



**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**  
**Σχολή επιστημών υγείας**  
**Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας &**  
**Τμήμα Ιατρικής, ΣΕΥ, ΠΘ**

## **Διπλωματική εργασία**

**Θέμα: Η In vitro ανοσοτροποποιητική δράση της  
κουρκουμίνης σε ασθενείς με ψωριασικές παθήσεις**

**Σκυβαλίδας Δημήτριος**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Μπόγδανος Δημήτριος Αναπληρωτής καθηγητής Παθολογίας και αυτοάνοσων νοσημάτων, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ, ΣΕΥ
- Μαμούρης Ζήσης Καθηγητής Γενετικής ζωικών πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, ΠΘ, ΣΕΥ
- Ζαφειρίου Ευτέρπη Επίκουρος καθηγήτρια Δερματολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ, ΣΕΥ,

**Λάρισα, Φεβρουάριος, 2019**



**University of Thessaly**

**School of Health Science**

**Faculty of Biochemistry and Biotechnology &**

**Faculty of Medicine, SHS, UTH**

**In vitro immunomodulatory effect of curcumin in  
patients with psoriatic diseases.**

**by**

Skyvalidas Dimitrios

Three-member committee:

- Bogdanos Dimitrios, Associate Professor of Pathology and Autoimmune Disease
- Mamuris Zhshs, Professor of Animal Population Genetics
- Zafiriou Eyterph, Assistant Professor of Dermatology

Larisa, February, 2019

## Περίληψη

Η ψωρίαση είναι μία χρόνια πάθηση του δέρματος που επηρεάζει το 2% του παγκόσμιου πληθυσμού. Η ασθένεια αυτή χαρακτηρίζεται ως αυτοάνοση λόγω της απορρύθμισης της λειτουργίας των δενδριτικών κυττάρων, των T κυττάρων καθώς και των NK κυττάρων. Σημαντικό της νόσου αυτής είναι η δημιουργία φλεγμονής που προκαλείται από την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως είναι οι IL-17, η IL-22, ο TNF-α και η IFN-γ. Έτσι, λοιπόν, στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση της κουρκουμίνης στην IFN-γ σε ασθενείς με ψωρίαση αλλά και με ψωριασική αρθρίτιδα ενώ συμπεριλήφθησαν και υγιείς μάρτυρες. Η κουρκουμίνη είναι ένα φλαβονοειδές που προέρχεται από το φυτό *Curcuma longa* και το οποίο όπως είναι γνωστό έχει ποικίλες δράσεις όπως αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις. Για τον σκοπό αυτό αρχικά βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για την δράση της ουσίας αυτής όσον αφορά την συγκέντρωση, τον χρόνο επώασης και την επιλογή του κατάλληλου διεγέρτη κυττάρων για παραγωγή IFN-γ. ΜΕ βάση τις συνθήκες αυτές πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε 35 ασθενείς, από τους οποίους οι 25 έπασχαν από ψωρίασης και οι υπόλοιποι 10 από ψωριασική αρθρίτιδα, καθώς και σε 13 υγιείς μάρτυρες. Τα αποτελέσματα από την μελέτη αυτή ήταν ενθαρρυντικά όσον αφορά την ουσία αυτήν καθώς βρέθηκε ότι η κουρκουμίνη και στις δύο νόσους προκαλεί πτώση των επιπέδων της IFN-γ σε όλους τους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς που μελετήθηκαν δηλαδή στα CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα καθώς και στα NK και NKT κύτταρα.

### Abstract

Psoriasis is a chronic skin disease that affects 2% of the world's population. This disease is characterized as autoimmune due to the deregulation of dendritic, T and NK cell function. Significant of this disease is inflammation induced by the secretion of inflammatory cytokines such as IL-17, IL-22 and IFN-γ. Thus, in this thesis, the effect of curcumin on IFN-γ was studied in patients with psoriasis and psoriatic arthritis, but also healthy controls were included. Curcumin is a flavonoid derived from *Curcuma longa*, a plant that has various effects such as antioxidant, anticancer, antimicrobial and anti-inflammatory. For this purpose, the optimal conditions for the action of this substance were initially found in terms of concentration, incubation time and selection of the appropriate cells stimulator for IFN-γ production. Based on these conditions, experiments were performed on 35 patients, of whom 25 had psoriasis and 10 had psoriatic arthritis, as well as on 13 healthy controls. The results from this study were encouraging for this substance as it was found that curcumin in both diseases causes a fall in IFN-γ levels in all lymphocyte populations studied, both in CD4 + and CD8 + T lymphocytes as well as in NK and NKT cells.

# Συντομογραφίες

Ps→Psoriasis

PsA→Psoriatic Arthritis

IFN-g→Interferon-γ

IL10/12/18→ Interleukin 10/12/18

PMA→ Phorbol 12-myristate 13-acetate

IONO→ Ionomycin

NK cells→ Natural Killers cells

NKT cells →Natural Killer T cells

Th cells→ T helper cells

DC→Dendritic cells

TNF→Tumor Necrosis Factor

TGF-β→ Transforming Growth Factor- β

STAT→ Signal Transducer Activator of Transcription

PAMPs→Pathogen Associated Molecular Pattern

EAE→Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

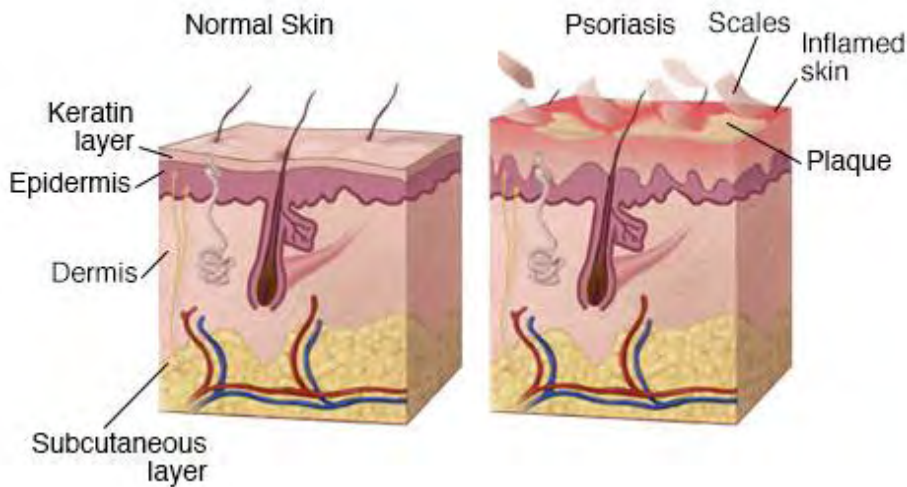
PBMCs→Peripheral Blood Mononuclear Cells

# Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	6
1.1 Γενικά στοιχεία ψωρίασης και ψωριασικής αρθρίτιδας .....	6
1.2 Επιδημιολογία .....	8
1.3 Αιτιοπαθογένεια.....	10
1.4 Κυτταρικοί πληθυσμοί .....	12
1.4.1 Th1.....	13
1.4.2 Th17.....	14
1.4.3 IFN-γ παραγωγά κύτταρα.....	15
1.4.4 IL-17 παραγωγά κύτταρα .....	15
1.4.5 NK και NKT κύτταρα .....	16
1.5 Γενετικοί παράγοντες.....	17
1.6 Άλλοι παράγοντες .....	18
1.7 Διάγνωση και Θεραπεία.....	19
1.8 Κουρκουμίνη .....	21
1.8.1 Μηχανισμοί δράσης.....	22
1.8.2 Ανοσορυθμιστική-Αντιφλεγμονώδης δράση .....	26
1.8.3 Ψωρίαση και ψωριασική αρθρίτιδα .....	28
2.Σκοπός .....	29
3.Υλικά και μέθοδοι .....	29
3.1 Απομόνωση και κρυσσαίνηση μονοπύρηνων λευκοκυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs) .....	29
3.2 Μέτρηση κυττάρων με χρώση Trypan Blue .....	31
3.3 Καλλιέργεια PBMCs.....	32
Κυτταρικά διεγερτικά.....	32
3.4 Επώαση κυττάρων με μονοκλωνικά αντισώματα και προετοιμασία κυτταρομετρίας ροής ..	33
3.5 Κυτταρομετρία ροής.....	35
3.6 Στατιστική ανάλυση.....	37
4.Αποτελέσματα.....	38
5.Συζήτηση .....	50
6.Βιβλιογραφία .....	52

# Εισαγωγή

## 1.1 Γενικά στοιχεία ψωρίασης και ψωριασικής αρθρίτιδας

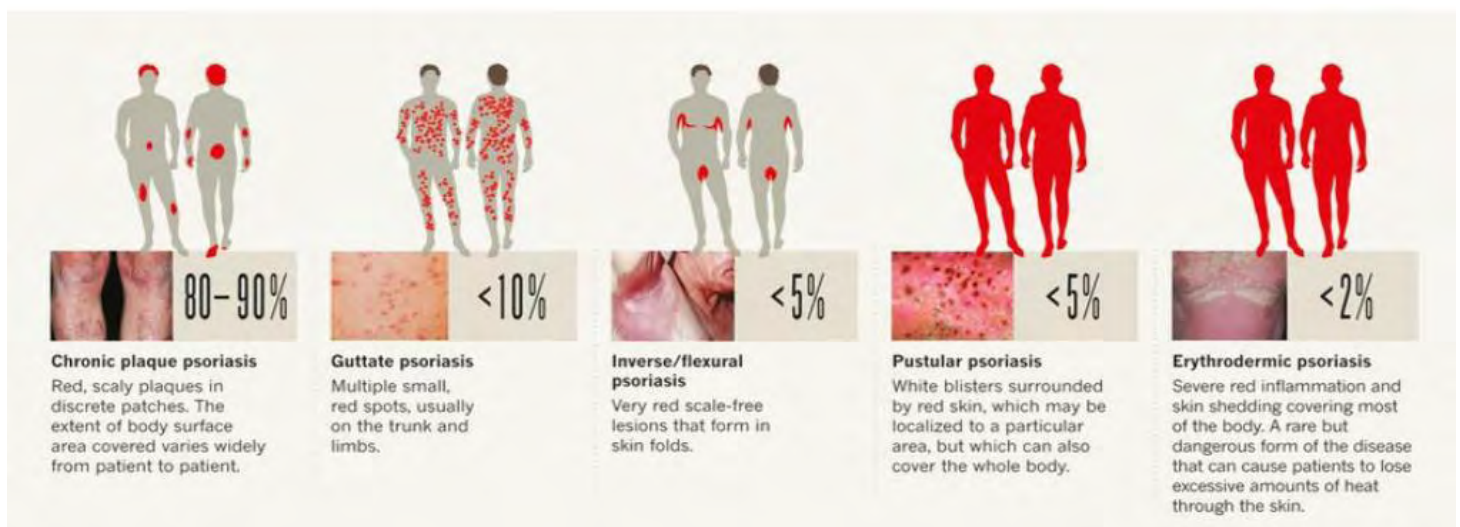


Εικόνα 1. Διαφορά των στρωμάτων του δέρματος σε κανονικό ιστό και σε ιστό που πάσχει από ψωρίαση. Πηγή: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/psoriasis/symptoms-causes/syc-20355840>

Η ψωρίαση (Ps) είναι μια κοινή χρόνια πάθηση του δέρματος που προκαλεί επιτάχυνση του κύκλου ζωής των κυττάρων του δέρματος και επηρεάζει μέχρι και το 2% του πληθυσμού.[1] Κύριο χαρακτηριστικό της νόσου είναι η μειωμένη διάρκεια ζωής των κυττάρων και η ανώμαλη ωρίμανση τους που έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός στρώματος κυττάρων στην επιφάνεια του δέρματος μεγαλύτερου του φυσιολογικού. Ως αποτέλεσμα, η επιδερμίδα γίνεται πιο πυκνή (ακάνθωση) και παρατηρείται εκδήλωση φλεγμονής και συνήθως πλάκες οι οποίες μπορεί να ποικίλουν από λεπτές μέχρι πιο εκτεταμένες.[2] Η ψωρίαση μπορεί να αναπτυχθεί καθόλη την διάρκεια της ζωής του ατόμου και η ηλικία έναρξης της ποικίλει ανάμεσα στους ασθενείς. Παρόλα αυτά, η ηλικία με την υψηλότερη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου χωρίζεται σε δύο φάσεις, έναν τύπο που εμφανίζεται πριν την ηλικία των 40 ετών και έναν άλλο τύπο μετά τα 40 έτη [3-5] Υπάρχουν διάφορες μορφές ψωρίασης με τις κυριότερες να φαίνονται στην Εικόνα 2. Αναλυτικότερα:

- Ψωρίαση κατά πλάκας ή Ψωρίαση Vulgaris: Αποτελεί την πιο συνήθη μορφή ψωρίασης πλήττοντας το 80%-90% των ασθενών που πάσχουν από ψωρίαση. Η μορφή αυτή χαρακτηρίζεται από την παρουσία ερυθρών, φολιδωτών πλακών. Ο αριθμός των πλακών, καθώς και η περιοχή εμφάνισης και η έκταση τους ποικίλλει ευρέως από ασθενή σε ασθενή.
- Σταγονοειδής ψωρίαση: Αυτός ο τύπος επηρεάζει κυρίως παιδιά και νεαρούς ενήλικες κάτω των 30 ετών και αφορά λιγότερο από το 10% των περιπτώσεων ψωρίασης. Χαρακτηρίζεται από μικρές, φολιδωτές βλάβες σαν σταγόνες που καλύπτουν κυρίως τον κορμό, τα χέρια, τα πόδια και το τριχωτό της κεφαλής. Οι βλάβες αυτές ωστόσο δεν είναι τόσο εκτεταμένες όσο στην ψωρίαση κατά πλάκας. Κύριο αίτιο αυτής της μορφής είναι η βακτηριακή μόλυνση με ένα παράδειγμα να αποτελεί η μόλυνση από στρεπτόκοκκο.

- Φλυκταινώδης ψωρίαση: Πρόκειται για σπανιότερη μορφή ψωρίασης που πλήττει λιγότερο από το 5% των ασθενών. Χαρακτηρίζεται από φουσκάλες ή λευκές φλύκταινες οι οποίες περιέχουν πύον και περιβάλλονται από ερεθυσμένο δέρμα. Οι φουσκάλες αυτές μπορούν να εξαφανίζονται και να επανέρχονται γρήγορα εντοπιζόμενες σε μία συγκεκριμένη περιοχή ή σε ολόκληρο το σώμα.
- Ανάστροφη ψωρίαση: Αποτελεί, όπως και η φλυκταινώδης ψωρίαση, που πλήττει λιγότερο του 5% των ασθενών. Χαρακτηρίζεται από βλάβες οι οποίες όμως δεν φέρουν φολίδες και καλύπτουν πτυχές του δέρματος όπως οι μασχάλες, οι βουβώνες, κάτω από τα στήθη. Οι βλάβες αυτές αποτελούνται από από ερυθρό, ερεθισμένο δέρμα το οποίο χειροτερεύει από τον ιδρώτα και την τριβή. Συνήθως η μορφή αυτή οφείλεται σε μυκητιακές μολύνσεις.
- Ερυθροδερμική ψωρίαση: Σπάνιο είδος ψωρίασης το οποίο εμφανίζεται σε λιγότερο από το 2% των ασθενών. Είναι ιδιαίτερα επικίνδυνο η μορφή της νόσου καθώς χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός ερυθρού, ερεθυσμένου εξανθήματος που μπορεί να καλύπτει και ολόκληρο το σώμα από το οποίο μπορεί να υπάρξει μεγάλη απώλεια θερμότητας. [6, 7]



Εικόνα 2. Οι διαφορετικές μορφές ψωρίασης και η πιθανότητα εμφάνισής τους. Πηγή: Psoriasis uncovered, J. Crow, Nature volume492, pagesS50–S51

Η ψωριασική αρθρίτιδα (PsA) είναι μία φλεγμονώδης νόσος που πλήττει τις αρθρώσεις και σχετίζεται με την ψωρίαση. Οι αρθρώσεις που συνήθως επηρεάζονται είναι οι περιφερικές αρθρώσεις, καθώς και οι ενθέσεις και οι αρθρώσεις της σπονδυλικής στήλης. Παρατηρούνται, επίσης, και εξωαρθρικές εκδηλώσεις της νόσου, με σημαντικότερη την προσβολή των οφθαλμών. Παρά τα κοινά τους στοιχεία, παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστο αν η ψωρίαση και η ψωριασική αρθρίτιδα αποτελούν ενιαία ανοσολογική οντότητα. Ωστόσο, υπάρχουν στοιχεία που καθιστούν πιθανή την άποψη ότι η ψωρίαση συνεισφέρει μερικώς ή και αποκλειστικώς στην παθογένεση της ψωριασικής αρθρίτιδας, με σημαντικότερο το γεγονός πως η ασθένεια αυτή

εμφανίζεται συχνότερα σε ασθενείς που ήδη έχουν ή αναπτύσσουν Ps, με το ποσοστό των ατόμων με ψωρίαση που αναπτύσσουν ψωριασική αρθρίτιδα να φτάνει το 70%.

Η ηλικία με την μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης της ψωριασικής αρθρίτιδας είναι μεταξύ των 30-55 παρατηρούνται ωστόσο και αρκετές περιπτώσεις εμφάνισης της σε μεγαλύτερες ηλικίες. Όσον αφορά τον επιπολασμό της νόσου στα δύο φύλα, πλήττονται και τα δύο εξίσου.

Ενώ, η ψωριασική αρθρίτιδα συνήθως αναπτύσσεται εντός 7 χρόνων από την εμφάνιση της ψωρίαση χωρίς όμως να είναι σπάνιο να εμφανιστεί και πριν αυτής, καθώς υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν ότι 15-20% των ατόμων με ψωριασική αρθρίτιδα θα εμφανίσουν αυτήν προτού της ψωρίασης. [8, 9]

## 1.2 Επιδημιολογία

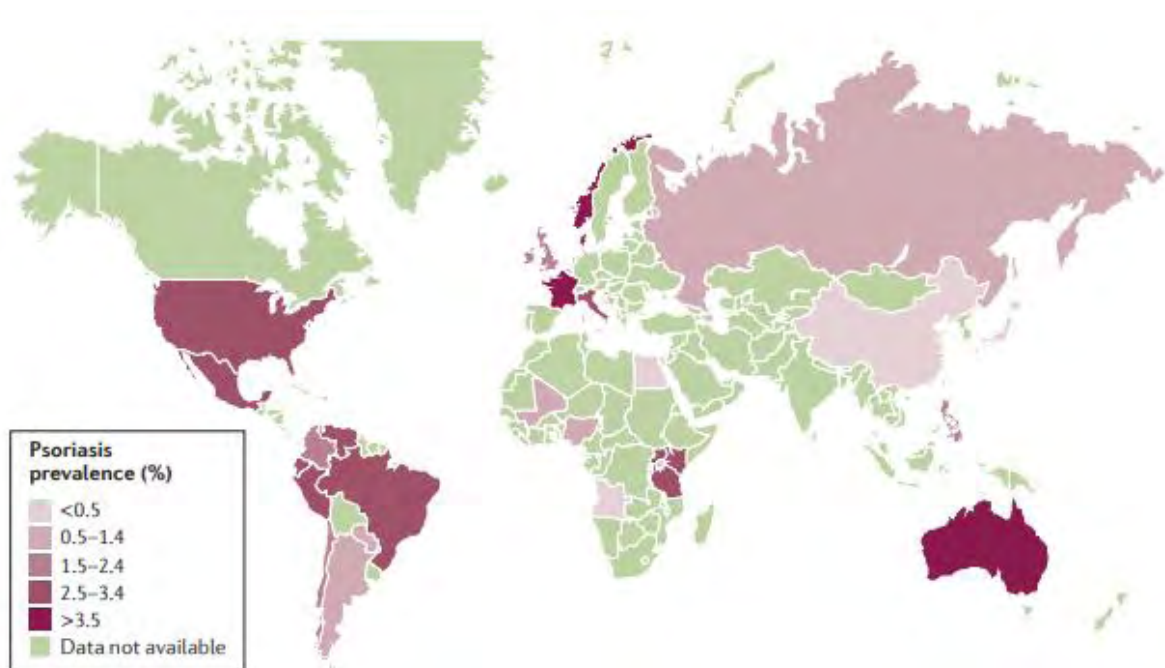
Η ψωρίαση είναι μια ασθένεια με παγκόσμιο επιπολασμό, επηρεάζοντας το 2-3% του πληθυσμού.[10, 11] Τόσο οι άντρες όσο και οι γυναίκες επηρεάζονται εξίσου από αυτήν. Ειδικότερα, στην ψωρίαση κατά πλάκας, μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου αφορά κυρίως δύο ηλικιακές ομάδες. Συμφωνα με μελέτες των Henseler et al και Yadan et al προέκυψε ότι ο πρώτος τύπος σχετίζεται με το οικογενειακό ιστορικό ή μόλυνση από στρεπτόκοκκο και εμφανίζεται περίπου στα 17-35 έτη, ενώ ο δεύτερος τύπος εμφανίζεται μετά τα 40, περίπου στα 55-60 έτη, χωρίς να υπάρχει κάποιο οικογενειακό ιστορικό.[12] Η μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης κάθε χρόνο όπως προκύπτει από μια παγκόσμια μελέτη είναι στην Ιταλία με ποσοστό εμφάνισης 2.90% και ακολουθούν η Δανία με 2.84%, η Σουηδία με 2.00% και η Γερμανία με 2.00%.[7] Στην παραπάνω μελέτη δεν συμπεριλαμβάνονται όμως χώρες όπως η Ινδία που βρίσκονται στην Ασία. Από στοιχεία του δερματολογικού κέντρου PGIMER στο Chandigarh, India φαίνεται ότι στην Ινδία το 2.3 % των ασθενών που εξετάζονται για δερματολογικά προβλήματα αναπτύσσουν ψωρίαση. Το ποσοστό αυτό δεν είναι σταθερό και φαίνεται ότι τόσο η επίπτωση όσο και ο επιπολασμός της νόσου διαρκώς αυξάνονται. Επίσης, από την ίδια μελέτη φαίνεται ότι το 93% των διαγνωσμένων με ψωρίαση ατόμων αναπτύσσουν τον κατά πλάκας τύπο της ψωρίασης. ("Prevalence, morbidity of psoriasis increasing in India: PGI doc," 2012) Ωστόσο, και στο παγκόσμιο πληθυσμό η επίπτωση και ο επιπολασμός συνεχώς αυξάνονται. Αυτό φαίνεται και σε μία άλλη μελέτη που έγινε στην Αγγλία. Σε αυτήν ο επιπολασμός της στον πληθυσμό από 2.1% το 1999 αυξήθηκε στο 2.8% το 2013, ενώ η επίπτωση το 1999 ήταν 159 στα 100.000 άτομα και μέχρι το 2010 υπήρξε μια αύξηση και έπειτα από το σημείο εκείνο μια πτώση ώστε το 2013 να είναι 129 στα 100.000 άτομα που αναπτύσσουν ψωρίαση κάθε χρόνο.[13] Παρακάτω φαίνεται μία εικόνα από μια πρόσφατη μελέτη με τον επιπολασμό της νόσου στον γενικό πληθυσμό, στην οποία διακρίνεται ότι το ποσοστό αυτό κυμαίνεται σε ένα μεγάλο σχετικά εύρος από 2.7% στις ΗΠΑ έως και 8.5% στην Νορβηγία, με τα πιο χαμηλά ποσοστά να παρατηρούνται στην Ινδία, στην Αφρική και



στην Ασία, ενώ τα πιο υψηλά να αφορούν την Ευρώπη. [14]

Αντίστοιχα και στην PsA υπάρχουν ορισμένες αναφορές που σχετίζονται τόσο με τον επιπολασμό όσο και με την επίπτωση της. Από μελέτες έχει δειχθεί ότι η συχνότητα στον πληθυσμό ποικίλλει από 0.06-0.25% στην Αμερική, 0.05-0.21% στις διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες, ενώ για την Ασία, την Αφρική και την νότια Αμερική υπάρχουν ελάχιστες αναφορές που υποδεικνύουν ότι οι συχνότητα σε αυτές είναι μικρότερη από ότι στις παραπάνω. Επίσης, λιγοστές είναι οι μελέτες που σχετίζονται το ποσοστό των ατόμων που αναπτύσσουν PsA κάθε χρόνο. Ωστόσο, από ορισμένες εξ' αυτών που δημοσιεύτηκαν μεταξύ του 2009-2011 προκύπτει ότι κάθε χρόνο 3.6-7.2 στα 100.000 άτομα αναπτύσσουν την νόσο χωρίς όμως αυτό να είναι απολύτως βέβαιο καθώς ανάλογες μελέτες μεταξύ του 2001-2003 ανέφεραν έναν πολύ μεγαλύτερο εύρος μεταξύ του 0.1-23.1%. [15, 16]

Επομένως, καταδεικνύεται ότι η μελέτη της Ps και της PsA πρέπει να βελτιστοποιηθεί. Οι μελέτες που υπάρχουν πάνω σε αυτές είναι λίγες και συχνά περιορίζονται σε γεωγραφικά κριτήρια χωρίς να είναι σωστά ενημερωμένες. Για τον λόγο αυτό θα πρέπει να υπάρξουν περισσότερες έρευνες ευρείας κλίμακας που θα αναφέρουν το ποσοστό ατόμων που αναπτύσσουν Ps και PsA κάθε χρόνο, καθώς και την συχνότητα εμφάνισης τους στον γενικό πληθυσμό.

