

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

***Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TNF α ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΤΩΝ
ΨΩΡΙΑΚΩΝ ΚΕΡΑΤΙΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ***

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΚΟΛΑΚΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

ΣΑΜΠΙΝΕ ΚΡΥΓΚΕΡ – ΚΡΑΣΑΓΑΚΗ

ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΜΑΪΟΣ 2013



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Επιβλέπουσα:

Σαμπίνε Κρύγκερ-Κρασαγάκη
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Δερματολογίας
Ιατρική Σχολή

Μέλη:

Γεώργιος Χαλεπάκης
Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας
Τμήμα Βιολογίας

Χρήστος Τσατσάνης
Αναπληρωτής καθηγητής
Κλινικής Χημείας
Ιατρική Σχολή

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

Σαμπίνε Κρύγκερ-Κρασαγάκη
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Δερματολογίας

Γεώργιος Χαλεπάκης
Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Χρήστος Τσατσάνης
Αναπληρωτής Καθηγητής
Κλινικής Χημείας

Κυριακή Θερμού
Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Ευστάθιος Σταθόπουλος
Καθηγητής Παθολογοανατομίας

Κωνσταντίνος Κρασαγάκης
Αναπληρωτής Καθηγητής
Δερματολογίας

Λήδα Χατζή
Λέκτορας Επιδημιολογίας

Στους γονείς μου
Μαρία&Παντελή
και στα αδέρφια μου
Χρυσούλα&Δημήτρη

"Δεν υπάρχει αριθμός πειραμάτων που να μπορεί να δείξει ότι η θεωρία μου είναι σωστή, αλλά ένα και μόνο πείραμα μπορεί να αποδείξει ότι είναι λάθος"

Άλμπερτ Αϊνστάιν

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|-----------|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ | 7 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 11 |
| Ψωρίαση..... | 11 |
| Ο ρόλος του TNFα..... | 13 |
| Απόπτωση..... | 16 |
| Απόπτωση στην ψωρίαση | 19 |
| Σκοπός και πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης | 21 |
| ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 22 |
| Ασθενείς | 22 |
| Λήψη βιοψιών και μονιμοποίηση παρασκευασμάτων..... | 22 |
| <i>Τομή, αποπαραφίνωση και ενυδάτωση ιστοτεμαχίων</i> | 23 |
| <i>Αποκάλυψη αντιγονικού επιτόπου και χρώση ιστοτεμαχίων</i> | 23 |
| <i>Εκτίμηση ανοσοϊστοχημικών χρώσεων</i> | 25 |
| <i>Μέτρηση πάχους της επιδερμίδας</i> | 25 |
| Απομόνωση και καλλιέργεια φυσιολογικών ανθρώπινων κερατινοκυττάρων..... | 25 |
| Καλλιέργεια κερατινοκυττάρων HaCat..... | 26 |
| Λύση των κυττάρων και συλλογή πρωτεΐνης | 26 |
| <i>Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών</i> | 27 |
| <i>Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)</i> | 27 |
| Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού..... | 30 |
| Προσδιορισμός της Απόπτωσης και της κυτταροτοξικότητας | 31 |
| Στατιστική ανάλυση..... | 31 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 33 |
| Ψηφιακή ανάλυση ανοσοϊστοχημικών χρώσεων και σύγκριση με κλασική παθολογοανατομική εκτίμηση | 33 |
| Διαταραγμένη έκφραση των αποπτωτικών πρωτεϊνών της ψωριασικής πλάκας σε σύγκριση με υγιές δέρμα ψωριασικών ασθενών | 36 |
| Μείωση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2, Bcl-XL και NFκB μετά από θεραπεία με infliximab .. | 38 |
| Αύξηση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών P53, AIF και Bax μετά από θεραπεία με infliximab | 39 |
| Μέτρηση πάχους επιδερμίδας..... | 45 |

| | |
|---|-----------|
| Στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πάχους της επιδερμίδας με τον κλινικό δείκτη PASI κατά την διάρκεια της θεραπείας. | 45 |
| Συnergιστική αύξηση της απόπτωσης πρωτογενών κερατινοκυττάρων μετά από προεπάση με TNFα και θεραπεία με infliximab | 47 |
| Έκφραση αποπτωτικών πρωτεϊνών σε κυτταροκαλλιέργειες της κυτταρικής σειράς HaCat και σε πρωτογενή φυσιολογικά ανθρώπινα κερατινοκύτταρα | 49 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 51 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 59 |
| ABSTRACT | 61 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 63 |
| ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ | 67 |

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας μια πολυετή προσπάθεια, συνειρμικά ο χρόνος γυρίζει πίσω και αναζωπυρώνει αναμνήσεις από το κοντινό ή ίσως μακρινό παρελθόν.

Ήδη ως φοιτητής στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης είχα την τύχη να γνωρίσω την τότε Επίκουρο Καθηγήτρια Δερματολογίας και νυν επιβλέπουσα του Διδακτορικού μου και Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας κ. Σαμπίνε Κρυγκερ-Κρασαγκάκη. Ο τρόπος σκέψης, ο επαγγελματισμός και η γενναιόδωρη προσφορά γνώσεων και εμπειριών της με συνεπήραν και με έκαναν να «ζηλέψω» της πορείας της. Αρχικά στη Δερματολογική Κλινική, έπειτα στο εργαστήριο αλλά και η μετέπειτα καθοδήγηση προς την Πανεπιστημιακή Κλινική Δερματολογίας του Charité στο Βερολίνο χάραξαν την έως τώρα επαγγελματική μου πορεία και άνοιξαν νέους ορίζοντες στην επαγγελματική μου εξέλιξη. Η άριστη αυτή σχέση δασκάλου-μαθητή, με όλο τον ενθουσιασμό και τους προβληματισμούς που περιλαμβάνει, οδήγησε στην ωρίμανση την επιστημονικής μου σκέψης και κρίσης. Για αυτά, λοιπόν, αλλά και για πολλά άλλα παραμένω ευγνώμων στην κ. Κρυγκερ-Κρασαγκάκη.

Η πορεία μου στην επιστημονικό χώρο έγινε ακόμα πιο συναρπαστική όταν ως απόφοιτος πλέον της σχολής και με την παρότρυνση της κ. Κρυγκερ-Κρασαγκάκη, μου δόθηκε η δυνατότητα να συμμετέχω στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Καθηγητή κ. Γιώργου Χαλεπάκη. Οι ατελείωτες συζητήσεις με τον Γιώργη και ο ενθουσιασμός που τις χαρακτήριζε λειτούργησαν υποσυνείδητα ως κίνητρο για την μύηση μου στο πεδίο των βασικών επιστημών, στο μοριακό «Κόσμο των θαυμάτων».

Με αφετηρία, λοιπόν, το εργαστήριο του Γιώργη και με συνεπακόλουθο τρόπο «αλυσιδωτών αντιδράσεων» κατάφερα να εμπλακώ στον εργαστηριακό μικρόκοσμο του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τον επόμενο σταθμό αποτέλεσε το Εργαστήριο Ερευνητικής Δερματολογίας της Δερματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την διεύθυνση της Καθηγήτριας κ. Ανδρονίκης Τόσκα, την οποία επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω για την αποδοχή της και την υποστήριξή της στα χρόνια που ακολούθησαν. Στο εργαστήριο αυτό γνώρισα ανθρώπους που πέρα από την άψογη συνεργασία αναπτύχθηκε μια μακροχρόνια φίλια. Ιδιαίτερως θα

ήθελα να ευχαριστήσω τη Μελίνα Σταυρούλακη αλλά και την Τόνια Ακουμιανάκη που με τόση υπομονή με δίδαξαν όχι μόνο τις βασικές μεθόδους αλλά και την επιμονή που απαιτεί η επιστημονική δουλειά. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον πολύ καλό φίλο Στέφανο Κληρονόμο για την συμπαράσταση όλα αυτά τα χρόνια, πριν και μετά το Διδακτορικό. Δεν θα μπορούσα στο σημείο αυτό να παραλείψω από τις ευχαριστίες την Επίκουρο Καθηγήτρια Στέλλα Γιακουμάκη για την πολύτιμη βοήθειά της στην στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Και τέλος ευχαριστώ πολύ τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Λάμπρο Παναγή για την καθοριστική του βοήθεια στην ψηφιακή ανάλυση των χρώσεων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να εκφράσω στον Καθηγητή Παθολογοανατομίας κ. Σ. Σταθόπουλο και στην ομάδα του εργαστηρίου του. Στην Λίντα Γιαννικάκη χρωστάω σε μεγάλο βαθμό τις παθολογοανατομικές μου γνώσεις. Πάντα πρόθυμη να μοιραστεί τους προβληματισμούς μου και να ακούσει τις προτάσεις μου. Επίσης ευχαριστώ πολύ τη Μαρία Κλινάκη και τη Γιωργία Φιολιτάκη για την άψογη τεχνική υποστήριξη στις ιστολογικές τομές και χρώσεις όλων των πειραμάτων της διατριβής μου.

Επίσης ευχαριστώ τον συνεπιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Χρήστο Τσατσάνη που με προθυμία δέχθηκε να συμμετέχει στην τριμελή επιτροπή της διατριβής μου, καθώς και την Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κ. Κυριακή Θερμού, τον Καθηγητή Δερματολογίας κ. Κωνσταντίνο Κρασαγάκη και την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Λήδα Χατζή για τη συμμετοχή τους στην επταμελή επιτροπή της διατριβής μου.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοψυχολογίας και πολύ καλό φίλο Γιώργο Παναγή ευχαριστώ πολύ τόσο για τη συμβουλευτική καθοδήγηση αλλά και την ηθική συμπαράσταση σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου. Οι συζητήσεις μαζί του αποτέλεσαν αναμφισβήτητη κινητήριο δύναμη στην εκπόνηση της.

Χωρίς την καθοριστική υποστήριξη του Μάνου Γιατρομανωλάκη, διαχειριστή συστημάτων και δικτύων στο Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και LASER του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας Κρήτης, στο τεχνικό υπολογιστικό μέρος της διατριβής μου η εκπόνηση της θα ήταν σαφώς δυσκολότερη. Γι' αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω το Μάνο για τη βοήθειά του όλα αυτά τα χρόνια.

Στο πλαίσιο της Διδακτορικής Διατριβής μου και μέσω της ερευνητικής υποτροφίας που έλαβα από τον Γερμανικό Οργανισμό Ακαδημαϊκών Ανταλλαγών (DAAD, Deutscher Akademischer Austausch Dienst) πραγματοποίησα το πρώτο μου βήμα στην Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Charité του Βερολίνου. Αρχικά στα ερευνητικά εργαστήρια «Ρύθμισης Απόπτωσης» του Δερματολογικού Ογκολογικού Κέντρου Charité (Apoptosis Regulation, Hauttumor Centrum Charité) και στο Διεπιστημονικό Κέντρο Μοριακής Ανοσολογίας του Κέντρου Μελετών Ψωρίασης (Interdisziplinäre Gruppe Molekulare Immunpathologie, Psoriasis Studienzentrum, Charité) και μετέπειτα στην Κλινική Δερματολογίας, Αφροδισιολογίας και Αλλεργιολογίας του Charité στην οποία και εργάζομαι ως ειδικευόμενος ιατρός.

Θα ήταν παράλειψη να μην αναφέρω ανθρώπους που με στηρίζουν ακόμα και σήμερα στην κλινική αλλά και στο εργαστήριο. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Δερματολογίας και Διευθυντή της Κλινικής, κ. Wolfram Sterry, που από την πρώτη κιόλας μας συνάντηση με δέχτηκε εγκάρδια και με ενσωμάτωσε στο δυναμικό της Κλινικής. Νιώθω τυχερός που κατάφερα να γίνω «μαθητής» της «Σχολής Δερματολογίας» του Καθηγητή Sterry. Παράλληλα ευχαριστώ τον Καθηγητή Δερματολογίας και Διευθυντή του ερευνητικού τμήματος της κλινικής κ. Marcus Maurer, καθώς και τον Καθηγητή κ. Torsten Zuberbier. Επίσης αποδίδω τις ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή, κ. Jürgen Eberle και στην ομάδα του εργαστηρίου του, ιδιαιτέρως την τεχνολόγο κ. Conny Schwarz και το διδακτορικό φοιτητή Frank Braun, για την άψογη συνεργασία και ανεκτίμητη βοήθεια σε όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο «Ρύθμισης Απόπτωσης».

Θα ήθελα ξεχωριστά να ευχαριστήσω το Τμήμα Ψωρίασης της Κλινικής που αποτελεί τη βάση μου και το σημείο της εξειδίκευσής μου. Θα αναφερθώ ιεραρχικά στα άτομα του Τμήματος και θα ήθελα να τους ευχαριστήσω όλους για την έως τώρα άψογη συνεργασία και την υποστήριξη τόσο οικονομικά όσο και ηθικά. Ευχαριστώ λοιπόν: τον κ. Robert Sabat, Διευθυντή του Κέντρου της Ψωρίασης και Υπεύθυνο του Ερευνητικού Παραρτήματος, την κ. Sandra Philipp, Υπεύθυνη του Κλινικού Παραρτήματος του Κέντρου Ψωρίασης, την κ. Kerstin Wolk, Υπεύθυνη του Διεπιστημονικού Τμήματος Μοριακής Ανοσολογίας, τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια κ. Ellen Witte και υπεύθυνη του Τμήματος Πειραματόζωων και in vivo Πειραμάτων, τους συνειδικευμένους μου στο Τμήμα, κ. Frank Bachmann, κ. Kang Wang και κ. Agata Kurek καθώς και το νοσηλευτικό και τεχνολογικό προσωπικό (κ. Stefanie Kunz, κ.

Sabine Schult, κ. Katrin Witte, κ. Brigitte Kette, κ. Beate Pust, κ. Annette Buss, κ. Birgit Formann, κ. Andrea Schmidt).

Η ολοκλήρωση της διατριβής αυτής φυσικά δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την συναίνεση και αφιλοκερδή συμμετοχή των ασθενών που δέχθηκαν να υποβληθούν στην επώδυνη διαδικασία διαδοχικών βιοψιών.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένεια μου, τον πατέρα μου Παντελή, τη μητέρα μου Μαρία και τα αδέρφια μου Δημήτρη, Χρυσούλα και Μανόλη Χανιωτάκη, που όλα αυτά τα χρόνια με στήριξαν οικονομικά αλλά πρωτίστως ηθικά για την εκπλήρωση αυτού του δύσκολου έργου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ψωρίαση

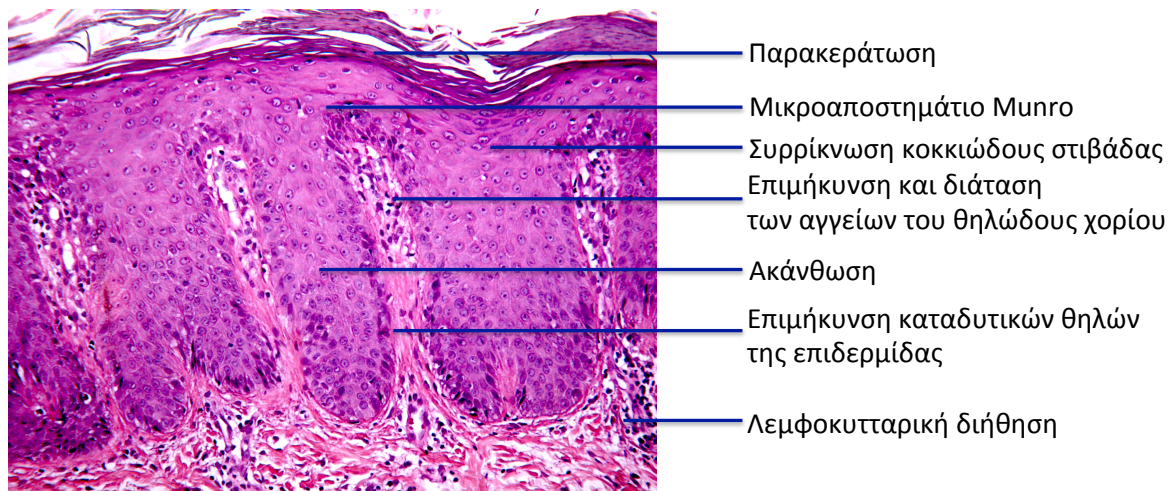
Η ψωρίαση αποτελεί μία από τις πλέον συχνές φλεγμονώδεις δερματοπάθειες με επίπτωση περίπου 3-5 % στον δυτικό πληθυσμό [1]. Ως επί το πλείστον, η επιστημονική έρευνα αναφέρεται στον κλινικό όρο κοινή ψωρίαση, η οποία προσβάλλει το 85-90% των ασθενών με την πάθηση αυτή [2]. Εκτός όμως από το δέρμα, η ψωρίαση μπορεί να προσβάλλει τους βλεννογόνους, τα νύχια, τις αρθρώσεις, τους συνδέσμους και τους τένοντες επιτείνοντας έτσι τη δυσχέρεια του ασθενούς στην καθημερινότητά του και επηρεάζοντας αρνητικά την ποιότητα ζωής του [3]. Η επιβάρυνση που προκαλεί η ψωρίαση στην γενικότερη φυσική κατάσταση του ασθενούς και κατ' επέκταση στην ευρύτερη κοινωνικοοικονομική δομή είναι σε αρκετές περιπτώσεις εντονότερη απ' ότι καταστάσεις απειλητικές για τη ζωή όπως για παράδειγμα το έμφραγμα μυοκαρδίου ή η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια [4].

Η γενετική συμμετοχή στην παθογένεια της ψωρίασης είναι αναμφισβήτητα αποδεδειγμένη σε κλινικές μελέτες διδύμων όπου διαπιστώθηκε συνύπαρξη της πάθησης στο 72% στους μονοζυγωτικούς δίδυμους ενώ μόνο 15-25% στους διζυγωτικούς. Εκτιμάται πως η κληρονομησιμότητα της ψωρίασης κυμαίνεται μεταξύ 60-90%. Παρόλο που έχουν περιγραφεί ποικίλες αλλαγές στην έκφραση διαφόρων γονιδιακών συμπλεγμάτων –όπως PSORS1, PSORS2 ή RAPTOR, δεν έχει ακόμα αποδειχθεί μία απόλυτη λειτουργική συσχέτιση των γενετικών παραγόντων με την παθογένεια της νόσου [5]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν πολυμορφισμοί στον εκκινητή του γονιδίου του TNFα (Tumor Necrosis Factor alpha, Παράγοντας νέκρωσης των όγκων άλφα) που φαίνεται να επηρεάζουν το επίπεδο έκφρασής του [6]. Η ακριβής συσχέτιση αυτών των πολυμορφισμών με την ψωρίαση δεν έχει ακόμα αποδειχθεί αλλά μπορεί να ερμηνευθεί από την εγγύτητα της θέσης του εκκινητή του TNFα με το HLA-C (Human Leukocyte Antigen-C, Ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο-C) στην περιοχή του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) [5].

