



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Α' ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΚΑΙ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΝΟΣΩΝ**

**Διευθυντής: Καθηγητής Δημήτριος Γ. Ρηγόπουλος**

**ΣΕ ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΟΝ**

**ΤΟΜΕΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΟΣΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ**  
**ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΤΗΣ**

**ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΤΟΥΤΣ ΒΟΣΤΩΝΗΣ**

**Διευθυντής: Καθηγητής Θεοχάρης Κ. Θεοχαρίδης**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Μελέτη Της Δυναμικής Συμπεριφοράς Των Μιτοχονδρίων Και**  
**Των Ρυθμιστών Τους Στην Ψωρίαση**

της Δερματολόγου-Αφροδισιολόγου

Αναστασίας Θεριανού

ΑΘΗΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2018

## **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

### **1. Δημήτριος Ρηγόπουλος**

Καθηγητής Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας, Διευθυντής Νοσοκομείου Δερματικών και Αφροδίσιων Νοσημάτων 'Αντρέας Συγγρός', Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών (Επιβλέπων Καθηγητής).

### **2. Αλέξανδρος Στρατηγός**

Καθηγητής Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών.

### **3. Θεοχάρης Θεοχαρίδης**

Καθηγητής Φαρμακολογίας και Παθολογίας, Διεθνούς Τμήματος Μοριακής Ανοσοφαρμακολογίας και Ανακάλυψης Φαρμάκων, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Tufts, Βοστώνη, ΗΠΑ.

## **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

1. **Θεοχάρης Θεοχαρίδης**, Καθηγητής Φαρμακολογίας και Παθολογίας, Διευθυντής Τμήματος Μοριακής Ανοσοφαρμακολογίας και Ανακάλυψης Φαρμάκων, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Tufts, Βοστώνη, ΗΠΑ.
2. **Αλέξανδρος Κατούλης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών
3. **Ηλέκτρα Νικολαΐδου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών
4. **Δημήτριος Ρηγόπουλος**, Καθηγητής Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας, Διευθυντής Νοσοκομείου Δερματικών και Αφροδίσιων Νοσημάτων 'Αντρέας Συγγρός', Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών. (Επιβλέπων Καθηγητής)
5. **Αλέξανδρος Στρατηγός**, Καθηγητής Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών.
6. **Ερυφίλη Χατζηαγγελάκη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών
7. **Αργυρώ Χατζηγιάννου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
SUMMARY.....	8
Αντί προλόγου.....	9

### ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΨΩΡΙΑΣΗ

1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ- ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ .....	13
1.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ.....	14
1.3 ΕΚΛΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	17
1.3.1. Φαινόμενο Köebner.....	17
1.3.2 Φάρμακα.....	18
1.3.3 Λοιμώξεις.....	18
1.3.4 Κάπνισμα, αλκοόλ, στρες.....	19
1.3.5 Ενδοκρινικοί παράγοντες.....	19
1.4 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ .....	20
1.4.1 Κοινή κατά πλάκας ψωρίαση.....	20
1.4.2 Σταγονοειδής ψωρίαση.....	21
1.4.3 Ερυθροδερμική ψωρίαση.....	22
1.4.4 Φλυκταινώδης ψωρίαση.....	24
1.4.5 Περιοχική ψωρίαση.....	26
1.5 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ.....	29
1.6 ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.....	31
1.7 ΣΥΝΟΣΗΡΟΤΗΤΕΣ.....	33
1.8 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΨΩΡΙΑΣΗΣ.....	35

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ**

2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ.....	38
2.2 ΣΧΑΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΞΗ .....	41
2.3 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ.....	46
2.3.1 Ο ρόλος της σχετιζόμενης με τη Δυναμίνη Πρωτεΐνη 1, DRP- 1.....	46
2.3.2 Καλσινευρίνη, ο ρόλος της στα μιτοχόνδρια.....	48
2.3.3 Ο ρόλος της πρωτεΐνης αποσύνδεσης 2-UCP2 στο μιτοχόνδριο.....	49
2.4 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA.....	51
2.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	54

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΡΕΥΝΑΣ**

3.1 Πληθυσμός Μελέτης.....	57
3.2 Πρωτόκολλο συλλογής και αποθήκευσης βιολογικών δειγμάτων.....	58
3.2.1 Βιοψίες Δέρματος.....	58
3.2.2 Αιμοληψίες.....	59
3.3 Τεχνικές που εφαρμόστηκαν στους ιστούς.....	61
3.3.1 Απομόνωση ολικού κυτταρικού RNA.....	61
3.3.2 Σύνθεση cDNA-Μέθοδος αντίστροφης μεταγραφής ακολουθούμενης από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Reverse Transcription-PCR, RT-PCR).....	63
3.3.3 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR).....	64
3.4 Τεχνικές που εφαρμόστηκαν σε κύτταρα.....	69

3.4.1 Καλλιέργεια μαστοκυττάρων.....	69
3.4.2 Απομόνωση μιτοχονδριακού DNA από κύτταρα.....	70
<b>3.5 Τεχνικές που εφαρμόστηκαν στον ορό.....</b>	<b>72</b>
3.5.1 Απομόνωση μιτοχονδριακού DNA από τον ορό.....	72
3.5.2 Μέθοδος ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης στον ορό (quantitative PCR, qPCR).....	75
<b>3.6 Στατιστική ανάλυση.....</b>	<b>75</b>
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	
<b>4.1 Αποτελέσματα στον ορό.....</b>	<b>76</b>
4.1.1 Μετρήσεις μιτοχονδριακού DNA στον ορό αίματος.....	76
<b>4.2 Αποτελέσματα πειραμάτων στους ιστούς.....</b>	<b>78</b>
4.2.1 Μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου της πρωτεΐνης DRP1 με qPCR.....	78
4.2.2 Μέτρηση έκφρασης του γονιδίου της καλσινευρίνης με qPCR.....	80
4.2.3 Μέτρηση έκφρασης του γονιδίου της UCP2 με qPCR.....	81
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>83</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ.....</b>	<b>86</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΑΙΡΩ ΕΡΕΥΝΑ.....</b>	<b>87</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>88</b>
<b>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....</b>	<b>101</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ψωρίαση είναι μια φλεγμονώδης νόσος που χαρακτηρίζεται από πολλαπλασιασμό κερατινοκυττάρων και χρόνια φλεγμονή, αλλά η παθογένεση δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Τα μιτοχόνδρια θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μειωμένη απόπτωση και εξωκυτταρική έκκριση του μιτοχονδριακού DNA (mt DNA), το οποίο λειτουργώντας ως "έμφυτο παθογόνο" επάγει την φλεγμονή. Ορός συλλέχθηκε από υγιείς εθελοντές και ασθενείς με ψωρίαση. Το μιτοχονδριακό DNA εκχυλίστηκε από τον ορό και ενισχύθηκε με ποσοτική PCR (qPCR). Βιοψίες δέρματος ελήφθησαν από ψωριασικές πλάκες, μη παθολογικό ψωριασικό δέρμα (10 cm μεταξύ τους) και από δέρμα υγιών εθελοντών, τοποθετήθηκαν σε υγρό RNA later και αποθηκεύθηκαν στους -80 °C μέχρις ότου το RNA εκχυλίστηκε και συντέθηκε cDNA. Η γονιδιακή έκφραση της πρωτεΐνης αποσύνδεσης 2 (UCP2), η σχετιζόμενη με τη δυναμική πρωτεΐνη 1 (Dnp1) και η καλσινευρίνη, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων, ανιχνεύθηκαν με qPCR. Το μιτοχονδριακό DNA βρέθηκε στατιστικώς σημαντικά αυξημένο (mitochondrial 7s,  $p = 0,0496$  και Cytochrome B, CytB,  $p = 0,0403$ ) στον ορό των ψωριασικών ασθενών ( $n = 63$ ) σε σύγκριση με τους μάρτυρες ( $n = 27$ ). Η γονιδιακή έκφραση για το UCP2 ( $p = 0.0218$ ), το Dnp1 ( $p = 0.0001$ ) και την καλσινευρίνη ( $p = 0.0001$ ) βρέθηκε στατιστικώς σημαντικά μειωμένη στις ψωριασικές πλάκες, σε σύγκριση με το μη παθολογικό δέρμα και το δέρμα υγιών μαρτύρων. Το αυξημένο εξωκυτταρικό mtDNA ορού σε ασθενείς με ψωρίαση και η μειωμένη έκφραση των μιτοχονδριακών ρυθμιστικών πρωτεϊνών στο ψωριασικό δέρμα, υποδηλώνουν αυξημένη φλεγμονή και μειωμένη απόπτωση κερατινοκυττάρων, αντίστοιχα. Αναστολείς έκκρισης mtDNA ή/και αγωνιστές της UCP2 μπορεί να είναι πιθανές επιλογές θεραπείας για την ψωρίαση στο μέλλον.

## SUMMARY

Psoriasis is characterized by keratinocyte proliferation and chronic inflammation, but the pathogenesis is still unclear. Dysregulated mitochondria could lead to reduced apoptosis and extracellular secretion of mitochondrial DNA (mt DNA), acting as “innate pathogen” triggering inflammation. Serum was obtained from healthy volunteers and psoriatic patients. Mitochondrial DNA was extracted from the serum and amplified with quantitative PCR (qPCR). Punch biopsies were obtained from lesional and non-lesional psoriatic skin (10 cm apart) and from healthy volunteers, were placed in RNA later and were stored at -80°C until RNA was extracted and cDNA was synthesized; gene expression of uncoupling protein 2 (UCP2), Dynamin-related protein 1 (Drp1) and calcineurin, involved in the regulation of mitochondria function, was detected with qPCR. Mitochondrial DNA was significantly increased (7s,  $p=0.0496$  and Cytochrome B, CytB,  $p=0.0403$ ) in the serum of psoriatic patients ( $n=63$ ) as compared to controls ( $n=27$ ). Gene expression was significantly reduced for UCP2 ( $p=0.0218$ ), Drp1 ( $p=0.0001$ ) and calcineurin ( $p=0.0001$ ) in lesional psoriatic skin, as compared to non-lesional or control skin. Increased serum extracellular mtDNA in psoriatic patients and decreased expression of mitochondrial regulatory proteins in psoriatic skin suggest increased inflammation and reduced keratinocyte apoptosis, respectively. Inhibitors of mtDNA secretion and/or UCP2 stimulants may be potential treatment options.



## Αντί προλόγου...

Αυτές τις μέρες ολοκληρώνεται ένας κύκλος ενασχόλησης, που κλείνει χωρίς να τελειώνει, καθώς πρόκειται κατά βάση για απλή αποπεράτωση που σηματοδοτεί μια αρχή: την αέναη δηλαδή διαδικασία της μάθησης και της εμπάθουσας. Απέναντι σε αυτό τον απολογισμό των δρώμενων αισθάνομαι ιδιαίτερη ικανοποίηση αναλογιζόμενη τα πρόσωπα που στάθηκαν δίπλα μου και συνέβαλαν σημαντικά, ο καθένας με το δικό του μοναδικό τρόπο στην εκπόνηση της διατριβής μου.

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε κατά το μεγαλύτερο μέρος της στο Εργαστήριο Μοριακής Ανοσοφαρμακολογίας και Ανακάλυψης Φαρμάκων του Πανεπιστημίου Tufts της Βοστώνης μέσω διαπανεπιστημιακής συνεργασίας με το Νοσοκομείο Δερματικών και Αφροδίσιων Νοσημάτων 'Αντρέας Συγγρός' και με την Αλλεργιολογική Μονάδα της Β' Πανεπιστημιακής Κλινικής Δερματολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Αττικών.

Κατ' αρχάς, θεωρώ τύχη τη συνεργασία μου με έναν τόσο πνευματώδη ερευνητή και άνθρωπο, τον Καθηγητή μου, κ. Θεοχάρη Θεοχαρίδη, ο οποίος είχε την επίβλεψη της εργαστηριακής έρευνας στο εξωτερικό για την παρούσα διατριβή. Είναι ο άνθρωπος, που χάρη στην εμπιστοσύνη, τις συμβουλές και τη διαρκή του υποστήριξη κατόρθωσα να φέρω εις πέρας την έρευνα αυτή. Ο δικός του αστείρευτος ενθουσιασμός και η δίψα για γνώση με ενέπνευσαν να αφοσιωθώ στην έρευνα και οι δικές του διδαχές για το «ευ αγωνίζεσθαι» διαπνέουν την ακαδημαϊκή μου πορεία.

Πολλά οφείλω επίσης στα αρχικά μέλη της συμβουλευτικής μου επιτροπής, την Ομότιμη πλέον Καθηγήτρια, κα Χριστίνα Αντωνίου, την Ομότιμη Καθηγήτρια κα Αλεξάνδρα Κατσαρού, τον Ομότιμο Καθηγητή, κ. Αντρέα Κατσάμπα, που επέτρεψαν για ένα αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα την παρουσία μου στα ιατρεία του Νοσοκομείου 'Αντρέας Συγγρός' στην προσπάθεια να συλλέξω δείγματα και όλο αυτό το διάστημα ήταν πάντα δίπλα μου σε ό,τι χρειαζόμουν. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο Καθηγητή, κ. Νικόλαο Σταυριανέα, που επέτρεψε την παρουσία μου στα εξωτερικά ιατρεία του Δερματολογικού τμήματος του Νοσοκομείου «Αττικόν» με σκοπό τη συλλογή των δειγμάτων.

Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να κάνω ιδιαίτερη μνεία στον αείμνηστο Καθηγητή Δημήτριο Καλογερομήτρο, που υπήρξε αστείρευτη πηγή θετικής ενέργειας κατά το διάστημα συλλογής των ασθενών για τη μελέτη, όσο ήταν ακόμα εν ζωή. Αιωνία η μνήμη του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τον Καθηγητή, κο Δημήτριο Ρηγόπουλο, που με μεγάλη προθυμία δέχθηκε να αναλάβει καθήκοντα ως Επιβλέπων για την ολοκλήρωση της διατριβής μου έπειτα από συνταξιοδότηση της Καθηγήτριας, κας Αντωνίου. Τις ευχαριστίες μου επίσης στον Καθηγητή, κ. Αλέξανδρο Στρατηγό, που προσεφέρθη να με βοηθήσει στην αντικατάσταση της τριμελούς μου επιτροπής. Ήταν πραγματικά τιμή μου που έχω συνεργαστεί μαζί τους.

Θα ήταν παράλειψη να μην εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στις φίλες και συνεργάτιδες μου, την Βιολόγο Μαγδαληνή Βασιάδη, και την ενδοκρινολόγο, Δανάη Δελιβάνη, για τη βοήθεια και την προθυμία τους να μοιραστούν την εμπειρία τους και τα μυστικά των μοριακών τεχνικών μαζί μου. Ευχαριστώ ακόμα τον ιατρό

Κωνσταντίνο-Διονύσιο Αλυσανδράτο για τη βοήθειά του στην στατιστική ανάλυση, τον Ωτορινολαρυγγολόγο Αθανάσιο Θεοχαρίδη για τη βοήθειά του στη συλλογή ορού υγιών εθελοντών που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες στα πειράματά μας, και την Πλαστικό Χειρουργό Θεοδώρα Πετρακοπούλου για τη συμβολή της στην συλλογή βιοψιών από υγιείς εθελοντές.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα όλους τους ασθενείς και υγιείς μάρτυρες που δέχθηκαν ανιδιοτελώς να συμμετάσχουν και χωρίς αυτούς δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η έρευνα αυτή.

Τέλος, ένα μεγάλο 'ευχαριστώ' στους γονείς μου και την αείμνηστη πλέον γιαγιά μου για τις αξίες και την παιδεία που μου έδωσαν, αλλά και στον σύζυγό μου και τους αληθινούς φίλους μου που με κατανόηση και υπομονή στάθηκαν στο πλευρό μου.

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΨΩΡΙΑΣΗ

### 1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ-ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η ψωρίαση είναι μια κοινή, χρόνια ανοσοδιαμεσολαβούμενη φλεγμονώδης νόσος, η οποία χαρακτηρίζεται από εξάρσεις και υφέσεις και προσβάλλει κυρίως το δέρμα, τα εξαρτήματά του αλλά και τις αρθρώσεις.<sup>1</sup> Ο Ιπποκράτης (460-377 π.Χ) θα περιγράψει τις λεπιδώδεις δερματοπάθειες στις οποίες μάλλον συμπεριλαμβάνει την ψωρίαση αλλά και τη λέπτρα. Ο ίδιος θα χρησιμοποιήσει θειούχο αρσενικό σε μορφή πάστας για τη θεραπεία αυτών των νόσων.<sup>2</sup> Η συσχέτιση του ειδικού ερυθματολεπιδώδους εξανθήματος με τον όρο ψωρίαση έγινε από τον Βρετανό Willan (1757-1812) ο οποίος ήταν ο πρώτος μιας μακριάς σειράς δερματολόγων που επιχείρησε αυτή τη συσχέτιση.<sup>3</sup>

Η ψωρίαση έχει επιπολασμό 0,2%-6,5%, ανάλογα με την προέλευση του πληθυσμού.<sup>4</sup> Στην Ευρώπη και Βόρειο Αμερική η συχνότητα της ψωριάσεως στο γενικό πληθυσμό υπολογίζεται σε περίπου 2%.<sup>5</sup> Είναι ασυνήθης η εμφάνισή της στη μαύρη και κίτρινη φυλή, ενώ πολύ σπάνια εμφανίζεται στους Εσκιμώους και Ινδιάνους της Αμερικής.<sup>6</sup> Προσβάλλει και τα δύο φύλα με την ίδια περίπου συχνότητα. Αν και η ψωρίαση μπορεί να εκδηλωθεί σε οποιαδήποτε ηλικία, οι περισσότεροι ασθενείς εμφανίζουν για πρώτη φορά τις χαρακτηριστικές ψωριασικές αλλοιώσεις στην 3η δεκαετία της ζωής. Μπορεί να εμφανιστεί στην ηλικία των 16-24 ετών με οικογενή χαρακτήρα, υψηλή συχνότητα HLA και δυσμενέστερη πορεία ενώ όταν πρωτοεμφανίζεται σε μεγαλύτερες ηλικίες 50-60 ετών δεν έχει οικογενή χαρακτήρα αλλά ούτε μεγάλη συχνότητα HLA δεικτών καθώς και ηπιότερη κλινική

πορεία.<sup>7</sup> Έτσι η νόσος έχει διαχωριστεί σε τύπου I και II ανάλογα με την έναρξη της νόσου πριν ή μετά την ηλικία των 40 ετών.<sup>8</sup>

Η ψωρίαση συνδέεται με υψηλό βαθμό νοσηρότητας. Οι ασθενείς ντρέπονται για την εμφάνιση του δέρματός τους και η φαρμακευτική αγωγή έχει συχνά παρενέργειες. Επιπλέον, οι ασθενείς αυτοί έχουν μειωμένα επίπεδα απασχόλησης και εισοδήματος καθώς και μειωμένη ποιότητα ζωής.<sup>9, 10</sup> Το κόστος της μακροχρόνιας θεραπείας και του κοινωνικό κόστος της νόσου έχει σημαντικό αντίκτυπο στα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης και στην κοινωνία εν γένει.

## 1.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Μόλις το 1990, με την μελέτη του ανθρώπινου γονιδιώματος, άρχισε και η έρευνα για τα γονίδια της νόσου. Γενικώς, είναι αποδεκτό πως η κληρονομικότητα στην ψωρίαση είναι πολυγονιδιακή με διεισδυτικότητα που ποικίλει. Σε μελέτες διδύμων το ποσοστό της νόσου έφτανε το 70% στους μονοζυγωτικούς και το 20% τους διζυγωτικούς.<sup>11</sup>

Αυτά τα ποσοστά δεν αγγίζουν το 100% και αυτό οφείλεται στο γεγονός πως η εμφάνιση της ψωρίασης χρειάζεται συγχρόνως και την επίδραση περιβαλλοντικών-εκλυτικών παραγόντων στα γενετικώς προδιατεθειμένα άτομα. Οι μοριακές μελέτες του γονιδιώματος ψωριασικών ασθενών έως το 2010 είχαν αναδείξει 19 γονιδιακούς τόπους οι οποίοι ανευρίσκονται συχνότερα και φαίνεται πως έχουν σχέση με τη νόσο. Σε αυτούς προστέθηκαν 15 νέοι γονιδιακοί τόποι σε ασθενείς με Ευρωπαϊκή

καταγωγή μόλις το 2012 (Πίνακας 1) συν 5 ακόμη που σχετίζονται μόνο με τον Κινέζικο πληθυσμό.<sup>12</sup>

**Πίνακας 1.** Γονίδια που εμπλέκονται στην ψωρίαση.<sup>13</sup>

IL28RA	
IL23R	
LCE3D	
REL	
IFIH1	SLC45A1
ERAP1	RUNX3
IL13/IL4	B3GNT2
TNIP1	EXOC2/IRF4
IL12B	TAGAP
HLA-C	ELMO1
TRAF3IP2	DDX58
TRAF3IP3	KLF4
IL23A/STAT2	ZC3H12C
NFKBIA	ETS1
FBXL19	SOCS1
NOS2	STAT3
TYK2	CARD14
RNF114	STARD6,POLI
UBE2L3	ILF3,CARM1
<b>2010</b>	<b>2012</b>

Οι γονιδιακοί αυτοί τύποι, οι οποίοι βρίσκονται είτε στο Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας MHC είτε όχι, συμμετέχουν βασικά σε τρία βιολογικά μονοπάτια στο μηχανισμό της ψωρίασης: στη φυσική και την επίκτητη ανοσία, καθώς και τον επιδερμικό φραγμό.

Μια πιο προσεκτική εξέταση των ανοσολογικών γονιδίων αποκαλύπτει την κρίσιμη συμβολή στην ευαισθησία της νόσου μέσα από τέσσερις θεμελιώδεις ανοσολογικές διεργασίες και οδούς: την αντιγονοπαρουσίαση, την σηματοδότηση NP-κΒ (που παίζει κεντρικό ρόλο στην ενίσχυση και τη διατήρηση της χρόνιας φλεγμονής), τον άξονα IL-23 / IL-17 και το μονοπάτι INF τύπου I.

Είναι ενδιαφέρον ότι μερικά γονίδια από τις παραπάνω οδούς σχετίζονται και με άλλες αυτοάνοσες οντότητες όπως τη νόσος του Crohn, την κοιλιοκάκη και την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, επιβεβαιώνοντας έτσι την παρουσία μιας κοινής γενετικής βάσης μεταξύ των ανοσοδιαμεσολαβούμενων φλεγμονωδών ασθενειών.<sup>13</sup>

Η γονιδιακή περιοχή που συνδέεται ισχυρότερα με την εμφάνιση της ψωρίασης είναι η PSORS1, που εντοπίζεται στην χρωμοσωμιακή θέση 6p21.33, μέσα στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC) και κωδικοποιεί το αλληλίο HLA-Cw6 που σχετίζεται με την αντιγονοπαρουσίαση και ονομάζεται HLA-C.<sup>14</sup>

Παρά τα ισχυρά γενετικά αποδεικτικά στοιχεία και την προφανή ανοσολογική λειτουργία του HLA-C, εξακολουθούν να λείπουν λειτουργικές μελέτες που ασχολούνται με τον ακριβή μηχανισμό με τον οποίο τα αλληλία Cw \* 0602 προκαλούν την ψωρίαση και δεν έχει ταυτοποιηθεί το ακριβές γονίδιο Cw \* 0602 μέχρι σήμερα. Το γονίδιο IL-36RN παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί έχει συσχετισθεί με συγκεκριμένο ψωριασικό φαινότυπο, τη γενικευμένη φλυκταινώδη ψωρίαση.<sup>15</sup> Το IL-36RN κωδικοποιεί τον υποδοχέα του ανταγωνιστή της ιντερλευκίνης 36 (IL-36) και έχει ως βασική λειτουργία την εξουδετέρωση της φλεγμονώδους δράσης των προφλεγμονωδών ιντερλευκινών 1, 6 (IL-1, IL-6)<sup>15,16</sup> και της χημοκίνης ιντερλευκίνη-8 (IL-8). Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι σε ασθενείς με γενικευμένη φλυκταινώδη ψωρίαση παρατηρείται κατάργηση της δράσης του υποδοχέα IL-36Rα με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή IL-1, IL-6 και IL-8.<sup>15</sup>



Ωστόσο, δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική σύνδεση του γονιδίου αυτού με την ψωρίαση κατά πλάκας.<sup>16</sup>

### **1.3 ΕΚΛΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

Σε αντίθεση με τον ταχέως αναπτυσσόμενο κατάλογο των γονιδίων ευαισθησίας στην ψωρίαση, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που συνάδουν με την έναρξη της νόσου παραμένουν ασαφείς. Μεταξύ των γνωστών περιβαλλοντικών αιτιών της ψωρίασης είναι φάρμακα, λοιμώξεις, σωματικό ή ψυχολογικό τραύμα, κάπνισμα, αλκοόλ και άγχος. Διάφοροι παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν την έκλυση των ψωριασικών βλαβών ή ακόμη και την επιδείνωση των ήδη υφισταμένων αλλά και την μετάπτωση της μιας μορφής της νόσου σε άλλη.