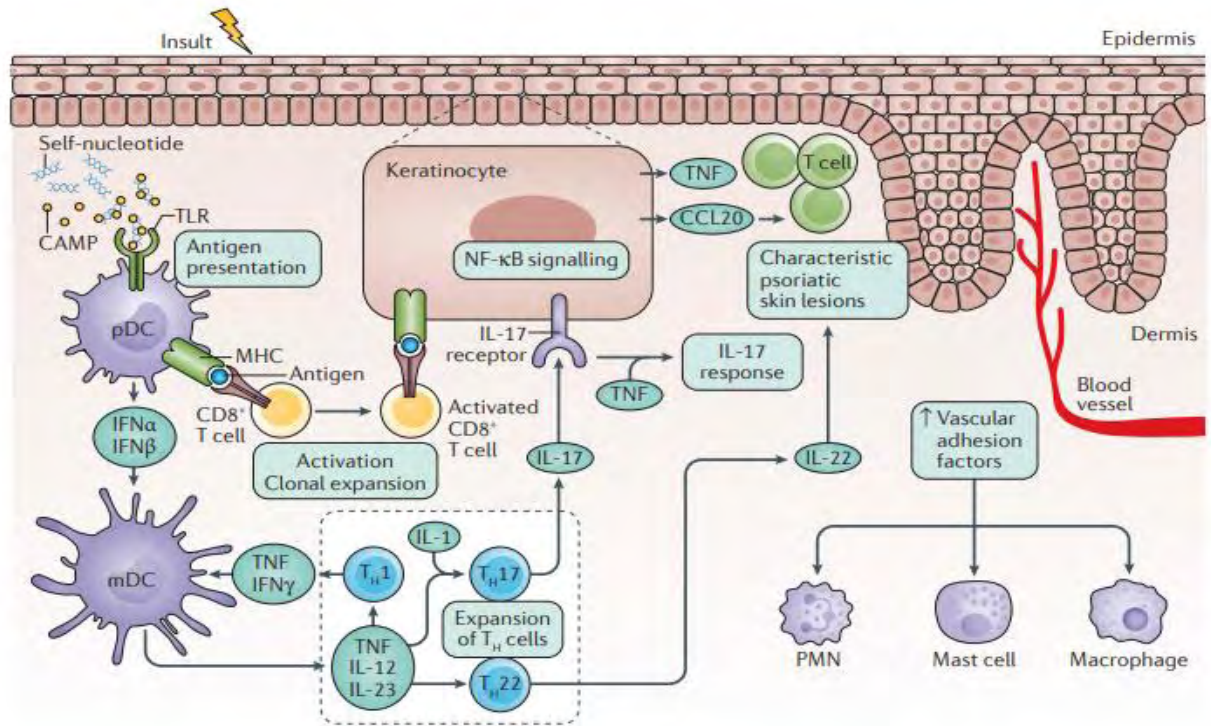


Εικόνα 3. Το ποσοστό εμφάνισης της ψωρίασης στον γενικό πληθυσμό. Πηγή: Psoriasis, Gottlieb et al, NATURE REVIEWS, VOLUME 2 | 2016

## 1.3 Αιτιοπαθογένεια

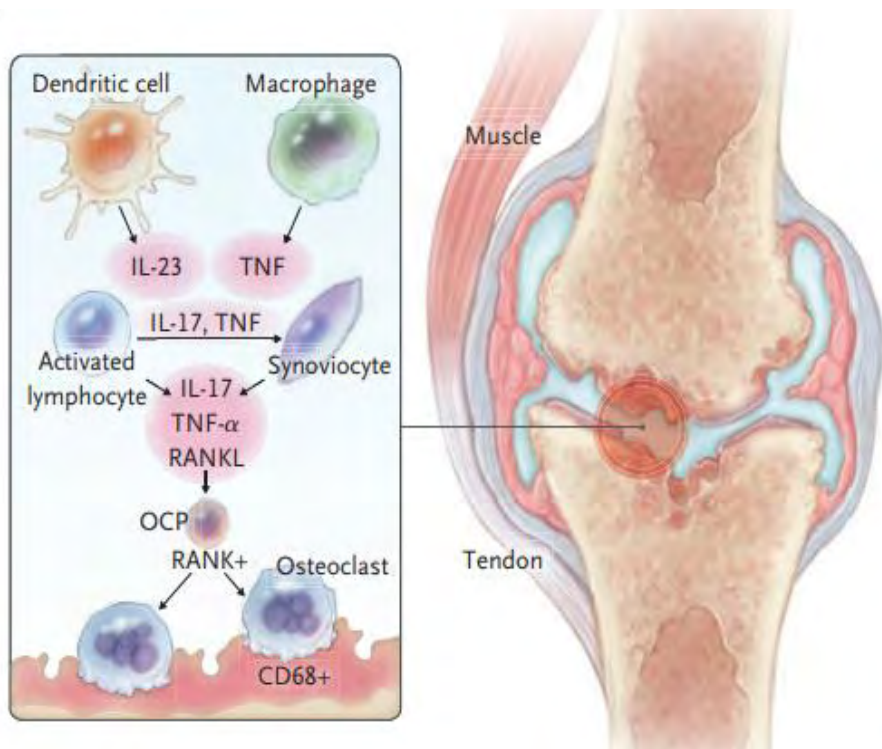
Η ψωρίαση νόσος είναι μια ασθένεια στην οποία κεντρικό ρόλο διαδραματίζουν τα κερατινοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα καθώς και τα Τ λευκοκύτταρα. Πολλές ανωμαλίες παρατηρούνται στην αντιγονοπαρουσίαση, στην ενεργοποίηση του μονοπατιού του NF-κΒ γεγονός που οδηγούν στην απορρύθμιση των Th17 κυττάρων με αποτέλεσμα την ενίσχυση της δράσης τους, η οποία με την σειρά της οδηγεί σε ανάπτυξη ανοσολογικής απόκρισης και αυξημένη διείσδυση λευκοκυττάρων. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 4, ο μηχανισμός της ψωρίασης περιλαμβάνει την έκθεση σε κάποιο εξωτερικό ερέθισμα (όπως τραύμα, φαρμακευτική αγωγή ή κάτι άλλο), το οποίο προκαλεί την απελευθέρωση νουκλεϊκών οξέων που λειτουργούν ως αντιγόνα ειδικά όταν τα άτομα υπόκεινται σε γενετική προδιάθεση υπέρ της νόσου. Τα νουκλεϊκά οξέα αυτά μπορούν να σχηματίσουν συμπλέγματα με τα αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMP) που απελευθερώνονται από κερατινοκύτταρα όπως για παράδειγμα τα CAMPs (Cathelicidin antimicrobial peptides) τα οποία προσδένονται στους υποδοχείς αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων TLR7 και TLR9 οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια πλασμοκυτταρικών δενδριτικών κυττάρων (pDCs). Η σύνδεση αυτή θα οδηγήσει την παρουσίαση του αντιγόνου που θα οδηγήσει εν τέλει στην ενεργοποίηση των CD8+ Τ κυττάρων. Στην συνέχεια, τα ενεργοποιημένα κύτταρα αυτά μεταναστεύουν στην επιδερμίδα όπου έρχονται σε επαφή με MHC (Major histocompatibility Complex) τύπου I υποδοχέα των κερατινοκυττάρων με αποτέλεσμα την διέγερση της απελευθέρωσης διαλυτών παραγόντων όπως κυτταροκινών, χημειοκίνες και μεσολαβητών της έμφυτης ανοσίας οι οποίοι θα οδηγήσουν εν τέλει σε φλεγμονή και θα διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων. Επίσης, τα pDCs παράγουν IFN  $\alpha$  και  $\beta$  που διεγείρει τα mDCs (myeloid DCs) να παράγουν άλλες φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως IL-12, IL-23 και TNF οι οποίες θα οδηγήσουν στην ενεργοποίηση διάφορων Τ κυτταρικών πληθυσμών όπως Th1, Th17 και Th22 για την περαιτέρω παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών. Η ενεργοποίηση της απόκρισης των Th17 κυττάρων από την IL-23 ενισχύεται και από την IL-1. Η IL-17 δρα απευθείας στα κερατινοκύτταρα διεγείρωντας την έκκριση TNF και μια χημειοτακτικής ουσίας της CCL20 που προσελκύει DC και Τ κύτταρα. Επιπλέον, η IL-17 δρα σε συνδυασμό με άλλες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και με τον TNF για την παραγωγή χημειοκινών και defensins που θα ενισχύσουν την άμυνα του ατόμου και θα επάγουν την στρατολόγηση και άλλων φλεγμονωσών κυττάρων στις ψωριασικές βλάβες. Η IL-22 είναι μία κυτταροκίνη που συνεισφέρει σημαντικά στον χαρακτηριστικό φαινότυπο της νόσου προκαλώντας ανάπτυξη επιδερμικής υπερπλασίας, ακάνθωσης και παρακένωσης.

Τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην παθογένεια της ψωριασικής νόσου είναι το cAMP, οι JAK-STAT κινάσες καθώς και ο NF-κΒ, με την ενεργοποίησή τους να οδηγεί σε παραγωγή TNF και IL-17. Τέλος, η έκφραση του υποδοχέα του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα προκαλεί τον πολλαπλασιασμό του ενδοθηλίου και έκφραση προσκολλητικών μορίων που θα οδηγήσουν περαιτέρω στρατολόγηση φλεγμονωδών κυτταρικών πληθυσμών. Έτσι, όλα αυτά θα οδηγήσουν σε μια συμπτωματική χρόνια φάση της ψωριασικής νόσου η οποία θα συνεχίσει μέχρι την χορήγηση κάποιας θεραπείας που θα σπάσει τον κύκλο αυτό. [14]



Εικόνα 4. Μηχανισμός της Ψωρίασης. Πηγή: Psoriasis, Gottlieb et al, NATURE REVIEWS, VOLUME 2 | 2016

Τα ίδια ισχύουν και στην ψωριασική αρθρίτιδα συμπεριλαμβανομένου και κάποιες πρόσθετα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα για την προσβολή των αρθρώσεων. Πιο συγκεκριμένα, τα ενεργοποιημένα κερατινοκύτταρα που υπόκεινται σε στρες απελευθερώνουν DNA το οποίο συνδέεται με το αντιμικροβιακό πεπτίδιο LL-37 επάγωντας την παραγωγή IFN-α από τα pDCs. Αυτήν θα ενεργοποιήσει τα mDCs να μεταναστεύσουν στους λεμφαδένες όπου θα επάγουν την διαφοροποίηση των Th1 και Th17 κυττάρων τα οποία εν τέλει θα απελευθερώσουν IL-12, IL-17, IL-22, TNF-α καθώς και άλλες κυτταροκίνες και χημειοκίνες. Στην δερμίδα τα κύτταρα που εκκρίνουν IFN-γ είναι τα CD8+ T κύτταρα και τα έμφυτα λεμφικά κύτταρα. Οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται στην δερμίδα είναι αυτές που ενεργοποιούν τα κερατινοκύτταρα ώστε να παράξουν με την σειρά τους άλλες κυτταροκίνες που θα δράσουν παρακρινώς σε άλλα γειτονικά κύτταρα. Η διαφοροποίηση των Th1 και Th17 ταυτόχρονα με άλλους τύπους κυττάρων που παράγουν IL-17 και με τα OCPs (Osteoclast precursors) θα γίνει στον μυελό των οστών. Τα τύπου Th17 κύτταρα, οι OCPs και τα δενδριτικά κύτταρα φθάνουν στην άρθρωση είτε μέσω κάποιας γειτονικής ένθεσης ή μέσω της ροής του αίματος. Η αυξημένη έκφραση του ενεργοποιητή-προσδέματος (RANKL) του υποδοχέα του NF-κΒ (RANK) από αρθρικά κύτταρα σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα TNF και IL-17 οδηγεί στην διαφοροποίηση των OCPs σε οστεοκλάστες με αποτέλεσμα την διάβρωση του οστού και την δημιουργία παθολογικού φαινοτύπου. [17]

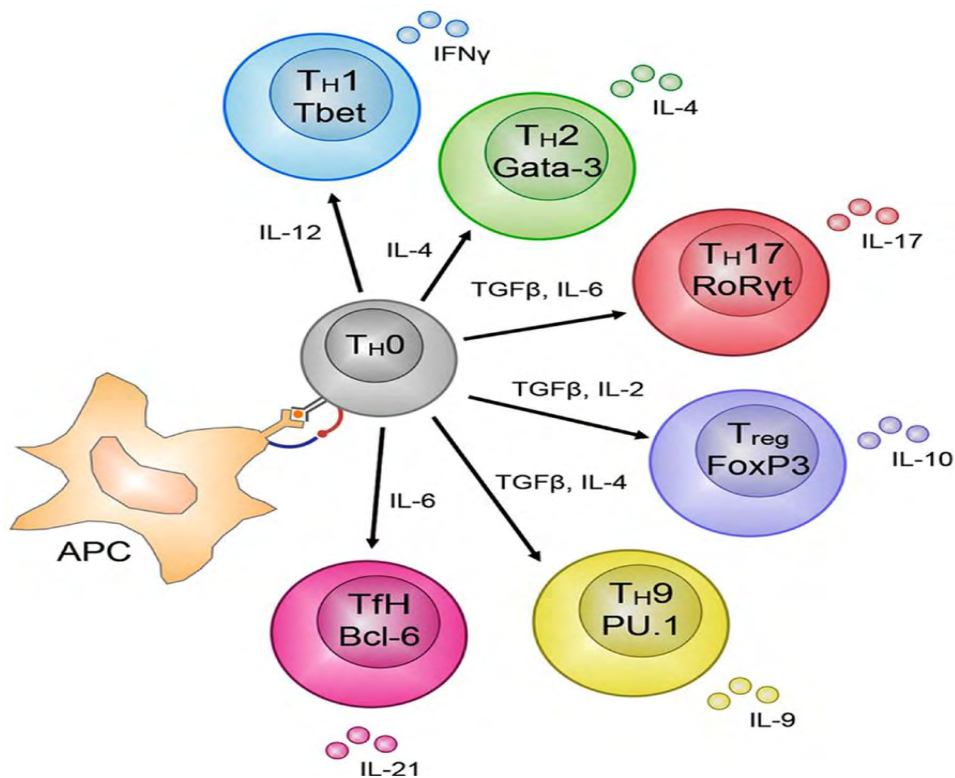


Εικόνα 5. Ο μηχανισμός της ψωριασικής αρθρίτιδας. Πηγή: Psoriatic arthritis, Gladman et al, N Engl J Med 2017;376:957-70

## 1.4 Κυτταρικοί πληθυσμοί

Κατα τη διάρκεια μιας τυπικής ανοσολογικής απόκρισης εναντίον ενός ισχυρού παθογόνου, αντιγόνο-ειδικά κύτταρα ενεργοποιούνται, πολλαπλασιάζονται, και εξαπλώνονται σε μεγάλο βαθμό. Αυτή η φάση εξάπλωσης έχει ως αποτέλεσμα ένα μεγάλο πληθυσμό ανοσοδραστικών Τ-κυττάρων πράγμα, φαινόμενο το οποίο συναντάται και στην ψωριασική νόσο. Για πολλά χρόνια μέχρι την δεκαετία του 1970 η ψωριασική νόσος θεωρούνταν μίας ασθένεια που οφείλεται κυρίως στα ελαττωματικά επιδερμικά κερατινοκύτταρα. Ωστόσο, διάφορα ερευνητικά ευρήματα μετατόπισαν το ενδιαφέρον προς την επίκτητη και έμφυτη ανοσία και ειδικά στην ενεργοποίηση των Τ κυττάρων τα οποία όπως πλέον είναι γνωστό παίζουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της ψωριασικής νόσου. Αυτό έχει γίνει αποδεκτό ήδη από τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα καθώς όπως έχει αναφερθεί ήδη από τότε τα ενεργοποιημένα CD4<sup>+</sup> Τ κύτταρα είναι αυτά που μέσω της έκκρισης IFN- $\gamma$  μπορούν να ενισχύσουν τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων στις ψωριασικές βλάβες. Αν και για πολλά χρόνια το ενδιαφέρον είχε εστιαστεί στα Th1 που αποτελούν τους κύριους μεσολαβητές των ανοσολογικών αποκρίσεων στις ψωριασικές βλάβες, τα τελευταία χρόνια αρκετές έρευνες μετατόπισαν το ενδιαφέρον προς τον ρόλο των Th17 κυττάρων. Στην συνέχεια, θα αναλυθούν ορισμένοι φλεγμονώδεις κυτταρικοί πληθυσμοί καθώς και οι μηχανισμοί δράσεις τους για την καλύτερη κατανόηση της μελέτης αυτών στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

## 1.4.1 Th1



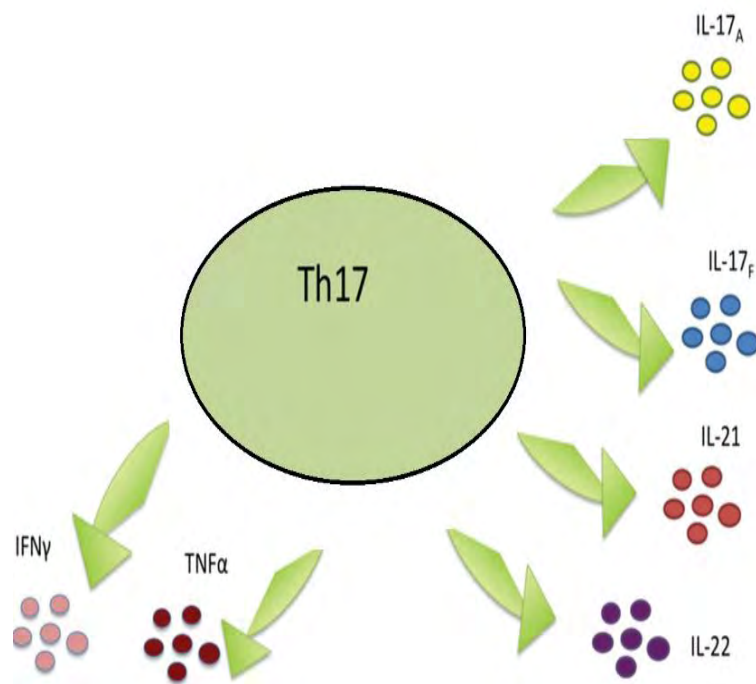
Εικόνα 6. Διαφοροποίηση των T κυττάρων σε υποπληθυσμούς με τους μεταγραφικούς παράγοντες και τα εκκρινόμενα μόρια τους. Πηγή: T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation, Turner et al, Front. Genet., 12 November 2013

Τα T λεμφοκύτταρα αφότου ενεργοποιηθούν από κάποιο αντιγόνο και άλλα σήματα του περιβάλλοντος διαφοροποιούνται σε υποπληθυσμούς με διαφορετικό προφίλ κυτταροκινών και λειτουργικές δραστηριότητες. Τα CD4<sup>+</sup> MHC τάξης II Τα κύτταρα είναι αυτά που συνήθως αποκτούν την λειτουργία βοηθητικών T κυττάρων (Th cells). Υπάρχουν διάφοροι υποπληθυσμοί Th κυττάρων ανάλογα τους δείκτες επιφανείας, τους μεταγραφικούς παράγοντες, την λειτουργία που επιτελούν καθώς και τις κυτταροκίνες που εκκρίνουν. Οι πιο κύριες εξ' αυτών είναι οι Th1, Th2, Th17, Th9 και Tfh. Τα T κύτταρα μπορούν επίσης να διαφοποιηθούν και σε κυτταροτοξικά CD8<sup>+</sup> MHC τάξης I T κύτταρα τα οποία διαχωρίζονται και αυτά σε υποπληθυσμούς όπως Tc1 και Tc2.

Χαρακτηριστικό της Th1 είναι η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Tbet, STAT1, STAT4 καθώς και η παραγωγή IFN-γ η οποία προωθεί την ανοσία έναντι ενδοκυτταρικών παθογόνων. [18, 19] Στην ψωρίαση φαίνεται να συμμετέχουν κυρίως Th1 και Tc1 υποπληθυσμοί. Τόσο σε ψωριασικές πλάκες όσο και στο αίμα των ασθενών με ψωριασική νόσο έχουν βρεθεί αυξημένοι αριθμοί CD4<sup>+</sup> Th1 και CD8<sup>+</sup> Tc1 όπως επίσης και αυξημένα επίπεδα της IFN-γ, του TNF-α και της IL-12. [20] Επίσης, από διάφορες μελέτες προέκυψε ότι στην δερμίδα υπάρχει αυξημένος αριθμός CD4<sup>+</sup> T

κυττάρων, ενώ στην επιδερμίδα υπερέχουν τα CD8+ T κύτταρα. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην ψωριασική αρθρίτιδα όπου μία σχετικά πρόσφατη μελέτη αναφέρει μία αύξηση του αριθμού των CD8+ T κυττάρων στο αρθρικό υγρό των ασθενών, χωρίς όμως να καταφέρει η μελέτη αυτή να συσχετίσει τα επίπεδα αυτά των CD8+ T κυττάρων με την σοβαρότητα της νόσου. Ωστόσο, είναι γνωστό όσον αφορά την ψωριασική αρθρίτιδα ότι υπάρχει αφθονία CD4+ T κυττάρων αρθρικό ιστό, ενώ στο αρθρικό υγρό όπως αναφέρθηκε υπάρχει πλεόνασμα CD8+ T κυττάρων. [21]

## 1.4.2 Th17



Εικόνα 7. Κυτταροκίνες που παράγονται από Th17 κύτταρα.  
Πηγή:

Τα κύτταρα Th17 ανακαλύφθηκαν αρκετά πρόσφατα μόλις το 2005 με τον ρόλο του να έχει διερευνηθεί αρκετά από τότε. Οι κυτταροκίνες που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των Th17 κυττάρων είναι οι IL-6, IL-21, IL-23, IL-1β καθώς και ο TGF-β πιθανώς λόγω της ικανότητας του να καταστέλλει την ανάπτυξη Th1 κυτταρικών πληθυσμών. Αν και στην κατηγορία των Th17 εκκρινόμενων κυτταροκινών ανήκουν 6 μέλη οι πιο σημαντικές εξ' αυτών είναι κυρίως δύο η IL-17A και η IL-17F. [22]

Υπάρχουν ολοένα και περισσότερα στοιχεία που υποδεικνύουν ότι τα Th17 κύτταρα καθώς και οι κυτταροκίνες που σχετίζονται με αυτά όπως η IL-17A, η IL-17F, η IL-21, η IL-22, η IL-23 και η IL-26 παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στις χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και η ψωρίαση και η ψωριασική αρθρίτιδα. Τόσο τα Th17 όσο και οι εκκρινόμενες κυτταροκίνες τους που μόλις αναφέρθηκαν φαίνεται να βρίσκονται αυξημένες στο ψωριασικό δέρμα και στην κυκλοφορία. [23] Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η ενδομυϊκή ένεση IL-21 ή IL-23 σε ποντίκια μπορεί να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό κερατινοκυττάρων και να προκαλέσει υπερδερμική υπερπλασία. [24] Άλλες μελέτες δείχνουν ότι η IL-22 όπως και η IL-17 η οποία θα αναλυθεί παρακάτω είναι απαραίτητες για την δημιουργία ενός φλεγμονώδους μοντέλου, όπως στην ψωρίαση. [25] Μελέτες τόσο σε PBMCs όσο και στο ψωριασικό δέρμα έδειξαν μια αυξημένη συχνότητα κυττάρων που παράγουν IL-17 και IL-22 σε άτομα που πάσχουν από ψωρίαση καθώς και σε άτομα που πάσχουν από ψωριασική αρθρίτιδα. [26] Υποδεικνύεται έτσι ότι η ψωριασική νόσος δεν είναι μία ασθένεια που εξαρτάται μόνο από την Th1 αλλά και από την Th17 απόκριση με την IFN-γ και IL-17 να είναι δύο από τις σημαντικότερες κυτταροκίνες που για τον λόγο αυτό αποτελούν τους πιο συχνούς στόχους θεραπείας.