Παρόλο που ο ακριβής παθοφυσιολογικός μηχανισμός παραμένει ακόμα άγνωστος, η παθογένεια της νόσου σχετίζεται με ανοσολογικές διεργασίες. Αρχικά, με τη συμμετοχή των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων ξεκινά η φάση ευαισθητοποίησης, η οποία λαμβάνει

χώρα στα δευτερεύοντα όργανα του λεμφικού συστήματος και οδηγεί στη γένεση Τ κυττάρων μνήμης αλλά και τελεστικών. Αν και το αντιγόνο που πυροδοτεί την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος δεν έχει ταυτοποιηθεί ακριβώς, ποικίλες αναφορές υποστηρίζουν τη συμμετοχή των β-αιμολυτικών στρεπτόκοκκων. Στη συνέχεια ακολουθεί η ενεργός φάση κατά την οποία Τ λεμφοκύτταρα και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού μεταναστεύουν στο δέρμα. Στον εκλεκτικό δερματοτροπισμό των ανοσοκυττάρων καθοριστικό ρόλο διαδραματίζουν τα ενδοθηλιακά μόρια προσκόλλησης, όπως για παράδειγμα η E-selectin, αλλά και χημειοκίνες, όπως η CXCR3. Τα μεταναστευθέντα κύτταρα ενεργοποιούν τόσο τα δενδριτικά και τα Τ λεμφοκύτταρα του χορίου όσο και τα κερατινοκύτταρα. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι αμφίδρομη, καθώς και τα κερατινοκύτταρα ενεργοποιούν τα λεμφοκύτταρα. Στη φάση αυτή είναι καθοριστική η συμμετοχή των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας καθώς και των προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η IFN γ (Interferon-gamma, ιντερφερόνη-γάμα) ή ο TNF α . Ανάμεσα στη φάση ευαισθητοποίησης και την ενεργό φάση, παρεμβάλλεται η λανθάνουσα φάση, η διάρκεια της οποίας ποικίλλει [7].

Ως αποτέλεσμα των παραπάνω φλεγμονωδών διεργασιών ακολουθεί η υπερπλασία της επιδερμίδας λόγω του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων [8]. Ο υπερπολλαπλασιασμός των κερατινοκυττάρων σε συνδυασμό με την αντίσταση αυτών σε αποπτωτικά ερεθίσματα πιθανώς ευθύνονται για την επαγωγή της ακάνθωσης στην ψωριασική επιδερμίδα με χαρακτηριστική επιμήκυνση των καταδυτικών θηλών της επιδερμίδας [9]. Η διαταραγμένη τελική διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων οδηγεί σε παρακεράτωση καθώς και στον σχηματισμό παχέων λεπιών στην επιφάνεια της ψωριασικής πλάκας. Η κοκκιώδης στιβάδα της επιδερμίδας, στην οποία λαμβάνει χώρα η τελική διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, ελαττώνεται σημαντικά ή απουσιάζει τελείως. Συχνά παρατηρείται συλλογή ουδετερόφιλων στην κερατίνη στιβάδα και διάχυτη λεμφοκυτταρική διήθηση στην επιδερμίδα. Εκτός όμως από την επιδερμίδα παρατηρείται και έντονη συμμετοχή του χορίου στην εξέλιξη της ψωριασικής πλάκας με έντονη λεμφοκυτταρική διήθηση [8]. Επιπλέον, παρουσιάζεται έντονη νεοαγγειογένεση με διάταση και επιμήκυνση των τριχοειδών του χορίου και ακανόνιστη νεοδόμηση αγγείων [10] (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Ιστοπαθολογική εικόνα ψωρίασης. Η αλληλεπίδραση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, των αγγείων, του χορίου και της επιδερμίδας στην εγκαθίδρυση της ψωριασικής πλάκας.

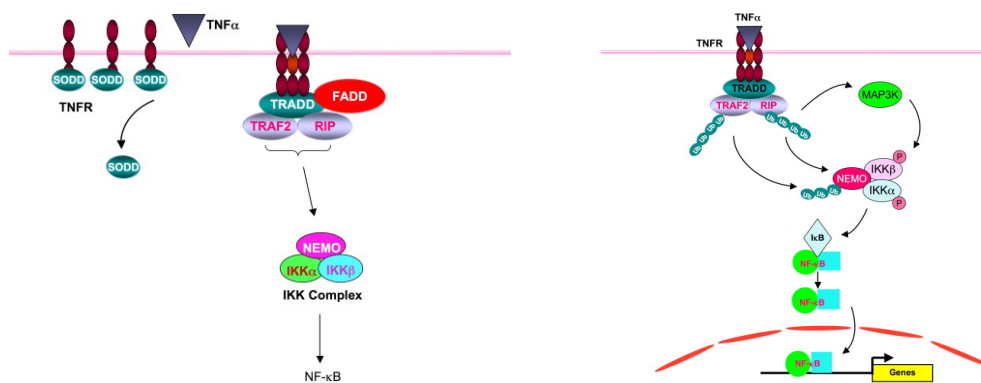
Οι διεργασίες αυτές διαμορφώνουν τελικά την κλινική εικόνα της ψωρίασης με τις χαρακτηριστικές σαφώς αφοριζόμενες ερυθματώδεις πλάκες με παχύ αργυρόχρωο λέπι. Οι ψωριασικές πλάκες παρουσιάζουν ομοιόμορφη κατανομή σε όλο το δέρμα και συχνότερα προσβάλλουν τις εκτατικές επιφάνειες των αγκώνων και των γονάτων. Σε συγκεκριμένες μορφές ψωρίασης, όπως η φλυκταινώδης ψωρίαση των παλαμών και των πελμάτων ή η ψωρίαση Zumbusch, ενδέχεται να εμφανιστούν στείρες φλύκταινες στην επιφάνεια των ψωριασικών βλαβών. Σε γενικευμένες περιπτώσεις, η ψωρίαση μπορεί να οδηγήσει σε ερυθροδερμία με κλινική εικόνα οξέος πάσχοντος [2].

Ο ρόλος του TNFα

Η σημαντικότερη ίσως απόδειξη για το ανοσολογικό υπόβαθρο της ψωρίασης έγκειται στο γεγονός ότι οι αλλαγές που παρατηρούνται στην ψωριασική επιδερμίδα υποστρέφουν μετά από ανοσοκατασταλτική θεραπεία με κυκλοσπορίνη A [11]. Η περαιτέρω έρευνα και ανάπτυξη μονοκλωνικών αντισωμάτων που αδρανοποιούν τον TNFα, υποστρέφοντας έτσι τα κλινικά συμπτώματα της ψωρίασης, υποδηλώνουν τον προέχοντα ρόλο της προφλεγμονώδους αυτής κυτοκίνης στην παθογένεια της ψωρίασης [12].

Ο TNFα είναι μια καθοριστική κυτοκίνη που ανιχνεύεται σε αυξημένα επίπεδα στις βλάβες αλλά και στο αίμα ασθενών με ψωρίαση [12]. Η παραγωγή του TNFα ελέγχεται σε μεταγραφικό, μεταφραστικό αλλά και μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Η έκφραση του γονιδίου οδηγεί σε μια πρόδρομο πρωτεΐνη 26 kDa που περιλαμβάνει ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο και μια μακριά άλυσο αμινοξέων η οποία υπόκειται σε πρωτεολυτική διάσπαση από συγκεκριμένες μεταλλοπρωτεϊνάσες με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ώριμου πεπτιδίου. Ο ελεύθερος TNFα είναι μία μη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη που κυκλοφορεί σαν ένα τριμερές 51 kDa. Η πρόδρομος μορφή παραμένει στην κυτταρική μεμβράνη και η βιολογική του δραστηριότητα βασίζεται στην άμεση επαφή με τα γειτονικά κύτταρα [13]. Δύο συγκεκριμένοι διαμεμβρανικοί υποδοχείς για τον TNFα, TNF-υποδοχέας-1 (TNF-Receptor-1, TNFR1) και TNFR2, εκφράζονται στα περισσότερα κύτταρα [14]. Παρόλο που και οι δύο υποδοχείς είναι παρόντες στα κερατινοκύτταρα [15], φαίνεται πως κυρίως ο TNFR1 μεσολαβεί στη φλεγμονή [16]. Επίσης, ο TNFα επηρεάζει άμεσα την έκφραση του TNFR1 καθώς σε παρουσία της κυτοκίνης παρατηρείται εκσεσημασμένη υπερέκφραση του TNFR1 αλλά όχι και του TNFR2 [17].

Η ενεργοποίηση του TNFR οδηγεί, μέσω ενεργοποίησης προσαρμοστικών μορίων, σε μια πληθώρα αντιφατικών σε ορισμένες περιπτώσεις διαδικασιών. Συγκεκριμένα, με άμεση ενεργοποίηση της κασπάσης-8 μπορεί να ωθήσει το κύτταρο σε απόπτωση. Διαφορετικά, μέσω ενεργοποίησης των Jak-κινασών και του p38, οδηγεί σε ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 (Activator Protein 1, Πρωτεΐνη Ενεργοποίησης 1). Ωστόσο, το σημαντικότερο ίσως σηματοδοτικό μονοπάτι στην περίπτωση της ψωρίασης φαίνεται να ενεργοποιείται με τη μεσολάβηση MAP-κινασών και τη συνεπακόλουθη αποδόμηση του αναστολέα του NFκB (Nuclear Factor kappa Beta, Πυρηνικός παράγοντας κάπα Βήτα), IκB (Inhibitor of kappa Beta, Αναστολέας του κάπα Βήτα). Αποτέλεσμα των διεργασιών αυτών είναι η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB και η μετατόπισή του στον πυρήνα [18] (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Σηματοδοτικό μονοπάτι του TNFα και ενεργοποίηση του NFκB. Τροποποιημένο από Li et al [18].

Πρόσφατα αποδείχτηκε πως συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί στο γονίδιο του TNFα (-857C) και του TNFR1 (TNFRSF1B 676T) συσχετίζονται με θετική ανταπόκριση των ασθενών σε θεραπεία με etanercept, ένα διμερές χιμαιρικής πρωτεΐνης σύντηξης της περιοχής εξωκυττάριας σύνδεσης του ανθρώπινου TNFR2 του με την περιοχή Fc της ανθρώπινης IgG₁ [19].

Η εντόπιση του TNFα διαφέρει στο ψωριασικό από το φυσιολογικό δέρμα. Στο φυσιολογικό δέρμα ο TNFα εντοπίζεται κυρίως στη βασική στιβάδα, ενώ στην ψωρίαση ανιχνεύεται σε όλες τις στιβάδες της επιδερμίδας αλλά και στα αγγεία του θηλώδους χορίου. Παράγεται από ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα, κερατινοκύτταρα, μαστοκύτταρα, μακροφάγα και κύτταρα του Langerhans [20].

Ο TNFα επάγει την παραγωγή άλλων κυτοκινών (π.χ. IL-1, IL-6, IL-8) και προάγει την έκφραση μορίων προσκόλλησης στα κερατινοκύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνοντας την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB, διευκολύνοντας έτσι τη διείσδυση T λεμφοκυττάρων στο δέρμα [21]. Επιπροσθέτως, η εκσεσημασμένη νεοαγγειογένεση που παρατηρείται στην ψωρίαση ενισχύει την εξαγγείωση των T λεμφοκυττάρων. Η νεοαγγειογένεση ελέγχεται από τον VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας) που παράγεται από ενεργοποιημένα κερατινοκύτταρα [22].

Μια νέα άποψη για παθογένεια της ψωρίασης υποστηρίζει την καθοριστική συμμετοχή του μεταγραφικού παράγοντα PPARδ (peroxisome proliferator-activated receptor delta, ενεργοποιημένος παράγοντας πολλαπλασιασμού υπεροξειδιοσωμάτων δέλτα) στην

διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων καθώς και στις αντιαποπτωτικές και προαγγειογενετικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα. Ο υποδοχέας αυτός επάγεται από στρεσοεπαγόμενες κινάσες, την IFN γ και τον TNF α με μεταγραφικούς μηχανισμούς μέσω της πρωτεΐνης AP-1 [23].

Η εντυπωσιακή και άμεση ανταπόκριση τόσο της ψωρίασης όσο και της ψωριασικής αρθρίτιδας σε θεραπείες με αντισώματα κατά του TNF α υποδεικνύουν τον καθοριστικό του ρόλο στην παθογένεια της ψωρίασης [24].

Κλινικές μελέτες με infliximab ως μονοθεραπεία για ψωρίαση συγκρίναν τη δόση των 5 mg/kg με 10 mg/kg και έδειξαν ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο κλινικό αποτέλεσμα. Παρόλα αυτά, σημαντικές διαφορές που αφορούν στην ανταπόκριση στη θεραπεία και τη διάρκεια του αποτελέσματος παρατηρήθηκαν σε ασθενείς που έλαβαν 3 mg/kg και σε αυτούς με 5 mg/kg. Έτσι καθορίστηκε η δόση των 5 mg/kg στις εβδομάδες 0, 2 και 6 ως η ιδανική για την θεραπεία της ψωρίασης [25].

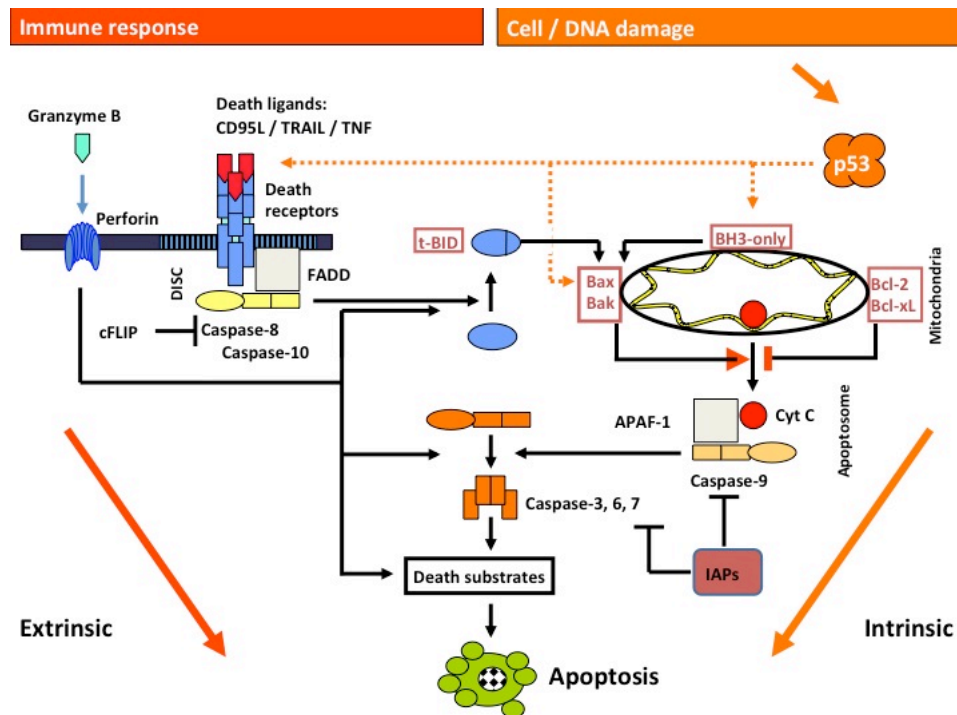
Το infliximab είναι ένα χμιαϊκό μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του TNF α που αποτελείται από τις καλά συντηρημένες περιοχές της ανοσοσφαιρίνης G1K που καταλήγουν στις μη συντηρημένες περιοχές πρόσδεσης αντιγόνου επίμυος με υψηλή συγγένεια για τον ανθρώπινο TNF α . Σαν χμιαϊκό αντίσωμα προκαλεί ελαττωμένη αντιγονικότητα στον άνθρωπο σε σχέση με ένα αυτούσιο αντίσωμα επίμυος [26]. Το infliximab παρουσιάζει υψηλή συγγένεια και ειδικότητα και για τις δύο μορφές του TNF α , την διαλυτή και την διαμεμβρανική [27]. Το αντίσωμα εξουδετερώνει τη λειτουργική δραστηριότητα του TNF α παρεμποδίζοντας την πρόσδεσή του τόσο στον TNFR1 όσο και στον TNFR2 [28].

Απόπτωση

Η απόπτωση αποτελεί τον κύριο μηχανισμό διατήρησης της ομοιόστασης των ιστών. Διαταραχές στους αποπτωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου, τόσο υπέρ όσο και έναντι αυτής, οδηγούν σε δομικές και λειτουργικές διαταραχές των κυττάρων και, κατ' επέκταση, των ιστών.

Σε κυτταρικό επίπεδο, η απόπτωση επάγεται από μεταβολικές διαταραχές που μπορεί να ενεργοποιήσουν δύο διακριτές οδούς, την εξωγενή και την ενδογενή, οδηγώντας έτσι το κύτταρο στον θάνατο. Στην εξωγενή οδό, ή εξωμιτοχονδριακή, η απόπτωση επάγεται μετά

από ενεργοποίηση μεμβρανικών υποδοχέων και συνεπακόλουθη ενεργοποίηση με διάσπαση των εναρκτήριων κασπασών [29]. Στην ενδογενή ή μιτοχονδριακή οδό, συγκεκριμένες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μπορούν να προκαλέσουν τον κυτταρικό θάνατο είτε ενεργοποιώντας τον καταρράκτη των κασπασών ή επιδρώντας άμεσα στον πυρήνα χωρίς τη συμμετοχή των κασπασών [30] (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Η ενδογενής και η εξωγενής οδός της απόπτωσης και η μεταξύ τους διασταύρωση. Χρήση με συναίνεση του συγγραφέα [31].

Οι κασπάσες είναι τελεστικά κυτταροπλασματικά ένζυμα των οποίων η ενεργοποίηση θα οδηγήσει τελικά το κύτταρο σε απόπτωση [32]. Ο καταρράκτης των κασπασών μπορεί να ενεργοποιηθεί είτε από την εξωγενή ή από την ενδογενή οδό [33]. Τόσο η ενδογενής οδός όσο και η εξωγενής χρησιμοποιούν κοινές αρχές στην αποδοχή του αποπτωτικού σήματος και στην ενεργοποίηση της απόπτωσης. Ένα εξωγενές αποπτωτικό σήμα μεταδίδεται με τη δέσμευση ενός εξωκυττάριου προσδέτη (π.χ. FasL, TRAIL) σε ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα και οδηγεί στο σχηματισμό ενός συμπλόκου που επάγει μήνυμα θανάτου, το οποίο είναι ικανό να ενεργοποιήσει την εναρκτήρια κασπάση-8. Με τη σειρά της η ενεργοποιημένη κασπάση-8 θα ενεργοποιήσει τις τελεστικές κασπάσες 3 και 7. Στην ενδογενή οδό, η εξαρτώμενη από τις κασπάσες οδός επάγεται από το κυτόχρωμα c, που μαζί με τον Araf-1,

την προκασπάση-9 και dATP θα σχηματίσουν το αποπτόσωμα στο κυτταρόπλασμα. Μετά τον σχηματισμό του συμπλόκου, ενεργοποιείται η κασπάση-9 που στη συνέχεια ενεργοποιεί τις τελεστικές κασπάσες.

Στην δεύτερη περίπτωση η διάτρηση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP) και η συνεπακόλουθη απελευθέρωση προαποπτωτικών πρωτεϊνών από τον διαμεμβρανικό μιτοχονδριακό χώρο (Intermembrane Mitochondrial Space, ΔΜΧ) έγκειται στον έλεγχο μιας λεπτής ισορροπίας μεταξύ προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2. Οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, όπως για παράδειγμα Bcl-2 ή Bcl-XL, αναστέλλουν τη διάτρηση της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων ενώ αντιθέτως τα προαποπτωτικά μέλη της οικογένειας, συγκεκριμένα Bax και Bak, την προάγουν. Αφότου διατηρηθεί η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη ένα σύνολο πρωτεϊνών του ΔΜΧ, όπως το κυτόχρωμα c, Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, AIF (Apoptosis Inducing Factor, Παράγοντας επαγωγής απόπτωσης) και η ενδονουκλεάση G, απελευθερώνονται και επάγουν ενεργά τον κυτταρικό θάνατο ανεξαρτήτως των κασπασών [34]. Τόσο ο AIF όσο και η ενδονουκλεάση G μεταφέρονται στον πυρήνα όπου προκαλούν τον κατακερματισμό του DNA [35]. Εκτός από τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες, ο πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας p53, ο οποίος ελέγχει την επιβίωση του κυττάρου μέσω αποπτωτικών γονιδίων [36], μπορεί να δράσει προαποπτωτικά ανεξάρτητα από την μεταγραφική του ιδιότητα προσδένοντας και ενεργοποιώντας άμεσα τόσο το Bax όσο και το Bak [34].