#### **1.3.1. Φαινόμενο Köebner**

Ο Köebner το 1877 παρατήρησε την εμφάνιση ψωριασικών βλαβών στις θέσεις ήπιου τραυματισμού του φαινομενικά υγιούς δέρματος ασθενών με ψωρίαση. Το φαινόμενο Köebner, δεν είναι ειδικό μόνο για την ψωρίαση αλλά εμφανίζεται στην λεύκη, τις μυρμηκίες, τον ομαλό λειχήνα, τη μολυσματική τέρμινθο και σε άλλες δερματολογικές παθήσεις. Κατά την λύση της συνέχειας της επιδερμίδας και του χορίου πραγματοποιείται απελευθέρωση κυτταροκινών και ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων.<sup>17</sup>

### 1.3.2 Φάρμακα

Φάρμακα, όπως τα αντιϊικά, η ανοσοτροποποιητική ιμικουιμόδη, τα αντικαταθλιπτικά (λίθιο), τα αντιυπερτασικά (βήτα αναστολείς), οι ιντερφερόνες, καθώς και οι θεραπείες έναντι των κυτταροκινών που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της ψωρίασης (αντι-TNF αντισώματα) έχουν κλινικά συνδεθεί με την έναρξη και επιδείνωση της νόσου.<sup>18</sup>

Η ιμικουιμόδη, ένας αγωνιστής του Toll-like υποδοχέα (TLR) 7/8 που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία των μη μελανωματικών δερματικών όγκων και των κονδυλωμάτων των γεννητικών οργάνων, αντιπροσωπεύει ένα από τα καλύτερα ερευνηθέντα παραδείγματα της ενεργοποίησης της ψωρίασης μέχρι στιγμής και δρά ενεργοποιώντας την οδό σηματοδότησης IFN τύπου I.

### 1.3.3 Λοιμώξεις

Διάφορες λοιμώξεις προκαλούν ή επιδεινώνουν τη νόσο. Η σχέση της στρεπτοκοκκικής λοίμωξης με την εμφάνιση οξείας σταγονοειδούς ψωρίασεως αλλά και με εξάρσεις της ψωρίασης κατά πλάκας έχει τεκμηριωθεί σε μεγάλες κλινικές μελέτες.<sup>19, 20</sup> Ομόλογοι κλώνοι T κυττάρων έχουν βρεθεί τόσο στις αμυγδαλές όσο και στις δερματικές βλάβες ασθενών με ψωρίαση κατά πλάκες.<sup>21</sup> Έχει μελετηθεί επίσης ότι βακτηριακές τοξίνες που δρουν ως υπεραντιγόνα μετέχουν στους μηχανισμούς ενεργοποίησης των πρωτογενών κυττάρων-στόχων στην ψωρίαση.<sup>22</sup>

### 1.3.4 Κάπνισμα, αλκοόλ, στρες

Η συσχέτιση των διαφόρων καθημερινών συνηθειών, όπως το κάπνισμα και η κατανάλωση οινοπνεύματος, καθώς και συννοσηρότητες όπως το άγχος, είναι πιο δύσκολο να διερευνηθούν. Αν και αρκετές μελέτες έχουν προσφέρει στοιχεία που συνδέουν το άγχος και το κάπνισμα με την ψωρίαση,<sup>23 , 24</sup> δεν υπάρχει συναίνεση σχετικά με το εάν οι παράγοντες αυτοί προκαλούν ή επιδεινώνουν την ψωρίαση.<sup>25</sup>

### 1.3.5 Ενδοκρινικοί παράγοντες

Υπάρχουν κάποιες αναφορές περιστατικών στην διεθνή βιβλιογραφία που σχετίζουν την ψωρίαση και κυρίως την γενικευμένη φλυκταινώδη μορφή με τον υποπαραθυρεοειδισμό και την υπασβαστιαιμία, ωστόσο τα στοιχεία είναι περιορισμένα.<sup>26 , 27, 28, 29</sup>

## 1.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

### 1.1.1 Κοινή κατά πλάκας ψωρίαση

Αποτελεί τον συχνότερο τύπο ψωρίασης που φτάνει το 90% των περιπτώσεων. Η στοιχειώδης βλάβη έχει τα εξής χαρακτηριστικά: 1) σαφώς αφοριζόμενη και επηρμένη πλάκα λόγω της υπερπλασίας της επιδερμίδας, 2) καλύπτεται από παχιά αργυρόχροα, χαλαρώς προσκολλημένα λέπια λόγω της ανώμαλης κερατινοποίησης, 3) έντονα ερυθρό χρώμα, λόγω του διευρυσμένου τριχοειδικού δικτύου. Το μέγεθος της βλάβης ποικίλλει, ενώ το σχήμα της είναι συνήθως κυκλικό, ωοειδές ή ακανόνιστο (Εικόνα 2).

Μικρές πλάκες μπορούν να συνενώνονται και να σχηματίζουν μεγαλύτερες πλάκες που καλύπτουν μεγάλη επιφάνεια του σώματος. Οι πλάκες αυτές είναι συμμετρικές και η πιο συνηθισμένη εντόπιση της ψωρίασης είναι στις εκτατικές επιφάνειες των αγκώνων και των γονάτων, πιθανόν λόγω της συνεχούς τριβής και του τραυματισμού του δέρματος στα σημεία αυτά, το τριχωτό της κεφαλής, την οσφυϊκή και την περιομφαλική χώρα. Από άποψη συμπτωματολογίας, η κοινή κατά πλάκας ψωρίαση είναι συνήθως ασυμπτωματική αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις συνοδεύεται από άλγος ή κνησμό. Οι βλάβες της κοινής ψωρίασης επιμένουν συνήθως για μεγάλο χρονικό διάστημα με ελάχιστες μορφολογικές αλλαγές και τάση επέκτασης. Όχι σπάνια, μπορεί να παρατηρηθεί απότομη εμφάνιση διάσπαρτων μικρών και μεγάλων πλακών (εξανθηματική μορφή), πολλαπλών φλυκταινωδών βλαβών (φλυκταινώδης ψωρίαση) ή καθολική ερυθρότητα και απολέπιση του δέρματος (ερυθροδερμική ψωρίαση). Παρατηρούνται τρία κλινικά σημεία με ιδιαίτερη

διαγνωστική σημασία α) Το σημείο της αιματηράς δρόσου που αναφέρεται στην εμφάνιση στικτής αιμορραγίας μετά την απομάκρυνση των λεπιών από την επιφάνεια της πλάκας και οφείλεται στον τραυματισμό των διατεταμένων επιφανειακών τριχοειδών β) το σημείο στεατοκηρίου που η μηχανική απομάκρυνση των λεπιών συμβαίνει με την μορφή μικρών λευκών κομματιών σαν από κερί γ) το φαινόμενο Kóebner ή ισομορφικό φαινόμενο, που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση ψωριασικής βλάβης σε κλινικά υγιές δέρμα μετά από ήπιο τραυματισμό όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.



**Εικόνα 2.** Κλινική εικόνα ψωρίασης κατά πλάκας

#### **1.4.2. Σταγονοειδής ψωρίαση**

Εμφανίζεται αιφνίδια στα παιδιά και σε νεαρούς ενήλικες συνήθως μετά από στρεπτοκοκκική λοίμωξη, ανεξάρτητα από τη λήψη ή μη αντιβιοτικής αγωγής. Χαρακτηρίζεται από μικρές σταγονοειδείς βλατίδες ή πλάκες έως 1.5cm εντοπιζόμενες κυρίως στον κορμό και στα άκρα αλλά όχι στα πέλματα. Οι βλάβες συνήθως υποχωρούν αυτόματα μέσα σε 2-3 μήνες. Σε σπάνιες περιπτώσεις

μεταπίπτουν σταδιακά στη χρόνια ψωρίαση κατά πλάκας. Μερικές φορές ασθενείς με χρόνια κατά πλάκας ψωρίαση εμφανίζουν τυπική σταγονοειδή ψωρίαση (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3.** Κλινική εικόνα Σταγονοειδούς Ψωρίασης

#### **1.4.3. Ερυθροδερμική ψωρίαση**

Η ερυθροδερμική ψωρίαση αποτελεί μια σοβαρή μορφή της ψωρίασης που η συχνότητά της είναι μικρότερη από 2 % του συνόλου των ψωριασικών ασθενών και χαρακτηρίζεται από καθολική φλεγμονή με έντονη ερυθρότητα και απολέπιση. Η διάχυτη δερματική φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε παροδική αλωπεκία ή σοβαρές διαταραχές ανάπτυξης των ονύχων. Η ερυθροδερμική ψωρίαση μπορεί να εμφανισθεί εν αιθρία ή να αποτελεί την ακραία μορφή επιδείνωσης μιας προϋπάρχουσας χρόνιας κοινής ή φλυκταινώδους ψωρίασης. Εμφανίζεται συνήθως σε νέα ή μέσης ηλικίας άτομα, αλλά μπορεί να εκδηλωθεί σε κάθε ηλικία . Εκλυτικοί παράγοντες θεωρούνται η απότομη διακοπή τοπικών ή συστηματικών κορτικοειδών,

κάποια ερεθιστική τοπική θεραπεία ή έγκαυμα από υπεριώδη ακτινοβολία, αντίδραση σε φάρμακο, λοιμώξεις, HIV κ.α. Η γενική κατάσταση του ασθενούς είναι κακή με υψηλό πυρετό και ρίγη, κακουχία, οιδήματα κάτω άκρων και διαταραχές της θερμορύθμισης και των ηλεκτρολυτών. Λόγω της εκτεταμένης αγγειοδιαστολής οι ασθενείς έχουν σημαντική απώλεια θερμοκρασίας, υποθερμία και ενδεχόμενη επιβάρυνση της καρδιακής λειτουργίας. Συνοδεύονται από υψηλή θνησιμότητα πριν η νεότερη θεραπευτική να αποβεί σωτήρια (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Ερυθροδερμική ψωρίαση.

#### 1.4.4. Φλυκταινώδης ψωρίαση

Η φλυκταινώδης ψωρίαση χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό φλυκταινών λόγω αθρόας συνάθροισης πολυμορφοπύρηνων στην επιδερμίδα. Σύμφωνα με το πρόσφατο Ευρωπαϊκό consensus υπάρχουν 3 τύποι φλυκταινώδους ψωρίασης: α) η γενικευμένη φλυκταινώδης ψωρίαση, β) η φλυκταινώδης ψωρίαση παλαμών / πελμάτων και γ) η ακροδερματίτιδα Hallopeau.<sup>30</sup>

##### α) Γενικευμένη φλυκταινώδης ψωρίαση

Είναι μια σπάνια νόσος που μπορεί να συνυπάρχει με συστηματική φλεγμονή αλλά όχι απαραίτητα. Επίσης μπορεί να παρουσιαστεί σε προϋπάρχουσες πλάκες κοινής ψωρίασης οι οποίες έχουν έντονα ερυθρά απόχρωση, είναι ελαφρά οιδηματώδεις, με ελάχιστη ή καθόλου απολέπιση. Είναι είτε υποτροπιάζουσα (> 1 επεισόδιο) είτε επίμονη (> 3 μήνες) κατάσταση. Οι βλάβες μπορεί να επεκταθούν σε όλη την επιφάνεια του σώματος και να διαμορφώσουν εικόνα εκτεταμένης ερυθροδερμίας. Τα αίτιά της είναι ασαφή, αν και στις περισσότερες περιπτώσεις οφείλεται σε ακατάλληλη θεραπευτική αγωγή. Η απότομη διακοπή συστηματικών κορτικοστεροειδών που χορηγήθηκαν για άλλη συνυπάρχουσα νόσο, η εφαρμογή τοξικής ή ερεθιστικής τοπικής θεραπείας σε προϋπάρχουσες βλάβες ψωρίασης καθώς και η απότομη διακοπή χρονίως χορηγούμενων ισχυρών τοπικών κορτικοστεροειδών αποτελούν ορισμένους από τους συχνότερους εκλυτικούς παράγοντες. Λιγότερο συχνά αίτια αποτελούν η κύηση, η χρήση αντισυλληπτικών, η



χορήγηση λιθίου ή άλλων εκλυτικών φαρμάκων, καθώς και ορισμένες λοιμώξεις και μεταβολικές διαταραχές. Σε ορισμένες περιοχές, οι φλύκταινες συνενώνονται σε μεγαλύτερους πυώδεις σχηματισμούς σχηματίζοντας «λίμνες πύου». Το εξάνθημα προσβάλλει ιδιαίτερα τις πτυχές του σώματος καθώς και τη γεννητική και περιγεννητική περιοχή. Ο στοματικός βλεννογόνος προσβάλλεται από κυκλικές και ημικυκλικές λευκοκίτρινες πλάκες, ενώ η συσσώρευση πύου κάτω από τα νύχια μπορεί να οδηγήσει σε αποκόλλησή τους. Συστηματικές επιπλοκές όπως αφυδάτωση, ηλεκτρολυτικές διαταραχές, υπασβεστιαμία, υπολευκωματιναιμία, καρδιακή ανεπάρκεια, ηπατική δυσλειτουργία, οξεία νεφρική σωληναριακή νέκρωση και δευτεροπαθείς βακτηριακές λοιμώξεις, θέτουν σε άμεσο κίνδυνο την υγεία των ασθενών. Οι ασθενείς αυτοί συχνά χρήζουν άμεσης νοσηλείας και παρακολούθησης, σε μονάδες εντατικής φροντίδας.

### β) Φλυκταινώδης ψωρίαση παλαμών / πελμάτων

Στην φλυκταινώδη ψωρίαση παλαμών/πελμάτων η στοιχειώδης βλάβη είναι η επιπολής φλύκταινα. Οι φλύκταινες είναι στείρες μικροβίων, επίμονες (>3μήνες) και εμφανίζονται συνήθως, αλλά όχι απαραίτητα πάνω σε ερυθηματώδεις πλάκες σαφώς περιγεγραμμένες. Μπορεί να συνδυάζεται με την παρουσία ψωριασικών βλαβών σε άλλα σημεία του σώματος ή να αποτελεί τη μόνη εκδήλωση της νόσου. Στα χέρια οι βλάβες εμφανίζονται αρχικά στην περιοχή του θέναρος και σιγά-σιγά επεκτείνονται για να καταλάβουν την κεντρική μοίρα της παλάμης και σε ορισμένες περιπτώσεις, τις ραχιαίες και πλάγιες επιφάνειες των δακτύλων. Στα πόδια, οι βλάβες πρωτοεμφανίζονται στις καμάρες και τις πτέρνες και επεκτείνονται σταδιακά

στις υπόλοιπες περιοχές των πελμάτων. Οι φλύκταινες περιέχουν άσηπτο πυώδες υγρό το οποίο μετά 7-10 ημέρες αποξηραίνεται δημιουργώντας μία κιτρινόφαιη ή καφεοειδή εφελκίδα. Σε ορισμένες περιπτώσεις το εξάνθημα μπορεί να γενικευθεί και να μετατραπεί σε γενικευμένη φλυκταινώδη ψωρίαση. Λόγω της ιδιομορφίας και του πάχους του δέρματος στις προσβεβλημένες περιοχές, η θεραπευτική αντιμετώπιση με τοπικά μέσα είναι δύσκολη και απαιτείται συνήθως συστηματική θεραπεία.

#### γ) Ακροδερματίτιδα Hallopeau

Στην ακροδερματίτιδα του Hallopeau οι φλύκταινες σχηματίζουν επίμονες (>3 μήνες) λίμνες με πύον και συνοδεύεται και από φλυκταίνωση των ονύχων που οδηγεί σε ονυχοδυστροφία και απώλεια των νυχιών στα προσβεβλημένα δάκτυλα. Μπορεί επίσης να εμφανιστεί οστεόλυση της τελικής φάλαγγα με τον καιρό.

#### **1.4.5. Περιοχική ψωρίαση**

Η κλινική εικόνα της ψωρίασης παρουσιάζει ιδιομορφίες όταν η νόσος εντοπίζεται σε ειδικές θέσεις, όπως στο τριχωτό της κεφαλής, το πρόσωπο, τις παλάμες και τα πέλματα, τις πτυχές, τους βλεννογόνους ή τους όνυχες.

### Τριχωτό κεφαλής

Η προσβολή του τριχωτού της κεφαλής είναι συχνή και όχι σπάνια αποτελεί την πρώτη κλινική εκδήλωση της νόσου. Συνήθως εμφανίζεται με τη μορφή ερυθματολεπιδωδών πλακών στην ινιακή χώρα και οπισθωτιαία. Οι βλάβες είναι σαφώς περιγεγραμμένες και από το εσωτερικό τους αναδύονται οι τρίχες. Περιγράφονται και διάχυτες μορφές που καταλαμβάνουν όλη την έκταση του τριχωτού της κεφαλής. Η φλεγμονώδη διήθηση και τα λέπια περιβάλλουν τις ρίζες των τριχών χωρίς να προκαλείται αλωπεκία. Οι βλάβες συχνά επεκτείνονται και στην μετωπιαία περιοχή. Η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει την σμηγματορροϊκή δερματίτιδα, τον δισκοειδή λύκο και την τριχοφυτίαση.

### Ανάστροφη ψωρίαση

Συνήθως προσβάλλονται οι πτυχές του σώματος στις μηροβουβωνικές, μασχालιαίες και υπομαστικές περιοχές, την μεσογλουτιαία σχισμή, παλάμες και πέλματα. Προσβάλλονται συχνότερα οι μεσήλικες, οι ηλικιωμένοι και ιδιαίτερα τα παχύσαρκα άτομα λόγω έντονης τριβής του δέρματος. Είναι δυνατόν να μη συνοδεύεται από άλλες τυπικές ψωριασικές βλάβες, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις αποτελεί τη μόνη ή την κυριότερη κλινική εικόνα της νόσου. Οι αλλοιώσεις είναι σαφώς περιγεγραμμένες, εφυγρανθείσες, έντονα ερυθρές και σιλπνές. Σπανιότερα εντοπίζεται περιομφαλικά και στις μεσοδακτύλιες πτυχές, ιδίως των κάτω άκρων. Το λευκωπό επίχρισμα που δεν υποχωρεί μετά από αντιμυκητιασική αγωγή ίσως αποτελεί κλινική εκδήλωση της ψωρίασης. Η οπισθωτιαία εντόπιση και γενικότερα ή

ψωρίαση στις πτυχές, όπως αναφέρθηκε δημιουργεί πρόβλημα διαφορικής διάγνωσης ή αλληλεπικάλυσης ψωρίασης και σμηγματορροϊκής δερματίτιδας, παρατρίμματος ή δερμοφυτιάσεως.

### Βλεννογόνοι

Η προσβολή του στοματικού βλεννογόνου είναι σπάνια και συμβαίνει κυρίως στη φλυκταινώδη και ερυθροδερμική μορφή της ψωρίασης. Εμφανίζονται κιτρινόφαιες ή λευκές, σαφώς αφοριζόμενες πλάκες στη γλώσσα, την υπερώα και τις παρειές. Συχνά εμφανίζεται εικόνα γεωγραφικής γλώσσας. Η προσβολή του γεννητικού βλεννογόνου όπως αυτή του πέους μπορεί να συμβεί μεμονωμένα ή στα πλαίσια μίας γενικότερης προσβολής του δέρματος. Οι βλάβες είναι μονήρεις ή πολλαπλές και διατηρούν την σαφώς αφοριζόμενη μορφή των ψωριασικών πλακών. Ωστόσο τα αργυρόχρωα λέπια μπορεί να λείπουν, ιδιαίτερα όταν η πλάκα καλύπτεται πλήρως από την πόσθη όπου η διαβροχή της περιοχής είναι έντονη.

### Όνυχες

Περίπου 35% των ψωριασικών ασθενών εμφανίζουν προσβολή των ονύχων. Μπορεί να αποτελεί μεμονωμένη εκδήλωση της νόσου ή να συνοδεύει μία γενικότερη προσβολή του δέρματος. Οι μορφολογικές αλλοιώσεις των ονύχων στην ψωρίαση ποικίλλουν ανάλογα με τη χρονιότητα της κατάστασης και το τμήμα του όνυχος που προσβάλλεται (μήτρα, επιφάνεια νυχιού, υπονύχιο). Η πιο συχνή εκδήλωση είναι τα βοθρία, στικτές εμβυθύνσεις που εμφανίζονται στην επιφάνεια του νυχιού σε μερικά ή όλα τα δάκτυλα. Τα βοθρία είναι ενδεικτικά κλινικά σημεία της

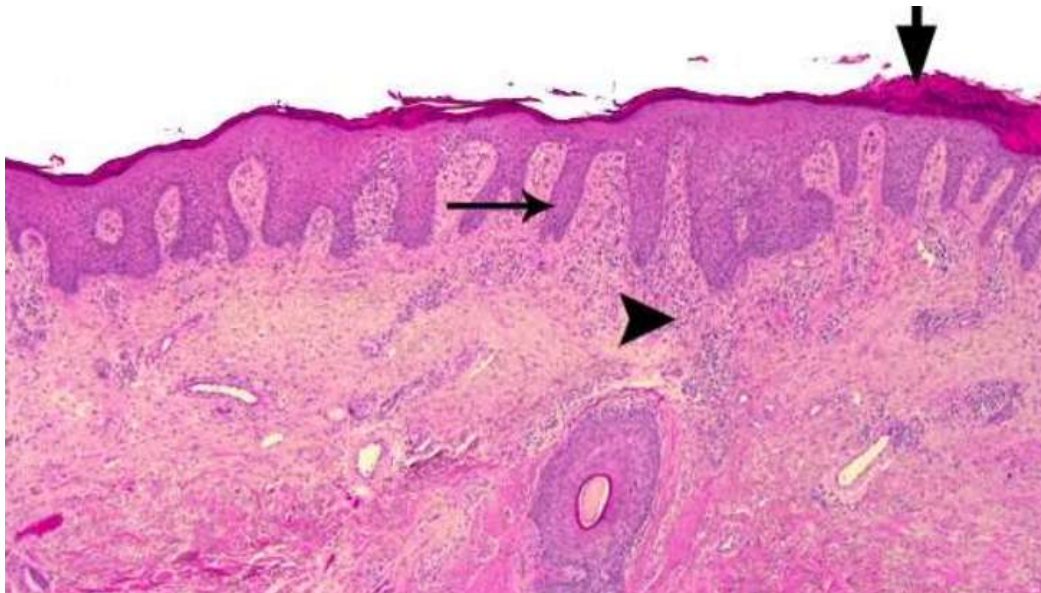
ψωρίασης αλλά όχι και παθογνωμονικά, αφού μπορούν να εμφανισθούν και σε άλλα νοσήματα όπως οομαλός λειχήνα ή η γυροειδής αλωπεκία.