### 1.4.3 IFN-γ παραγωγά κύτταρα

Η κυτταροκίνη IFN-γ ανήκει στην οικογένεια των ιντερφερονών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την προστασία των κυττάρων από ιικές λοιμώξεις. Η οικογένεια των ιντερφερονών διακρίνεται σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη περιλαμβάνονται τα μόρια IFN-α και IFN-β που εκκρίνονται σε περιπτώσεις ιικής λοίμωξης ενώ η IFN-γ ανήκει στην δεύτερη κατηγορία ιντερφερονών που διαφέρουν σημαντικά από τις ιντερφερόνες τύπου I. Η IFN-γ εκκρίνεται κυρίως από τα T κύτταρα και φυσικά (NK) κύτταρα, αλλά και επίσης από τα B-κύτταρα, APCs και κύτταρα T (NKT) φυσικοί φονείς. Τα κύτταρα Th1 εκκρίνουν ισχυρά IFN-γ και TNF-α. Η κύρια δράση της IFN-γ είναι η προαγωγή της διαφοροποίησης των Th κυττάρων προς Th1 και η αναχαίτηση της επέκτασης του Th2 πληθυσμού, με την δράση αυτή να διεκπαιρώνεται μέσω αύξησης παραγωγής IL-12 από μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα που θα οδηγήσει σε ενεργοποίηση του υποδοχέα των T κυττάρων. [27] Μελέτες τόσο στον ορό όσο και σε PBMCs ασθενών με ψωρίαση έδειξαν ότι το ποσοστό της IFN-γ και στα δύο αυτά είναι σημαντικά αυξημένο από ότι στους υγιείς με το ποσοστό να αυξάνεται μέχρι και 2.5 φορές περισσότερο στους ασθενείς. [28] Επίσης, χορήγηση ενός anti-IFN-γ φαρμάκου σε ασθενείς με ψωριασική νόσο φάνηκε να βοηθάει στην βελτίωση της ασθένειας σε ορισμένες περιπτώσεις προκαλώντας πτώση του PASI καθώς και μείωση της έκφρασης γονδίων που σχετίζονται με φλεγμονή όπως το CXCL9. [29]

### 1.4.4 IL-17 παραγωγά κύτταρα

Η IL-17 είναι υπεύθυνη κυρίως για την άμυνα έναντι εξωκυττάρων βακτηρίων και μυκητών. Αν και η κυτταρική απάντηση διαφέρει ανάλογα με τον στόχο της, η IL-17 δρα συνεργατικά με άλλες κυτταροκίνες αυξάνοντας την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-6, TNF-α), χημειοκινών (CXCL2, CXCL8) και πρωτεϊνών τελεστών (συμπλήρωμα). Από διάφορες μελέτες έχει δειχθεί ότι η IL-17 είναι σημαντικά αυξημένη στον ορό σε ασθενείς με ψωρίαση. [30] Επίσης, και *in vitro* έρευνες σε PBMCs από ψωριασικούς ασθενείς έδειξαν έναν αυξημένο αριθμό CD4+ T κυττάρων τα οποία παράγουν IL-17 καθώς και IL-22 μία άλλα κυτταροκίνη των Th17 κυττάρων. [31] Αυτές οι κυτταροκίνες που παράγονται από Th17 κύτταρα αναφέρεται ότι μπορούν να δράσουν στα κερατινοκύτταρα καθώς και άλλα φλεγμονώδη κύτταρα του δέρματος ενισχύοντας έτσι την τοπική φλεγμονή και προκαλώντας εν τέλει υπερπλασία των κερατινοκυττάρων βασικό χαρακτηριστικό της ψωριασικής νόσου. [23] Για τον λόγο αυτό η IL-17 είναι ένας στόχος πολλών φαρμάκων. Από κλινικές δοκιμές με αναστολείς της IL-17 σε ασθενείς που έπασχαν από ψωριασική αρθρίτιδα επιβεβαιώθηκε η σημαντικότητα της κυτταροκίνης αυτής καθώς τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι αναστολείς αυτοί βοηθούν στην βελτίωση της κλινικής σοβαρότητας της νόσου. [32] Τέλος, κάτι που αξίζει να αναφερθεί είναι η συσχέτιση της IL-17 με την IFN-γ όπως αναφέρεται από τον Kryczek et al καθώς η IFN-γ ενδεχόμενως αποτελεί ένα προαγωγέα της μετακίνησης και της

λειτουργίας της IL-17. Οι δύο αυτές κυτταροκίνες μπορούν να δρουν συνεργατικά στα φυσιολογικά κερατινοκύτταρα για την παραγωγή της β-defensin 2, υποδεικνύοντας έτσι μία συνεργασία μεταξύ των κυττάρων Th1 και Th17 στην παθογένεια της νόσου. [23]

### 1.4.5 NK και NKT κύτταρα

Τα κύτταρα φυσικοί-φονείς (Natural killer cells-NK) είναι μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα που έχουν την ικανότητα να λύουν αυθόρμητα κύτταρα στόχους. Αποτελούν 10-15% των κυττάρων του περιφερικού αίματος, βρίσκονται όμως φυσιολογικά και σε λεμφικά όργανα, όπως στο σπλήνα, σε λεμφαδένες καθώς και σε όργανα εκτός του λεμφικού ιστού, όπως ο πλακούντας. Η λειτουργική τους σημαντικότητα έγκειται στην άμυνα του οργανισμού από ιογενείς λοιμώξεις καθώς και στον έλεγχο των νεοπλασιών. Τα κύτταρα αυτά αναγνωρίζουν και ενεργοποιούνται από κύτταρικούς-στόχους που βρίσκονται σε κατάσταση κινδύνου, ανιχνεύοντας σε αυτά συνδέτες επαγόμενους από στρες μέσω φυσικών υποδοχέων κυτταροτοξικότητας. Τα κύτταρα NK εκφράζουν πολυάριθμους υποδοχείς που αναστέλλουν την ενεργοποίησή τους, συμπεριλαμβανομένης της οικογένειας υποδοχέων KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptor). Ελλείψει αυτών των προσδετών, τα κύτταρα NK ενεργοποιούνται και θανατώνουν κύτταρα στόχους. [33, 34] Αν και ο ρόλος των NK δεν είναι απολύτως ξεκάθαρος υπάρχουν ορισμένες ενδείξεις που υποστηρίζουν την εμπλοκή του στην ψωρίαση. Από μία *in vitro* πειραματική μελέτη πάνω σε PBMCs βρέθηκε ότι τα NK κύτταρα ασθενών με ψωριασική νόσο είχαν μειωμένη κυτταροτοξικότητα καθώς και παραγωγή ορισμένων σημαντικών κυτταροκινών. Αυτή η μειωμένη λειτουργικότητα των NK κυττάρων θα μπορούσε να έχει πολλές επιπλοκές καθώς τα NK κύτταρα είναι σημαντικά σε πολλές καταστάσεις όπως στην καταστροφή των υπερενεργοποιημένων μακροφάγων και T κυττάρων, την καταστολή της διαφοροποίησης σε Th17 κύτταρα και πολλά άλλα. [35]

Τα T-κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural killer T-cells NKT), αποτελούν μια υποομάδα T λεμφοκυττάρων που αναγνωρίζουν αντιγόνα λιπιδίων ή γλυκολιπιδίων που παρουσιάζονται μέσω της πρωτεΐνης CD1d που σχετίζεται με την τάξη MHC I. Διακρίνονται από τα NK κύτταρα τα οποία ανήκουν στην φυσική ανοσία και διαθέτουν υποδοχείς KIR όπως τα NK για την αναστολή της καταστροφής ίδιων αντιγόνων μέσω της αναγνώρισης MHC μορίων επιφανείας. Τα φυσιολογικά επίπεδα των NKT κυττάρων στο αίμα δεν είναι σταθερά και μπορεί να ποικίλλουν από άτομο σε άτομο. [36] Ο ακριβής ρόλος των NKT στην παθογένεια της ψωριασικής νόσου παραμένει αντικρουόμενος, όμως υπάρχει τουλάχιστον μία μελέτη που υποστηρίζει την ύπαρξη των CD56+ T (NKT) κυττάρων στους ψωριασικούς ιστούς. Επίσης, έχει δειχθεί ότι τόσο τα κύτταρα αυτά μπορούν να παράγουν IFN- $\gamma$  συμμετέχοντας σε μία φλεγμονώδη κατάσταση. Τα κερατινοκύτταρα είναι αυτά που εκκρίνουν χημειοκίνες, όπως είναι CXCL10, CCL5 και CCL20, οι οποίες προσελκύουν τα NKT κύτταρα. Η έκκριση αυτών των χημειοκινών συνδράμει στην στρατολόγηση των NKT κυττάρων στο δέρμα όπου η ενεργοποίησή τους μπορεί να συνεισφέρει στην δημιουργία του φλεγμονώδους περιβάλλοντος της ασθένειας. [37-39]



## 1.5 Γενετικοί παράγοντες

Ο μηχανισμός ανάπτυξης τόσο της ψωρίασης όσο και της ψωριασικής αρθρίτιδας δεν είναι γνωστός και υπάρχουν ποικίλλοι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται. Όσον αφορά το γενετικό υπόβαθρο της νόσου, οι περισσότερες αναφορές μιλούν για έναν πολυπαραγοντικό τρόπο κληρονομής. Μελέτες έδειξαν ότι η πιθανότητα ανάπτυξης ψωρίασης είναι υψηλότερη ανάμεσα σε συγγενείς πρώτου και δεύτερου βαθμού από ότι στον γενικό πληθυσμό. Σε μελέτες όπου είτε ο ένας ή και οι δύο γονείς είχαν ψωρίαση βρέθηκε ότι το ρίσκο ανάπτυξης ψωρίασης αν ο ένας γονιός έχει ψωρίαση είναι 22% και όταν και οι δύο έχουν τότε 65%. Τα ποσοστά αυτά αυξάνονται όταν ένα παιδί στην οικογένεια έχει ήδη ψωρίαση σε 51% και 83% αντίστοιχα. [40] Επίσης, από μελέτες σε διδύμους έχει βρεθεί ότι ο κίνδυνος ψωρίασης είναι τρεις φορές μεγαλύτερος σε μονοζυγωτικούς από ότι σε διζυγωτικούς διδύμους. Αυτό μεταφράζεται στο ότι περίπου το 15-30% των διζυγωτικών διδύμων αναπτύσσει την νόσο ενώ για τους μονοζυγωτικούς το ποσοστό αυτό κυμαίνεται στο 65-75%. Όλα αυτά υποδεικνύουν ότι η ψωρίαση αποτελεί μια ασθένεια που σχετίζεται σημαντικά με γενετικούς παράγοντες αλλά δεν επηρεάζεται αποκλειστικά μόνο από αυτούς, με την κληρονομικότητα της να μην φτάνει ποτέ στο 100%. [41] Σημαντική είναι επίσης η επίδραση τόσο περιβαλλοντικών παραγόντων [40] όσο και των επιγενετικών τροποποιήσεων. [42]

Όσον αφορά συγκεκριμένους γενετικούς τόπους που φαίνεται να συσχετίζονται με την ψωριασική νόσο, ξεχωρίζει ο γενετικός τόπος PSORS1C1 (psoriasis susceptibility 1 candidate 1) ο οποίος εδράζεται στο χρωμόσωμα 6 και θεωρείται υπεύθυνος περίπου για το 35%-50% της κληρονομικότητας της νόσου. Εκτός από το PSORS1C1, δύο ακόμα σημαντικά γονίδια για την ανάπτυξη της ψωρίασης εδράζονται στο χρωμόσωμα 6 και συγκεκριμένα στην περιοχή HLA-C. Τα γονίδια αυτά είναι το HCR (helix coiled coil rod homolog) και το CDSN/C(corneodesmosin). [43] Συνολικά στην περιοχή αυτή έχουν βρεθεί τουλάχιστον επτά διαφορετικοί μονονουκλεοτιδικοί σημειακοί πολυμορφισμοί (SNPs) με τους HLA-A και HLA-C να έχουν βρεθεί ότι είναι οι πιο σημαντικοί που επιδρούν στην ανάπτυξη της νόσου. Ο HLA-Cw6 στην περιοχή PSOR1 έχει συσχετιστεί με την ψωρίαση σε πολλές γεωγραφικές περιοχές και εθνικότητες. [44, 45] Όμως μελέτες σχετικά με το ποιος έχει την μεγαλύτερη συσχέτιση με την ψωρίαση ποικίλουν, καθώς υπάρχουν και άλλες που υποστηρίζουν την θεωρία ότι ο HLA-A διαθέτει μεγαλύτερη συσχέτιση. [46] Η παραπάνω περιοχή δεν είναι όμως η μόνη που σχετίζεται με την ψωρίαση. Είναι γνωστό και αποδεκτό εδώ και αρκετά χρόνια από την βιβλιογραφία ότι υπάρχουν διάφορες περιοχές που ενδεχομένως να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη της ψωρίασης. Ορισμένες τέτοιες περιπτώσεις είναι οι PSORS2(17q25), PSORS3(4q34), PSORS4(1q), PSORS5(3q21), PSORS6(19q13), PSORS7(1p), PSORS8(16q12-13), PSORS11(5q31.1-q33.1), PSORS12(20q13), PSORS13(6q21) και CX3CL1. [47-54]

Αντίστοιχα, και όσον αφορά την γενετική βάση της ψωριασικής αρθρίτιδας, έχει μελετηθεί ο ρόλος διαφόρων γενετικών τόπων, με αυτά του HLA(Human Leukocytes Antigen) συμπλέγματος να αποτελούν αυτά που έχουν μελετηθεί περισσότερο. Τα γονίδια αυτά μπορεί να διαφέρουν από άτομα σε άτομο και ορισμένα πολυμορφισμοί αυτών μπορεί να σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης της ασθένειας. Έτσι, οι πιο

σημαντικοί γενετικοί τόποι που σχετίζονται με την PsA είναι HLA-B, IL12B, TRAF3IP2, TNIP1, TYK2, καθώς και άλλοι που έχουν αναφερθεί σχετικά πρόσφατα όπως περιοχές κοντά στα ATR10D, RTRN2, CTNNA3, TNS1.[55]

Οι περιοχές που μπορεί να σχετίζονται με τις ασθένειες αυτές συνεχώς πληθαίνουν ωστόσο είναι ιδιαίτερα σημαντικό να δούμε την βιολογική σημασία των περιοχών αυτών καθώς και τον μηχανισμό δράσης τους που μπορεί να οδηγήσει εν τέλει στην ασθένεια

## 1.6 Άλλοι παράγοντες

Όπως προαναφέρθηκε οι γενετικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας, δεν πρέπει όμως να παραλείπεται και ο ρόλος που παίζουν διάφοροι άλλοι παράγοντες σε αυτήν. Οι παράγοντες αυτές ποικίλλουν και μπορεί να είναι κάποιο φυσικό τραύμα, η παχυσαρκία, το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, διάφορα φάρμακα, το στρες και διάφοροι άλλοι. Πιο αναλυτικά, ξεκινώντας με το φυσικό τραύμα, πρώτος ο Heinrich Koebner αναφέρθηκε στην ανάπτυξη της ψωρίασης μετά από κάποιον τραυματισμό. Το φαινόμενο αυτό κατά το οποίο πλάκες ψωρίασης εμφανίζονται σε περιοχές που υπήρξε κάποιος τραυματισμός ονομάστηκε φαινόμενο Koebner και έχει τεκμηριωθεί ότι στον γενικό πληθυσμό αυτό είναι υπεύθυνος για την ανάπτυξη της νόσου στο 24%-51% των περιπτώσεων. Κάτι παρόμοιο ισχύει και στην ψωριασική αρθρίτιδα όπου έχει αναφερθεί ένα παρόμοιο φαινόμενο με βάση το οποίο θα μπορούσε να εξηγηθεί και η βλάβη σε εν τω βάθει ιστούς όπως στην αρθρίτιδα.[56]

Ιδιαίτερα σημαντικό παράγοντας πέρα του τραυματισμού, θεωρείται πως αποτελεί η μόλυνση από διάφορα παθογόνα μικρόβια. Βιβλιογραφικά έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου η μόλυνση από *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* και άλλων παθογόνων οδηγεί στην ανάπτυξη ψωρίασης. Επίσης, η μόλυνση από *Helicobacter pylori* συσχετίστηκε με την σοβαρότητα της νόσου όπως καταγράφεται σε ορισμένες μελέτες. Αντίστοιχα, και στην ψωριασική αρθρίτιδα η προσβολή τόσο της ανώτερης όσο και κατώτερης αναπνευστικής οδού, καθώς και λοιμώξεις μαλακών μορίων, φαίνεται να συνδέεται με την ανάπτυξη της νόσου.

Επίσης, και άλλοι παράγοντες είναι καθοριστικοί για την ανάπτυξη αυτών των ασθενειών. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα φάρμακα, η κατανάλωση αλκοόλ και το κάπνισμα. Όσον αφορά τον ρόλο συγκεκριμένων φαρμάκων, τόσο κατά την ανάπτυξη ψωρίασης όσο και ψωριασικής αρθρίτιδας, ορισμένες φαρμακευτικές αγωγές όπως για παράδειγμα το λίθιο, οι β-blockers, οι τετρακυκλίνες, οι μη στεροειδής αντιφλεγμονώδης θεραπείες αλλά και πιο πρόσφατα φάρμακα όπως οι TNF blockers, IL-6R blockers και άλλα φαίνεται ότι πυροδοτούν την έναρξη των ασθενειών αυτών. Η σχέση του αλκοόλ με την έναρξη της ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας είναι πολύπλοκη και δεν έχει βρεθεί ακόμα ο μηχανισμός δράσης του. Ωστόσο, από μελέτες έχει δειχθεί ότι η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ οδηγεί και σε μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης της ασθένειας, ενώ όσο αυξάνεται η καταναλούμενη ποσότητα τόσο μπορεί να αυξάνεται και η σοβαρότητα της νόσου. Ένας πιθανός τρόπος με βάση των οποίο μπορεί η αιθανόλη μπορεί να δρα είναι ενεργοποιώντας T cells και κερατινοκύτταρα και

οδηγώντας στον υπερ-πολλαπλασιασμό τους. Τέλος, το κάπνισμα όπως προαναφέρθηκε συσχετίζεται με την ανάπτυξη της ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας. Από μελέτες στην ψωρίαση έχει αναφερθεί ότι το ρίσκο ανάπτυξης της ασθένειας είναι μεγαλύτερο σε άτομα που καπνίζουν ή κάπνιζαν στο παρελθόν από ότι σε άτομα που δεν έχουν καπνίσει ποτέ. Όσον αφορά τη ψωριασική αρθρίτιδα, αυτό το εύρημα δεν έχει επιβεβαιωθεί, καθώς σε μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε δεν παρατηρήθηκε η παραπάνω συσχέτιση μεταξύ της ασθένειας και του καπνίσματος.

Εκείνο που πρέπει να τονιστεί είναι ότι αν και οι παραπάνω παράγοντες είναι οι πιο σημαντικοί που διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη ή μη της ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας, δεν είναι ωστόσο οι μόνοι. Υπάρχουν πολλοί ακόμη υποψήφιοι πυροδοτικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα το στρες, το περιβάλλον στο οποίο εκτίθονται τα άτομα, διάφορες ορμόνες, η παχυσαρκία καθώς και διάφοροι άλλοι, οι οποίοι μπορεί να αποδειχθούν ιδιαίτερα σημαντικοί για τον έλεγχο και την διάγνωση της ασθένειας. [37, 57]

## 1.7 Διάγνωση και Θεραπεία

Η διάγνωση της ψωρίασης γίνεται κλινικά με φυσική εξέταση του δέρματος, των ονύχων και της κεφαλής, ενώ ορισμένες φορές η οριστική διάγνωση μπορεί να τεθεί με την λήψη μικρών τμημάτων δέρματος για τη διενέργεια βιοψίας, έτσι να διαπιστωθεί με την χρήση μικροσκοπίου το είδος της ψωρίασης. Αντίστοιχα, και στην ψωριασική αρθρίτιδα μπορούν να γίνουν τα παραπάνω αλλά στην νόσο αυτήν απαραίτητο είναι να ελεγχθούν και οι αρθρώσεις για την διάγνωση της. Αυτό μπορεί να γίνει είτε φυσικά με ενδελεχή κλινική εξέταση ή αλλιώς μέσω δύο πολύ σημαντικών τεχνολογιών, με την χρήση ακτίνων X ή με MRI (Magnetic Resonance Imaging).



Εικόνα 8. Η προσθοπίσθια ακτινογραφία των χεριών όπου φαίνεται η συνένωση των οστών του καρπού  
<https://emedicine.medscape.com/article/394752-overview>

Για την αξιολόγηση της σοβαρότητας της νόσου υπάρχει μία μεγάλη ποικιλία διαγνωστικών “εργαλείων” και σκορ που χρησιμοποιούνται. Όσον αφορά την ψωρίαση το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο είναι το PASI (Psoriasis Area and Severity Index) αλλά υπάρχουν και άλλα χρήσιμα όπως το BSA (Body Surface Area), το DLQI ( Dermatology Life Quality Index), το VAS (Visual Analogue Scale) τα οποία επίσης αξιοποιούνται και μπορούν να προσφέρουν μεγάλη βοήθεια. Παιρνώντας στην ψωριασική αρθρίτιδα και εκεί συναντώνται πολλά διαγνωστικά μέσα με τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα να είναι το PsARC (PsA Response Criteria), και το DAS28 (Disease Activity Score 28). [58]

Από την στιγμή που θα τεθεί η διάγνωση ψωρίασης ή/και η ψωριασική αρθρίτιδας απαραίτητη είναι η λήψη της κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής. Για το λόγο αυτό υπάρχουν διάφορα φάρμακα που μπορεί να είναι κοινά μεταξύ των δύο. Ανάλογα με τον δριμύτητα της νόσου καθώς και άλλων παραγόντων(όπως τη συμμόρφωση και την ανταπόκριση του ασθενούς η φαρμακευτική αγωγή ποικίλλει. Ειδικότερα, όσον αφορά τους ηπιότερους υπότυπους της την ψωρίασης, ενδείκνυται συνήθως τοπικοί παράγοντες όπως κορτικοστεροειδή, ανάλογα βιταμίνης D, ρετινοϊκό, ανθραλίνη και άλλα, με τα κορτικοστεροειδή να είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα. Αυτές οι ουσίες μπορεί να βρίσκονται σε κρέμες, τζελ, ενυδατικά προϊόντα και σε διάφορα άλλες μορφές. Όταν η ψωρίαση εκδηλώνεται με βαρύτερους κλινικούς φαινοτύπους, τότε η στρατηγική αντιμετώπισης της περιλαμβάνει συνήθως την χρήση συστηματικών θεραπειών όπως της μεθοτρεξάτης και της κυκλοσπορίνης και σε περιπτώσεις όπου δεν αποδίδουν οι παραπάνω θεραπείες μπορεί η αγωγή να συνεχιστεί με την χρήση βιολογικών παραγόντων που στοχεύουν σε συγκεκριμένα μονοπάτια. Τέτοιοι βιολογικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται σήμερα, είναι οι αναστολείς του TNF-α, οι αναστολείς της Φωσφοδιεστεράσης 4 (PDE4) και συγκεκριμένες κυτταροκίνες όπως οι αναστολείς της IL17, οι αναστολείς των IL12/IL23. Παράλληλα, τόσο για τις πιο ήπιες μορφές όσο και σε πιο επιδεινωμένες αρκετές φορές γίνεται χρήση UVA και UVB ακτινοβολίας. Τέλος, όσον αφορά την ψωριασική αρθρίτιδα οι ήπιες μορφές της αντιμετωπίζονται κυρίως με μη στεροΐδη αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAID) ή με θεραπεία με κορτικοστεροΐδη. Όταν η θεραπείες αυτές δεν είναι αρκετές για την ανακούφιση των συμπτωμάτων ή όταν η νόσος εμφανίζεται με βαρύτερες κλινικές εκδηλώσεις τότε χρησιμοποιούνται DMARDs (Disease-Modifying AntiReumatic Drugs) όπως η μεθοτρεξάτη. Επίσης, όπως και στην ψωρίαση, ως θεραπεία δεύτερης γραμμής αρκετές φορές αξιοποιούνται βιολογικοί παράγοντες όπως αναστολείς του TNF-α , ενώ πιο πρόσφατα, ορισμένα νέα σχετικά φάρμακα όπως αναστολείς της IL17 και αναστολείς του PDE4 που χρησιμοποιούνται στην ψωρίαση έχουν δοκιμαστεί και στην ψωριασική αρθρίτιδα[59, 60]

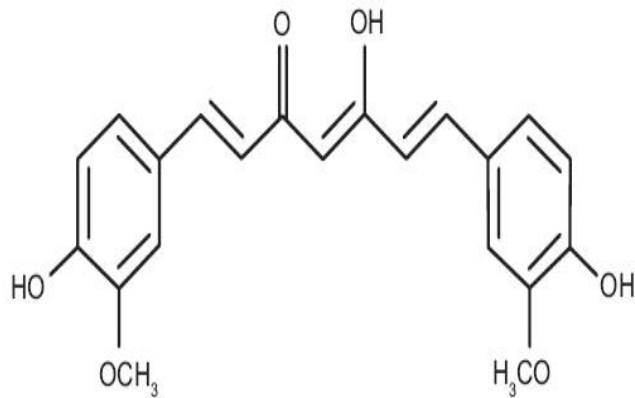
## 1.8 Κουρκουμίνη

Η κουρκουμίνη είναι η δραστική ουσία που βρίσκεται στο μπαχαρικό κουρκουμάς το οποίο προέρχεται από την ρίζα του φυτού *Curcuma Longa* (turmeric), ένα φυτό που ανήκει στην οικογένεια των *Ginger, Zingiberaceae*. [61] Η χρήση του turmeric χρονολογείται τουλάχιστον εδώ και 4000 χρόνια στην Ινδία, όπου χρησιμοποιούνταν ως μαγειρικό καρύκευμα, ενώ είχε και θρησκευτική σημασία. Από διάφορες αναφορές πιθανολογείται ότι το turmeric έφθασε στην Κίνα το 700 μ.Χ., στην Ανατολική Αφρική το 800 μ.Χ., στην Δυτική Αφρική το 1200 μ.Χ. και στην Τζαμάικα τον 18ο αιώνα. Το 1280, ο Μάρκο Πόλο ανέφερε για ένα μπαχαρικό που παρουσίαζε παρόμοιες ιδιότητες με το σαφρόν περιγράφοντας το turmeric. Σύμφωνα με ορισμένα Σανσκριτικά χειρόγραφα το turmeric αναφέρεται ότι χρησιμοποιούνταν ευρέως στην νότια Ασία ως θεραπευτικός παράγοντας όπως ως αντισηπτικό έναντι καψιμάτων, μωλώπων και αντιβακτηριδιακό. Στο Πακιστάν χρησιμοποιούνταν ως αντιφλεγμονώδες για γαστρικές διαταραχές, ενώ στο Αφγανιστάν αξιοποιούνταν για καθαρισμό των πληγών και πιστευόταν ότι βοηθάει στην ανάρρωση. [Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects, Chapter 13- Turmeric, the Golden Spice, Sahdeo Prasad and Bharat B. Aggarwal.]

Η ανακάλυψη της κουρκουμίνης χρονολογείται το 1815 από τους Vogel και Pellatier οι οποίοι αναφέρονται στην απομόνωση “μίας κίτρινης ουσίας” από τις ρίζες του φυτού *Curcuma Longa* και το οποίο ονόμασαν κουρκουμίνη. Αργότερα, βρέθηκε ότι η ουσία αυτήν είναι ένα μείγμα από διάφορες ουσίες. Το 1842 ήταν που έγινε τελικά η απομόνωση καθαρής κουρκουμίνης από τον Vogel Jr, ενώ το 1910 ήταν που βρέθηκε από τον Milobedzka και Lampe η χημικός της δομή. Αν και όπως αναφέρθηκε το turmeric καταναλωνόταν για χιλιάδες χρόνια λόγω των πιθανών θετικών του δράσεων, το 1949 ο Schraufstatter et al ήταν ο πρώτος που δημοσίευσε στο Nature μία μελέτη σχετικά με την αντιμικροβιακές δράσεις της κουρκουμίνης. Τις επόμενες δύο δεκαετίες δεν υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον μέχρις ότου τις δεκαετίες του 1970 – 1980 όπου η ερευνητική δραστηριότητα πάνω στην κουρκουμίνη ανακάμπτει, με πολλαπλές αναφορές πάνω σε πολλές διαφορετικές δράσεις της όπως αντι-διαβητική, αντι-φλεγμονώδης, αντι-οξειδωτική, αντι-καρκινική και διάφορες άλλες. [62]



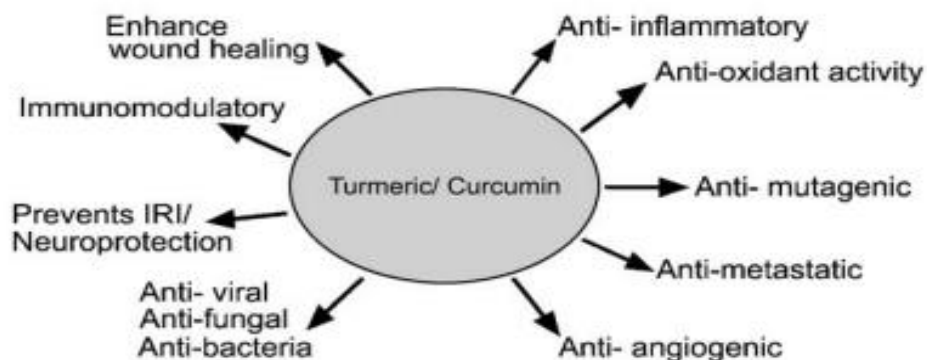
Εικόνα 9. Κουρκουμίνη. Πηγή: Turmeric and Curcumin for Arthritis, Vijay B Vad



Εικόνα 10. Χημική δομή της κουρκουμίνης. Πηγή: Entrapment of curcumin into monoolein-based liquid crystalline nanoparticle dispersion for enhancement of stability and anticancer activity, Kim et al

Η κουρκουμίνη, όπως αναφέρθηκε, δεν βρίσκεται σε καθαρή μορφή αλλά απομονώνεται από το φυτό tumeric. Το φυτό αυτό ευδοκιμεί σε τροπικό κλίμα όπως στην Ινδία, Κίνα και από τις ρίζες αυτού προκύπτουν τα διάφορα παράγωγα της κουρκουμίνης με κυριότερο την κουρκουμίνη. Οι ρίζες μετατρέπονται στην γνωστό κιτρινόχρωμο μπαχαρικό μέσω μια διαδικασίας όπου συλλέγονται, καθαρίζονται, ξεραίνονται και μετατρέπονται σε σκόνη. Η κουρκουμίνη θεωρείται ότι έχει μεγάλη φαρμακευτική αξία και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής σε διάφορες χώρες. Άλλα χαρακτηριστικό παράδειγματα αξιοποίησης της αποτελούν η χρήση της στην Ινδία ως μπαχαρικά, στην Ταϊλάνδη ως καλλυντικά, στην Κορέα σε ποτά, στην Μαλαισία ως αντισηπτικό και η χρήση της στην βιομηχανία τροφίμων στις ΗΠΑ ως συντηρητικό και ως παράγοντας που προσδίδει χρώμα σε μουςτάρες, τυριά, βούτυρα και άλλα προϊόντα. [62, 63]

## 1.8.1 Μηχανισμοί δράσης



Εικόνα 11. Βιολογικές δράσεις της κουρκουμίνης/turmeric. Πηγή: Multiple biological activities of curcumin: A short review, R. Simal et al, Life Sciences 78 (2006) 2081–2087

Όπως προαναφέρθηκε, η κουρκουμίνη αποτελεί μια ουσία με μεγάλη βιολογική σημασία και αυτό γιατί όπως φαίνεται και στην Εικόνα 11 έχει πολλές και ποικίλλες δράσεις. Οι δράσεις αυτές θα αναλυθούν στην συνέχεια.