Επιπροσθέτως, άλλη μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων, η οικογένεια του NFκB, κατέχει έναν ιδιαίτερος σημαντικό ρόλο στις ανοσολογικές και φλεγμονώδες αποκρίσεις καθώς και στην αντίσταση κατά του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. Κατά την κλασική οδό, η φωσφορυλίωση και η επακόλουθη αποδόμηση του IκB οδηγεί στην ενεργοποίηση και την μετατόπιση του ετεροδιμερούς RelA(p65)/NFκB1(p59) προς τον πυρήνα. Ποικίλα προφλεγμονώδη ερεθίσματα όπως κυτοκίνες (TNFα, IL-1), διάφορα παθογόνα ή στρες μπορούν να ενεργοποιήσουν τον NFκB [37].

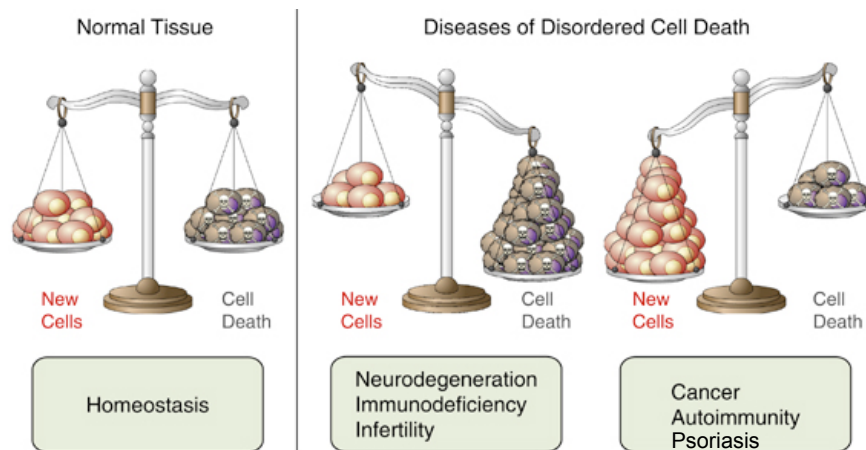
Υπό τον άμεσο μεταγραφικό έλεγχο του NFκB υπόκεινται τόσο αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως Bcl-2, Bcl-XL, survivin, όσο και προαποπτωτικοί παράγοντες, για παράδειγμα P53, IκBa, TRAIL (TNF-related Apoptosis Inducing Ligand, Προσδέτης επαγωγής απόπτωσης σχετιζόμενος με TNF), άλλοτε με θετική και άλλοτε με αρνητική επίδραση [38]. Το γεγονός

αυτό αποδεικνύει τον καθοριστικό ρόλο του NFκB στη ρύθμιση των αποπτωτικών διεργασιών του κυττάρου.

Τον ιδιαιτέρως σημαντικό ρόλο του NFκB στην ψωρίαση επιβεβαίωσαν πρόσφατα πειράματα με διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία αναστάλθηκε η έκφραση του αναστολέα του NFκB, IKK, στην επιδερμίδα. Αποτέλεσμα της αναστολής αυτής είναι η συνεχής ενεργοποίηση του NFκB. Στα ποντίκια αυτά παρατηρήθηκε η επαγωγή ψωριασιόμορφης δερματοπάθειας με ιστολογικά χαρακτηριστικά ψωρίασης. Η φλεγμονή αυτή φάνηκε να επάγεται από την παραγωγή του TNFα, ενώ μεσολαβεί και η ενεργοποίηση T-λεμφοκυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν τον καθοριστικό ρόλο της δραστηριότητας του NFκB στην ανοσοομοίωση του δέρματος [39].

Απόπτωση στην ψωρίαση

Διαταραχές στην ισορροπία της απόπτωσης επηρεάζουν άμεσα την ομοίωση των κυττάρων και οδηγούν σε παθολογικές καταστάσεις. Η δυσλειτουργία των αποπτωτικών μηχανισμών θα οδηγήσει άλλοτε σε πρόωρο κυτταρικό θάνατο όπως για παράδειγμα στην περίπτωση των εκφυλιστικών διαταραχών του νευρικού συστήματος, και άλλοτε πάλι σε ατέρμονα επιβίωση των κυττάρων όπως συμβαίνει στις κακοήθεις παθήσεις ή στα αυτοάνοσα νοσήματα [40] (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Αποπτωτική ισορροπία και ομοίωση. Διαταραχές στην αποπτωτική ισορροπία των κυττάρων και συσχετιζόμενες παθήσεις [40].

Σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις όπως ψωρίαση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα ή νόσος Crohn φαίνεται πως οι αποπτωτικοί μηχανισμοί είναι εξασθενημένοι στους ιστούς που φλεγμαίνουν, οπότε η διαταραχή αυτή των αποπτωτικών διεργασιών ίσως να αποτελεί έναν αιτιολογικό παράγοντα για την φλεγμονή [41, 42].

Συγκεκριμένα στην περίπτωση της ψωριασικής επιδερμίδας, η ανοχή των κερατινοκυττάρων σε αποπτωτικά ερεθίσματα και η συνεπαγόμενη αναστολή των αποπτωτικών διεργασιών φαίνεται να ευθύνεται για τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους. Έχει αποδειχτεί πρωτίτερα πως τα ψωριασικά κερατινοκύτταρα παρουσιάζουν αντίσταση στην απόπτωση [9].

Ήδη από το 1995 είχε παρατηρηθεί εκσεσημασμένη έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-XL στα ψωριασικά κερατινοκύτταρα σε σύγκριση με τη φυσιολογική επιδερμίδα των ασθενών [43]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν αυξημένη έκφραση της φωσφορυλιωμένης μορφής του μεταγραφικού παράγοντα NFκB στις ψωριασικές πλάκες συγκρινόμενη με δέρμα ελεύθερου βλάβης [44]. Ο μεταγραφικός παράγοντας NFκB ασκεί άμεσο έλεγχο στην έκφραση ποικίλων αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα η survivin. Αποτελέσματα της ίδιας ομάδας έδειξαν παράλληλη αύξηση την έκφραση της survivin, εξηγώντας έτσι εν μέρει την αντοχή των ψωριασικών κερατινοκυττάρων σε αποπτωτικά ερεθίσματα. Αντιστοίχως, αυξημένη έκφραση της ενεργοποιημένης μορφής του NFκB στην ψωριασική επιδερμίδα, και σταδιακή μείωσή της κατά τη διάρκεια της θεραπείας με etanercept έδειξαν ο Lizzul και συνεργάτες [21]. Η μείωση αυτή στην έκφραση του NFκB συσχετίστηκε με την ελάττωση του πάχους της επιδερμίδας και την αποκατάσταση των δεικτών διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Αντιστοίχως με τα προηγούμενα, πρόσφατα δεδομένα αποδεικνύουν αυξημένη έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης survivin με παράλληλη αύξηση των επιπέδων έκφρασης της ενεργοποιημένης μορφής του NFκB σε ψωριασικές πλάκες. Η έκφραση της survivin φάνηκε να συσχετίζεται σημαντικά με την υποστρόφη των πλακών [45].

Η υποστρόφη της επιδερμίδας στην ψωρίαση φαίνεται να περιλαμβάνει μηχανισμούς επαγωγής της απόπτωσης, οι οποίοι υπερνικούν την σθεναρή αντίσταση των ψωριασικών κερατινοκυττάρων στα αποπτωτικά ερεθίσματα [46]. Αυτή η αντίσταση μπορεί να κατασταλεί με διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις όπως η ανθραλίνη [47], η μεθοτρεξάτη [48] ή το infliximab [45] που έχει αναφερθεί πως επάγουν την απόπτωση στα κερατινοκύτταρα. Πρωτίτερα in vivo αποτελέσματα της ομάδας μας που αφορούν στην

επίδραση του infliximab στα ψωριασικά κερατινοκύτταρα προτείνουν – εκτός από τις αντιφλεγμονώδεις διεργασίες – έναν μηχανισμό επαγωγής προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ανεξάρτητο από τον καταρράκτη των κασπασών [49].

Σκοπός και πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης

Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα αυτά προχωρήσαμε στην παρούσα μελέτη με σκοπό την περαιτέρω διασαφήνιση των μιτοχονδριακών αποπτωτικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται στα ψωριασικά κερατινοκύτταρα κατά τη διάρκεια της θεραπείας με infliximab. Η μελέτη βασίστηκε στην ανοσοϊστοχημική ανάλυση βιοψιών ασθενών με ψωρίαση πριν αλλά και κατά τη διάρκεια της θεραπείας με infliximab σε χρώσεις για μιτοχονδριακές αποπτωτικές πρωτεΐνες. Παράλληλα, έγινε συσχέτιση ιστολογικών παραμέτρων (επιδερμικό πάχος) με κλινικούς δείκτες εκτίμησης της νόσου (PASI, Psoriasis Area and Severity Index, Δείκτης επέκτασης και σοβαρότητας της ψωρίασης).

Τέλος, επιχειρήθηκε *in vitro* προσομοίωση των αποτελεσμάτων από τις βιοψίες των ασθενών στην κυτταρική σειρά ανθρωπίνων αθανатоποιημένων κερατινοκυττάρων HaCat [50] καθώς και σε πρωτογενή ανθρώπινα φυσιολογικά κερατινοκύτταρα. Διεγείροντας με κύτταρα με TNFα και έπειτα με infliximab, μελετήθηκε η επίδραση των θεραπειών αυτών στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων με τη χρωματομετρική μέθοδο WST. Έπειτα με χρήση ELISA για την ανίχνευση προϊόντων κατακερματισμού του DNA εκτιμήθηκε ο ρυθμός απόπτωσης των κυττάρων. Η πιθανότητα κυτταροτοξικής δράσης των θεραπειών στα κύτταρα ελέγχτηκε με χρωματομετρική μέθοδο μέτρησης της εκλυόμενης LDH από τα κύτταρα. Για την εκτίμηση της έκφρασης των αποπτωτικών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η ανοσοαποτύπωση κατά Western.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς

Για τη μελέτη αυτή επιλέχθηκαν 10 άνδρες και 4 γυναίκες ασθενείς μέσης ηλικίας 42 ± 16 ετών με κοινή ψωρίαση μέτριου ή σοβαρού βαθμού (PASI>10) με ή χωρίς συμπτώματα από τις αρθρώσεις και μέση διάρκεια νόσου $8,2\pm 7,6$ έτη. Όλοι οι ασθενείς λάμβαναν ως μονοθεραπεία για την ψωρίαση infliximab σε δόση 5 mg/kg σωματικού βάρους την εβδομάδα 0, 2, 6 και έπειτα κάθε 8 εβδομάδες. Όλοι οι ασθενείς που μελετήθηκαν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία. Οποιαδήποτε άλλη συστηματική ή τοπική αγωγή που ενδέχεται να επηρεάζει την κατάσταση του δέρματος των ασθενών αποτέλεσε κριτήριο αποκλεισμού. Κάθε προηγούμενη συστηματική αγωγή είχε διακοπεί τουλάχιστον 2 μήνες πριν την έναρξη της μελέτης. Η τοπική αγωγή για την ψωρίαση καθώς και η φωτοθεραπεία είχαν διακοπεί 2 εβδομάδες πριν την πρώτη έγχυση. Το φαρμακευτικό σκεύασμα σε μορφή λιπόφιλης σκόνης φυλασσόταν στους 4° C και η ανασύσταση όπως και η έγχυση πραγματοποιήθηκαν κατά τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας.

Όλοι οι ασθενείς συναίνεσαν γραπτώς για τη συμμετοχή τους στη μελέτη.

Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και πραγματοποιήθηκε σε απόλυτη συμφωνία με τις αρχές της Συνθήκης του Ελσίνκι.

Λήψη βιοψιών και μονιμοποίηση παρασκευασμάτων

Πριν την πρώτη έγχυση έγινε λήψη ιστοτεμαχίου φυσιολογικού δέρματος αλλά και δέρματος από βλάβη-στόχο. Από την ίδια πλάκα ελήφθησαν ιστοτεμάχια δέρματος 5, 14 και 21 μέρες μετά. Προτιμώμενες θέσεις ήταν το δέρμα της περιοχής του αγκώνα, της ράχης και του γόνατος. Για τις βιοψίες φυσιολογικού δέρματος επιλέχθηκαν περιοχές ελεύθερες βλαβών από σημεία χωρίς αισθητικές ή λειτουργικές δυσκολίες. Στα ίδια χρονικά σημεία με τη λήψη των βιοψιών έγινε κλινική εκτίμηση για την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με υπολογισμό του δείκτη PASI (Psoriasis Area and Severity Index, Δείκτης Επέκτασης και Σοβαρότητας Ψωρίασης)[51].

Η λήψη βιοψιών πραγματοποιήθηκε με την κλασική μέθοδο με νυστέρι μετά από τοπική αναισθησία με υποδόρια έγχυση διαλύματος λιδοκαΐνης.

Τα παρασκευάσματα μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης και αφυδατώθηκαν με εμβάπτιση σε διαλύματα αιθανόλης με σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση από 50%, 70%, 90% και τέλος 100%. Στη συνέχεια τα ιστοτεμάχια εγκλείστηκαν σε κύβους παραφίνης.

Τομή, αποπαραφίνωση και ενυδάτωση ιστοτεμαχίων

Διαδοχικές τομές των ιστοτεμαχίων πάχους 3μm κόπηκαν σε μικροτόμο και εναποτέθηκαν σε αντικειμενοφόρα πλακίδια θετικά φορτισμένου γυαλιού (SuperFrost plus).

Για την απομάκρυνση της παραφίνης, τα πλακίδια επώαστηκαν σε κλίβανο στους 56° C για μία ώρα και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα ξυλόλης για 15 λεπτά. Η ενυδάτωση των ιστών έγινε με εμβάπτιση των πλακιδίων σε διάλυμα αιθανόλης σταδιακά ελαττωμένης συγκέντρωσης από 100% σε 96%, 80% και τέλος 76%. Σε κάθε διάλυμα οι ιστοί παρέμειναν 5 λεπτά. Έπειτα τα πλακίδια εκπλύθηκαν με άφθονο απιονισμένο νερό.

Αποκάλυψη αντιγονικού επιτόπου και χρώση ιστοτεμαχίων

Μετά την αποπαραφίνωση και την ενυδάτωση των τομών ακολούθησε η διεργασία αποκάλυψης αντιγονικού επιτόπου. Τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα κιτρικού οξέως ή EDTA (Ethylene Dinitrile Diamine Tetraacetic Acid) και αφέθηκαν σε βρασμό σε φούρνο μικροκυμάτων για 5 λεπτά σε 500 watt. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν δύο κύκλοι των 5 λεπτών. Ανάμεσα στους δύο κύκλους καθώς και στο τέλος της διαδικασίας οι τομές αφέθηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, ακολούθησε πλύση των τομών με άφθονο απιονισμένο νερό.

Στη συνέχεια έγινε ανοσοϊστοχημική χρώση των τομών με ειδικά αντισώματα κατά των προς μελέτη αποπτωτικών πρωτεϊνών. Για την χρώση των τομών χρησιμοποιήθηκε η τυποποιημένη συσκευασία ανοσοϊστοχημικών χρώσεων ULTRAVision (LabVision) σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Σύντομα, η διαδικασία χρώσης βασίζεται σε ένα υπόστρωμα πολυμερισμού αλκαλικής φωσφατάσης. Ένα δευτεροταγές αντίσωμα συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του πρωτοταγούς αντισώματος. Το δευτεροταγές αντίσωμα μέσω της αλκαλικής φωσφατάσης αντιδρά με το χρωμογόνο FastRed (LabVision) και η αντίδραση τελικά καταλήγει στην παραγωγή μη

διαλυτής κόκκινης χρώσης στα σημεία πρόσδεσης των δύο αντισωμάτων. Η τεχνική αυτή συγκριτικά με άλλες καταλήγει σε καλύτερη ποιότητα χρώσης με σαφώς ελαττωμένο μη ειδικό υπόβαθρο και εξοικονόμηση πρωτεύοντος αντισώματος. Στη συσκευασία εμπεριέχεται διάλυμα ορού για πρόσδεση των μη ειδικών θέσεων. Για την έκπλυση των παρασκευασμάτων σε όλη τη διαδικασία χρώσης με UltraVision χρησιμοποιήθηκε διάλυμα TBS.

Για κάθε πρωτεύον αντίσωμα η συγκέντρωση, ο χρόνος επώασης καθώς και ο τρόπος αποκάλυψης του αντιγονικού επιτόπου δεν ήταν όμοια . Για χρόνο επώασης 1 ή 2 ώρες η επώαση έγινε σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ για ολονύχτιες επωάσεις προτιμήθηκαν 4° C. Και στις δύο περιπτώσεις η επώαση πραγματοποιήθηκε σε σκοτεινό και υγρό περιβάλλον. Αναλυτικά αναφέρονται οι λεπτομέρειες για κάθε αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε στον πίνακα που ακολουθεί. Στη συνέχεια οι τομές καλύφθηκαν με ειδική γέλη (Glycergel, Dako Cytomation) προτού τοποθετηθούν οι καλυπτρίδες.

| ΑΝΤΙΓΟΝΟ | ΕΤΑΙΡΙΑ | ΚΩΔΙΚΟΣ/ ΚΛΩΝΟΣ | ΑΠΟΚΑΛΥΨΗ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΥ ΕΠΙΤΟΠΟΥ | ΤΙΤΛΟΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ | ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΩΑΣΗΣ | ΕΝΤΟΠΙΣΗ |
|----------------------------------|-------------------|--------------------|---|--------------------|-------------------|-------------|
| P53 | DAKO | DO-07 | Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέως | 1:50 | 1 ώρα | Πυρηνική |
| Bcl-2 | DAKO | Clone 124 | Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέως | 1:50 | 2 ώρες | Κυτ/σματική |
| Phospho NFκB/p65 (Ser 276) | Cell Signaling | 30375 | Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέως | 1:50 | Ολονυχτίως | Πυρηνική |
| AIF | Cell Signaling | 4642 | Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέως | 1:50 | Ολονυχτίως | Κυτ/σματική |
| Bcl _{XL} | Cell Signaling | 2762 | Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέως | 1:25 | Ολονυχτίως | Κυτ/σματική |
| Bax | Spring | E3384 | Διάλυμα EDTA | 1:50 | Ολονυχτίως | Κυτ/σματική |

Εκτίμηση ανοσοϊστοχημικών χρώσεων

Για την ανάλυση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων αναπτύξαμε ένα ψηφιακό σύστημα βασιζόμενο στην καταμέτρηση εικονοστοιχείων μετά από ψηφιακή απεικόνιση των τομών. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η εγκυρότητα της ψηφιακής ανάλυσης των ανοϊστοχημικών χρώσεων αλλά και για την εκτίμηση της ποιότητας των παρασκευασμάτων, δύο έμπειροι ανεξάρτητοι παθολογοανατόμοι εξέτασαν τις τομές τυφλά και τυχαία. Για την κλασική παθολογοανατομική εκτίμηση επιλέχθηκε ως αντιπροσωπευτική πυρηνική χρώση αυτή με την πρωτεΐνη P53. Αντιστοίχως, ως αντιπροσωπευτική κυτταροπλασματική χρώση μελετήθηκε το Bcl-2. Για κάθε αντίσωμα επιλέχθηκε η σειρά των βιοψιών από πέντε συνολικά ασθενείς. Η επιδερμίδα μελετήθηκε χωριστά σε τρία διαμερίσματα, όπως και στην ψηφιακή ανάλυση, βασική/παραβασική, ακανθωτή και κοκκιώδης στιβάδα. Η κλίμακα από 0 έως 4 χρησιμοποιήθηκε για το ποσοστό των θετικών προς τη χρώση κερατινοκυττάρων (0: μηδενική χρώση, 1: <25%, 2: 25-50%, 3: 50-75% και 4: >75%). Η ένταση της χρώσης βαθμολογήθηκε από 1 έως 3 (1: ήπια, 2: μέτρια και 3: έντονη χρώση). Τα αποτελέσματα της κλασικής ανάλυσης συγκρίθηκαν με αυτά από την ψηφιακή ανάλυση [52].