Υπονύχια προσβολή προκαλεί αποχωρισμό του νυχιού από την κοίτη του και ονυχόλυση, ενώ το χαρακτηριστικό υποκίτρινο χρώμα του προσβεβλημένου όνυχα, δίκην “σταγόνας λαδιού”, οφείλεται στη φλεγμονή και τη συσσώρευση ορώδους εξιδρώματος στον υπονύχιο χώρο. Η σταδιακή ανάπτυξη υπονύχιας υπερκεράτωσης από την περιφέρεια του νυχιού προς το κέντρο και η φλεγμονώδης προσβολή της μήτρας του νυχιού μπορεί να προκαλέσει σοβαρή ονυχοδυστροφία και να οδηγήσει σε παροδική απώλεια των ονύχων. Στη φλυκταινώδη μορφή της ψωρίασης μπορούν να προκληθούν καταστροφικές αλλαγές των νυχιών λόγω της προσβολής της μήτρας του νυχιού και του υπονύχιου από άσηπτες φλύκταινες (ακροδερματίτιδα του Hallopeau). Οι ψωριασικές αλλαγές των ονύχων συχνά επιδεινώνονται από μυκητιασικές επιμολύνσεις από δερματόφυτα ή candida ενώ, σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορούν να αποτελέσουν πύλες εισόδου μικροβίων με αποτέλεσμα την εκδήλωση βακτηριακών λοιμώξεων του δέρματος.

## 1.2 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Αρχικά εμφανίζεται διαστολή των τριχοειδών και οίδημα στο θηλώδες χόριο, με λεμφοκυτταρική περιαγγειακή διήθηση. Τα λεμφοκύτταρα εισέρχονται στο κατώτερο μέρος της επιδερμίδας όπου αναπτύσσεται σπογγίωση. Ακολουθεί μείωση ή εξαφάνιση των κυττάρων της κοκκώδους στιβάδας και έναρξη της παρακερατώσης. Στο ψωριασικό δέρμα, παρατηρούνται οι εξής ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις: 1) Υπερκεράτωση, ακάνθωση, παρακεράτωση, επιμήκυνση των επιθηλιακών

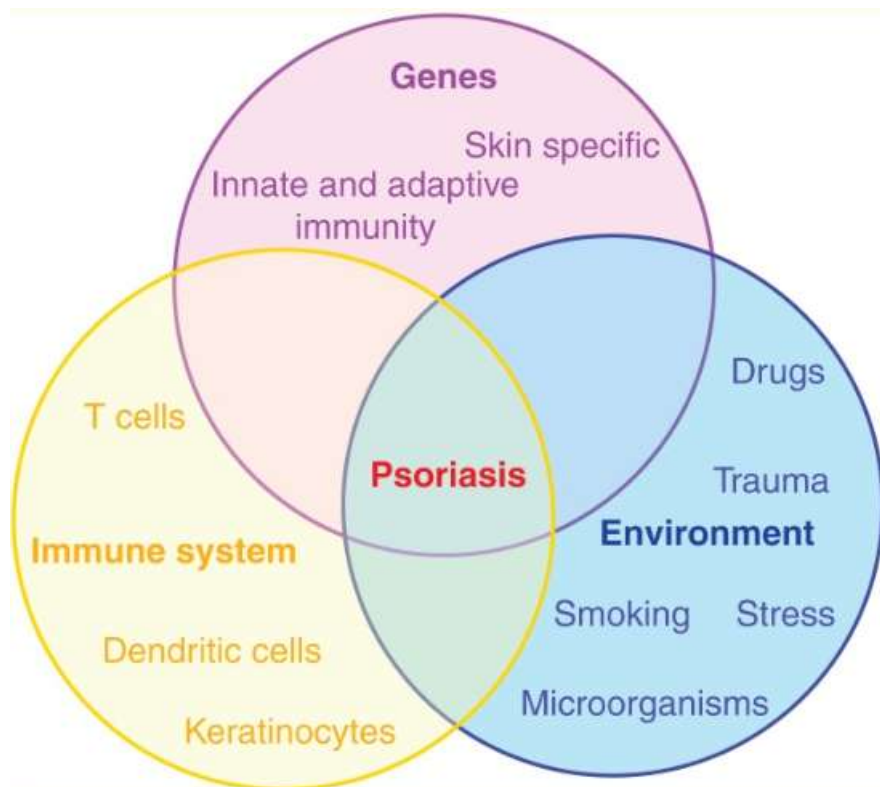
καταδύσεων της επιδερμίδας στο χόριο, 2) λέπτυνση του τμήματος της επιδερμίδας πάνω από τις θηλές και δημιουργία σπογγοειδών φλυκταινιδίων (φλυκταινίδια του Kogoj) λόγω συσσωρεύσεως ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων, 3) ελάττωση ή πλήρης έλλειψη της κοκκώδους στιβάδας, 4) μικροαποστημάτια Munro, τα οποία σχηματίζονται στην κεράτινη στιβάδα των πρώιμων αλλοιώσεων, κυρίως από την συνάθροιση ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων. 5) επιμήκυνση και οίδημα στις θηλές του χορίου, 6) διαστολή και ελικοειδής διαμόρφωση των τριχοειδών 7) φλεγμονώδης διήθηση από λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηννα, και μαστοκύτταρα στο χόριο (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5.** Ιστοπαθολογική απεικόνιση της ψωρίασης. 1. υπερκεράτωση με παράκεράτωση, κάθετο βέλος 2. πάχυνση της επιδερμίδας (ακάνθωση), με επιμήκυνση των θηλών του χορίου, μακρύ βέλος 3. χρόνια φλεγμονώδη διήθηση του άνω χορίου που αποτελείται κυρίως από μικρά T-λεμφοκύτταρα, οριζόντια αιχμή βέλους.

### 1.3 ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η έναρξη σύνθετων ασθενειών, όπως η ψωρίαση, λαμβάνει χώρα σε γενετικά προδιάθετα άτομα στα οποία εμφανίζεται μια μη ρυθμισμένη ανοσοαπόκριση μετά από έκθεση σε ορισμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αν και οι μηχανισμοί που συνδέουν διακριτούς περιβαλλοντικούς παράγοντες με συγκεκριμένους γενετικούς καθοριστές και μη ρυθμισμένες ανοσολογικές διαδικασίες είναι ακόμη άγνωστοι, ωστόσο έχουν προσδιοριστεί οι κρίσιμοι καθοριστικοί παράγοντες αυτής της παθολογικής αλληλεπίδρασης (Εικόνα 6).

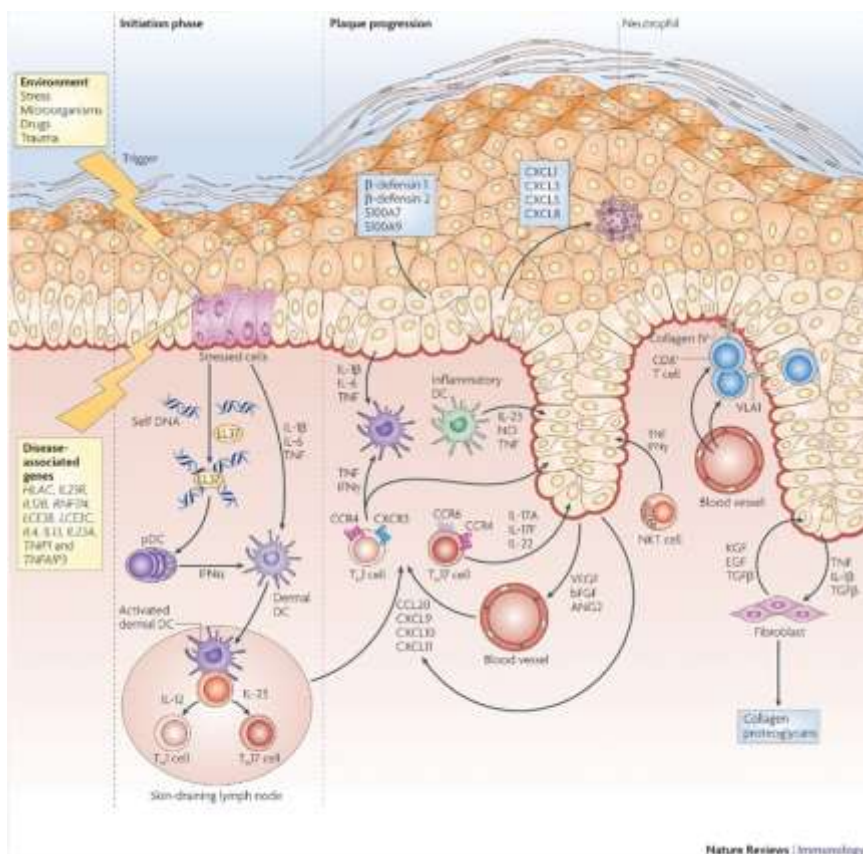


**Εικόνα 6. Η αιτιοπαθογένεια της ψωρίασης.** Η ασθένεια λαμβάνει χώρα σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα, τα οποία φέρουν ένα ή περισσότερα γονίδια ευαισθησίας στην ψωρίαση, στα οποία εμφανίζεται μια μη ρυθμισμένη ανοσοαπόκριση μετά από έκθεση σε ορισμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες.<sup>31</sup>

Αρχικά η ψωρίαση θωρήθηκε ως μια νόσος που οφειλόταν αποκλειστικά στον αυξημένο πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων. Η παρουσία του διεγερμένου ανοσιακού συστήματος είχε παρατηρηθεί από πολύ νωρίς όμως η ενεργή συμμετοχή του στην παθογένεια της νόσου έγινε αντιληπτή όταν το 1970 παρατηρήθηκε βελτίωση της νόσου μετά από χορήγηση κυκλοσπορίνης που είναι ανοσοκατασταλτικό φάρμακο. Έτσι μετά ακολούθησε η συσσώρευση επιστημονικών στοιχείων που υποστήριζε τη σπουδαιότητα του διαταραγμένου ανοσολογικού συστήματος στην ψωρίαση.<sup>32, 33, 34</sup>

Η φυσική ανοσία παρέχει στον οργανισμό μια γρήγορη μη ειδική απάντηση σε ερεθίσματα. Συγκεκριμένα, κάποιο περιβαλλοντικό ερέθισμα όπως ένα τραύμα, ένα μικρόβιο κλπ προκαλεί την παραγωγή IFN-α από τα πλασματο-κυτοειδή δένδριτικά κύτταρα (pDCs), τα οποία ενεργοποιούνται μέσω των Toll-like receptors 7 και 9. Η IFN-α με τη σειρά της ενεργοποιεί τα μυελοειδή δένδριτικά κύτταρα (mDCs) που μετακινούνται στους επιχώριους λεμφαδένες και εκεί επάγουν την διαφοροποίηση των T κυττάρων σε Th1 και 17 μέσω της παραγωγής IL-12 και 23. Με την σειρά τους τα T κύτταρα παράγουν ουσίες όπως ιντερλευκίνη 17A, 17F και IL-22 που δρουν στα κερατινοκύτταρα και προκαλούν την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων όπως β-defensins και LL-37 καθελιδίνη, προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως TNF-α, IL-1β, IL-6, χυμοκινών CXCL8 μέχρι 11 και S100 πρωτεϊνών. Με τον τρόπο αυτό η φυσική και η επίκτητη ανοσία πλέκουν τον ιστό της ψωριασικής φλεγμονώδους διαδικασίας με γέφυρα τα ενεργοποιημένα μυελοειδή δένδριτικά κύτταρα του χορίου και τα T κύτταρα να έχουν καθοριστικό ρόλο στην επιδερμίδα (Εικόνα 7).





Εικόνα 7. Αιτιοπαθογένεια της ψωρίασης<sup>35</sup>

## 1.7 ΣΥΝΟΣΗΡΟΤΗΤΕΣ

### 1.7.1. Ψωριασική Αρθρίτιδα

Περίπου το 15%-30% των ανθρώπων με ψωρίαση τελικά θα αναπτύξουν ψωριασική αρθρίτιδα, μια συχνά δύσκολη μυοσκελετική κατάσταση η οποία είναι συνήθως οροαρνητική για τον ρευματοειδή παράγοντα.<sup>36</sup> Συνήθως ακολουθεί τη δερματική προσβολή (75%) μπορεί όμως να προηγείται (10-15%) ή να εμφανίζεται ταυτόχρονα με τη δερματική προσβολή (10%). Σε κάποιες ελάχιστες περιπτώσεις μπορεί να υπάρχει αρθρίτιδα ή ονυχία χωρίς δερματική προσβολή. Προσβάλλει εξίσου άνδρες

και γυναίκες και οι κλινικές μορφές είναι: 1. Η ασύμμετρη ολιγοαρθρίτιδα ή περιφερική μονοαρθρίτιδα , η οποία είναι η συχνότερη μορφή, 2. η άπω μεσοφαλαγγική αρθρίτιδα, 3. η συμμετρική πολυαρθρίτιδα, 4. η σπονδυλίτιδα και τέλος, 5. η παραμορφωτική αρθρίτιδα.

Κλινικά μπορεί να εμφανιστεί με οίδημα, πόνο, φλεγμονή και παραμόρφωση της άρθρωσης που επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την λειτουργικότητα της και μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμες βλάβες. Σχετικά με το γενετικό υπόβαθρο της νόσου υπάρχουν γονίδια κοινά για την ψωρίαση και την ψωριασική αρθρίτιδα όπως τα HLA-Cw\*06 και IL12B, IL23R και άλλα που σχετίζονται μόνο με την ψωρίαση όπως τα γονίδια του επιδερμικού φραγμού LCE (Late cornified envelope) ή μόνο με την αρθρίτιδα όπως της ιντερλευκίνης 13. Επίσης στην ψωριασική αρθρίτιδα παίζουν ρόλο πολυμορφισμοί του TNF (Tumor Necrosis Factor) (-238A και -857T) και αλληλία του γονιδίου MIC.

### **1.7.2. Άλλες παθήσεις**

Η ψωρίαση εκτός από το δέρμα και τις αρθρώσεις, συσχετίζεται συχνά με την καρδιαγγειακή νόσο, με το μεταβολικό σύνδρομο καθώς και αυτοάνοσες ασθένειες όπως η νόσος του Crohn και η ρευματοειδής αρθρίτιδα, οι συνέπειες των οποίων αποκαλύπτουν την συστηματική φύση της ψωρίασης (Psoriatic March).<sup>37, 38, 39, 40</sup>

Πρόσφατη μελέτη σε 469.097 ασθενείς με ψωρίαση στις Ηνωμένες Πολιτείες ανέδειξε τον επιπολασμό και την συχνότητα εμφάνισης 24 συννοσηροτήτων. Οι συνηθέστερες παθήσεις ήταν η υπερλιπιδαιμία (45,64% και 30,83% για τον επιπολασμό και την συχνότητα αντίστοιχα), η υπέρταση (42,19% και 24,19%), η

κατάθλιψη (17,91% και 12,68%), ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (17,45% και 8,44%) και η παχυσαρκία 14.38% και 11,57%).<sup>41</sup>

## **1.8 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΨΩΡΙΑΣΗΣ**

Από πλευράς θεραπευτικής υπάρχει πλούσια θεραπευτική φαρέτρα για τον έλεγχο της νόσου. Αυτή περιλαμβάνει τοπικές και συστηματικές θεραπείες.

Στις τοπικές εντάσσονται: Ανθραλίνη, ανάλογα βιταμίνης D3, πίσσα, τοπικά κορτικοστεροειδή, μαλακτικοί παράγοντες, θεραπείες με υπεριώδες φως: PUVA, bath PUVA και στενό φάσμα υπεριώδους ακτινοβολίας B.

Συστηματικές Θεραπείες: Μεθοτρεξάτη, κυκλοσπορίνη, ρετινοειδή, εστέρες του φουμαρικού οξέος, υδροξυουρία, απρεμιλάστη (μικρομοριακός αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης 4), βιολογικοί παράγοντες και συνδυασμοί θεραπειών.

### **Βιολογικοί παράγοντες**

#### Ετανερσέπτη

Έχει εγκριθεί για την θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη σύντηξης, που αποτελείται από την εξωκυτάρια περιοχή του ανθρώπινου TNF-α υποδοχέα, σε σύντηξη με το Fc τμήμα της ανθρώπινης IgG1.

### Αδαλιμουμάμπη

Χρησιμοποιείται στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της ψωρίασης. Είναι ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον του TNF-α που αναστέλλει την αλληλεπίδραση με τους p55, p75 υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας.

### Ινφλιξιμάμπη

Πρόκειται για ένα χιμαιρικό ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του TNF-α. Αδρανοποιεί τον διαλυτό TNF-α και αναστέλλει τον συνδεδεμένο TNF-α στις κυτταρικές μεμβράνες. Χρησιμοποιείται στην ψωρίαση και φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου.

### Ουστεκινουμάμπη

Πρόκειται για πλήρως ανθρώπινο μονοκλωνικό IgG1 αντίσωμα έναντι της ιντερλευκίνης 12/23. Χρησιμοποιείται για την θεραπεία μέτριας ως σοβαρής ψωρίασης.

### Σεκουκινουμάμπη

Ανθρώπινο Ig1k μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον της ιντερλευκίνης 17A (IL-17)

### Ιξεκιζουμάμπη

Ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον της ιντερλευκίνης 17A (IL-17)

Μπρονταλουμάμπη

Ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 17A (IL-17)

Γκουσελκουμάμπη

Μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον της υπομονάδας p19 της ιντερλευκίνης 23 (IL-23)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

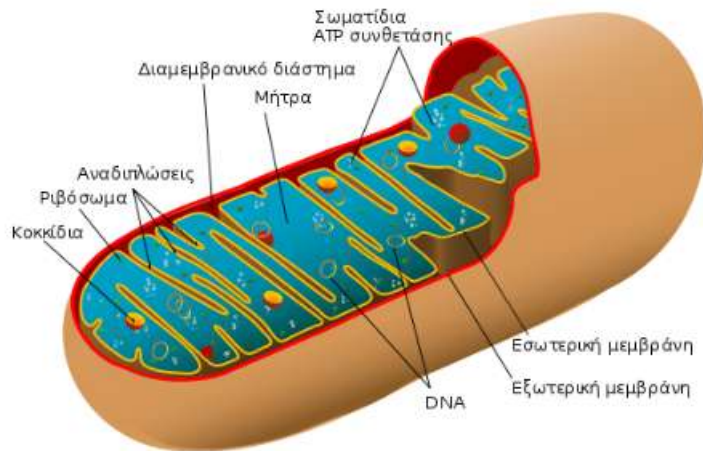
### 2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια μέσα στα κύτταρα των ευκαρυωτικών οργανισμών που εκτελούν ποικίλα καθήκοντα για τη σωστή λειτουργία των κυττάρων. Εμπλέκονται σε λειτουργίες εντός του κυττάρου αλλά και εκτός αυτού. Μέσα στο κύτταρο παράγουν ATP μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, γι αυτό άλλωστε αποκαλούνται συχνά «εργοστάσια του κυττάρου», ρυθμίζουν μια σειρά από μεταβολικές οδούς όπως την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), συνθέτουν λιπαρά οξέα, ομάδες αίμης και σιδήρου-θείου που είναι σημαντικά συστατικά της αιμοσφαιρίνης, αποθηκεύουν και απελευθερώνουν ιόντα ασβεστίου λαμβάνοντας έτσι μέρος στην ομοιόσταση του  $Ca^{2+}$ <sup>42</sup>, ενεργοποιούν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και την αυτοφαγία, μεσολαβούν στην φυσική ανοσία και παράγουν και μεταφέρουν ηλεκτρόνια. Σε επίπεδο εκτός του κυττάρου, ρυθμίζουν την επικοινωνία μεταξύ κυττάρων και ιστών.<sup>43, 44, 45</sup>

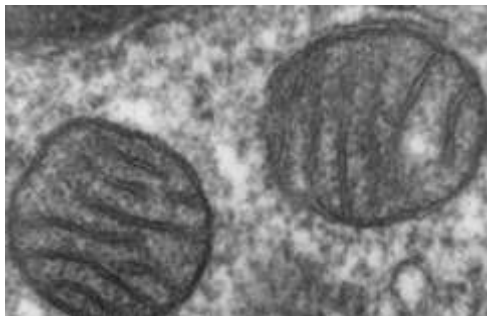
Ο αριθμός των μιτοχονδρίων ανά κύτταρο εκτιμάται ότι κυμαίνεται από μηδέν, με παράδειγμα τα ερυθροκύτταρα, έως κάποιες χιλιάδες, όπως τα ηπατικά κύτταρα που έχουν περισσότερα από 2000 μιτοχόνδρια, με το καθένα να περιέχει το δικό του γονιδίωμα. Τα μιτοχόνδρια σε μεγάλη ποσότητα εμφανίζονται σε κύτταρα με υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια (μυϊκά κύτταρα, νευρικά κύτταρα, κύτταρα των αισθητηρίων οργάνων, ωάρια, κ.λπ.). Στα μυϊκά κύτταρα της καρδιάς, έχουμε ένα ποσοστό μιτοχονδρίων του 36%. Ευκαρυωτικά κύτταρα, που θα χάσουν τα μιτοχόνδριά τους, δεν μπορούν πλέον να αναζωογονηθούν. Ωστόσο, υπάρχουν και ευκαρυωτικά κύτταρα χωρίς μιτοχόνδρια (π.χ. ορισμένα πρωτόζωα).

Η προέλευση των μιτοχονδρίων πιστεύεται ότι προέρχεται από ένα απρωτοβακτήριο που ενδοσυμβίωσε μέσα στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αυτό υπολογίζεται ότι συνέβη πριν από περίπου 1,5 δισεκατομμύρια χρόνια.<sup>46</sup> Παραδόξως, αυτό το οργανίδιο βακτηριακής προέλευσης έχει έκτοτε όχι μόνο γίνει αποδεκτό από το ανοσοποιητικό σύστημα, αλλά παίζει κεντρικό ρόλο ως ρυθμιστής των κυτταρικών διαδικασιών κινδύνου, ενεργοποιώντας όλα τα στάδια φλεγμονωδών αποκρίσεων.<sup>47</sup>

Μιτοχόνδρια παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά την δεκαετία του 1840, ταυτοποιήθηκαν όμως ως ανεξάρτητα κυτταρικά οργανίδια το 1894. Τα μιτοχόνδρια έχουν δύο μεμβράνες, μια εξωτερική και μια εσωτερική. Αυτές οι μεμβράνες κατασκευάζονται από στρώματα φωσφολιπιδίων, όπως και η εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου. Η εξωτερική μεμβράνη καλύπτει την επιφάνεια του μιτοχονδρίου, ενώ η εσωτερική μεμβράνη βρίσκεται μέσα και έχει πολλές πτυχές. Οι πτυχές αυξάνουν την επιφάνεια της μεμβράνης, η οποία είναι σημαντική επειδή η εσωτερική μεμβράνη συγκρατεί τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Εκεί επίσης συμβαίνουν πολλές άλλες χημικές αντιδράσεις για την εκτέλεση των πολλών λειτουργιών των μιτοχονδρίων. Μια αυξημένη επιφάνεια δημιουργεί περισσότερο χώρο για περισσότερες αντιδράσεις και αυξάνει την παραγωγή μιτοχονδρίων. Ο χώρος μεταξύ των εξωτερικών και εσωτερικών μεμβρανών ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος και ο χώρος μέσα στην εσωτερική μεμβράνη ονομάζεται μήτρα. Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) τους βρίσκεται μέσα στην μήτρα<sup>48, 49</sup> (Εικόνα 8α).



α.



β.