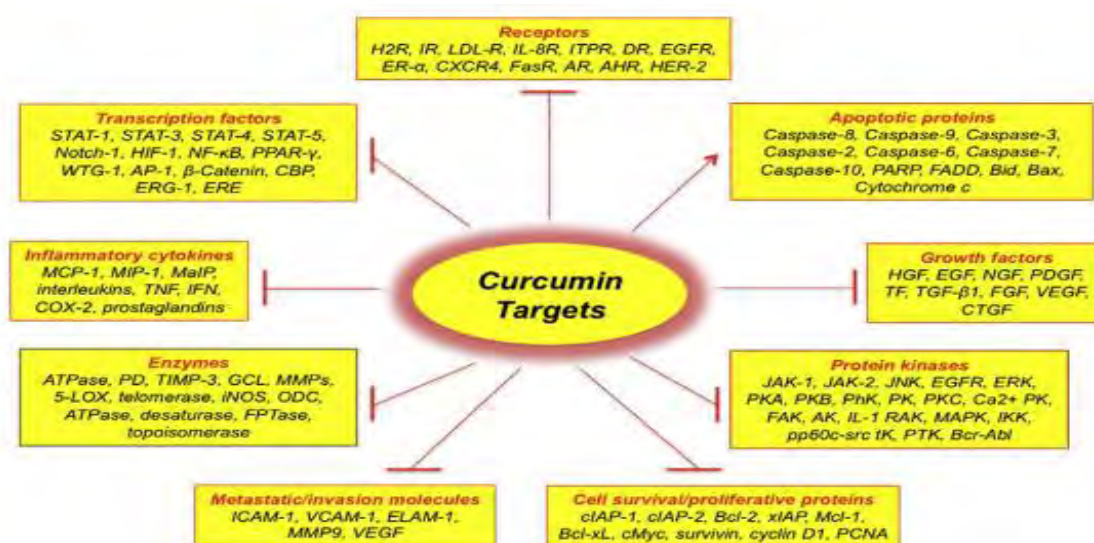
### Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Η αντιοξειδωτική ικανότητα της κουρκουμίνης αποτελεί από τις σημαντικότερες ιδιότητες της κουρκουμίνης. Η κουρκουμίνη έχει δείχθει ότι βελτώνει σημαντικούς δείκτες του οξειδωτικού στρες. Υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να αυξήσει την δραστικότητα διάφορων αντιοξειδωτικών όπως της δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) στον ορό. Από μία σχετικά πρόσφατη συστηματική μελέτη, σχετικά με την αποτελεσματικότητα συμπληρωμάτων πλούσιων σε κουρκουμίνη και σε ανάλογα της πάνω σε ένζυμα του οξειδωτικού στρες, προέκυψε σημαντικές αλλαγές σε διάφορους παράγοντες του οξειδωτικού στρες. Αναλυτικά από την μελέτη αυτή, η έκθεση σε ένα συμπλήρωμα κουρκουμίνης οδήγησε σε αύξηση της δραστικότητας του SOD και της καταλάσης (CAT) στον ορό, σε αυξημένα επίπεδα GSH, ενώ μείωσε τα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξειδάσης. Παρόμοια αποτελέσματα υπήρχαν και σε αρουραίους με μυοκαρδιακή ισχαιμία όπου η χορήγηση της κουρκουμίνης είτε προ ή μετά της ασθένειας έδειξε να οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της λιπιδικής υπεροξειδάσης, του σουπεροξειδικού ανιόντος και της οξειδάσης της ξανθίνης, καθώς και σε αύξηση των επιπέδων ενζύμων SOD, CAT, GST και της υπεροξειδάσης της γλουταθιόνης. Επίσης, η επίδραση της κουρκουμίνης στις ελεύθερες ρίζες γίνεται μέσω διάφορων μηχανισμών. Η κουρκουμίνη μπορεί να προφυλάξει από τις ελεύθερες ρίζες όπως από ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) και από ενεργές ρίζες αζώτου (RNS), μπορεί να τροποποιήσει την δραστικότητα των ενζύμων GSH, καταλάση και SOD ώστε να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες, μπορεί να αναστέλλει ένζυμα που συμμετέχουν στην παραγωγή των ROS όπως η κυκλοοξυγενάση/λιποξυγενάση και η οξειδάση/υδροξυγενάση της ξανθίνης. Τέλος, η κουρκουμίνη είναι λιπόφιλο μόριο κάτι που την καθιστά ικανή να προστατεύει από ρίζες υπεροξυλίου, ενώ ακόμη θεωρείται όπως και η βιταμίνη E ένα αντιοξειδωτικό το οποίο μπορεί να διασπά αλυσίδες. [64, 65]

### Αντικαρκινικές ιδιότητες

Η αντικαρκινική δράση της κουρκουμίνης είναι γνωστή και καλά τεκμηριωμένη. Έχει βρεθεί ότι η κουρκουμίνη μπορεί να βοηθήσει στην ανακούφιση των συμπτωμάτων καθώς και να βελτιώσει καρκινικούς δείκτες σε διάφορους τύπος καρκίνου όπως των πνευμόνων, του εγκεφάλου, του μαστού, του προστάτη, του παχέος εντέρου και του παγκρέατος. In vitro η κουρκουμίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό διάφορων καρκινικών κυττάρων όπως των κυττάρων του καρκινώματος του μαστού και του

παχέος εντέρου, των Τ κυττάρων σε λευκώματα καθώς και άλλων, ενώ παράλληλα επάγει την απόπτωση καρκινικών κυττάρων. Για παράδειγμα σε μία μελέτη καρκινικών κυττάρων στήθους η κουρκουμίνη φάνηκε να επάγει τον μεταγραφικό παράγοντα *bax* μέσω του *p38* οδηγώντας έτσι σε απόπτωση των κυττάρων αυτών. Αλλά αποδείξεις σχετικά με την αντικαρκινική δράση της κουρκουμίνης υπάρχει και σε κλινικές δοκιμές. Όταν δοκιμάστηκε σε ασθενείς με μυέλωμα, στους οποίους χορηγήθηκε κουρκουμίνη μέσω του στόματος (1-12gr/day), οδήγησε μείωση των επιπέδων του καρκινικού ουρητικού N-τελοπεπτιδίου του κολλαγόνου τύπου Ι (urinary 504 N-telopeptide of type I collagen) και σε μείωση της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB, STAT3 και της COX2. Τέλος, μια άλλη μελέτη στον καρκίνο του παγκρέατος, στην οποία η κουρκουμίνη χορηγούνταν στους ασθενείς μέσω του στόματος, έδειξε μείωση των επιπέδων του TNF-α στον ορό, μείωση του αριθμού και του μεγέθους των πολυπόδων καθώς και μια αύξηση στον αριθμό των αποπτωτικών καρκινικών κυττάρων και στην έκφραση των *p53*, *Bax* και *Bcl-2*. [66, 67]



Εικόνα 12 : Μοριακοί στόχοι της κουρκουμίνης. Πηγή: Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back, B. Aggarwal, Biotechnology Advances 32 (2014) 1053–1064

### Αντιαγγειογενετικές ιδιότητες

Η κουρκουμίνη έχει δειχθεί ότι αποτελεί έναν άμεσο αναστολέα της αγγειογένεσης, ενώ αναστέλλει επίσης και την παραγωγή πρωτεϊνών που προάγουν την αγγειογένεση. Οι αντιαγγειογενετικές ιδιότητες της κουρκουμίνης οφείλονται σε δύο ιδιότητες της, στην ικανότητα να αναστέλλει την παραγωγή κυτταροκινών που σχετίζονται με ανάπτυξη καρκίνου όπως ο TNF-α και στην αντιαποπτωτική ικανότητα της στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η κουρκουμίνη έχει δειχθεί σε κυτταρικές σειρές ότι μέσω της αναστολής του VEGF, του COX2 και του bFGF μπορεί εν τέλει να αναστέλλει και την αγγειογένεση. Τέλος, οι αγγειογενετικές ιδιότητες της κουρκουμίνης υποστηρίζονται και μέσω της αναστολής της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων λόγω της αναστολής του ενζύμου MMP, ενώ σημαντικό είναι και το ότι η κουρκουμίνη αναστέλλει την παραγωγή ή/και απελευθέρωση αγγειογενετικών παραγόντων όπως TNF, TGF καθώς και άλλων. [68]



### Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Η κουρκουμίνη φαίνεται να έχει ισχυρή αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή και αντιϊκή δράση. Η αντιβακτηριακή δράση αυτήν έχει τεκμηριωθεί σε διάφορες μελέτες ενάντια σε πολλά και διαφορετικά βακτήρια όπως το *H.pylori*, ο *Staph. aureus* και η *E. coli*, με την κουρκουμίνη να δρα μέσω του NF-κΒ, της MMP-3, MMP-9 και άλλων παραγόντων. Ο HBV, HPV, HIV είναι κάποιοι από τους σημαντικότερους ιούς στους οποίους η κουρκουμίνη φαίνεται να επιδρά μέσω πρωτεασών και διαφόρων άλλων παραγόντων. Τέλος, η κουρκουμίνη δρα και ως αντιμυκητιακό αναστέλλοντας την ανάπτυξη διαφόρων μυκήτων όπως του είδους *Candida* και διαφόρων άλλων κυρίως μέσω της μείωσης της έκφρασης του ενζύμου ERG3 το οποίο θα οδηγήσει τελικά σε κυτταρικό θάνατο λόγω αυξημένης παραγωγής ROS. [69]

### Νευροπροστατευτικές ιδιότητες

Η κουρκουμίνη συνδράμει επίσης τόσο στην νόσο Alzheimer(AD) όσο και στην κατάθλιψη. Όσον αφορά την AD η κουρκουμίνη δρα μέσω του ελέγχου διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, ενζύμων και κυτταροκινών σχετικών με την δράση του NF-κΒ. Επίσης, η κουρκουμίνη μπορεί να δεσμεύεται με τα  $Fe^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ , τα οποία παίζουν ρόλο στην παθογένεια του AD, μειώνοντας έτσι την τοξικότητα που οφείλεται στην εναπόθεση των πλακών αμυλοειδούς. Στην κατάθλιψη από διάφορες μελέτες, στις οποίες χορηγούνταν δόσεις κουρκουμίνης 500-1000mg/day, προέκυψε ότι η κουρκουμίνη βοήθησε στην βελτίωση των συμπτωμάτων που σχετίζεται με την κατάθλιψη όπως αυτό προκύπτει από διάφορα τεστ όπως BAI, BDI και άλλα. Από αντίστοιχες μελέτες βρέθηκε ότι η κουρκουμίνη μειώνει τα επίπεδα της IL-1β και του TNF-α, ενώ επιπλέον αυξάνει τα επίπεδα της θρομβοξάνη B2, της ενδοθηλίνη-1 και της λεπτίνης τα οποία θεωρούνται σημαντικά μόρια του μηχανισμού δράσης της κουρκουμίνης στην νόσο αυτή. [66, 70]

### Ενίσχυση Θεραπείας τραυμάτων

Σημαντική είναι η δράση της κουρκουμίνης στην θεραπεία τραυμάτων. Αυτό οφείλεται στην ιδιότητες της ως αντιοξειδωτικός, αντιφλεγμονώδης και αντιμολυσματικός παράγοντας όπως αυτά αναλύθηκαν και παραπάνω. Η ιδιότητα της ως αντιφλεγμονώδης βοηθάει στην περίπτωση αυτήν στην μείωση της φλεγμονής και στην επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού για την θεραπεία του τραυματισμένου ιστού. Οι άλλες δύο ιδιότητες της κουρκουμίνης, δηλαδή η αντιμολυσματική και η αντιοξειδωτική της δράση, βοηθούν αφενός στην προστασία από διαφόρους μικροοργανισμούς και αφ' ετέρου στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών, παραγόντων δηλαδή που οδηγούν σε ανάπτυξη φλεγμονής. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η κουρκουμίνη βοηθάει στην θεραπεία τραυμάτων μέσω συμμετοχής στην αναδιαμόρφωση των ιστών, στην απόθεση κολλαγόνου. Κλείνοντας, σημαντικό είναι ότι έχει υποστηριχθεί και η δράση της ως επαγωγικός παράγοντας στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών καθώς και στην αναγέννηση των επιθηλιακών κυττάρων. [71]

## 1.8.2 Ανοσορυθμιστική-Αντιφλεγμονώδης δράση

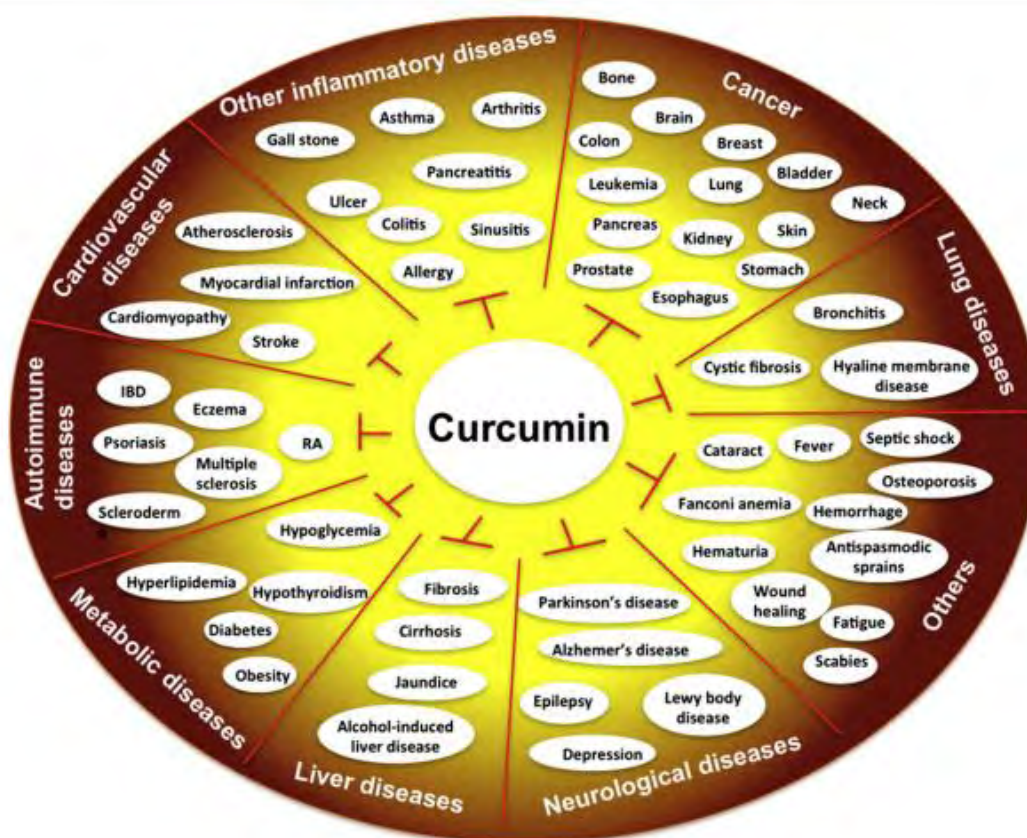
Το οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί με πολλές ασθένειες καθώς και με την εκδήλωση φλεγμονής. Όπως έχει υποστηριχθεί πολλές φορές στην βιβλιογραφία τα φλεγμονώδη κύτταρα απελευθερώνουν ROS στο σημείο της φλεγμονής οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες. Αντίστοιχα, όμως, ένας αριθμός ενεργών ριζών οξυγόνου ή αζώτου μπορούν επίσης να υποκινήσουν έναν ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μονοπάτι που θα επάγει την έκφραση προφλεγμονωδών παραγόντων. Έτσι, είναι εύκολα αντιληπτή η συσχέτιση της φλεγμονής με το οξειδωτικό στρες πράγμα που συσχετίζεται και με διάφορες νόσους όπως νεοπλασίες, AD, νόσο Parkinson και άλλα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της παραπάνω συσχέτισης αποτελεί ο TNF-α, ο οποίος είναι ένας προφλεγμονώδης παράγοντας που ελέγχεται από την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, ο οποίος επάγεται παρουσία οξειδωτικού στρες. Ωστόσο, η κουρκουμίνη δρα μπλοκάροντας την ενεργοποίηση του NF-κΒ μέσω του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του. Ένας άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου η κουρκουμίνη αναστέλλει τον NF-κΒ είναι μέσω επηρεασμού του προτύπου μεθυλίωσης του επαγωγέα TNF-α, γεγονός που υποδηλώνει τους πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς με τους οποίους δρα η ουσία αυτή.

Από μελέτες σε διάφορες νόσους σχετικές με το άσθμα η κουρκουμίνη μείωσε την φλεγμονή μέσω ενεργοποίησης του Nrf2/HO-1 και μείωση των επιπέδων των IL-1β, IL-6 και TNF-α. Σε τύπου II σακχαρώδη διαβήτη χορήγηση κουρκουμίνης από το στόμα οδήγησε σε βελτιωμένη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων και αύξηση των επιπέδων των κυτταροκινών που αναφέρθηκαν και πιο πάνω. Σε ασθενείς με μεταβολικές νόσους, επίσης αναφέρεται η αντιφλεγμονώδης δράση της κουρκουμίνης καθώς η χορήγηση της ουσίας οδηγεί σε μείωση των επιπέδων διαφόρων προφλεγμονωδών κυτταροκινών (όπως TNF-α, TGF-β, IL-6 και MCP-1) στον ορό. Στην υποξία, η κουρκουμίνη με έναν δοσο-εξαρτώμενο τρόπο βοηθάει στον έλεγχο των λιποκυττάρων μέσω της ρύθμισης της έκφρασης φλεγμονωδών κυτταροκινών, ενώ τόσο στο συκώτι όσο και στους νεφρούς η κουρκουμίνη φαίνεται να προστατεύει από την παρακεταμόλη μέσω μείωση των επιπέδων του MMP-8, IL-1β, IL-6, TNF-α και IL-8. Τέλος, οι κυτταροκίνες IL-1β και IL-6 αναφέρεται ότι αναστέλλονται από την κουρκουμίνη τόσο σε κυτταρικές σειρές HaCaT που έχουν διεγερθεί με TNF-α όσο και BV-2 μικρογλοιακά κύτταρα διεγερμένα με LPS.

Οι αντιφλεγμονώδης αυτές ιδιότητες της κουρκουμίνης είναι ευρέως γνωστές και έχουν μελετηθεί σε πολλές ασθένειες. Δύο πολύ καλά μελετημένες ασθένειες όπου η κουρκουμίνη έχει ισχυρή ανοσορυθμιστική-αντιφλεγμονώδη δράση είναι η οστεορθρίτιδα (OA) και η ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA). Η θεραπευτική δράση της κουρκουμίνης σε αυτές τις νόσους έχει μελετηθεί σε διάφορες δόσεις 200-2000mg/day, σε διάφορες μορφές της ουσίας (πχ κάψουλα, C3 complex κ.α.) και για διάφορους χρόνους χορήγησης. Από μία τέτοια μελέτη σε ασθενείς με RA φάνηκε ότι η κουρκουμίνη βοηθάει όσο ορισμένα φάρμακα όπως στην πρωκειμένη το phenylbutazone στην βελτίωση των συμπτωμάτων σχετικών με RA όπως η ακαμψία, η φλεγμονή των γονάτων και άλλα. Επίσης, από άλλη μελέτη της κουρκουμίνης και ενός άλλου φαρμάκου του diclofenac sodium φάνηκε ότι η συνδυαστική θεραπεία των δύο

αυτών βοηθά περισσότερο στην βελτίωση των συμπτωμάτων του RA από ότι η μεμονωμένη χρήση καθεμίας από αυτές. Τέλος, έχει δειχθεί ότι η κουρκουμίνη αναστέλλει την ανάπτυξη των αρθρικών ινοβλαστών λόγω επαγωγής της απόπτωσης μέσω της αυξημένη έκφρασης του προ-αποπτοτικού μορίου Bax και της μειωμένης έκφραση του αντι-αποπτοτικού BCl2 και XIAP.

Αντίστοιχα, στην OA υπάρχουν μελέτες σχετικές με διάφορους φλεγμονώδεις δείκτες και δείκτες στρες. Από αυτές προκύπτει ότι η κουρκουμίνη στην ασθένεια αυτή μειώνει τους προφλεγμονώδεις δείκτες IL-1 $\beta$ , IL-6, του CD40 προσδέτη, sVCAM( soluble vascular cell adhesion molecule) και του ESR(erythrocyte sedimentation rate), μειώνει την παραγωγή του ενζύμου COX2 καθώς και τα επίπεδα διαφόρων προ-φλεγμονωδών μεσολαβιτών όπως TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6, hsCRP (high-sensitivity C-reactive protein , MCP1 (monocyte chemotactic protein-1) και CGRP (calcitonin gene-related peptide). Επιπρόσθετα, από έρευνα πάνω σε ασθενείς με OA που έπαιρναν κουρκουμίνη συμπληρωματικά με την θεραπεία τους δείχθηκε ότι διάφορα σκορ όπως το WOMAC, σκορ σχετικά με την σκληρότητα και άλλα βελτιώθηκαν, ενώ μειώθηκαν σημαντικά τα επίπεδα πολλών φλεγμονωδών δεικτών όπως CD40L, IL-1 $\beta$ , IL-6, sVCAM και ESR. [64, 66, 70]



Εικόνα13 : Ασθένειες στις οποίες συνεισφέρει η κουρκουμίνη . Πηγή: Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back, B. Aggarwal, Biotechnology Advances 32 (2014) 1053–1064

### 1.8.3 Ψωρίαση και ψωριασική αρθρίτιδα

Όσον αφορά το ρόλο της κουργουμίνης στη ψωριασική νόσο, με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία, φαίνεται να ασκεί σαφή αντιφλεγμονώδη δράση τόσο *in vitro* όσο και σε ζωικά μοντέλα. Μια *in vitro* μελέτη της δράσης της κουργουμίνης ήταν αυτή που έγινε από την Varma et al πάνω σε κύτταρα που προσομοιάζουν αυτά της ψωρίασης (κυτταρική σειρά HaCaT). Στην μελέτη αυτή αναφέρεται ότι η κουργουμίνη ήταν ικανή να αναστείλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών μέσω της μείωσης της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως της IL-17, IFN- $\gamma$  και της IL-6 (ενώ ταυτόχρονα η κουργουμίνη επάγει την έκφραση των πρωτεϊνών involucrin (iNV) και filaggrin (FLG), δύο σημαντικών πρωτεϊνών του δέρματος). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζονται και από μία άλλη μελέτη πάνω στην κυτταρική σειρά HaCaT στην οποία φαίνεται ότι η κουργουμίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ψωριασικών κυττάρων ακόμη και όταν τα κύτταρα καλλιεργηθούν παρουσία της IL-22, μίας κυτταροκίνης που όπως προαναφέρθηκε παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ψωρίασης. Μία ακόμη σημαντική μελέτη που δημοσιεύθηκε πρόσφατα αναφέρει ότι η κουργουμίνη αναστέλλει την παραγωγή σημαντικών για την παθογένεια της ψωρίασης φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL12 και IL-23 από δένδριτικά κύτταρα, ενώ και σε PBMCs φαίνεται να έχει παρόμοια δράση αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών. [72-74]

Οι ενδείξεις αυτές συμφωνούν και με αντίστοιχα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε ζωικά μοντέλα. Σχετικά πρόσφατα υπήρξε μια μελέτη από τους Kang et al στην οποία υποστηρίχθηκε ότι η κουργουμίνη αναστέλλει την παραγωγή προφλεγμονωδών παραγόντων από τα T κύτταρα στην ψωρίαση. Η μελέτη έγινε πάνω σε ποντίκια με μια νόσο που προσομοιάζει τη ψωρίαση και παρατηρήθηκε ότι μετά από 20 μέρες χορήγησης κουργουμίνης από το στόμα τα επίπεδα των κυτταροκινών IL-17, IL-22, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-8 και TNF- $\alpha$  μειώθηκαν περίπου 30-60%. Επιπλέον, σημαντικό είναι να αναφερθεί και μια άλλη μελέτη που έγινε από τους Sun et al στην οποία μελετήθηκε η δράση της κουργουμίνης σε ποντίκια με νόσο που προσομοιάζει τη ψωρίαση, όταν επάγεται από το imiquimod. Σε αυτήν έγιναν πειράματα τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* και προέκυψε ότι η κουργουμίνη βοηθάει στην ελάττωση των συμπτωμάτων της ψωρίασης μειώνοντας την φλεγμονή και αναστέλλοντας την πάχυνση του δέρματος. Επιπλέον, από την ίδια μελέτη προέκυψε ότι η κουργουμίνη μειώνει τα επίπεδα του mRNA διαφόρων φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-1 $\beta$ , IL-6 και TNF- $\alpha$ , με την IL-1 $\beta$  και τον TNF- $\alpha$  να παρουσιάζουν την μεγαλύτερη πτώση. [75, 76]

Τέλος, δεν μπορούν να παραλειφθούν οι κλινικές μελέτες που έχουν γίνει πάνω σε ψωριασικούς ασθενείς όσον αφορά την δράση της κουργουμίνης. Μία κλινική μελέτη που αφορά την κουργουμίνη στην ψωρίαση έγινε από τους Caproni et al στην οποία χορηγήθηκε κουργουμίνη μαζί με φωσφολιπίδια για αυξημένη διαλυτότητα. Σύμφωνα με αυτήν παρατηρείται μία πτώση των επιπέδων μίας σημαντικής προφλεγμονώδους κυτταροκίνης της IL-22. Επιπλέον, από άλλη κλινική μελέτη αναφέρεται ότι χορήγηση

κουρκουμίνης μετά από φωτοθεραπεία έδειξε να έχει ευεργετικές δράσεις προκαλώντας σημαντική μείωση του PASI. Τέλος, σε μία μελέτη των Gelfand et al στην οποία συμμετείχαν 12 άτομα η κουρκουμίνη φάνηκε να δρα μόνο στο 17% των περιπτώσεων, με σημαντική όμως βελτίωση στους ασθενείς αυτούς. Ωστόσο, η μελέτη αυτήν δεν είναι αρκετή λόγω του μικρού δείγματος της για την δημιουργία σαφή συμπερασμάτων και κρίνεται απαραίτητο να γίνουν περισσότερες κλινικές μελέτες έτσι ώστε να μπορέσει να διερευνηθεί η δράση καθώς και η συμμετοχή της κουρκουμίνης στην θεραπεία της ψωρίασης. [77-79]

## 2.Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής μελέτης ήταν η διερεύνηση της ανοσορυθμιστικής δράσης της κουρκουμίνης σε κύτταρα ασθενών με ψωρίαση και ψωριασική αρθρίτιδα. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων σε διάλυμα κουρκουμίνης και μετρήθηκε η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών μέσω χρήσης κυτταρομετρίας ροής.

