



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«Τοξικολογία»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΔΡΑΣΗΣ
ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΣΠΟΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ
ΚΥΚΛΟΣΠΟΡΙΝΗ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΨΩΡΙΑΣΗ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ**

Δίγκα Δανάη
Φαρμακοποιός

Λάρισα 2021

ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΔΡΑΣΗΣ
ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΣΠΟΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ
ΚΥΚΛΟΣΠΟΡΙΝΗ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΨΩΡΙΑΣΗ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

PHARMACOGENETIC STUDY OF POLYMORPHISMS CYCLOSPORINE PATHWAY
OF ACTION AND THE OCCURANCE OF TOXICITY TO CYCLOSPORINE
TREATMENT IN PATIENTS WITH PSORIASIS IN THE GREEK POPULATION

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Ιωάννης Βασιλόπουλος (επιβλέπων καθηγητής)

Επίκουρος Καθηγητής
Τομέας Γενετικής Βιολογίας Κυττάρου & Ανάπτυξης
Τμήμα Βιολογίας
Πανεπιστήμιο Πατρών

Ευτέρπη Ζαφειρίου

Επίκουρη Καθηγήτρια
Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δημήτριος Στάγκος

Επίκουρος Καθηγητής
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Η Δίγκα Δανάη, γνωρίζοντας τις συνέπειες της λογοκλοπής, δηλώνω υπεύθυνα ότι η παρούσα εργασία με τίτλο «Φαρμακογενετική μελέτη πολυμορφισμών στο μονοπάτι δράσης της κυκλοσπορίνης και εμφάνιση τοξικότητας στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη σε ασθενείς με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό» αποτελεί προϊόν αυστηρά προσωπικής εργασίας και όλες οι πηγές που έχω χρησιμοποιήσει έχουν δηλωθεί κατάλληλα στις βιβλιογραφικές παραπομπές και αναφορές. Τα σημεία όπου έχω χρησιμοποιήσει ιδέες, κείμενο ή / και πηγές άλλων συγγραφέων, αναφέρονται ευδιάκριτα στο κείμενο με την κατάλληλη παραπομπή και η σχετική αναφορά περιλαμβάνεται στο τμήμα των βιβλιογραφικών αναφορών με πλήρη περιγραφή.

Η ΔΗΛΟΥΣΑ

Περίληψη

Η ψωρίαση αποτελεί χρόνια φλεγμονώδη αυτοάνοση νόσο η οποία προσβάλλει το 2-3% του παγκόσμιου πληθυσμού. Κλινικά, η νόσος εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία και ανάλογα με τον τύπο της, προκαλεί την εμφάνιση δερματικών βλαβών σε διάφορα σημεία του σώματος. Η εκδήλωση της ψωρίασης εξαρτάται από ένα πολυπαραγοντικό σύστημα που περιλαμβάνει την επίδραση διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων σε άτομα με γενετική προδιάθεση, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, τον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό των κυττάρων της κεράτινης στιβάδας του δέρματος και τελικά την εμφάνιση δερματικών βλαβών. Η κυκλοσπορίνη είναι ανοσκοκατασταλτικό φάρμακο που χρησιμοποιείται ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς με μέτρια έως βαριά νόσο. Η ανταπόκριση στη θεραπεία και η εμφάνιση τοξικότητας εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των ασθενών που την λαμβάνουν, γεγονός που πιθανώς να οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες. Συνεπώς, προέκυψε η ανάγκη για έρευνα ώστε να εντοπιστούν τα γονίδια και οι πολυμορφισμοί που επηρεάζουν την ανταπόκριση και την εμφάνιση τοξικότητας στην κυκλοσπορίνη. Προηγούμενη μελέτη ανέδειξε τη συσχέτιση του πολυμορφισμού ABCB1 C3435T με την ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Σε συνέχεια της παραπάνω μελέτης κατασκευάστηκε ένα δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στο μονοπάτι δράσης της κυκλοσπορίνης, με τη χρήση της μεταβάσης δεδομένων PICKLE. Η παρούσα μελέτη στοχεύει στην ανάλυση 30 πολυμορφισμών από 22 γονίδια των πρωτεϊνών του παραπάνω δικτύου, ώστε να βρεθούν πιθανοί προγνωστικοί δείκτες της εμφάνισης τοξικότητας στην κυκλοσπορίνη, σε 96 ασθενείς, εκ των οποίων το 12,5% εμφάνισε τοξικότητα. Η γονοτύπηση των δειγμάτων DNA πραγματοποιήθηκε με το σύστημα MassArray® System (Agena Biosciences) που χρησιμοποιεί την τεχνική φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF-MS. Η ανάλυση των παραπάνω δεδομένων ανέδειξε στον πολυμορφισμό rs1868402 του γονιδίου PPP3R1, στατιστικά σημαντική συσχέτιση του σπάνιου αλληλόμορφου (A) με την εμφάνιση τοξικότητας ($P=0.032$) και στον πολυμορφισμό rs28362491 του γονιδίου NFκB1, στατιστικά σημαντική συσχέτιση του κοινού αλληλόμορφου (ATTG) με την εμφάνιση τοξικότητας ($P=0.015$). Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής, μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω μελέτη, σε μεγαλύτερο πληθυσμό, των πολυμορφισμών που βρέθηκε πως εμφανίζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση τοξικότητας στην κυκλοσπορίνη.

Λέξεις κλειδιά: ψωρίαση, κυκλοσπορίνη, τοξικότητα, φαρμακογενετική, MALDI-TOF-MS

Abstract

Psoriasis is a chronic inflammatory autoimmune disease that affects 2-3% of the population. Clinically hallmarks comprise various skin lesions in multiple parts of the body. The pathophysiology of psoriasis is multifactorial and involves a combination of environmental and genetic factors, resulting in the activation of the immune system, epidermal hyperproliferation and abnormal differentiation of epidermal keratinocytes. Cyclosporine, an immunosuppressive drug, is a first-line systemic therapy for moderate to severe forms of psoriasis. Patients exhibit heterogeneity in their response to therapy and occurrence of toxicity to cyclosporine, possibly due to genetic factors. A previous study highlighted the association of the ABCB1 C3435T polymorphism with cyclosporine treatment response. Following this study, a network of protein-to-protein interactions on the cyclosporine pathway of action was established, using data from the meta-database PICKLE. The aim of the present study was to assess the 30 polymorphisms, from 22 genes, of the above-mentioned protein network, as possible predictive markers of cyclosporine toxicity in 96 psoriatic patients. Toxicity to cyclosporine was reported in 12.5% of the patients. SNP analysis was performed using the MALDI-TOF-MS technique, by the MassArray® System (Agena Biosciences). Association analysis revealed statistically significant associations of SNP rs1868402 rare allele-A (PPP3R1 gene) with the occurrence of toxicity ($P = 0.032$) and of SNP rs28362491 common allele-ATTG (NFKB1 gene) with the occurrence of toxicity ($P = 0.015$). The results of this study could be used for further research, in larger independent groups of population.

Keywords: psoriasis, cyclosporine, toxicity, pharmacogenetics, MALDI-TOF-MS

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	v
1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Ψωρίαση.....	1
1.1.1 Επιδημιολογία.....	1
1.1.2 Τύποι και κλινικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης.....	1
1.1.3 Μέθοδοι αξιολόγησης της βαρύτητας της ψωρίασης.....	4
1.1.4 Αιτιολογία.....	5
1.1.5 Ανοσοπαθогένεια.....	8
1.2 Θεραπεία και συννοσηρότητα της ψωρίασης.....	12
1.2.1 Τοπική αγωγή.....	12
1.2.2 Φωτοθεραπεία.....	14
1.2.3 Συστηματική αγωγή.....	15
1.3 Κυκλοσπορίνη.....	16
1.3.1 Γενικά για την κυκλοσπορίνη.....	16
1.3.2 Μηχανισμός δράσης κυκλοσπορίνης.....	18
1.4 Φαρμακογενετική.....	20
1.4.1 Φαρμακογενετικές μελέτες σε ασθενείς με ψωρίαση υπό θεραπεία με κυκλοσπορίνη.....	21
1.5 Σκοπός.....	22
2. Πειραματικό μέρος.....	23
2.1 Πληθυσμός μελέτης.....	23
2.2 Κριτήρια επιλογής των υπό μελέτη γενετικών πολυμορφισμών.....	23
2.3 Προετοιμασία των δειγμάτων για την ανάλυση γονότυπου.....	26
2.3.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από κύτταρα φλεβικού αίματος.....	26
2.3.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	28
2.3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA με φασματοφωτόμετρο.....	30
2.3.4 Αραίωση και κατακρήμνιση δειγμάτων γονιδιακού DNA.....	31
2.4 Γονοτύπηση με τη χρήση του συστήματος Agena Bioscience MassARRAY®.....	34
2.4.1 Ενίσχυση των γονιδιακών περιοχών που βρίσκονται οι υπό προσδιορισμό πολυμορφισμοί.....	35
2.4.1.1 Σχεδιασμός και παρασκευή διαλυμάτων εκκινητών.....	35
2.4.1.2 1η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	40
2.4.1.3 Αντίδραση SAP.....	42
2.4.1.4 Extension PCR.....	43

2.4.2 Μεταφορά των προς ανάλυση δειγμάτων σε SpectroCHIP® Array με τη χρήση του MassARRAY® Nanodispenser RS1000	45
2.4.3 Ανάλυση των δειγμάτων με τη χρήση του MassARRAY® Analyzer 4.....	49
2.5 Στατιστική ανάλυση	53
3. Αποτελέσματα	54
3.1 Χαρακτηριστικά ασθενών	54
3.2 Αποτελέσματα ελέγχου του DNA που απομονώθηκε με ηλεκτροφόρηση	54
3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA.....	55
3.4 Εμφάνιση τοξικότητας.....	57
3.5 Αποτελέσματα ελέγχου των προϊόντων της Extension PCR με ηλεκτροφόρηση	59
3.6 Αποτελέσματα γονοτύπησης.....	60
3.7 Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης συσχέτισης των πολυμορφισμών με την εμφάνιση ή μη τοξικότητας στην κυκλοσπορίνη	71
4. Συζήτηση	72
Βιβλιογραφία.....	75
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	80
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	94

1. Εισαγωγή

1.1 Ψωρίαση

Η ψωρίαση είναι μία χρόνια φλεγμονώδης αυτοάνοση νόσος η οποία προσβάλλει το δέρμα και σε κάποιες περιπτώσεις και τις αρθρώσεις των ασθενών. Στο δέρμα παρατηρείται αλόγιστη ανάπτυξη των κερατινοκυττάρων και σχηματισμός ερυθρών κηλίδων συχνά με λέπια (Καραμπίδου Κ. κ. συν., 2010).

1.1.1 Επιδημιολογία

Η ψωρίαση προσβάλλει το 2-3% περίπου του παγκόσμιου πληθυσμού, δεν παρουσιάζει μεγαλύτερο επιπολασμό σε κάποιο από τα δύο φύλα και γεωγραφικά εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στους πληθυσμούς της Ευρώπης και της Βορείου Αμερικής. Συγκεκριμένα, στη Βόρεια Αμερική και το Ηνωμένο Βασίλειο ο επιπολασμός είναι περίπου στο 2%, αντίθετα στην Ιαπωνία είναι περίπου στο 0,2%. Στην Ελλάδα υπολογίζεται πως η ψωρίαση εμφανίζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 3% του συνολικού πληθυσμού (Parisi et al., 2013).

1.1.2 Τύποι και κλινικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης

Η ψωρίαση είναι μία νόσος με ποικίλη μορφολογία, αιτιοπαθογένεια και σοβαρότητα. Χαρακτηρίζεται από ερυθρηματόμορφες βλατίδες διαμέτρου μεγαλύτερης του ενός εκατοστού και από τη σταδιακή αύξηση των βλατίδων που οδηγεί στη δημιουργία ερυθρηματωδών πλακών. Οι πλάκες έχουν γύρω τους έναν λευκό δακτύλιο (δαχτυλίδι Woronoff) (C. E. M. Griffiths et al., 2007). Οι βλάβες εμφανίζονται συνήθως στο κρανίο, στον κορμό, στους αγκώνες, στα γόνατα, σε πτυχώσεις, στα γεννητικά όργανα και τα νύχια (Zangeneh, F.Z. Shooshtary, 2013). Η ψωρίαση μπορεί να είναι είτε μία σταθερή κατάσταση ή να παρουσιάζει ξαφνική και ταχεία εξέλιξη. Συνήθως, πέραν της εμφάνισης των δερματικών αλλοιώσεων, που συχνά συνοδεύονται από κνησμό και αίσθημα καύσου, η νόσος αυτή δεν εμφανίζει άλλα συμπτώματα (Langley et al., 2005).

Τύποι της ψωρίασης

Χρόνια ψωρίαση κατά πλάκας

Η χρόνια ψωρίαση κατά πλάκας αποτελεί τη συνηθέστερη μορφή εκδήλωσης ψωρίασης αφού απαντάται στο 80-90% των ψωριασικών ασθενών. Οι πλάκες είναι ωσειδείς η στρογγυλές με λέπια αργυρού χρώματος. Κατά την έξαρση είναι πιθανό να ενώνονται μικρότερες αλλοιώσεις σχηματίζοντας μεγαλύτερες πλάκες (Menter et al., 2008). Ανάλογα με τα σημεία του σώματος στα οποία εμφανίζονται οι βλάβες, διαχωρίζεται στα παρακάτω είδη:

α) Φλεγμονώδης ψωρίαση, όπου εμφανίζονται καλά οριοθετημένες ελάχιστα φολιδωτές πλάκες σε πτυχώσεις του δέρματος (μασχάλες, βουβωνική χώρα, περιοχή γεννητικών οργάνων).

β) Ψωρίαση ονύχων, η οποία μπορεί να εμφανίζεται και χωρίς την παρουσία δερματικών βλαβών. Οι κλινικές της εκδηλώσεις περιλαμβάνουν υπερκεράτωση, ονυχόλυση και αποχρωματισμό των ονύχων. Αποτελεί θετικό προγνωστικό παράγοντα για την εμφάνιση ψωριασικής αρθρίτιδας.

γ) Ψωρίαση τριχωτού κεφαλής, είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη κ δυσχερώς αντιμετωπίσιμη.

δ) Παλαμοπελματιαία, που αποτελείται από εντοπισμένες βλάβες στις παλάμες και τα πέλματα με ποικίλους χρωματισμούς ερυθρότητας και όχι πάντα σε σχηματισμό πλακών.

Κοινή κλινική εκδήλωση σε όλες τις μορφές της ψωρίασης κατά πλάκας είναι ο κνησμός στα σημεία των αλλοιώσεων (Kim et al., 2017).

Ανάστροφη ψωρίαση

Η ανάστροφη ψωρίαση εμφανίζεται κυρίως σε ηλικιωμένους και κοινό χαρακτηριστικό κλινικό εύρημα αποτελεί το ερυθρό, διαβρωμένο δέρμα σε πτυχώσεις του δέρματος (υπομαστική περιοχή, βουβωνική χώρα, μασχάλη) (Kim et al., 2017). Οι αλλοιώσεις αυτές δεν συγχέονται με της κοινής ψωρίασης καθώς δεν υπάρχουν τα χαρακτηριστικά ξηρά λέπια της κατά πλάκας ψωρίασης και επειδή οι αλλοιώσεις έχουν αυξημένη υγρασία, λόγω της τοποθέτησής τους σε πτυχώσεις του σώματος.

Ερυθροδερμική ψωρίαση

Η ερυθροδερμική ψωρίαση καλύπτει μεγάλο ποσοστό της επιφάνειας του σώματος, περίπου το 90% με ερυθρηματολεπιδώδεις πλάκες, οι οποίες παρουσιάζουν βαθύ ερυθρό χρώμα αλλά ο βαθμός σχηματισμού λεπιών ποικίλει (Zangeneh, F.Z. Shooshtary, 2013). Παρουσιάζει

οξεία ή υποξεία έναρξη και συνήθως αποτελεί εκδήλωση επιδείνωσης κάποιας από τις άλλες μορφές ψωρίασης. Εμφανίζει επιπλέον, διάφορες συστηματικές εκδηλώσεις όπως υποθερμία υπολευκωματιναιμία, ηλεκτρολυτικές διαταραχές και καρδιακή ανεπάρκεια (Kim et al., 2017).

Φλυκταινώδης ψωρίαση

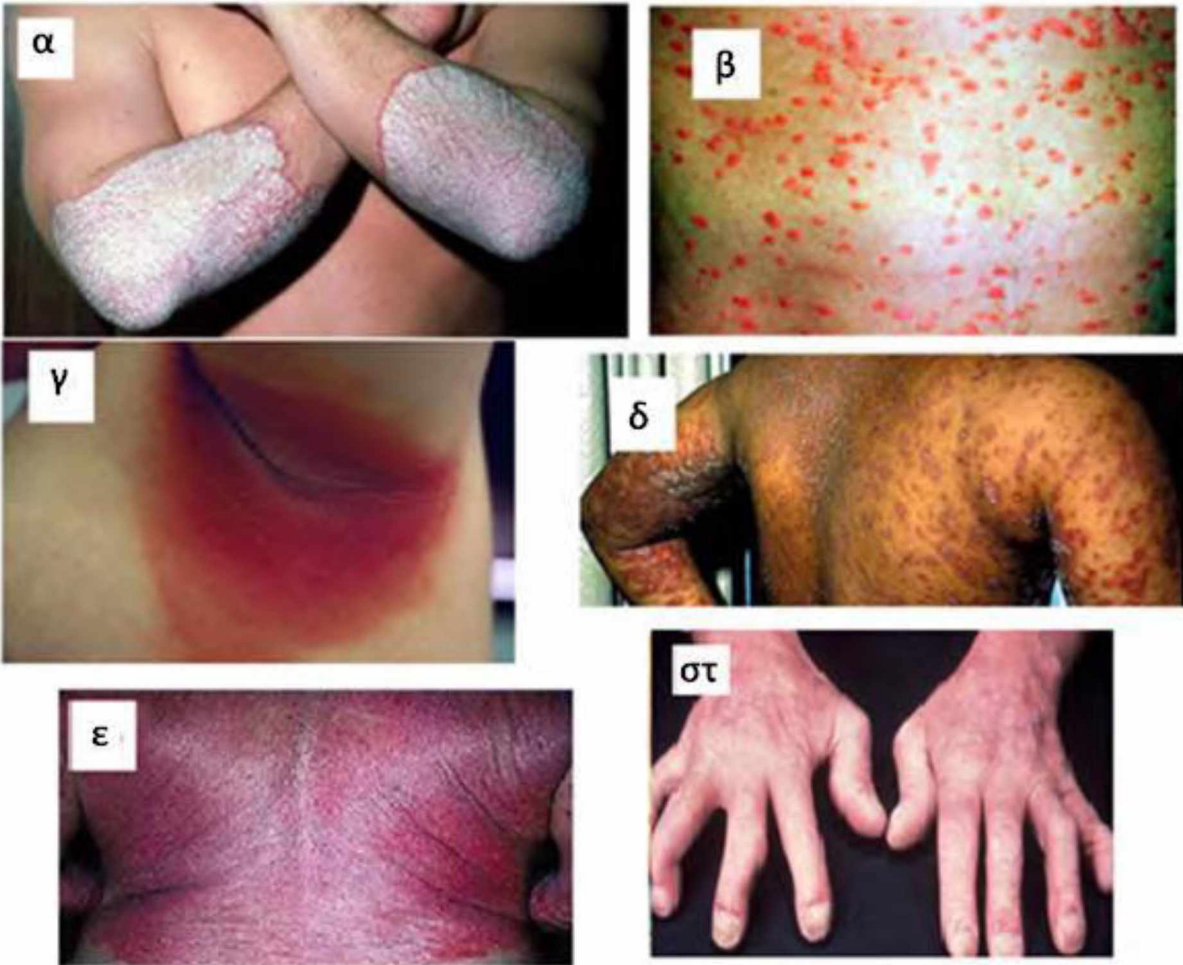
Είναι σπάνια μορφή και παρουσιάζεται συνηθέστερα στους ενήλικες. Εμφανίζεται είτε εντοπισμένα (παλάμες, πέλματα) είτε γενικευμένα σε όλο το σώμα, ως φλύκταινες σε φλεγμονώδες δέρμα (Kim et al., 2017).

Σταγονοειδής ψωρίαση

Η έναρξη της εντοπίζεται κυρίως στην παιδική και εφηβική ηλικία, συχνά μετά από στρεπτοκοκκική αμυγδαλίτιδα. Αποτελεί το 10% των περιστατικών με ψωρίαση και είναι η δεύτερη συνηθέστερη μορφή ψωρίασης μετά την ψωρίαση κατά πλάκας. Στη μορφή αυτή εμφανίζονται πολλές μικρές ροζ λεπιδοειδείς βλατίδες σε όλο το σώμα (Kim et al., 2017).

Ψωριασική αρθρίτιδα

Είναι ένα είδος χρόνιας αρθρίτιδας η οποία συνδυάζεται με την εμφάνιση αλλοιώσεων στο δέρμα. Εμφανίζεται με πολύ μεγαλύτερη συχνότητα σε ψωριασικούς ασθενείς απ' ό τι στον γενικό πληθυσμό: 7-15% έναντι 0,9-0,25%. Στους ασθενείς που πάσχουν ήδη από ψωρίαση εμφανίζεται περίπου 7-10 χρόνια μετά την πρώτη εμφάνιση δερματικών αλλοιώσεων (Zangeneh, F.Z. Shoostary, 2013). Δεν εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε κάποιο φύλο (Kimball et al., 2008). Οι κλινικές της εκδηλώσεις περιλαμβάνουν άλγος, οίδημα ερυθρότητα και περιορισμένη κινητικότητα των αρθρώσεων των άκρων και της σπονδυλικής στήλης (Langley et al., 2005).



Εικόνα 1: Τύποι ψωρίασης. α. ψωρίαση κατά πλάκας, β. σταγονοειδής ψωρίαση, γ. ανάστροφη ψωρίαση, δ. φλυκταινώδης ψωρίαση, ε. ερυθροδερμική ψωρίαση στ. ψωριασική αρθρίτιδα. Πηγή: (Roberson & Bowcock, 2010)

1.1.3 Μέθοδοι αξιολόγησης της βαρύτητας της ψωρίασης

Λόγω της ποικιλομορφίας της νόσου είναι απαραίτητη η χρήση κοινών εργαλείων αξιολόγησης της βαρύτητας της ψωρίασης. Κατά κόρον από την επιστημονική κοινότητα χρησιμοποιούνται τα BSA (Body Surface Area) και PASI (Psoriasis Area and Severity Index) (Puig et al., 2009).

Ο κλινικός δείκτης PASI αξιολογεί επιπλέον της έκτασης, το ερύθημα, τη διήθηση και την απολέπιση των δερματικών βλαβών. Ο PASI παίρνει τιμές από 1 έως 72 και είναι ο κλινικός δείκτης που επιλέγεται σε μελέτες που αφορούν στην εκτίμηση της αποτελεσματικότητας

φαρμάκων, όπου ένδειξη αποτελεσματικότητας αποτελεί η βελτίωση κατά 75% του PASI (Menter et al., 2008). Τιμές PASI πάνω από 12 χαρακτηρίζουν σοβαρή ψωρίαση η οποία χρήζει αντιμετώπισης με συστηματική αγωγή.

1.1.4 Αιτιολογία

Η εκδήλωση της ψωρίασης εξαρτάται από ένα πολύπλοκο και πολυπαραγοντικό σύστημα που περιλαμβάνει την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων σε άτομα με γενετική προδιάθεση, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και τον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό των κυττάρων της κεράτινης στιβάδας του δέρματος.

Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Κατά το φαινόμενο Koebner, ήπιες τοπικές εκδορές, προκαλούμενες είτε από μικροτραυματισμούς είτε από δερματοστιξία ή ηλιακά και χημικά εγκαύματα, μπορεί να προκαλέσουν την εμφάνιση ψωριασικών αλλοιώσεων σε υγιές δέρμα ασθενών που πάσχουν ήδη από ψωρίαση. Ο μηχανισμός της δημιουργίας των αλλοιώσεων αυτών είναι ακόμη άγνωστος αλλά εικάζεται πως περιλαμβάνει τη συμμετοχή κυτοκινών και την δημιουργία αντισωμάτων μέσω αυτοάνοσων διεργασιών (Sagi & Trau, 2011).

Συγκεκριμένες φαρμακευτικές ουσίες κυρίως οι β-αδρενεργικοί ανταγωνιστές και το λίθιο, αλλά και τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, τα στεροειδή και διάφορα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της ψωρίασης, φαίνεται πως επηρεάζουν την εμφάνιση και την πορεία της νόσου. Συγκεκριμένα, μπορούν να προκαλέσουν είτε την εμφάνιση της ψωρίασης σε υγιή άτομα ή την έξαρση της ήδη υπάρχουσας νόσου με την εμφάνιση ψωριασικών βλαβών σε άθικτο δέρμα, στο 30-50% των ασθενών που εξετάστηκαν σε έρευνα (Basavaraj et al., 2010). Αντίθετα, σύμφωνα με την ίδια έρευνα, τα ανθελονοσιακά φάρμακα ενώ δεν επάγουν την εμφάνιση της νόσου σε υγιή άτομα, μπορούν να επιδεινώσουν έναν ψωριασικό ασθενή.

Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί πως οι λοιμώξεις από στρεπτόκοκκο μπορούν να επάγουν την εμφάνιση ψωρίασης σε υγιή άτομα ή και να επιδεινώσουν την χρόνια νόσο (Sigurdardottir et al., 2013).

Τέλος, η έναρξη συγκεκριμένα της κατά πλάκας ψωρίασης σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με κάποιο στρεσογόνο συμβάν στη ζωή των ασθενών (Mallbris et al., 2005). Το στρες αποτελεί

βασικό παράγοντα έναρξης της ψωρίασης στο 35% των ατόμων, αλλά και έξαρσης της ήδη υπάρχουσας νόσου στο 70% των ασθενών.

Γενετικοί παράγοντες

Υπάρχουν γεγονότα που καταδεικνύουν εδώ και χρόνια την ύπαρξη ισχυρού γενετικού υπόβαθρου στην ψωρίαση. Αρχικά, εκτιμάται πως 30%-50% των ασθενών έχουν οικογενειακό ιστορικό της ψωρίασης. Επιπλέον απόδειξη αποτελεί έρευνα σε μονοζυγωτικούς διδύμους όπου η εκδήλωση ψωρίασης και στους δύο αγγίζει το 70% (Schön & Boehncke, 2005). Τέλος, έχει παρατηρηθεί πως η εμφάνιση της ψωρίασης διαφέρει μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών. Για παράδειγμα ο πληθυσμός της Αμερικανικής Σαμόα καθώς και η ιθαγενής φυλή Μαπούτσε στην Χιλή είναι εντελώς απαλλαγμένη από τη νόσο της ψωρίασης (Valenzuela et al., 2012).

Οι γενετικοί τόποι με την ονομασία PSORS (PSORiasis Susceptibility) είναι χρωμοσωμικές περιοχές όπου υπάρχουν γονίδια σχετικά με την ψωρίαση. Μελέτες συσχέτισης σε οικογένειες ατόμων με ψωρίαση, οδήγησαν στην ανακάλυψη τουλάχιστον δώδεκα διαφορετικών γενετικών τόπων PSORS (Alwan & Nestle, 2015). Οι προαναφερόμενες γονιδιωματικές μελέτες συσχέτισης, αφορούν την μελέτη μεγάλων ομάδων ψωριασικών ασθενών συγκριτικά με ομάδες ελέγχου και την γονοτύπηση τους για απλούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs). Η σύγκριση των αποτελεσμάτων οδήγησε στην ανακάλυψη περισσότερων από 60 γενετικών πολυμορφισμών που σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης της ψωρίασης και της εξέλιξης της (Harden et al., 2015).

Ο PSORS1 θεωρείται ο σημαντικότερος για τον καθορισμό της εμφάνισης και εξέλιξης της ψωρίασης, καθώς εμπλέκεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των περιστατικών της ψωρίασης (Veal et al., 2002). Βρίσκεται στην χρωμοσωμική περιοχή 6p21.3, η οποία περιλαμβάνεται στην περιοχή που κωδικοποιεί το Μείζων Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας MHC (Major Histocompatibility Complex). Τα μόρια του συμπλέγματος βρίσκονται σε όλα σχεδόν τα κύτταρα του οργανισμού και αποτελούν βασικό μηχανισμό της ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος.

Από τις μελέτες συσχέτισης προέκυψε επίσης πως τα γονίδια HLA (λευκοκυτταρικών αντιγόνων του ανθρώπου) εμφανίζουν υψηλή συσχέτιση με την ψωρίαση. Συγκεκριμένα το HLA-Cw6, ένα αλληλόμορφο του HLA-C που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη του MHC I, συσχετίστηκε με το 46% των περιστατικών με ψωρίαση κατά πλάκας και το 73% των περιστατικών με σταγονοειδή

ψωρίαση (Roberson & Bowcock, 2010).

Δύο ακόμη γονίδια που σχετίζονται με προδιάθεση στην εμφάνισή της ψωρίασης βρίσκονται στην περιοχή 6p21.3, το CCHCR1 και το CDSN που κωδικοποιούν την Coiled-Coil α-Helical Rod Protein1 και την κορνεοδεσμίνη αντίστοιχα. Οι δυο αυτές πρωτεΐνες υπερεκφράζονται στην επιδερμίδα με ψωριασικές βλάβες (Nair et al., 2006).

Πέραν των παραπάνω γενετικών τόπων, στον Πίνακα 1 φαίνονται τα σημαντικότερα από τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για τις οποίες έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της ψωρίασης. Τα περισσότερα γονίδια κατέχουν έναν βασικό ρόλο στην εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου, τόσο του εγγενούς όσο και του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος. Τέλος η συσχέτιση με την ψωρίαση πολλών παραλλαγών στα γονίδια που κωδικοποιούν τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης (IL-23, IL-12, IL-29), αναδεικνύει την σημασία των T-κυττάρων γενικά στην παθοφυσιολογία της νόσου και ειδικότερα των T βοηθητικών 17 λεμφοκυττάρων (Boehncke, 2015).

Πίνακας 1. Κύρια γονίδια που σχετίζονται με την ψωρίαση. Κατηγορία A: Γονίδια που σχετίζονται με το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα. Κατηγορία B: Γονίδια που σχετίζονται με το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα. Πηγή: (Caron & Barker, 2012)

Κύρια γονίδια που σχετίζονται με την ψωρίαση			
Κατηγορία	Γονίδιο	Πρωτεϊνική λειτουργία	Μονοπάτι
A	<i>PSORS1</i> (<i>HLA-C</i>)	Αντιγόνο HLA κλάσης I	Παρουσίασης αντιγόνου
A	<i>ERAP1</i>	Πεπτιδάση του ΕΔ - Επεξεργασία πρωτεϊνών για παρουσίαση στο MHC I	Παρουσίασης αντιγόνου
A	<i>IL23A</i>	Υπομονάδα της IL-23	Σηματοδοτικό της IL-23
A	<i>IL23R</i>	Υπομονάδα του υποδοχέα της IL-23	Σηματοδοτικό της IL-23
B	<i>IL12B</i>	Κοινή υπομονάδα της IL-12 και της IL-23	Σηματοδοτικό της IL-23
B	<i>IL28RA</i>	Υπομονάδα του υποδοχέα της IL-29	Σηματοδοτικό της IFN
B	<i>TNFAIP3</i>	Αναστολέας του TNF-α και πρόκληση σηματοδότησης του NF-κB	Σηματοδοτικό του NF-κB
B	<i>TNIP1</i>	Αναστολέας του TNF-α και πρόκληση σηματοδότησης του NF-κB	Σηματοδοτικό του NF-κB

1.1.5 Ανοσοπαθογένεια

Περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν, με αποτέλεσμα την απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και τον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων του δέρματος. Οι μελέτες συσχέτισης που έχουν πραγματοποιηθεί στο σύνολο του γονιδιώματος, εντόπισαν πως σχετίζονται με την ψωρίαση κυρίως γονίδια σχετικά με το ανοσοποιητικό σύστημα (Elder, 2009).

Όπως μία οποιαδήποτε ανοσολογική αντίδραση, η εκδήλωση της ψωρίασης λαμβάνει χώρα σε τρία στάδια. Το πρώτο είναι αυτό της ευαισθητοποίησης, κατά το οποίο T λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται αφού δένδριτικά κύτταρα τους έχουν παρουσιάσει και προωθήσει κάποιον αντιγονικό παράγοντα. Στο στάδιο αυτό δεν εμφανίζονται δερματικές αλλοιώσεις. Στη συνέχεια υπάρχει ένα σιωπηλό στάδιο το οποίο ακολουθείται από τη δραστική φάση της νόσου. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο, την δραστική φάση κύτταρα του ανοσοποιητικού διηθούν το δέρμα ενεργοποιώντας τα δερματικά ανοσολογικά κύτταρα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση κερατινοκυττάρων και την δημιουργία ψωριασικών βλαβών στο δέρμα (Sabat et al., 2007).

Πιο αναλυτικά, η ψωρίαση προκαλείται από μία ακολουθία γεγονότων η οποία οδηγεί σε απορρύθμιση το ανοσοποιητικό σύστημα προκαλώντας μία αυτοάνοση κατάσταση. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2 εναρκτήριοι παράγοντες της ακολουθίας αυτής είναι συχνά ένα τραύμα ή κάποια λοίμωξη, λόγω της οποίας ενεργοποιούνται τα δερματικά δένδριτικά κύτταρα (DDCs). Η ενεργοποίηση των DDCs μπορεί να γίνει μέσω δύο οδών. Σύμφωνα με το πρώτο μονοπάτι τα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας παράγουν ιντερλευκίνη-1β (IL-1B), ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF-a), παράγοντες οι οποίοι οδηγούν στην ενεργοποίηση των δερματικών δένδριτικών κυττάρων DDCs. Το δεύτερο μονοπάτι περιλαμβάνει την δημιουργία συμπλοκών μεταξύ του DNA ή RNA τα οποία απελευθερώνονται από αποπτωτικά κύτταρα του δέρματος, με τα αντιμικροβιακά πεπτίδια (LL-37) που παράγονται από τα κύτταρα της κερατίνης στιβάδας της επιδερμίδας. Το σύμπλοκο αυτό ενεργοποιεί τα πλασματοκυτταροειδή δένδριτικά κύτταρα (pDCs), τα οποία με τη σειρά τους παράγουν ιντερφερόνη-α (IFN-a), μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση των δερματικών δένδριτικών κυττάρων DDCs. Παράλληλα η ιντερφερόνη-α (IFN-a) που παράγεται, ενεργοποιεί τα Vγ9Vδ2 T-κύτταρα τα οποία με άμεσους και έμμεσους μηχανισμούς, προσελκύουν ουδετερόφιλα με αποτέλεσμα την διατήρηση της φλεγμονής στην επιδερμίδα μέσω αυτού του συστήματος θετικής ανατροφοδότησης.