**Εικόνα 8 α.** Δομή μιτοχονδρίου. **β.** απεικόνιση μιτοχονδρίου με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Η πρώτη ηλεκτρονική απεικόνιση των μιτοχονδρίων δείχνει ένα στατικό πορτραίτο των μιτοχονδρίων που μοιάζει με φασόλι<sup>50</sup> (Εικόνα 9β). Οι νέες απεικονιστικές μέθοδοι εισήγαγαν ένα πιο δυναμικό προφίλ για τα μιτοχόνδρια, αποκαλύπτοντας ένα πολύ κινητό πληθυσμό από σωληνάρια σε ποικίλα μήκη.<sup>51, 52</sup>

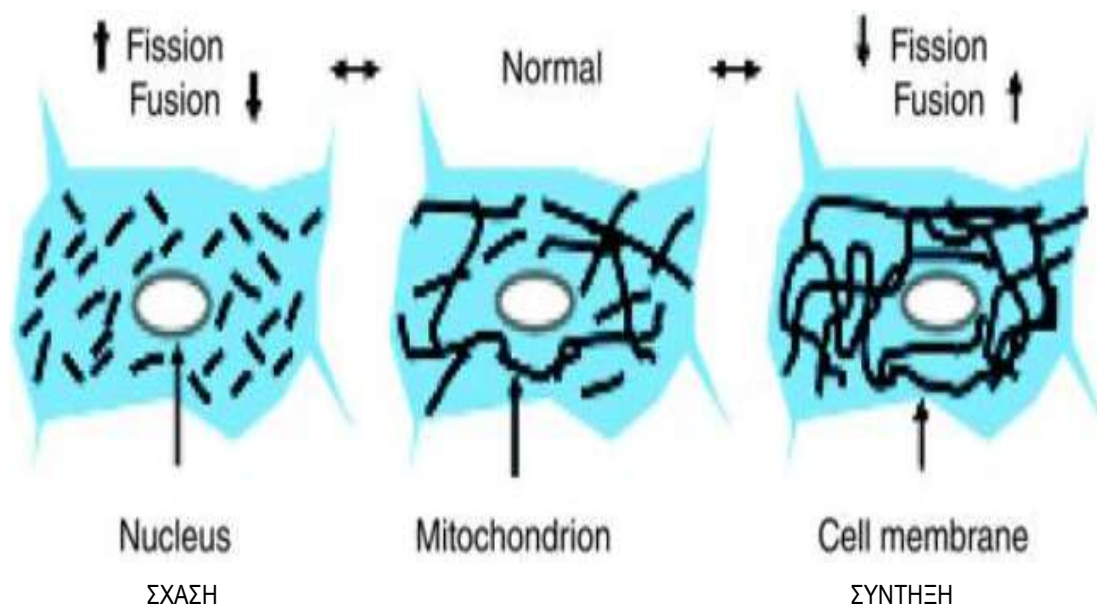
Σε καλλιεργούμενα κύτταρα, όπως οι εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού, οι μεμονωμένοι σωληνίσκοι μπορούσαν να παρατηρηθούν συνεχώς κινούμενοι και να υφίστανται πολλαπλές σχάσεις, κατά τις οποίες ένα σωληνάριο χωρίζεται σε δύο κατά μήκος του βραχέως ή εγκάρσιου άξονα. Επίσης υφίστανται σύντηξη, στην οποία συναντώνται δύο σωληνίσκοι για να συγχωνευθούν σε ένα.<sup>53</sup> Αυτές οι παρατηρήσεις,



και η ανακάλυψη βασικών αναπτυξιακών παραγόντων που ελέγχουν τη διαδικασία, ξεκίνησε από έρευνα εδώ και τρεις δεκαετίες που ονομάζεται πλέον μιτοχονδριακή δυναμική.<sup>54</sup>

## 2.2 ΣΧΑΣΗ-ΣΥΝΤΗΞΗ

Τα μιτοχόνδρια αλλάζουν το μέγεθος, το σχήμα και τη θέση τους κατά τη διάρκεια μερικών δευτερολέπτων. Πολλές από αυτές τις αλλαγές σχετίζονται με την ικανότητα τους να υπόκεινται σε πολύ συντονισμένες διαδικασίες: την σχάση (διαίρεση ενός μοναδικού οργανισμού σε δύο ή περισσότερες ανεξάρτητες δομές) ή τη σύντηξη (αντίθετη αντίδραση). Αυτό συμβαίνει προκειμένου να μπορούν να ανταπεξέρχονται σε όλες τις λειτουργίες τους. Η ισορροπία μεταξύ αυτών ρυθμίζει τη συνολική μορφολογία των μιτοχονδρίων μέσα στο κύτταρο (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Απεικόνιση Σχάσης και Σύντηξης των μιτοχονδρίων στο κύτταρο<sup>55</sup>

Η ρύθμιση της μιτοχονδριακής μορφολογίας είναι σημαντική για τη διατήρηση της κυτταρικής λειτουργίας και η δυσλειτουργία της συνδέεται με μια όλο και μεγαλύτερη αναλογία ανθρώπινων κληρονομικών διαταραχών και εμπλέκεται σε κοινές ασθένειες, όπως είναι οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές, οι καρδιομυοπάθειες, το μεταβολικό σύνδρομο, ο καρκίνος και η παχυσαρκία.

Η μιτοχονδριακή σχάση απαιτείται να γίνει πριν την διαίρεση του κυτταροπλάσματος κατά την μίτωση καθώς τα μιτοχόνδρια δεν μπορούν να σχηματιστούν *de novo*. Πριν από τη διαίρεση των κυττάρων, ο μιτοχονδριακός πληθυσμός πρέπει επίσης να διαιρείται και να εντοπίζεται και στις δύο πλευρές του επιπέδου διαίρεσης, έτσι ώστε κάθε νέο κύτταρο να μπορεί να λαμβάνει μέρος των οργανιδίων.

Ωστόσο, η μιτοχονδριακή σχάση και σύντηξη παρατηρούνται συνεχώς σε πολλά μη διαιρούμενα κύτταρα, υποδεικνύοντας ότι πρέπει να είναι απαραίτητες και για άλλες λειτουργίες πέραν της μίτωσης. Η σχάση συμβάλει στον ποιοτικό έλεγχο, επιτρέποντας τον διαχωρισμό των κατεστραμμένων τμημάτων των μιτοχονδρίων που θα εξαλειφθούν με αυτοφαγία. Η σύντηξη βοηθά στην άμβλυση του στρες με την ανάμιξη των περιεχομένων των μερικώς κατεστραμμένων μιτοχονδρίων ως μια μορφή συμπληρώματος.<sup>56</sup> Η απομάκρυνση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων με την αυτοφαγία είναι μια ρυθμιζόμενη διαδικασία, που ονομάζεται μιτοφαγία, η οποία είναι κρίσιμη για την πρόληψη των κυτταροτοξικών επιδράσεων που προκαλούνται από δυσλειτουργίες των μιτοχονδρίων και για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης.

Οι γενετικές μελέτες σε μύγες, ζυμομύκητες και σκουλήκια έβαλαν τα πρώιμα θεμέλια στην κατανόηση της μιτοχονδριακής δυναμικής, προσδιορίζοντας τους παράγοντες που απαιτούνται για τη σχάση και την σύντηξη. Η πρώτη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη

σύντηξης που ανακαλύφθηκε ήταν η 'χνουδωτά κρεμμύδια' fuzzy onions (Fzo), που ονομάστηκε έτσι λόγω της εμφάνισής της σε διατομή λίγο πριν την σύντηξη στα σπερματοζωάρια των μεταλλαγμάτων *Drosophila fzo*. Ομόλογα σε ζυμομύκητες (Fzo1p), ποντίκια και ανθρώπους (Mfn1 και Mfn2 για μιτοφουσίνη 1 και μιτοφουσίνη 2, αντίστοιχα) ταυτοποιήθηκαν στη συνέχεια, με μεταλλάξεις που σηματοδοτούν την απώλεια λειτουργίας αυτών των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα κατακερματισμένα μιτοχόνδρια από τη μείωση της μιτοχονδριακής σύντηξης.<sup>57,58,59,60</sup> Αυτές οι πρωτεΐνες στους ανθρώπους οι οποίες όπως προαναφέρθηκε αποκαλούνται μιτοφουσίνες, εντοπίζονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και είναι απαραίτητες για τη σύντηξη.<sup>61, 62, 63</sup>

Η σύντηξη της εσωτερικής μεμβράνης βρέθηκε να προκαλείται από τη 'διατήρηση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος 1', mitochondrial genome maintenance 1 (Mgm1p) σε 3 ζυμομύκητες και της 'οπτικής ατροφίας τύπου 1', optic atrophy type 1 (Opa1) σε θηλαστικά.<sup>64, 65, 66, 67</sup>

Στην σύντηξη λοιπόν εμπλέκονται 3 μεγάλες GTPασες. Η Μιτοφουσίνη 1 (Mfn1), η μιτοφουσίνη 2 (Mfn 2) και η Οπτική Ατροφία 1 (OPA1). Οι δύο πρώτες είναι διαμεμβρανικές και βρίσκονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και η OPA1 βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη. Σε κύτταρα θηλαστικών που στερούνται Opa1, η σύντηξη της εξωτερικής μεμβράνης, αλλά όχι η σύντηξη εσωτερικής μεμβράνης, παρατηρείται, υποδηλώνοντας ότι η πλήρης μιτοχονδριακή σύντηξη προχωρά με διαδοχικό τρόπο, πρώτα με τη μεσολαβούμενη από μιτοφουσίνη σύντηξη της εξωτερικής μεμβράνης, ακολουθούμενη από τη σύντηξη της εσωτερικής μεμβράνης με την Opa1.<sup>68, 69</sup>

Η σύντηξη γίνεται για να αναμειχθεί το περιεχόμενο των μιτοχονδρίων. Από τις 1000 και περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, μόνο οι 13 εκφράζονται από το mtDNA,

οι υπόλοιπες εκφράζονται από το γονιδίωμα του πυρήνα και εισάγονται από το κυτοσόλιο. Κατά τη βιογένεση των μιτοχονδρίων, τα επίπεδα αυτών των δύο συνόλων πρωτεϊνών πρέπει να ρυθμίζονται συντονισμένα. Εάν δεν υπήρχε σύντηξη, καθένα από τα μερικές εκατοντάδες μιτοχόνδρια σε ένα τυπικό κύτταρο θα ενεργούσαν αυτόνομα. Έτσι με την συντήξη το περιεχόμενό τους ομογενοποιείται και μπορούν να δρουν ως συνεκτικός πληθυσμός. Όταν δεν γίνεται η σύντηξη και άρα χάνεται η μίξη του περιεχομένου, δημιουργείται αστάθεια στο mtDNA και συγκεκριμένα μεγάλη μείωση του mtDNA το οποίο κωδικοποιεί 13 υπομονάδες που εμπλέκονται στην αναπνευστική αλυσίδα, με αποτέλεσμα να υπάρξει μειωμένη αναπνευστική ικανότητα. Άρα η σύντηξη φαίνεται να παίζει έναν προστατευτικό ρόλο σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις.<sup>70</sup> Οι περισσότερες μεταλλάξεις mtDNA που προκαλούν εγκεφαλοπάθεια είναι υπολειπόμενες και τα κύτταρα των θηλαστικών αντέχουν έναν μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων χωρίς μείωση της αναπνευστικής ικανότητας.<sup>71, 72</sup> Αυτό μπορεί να συμβαίνει επειδή γίνεται μίξη του περιεχομένου κατά την σύντηξη, και άρα διόρθωση των μεταλλάξεων του mtDNA.<sup>73</sup>

Από την άλλη πλευρά, το μονοπάτι της κυτταρικής απόπτωσης εξαρτάται από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλων προαποπτωτικών μορίων από το εσωτερικό μιτοχονδριακό διάστημα.<sup>74</sup> Η απελευθέρωση συμβαίνει όταν η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη αυξάνει την διαπερατότητα της λόγω των δράσεων της αποπτωτικής οικογένειας των πρωτεϊνών Bcl-2. Όταν γίνεται απόπτωση, τα μιτοχόνδρια υπόκεινται σε σχάση και η κύρια πρωτεΐνη που ρυθμίζει την διαδικασία αυτή είναι η 'συσχετιζόμενη με την Δυναμίνη Πρωτεΐνη 1, DRP1. Αναστολή της λειτουργίας της DRP1, μπορεί να αποτρέψει αυτή τη διάσπαση και να μειώσει την απέκκριση του κυτοχρώματος c και τον κυτταρικό θάνατο.<sup>75</sup>

Η έρευνα σε ζυμομύκητες και *C. elegans* ταυτοποίησε την πρωτεΐνη 'σχετική με τον ζυμομύκητα 1' (DyNaMin-related 1, Dnm1) και η έρευνα σε σκωλήκια την 'σχετιζόμενη με δυναμίνη πρωτεΐνη 1' (dynamin-related protein 1, DRP-1) ως παράγοντα που απαιτείται για τη μιτοχονδριακή σχάση,<sup>76, 77, 78</sup> Οι μεταλλάξεις στη Dnm1 του ζυμομύκητα και στην DRP-1 του σκώληκα *C. elegans* αποδείχθηκαν ότι αποκλείουν την σχάση, καταλήγοντας σε πολύ επιμήκη μιτοχόνδρια.<sup>75, 77</sup> Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με άλλες μεθόδους ζωντανής απεικόνισης εντόπισαν τις πρωτεΐνες στα μιτοχόνδρια και η υπερέκφραση των πρωτεϊνών αυτών οδήγησε σε κατακερματισμένα μιτοχόνδρια.<sup>75, 76</sup>

Αυτή η εμπλοκή της DRP1 επιβεβαιώθηκε σε αρκετές μελέτες.<sup>79, 80, 81</sup> Αντίθετα, η μιτοχονδριακή σύντηξη προστατεύει ενάντια σε αποπτωτικά ερεθίσματα,<sup>82</sup> αν και υπάρχουν εξαιρέσεις.<sup>83</sup> Παρόλα αυτά, οι μελέτες είναι αντικρουόμενες ως προς το αν η μιτοχονδριακή διάσπαση παίζει κεντρικό ρόλο στην κυτταρική απόπτωση.<sup>84, 85</sup> Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι η αναστολή της DRP1 δεν καθυστερεί την απέκριση του κυτοχρώματος c και τελικά δεν μειώνει την έκταση του κυτταρικού θανάτου.<sup>86, 87</sup>

Συνολικά, αυτές οι μελέτες των Dnm1, των μιτοφουσινών και της Opa1 καθιέρωσαν ένα "διπλού ελέγχου" μοντέλο μιτοχονδριακής δυναμικής, στην οποία η συνολική μορφολογία του μιτοχονδριακού πληθυσμού σε ένα κύτταρο καθορίζεται από την αντίθετη δράση της σχάσης μέσω της Dnm1, και της σύντηξης από τις Mfn1 / 2 και Opa1.<sup>88</sup> Δοκιμασίες με ποντίκια απέδειξαν σαφώς ότι αυτή η ισορροπία είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη των οργανισμών, καθώς και το ότι η απώλεια οποιουδήποτε από τους 4 σημαντικούς παράγοντες (Mfn1, Mfn2, Opa1, Dnm1) οδηγεί σε εμβρυϊκή θνησιμότητα.<sup>89, 90, 91, 92</sup> Επιπλέον, οι παραλλαγές σε καθέναν από αυτούς τους παράγοντες προκαλούν ασθένειες που έχουν περιγραφεί σε ανθρώπους.<sup>93</sup>

Τα μιτοχόνδρια έχουν επίσης τοποθετηθεί ως κεντρικός ρυθμιστής της κυτταρικής άμυνας. Ρυθμίζουν την κυτταρική ανταπόκριση με εμπλοκή κρίσιμων εγγενών ανοσολογικών υποδοχέων. Επιπλέον, κατά το στρες ή όταν τα κυττάρα υποστούν βλάβες, τα μιτοχονδριακά συστατικά απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα ή στο κυτταρικό περιβάλλον, όπου λειτουργούν ως σήματα κινδύνου και αναγνωρίζονται από τους εγγενείς ανοσολογικούς υποδοχείς. Τέλος, ρυθμίζοντας την ενεργητική κατάσταση της ανοσολογικής σύναψης μεταξύ των δενδριτικών κυττάρων και των λεμφοκυττάρων, τα μιτοχόνδρια ρυθμίζουν τη μοίρα της φλεγμονής προς ανοσοτοξικότητα ή ανοσογονικότητα. Καθώς οι δυσλειτουργίες αυτών των διαδικασιών έχουν πρόσφατα εμπλακεί σε διάφορες ασθένειες, η ταυτοποίηση των υποκείμενων μηχανισμών μπορεί να ανοίξει νέες οδούς για τη ρύθμιση της φλεγμονής.<sup>94</sup>

Τα μιτοχόνδρια λοιπόν, εμπλέκονται στην φλεγμονή παίζοντας ενεργό ρόλο στην φυσική ανοσία, στην επίκτητη ανοσία καθώς και στον κυτταρικό θάνατο με πολύπλοκους μοριακούς μηχανισμούς.<sup>93</sup>

## **2.3 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ**

### **2.3.1 Ο ρόλος της Συσχετιζόμενης με την Δυναμίνη Πρωτεΐνη 1, DRP1 στην σχάση.**

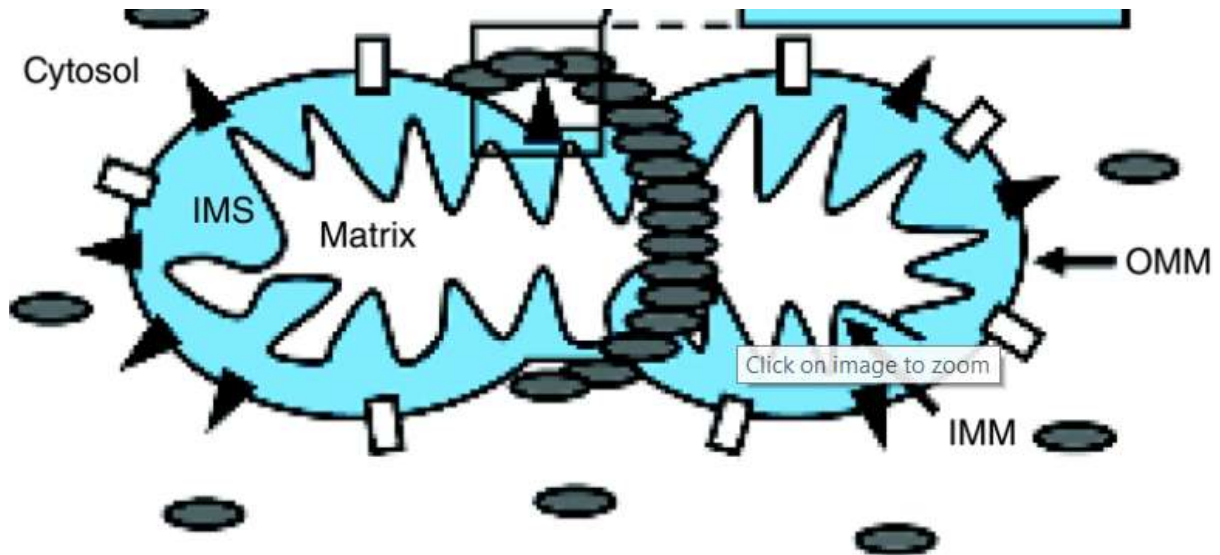
Στην ενδοκύτωση, τα συστατικά που εισέρχονται στο κύτταρο περιβάλλονται από τη μεμβράνη του πλάσματος, η οποία στη συνέχεια σχηματίζει ένα κυστίδιο που μπορεί

να κινηθεί μέσα στο κυτταρόπλασμα. Η διάσπαση της μεμβράνης διεξάγεται από την δυναμίνη, ένα μηχανικό ένζυμο που σχηματίζει σφιχτά σπειράματα γύρω από το λαιμό των κυστιδίων για να τα σφίγγει και στη συνέχεια να τα αποκόπτει.

Η δυναμίνη, είναι μια GTPάση που χρησιμοποιεί την ενέργεια που απελευθερώνεται από την υδρόλυση του GTP για να παρέχει τις μηχανικές δυνάμεις που απαιτούνται στα συστήματα διαίρεσης.<sup>95</sup>

Η Drp1 είναι μια πρωτεΐνη ομόλογη της δυναμίνης, η οποία βρίσκεται στο κυτοσόλιο και προσλαμβάνεται σε θέσεις μιτοχονδριακής σχάσης στην μιτοχονδριακή επιφάνεια και αποκόπτει τα μιτοχόνδρια ρυθμίζοντας έτσι την σχάση<sup>96, 97, 98</sup> (Εικόνα 10). Η πρόσληψή της γίνεται από τις Fis 1, Mff, MiD49 και MiD51 πρωτεΐνες-υποδοχείς που βρίσκονται στην μιτοχονδριακή επιφάνεια.<sup>99</sup> Κατά τη διάρκεια της σχάσης, περικυκλώνει την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη στα σημεία κοπής και πραγματοποιεί τα τελευταία βήματα της σχάσης.<sup>100</sup>

Σε αυτές τις θέσεις διάσπασης, η DRP1 σχηματίζει μεγάλα ομοπολυκεντρικά σύμπλοκα που περικλείουν το μιτοχόνδριο σε σπείρες, οι οποίες στη συνέχεια συστέλλονται με τρόπο εξαρτώμενο από την ενέργεια μέχρις ότου συμβεί η σχάση της μεμβράνης (Εικόνα 10). Οι μεταλλάξεις στη Drp1 μπλοκάρουν τη μιτοχονδριακή σχάση, αναστέλλοντας έτσι την ισορροπία μεταξύ σχάσης και σύντηξης που ελέγχει τη συνολική μιτοχονδριακή μορφολογία και αυτό οδηγεί στο σχηματισμό δικτύων πολύ διασυνδεδεμένων μιτοχονδριακών σωληναρίων, καθώς η μιτοχονδριακή σύντηξη συνεχίζεται κανονικά.<sup>101</sup> Τα ποντίκια που δεν έχουν Drp1, έχουν αναπτυξιακές ανωμαλίες, που έχουν ως αποτέλεσμα εμβρυϊκή θνησιμότητα όπως προαναφέρθηκε.<sup>102, 103</sup>



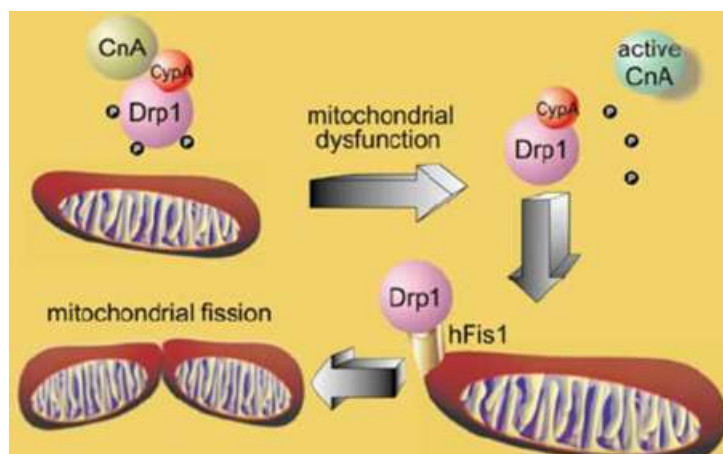
**Εικόνα 10.** Μιτοχονδριακή σχάση από περιτύλιξη της DRP1 στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. DRP 1: μαύρο οβάλ σχήμα.<sup>101</sup>

Κανονικά η φωσφορυλιωμένη Drp-1 βρίσκεται σε ένα κυττασολικό σύμπλεγμα με την καλσινευρίνη (cytosolic calcineurin). Η ενεργοποίηση της τελευταίας έχει ως αποτέλεσμα την αποφωσφορυλίωση της Drp-1, τη διάστασή της από αυτό το σύμπλεγμα και την μετατόπισή της στα μιτοχόνδρια. Η αναστολή της καλσινευρίνης, προκαλεί αναστολή της Drp-1, με συνέπεια μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.<sup>104</sup>

### 2.3.2 Καλσινευρίνη (protein phosphatase 2A , PP2A), ο ρόλος της στη σχάση

Η αποπόλωση του μιτοχονδρίου επιτυγχάνεται με αύξηση του ασβεστίου μέσα στα μιτοχόνδρια το οποίο προκαλεί ενεργοποίηση της καλσινευρίνης. Η καλσινευρίνη αποφωσφορυλιώνει την DRP1 και έτσι ρυθμίζει τη μετατόπιση της στα μιτοχόνδρια όπως προαναφέρθηκε<sup>105</sup> (Εικόνα 11).