## 3.Υλικά και μέθοδοι

### 3.1 Απομόνωση και κρυσυντήρηση μονοπύρηνων λευκοκυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs)

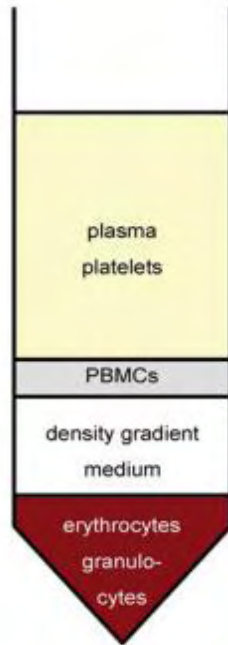
#### Υλικά και αντιδραστήρια

- Ηπαρινισμένη σύριγγα συλλογής αίματος (20ml ή μεγαλύτερη)
- Tubes 50ml
- Tubes 15ml
- Μέσο RPMI-1640
- Στείρες πιπέτες Pasteur
- Διάλυμα Lymphoprep
- Ορό εμβρύου μόσχου (FBS)
- Διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- Cryovials
- Υγρό άζωτο

#### Μέθοδος:

1. Συλλογή 20ml περιφερικού αίματος σε ηπαρινισμένη σύριγγα.
2. Σημείωση των πληροφοριών του εκάστωτε δείγματος (ασθενούς ή υγιούς αντίστοιχα) και διατήρηση τους σε φάκελο.
3. Επίστρωση των 20ml αίματος σε 10ml διάλυμα διαβάθμισης Lymphoprep σε falcon tube 50ml.

4. Φυγοκέντρηση σε 2500 rpm για 20 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο με ελάχιστα φρένα ώστε να μην διαταραχθεί η διαστρωμάτωση.
5. Συλλογή της "θολερής" ζώνης (ανάμεσα στο Lymphogrep και την ζώνη που υπάρχουν πλάσμα και αιμοπετάλια), όπου περιέχονται τα λεμφοκύτταρα, σε falcon tube των 15ml.



Εικόνα14: Διαστρωμάτωση περιφερικού αίματος έπειτα από φυγοκέντρηση. Τροποποιημένο από:C.Riedhammer et al, Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing and Culture

6. Προσθήκη μέσου RPMI-1640 και φυγοκέντρηση σε 1800 rpm για 5 λεπτά με φρένα.
7. Με ιδιαίτερη προσοχή γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου χωρίς να πειραχθεί το κυτταρικό ίζημα και πλύση με νέο RPMI-1640 όπου καθίσταται αναγκαίο για καλύτερη απομόνωση των λευκοκυττάρων.
8. Προσθήκη 3ml διαλύματος κρυσυντήρησης που αποτελείται από FBS 60%, RPMI-1640 30% και DMSO 10%.
9. Διαίρεση των κυττάρων σε τρία Cryovials που περιλαμβάνουν κατάλληλη σήμανση και αποθήκευση τους σε κατάψυξη στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για τουλάχιστον 24 ώρες.
10. Μεταφορά στο υγρό άζωτο για μακροχρόνια αποθήκευση σε ειδικά Cryobox.(...)

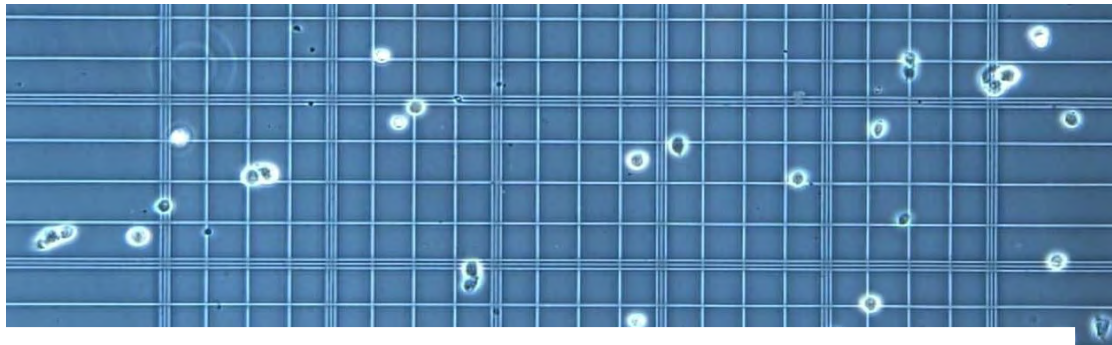
## 3.2 Μέτρηση κυττάρων με χρώση Trypan Blue

### Υλικά και αντιδραστήρια

- Οπτικό μικροσκόπιο
- 0.4% Trypan Blue
- Πλάκα Neubauer

### Μέθοδος

1. Γίνεται λήψη 100μl κυττάρων σε Eppendorf tube και προσθήκη 400μL 0.4% Trypan Blue (τελική συγκέντρωση 0.32%). Είναι απαραίτητο να γίνει καλό ανακάτεμα χωρίς δημιουργία φυσαλίδων.
2. Γίνεται λήψη 100μl κυτταρικού εναιωρήματος που έχει υποστεί κατεργασία με Trypan Blue και γίνεται εφαρμογή σε αιμοκυτταρόμετρο. Ακολουθεί γέμισμα των δύο θαλάμων κάτω από την καλύπτρα, επιτρέποντας έτσι την αφαίρεση του κυττάρου μέσω τριχοειδούς δράσης.
3. Χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο, γίνεται εστίαση στις γραμμές πλέγματος του αιμοκυτταρομέτρου με μεγέθυνση 10X.



Εικόνα15: Μέτρηση βιωσιμότητας κυττάρων εστιαζόμενοι στις γραμμές πλέγματος αιμοκυτταρομέτρου.

4. Μέτρηση των ζωντανών, μη χρωματισμένων κυττάρων καθώς τα ζωντανά κύτταρα δεν βάφονται από Trypan Blue.
5. Πολλαπλασιασμός του αποτελέσματος  $\times 10^4$  λόγω του ότι η πλευρά του κάθε "τετραγώνου" είναι 1mm και η απόσταση μεταξύ του slide και του καλύμματος της είναι 0.1mm άρα  $0.1\text{mm}^3$ .
6. Πολλαπλασιασμός με 5 λόγω της αρχικής αραιώσης 1:5 από την προσθήκη Trypan Blue.
7. Η τελική τιμή που θα προκύψει είναι ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων/ml στο αρχικό κυτταρικό εναιώρημα.

### 3.3 Καλλιέργεια PBMCs

#### Υλικά και αντιδραστήρια

- Μέσο RPMI-1640
- Διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης
- Ορός εμβρύου μόσχου (FBS)
- Πλάκα κυτταρικής καλλιέργειας 24 φρεατίων
- Complete medium (10% FBS σε RPMI-1640 παρουσία 100 units/ml πενικιλίνης και 100μg/ml στρεπτομυκίνης)

#### Μέθοδος

1. Απόψυξη του εναιωρήματος των λεμφοκυττάρων από το υγρό άζωτο στους 37 °C.
2. Μεταφορά από το cryovial σε ένα falcon 15ml.
3. Πλύση με RPMI-1640 με φρένα στις 2000 rpm για 5 λεπτά ώστε να αραιωθεί το DMSO το οποίο μπορεί να είναι τοξικό για τα κύτταρα ανάλογα με την συγκέντρωση και την έκθεση σε αυτό.
4. Προσθέεται 100μl Complete medium στα κύτταρα για κάθε point που θα περιλαμβάνεται στο πείραμα και επαναιώρηση.
5. Γίνεται προσεκτική ανάδευση ώστε να πάρω περίπου ίση ποσότητα κυττάρων σε κάθε well.
6. Μεταφορά 100μl κυττάρων σε πλάκα κυτταρικής καλλιέργειας 24 φρεατίων.
7. Συμπληρώνεται μέχρι το 1ml με complete medium.
8. Προστίθενται τα αντιδραστήρια ανάλογα με το εκάστοτε πρωτόκολλο και ακολουθεί ελαφριά επαναιώρηση.
9. Οι πλάκες κυτταρικής καλλιέργειας τοποθετούνται σε επωαστήρα με συνθήκες 37 °C και 5% CO<sub>2</sub>.

#### Κυτταρικά διεγερτικά

Τα διεγερτικά που χρησιμοποιήθηκαν παραπάνω προκειμένου να επιτευχθεί η διέγερση της παραγωγής IFN-γ από τα T λεμφοκύτταρα είναι τα εξής:

- **PMA (phorbol 12-myristate 13acetate) ή TPA:** Πρόκειται για μία χημική ένωση η οποία χρησιμοποιείται για την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης (PKC), ένζυμο που συμμετέχει στη μετάδοση του μηνύματος ενεργοποίησης των T κυττάρων. Το PMA δρα σε συνεργασία με την Ιονομυκίνη. Η ουσία αυτή πρόκειται για ένα ιονοφόρο ασβεστίου που οδηγεί στην αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου, συμμετέχοντας επίσης στην μετάδοση του μηνύματος ενεργοποίησης των T κυττάρων. Η ουσίες αυτές δρουν συνεργαστικά μεταξύ τους σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα την



ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω της πρόσδεσης με TCR (T cell receptor) καθώς και την παραγωγή κυτταροκινών. [80]

- **Ιντερλευκίνη 12 ή IL12:** Πρόκειται για μια ιντερλευκίνη που παράγεται φυσιολογικά από τα μακροφάγα, ουδετερόφιλα, δενδριτικά και Β κύτταρα ως απόκριση σε κάποιο ερέθισμα. Η IL12 εμπλέκεται στην διαφοροποίηση των Τ κυττάρων σε Th1 κύτταρα και οδηγεί σε αύξηση της παραγόμενης IFN- $\gamma$  από τα Τ κύτταρα καθώς και από τα NK κύτταρα. Αυτό το κάνει μέσω πρόσδεσης στον υποδοχέα της και ενεργοποίησης στην συνέχεια του μονοπατιού JAK-STAT και ειδικά του STAT4. Σε συνεργασία με αυτήν δρα και μια άλλη ιντερλευκίνη η IL18. Αυτήν προκαλεί περαιτέρω αύξηση της IFN- $\gamma$  από τα CD4<sup>+</sup>, T, B και NK κύτταρα δρώντας μόνο στα Th1 κύτταρα. Ο μηχανισμός δράσης της είναι μέσω της ενεργοποίησης του AP1 και NF- $\kappa$ B ενώ, παράλληλα προκαλεί και up-regulation της έκφρασης του υποδοχέα της IL12, IL12Rb2. [81, 82]

**Brefeldin A:** Πρόκειται για μια αντι-ική λακτόνη που παράγεται από τον *Eurotium breffeldianum*. Η ουσία αυτή αποτελεί έναν αναστρέψιμο αναστολέα της πρωτεϊνικής μεταφοράς από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύστημα Golgi οδηγώντας σε συσσώρευση τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ο κύριος στόχος της είναι ένας παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης ο GBF1 ο οποίος αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα COP-I. Η μπρεφελντίνη αναστέλλει αναστρέψιμα την σύνδεση αυτή καθώς δεν επιτρέπει στον GBF1 να μετατρέψει το GDP σε GTP και ώστε να ενεργοποιηθεί και να μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον COP-I. Η Brefeldin χρησιμοποιείται στα *in vitro* πειράματα καθώς προκαλεί μέγιστη ανίχνευση ορισμένων κυτταροκινών οι οποίες υπό άλλες περιπτώσεις θα διέφευγαν από το κύτταρο και δεν θα μπορούσαν να ανιχνευθούν μέσω κυτταρομετρίας ροής. [83]

### 3.4 Επώαση κυττάρων με μονοκλωνικά αντισώματα και προετοιμασία κυτταρομετρίας ροής

#### Υλικά και αντιδραστήρια

- Διάλυμα χρώσης PBS με 2% FBS (staining buffer)
- Μονιμοποιητικό μέσο PFA 2% (παραφορμαλδεΐδη)
- Διάλυμα διαπερατότητας (Permeabilization buffer/ Wash buffer)
- Μονοκλωνικά αντισώματα σεσημασμένα με φθοριοχρωματά
- Πιπέττες διαφόρων μεγεθών (0.5-2μl, 2-20μl, 20-200μl, 100-1000μl)
- Ορός εμβρύου μόσχου (FBS)
- Διάλυμα PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Πλαστικά σωληνάρια τύπου eppendorf

#### Μέθοδος

1. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε κωνικά σωληνάρια τύπου Eppendorf και υπόκεινται σε φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 2 λεπτά.
2. Αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο και γίνεται πλύση με 800μl staining buffer (επαναίωση του δείγματος, φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 2 λεπτά και έπειτα αφαίρεση του υπερκειμένου).

3. Προστίθεται τα επιφανειακά αντισώματα σε κατάλληλες ποσότητες, 100μl Staining Buffer και αναδεύονται.
4. Επώαση για 30 λεπτά στους 4°C.
5. Πλύση με 800μl Staining Buffer (επαναιώρηση του δείγματος, φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 2 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου).
6. Προσθήκη 200μl 2% PFA και ανάδευση.
7. Επώαση για 10 λεπτά στους 4°C.
8. Πλύση με 800μl Staining Buffer (επαναιώρηση του δείγματος, φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 2 λεπτά και προσεκτική αφαίρεση του υπερκειμένου).
9. Επαναιώρηση σε 200μl Staining Buffer.
10. Τα κύτταρα παραμένουν στο ψυγείο για κάποιες ώρες (overnight), καθώς το πείραμα συνεχίζεται την επόμενη μέρα.
11. Πλύση με 800μl διαλύματος PBS (επαναιώρηση του δείγματος, φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 2 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου).
12. Προσθήκη 300μl permeabilization buffer και ανάδευση με χρήση vortex.
13. Επώαση για 15 λεπτά στους 4°C.
14. Πλύση με 500μl permeabilization buffer (επαναιώρηση του δείγματος, φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 2 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου).
15. Γίνεται προσθήκη των επιφανειακών αντισωμάτων σε κατάλληλες ποσότητες, 100μl permeabilization buffer και αναδεύονται.
16. Επώαση για 30 λεπτά στους 4°C.
17. Πλύση με 800μl permeabilization buffer (επαναιώρηση του δείγματος, φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 2 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου).
18. Προσθήκη διαλύματος PBS ώστε ο τελικός όγκος να είναι περίπου 250-300μl και προσεκτική ανάδευση.

Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 1**) αναγράφονται τα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό και την φαινοτύπηση κυττάρων από τους ασθενείς και τους υγιείς δότες. Όλα τα συζευγμένα αντισώματα φθοριοχρωμάτων για την ανάλυση κυτταρομετρίας ροής προμηθεύτηκαν από την BD Bioscience (San Jose, CA), BioLegend (San Diego, CA), και την Beckman Coulter (San Diego, CA).

Πίνακας 1: Φθοριοχρώματα που αξιοποιήθηκαν για φαινοτύπηση κυττάρων

Κυτταρικοί πληθυσμοί-Κυτταροκίνες	Μονοκλωνικά αντισώματα	Κλώνος	Ποσότητα (μl)
CD3+CD4+ T-κύτταρα	FITC Anti-Human CD3	UCHT1	5
	PE Anti-Human CD4	A161A1	2

CD3+CD8+ T-κύτταρα	FITC Anti-Human CD3 PE Anti-Human CD8	UCHT1 SK1	5 2
CD3+ T-κύτταρα	FITC Anti-Human CD3	UCHT1	5
NK κύτταρα	PE-Cy5 Anti-Human CD56	B159	5
NKT κύτταρα	PE-Cy5 Anti-Human CD56 FITC Anti-Human CD3	B159 UCHT1	5 5
IFN-γ	APC Anti-Human IFN-γ	4S.B3	1

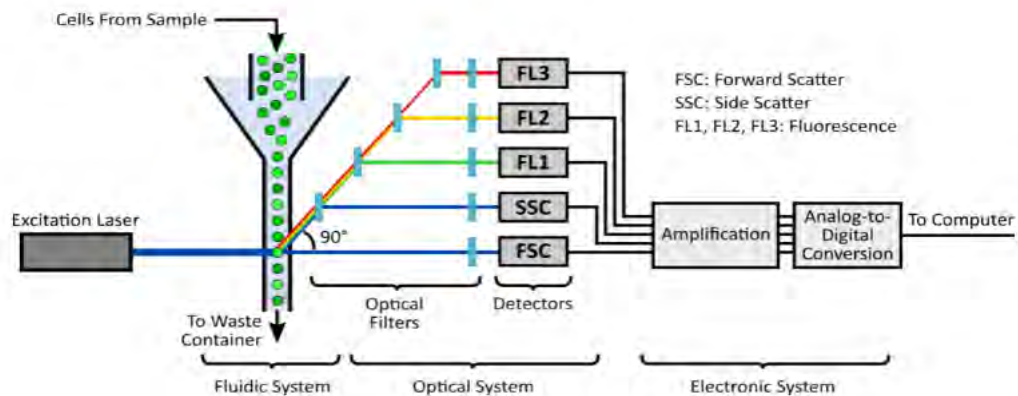
### 3.5 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο της κυτταρικής βιολογίας καθώς αξιοποιεί την χρήση ακτίνων laser για ποικίλες δράσεις. Πρόκειται για μια αυτοματοποιημένη μέθοδο για την ανίχνευση και μέτρηση πολλαπλών φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών ορισμένων σωματιδίων, όπως για παράδειγμα κυττάρων, όταν αυτά βρίσκονται σε εναιώρηση σε συνεχόμενη ροή. Ένας κυτταρομετρητής ροής επιτρέπει ταυτόχρονη πολυπαραμετρική ανάλυση έως και χιλιάδων σωματιδίων ανά δευτερόλεπτο. Οι σύγχρονοι αναλυτές έχουν εξελιχθεί ιδιαίτερα επιτρέποντας την ταυτόχρονα ανάλυση μέχρι και 30 διαφορετικών παραμέτρων ταυτόχρονα.

Για τους παραπάνω λόγους, η κυτταρομετρία ροής βρίσκει ποικίλες εφαρμογές στην έρευνα, στην κλινική πράξη και κλινικές δοκιμές. Στις χρήσεις αυτές περιλαμβάνονται τα εξής:

- Μέτρηση κυττάρων
- Διαλογή κυττάρων
- Καθορισμός κυτταρικών χαρακτηριστικών και λειτουργιών

- Ανίχνευση μικροοργανισμών
- Ανακάλυψη βιοδεικτών
- Διάγνωση ασθενειών όπως καρκίνου, λευχαιμίας κ.α.



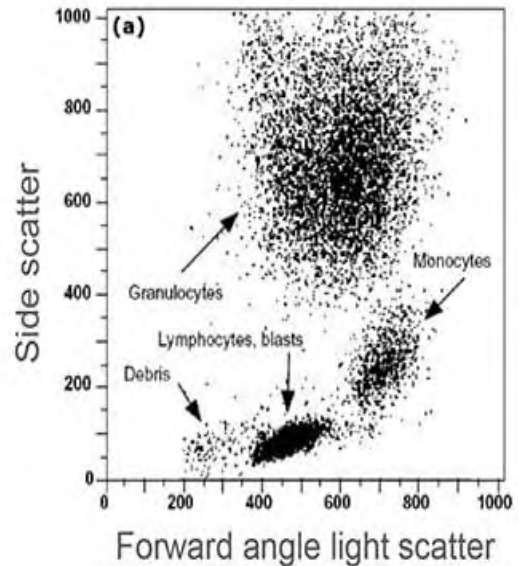
Εικόνα16: Σχηματική απεικόνιση επιμέρους τμημάτων του κυτταρομέτρου ροής. Τροποποιημένο από: S.Castillo-Hair, FlowCal software for analysis and calibration of flow cytometry data

Κάθε κυτταρόμετρο περιλαμβάνει τρία βασικά συστήματα, 1.το σύστημα ροής υγρών (υδροδυναμικό σύστημα), 2.το οπτικό σύστημα και 3.το ηλεκτρονικό (υπολογιστικό) σύστημα όπως απεικονίζονται και στην Εικόνα (16). 1. Το σύστημα ροής υγρών μεταφέρει το δείγμα από το σωλήνα δειγμάτων στον θάλαμο ροής. 2. Στο οπτικό σύστημα περιλαμβάνονται πηγή φωτός, φίλτρα και διάφοροι ανιχνευτές που είναι υπεύθυνοι για την μεταφορά του φωτός και την ανίχνευση του. 3. Τέλος, το οπτικό σύστημα είναι αυτό που ενισχύει το σήμα που ανιχνεύεται μετατρέποντας το στην συνέχεια σε ψηφιακή μορφή η οποία καθίσταται διαχειρίσιμη για μελλοντική ανάλυση της. Έτσι, τα εναιωρήση κύτταρα κινούνται με σταθερή ταχύτητα σε ροή περνώντας μέσα από μια συσκευή οπτικών και ηλεκτρικών σημάτων. Η ανάλυση των δειγμάτων επιτυγχάνεται μέσω του σκεδασμού του φωτός σε συνδυασμό με τον φθορισμό που υπάρχει λόγω σήμανσης με φθορίζουσες ουσίες. Η πρόπτωση της δέσμης λέιζερ πάνω στα κύτταρα προκαλεί το φαινόμενο του σκεδασμού φωτός (σκεδασμός κατά Rayleigh–Debye–Gans). Τέλος, ως φωτοανιχνευτές υπάρχουν ορισμένες φωτοδιόδοι οι οποίες μετατρέπουν το φως σε ηλεκτρικούς παλμούς που θα καταλήξει τελικά να μετατραπεί σε ψηφιακή μορφή.

Στην παρούσα μελέτη, για την κυτταρομετρική ανάλυση των δειγμάτων εφαρμόστηκε τετραπλός άμεσος ανοσοφθορισμός. Για την πραγματοποίηση αυτού χρησιμοποιήθηκε ο κυτταρομετρικής ροής Guava easyCyte™ της Millipore-Merck ο οποίος φαίνεται στην εικόνα17 και για την επιμέρους ανάλυση των δεδομένων τα λογισμικά Guava InCyte και FlowJo. Σε κάθε ανάλυση, η εγκυρότητα της λειτουργικότητας ελεγχόταν με το guava easyCheck™ Kit. Μιας και πρόκειται για κύτταρα περιφερικού αίματος υπάρχουν διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί στο δείγμα μας όπως των ουδετερόφιλων, μονοκύτταρων, αιμοπεταλίων και συσσωματωμάτων ερυθρών (debris) (Εικόνα18). Για την διαλογή του λεμφοκυτταρικού πληθυσμού βασιστήκαμε στις παραμέτρους πρόσθιας (forward-scattered light/FSC) και πλάγιας (side-scattered light/SSC) σκέδασης. [84, 85]



Εικόνα17: Κυτταρομετρητής ροής Guava easyCyte™ Merck-Millipore.



Εικόνα18: Διάγραμμα πρόσθιας(Forward, FSC) και πλάγιας (Side,SSC) σκέδασης. Τροποποιημένο από: Riley and et al, Principles and applications of Flow Cytometry

Τέλος, τα αποτελέσματα της ανάλυσης απεικονίζονται κυρίως με στικτογράμματα ή κυτταροδιαγράμματα(dot plots) καθώς και με περιμετρικά διαγράμματα ή νεφελοδιαγράμματα (contour plot).