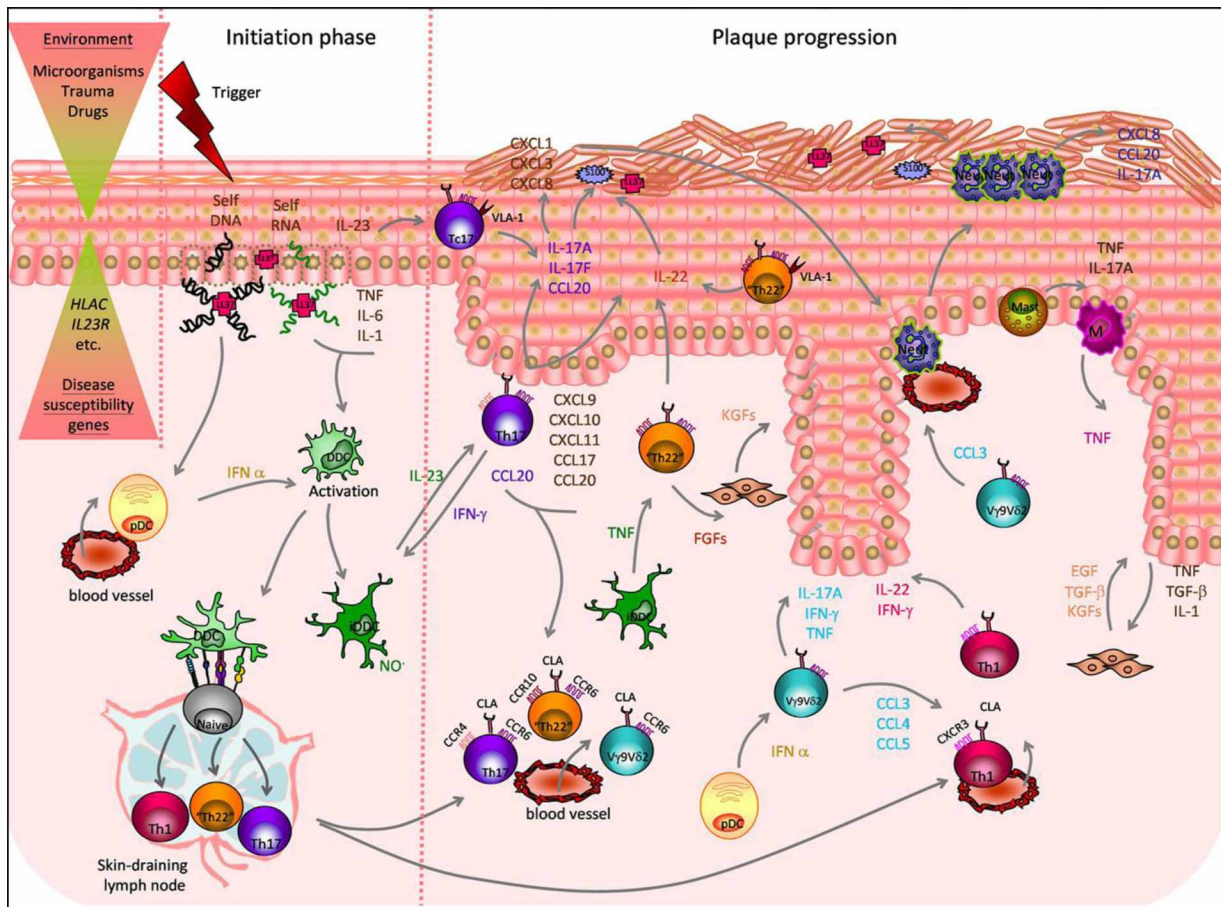
Στη συνέχεια, τα ενεργοποιημένα δερματικά δενδριτικά κύτταρα DDCs μεταναστεύουν στους λεμφαδένες όπου τα παρθένα T κύτταρα διαφοροποιούνται σε δραστικά T-κύτταρα, αφού διεγερθούν από την επαφή τους με τα DDCs, τα οποία αναλαμβάνουν τον ρόλο αντιγόνου. Συγκεκριμένα διαφοροποιούνται στα T-βοηθητικά κύτταρα τύπου 1 (Th1), T-βοηθητικά κύτταρα τύπου 17 (Th17), T-βοηθητικά κύτταρα τύπου 22 (Th22). Τα παραπάνω δραστικά T-κύτταρα έχουν την ιδιότητα να εκφράζουν το δερματικό λευκοκυτταρικό αντιγόνο CLA, λόγω του οποίου προσελκύονται από τις χημειοκίνες 20 και 17 (CCL20, CCL17) που εκκρίνουν τα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας. Μέσω του παραπάνω μηχανισμού τα T-βοηθητικά κύτταρα μεταφέρονται στο ψωριασικό χόριο όπου συμβάλλουν στη δημιουργία ψωριασικής πλάκας. Μόρια προσκόλλησης που παράγονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του αίματος, λειτουργούν ως οχήματα μεταφοράς των παραπάνω T-βοηθητικών κυττάρων διαμέσου των αιμοφόρων αγγείων (Di Meglio et al., 2011).

Μια παράλληλη διεργασία του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη δημιουργία δερματικών βλαβών της ψωρίασης περιλαμβάνει τα φλεγμονώδη δερματικά δενδριτικά κύτταρα iDDCs, τα οποία προέρχονται από την ενεργοποίηση των δερματικών δενδριτικών κυττάρων DDCs. Τα iDDCs παράγουν ελεύθερες ρίζες νιτρικού οξειδίου (NO•), ιντερλευκίνη 23α (IL-23A) και παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF-α). Αρχικά η ιντερλευκίνη 23α (IL-23A) επάγει την έκκριση ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) από τα T-βοηθητικά 17 κύτταρα (Th-17) η οποία προάγει την περαιτέρω ενεργοποίηση των φλεγμονωδών δερματικών δενδριτικών κυττάρων iDDCs. Τα T-βοηθητικά 17 κύτταρα (Th-17) εκκρίνουν επιπλέον ιντερλευκίνη-17α (IL-17A), ιντερλευκίνη 17F (IL-17F) και χημειοκίνη 20 (CCL20), τα οποία οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή από τα κερατινοκύτταρα χημειοκινών και αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs). Τα τελευταία, έχοντας την ιδιότητα να προσελκύουν ουδετερόφιλα και άλλα φαγοκύτταρα συμβάλλουν στη δημιουργία του φλεγμονώδους περιβάλλοντος του ψωριασικού χορίου.

Ανάλογα με τον παραπάνω μηχανισμό ο TNF-α μπορεί, μέσω της έκκρισης ιντερλευκίνης 22 (IL-22) από τα T-βοηθητικά 22 κύτταρα (Th-22) και την προσέλκυση ουδετερόφιλων, να προκαλέσει το ίδιο αποτέλεσμα. Η συσσώρευση ουδετερόφιλων που επιτυγχάνεται τελικά και στις δύο περιπτώσεις έχει ως αποτέλεσμα την προσέλκυση T-κυτταροτοξικών κυττάρων 17 (Tc-17) T-βοηθητικών 22 κυττάρων (Th-22), τα οποία φέρουν το μόριο προσκόλλησης VLA-1 και οδηγούν σε περαιτέρω απελευθέρωση ιντερλευκίνης 17α (IL-17A), ιντερλευκίνης 17F (IL-17F) και χημειοκίνης 20 (CCL20) και την εκ των έσω ανατροφοδότηση του συστήματος αυτού. Η

ιντερλευκίνη 17α (IL-17A) και η ιντερλευκίνη 22 (IL-22) που παράγονται μέσω των παραπάνω διεργασιών, προκαλούν αύξηση του πολλαπλασιασμού και της λανθασμένης διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία επιδερμικής υπερπλασίας και τελικά τον σχηματισμό ψωριασικής πλάκας. Τέλος, τα κερατινοκύτταρα που παράγουν ιντερλευκίνη 1 (IL-1), παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF) και μεταμορφωτικό αυξητικό παράγοντα (TGF-β), αλληλεπιδρούν με τους ινοβλάστες οι οποίοι απαντούν με την απελευθέρωση αυξητικού παράγοντα κερατινοκυττάρων (KGF), επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) καθώς και αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (FGFs), μέσω των T-βοηθητικών 22 κύτταρων (Th-22), συντελώντας τελικά στην αναγέννηση των ιστών και την ανανέωση της κεράτινης στιβάδας της επιδερμίδας (Di Meglio et al., 2011).

Μέσω του παραπάνω πολύπλοκου μηχανισμού βλέπουμε πως εγκαθίσταται ένα κλειστό σύστημα ανατροφοδότησης μεταξύ των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και των κυττάρων του δέρματος, με αποτέλεσμα την υπέρμετρη παραγωγή κερατινοκυττάρων και τη συνεχή δημιουργία ψωριασικών πλακών.



Εικόνα 2. Ανοσοπαθογένεια της ψωρίασης. pDCs: πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα, DDCs: δερματικά δενδριτικά κύτταρα, iDDCs: φλεγμονώδη δερματικά δενδριτικά κύτταρα, Th: T-βοηθητικά κύτταρα, Tc: T-κυτταροτοξικά κύτταρα, IL: ιντερλευκίνη, TNF: παράγοντας νέκρωσης όγκων, TGF: μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας, KGF: αυξητικός παράγοντας κερατινοκυττάρων, EGF: επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, FGFs: αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών, IFN: ιντερφερόνη, CLA: δερματικό λευκοκυτταρικό αντιγόνο, CCL: χημειοκίνες, NO•: ελεύθερες ρίζες νιτρικού οξειδίου, AMPs: αντιμικροβιακά πεπτίδια. Πηγή:(Di Meglio et al., 2011).

1.2 Θεραπεία και συννοσηρότητα της ψωρίασης

Έχει εντοπιστεί πως άτομα που πάσχουν από ψωρίαση εμφανίζουν σε μεγαλύτερη συχνότητα από τον γενικό πληθυσμό διάφορες άλλες παθήσεις όπως σακχαρώδη διαβήτη, νόσο Crohn, στεφανιαία νόσο, υπέρταση, κατάθλιψη κ.λπ. (Aurangabadkar, 2013).

Επιπλέον, η σοβαρότητα της νόσου στους ψωριασικούς ασθενείς, αποτελεί παράγοντα που ενισχύει τον κίνδυνο της εμφάνισης των παραπάνω συννοσηροτήτων. Ως εκ τούτου, νοσήματα με παρόμοιους μηχανισμούς παθογένεσης, εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με ψωρίαση μέτριας έως σοβαρής βαρύτητας (Onumah & Kircik, 2012).

Τέλος, σημαντικό ρόλο στην αύξηση της συννοσηρότητας της ψωρίασης παίζει και η ηλικία, καθώς σύμφωνα με μελέτες, οι ψωριασικοί ασθενείς άνω των 65 ετών έχουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης υπέρτασης, σακχαρώδους διαβήτη, υπερτροφίας της αριστερής κοιλίας και αυξημένες τιμές σακχάρου σε σχέση με την αντίστοιχη ηλικιακή ομάδα του γενικού πληθυσμού (Fernández-Torres et al., 2012).

Η συννοσηρότητα λοιπόν, καθώς επηρεάζει επιπλέον την ήδη επιβαρυνόμενη ποιότητα ζωής των ψωριασικών ασθενών, λαμβάνεται υπ' όψιν στην επιλογή του θεραπευτικού σχήματος για κάθε ασθενή.

Η θεραπεία εκλογής για τον κάθε ασθενή εξαρτάται από την βαρύτητα της νόσου, την ηλικία και το φύλλο. Στην τελική επιλογή του θεραπευτικού σχήματος λαμβάνεται επίσης υπ' όψιν η ύπαρξη άλλων νοσημάτων καθώς και προσωπικά στοιχεία του κάθε ασθενή που αφορούν τον αντίκτυπο της νόσου στην εργασιακή του απασχόληση, την ψυχολογία του και την κοινωνική του ζωή.

Οι θεραπευτικές επιλογές χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες, την θεραπεία με τοπική εφαρμογή σκευασμάτων, την φωτοθεραπεία και την συστηματική χορήγηση φαρμάκων. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν ποικίλες επιλογές θεραπευτικών σχημάτων, δεν υπάρχει φαρμακευτική αγωγή που να θεραπεύει οριστικά την ψωρίαση (Kim et al., 2017).

1.2.1 Τοπική αγωγή

Τα τοπικά σκευάσματα χρησιμοποιούνται είτε αποκλειστικά σε ασθενείς με ήπια ψωρίαση ή συνδυαστικά με τη συστηματική αγωγή όταν αυτό απαιτείται από τη σοβαρότητα της ασθένειας. Οι κυριότερες δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ως τοπική αγωγή είναι:

Κορτικοστεροειδή

Χρησιμοποιούνται σε διάφορες μορφές, κρέμας ή αλοιφής και σε ποικιλία συνδυασμών και δραστηριότητας. Εμφανίζουν γενικά καλή ανοχή σε μακροχρόνια χρήση και λόγω της αντιφλεγμονώδους δράσης τους, προσφέρουν ισχυρή αναλγητική και αντικνησώδη δράση. Συνδυάζονται με δραστικές ουσίες άλλων κατηγοριών, όπως για παράδειγμα τον κερατολυτικό παράγοντα σαλικυλικό οξύ, προσφέροντας καλύτερο αποτέλεσμα στις περιπτώσεις έντονων ψωριασικών πλακών. Μπορούν να βελτιώσουν τις βλάβες στο 45-89% των ασθενών ανάλογα με την ισχύ τους (Lebwohl et al., 2005). Μακροχρόνια χρήση τους μπορεί σπάνια να προκαλέσει καταστολή του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA Axis) (Kim et al., 2017).

Ανάλογα βιταμίνης D3

Στην αντιμετώπιση της ψωρίασης χρησιμοποιούνται οι καλσιποτριόλη, η καλσιτριόλη και η τακαλισιόλη. Αποτελούν τα αποτελεσματικότερα μέσα τοπικής θεραπείας στην ψωρίαση, μετά τα κορτικοστεροειδή. Χρησιμοποιούνται είτε ως μονοθεραπεία είτε συνδυαστικά με κορτικοστεροειδή, ο συνδυασμός των οποίων έχει βρεθεί πως έχει καλύτερα αποτελέσματα από την χρήση του κάθε παράγοντα μεμονωμένα. Αντένδειξη αποτελεί η χρήση τους με σαλικυλικό οξύ και προ της φωτοθεραπείας. Η καλσιποτριόλη αποτελεί το φάρμακο εκλογής στη θεραπεία της ψωρίασης κατά πλάκας. Δρα ρυθμίζοντας την διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων, και μειώνοντας την δραστηριότητα των T λεμφοκυττάρων που συμμετέχουν στον μηχανισμό σχηματισμού των ψωριασικών βλαβών. Έχει αποδειχθεί πως η χρήση της είναι ασφαλής και αποτελεσματική σε ασθενείς με νόσο μέτριας σοβαρότητας. Ως ανεπιθύμητες ενέργειες μπορεί να εμφανιστεί ήπια δερματίτιδα και σπάνια σε υψηλές δόσεις υπερκαλιαιμία (Kim et al., 2017).

Τοπικά ρετινοειδή

Εκπρόσωπος τους σε χρήση για την αντιμετώπιση της ψωρίασης είναι η ταζαροτένη. Βελτιώνει την επιδερμική βλάβη της ψωριασικής πλάκας, αλλά έχει κατηγορηθεί για την πρόκληση τοπικού ερεθισμού στην επιδερμίδα. Συνήθως χορηγείται συνδυαστικά με κορτικοστεροειδή (Lebwohl et al., 2005).

Λοιποί παράγοντες τοπικής χρήσης

Παλαιότεροι παράγοντες που όμως χρησιμοποιούνται ακόμη είναι η ανθραλίνη και η πίσσα, των οποίων η χρήση είναι περιορισμένη λόγω της δυσάρεστης μυρωδιάς τους, και του ερεθισμού που προκαλούν στο δέρμα (Lebwohl et al., 2005).

1.2.2 Φωτοθεραπεία

Η φωτοθεραπεία χρησιμοποιείται σε μέτριας έκτασης ψωρίαση. Εφαρμόζεται είτε ως μονοθεραπεία ή συνδυάζεται με άλλη τοπική ή συστηματική αγωγή και επιφέρει μείωση του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων, με άμεση συνέπεια την βελτίωση της εικόνας των ψωριασικών βλαβών. Χρησιμοποιείται ακτινοβολία του υπεριώδους φάσματος UVB ή UVA, σε εφαρμογές 2-3 φορές την εβδομάδα για χρονικό διάστημα 4 έως 12 εβδομάδων. Η πρώτη επιλογή περιλαμβάνει την έκθεση των βλαβών σε UVB ακτινοβολία ευρέος φάσματος (290-320 nm) ή στενού φάσματος (311nm) που θεωρείται το πιο θεραπευτικό της τμήμα και οδηγεί σε θεραπεία των βλαβών στο 63-75% των ασθενών. Αποτελεί ασφαλή θεραπεία για παιδιά και εγκύους, εμφανίζει ήπιες ανεπιθύμητες ενέργειες μετά την εφαρμογή, όπως ερυθρότητα αλλά μακροπρόθεσμα προκαλεί φωτογήρανση του δέρματος και έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση δερματολογικών όγκων (Κοσμαδάκη κ. συν., 2007).

Στη δεύτερη περίπτωση φωτοθεραπείας, χρησιμοποιείται UVA ακτινοβολία, προ της έκθεσης στην οποία γίνεται χορήγηση φωτοευαίσθητων χημικών ουσιών είτε τοπικά είτε συστηματικά. Ονομάζεται φωτοχημειοθεραπεία (PUVA) και οι φωτοευαίσθητες ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι τα ψωραλένια (5-μεθυλψωραλένιο 5-MOP ή 8-μεθυλψωραλένιο 8-MOP). Άμεσες ανεπιθύμητες ενέργειες της είναι η ναυτία και ο πονοκέφαλος. Μακροπρόθεσμα, μετά από σημαντικό αριθμό συνεδριών και ιδιαίτερα αν η εφαρμογή της ακολουθηθεί από χορήγηση κυκλοσπορίνης, μπορεί να προκαλέσει δερματολογικούς όγκους (Κοσμαδάκη κ. συν., 2007).

Η στενού φάσματος UVB ακτινοβολία χρησιμοποιείται πλέον ως πρώτης γραμμής θεραπεία λόγω του συγκριτικά ασφαλέστερου προφίλ και της αποτελεσματικότητάς της. Παρόλα αυτά αποτελεί ένα θεραπευτικό σχήμα στο οποίο δύσκολα συμμορφώνονται οι ασθενείς λόγω των πολυάριθμων συνεδριών και της δυσκολίας εύρεσης κέντρων φωτοθεραπείας (Kim et al., 2017).

1.2.3 Συστηματική αγωγή

Η μετάβαση σε συστηματική αγωγή κατά της ψωρίασης γίνεται σε περιπτώσεις μέτριας ή σοβαρής μορφής της νόσου, σε περιπτώσεις που ο ασθενής παρουσιάζει εξάρσεις με μεγάλη συχνότητα, όταν οι ψωριασικές αλλοιώσεις επηρεάζουν την κοινωνική ζωή του ασθενούς και τέλος, όταν συνυπάρχει ψωριασική αρθρίτιδα.

Βιολογικοί παράγοντες

Οι βιολογικοί παράγοντες αποτελούν νεότερη θεραπευτική προσέγγιση στην ψωρίαση αλλά και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα όπως οι ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου. Χρησιμοποιούνται στη θεραπεία μέτριας έως και σοβαρής ψωρίασης, ως θεραπεία δεύτερης γραμμής, όταν δηλαδή είτε έχει αποτύχει είτε δεν έγινε καλά ανεκτή από τον ασθενή κάποια άλλη μέθοδος, όπως η φωτοθεραπεία ή κάποια κλασική συστηματική αγωγή όπως η μεθοτρεξάτη και η κυκλοσπορίνη. Οι βιολογικοί παράγοντες που βρίσκονται σε κυκλοφορία ανήκουν σε τρεις ομάδες ανάλογα με τον μηχανισμό μέσω του οποίου δρουν στον οργανισμό. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τους παράγοντες που έχουν ως μόριο στόχο τον TNF-α (infliximab, adalimumab, etanercept), ενώ η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει αυτούς που στοχεύουν τις ιντερλευκίνες 12 και 23 (ustekinumab). Τέλος, η τρίτη ομάδα βιολογικών παραγόντων περιλαμβάνει αυτούς που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση και μετανάστευση των T-κυττάρων (alefacept, efalizumab) (Sivamani et al., 2010).

Κλασική συστηματική φαρμακευτική αγωγή

Στην συστηματική φαρμακευτική αγωγή που ακολουθείται παραδοσιακά ανήκουν η μεθοτρεξάτη, η ακιτρετίνη και η κυκλοσπορίνη, η οποία λόγω της χρήσης της στο πρωτόκολλο της μελέτης μας θα παρουσιαστεί αναλυτικά στην επόμενη ενότητα.

Μεθοτρεξάτη

Η Μεθοτρεξάτη ανήκει στην κατηγορία των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, είναι ανταγωνιστής του φυλλικού οξέος, με αποτέλεσμα την αναστολή της μετατροπής του φυλλικού οξέος στον δραστικό του μεταβολίτη το τετραϋδροφυλλικό οξύ από την διυδροφυλλινική αναγωγή. Λόγω της αναστολής της σύνθεσης φυλλικού οξέος ελαττώνεται η σύνθεση DNA και προοδευτικά τα κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση. Χρησιμοποιείται λοιπόν στην ψωρίαση λόγω

των κυτταροστατικών και αντιφλεγμονωδών της ιδιοτήτων στη θεραπεία μέτριας έως σοβαρής ψωρίασης. Παρουσιάζει αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες με πιο σοβαρή την ηπατοτοξικότητα (Kim et al., 2017). Οι πιο κοινές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι ναυτία, διάρροια, έμετος, κόπωση οι οποίες ελέγχονται ικανοποιητικά με λήψη συμπληρωμάτων φυλλικού οξέος (Lee & Kalb, 2008).

Ακιτρετίνη

Η ακιτρετίνη είναι ένα συνθετικό ανάλογο του ρετινοϊκού οξέος και χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση περιστατικών σοβαρής ψωρίασης. Εξομαλύνει τον πολλαπλασιασμό των επιδερμικών κυττάρων και συνήθως χρησιμοποιείται συνδυαστικά με τη φωτοθεραπεία όπου επιτυγχάνονται καλύτερα αποτελέσματα με μειωμένη έκθεση στην ακτινοβολία (Winterfield et al., 2005). Η χρήση της μπορεί να προκαλέσει τρανσαμινασαιμία και υπερτριγλυκεριδαιμία καθώς επίσης, λόγω της τερατογόνου δράσης της θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση της σε ασθενείς αναπαραγωγικής ηλικίας ή να λαμβάνεται επαρκής αντισύλληψη κατά την χρήση της. Άλλες πιο κοινές ανεπιθύμητες ενέργειες αποτελούν η ξηρότητα στους βλεννογόνους, η αρθραλγία, η φωτοευαισθησία του δέρματος και οι γαστρεντερικές διαταραχές (Kim et al., 2017).

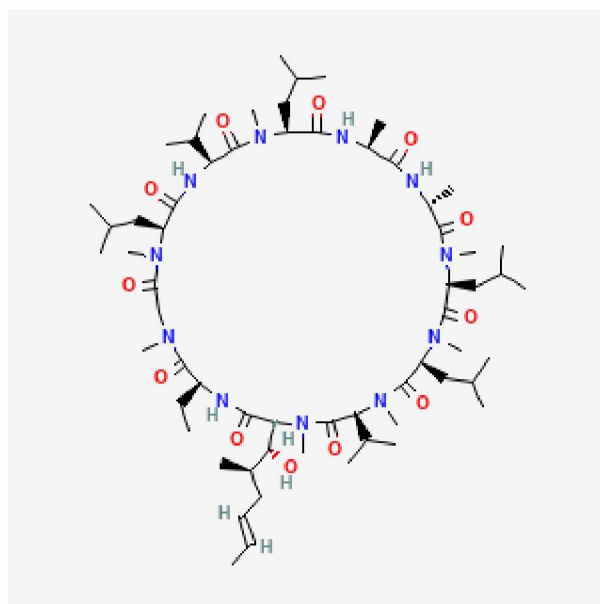
1.3 Κυκλοσπορίνη

1.3.1 Γενικά για την κυκλοσπορίνη

Η κυκλοσπορίνη (CsA) απομονώθηκε το 1970, από τον μύκητα *Tolypocladium inflatum* Gams και είναι ένα υδρόφοβο πολυπεπτιδίο έντεκα αμινοξέων. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ως ανοσοκατασταλτικός παράγοντας μετά από μεταμοσχεύσεις οργάνων.

Από το 1997 η κυκλοσπορίνη έχει λάβει άδεια χρήσης από τον FDA για την αντιμετώπιση της ψωρίασης καθώς μελέτες αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητά της στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, την ψωριασική αρθρίτιδα και τη δερματική ψωρίαση (Prodanovic & Korman, 2008). Αποτέλεσε τον πρώτο παράγοντα ανοσορρύθμισης T-κυττάρων που δεν προκαλεί καταστολή του μυελού των οστών και εμφανίζει ελεγχόμενη τοξικότητα.

Κυκλοφορεί σε φαρμακοτεχνικές μορφές για χορήγηση από το στόμα αλλά και για ενδοφλέβια χορήγηση. Η κυκλοσπορίνη επιλέγεται για τη θεραπεία ασθενών με ψωρίαση στην οξεία μορφή ψωρίασης, σε ερυθροδερμική, φλυκταινώδη ψωρίαση, σε ψωρίαση ονύχων, στην ψωριασική αρθρίτιδα, σε χρόνια δερματική ψωρίαση ανθεκτική σε τοπική ή άλλη συστηματική αγωγή, όταν ο δείκτης PASI είναι πάνω από 10, και όταν οι δερματικές βλάβες επηρεάζουν την κοινωνική ζωή και κατ' επέκταση την ψυχολογική κατάσταση του ασθενή (C. E. M. Griffiths et al., 2004).



Εικόνα 3. Χημική δομή της κυκλοσπορίνης.

Πηγή: PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284373#section=2D-Structure>)

Η σωστή δοσολογία ποικίλει ανάμεσα στους ασθενείς, λόγω μεταβλητότητας στην απορρόφηση της, και απαιτείται παρακολούθηση των επιπέδων της στο αίμα (TDM, Therapeutic Drug Monitoring) λόγω του στενού θεραπευτικού της εύρους και των σοβαρών δοσοεξαρτώμενων ανεπιθύμητων ενεργειών (Moes et al., 2014). Συνταγογραφείται ως θεραπεία μικρής διάρκειας (έως 16 εβδομάδες) με τη δυνατότητα τακτικής πραγματοποίησης κύκλων θεραπειών αυτής της διάρκειας. Το παραπάνω σχήμα ελαχιστοποιεί τις παρενέργειες καθώς ο ασθενής δεν έχει συσσωρευτικά μεγάλη έκθεση στο φάρμακο.

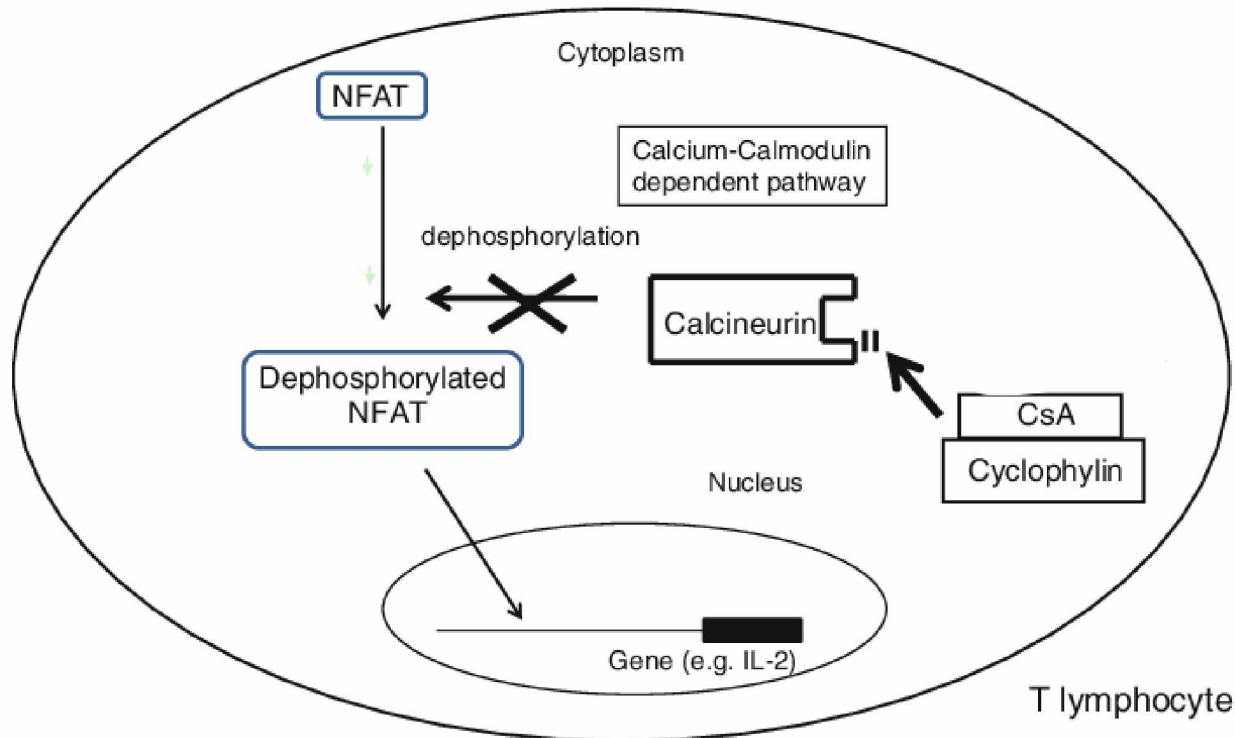
Όσον αφορά τις ανεπιθύμητες ενέργειες, είναι δοσοεξαρτώμενες και καλά διαχειρίσιμες, αλλά η εμφάνισή τους παρουσιάζει υψηλή ετερογένεια μεταξύ των ασθενών. Η κυκλοσπορίνη

πλεονεκτεί σε σχέση με τους λοιπούς ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες καθώς δεν προκαλεί καταστολή του μυελού των οστών, δεν είναι μεταλλαξιγόνος και δεν επηρεάζει τη γονιμότητα (C. E. Griffiths et al., 2000). Μπορεί όμως να επηρεάσει αναστρέψιμα ή μη τη νεφρική λειτουργία, να προκαλέσει αρτηριακή υπέρταση, τρόμο, κεφαλαλγία, ήπια υπομαγνησισαμία, υπερκαλιαιμία, αυξημένο ουρικό οξύ, διαταραχές του γαστρεντερικού συστήματος, κόπωση, υπερπλασία στις ουλές και τριχόπτωση (Ho, 2004). Τέλος, εάν η χορήγηση της κυκλοσπορίνης συνδυαστεί με χημειοθεραπεία PUVA μπορεί να προκαλέσει δερματολογικούς όγκους (Κοσμαδάκη κ. συν., 2007).

1.3.2 Μηχανισμός δράσης κυκλοσπορίνης

Κατά την φυσιολογική διεργασία μιας ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού, γίνεται ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και ακολούθως εμφανίζεται αυξημένη εισροή ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο. Αφού η συγκέντρωση του ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου αυξηθεί πάνω από κάποιο όριο, τότε δημιουργείται το σύμπλοκο ασβεστίου-καλμοδουλίνης και καλσινευρίνης. Η καλσινευρίνη είναι μία φωσφατάση που όταν βρεθεί στο παραπάνω σύμπλοκο καταλύει την αποφωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα NF-AT (Nuclear factor of activated T-cells). Ο μεταγραφικός παράγοντας αυτός αφού μεταφερθεί στο εσωτερικό του πυρήνα ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων της ανοσολογικής απόκρισης, όπως αυτό της ιντερλευκίνης-2 (IL-2) (Prodanovic & Korman, 2008).

Όταν χορηγηθεί κυκλοσπορίνη, σχηματίζει σύμπλοκο με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη κυκλοφιλίνη. Το σύμπλοκο αυτό δεσμεύει την καλσινευρίνη με αποτέλεσμα την εκλεκτική αναστολή της δράσης της ως φωσφατάση. Με αυτόν τον τρόπο αναστέλλεται η δράση του μεταγραφικού παράγοντα NF-AT, αφού η φωσφορυλίωση που τον ενεργοποιεί δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί. Ως άμεσο αποτέλεσμα, δεν ενεργοποιείται η μεταγραφή των γονιδίων των παρακάτω κυτταροκινών: ιντερλευκίνες, (L-2, IL-3, IL-4), παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF- α), ιντερφερόνη- γ (INF- γ) που θα ενεργοποιούσαν περαιτέρω τα T-λεμφοκύτταρα και θα προήγαγαν τη φλεγμονή (Εικόνα 4). Έτσι έχουμε τελικά αναστολή της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των T-κυττάρων που συμμετέχουν στην διατήρηση της φλεγμονής και συνεπώς των ψωριασικών βλαβών (Prodanovic & Korman, 2008).



Εικόνα 4: Απλοποιημένο μοντέλο του μηχανισμού δράσης της κυκλοσπορίνης. Πηγή:(Naganuma et al., 2011)

Επιπλέον η κυκλοσπορίνη παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση λόγω της μειωμένης απελευθέρωσης ισταμίνης από τα μαστοκύτταρα που οδηγεί σε μειωμένη έκφραση μορίων προσκόλλησης (ICAM) στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του αίματος. Τα μόρια προσκόλλησης λειτουργούν ως οχήματα μεταφοράς των T-βοηθητικών κυττάρων διαμέσου των αιμοφόρων αγγείων και συνεπώς η μειωμένη έκφρασή τους οδηγεί στον περιορισμό της φλεγμονής και τελικά της ψωριασικής βλάβης (Ho, 2004).