**Εικόνα 11. Ο ρόλος της καλσινευρίνης στα μιτοχόνδρια.** Η καλσινευρίνη αποφωσφωρυλιώνει την DRP 1, η οποία με τη σειρά της μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια και ενεργοποιεί την σχάση.

### 2.3.3 Ο ρόλος της πρωτεΐνης αποσύνδεσης 2- UCP2 στο μιτοχόνδριο

Οι πρωτεΐνες αποσύνδεσης (UCPs) βρίσκονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου μεταβάλλουν την δυναμική της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, reactive oxygen species (ROS).<sup>106</sup> Υπενθυμιστικά, οι δραστικές μορφές οξυγόνου είναι προϊόντα μεταβολισμού του οξυγόνου και εμπλέκονται στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων καθώς και στην κυτταρική ομοιόσταση.

Ειδικά η UCP2, είναι πρωτεΐνη που βρίσκεται σε αρκετούς ιστούς, έχει πολύ μικρό χρόνο ημίσειας ζωής, λιγότερο από 1 ώρα<sup>107</sup> και έχει εμπλακεί στον έλεγχο της παραγωγής μιτοχονδριακού ROS. Παίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση της δυναμικής της μιτοχονδριακής μεμβράνης και στην εξάλειψη της μεταβολικής ενέργειας με σκοπό την πρόληψη της συσσώρευσης του οξειδωτικού στρες.<sup>108</sup> Η UCP2 επίσης

επιβραδύνει την φλεγμονώδη απόκριση των μακροφάγων.<sup>109,110,111</sup> Αν μπλοκάρουμε την UCP2, μειώνεται η έκκριση της IL-4 που επάγει την ενεργοποίηση των M2 μακροφάγων. Έχουμε αποδείξει στο παρελθόν ότι η πρωτεΐνη αυτή αναστέλλει την ενεργοποίηση των ιστιοκυττάρων και μειώνει την περιεκτικότητα σε ισταμίνη.<sup>112</sup> Η ανεπάρκειά της στα κύτταρα του ανοσοποιητικού έχει σημαντικές συνέπειες στην ανάπτυξη της ανοσολογικής αντίδρασης σε μελέτες που έγιναν σε ποντίκια.<sup>113</sup> Ωστόσο ο ρόλος της στην ρύθμιση άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού πέρα των μακροφάγων δεν είναι ακόμα διευκρινισμένος.

Επιπλέον, επισημάνθηκε μια κρίσιμη επίδραση της UCP2 σε διάφορα φυσιολογικά γεγονότα όπως η έκκριση ινσουλίνης, η παχυσαρκία, η διαβητική νευρωνική δραστηριότητα.<sup>114,115,116</sup> Η λειτουργία της UCP2 έχει επίσης συνδεθεί με τις μεταβολικές παθήσεις και την αθηροσκλήρωση.<sup>117, 118, 119, 120</sup>

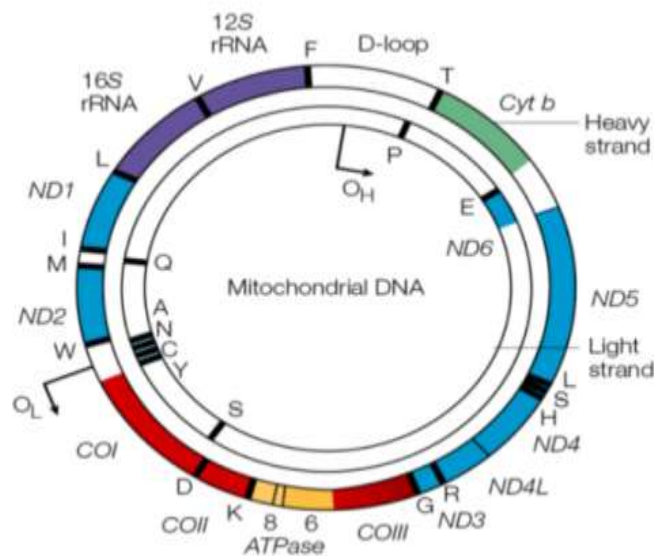
Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο ρόλος της πρωτεΐνης UCP2 είναι προστατευτικός σε χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες.<sup>121</sup> Επιπλέον υπάρχει ένας νέος ρόλος της UCP2 που έχει να κάνει με τη ρύθμιση της αποπτωτικής κάθαρσης των κυττάρων και αποτελεί μια πρόσθετη γνώση για την κατανόηση της σύνθετης αιτιολογίας και της παθογένειας αυτών των ασθενειών.<sup>122</sup>

Η κατανόηση των μοριακών επιπτώσεων της UCP2 στις μεταβολικές οδούς και το πως επηρεάζει την ενεργοποίηση των ανοσοκυττάρων μπορεί να αποτελέσει κλειδί για μελλοντικές θεραπείες σε χρόνιες ασθένειες όπως η ψωρίαση.

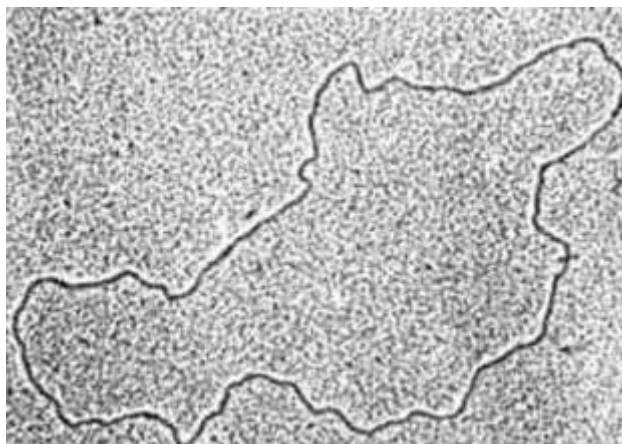
## 2.4 Μιτοχονδριακό DNA

Παρόμοια με το πυρηνικό γονιδίωμα, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι χτισμένο από δίκλωνο DNA, κωδικοποιεί γονίδια και βρίσκεται στην μήτρα (Εικόνα 12). Ωστόσο, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα διαφέρει από το πυρηνικό με διάφορους τρόπους όπως για παράδειγμα ότι είναι κυκλικό, σε αντίθεση με το πυρηνικό που είναι επίμηκες, αλλά και το ότι είναι πιο επιρρεπές σε μεταλλάξεις μιας και δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του μορίου.

Αν και μικρό μέγεθος, είναι υπεύθυνο για τη διασφάλιση της σωστής λειτουργίας των κυττάρων μας. Περιέχει 37 γονίδια που κωδικοποιούν 13 πρωτεΐνες, 22 μεταφορικά RNA (tRNA) και 2 ριβοσωμικά RNA (rRNA). Οι 13 μιτοχονδριακές γονιδιακώς κωδικοποιημένες πρωτεΐνες καθοδηγούν τα κύτταρα να παράγουν πρωτεϊνικές υπομονάδες των συμπλεγμάτων ενζύμου του οξειδωτικού συστήματος φωσφορυλίωσης, το οποίο επιτρέπει στα μιτοχόνδρια να δρουν ως οι δυνάμεις των κυττάρων μας.<sup>123</sup>



A.



**B.**

**Εικόνα 12.** **A.** Μιτοχονδριακό DNA<sup>124</sup>, **B.** μιτοχονδριακό DNA από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Η ποικίλη φύση των μιτοχονδριακών ασθενειών υπογραμμίζει τους πολλούς ρόλους που παίζουν τα μιτοχόνδρια και το DNA τους όχι μόνο ως 'εργοστάσια' παραγωγής ενέργειας αλλά και ως ρυθμιστές του ανοσοποιητικού συστήματος. Πλέον το mDNA θεωρείται ένα από τα 'alarmins', δηλαδή ενδογενή μόρια που βρίσκονται μέσα στον ενδοκυττάριο χώρο των φυσιολογικών κυττάρων και απελευθερώνονται λόγω κάποιας παθολογικής προσβολής.<sup>125</sup> Ο TLR-9 (toll like receptor 9) είναι υποδοχέας που αναγνωρίζει το mDNA.

Ο Collins και η ομάδα του ανέφεραν πρώτοι τις ανοσοδιεγερτικές δυνατότητες του mDNA το 2004. Διαπίστωσαν ότι η ενδοαρθρική ένεση του mDNA, αλλά όχι του πυρηνικού DNA, προκαλεί φλεγμονώδη αρθρίτιδα σε ποντίκια προκαλώντας την έκκριση του TNF-α στα σπληνοκύτταρα.<sup>126</sup> Το mDNA ενεργοποιεί το NLRP3 inflammasome, το οποίο είναι ένα από τα βασικά μονοπάτια της φυσικής ανοσίας, και επάγει την παραγωγή IL-1b και IL-18.<sup>127</sup> Το mDNA επίσης βρέθηκε ότι ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα μέσω δέσμευσης TLR 9.<sup>128</sup> Η ομάδα μας έδειξε στο παρελθόν ότι τα μαστοκύτταρα ως απάντηση στο στρες, εκκρίνουν mDNA το οποίο διεγείρει τα γειτονικά μαστοκύτταρα, τα κερατινοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα

ώστε να παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες.<sup>129</sup> Θραύσματα mtDNA είναι παρόντα σε αρθρικό υγρό ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και η ποσότητα τους συσχετίζεται με τη σοβαρότητα της νόσου.<sup>130</sup> Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι το mtDNA προκαλεί συστηματική φλεγμονώδη απάντηση.

Ένα συνεχές φλεγμονώδες έναυσμα που προκαλείται από το mtDNA συγκεκριμένων κυττάρων, προκαλεί την ενεργοποίηση κυττάρων του ανοσοποιητικού, τα οποία, με τη σειρά τους, αποκρίνονται προκαλώντας μια συστημική απόκριση μέσω της ενεργοποίησης φλεγμονωδών οδών. Η απελευθέρωση κυτοκινών, χημειοκινών, νιτρικού οξειδίου και ROS από φλεγμονώδη κύτταρα μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω βλάβη στα μιτοχόνδρια, αναπτύσσοντας έτσι έναν φαύλο κύκλο, ο οποίος ενισχύει ολόκληρη τη διαδικασία που οδηγεί σε φλεγμονή.<sup>131</sup>

Για τους ανοσολόγους το μιτοχόνδριο μπορεί να αποτελέσει κέντρο του ανοσοποιητικού συστήματος εκτός από κέντρο ενέργειας των κυττάρων. Μετά από πολλές δεκαετίες σκληρής δουλειάς, αξιοσημείωτες εξελίξεις στην ανοσολογική έρευνα έχουν βελτιώσει την κατανόησή μας για το ανοσοποιητικό σύστημα και οι επιστήμονες είναι τώρα καλύτερα εξοπλισμένοι με σύγχρονες γνώσεις και τεχνικές για να περάσουν σε νέα μονοπάτια. Η μελλοντική έρευνα θα συνεχίσει να αποκαλύπτει τις λειτουργίες των μιτοχονδρίων σχετικά με την ανοσία. Εμείς λοιπόν σκεφτήκαμε να μελετήσουμε το κατά πόσο το mtDNA και κάποιες από τις βασικές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες εμπλέκονται στην αιτιοπαθογένεια της ψωρίασης.

## 2.5 ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Διαπιστώσαμε μελετώντας τη βιβλιογραφία ότι μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί το αν τα μιτοχόνδρια και συγκεκριμένα το μιτοχονδριακό τους DNA και οι κύριοι ρυθμιστές τους, εμπλέκονται στην παθογένεια της ψωρίασης. Έτσι αποφασίσαμε να μελετήσουμε τον ενδεχόμενο ρόλο τους και περιγράψω στα επόμενα κεφάλαια αναλυτικά την έρευνα και τα αποτελέσματά μας.

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1 Πληθυσμός Μελέτης

Ο πληθυσμός από τον οποίο προέρχονται οι εθελοντές ασθενείς και οι μάρτυρες αντιπροσωπεύει τον ελληνικό πληθυσμό της μέσης αστικής τάξης που κατοικεί σε μεγάλα αστικά κέντρα της χώρας. Συγκεκριμένα, στην έρευνά μας συμπεριλάβαμε ασθενείς από το νοσοκομείο Ανδρέας Συγγρός (Α' Πανεπιστημιακή Δερματολογική Κλινική), το οποίο λειτουργεί ως κέντρο αναφοράς για περιστατικά από όλη την Ελλάδα, και το Αττικό Νοσοκομείο (Β' Πανεπιστημιακή Δερματολογική Κλινική) στο Χαϊδάρι Αττικής, το οποίο παρέχει υπηρεσίες υγείας σε ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού από το νομό Αττικής. Ο ορός από τους μάρτυρες προέρχονται από παράρτημα του ΙΚΑ (Ίδρυμα Κοινωνικών Ασφαλίσεων) στο νομό Θεσσαλονίκης όπου προσέρχονταν για έλεγχο ρουτίνας, και το δέρμα από τους μάρτυρες από ιδιωτικό ιατρείο στο νομό Αττικής, όπου προσέρχονταν για χειρουργική αφαίρεση σπίλων.

Οι επιτροπές ηθικής δεοντολογίας του Νοσοκομείου 'Αντρέας Συγγρός' και του Αττικού Νοσοκομείου, καθώς και το επιστημονικό συμβούλιο του Πανεπιστημίου Αθηνών ενέκριναν το παραπάνω πρωτόκολλο και όλοι οι συμμετέχοντες έδωσαν την έγγραφη συγκατάθεσή τους σύμφωνα με την διακήρυξη των αρχών της Συνθήκης του Ελσίνκι (Declaration of Helsinki Principles).



Απαραίτητες προϋποθέσεις για την συλλογή των ασθενών ήταν :

- να είναι ενήλικες έως 65 ετών
- να έχουν μέτρια έως και σοβαρή ψωρίαση που καθοριζόταν από τον δείκτη σοβαρότητας της νόσου, Psoriasis Area and Severity Index -PASI μεγαλύτερο ή ίσο του 10
- να μην λαμβάνουν συστηματική θεραπεία για τουλάχιστο 3 μήνες
- να μην χρησιμοποιούν τοπική θεραπεία για τουλάχιστο 15 μέρες πριν από την λήψη των βιοψιών
- να μην βρίσκονται σε φαρμακευτική αγωγή συστηματικών στεροειδών ή άλλων συστηματικών φαρμάκων κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης, π.χ. αντιβιοτικών, αντιφλεγμονωδών ή αντικαρκινικών φαρμάκων.

Απαραίτητες προϋποθέσεις για την συλλογή των μαρτύρων τόσο του ορού όσο και των βιοψιών ήταν:

- να είναι υγιείς ενήλικες, χωρίς γνωστά προβλήματα υγείας
- να μην λαμβάνουν οποιαδήποτε συστηματική ή τοπική θεραπεία

## 3.2 Πρωτόκολλο συλλογής και αποθήκευσης Βιολογικών δειγμάτων

### 3.2.1 Βιοψίες Δέρματος

Από κάθε ασθενή ελήφθησαν δύο βιοψίες που απείχαν μεταξύ τους τουλάχιστο 10 cm, μία από το παθολογικό δέρμα μη ηλιοεκτεθημένης περιοχής και μία από το φυσιολογικό. Το παθολογικό δέρμα που επρόκειτο να απομονωθεί, καθαριζόταν με αντισηπτικό σε αποστειρωμένη γάζα και με τη βοήθεια ενός μαρκαδόρου, μαρκάραμε το σημείο επιλογής για την λήψη της βιοψίας. Μετά από έγχυση τοπικού αναισθητικού (περίπου 0.5 ml 1% lidocaine), χρησιμοποιούσαμε punch μιας χρήσης διαμέτρου 4 mm. Το βυθίζαμε ελαφρά στο δέρμα και με 2-3 λεπτές στροφικές κινήσεις απομονώναμε το τμήμα που μας ενδιέφερε.

Στη συνέχεια, τοποθετούσαμε το τμήμα αυτό σε φιαλίδιο που περιείχε σταθεροποιητικό ορό (RNA stabilization reagent, RNAlater, Ambion Inc., Austin, Texas, USA) και κατευθείαν καταψύχαμε τα δείγματα στους -80C μέχρι να τα χρησιμοποιήσουμε στα πειράματα της μελέτης. Για λόγους εμπιστευτικότητας και προστασίας ιατρικών δεδομένων, καθώς και για διατήρηση συνθηκών τυφλής ανάλυσης, οι ασθενείς και τα δείγματά τους αντιστοιχίζονταν σε έναν κωδικό αριθμό και στην ετικέτα κάθε δείγματος αναγραφόταν ο αντίστοιχος κωδικός. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν από το Νοσοκομείο Ανδρέας Συγγρός και το Αττικό Νοσοκομείο απευθείας στο Tufts University στη Βοστώνη των ΗΠΑ μέσα σε ξηρό πάγο, προς ανάλυση. Συλλέχθηκαν διαδοχικά 4 ομάδες (sets) δειγμάτων ασθενών: set IV (13 ασθενείς) , set V ( 16 ασθενείς) και set VI (15 ασθενείς) στο

σύνολο 44 ασθενείς. Μερικούς μήνες νωρίτερα είχαν συλλεχθεί άλλες 19 βιοψίες, στο 63 σύνολο.

Σε έλεγχο της ποιότητας τους (η διαδικασία αναλύεται παρακάτω) διαπιστώθηκε ότι μόνο οι 40 από τις 63 βιοψίες είχαν άριστης ποιότητας RNA, οπότε χρησιμοποιήθηκαν μόνο αυτές. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών και των υγιών μαρτύρων με τους οποίους έγινε η σύγκριση αναγράφονται στους Πίνακες 2 και 3 αντίστοιχα.

## Πίνακας 2

**Χαρακτηριστικά εθελοντών ασθενών με ψωρίαση από τους οποίους ελήφθησαν βιοψίες.**

Αριθμός Ασθενών	Μέσος Όρος Ηλικίας $\pm$ SD	Μέσος PASI $\pm$ SD
40 (19 γυναίκες και 21 άντρες)	45.47 $\pm$ 17.02 έτη	17.7 $\pm$ 9.03

SD (Standard deviation): τυπική απόκλιση

## Πίνακας 3

**Χαρακτηριστικά υγιών μαρτύρων από τους οποίους ελήφθη βιοψία δέρματος**

Αριθμός Υγιών Μαρτύρων	Μέσος Όρος Ηλικίας $\pm$ SD
39 ( 11 άντρες και 28 γυναίκες)	48.5 $\pm$ 18.06

### **3.2.2 Αιμοληψίες**

Οι προοριζόμενες για τη μελέτη αιμοληψίες πραγματοποιούνταν τις πρωινές ώρες σε συνθήκες νηστείας, για να ελαχιστοποιηθούν οι μεταγευματικές επιδράσεις στις μετρήσεις μας. Το αίμα συλλεγόταν σε μη ηπαρινισμένα φιαλίδια και αφού περιήλθετο σε κατάσταση πήξης (μετά από περίπου 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου), φυγοκεντρούταν για 10 λεπτά στα 1000 x g. Ακολουθούσε συλλογή του ορού και αποθήκευση του στους -80°C μέχρι την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Για λόγους εμπιστευτικότητας και προστασίας ιατρικών δεδομένων, καθώς και για διατήρηση συνθηκών τυφλής ανάλυσης, οι ασθενείς και τα δείγματά τους αντιστοιχίζονταν σε έναν κωδικό αριθμό όπως ακριβώς και με την λήψη των βιοψιών δέρματος. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν ο ορός των ίδιων 63 ασθενών που συλλέχθηκαν και οι βιοψίες. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών που συλλέχθηκε ορός καθώς και των υγιών μαρτύρων με τους οποίους έγινε η σύγκριση αναγράφονται στους Πίνακες 4 και 5 αντίστοιχα.

#### **Πίνακας 4**

##### **Χαρακτηριστικά ασθενών από τους οποίους ελήφθη ορός**

<b>Αριθμός Ασθενών</b>	<b>Μέσος Όρος Ηλικίας ± SD</b>	<b>Μέσος PASI ± SD</b>
63 (30 γυναίκες και 33 άντρες)	44.3 ± 17.5 έτη	15.99 ± 8.63

#### **Πίνακας 5**

##### **Χαρακτηριστικά υγιών μαρτύρων από τους οποίους ελήφθη ορός**

<b>Αριθμός Υγιών Μαρτύρων</b>	<b>Μέσος Όρος Ηλικίας (έτη) ± SD</b>
27 ( 16 άντρες και 11 γυναίκες)	50 ± 13.7

### 3.3 Τεχνικές που εφαρμόστηκαν στους ιστούς

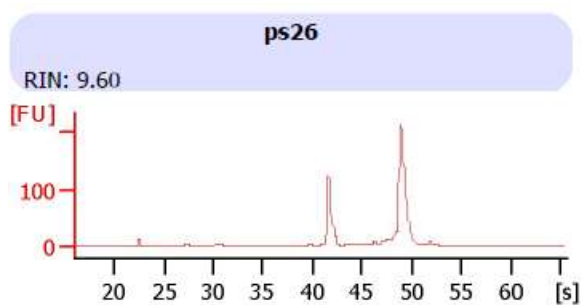
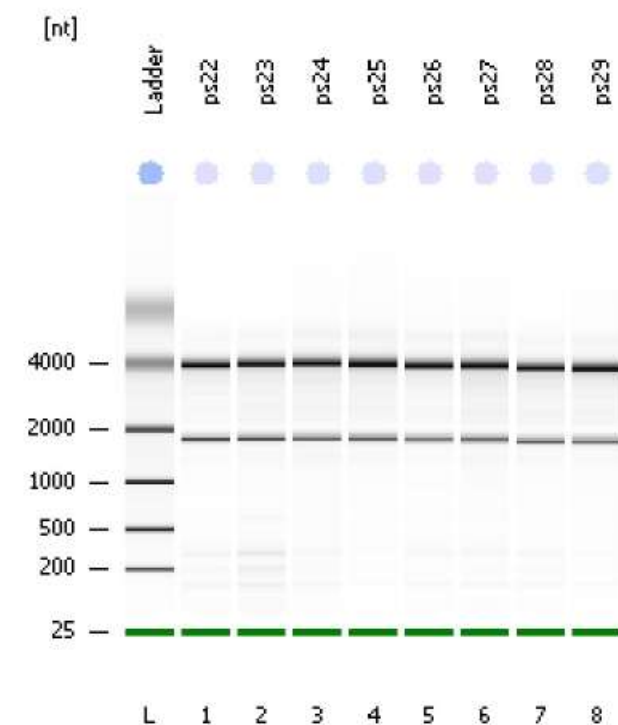
#### 3.3.1 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA από τα δείγματα του Set IV καθώς και των 19 αρχικών δειγμάτων έγινε με τη χρήση του TRIzol Reagent (Invitrogen), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή για την απομόνωση του RNA από τον ιστό δέρματος, ενώ για τα δείγματα των SET V και VI, καθώς και των υγιών εθελοντών χρησιμοποιήθηκε το RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit της QIAGEN, CA (cat. No 74704). Η δεύτερη μέθοδος αποδείχθηκε καλύτερη μέθοδος απομόνωσης ολικού RNA από δερματικό ιστό και έδωσε υψηλότερη συγκέντρωση και καλύτερη ποιότητα RNA. Το απομονωμένο RNA ποσοτικοποιήθηκε με χρήση σπεκτροφωτόμετρου Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός RNA γινόταν με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 260 nm με τη χρήση του παραπάνω σπεκτροφωτόμετρου Nanodrop 2000. Η μέτρηση γινόταν με τη χρήση ως τυφλού 1mL dH<sub>2</sub>O, στο οποίο στη συνέχεια αραιωνόταν 1 μL του προς μέτρηση δείγματος. Με βάση αυτή την αραιώση (1:1000) η συγκέντρωση του δείγματος (σε ng/μL) υπολογιζόταν από το γινόμενο: OD<sub>260</sub> x 1000 x 40 (για δείγμα RNA), όπου OD η οπτική πυκνότητα. Η αναλογία των τιμών OD στα 260 nm και στα 280 nm παρέχει μια εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος, δηλαδή το κατά πόσο αυτό είναι μολυσμένο με πρωτεΐνες. Αν ο λόγος OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub> είναι μεταξύ 1.8 και 2.0, τότε το δείγμα θεωρείται καθαρό, ενώ σε περίπτωση που είναι μικρότερος από 1.5 το δείγμα δε θεωρείται καθαρό και οι τιμές OD είναι ανακριβείς. Η αποθήκευση RNA γινόταν άμεσα στους -80°C.