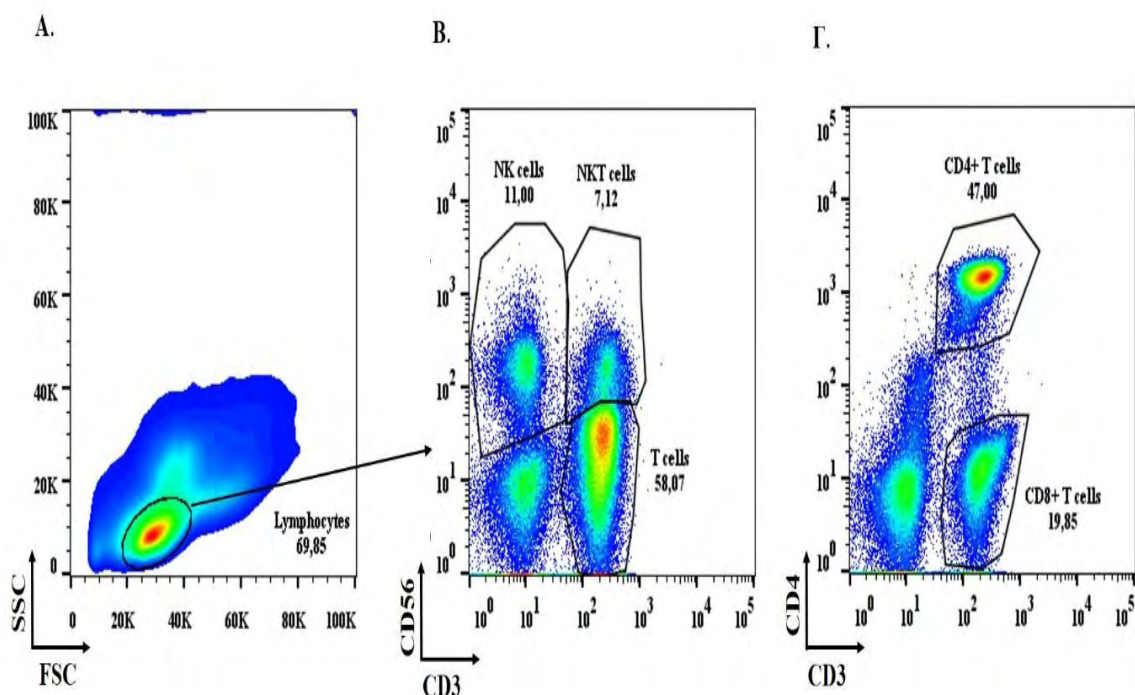
### 3.6 Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των δεδομένων, για κάθε άτομο το ποσοστό των κυττάρων που φέρουν συγκεκριμένους δείκτες καθώς και το MFI τους θεωρείται ως ο μέσος όρος ή η μέση τιμή του κάθε ατόμου σε κάθε ομάδα. Η διακύμανση σε κάθε ομάδα ασθενών ορίστηκε μέσω σταθερής απόκλισης (Standard Deviation, SD) και το σφάλμα ορίστηκε μέσω της σταθερής απόκλισης λάθους (Standard Error of the Mean, SEM).Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων ασθενών και των υγιών ατόμων υπολογίστηκαν με την μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης ANOVA. Στατιστικά σημαντικές τιμές θεωρήθηκαν οι τιμές που παρουσίασαν  $p \leq 0.05$ . Οι στατιστικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με GraphPad Prism.

## 4.Αποτελέσματα

### Φαινοτυπικός προσδιορισμός λεμφοκυτταρικών πληθυσμών με χρήση κυτταρομετρίας ροής

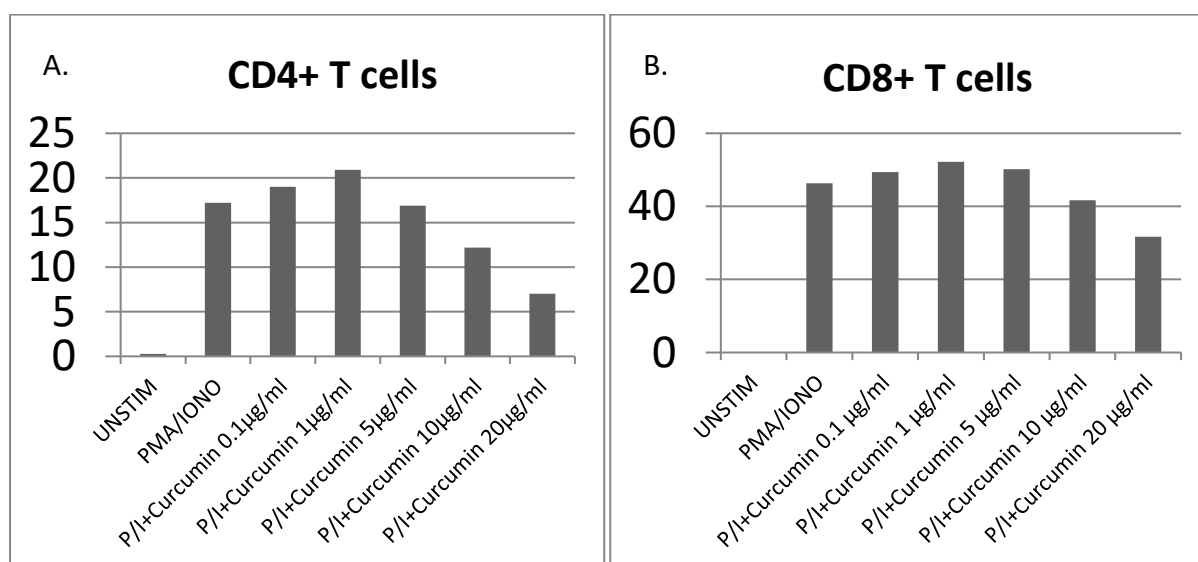
PBMCs τόσο από υγιείς δότες όσο και από ασθενείς με Ps ή/και με PsA επώαστηκαν παρουσία ειδικών συζευγμένων με φθοριοχρώματα μονοκλωνικών αντισωμάτων (όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 1) και έπειτα τα κύτταρα αυτά αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Μέσω των φαινοτυπικών επιτόπων τους έγινε ο προσδιορισμός των T βοηθητικών λευκοκυττάρων, των T κυτταροτοξικών λευκοκυττάρων, των φυσικών φονέων (NK) και των NKT λευκοκυττάρων (Εικόνα 19). Βάση της πρόσθιας (FSC-Forward Scatter) και πλάγιας (SSC-Side Scatter) σκέδασης γίνεται επιλογή των βιώσιμων λεμφοκυττάρων (Lymphocyte gate) με μια στρατηγική που λέγεται "gating" τα οποία μετά μπορούν να αναλυθούν με βάση τους φαινοτυπικούς επιτόπους. Με τους επιτόπους CD56/CD3 είναι δυνατός ο προσδιορισμός των NK κυττάρων CD56+CD3- και των NKT κυττάρων CD56+CD3+, ενώ με τους επιτόπους CD4/CD3 είναι δυνατός ο προσδιορισμός των CD4+ T κυττάρων αλλά και των CD8+ T κυττάρων καθώς αυτά είναι CD4-CD3+. Επίσης, ο προσδιορισμός των CD4 και CD8 έγινε και με χρήση του επιτόπου CD8.



**Εικόνα 3.1:** Αντιπροσωπευτική φαινοτυπική ανάλυση και υπο-ταξινόμηση (sub-gating) κυτταρικών πληθυσμών περιφερικού αίματος υγιών μαρτύρων. (A) Επιλογή των βιώσιμων λεμφοκυττάρων. (B) Φαινοτυπική ανάλυση για τον χαρακτηρισμό NK και NKT κυττάρων. (Γ) Φαινοτυπική ανάλυση για τον χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση CD+4 και CD+8 κυττάρων.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων (dose response) κουρκουμίνης στην παραγωγή IFN- $\gamma$  από T λεμφοκύτταρα έπειτα από διέγερση με PMA/IONOMYCIN.

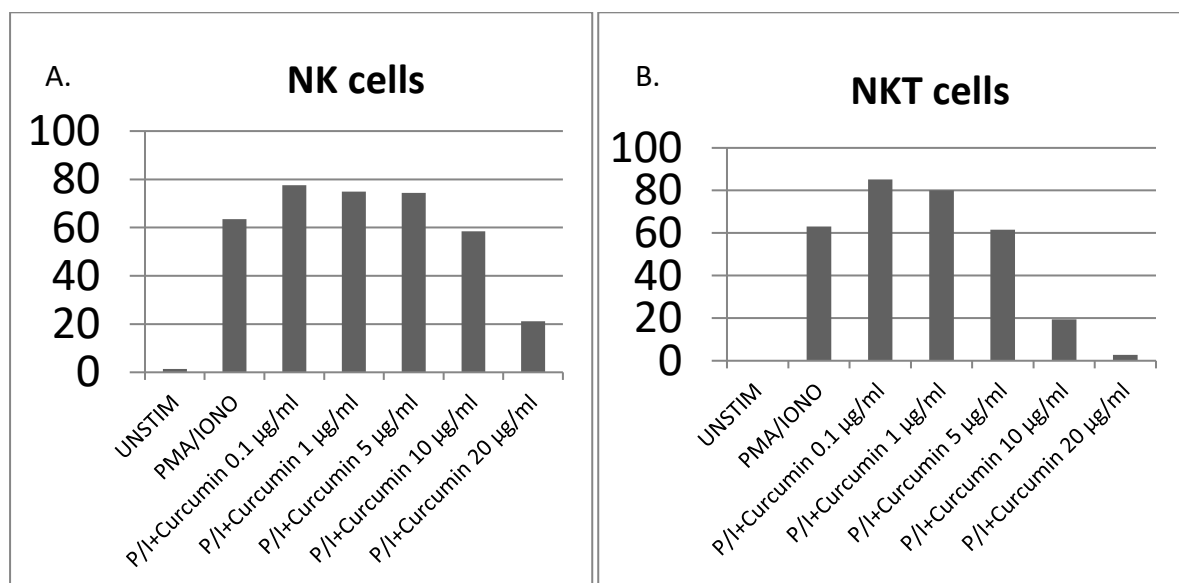
Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα η δοσολογία της κουρκουμίνης που χρησιμοποιείται σε *in vitro* αλλά και *in vivo* πειράματα κυμαίνεται μεταξύ των 0.1 $\mu$ g/ml-20 $\mu$ g/ml. Επομένως, πριν την διενέργεια οποιουδήποτε πειράματος σε ασθενείς πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα σε διάφορες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης για τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης κουρκουμίνης που θα έχει την μέγιστη επίδραση στα επίπεδα της IFN- $\gamma$  από τους λευκοκυτταρικούς πληθυσμούς που μελετήθηκαν. Η κουρκουμίνη για τον έλεγχο της συνθήκης αυτής προστέθηκε την ίδια χρονική στιγμή με τον διεγέρτη των κυττάρων είτε αυτός είναι το PMA/IONOMYCIN είτε είναι η IL12/18. Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα που φαίνεται η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων κουρκουμίνης στους πληθυσμούς των CD4+ T κυττάρων καθώς και των CD8+ T κυττάρων σε κύτταρα ενός υγιούς μάρτυρα κουρκουμίνης.



**Εικόνα 3.2** Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων κουρκουμίνης (A) στα CD4+ T κύτταρα και (B) στα CD8+ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN.

Αρχικά, ξεκινώντας με τα CD4+ T κύτταρα είναι διακριτό από την Εικόνα 3.2 ότι στις χαμηλές συγκεντρώσεις η κουρκουμίνη δεν αναστέλλει το ποσοστό των κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$ . Αντίθετα, στις αυξημένες συγκεντρώσεις, των 10 $\mu$ g/ml και των 20 $\mu$ g/ml παρατηρείται μεγάλη πτώση μέχρι και 59%. Αντίστοιχα και στα CD8+ T κύτταρα παρατηρούνται τα ίδια συμπεράσματα. Αρχικά, το ποσοστό των κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$  δεν μειώνεται στις χαμηλές συγκεντρώσεις κουρκουμίνης όμως στις συγκεντρώσεις των 10 $\mu$ g/ml και των 20 $\mu$ g/ml το ποσοστό των CD8+ T κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$  μειώνεται μέχρι και 35%.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων (dose response) κουρκουμίνης στην παραγωγή IFN- $\gamma$  από τα NK και NKT κύτταρα έπειτα από διέγερση με PMA/IONOMYCIN.



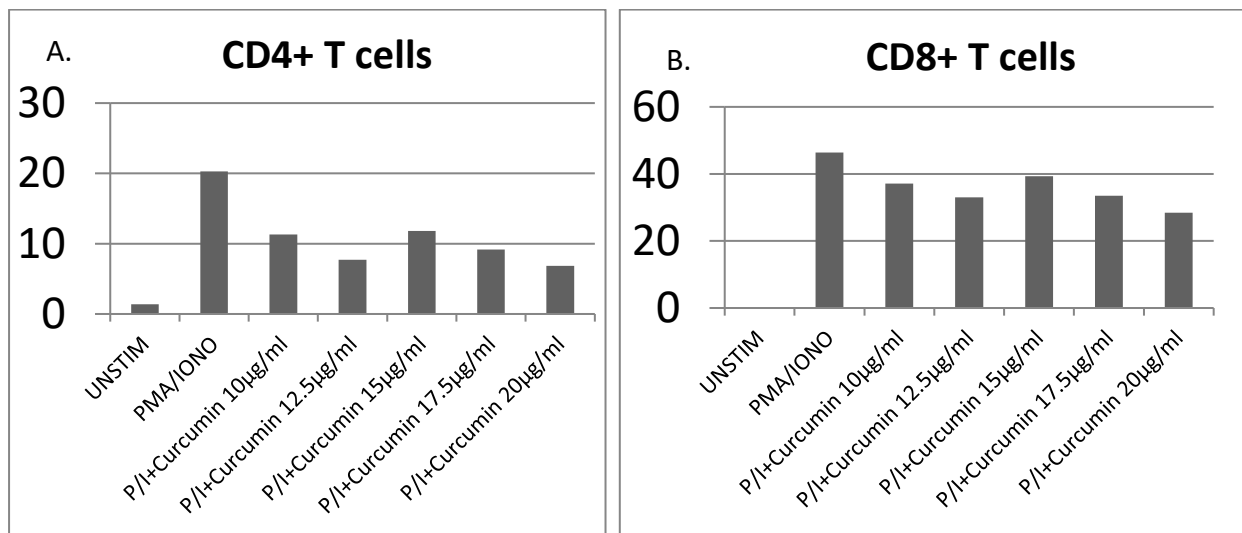
**Εικόνα 3.3** Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων κουρκουμίνης (A) στα NK και (B) στα NKT κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με τον διεγέρτη PMA/IONOMYCIN.

Αντίστοιχα με τα T λεμφοκύτταρα και στους υπόλοιπους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς στα NK και NKT κύτταρα παρατηρείται μεγάλη πτώση των κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$ . Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3 στις χαμηλές συγκεντρώσεις των 0.1µg/ml, 1µg/ml και 5µg/ml η κουρκουμίνη δεν προκαλεί αναστολή των επιπέδων της IFN- $\gamma$ , ενώ όμως στις συγκεντρώσεις των 10µg/ml και 20µg/ml η κουρκουμίνη προκαλεί αναστολή η οποία μπορεί να φτάσει στα NK μέχρι και στο 67%, ενώ στα NKT μέχρι και στο 90%.

Επίδραση περαιτέρω διαφορετικών συγκεντρώσεων (dose response) κουρκουμίνης στην παραγωγή IFN- $\gamma$  από T λεμφοκύτταρα έπειτα από διέγερση με PMA/IONOMYCIN.

Έπειτα από την πρώτη διαβάθμιση συγκέντρωσης πραγματοποιήθηκε μια περαιτέρω διαβάθμιση συγκέντρωσης ανάμεσα στις συγκεντρώσεις που φάνηκε η κουρκουμίνη να ασκεί καλύτερα την επίδραση της, δηλαδή ανάμεσα στα 10µg/ml και στα 20µg/ml. Οι συγκεντρώσεις που ελέχθησαν στην περίπτωση αυτήν ήταν τα 10, 12.5, 15, 17.5 και 20µg/ml και το πείραμα έγινε για τους ίδιους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς όπως και πριν οι οποίοι διεγέρθηκαν με PMA/IONO.

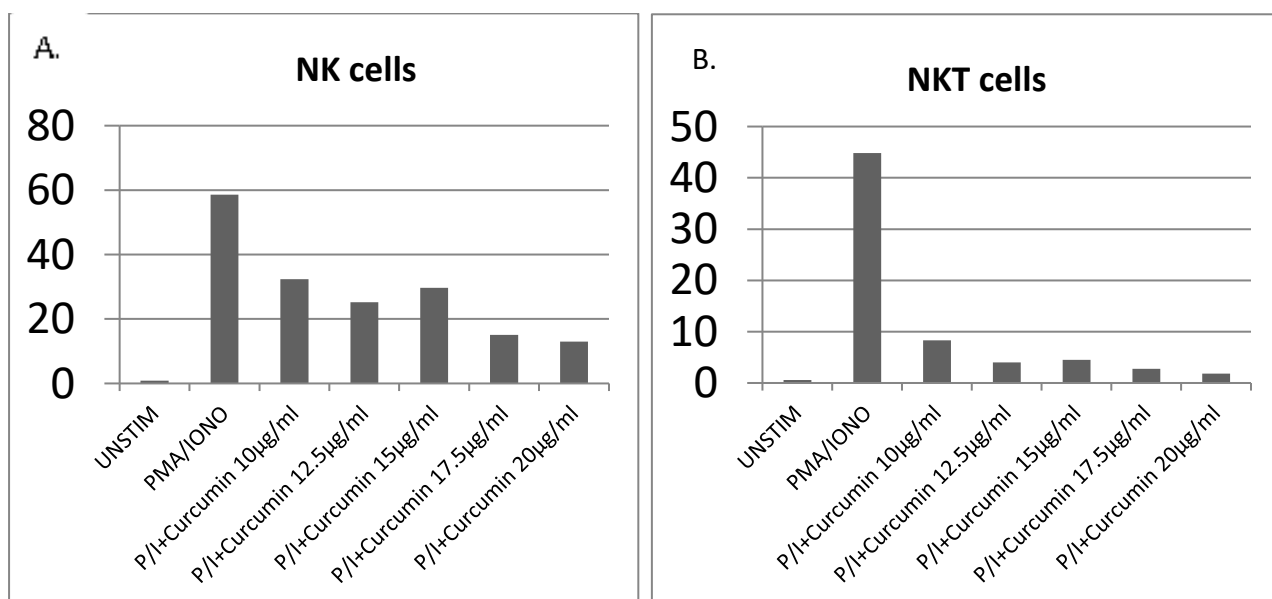




**Εικόνα 3.4** Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων κουρκουμίνης (A) στα CD4+ T κύτταρα και (B) στα CD8+ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την περαιτέρω διαβάθμιση συγκέντρωσης είναι συγκρίσιμα με τα προηγούμενα. Σύμφωνα με τα αυτά από την συγκέντρωση των 10µg/ml η κουρκουμίνη ασκεί καλύτερα την δράση της. Όπως είναι διακριτό η αναστολή της παραγωγής της IFN-γ που προκαλείται από τις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις των 12.5, 15 και 17.5µg/ml είναι παρόμοια και για τις τρεις συγκεντρώσεις με μικρή διαφορά κάτι που μας κάνει να υποθέσουμε ότι ενδεχομένως να δημιουργείται ένα πλατώ στις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις αυτές. Όπως και προηγουμένως η μεγαλύτερη αναστολή παρουσιάζεται στα 20µg/ml είτε αναφερόμαστε στον πληθυσμό των CD4+ είτε των CD8+ T κυττάρων. Με τα αποτελέσματα για την αναστολή να είναι όπως και προηγουμένως στα CD4+ της τάξης του 65% ενώ στα CD8+ της τάξης του 30%.

Επίδραση περαιτέρω διαφορετικών συγκεντρώσεων (dose response) κουρκουμίνης στην παραγωγή IFN-γ από τα NK και NKT κύτταρα έπειτα από διέγερση με PMA/IONOMYCIN.

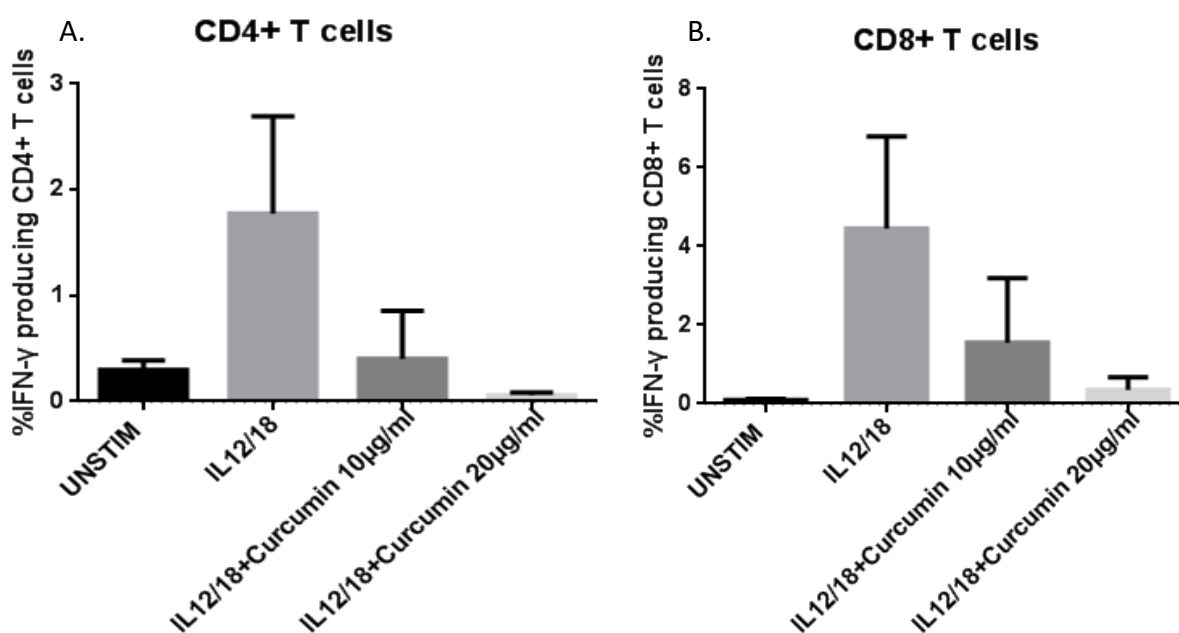


**Εικόνα 3.5** Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων κουρκουμίνης (A) στα NK και (B) στα NKT κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με τον διεγέρτη PMA/IONOMYCIN.

Αντίστοιχα συμπεράσματα με τα T λεμφοκύτταρα παρατηρούνται και στους υπόλοιπους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς. Έτσι, προκύπτει και από την Εικόνα 3.5 ότι η αναστολή που προκαλείται από τις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις είναι σχετικά παρόμοια και στις τρεις αυτές συγκεντρώσεις. Η μεγαλύτερη αναστολή παρατηρείται στα 20μg/ml με το ποσοστό αυτής να φτάνει μέχρι και στα 77% για τα NK κύτταρα και στα 90% για τα NKT κύτταρα.

Ωστόσο, κάτι το οποίο θα πρέπει να αναφερθεί στο σημείο αυτό είναι ότι τα 20μg/ml αποτελεί μια ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση και η οποία όπως φαίνεται προκαλεί αυξημένο κυτταρικό θάνατο. Για το λόγο αυτό καθώς τα ποσοστά της αναστολής είναι συγκρίσιμα τόσο για τις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις όσο και για τα 10μg/ml επιλέχθηκε ως η βέλτιστη συγκέντρωση κουρκουμίνης τα 10μg/ml όπου ελαχιστοποιείται ο κυτταρικός θάνατος ενώ παράλληλα διατηρείται αυτήν η σημαντική δράση της κουρκουμίνης.

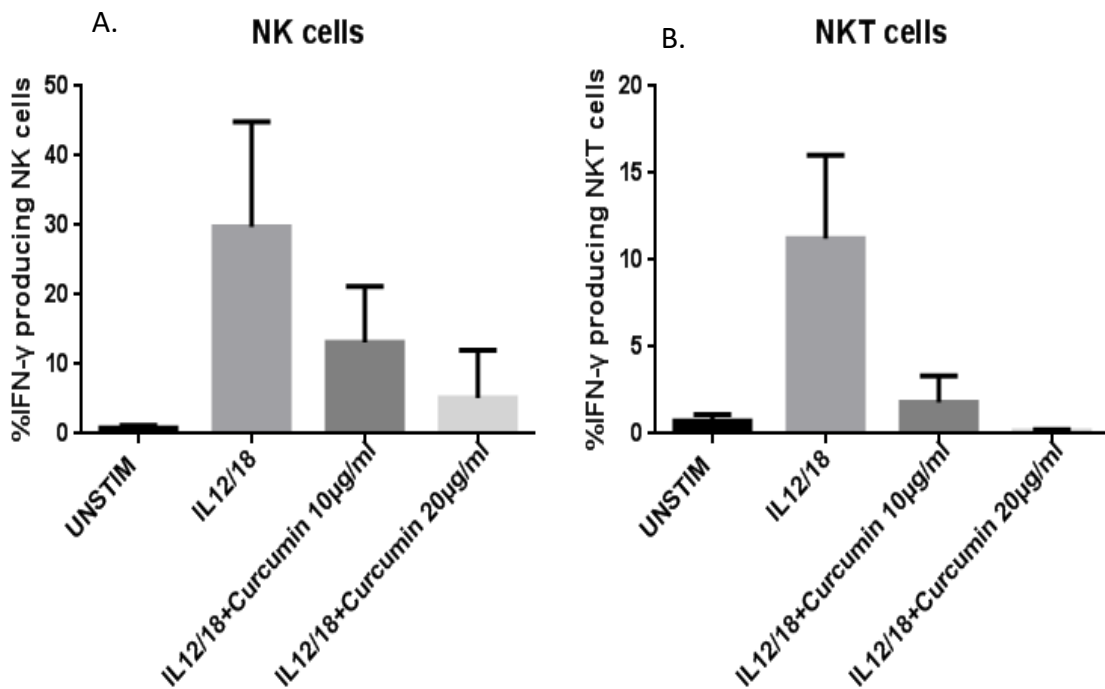
Επίδραση συγκεντρώσεων κουρκουμίνης στην παραγωγή της IFN-γ από τα CD4+ και CD8+ T κύτταρα έπειτα από διέγερση με IL-12 /18



**Εικόνα 3.6** Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης βέλτιστων συγκεντρώσεων κουρκουμίνης (A) στα CD4+ και (B) στα CD8+ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με τον διεγέρτη IL-12/18.

Για να διευκρινιστεί η καλύτερη ουσία διέγερσης των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε πέρα από το PMA/Ιονομυκίνη που αποτελεί ένα χημικό ερέθισμα και η ενεργοποίηση των κυττάρων με ένα φυσιολογικό ερέθισμα όπως είναι η IL-12/18. Από την Εικόνα 3.6 φαίνεται ότι και με την χρήση της IL-12/18 ως διεγέρτη η δράση της κουρκουμίνης παραμένει όπως και με το PMA/Ιονομυκίνη. Πιο συγκεκριμένα, τόσο με τα 10μg/ml όσο και με τα 20μg/ml υπάρχει σημαντική πτώση του ποσοστού τόσο των CD4+ όσο και των CD8+ T κυττάρων που παράγουν IFN-γ. Η αναστολή αυτή για τα CD4+ κυμαίνεται στο 80% για την συγκέντρωση των 10μg/ml και στο 95% για τα 20μg/ml. Ενώ, όσον αφορά τα CD8+ T κύτταρα η αναστολή είναι της τάξης του 65% και 95% αντίστοιχα.