Μέτρηση πάχους της επιδερμίδας

Για την μέτρηση του επιδερμικού πάχους χρησιμοποιήθηκαν τομές H&E. Οι μετρήσεις έγιναν με την χρήση του προγράμματος Scion Image. Στα πλαίσια της Παρούσας μελέτης στοιχειοθετήσαμε ένα σταθερό σύστημα συσχέτισης εικονοστοιχείων με πραγματική απόσταση. Η περιγραφή του συστήματος αναφέρεται αναλυτικά στο παράρτημα “Αποτελέσματα”.

Απομόνωση και καλλιέργεια φυσιολογικών ανθρώπινων κερατινοκυττάρων

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικά ανθρώπινα κερατινοκύτταρα που απομονώθηκαν από δέρμα παιδικής ακροποσθίας. Συνοπτικά, μετά από απομάκρυνση του υποδόριου λίπους, το δέρμα επώαστηκε ολονυχτίως σε διάλυμα τρυψίνης 0.25% σε PBS (Phosphate Buffered Saline, χωρίς Mg⁺⁺ ή Ca⁺⁺, Sigma-Aldrich) στους 4°C. Έπειτα έγινε μηχανική απόσπαση των κερατινοκυττάρων από την επιδερμίδα και μεταφορά τους σε

φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών 75 cm² μέσα σε πλήρες θρεπτικό φυσιολογικών κερατινοκυττάρων ελεύθερο ορού με προσθήκη L-γλουταμίνης, ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και εκχυλίσματος υπόφυσης βοός (Keratinocyte-SFM Medium (Kit) with L-Glutamine, EGF and BPE KSFM, Gibco-Invitrogen) και 1% ο/ο πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Προστέθηκε επίσης 2% εμβρυικός βόειος ορός (Fetal Bovine Serum, FBS) κατά το πρώτο εικοσιτετράωρο, προκειμένου να βοηθηθεί η προσκολλητική τους ικανότητα στην φιάλη, ενώ αργότερα τα κύτταρα διατηρήθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς προσθήκη ορού. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλαστικές φιάλες πολυπροπυλενίου, εμβαδού 75cm², στους 37°C και σε υγρή ατμόσφαιρα με 5% CO₂.

Καλλιέργεια κερατινοκυττάρων HaCat

Εκτός από τα απομονωμένα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν επίσης αθανατοποιημένα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα της σειράς HaCat. Τα κύτταρα αυτά αθανατοποιήθηκαν έπειτα από μια αυθόρμητη εξαλλαγή, καθιστώντας τα έτσι ικανά για τη σύσταση κυτταρικής σειράς [50]. Σύμφωνα με τις απαιτήσεις των κυττάρων αυτών, η καλλιέργεια τους πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) με προσθήκη 10% βόειου εμβρυικού ορού και 1% ο/ο πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Η διάσπαση των κυττάρων και η μεταφορά τους σε νέες φλάσκες πραγματοποιούνταν όταν η πληρότητα των φλασκών πλησίαζε το 70-80% προκειμένου να αποφευχθεί η διαφοροποίηση των κυττάρων. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στις ίδιες συνθήκες όπως και τα φυσιολογικά κερατινοκύτταρα.

Λύση των κυττάρων και συλλογή πρωτεΐνης

Προκειμένου να συλλέξουμε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων, προκαλούμε λύση αυτών με διάλυμα λύσης στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών (Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Applied Science). Το διάλυμα λύσης των κυττάρων αποτελείται από: 2-4% CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), 8M Urea, 3M Thiourea, 100mM Tris-HCl pH 8 και 50nM DTT (Dithiothreitol, Sigma-Aldrich). Η όλη διαδικασία λύσης πραγματοποιείται σε πάγο. Αφότου συλλέξουμε το κυτταρικό λύμα, το φυγοκεντρούμε στα

12.000g για 7 λεπτά σε ψυκτική φυγόκεντρο στους 4°C. Συλλέγουμε το υπερκείμενο και απομακρύνουμε επικαθήμενο. Το κυτταρικό λύμα αποθηκεύεται στους -80°C.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο κυτταρικό λύμα χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος Bradford [53], η οποία στηρίζεται στο σχηματισμό έγχρωμων συμπλόκων μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων και μορίων χρωστικής Coomassie brilliant blue. Το φάσμα απορρόφησης των συμπλόκων αυτών εντοπίζεται στα 595nm. Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης του αγνώστου δείγματος χρησιμοποιήθηκε μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η οποία υπολογίστηκε με μέτρηση της απορρόφησης δειγμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης (αλβουμίνη βόειου ορού, Bovine Serum Albumin, BSA)

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)

Προετοιμασία δειγμάτων

Τα πρωτεϊνικά δείγματα πριν από την ηλεκτροφόρηση διαλύθηκαν σε αποδιατακτικό διάλυμα (4X sample buffer: 250mM Tris-HCL pH 6.8, 9.2% β/ο SDS, 40% ο/ο γλυκερόλη, 0.2% β/ο Bromophenol blue, 100mM DTT (Sigma-Aldrich) και στη συνέχεια θερμάνθηκαν στους 95°C για 5 λεπτά, ώστε να αποδιαταχθούν πλήρως οι πρωτεΐνες. Παρουσία του αναγωγικού παράγοντα DTT επιτυγχάνεται η διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών που συγκρατούν τη στερεοχημική διάταξη των πρωτεϊνών. Παράλληλα, τα ηλεκτραρνητικά μόρια του SDS (sodium dodecyl sulfate) σχηματίζουν ηλεκτρικά φορτισμένα σύμπλοκα με τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Αυτά έχουν σαν συνέπεια η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνών να εξαρτάται αποκλειστικά από το μοριακό τους βάρος, με συνεπακόλουθο διαχωρισμό τους κατά μήκος της πηκτής κατά μοριακό βάρος. Οι βαρύτερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες παραμένουν εγγύτερα στη θέση φόρτωσης του δείγματος συγκριτικά με τις ελαφρύτερες.

Προετοιμασία πηκτής πολυακρυλαμίδης

Για την προετοιμασία των δύο επιμέρους πηκτωμάτων (running gel, stacking gel), αναμείχθηκαν όλα τα συστατικά των διαλυμάτων εκτός του APS (Ammonium Persulphate, Sigma) και του TEMED (Sigma-Aldrich), όπου προστέθηκαν στο τέλος. Τα συστατικά αυτά λειτουργούν σαν καταλύτες για την πυροδότηση και τη διατήρηση του πολυμερισμού αντίστοιχα,.

Αρχικά παρασκευάστηκε το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel: 10% ο/ο διάλυμα πολυακρυλαμίδης (Sigma), 25% ο/ο ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (separating buffer), 0.1% ο/ο APS, 0.05% ο/ο TEMED) και εκχύθηκε στον κενό χώρο που δημιουργείται μεταξύ δύο γυάλινων πλακών που διαχωρίζονται με κομμάτια γυαλιού (spacers) πάχους 1.5mm. Αφότου πολυμεριστεί το πήκτωμα διαχωρισμού, παρασκευάστηκε και προστέθηκε το πήκτωμα επιστοιβάξης (stacking gel: 4.5% v/v διάλυμα πολυακρυλαμίδης, 25% ο/ο ρυθμιστικό διάλυμα επιστοιβάξης (stacking buffer), 0.1% ο/ο APS, 0.1% ο/ο TEMED), μέσα στο οποίο τοποθετήθηκε ειδική μήτρα για το σχηματισμό των θέσεων (πηγάδια) εντός των οποίων θα γίνει η προσθήκη των δειγμάτων στην πηκτή. Το ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού και επιστοιβάξης συνίστανται από 1.5M Tris-HCl pH 8.8, 0.4% SDS και 0.5M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS αντίστοιχα.

Ηλεκτροφόρηση

Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις που έχουν δημιουργηθεί, στο δοχείο ηλεκτροφόρησης προστίθεται διάλυμα ηλεκτροφόρησης (25mM Tris base, 192mM γλυκίνη, 0.1% β/ο SDS) και εφαρμόζεται σταθερή τάση 150V (75mA) μέχρι ο μάρτυρας που έχουμε χρησιμοποιήσει να προωθηθεί ως την βάση του πηκτώματος.

Μεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μετά τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε μεταφορά αυτών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham 0.45μm) με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τάσης 100V (400 mA) για 1 ώρα. Η Το διάλυμα μεταφοράς που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 25mM Tris base, 192mM γλυκίνη, 0.1% β/ο SDS και 20% ο/ο μεθανόλη.

Διαδικασία ανοσοανίχνευσης

Η μέθοδος ανοσοανίχνευσης στηρίζεται στη σύνδεση του αντισώματος κατά της πρωτεΐνης που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε, με το συγκεκριμένο αντιγόνο που βρίσκεται ακινητοποιημένο στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται ανοσοσφαιρίνη ίδιου ισοτύπου με τον αντί-ορό του ζώου ξενιστή που έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του πρώτου αντισώματος, η οποία αναγνωρίζει την ανοσοσφαιρίνη του πρώτου ειδικού αντισώματος και συνδέεται με αυτό. Στη δεύτερη ανοσοσφαιρίνη έχει συνδεθεί υπεροξειδάση (Horseradish Peroxidase, HRP). Για την ανίχνευση του ενζύμου και κατά συνέπεια του συμπλόκου αντισώματος-πρωτεΐνης χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο West-Pico (Western Blotting Detection Kit, Pierce). Η αντίδραση του υποστρώματος με την υπεροξειδάση οδηγεί σε χημειοφωταύγεια (Chemiluminescence), η οποία ανιχνεύεται με τη χρήση ειδικού ακτινογραφικού φιλμ.

Αρχικά η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα 20mM Tris HCl pH 7.4, 155mM NaCl και 0.1% ο/ο Tween-20, 5% ο/ο σκόνη γάλακτος χωρίς λιπαρά (διάλυμα δέσμησης, blocking buffer) για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος έτσι ώστε να καλυφθούν οι ελεύθερες μη ειδικές θέσεις της. Ακολουθεί ολονύχτια επώαση με το πρωτεύον αντίσωμα στους 4°C, το οποίο αραιώθηκε κατάλληλα σε διάλυμα δέσμησης. Στην συνέχεια η μεμβράνη εκπλύεται 3 φορές για 15 λεπτά σε διάλυμα 20mM Tris HCl pH 7.4, 155mM NaCl και 0.1% ο/ο Tween-20 (διάλυμα έκπλυσης, washing buffer) προκειμένου να απομακρυνθεί το μη δεσμευμένο αντίσωμα. Κατόπιν ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το δευτερεύον αντίσωμα, αραιωμένο σε διάλυμα δέσμησης, για μία ώρα και έπειτα εκπλύεται ξανά όπως αναφέρθηκε προωτέρα. Ακολούθως, επωάζεται με αντιδραστήριο εμφάνισης και στη συνέχεια εκτίθεται σε ακτινογραφικό φιλμ σε συνθήκες σκότους για χρόνο που εξαρτάται από την ένταση του σήματος της χημειοφωταύγειας.

Συγκεκριμένα, για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντισώματα αραιωμένα σε διάλυμα δέσμησης.

| Πρωτεύοντα Αντισώματα | Αραιώσεις |
|---|---------------------------|
| anti-NFκB/p65 (Santa Cruz, sc-109, rabbit) | 1:500 |
| anti-IκB-α (Santa Cruz, sc-371, rabbit) | 1:600 |
| anti-p53 (DO-1) (Santa Cruz, sc-126, mouse) | 1:600 |
| anti-Caspase-3 (Santa Cruz, 3G2, mouse) | 1:5000 |
| anti-Cleaved Caspase-3 (Santa Cruz, Asp175, rabbit) | 1:1000 |
| anti-AIF (Assay Biotech, C13024, rabbit) | 1:300 |
| anti-GAPDH (6C5) (Santa Cruz, sc-32233, mouse) | 1:1000 |
| | |
| Δευτερεύοντα Αντισώματα | Αραιώσεις |
| goat-Anti-rabbit+HRP (DAKO, P0448) | 1:5000 σε blocking buffer |
| goat-Anti-mouse+HRP (DAKO, P0447) | 1:5000 σε blocking buffer |

Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Ο πολλαπλασιασμός μελετήθηκε χρωματομετρικά με χρήση του αντιδραστηρίου WST-1 (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics).

Τόσο τα πρωτογενή ανθρώπινα κερατινοκύτταρα όσο και τα κύτταρα HaCaT καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό σε τριβλία 96 πηγαδιών (96 well plates) στους 37 °C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Ο αρχικός αριθμός των φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων ήταν 7.500 κύτταρα ανά πηγάδι για τα HaCaT 5.000 κύτταρα ανά πηγάδι. Μετά από επώαση 24 ωρών με TNFα 10ng/l, τα κύτταρα επώασθησαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας για 72 ώρες με infliximab 400μg/l αποκλειστικά όπως και σε συνδυασμό με TNFα. Έπειτα, προστέθηκε το αντιδραστήριο WST-1 στο υπερκείμενο των καλλιιεργειών και μετρήθηκε η χρώση ½ και 2 ώρες μετά.

Το WST-1 είναι ένα σταθερό άλας τετραζολίου, το οποίο αποδομείται σε φορμαζάνη μετά από περίπλοκες κυτταρικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κυρίως στην κυτταρική επιφάνεια. Η αποδόμηση του εξαρτάται άμεσα από την γλυκολυτική παραγωγή NAD(P)H στα βιώσιμα κύτταρα. Έτσι, η ποσότητα της παραγόμενης χρωστικής φορμαζάνης συσχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων.

Προσδιορισμός της Απόπτωσης και της κυτταροτοξικότητας

Μετά από 72 ώρες επώαση με infliximab (Centocor, Leiden, The Netherlands) υπό παρουσία TNF α (Recombinant Human TNF- α /TFNSF1A, R&D Systems, minneapolis, USA) ή όχι, ποσοτικοποιήθηκε η απόπτωση με ανοσοενζυμική μέθοδο ανίχνευσης κυτταρικού θανάτου (ELISA enzyme-linked immunosorbent assay), η οποία ανιχνεύει μονο- και ολιγονουκλεοσώματα που σχηματίζονται στα αποπτωτικά κύτταρα (Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Η κυτταροτοξικότητα εκτιμήθηκε με χρωματομετρική μέθοδο μέτρησης της γαλακτικής αφυδρογονάσης στο υπερκείμενο των κυττάρων (Cytotoxicity Detection System, Roche Diagnostics).

Στη συνέχεια, αφότου έγινε λύση των κυττάρων, μετρήθηκε η ολική έκλυση γαλακτικής αφυδρογονάσης, προκειμένου να εκτιμηθεί έμμεσα ο συνολικός κυτταρικός πληθυσμός και να κανονικοποιηθούν ως προς αυτόν η απόπτωση και η κυτταροτοξικότητα μετά από επώαση με TNF α και infliximab.

Στατιστική ανάλυση

Για την σύγκριση των συνεχών μεταβλητών που προέκυψαν από την ψηφιακή ανάλυση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (Repeated measures analysis of variance – ANOVA). Ως μεταβλητή στο εσωτερικό των υποκειμένων (within-subjects variables) ορίστηκαν οι τιμές από διακριτές στιβάδες της επιδερμίδας ενώ ως μεταβλητή μεταξύ των υποκειμένων (between-subjects variable) ορίστηκε ο χρόνος. Μετέπειτα συγκρίσεις ανά ζεύγη έγιναν με Bonferroni post-hoc ανάλυση. Στατιστικά σημαντική ορίστηκε η τιμή $p < 0.05$. Για την επιβεβαίωση της κανονικότητας στην κατανομή των τιμών εφαρμόστηκε η δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov. Για τις πρωτεΐνες στις οποίες αποδείχθηκε σημαντική αλληλεπίδραση της στιβάδας της επιδερμίδας με τον χρόνο, ακολούθησε follow-up ανάλυση με ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης ανεξάρτητων δειγμάτων (One way ANOVA) πολλαπλών συγκρίσεων με Bonferroni post-hoc δοκιμασία για κάθε στιβάδα χωριστά για τα σημαντικά χρονικά σημεία.

Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση της ψωριασικής επιδερμίδας στις μέρες 0 και 21 με τη φυσιολογική επιδερμίδα με ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης ορίζοντας τον μέσο όρο των επιδερμικών στρωμάτων ως εξαρτημένη μεταβλητή και την κατάσταση (ψωριασική και φυσιολογική επιδερμίδα) ως ανεξάρτητη μεταβλητή για κάθε time point χωριστά.

Η πολυπαραγοντική συσχέτιση του κλινικού δείκτη PASI με την ιστολογική εκτίμηση (πάχος επιδερμίδας) ανά το χρόνο πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας το μοντέλο των γενικευμένων εξισώσεων εκτίμησης (Generalized Estimation Equations, GEE), προσδιορίζοντας ένα συνεχές αποτέλεσμα και σύνδεσμο ταύτισης με τυχαία διαστήματα, προκειμένου να υπολογιστεί η συσχέτιση εντός ενός υποκειμένου με μια ανεξάρτητη δομή συσχέτισης (“population-averaged” effects). Οι μετρήσεις των σχέσεων αναφέρονται ως διαφορές μέσω των όρων (coef.) με διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Το μοντέλο GEE ανήκει στην κατηγορία των ημιπαραμετρικών τεχνικών συσχέτισης και ενδείκνυται όταν οι τυχαίες επιδράσεις και οι διακυμάνσεις τους δεν είναι στα άμεσα ενδιαφέροντα της μελέτης.

Για την ημιποσοτική κλασική παθολογοανατομική ανάλυση των χρώσεων εφαρμόστηκε η μη παραμετρική μέθοδος Wilcoxon, και η συσχέτιση τους με των ψηφιακή ανάλυση έγινε με το μοντέλο γραμμικών συσχετίσεων.

Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS (SPSS IBM Statistics, New York, USA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ψηφιακή ανάλυση ανοσοϊστοχημικών χρώσεων και σύγκριση με κλασική παθολογοανατομική εκτίμηση

Για την αντικειμενικότερη μελέτη των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων στην παρούσα μελέτη και τη πληρέστερη ανάλυση των αποτελεσμάτων καθιερώσαμε ένα ψηφιακό σύστημα ανάλυσης βασιζόμενο στην καταμέτρηση των θετικά σεσημασμένων εικονοστοιχείων. Η αρχιτεκτονική της επιδερμίδας ως συνεχές επιθήλιο επιτρέπει την ανάλυση ευρέων περιοχών, όχι μόνο στο σύνολό τους αλλά και τμηματικά. Έτσι, ήταν δυνατός ο διαχωρισμός της επιδερμίδας σε επιμέρους στιβάδες και η μεμονωμένη ανάλυση αλλά και σύγκριση αυτών.

Αναλυτικότερα, μετά από την ανοσοϊστοχημική χρώση καθώς και τη χρώση ηωσίνης&αιματοξυλίνης (H&A), οι τομές εξετάστηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο Leitz Laborlux (Leica) και φωτογραφήθηκαν σε ψηφιακή κάμερα Leica DFC320 digital camera (Leica) συνδεδεμένη στο μικροσκόπιο μέσω του λογισμικού προγράμματος Leica Application Suite software (Leica). Η μετέπειτα προσαρμογή του μεγέθους των εικόνων έγινε στο Adobe Photoshop Elements 3 software (Adobe, San Jose, California, USA). Για τη μέτρηση του πάχους της επιδερμίδας έγινε φωτογράφιση των τομών H&A σε αντικειμενικό φακό 10x, ενώ για την ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών εξετάστηκαν οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις των τομών σε αντικειμενικό φακό 16x. Η διαφορά αυτή στη μεγέθυνση έγινε προκειμένου να επιτευχθεί μια καλύτερη προοπτική απεικόνιση και επομένως ακριβέστερος εντοπισμός των βαθύτερων καταδύσεων για τη μέτρηση του πάχους της επιδερμίδας. Στη δε περίπτωση της ανάλυσης των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων, η μεγαλύτερη μεγέθυνση απέδωσε μεγαλύτερη ακρίβεια στον εντοπισμό της χρώσης και στη επιλογή των κατάλληλων περιοχών για ανάλυση.

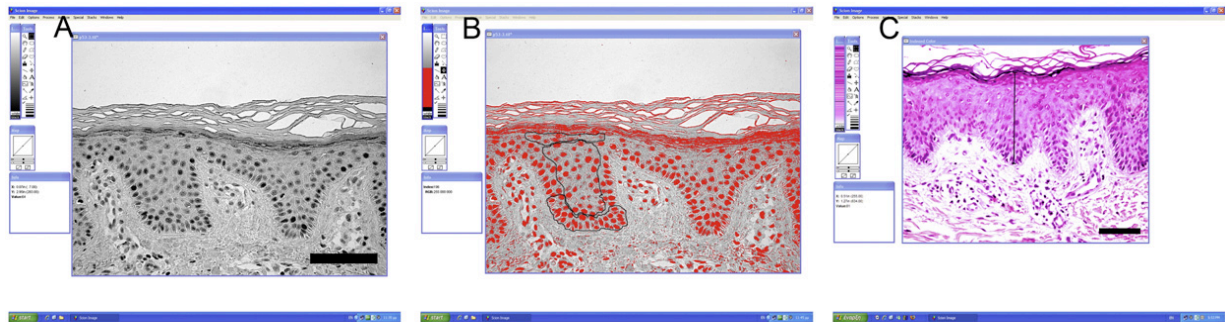
Η ψηφιοποίηση των χρώσεων H&A έγινε σε έγχρωμα αρχεία του συστήματος Red Green Blue (RGB) σε 16 bit βάθος ανάλυσης. Η απεικόνιση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων πραγματοποιήθηκε σε αρχεία 8 bit στις αποχρώσεις της κλίμακας του γκρι, αφότου τοποθετήθηκε πράσινο φίλτρο μεταξύ της πηγής φωτός και του πυκνωτή φωτός του μικροσκοπίου. Το φίλτρο αυτό, απορροφώντας το φάσμα του πράσινου, ενίσχυσε την αντίθεση μεταξύ ειδικής χρώσης (κόκκινο) και υπόβαθρου. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα το

εντονότερο κόκκινο χρώμα να απεικονιστεί ως βαθύ γκρι και, κατά αντιστοιχία, το ανοιχτό κόκκινο ως φωτεινό γκρι.

Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Scion Image software v. Alpha 4.0.3.2 (Scion corp.) για τον ημιαυτόματο προσδιορισμό του κλάσματος των θετικών κυττάρων στο υπό εξέταση δείγμα. Αναλυτικά, αφού ανακλήθηκαν τα αρχεία των εικόνων έγινε εφαρμογή της εντολής “Look Up Table” και επιλογή των περιοχών προς ανάλυση με το εργαλείο ελεύθερης επιλογής “Freehand selection tool”. Στη συνέχεια επιλέχθηκε η εντολή “Density Slice”. Η επιλογή αυτή επιτρέπει τη νοερή απεικόνιση των επιλεγμένων επιπέδων τιμών της κλίμακας του γκρι εντός της περιοχής ενδιαφέροντος (Region of Interest). Στην κλίμακα αυτή το 0 αντιπροσωπεύει το απόλυτο λευκό ενώ το 255 το απόλυτο μαύρο αντίστοιχα. Η ουδός καθορίστηκε ομοιότυπα αλλά χωριστά για κάθε εικόνα, με τρόπο τέτοιο ώστε να επιλεγεί το σύνολο των θετικών για τη χρώση κυττάρων και συγχρόνως να παραληφθούν τα αρνητικά κύτταρα. Για παράδειγμα, κύτταρα της βασικής/παραβασικής στιβάδας επιλέχθηκαν με το εργαλείο ελεύθερης επιλογής και έγινε μέτρηση της περιοχής των εικονοστοιχείων (pixels) των οποίων η ένταση εμπίπτει εντός της περιοχής των ορίων που καθορίζει η προεπιλεγμένη ουδός. Έπειτα απενεργοποιήθηκε η επιλογή Density Slice και μετρήθηκε το σύνολο των εικονοστοιχείων της επιλεγμένης περιοχής. Διαιρώντας τις δύο αυτές τιμές, προκύπτει το κλάσμα της περιοχής των θετικά σσημασμένων κυττάρων προς το σύνολο των κυττάρων της σταθερά πάντα επιλεγμένης περιοχής. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για την ακανθωτή και κοκκιώδη στιβάδα της επιδερμίδας. Βασική στερεολογική ανάλυση, σύμφωνα με την αρχή του Delesse, επιτρέπει την άμεση αναγωγή κλασμάτων επιφανείας από τις εικόνες των τομών σε κλάσματα όγκου των κυττάρων στους ιστούς [54]. Η επιλογή των προς ανάλυση περιοχών και για τις τρεις στιβάδες της επιδερμίδας έγινε από γειτονικές περιοχές της τομής ώστε να αποφευχθούν διακυμάνσεις στο τελικό αποτέλεσμα καθώς διαφορετικές περιοχές του ιστού ενδέχεται να αντιδράσουν διαφορετικά με τα πρωτοταγή αντισώματα (Εικόνα 5, A και B).

Αναλύοντας ψηφιακά την θετικότητα της εκάστοτε χρώσης στις επιμέρους στιβάδες της επιδερμίδας οδηγηθήκαμε στην παραγωγή παραμετρικών τιμών και επομένως σε βαθύτερη στατιστική ανάλυση των διαφορών στη διάρκεια της θεραπείας με τη χρήση παραμετρικών στατιστικών δοκιμασιών (ANOVA, post hoc). Με τη βοήθεια της μεθόδου αυτής αποδείχθηκε για πρώτη φορά η στατιστικά σημαντική διαφορά της έκφρασης των αποπτωτικών πρωτεϊνών στα επιμέρους διαμερίσματα της επιδερμίδας. Θα πρέπει, ωστόσο,

να επισημανθεί πως η μέθοδος προσφέρει μια ημιποσοτική ανάλυση των χρώσεων. Επίσης, η απόκλιση κατά τη μελέτη ενός πλακιδίου καταργείται, αλλά μεταξύ των διαφορετικών πλακιδίων δεν είναι δυνατή η εξαλοιφή της καθώς οι σταθερές της ανάλυσης ρυθμίζονται εκ νέου. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η εγκυρότητα της μεθόδου αναλύθηκαν αντιπροσωπευτικές σειρές πυρηνικών αλλά και κυτταροπλασματικών χρώσεων τόσο με την ψηφιακή όσο και με την κλασική παθολογοανατομική μέθοδο, όπως περιγράφεται στο παράρτημα “Υλικά και Μέθοδοι”. Η σύγκριση των μεθόδων αυτών δεν απέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στο τελικό αποτέλεσμα [52].



Εικόνα 5. Ψηφιακή ανάλυση ανοσοϊστοχημικών χρώσεων με επιλογή διακριτών περιοχών της επιδερμίδας. Μέτρηση πάχους καταδυτικών θηλών της επιδερμίδας [52].

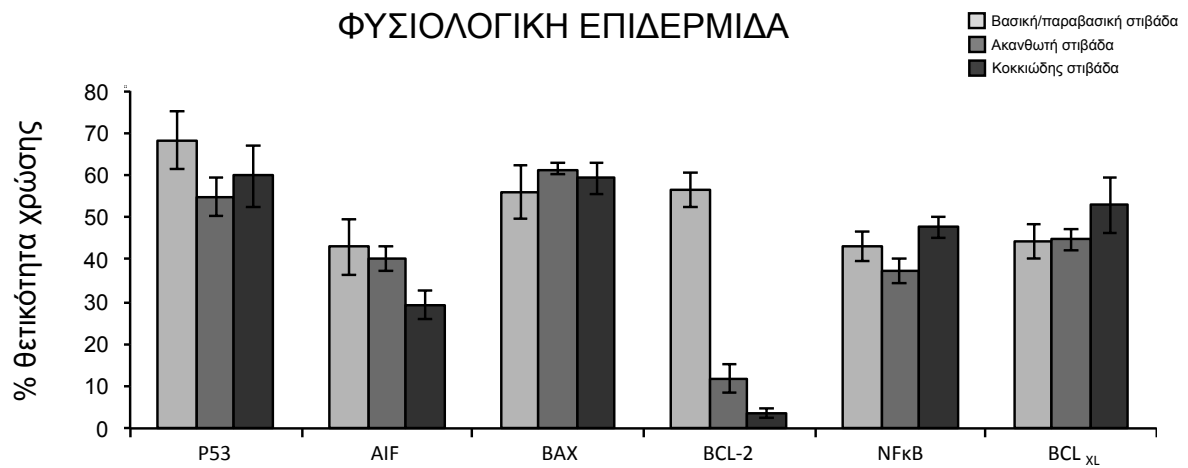
Διαταραγμένη έκφραση των αποπτωτικών πρωτεϊνών της ψωριασικής πλάκας σε σύγκριση με υγιές δέρμα ψωριασικών ασθενών

Η πάχυνση της επιδερμίδας στην ψωρίαση φαίνεται να σχετίζεται με την απορρύθμιση της αποπτωτικής ισορροπίας των κερατινοκυττάρων. Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών και των μεταγραφικών παραγόντων p53 και NFκB στην απόπτωση και η αλλαγή στην έκφρασή τους στην ψωριασική επιδερμίδα κατά τη θεραπεία με infliximab, στην παρούσα μελέτη εξετάσθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών αυτών σε φυσιολογικό δέρμα ασθενών με ψωρίαση (Εικόνα 6) και ακολούθησε σύγκριση με την ψωριασική πλάκα. Όπως προέκυψε από την μονόδρομη ανάλυση ANOVA, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών αυτών μεταξύ φυσιολογικού και ψωριασικού δέρματος. Πριν την έναρξη της θεραπείας, παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών p53 και Bax ($p=0.000$ και $p=0.002$, αντιστοίχως) και παράλληλα χαμηλότερη έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-XL και NFκB ($p=0.028$ και $p=0.039$, αντιστοίχως) στο φυσιολογικό σε σύγκριση με το ψωριασικό δέρμα. Η διαταραγμένη αυτή ισορροπία υπέρ της έκφρασης των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών στις ψωριασικές πλάκες ενδεχομένως να ερμηνεύει εν μέρει την επαγωγή και τη διατήρηση της επιδερμικής υπερπλασίας στην ψωρίαση.

Συγκρίνοντας, έπειτα, την έκφραση των πρωτεϊνών αυτών σε φυσιολογικό και ψωριασικό δέρμα μετά από 21 ημέρες θεραπείας, δεν προέκυψαν σημαντικές αλλαγές στην έκφραση των p53, Bax, Bcl-XL και NFκB. Αυτό υποδεικνύει ότι το infliximab αποκατέστησε την ισορροπία των προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών στις υποστρέφουσες ψωριασικές πλάκες καταργώντας έτσι την αντίσταση των κερατινοκυττάρων του φλεγμαίνοντος ιστού στα αποπτωτικά ερεθίσματα.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως η έκφραση των Bcl-2 και AIF στο φυσιολογικό σε σύγκριση με το ψωριασικό δέρμα πριν από θεραπεία δεν διαφέρει σημαντικά. Μετά από 21 ημέρες θεραπείας, ωστόσο, η έκφραση του Bcl-2 στο ψωριασικό δέρμα ελαττώνεται σημαντικά ($p=0.004$), ενώ τα επίπεδα έκφρασης του AIF αυξάνονται σημαντικά ($p=0.002$). Οι όψιμες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών πιθανώς υποδεικνύουν μια περαιτέρω συνεχιζόμενη αποπτωτική διεργασία κατά τη διάρκεια της υποστροφής των

ψωριακών πλακών, όπου το τελικό στάδιο της ομοίωσης του ιστού δεν έχει ακόμα επιτευχθεί.



Εικόνα 6. Έκφραση των αποπτωτικών πρωτεϊνών p53, AIF, Bax, Bcl-2, NFκB και Bcl-XL σε φυσιολογική επιδερμίδα ασθενών με ψωρίαση πριν από θεραπεία με infliximab. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις και ανάλυση εικόνας (μέσος και σταθερή απόκλιση).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ και *** $p < 0.001$

Μείωση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2, Bcl-XL και NFκB μετά από Θεραπεία με infliximab

Τόσο πριν από θεραπεία, όσο και κατά τη διάρκεια της θεραπείας, η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 εντοπίζεται κυρίως στην βασική/παραβασική στιβάδα της επιδερμίδας. Η θετικότητα της χρώσης πριν από τη θεραπεία πλησιάζει το 46% στην βασική/παραβασική στιβάδα. Σταδιακή μείωση της χρώσης στην βασική/παραβασική στιβάδα με ποσοστό 42,7%, 36,6% και 29,4% παρατηρείται αντιστοίχως 5, 14 και 21 μέρες από θεραπεία. Η κοκκιώδης και η ακανθωτή στιβάδα της επιδερμίδας, ωστόσο, επηρεάζονται ελάχιστα (εικόνα 7. ο, ρ, ς και τ). Στατιστικά σημαντική μείωση στην έκφραση του Bcl-2 παρατηρήθηκε 21 ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας ($p < 0.01$) (Εικόνα 8). Στην ανάλυση της επίδρασης της θεραπείας στα επιμέρους διαμερίσματα της επιδερμίδας με το χρόνο φάνηκε πως η θεραπεία έδρασε διαφορετικά στις τρεις διακριτές στιβάδες ($p = 0,01$). Σε περαιτέρω ανάλυση με μονόδρομη ANOVA, αποδείχθηκε πως η χρώση μεταβλήθηκε σημαντικά μόνο στην βασική/παραβασική στιβάδα συγκριτικά με τις άλλες στιβάδες 14 και 21 μέρες μετά από θεραπεία ($p = 0,00$ και $p < 0,0001$ αντιστοίχως).

Ενδιαφέρον, επίσης, παρουσιάζει η θετική χρώση με Bcl-2 των λεμφοκυττάρων του υποκείμενου χορίου και η σταδιακή ελάττωση της θετικότητας στην πορεία της θεραπείας. Αντιστοίχως, θετικά στην χρώση με Bcl-2 παρουσιάζονται και τα ενδοθηλιακά κύτταρα του θηλώδους χορίου.

Σε αντίθεση με το Bcl-2, η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-XL, παρουσίασε έντονα θετική χρώση σε όλες τις στιβάδες της επιδερμίδας πριν από θεραπεία, με ποσοστά που πλησιάζουν το 71% στις ανώτερες στιβάδες. Το infliximab έδρασε όμοια σε όλες τις στιβάδες της ψωριασικής επιδερμίδας, με αποτέλεσμα την σταδιακή μείωση της χρώσης και στατιστικώς σημαντική μείωση παρατηρήθηκε 21 ημέρες μετά την πρώτη έγχυση (Εικόνα 8). Την ημέρα αυτή, 50%, 38% και 48% των κυττάρων της βασικής/παραβασικής, ακανθωτής και κοκκιώδους στιβάδας αντίστοιχα ήταν θετικά ως προς τη χρώση (Εικόνα 7. m και n). Μελετώντας, ωστόσο, την επίδραση της θεραπείας στα επιμέρους διαμερίσματα της επιδερμίδας με το χρόνο, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,2$). Αυτό αποδεικνύει πως η θεραπεία έδρασε όμοια σε όλες τις στιβάδες της επιδερμίδας, χωρίς να παρατηρηθεί σημαντική διαφορά σε κάποια από αυτές.

Τέλος, ο μεταγραφικός παράγοντας NFκB ελαττώθηκε σημαντικά σε όλες τις στιβάδες της επιδερμίδας κατά τη διάρκεια της θεραπείας με infliximab. Συγκεκριμένα, πριν την έναρξη της θεραπείας παρατηρήθηκε αύξηση του NFκB σε όλες τις στιβάδες της επιδερμίδας, με ήπια υπεροχή της κοκκιδώδους στιβάδας με ποσοστό 63,1%. Η χρώση ελαττώνεται σταδιακά στη διάρκεια της θεραπείας. Στατιστικά σημαντική ελάττωση στην έκφρασή του παρατηρείται 14 ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας (Εικόνα 8). Στο σημείο αυτό η βασική/παραβασική στιβάδα και η κοκκιδώδης στιβάδα παρουσιάζουν όμοια ποσοστά έκφρασης του NFκB περίπου 44%, ενώ η ελάττωση της χρώσης στην ακανθωτή στιβάδα είναι ακόμα εντονότερη και πλησιάζει το 34,6% (εικόνα 7. s, t, u και v). Η ελάττωση στην ένταση της χρώσης του NFκB σε όλες τις στιβάδες της επιδερμίδας συνεχίζεται και στις 21 ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας. Αναλύοντας, τέλος, την επίδραση της θεραπείας στην χρώση των επιμέρους επιδερμικών στιβάδων δεν φάνηκε να είναι σημαντική η διαφορά ($p>0,1$), πράγμα που αποδεικνύει πως η θεραπεία επηρέασε όμοια την έκφραση του NFκB σε όλες τις στιβάδες της επιδερμίδας.

Αύξηση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών P53, AIF και Bax μετά από θεραπεία με infliximab

Παράλληλα με την μείωση στην έκφραση των παραπάνω αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών στη διάρκεια της θεραπείας με infliximab, παρατηρήσαμε σημαντική αύξηση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών P53, AIF και Bax.