Τέλος, έχει αποδειχθεί πως η κυκλοσπορίνη εμπλέκεται στα μονοπάτια δράσης των πρωτεϊνικών κινασών JNK και p38 που ανήκουν σε μια υποομάδα των κινασών MAPK (mitogen-activated protein kinase) και για τις οποίες ήδη γνωρίζαμε πως ενεργοποιούνται από τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και από το περιβαλλοντικό στρες. Αποδείχθηκε ότι η δράση της κυκλοσπορίνης επηρεάζει μέσω των μονοπατιών αυτών, την έκφραση γονιδίων ιντερλευκίνης 2 (IL-2) σε T-λεμφοκύτταρα, γεγονός που πιθανώς υποδεικνύει την ύπαρξη μορίων στόχων της κυκλοσπορίνης σε μονοπάτια εκτός του μονοπατιού καλσινευρίνης-NF-AT (S Matsuda et al., 1998).

1.4 Φαρμακογενετική

Η κλασική φαρμακολογία έχει από την αρχή της ιστορίας της στηριχθεί στην εμπειρική προσέγγιση στη θεραπεία ασθενών, και συνεπώς η αποτελεσματικότητα της φαρμακοθεραπείας που παρέχεται παρουσιάζει σημαντικές αποκλίσεις από ασθενή σε ασθενή. Οι αποκλίσεις αυτές περιλαμβάνουν περιπτώσεις μειωμένης φαρμακολογικής δράσης και περιπτώσεις εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών λόγω τοξικότητας. Η φαρμακογενετική, αποτελεί το πεδίο στο οποίο συνδυάζονται η κλινική φαρμακολογία και η γενετική με σκοπό την εξατομίκευση της παρεχόμενης φαρμακοθεραπείας σύμφωνα με τη γενετική βάση του κάθε ασθενή (Βιζιριανάκης, 1990).

Κατά την είσοδο ενός φαρμάκου στον οργανισμό οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση ή μη θεραπευτικού αποτελέσματος είναι δυο, η φαρμακοκινητική και η φαρμακοδυναμική του. Η φαρμακοκινητική αφορά την απορρόφηση, τον μεταβολισμό και την απέκκριση του φαρμάκου και επηρεάζει τελικά την ποσότητα του φαρμάκου που θα καταφέρει να φτάσει στα μόρια στόχους του, δηλαδή τη βιοδιαθεσιμότητα του. Η φαρμακοδυναμική αφορά την αλληλεπίδραση του φαρμάκου με τα μόρια στόχους του, βάσει του μηχανισμού δράσης του.

Η φαρμακογενετική στοχεύει στην διερεύνηση της ύπαρξης γενετικών διαφορών στα αλληλόμορφα των γονιδίων που κωδικοποιούν τα βιολογικά μόρια που συμμετέχουν στις παραπάνω διεργασίες. Ο συχνότερος τύπος γενετικής ποικιλομορφίας είναι οι σημειακοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (single nucleotide polymorphisms, SNP) όπου κάθε SNP αντιστοιχεί σε ένα μοναδικό νουκλεοτίδιο, το οποίο μπορεί να αντικαθίσταται από κάποιο άλλο ή να προστίθεται ή και να παραλείπεται. Γενετική ποικιλομορφία προκύπτει και από ένα ακόμη είδος μεταβολής του γενετικού υλικού, την ποικιλομορφία αριθμού αντιγράφων (copy number variation CNV), όπου περιοχές του γονιδιώματος μεγέθους από μερικές βάσεις έως και κάποιες χιλιάδες βάσεις, διπλασιάζονται ή απαλείφονται. Κάθε άτομο είναι είτε ετεροζυγώτης είτε ομοζυγώτης για το σπάνιο ή το κοινό αλληλόμορφο, όπου σπάνιο ονομάζεται το αλληλόμορφο που συναντάται λιγότερο συχνά στον πληθυσμό (Νικολάου & Χουβαρδάς, 2015). Εάν οι παραπάνω γενετικές αλλαγές, βάσει της θέσης τους στο γονίδιο, κωδικοποιούν ένα διαφορετικό αμινοξύ ή την πρόωρη λήξη της πρωτεϊνοσύνθεσης, οδηγούν στη δημιουργία μιας διαφορετικής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης και πιθανώς διαφορετικής λειτουργίας της, επηρεάζοντας έτσι την φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική του χορηγούμενου φαρμάκου.

Έτσι, μέσω της φαρμακογενετικής δημιουργούνται μοντέλα πρόβλεψης της αποτελεσματικότητας, της τοξικότητας καθώς και της ιδανικής δοσολογίας για τον κάθε ασθενή, σύμφωνα με τα γενετικά του χαρακτηριστικά. Με τη χρήση των παραπάνω μοντέλων γίνεται στοχευμένα η επιλογή του θεραπευτικού σχήματος για τον κάθε ασθενή με τις λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες και τη βέλτιστη αποτελεσματικότητα.

1.4.1 Φαρμακογενετικές μελέτες σε ασθενείς με ψωρίαση υπό θεραπεία με κυκλοσπορίνη

Η κυκλοσπορίνη απορροφάται στο έντερο, κατόπιν δεσμεύεται από πρωτεΐνες του πλάσματος και μεταβολίζεται κυρίως από το ήπαρ και το έντερο. Η βιοδιαθεσιμότητα της εξαρτάται κυρίως από την P-γλυκοπρωτεΐνη (P-gp) και από τα ισόένζυμα CYP3A4 και CYP3A5 του κυτοχρώματος P450. Η P-γλυκοπρωτεΐνη κωδικοποιείται από το γονίδιο ABCB1 και είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία μεταφέρει εκτός του κυτταροπλάσματος ενδογενείς ουσίες και φάρμακα, όπως και την κυκλοσπορίνη και εκφράζεται στο ήπαρ, στα νεφρά και το έντερο. Τα CYP3A4 και CYP3A5 είναι μεταβολικά ένζυμα και η υποοικογένεια τους CYP3A μεταβολίζει την πλειοψηφία των φαρμάκων στο ήπαρ, όπως και την κυκλοσπορίνη (Ovejero-Benito et al., 2018).

Στα γονίδια των CYP3A4 και CYP3A5 και στο ABCB1 έχουν εντοπιστεί πολλοί σημειακοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) και πιστεύεται πως σε αυτούς οφείλεται η ποικιλομορφία στην φαρμακοκινητική και τη δραστηριότητα της κυκλοσπορίνης μεταξύ των ασθενών που τη λαμβάνουν (Kawauchi et al., 2014).

Σε προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ελληνικό πληθυσμό με ψωρίαση, υπό θεραπεία με κυκλοσπορίνη, βρέθηκε πως το 3435T, σπάνιο αλληλόμορφο του πολυμορφισμού ABCB1 C3435T, βρίσκεται με στατιστικά σημαντικά αυξημένη συχνότητα στους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη (Vasilopoulos et al., 2014).

1.5 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο έλεγχος συσχέτισης 30 πολυμορφισμών γονιδίων που συμμετέχουν και αλληλεπιδρούν στο μονοπάτι δράσης της κυκλοσπορίνης, με την εμφάνιση τοξικότητας κατά τη λήψη κυκλοσπορίνης. Συνδυαστικά με την μελέτη που αναφέρθηκε παραπάνω και έχει ήδη συσχετίσει έναν γενετικό πολυμορφισμό με την ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη, στοχεύουμε στη δημιουργία μοντέλου πρόβλεψης της αποτελεσματικότητας και της τοξικότητας για τον κάθε ασθενή, σύμφωνα με τα γενετικά του χαρακτηριστικά.

2. Πειραματικό μέρος

2.1 Πληθυσμός μελέτης

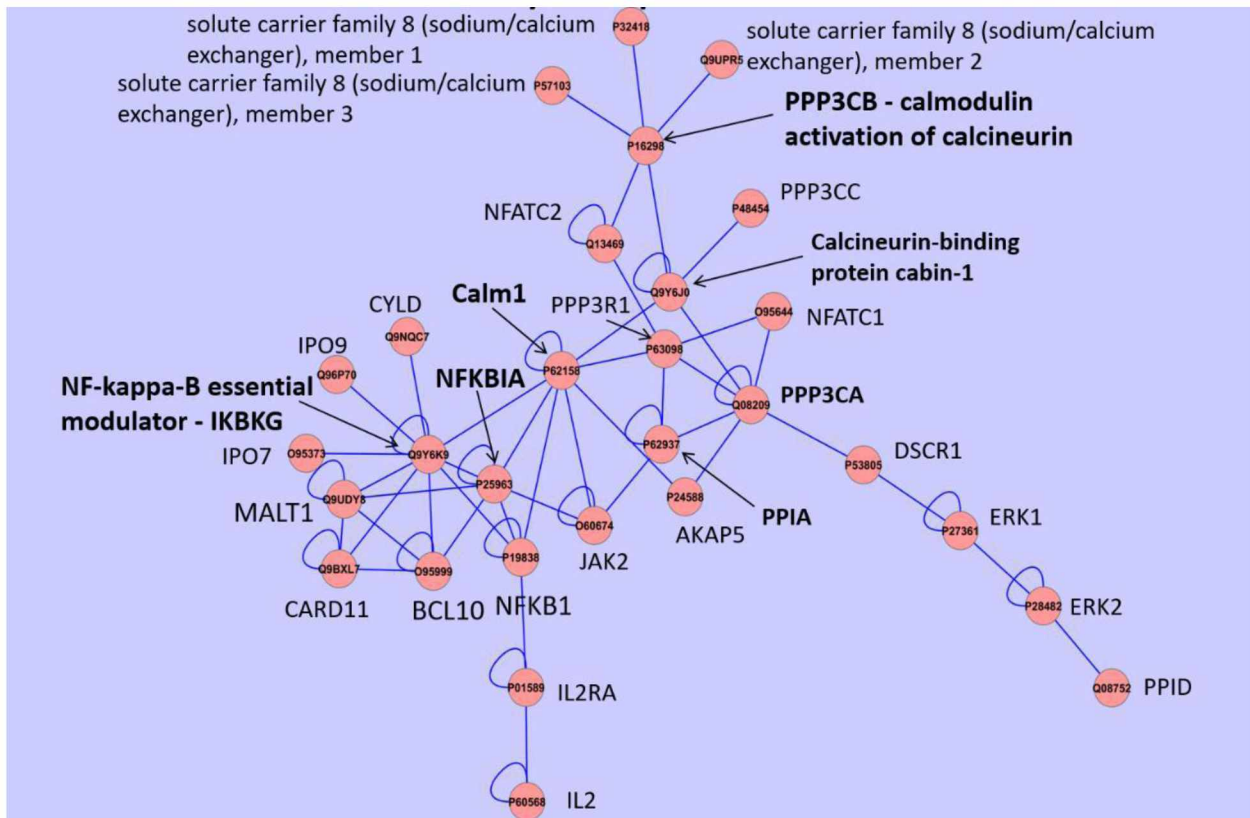
Για τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης συλλέχθηκε δείγμα φλεβικού αίματος από 96 ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με ψωρίαση βάσει του δείκτη PASI, από τη Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και τη Δερματολογική Κλινική του Νοσοκομείου Παπαγεωργίου Θεσσαλονίκης. Τα δείγματα αίματος τοποθετήθηκαν σε ειδικά φιαλίδια με αντιπηκτικό EDTA το οποίο δρα δεσμεύοντας τα ιόντα ασβεστίου του πλάσματος που είναι απαραίτητα για την δράση των παραγόντων πήξης του αίματος (Banfi et al., 2007). Η αποθήκευση των δειγμάτων έγινε στους -20 °C.

Οι ασθενείς έλαβαν κυκλοσπορίνη 3mg ανά κιλό σωματικού βάρους ανά ημέρα, για τουλάχιστον 3 μήνες και κατηγοριοποιήθηκαν βάσει των ανεπιθύμητων ενεργειών που παρουσίασαν σε εκείνους που εμφάνισαν τοξικότητα και σε εκείνους που δεν εμφάνισαν.

Τα δείγματα ελήφθησαν μετά από έγγραφη συγκατάθεση όλων των ασθενών που έλαβαν μέρος στη μελέτη.

2.2 Κριτήρια επιλογής των υπό μελέτη γενετικών πολυμορφισμών

Για την επιλογή των γενετικών πολυμορφισμών της μελέτης αυτής, χρησιμοποιήθηκε το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στο μονοπάτι δράσης της κυκλοσπορίνης, όπως αυτό φαίνεται στην εικόνα 1. Το δίκτυο αυτό, προσδιορίστηκε μέσω της μετα-βάσης δεδομένων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στον άνθρωπο PICKLE (www.pickle.gr) (Dimitrakopoulos et al., 2021; Gioutlakis et al., 2017; Klapa et al., 2013).



Εικόνα 1. Δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στο μονοπάτι δράσης της κυκλοσπορίνης.

Πηγή: (Moschonas N., Vasilopoulos Y., et al., 2020, unpublished observations)

Τα κριτήρια που τέθηκαν για την επιλογή των πολυμορφισμών που μελετήθηκαν ήταν:

α) η συχνότητα εμφάνισης του σπάνιου αλληλόμορφου στον γενικό πληθυσμό να είναι πάνω από 5% (minor allele frequency MAF>5%)

β) να έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι ο πολυμορφισμός είναι λειτουργικός, ότι δηλαδή ο ρόλος του είναι κρίσιμος έχοντας αντίκτυπο στην τελική έκφραση της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το εκάστοτε γονίδιο.

Οι επιλεγμένοι πολυμορφισμοί με τα συνοδά στοιχεία του γονιδίου, της θέσης τους σε αυτό και των πιθανών αλληλόμορφων φαίνονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν

Γονίδιο	rsID	Αλληλόμορφα	Χρωμοσωματική θέση	Θέση στο γονίδιο
<i>PPI</i>	rs8177826	C/G	chr7:44796669	5' UTR
<i>PPP3CA</i>	rs3804358	G/C	chr4:101100944	Ιντρόνιο
<i>PPP3CB</i>	rs12644	C/T	chr10:73437293	3' UTR
<i>PPP3CC</i>	rs7430	G/C	chr8:22540901	3' UTR
	rs4872499	C/T	chr8:22435793	Ανοδικά του γονιδίου
	rs11780915	G/A	chr8:22447504	Ιντρόνιο
<i>PPP3R1</i>	rs1868402	G/A	chr2:68181905	Ιντρόνιο
	rs200513900	delTTTAA / dupTTTAA	chr2:6821818268218190	Ιντρόνιο
<i>NFATC2</i>	rs880324	G/A	chr20:51437653	Ιντρόνιο
<i>NFKB1</i>	rs4648068	A/G	chr4:102597148	Ιντρόνιο
	rs28362491	ATTGATTG/ ATTG	chr4:102500998102501005	2kbp ανοδικά (στον υποκινητή)
<i>SLC8A1</i>	rs13017846	A/G	chr2:40530651	Ιντρόνιο
<i>SLC8A2</i>	rs12459087	G/A	chr19:47466137	Εξόνιο (συνώνυμη μετάλλαξη)
<i>AKAP5</i>	rs2230491	C/T	chr14:64468693	Εξόνιο (αντισηματική μετάλλαξη)
<i>JAK2</i>	rs10758669	C/A	chr9:4981602	3kb ανοδικά του γονιδίου
	rs7849191	C/T	chr9:4988761	Ιντρόνιο
	rs3780378	C/T	chr9:5112288	Ιντρόνιο
<i>CARD11</i>	rs17834873	A/G	chr7:3028279	Ιντρόνιο
<i>MALT1</i>	rs2874116	G/A	chr18:58792367	42.2 kbp καθοδικά του γονιδίου
<i>IPO7</i>	rs12279202	C/T	chr11:9410543	Ιντρόνιο
<i>IPO9</i>	rs8024	C/A	chr1:201876447	3' UTR
	rs696	C/T	chr14:35401887	3' UTR
	rs17103265	AAA/AA	chr14:3540550335405505	2kbp ανοδικά (στον υποκινητή)
<i>CABIN1</i>	rs873833	A/G	chr22:24031430	Ιντρόνιο
	rs422674	C/A	chr22:24010332	2kbp ανοδικά
<i>CALM1</i>	rs12885713	C/A	chr14:90397013	Ιντρόνιο
<i>NOD2</i>	rs7205423	C/G/T	chr16:50735351	Ιντρόνιο
<i>EPCAM-DT</i>	rs7565161	A/G	chr2:47267888	Ιντρόνιο
<i>PPP5D1</i>	rs11083838	C/T	chr19:46584982	Ιντρόνιο
<i>PTGIR</i>	rs12461917	C/A	chr19:46614145	Ιντρόνιο

2.3 Προετοιμασία των δειγμάτων για την ανάλυση γονότυπου

Για την προετοιμασία των δειγμάτων πριν την γονοτύπηση με το σύστημα MassARRAY® της εταιρίας Agena Bioscience™ ακολουθήθηκε η εξής μεθοδολογία:

1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από κύτταρα φλεβικού αίματος
2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.
3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA με φασματοφωτόμετρο.
4. Αραίωση και κατακρήμνιση δειγμάτων γονιδιακού DNA.

2.3.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από κύτταρα φλεβικού αίματος

Τα 96 δείγματα ασθενών με ψωρίαση που συλλέχθηκαν, επεξεργάστηκαν ώστε να πραγματοποιηθεί απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τα εμπύρηνια κύτταρα φλεβικού αίματος, τα λευκά αιμοσφαίρια με το “PureLink Genomic DNA Mini Kit” (Thermo Fisher Scientific).

Περιεχόμενα PureLink Genomic DNA Mini Kit:

- 5 ml Proteinase K (20 mg/ml).

Η πρωτεϊνάση K είναι μια πρωτεάση σερίνης. Διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών των κυττάρων, οδηγώντας στην αποικοδόμηση τους. Επιπλέον αδρανοποιεί τις νουκλεάσες οι οποίες καταστρέφουν τα μόρια DNA.

- 5 ml RNase A (20 mg/ml).

Η ενδονουκλεάση A (RNάση A) είναι ένα περιοριστικό ένζυμο που αποικοδομεί το RNA του δείγματος.

- 50 ml PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer.

Το Lysis Buffer οδηγεί στη λύση του κυττάρου με την καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών.

- 50 ml 97% αιθανόλης.

Με την αιθανόλη επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες.

- 5 × 50 each PureLink™ Spin Columns with Collection Tubes.

- 5 × 100 PureLink™ Collection Tubes (2.0 ml).

- 50 ml PureLink™ Genomic Wash Buffer 1.

- 37.5 ml PureLink™ Genomic Wash Buffer 2.

- 50 ml PureLink™ Genomic Elution Buffer.

Πρωτόκολλο λύσης των κυττάρων του αίματος

1. Προθέρμανση ενός θερμομπλόκ στους 55° C.
2. Σε φιαλίδιο erpendorf γίνεται προσθήκη 20μl πρωτεΐνης K.
3. Στο παραπάνω φιαλίδιο erpendorf προστίθενται 200 μl αίματος.
4. Γίνεται προσθήκη 20 μl Rνάσης A. Ακολουθεί σύντομη ανάδευση σε vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
5. Στο μίγμα προστίθενται 200 μl διαλύματος PureLink Lysis Buffer και ανάδευση σε vortex για να ομογενοποιηθεί.
6. Επώαση στους 55° C σε θερμομπλόκ για 10 λεπτά, για την προαγωγή της πρωτεϊνικής πέψης.
7. Προσθήκη 200 μl 97% αιθανόλης και ανάδευση σε vortex.

Πρωτόκολλο καθαρισμού DNA

1. Τοποθέτηση μιας στήλης PureLink Spin σε Collection tube και προθήκη του διαλύματος που προέκυψε από την κατεργασία για την λύση των κυττάρων του φλεβικού αίματος.
2. Φυγοκέντρηση της στήλης στις 10.000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου, για 1 λεπτό.
3. Απόρριψη του Collection tube και τοποθέτηση της στήλης σε ένα νέο, καθαρό Collection tube.
4. Προσθήκη 500 μl Wash Buffer 1 στη στήλη, το οποίο έχουμε ήδη αραιώσει με αιθανόλη 97% σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
5. Επανάληψη των βημάτων 2 και 3.
6. Προσθήκη 500 μl Wash Buffer 2 στη στήλη, το οποίο έχουμε ήδη αραιώσει με αιθανόλη 97% σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
7. Φυγοκέντρηση της στήλης σε μέγιστη ταχύτητα για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Απόρριψη του Collection tube.
9. Τοποθέτηση της στήλης σε φιαλίδιο erpendorf και προσθήκη 50 μl PureLink Genomic Elution Buffer στη στήλη, για την έκλυση του DNA από τη στήλη.
10. Φυγοκέντρηση της στήλης σε μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό.
12. Για την ανάκτηση επιπλέον γονιδιωματικού DNA ακολουθεί η τοποθέτηση της στήλης σε νέο, καθαρό φιαλίδιο erpendorf και προσθήκη 150 μl PureLink Genomic Elution Buffer.
13. Φυγοκέντρηση της στήλης σε μέγιστη ταχύτητα για 1,5 λεπτό.

14. Αποθήκευση του DNA στους -20°C . Ο τελικός διαλύτης “PureLink Genomic Elution Buffer” του DNA που έχει απομονωθεί, είναι κατάλληλος για μακρόχρονη αποθήκευση καθώς αποτρέπει την όξινη υδρόλυση που θα μπορούσε το DNA να υποστεί κατά την αποθήκευση του σε νερό.

2.3.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της απομόνωσης του DNA με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η αρχή της μεθόδου της δοκιμής αυτής στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο μόριο και συνεπώς, σε ένα πήκτωμα αγαρόζης αν εφαρμοστεί διαφορά δυναμικού, θα μετακινηθεί από τον αρνητικό πόλο προς τον θετικό. Η ταχύτητα μετακίνησης του DNA εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης, την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, τη διαμόρφωση του DNA και το μέγεθος των μορίων DNA. Στο πείραμά μας, με σταθερές τις τρεις πρώτες παραμέτρους, λόγω της μικρότερης αντίστασης στους πόρους του πηκτώματος, μικρότερα μόρια θα μετακινηθούν γρηγορότερα προς τον θετικό πόλο και συνεπώς τη στιγμή διακοπής παροχής ηλεκτρικού πεδίου θα έχουν διανύσει μεγαλύτερη απόσταση.

Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των μορίων DNA, χρησιμοποιείται κάποιος μάρτυρας με κομμάτια DNA γνωστού μοριακού βάρους (ladder).

Για να γίνουν ορατές οι ζώνες που έχουν δημιουργηθεί από τα τμήματα DNA που ηλεκτροφορήθηκαν, χρησιμοποιείται η χρωστική Midori Green Advance (Nippon Genetics). Η ουσία αυτή δεσμεύεται στο DNA και επειδή διεγείρεται από την υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να μπορούμε να φωτογραφίσουμε τις ζώνες κατά την έκθεση τους σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Διαλύματα-Αντιδραστήρια:

- 1000 ml 0,5X TBE
- 10 g αγαρόζης.
- 20 ml χρωστική Midori Green Advance (Nippon Genetics)
- 1 μl ladder 1kb (Nippon Genetics, 110ng/ μl)
- 100 μl 3X loading dye
- 50 ml dH₂O
- Δείγματα απομονωμένου DNA

Προετοιμασία πηκτώματος 1,5%

Υπολογίζεται η ποσότητα της αгарόζης για την παρασκευή διαλύματος τελικής συγκέντρωσης 1,5%. Ο όγκος του διαλύματος εξαρτάται από τις διαστάσεις του εκμαγείου που χρησιμοποιείται για τη στερεοποίηση του πηκτώματος και στην περίπτωση μας χρησιμοποιήθηκαν 30ml.

Αγαρόζη 0,45gr διαλύεται σε 30 ml διάλυμα TBE συγκέντρωσης 0.5 X με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι βρασμού. Αφήνεται σε απαγωγό να κρυώσει και κατόπιν προστίθενται 1.5 μl χρωστική Midori Green Advance (Nippon Genetics) με ελαφριά ανάδευση. Το διάλυμα τοποθετείται στο εκμαγείο και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου σε απαγωγό έως να σταθεροποιηθεί.

Προετοιμασία δειγμάτων φόρτωσης

Για την προετοιμασία του μάρτυρα (ladder) χρησιμοποιήθηκαν:

- 1 μL ladder 1kb (Nippon Genetics, 110ng/μL)
- 2 μL 3X loading dye
- 9 μL dH₂O

Ομοίως προετοιμάστηκαν τα δείγματα DNA των ασθενών:

- 2 μL δείγματος
- 2 μL 3X loading dye
- 8 μL dH₂O

Φόρτωση στο πήκτωμα αгарόζης

Το πήκτωμα, αφού σταθεροποιηθεί, τοποθετείται σε διάλυμα TBE συγκέντρωσης 0,5 X στο δοχείο ηλεκτροφόρησης. Τοποθετούνται στα πηγαδάκια του πηκτώματος τα παραπάνω δείγματα (DNA ασθενών και μάρτυρας), των οποίων ο όγκος επιλέχθηκε βάσει των συγκεντρώσεων των δειγμάτων και της ποσότητας που απαιτείται από την χρωστική που χρησιμοποιείται (Midori Green Advance) για να είναι ορατές οι ζώνες DNA μετά την ηλεκτροφόρηση. Αφού κλειστεί το δοχείο της ηλεκτροφόρησης εφαρμόζεται τάση 90V για 110 λεπτά.

Έλεγχος και φωτογράφιση του πήκτωματος αγαρόζης με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία

Χρησιμοποιήθηκε μηχανήμα αποτύπωσης της εικόνας του πήκτωματος αγαρόζης με ακτινοβολία UV, συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή, με το λογισμικό Image Lab. Ορίστηκε από τον χρήστη η παράμετρος “GelGreen” κατάλληλη για την χρήση της χρωστικής “Midori Green Advance” που χρησιμοποιήθηκε, για να γίνουν ορατές στην υπεριώδη ακτινοβολία οι ζώνες που έχουν δημιουργηθεί από τα τμήματα DNA. Αφού τοποθετηθεί το πήκτωμα αγαρόζης στην υπεριώδη ακτινοβολία λαμβάνεται αυτόματα η φωτογραφία του από το λογισμικό, η οποία ελέγχεται μέσω της οθόνης του ηλεκτρονικού υπολογιστή και μπορεί να αποθηκευτεί σε εξωτερικό μέσο αποθήκευσης.

2.3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA με φασματοφωτόμετρο

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA κάθε δείγματος, με το φασματοφωτόμετρο Q5000 UV-Vis. Το φασματοφωτόμετρο Q5000 UV-Vis διαθέτει ειδικό σύστημα συγκράτησης του δείγματος ανάμεσα σε δύο επιφάνειες, βασισμένο στην επιφανειακή τάση, χωρίς τη χρήση κυψελίδων. Έτσι ο όγκος του δείγματος που απαιτείται για τη μέτρηση είναι πολύ μικρός (1μl). Το φασματοφωτόμετρο, μετρώντας την απορρόφηση του δείγματος, υπολογίζει αυτόματα τη συγκέντρωση του, βάσει του νόμου Lambert-Beer : $A=Cbe$ όπου:

- A: Η μετρούμενη απορρόφηση
- C: Η συγκέντρωση του δείγματος
- b: Το μήκος της οπτικής διαδρομής σε cm
- e: Η μοριακή απορροφητικότητα

Διαλύματα:

- Δείγματα απομονωμένου DNA
- 50 ml dH₂O

Διαδικασία:

Αφού εκκινήσουμε το φασματοφωτόμετρο Q5000 UV-Vis και το λογισμικό του στον ηλεκτρονικό υπολογιστή, εισάγουμε στο λογισμικό την πληροφορία ότι πρόκειται για τη μέτρηση συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων.

Πριν την έναρξη των μετρήσεων, και ανά δέκα μετρήσεις δειγμάτων εισάγουμε στο φασματοφωτόμετρο τυφλό δείγμα (1μL dH₂O). Μετά από κάθε μέτρηση σκουπίζεται η επιφάνεια του φασματοφωτόμετρου με καθαρό χαρτί.

Για τη μέτρηση του κάθε δείγματος εισάγουμε στο φασματοφωτόμετρο 1 μL δείγματος DNA, όπως αυτό είχε αποθηκευτεί μετά την απομόνωση του.

Τέλος μέσω του λογισμικού του φασματοφωτόμετρου εξάγουμε τα δεδομένα των μετρήσεων σε υπολογιστικό φύλλο Excel.

Οι μετρήσεις που λήφθηκαν για τη συγκέντρωση DNA των δειγμάτων παρατίθενται στον Πίνακα 15 στο κεφάλαιο 3 όπου παρουσιάζονται όλα τα αποτελέσματα.

2.3.4 Αραίωση και κατακρήμνιση δειγμάτων γονιδιακού DNA

Η επιθυμητή τελική συγκέντρωση των δειγμάτων προς ανάλυση για τη διενέργεια της γονοτύπησης είναι τα 10 ng/μl , σε τελικό όγκο 20 μl. Με τα δεδομένα των μετρήσεων της συγκέντρωσης των δειγμάτων DNA του πίνακα 15 και τον βασικό τύπο υπολογισμού της αραίωσης:

$C_{\text{αρχικό}} \times V_{\text{αρχικό}} = C_{\text{τελικό}} \times V_{\text{τελικό}}$ και

-C_{αρχικό} για κάθε δείγμα η συγκέντρωση του από τον πίνακα 15

-C_{τελικό} τα 10ng/μl

-V_{τελικό} τα 20 μl

υπολογίζεται το V_{αρχικό}, ο όγκος δηλαδή που λήφθηκε από τα δείγματα όπως αυτά είχαν αποθηκευτεί μετά την απομόνωση του DNA.

Στον πίνακα 3 φαίνεται ο αρχικός όγκος των δειγμάτων DNA που λήφθηκε και ο όγκος H₂O με το οποίο συμπληρώθηκε έως του τελικού όγκου των 20 μl.

Στα δείγματα με αρχική συγκέντρωση μικρότερη των 10 ng/μl πραγματοποιήθηκε κατακρήμνιση DNA, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση μεγαλύτερη των 10 ng/μl, αφού τελικά το ίζημα που προκύπτει από τη διαδικασία της κατακρήμνισης και περιέχει το σύνολο του DNA του δείγματος επαναδιαλυτοποιείται σε μικρότερο όγκο από τον αρχικό όγκο του δείγματος.

Πρωτόκολλο κατακρήμνισης

1. Σε κάθε ένα από τα δείγματα, όγκου V, όπως αυτά είχαν αποθηκευτεί μετά την απομόνωση του DNA προστίθενται 1/10 V CH₃COONa (3M, pH=5.3) (όπου V ο όγκος του διαλύματος DNA).

2. Στο μείγμα έπειτα από ισχυρή ανάδευση προστίθεται παγωμένη απόλυτη αιθανόλη όγκου 2,5V
3. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και τοποθέτηση του μίγματος της αντίδρασης στους -20° C για 24 ώρες.
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία 4° C.
5. Γίνεται προσεκτικά απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και ακολούθως προστίθεται στο ίζημα 1 ml παγωμένη αιθανόλη 70 % και αναδεύεται έντονα.
6. Τα στάδια 4 και 5 επαναλαμβάνονται.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία 4° C και απομάκρυνση της αιθανόλης με ξήρανση στον απαγωγό για 2 ώρες.
8. Το ίζημα επαναδιαλύεται με την προσθήκη 20ml ddH₂O.

Πίνακας 3. Ο όγκος των αρχικών δειγμάτων DNA που λήφθηκε και ο όγκος H₂O με τον οποίο συμπληρώθηκε έως τελικού όγκου των 20 μl για την επίτευξη συγκέντρωσης 10 ng/μl.

Κωδικός δείγματος	DNA (μl)	H ₂ O (μl)
P2	6,21118012	13,78881988
P3	6,50406504	13,49593496
P4	5,57880056	14,42119944
P5	6,67779633	13,32220367
P7	3,96825397	16,03174603
P8	8,47457627	11,52542373
P9	14,3884892	5,611510791
P10	6,12557427	13,87442573
P11	6,74536256	13,25463744
P12	7,51879699	12,48120301
P19	19,047619	0,952380952
P20	11,7647059	8,235294118
P21	12,7795527	7,220447284
P22	15,3256705	4,674329502
P23	13,8408304	6,15916955
P25	13,2890365	6,710963455
P26	14,8698885	5,130111524
P28	11,6959064	8,304093567
P29	4,31499461	15,68500539
P31	16,194332	3,805668016
P32	11,7647059	8,235294118
P33	11,3636364	8,636363636

P34	13,559322	6,440677966
P35	8,26446281	11,73553719
P36	13,5135135	6,486486486
P37	17,699115	2,300884956
P38	7,96812749	12,03187251
P39	10,4712042	9,528795812
P40	8,31600832	11,68399168
P41	7,40740741	12,59259259
P42	3,67985281	16,32014719
P45	6,73400673	13,26599327
P46	6,87285223	13,12714777
P47	6,53594771	13,46405229
P48	4,66200466	15,33799534
P69	8,16326531	11,83673469
P70	4,91400491	15,08599509
P72	8,11359026	11,88640974
P73	4,85436893	15,14563107
P74	4,04448938	15,95551062
P75	7,35294118	12,64705882
P76	11,3636364	8,636363636
P77	1,49925037	18,50074963
P78	5,12163892	14,87836108
P79	3,09119011	16,90880989
P80	3,74181478	16,25818522
P81	3,08641975	16,91358025
P82	5,67375887	14,32624113
P83	10,5540897	9,44591029
P84	8,26446281	11,73553719
P85	6,38977636	13,61022364
P86	6,83760684	13,16239316
P87	5,47195622	14,52804378
P88	3,82043935	16,17956065
P89	3,86100386	16,13899614
P90	8,98876404	11,01123596
P91	4,57142857	15,42857143
P92	3,17208565	16,82791435
P93	7,66283525	12,33716475
P20	1,36147039	18,63852961
P30	17,3160173	2,683982684
P70	5,47945205	14,52054795
P80	19,7044335	0,295566502
P90	18,3486239	1,651376147
P120	15,503876	4,496124031

P140	18,2648402	1,735159817
P150	10,3359173	9,664082687
P160	18,3486239	1,651376147
P190	7,84313725	12,15686275
P200	8,19672131	11,80327869
P210	7,93650794	12,06349206
P240	17,699115	2,300884956
P260	18,957346	1,042654028
P280	14,084507	5,915492958
P300	12,3839009	7,616099071
P310	16,9491525	3,050847458
P330	7,64818356	12,35181644
P350	15,5642023	4,435797665
P390	19,8019802	0,198019802
P400	18,1818182	1,818181818
P410	10,5820106	9,417989418

2.4 Γονοτύπηση με τη χρήση του συστήματος Agena Bioscience

MassARRAY®

Το σύστημα MassARRAY® της εταιρίας Agena Bioscience™ είναι μία σειρά οργάνων που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό νουκλεϊκών οξέων. Ο αναλυτής που διαθέτει είναι φασματογράφος μάζας και δύναται να επεξεργαστεί και να προσδιορίσει εκατοντάδες δείγματα DNA και 10 έως 40 πολυμορφισμούς (SNPs) ταυτόχρονα, σε έναν κύκλο ανάλυσης.