Επίδραση συγκεντρώσεων κουρκουμίνης στην παραγωγή της IFN- $\gamma$  από τα NK και NKT κύτταρα έπειτα από διέγερση με IL-12/18



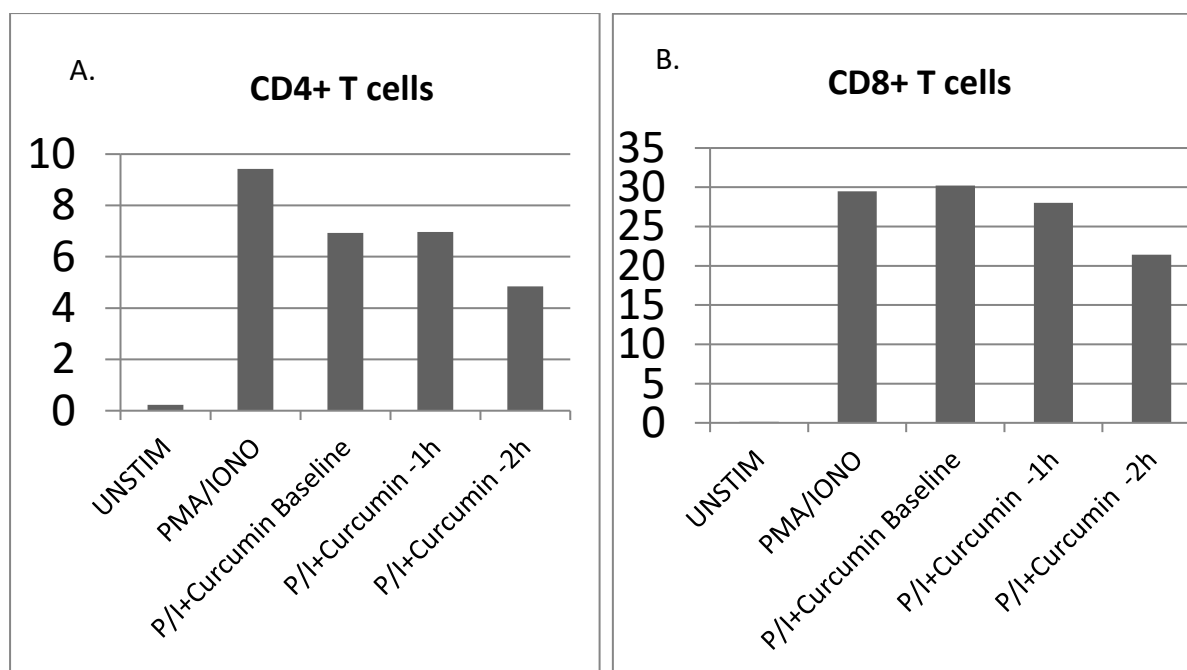
**Εικόνα 3.7** Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης βέλτιστων συγκεντρώσεων κουρκουμίνης (A) στα NK και (B) στα NKT κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με τον διεγέρτη IL-12/18.

Το ίδιο πείραμα για την μελέτη της επίδρασης της κουρκουμίνης στην IFN- $\gamma$  με τον διεγέρτη IL-12/18 πραγματοποιήθηκε και για τους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς των NK και NKT κυττάρων. Όπως είναι διακριτό στην Εικόνα 3.7 και για τους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς αυτούς η κουρκουμίνη ασκεί παρόμοια δράση παρά την αλλαγή του διεγέρτη των κυττάρων. Υπάρχει δηλαδή μία αναστολή για τα NK κύτταρα της τάξης του 55% στα 10 $\mu\text{g/ml}$ , ενώ για τα 20 $\mu\text{g/ml}$  είναι της τάξης του 80%. Όμοια με τα NK και στα NKT υπάρχει σημαντική αναστολή που φτάνει στο 90% για τα 10 $\mu\text{g/ml}$  και στο 95% για τα 20 $\mu\text{g/ml}$ .

Επομένως, και με την χρήση της IL-12/18 ως διεγέρτη για την παραγωγή IFN- $\gamma$  από τους κυτταρικούς πληθυσμούς μπορεί να φανεί η δράση της κουρκουμίνης στην IFN- $\gamma$ . Ωστόσο, στην περίπτωση αυτήν προκύπτει ένα πρόβλημα. Το πρόβλημα αυτό είναι η δυσκολία να δειχθεί η δράση της κουρκουμίνης λόγω της χαμηλής παραγωγής IFN- $\gamma$  που προκαλείται από αυτόν τον διεγέρτη. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτού είναι στα CD4+ T κύτταρα όπου το ποσοστό των κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$  κυμαίνεται στα 17.5-20% όταν διεγερθούν με PMA/Ionomycin, ενώ το ποσοστό αυτό φτάνει μόλις το 1.5-2% όταν ως διεγέρτης χρησιμοποιηθεί η IL-12/18. Για το λόγο αυτό το PMA/Ionomycin θεωρήθηκε ως ο βέλτιστος διεγέρτης για την παραγωγή IFN- $\gamma$  από τους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς που μελετήθηκαν.

Επίδραση κουρκουμίνης προστιθέμενης σε διάφορες ώρες πριν τον διεγέρτη στην παραγωγή της IFN- $\gamma$  από τα CD4+ και CD8+ T κύτταρα έπειτα από διέγερση με PMA/Ionomycin.

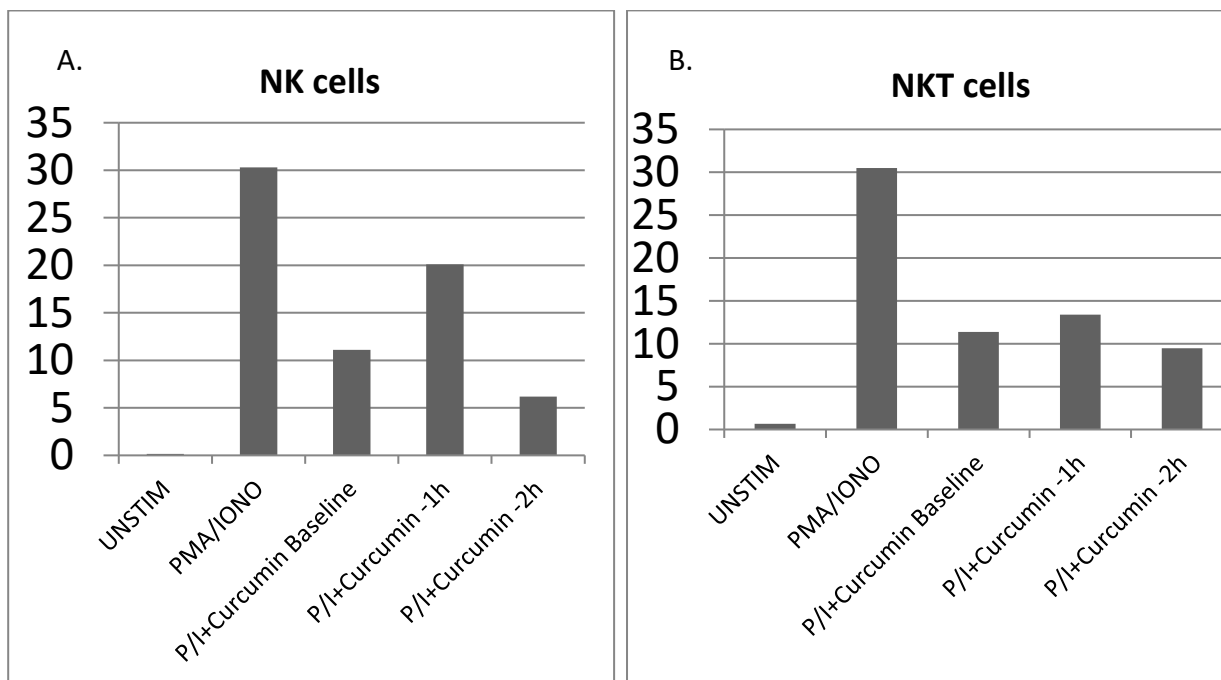
Μία τρίτη παράμετρος που θα έπρεπε να μελετηθεί, πέρα από την συγκέντρωση της κουρκουμίνης και την ουσία με την οποία θα διεγερθούν τα κύτταρα για να παραγάγουν IFN- $\gamma$ , είναι ο χρόνος επώασης των κυττάρων με την κουρκουμίνη. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε πείραμα όπου η κουρκουμίνη στα 10 $\mu$ g/ml, που όπως αναφέρθηκε θεωρήθηκε ως η βέλτιστη συγκέντρωση, προστέθηκε σε διαφορετικές χρονικές περιόδους στην καλλιέργεια. Έτσι, η κουρκουμίνη προστέθηκε είτε δύο ώρες προτού των διεγέρτη είτε μία ώρα προτού τον διεγέρτη είτε ταυτόχρονα με τον διεγέρτη. Από το πείραμα αυτό προκύπτουν οι Εικόνες 3.8 και 3.9.



**Εικόνα 3.8** Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης κουρκουμίνης προστιθέμενης σε διαφορετικούς χρόνους (A) στα CD4+ και (B) στα CD8+ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με τον διεγέρτη PMA/Ionomycin.

Από την Εικόνα 3.8 φαίνεται μία πτώση του ποσοστού των κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$  και η οποία παρουσιάζεται τόσο στα CD4+ όσο και στα CD8+ T λεμφοκύτταρα. Η αναστολή αυτήν παρατηρείται σε όλες τις χρονικές περιόδους με την μέγιστη τιμή της όμως να είναι στις δύο ώρες προτού την προσθήκη του διεγέρτη. Αυτήν η αναστολή για τα CD4+ ανέρχεται στο 49%, ενώ για τα CD8+ T λεμφοκύτταρα στο 32%.

Επίδραση κουρκουμίνης προστιθέμενης σε διάφορες ώρες πριν τον διεγέρτη στην παραγωγή της IFN- $\gamma$  από τα NK και NKT κύτταρα έπειτα από διέγερση με PMA/Ionomycin.



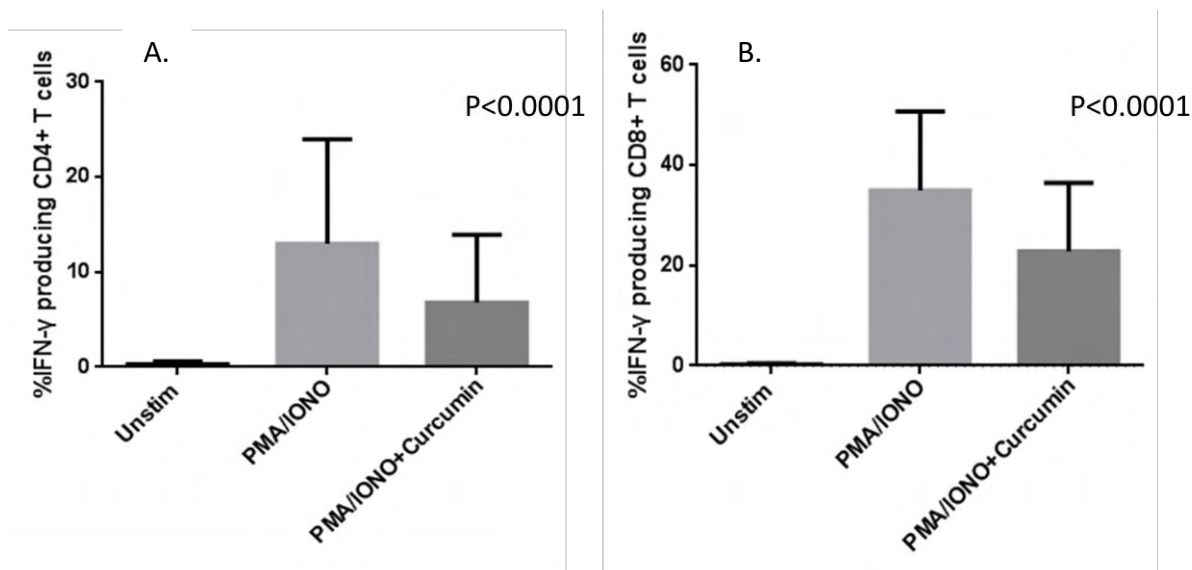
**Εικόνα 3.9** Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης κουρκουμίνης προστιθέμενης σε διαφορετικούς χρόνους (A) στα NK και (B) στα NKT κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με τον διεγέρτη PMA/Ionomycin.

Παρόμοια αποτελέσματα με τους T λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς υπάρχουν και από την Εικόνα 3.9 τόσο για τα NK όσο και για τα NKT. Στην εικόνα αυτήν παρουσιάζεται πτώση του ποσοστού των κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$  τόσο για τα NK όσο και για τα NKT σε όλες τις χρονικές περιόδους. Ωστόσο, η μεγαλύτερη αναστολή παρουσιάζεται στις δύο ώρες πριν την προσθήκη του διεγέρτη, με αυτήν να ανέρχεται στο 80% για τα NK κύτταρα και στο 69% για τα NKT κύτταρα. Επομένως, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκε ως βέλτιστος χρόνος επώασης των κυττάρων με την κουρκουμίνη οι δύο ώρες πριν την προσθήκη του διεγέρτη.

Συνοπτικά, οι βέλτιστες συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν και είναι αυτές στις οποίες η κουρκουμίνη ασκεί την βέλτιστη δράση της είναι οι εξής:

- Η συγκέντρωση της με την καλύτερη δράση είναι τα 10 $\mu$ g/ml.
- Ο διεγέρτης με τον οποίο η παραγωγή της IFN- $\gamma$  είναι επαρκής για να δούμε την δράση της κουρκουμίνης είναι το PMA/Ionomycin.
- Ο χρόνος επώασης με την κουρκουμίνη είναι δύο ώρες προτού την προσθήκη του διεγέρτη.

Επίδραση βέλτιστων συνθηκών κουρκουμίνης στην παραγωγή IFN- $\gamma$  από CD4+ και CD8+ T κύτταρα ασθενών με Ps έπειτα απο διέγερση με PMA και ιονομυκίνη

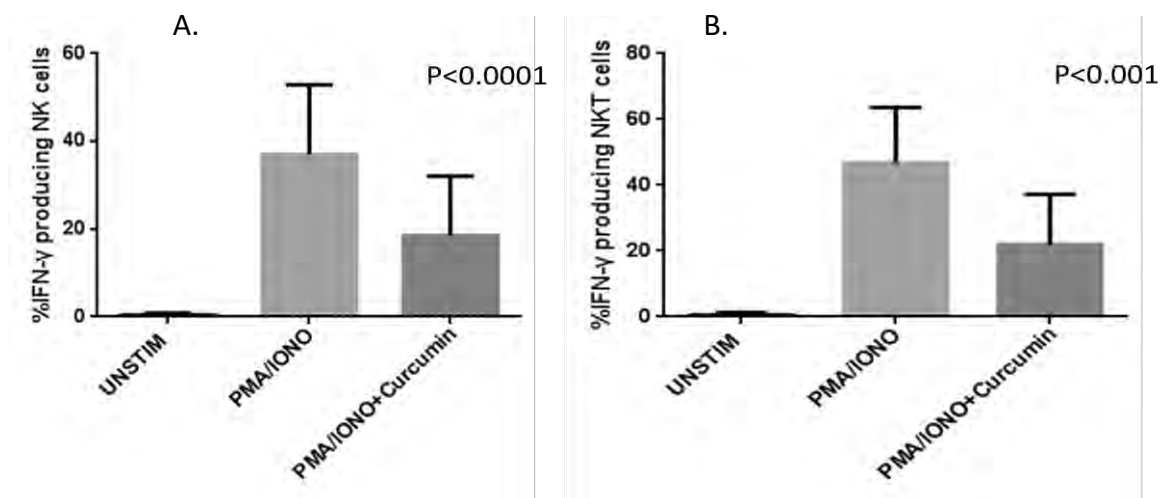


**Εικόνα 3.10** Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης κουρκουμίνης σε δότες που πάσχουν από Ps στις βέλτιστες συνθήκες (A) στα CD4+ και (B) στα CD8+ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με τον διεγέρτη PMA/Ionomycin.

Όσον αφορά τόσο τα CD4+ T κύτταρα όσο και τα CD8+ T κύτταρα ασθενών που έπασχαν από ψωρίαση (n=25) παρατηρείται μία στατιστικά σημαντική πτώση της παραγωγής της IFN- $\gamma$  όπως είναι αντιληπτό και από την Εικόνα 3.10 όταν προστίθεται η κουρκουμίνη στην βέλτιστη συγκέντρωση των 10 $\mu$ g/ml. Η αναστολή της παραγωγής της IFN- $\gamma$  είναι της τάξης του 48% σε δείγμα ασθενών που πάσχουν από ψωρίαση n=25 με

P value<0.0001. Ενώ, για τα CD8+ T κύτταρα η αναστολή του ποσοστού των κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$  είναι της τάξης του 35% με στατιστική σημαντικότητα P value<0.0001.

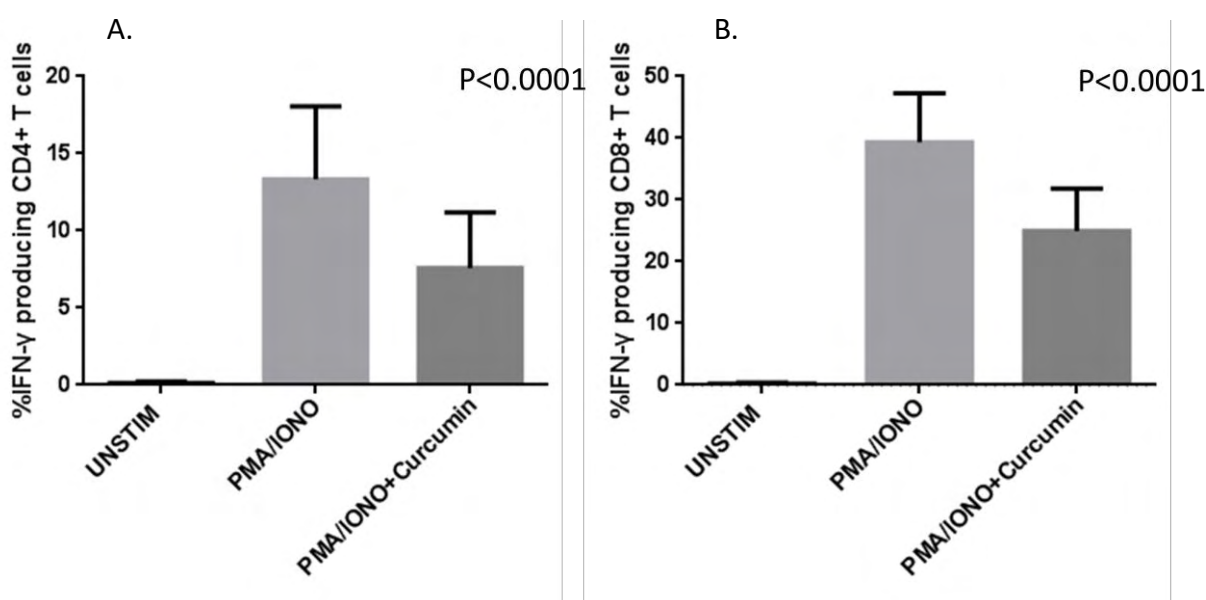
Επίδραση βέλτιστων συνθηκών κουρκουμίνης στην παραγωγή IFN- $\gamma$  από NK και NKT κύτταρα ασθενών με Ps έπειτα απο διέγερση με PMA και ιονομυκίνη



**Εικόνα 3.11** Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης κουρκουμίνης σε δότες που πάσχουν από Ps στις βέλτιστες συνθήκες (A) στα NK και (B) στα NKT κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με τον διεγέρτη PMA/Ionomycin.

Αντίστοιχα συμπεράσματα με τους T λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς παρατηρούνται και στους NK και NKT κυτταρικούς πληθυσμούς ασθενών που έπασχαν από ψωρίαση (n=25). Στους δύο πληθυσμούς αυτούς φαίνεται ότι υπάρχει μια στατιστικά σημαντική πτώση του ποσοστού των κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$ . Η πτώση αυτήν όσων αφορά τα NK κύτταρα ανέρχεται στο ποσοστό του 50% με στατιστική σημαντικότητα P value<0.0001. Αντίστοιχα, αυξημένη είναι και η αναστολή όσων αφορά τα NKT κύτταρα η οποία ανέρχεται στο 53% με στατιστική σημαντικότητα P value<0.001.

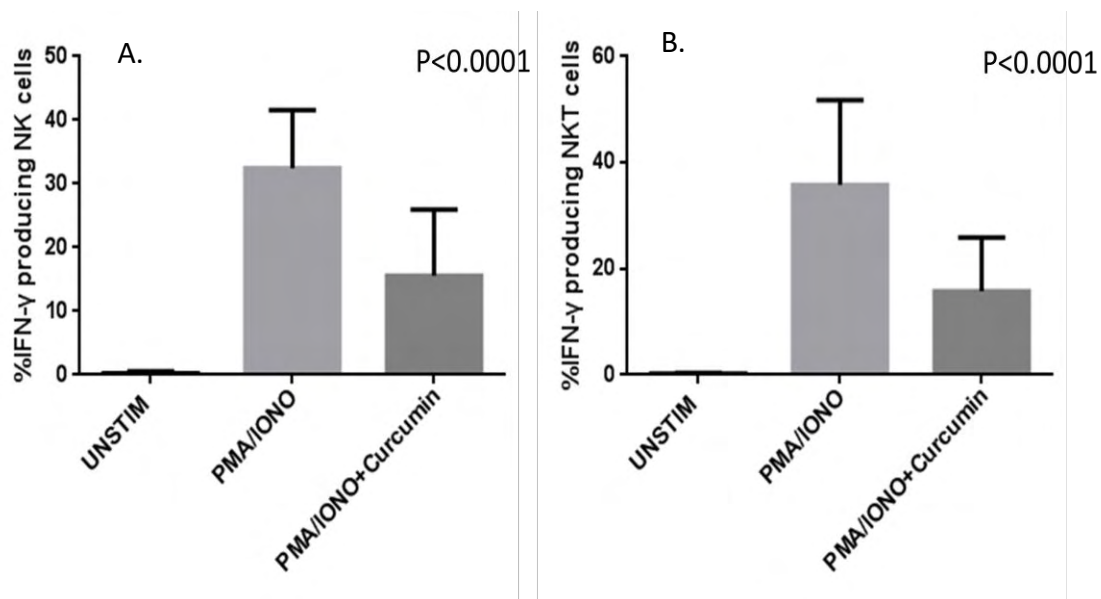
Επίδραση βέλτιστων συνθηκών κουρκουμίνης στην παραγωγή IFN- $\gamma$  από CD4+ και CD8+ T κύτταρα ασθενών με PsA έπειτα απο διέγερση με PMA και ιονομυκίνη



**Εικόνα 3.12** Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης κουρκουμίνης σε δότες που πάσχουν από PsA στις βέλτιστες συνθήκες (A) στα CD4+ και (B) στα CD8+ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με τον διεγέρτη PMA/Ionomycin.

Όπως και στους ασθενείς με ψωρίαση έτσι και σε αυτούς με ψωριασική αρθρίτιδα (n=10) παρατηρούνται συγκρίσιμα αποτελέσματα όσων αφορά την δράση της κουρκουμίνης στους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς που μελετήθηκαν. Αρχικά, όπως είναι διακριτό στην Εικόνα 3.12 υπάρχει μια στατιστικά σημαντική πτώση του ποσοστού των CD4+ T κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$  με στατιστική σημαντικότητα P value<0.0001. Η αναστολή αυτήν είναι της τάξης του 44%. Παρόμοια αποτελέσματα υπάρχουν και για τα CD8+ T κύτταρα. Σε αυτόν τον λεμφοκυτταρικό πληθυσμό επίσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική πτώση του ποσοστού των κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$  με στατιστική σημαντικότητα P value<0.0001. Η αναστολή αυτήν ανέρχεται στο 37%.

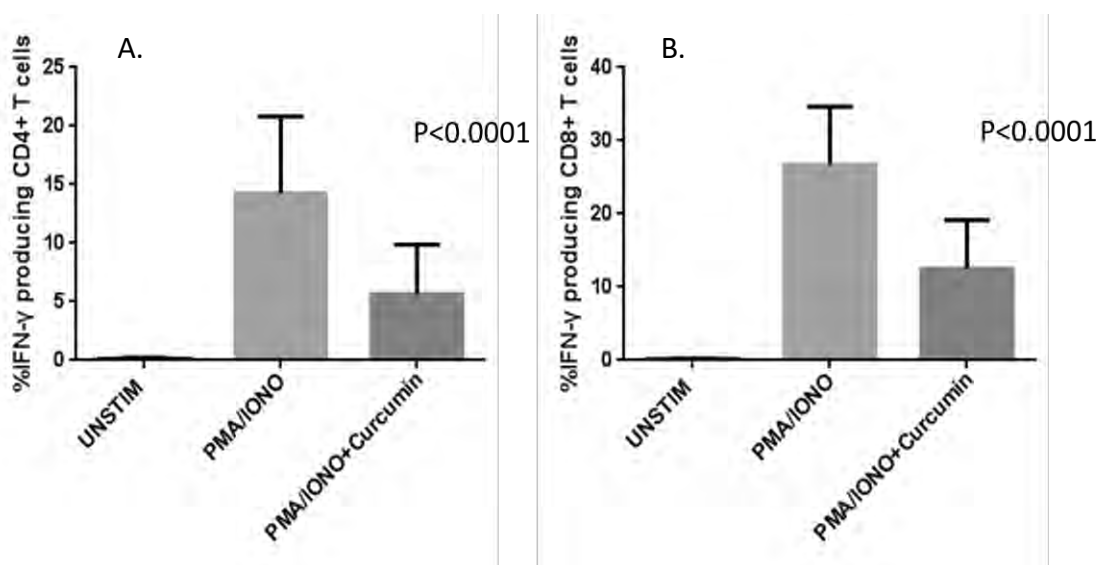
Επίδραση βέλτιστων συνθηκών κουρκουμίνης στην παραγωγή IFN- $\gamma$  από NK και NKT κύτταρα ασθενών με PsA έπειτα απο διέγερση με PMA και ιονομυκίνη



**Εικόνα 3.13** Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης κουρκουμίνης σε δότες που πάσχουν από PsA στις βέλτιστες συνθήκες (A) στα NK και (B) στα NKT κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με τον διεγέρτη PMA/Ionomycin.