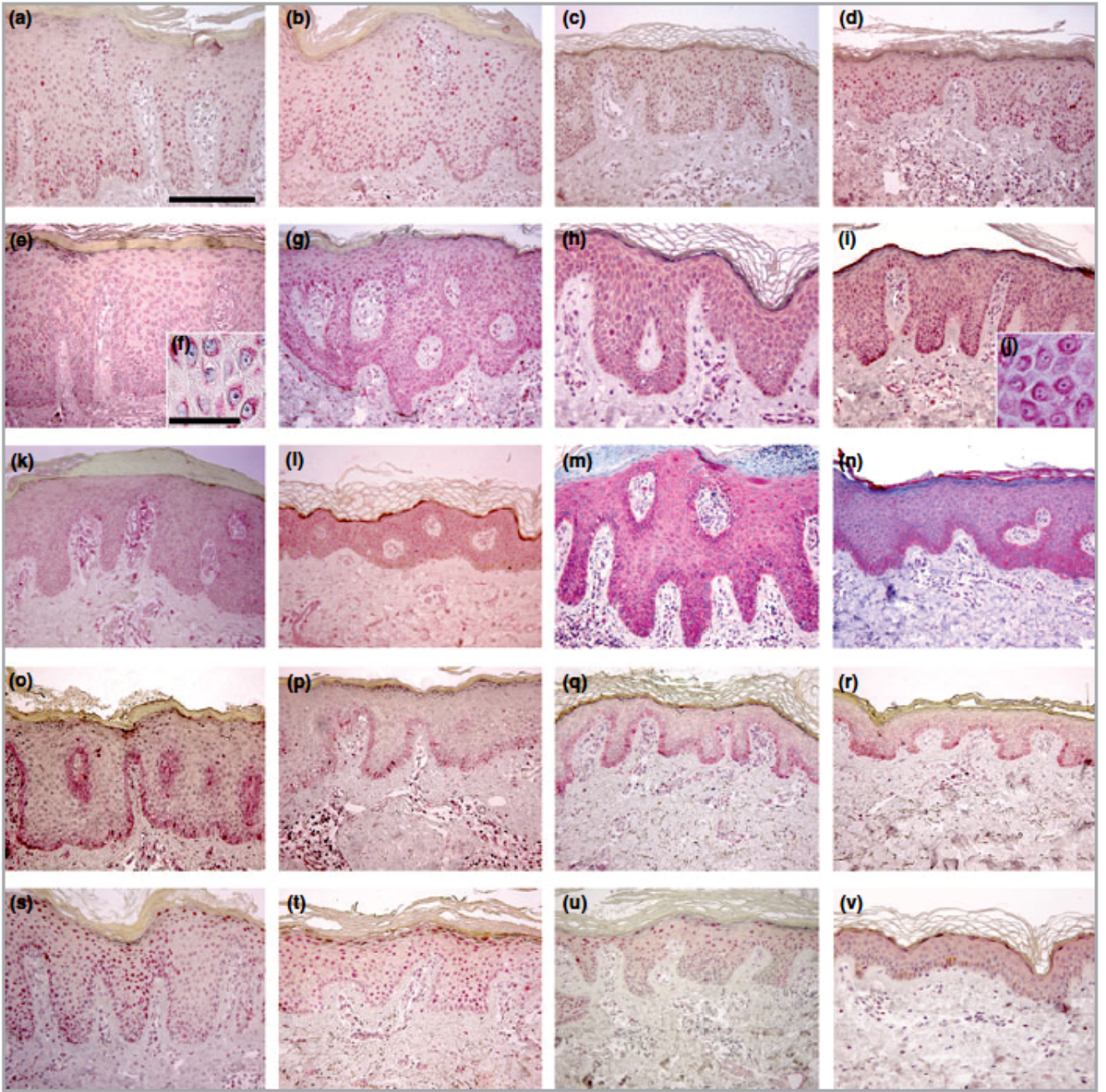
Συγκεκριμένα, η προαποπτωτική πρωτεΐνη P53 παρουσίασε ελαττωμένη έκφραση πριν από την θεραπεία, με εντόπιση κυρίως στη βασική/παραβασική στιβάδα με ποσοστό έκφραση που πλησίαζε το $53\pm 5\%$. Στην ακανθωτή και την κοκκιδώδη στιβάδα η θετικότητα της χρώσης πλησίαζε το 30%. Στην διάρκεια της θεραπείας, ωστόσο, παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση του P53, ιδιαιτέρως στην ακανθωτή και κοκκιδώδη στιβάδα, με αποτέλεσμα 21 ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας η επιδερμίδα να παρουσιάζει μια διάχυτη χρώση σε όλες τις κυτταρικές στιβάδες (Εικόνα 7. a, b, και c). Σημαντική αύξηση στην έκφραση του P53 παρατηρήθηκε ήδη 5 ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας ($p<0.01$) (Εικόνα 8), γεγονός που ενδεχομένως να υποδηλώνει τον πρωταρχικό ρόλο της πρωτεΐνης αυτής στην

πυροδότηση των αποπτωτικών διεργασιών που μελετήθηκαν. Στο τελευταίο χρονικό σημείο που μελετήθηκε, 21 ημέρες μετά από θεραπεία, η επιδερμίδα παρουσιάζει ομοιόμορφη χρώση σε όλες τις στιβάδες με ποσοστό που προσεγγίζει το 70% στην βασική/παραβασική στιβάδα και το 57% και 55% στην ακανθωτή και κοκκιώδη στιβάδα αντίστοιχα (Εικόνα 7. d). Αναλύοντας την επίδραση της θεραπείας με το χρόνο στα επιμέρους διαμερίσματα της επιδερμίδας με μονόδρομη ANOVA, φάνηκε πως η δράση του φαρμάκου διέφερε στατιστικώς σημαντικά στις επιμέρους στιβάδες ($p=0.03$). Η ακανθωτή και η κοκκιώδης στιβάδα παρουσίασαν μια αξιοσημείωτα αυξημένη ανταπόκριση στη θεραπεία. Έτσι, η αρχική υπεροχή της βασικής/παραβασικής στιβάδας καταρρίφθηκε και 21 ημέρες μετά την πρώτη έγχυση όλες οι στιβάδες της επιδερμίδας παρουσίασαν συγκρίσιμα ποσοστά θετικότητας. Η διαφορά αυτή εντοπίστηκε στις 14 και 21 ημέρες αντίστοιχα ($p\leq 0.002$).

Ομοίως με το P53 και ο AIF παρουσίασε αξιοσημείωτη αύξηση της έκφρασής του στη διάρκεια της θεραπείας με infliximab. Πριν την έναρξη της θεραπείας, εντονότερη έκφραση παρουσίασε η βασική/παραβασική στιβάδα με ποσοστό 37%, ενώ ηπιότερη χρώση με ποσοστό περίπου 27% παρουσίασαν η ακανθωτή και η κοκκιώδης στιβάδα. Ραγδαία αύξηση της χρώσης παρατηρήθηκε στην κοκκιώδη στιβάδα σε ποσοστό 40% ήδη 5 ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας (Εικόνα 7. e και g). Στατιστικά σημαντική επίδραση της θεραπείας στην έκφραση του AIF παρατηρήθηκε 21 ημέρες μετά την πρώτη έγχυση ($p=0.012$) (Εικόνα 8). Σε αυτό το χρονικό σημείο, και οι τρεις επιμέρους στιβάδες της επιδερμίδας παρουσίαζαν όμοια ποσοστά θετικότητας της χρώσης που πλησίαζαν το 50% (εικόνα 7. h και i). Η επίδραση του χρόνου στα επιμέρους διαμερίσματα της επιδερμίδας δεν φάνηκε να είναι σημαντική. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως η θεραπεία στη διάρκεια του χρόνου έδρασε όμοια σε όλες τις στιβάδες της επιδερμίδας. Ενδιαφέρον, επίσης, παρουσιάζει η εντόπιση του AIF στη διάρκεια της θεραπείας. Πριν την έναρξη της θεραπείας η χρώση παρουσιάζει διάχυτη κυτταροπλασματική κατανομή (Εικόνα 7. f). Στην διάρκεια της θεραπείας παρατηρείται τάση συσσώρευσης γύρω από τον πυρήνα καταλήγοντας σε συγκεκριμένες περιοχές στον σχηματισμό περιπυρηνικών δακτυλίων, ή και σε ασθενή πυρηνική χρώση (Εικόνα 7. j). Αυτό υποδεικνύει πιθανώς την κινητικότητα του AIF από τα μιτοχόνδρια προς τον πυρήνα κατά τη διάρκεια της θεραπείας.

Τέλος, ανάλογη αύξηση με τις προαναφερθείσες προαποπτωτικές πρωτεΐνες, παρατηρείται και στην έκφραση του Bax. Η χρώση παρουσιάζει καθαρά κυτταροπλασματική κατανομή σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Με διακριτική υπεροχή της βασικής/παραβασικής στιβάδας,

και τα τρία διαμερίσματα της επιδερμίδας φαίνονται θετικά προς τη χρώση. Πριν την έναρξη της θεραπείας εντονότερη χρώση παρουσιάζει η βασική/παραβασική στιβάδα με ποσοστό 51% και ακολουθούν η ακανθωτή και κοκκιώδης στιβάδα με ποσοστό 40% και 45% αντίστοιχα. Η χρώση παρουσιάζει ομοιόμορφη σταδιακή αύξηση στην διάρκεια της θεραπείας (Εικόνα 7. κ και Ι). Στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρείται αρχικά 14 ημέρες μετά την πρώτη έγχυση ($p=0.006$) με ποσοστό περίπου 50% σε όλες τις στιβάδες καθώς και 21 ημέρες με ποσοστό 60% για την βασική/παραβασική και 67% για την κοκκιώδη στιβάδα (Εικόνα 8). Η επίδραση του χρόνου στα επιμέρους διαμερίσματα της επιδερμίδας κατά τη διάρκεια της θεραπείας, όπως προκύπτει από την ανάλυση ANOVA, δεν φάνηκε να είναι σημαντική.

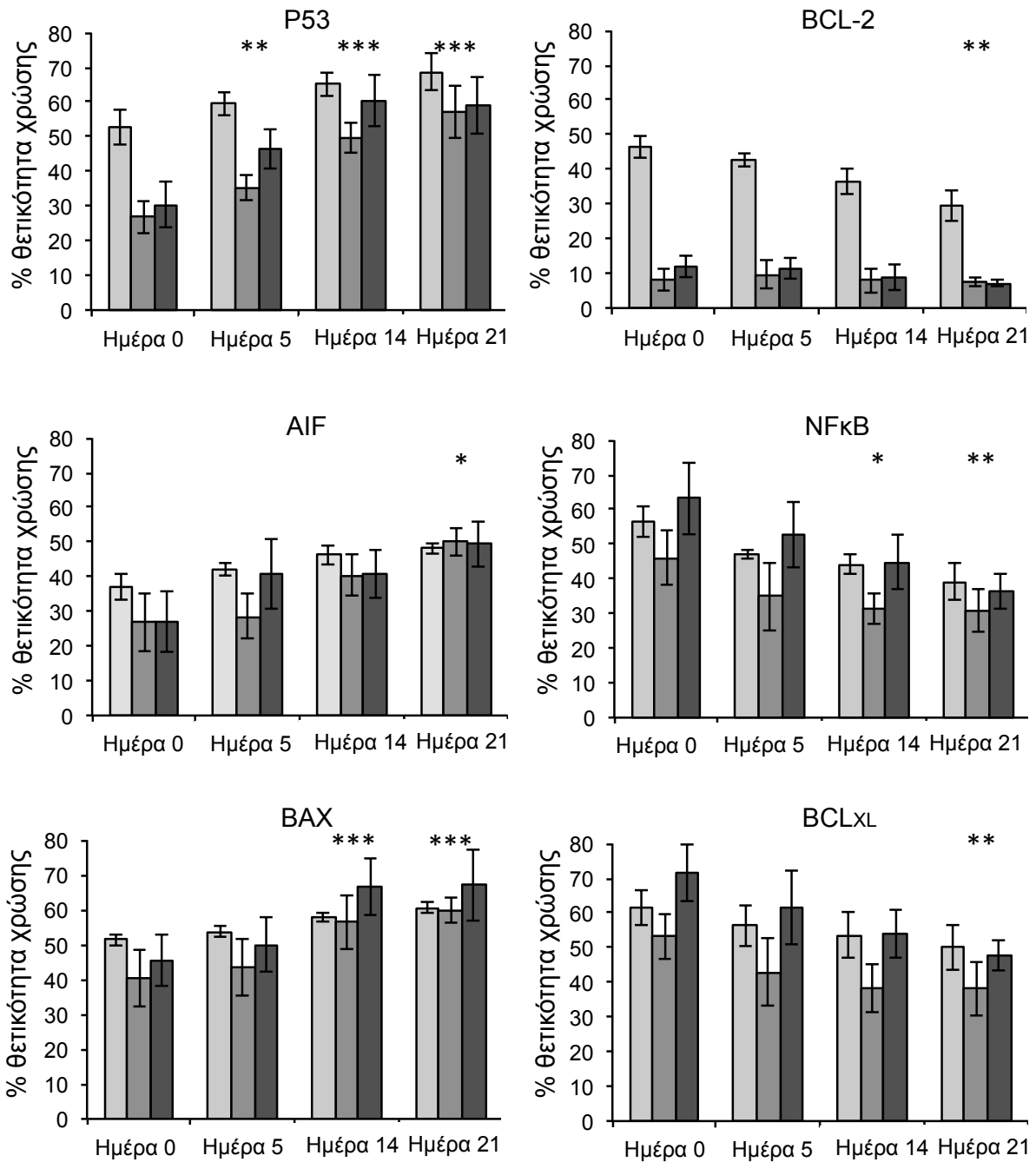


Εικόνα 7. Αποκατάσταση της διαταραγμένης έκφρασης των αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2, Bcl-XL, Bax, p53, NFκB και AIF στις ψωριασικές πλάκες υπό θεραπεία με infliximab.

Ανοσοϊστοχημική ανάλυση αντιπροσωπευτικών δειγμάτων όπου επιδεικνύεται προοδευτική αύξηση στην χρώση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών: έντονη πυρηνική έκφραση του p53 σε όλη την επιδερμίδα την 5η (b), 14η (c) και 21η (d) ημέρα της θεραπείας σε σύγκριση με την σποραδική χρώση κυρίως στην βασική και παραβασική στιβάδα πριν την έναρξη της θεραπείας (a). Ο AIF παρουσιάζει διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση πριν από τη θεραπεία (e) [(f) ένθετο: μεγέθυνση 400x], η οποία αυξάνεται σε όλες τις στιβάδες της επιδερμίδας 5 (g), 14 (h) και 21 (i) ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας. Στην 21^η ημέρα της θεραπείας ο AIF παρουσιάζει μια προέχουσα περιπυρηνική εντόπιση [(j) ένθετο: μεγέθυνση 400x]. Η θετικότητα της χρώσης του Bax παρουσιάζει μια συνολική αύξηση σε όλες τις επιδερμικές στιβάδες μετά από 21 ημέρες θεραπείας (l) αναφορικά με την ημέρα 0 (k). Αντιθέτως με τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες, οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες παρουσιάζουν σταδιακή μείωση στην έκφραση τους κατά τη διάρκεια της θεραπείας: σημαντική μείωση στην έκφραση του BclXL σε όλη την επιδερμίδα την 21^η ημέρα (n) σε σύγκριση με την ημέρα πριν την έναρξη της θεραπείας (m). Η χρώση για το Bcl-2 είναι έντονα θετική πριν την έναρξη της θεραπείας κυρίως στην βασική/παραβασική στιβάδα (o) και σταδιακά ελαττώνεται 5 (p), 14 (q) και 21 (r) ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας. Ο NFκB παρουσιάζει έντονη πυρηνική χρώση σε όλες τις στιβάδες της επιδερμίδας πριν την έναρξη της θεραπείας (s) και σταδιακά ελαττώνεται στην ημέρα 5 (t), 14 (u) και 21 (v) [55]. Κλίμακα=200μm, στα ένθετα 100μm.

ΨΩΡΙΑΣΙΚΗ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑ

□ Βασική/παραβασική στιβάδα
 ■ Ακανθωτή στιβάδα
 ■ Κοκκιώδης στιβάδα



Εικόνα 8. Έκφραση προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών στην ψωριασική επιδερμίδα πριν και μετά από θεραπεία με infliximab.

Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις και εκτίμηση με ανάλυση εικόνας. Στα γραφήματα απεικονίζεται η σημαντική αυξορρύθμιση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών p53, AIF και Bax και η μειορρύθμιση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2, NFκB και Bcl-XL (μέσος και σταθερή

απόκλιση). Οι αστερίσκοι επισημαίνουν την σημαντικότητα της διαφοράς συγκριτικά με τη μέρα 0 όπως προέκυψε από την post-hoc ανάλυση Bonferroni, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ και *** $p < 0.001$.

Μέτρηση πάχους επιδερμίδας

Η εκτίμηση του πάχους της επιδερμίδας έγινε σε τομές H&A. Ένα πλακίδιο με μικροσκοπικό πλέγμα βαθμονόμησης φωτογραφήθηκε στο μικροσκόπιο που ψηφιοποιήθηκαν οι τομές στην ίδια ακριβώς μεγέθυνση με το λογισμικό που προαναφέρθηκε. Χρησιμοποιώντας το Scion Image, η δεδομένη απόσταση των 250 μ m όπως προκύπτει από το πλακίδιο βαθμονόμησης αντιστοιχήθηκε με την απόσταση 733 εικονοστοιχείων στην εικόνα. Με την εντολή “Set scale” (Ρύθμιση κλίμακας), όπως περιγράφεται στις οδηγίες του κατασκευαστή (http://www.scioncorp.com/frames/fr_download_now.htm), αντιστοιχήθηκε η εκτιμώμενη απόσταση των εικονοστοιχείων σε μικρόμετρα. Επιλέγοντας την εντολή “Propagate spatial calibration” (Διαβίβαση διαστηματικής βαθμονόμησης) βαθμονομήθηκαν όλες οι εικόνες και έγινε αναγωγή κάθε δεδομένης απόστασης από εικονοστοιχεία σε μικρόμετρα. Η μέτρηση του επιδερμικού πάχους οριοθετήθηκε μεταξύ της βασικής μεμβράνης και του ανώτατου ορίου της επιδερμίδας ακριβώς κάτωθεν της κερατίνης στιβάδας. Η τελική τιμή του πάχους της επιδερμίδας ορίστηκε από τον μέσο όρο τριών ανεξάρτητων μετρήσεων από διαφορετικές περιοχές της τομής (Εικόνα 5, C).

Στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πάχους της επιδερμίδας με τον κλινικό δείκτη PASI κατά την διάρκεια της θεραπείας.