Η ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων από το σύστημα MassARRAY® αποτελείται από τρία στάδια:

- Την ενίσχυση των γονιδιακών περιοχών που βρίσκεται ο κάθε πολυμορφισμός (SNP) που θέλουμε να προσδιορίσουμε και τον προσδιορισμό της πολυμορφικής βάσης.
- Τη μεταφορά των προς ανάλυση δειγμάτων σε ειδικό πλακίδιο συστοιχίας δειγμάτων (SpectroCHIP® Array)
- Την ανάλυση των δειγμάτων νουκλεϊκών οξέων και την παρουσίαση των δεδομένων από το λογισμικό του οργάνου.

Το σύστημα MassARRAY® αποτελεί τμήμα του εξοπλισμού του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών.

2.4.1 Ενίσχυση των γονιδιακών περιοχών που βρίσκονται οι υπό προσδιορισμό πολυμορφισμοί

Για την πραγματοποίηση της ενίσχυσης των γενετικών περιοχών που βρίσκονται οι υπό προσδιορισμό πολυμορφισμοί, απαιτείται η χρήση τριών ειδών εκκινητών για κάθε μελετούμενο πολυμορφισμό: Forward, Reverse και Extension. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μικρού μεγέθους με αλληλουχία συμπληρωματική με τη μία από τις δύο αλυσίδες DNA που επιθυμούμε να ενισχυθεί.

Αρχικά με την πραγματοποίηση μιας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και τη χρήση των εκκινητών Forward και Reverse, επιτυγχάνουμε την ενίσχυση της περιοχής του κάθε πολυμορφισμού. Οι εκκινητές Forward και Reverse συνδέονται ανοδικά και καθοδικά της γονιδιακής περιοχής του γενετικού πολυμορφισμού και ενισχύουν την περιοχή που περικλείουν.

Ακολούθως πραγματοποιείται η αντίδραση SAP, η οποία σε ένα θερμοκρασιακό κύκλο προετοιμάζει τα προϊόντα της πρώτης αντίδρασης PCR για το επόμενο βήμα της διαδικασίας.

Κατόπιν διενεργείται μια ακόμη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), που χαρακτηρίζεται ως Extension PCR και κατά την οποία οι εκκινητές Extension προσδένονται ακριβώς πριν την νουκλεοτιδική βάση του κάθε πολυμορφισμού (SNP) που μελετάμε. Κατά την Extension PCR το DNA επιμηκύνεται κατά μια μόνο νουκλεοτιδική βάση η οποία είναι η συμπληρωματική της νουκλεοτιδικής βάσης του δείγματος που παρουσιάζει τον σημειακό πολυμορφισμό. Η νουκλεοτιδική βάση αυτή που προστίθεται κατά τη διενέργεια της Extension PCR, έχει βάσει σχεδιασμού του πειράματος έλλειψη της 3'-OH ομάδας της και συνεπώς το νουκλεοτιδικό τμήμα αυτό δεν δύναται να επεκταθεί περαιτέρω.

Τέλος, οι νουκλεοτιδικές βάσεις που προστίθενται στο σημείο του κάθε πολυμορφισμού, έχουν υποστεί τροποποίηση της μάζας τους, ώστε οι νουκλεοτιδικές αλυσίδες που προκύπτουν τελικά από την προκατεργασία αυτή και διαφέρουν σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο, να μπορούν να εμφανίζουν ανιχνεύσιμες διαφορές κατά την ανάλυσή τους από τον φασματογράφο μάζας του συστήματος MassARRAY®.

2.4.1.1 Σχεδιασμός και παρασκευή διαλυμάτων εκκινητών

Το λογισμικό “Assay Design Suite v2.0” της εταιρίας Agena Bioscience™ παρέχει τη δυνατότητα σχεδιασμού των ιδανικών εκκινητών βάσει του είδους και του πλήθους των πολυμορφισμών που επιθυμούμε να αναλύσουμε. Ο σχεδιασμός των εκκινητών του πειράματος

έγινε μέσω του παραπάνω λογισμικού από την Δρ. Ελεάνα Σταύρου, τεχνική υπεύθυνο της Μονάδας Μοριακής Γενετικής του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών.

Για τον σχεδιασμό των εκκινητών, εισάγουμε στο παραπάνω λογισμικό τα δεδομένα της ταυτότητας των γενετικών πολυμορφισμών (rsID) που θα μελετηθούν, ώστε να λάβουμε τις πληροφορίες για την αλληλουχία τους από την βάση δεδομένων NCBI dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) και ρυθμίζουμε τις επιλογές σχεδίασης όπως φαίνεται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Επιλογές σχεδίασης εκκινητών

Ρύθμιση λογισμικού	Επιλογή
Preset	High multiplexing iPLEX (36-plex)
Organism	Human
Chemistry	iPLEX (SBE)

Ακολούθως, κατά τη διαδικασία σχεδιασμού των εκκινητών, γίνεται ανάκτηση από την βάση δεδομένων NCBI dbSNP, των πληροφοριών αλληλουχίας των πολυμορφισμών, καθώς και ο προσδιορισμός της πολυμορφικής βάσης. Αφού προσδιοριστούν οι βέλτιστες περιοχές που θα καλύπτουν οι εκκινητές ώστε να καθίστανται μοναδικοί για κάθε πολυμορφισμό, γίνεται ο τελικός σχεδιασμός τους και η επικύρωση του σχεδιασμού τους από τον ερευνητή.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών Forward Reverse και Extension παρουσιάζονται στους Πίνακες 5, 6 και 7 αντίστοιχα.

Για την παρασκευή των διαλυμάτων των εκκινητών γνωρίζουμε ότι οι εκκινητές από την εταιρία κατασκευής τους παρασκευάζονται σε συγκέντρωση 100 μM . Η τελική επιθυμητή συγκέντρωση κάθε εκκινητή Forward και Reverse είναι 50 μM και ο επιθυμητός τελικός όγκος 100 μl . Σύμφωνα με τον τύπο της αραιώσης $C_{\text{αρχικό}} \times V_{\text{αρχικό}} = C_{\text{τελικό}} \times V_{\text{τελικό}}$ λαμβάνονται 50 μl εκκινητών και συμπληρώνουμε με 50 μl HPLC grade H_2O . Η τελική επιθυμητή συγκέντρωση των εκκινητών Extension είναι 400 μM και ο επιθυμητός τελικός όγκος 100 μl . Ομοίως με παραπάνω, προχωράμε σε συμπύκνωση του διαλύματος στο ένα τέταρτο του αρχικού του όγκου.

Πίνακας 5. Forward εκκινητές

Γονίδιο	SNP ID	Forward Primer ID	Forward Primer Sequence
NFKBIA	rs696_W1	rs696_W1_F	ACGTTGGATGAAAATGAGGGCTGATCCTAC
PPI	rs8177826_W1	rs8177826_W1_F	ACGTTGGATGGAAGTCGCAGACCCGATTG
JAK2	rs3780378_W1	rs3780378_W1_F	ACGTTGGATGTTGGAGGCGAACACCCTGAG
CARD11	rs17834873_W1	rs17834873_W1_F	ACGTTGGATGCAAGTCAACAGAGGAAGTGC
SLC8A2	rs12459087_W1	rs12459087_W1_F	ACGTTGGATGCTTTTGACGTGATGACCTCG
AKAP5	rs2230491_W1	rs2230491_W1_F	ACGTTGGATGGGCCTCACTCAAACGTCTTG
PTGIR	rs12461917_W1	rs12461917_W1_F	ACGTTGGATGTCATTTCCAGTTCAGCCTCG
PPP3CC	rs4872499_W1	rs4872499_W1_F	ACGTTGGATGAACAGGGCTGGATCTTAAGG
NFKB1	rs28362491_W1	rs28362491_W1_F	ACGTTGGATGCATGACTCTATCAGCGGCAC
PPP3CC	rs11780915_W1	rs11780915_W1_F	ACGTTGGATGCGAGCCTGGCCTAATTTTGG
NFATC2	rs880324_W1	rs880324_W1_F	ACGTTGGATGGATCTTAACAAGGAACACGC
CABIN1	rs873833_W1	rs873833_W1_F	ACGTTGGATGGGACACCAAGGGTTGTAAAG
JAK2	rs10758669_W1	rs10758669_W1_F	ACGTTGGATGAAGGGAAGTGTAGAGAC
CALM1	rs12885713_W1	rs12885713_W1_F	ACGTTGGATGCGGCGCACCATATATATATC
PPP3CB	rs12644_W1	rs12644_W1_F	ACGTTGGATGAAAGCCAGCAGCAAATCACC
CABIN1	rs422674_W1	rs422674_W1_F	ACGTTGGATGGAGGTTAAAAAGCCCCAAC
JAK2	rs7849191_W1	rs7849191_W1_F	ACGTTGGATGGTTGTACTAGTCACTTCTCTG
PPP5D1	rs11083838_W1	rs11083838_W1_F	ACGTTGGATGGAACAAGAAGTACATGATC
PPP3CC	rs7430_W1	rs7430_W1_F	ACGTTGGATGTGACTTAGAGTCTGCCGTG
PPP3CA	rs3804358_W1	rs3804358_W1_F	ACGTTGGATGGAGTAATCATCTCTCTTAGC
SLC8A1	rs13017846_W1	rs13017846_W1_F	ACGTTGGATGTGTAGAGAGTAGGCTTCTCC
NFKBIA	rs17103265_W1	rs17103265_W1_F	ACGTTGGATGACTTCCTAGGGATGAACAGC
MALT1	rs2874116_W1	rs2874116_W1_F	ACGTTGGATGTGGCTGCAGAAGTTGATTG
PPP3R1	rs1868402_W1	rs1868402_W1_F	ACGTTGGATGCTCAGTGAATACTGACATGG
IPO7	rs12279202_W1	rs12279202_W1_F	ACGTTGGATGGGCTCTTGATTAACCTCCTC
IPO9	rs8024_W1	rs8024_W1_F	ACGTTGGATGATTATTTTGCCCCGCTCAG
PPP3R1	rs200513900_W1	rs200513900_W1_F	ACGTTGGATGTAACCTTGACCCTGCCTAGC
NOD2	rs7205423_W2	rs7205423_W2_F	ACGTTGGATGCTTGGCTCCAGCCCATTTTG
EPCAM-DT	rs7565161_W2	rs7565161_W2_F	ACGTTGGATGGCTTTGCCCTTACTAGTGC
NFKB1	rs4648068_W2	rs4648068_W2_F	ACGTTGGATGCTGTTTATGGCAGAGATGTG

Πίνακας 6. Reverse εκκινήτες

Γονίδιο	SNP ID	Reverse Primer ID	Reverse Primer Sequence
NFKBIA	rs696_W1	rs696_W1_R	ACGTTGGATGGTGTACTTATATCCCACTGC
PPI	rs8177826_W1	rs8177826_W1_R	ACGTTGGATGTGGCGTCTGCAAAACGGCAC
JAK2	rs3780378_W1	rs3780378_W1_R	ACGTTGGATGTGGCTAGCTGGAGAGGGCAA
CARD11	rs17834873_W1	rs17834873_W1_R	ACGTTGGATGACAGGGACTGATTTGAGAGG
SLC8A2	rs12459087_W1	rs12459087_W1_R	ACGTTGGATGACTTTGTGGCCATGGTCTAC
AKAP5	rs2230491_W1	rs2230491_W1_R	ACGTTGGATGTTGCAGGTTGCATTTCAACC
PTGIR	rs12461917_W1	rs12461917_W1_R	ACGTTGGATGGTAAGTCCCCTTCTCTAGTC
PPP3CC	rs4872499_W1	rs4872499_W1_R	ACGTTGGATGCCTTATATCCTGGAAACACC
NFKB1	rs28362491_W1	rs28362491_W1_R	ACGTTGGATGTAGGGAAGCCCCAGGAAG
PPP3CC	rs11780915_W1	rs11780915_W1_R	ACGTTGGATGAGCCTCAACAACAGGGCGAA
NFATC2	rs880324_W1	rs880324_W1_R	ACGTTGGATGAATTGCGCTGTAAGGTCAGG
CABIN1	rs873833_W1	rs873833_W1_R	ACGTTGGATGTAGAGTGTGGCTGAGTTGTG
JAK2	rs10758669_W1	rs10758669_W1_R	ACGTTGGATGGGTTGGCTATGGCAAAGAAA
CALM1	rs12885713_W1	rs12885713_W1_R	ACGTTGGATGACTACGAGTAACGGCACGG
PPP3CB	rs12644_W1	rs12644_W1_R	ACGTTGGATGACAGGTACGACATGTATAGG
CABIN1	rs422674_W1	rs422674_W1_R	ACGTTGGATGTCATAGCTGCTTGAGTCTTG
JAK2	rs7849191_W1	rs7849191_W1_R	ACGTTGGATGGGCATTC GGAGTTTAAGGAG
PPP5D1	rs11083838_W1	rs11083838_W1_R	ACGTTGGATGGGTTGAG GAAATTTTCATTC
PPP3CC	rs7430_W1	rs7430_W1_R	ACGTTGGATGGCAGACTGAATTATAAATGC
PPP3CA	rs3804358_W1	rs3804358_W1_R	ACGTTGGATGCTTGGGCTGTATAGTCAAAC
SLC8A1	rs13017846_W1	rs13017846_W1_R	ACGTTGGATGGAGGAAAATCGAAAGTCAG
NFKBIA	rs17103265_W1	rs17103265_W1_R	ACGTTGGATGCCTTGCTTTACTTGGGAAAC
MALT1	rs2874116_W1	rs2874116_W1_R	ACGTTGGATGCTTCTATACCTGCTACCTGC
PPP3R1	rs1868402_W1	rs1868402_W1_R	ACGTTGGATGACATTCCCCCAAATGATAC
IPO7	rs12279202_W1	rs12279202_W1_R	ACGTTGGATGGAGTGTGAATCCCCCAAAC
IPO9	rs8024_W1	rs8024_W1_R	ACGTTGGATGTCTGAACACATCAGAAGTCC
PPP3R1	rs200513900_W1	rs200513900_W1_R	ACGTTGGATGTTTCAGGTTTTTCAGTAGCTTC
NOD2	rs7205423_W2	rs7205423_W2_R	ACGTTGGATGTATGGCTGCTGCAGGAAATG
EPCAM-DT	rs7565161_W2	rs7565161_W2_R	ACGTTGGATGCTATCCCATGGAAAAGGAAC
NFKB1	rs4648068_W2	rs4648068_W2_R	ACGTTGGATGTCACCAATATCTTGGTGAA

Πίνακας 7. Extension εκκινητές

Γονίδιο	SNP ID	Extension Primer ID	Extension Primer Sequence
NFKBIA	rs696_W1	rs696_W1_E	CACTGCACACTGCCT
PPI	rs8177826_W1	rs8177826_W1_E	AAACGGCACGAGCCT
JAK2	rs3780378_W1	rs3780378_W1_E	GAGGGCAACATGGAT
CARD11	rs17834873_W1	rs17834873_W1_E	TTGCCAGAAAGCTTGC
SLC8A2	rs12459087_W1	rs12459087_W1_E	TGGGAGTGTCCATCAT
AKAP5	rs2230491_W1	rs2230491_W1_E	GCATTTACACCTCCAAT
PTGIR	rs12461917_W1	rs12461917_W1_E	CGCGCAGGTCTACCAGA
PPP3CC	rs4872499_W1	rs4872499_W1_E	CCCTTCCTTCTCTACTTC
NFKB1	rs28362491_W1	rs28362491_W1_E	AAGCCTGCCGGGCCCAAT
PPP3CC	rs11780915_W1	rs11780915_W1_E	CAAAGGGCGAAACTCCAC
NFATC2	rs880324_W1	rs880324_W1_E	TGTTACAAAGGGCTCTAG
CABIN1	rs873833_W1	rs873833_W1_E	TGAGTTGTGTCTCAGATAC
JAK2	rs10758669_W1	rs10758669_W1_E	AAATTTTCCAATACCTCCTC
CALM1	rs12885713_W1	rs12885713_W1_E	CCCATATATATATCGCGGGG
PPP3CB	rs12644_W1	rs12644_W1_E	TGAGTACTCAAGTTGCTTA
CABIN1	rs422674_W1	rs422674_W1_E	AAATTGAGTCTTGACAGAT
JAK2	rs7849191_W1	rs7849191_W1_E	GTTTAAGGAGATGAACAGAA
PPP5D1	rs11083838_W1	rs11083838_W1_E	CAAAATGCTTTTTTTTCACCT
PPP3CC	rs7430_W1	rs7430_W1_E	GCCAACTCAAACAACCTCAAC
PPP3CA	rs3804358_W1	rs3804358_W1_E	AGTCAAACATAATTAGTTCTCA
SLC8A1	rs13017846_W1	rs13017846_W1_E	TTGGAAGTTTATCTCCATAAATA
NFKBIA	rs17103265_W1	rs17103265_W1_E	GGGAATGGTCCTATTCAGCAGTT
MALT1	rs2874116_W1	rs2874116_W1_E	CCTTTGCATAATTATTTAACCTG
PPP3R1	rs1868402_W1	rs1868402_W1_E	CAAATGATACAGATACTACACTTA
IPO7	rs12279202_W1	rs12279202_W1_E	GGACAAAACACACTGATTAAAGAA
IPO9	rs8024_W1	rs8024_W1_E	ACTACCATTATATTCTAAAACAGA
PPP3R1	rs200513900_W1	rs200513900_W1_E	GCAGTAAGTATACAGTTGCTATTAA
NOD2	rs7205423_W2	rs7205423_W2_E	GGACTTCTGGCTTCCA
EPCAM-DT	rs7565161_W2	rs7565161_W2_E	CCTCAGTTCCTTCATCC
NFKB1	rs4648068_W2	rs4648068_W2_E	GCTAATTGTTAGAG ATTCCA

2.4.1.2 1η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι ο *in vitro* εκλεκτικός τρόπος πολλαπλασιασμό συγκεκριμένου τμήματος DNA από το γενωμικό DNA. Αποτελεί μια κυκλική επανάληψη της θερμικής αποδιάταξης του DNA, της υβριδοποίησης των εκκινητών και τη σύνθεσης dna με την επιμήκυνση των εκκινητών από κάποια θερμοανθεκτική πολυμεράση. Το αρχικό μόριο DNA και τα προϊόντα των επόμενων κύκλων χρησιμοποιούνται σαν υπόστρωμα σε κάθε επόμενο κύκλο της αντίδρασης και συνεπώς ο πολλαπλασιασμός είναι εκθετικός.

Με την πραγματοποίηση της 1ης PCR επιτυγχάνεται το πρώτο στάδιο της ενίσχυση της γονιδιακής περιοχής του κάθε πολυμορφισμού, με την σύνδεση των εκκινητών Forward και Reverse ανοδικά και καθοδικά της περιοχής αυτής.

Διαλύματα:

- 100 μl για κάθε forward primer (50 μM).
- 100 μl για κάθε reverse primer (50 μM).
- 500 μl PCR Buffer (10X) που περιέχει 20 mM MgCl₂: Ρυθμιστικό διάλυμα που διατηρεί σταθερό το pH της αντίδρασης, αυξάνει την ικανότητα αποδιάταξης του DNA, διευκολύνει την υβριδοποίηση των εκκινητών και τη δράση της πολυμεράσης.
- 500 μl MgCl₂ (25 mM): Το μαγνήσιο αποτελεί συνένζυμο της DNA πολυμεράσης και σταθεροποιεί το δίκλωνο DNA. Η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου είναι ανάλογη με την ενεργότητα της πολυμεράσης.
- 500 μl dNTP mix 25mM: Ισομοριακό μείγμα των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) τα οποία αποτελούν τα δομικά μέρη για το σχηματισμό των νέων αλυσίδων.
- 500 μl PCR enzyme: Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση που καταλύει τον σχηματισμό των νέων αλυσίδων DNA.
- Δείγματα απομονωμένου DNA συγκέντρωσης 10 ng/μl.
- 50 ml HPLC – grade water.

Πρωτόκολλο αντίδρασης:

1. Προετοιμασία ενός PCR mastermix όπως φαίνεται στον πίνακα 8

Πίνακας 8. Περιεχόμενα mastermix 1^{ης} PCR

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (μl)
HPLC – grade water	216
PCR Buffer (10x) με 20 mM MgCl ₂	60
MgCl ₂ (25 mM)	48
dNTP mix 25mM	12
PCR primer mix	120
PCR Enzyme	24
Τελικός όγκος	480

• PCR primer mix: περιέχει forward και reverse εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 0,5μM για τον κάθε εκκινητή και τελικό όγκο 120μl. Ο τελικός όγκος του υπολογίζεται στα 120 μl διότι για κάθε αντίδραση PCR απαιτείται 1μl του PCR primer mix , συνεπώς για τα 96 δείγματα της μελέτης μας και προσθέτοντας 25% περίσσεια απαιτούνται 120μl. Για την παρασκευή του παραπάνω διαλύματος σε ένα φιαλίδιο προσθέτουμε 1,2 μl από κάθε forward και reverse εκκινητή συγκέντρωσης 50μM, σύμφωνα με τον τύπο της αραιώσης $C_{αρχικό} \times V_{αρχικό} = C_{τελικό} \times V_{τελικό}$.

2. Γίνεται προσθήκη 4 μl PCR mastermix σε κάθε ένα από τα 96 πηγαδάκια του δοχείου (well plate) της αντίδρασης.

3. Προσθήκη σε κάθε πηγαδάκι 1 μl δείγματος DNA συγκέντρωσης 10 ng/μl, και για τα 96 δείγματα, και σφράγισμα του well plate.

4. Ανάδευση στο Vortex και φυγοκέντρηση του well plate.

5. Πρόγραμμα PCR

Στάδιο I. 95° C για 2 λεπτά

Στάδιο II. 95° C για 30 δευτερόλεπτα

Στάδιο III. 56° C για 30 δευτερόλεπτα

Στάδιο IV. 72° C για 1 λεπτό

Στάδιο V. Επανάληψη σταδίων II έως IV για 44 κύκλους

Στάδιο VI. 72° C για 5 λεπτά

Στάδιο VII. 4° C για 4 λεπτά

Στάδιο VIII. 4° C παραμονή

2.4.1.3 Αντίδραση SAP

Διαλύματα:

- 500 μl SAP Buffer (10x)
- 500 μl SAP Enzyme (1.7 ng/μl)
- 10 ml HPLC – grade H₂O

Πρωτόκολλο αντίδρασης:

1. Φυγοκέντρηση του well plate της 1ης αντίδρασης PCR του προηγούμενου σταδίου (3200g, 5 sec).
2. Προετοιμασία του μίγματος για την αντίδραση SAP όπως φαίνεται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9. Μίγμα αντίδρασης SAP

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl)
HPLC – grade water	153
SAP Buffer (10x)	17
SAP Enzyme (1.7 ng/μl).	30
Τελικός όγκος	200

3. Ανάδευση στο Vortex και φυγοκέντρηση του μίγματος της αντίδρασης SAP
4. Προσθήκη 2 μl από το μίγμα της αντίδρασης SAP σε κάθε πηγαδάκι του well plate και σφράγισμα του plate
5. Ανάδευση στο Vortex και φυγοκέντρηση του well plate (3200 g, 5 sec)
6. Παραμονή του well plate της αντίδρασης:
 - Στους 37° C για 40 λεπτά
 - Στους 85° C για 5 λεπτά
 - Στους 4° C παραμονή

2.4.1.4 Extension PCR

Διαλύματα:

- 100 μl για κάθε extension primer (400 μM)
- 500 μl IPLEX Buffer Plus (10X): Ρυθμιστικό διάλυμα.
- 500 μl IPLEX Termination mix: Μίγμα νουκλεοτιδικών βάσεων με έλλειψη της 3'-OH ομάδας τους, που οδηγούν στον τερματισμό της σύνθεσης νουκλεοτιδικής αλυσίδας.
- 100 μl IPLEX Pro Enzyme: Ένζυμο κατάλυσης της αντίδρασης
- 50 ml HPLC – grade H₂O

Πρωτόκολλο αντίδρασης:

1. Προετοιμασία του μίγματος της αντίδρασης Extension PCR όπως φαίνεται στον πίνακα 10

Πίνακας 10. Μίγμα της αντίδρασης Extension PCR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl)
HPLC – grade water	26
IPLEX Buffer Plus (10x)	20
IPLEX Termination mix	20
Extension primer mix	130
IPLEX Pro Enzyme	4
Τελικός όγκος	200

- Extension primer mix: Για την παρασκευή του ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Αρχικά, οι εκκινητές extension χωρίστηκαν σύμφωνα με το λογισμικό σχεδιασμού εκκινητών, σε τέσσερις ομάδες διαφορετικής τελικής συγκέντρωσης όπως αυτές φαίνονται στον πίνακα 11.

Σύμφωνα με τον τύπο της αραίωσης $C_{\text{αρχικό}} \times V_{\text{αρχικό}} = C_{\text{τελικό}} \times V_{\text{τελικό}}$ και επειδή ο επιθυμητός τελικός όγκος του Extension primer mix είναι 130 μl,

-για τους εκκινητές της ομάδας 1 λήφθηκαν 2,3 μl από κάθε εκκινητή και συνολικά για τους 6 εκκινητές ο όγκος τους είναι 13,8 μl

-για τους εκκινητές της ομάδας 2 λήφθηκαν 3μl από κάθε εκκινητή και συνολικά για τους 8 εκκινητές ο όγκος τους είναι 24 μl,

-για τους εκκινητές της ομάδας 3 λήφθηκαν 3,77μl από κάθε εκκινητή και συνολικά για τους 9 εκκινητές ο όγκος τους είναι 33,9 μl,

-για τους εκκινητές της ομάδας 4 λήφθηκαν 4,6μl από κάθε εκκινητή και συνολικά για τους 7 εκκινητές ο όγκος τους είναι 31,84 μl.

Για τη συμπλήρωση του όγκου του Extension primer mix έως τα 130μl συμπληρώνουμε με 26,46μl ddH₂O.

Πίνακας 11. Διαχωρισμός των extension εκκινητών σε ομάδες διαφορετικών συγκεντρώσεων

Ομάδα 1 Όγκου 7μM	Ομάδα 2 Όγκου 9,3μM	Ομάδα 3 Όγκου 11,6μM	Ομάδα 4 Όγκου 14μM
rs696_W1_E	rs2230491_W1_E	rs10758669_W1_E	rs13017846_W1_E
rs8177826_W1_E	rs12461917_W1_E	rs12885713_W1_E	rs17103265_W1_E
rs3780378_W1_E	rs7565161_W2_E	rs12644_W1_E	rs2874116_W1_E
rs17834873_W1_E	rs4872499_W1_E	rs422674_W1_E	rs1868402_W1_E
rs12459087_W1_E	rs28362491_W1_E	rs7849191_W1_E	rs12279202_W1_E
rs7205423_W2_E	rs11780915_W1_E	rs4648068_W2_E	rs8024_W1_E
	rs880324_W1_E	rs11083838_W1_E	rs200513900_W1_E
	rs873833_W1_E	rs7430_W1_E	
		rs3804358_W1_E	

2. Ανάδευση στο Vortex και φυγοκέντρηση του μίγματος της αντίδρασης Extension PCR.
3. Προσθήκη 2 μl από το μίγμα της αντίδρασης Extension PCR σε κάθε πηγαδάκι του well plate και σφράγιση του well plate.
4. Ανάδευση στο Vortex και φυγοκέντρηση του well plate (3200 g, 5 sec).
5. Πρόγραμμα Extension PCR

Στάδιο I. 95° C για 30 δευτερόλεπτα

Στάδιο II. 95° C για 5 δευτερόλεπτα

Στάδιο III. 52° C για 5 δευτερόλεπτα

Στάδιο IV. 80° C για 5 δευτερόλεπτα

Στάδιο V. Επανάληψη σταδίων III έως IV για 5 κύκλους

Στάδιο VI. 72° C για 3 λεπτά

Στάδιο VII. Επανάληψη σταδίων II έως VI για 39 κύκλους

Στάδιο VIII. 4° C παραμονή

Έλεγχος προϊόντων της Extension PCR

Πραγματοποιήθηκε δειγματοληπτικός έλεγχος των προϊόντων της Extension PCR, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% στα δείγματα με κωδικούς: P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11, P12, P17, P18, P19. Η διαδικασία για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% πραγματοποιήθηκε ομοίως με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για τον έλεγχο της επιτυχούς απομόνωσης του DNA (κεφ.2.3.2).

2.4.2 Μεταφορά των προς ανάλυση δειγμάτων σε SpectroCHIP® Array με τη χρήση του MassARRAY® Nanodispenser RS1000

Η λήψη και ανάλυση των δειγμάτων από το MassARRAY® Analyzer 4 γίνεται μέσω ενός πλακιδίου μικρού μεγέθους, με προκαθορισμένες θέσεις σε μικροσυστοιχία, τα SpectroCHIP® Array, όπου τοποθετούνται τα προς ανάλυση δείγματα σε πολύ μικρές ποσότητες. Το σύστημα MassARRAY® χρησιμοποιεί το MassARRAY® Nanodispenser RS1000, ένα κλειστό και αυτόνομο σύστημα, για τη μεταφορά των προς ανάλυση δειγμάτων από τα δοχεία της αντίδρασης (microtiter plates MTPs) στα SpectroCHIP® Arrays. Στην έρευνά μας χρησιμοποιήθηκε microtiter plate 96 θέσεων (το well plate των αντιδράσεων των προηγούμενων σταδίων του πειράματος) και αντίστοιχα SpectroCHIP® Array με 96 θέσεις.

Αφαλάτωση της αναλυτέας ουσίας

Πριν την έναρξη της διαδικασίας μεταφοράς των προς ανάλυση δειγμάτων στο SpectroCHIP® Array, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, πραγματοποιείται αφαλάτωση της αναλυτέας ουσίας με τη χρήση ρητίνης:

1. Φυγοκέντρηση (3200 g για ένα λεπτό) του microtiter plate (MTP) της αντίδρασης, όπως αυτό προέκυψε από το τελευταίο στάδιο της Extension PCR.

2. Προστίθενται 3 μεζούρες καθαρής ρητίνης σε ένα καθαρό well plate απλώνεται σε όλα τα πηγαδάκια ομοιόμορφα και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10λεπτά ώστε να στεγνώσει.
3. Φυγοκέντρηση του well plate με τη ρητίνη (3200 g για ένα λεπτό).
4. Προστίθενται 41 μl ddH₂O σε κάθε πηγαδάκι του microtiter plate (MTP) της αντίδρασης.
5. Τοποθετείται το microtiter plate (MTP) της αντίδρασης πάνω στο plate με τη ρητίνη ώστε τα πηγαδάκια τους να ευθυγραμμίζονται και αναποδογυρίζουμε το σύστημα, ώστε η ρητίνη με ελαφριά ανακίνηση να μεταφερθεί στα πηγαδάκια του microtiter plate (MTP) της αντίδρασης.
6. Το microtiter plate (MTP) της αντίδρασης σφραγίζεται και περιστρέφεται 360° ως προς τον οριζόντιο άξονά του για 15 λεπτά.
7. Φυγοκέντρηση του microtiter plate (MTP) της αντίδρασης (3200 g για πέντε λεπτά).

Διαδικασία εκτέλεσης μεταφοράς των δειγμάτων στο SpectroCHIP® Array από το MassARRAY® Nanodispenser RS1000

1. Εκκίνηση του οργάνου και είσοδος στο λογισμικό του.
2. Πραγματοποιούμε τις εξής ενέργειες καθημερινής συντήρησης του οργάνου πριν από την έναρξη εκτέλεσης μεταφοράς των δειγμάτων.
 - Οι ακίδες μεταφοράς καθαρίζονται
 - Η φιάλη τροφοδοσίας του συστήματος υπερηχητικών πλύσεων αδειάζεται και επαναπληρώνεται
 - Το δοχείο βαθμονόμησης ξεπλένεται
 - Πλήρωση του δοχείου τροφοδοσίας
 - Άδειασμα του δοχείου αποβλήτων
3. Γίνεται η ρύθμιση της λειτουργίας διανομής των προς ανάλυση δειγμάτων, όπως φαίνεται στον πίνακα 12.