Μετέπειτα ελέγξαμε την ποιότητά του με χρήση του Agilent RNA 6000 NanoKit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) (Εικόνα 13).

### Electrophoresis File Run Summary



**Εικόνα 13.** Έλεγχος της ποιότητας του RNA με χρήση του Agilent RNA 6000 NanoKit. Οι δύο ακίδες στην γραφική παράσταση δείχνουν το 18S και το 28S ριβosomal RNA και φαίνονται ξεκάθαρα όταν το RNA είναι άθικτο. Το RIN (RNA integrity number) είναι ένας αλγόριθμος που δείχνει την ακεραιότητα του RNA. Όσο πιο κοντά στο 10 είναι η τιμή του, τόσο πιο καλής ποιότητας είναι το RNA.

Από τον έλεγχο που έγινε για την ποιότητα και την ποσότητα του RNA προέκυψε ότι μόνο οι 40 βιοψίες είχαν RNA αρίστης ποιότητας. Οι βιοψίες που δεν είχαν καλή ποιότητα RNA δεν χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματά μας. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν 300ng RNA από το κάθε δείγμα που δεν είχε αποικοδομηθεί για την σύνθεση cDNA ακολουθώντας τις οδηγίες του iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA).

### **3.3.2 Σύνθεση cDNA - Μέθοδος αντίστροφης μεταγραφής ακολουθούμενης από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Reverse Transcription, Polymerase Chain Reaction)**

#### ***Αντιδραστήρια***

- Μίγμα αντίδρασης που περιέχει dNTP, oligo dT και ρυθμιστικό διάλυμα (5x iScript reaction mix) (iScript cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (iScript transcriptase) (iScript cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad)
- Νερό ελεύθερο ριβονουκλεασών (RNase free water)

#### ***Πρωτόκολλο***

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε αποτελούταν από 2 στάδια που πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (PTC 200 thermal cycler, Bio-Rad). Για κάθε κατάσταση χρησιμοποιούνταν 300 ng RNA και το εμπορικά διαθέσιμο kit αντίστροφης μεταγραφής (iScript cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad).

1. Για κάθε κατάσταση γινόταν η εξής πρόσμειξη αντιδραστηρίων σε ειδικά σωληνάρια (MicroAmp Optical sterile tubes and 8-cap strips, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA):

- 1  $\mu$ L iScript τρανσκριπτάση (iScript Transcriptase)
- 5  $\mu$ L Νερό ελεύθερο RNAσης (RNase free water)
- 10  $\mu$ L δείγμα RNA
- 4  $\mu$ L 5x iScript αντιδραστικό μείγμα (5x iScript reaction mix)
- Σύνολο = 20  $\mu$ L σε κάθε ένα ειδικό σωληνάριο

2. Τοποθέτηση στον θερμικό κυκλοποιητή:

- Σύνθεση cDNA: 10 λεπτά στους 23°C, 50 λεπτά στους 42 °C
- Αδρανοποίηση αντίστροφης μεταγραφάσης: 5 λεπτά στους 95°C

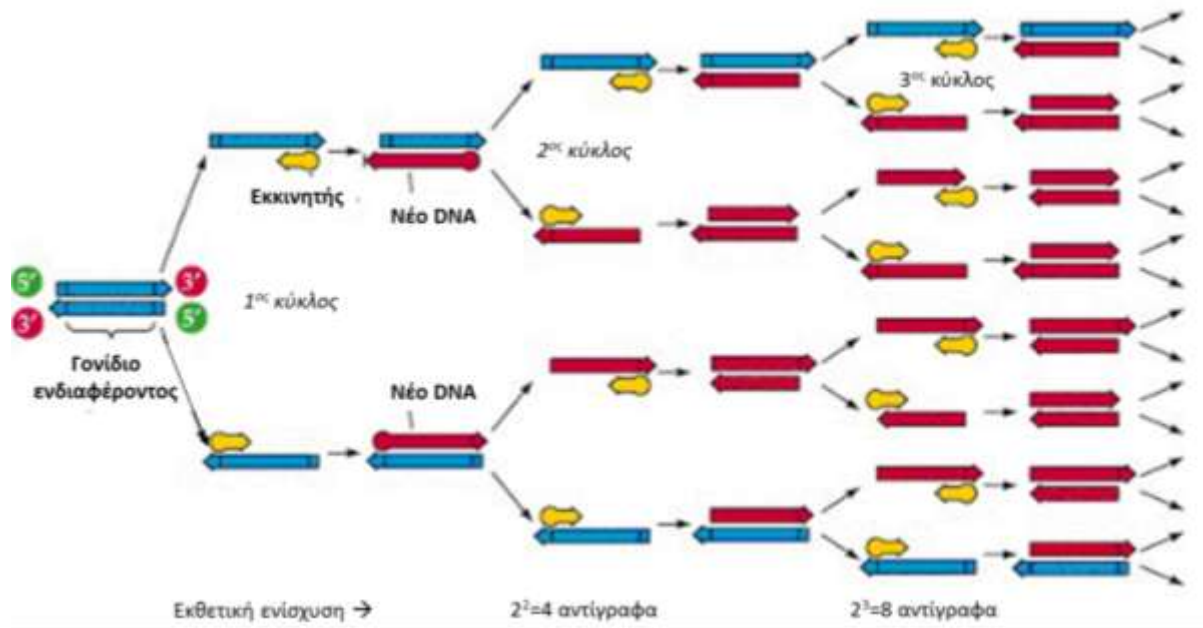
3. Μετά το πέρας της αντίστροφης μεταγραφής, ακολουθεί η ενίσχυση του cDNA με την αντίδραση PCR όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

### **3.3.3 Μέθοδος ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (quantitative PCR, qPCR).**

Η PCR είναι μια μέθοδος, που χρησιμοποιείται για την ποσοτική ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος του DNA, το οποίο μπορεί να είναι ένα απλό γονίδιο ή τμήμα του ή κάποια άλλη μη γενετικά κωδικοποιημένη αλληλουχία. Αρχή της μεθόδου είναι η πολλαπλή αντιγραφή και ποσοτική μεγέθυνση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA, μεγέθους από 50 έως περισσότερο από 2.000 βάσεις, που επιτυγχάνεται *in vitro* με τη βοήθεια του ενζύμου της DNA πολυμεράσης. Κατά



κανόνα χρησιμοποιούνται δύο ιχνηθέτες, που είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, συνήθως μήκους 20-30 βάσεων. Στην αντίδραση PCR συμβαίνουν επαναλαμβανόμενες μεταβολές της θερμοκρασίας στο μίγμα της αντίδρασης, που ονομάζονται κύκλοι. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει 3 διαφορετικά στάδια, με διαφορετικές θερμοκρασίες οι οποίες προγραμματίζονται από τον θερμικό κυκλοποιητή. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την αποδιάταξη ή μετουσίωση (*denaturation*) του DNA, που επιτυγχάνεται σε υψηλή θερμοκρασία, συνήθως, 90-95 °C, επί 1-2 λεπτά. Με τη μετουσίωση διασπώνται οι έλικες του DNA, αλλάζει έτσι η δομή του με το χωρισμό των δύο ελίκων και τη μετατροπή του από δίκλωνο σε μονόκλωνο. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει τη σύνδεση των αλληλουχιών-ιχνηθετών με το μετουσιωμένο DNA, διαδικασία που αναφέρεται και ως υβριδισμός των αφετηριών (*annealing*) και που επιτυγχάνεται σε χαμηλότερη θερμοκρασία 40-60 °C σε χρόνο, συνήθως, λίγων δευτερολέπτων. Το τρίτο και τελικό στάδιο που αναφέρεται ως επιμήκυνση (*extension / elongation*), επιτυγχάνεται, συνήθως, σε θερμοκρασίες 70-75 °C και περιλαμβάνει την προσθήκη υπό τη δράση της DNA πολυμεράσης των συμπληρωματικών dNTPs στο 3' άκρο κάθε αλύσου. Ακολουθεί η επέκταση προς το 5' άκρο και, έτσι, σχηματίζονται 2 καινούριες αλυσίδες (κλώνοι) DNA, συμπληρωματικές προς αυτές των 2 κλώνων του προτύπου DNA και διπλασιάζεται η συγκεκριμένη περιοχή. Καθώς εξελίσσεται η αντίδραση PCR, το τμήμα του DNA στόχου που αναπαράγεται αποτελεί μετά το τέλος του κάθε κύκλου και τη μήτρα αντιγραφής που θα προκαλεί την εκθετική του ενίσχυση (*amplification*) δια μέσου των αλυσιδωτών αντιδράσεων σε τελικό αριθμό ανατύπων  $2^n$  ( $n = \text{o αριθμός των κύκλων}$ ). Η αντίδραση PCR συνεχίζεται έως ότου εξαντληθεί κάποιο αντιδραστήριο ή η DNA πολυμεράση δεν μπορεί να συνθέσει νέο DNA (Εικόνες 14,15).



**Εικόνα 14. Σχηματική αναπαράσταση των κύκλων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.** Η αλληλουχία ενδιαφέροντος μετουσιώνεται και το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται ώστε να καταστεί δυνατή η πρόσδεση των εκκινητών και να ξεκινήσει η διαδικασία υβριδισμού των αφετηριών. Το τμήμα του DNA που αναπαράγεται, χρησιμοποιείται τη νέα μήτρα αντιγραφής, πάνω στην οποία θα συντεθεί ο καινούργιος κλώνος γονιδιακού υλικού στο νέο κύκλο. Η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται  $2n$  φορές, ώστε στο τέλος των αντιδράσεων δημιουργούνται αντίγραφα  $2^n$  ( $n$ =αριθμός κύκλων). Η αντίδραση επαναλαμβάνεται ως ότου εξαντληθεί το αντιδραστήριο ή η DNA πολυμεράση δεν έχει να συνθέσει νέο DNA.

### **Αντιδραστήρια (για την τεχνική της qPCR)**

- Taqman master mix (Applied Biosystems): περιέχει AmpliTaq Gold DNA Polymerase, UDG (Uracil-DNA Glycosylase), dNTPs/dUTP
- Ιχνηθέτης για το γονίδιο αναφοράς GAPDH (Hu, VIC/TAMRA, Applied Biosystems), (συγκέντρωση 50  $\mu\text{mol/L}$ )
- Ιχνηθέτης για το γονίδιο-στόχο (Applied Biosystems), (συγκέντρωση 50  $\mu\text{mol/L}$ )
- δείγμα cDNA
- Νερό ελεύθερο Rnaσης (RNase free water)

## **Πρωτόκολλο**

1. Αραίωση cDNA (συγκέντρωσης περίπου 1000 ng/mL) το οποίο παραγόταν από την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής 1:10 (τελική συγκέντρωση περίπου 100 ng/ml) σε dH<sub>2</sub>O.

2. Για κάθε πειραματική κατάσταση γινόταν η εξής πρόσμειξη αντιδραστηρίων σε ειδικά σωληνάρια, εις τριπλούν:

- 10 μL Taqman Master Mix
- 1 μL ιχνηθέτης γονιδίου στόχου
- 1 μL ιχνηθέτης γονιδίου GAPDH
- 8 μL cDNA
- **ΣΥΝΟΛΟ = 20 μL όγκου σε κάθε ειδικό σωληνάριο**

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης γινόταν η εξής πρόσμειξη αντιδραστηρίων, για 3 διαδοχικές αραιώσεις cDNA (10x, 100x, 1000x) σε διπλέτες:

- 10 μL Taqman Master Mix
- 1 μL ιχνηθέτης γονιδίου στόχου
- 1 μL ιχνηθέτης γονιδίου GAPDH
- 8 μL cDNA
- **ΣΥΝΟΛΟ: 20 μL**

Για τα δείγματα αναφοράς χωρίς DNA (control samples), γινόταν η εξής πρόσμιξη αντιδραστηρίων (1 σωληνάριο για κάθε ιχνηθέτη):

- 10  $\mu$ L Taqman Master Mix
- 1  $\mu$ L ιχνηθέτης
- 9  $\mu$ L RNase free water
- **ΣΥΝΟΛΟ: 20  $\mu$ L**

3. Τοποθέτηση στον θερμικό κυκλοποιητή (Applied Biosystems 7300 sequence detector). Οι θερμοκρασιακοί κύκλοι της αντίδρασης ήταν 50° C για 2 λεπτά, 95° C για 10 λεπτά, 95° C για 15 δευτερόλεπτα επί 40 κύκλους και 60° C για 1 λεπτό επί 40 κύκλους. Η διαδικασία ολοκληρωνόταν με τον προσδιορισμό του CT (threshold cycle) για κάθε δείγμα.

4. Για τον υπολογισμό του αριθμού κυττάρων που εκφράζουν το γονίδιο στόχο και το γονίδιο αναφοράς χρειάζεται η κατασκευή πρότυπης καμπύλης, η οποία προκύπτει από διαδοχικές αραιώσεις του γονιδίου προς μελέτη.

Η σχετική ποσοτικοποίηση βασίζεται στο λόγο των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-στόχο ως προς το γονίδιο αναφοράς. Για το υπολογισμό αυτού του λόγου χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$R = 2^{- (\Delta C_t \text{ sample} - \Delta C_t \text{ control}) / 3.77}$$

Μετρήθηκε η έκφραση των γονιδίων DRP1, UCP2 και καλσινευρίνης.



**Εικόνα 15.** Θερμικός κυκλοποιητής όπου πραγματοποιούνταν η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

### 3.4 Τεχνικές που εφαρμόστηκαν σε κύτταρα

#### 3.4.1 Καλλιέργεια μαστοκυττάρων



**Εικόνα 16.** Ειδικές καλλιεργητικές φλάσκες όπου γινόταν η επώαση των κυττάρων LAD2.

Στις qPCR για το μιτοχονδριακό DNA χρησιμοποιήθηκε standard curve που πραγματοποιήθηκε από μετρήσεις σε κυτταρική σειρά ανθρώπινων λευχαιμικών μαστοκυττάρων (human LAD2 cells), τα οποία διατέθηκαν από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (National Institute of Health, NIH, Bethesda, MD, USA) των ΗΠΑ. Η επώαση των κυττάρων LAD2 γινόταν σε ειδικές καλλιεργητικές φλάσκες (εικόνα 19), όπου τοποθετούνταν σε συγκέντρωση  $10^5$ /mL καλλιεργητικού υλικού (StemPro-34 serum-freemedium, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Στην καλλιέργεια προστίθεντο 100

ng/mL ανασυνδιασμένος ανθρώπινος παράγοντας βλαστικών κυττάρων (recombinant human stem cell factor, rhSCF, Biovitrum, Sweden), 1% πενικιλίνη, 1% στρεπτομυκίνη και 1% γλουταμίνη. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε επωαστικό θάλαμο συγκέντρωσης 5% CO<sub>2</sub> στους 37°C και χρησιμοποιούνταν κατά τη λογαριθμική φάση ανάπτυξής τους.

### **3.4.2. Απομόνωση μιτοχονδριακού DNA από κύτταρα**

Η απομόνωση του μιτοχονδριακού DNA από καλλιεργούμενα κύτταρα LAD 2 έγινε με τη χρήση του εμπορικού Mitochondrial DNA isolation kit, ab 65321 της εταιρείας Abcam.

#### **Πρωτόκολλο mitochondrial DNA isolation kit**

1. Συλλογή 50.000.000 καλλιεργούμενων μαστοκυττάρων και φυγοκέντρωση στους 600×g για 5 λεπτά στους 4 °C.
2. Πλύσιμο των κυττάρων με 5-10 ml πάγο PBS. Φυγοκέντρωση στους 600×g για 5 λεπτά στους 4 °C και αφαίρεση του υπεκείμενου υγρού.
3. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 ml από ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης κυτταρίνης (cytosol extraction buffer).
4. Επωασμός σε πάγο για 10 λεπτά.
5. Ομογενοποίηση των κυττάρων σε έναν παγωμένο μηχανισμό άλεσης ιστών με το μύλο στον πάγο. 50-100 περάσματα με το μύλο.
6. Μεταφορά του ομογενοποιημένου σε ένα σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης 1,5 ml και φυγοκέντρωση στα 700 xg για 10 λεπτά στους 4 ° C. Το στάδιο αυτό αφαιρεί πυρήνες και άθικτα κύτταρα.

7. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο φιαλίδιο των 1,5 ml και φυγοκέντρηση στα 10.000 x g για 30 λεπτά στους 4 ° C.
8. Αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού.
9. Επαναιώρηση ξανά του ιζήματος σε 1 ml 1×ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης Cytosol και φυγοκέντρηση στα 10000 x g για 30 λεπτά στους 4 ° C και πάλι.
10. Αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού. Το ίζημα είναι απομονωμένα μιτοχόνδρια.
11. Λύση των μιτοχονδρίων σε 30 μl του μιτοχονδριακού ρυθμιστικού διαλύματος λύσης, παραμονή στον πάγο για 10 λεπτά.
12. Πρόσθεση 5 μl ενζύμου mix, ανάμειξη και επώαση σε υδατόλουτρο στους 50 ° C για 60 λεπτά ή περισσότερο μέχρι να καταστεί διαυγές το διάλυμα.
13. Πρόσθεση 100 μl απόλυτης αιθανόλης, ανάμειξη και φύλαξη στους -20 ° C για 10 λεπτά.
14. Φυγοκέντριση σε μικροφυγόκεντρο με τελική ταχύτητα για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
15. Αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού. Το ίζημα είναι μιτοχονδριακό DNA.
16. Πλύσιμο του ιζήματος DNA με 1 ml 70% αιθανόλης. Αφαίρεση της ποσότητας ιχνοστοιχείων αιθανόλης χρησιμοποιώντας την άκρη της πιπέτας. Στέγνωμα με αέρα για 5 λεπτά.
17. Ανακίνηση ξανά του DNA σε 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE ή σε νερό.

Το μιτοχονδριακό DNA μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf και κατόπιν ποσοτικοποιήσης αποθηκεύτηκε στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

Η καθαρότητα του νουκλεϊκού οξέος προσδιορίστηκε από το λόγο της απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280nm (A260-A280). Καθαρό DNA έχει λόγο 1,8 ενώ αν υπάρχουν προσμίξεις από πρωτεΐνη και φαινόλη, ο λόγος θα είναι μικρότερος. Εφόσον το DNA ήταν ελεύθερο προσμίξεων, χρησιμοποιήθηκε στη μέθοδο ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

### **3.5 Τεχνικές που εφαρμόστηκαν στον ορό**

#### **3.5.1 Απομόνωση μιτοχονδριακού DNA από τον ορό**

Η απομόνωση του μιτοχονδριακού DNA (purification) από τον ορό αίματος ασθενών και μαρτύρων, πραγματοποιήθηκε με Qiaamp DNA Microkit (56304), Qiagen, CA.

#### **Πρωτόκολλο Qiaamp DNA microkit**

##### ***Αντιδραστήρια***

- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Πρωτεϊνάση K (QIAamp DNA MicroKit QIAGEN) για λύση των κυττάρων
- Διάλυμα ATL (QIAamp DNA MicroKit QIAGEN) για λύση των κυττάρων
- Διάλυμα AL (QIAamp DNA MicroKit QIAGEN) για προσκόλληση του DNA στο φίλτρο
- Διάλυμα AW 1 (QIAamp DNA MicroKit QIAGEN) για έκπλυση προσμίξεων
- Διάλυμα AW 2 (QIAamp DNA MicroKit QIAGEN) για έκπλυση προσμίξεων
- Διάλυμα AE (QIAamp DNA MicroKit QIAGEN) για έκλυση καθαρού DNA



### **Πρωτόκολλο εξαγωγής του γενετικού υλικού**

1. Ενοφθαλμισμός 20  $\mu\text{L}$  ορού αίματος από κάθε ασθενή/μάρτυρα σε σωληνάκια τύπου Eppendorf χωρητικότητας 1,5 mL.
2. Προσθήκη 80  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος ATL προς τελικό όγκο 100  $\mu\text{L}$ .
3. Προσθήκη 10  $\mu\text{L}$  πρωτεϊνάσης K.
4. Προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος AL και ανακίνηση (vortex) των δειγμάτων για 15 δευτερόλεπτα.
5. Επώαση στους 56° C για 10 λεπτά με ταυτόχρονη ανάδευση.
6. Φυγοκέντρηση των σωληναρίων Eppendorf για να απομακρυνθούν τυχόν σταγόνες υλικού από το καπάκι που μπορεί να επηρεάσουν τον τελικό όγκο.
7. Προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  αιθανόλης (96-100%) και ανακίνηση στο vortex για 15 δευτερόλεπτα. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά.
8. Φυγοκέντρηση των σωληναρίων Eppendorf για να απομακρυνθούν τυχόν σταγόνες υλικού από το καπάκι που μπορεί να επηρεάσουν τον τελικό όγκο.
9. Μεταφορά όλης της ποσότητας του δείγματος σε φίλτρο-στήλη, που περιέρχονταν στο kit, με προσοχή να μην εναποτεθεί υλικό στα τοιχώματα ή το στόμιο του σωληναρίου. Ύστερα από φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό, το φίλτρο τοποθετείται σε καθαρή στήλη και το υποκείμενο διάλυμα απορρίπτεται.
10. Προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  του διαλύματος AW1 στο φίλτρο-στήλη με προσοχή να μην εναποτεθεί υλικό στα τοιχώματα ή το στόμιο του σωληναρίου. Ύστερα από φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό, το φίλτρο τοποθετείται σε καθαρή στήλη και το υποκείμενο διάλυμα απορρίπτεται.

11. Προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  του διαλύματος AW2 στο φίλτρο-στήλη με προσοχή να μην εναποτεθεί υλικό στα τοιχώματα ή το στόμιο του σωληναρίου. Ύστερα από φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό, το φίλτρο τοποθετείται σε καθαρή στήλη και το υποκείμενο διάλυμα απορρίπτεται.
12. Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 1 λεπτό για να απομακρυνθεί όλη ποσότητα ρυθμιστικών διαλυμάτων.
13. Τοποθέτηση του φίλτρου σε νέο Eppendorf και απόρριψη του υποκείμενου διαλύματος. Προσθήκη 50 $\mu\text{L}$  του διαλύματος έκπλυσης (AE) στο κέντρο του φίλτρου-στήλης.
14. Επώαση του φίλτρου στήλης σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 5 λεπτά.

Το μιτοχονδριακό DNA μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf και κατόπιν ποσοτικοποίησης αποθηκεύτηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για μελλοντική χρήση.

### **3.5.2 Μέθοδος ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (quantitative PCR, qPCR).**

Με την μέθοδο της qPCR που αναφέρθηκε λεπτομερώς παραπάνω, μετρήσαμε 2 γονίδια τυπικά για το mtDNA, το μιτοχονδριακό 7S και τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη Cytochrome B (Cyt. B).