Το πάχος της επιδερμίδας μετρήθηκε στα δεδομένα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της μελέτης και επιχειρήθηκε η πολυπαραγοντική συσχέτισή του με τον δείκτη PASI. Μετά από 5 καθώς και 21 ημέρες θεραπείας παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην τιμή του PASI ($p < 0.001$ και $p < 0.001$ αντίστοιχα) σε σύγκριση με το χρονικό σημείο πριν την έναρξη της θεραπείας. Στα δύο αυτά χρονικά σημεία παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση του PASI με

το επιδερμικό πάχος, όπως αυτό εκτιμήθηκε στις ιστολογικές τομές ($r=-4.32$, 95% διάστημα εμπιστοσύνης (CI) -7.54 έως -1.10 , και $r=-11.50$, 95% διάστημα εμπιστοσύνης (CI) -16.64 έως -6.35 αντίστοιχα). Έτσι, για κάθε μοναδιαία αύξηση του επιδερμικού πάχους (μm) (95% CI -0.0027 έως 0.042) συνεπάγεται ανεξάρτητη αύξηση στην τιμή του PASI κατά 0.0197 , προσεγγίζοντας οριακά τη στατιστική σημαντικότητα. Εφαρμόζοντας, λοιπόν, την προκύπτουσα γραμμική εξίσωση

$$\text{PASI} = b_0 + b_1 \times \text{Πάχος της επιδερμίδας} + b_2 \times \text{Χρονικό σημείο}$$

για την 5^η και την 21^η ημέρα της θεραπείας, μπορεί κατά προσέγγιση να εκτιμηθεί το επιδερμικό πάχος όταν είναι γνωστή η τιμή του PASI, και αντιστρόφως (Εικόνα 9).

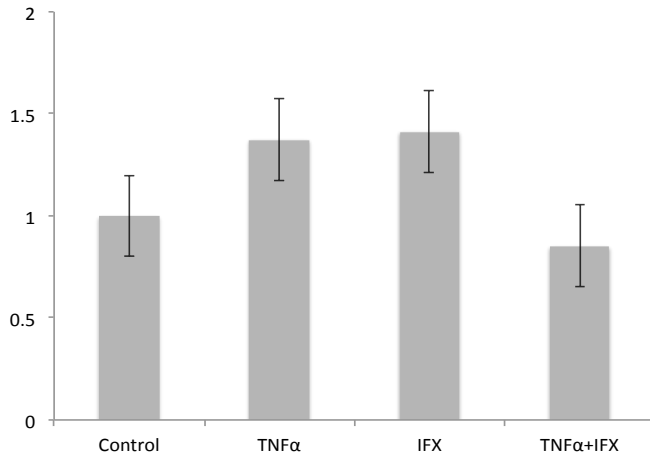


Εικόνα 9. Γραμμική συσχέτιση κλινικού δείκτη PASI και πάχους της επιδερμίδας (μm) κατά τη διάρκεια της θεραπείας με *infliximab*. Παράλληλη γραμμική φθίνουσα πορεία και των δύο δεικτών στη διάρκεια της θεραπείας.

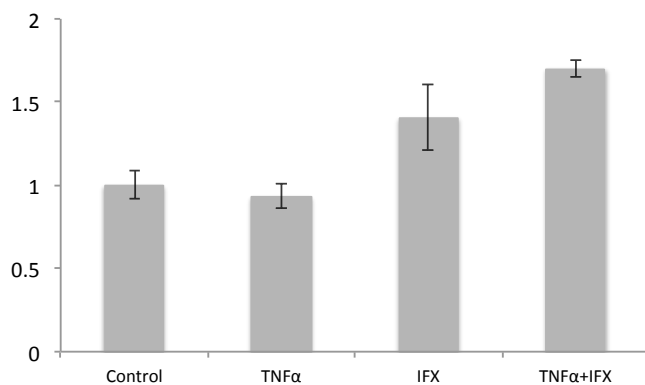
Συνεργιστική αύξηση της απόπτωσης πρωτογενών κερατινοκυττάρων μετά από επώαση με TNFα και θεραπεία με infliximab

Πρωτογενή ανθρώπινα κερατινοκύτταρα απομονώθηκαν από ακροποσθία υγιών δοτών και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε 10ng/ml ανθρώπινο ανασυνδυασμένο TNFα για 24 ώρες. Έπειτα απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό με τον TNFα και προστέθηκε θρεπτικό υλικό με 400μg/ml infliximab [56]. Μετά από 48 ώρες επώαση μελετήθηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων καθώς και το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων με ELISA ειδική για θραύσματα από τον κατακερματισμό του DNA. Η κυτταροτοξικότητα της θεραπείας εκτιμήθηκε με χρωματομετρική μέθοδο υπολογίζοντας την περιεκτικότητα του υπερκείμενου σε LDH. Στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν με θρεπτικό που περιλάμβανε TNFα παρατηρήθηκε αυξημένος ρυθμός πολλαπλασιασμού. Όμοια αποτελέσματα παρουσίασαν και τα κερατινοκύτταρα που διεγέρθηκαν με infliximab. Αντιθέτως, στα κύτταρα που προηγήθηκε διέγερση με TNFα και έπειτα επώαση με infliximab, ο πολλαπλασιαστικός ρυθμός των κυττάρων ελαττώθηκε εμφανώς (Εικόνα 10). Σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα σχετικά με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τα κερατινοκύτταρα που διεγέρθηκαν με TNFα δεν παρουσίασαν αυξημένα ποσοστά απόπτωσης συγκριτικά με τον μάρτυρα. Αυξημένα ποσοστά κατακερματισμού του DNA παρουσίασαν ωστόσο τα κύτταρα που επώαστηκαν με infliximab. Στην περίπτωση της προδιέγερσης των κερατινοκυττάρων με TNFα και συνεπακόλουθη επώαση με infliximab τα ποσοστά αποπτωτικού θανάτου των κυττάρων ήταν ακόμα υψηλότερα (Εικόνα 11). Τα ποσοστά έκλυσης της LDH και στις 4 συνθήκες καλλιέργειας ήταν χαμηλά, αποκλείοντας έτσι τον μη ειδικό κυτταροτοξικό θάνατο των κυττάρων (Εικόνα 12).

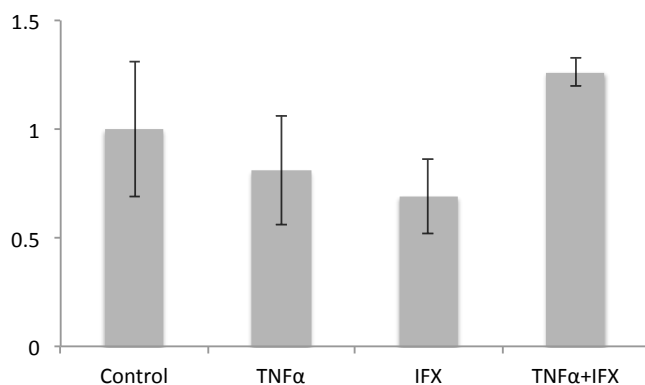
Πολλαπλασιασμός, απόπτωση και κυτταροτοξικότητα φυσιολογικών ανθρώπινων κερατινοκυττάρων μετά από διέγερση με TNFα και infliximab



Εικόνα 10. Εκτίμηση πολλαπλασιασμού φυσιολογικών πρωτογενών ανθρώπινων κερατινοκυττάρων με τη μέθοδο WST μετά από διέγερση με TNFα (10ng/ml), infliximab (400μg/ml) και προδιέγερση με TNFα και μετέπειτα επώαση με infliximab. Κανονικοποίηση σε σχέση με τον μάρτυρα (\pm σταθερή απόκλιση).



Εικόνα 11. Εκτίμηση απόπτωσης φυσιολογικών πρωτογενών ανθρώπινων κερατινοκυττάρων με τη μέθοδο ELISA μετά από διέγερση με TNFα, infliximab και προδιέγερση με TNFα και μετέπειτα επώαση με infliximab. Κανονικοποίηση σε σχέση με τον μάρτυρα (\pm σταθερή απόκλιση).

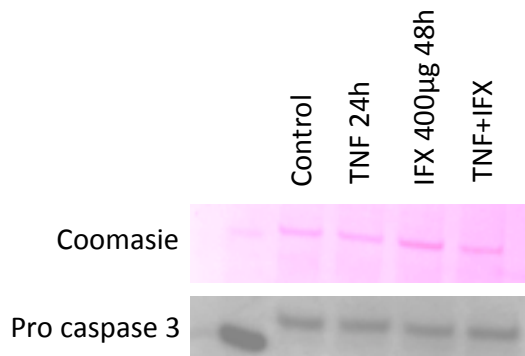


Εικόνα 12. Εκτίμηση κυτταροτοξικότητας φυσιολογικών πρωτογενών ανθρώπινων κερατινοκυττάρων με τη μέθοδο WST μετά από διέγερση με TNFα, infliximab και προδιέγερση με TNFα και μετέπειτα επώαση με infliximab. Κανονικοποίηση σε σχέση με τον μάρτυρα (\pm σταθερή απόκλιση).

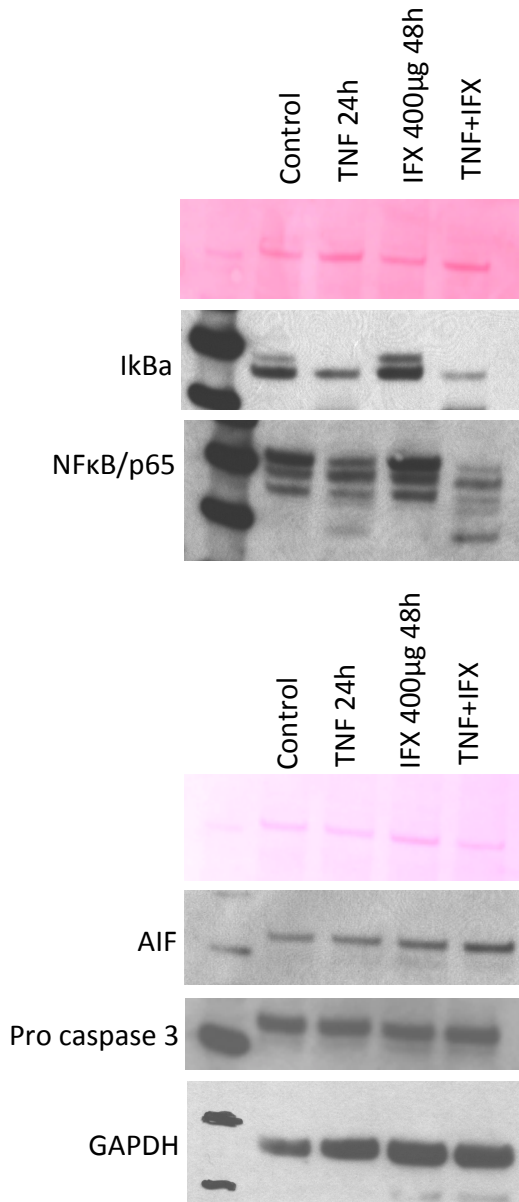
Έκφραση αποπτωτικών πρωτεϊνών σε κυτταροκαλλιέργειες της κυτταρικής σειράς HaCat και σε πρωτογενή φυσιολογικά ανθρώπινα κερατινοκύτταρα

Προκειμένου να μελετηθεί σε κυτταρικό επίπεδο η έκφραση δεδομένων αποπτωτικών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά αθανοτοποιημένων ανθρώπινων κερατινοκυττάρων HaCat για την τυποποίηση των πειραματικών συνθηκών. Στη συνέχεια, κάτω από αυτές τις συνθήκες, μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών αυτών στα πρωτογενή κερατινοκύτταρα. Η έκφραση της προκασπάσης 3 στα κύτταρα HaCat δεν φαίνεται να επηρεάζεται κατά την διάρκεια της διέγερσης με TNFα, infliximab ή συνδυασμό των δύο. Ο έλεγχος ισοφόρτωσης της γέλης πραγματοποιήθηκε με τη χρώση Coomassie (Εικόνα 13, HaCat). Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και από την καλλιέργεια των πρωτογενών κερατινοκυττάρων. Επιπροσθέτως, μελετήθηκε η έκφραση του AIF, χωρίς να παρατηρηθεί διαφορά στην έκφραση του και τις προαναφερθείσες διεγέρσεις (Εικόνα 13). Αντιθέτως, στην περίπτωση του IκBα και συνεπώς του NFκB/p65, φάνηκε πως η έκφρασή τους επηρεάζεται αποκλειστικά από την παρουσία του TNFα στο θρεπτικό μέσο. Στην περίπτωση που τα κύτταρα διεγέρθηκαν με TNFα, είτε ως μονοθεραπεία αλλά και με συνεπακόλουθη διέγερση με infliximab, η έκφραση του IκBα ελαττώθηκε εμφανώς. Αντιστοίχως, σε αυτές τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε και διάσπαση NFκB/p65 (Εικόνα 13).

HaCat



Πρωτογενή ανθρώπινα κερατινοκύτταρα



Εικόνα 13

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αυξορρύθμιση των μηχανισμών επιβίωσης και η παράλληλη καταστολή της απόπτωσης φαίνεται να εμπλέκονται στην φλεγμονή του δέρματος και στη διατήρηση της επιδερμικής υπερπλασίας στην ψωρίαση [9, 46, 57].

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε για πρώτη φορά ο προσδιορισμός πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση, των οποίων η έκφραση επηρεάζεται στις υποστρέφουσες ψωριασικές πλάκες υπό θεραπεία με αντισώματα που εξουδετερώνουν τον TNFα.

Συγκεκριμένα διερευνήθηκε η επίδραση της θεραπείας με infliximab στα κερατινοκύτταρα 14 ασθενών με μετρίως σοβαρή έως σοβαρή ψωρίαση. Η εκτίμηση βασίστηκε κυρίως σε ανοσοϊστοχημικές μεθόδους καθώς και σε κλινικές παραμέτρους. Για την περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης της θεραπείας στα κερατινοκύτταρα έγινε προσπάθεια εξομοίωσης των φλεγμονωδών συνθηκών της ψωριασικής επιδερμίδας στην κυτταρική σειρά HaCat, καθώς και σε πρωτογενή ανθρώπινα κερατινοκύτταρα.

Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση των αποπτωτικών πρωτεϊνών στις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις διεξοδικά και με παραγωγή αποτελεσμάτων με παραμετρικές τιμές ώστε να γίνει δυνατή η εμπειριστατωμένη στατιστική εκτίμηση της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών στη διάρκεια της θεραπείας, στοιχειοθετήθηκε ένα σύστημα βασιζόμενο σε ψηφιακή ανάλυση εικόνας. Περιληπτικά, οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις ψηφιοποιήθηκαν με χρήση ειδικών φίλτρων και έπειτα με ειδικό λογισμικό οριοθετήθηκε το εύρος της θετικότητας κάθε χρώση και καταμετρήθηκαν τα εικονοστοιχεία που εμπίπτουν στο εύρος αυτό. Από την ανάλυση αυτή προκύπτουν παραμετρικές αναπαραγωγίμες παραμετρικές τιμές που δίνουν τη δυνατότητα ανάλυση με παραμετρικές στατιστικές δοκιμασίες. Το πλεονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι η παρατήρηση των μεταβολών των τιμών στο χρόνο μεταξύ των διαφορετικών χρονικών σημείων, αλλά και παρατήρηση των μεταβολών μεταξύ των επιμέρους επιδερμικών στιβάδων σε συγκεκριμένο χρονικό σημείο. Η εγκυρότητα της μεθόδου επιβεβαιώθηκε συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής με τα αποτελέσματα των ίδιων παρασκευασμάτων με την κλασική ημιποσοτική παθολογοανατομική εκτίμηση. Η σύγκριση των δύο μεθόδων έγινε με εφαρμογή του μοντέλου γραμμικών συσχετίσεων και δεν έδειξε σημαντικές διαφορές στο τελικό αποτέλεσμα [52].

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, στην μελέτη αυτή για πρώτη φορά επιχειρήθηκε ο διαχωρισμός της επιδερμίδας σε τρία διακριτά διαμερίσματα και η εξέταση αυτών χωριστά και όχι στο σύνολο της επιδερμίδας. Ο διαχωρισμός αυτός βασίστηκε στον διαφορετικό ρυθμό πολλαπλασιασμού και το διαφορετικό μοτίβο διαφοροποίησης των επιμέρους στιβάδων, που συνεπάγεται διαφορετική ανταπόκριση στα εξωγενή αποπτωτικά ερεθίσματα. Στην βασική/παραβασική στιβάδα της επιδερμίδας στοιβάζονται τα κυρίως βλαστικά κύτταρα της επιδερμίδας με ταχύ ρυθμό πολλαπλασιασμού αλλά χαμηλό βαθμό κερατινοποίησης. Στην κοκκιώδη στιβάδα ο ρυθμός πολλαπλασιασμού ελαττώνεται σημαντικά ή σχεδόν μηδενίζεται, ενώ αντιθέτως αυξάνεται η παραγωγή κερατινών. Στις ανώτερες στιβάδες, κοκκιώδη και κερατίνη, έχει πλέον ολοκληρωθεί η διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, και προχωρούν πλέον σε απόπτωση. Σε αντίθεση με την φυσιολογική επιδερμίδα, στην ψωρίαση τα βασικά/παραβασικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται εμφανώς ταχύτερα, πράγμα που οδηγεί στον «κορεσμό» των επιδερμικών στρωμάτων με εκσεσημασμένη αύξηση της ακανθώτης στιβάδας και την συρρίκνωση της κοκκιώδους. Παράλληλα, παρατηρείται διατήρηση των κυτταρικών πυρήνων στην κερατίνη στιβάδα [8]. Από τα παραπάνω γίνεται σαφές πως εξωτερικά ερεθίσματα που επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως στην συγκεκριμένη περίπτωση η αναστολή του TNF α , θα μπορούσαν να έχουν διαφορετική επίδραση στα επιμέρους επιδερμικά διαμερίσματα. Στην παρούσα μελέτη, όπως προέκυψε από την στατική ανάλυση (ANOVA/Bonferroni post hoc tests), η έκφραση των αποπτωτικών πρωτεϊνών που μελετήθηκαν διέφερε σημαντικά στις επιμέρους στιβάδες της επιδερμίδας τόσο στο φυσιολογικό δέρμα όσο και στις ψωριασικές πλάκες κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Παρατηρώντας στατικά τις μεταβολές των πρωτεϊνών αυτών για δεδομένη χρονική στιγμή φάνηκε να διαφέρει σημαντικά η έκφραση τους στις επιμέρους στιβάδες της επιδερμίδας για όλα τα αντισώματα.

Επίσης, μελετώντας δυναμικά την έκφραση των πρωτεϊνών αυτών στο χρόνο ανά στιβάδα, φάνηκε πως υπήρξαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην έκφραση τους κατά διάρκεια της θεραπείας για το P53 και Bcl-2. Αποδείχθηκε, λοιπόν, πως η θεραπεία με infliximab στην περίπτωση των προαναφερθέντων πρωτεϊνών, επηρέασε κάποιες στιβάδες περισσότερο από άλλες στη διάρκεια του χρόνου.