Πίνακας 12. Ρυθμίσεις διανομής MassARRAY® Nanodispenser RS1000

Ρύθμιση	Περιγραφή	Τιμή
Όγκος στόχος	Ο όγκος της αναλυτέας ουσίας, που διανέμεται σε κάθε θέση του SpectroCHIP® Array	12 nl
Όρια του όγκου στόχου	Το εύρος του όγκου, της αναλυτέας ουσίας, που διανέμεται το οποίο είναι αποδεκτό	8 – 20 nl
Χρόνος αναρρόφησης	Ο χρόνος που οι ακίδες παραμένουν στο MTP, για να αναρροφήσουν την αναλυτέα ουσία	8 sec
Βάθος αναρρόφησης	Το βάθος που φτάνουν οι ακίδες στα πηγαδάκια του MTP	5 mm
Ταχύτητα αναρρόφησης	Η ταχύτητα που οι ακίδες βγαίνουν έξω από τα πηγαδάκια του MTP	60 mm/sec
Χρόνος διανομής	Ο χρόνος που οι ακίδες παραμένουν στις θέσεις της επιφάνειας του SpectroCHIP Array	0 sec
Αντιστάθμιση διανομής	Η απόσταση που μετακινούνται οι ακίδες, ώστε να διασφαλιστεί ότι όλες οι ακίδες έχουν έρθει σε επαφή με το SpectroCHIP Array	1 mm
Ταχύτητα διανομής	Ρυθμίζει την ανύψωση του SpectroCHIP Array για την επίτευξη διανομής του καθορισμένου όγκου	100 mm/sec
Διανομή ανά αναρρόφηση του βαθμονομητή	Ελέγχει πόσες λειτουργίες διανομής βαθμονομητή εκτελούνται για κάθε αναρρόφηση του βαθμονομητή, ο οποίος διανέμεται στο SpectroCHIP Array σε ειδικές θέσεις βαθμονόμησης (5 θέσεις για το SpectroCHIP Array 96 θέσεων)	1
Ταχύτητα διανομής του βαθμονομητή	Η ταχύτητα με την οποία ο βαθμονομητής μεταφέρεται στις θέσεις βαθμονόμησης.	100 mm/sec
Χρόνος ξεπλύματος	Ο χρόνος που παραμένουν οι ακίδες στη θέση ξεπλύματος	3.5 sec
Χρόνος πλύσης	Ο χρόνος που οι ακίδες παραμένουν στη θέση πλύσης	5 sec
Χρόνος αποστράγγισης	Ο χρόνος που οι ακίδες παραμένουν στη θέση αποστράγγισης	0.2 sec

4. Γέμισμα του δοχείου βαθμονόμησης με 60μl, αφού ο βαθμονομητής παραμείνει για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Τοποθέτηση του microtiter plate (MTP) της αντίδρασης στη θέση 1 του οργάνου.
6. Τοποθέτηση του SpectroCHIP Array στο όργανο, στον ειδικό υποδοχέα πολλαπλών θέσεων (Scout plate).
7. Δίνεται εντολή για εκκίνηση της διανομής, μέσω του λογισμικού και της οθόνης αφής του οργάνου.
 - Πραγματοποιείται αυτόματο ξέπλυμα από το όργανο, το οποίο ελέγχεται οπτικά από τον αναλυτή.
 - Ο αναλυτής επιβεβαιώνει τη σωστή λειτουργία της θέσης ξεπλύματος.
 - Η μεταφορά των δειγμάτων από τα 96 πηγαδάκια του microtiter plate (MTP) της αντίδρασης στις 96 θέσεις του SpectroCHIP Array και του βαθμονομητή στις 5 θέσεις του SpectroCHIP Array ξεκινάει και διαρκεί περίπου 8 – 10 λεπτά.
8. Το MassARRAY® Nanodispenser RS1000 πραγματοποιεί τις παρακάτω αυτόματες δραστηριότητες κατά τη μεταφορά των δειγμάτων στο SpectroCHIP Array.
 - Πριν την έναρξη της διανομής, πραγματοποιείται αυτόματα προετοιμασία του συστήματος τροφοδοσίας νερού, διάρκειας 7 δευτερολέπτων, κατά την οποία γίνεται αργή άντληση νερού από το δοχείο τροφοδοσίας με σκοπό την απομάκρυνση των φυσαλίδων που πιθανώς να έχουν παγιδευτεί στο σύστημα.
 - Το όργανο ελέγχει την θέση τοποθέτησής του SpectroCHIP Array στον ειδικό υποδοχέα (Scout plate).
 - Πραγματοποιείται ανάγνωση των barcodes των SpectroCHIP Array και του microtiter plate (MTP) της αντίδρασης.
 - Κατά την διάρκεια της διανομής παρατίθενται μέσω του λογισμικού του οργάνου στοιχεία για την πρόοδο της διανομής των δειγμάτων, για τον όγκο που έχει τοποθετηθεί σε κάθε θέση του SpectroCHIP Array, με φωτογραφική απεικόνιση της θέσης και στοιχεία της ταχύτητας διανομής.
9. Καθαρισμός του οργάνου αφού ολοκληρωθεί η διανομή των δειγμάτων
 - Αφαιρείται το SpectroCHIP Array από τον ειδικό υποδοχέα του (Scout plate) και τοποθετείται άμεσα στον υποδοχέα του MassARRAY® Analyzer 4 όπου και θα αναλυθούν τα δείγματα.

- Αφαιρείται το microtiter plate (MTP) της αντίδρασης από τη θέση 1 του οργάνου και αποθηκεύεται για πιθανή χρήση στο μέλλον.
- Αδειάζεται το δοχείο βαθμονόμησης με τη χρήση μικροπιπέτας και ο βαθμονομητής που απέμεινε αποθηκεύεται στους -20°C για πιθανή χρήση στο μέλλον

10. Απενεργοποιούμε το όργανο αφού αποσυνδεθούμε από το λογισμικό του.

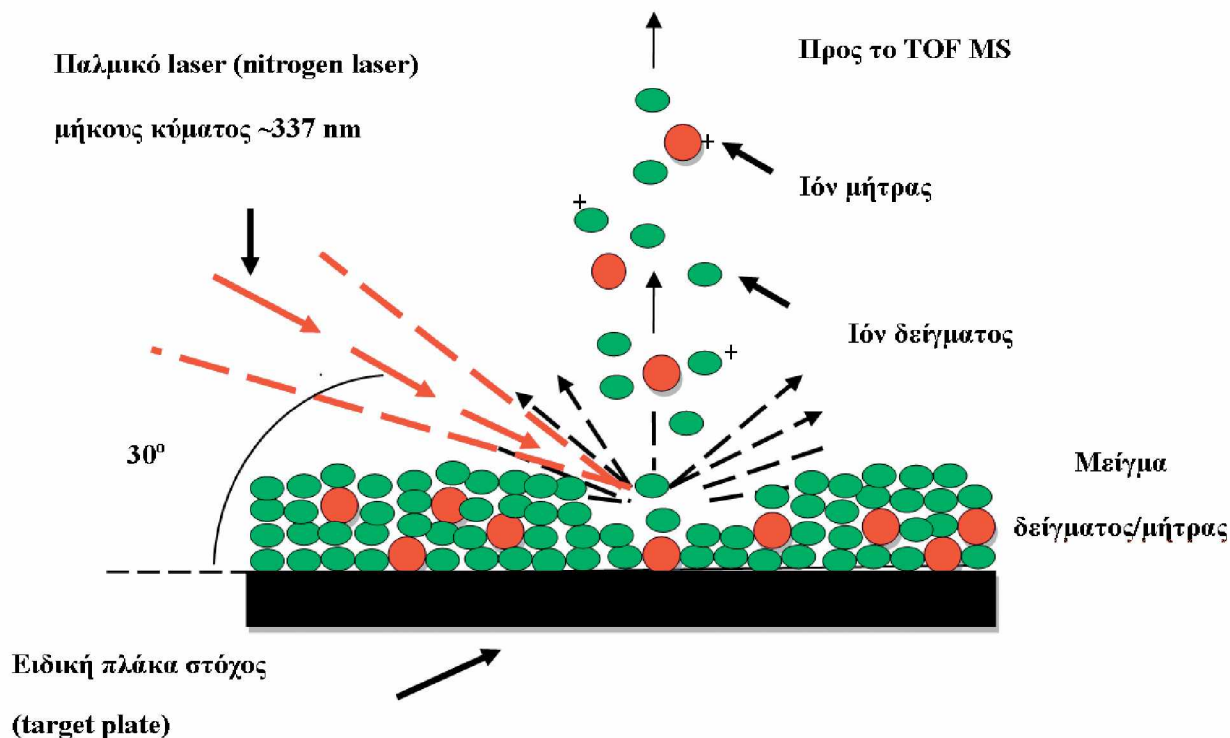
2.4.3 Ανάλυση των δειγμάτων με τη χρήση του MassARRAY® Analyzer 4

Η ανάλυση των δειγμάτων που πλέον έχουν μεταφερθεί στο SpectroCHIP Array, γίνεται από τον φασματογράφο μάζας MassARRAY® Analyzer 4. Το MassARRAY® Analyzer 4 είναι ένας φασματογράφος μάζας, με υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία στην ανάλυση νουκλεϊκών οξέων που χρησιμοποιεί την ειδική τεχνική φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer).

Η αρχή της μεθόδου αυτής βασίζεται στη μέτρηση του λόγου μάζας προς φορτίου (m/z) των προς ανάλυση ουσιών, οι οποίες έχουν προηγουμένως μετατραπεί σε ιόντα θετικά ή αρνητικά φορτισμένα. Ο ιονισμός της προς ανάλυση ουσίας επιτυγχάνεται μέσω της προηγούμενης ανάμειξης της με κατάλληλη χημική ουσία (μήτρα/matrix) και την τοποθέτηση του μίγματος σε κατάλληλη πλάκα (SpectroCHIP Array), όπου εφαρμόζεται παλμικό λέιζερ σε κάθε υπό ανάλυση δείγμα. Το παλμικό λέιζερ προκαλεί μερική ατμοποίηση και ιονισμό της προς ανάλυση ουσίας και τα παραγόμενα ιόντα επιταχύνονται με την εφαρμογή δυναμικού, προς τον ανιχνευτή, διαμέσου ενός σωλήνα ορισμένου μήκους. Κατά τη διαδρομή των ιόντων στον σωλήνα, η οποία γίνεται σε κενό αέρα ελλείπει δυναμικού μετά την αρχική επιτάχυνση, ο χρόνος που χρειάζεται κάθε ιόν για να διανύσει τη συγκεκριμένη απόσταση, εξαρτάται από τον λόγο της μάζας προς το φορτίο (m/z) του. Ο ανιχνευτής TOF-MS (time of flight mass spectrometer) υπολογίζοντας τον χρόνο πτήσης του κάθε ιόντος τα διαχωρίζει σύμφωνα με το m/z τους, με τον γενικό κανόνα ότι τα ελαφρύτερα ιόντα διανύουν την απόσταση γρηγορότερα από τα πιο βαριά (Εικόνα 5).

Βάσει της μάζας του κάθε τμήματος DNA, όπως αυτό έχει προκύψει μετά την Extension PCR και την τοποθέτηση τελικού νουκλεοτιδίου διαφορετικής μάζας για κάθε πολυμορφισμό, το λογισμικό του οργάνου καθορίζει τη νουκλεοτιδική βάση που βρίσκεται στην θέση της πολυμορφικής βάσης.

Το MassARRAY® Analyzer 4 μπορεί να ξεχωρίσει διαφορές μάζας περίπου 16 Daltons και κατά τη διάρκεια της ανάλυσης το λογισμικό του οργάνου λαμβάνει και αναλύει τα φάσματα των αναλυόμενων δειγμάτων και υπολογίζει τον τύπο των αλληλόμορφων για κάθε πολυμορφισμό, αποθηκεύοντας τα στην βάση δεδομένων του.



Εικόνα 5. Αρχή παραγωγής ιονισμένων μορίων με τη μέθοδο MALDI. Πηγή: (Καλογεροπούλου Ε. κ. συν., 2008)

Διαδικασία εκτέλεσης ανάλυσης των δειγμάτων στο MassARRAY® Analyzer 4

1. Τοποθέτηση του SpectroCHIP Array στην ειδική υποδοχή του αναλυτή και αυτόματη μεταφορά του στη σωστή θέση από το όργανο.
2. Δημιουργούμε ένα αρχείο εισαγωγής δεδομένων στο οποίο καταχωρούμε τα στοιχεία:
 - του microtiter plate (MTP) της αντίδρασης (barcode, θέσεις)
 - του κωδικού κάθε δείγματος DNA
 - των υπό μελέτη πολυμορφισμών

- του τύπου των νουκλεοτιδίων τερματισμού που χρησιμοποιήθηκαν κατά την Extension PCR (“iPLEX”)
- της μεθόδου επεξεργασίας (“Genotype + Area”)
- της μεθόδου διανομής των δειγμάτων από το microtiter plate (MTP) της αντίδρασης στο SpectroCHIP Array (“Nanodispenser 96 to 96”)
- του τίτλου του πειράματος
- του SpectroCHIP Array (barcode)

3. Ρυθμίσεις του οργάνου πριν την έναρξη της ανάλυσης

- Επιλέγουμε το αρχείο εισαγωγής δεδομένων που δημιουργήσαμε στο προηγούμενο βήμα της διαδικασίας και παρέχει στο όργανο όλες τις πληροφορίες που έχουμε εισάγει.
- Ρυθμίζουμε τις παραμέτρους σύμφωνα με το πρωτόκολλο “iPLEX” που προτείνει ο κατασκευαστής για το είδος του SpectroCHIP Array που χρησιμοποιούμε στο πείραμα μας, το οποίο περιλαμβάνει τα δεδομένα του πίνακα 13.

Πίνακας 13. Παράμετροι αυτόματης εκτέλεσης ανάλυσης πρωτοκόλλου “iPLEX”

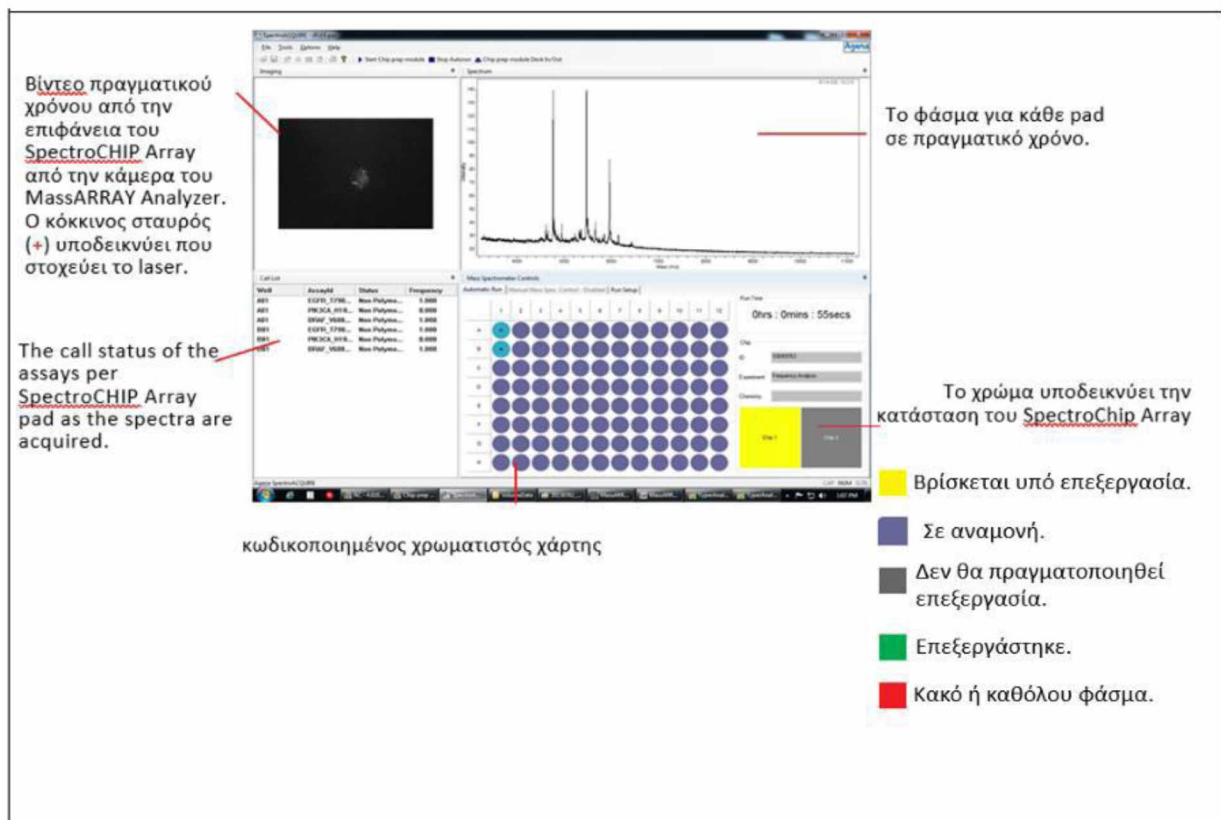
Παράμετροι	Τιμές
Βολές του λέιζερ σε κάθε μέτρηση που πραγματοποιεί το όργανο	20
Αριθμός θέσεων στο δείγμα στις οποίες πραγματοποιούνται μετρήσεις	9
Ελάχιστος αριθμός φασμάτων που θα πρέπει να έχουν ανακτηθεί πριν το λογισμικό προχωρήσει σε επεξεργασία και ανάλυση των πρωτογενών δεδομένων	5
Μέγιστος αριθμός φασμάτων που όταν έχουν ανακτηθεί το όργανο σταματά να πραγματοποιεί αναλύσεις για το συγκεκριμένο δείγμα και προχωρά σε επεξεργασία και ανάλυση των πρωτογενών δεδομένων	5

- Ρυθμίζουμε το όργανο ώστε να λάβει φάσματα από τις θέσεις του SpectroCHIP Array που έχουμε τοποθετήσει.

- Ρύθμιση αυτόματου ελέγχου και εφαρμογής μικροδιορθώσεων της τοποθέτησης του SpectroCHIP Array.

4. Δίνεται η εντολή για την εκκίνηση της ανάλυσης των δειγμάτων μέσω του λογισμικού SpectroACQUIRE του οργάνου.

- Το όργανο επαληθεύει την ορθότητα των στοιχείων του SpectroCHIP Array που έχουμε εισάγει, σε σχέση με τα στοιχεία του αρχείου εισαγωγής δεδομένων.
- Ελέγχει τη θέση του SpectroCHIP Array.
- Ξεκινάει την ανάλυση λαμβάνοντας τα φάσματα του βαθμονομητή.
- Λαμβάνει τα φάσματα των προς ανάλυση δειγμάτων.
- Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, το όργανο προβάλλει μέσω του λογισμικού του το φάσμα κάθε δείγματος σε πραγματικό χρόνο (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Λογισμικό SpectroACQUIRE, προβολή σε πραγματικό χρόνο των δεδομένων ανάλυσης.

5. Αφού ολοκληρωθεί η ανάλυση και το υψηλό δυναμικό έχει απενεργοποιηθεί, αφαιρούμε το SpectroCHIP Array.
6. Το λογισμικό SpectroACQUIRE μετά την ανάλυση επεξεργάζεται τα πρωτογενή δεδομένα και αποθηκεύει τα αποτελέσματα της επεξεργασίας στη βάση δεδομένων του.

2.5 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων, οι ασθενείς που έλαβαν κυκλοσπορίνη διαχωρίστηκαν βάσει των ανεπιθύμητων ενεργειών που παρουσίασαν, σε εκείνους που εμφάνισαν και σε εκείνους που δεν εμφάνισαν τοξικότητα. Μετρήθηκε για κάθε γενετικό πολυμορφισμό η συχνότητα εμφάνισης του κοινού αλληλόμορφου. Επιπλέον έγινε η υπόθεση για κάθε μελετούμενο πολυμορφισμό πως το κοινό αλληλόμορφο είναι επικρατές έναντι του σπάνιου και το αντίστροφο. Η συσχέτιση των αλληλόμορφων με την εμφάνιση τοξικότητας έγινε με το τεστ Cochran-Armitage και χρησιμοποιήθηκε ο υπολογισμός των odds ratio ώστε να εντοπιστεί η συσχέτιση της εμφάνισης κάθε αλληλόμορφου με την πιθανότητα εμφάνισης ή μη τοξικότητας (για 2x2 πίνακες συνάφειας). Το απαιτούμενο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας καθορίστηκε σε $p < 0.05$. Η επεξεργασία των δεδομένων της πειραματικής ανάλυσης έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS.

3. Αποτελέσματα

3.1 Χαρακτηριστικά ασθενών

Στον πίνακα 14 φαίνονται τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν μέρος στην έρευνα καθώς επίσης και τα στατιστικά στοιχεία εμφάνισης η μη τοξικότητας, επί του συνόλου του μελετούμενου πληθυσμιακού δείγματος.

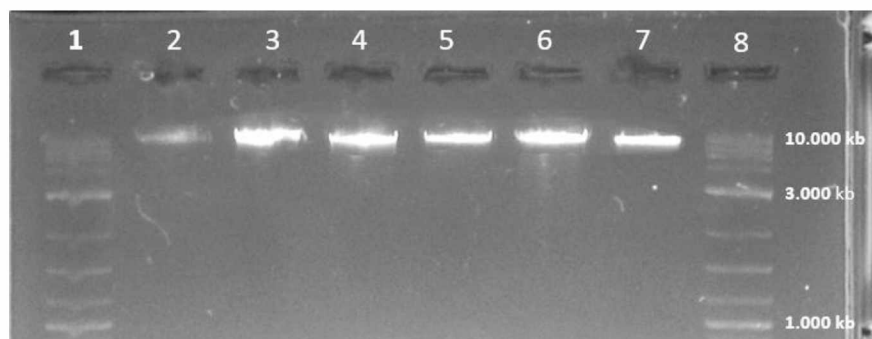
Πίνακας 14. Χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν μέρος στη μελέτη (n=96)

Μεταβλητή	Τιμή
Ηλικία σε έτη, μέση τιμή \pm SD*	46,86 \pm 12,44
Διάρκεια ασθένειας σε έτη, μέση τιμή \pm SD*	4,24 \pm 1,56
Ηλικία εμφάνισης σε έτη, μέση τιμή \pm SD*	33,57 \pm 11,24
Συν-νοσηρότητα, ποσοστό	35%
Εμφάνιση Τοξικότητας	12 (12,50 %)
Μη Εμφάνιση Τοξικότητας	84 (87,50 %)

*Σταθερά απόκλισης (standard deviation) n=96

3.2 Αποτελέσματα ελέγχου του DNA που απομονώθηκε με ηλεκτροφόρηση

Αφού απομονώθηκε το γονιδιωματικό DNA από φλεβικό αίμα των ασθενών, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της απομόνωσης του DNA με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. (Εικόνα 7)



Εικόνα 7. Ενδεικτικός έλεγχος αποτελέσματος απομόνωσης γονιδιωματικού DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5 %. 1:μάρτυρας 1kb (Nippon Genetics, 110ng/μl), 2:P42, 3:P74, 4:P77, 5:P79, 6:P80, 7:P2Θ, 8: μάρτυρας 1kb (Nippon Genetics, 110ng/μl)

3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA

Τα αποτελέσματα της μέτρησης της συγκέντρωσης του DNA κάθε δείγματος, με το φασματοφωτόμετρο Q5000 UV-Vis παρατίθενται στον πίνακα 15.

Πίνακας 15. Αποτελέσματα μέτρησης συγκέντρωσης DNA στα δείγματα των ασθενών

Κωδικός δείγματος	Συγκέντρωση (ng/μl)	Κωδικός δείγματος	Συγκέντρωση (ng/μl)
P1	8,90	P36	14,80
P2	32,20	P37	11,30
P3	30,75	P38	25,10
P4	35,85	P39	19,10
P5	29,95	P40	24,05
P6	9,60	P41	27,00
P7	50,40	P42	54,35
P8	23,60	P43	9,90
P9	13,90	P45	29,70
P10	32,65	P46	29,10
P11	29,65	P47	30,60
P12	26,60	P48	42,90
P17	7,90	P69	24,50
P18	7,95	P70	40,70
P19	10,50	P71	9,40
P20	17,00	P72	24,65
P21	15,65	P73	41,20
P22	13,05	P74	49,45
P23	14,45	P75	27,20
P25	15,05	P76	17,60
P26	13,45	P77	133,40
P27	8,30	P78	39,05
P28	17,10	P79	64,70
P29	46,35	P80	53,45
P30	9,35	P81	64,80
P31	12,35	P82	35,25
P32	17,00	P83	18,95
P33	17,60	P84	24,20
P34	14,75	P85	31,30
P35	24,20	P86	29,25

Κωδικός δείγματος	Συγκέντρωση (ng/μl)
P87	36,55
P88	52,35
P89	51,80
P90	22,25
P91	43,75
P92	63,05
P93	26,10
P2Θ	146,90
P3Θ	11,55
P7Θ	36,50
P8Θ	10,15
P9Θ	10,90
P10Θ	8,45
P12Θ	12,90
P14Θ	10,95
P15Θ	19,35
P16Θ	10,90
P17Θ	8,95
P18Θ	9,15
P19Θ	25,50
P20Θ	24,40
P21Θ	25,20
P22Θ	8,45
P26Θ	10,55
P27Θ	9,50
P28Θ	14,20
P30Θ	16,15
P31Θ	11,80
P33Θ	26,15
P35Θ	12,85
P36Θ	8,60
P37Θ	9,20
P39Θ	10,10
P40Θ	11,00
P41Θ	18,90
P42Θ	8,70

3.4 Εμφάνιση τοξικότητας

Οι ασθενείς που συμμετείχαν στην έρευνα, κατηγοριοποιήθηκαν βάσει της εμφάνισης ή μη ανεπιθύμητων ενεργειών σε εκείνους που εμφάνισαν και σε εκείνους που δεν εμφάνισαν τοξικότητα στην κυκλοσπορίνη, όπως φαίνεται στον πίνακα 16.

Πίνακας 16. Αποτελέσματα εμφάνισης ή μη τοξικότητας. (n=96)

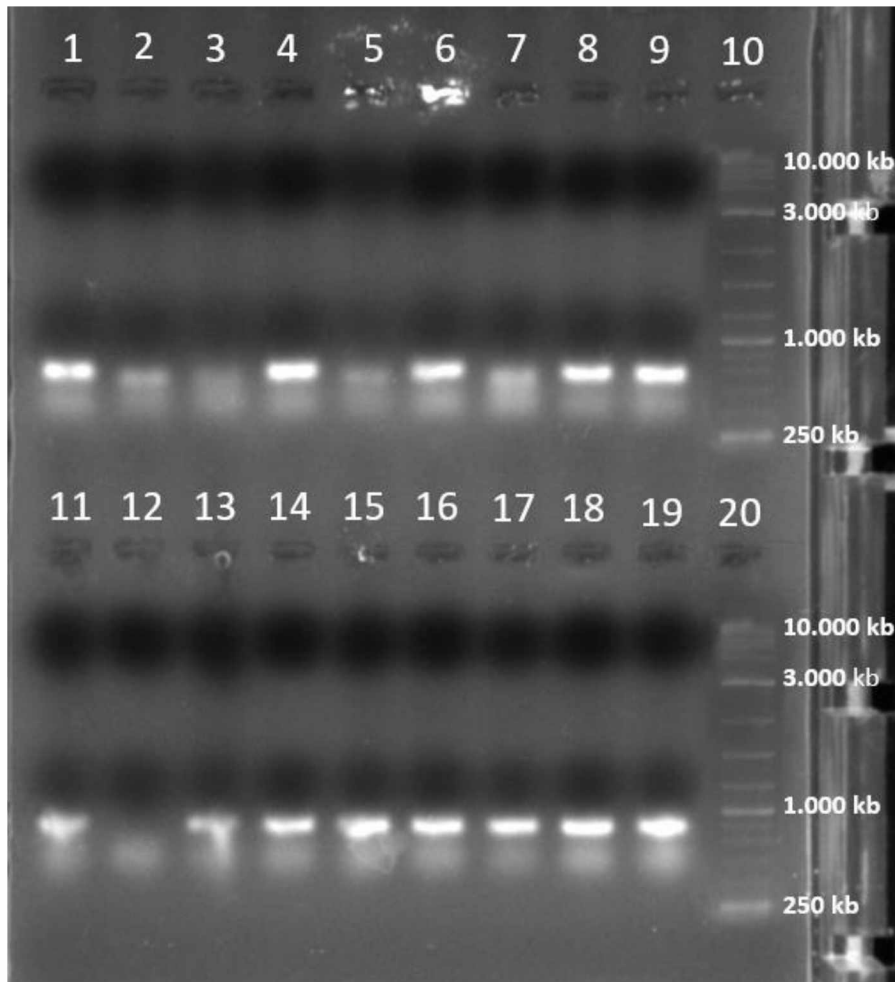
Κωδικός δείγματος	Εμφάνιση Τοξικότητας
P1	OXI
P2	OXI
P3	OXI
P4	OXI
P5	OXI
P6	OXI
P7	OXI
P8	OXI
P9	OXI
P10	OXI
P11	OXI
P12	OXI
P17	OXI
P18	OXI
P19	OXI
P20	OXI
P21	OXI
P22	OXI
P23	OXI
P25	OXI
P26	OXI
P27	OXI
P28	OXI
P29	OXI
P30	OXI
P31	OXI
P32	OXI
P33	NAI
P34	OXI
P35	OXI

Κωδικός δείγματος	Εμφάνιση Τοξικότητας
P36	OXI
P37	OXI
P38	OXI
P39	OXI
P40	OXI
P41	OXI
P42	OXI
P43	OXI
P45	OXI
P46	OXI
P47	NAI
P48	NAI
P69	OXI
P70	OXI
P71	OXI
P72	OXI
P73	OXI
P74	OXI
P75	OXI
P76	OXI
P77	OXI
P78	OXI
P79	OXI
P80	OXI
P81	OXI
P82	OXI
P83	OXI
P84	OXI
P85	NAI
P86	NAI

Κωδικός δείγματος	Εμφάνιση Τοξικότητας
P87	ΝΑΙ
P88	ΝΑΙ
P89	ΟΧΙ
P90	ΝΑΙ
P91	ΟΧΙ
P92	ΟΧΙ
P93	ΟΧΙ
P2Θ	ΟΧΙ
P3Θ	ΟΧΙ
P7Θ	ΟΧΙ
P8Θ	ΟΧΙ
P9Θ	ΟΧΙ
P10Θ	ΟΧΙ
P12Θ	ΟΧΙ
P14Θ	ΝΑΙ
P15Θ	ΝΑΙ
P16Θ	ΝΑΙ
P17Θ	ΝΑΙ
P18Θ	ΟΧΙ
P19Θ	ΟΧΙ
P20Θ	ΟΧΙ
P21Θ	ΟΧΙ
P22Θ	ΟΧΙ
P26Θ	ΟΧΙ
P27Θ	ΟΧΙ
P28Θ	ΟΧΙ
P30Θ	ΟΧΙ
P31Θ	ΟΧΙ
P33Θ	ΟΧΙ
P35Θ	ΟΧΙ
P36Θ	ΟΧΙ
P37Θ	ΟΧΙ
P39Θ	ΟΧΙ
P40Θ	ΟΧΙ
P41Θ	ΟΧΙ
P42Θ	ΟΧΙ

3.5 Αποτελέσματα ελέγχου των προϊόντων της Extension PCR με ηλεκτροφόρηση

Πραγματοποιήθηκε δειγματοληπτικός έλεγχος των προϊόντων της Extension PCR με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. (Εικόνα 8)



Εικόνα 8. Δειγματοληπτικός έλεγχος των προϊόντων της Extension PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1:P1, 2:P2, 3:P3, 4:P4, 5:P5, 6:P6, 7:P7, 8:P8, 9:P9, 10:μάρτυρας 1kb (Nippon Genetics, 110ng/μl), 11:P11, 12:P12, 13:P17, 14:P18, 19:P19, 20:μάρτυρας 1kb (Nippon Genetics, 110ng/μl).

3.6 Αποτελέσματα γονοτύπησης

Το MassARRAY® Analyzer 4, μέσω του λογισμικού του SpectroACQUIRE, πραγματοποίησε την γονοτύπηση των προς ανάλυση δειγμάτων DNA. Λήφθηκαν δεδομένα για τους 27 από τους 30 πολυμορφισμούς, λόγω τεχνικού προβλήματος κατά την εισαγωγή στοιχείων στο λογισμικό του αναλυτή MassARRAY® Analyzer 4. Το λογισμικό μετά την ανάλυση των φασμάτων μάζας που έλαβε, δημιούργησε ένα γράφημα για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς που αναλύθηκαν. Το σύνολο των εικόνων των γραφημάτων αυτών παρατίθενται στο Παράρτημα Α. Σε κάθε γράφημα, τα δείγματα που εμφανίζουν ομόζυγωτία για το κοινό αλληλόμορφο σημαίνονται με μπλε τρίγωνο σχήμα, τα ετερόζυγα δείγματα με πράσινο τετράγωνο σχήμα και τα ομόζυγα για το σπάνιο αλληλόμορφο με κίτρινο ανεστραμμένο τρίγωνο. Με κόκκινο κύκλο σημαίνονται τα δείγματα τα οποία δεν πληρούν τις προϋποθέσεις που έχουμε θέσει, ώστε να κατηγοριοποιηθούν αυτόματα από το SpectroACQUIRE σε μια από τις τρεις παραπάνω κατηγορίες. Στις περιπτώσεις αυτές και όπου αυτό ήταν δυνατόν, μετά από μελέτη των φασμάτων τα δείγματα αυτά εντάχθηκαν χειροκίνητα σε μία από τις παραπάνω περιπτώσεις. Στον πίνακα 17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της γονοτύπησης.

Πίνακας 17. Αποτελέσματα γονοτύπησης με το MassARRAY® Analyzer 4 Α: Δείγμα ομόζυγο για την αδερίνη, Τ: Δείγμα ομόζυγο για την θυμίνη, C: Δείγμα ομόζυγο για την κυτοσίνη, G: Δείγμα ομόζυγο για την γουανίνη. Οι γονότυποι με έντονη γραφή αφορούν τις περιπτώσεις που δεν πληρούσαν τις προϋποθέσεις για να κατηγοριοποιηθούν αυτόματα από το SpectroACQUIRE και μετά από μελέτη των φασμάτων εντάχθηκαν χειροκίνητα σε μία από τις παραπάνω κατηγορίες.