### **3.6 Στατιστική ανάλυση**

Η κανονικότητα της κατανομής των ευρεθεισών τιμών καθοριζόταν με οπτική παρατήρηση των αντίστοιχων ιστογραμμάτων. Οι συγκρίσεις μεταξύ συνεχών και κατηγορικών μεταβλητών γίνονταν με το Student's *t*-test και στην περίπτωση μη κανονικής κατανομής το μη-παραμετρικό Mann-Whitney *U* test. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε ως μικρότερο του 0,05 ( $p < 0,05$ ). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιούταν με το πρόγραμμα Graph Pad Prism, Version 4.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

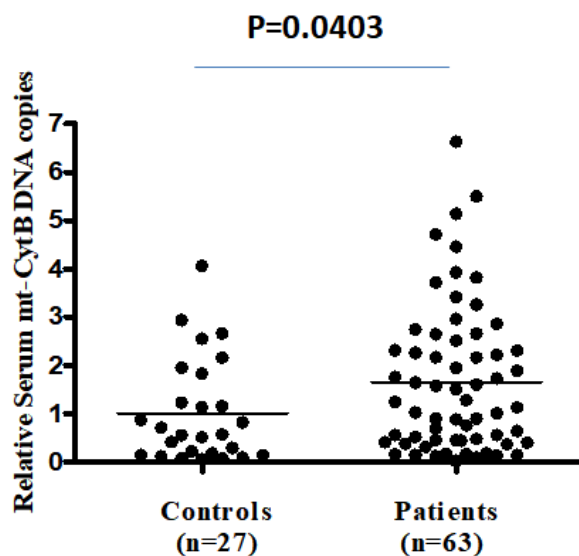
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Αποτελέσματα πειραμάτων στον ορό

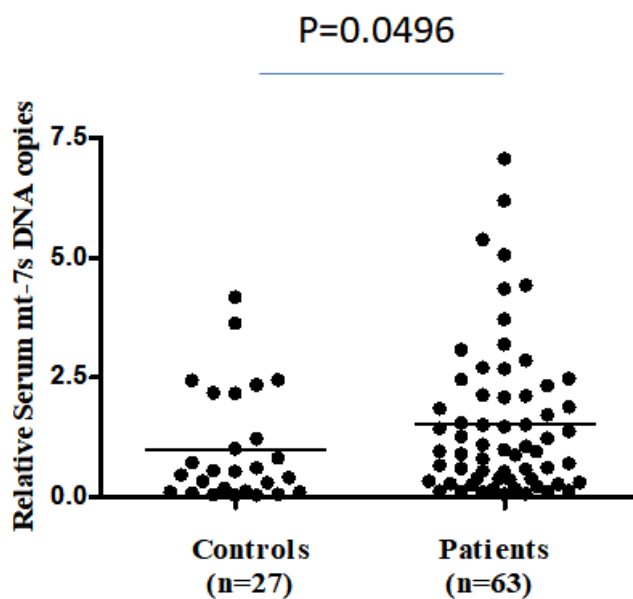
#### 4.1.1 Μετρήσεις μιτοχονδριακού DNA στον ορό αίματος

Ελέγξαμε τον ορό 63 ψωριασικών ασθενών για παρουσία mDNA (30 γυναίκες και 33 άντρες). Τα δείγματα ελέγχθηκαν εις τριπλούν. Μετά την απομόνωση mDNA από τον ορό, αναζητήθηκε με PCR η ποσότητα 2 συγκεκριμένων γονιδίων, των *mt-CytB* και *mt-7S*, τα οποία βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα ( $P < 0.05$ ) στα άτομα με ψωρίαση σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Τα 7s και *cytB* είναι μιτοχονδριακές μονάδες που χρησιμοποιούνται συχνά σε πειράματα ανίχνευσης mDNA. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ιχνηθέτες (Applied Biosystems) για τα εξής γονίδια: *mt cyb* (Hs 02596867\_s1), *mt 7s* (Hs 02596861\_s1) και *Gapdh* (Hu, VICTAMRA) (Σχήμα 1).

Το γονίδιο GAPDH ήταν μη ανιχνεύσιμο, γεγονός που υπονοεί και επιβεβαιώνει την απουσία γενομικού DNA που μπορεί να επηρεάζει τα αποτελέσματά μας.



Σχήμα 1A. mt Cyt B



Σχήμα 1B. mt 7s

**Σχήμα 1.** Επίπεδα μιτοχονδριακού DNA στον ορό ασθενών με ψωρίαση (n= 63) και υγιών μαρτύρων (n= 27)  
**1A.** Μιτοχονδριακού cytochrome B (CytB),  $p= 0.0403$ . **1B.** μιτοχονδριακού 7S ,  $p=0.0496$ . Οι οριζόντιες γραμμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους.  $P < 0,05$  ορίζεται ως στατιστικώς σημαντικό. Controls = μάρτυρες, Patients = ασθενείς, n = αριθμός ατόμων.

## 4.2 Αποτελέσματα πειραμάτων στους ιστούς

### 4.2.1 Μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου της πρωτεΐνης DRP1 με qPCR

Όπως προαναφέρθηκε, από τις βιοψίες δέρματος των 63 ασθενών που συλλέχθηκαν συνολικά, απομονώσαμε το RNA με δύο μεθόδους, αρχικά την μέθοδο TRizol Reagent της Invitrogen και αργότερα την μέθοδο RNAeasy Fibrous Tissue MiniKit της QIAGEN. Όταν όμως ελέγχθηκε η ποιότητα του RNA με την μέθοδο Aligent RNA 6000 NanoKit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) βρέθηκε ότι η ποιότητα του RNA μόνο των 40 βιοψιών ήταν καλή (31 με την μέθοδο της Qiagen και μόνο 9 με την μέθοδο της Invitrogen). Επίσης καλή ήταν η ποιότητα του RNA από τις βιοψίες μη παθολογικού δέρματος μόνο από τους 15 ασθενείς. Αυτό πιστεύουμε ότι οφείλεται στο λάθος υγρό που χρησιμοποιήθηκε για να αποθηκεύσουμε τις βιοψίες αυτές. Συγκεκριμένα αντί για RNAlater, χρησιμοποιήσαμε Freezing Medium.

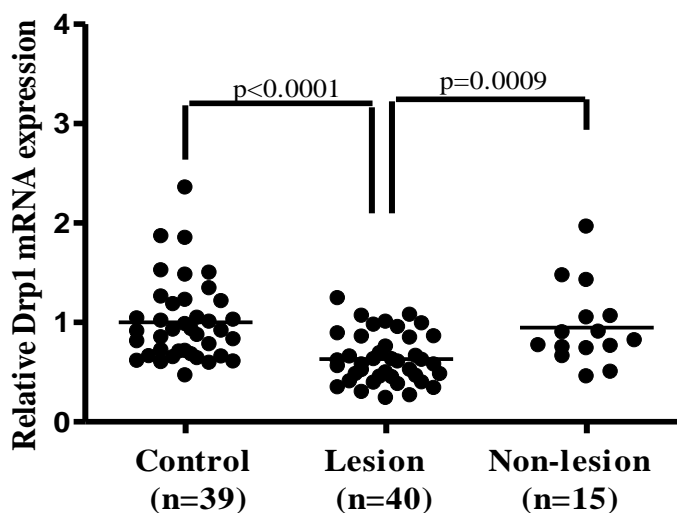
Έτσι τελικώς μετρήσαμε την έκφραση της DRP 1 μόνο από τους 40 ασθενείς που απομονώθηκε καλής ποιότητας RNA. Η μέτρηση έγινε με qPCR. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών καθώς και τα χαρακτηριστικά των υγιών μαρτύρων έχουν ήδη αναφερθεί (Πίνακες 2 και 3). Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι Tagman εκκινητές ή ανιχνευτές φθορισμού οι οποίοι συνεστήθηκαν από την εταιρεία Applied Biosystems: Hs 00247152-m1 για το γονίδιο της DRP1, DNMT1L και 4310884E-110247 για το GAPDH. Όλες οι τιμές ανήχθησαν στο εσωτερικό γονίδιο αναφοράς GAPDH και εκφράστηκαν ως προς τις μέσες τιμές. Παρακάτω αναφέρονται τα χαρακτηριστικά

των ατόμων με ψωρίαση από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν οι βιοψίες από το μη παθολογικό δέρμα τους (Πίνακας 6).

Πίνακας 6

Βιοψίες μη παθολογικού δέρματος από ασθενείς

Αριθμός Ασθενών	Μέσος Όρος Ηλικίας $\pm$ SD	Μέσος PASI $\pm$ SD
15 (6 γυναίκες και 9 άντρες)	40.1 $\pm$ 15.12	17.9 $\pm$ 10.26



**Σχήμα 2.** Έκφραση του γονιδίου Drp1 στο δέρμα ψωριασικών ασθενών (n=40) συγκριτικά με το μη παθολογικό δέρμα των ασθενών (n= 15) αλλά και των υγιών μαρτύρων (n= 39). Η έκφραση του γονιδίου της Drp1 είναι μειωμένη σε σχέση με το μη παθολογικό δέρμα των ασθενών (  $p=0.0009$ ) και σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (  $p < 0.0001$ ).  $P < 0,05$  ορίζεται ως στατιστικώς σημαντικό.

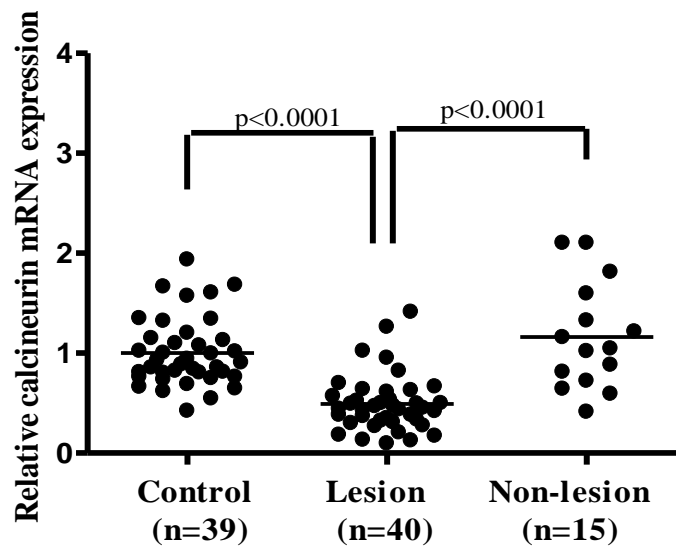
Από τα ανωτέρα αποτελέσματα συμπεραίνουμε πως στο δέρμα ασθενών με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση η έκφραση του γονιδίου *Dgp-1* είναι σημαντικά μειωμένη σε σύγκριση με το δέρμα των υγιών μαρτύρων ( $p < 0.0001$ ) (Σχήμα 2). Επίσης η έκφραση του γονιδίου αυτού στο παθολογικό δέρμα των ψωριασικών ασθενών εν συγκρίση με το δέρμα που δεν υπάρχουν βλάβες είναι σημαντικώς μειωμένη ( $p < 0.0009$ ). Δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ υγιούς δέρματος ψωριασικών ασθενών και δέρματος υγιών μαρτύρων ( $p = 0.676$ ).

#### **4.2.2 Μέτρηση έκφρασης του γονιδίου της καλσινευρίνης με qPCR**

Για την μέτρηση αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι ασθενείς και μάρτυρες με τις μετρήσεις του γονιδίου *DRP1* που συζητήθηκε παραπάνω. Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε στην PCR ήταν ο *Hs 00174223-m1* για το γονίδιο της Καλσινευρίνης, *PP3CA*.

Η έκφραση του γονιδίου της καλσινευρίνης ήταν επίσης μειωμένη στο ψωριασικό δέρμα συγκρινόμενο είτε με το υγιές δέρμα των ίδιων ασθενών είτε με το δέρμα των φυσιολογικών μαρτύρων (Σχήμα 3). Η έκφραση του γονιδίου καλσινευρίνης μεταξύ δέρματος υγιών μαρτύρων και υγιούς δέρματος ψωριασικών ασθενών δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p = 0.192$ ).





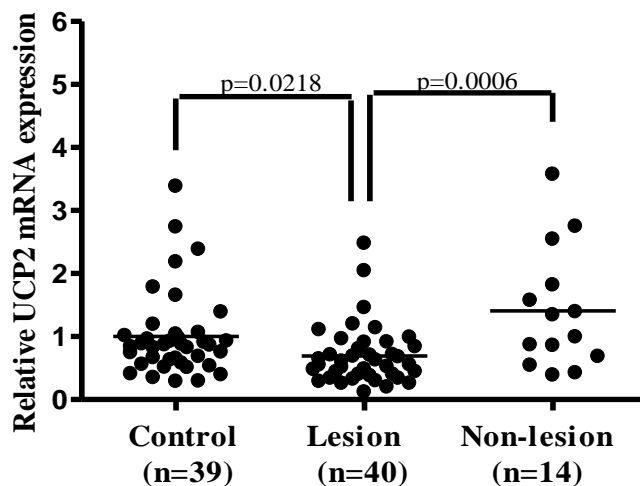
**Σχήμα 3.** Έκφραση του γονιδίου της καλσινευρίνης στο δέρμα ψωριασικών ασθενών (n=40) συγκριτικά με το μη παθολογικό δέρμα των ασθενών (n= 15) αλλά και των υγιών μαρτύρων (n= 39). Η έκφραση του γονιδίου της καλσινευρίνης είναι μειωμένη σε σχέση με το μη παθολογικό δέρμα των ασθενών (  $p < 0.0001$  ) και σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (  $p < 0.0001$  ).  $P < 0,05$  ορίζεται ως στατιστικώς σημαντικό.

#### 4.2.3 Μέτρηση έκφρασης του γονιδίου της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης UCP2 με qPCR.

Χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος πληθυσμός ψωριασικών και υγιών μαρτύρων που χρησιμοποιήσαμε και για την έκφραση της DRP1 παραπάνω με την μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιήσαμε 14 βιοψίες από μη παθολογικό δέρμα ασθενών (αντί για 15) αφού τελειώσε το υλικό από έναν ασθενή. Ως εκκινητής για το γονίδιο UCP2 χρησιμοποιήθηκε ο Hs 01075227-m1.

Η έκφραση του γονιδίου UCP2 ήταν μειωμένη στο ψωριασικό δέρμα συγκρινόμενο είτε με το μη παθολογικό δέρμα των ίδιων ασθενών είτε με το δέρμα φυσιολογικών εθελοντών. Η έκφραση γονιδίου UCP2 μεταξύ δέρματος υγιών μαρτύρων και υγιούς δέρματος ψωριασικών ασθενών δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p=0.089$ ). Αυτό το

αποτέλεσμα δηλώνει ελλειμματική αναστολή της ενεργοποίησης των μακροφάγων , των μαστοκυττάρων, και πιθανόν άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος.



**Σχήμα 4.** Έκφραση του γονιδίου της πρωτεΐνης UCP2 στο δέρμα ψωριασικών ασθενών (n=40) συγκριτικά με το μη παθολογικό δέρμα των ασθενών (n= 14) αλλά και των υγιών μαρτύρων (n= 39). Η έκφραση του γονιδίου της UCP2 είναι μειωμένη σε σχέση με το μη παθολογικό δέρμα των ασθενών (  $p=0.0006$ ) και σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (  $p=0.0218$ ).  $P < 0,05$  ορίζεται ως στατιστικώς σημαντικό.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ευρήματά μας δείχνουν ότι ο ορός των ασθενών με ψωρίαση περιέχει περισσότερη ποσότητα mtDNA από τους υγιείς μάρτυρες. Το εργαστήριο του Δρ Θεοχαρίδη έχει αποδείξει στο παρελθόν ότι το mtDNA μπορεί να εκκριθεί εξωκυτταρικά από ανθρώπινα καλλιεργημένα μαστοκύτταρα όταν αυτά διεγερθούν από τη νευροπεπτιδική ουσία P (SP).<sup>132</sup> Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι το mtDNA αυξάνει τη διέγερση των μαστοκυττάρων μέσω αλλεργικής πυροδότησης.<sup>125</sup> Το εξωκυτταρικό mtDNA μπορεί να δράσει ως "συναγερμός"<sup>125, 133</sup> που οδηγεί σε έκκριση προ-φλεγμονώδους μεσολαβητή από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού<sup>134, 135,136</sup> επί απουσίας ενεργού λοίμωξης.<sup>130</sup>

Η πηγή του mtDNA στον ορό είναι προς το παρόν άγνωστη, αλλά θα μπορούσε να προέρχεται είτε από αποπτωτικά κερατινοκύτταρα και / ή από ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού, κυρίως από μαστοκύτταρα.<sup>137, 138</sup>

Είχαμε αποδείξει ότι η αποκοκκίωση των ανθρώπινων μαστοκυττάρων σε απόκριση της SP συνεπάγεται τη μιτοχονδριακή σχάση και την απελευθέρωση του mtDNA εξωκυτταρικά χωρίς τον θάνατο των κυττάρων.<sup>139</sup>

Η διαδικασία αυτή είναι διαφορετική από την απελευθέρωση mtDNA από κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη ή νεκρά κύτταρα σε ασθενείς με σήψη που ενεργοποιούν πολυμορφοπύρηννα μέσω υποδοχέων toll likereceptors (TLR)<sup>140</sup> ή από ιστούς αρουραίων που έχουν υποστεί σοκ από τραυματισμό.<sup>141</sup>

Επίσης τα πειράματά μας αποδεικνύουν ότι η γονιδιακή έκφραση των μιτοχονδριακών ρυθμιστικών πρωτεϊνών UCP2, Drr1 και καλσινευρίνης είναι μειωμένη στο ψωριασικό δέρμα σε σύγκριση τόσο με το μη παθολογικό δέρμα των ίδιων ασθενών όσο και με το δέρμα των υγιών μαρτύρων. Έχουμε αποδείξει στο παρελθόν ότι η έκφραση του UCP2 είναι επίσης μειωμένη σε ανθρώπινα καλλιεργημένα μαστοκύτταρα που διεγείρονται με SP.<sup>142</sup>

Η αύξηση της έκφρασης της UCP2 έχει συσχετιστεί με την αναστολή των φλεγμονωδών κυττάρων,<sup>143</sup> συμπεριλαμβανομένων των μαστοκυττάρων<sup>144</sup> και των μακροφάγων.<sup>145</sup> Η DRP1 είναι γνωστό ότι ρυθμίζει την μιτοχονδριακή σχάση.<sup>146</sup> Έχουμε δείξει ότι η έκφραση της DRP1 και της καλσινευρίνης ήταν αυξημένες στην ατοπική δερματίτιδα,<sup>147</sup> εντούτοις η ψωρίαση, σε αντίθεση με την ατοπική δερματίτιδα<sup>150</sup> παρουσιάζει πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και μειωμένη κυτταρική απόπτωση<sup>148</sup> οπότε αντιστρόφως σχετίζεται με μειωμένη έκφραση της DRP1 και της καλσινευρίνης.

Το αυξημένο mDNA στον ορό ασθενών με ψωρίαση θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως «έμφυτο» παθογόνο το οποίο θα μπορούσε να προκαλέσει φλεγμονώδεις αποκρίσεις, ενώ η μειωμένη έκφραση της Drr1, της καλσινευρίνης και της UCP2 δείχνουν μειωμένη απόπτωση. Η μειωμένη έκφραση της UCP2 πιθανόν να σχετίζεται με την αυξημένη φλεγμονή που επικρατεί στην ψωρίαση.

Παρά τις προόδους στον έλεγχο της ψωρίασης με νέα φάρμακα, δεν έχει ακόμα βρεθεί η θεραπεία της νόσου. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν νέους παθογενετικούς μηχανισμούς που μπορούν να στοχεύσουν νέες θεραπείες στο μέλλον.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη απόπειρα μέτρησης mDNA και κάποιων από τις βασικές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες στην ψωρίαση, και ελπίζουμε ότι στο μέλλον τα

αποτελέσματα αυτά θα αποτελέσουν έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου των μιτοχονδρίων στην ψωρίαση.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Ένας περιορισμός της παρούσας μελέτης ήταν ότι παρόλο που ο αριθμός των δειγμάτων για τα πειράματά μας ήταν ικανοποιητικός σύμφωνα με στατιστική ανάλυση, δεν ήταν αρκετά μεγάλος για να σταθεί δυνατή η ανάλυση σε υποκατηγορίες της νόσου.

Οι υγιείς μάρτυρες που διέθεσαν τα δείγματα αίματος ήταν διαφορετικοί από τους υγιείς μάρτυρες που διέθεσαν τις βιοψίες, καθότι ήταν αδύνατο αλλά και ανήθικο να υποβάλλουμε υγιή κατά τ' άλλα άτομα σε βιοψίες δέρματος αποκλειστικά για ερευνητικούς σκοπούς. Οι βιοψίες των υγιών μαρτύρων προήλθαν από άτομα τα οποία υπεβλήθησαν σε κάποιο είδος χειρουργείου, κατά το οποίο αφαιρέθηκε κομμάτι δέρματος (π.χ. αφαίρεση σπίλου, καισαρική τομή). Πρέπει να σημειωθεί ότι αν και αυτά τα άτομα δεν έπασχαν από κάποιο γνωστό νόσημα, δεν μπορούν να αποκλεισθούν φλεγμονώδη νοσήματα που δεν έχουν εκδηλωθεί ακόμα στα άτομα αυτά και θα μπορούσαν να έχουν επίδραση στην αξιοπιστία των αποτελεσμάτων μας. Επίσης δεν υπήρχε απόλυτη αντιστοιχία των θέσεων λήψης βιοψίας μεταξύ των ασθενών και των υγιών εθελοντών. Κάτι τέτοιο είναι αυτονόητο ότι είναι σχεδόν απίθανο να πραγματοποιηθεί.

Επιπλέον στα αρχικά δείγματα ασθενών, χρησιμοποιήθηκε μέθοδος απομόνωσης RNA από τους ιστούς που δεν έδωσε καλή συγκέντρωση και ποιότητα με αποτέλεσμα να εξαιρεθεί ένας αριθμός ασθενών από τα περαιτέρω πειράματα. Επίσης σε ένα σημαντικό μέρος των βιοψιών από μη παθολογικό δέρμα, δεν απομονώθηκε καλής ποιότητας RNA λόγω αποθήκευσής τους σε λάθος υγρό.

Παρά τους παραπάνω περιορισμούς, η μελέτη μας είναι μοναδική καθώς επισημαίνει για πρώτη φορά τον πιθανό ρόλο των μιτοχονδρίων στην παθογένεια

της ψωρίασης και ανοίγει νέους ορίζοντες στη μελέτη θεραπευτικών ουσιών που στοχεύουν στα μιτοχόνδρια.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΡΕΥΝΑ

Η μελέτη μας οδήγησε σε μοναδικά ευρήματα, τα οποία δεν έχουν αναλυθεί προηγουμένως και αποτελούν έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου των μιτοχονδρίων στην παθογένεια της ψωρίασης.

Μελλοντικά πειράματα θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν τη μέτρηση μιτοχονδριακού DNA σε μεγαλύτερο αριθμό ατόμων, ώστε να είναι δυνατή η συσχέτιση των ευρημάτων ανάμεσα στις διαφορετικές υποκατηγορίες της νόσου καθώς και ανάμεσα σε ασθενείς με νόσο διαφορετικής βαρύτητας.

Θα ήταν ενδιαφέρον, η μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης και άλλων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στο ψωριασικό δέρμα και να συνοδευτεί από ανίχνευση του πρωτεϊνικού προϊόντος με μεθόδους *in situ* υβριδισμού ή ανοσοϊστοχημείας.

Τέλος, θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν κλινικές μελέτες με χρήση παραγόντων που θα μπορούσαν να ενισχύσουν την UCP2 ή φαρμάκων που προκαλούν αναστολή της απελευθέρωσης του μιτοχονδριακού DNA προς στην κυκλοφορία του αίματος με σκοπό τη θεραπεία της νόσου.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- 1 Deng, Y., Chang, C., Lu, Q. Clin. The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. *Rev Allergy Immunol.* 2016 Jun; 50(3):377-89.
- 2 Cowden A, Van Voorhees AS. Introduction: History of psoriasis and psoriasis therapy. In Ed. Weinberg JM. *Treatment of psoriasis.* Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin 2008; 1-9
- 3 Leach D. The founders of dermatology: Robert Willan and Thomas Bateman. *JR Coll. Physicians Lond* 1999; 33:580-592
- 4 Chandran V., Raychaudhuri S.P. Geoeidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriatic arthritis. *J. Autoimmun.* 2010;34:J314–J321
- 5 Christophers E. Psoriasis-epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* 2001;26:314-320
- 6 Gudjonsson JE, Elder JT. Psoriasis: epidemiology. *Clin Dermatol.* 2007 Nov-Dec;25(6):535-46
- 7 Griffiths CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet.* 2007 Jul 21;370(9583):263-271
- 8 Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1985; 13: 450-6.
- 9 Horn EJ, Fox KM, Patel V, Chiou CF, Dann F, Lebwohl M. Association of patient-reported psoriasis severity with income and employment. *J Am Acad Dermatol* 2007;57:963-971
- 10 Gelfand JM, Feldman SR, Stern RS, Thomas J, Rolstad T, Margolis DJ. Determinants of quality of life in patients with psoriasis: a study from the US population. *J Am Acad Dermatol* 2004;51:704-708
- 11 O'Rielly DD, Rahman P. Genetics of susceptibility and treatment response in psoriatic arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011 Nov 8;7(12):718-32.
- 12 Sun et al. Association analyses identify six new psoriasis susceptibility loci in the Chinese population. *Nat Genet.* 2010 Nov; 42(11):1005-9.
- 13 Tsoi LC et al. Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. *Nat Genet.* 2012 Dec;44(12):1341-8.