Πέρα των T λεμφοκυτταρικών πληθυσμών παρόμοια δράση της κουρκουμίνης βρέθηκε και στους κυτταρικούς πληθυσμούς των NK και NKT κυττάρων ασθενών n=10 που έπασχαν από ψωριασική αρθρίτιδα. Σύμφωνα με την Εικόνα 3.13 υπάρχει μια στατιστικά σημαντική πτώση P value<0.0001 του ποσοστού των κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$  τόσο από τα NK όσο και από τα NKT κύτταρα. Με την αναστολή αυτήν να είναι της τάξης του 52% για τα NK και της τάξης του 57% για τα NKT κύτταρα.

Επίδραση βέλτιστων συνθηκών κουρκουμίνης στην παραγωγή IFN- $\gamma$  από CD4+ και CD8+ T κύτταρα υγιών μαρτύρων έπειτα απο διέγερση με PMA και ιονομυκίνη

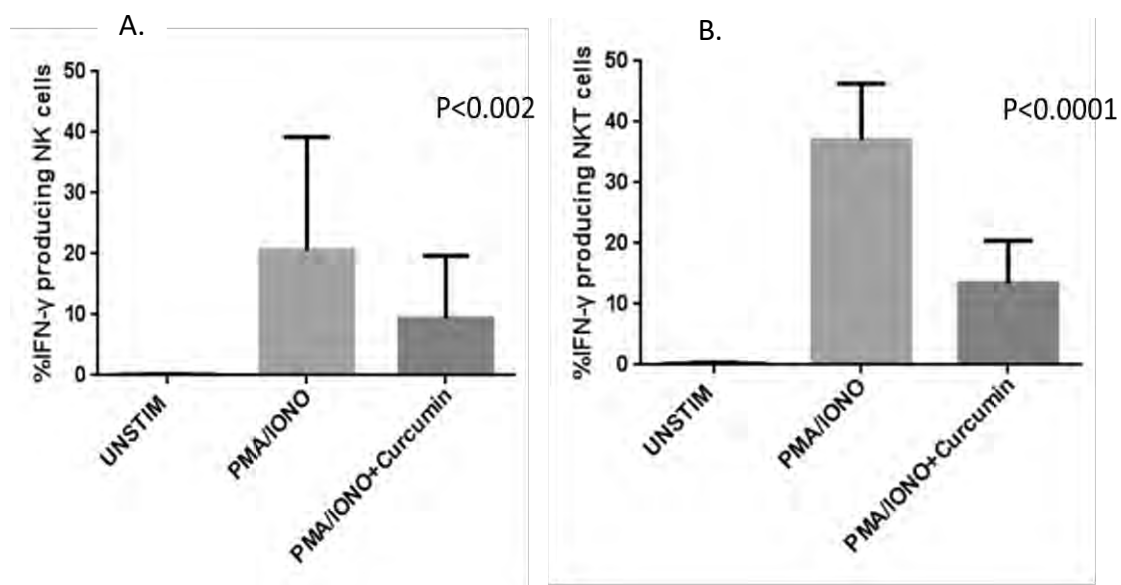


**Εικόνα 3.12** Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης κουρκουμίνης σε υγιείς μάρτυρες στις βέλτιστες συνθήκες (A) στα CD4+ και (B) στα CD8+ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με τον διεγέρτη PMA/Ionomycin.



Εκτός των πειραμάτων που διενεργήθηκαν πάνω σε κύτταρα ασθενών που έπασχαν από ψωρίαση και ψωριασική αρθρίτιδα ενδιαφέρον είχε και η μελέτη πάνω σε κύτταρα υγιών μαρτύρων. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε ένα δείγμα υγιών μαρτύρων n=13 στους ίδιους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς όπως και στους ασθενείς. Από την Εικόνα 3.12 παρατηρείται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική πτώση του ποσοστού τόσο των CD4+ όσο και των CD8+ T κυττάρων. Η αναστολή αυτήν ανέρχεται στο 60% για τα CD4+ T κύτταρα και στο 54% για τα CD8+ T κύτταρα με στατιστική σημαντικότητα P value<0.0001

Επίδραση βέλτιστων συνθηκών κουρκουμίνης στην παραγωγή IFN-γ από NK και NKT κύτταρα υγιών μαρτύρων έπειτα απο διέγερση με PMA και ιονομυκίνη



**Εικόνα 3.13** Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης κουρκουμίνης σε υγιείς μάρτυρες στις βέλτιστες συνθήκες (A) στα NK και (B) στα NKT κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με τον διεγέρτη PMA/Ionomycin.

Τέλος, μελέτη της δράσης της κουρκουμίνης έγινε και στους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς των NK και NKT κυττάρων υγιών μαρτύρων (n=13). Όπως διακρίνεται στην Εικόνα 3.13 τόσο για τα NK όσο και για τα NKT κύτταρα η αναστολή του ποσοστού των κυττάρων που παράγουν IFN-γ είναι στατιστικά σημαντική. Η αναστολή αυτήν ανέρχεται στο 55% για τα NK κύτταρα με στατιστική σημαντικότητα P<0.002 και στο 64% για τα NKT κύτταρα με στατιστική σημαντικότητα P<0.0001.

## 5. Συζήτηση

Η ψωρίαση αποτελεί μία χρόνια πάθηση του δέρματος η οποία πλήττει μέχρι και το 2% του πληθυσμού. Χαρακτηρίζεται από την ανώμαλη ωρίμανση των κυττάρων του δέρματος και συνδέεται με την ψωριασική αρθρίτιδα. Η ψωριασική αρθρίτιδα είναι μία αυτοάνοση νόσος που συνήθως ακολουθεί την ψωρίαση καθώς το 70% των ατόμων που πάσχουν από ψωρίαση αναπτύσσουν κάποια στιγμή και ψωριασική αρθρίτιδα. Οι ασθενείς αυτές αν και έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά δεν είναι ξεκάθαρο αν αποτελούν την ίδια ανοσολογική οντότητα. Ωστόσο, και οι δύο πρόκειται για πολυπαραγοντικά νοσήματα στα οποία ο μηχανισμός εμφάνισης της νόσου ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Κύριο ρόλο στην ψωριασική νόσο διαδραματίζουν τα κερατινοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα Τ λεμφοκύτταρα καθώς και τα NK κύτταρα. Τόσο τα Τ λεμφοκύτταρα όσο και τα NK κύτταρα παράγουν ορισμένες προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες οι οποίες συμμετέχουν στην νόσο με ορισμένες από αυτές να είναι η IFN- $\gamma$  και η IL-17.

Έτσι, σκοπός της παρούσας διπλωματικής μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της επίδρασης της κουρκουμίνης στα επίπεδα της IFN- $\gamma$  σε ασθενείς που έπασχαν τόσο από ψωρίαση όσο και από ψωριασική αρθρίτιδα καθώς και σε υγιείς μάρτυρες. Η κουρκουμίνη είναι ένα флаβονοειδές το οποίο προέρχεται από τον κουρκουμά ένα μπαχαρικό που απομονώνεται από την ρίζα του φυτού *curcuma longa*. Η ουσία αυτήν έχει πολλές δράσεις με την αντιφλεγμονώδη δράση να είναι μία από αυτές. Για τον λόγο αυτό μελετήθηκε η δράση που έχει η ουσία στα επίπεδα των κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$  στους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς των CD4+ και CD8+ Τ λεμφοκυττάρων καθώς και στα NK και NKT κύτταρα. Αυτό έγινε με στόχο να παρατηρηθεί πτώση των επιπέδων της IFN- $\gamma$  στους λεμφοκυτταρικούς αυτούς πληθυσμούς όταν τα κύτταρα επωαστούν με την ουσία αυτήν.

Για τον λόγο αυτό απομονώθηκαν μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία κουρκουμίνης αφού είχαν ενεργοποιηθεί με τον χημικό διεγέρτη του PMA/Ionomycin ώστε να δούμε επίδραση της κουρκουμίνης στα επίπεδα της IFN- $\gamma$  με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Έτσι, αρχικά, έγιναν πειράματα για να διαπιστωθούν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης της ουσίας αυτής. Από αυτά προέκυψε ότι οι βέλτιστη συγκέντρωση για την ουσία αυτήν είναι τα 10 $\mu$ g/ml όπου παρατηρείται σημαντική αναστολή των επιπέδων των κυττάρων τα οποία παράγουν IFN- $\gamma$ , ενώ παράλληλα δεν υπάρχει και τόσο αυξημένος κυτταρικός θάνατος όπως στα 20 $\mu$ g/ml. Επίσης, ως διεγέρτης των κυττάρων για παραγωγή IFN- $\gamma$  επιλέχθηκε το PMA/Ionomycin έναντι της IL-12/18 λόγω της υψηλότερης παραγωγής IFN- $\gamma$  από τον διεγέρτη αυτόν, ενώ ως βέλτιστος χρόνος επώασης με την ουσία αυτήν βρέθηκε ότι ήταν οι δύο ώρες πριν την προσθήκη του διεγέρτη ώστε ενδεχομένως η κουρκουμίνη να προλάβει να απορροφηθεί από τα κύτταρα και να ασκήσει την δράση της αδρανοποιώντας κάποιους μεταγραφικούς παράγοντες και ενεργοποιώντας ίσως κάποιους άλλους. Έτσι, όπως αναφέρθηκε η κουρκουμίνη φαίνεται να μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της IFN- $\gamma$  σε όλους τους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς. Αυτό θα μπορούσε να αποδειχθεί ιδιαίτερα σημαντικό καθώς η παραγωγή της IFN- $\gamma$  τόσο από τα CD8+ Τ λεμφοκύτταρα όσο και από τα NK κύτταρα είναι ένας από τους παράγοντες που επάγουν την φλεγμονή στην ψωριασική νόσο. Έτσι, η πτώση που προκαλεί η ουσία αυτήν θα μπορούσε να αποτελέσει ευεργετικό για την νόσο αυτήν. Ενδιαφέρον θα ήταν να μελετηθεί, επίσης, η δράση της κουρκουμίνης σε συνεργασία με άλλες φαρμακευτικές αγωγές που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία της ψωριασικής νόσου ώστε να διερευνηθεί και η

ύπαρξη ενδεχόμενης συνδυαστικής δράσεις με τις θεραπείας αυτές για την βελτίωση της νόσου.

Ωστόσο, είναι ανάγκη να αναφερθεί ότι όπως αναφέρεται από βιβλιογραφικά δεδομένα η απορρόφηση της κουρκουμίνης είναι ιδιαίτερα μικρή και η αποικοδόμηση της είναι αρκετά αυξημένη μετά την κατανάλωση της. Επομένως, συμπεραίνεται ότι η απλή χορήγηση της εκ του στόματος δεν είναι γνωστό αν μπορεί να επιφέρει τα βέλτιστα αποτελέσματα δράσης της. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος έχουν πραγματοποιηθεί και συνεχίζουν να γίνονται ολοένα και περισσότερες μελέτες σχετικά με την χορήγησης της είτε με άλλες μορφές όπως για παράδειγμα ως κάψουλες ή σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες όπως η πιπερίνη, τα λιποσωμάτια και τα νανοσωμάτια τα οποία μπορούν να αυξήσουν την βιοδιαθεσιμότητα της. Οι μελέτες με τους παράγοντες αυτούς έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως εστιαζόμενες στην αντικαρκινική της ιδιότητα και περιόριζονται σε ζωικά μοντέλα ή σε in vitro μελέτες. Συμπερασματικά, θα αποτελούσε ιδιαίτερα σημαντικό οι παραπάνω μελέτες να πραγματοποιηθούν και σε κλινική επίπεδο. Επίσης, τόσο στην ψωρίαση όσο και στην ψωριασική αρθρίτιδα οι μελέτες που έχουν γίνει δεν είναι αρκετές και για τον λόγο αυτόν πέρα από την αύξηση της διαθεσιμότητας που μόλις αναλύθηκε θα έπρεπε να γίνουν περαιτέρω in vivo μελέτες για την δράση της κουρκουμίνης σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών όσων αφορά διάφορους προ-φλεγμονόδους παράγοντες και δείκτες σοβαρότητας της νόσου.

Κλείνοντας, η μελέτη αυτήν αποτέλεσε με βάση την βιβλιογραφία μία από τις ελάχιστες προσεγγίσεις που υπάρχουν πάνω στην κουρκουμίνη και στα PBMcs όσων αφορά την ψωρίαση. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτήν είναι αρκετά ελπιδοφόρα ωστόσο είναι απαραίτητο να γίνουν κλινικές μελέτες ώστε να ξεπεραστούν τα εμπόδια που υπάρχουν όσον αφορά την ουσία αυτή και έτσι ώστε να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί ευρέως στην κλινική πράξη.

## 6.Βιβλιογραφία

1. Nestle, F.O., D.H. Kaplan, and J. Barker, *Psoriasis*. N Engl J Med, 2009. **361**(5): p. 496-509.
2. Christensen, T.E., et al., *Observations of psoriasis in the absence of therapeutic intervention identifies two unappreciated morphologic variants, thin-plaque and thick-plaque psoriasis, and their associated phenotypes*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(11): p. 2397-403.
3. Allen, M.H., et al., *The major psoriasis susceptibility locus PSORS1 is not a risk factor for late-onset psoriasis*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(1): p. 103-6.
4. Swanbeck, G., et al., *Age at onset and different types of psoriasis*. Br J Dermatol, 1995. **133**(5): p. 768-73.
5. Henseler, T. and E. Christophers, *Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris*. J Am Acad Dermatol, 1985. **13**(3): p. 450-6.
6. Kim, W.B., D. Jerome, and J. Yeung, *Diagnosis and management of psoriasis*. Can Fam Physician, 2017. **63**(4): p. 278-285.
7. Crow, J.M., *Psoriasis uncovered*. Nature, 2012. **492**(7429): p. S50-1.
8. Sakkas, L.I. and D.P. Bogdanos, *Are psoriasis and psoriatic arthritis the same disease? The IL-23/IL-17 axis data*. Autoimmun Rev, 2017. **16**(1): p. 10-15.
9. Mease, P.J., *Psoriatic arthritis: update on pathophysiology, assessment and management*. Ann Rheum Dis, 2011. **70 Suppl 1**: p. i77-84.
10. Langley, R.G., G.G. Krueger, and C.E. Griffiths, *Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life*. Ann Rheum Dis, 2005. **64 Suppl 2**: p. ii18-23; discussion ii24-5.
11. Myers, W., M. Opeola, and A.B. Gottlieb, *Common clinical features and disease mechanisms of psoriasis and psoriatic arthritis*. Curr Rheumatol Rep, 2004. **6**(4): p. 306-13.
12. Dogra, S. and S. Yadav, *Psoriasis in India: prevalence and pattern*. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2010. **76**(6): p. 595-601.
13. Springate, D.A., et al., *Incidence, prevalence and mortality of patients with psoriasis: a U.K. population-based cohort study*. Br J Dermatol, 2017. **176**(3): p. 650-658.
14. Greb, J.E., et al., *Psoriasis*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16082.
15. Ogdie, A. and P. Weiss, *The Epidemiology of Psoriatic Arthritis*. Rheum Dis Clin North Am, 2015. **41**(4): p. 545-68.
16. Liu, J.T., et al., *Psoriatic arthritis: Epidemiology, diagnosis, and treatment*. World J Orthop, 2014. **5**(4): p. 537-43.
17. Ritchlin, C.T., R.A. Colbert, and D.D. Gladman, *Psoriatic Arthritis*. N Engl J Med, 2017. **376**(21): p. 2095-6.
18. Berger, A., *Th1 and Th2 responses: what are they?* BMJ, 2000. **321**(7258): p. 424.
19. Murphy, K.M., et al., *T helper differentiation proceeds through Stat1-dependent, Stat4-dependent and Stat4-independent phases*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **238**: p. 13-26.
20. Karczewski, J., et al., *New insights into the role of T cells in pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis*. Autoimmunity, 2016. **49**(7): p. 435-450.
21. Diani, M., G. Altomare, and E. Reali, *T cell responses in psoriasis and psoriatic arthritis*. Autoimmun Rev, 2015. **14**(4): p. 286-92.
22. Hoe, E., et al., *The contrasting roles of Th17 immunity in human health and disease*. Microbiol Immunol, 2017. **61**(2): p. 49-56.
23. Cai, Y., C. Fleming, and J. Yan, *New insights of T cells in the pathogenesis of psoriasis*. Cell Mol Immunol, 2012. **9**(4): p. 302-9.
24. Caruso, R., et al., *Involvement of interleukin-21 in the epidermal hyperplasia of psoriasis*. Nat Med, 2009. **15**(9): p. 1013-5.
25. Rizzo, H.L., et al., *IL-23-mediated psoriasis-like epidermal hyperplasia is dependent on IL-17A*. J Immunol, 2011. **186**(3): p. 1495-502.

26. Benham, H., et al., *Th17 and Th22 cells in psoriatic arthritis and psoriasis*. *Arthritis Res Ther*, 2013. **15**(5): p. R136.
27. Farrar, M.A. and R.D. Schreiber, *The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor*. *Annu Rev Immunol*, 1993. **11**: p. 571-611.
28. Mehta, N.N., et al., *IFN-gamma and TNF-alpha synergism may provide a link between psoriasis and inflammatory atherogenesis*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 13831.
29. Harden, J.L., et al., *Humanized anti-IFN-gamma (HuZAF) in the treatment of psoriasis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2015. **135**(2): p. 553-6.
30. Onishi, R.M. and S.L. Gaffen, *Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease*. *Immunology*, 2010. **129**(3): p. 311-21.
31. Kagami, S., et al., *Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis*. *J Invest Dermatol*, 2010. **130**(5): p. 1373-83.
32. Naik, G.S., et al., *Th17 Inhibitors in Active Psoriatic Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Clinical Trials*. *Dermatology*, 2017. **233**(5): p. 366-377.
33. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(5): p. 503-10.
34. Yang, Q., et al., *Antitumor activity of NK cells*. *Immunol Res*, 2006. **36**(1-3): p. 13-25.
35. Dunphy, S.E., et al., *Natural killer cells from psoriasis vulgaris patients have reduced levels of cytotoxicity associated degranulation and cytokine production*. *Clin Immunol*, 2017. **177**: p. 43-49.
36. Bendelac, A., P.B. Savage, and L. Teyton, *The biology of NKT cells*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 297-336.
37. Ayala-Fontanez, N., D.C. Soler, and T.S. McCormick, *Current knowledge on psoriasis and autoimmune diseases*. *Psoriasis (Auckl)*, 2016. **6**: p. 7-32.
38. Peternel, S. and M. Kastelan, *Immunopathogenesis of psoriasis: focus on natural killer T cells*. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2009. **23**(10): p. 1123-7.
39. Ottaviani, C., et al., *CD56brightCD16(-) NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(1): p. 118-28.
40. Alshobaili, H.A., et al., *Genetic background of psoriasis*. *Int J Health Sci (Qassim)*, 2010. **4**(1): p. 23-9.
41. Lonnberg, A.S., et al., *Heritability of psoriasis in a large twin sample*. *Br J Dermatol*, 2013. **169**(2): p. 412-6.
42. Gervin, K., et al., *DNA methylation and gene expression changes in monozygotic twins discordant for psoriasis: identification of epigenetically dysregulated genes*. *PLoS Genet*, 2012. **8**(1): p. e1002454.
43. Liu, Y., J.G. Krueger, and A.M. Bowcock, *Psoriasis: genetic associations and immune system changes*. *Genes Immun*, 2007. **8**(1): p. 1-12.
44. Fan, X., et al., *Fine mapping of the psoriasis susceptibility locus PSORS1 supports HLA-C as the susceptibility gene in the Han Chinese population*. *PLoS Genet*, 2008. **4**(3): p. e1000038.
45. Mallon, E., et al., *HLA-CW\*0602 is a susceptibility factor in type I psoriasis, and evidence Ala-73 is increased in male type I psoriatics*. *J Invest Dermatol*, 1997. **109**(2): p. 183-6.
46. Hirata, J., et al., *Variants at HLA-A, HLA-C, and HLA-DQB1 Confer Risk of Psoriasis Vulgaris in Japanese*. *J Invest Dermatol*, 2018. **138**(3): p. 542-548.
47. Huffmeier, U., et al., *Common variants at TRAF3IP2 are associated with susceptibility to psoriatic arthritis and psoriasis*. *Nat Genet*, 2010. **42**(11): p. 996-9.
48. Capon, F., et al., *Identification of ZNF313/RNF114 as a novel psoriasis susceptibility gene*. *Hum Mol Genet*, 2008. **17**(13): p. 1938-45.
49. Plant, D., et al., *The CX3CL1-CX3CR1 system and psoriasis*. *Exp Dermatol*, 2006. **15**(11): p. 900-3.
50. Asumalahti, K., et al., *Psoriasis susceptibility locus on 18p revealed by genome scan in Finnish families not associated with PSORS1*. *J Invest Dermatol*, 2003. **121**(4): p. 735-40.

51. Zhang, X.J., et al., *Evidence for a major psoriasis susceptibility locus at 6p21(PSORS1) and a novel candidate region at 4q31 by genome-wide scan in Chinese hans.* J Invest Dermatol, 2002. **119**(6): p. 1361-6.
52. Veal, C.D., et al., *Identification of a novel psoriasis susceptibility locus at 1p and evidence of epistasis between PSORS1 and candidate loci.* J Med Genet, 2001. **38**(1): p. 7-13.
53. Enlund, F., et al., *Psoriasis susceptibility locus in chromosome region 3q21 identified in patients from southwest Sweden.* Eur J Hum Genet, 1999. **7**(7): p. 783-90.
54. Capon, F., et al., *Evidence for interaction between psoriasis-susceptibility loci on chromosomes 6p21 and 1q21.* Am J Hum Genet, 1999. **65**(6): p. 1798-800.
55. Stuart, P.E., et al., *Genome-wide Association Analysis of Psoriatic Arthritis and Cutaneous Psoriasis Reveals Differences in Their Genetic Architecture.* Am J Hum Genet, 2015. **97**(6): p. 816-36.
56. Hsieh, J., S. Kadavath, and P. Efthimiou, *Can traumatic injury trigger psoriatic arthritis? A review of the literature.* Clin Rheumatol, 2014. **33**(5): p. 601-8.
57. Eder, L., et al., *Association between environmental factors and onset of psoriatic arthritis in patients with psoriasis.* Arthritis Care Res (Hoboken), 2011. **63**(8): p. 1091-7.
58. Garduno, J., et al., *Measures used in specifying psoriasis lesion(s), global disease and quality of life: a systematic review.* J Dermatolog Treat, 2007. **18**(4): p. 223-42.
59. Schadler, E.D., B. Ortel, and S.L. Mehlis, *Biologics for the primary care physician: Review and treatment of psoriasis.* Dis Mon, 2018.
60. Papoutsaki, M. and A. Costanzo, *Treatment of psoriasis and psoriatic arthritis.* BioDrugs, 2013. **27 Suppl 1**: p. 3-12.
61. Prasad, S., et al., *Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back.* Biotechnol Adv, 2014. **32**(6): p. 1053-64.
62. Gupta, S.C., et al., *Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012. **39**(3): p. 283-99.
63. Priyadarsini, K.I., *The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent.* Molecules, 2014. **19**(12): p. 20091-112.
64. Hewlings, S.J. and D.S. Kalman, *Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health.* Foods, 2017. **6**(10).
65. Manikandan, P., et al., *Curcumin modulates free radical quenching in myocardial ischaemia in rats.* Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(10): p. 1967-80.
66. Salehi, B., et al., *The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials.* Eur J Med Chem, 2018. **163**: p. 527-545.
67. Aggarwal, B.B., A. Kumar, and A.C. Bharti, *Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies.* Anticancer Res, 2003. **23**(1A): p. 363-98.
68. Bhandarkar, S.S. and J.L. Arbiser, *Curcumin as an inhibitor of angiogenesis.* Adv Exp Med Biol, 2007. **595**: p. 185-95.
69. Moghadamtousi, S.Z., et al., *A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 186864.
70. Ghosh, S., S. Banerjee, and P.C. Sil, *The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update.* Food Chem Toxicol, 2015. **83**: p. 111-24.
71. Akbik, D., et al., *Curcumin as a wound healing agent.* Life Sci, 2014. **116**(1): p. 1-7.
72. Campbell, N.K., et al., *Naturally derived Heme-Oxygenase 1 inducers attenuate inflammatory responses in human dendritic cells and T cells: relevance for psoriasis treatment.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 10287.
73. Varma, S.R., et al., *Imiquimod-induced psoriasis-like inflammation in differentiated Human keratinocytes: Its evaluation using curcumin.* Eur J Pharmacol, 2017. **813**: p. 33-41.
74. Zhao, Y., et al., *Curcumin inhibits proliferation of interleukin-22-treated HaCaT cells.* Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(6): p. 9580-4.
75. Kang, D., et al., *Curcumin shows excellent therapeutic effect on psoriasis in mouse model.* Biochimie, 2016. **123**: p. 73-80.

76. Sun, J., Y. Zhao, and J. Hu, *Curcumin inhibits imiquimod-induced psoriasis-like inflammation by inhibiting IL-1beta and IL-6 production in mice*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67078.
77. Carrion-Gutierrez, M., et al., *Effects of Curcuma extract and visible light on adults with plaque psoriasis*. Eur J Dermatol, 2015. **25**(3): p. 240-6.
78. Antiga, E., et al., *Oral Curcumin (Meriva) Is Effective as an Adjuvant Treatment and Is Able to Reduce IL-22 Serum Levels in Patients with Psoriasis Vulgaris*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 283634.
79. Kurd, S.K., et al., *Oral curcumin in the treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris: A prospective clinical trial*. J Am Acad Dermatol, 2008. **58**(4): p. 625-31.
80. Ai, W., et al., *Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment*. Int J Environ Res Public Health, 2013. **10**(9): p. 3834-42.
81. Mirjacic Martinovic, K., et al., *Favorable in vitro effects of combined IL-12 and IL-18 treatment on NK cell cytotoxicity and CD25 receptor expression in metastatic melanoma patients*. J Transl Med, 2015. **13**: p. 120.
82. Tominaga, K., et al., *IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells*. Int Immunol, 2000. **12**(2): p. 151-60.
83. Chardin, P. and F. McCormick, *Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive*. Cell, 1999. **97**(2): p. 153-5.
84. Adan, A., et al., *Flow cytometry: basic principles and applications*. Crit Rev Biotechnol, 2017. **37**(2): p. 163-176.
85. McCoy, J.P., Jr., *Basic principles of flow cytometry*. Hematol Oncol Clin North Am, 2002. **16**(2): p. 229-43.