Κωδ. ασθενή/ rsID SNP	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
rs10758669	CA			C	C	A	C	CA	CA	C
rs11083838	T			T		TC	C	TC	T	C
rs11780915	G		A	GA	A	GA	A	GA	GA	A
rs12279202	C		C	TC		C	C	C	C	C
rs12459087	G			G		G		G	G	G
rs12461917	CA			CA		CA		C	C	
rs12644	C			TC		C		TC	TC	C
rs12885713	C		C	T		T			T	C
rs13017846			G	A	A		GA			GA
rs17103265	A		A	A	A			A	A	DEL.A
rs17834873	A		A	A	A	A		A	A	A
rs1868402	GA			GA		A		GA	GA	G
rs200513900			TTAAT	DEL	DEL. TTAAT	DEL. TTAAT	DEL	DEL	DEL	DEL
rs2230491	T			C		C	T	C	C	
rs28362491	ATTG			DEL	DEL	DEL	ATTG	DEL	DEL	DEL
rs2874116	G			AG		AG	A	A	AG	A
rs3780378	TC		C	TC	TC	C	TC	TC	TC	TC
rs3804358	G			G				G	G	
rs422674	C		C	A	CA	C		CA	C	A
rs4872499	C		TC	C	TC	C	TC	C	C	T
rs696	TC		C	C	C	TC	C	T	C	C
rs7430	CG		C	CG	C	CG	G	CG	C	G
rs7849191	TC		T	T	C			TC	TC	C
rs8024	A		CA	CA	C	A	C	C	A	
rs8177826				G	G			C	GC	
rs873833	GA			A	A	GA	A	A	A	A
rs880324	GA		G	G	A	G		G	G	G

Κωδ. ασθενή/ rsID SNP	P11	P12	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P25
rs10758669				CA	CA	CA	CA	CA		CA
rs11083838				T	T	T	TC	T		T
rs11780915		A		GA	GA	G	A	GA		G
rs12279202		C		TC	TC	TC	C	TC		C
rs12459087		GA	GA	GA	G	G	G	G		G
rs12461917				C	C	C	C	C		C
rs12644				C	C	C	C	C		C
rs12885713	C	C	C	T	T	T	C	T		
rs13017846					GA	G	G			
rs17103265				A	A	A	A	A		A
rs17834873				A	A	A	A	A		A
rs1868402		G		GA	A	A	A	GA		A
rs200513900		DEL. TTAAT		DEL. TTAAT		DEL	TTA AT	DEL. TTAAT	DEL	TTA AT
rs2230491		C		C	T	C	TC	C		A
rs28362491				ATTG	DEL	ATTG	DEL	ATTG. DEL		ATT G
rs2874116				AG	AG	AG	G	A		AG
rs3780378		C		T	TC	TC	TC	TC		TC
rs3804358				G	G	G	G	G		G
rs422674		A		C	CA	A	C	C		CA
rs4872499		T		C	TC	C	T	C		C
rs696		C		C	T	TC	T	TC		T
rs7430		C		CG	CG	G	C	CG		G
rs7849191		C		C	T		T	T		C
rs8024				C	C	C	CA	CA		CA
rs8177826		G		C	C	GC		GC		GC
rs873833		A		A	GA	GA	GA	A		A
rs880324		A		GA	GA	GA	G	G		GA

Κωδ. ασθενή/ rsID SNP	P26	P27	P28	P29	P30	P31	P32	P33	P34	P35
rs10758669	A		CA		A	A	A	CA	A	
rs11083838	T	T	TC		T	TC	T	T	T	C
rs11780915	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G
rs12279202	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C
rs12459087	G	GA	GA	A	G	G	G	G	G	A
rs12461917	C	CA	C		C	C	C	C	CA	
rs12644	C	C	C	C	C	C	C	C	TC	TC
rs12885713	T	T		C		T		T	T	T
rs13017846										
rs17103265	A	A	A		A	A	A	A	A	DEL
rs17834873	A	GA	A	A	A	A	A	A	A	
rs1868402	A	G	GA	G	A	GA	A	GA	GA	G
rs200513900				DEL. TTA AT	TTA AT		DEL. TTA AT	TTAAT	DEL. TTA AT	TTA AT
rs2230491	TC		C	C	C	TC	C	C	TC	C
rs28362491	ATTG .DEL	AT TG	ATT G	DEL		ATT G	ATT G	ATTG.D EL	ATTG	DEL
rs2874116	AG	A	AG		G	A	AG	G	AG	
rs3780378	TC	C	TC	C	TC	TC	TC	TC	T	TC
rs3804358	G	G	G	C	G	G	G	G	G	G
rs422674	CA	C	CA	A	C	CA	A	C	A	
rs4872499	C	TC	C	T	C	C	C	C	C	T
rs696	T	TC	TC	C	C	T	TC	TC	TC	C
rs7430	C	G	G	C	G	G	G	G	CG	C
rs7849191	TC		C	C	C	T	T	TC	C	
rs8024	C	CA	A	A	CA	C	CA	C	C	
rs8177826			G		C	C	GC		G	GC
rs873833	A	GA	A	A	A	A	A	A	A	A
rs880324	G	GA	G	A	G	G	GA	GA	G	A

Κωδ. ασθενή/ rsID SNP	P36	P37	P38	P39	P40	P41	P42	P43	P45	P46
rs10758669	A	A	CA	A	C	CA		A	A	A
rs11083838	T	T	T	T	TC	T		T	T	T
rs11780915	GA	G	GA	G	GA	G		G	G	A
rs12279202	C	C	C	C	C	C		C	C	C
rs12459087	G	G	G	G	GA	G		G	G	G
rs12461917	C	CA	C	C	C	CA		C	C	C
rs12644	C	TC	C	C	C	C		C	C	C
rs12885713	T	T	T	T		T			T	
rs13017846		A	GA	G	G	G			G	
rs17103265	A	A	A	A	A	A		A	A	A
rs17834873	A	A	A	A	GA	A		A	A	A
rs1868402	A	GA	A	GA	GA	GA		A	A	GA
rs200513900	TTA AT	TTAAT	DEL			DEL. TTAAT		DEL. TTAA T	DE L	DEL
rs2230491	C	C	TC	C	C	C		C	C	C
rs28362491	ATT G	ATTG.D EL	ATT G	ATT G	ATT G	ATTG.D EL				ATT G
rs2874116	A	G	AG	G	A	AG		A	AG	AG
rs3780378	T	TC	T	TC	T	TC		C	C	C
rs3804358	G	G	G	G	G	G		G	G	G
rs422674	CA	A	C	CA	CA	CA		CA	C	CA
rs4872499	TC	C	TC	C	C	C		C	C	T
rs696	T	C	T	C	TC	C		C	TC	TC
rs7430	CG	G	CG	G	CG	CG		G	G	C
rs7849191	TC	TC	C	T	C	T		TC	TC	T
rs8024	C	C	C	C	CA	CA		C	C	A
rs8177826	C	GC		GC		C		C	C	C
rs873833	A	A	A	A	A	A		A	A	A
rs880324	G	G	G	G	GA	G		GA	GA	GA

Κωδ. ασθενή/ rsID SNP	P47	P48	P69	P70	P71	P72	P73	P74	P75	P76
rs10758669	CA	CA	CA	A	A		CA	A	CA	CA
rs11083838	T	T	T	T	TC		T	T	T	T
rs11780915	G	GA	GA	A	G		GA	GA	GA	GA
rs12279202	C	C	C	C	C		C	C	C	C
rs12459087	G	G	G	G	G		G	G	G	GA
rs12461917	CA	C	CA	C	C		CA	CA	C	C
rs12644	C	C	C	TC	C		C	C	C	C
rs12885713		T		T	T		T		T	T
rs13017846	GA	A	A	G	G		G	GA		G
rs17103265	A	A	A	A	A		A	A	A	A
rs17834873	A	A	A	GA	A		A	A	A	A
rs1868402	A	GA	A	GA	A		G	G	A	A
rs200513900	DEL	DEL		DEL	DEL		DEL. TTAAT	DEL. TTAA T	DEL	
rs2230491	C	C	TC	C	C		C	C	C	C
rs28362491	ATT G		ATTG. DEL	ATT G	DEL		ATTG	DEL	ATT G	ATT G
rs2874116	AG	AG	AG	G	A		A	AG	AG	AG
rs3780378	T	TC	TC	TC	T		TC	C	TC	TC
rs3804358	G	G	G	G	G		G	G	G	G
rs422674	CA	C	C	C	CA		CA	CA	CA	C
rs4872499	C	T	T	TC	C		TC	C	C	TC
rs696	TC	C	TC	T	TC		T	T	C	TC
rs7430	G	C	C	C	G		CG	CG	CG	CG
rs7849191	C	C	TC	TC	TC		T	T	TC	C
rs8024	C	CA	C	CA	CA		C	C	CA	C
rs8177826	G	GC	GC		GC		C	C	C	C
rs873833	GA	A	A	A	GA		GA	A	GA	A
rs880324	G	G	G	G	G		G	G	GA	GA

Κωδ. ασθενή/ rsID SNP	P77	P78	P79	P80	P81	P82	P83	P84	P85	P86
rs10758669	C	CA	C	CA	CA	C	CA	CA	CA	C
rs11083838	C	T		T	TC	C	T	T	T	T
rs11780915	A	GA	G	GA	A	G	GA	G	GA	G
rs12279202	C	C	C	C	C	C	C	TC	C	C
rs12459087		G		G	GA		GA	G	G	G
rs12461917		CA		C	C		C	C	A	CA
rs12644		TC		C	C	TC	TC	C	C	C
rs12885713	C	T	C	T			T	T	T	T
rs13017846	G	G	A			GA	G	G		
rs17103265		A	A	A	A	DEL	A	A	A	A
rs17834873	A	GA	G	A	GA		A	A	A	A
rs1868402		GA	G	GA	GA		A	GA	A	GA
rs200513900	TT AA T	TTAA T		TTA AT	DEL	DEL	DEL. TTAAT		DEL	
rs2230491	C	C		C	C		C	C	TC	C
rs28362491	DE L	ATTG. DEL		ATT G			ATTG. DEL	ATT G	ATT G	ATTG.D EL
rs2874116		A		G	AG		AG	A	AG	G
rs3780378	TC	T	TC	TC	TC	C	TC	TC	TC	TC
rs3804358		G		G	G		G	G	G	G
rs422674	C	C	A	CA	CA		C	CA	CA	C
rs4872499	T	C	TC	TC	TC	T	C	C	TC	C
rs696	C	C	C	TC	T		TC	TC	TC	TC
rs7430		CG		C	C		CG	G	CG	G
rs7849191	C	C	C	TC	C		C	TC	TC	C
rs8024	C	CA		CA	CA		C	C	CA	CA
rs8177826		GC	G	C	C	C	C	C	C	GC
rs873833	A	A	A	A	A	A	A	A	A	GA
rs880324	A	GA	A	G	G	A	GA	GA	G	G

Κωδ. ασθενή/ rsID SNP	P87	P88	P89	P90	P91	P92	P93	P2Θ	P3Θ	P7Θ
rs10758669	C	CA	CA		A	A	A	A	A	CA
rs11083838	T	T	TC		T	TC	T		T	C
rs11780915	GA	GA	GA		G	GA	GA	A	GA	GA
rs12279202	C	C	C		C	C	C	C	C	C
rs12459087	G	G	GA		G	GA	G			G
rs12461917	C	C	C		C	C	A		C	C
rs12644	TC	C	C		C	C	C		C	
rs12885713		T	T		T		T	C	T	T
rs13017846	GA	A	G			G		G	GA	GA
rs17103265	A	A	DEL. A		A	A	A	DE L	A	
rs17834873	A	A	GA		A	A	A		A	
rs1868402	A	A	A		GA	A	G		A	
rs200513900		DEL. TTA AT			DEL		TTAA T	DE L	DEL. TTAAT	DE L
rs2230491	C	TC	C		C	TC	T		TC	
rs28362491	ATT G	ATT G			DEL	DE L		DE L	ATTG.DE L	
rs2874116	A	G	G		G	AG	AG	G	G	G
rs3780378	T	C	TC		TC	TC	TC	C	TC	TC
rs3804358	G	G	G		G	G	G	G	G	G
rs422674	CA	A	C		CA	C	A	A	C	
rs4872499	TC	C	TC		C	TC	TC	T	C	T
rs696	C	TC	TC		C	TC	TC	T	TC	T
rs7430	CG	CG	C		G	CG	CG		CG	
rs7849191	C	C	TC		TC	T		C	TC	T
rs8024	C	CA	CA		C	C	C		C	C
rs8177826	C	C			C	C	C	G	C	
rs873833	A	GA	A		GA	A	A	A	A	A
rs880324	G	GA	G		G	GA	G	A	G	A

Κωδ. ασθενή/ rsID SNP	P8Θ	P9Θ	P10 Θ	P12Θ	P14Θ	P15 Θ	P16 Θ	P17Θ	P18Θ	P19Θ
rs10758669	C	A		C	CA		CA	C	CA	
rs11083838	TC	C		T	T		T	T	T	
rs11780915	GA	A		G	GA		GA	GA	G	A
rs12279202	C	C		TC	C		C	C	C	C
rs12459087		GA		G	G		GA	GA	GA	
rs12461917	CA			A	C		C	C	C	
rs12644	TC			TC	C		C	C	C	C
rs12885713	T	C			T		T	T		
rs13017846	G	GA			G		G	A		G
rs17103265	A			A	A		A	A	A	
rs17834873	A			G	A		GA	A	GA	A
rs1868402	A	G		GA	A		A	A	GA	G
rs200513900		DEL		DEL	DEL		DEL	DEL. TTAAT	DEL. TTAAT	DEL
rs2230491	TC	C		C	C		C	C	T	
rs28362491	AT TG	DEL		ATTG	ATTG		ATT G	ATTG	ATTG	DEL
rs2874116	G			G	AG		AG	AG	AG	
rs3780378	T	C		TC	TC		TC	TC	TC	C
rs3804358	G	GC		G	G		G	G	G	
rs422674	CA	A		C	CA		A	C	CA	A
rs4872499	TC	T		C	C		C	TC	TC	T
rs696	C	C		C	T		TC	TC	C	C
rs7430	CG	C		G	CG		C	CG	G	C
rs7849191	TC	C		C	C		T	C	T	C
rs8024	C	A		C			CA	C	C	
rs8177826	C	G		GC	GC		G		C	C
rs873833	A	A		A	GA		A	A	A	A
rs880324	G	A		G	GA		GA	G	GA	A

Κωδ. ασθενή/ rsID SNP	P20Θ	P21Θ	P22Θ	P26Θ	P27 Θ	P28Θ	P30Θ	P31 Θ	P33 Θ	P35Θ
rs10758669	A	CA	CA	C		A	A			C
rs11083838	T	T	T			T	T			
rs11780915	GA	GA	G	A		G				A
rs12279202	C	C	C	C		C				C
rs12459087	G	A	GA	GA		G	G			A
rs12461917	CA	C	C			C	CA			
rs12644	TC	T	TC			C	C			
rs12885713	T	T		C		T	T			C
rs13017846			G	A		A	A			GA
rs17103265	A		A	DEL		A	A			A
rs17834873	A	GA	A	G			A			G
rs1868402	GA	GA	A	G		GA	A			
rs20051390 0	DEL	DEL. TTAA T	DEL	DEL. TTAA T		TTAA T	DEL			DEL. TTAA T
rs2230491	C	TC	C	TC			C			T
rs28362491	ATT G	ATTG	ATT G	DEL		DEL	ATT G			DEL
rs2874116	G	G	AG			AG	AG			
rs3780378	C	T	TC	C		TC	TC			C
rs3804358	G	G	G	GC		G	G			G
rs422674	CA	CA	C			CA	C			
rs4872499	TC	C	C	T		C	TC			T
rs696	TC	T	TC	C		TC	C			T
rs7430	CG	CG	G	C		G	CG			
rs7849191	C	C	C	C		TC	C			C
rs8024	C	A	C	A		C	C			CA
rs8177826	C	C	C			GC				
rs873833	A	A	A	A		GA	A			
rs880324	GA	G	GA	A		G	GA			A

Κωδ. ασθενή/ rsID SNP	P36Θ	P37Θ	P39Θ	P40Θ	P41Θ	P42Θ
rs10758669		C			CA	
rs11083838	T				T	
rs11780915		A	A		G	
rs12279202		TC	C			
rs12459087					GA	
rs12461917						
rs12644					C	
rs12885713		C	C		C	
rs13017846		G	G		G	
rs17103265			A		A	
rs17834873			G		GA	
rs1868402					G	
rs200513900			TTAAT		DEL. TTAAT	
rs2230491					C	
rs28362491			DEL			
rs2874116					A	
rs3780378		C	C		C	
rs3804358					G	
rs422674		A	C		C	
rs4872499		T	TC		C	
rs696		C			TC	
rs7430			C		CG	
rs7849191		TC	C		C	
rs8024			C		C	
rs8177826					GC	
rs873833		A	A		A	
rs880324		GA			G	

3.7 Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης συσχέτισης των πολυμορφισμών με την εμφάνιση ή μη τοξικότητας στην κυκλοσπορίνη

Λαμβάνοντας τα δεδομένα των γονοτύπων του κάθε ασθενή για τον κάθε πολυμορφισμό από τον Πίνακα 17, πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση τους σε ομόζυγους ως προς το κοινό αλληλόμορφο, ομόζυγους ως προς το σπάνιο αλληλόμορφο και ετερόζυγους. Τα δεδομένα αυτό μελετήθηκαν σχετιζόμενα με την εμφάνιση ή μη τοξικότητας στην κυκλοσπορίνη (βλ. Πίνακα 16). Η συσχέτιση των αλληλόμορφων με την εμφάνιση τοξικότητας έγινε με το τεστ Cochran-Armitage και χρησιμοποιήθηκε ο υπολογισμός των odds ratio ώστε να εντοπιστεί η συσχέτιση της εμφάνισης κάθε αλληλόμορφου με την πιθανότητα εμφάνισης ή μη τοξικότητας (για 2x2 πίνακες συνάφειας). Επιπλέον, για κάθε πολυμορφισμό έγινε η υπόθεση, ότι το κοινό αλληλόμορφο είναι επικρατές έναντι του σπανίου αλληλόμορφου και το αντίστροφο. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $P < 0.05$. Η επεξεργασία των δεδομένων της πειραματικής ανάλυσης έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS.

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα Β (Πίνακας 18 έως Πίνακας 44).

Σύμφωνα με τους πίνακες της στατιστικής ανάλυσης, βρέθηκε πως εμφανίζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση τοξικότητας οι πολυμορφισμοί rs1868402 και rs28362491 (Πίνακες 28 και 33).

Συγκεκριμένα, στον πολυμορφισμό rs1868402 (Πίνακας 28) βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της εμφάνισης του σπανίου αλληλόμορφου (A) με την εμφάνιση τοξικότητας ($P=0.032$). Η συχνότητα εμφάνισης του σπανίου αλληλόμορφου (A) ήταν αυξημένη στους ασθενείς που εμφάνισαν τοξικότητα (0.85) σε σχέση με εκείνους που δεν εμφάνισαν τοξικότητα (0.58) (odds ratio:0.246 , CI:0.068-0.883 , $P=0.032$).

Τέλος, στον πολυμορφισμό rs28362491 (Πίνακας 33) βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του κοινού αλληλόμορφου (ATTG) με την εμφάνιση τοξικότητας ($P=0.015$). Η συχνότητα εμφάνισης του κοινού αλληλόμορφου (ATTG) ήταν αυξημένη στους ασθενείς που εμφάνισαν τοξικότητα (0.89) σε σχέση με εκείνους που δεν εμφάνισαν τοξικότητα (0.55) (odds ratio:6.5 , CI:1.4290-29.567 , $P=0.015$).

4. Συζήτηση

Στην αντιμετώπιση της ψωρίασης κατέχει σημαντική θέση εδώ και πολλά χρόνια ένας ανοσοκατασταλτικός παράγοντας, η κυκλοσπορίνη. Η κυκλοσπορίνη εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια στην ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία και στην εμφάνιση τοξικότητας, που είναι βασικά κριτήρια για την επιλογή μιας φαρμακοθεραπείας. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια, η εισαγωγή των βιολογικών παραγόντων στο πεδίο της συστηματικής αγωγής της ψωρίασης έχει δώσει στην ιατρική κοινότητα πληθώρα επιλογών, ώστε να παρέχεται η βέλτιστη φαρμακευτική αγωγή στους ασθενείς. Συνδυαζόμενοι, οι παραπάνω παράγοντες οδήγησαν στην ανάγκη του εντοπισμού των γονιδίων και πολυμορφισμών που επηρεάζουν την ανταπόκριση και την εμφάνιση τοξικότητας στην κυκλοσπορίνη. Με τα δεδομένα αυτά, η δημιουργία ενός συστήματος πρόβλεψης της βέλτιστης αγωγής για κάθε ασθενή, θα συντελεί στην αποφυγή εμπειρικής επιλογής της θεραπείας, που σε περίπτωση μη ανταπόκρισης ή εμφάνισης τοξικότητας, επιφέρει σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία των ασθενών και αύξηση του κόστους της θεραπείας.

Η πρώτη πολυκεντρική έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με ψωρίαση υπό θεραπεία με κυκλοσπορίνη στον ελληνικό πληθυσμό, μελέτησε τη συσχέτιση πολυμορφισμών του γονιδίου ABCB1 με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία και ανέδειξε, για τον πολυμορφισμό ABCB1 C3435T, τη συσχέτιση εμφάνισης του 3435T αλληλόμορφου με την μη ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη (Vasilopoulos et al., 2014). Το γονίδιο ABCB1 κωδικοποιεί την Ρ-γλυκοπρωτεΐνη και η ύπαρξη του πολυμορφισμού αυτού επηρεάζει τα επίπεδα της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης, επηρεάζοντας, είτε τη σταθερότητα του m-RNA που την κωδικοποιεί είτε την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης του (Vasilopoulos et al., 2014).

Σε συνέχεια της παραπάνω μελέτης και λόγω των περιορισμών της, με κύριο αυτόν του μεσαίου μεγέθους δείγματος του πληθυσμού που μελετήθηκε, κατασκευάστηκε μέσω της μεταβάσης δεδομένων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στον άνθρωπο PICKLE, το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στο μονοπάτι δράσης της κυκλοσπορίνης, όπως αυτό φαίνεται στην εικόνα 1. Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν από το παραπάνω δίκτυο για να μελετηθούν ως προς τη συσχέτιση τους με την εμφάνιση τοξικότητας στην κυκλοσπορίνη 30 πολυμορφισμοί (Πίνακας 2), βάσει της συχνότητας εμφάνισης του σπάνιου αλληλόμορφου στον γενικό πληθυσμό (MAF>5%) και της λειτουργικής τους σημασίας. Στην παρούσα έρευνα, βρέθηκε πως στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση τοξικότητας εμφανίζουν οι πολυμορφισμοί rs1868402 του γονιδίου PPP3R1 και rs28362491 του γονιδίου NFKB1.

Στον πολυμορφισμό rs1868402 του γονιδίου PPP3R1 βρέθηκε θετική συσχέτιση της εμφάνισης του σπάνιου αλληλόμορφου (A) με την εμφάνιση τοξικότητας. Το γονίδιο PPP3R1 κωδικοποιεί την B υπομονάδα της καλσινευρίνης. Η καλσινευρίνη είναι μία φωσφατάση η δράση της οποίας εξαρτάται από την ύπαρξη ασβεστίου και καλμοδουλίνης. Αποτελείται από δυο υπομονάδες, την A που έχει καταλυτικό ρόλο και την B που έχει μικρότερο μέγεθος και ρυθμιστικό ρόλο (Rusnak & Mertz, 2000). Κατά την φυσιολογική ανοσιακή απόκριση του οργανισμού, η ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα. Η καλμοδουλίνη, μία πρωτεΐνη που διαθέτει θέσεις δέσμευσης ασβεστίου, ανταποκρινόμενη στην μεταβολή του ασβεστίου του κυτταροπλάσματος, αλληλεπιδρά με την καλσινευρίνη με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της δραστηριότητας της ως φωσφατάση και την αποφωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα NF-AT, ο οποίος αφού μεταφερθεί στο εσωτερικό του πυρήνα ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων της ανοσολογικής απόκρισης. Κατά τη χορήγηση κυκλοσπορίνης σχηματίζεται το σύμπλοκο κυκλοσπορίνης-κυκλοφιλίνης, το οποίο δεσμεύει την καλσινευρίνη με αποτέλεσμα την εκλεκτική αναστολή της δράσης της ως φωσφατάση (Satoshi Matsuda & Koyasu, 2000). Η δράση και η τοξικότητα της κυκλοσπορίνης επηρεάζεται άμεσα από την καλσινευρίνη, καθώς σύμφωνα με τον μηχανισμό δράσης που περιγράφηκε παραπάνω, η καλσινευρίνη αποτελεί το μόριο στόχο της κυκλοσπορίνης στο μονοπάτι δράσης καλσινευρίνης - NF-AT (Satoshi Matsuda & Koyasu, 2000).

Τέλος, στον πολυμορφισμό rs28362491 του γονιδίου NFkB1 συσχετίστηκε η εμφάνιση του κοινού αλληλόμορφου (ATTG) με την εμφάνιση τοξικότητας στην κυκλοσπορίνη. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την πρωτεΐνη NFkB1 η οποία ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων Nuclear Factor-κB (NF-κB). Οι μεταγραφικοί παράγοντες αυτοί εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα δεσμευμένοι από τον αναστολέα τους I-κappa-B. Η φωσφορυλίωση του αναστολέα, παρουσία κάποιου ερεθίσματος, απελευθερώνει τον παράγοντα NFkB ο οποίος εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζοντας τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του. Η κυκλοσπορίνη όπως έχει βρεθεί σε προηγούμενες μελέτες, επηρεάζει τη δράση και των μεταγραφικών παραγόντων NFkB, εκτός του NF-AT (μονοπάτι καλσινευρίνης - NF-AT) (Mattila et al., 1990). Τέλος, πιο πρόσφατη μελέτη, αποδεικνύει ότι η κυκλοσπορίνη προκαλεί αύξηση της έκφρασης των υπομονάδων του NFkB (NFkB1 και NFkB2) και ακολούθως αύξηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων του NFkB όπως κυτοκίνες, παράγοντες ανάπτυξης, πρωτεΐνες της οικογένειας TNFR και άλλων

μεταγραφικών παραγόντων, στα σωληναριακά νεφρικά κύτταρα που μελετήθηκαν. Διαμέσου του μονοπατιού αυτού στο οποίο συμμετέχει ο μεταγραφικός παράγοντας NFκΒ1, η κυκλοσπορίνη στα σωληναριακά κύτταρα των νεφρών, προκαλεί την έναρξη προφλεγμονωδών διεργασιών που τελικά οδηγούν σε νεφροτοξικότητα. (González-Guerrero et al., 2013).

Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής, μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω μελέτη σε μεγαλύτερο πληθυσμό, για τους πολυμορφισμούς που βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση, καθώς το δείγμα της μελέτης μας είναι μέτριου μεγέθους και περιέχει πληθυσμό μόνο από δυο πόλεις της Ελλάδας. Συνεπώς, μια πολυκεντρική μελέτη για τους πολυμορφισμούς που συσχέτιστηκαν με την εμφάνιση τοξικότητας, σε μεγαλύτερο πληθυσμό, θα μπορούσε να επεκτείνει τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής. Απώτερος σκοπός είναι η δημιουργία ενός απλότυπου πρόβλεψης της πιθανότητας εμφάνισης τοξικότητας στην κυκλοσπορίνη και η αποφυγή χορήγησης της σε ασθενείς με τους συγκεκριμένους βιοδείκτες. Η εξέλιξη αυτή θα είναι καθοριστικής σημασίας τόσο από ιατρικής όσο και από οικονομικής πλευράς, για την άμεση επιλογή της ιδανικής για κάθε ασθενή φαρμακευτικής αγωγής και τη μείωση του κόστους της θεραπείας.

Βιβλιογραφία

- Alwan, W., & Nestle, F. O. (2015). Pathogenesis and treatment of psoriasis: Exploiting pathophysiological pathways for precision medicine. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 33(17), 2–6.
- Aurangabadkar, S. (2013). Comorbidities in psoriasis. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 79(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.4103/0378-6323.115506>
- Banfi, G., Salvagno, G. L., & Lippi, G. (2007). The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 45(5), 565–576. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.110>
- Basavaraj, K. H., Ashok, N. M., Rashmi, R., & Praveen, T. K. (2010). The role of drugs in the induction and/or exacerbation of psoriasis. *International Journal of Dermatology*, 49(12), 1351–1361. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04570.x>
- Boehncke, W. H. (2015). Etiology and Pathogenesis of Psoriasis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 41(4), 665–675. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2015.07.013>
- Capon, F., & Barker, J. N. W. N. (2012). The quest for psoriasis susceptibility genes in the postgenome-wide association studies era: Charting the road ahead. *British Journal of Dermatology*, 166(6), 1173–1175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.10895.x>
- Di Meglio, P., Perera, G. K., & Nestle, F. O. (2011). The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function. *Immunity*, 35(6), 857–869. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.003>
- Dimitrakopoulos, G. N., Klapa, M. I., & Moschonas, N. K. (2021). PICKLE 3.0: enriching the human meta-database with the mouse protein interactome extended via mouse–human orthology. *Bioinformatics*, 37(1), 145–146. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa1070>
- Elder, J. T. (2009). Genome-wide association scan yields new insights into the immunopathogenesis of psoriasis. *Genes and Immunity*, 10(3), 201–209. <https://doi.org/10.1038/gene.2009.11>
- Fernández-Torres, R. M., Páradelá, S., & Fonseca, E. (2012). Psoriasis in patients older than 65 years. A comparative study with younger adult psoriatic patients. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 16(6), 586–591. <https://doi.org/10.1007/s12603-012-0009-0>
- Gioutlakis, A., Klapa, M. I., & Moschonas, N. K. (2017). PICKLE 2.0: A human protein-protein interaction meta-database employing data integration via genetic information ontology. *PLoS ONE*, 12(10), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186039>
- González-Guerrero, C., Ocaña-Salceda, C., Berzal, S., Carrasco, S., Fernández-Fernández, B., Cannata-Ortiz, P., Egido, J., Ortiz, A., & Ramos, A. M. (2013). Calcineurin inhibitors recruit protein kinases JAK2 and JNK, TLR signaling and the UPR to activate NF-κB-mediated inflammatory responses in kidney tubular cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272(3), 825–841.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.08.011>

- Griffiths, C. E., Clark, C. M., Chalmers, R. J., Li Wan Po, A., & Williams, H. C. (2000). A systematic review of treatments for severe psoriasis. *Health Technology Assessment (Winchester, England)*, 4(40), 1–125. <https://doi.org/10.3310/hta4400>
- Griffiths, C. E. M., Christophers, E., Barker, J. N. W. N., Chalmers, R. J. G., Chimenti, S., Krueger, G. G., Leonardi, C., Menter, A., Ortonne, J.-P., & Fry, L. (2007). A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. *British Journal of Dermatology*, 156(2), 258–262. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2133.2006.07675.x>
- Griffiths, C. E. M., Dubertret, L., Ellis, C. N., Finlay, A. Y., Finzi, A. F., Ho, V. C., Johnston, A., Katsambas, A., Lison, A. E., Naeyaert, J. M., Nakagawa, H., Paul, C., & Vanaclocha, F. (2004). Ciclosporin in psoriasis clinical practice: An international consensus statement. *British Journal of Dermatology, Supplement*, 150(67), 11–23. <https://doi.org/10.1111/j.0366-077x.2004.05949.x>
- Harden, J. L., Krueger, J. G., & Bowcock, A. M. (2015). The immunogenetics of Psoriasis: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*, 64, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.07.008>
- Ho, V. C. (2004). The use of ciclosporin in psoriasis: a clinical review. *The British Journal of Dermatology*, 150 Suppl, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.0366-077X.2004.05950.x>
- Kawauchi, S., Nakamura, T., Miki, I., Inoue, J., Hamaguchi, T., Tanahashi, T., & Mizuno, S. (2014). Downregulation of CYP3A and P-glycoprotein in the secondary inflammatory response of mice with dextran sulfate sodium-induced colitis and its contribution to cyclosporine a blood concentrations. *Journal of Pharmacological Sciences*, 124(2), 180–191. <https://doi.org/10.1254/jphs.13141FP>
- Kim, W. B., Jerome, D., & Yeung, J. (2017). Diagnosis and management of psoriasis. *Canadian Family Physician*, 63(4), 278–285. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5389757/>
- Kimball, A. B., Gladman, D., Gelfand, J. M., Gordon, K., Horn, E. J., Korman, N. J., Korver, G., Krueger, G. G., Strober, B. E., & Lebwohl, M. G. (2008). National Psoriasis Foundation clinical consensus on psoriasis comorbidities and recommendations for screening. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58(6), 1031–1042. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2008.01.006>
- Klapa, M. I., Tsafo, K., Theodoridis, E., Tsakalidis, A., & Moschonas, N. K. (2013). Reconstruction of the experimentally supported human protein interactome: What can we learn? *BMC Systems Biology*, 7. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-96>
- Langley, R. G. B., Krueger, G. G., & Griffiths, C. E. M. (2005). Psoriasis: Epidemiology, clinical features, and quality of life. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(SUPPL. 2), 18–23. <https://doi.org/10.1136/ard.2004.033217>

- Lebwohl, M., Ting, P. T., & Koo, J. Y. M. (2005). *Psoriasis treatment : traditional therapy*. 83–86.
<https://doi.org/10.1136/ard.2004.030791>
- Lee, M., & Kalb, R. E. (2008). Systemic therapy for psoriasis. *Dermatology Nursing*, 20(2), 105–111; quiz 112.
- Mallbris, L., Larsson, P., Bergqvist, S., Vingård, E., Granath, F., & Ståhle, M. (2005). Psoriasis phenotype at disease onset: Clinical characterization of 400 adult cases. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(3), 499–504. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23611.x>
- Matsuda, S, Moriguchi, T., Koyasu, S., & Nishida, E. (1998). T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin A. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(20), 12378–12382. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.20.12378>
- Matsuda, Satoshi, & Koyasu, S. (2000). *Mechanisms of action of cyclosporine*. 119–125.
- Mattila, P. S., Ullman, K. S., Fiering, S., Emmel, E. A., McCutcheon, M., Crabtree, B. R., & Herzenberg, L. A. (1990). The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *EMBO Journal*, 9(13), 4425–4433. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07893.x>
- Menter, A., Gottlieb, A., Feldman, S. R., Van Voorhees, A. S., Leonardi, C. L., Gordon, K. B., Lebwohl, M., Koo, J. Y. M., Elmets, C. A., Korman, N. J., Beutner, K. R., & Bhushan, R. (2008). Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58(5), 826–850.
- Moes, D. J. A. R., Swen, J. J., Den Hartigh, J., Van Der Straaten, T., Homan Van Der Heide, J. J., Sanders, J. S., Bemelman, F. J., De Fijter, J. W., & Guchelaar, H. J. (2014). Effect of CYP3A4*22, CYP3A5*3, and CYP3A combined genotypes on cyclosporine, everolimus, and tacrolimus pharmacokinetics in renal transplantation. *CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology*, 3(2). <https://doi.org/10.1038/psp.2013.78>
- Naganuma, M., Fujii, T., & Watanabe, M. (2011). The use of traditional and newer calcineurin inhibitors in inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology*, 46(2), 129–137. <https://doi.org/10.1007/s00535-010-0352-z>
- Nair, R. P., Stuart, P. E., Nistor, I., Hiremagalore, R., Chia, N. V. C., Jenisch, S., Weichenthal, M., Abecasis, G. R., Lim, H. W., Christophers, E., Voorhees, J. J., & Elder, J. T. (2006). Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *American Journal of Human Genetics*, 78(5), 827–851. <https://doi.org/10.1086/503821>
- Onumah, N., & Kircik, L. H. (2012). Psoriasis and its comorbidities. *Journal of Drugs in Dermatology* :

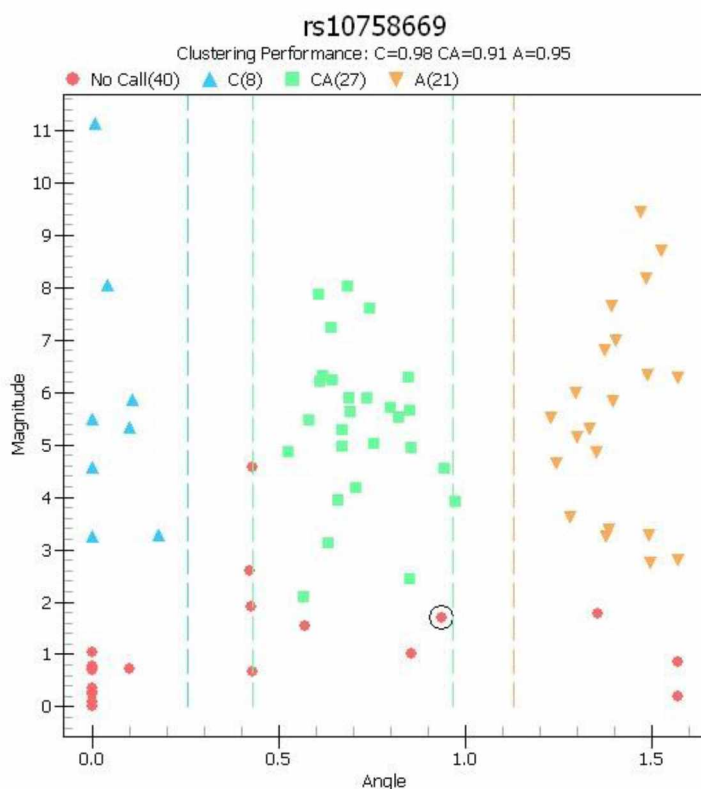
JDD, 11(5 Suppl), s5-10.