14 Nair RP, Henseler T, Jenisch S, Stuart P, Bichakjian CK, Lenk W, Westphal E, Guo SW, Christophers E, Voorhees JJ, Elder JT. Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. *Hum Mol Genet.* 1997 Aug; 6(8):1349-56

15 Capon F. IL-36RN Mutations in Generalized Pustular Psoriasis: Just the tip of the iceberg? *J Invest Dermatol* 2013; 133: 2503-2504.

16 Sugiura K et al. The majority of Generalized Pustular Psoriasis without Psoriasis Vulgaris is caused by deficiency of Interleukin-36 Receptor Antagonist. *J Invest Dermatol* 2013; 133: 2514-2521.

17 Powles AV, Baker BS, Rutman AJ, McFadden JP, Valdimarsson H, Fry L. Epidermal rupture is the initiating factor for the Koebner response in psoriasis. *Acta Derm Venereol.* 1990;70(1):35-8

18 Kim GK, Del Rosso JQ. Drug-provoked psoriasis: is it drug induced or drug aggravated? understanding pathophysiology and clinical relevance. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2010 Jan; 3(1):32-8.

19 Telfer NR et al. The role of streptococcal infection in the initiation of guttate psoriasis. *Arch Dermatol.* 1992 Jan;128(1):39-42.

20 Gudjonsson JE et al. Streptococcal throat infections and exacerbation of chronic plaque psoriasis: a prospective study. *Br J Dermatol.* 2003 Sep;149(3):530-4

21 Diluvio L, Vollmer S, Besgen P, Ellwart JW, Chimenti S, Prinz JC Identical TCR beta-chain rearrangements in streptococcal angina and skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. *J Immunol.* 2006 Jun 1; 176(11):7104-11

22 Leung DY, Travers JB, Norris DA. The role of superantigens in skin disease. *J Invest Dermatol.* 1995 Jul;105 (1 Suppl):37S-42S.

23 Naldi L et al. Cigarette smoking, body mass index, and stressful life events as risk factors for psoriasis: results from an Italian case-control study. *J Invest Dermatol.* 2005 Jul; 125(1):61-7.

24 Ozden MG et al. Environmental risk factors in pediatric psoriasis: a multicenter case-control study. *Pediatr Dermatol.* 2011 May-Jun; 28(3):306-12.

25 Dellavalle RP, Johnson KR. Do smoking, obesity, and stress cause psoriasis? *J Invest Dermatol.* 2005 Jul; 125(1):vi-vii

26 Tercedor J et al. Generalized pustular psoriasis and idiopathic hypoparathyroidism. Arch Dermatol. 1991. Sep;127 (9) :1418-9.

27 Knuever J, Tantcheva-Poor I. Generalized pustular psoriasis: A possible association with severe hypocalcaemia due to primary hypoparathyroidism. J Dermatol. 2017 Dec;44(12):1416-1417

28 Guerreiro de Moura CA et al. A Case of Acute Generalized Pustular Psoriasis of von Zumbusch Triggered by Hypocalcemia. Case Rep Dermatol. 2015 Dec 3;7(3):345-51

29 Ruan X et al. Hypocalcemia: low incidence in flares of pustular and chronic plaque psoriasis. Int J Dermatol. 2017 Jun;56(6): e133-e135

30 Navarini AA et al. European consensus statement on phenotypes of pustular psoriasis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2017 Nov;31(11):1792-1799

31 Paola Di Meglio et al. Psoriasis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014 Aug; 4(8)

32 Lew W et al. Psoriasis vulgaris: cutaneous lymphoid tissue supports T-cell activation and "Type 1" inflammatory gene expression. Trends Immunol. 2004 Jun;25(6):295-305

33 Rocha-Pereira P et al. The inflammatory response in mild and in severe psoriasis. Br J Dermatol. 2004 May;150(5):917-28

34 Chamian F, Krueger JG. Psoriasis vulgaris: an interplay of T lymphocytes, dendritic cells, and inflammatory cytokines in pathogenesis. Curr Opin Rheumatol. 2004 Jul;16(4):331-7.

35 Nature Reviews Immunology

36 Gordon, Kenneth B., Ruderman, Eric M. Psoriasis and Psoriatic Arthritis: An Integrated Approach. Springer; Berlin, New York: 2005. pp. 57–65.

37 Husted J.A., Thavaneswaran A., Chandran V., Eder L., Rosen C.F., Cook R.J., Gladman D.D. Cardiovascular and other comorbidities in patients with psoriatic arthritis: a comparison with patients with psoriasis. Arthritis Care Res. (Hoboken) 2011; 63:1729–1735.

38 Jamnitski A., Symmons D., Peters M.J., Sattar N., McInnes I., Nurmohamed M.T. Cardiovascular comorbidities in patients with psoriatic arthritis: a systematic review. Ann. Rheum. Dis. 2013; 72:211–216

39 Yeung H., Takeshita J., Mehta N.N., Kimmel S.E., Ogdie A., Margolis D.J., Shin D.B., Attor R., Troxel A.B., Gelfand J.M. Psoriasis severity and the prevalence of major medical comorbidity: a population-based study. *JAMA Dermatol.* 2013; 149:1173–1179.

40 Ni C., Chiu M.W. Psoriasis and comorbidities: links and risks. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2014; 7:119–132.

41 Shah KMellars L2, Changolkar A3, Feldman SR4 . Real-world burden of comorbidities in US patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 2017 Aug;77(2):287-292.

42 Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Sep;13(9):566-78

43 Jodi Nunnari, Anu Suomalainen. Mitochondria: In Sickness and in Health *Cell.* 2012 Mar 16; 148(6): 1145–1159

44 Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu Rev Genet.* 2009;43:95-118

45 West AP, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2011 Jun;11(6):389-402.

46 Archibald JM. Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Curr Biol.* 2015 Oct 5; 25(19):R911-21

47 Angajala A, Lim S, Phillips JB, Kim JH, Yates C, You Z, Tan M. Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. *Front Immunol.* 2018 Jul 12;9:1605.

48 Daems WT, Wisse E. Shape and attachment of the cristae mitochondriales in mouse hepatic cell mitochondria. *J Ultrastruct Res.* 1966 Sep;16(1):123-40.

49 Mannella CA, Marko M, Penczek P, Barnard D, Frank J. The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc Res Tech.* 1994 Mar 1;27(4):278-83

50 PALADE GE. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem.* 1953 Jul;1(4):188-211.

51 Bereiter-Hahn J, Vöth M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech.* 1994 Feb 15;27(3):198-219.

52 Nunnari J, Marshall WF, Straight A, Murray A, Sedat JW, Walter P. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell*. 1997 Jul;8(7):1233-42.

53 Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics in mammals. *Curr Top Dev Biol*. 2004;59:119-44.

54 Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*. 2006 Jun 30;125(7):1241-52.

55 Scott I, Youle RJ. Mitochondrial fission and fusion. *Essays in biochemistry*. 2010; 47:85-98.

56 Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 2012 Aug 31; 337(6098):1062-5.

57 Hermann GJ, Thatcher JW, Mills JP, Hales KG, Fuller MT, Nunnari J, Shaw JM. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol*. 1998 Oct 19;143(2):359-73.

58 Rapaport D, Brunner M, Neupert W, Westermann B. Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1998 Aug 7;273(32):20150-5

59 Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*. 2001 Mar;114(Pt 5):867-74

60 Eura Y, Ishihara N, Yokota S, Mihara K. Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem*. 2003 Sep;134(3):333-44.

61 Hermann GJ, Shaw JM. Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1998;14:265-303.

62 Rapaport D, Brunner M, Neupert W, Westermann B. Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1998 Aug 7;273(32):20150-5.

63 Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombès A. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci*. 2002 Apr 15;115(Pt 8):1663-74.

64 Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Bricchese L, Gas N, Guillou E, Delettre C, Valette A, Hamel CP, Ducommun B, Lenaers G, Belenguer P. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett.* 2002 Jul 17;523(1-3):171-6.

65 Satoh M, Hamamoto T, Seo N, Kagawa Y, Endo H. Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jan 10;300(2):482-93.

66 Wong ED, Wagner JA, Scott SV, Okreglak V, Holewinski TJ, Cassidy-Stone A, Nunnari J. The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol.* 2003 Feb 3;160(3):303-11.

67 DeVay R, Block J, Cassidy-Stone A, Wayson S, McCaffery JM, Nunnari J. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Meeusen S, Cell.* 2006 Oct 20;127(2):383-95.

68 Malka F1, Guillery O, Cifuentes-Diaz C, Guillou E, Belenguer P, Lombès A, Rojo M. Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *Sep;*6(9):853-9.

69 Song Z, Ghochani M, McCaffery JM, Frey TG, Chan DC. Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol Biol Cell.* 2009 Aug;20(15):3525-32.

70 Chan DC. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet.* 2012;46:265-87.

71 DiMauro S, Schon EA. 2003. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.* 348:2656–68.

72 Nakada K, Inoue K, Hayashi J. 2001. Interaction theory of mammalian mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288:743–46.

73 Twig G et al. 2008. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBOJ.* 27:433–46.

74 Tait SW, Green DR. 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:621–32.

75 Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, et al. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. 2001. *Dev. Cell* 1:515–25.

76 Bleazard W, McCaffery JM, King EJ, Bale S, Mozdy A, Tieu Q, Nunnari J, Shaw JM. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol.* 1999 Sep;1(5):298-304.

77 Labrousse AM, Zappaterra MD, Rube DA, van der Bliek AM. *C.elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell.* 1999 Nov;4(5):815-26.

78 Sesaki H, Jensen RE. Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol.* 1999 Nov 15;147(4):699-706.

79 Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingeman E, Song C, Yoo C, et al. 2008. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev. Cell* 14:193–204.

80 Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC. 2005. Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1 regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J.* 24:1546–56.

81 Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol. Biol.* 2004. *Cell* 15:5001–11.

82 Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, Karbowski M, Mattenberger Y, et al. 2009. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J.* 28:1589–600.

83 Shen T, Zheng M, Cao C, Chen C, Tang J, et al. 2007. Mitofusin-2 is a major determinant of oxidative stress-mediated heart muscle cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 282:23354–61.

84 Martinou JC, Youle RJ. 2011. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell.* 2011 Jul 19;21(1):92-101.

85 Sherian C, Martin SJ. Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion* 2010.10:640–48.

86 Estaquier J, Arnoult D. Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell Death Differ.* 2007. 14:1086–94.

87 Parone PA, James DI, Da Cruz S, Mattenberger Y, Donze O, et al. 2006. Inhibiting the mitochondrial fission machinery does not prevent Bax/Bak-dependent apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 26:7397–408.

88 Detmer SA; Chan DC . Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology*; Nov 2007; vol. 8 (no. 11); p. 870-879.

89 Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. 2003. *Jan 20*;160(2):189-200.

90 Davies VJ, Hollins AJ, Piechota MJ, Yip W, Davies JR, White KE, Nicols PP, Boulton ME, Votruba M. Hum Mol Genet .Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. 2007 *Jun 1*;16(11):1307-18.

91 Ishihara N, Nomura M, Jofuku A, Kato H, Suzuki SO, Masuda K, Otera H, Nakanishi Y, Nonaka I, Goto Y, Taguchi N, Morinaga H, Maeda M, Takayanagi R, Yokota S, Mihara K. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol.* 2009 *Aug*;11(8):958-66.

92 Wakabayashi J, Zhang Z, Wakabayashi N, Tamura Y, Fukaya M, Kensler TW, Iijima M, Sesaki H. The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J Cell Biol.* 2009 *Sep 21*;186(6):805-16.

93 Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet.* 2009 *Oct 15*;18(R2):R169-76.

94 Alain Meyer, Gilles Laverny, Livio Bernardi, Anne Laure Charles, Ghada Alsaleh, Julien Pottecher, Jean Sibilia, and Bernard Geny. Mitochondria: An Organelle of Bacterial Origin Controlling Inflammation. *Front Immunol* 2018;9: 536.

95 Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 2009;78:857–902.

96 Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell.* 2001;12:2245–2256.

97 Yoon Y, Pitts KR, McNiven MA. Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. *Mol Biol Cell.* 2001;12:2894–2905.



98 Ingerman E, Perkins EM, Marino M, Mears JA, McCaffery JM, Hinshaw JE, et al. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol.* 2005;170:1021–1027.

99 Otera H, Mihara K. Molecular Mechanisms and Physiologic Function of Mitochondrial Dynamics. *J Biochem.* 2011;149:241–251.

100 Lackner LL, Nunnari JM. The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1792:1138–1144.

101 Scott I, Youle RJ. Mitochondrial fission and fusion. *Essays in biochemistry.* 2010;47:85-98.

102 Ishihara N et al. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol.* 2009;11:958–966.

103 Wakabayashi J, Zhang Z, Wakabayashi N, Tamura Y, Fukaya M, Kensler TW, et al. The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *JCellBiol.* 2009;186:805–816.

104 Cereghetti GM, Scorrano L. The many shapes of mitochondrial death. *Oncogene.*2006.Aug 7;25(34):4717-24.

105 Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins de Brito O, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P, Scorrano L. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Oct 14;105(41):15803-8.

106 Echtay KS. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med.* 2007;43:1351–1371.

107 S. Rousset, J. Mozo, G. Dujardin, Y. Emre, S. Masscheleyn, D. Ricquier, A.M. Cassard-Doulcier. UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life. *FEBS Lett.* 2007 Feb 6;581(3):479-82

108 Pierelli G; Stanzione R; Forte M; Migliarino S; Perelli M; Volpe M; Rubattu S. Uncoupling Protein 2: A Key Player and a Potential Therapeutic Target in Vascular Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity;* 2017; vol. 2017; p. 7348372.

109 Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, ves-Guerra MC, Goubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S, Ricquier D. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet.* 2000;26:435–439.



110 Bai Y, Onuma H, Bai X, Medvedev AV, Misukonis M, Weinberg JB, Cao W, Robidoux J, Floering LM, Daniel KW, Collins S. Persistent nuclear factor-kappa B activation in Ucp2<sup>-/-</sup> mice leads to enhanced nitric oxide and inflammatory cytokine production. *J Biol Chem*. 2005;280:19062–19069

111 Emre Y, Hurtaud C, Nubel T, Criscuolo F, Ricquier D, Cassard-Doulcier AM. Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages. *Biochem J*. 2007;402:271–278.

112 Michael Tagen, Alvaro Elorza, Duraisamy Kempuraj, William Boucher, Christopher L. Kepley, Orian S. Shirihai, and Theoharis C. Theoharides. The mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) inhibits mast cell activation and reduces histamine content. *J Immunol*. 2009 Nov 15;183(10):6313-9.

113 Yalin Emre, Tobias Nübel. Uncoupling protein UCP2: When mitochondrial activity meets immunity. *FEBS Letters* 584(2010)1437–1442

114 C.Y. Zhang et al. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell*. 2001 Jun 15;105(6):745-55.

115 L.E. Parton et al. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature*. 2007 Sep 13;449(7159):228-32.

116 Z.B. Andrews, Z.W. Liu, N. Wallingford, D.M. Erion, E. Borok, J.M. Friedman, M.H. Tschöp, M. Shanabrough, G. Cline, G.I. Shulman. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature*. 2008 Aug 14;454(7206):846-51

117 Blanc J, et al. Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis. *Circulation*. 2003;107:388–390.

118 Fislser JS, Warden CH. Uncoupling proteins, dietary fat and the metabolic syndrome. *Nutr Metab (Lond)* 2006;3:38.

119 Moukdar F, et al. Reduced antioxidant capacity and diet-induced atherosclerosis in uncoupling protein-2-deficient mice. *J Lipid Res*. 2009;50:59–70.

120 Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, et al. (December 2000). "Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production". *Nat. Genet*. 26 (4): 435–9.

121 Yu X, Wiczorek S, Franke A, Yin H, Pierer M, Sina C, Karlsen TH, Boberg KM, Bergquist A, Kunz M, Witte T, Gross WL, Epplen JT, Alarcón-Riquelme ME,

Schreiber S, Ibrahim SM. Association of UCP2 -866 G/A polymorphism with chronic inflammatory diseases. *Genes Immun*. 2009 Sep;10(6):601-5.

122 Daeho Park, Claudia Han, Michael R. Elliott, Jason M. Kinchen, Paul C. Trampont, Soumita Das, Sheila Collins, Jeffrey J. Lysiak, Kyle L. Hoehn, and Kodi S. Ravichandran. Continued clearance of apoptotic cells critically depends on the phagocyte Ucp2 protein. *Nature*. 2011 Aug 21; 477(7363): 220–224.

123 Chial, H. & Craig, J. (2008) mtDNA and mitochondrial diseases. *Nature Education* 1(1):217.

124 Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*. 2005 May;6(5):389-402

125 Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81(1):1-5.

126 Collins LV, Hajizadeh S, Holme E, Jonsson IM, Tarkowski. A Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *J Leukoc Biol*. 2004 Jun; 75(6):995-1000

127 Angajala A, Lim S, Phillips JB, et al. Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:1605.

128 Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010 Mar 4; 464(7285):104-7.

129 Zhang B, Asadi S, Weng Z, Sismanopoulos N, Theoharides TC. Stimulated human mast cells secrete mitochondrial components that have autocrine and paracrine inflammatory actions. *PLoS One*. 2012;7(12):e49767.

130 Contis A, Mitrovic S, Lavie J, Douchet I, Lazaro E, Truchetet M-E, et al. Neutrophil-derived mitochondrial DNA promotes receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B and its ligand signalling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* (2017) 56(7):1200–5. [10.1093/rheumatology/kex041](https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex041)

131 Nakayama H, Otsu K. Mitochondrial DNA as an inflammatory mediator in cardiovascular diseases. *Biochemical Journal*. 2018;475(5):839-852.

132 Zhang B et al. Mitochondrial DNA and anti-mitochondrial antibodies in serum of autistic children. *J Neuroinflammation*. 2010 Nov 17;7:80.

133 Theoharides TC. Danger Signals and Inflammation. *Clin Ther* 2016; 38(5):996-999.

134 Collins LV, Hajizadeh S, Holme E, Jonsson IM, Tarkowski A. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *J Leukoc Biol* 2004; 75(6):995-1000

135 Marques PE, Amaral SS, Pires DA et al. Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology* 2012; 56(5):1971-1982.

136 Sun S, Sursal T, Adibnia Y et al. Mitochondrial DAMPs increase endothelial permeability through neutrophil dependent and independent pathways. *PLoS One* 2013; 8(3):e59989.

137 Theoharides TC. Skin mast cells: are we missing the forest for the trees? *Exp Dermatol* 2016; 25(6):422-423.

138 Theoharides TC. Neuroendocrinology of mast cells: Challenges and controversies. *Exp Dermatol* 2017; 26(9):751-759.

139 Zhang B, Alysandratos KD, Angelidou A et al. Human mast cell degranulation and preformed TNF secretion require mitochondrial translocation to exocytosis sites: Relevance to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127(6):1522-1531.

140 Zhang Q, Raouf M, Chen Y et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010; 464(7285):104-107.

141 Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ. Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase. *Shock*. 2010 Jul;34(1):55-9.

142 Tagen M, Elorza A, Boucher W, Kepley CL, Shirihai O, Theoharides TC. Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) inhibits mast cell activation and reduces histamine content. *J Immunol* 2009; 183(19):6313-6319.

143 Emre Y, Nubel T. Uncoupling protein UCP2: when mitochondrial activity meets immunity. *FEBS Lett* 2010; 584(8):1437-1442.

144 Toral M, Romero M, Jimenez R et al. Role of UCP2 in the protective effects of PPARbeta/delta activation on lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction. *Biochem Pharmacol* 2016; 110-111:25-36.

145 Moon JS, Lee S, Park MA et al. UCP2-induced fatty acid synthase promotes NLRP3 inflammasome activation during sepsis. *J Clin Invest* 2015; 125(2):665-680.

146 Chan DC. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet* 2012; 46:265-287.

147 Zhang B, Alysandratos KD, Angelidou A et al. TNF secretion from human mast cells is regulated by mitochondrial dynamics and mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2). *J Immunol* 2010; 184(135):11

148 Bowen AR, Hanks AN, Murphy KJ, Florell SR, Grossman D. Proliferation, apoptosis, and survivin expression in keratinocytic neoplasms and hyperplasias. *Am J Dermatopathol* 2004; 26(3):177-181.

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- 1) **Anastasia Therianou**, Magdalini Vasiadi, Danae A Delivanis, Theodora Petrakopoulou, Alexandra Katsarou-Katsari, Christina Antoniou, Alexandros Stratigos, Irene Tsilioni, Andreas Katsambas, Dimitris Rigopoulos, Theoharis C Theoharides. **Mitochondrial dysfunction in affected skin and increased mitochondrial DNA in serum from patients with psoriasis**. *Experimental Dermatology*. In Press.
- 2) Weng Z, Patel AB, Vasiadi M, **Therianou A**, Theoharides TC. **Luteolin inhibits human keratinocyte activation and decreases NF-κB induction that is increased in psoriatic skin**. *PLoS One*. 2014 Feb 28;9(2): e90739.
- 3) Vasiadi M, Mondolfi AP, Alysandratos KD, **Therianou A**, Katsarou-Katsari A, Petrakopoulou T, Theoharidis A, Miniati A, Theoharides TC. **Neurotensin serum levels and skin gene expression are increased in atopic dermatitis**. *Br J Dermatol*. 2013 Sep;169(3):695-9.
- 4) Zhang B, Weng Z, Sismanopoulos N, Asadi S, **Therianou A**, Alysandratos KD, Angelidou A, Shirihai O, Theoharides TC. **Mitochondria Distinguish Granule-Stored from de novo Synthesized Tumor Necrosis Factor Secretion in Human Mast Cells**. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;159(1):23-32.
- 5) Sismanopoulos N, Delivanis DA, Alysandratos KD, Angelidou A, Vasiadi M, **Therianou A**, Theoharides TC. **IL-9 induces VEGF secretion from human mast cells and IL-9/IL-9 receptor genes are over expressed in atopic dermatitis**. *PLoS One*. 2012;7(3):e33271.
- 6) Sismanopoulos N, Delivanis DA, Alysandratos KD, Angelidou A, **Therianou A**, Kalogeromitros D, Theoharides TC. **Mast cells in allergic and inflammatory diseases**. *Curr Pharm Des*. 2012;18(16):2261-77.

7) Vasiadi M, **Therianou A**, Sideri K, Smyrnioti M, Sismanopoulos N, Delivanis DA, Asadi S, Katsarou-Katsari A, Petrakopoulou T, Theoharides A, Antoniou C, Papadavid E, Stavrianeas N, Kalogeromitros D, Theoharides TC. **Increased serum CRH levels with decreased skin CRHR-1 gene expression in psoriasis and atopic dermatitis.** J Allergy Clin Immunol. 2012;129(5):1410-3.

8) Vasiadi M, **Therianou A**, Alysandratos KD, Katsarou-Katsari A, Petrakopoulou T, Theoharides A, Papadavid E, Stavrianeas N, Antoniou C, Kalogeromitros D, Theoharides TC. **“Serum neurotensin (NT) is increased in psoriasis and NT induces vascular endothelial growth factor release from human mast cells”.** Br J Dermatol. 2012;166(6):1349-52