- Ovejero-Benito, M. C., Muñoz-Aceituno, E., Reolid, A., Saiz-Rodríguez, M., Abad-Santos, F., & Daudén, E. (2018). Pharmacogenetics and Pharmacogenomics in Moderate-to-Severe Psoriasis. *American Journal of Clinical Dermatology*, 19(2), 209–222. <https://doi.org/10.1007/s40257-017-0322-9>
- Parisi, R., Symmons, D. P. M., Griffiths, C. E. M., & Ashcroft, D. M. (2013). Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(2), 377–385. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.339>
- Prodanovic, E. M., & Korman, N. J. (2008). Traditional systemic therapy I: methotrexate and cyclosporine. *Treatment of Psoriasis*, 103–120. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-7724-3_7
- Puig, L., Bordas, X., Carrascosa, J. M., Daudén, E., Ferrándiz, C., Hernanz, J. M., López-Estebarez, J. L., Moreno, J. C., Sánchez-Carazo, J. L., Vanaclocha, F., & Vázquez-Veiga, H. (2009). [Consensus document on the evaluation and treatment of moderate-to-severe psoriasis. Spanish psoriasis group of the Spanish Academy of Dermatology and Venereology]. *Actas dermo-sifiliográficas*, 100(4), 277–286.
- Roberson, E. D. O., & Bowcock, A. M. (2010). Psoriasis genetics: Breaking the barrier. *Trends in Genetics*, 26(9), 415–423. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.06.006>
- Rusnak, F., & Mertz, P. (2000). *Calcineurin : Form and Function*. 80(4), 1483–1521.
- Sabat, R., Philipp, S., Höflich, C., Kreutzer, S., Wallace, E., Asadullah, K., Volk, H. D., Sterry, W., & Wolk, K. (2007). Immunopathogenesis of psoriasis. *Experimental Dermatology*, 16(10), 779–798. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00629.x>
- Sagi, L., & Trau, H. (2011). The Koebner phenomenon. *Clinics in Dermatology*, 29(2), 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2010.09.014>
- Schön, M. P., & Boehncke, W.-H. (2005). Psoriasis, Medical progress. *The New England Journal of Medicine*, 1899–1912.
- Sigurdardottir, S. L., Thorleifsdottir, R. H., Valdimarsson, H., & Johnston, A. (2013). The role of the palatine tonsils in the pathogenesis and treatment of psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 168(2), 237–242. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.11215.x>
- Sivamani, R. K., Correa, G., Ono, Y., Bowen, M. P., Raychaudhuri, S. P., & Maverakis, E. (2010). Biological therapy of psoriasis. *Indian Journal of Dermatology*, 55(2), 161–170. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.62754>
- Valenzuela, F., Valenzuela, Y., & Zemelman, V. (2012). Epidemiological survey of psoriasis in the Chilean Mapuche population. In *International journal of dermatology* (Vol. 51, Issue 8, pp. 1005–1006). <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04682.x>

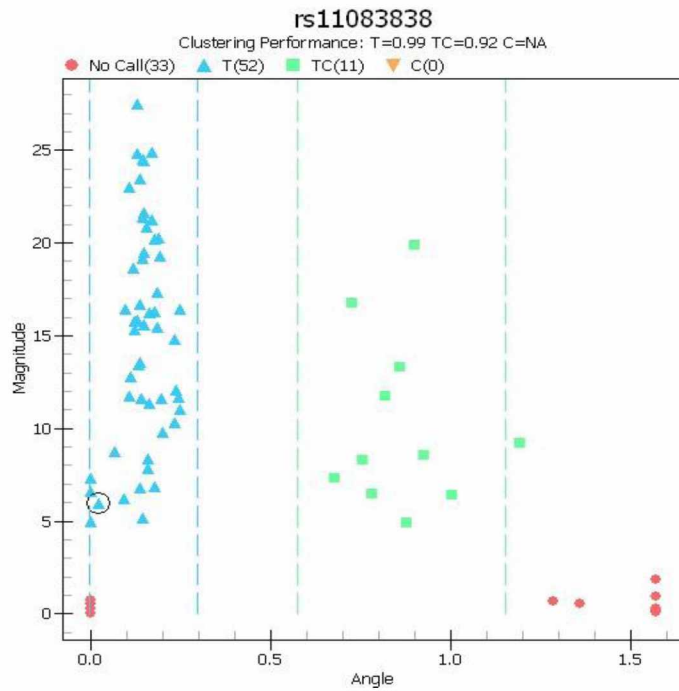
- Vasilopoulos, Y., Sarri, C., Zafiriou, E., Patsatsi, A., Stamatis, C., Ntoumou, E., Fassos, I., Tsalta, A., Karra, A., Roussaki-Schulze, A., Sotiriadis, D., Mamuris, Z., & Sarafidou, T. (2014). A pharmacogenetic study of ABCB1 polymorphisms and cyclosporine treatment response in patients with psoriasis in the Greek population. *Pharmacogenomics Journal*, *14*(6), 523–525.
<https://doi.org/10.1038/tpj.2014.23>
- Veal, C. D., Capon, F., Allen, M. H., Heath, E. K., Evans, J. C., Jones, A., Patel, S., Burden, D., Tillman, D., Barker, J. N. W. N., & Trembath, R. C. (2002). Family-based analysis using a dense single-nucleotide polymorphism-based map defines genetic variation at PSORS1, the major psoriasis-susceptibility locus. *American Journal of Human Genetics*, *71*(3), 554–564.
<https://doi.org/10.1086/342289>
- Winterfield, L. S., Menter, A., Gordon, K., & Gottlieb, A. (2005). Psoriasis treatment: Current and emerging directed therapies. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *64*(SUPPL. 2), 87–91.
<https://doi.org/10.1136/ard.2004.032276>
- Zangeneh, F.Z. Shooshtary, F. S. (2013). Psoriasis — Types, Causes and Medication. In *IntechOpen* (Issue Psoriasis — Types, Causes and Medication).
- Βιζιριανάκης, Ι. (1990). *Φαρμακογονιδιωματική και εξατομίκευση της φαρμακευτικής αγωγής*. *450*, 99–111.
- Καλογεροπούλου Ε., Solbach, W., & Knobloch, J. (2008). Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF. *ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ*, *5*, 258–267.
- Καραμπίδου Κ., Μπαλαμώτη Ε., & Αντωνίου Χ. (2010). Ψωρίαση: Βασικές έννοιες. *Ελλ. Επιθ. Δερμ. Αφρ.* *21:4*, 221–234.
- Κοσμαδάκη, Μ., Αντωνίου, Χ., Αυγερινού, Γ., Στρατηγός, Α. Ι., Σταυρόπουλος, Π., Ποτουρίδου, Ε., Πολυδώρου, Α., Στεφανάκη, Ε., & Κατσαμπάς, Α. (2007). Ψωρίαση: Θεραπευτικός οδηγός. In *Ελλ. Επιθ. Δερμ. Αφρ.* *18:2* (pp. 161–173).
- Νικολάου, Χ., & Χουβαρδάς, Π. (2015). Ανάλυση Της Γενετικής Ποικιλομορφίας. In *Εκδοσεις Κάλιππος*.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

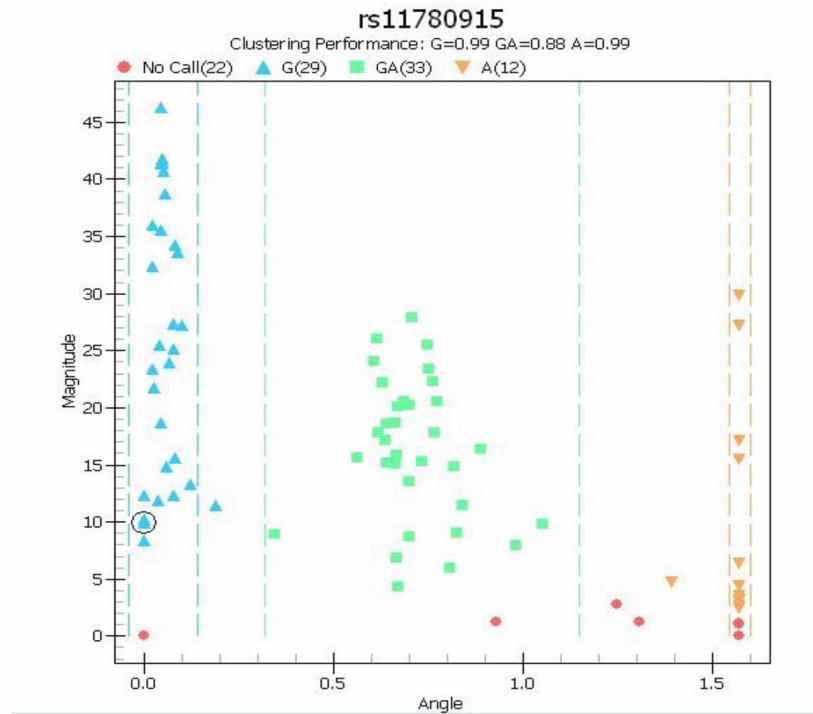
Στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α παρατίθενται οι εικόνες των γραφημάτων που εξήγαγε το λογισμικό SpectroACQUIRE, μετά την ανάλυση των δειγμάτων από τον αναλυτή MassARRAY® Analyzer 4. Κάθε γράφημα αφορά και έναν από τους πολυμορφισμούς που αναλύθηκαν, η ταυτότητα του οποίου αναγράφεται στο πάνω μέρος της κάθε εικόνας. Σε όλα τα γράφηματα τα δείγματα που εμφανίζουν ομοζυγωτία για το κοινό αλληλόμορφο, σημαίνονται με μπλε τρίγωνο σχήμα, τα ετερόζυγα δείγματα με πράσινο τετράγωνο σχήμα και τα ομόζυγα για το σπάνιο αλληλόμορφο με κίτρινο ανεστραμμένο τρίγωνο. Με κόκκινο κύκλο σημαίνονται τα δείγματα τα οποία δεν πληρούν τις προϋποθέσεις που έχουμε θέσει ώστε να καταταγούν αυτόματα από το SpectroACQUIRE σε μια από τις τρεις παραπάνω κατηγορίες.



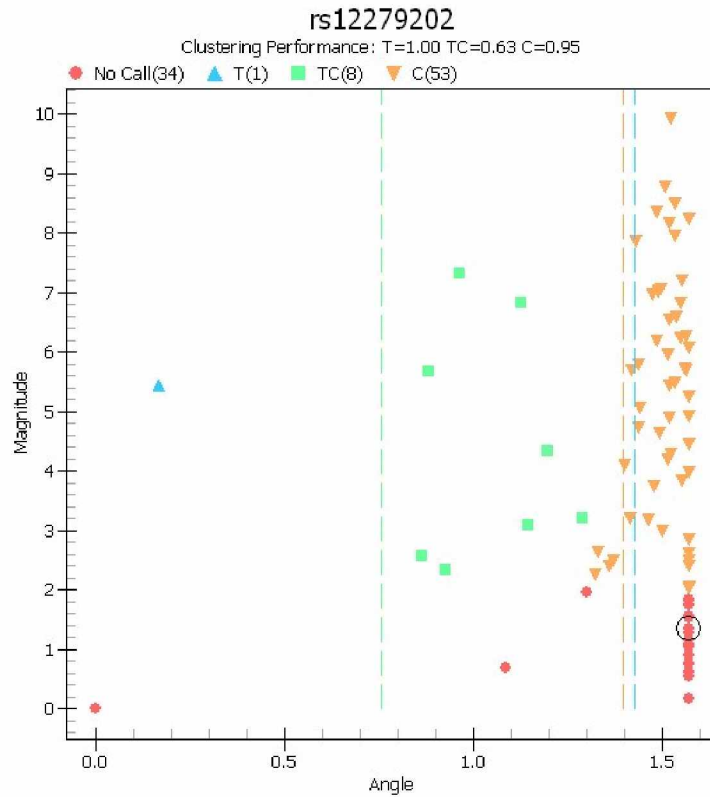
Εικόνα 9 Γονοτύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs10758669



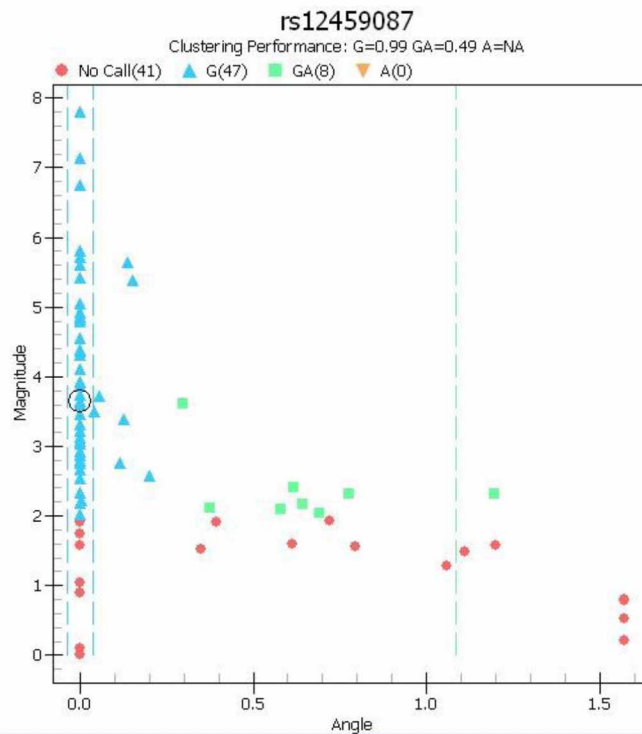
Εικόνα 10 Γονοτύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs11083838



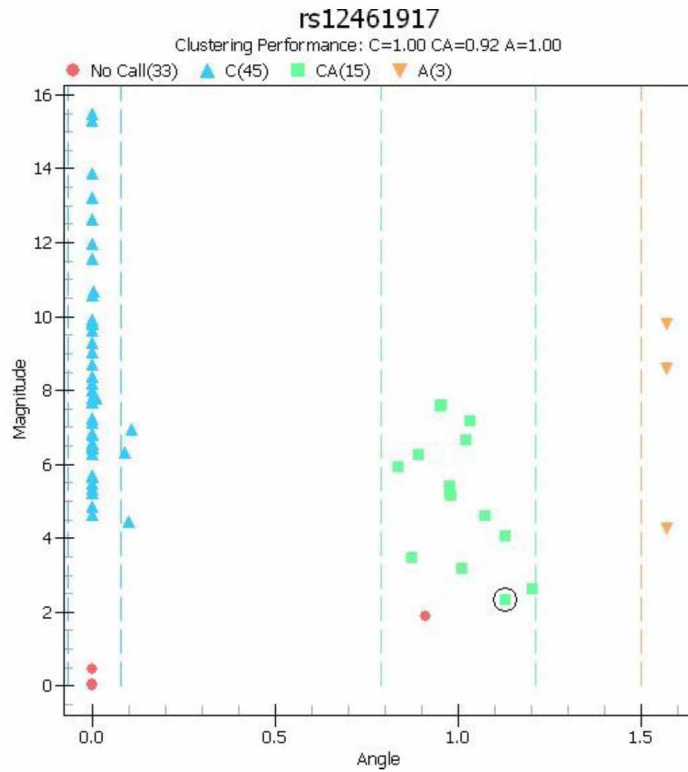
Εικόνα 11 Γονοτύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs11780915



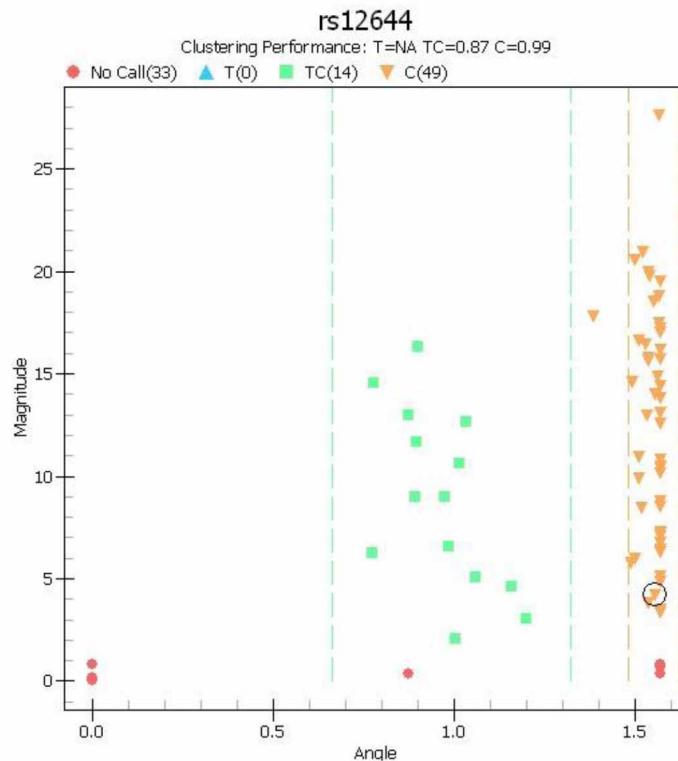
Εικόνα 12 Γονοτύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs12279202



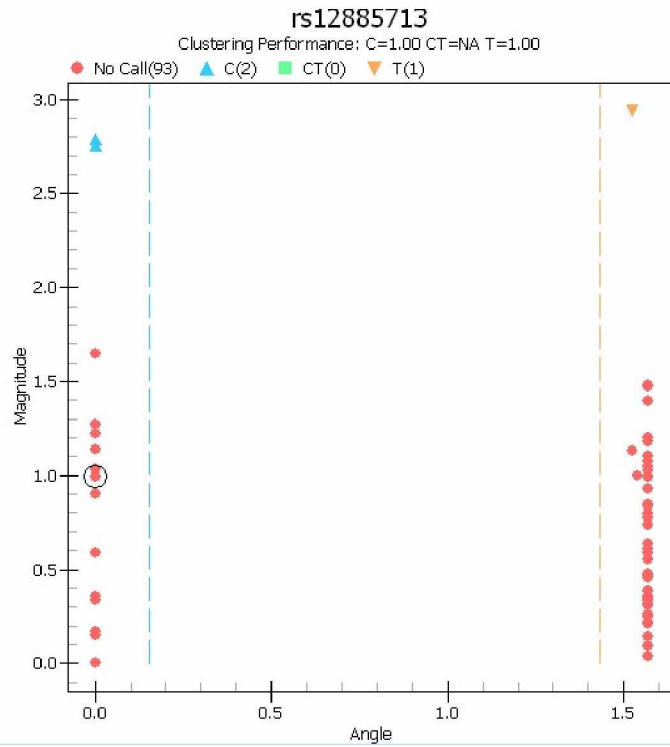
Εικόνα 13 Γονοτύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs12459087



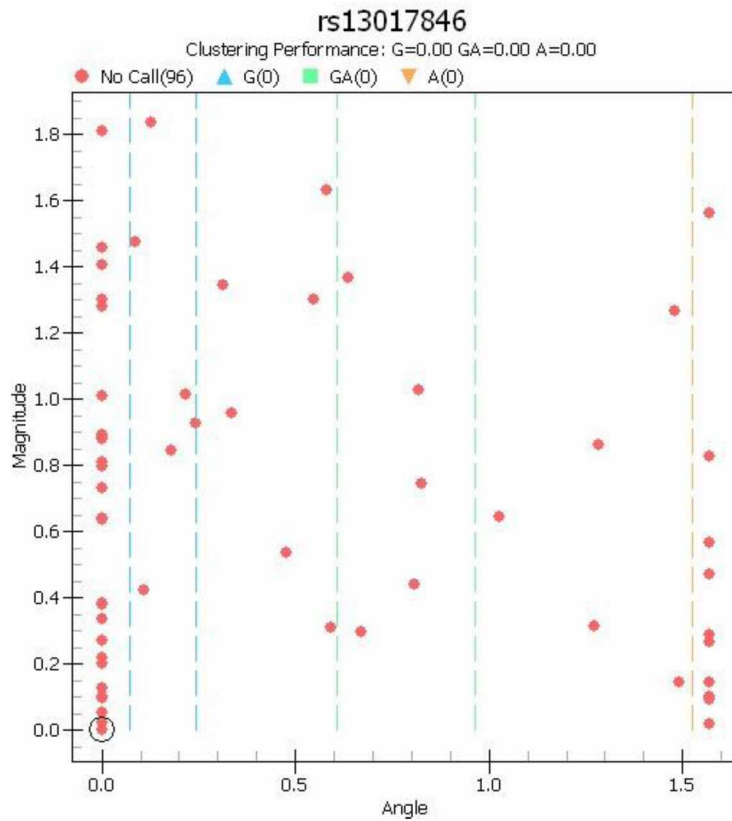
Εικόνα 14 Γονιότητα δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs1246191



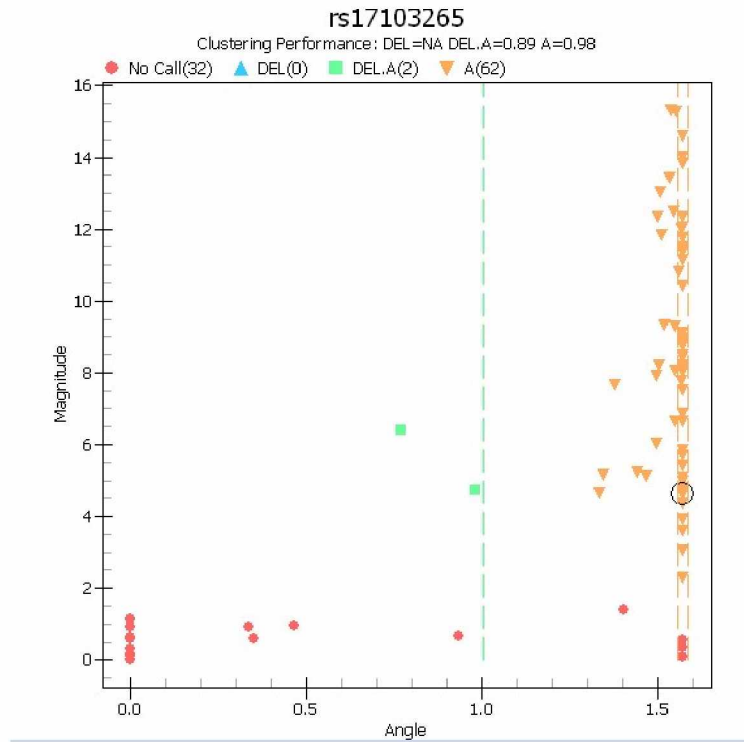
Εικόνα 15 Γονιότητα δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs12644



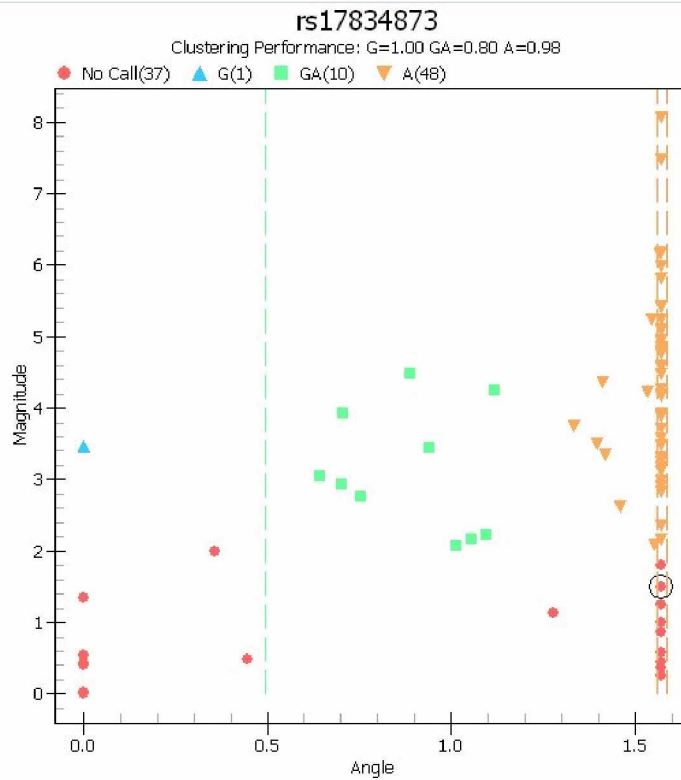
Εικόνα 16 Γοντύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό **rs12885713**



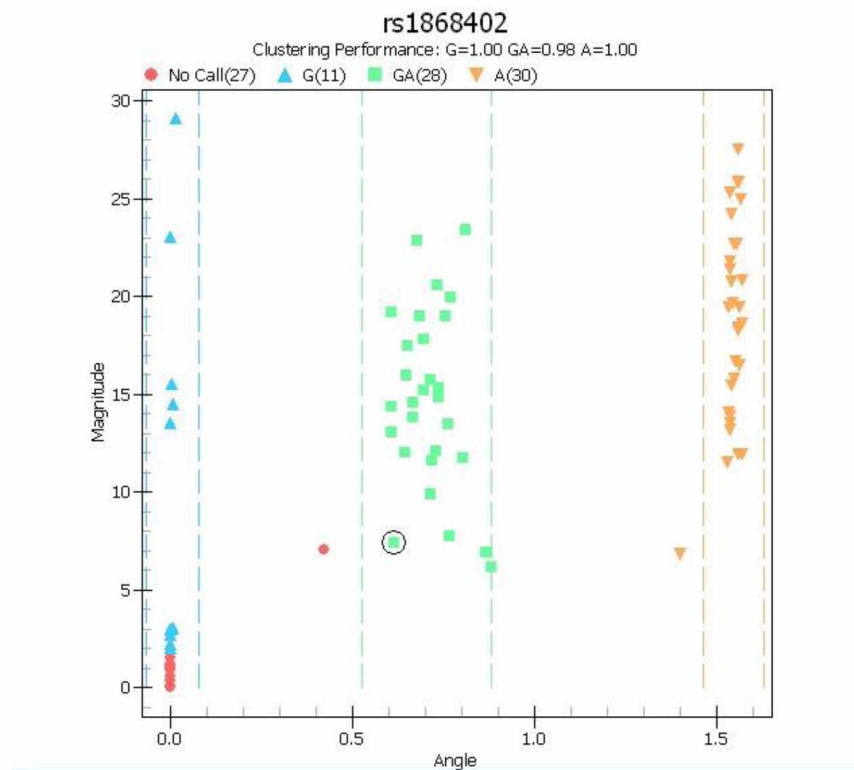
Εικόνα 17 Γοντύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό **rs13017846**



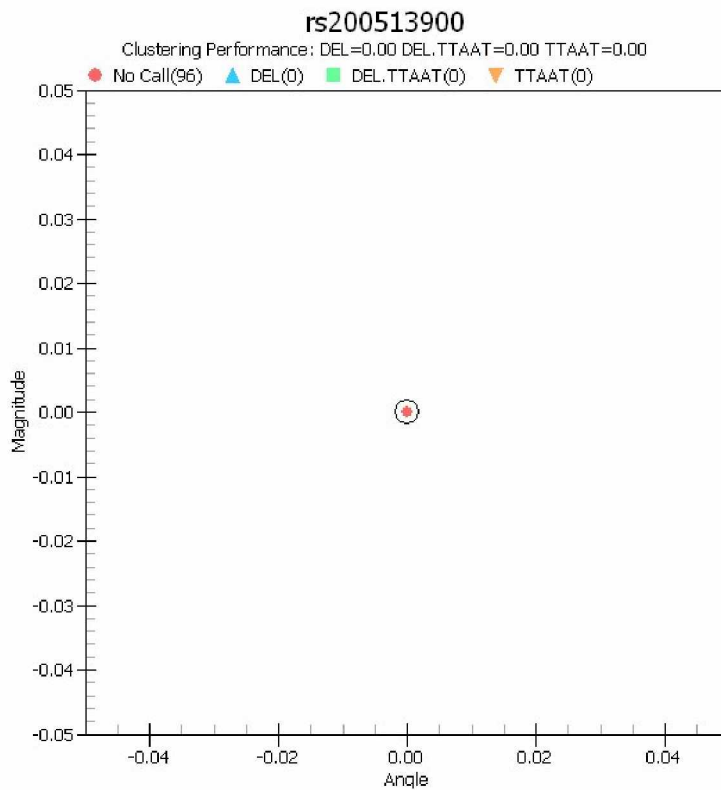
Εικόνα 18 Γονιότητα δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs17103265



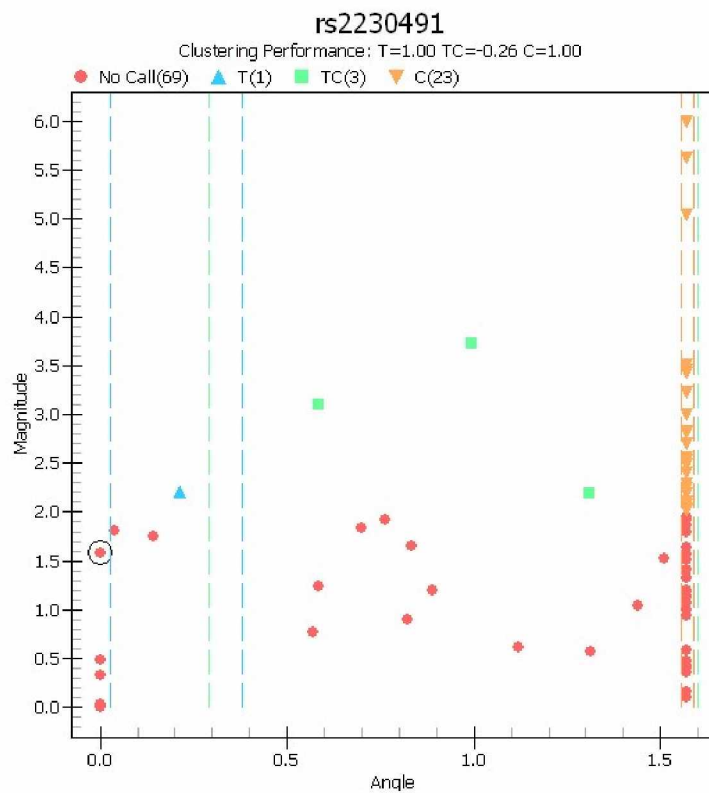
Εικόνα 19 Γονιότητα δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs17834873



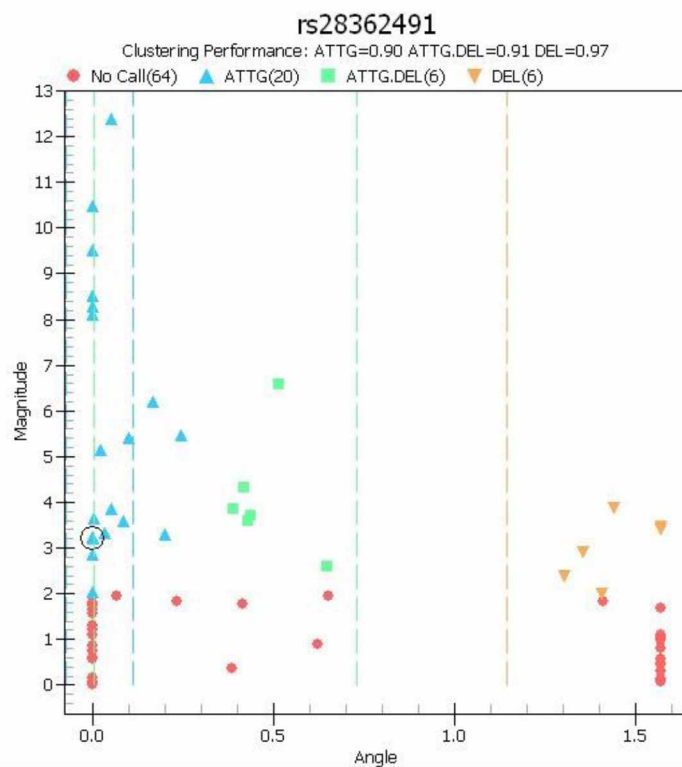
Εικόνα 20 Γοντύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs1868402



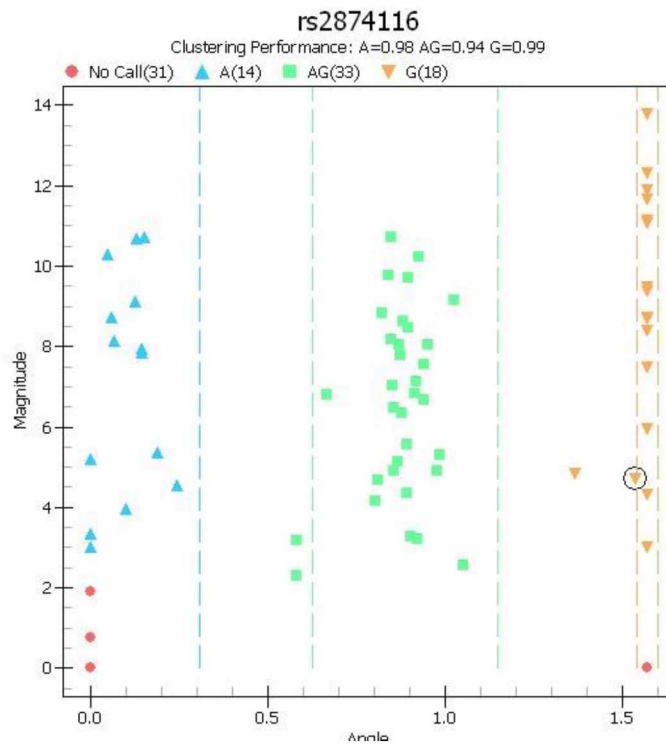
Εικόνα 21 Γοντύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs20051513900



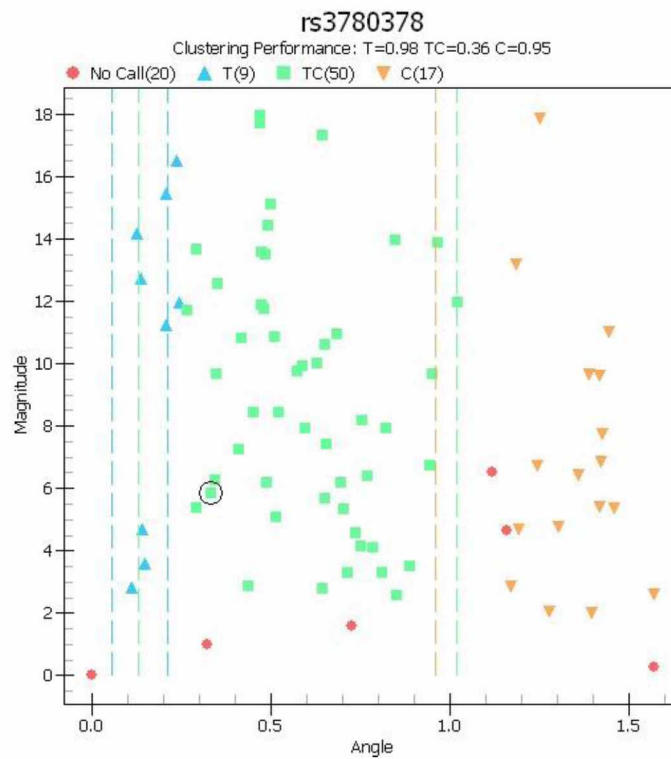
Εικόνα 22 Γονοτύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs2230491



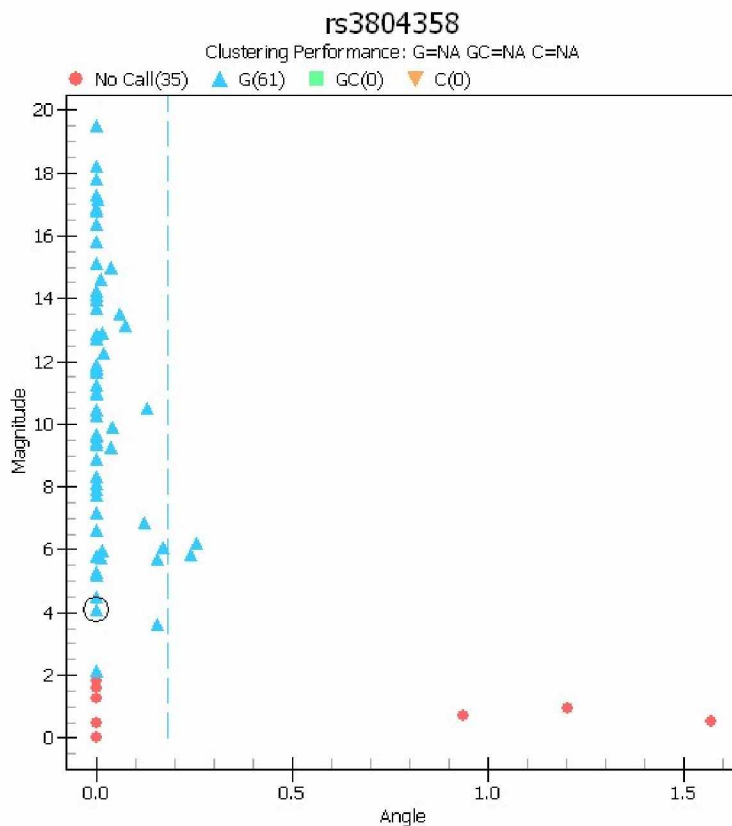
Εικόνα 23 Γονοτύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs28362491



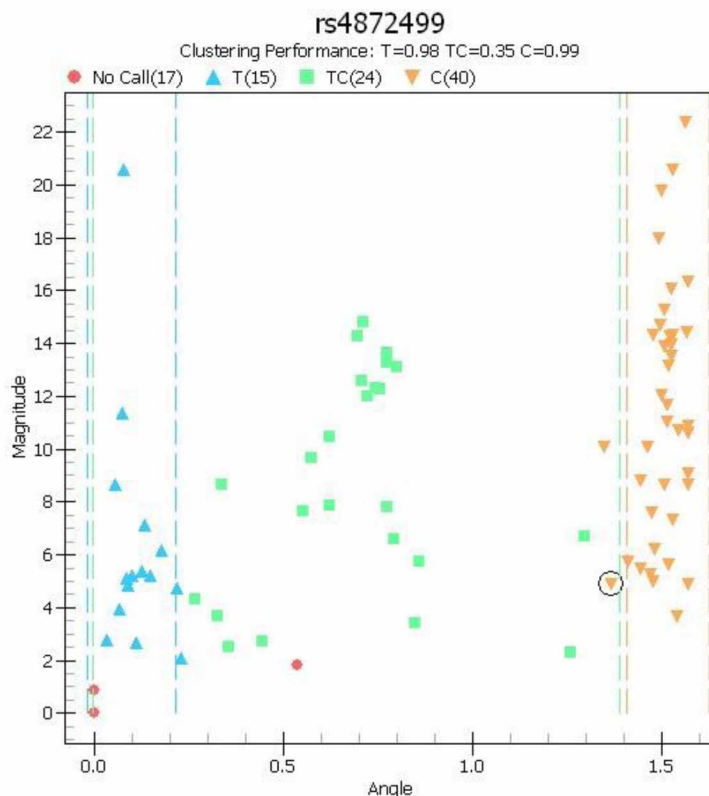
Εικόνα 24 Γονιότητα δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs2874116



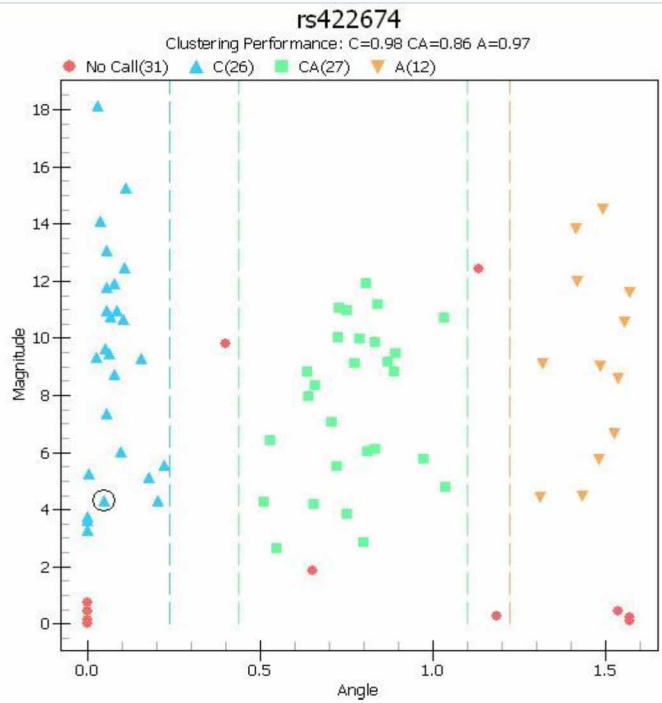
Εικόνα 25 Γονιότητα δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs3780378



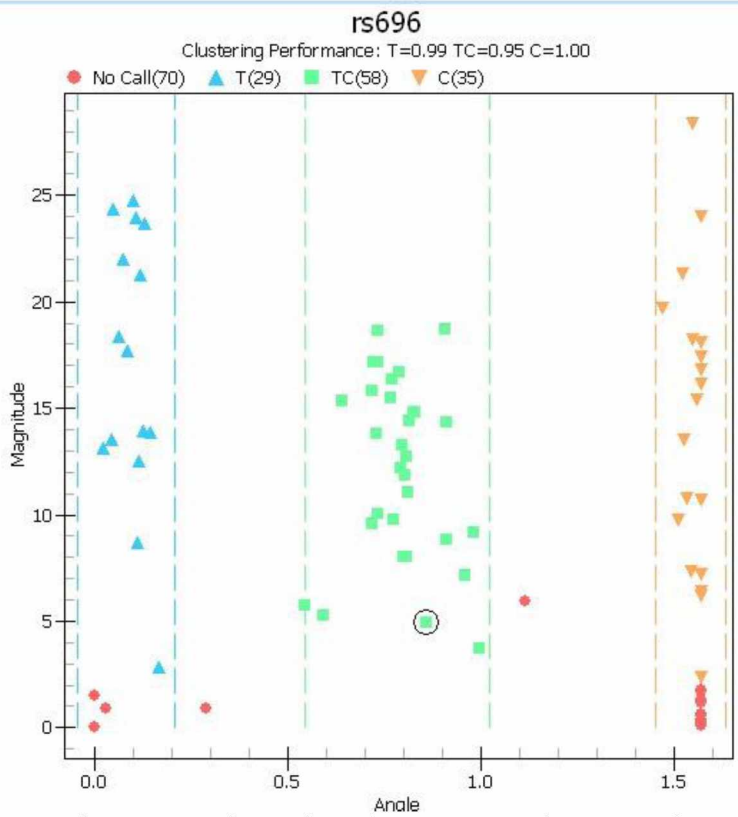
Εικόνα 26 Γονοτύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs3804358



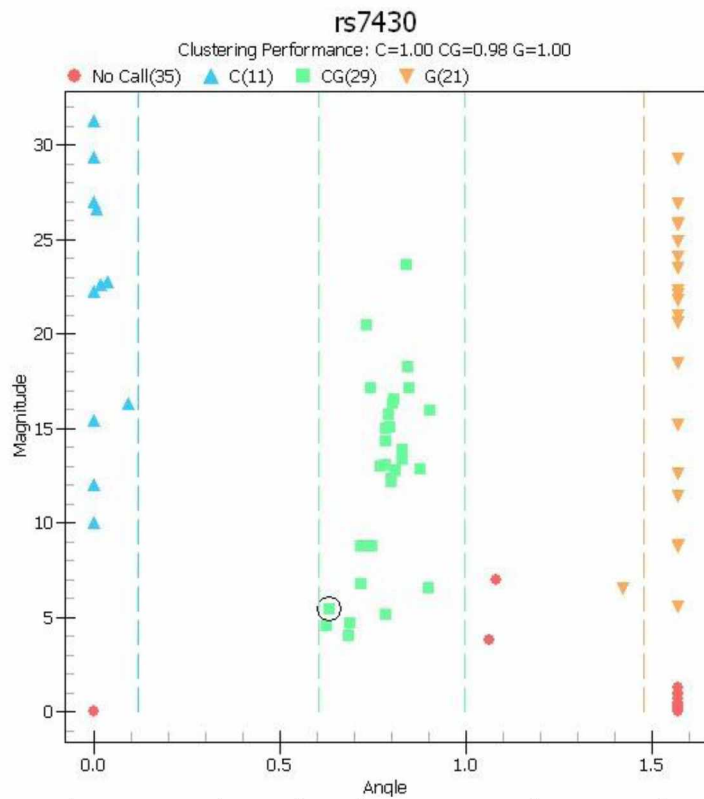
Εικόνα 27 Γονοτύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs4872499



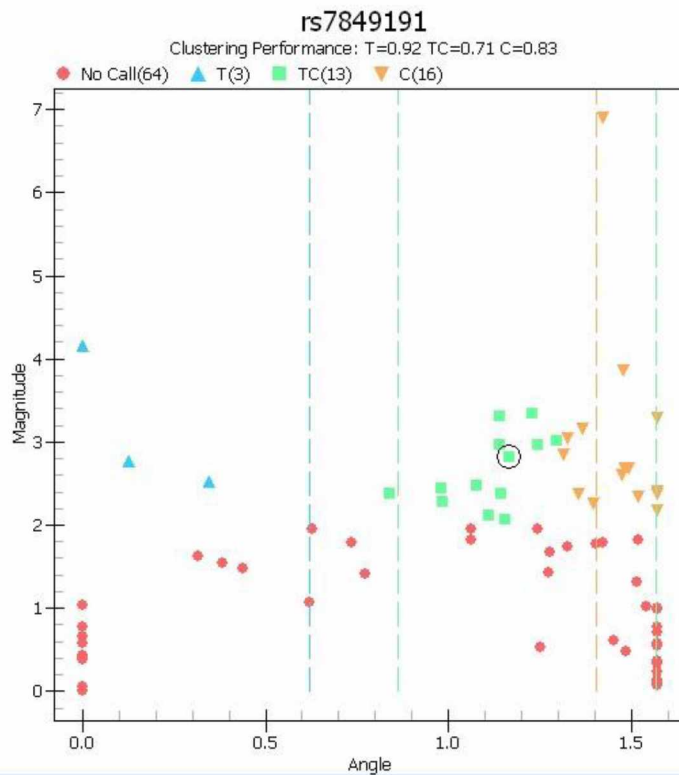
Εικόνα 28 Γονοτύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs422674



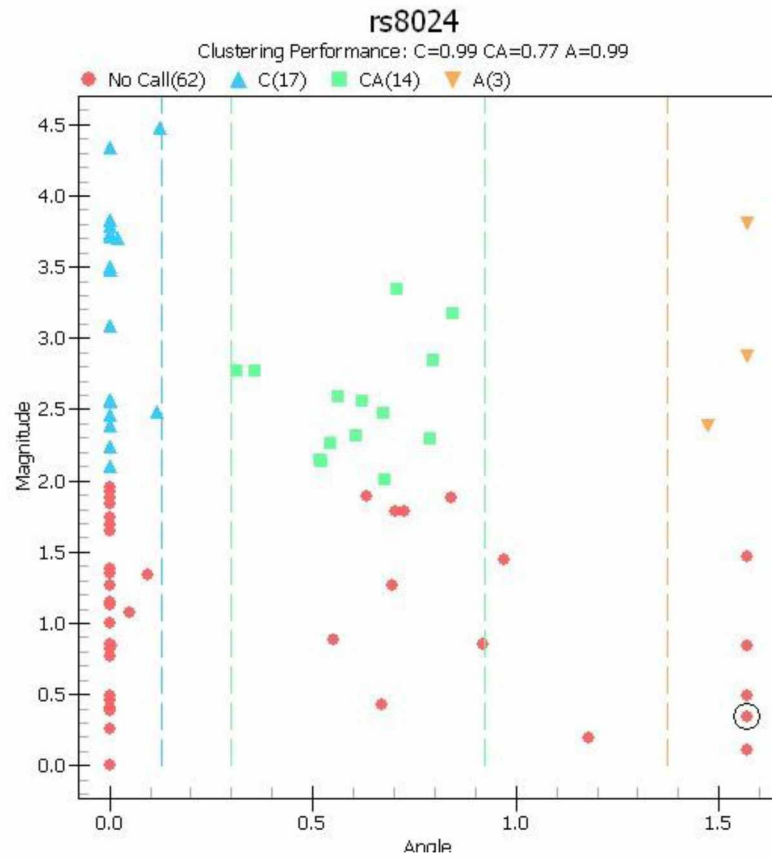
Εικόνα 29 Γονοτύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs696



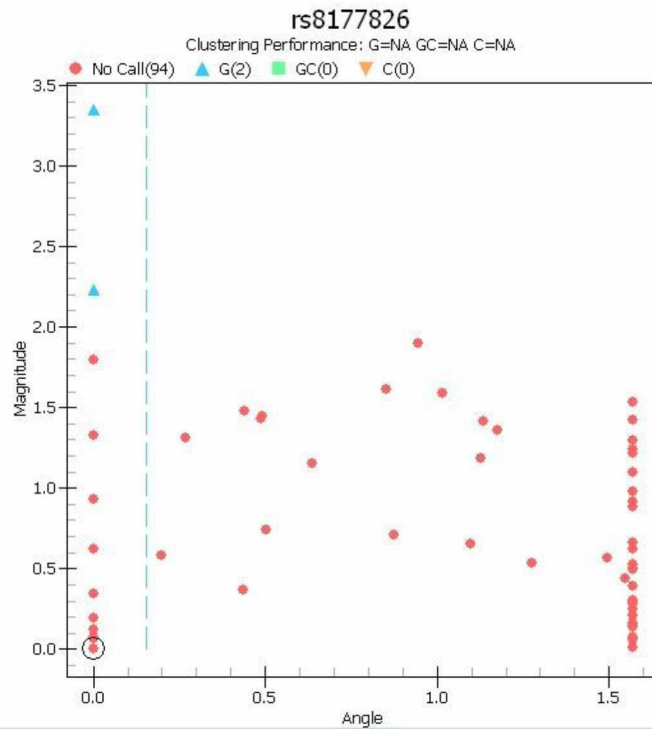
Εικόνα 30 Γονοτύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs7430



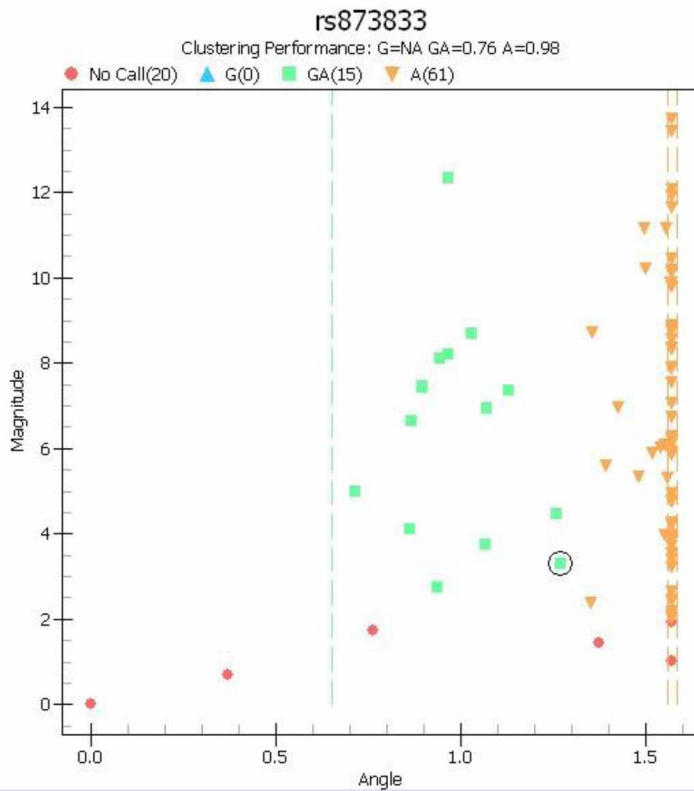
Εικόνα 31 Γονοτύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs7849191



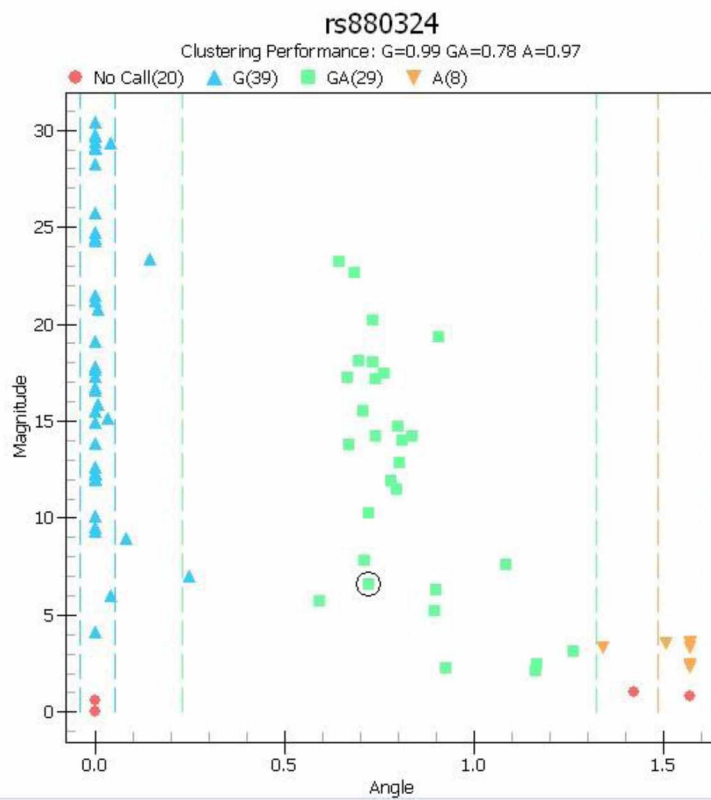
Εικόνα 32 Γονοτύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs8024



Εικόνα 33 Γονοτύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs8177826



Εικόνα 34 Γονοτύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs873833



Εικόνα 35 Γονοτύπηση δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs880324

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

Στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β παρουσιάζονται οι πίνακες που προέκυψαν από τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων των γονοτύπων του κάθε ασθενή για τον κάθε πολυμορφισμό από τον Πίνακα 17, σχετιζόμενα με την εμφάνιση ή μη τοξικότητας στην κυκλοσπορίνη (βλ. Πίνακα 16).

Πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση των ασθενών σε ομόζυγους ως προς το κοινό αλληλόμορφο, ομόζυγους ως προς το σπάνιο αλληλόμορφο και ετερόζυγους και για κάθε πολυμορφισμό έγινε η υπόθεση ότι το κοινό αλληλόμορφο είναι επικρατές έναντι του σπάνιου αλληλόμορφου και το αντίστροφο. Η συσχέτιση των αλληλόμορφων με την εμφάνιση τοξικότητας έγινε με το τεστ Cochran-Armitage και χρησιμοποιήθηκε ο υπολογισμός των odds ratio ώστε να εντοπιστεί η συσχέτιση της εμφάνισης κάθε αλληλόμορφου με την πιθανότητα εμφάνισης ή μη τοξικότητας (για 2x2 πίνακες συνάφειας). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $P < 0,05$. Επισημαίνεται με έντονη γραφή η τιμή P σε όσους πολυμορφισμούς εμφανίζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση εμφάνισης κάποιου αλληλόμορφου, σε σχέση με την εμφάνιση τοξικότητας στην κυκλοσπορίνη.

Η επεξεργασία των δεδομένων της πειραματικής ανάλυσης έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS.

Πίνακας 18: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs10758669.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>JAK2</i> rs10758669 C/A	Genotypic [CC/CA/AA]	3/7/0	13/27/24	0,061
	Cochran – Armitage [C/A]	13/7 (0.65)	53/75 (0.41)	0,056
	Επικρατές [(CC+CA)/AA]	10/0	40/24	0,084
	Υπολειπόμενο [CC/(CA+AA)]	3/7	13/51	0,442

Πίνακας 19: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs11083838.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>PPP5D1</i> rs11083838 C/T	Genotypic [CC/CT/TT]	0/0/10	7/11/43	0,139
	Cochran – Armitage [C/T]	0/20 (0,00)	25/97 (0,20)	0,102
	Επικρατές [(CC+CT)/TT]	0/10	18/43	0,137
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TGT)]	0/10	7/54	0,479

Πίνακας 20: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs11780915.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>PPP3CC</i> rs11780915 G/A	Genotypic [GG/GA/AA]	3/7/0	26/26/18	0,083
	Cochran – Armitage [G/A]	13/7 (0,65)	78/62 (0,55)	0,434
	Επικρατές [(GG+GA)/AA]	10/0	52/18	0,174
	Υπολειπόμενο [GG/(GA+AA)]	3/7	26/44	0,661

Πίνακας 21: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs12279202.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>IPO7</i> rs12279202 C/T	Genotypic [CC/CT/TT]	10/0/0	59/8/1	0,212
	Cochran – Armitage [C/T]	20/0 (1)	126/20 (0.86)	0,113
	Επικρατές [(CC+CT)/TT]	10/0	67/1	0,647
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	10/0	59/9	0,416

Πίνακας 22: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs12459087.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>SLC8A2</i> rs12459087 G/A	Genotypic [GG/GA/AA]	8/2/0	40/16/4	0,595
	Cochran – Armitage [G/A]	18/2 (0.90)	96/24 (0.80)	0,298
	Επικρατές [(GG+GA)/AA]	10/0	56/4	0,736
	Υπολειπόμενο [GG/(GA+AA)]	8/2	40/20	0,407

Πίνακας 23: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs12461917.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>PTGIR</i> rs12461917 C/A	Genotypic [CC/CA/AA]	7/2/1	37/14/2	0,663
	Cochran – Armitage [C/A]	16/4 (0.80)	88/18 (0.83)	0,745
	Επικρατές [(CC+CA)/AA]	9/1	51/2	0,415
	Υπολειπόμενο [CC/(CA+AA)]	7/3	37/16	>0,99

Πίνακας 24: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs12644.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>PPP3CB</i> rs12644 C/T	Genotypic [CC/CT/TT]	9/1/0	42/14/2	0,480
	Cochran – Armitage [C/T]	19/1 (0.95)	98/18 (0.84)	0,237
	Επικρατές [(CC+CT)/TT]	10/0	56/2	0,963
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	9/1	42/16	0,260

Πίνακας 25: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs13017846.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>SLC8A1</i> rs13017846 A/G	Genotypic [AA/AG/GG]	3/2/2	8/10/24	0,287
	Cochran – Armitage [A/G]	8/6 (0.57)	26/58 (0.31)	0,064
	Επικρατές [(AA+AG)/GG]	5/2	18/24	0,178
	Υπολειπόμενο [GG/(AG+AA)]	3/4	8/34	0,177

Πίνακας 26: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs12885713.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>CALMI</i> rs12885713 C/T	Genotypic [CC/CT/TT]	0/0/8	17/0/37	0.35
	Cochran – Armitage [C/T]	0/16 (0,00)	34/74 (0,31)	0.129
	Επικρατές [(CC+CT)/TT]	0/8	17/37	0,163
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	0/8	17/37	0,163

Πίνακας 27: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs17103265.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>NFKB1A</i> rs17103265 A/DEL	Genotypic [AA/A.DEL/DEL.DEL]	10/0/0	55/2/4	0,584
	Cochran – Armitage [A /DEL]	20/0 (1)	112/10 (0.92)	0,360
	Επικρατές [(AA + A.DEL)/DEL.DEL]	10/0	57/4	0,745
	Υπολειπόμενο [AA/(A.DEL+DEL.DEL)]	10/0	55/6	0,550

Πίνακας 28: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs1868402.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>PPP3R1</i> rs1868402 G/A	Genotypic [GG/GA/AA]	0/3/7	13/25/23	0,105
	Cochran – Armitage [G/A]	3/17 (0.15)	51/71 (0.42)	0,032
	Επικρατές [(GG+GA)/AA]	3/7	38/23	0,068
	Υπολειπόμενο [GG/(GA+AA)]	0/10	13/48	0,233

Πίνακας 29: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs17834873.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>CARD11</i> rs17834873 A/G	Genotypic [AA/AG/GG]	9/1/0	48/9/5	0,576
	Cochran – Armitage [A/G]	19/1 (0.95)	105/19 (0.85)	0,242
	Επικρατές [(AA+AG)/GG]	10/0	57/5	0,645
	Υπολειπόμενο [GG/(AG+GG)]	9/1	48/14	0,379

Πίνακας 30: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs2230491.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>AKAP5</i> rs2230491 C/T	Genotypic [CC/CT/TT]	8/2/0	41/11/7	0,515
	Cochran – Armitage [C/T]	18/2 (0.90)	93/25 (0.79)	0,257
	Επικρατές [(CC+CT)/TT]	10/0	52/7	0,464
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	8/2	41/18	0,502

Πίνακας 31: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs200513900.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>PPP3R1</i> rs200513900 DEL/TTAAT	Genotypic [DEL.DEL./DEL.TTAA T/TTAATTTAAT]	5/2/1	24/19/13	0,567
	Cochran –Armitage [DEL./ TTAAT]	12/4 (0.75)	67/45 (0.60)	0,249
	Επικρατές [(DEL.DEL. + DEL.TTAAT)/ TTAATTTAAT]	7/1	43/13	0,501
	Υπολειπόμενο [(DEL.DEL.) / (DEL.TTAAT) + TTAATTTAAT]	5/3	24/32	0,305

Πίνακας 32: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs2874116.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>MALT1</i> rs2874116 G/A	Genotypic [GG/GA/AA]	3/6/1	16/27/14	0,579
	Cochran – Armitage [G/A]	12/8 (0.60)	59/55 (0.52)	0,497
	Επικρατές [(GG+GA)/AA]	9/1	43/14	0,328
	Υπολειπόμενο [GG/(GA+AA)]	3/7	16/41	0,901

Πίνακας 33: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs28362491.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>NFKB1</i> rs28362491 ATTG/ DEL	Genotypic [ATTGATTG/ ATTG.DEL / DEL.DEL]	7/2/0	28/8/22	0,079
	Cochran – Armitage [ATTG / DEL]	16/2 (0.89)	64/52 (0.55)	0,015
	Επικρατές [(ATTGATTG + ATTG.DEL) / DEL.DEL]	9/0	36/22	0,095
	Υπολειπόμενο ATTGATTG/ (ATTG.DEL + DEL.DEL)]	7/2	28/30	0,117

Πίνακας 34: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs3780378.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>JAK2</i> rs3780378 C/T	Genotypic [CC/CT/TT]	1/7/2	19/43/9	0,480
	Cochran – Armitage [C/T]	9/11 (0.45)	81/61 (0.57)	0,313
	Επικρατές [(CC+CT)/TT]	8/2	62/9	0,531
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	1/9	19/52	0,274

Πίνακας 35: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs422674.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>CABIN1</i> rs422674 C/A	Genotypic [CC/CA/AA]	4/4/2	25/26/14	>0,99
	Cochran – Armitage [C/A]	12/8 (0.60)	76/54 (0.63)	0,851
	Επικρατές [(CC+CA)/AA]	8/2	51/14	0,912
	Υπολειπόμενο [CC/(CA+AA)]	4/6	25/40	0,926

Πίνακας 36: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs3804358.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>PPP3CA</i> rs3804358 G/C	Genotypic [GG/GC/CC]	10/0/0	56/2/1	0,767
	Cochran – Armitage [G/C]	20/0 (1)	114/4 (0.97)	0,752
	Επικρατές [(GG+GC)/CC]	10/0	58/1	0,710
	Υπολειπόμενο [GG/(GC+CC)]	10/0	56/3	0,865

Πίνακας 37: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs4872499.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>PPP3CC</i> rs4872499 C/T	Genotypic [CC/CT/TT]	6/3/1	34/21/16	0,632
	Cochran – Armitage [C/T]	15/5 (0.75)	89/53 (0.63)	0,287
	Επικρατές [(CC+CT)/TT]	9/1	55/16	0,378
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	6/4	34/37	0,476

Πίνακας 38: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs696.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>NFKB1A</i> rs696 C/T	Genotypic [CC/CT/TT]	2/7/1	28/25/16	0,126
	Cochran – Armitage [C/T]	11/9 (0.55)	81/57 (0.59)	0,754
	Επικρατές [(CC+CT)/TT]	9/1	53/16	0,360
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	2/8	28/41	0,225

Πίνακας 39: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs7430.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>PPP3CC</i> rs7430 G/C	Genotypic [GG/GC/CC]	3/5/2	20/26/18	0,820
	Cochran – Armitage [G/C]	11/9 (0.55)	66/62 (0.52)	0,775
	Επικρατές [(GG+GC)/CC]	8/2	46/18	0,593
	Υπολειπόμενο [GG/(GC+CC)]	3/7	20/44	0,937

Πίνακας 40: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs7849191.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>JAK2</i> rs7849191 C/T	Genotypic [CC/CT/TT]	7/2/1	29/20/15	0,337
	Cochran – Armitage [C/T]	16/4 (0.8)	78/50 (0.61)	0,109
	Επικρατές [(CC+CT)/TT]	9/1	49/15	0,355
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	7/3	29/35	0,159

Πίνακας 41: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs8024.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>IPO9</i> rs8024 C/A	Genotypic [CC/CA/AA]	4/5/0	36/18/9	0,191
	Cochran – Armitage [C/A]	13/5 (0.72)	90/36 (0.71)	0,944
	Επικρατές [(CC+CA)/AA]	9/0	54/9	0,423
	Υπολειπόμενο [CC/(CA+AA)]	4/5	36/27	0,477

Πίνακας 42: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs8177826.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>PPI</i> rs8177826 C/G	Genotypic [CC/CG/GG]	3/3/2	29/14/8	0,584
	Cochran – Armitage [C/G]	9/7 (0.56)	72/30 (0.71)	0,255
	Επικρατές [(CC+CG)/GG]	6/2	43/8	0,518
	Υπολειπόμενο [CC/(CG+GG)]	3/5	29/22	0,315

Πίνακας 43: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs873833.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>CABIN1</i> rs873833 A/G	Genotypic [AA/AG/GG]	6/4/0	58/11/0	0.101
	Cochran – Armitage [A/G]	16/4 (0.8)	127/11 (0.92)	0,098
	Επικρατές [(AA+AG)/GG]	10/0	69/0	0,351
	Υπολειπόμενο [GG/(AG+GG)]	6/4	58/11	0,083

Πίνακας 44: Ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό rs880324.

Γονίδιο Πολυμορφισμός Αλληλόμορφα	Test	Εμφάνιση τοξικότητας	Μη εμφάνιση τοξικότητας	P
<i>NFATC2</i> rs880324 G/A	Genotypic [GG/GA/AA]	6/4/0	34/22/13	0,324
	Cochran – Armitage [G/A]	16/4 (0.8)	90/48 (0.65)	0,197
	Επικρατές [(GG+GA)/AA]	10/0	56/13	0,275
	Υπολειπόμενο [GG/(GA+AA)]	6/4	34/35	0,528