Στην παρούσα μελέτη αποδείχθηκε πως το infliximab επηρέασε την διαταραγμένη ισορροπία των προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών στην ψωριασική επιδερμίδα. Η θεραπεία με infliximab σε σημαντική μείωση στην έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2, Bcl-

XL και NFκB στα κερατινοκύτταρα της ψωριασικής πλάκας και σε σύγχρονη αύξηση στην έκφραση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών p53, Bax και AIF. Ενδιαφέρον επίσης παρουσίασαν οι σημαντικές διαφορές στην έκφραση των αποπτωτικών πρωτεϊνών μεταξύ ψωριασικής πλάκας και φυσιολογικού δέρματος των ασθενών με ψωρίαση. Υψηλότερα ποσοστά έκφρασης αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών και χαμηλότερα ποσοστά πρόαποπτωτικών πρωτεϊνών εντοπίστηκαν στο ψωριασικό δέρμα σε σύγκριση με το φυσιολογικό. Επίσης παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση του κλινικού δείκτη PASI με το πάχος της επιδερμίδας, όπως αυτό εκτιμήθηκε στα ιστολογικά παρασκευάσματα, στις υποστρέφουσες ψωριασικές πλάκες. Τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν τον καθοριστικό ρόλο των αποπτωτικών πρωτεϊνών στην παθοφυσιολογία της ψωρίασης. Τα παρόντα αποτελέσματα όχι μόνο υποστηρίζουν αλλά επίσης διευρύνουν προηγούμενα ευρήματά μας σχετικά με τον κυτταρικό θάνατο των ψωριασικών κερατινοκυττάρων μετά από θεραπεία με infliximab. Συνοψίζοντας, η μελέτη αυτή αποδεικνύει την καθοριστική επίδραση του infliximab στην ισορροπία των προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών στα ψωριασικά κερατινοκύτταρα, υποδεικνύοντας έτσι έναν ακόμα πιθανό σημαντικό μηχανισμό δράσης του πέρα από την ανοσορρύθμιση.

Βασιζόμενοι σε αποτελέσματα από μελέτες σε νόσο Crohn και ρευματοειδή αρθρίτιδα οδηγούμαστε στη υπόθεση ότι η απόπτωση θα μπορούσε να είναι ένας αντιφλεγμονώδης μηχανισμός δράσης των TNFα-αναστολέων στην ψωρίαση. Συγκεκριμένα η επαγωγή της απόπτωσης στα κύτταρα του ανοσοποιητικού έχει αποδειχθεί ως ένας πιθανός μηχανισμός δράσης των θεραπειών αυτών. Η ομάδα του Malaniya και των συνεργατών περιέγραψε ελάττωση των CD11c+ δενδριτικών κυττάρων του χορίου με απόπτωση σε ασθενείς με ψωρίαση που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία με etanercept [58]. Επίσης, CD8+ T-λεμφοκύτταρα του ψωριασικού δέρματος και σε μικρότερο βαθμό CD4+ υπέστην απόπτωση μετά από θεραπεία με infliximab *in vitro* [59]. Η θεραπεία με αντι-TNFα μπορεί παρομοίως να προκαλέσει απόπτωση και σε άλλα κυτταρικά συστήματα στην ψωρίαση. Πρόσφατα μπορέσαμε να δείξουμε αποπτωτικό θάνατο των ενδοθηλιακών κυττάρων στην ψωρίαση μετά από θεραπεία με etanercept [10]. Σε αντίθεση με τα λεμφοκύτταρα, τα κερατινοκύτταρα των ψωριασικών πλακών δεν έχουν μελετηθεί εξίσου εκτενώς σε ότι αφορά στην επίδραση της αναστολής του TNFα. Η πρώτη *in vivo* απόδειξη κυτταρικού θανάτου των ψωριασικών κερατινοκυττάρων μετά από θεραπεία με infliximab προέκυψε

από μελέτη με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κατά την οποία παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές αποπτωτικού θανάτου στα κερατινοκύτταρα [49]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, ακολούθησαν διάφορες δημοσιεύσεις που υποδεικνύουν ελαττωμένη καταστολή των αποπτωτικών μηχανισμών των κερατινοκυττάρων μετά από θεραπεία με αντι-TNF παράγοντες.

Σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης survivin, μέλος των πρωτεϊνών αναστολέων της απόπτωσης (inhibitor of apoptosis proteins, IAP), παρατηρήθηκαν σε ψωριασικό δέρμα σε σύγκριση με φυσιολογικό. Η θεραπεία με infliximab οδήγησε σε σημαντική μείωση της έκφρασης της και η μείωση αυτή συσχετιζόταν σημαντικά με την πορεία της νόσου, όπως αυτή εκτιμήθηκε με τον κλινικό δείκτη PASI [45]. Παρομοίως, η πρωτεΐνη c-FLIP (cellular FLICE inhibitory protein, κυτταρική πρωτεΐνη αναστολής FLICE), ένας καθοριστικός αναστολέας της σηματοδότησης των μεμβρανικών υποδοχέων κυτταρικού θανάτου, παρουσίασε σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε όλα τις στιβάδες της επιδερμίδας σε σύγκριση με το φυσιολογικό δέρμα. Μελετώντας την απόπτωση των ψωριασικών κερατινοκυττάρων με τη μέθοδο TUNEL, φάνηκε πως τα επίπεδα έκφρασης του cFLIP συσχετίστηκαν αρνητικά με την απόπτωση των κερατινοκυττάρων [60]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου c-FLIP ρυθμίζεται άμεσα από τον NFκB, όπως φάνηκε σε κερατινοκύτταρα μετά από διέγερση με TNFα [61]. Η άμεση εξάρτηση της έκφρασης του c-FLIP από τον NFκB τονίζει για μια ακόμα φορά τον καθοριστικό ρόλο του NFκB στην παθογένεια της ψωρίασης.

Στις πρωτεΐνες που ρυθμίζονται από το σηματοδοτικό μονοπάτι TNFα συμπεριλαμβάνονται πρωτεΐνες της οικογένειας του NFκB, οι οποίες προστατεύουν το κύτταρο από αποπτωτικά ερεθίσματα [37]. Συγκεκριμένα σε ανοσοϊστοχημική μελέτη ασθενών με ψωρίαση παρατηρήθηκε πενταπλάσια έκφραση του NFκB στην ψωριασική επιδερμίδα σε σύγκριση με το ανέπαφο δέρμα. Παράλληλα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην έκφραση του φωσφορυλιωμένου NFκB στα ψωριασικά κερατινοκύτταρα 1 και 3 μήνες μετά από θεραπεία με etanercept [21]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, στην παρούσα μελέτη αποδείξαμε παρομοίως σημαντικά αυξημένα ποσοστά έκφρασης του φωσφορυλιωμένου NFκB στο ψωριασικό δέρμα σε σύγκριση με το φυσιολογικό. Το ποσοστό έκφρασης του NFκB μειώθηκε σημαντικά σε όλες τις στιβάδες της επιδερμίδας υπό θεραπεία με infliximab.

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το infliximab επάγει την απόπτωση των κερατινοκυττάρων με τρόπο ανεξάρτητο των κασπασών δεν έχει διευκρινιστεί ακριβώς. Περιλαμβάνει, ωστόσο, πιθανότατα την αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του NFκB. Έχει αποδειχθεί πως η αναστολή των σηματοδοτικών μονοπατιών NFκB μετά από αποκλεισμό του TNFα τροποποιεί την ισορροπία μεταξύ των προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών που εξαρτώνται από τον NFκB και συγχρόνως ελαττώνει πολλαπλασιαστικές πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου [61]. Ο ενεργοποιημένος NFκB προάγει την επιβίωση του κυττάρου είτε με αυξορρύθμιση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως Bcl-2, Bcl-XL και survivin, είτε με μειορρύθμιση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα p53, Fas, TRAIL, TNFα και κυτταρικών υποδοχέων θανάτου. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έρχονται σε συμφωνία με αυτή την υπόθεση. Παρατηρήθηκε ουσιαστική μειορρύθμιση των Bcl-2 and Bcl-XL με παράλληλη αυξορρύθμιση του p53. Οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-XL and Bcl-2 της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών αναστέλλουν την απόπτωση των κυττάρων με δύο τρόπους: είτε σταθεροποιώντας την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, ή σχηματίζοντας ετεροδιμερή σύμπλοκα με τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bad, αναστέλλοντας έτσι τη δράση τους. Όπως λοιπόν λογικά προκύπτει, η μειορρύθμιση του Bcl-2 στην βασική κυρίως στιβάδα και του σε όλες τις στιβάδες της ψωριασικής επιδερμίδας που παρατηρήθηκε οδηγεί πιθανότατα στην διακοπή της ανασταλτικής τους δράσης και συνεπώς στην απελευθέρωση του Bax από τα ετεροδιμερή με Bcl-2 και Bcl-XL. Η επαγωγή της απόπτωσης ενισχύεται περαιτέρω από την ογκοπρωτεΐνη p53. Στην παρούσα μελέτη φάνηκε ταχεία και παρατεταμένη αύξηση του σε όλες τις στιβάδες της επιδερμίδας ήδη 5 ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας, υποδεικνύοντας έτσι την ενίσχυση των αποπτωτικών μηχανισμών του ψωριασικού κερατινοκυττάρου. Το p53 προωθεί την απόπτωση είτε με άμεση μεταγραφική ενεργοποίηση προαποπτωτικών γονιδίων ή με καταστολή αντιαποπτωτικών γονιδίων [62]. Επίσης μπορεί να επηρεάσει άμεσα την ενδογενή οδό της απόπτωσης και να αδρανοποιήσει αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες με σχηματισμό συμπλόκων, όπως για παράδειγμα p53/Bcl-2 και p53/Bcl-XL. Συγχρόνως το p53 μπορεί να ενεργοποιήσει άμεσα την προαποπτωτική πρωτεΐνη Bax, η οποία με τη σειρά της επάγει την απόπτωση με διάτρηση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και τη συνεπακόλουθη απελευθέρωση αποπτωτικών μορίων. Εκτός από τα παραπάνω, το p53 ενδεχομένως ευαισθητοποιεί τα κύτταρα για αποπτωτικό θάνατο ανεξάρτητου των κασπασών επηρεάζοντας θετικά τη ρύθμιση του AIF [63]. Ο AIF

είναι πρωτεΐνη του διαμεμβρανικού χώρου των μιτοχονδρίων, η οποία, μετά από τη μετατόπισή της στον πυρήνα, μπορεί να επάγει τον κυτταρικό θάνατο με άμεση πρόσδεση στο DNA, διεγείροντας έτσι τη δραστηριότητα των DNAσών και πυροδοτώντας την συμπύκνωση της χρωματίνης και τον κατακερματισμό του DNA. Η συσώρευση του AIF γύρω από τον πυρήνα των κερατινοκυττάρων που παρατηρήθηκε μετά από τη θεραπεία με infliximab πιθανότατα υποδεικνύει την μετακίνησή του από τα μιτοχόνδρια στον πυρήνα.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει, ωστόσο, το γεγονός πώς η αποπτωτική ισορροπία στην ψωριασική επιδερμίδα μετά από θεραπεία με infliximab κλίνει εμφανώς περισσότερο υπέρ της απόπτωσης σε σύγκριση με την φυσιολογική επιδερμίδα. Η ερμηνεία της αποπτωτικής υπεροχής στην ψωριασική πλάκα υπό θεραπεία σε σχέση με τη φυσιολογική επιδερμίδα δεν φαίνεται να είναι σαφής. Πιθανώς μετά από 21 ημέρες θεραπεία η υποστρόφη των ψωριασικών πλακών δεν έχει ολοκληρωθεί. Η δυναμική των αποπτωτικών φαινομένων δεν έχει ισορροπήσει ολοκληρωτικά με αποτέλεσμα η ομοίωση των κυττάρων να μην έχει ακόμα κατασταλάξει. Η μελέτη των αποπτωτικών φαινομένων σε οψιμότερα χρονικά σημεία, πέρα από τις 21 ημέρες και εφόσον η υποστρόφη των ψωριασικών πλακών θα έχει ολοκληρωθεί, ενδεχομένως να εξηγούσε σαφέστερα τη διαφορά αυτή.

Πρόσφατη μελέτη, ωστόσο, απέδειξε πως η υποστρέφουσα ψωριασική πλάκα διατηρεί μία ενδογενή ενδοβλαβική γονιδιακή “μνήμη” που τη διαφοροποιεί από την φυσιολογική επιδερμίδα [64]. Στη μελέτη αυτή αναφέρθηκε γενομικό υπόλειμμα χαρακτηριστικό της πάθησης που κυρίως περιελάμβανε γονίδια σχετιζόμενα με φλεγμονή και δομικά στοιχεία του δέρματος. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα αυτά, στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε σημαντικές αλλαγές στην έκφραση μιας ομάδας αποπτωτικών πρωτεϊνών μεταξύ ψωριασικού και φυσιολογικού δέρματος και αυτό πιθανώς να διαδραματίζει έναν καθοριστικό ρόλο στην τελική πορεία της υποστρέφουσας ψωριασικής πλάκας.

Θα πρέπει σαφώς να αναφερθεί ως τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτουν από μια πολύ περιορισμένη μελέτη με μόλις 14 ασθενείς και αυτό προφανώς περιορίζει τις συσχετίσεις και το σθένος των αποτελεσμάτων. Ενδεχομένως σε μεγαλύτερες μελέτες να αναδειχθούν διαφορές μεταξύ πρωτεϊνών που στην παρούσα μελέτη δεν ήταν δυνατόν να αποδειχθούν. Επίσης, ενδέχεται να υπόκεινται διαφορές στην έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών ανάμεσα σε ασθενείς που ανταποκρίνονται στη θεραπεία με αναστολείς του TNF και σε

αυτούς που η θεραπεία αποτυγχάνει. Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα της μελέτης βασίζονται αποκλειστικά σε ανοσοϊστοχημικές χρώσεις. Έτσι, αποδεικνύεται στατικά αλλά δεν είναι απαραίτητως δυνατόν να αποδειχθεί και λειτουργικά η επαγωγή της απόπτωσης.

Στα *in vitro* πειράματα με τα πρωτογενή κερατινοκύτταρα, φάνηκε πως η προδιέγερσή τους με TNFα και η συνεπακόλουθη διέγερση με infliximab είχε συνεργιστική δράση στο τελικό αποπτωτικό αποτέλεσμα. Έτσι, σαφώς περισσότερα κερατινοκύτταρα οδηγήθηκαν σε απόπτωση όταν προδιεργέθηκαν με TNFα απ' ότι αυτά στα οποία προστέθηκε κατευθείαν infliximab χωρίς προδιέγερση με TNFα. Αντίστοιχη ήταν η επίδραση των θεραπειών και στο πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων. Εντονότερη ήταν η μείωση του πολλαπλασιαστικού ρυθμού των κερατινοκυττάρων όταν αυτά προδιεργέθηκαν με TNFα και έπειτα με infliximab, απ' ότι σε αυτά στα οποία δεν προηγήθηκε διέγερση με TNFα. Στην περίπτωση δε του TNFα, τα κερατινοκύτταρα παρουσίασαν αυξημένη πολλαπλασιαστική δραστηριότητα.

Στην περαιτέρω διερεύνηση των αποτελεσμάτων αυτών με ανοσοαποτύπωση κατά Western, δεν φάνηκε να επηρεάζεται ποσοτικά η προκασπάση 3, ο πρόδρομος της ενεργοποιημένης κασπάσης 3. Εμμέσως λοιπόν θα μπορούσαμε να υποθέσουμε την απουσία της ενεργοποιημένης κασπάσης 3. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί απόλυτα με τα αποτελέσματα από το κλινικό σκέλος της μελέτης και υποστηρίζει την υπόθεση ότι το infliximab προάγει τον κυτταρικό θάνατο των κερατινοκυττάρων με τρόπο ανεξάρτητο της ενεργοποίησης των κασπασών. Επίσης, κατά την επώαση με TNFα, παρατηρήθηκε ελαττωμένη έκφραση του αναστολέα του NFκB, IκBα με συνεπακόλουθη απελευθέρωση του NFκB από το σύμπλοκο με τον IκBα τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του, επιβεβαιώνοντας προηγουμένως δημοσιευμένα αποτελέσματα [18].

Θα πρέπει, ωστόσο, να επισημανθεί πως, αν και στα πειράματα που απεικονίζονται προέκυψαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα, αυτά δεν ήταν δυνατόν να αναπαραχθούν ώστε να επιβεβαιωθεί η στατιστική τους σημαντικότητα. Μένει, λοιπόν, ανοιχτό το ερώτημα, αν στα αποτελέσματα αυτά ήταν υπόκεινται μηχανισμοί πολυπλοκότεροι από το μονοπάτι ενεργοποίησης του TNFα ή αν για τεχνικούς λόγους δεν ήταν δυνατή η αναπαραγωγή τους. Τα κερατινοκύτταρα απομονώθηκαν από διαφορετικούς υγιείς δότες με διαφορετικό

συνεπώς γενοτυπικό υπόβαθρο. Αυτό ενδεχομένως να ερμηνεύει τη διαφορετική ανταπόκριση των κερατινοκυττάρων στις διεγέρσεις που μελετήθηκαν.

Συνοψίζοντας, η μελέτη απέδειξε για πρώτη φορά πως η θεραπεία με infliximab ομαλοποιεί την διαταραγμένη έκφραση των προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών στην ψωριασική πλάκα κατά τη διάρκεια υποστροφής της φλεγμονής. Αποδεικνύεται, έτσι, ο καθοριστικός ρόλος των αποπτωτικών πρωτεϊνών στην ψωρίαση και διευκρινίζεται περαιτέρω ο μηχανισμός δράσης του infliximab στην ψωρίαση. Σαφώς απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να διευκρινιστεί επακριβέστερα σε μοριακό επίπεδο ο βιολογικός μηχανισμός τερματισμού της οξείας φλεγμονής στην ψωρίαση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TNF α ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΨΩΡΙΑΣΙΚΩΝ ΚΕΡΑΤΙΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η ψωρίαση αποτελεί μια συχνή φλεγμονώδη δερματοπάθεια με επίπτωση περίπου 3-5% στον δυτικό πληθυσμό. Τον εξέχοντα ρόλο του TNF α ως κύριου μεσολαβητή της πάθησης αποδεικνύει η αποτελεσματικότητα των θεραπειών που αναστέλλουν τη δράση του. Βασιζόμενοι σε προηγούμενα αποτελέσματα της ομάδας μας επιδιώξαμε να προσδιορίσουμε περαιτέρω την επίδραση της αναστολής του TNF α στην απόπτωση των ψωριασικών κερατινοκυττάρων.

Διαδοχικές βιοψίες ελήφθησαν από ασθενείς με ψωρίαση πριν και κατά τη διάρκεια θεραπείας με infliximab και στη συνέχεια έγινε ανοσοϊστοχημική χρώση αυτών με αντισώματα για τις αποπτωτικές πρωτεΐνες P53, AIF, Bax, NF κ B, Bcl-2 και BCL $_{XL}$.

Για την ανάλυση τους εγκαθιδρύθηκε ένα υπολογιστικό σύστημα βασιζόμενο στην ψηφιακή ανάλυση εικονοστοιχείων. Το πάχος της επιδερμίδας εκτιμήθηκε επίσης ψηφιακά. Παράλληλα, πρωτογενή φυσιολογικά ανθρώπινα κερατινοκύτταρα καλλιεργήθηκαν υπό ή χωρίς την παρουσία TNF α και έπειτα προστέθηκε infliximab. Ακολούθησε ανάλυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικότητας καθώς και ELISA για απόπτωση και ανοσοαποτύπωση κατά Western για την ποσοτικοποίηση των αποπτωτικών πρωτεϊνών.

Με την ψηφιακή ανάλυση προέκυψαν παραμετρικές τιμές από την εκτίμηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων, επιτρέποντας έτσι την λεπτομερή ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών στα επιμέρους διαμερίσματα της επιδερμίδας κατά τη διάρκεια της θεραπείας.

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αυξορρύθμιση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών και συγχρόνως μειορρύθμιση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών. Πριν από τη θεραπεία η διαφορά της ψωριασικής από την φυσιολογική επιδερμίδα ήταν σημαντική. Ωστόσο, μετά τη θεραπεία η ψωριασική επιδερμίδα προσομοίαζε την φυσιολογική. Ο κλινικός δείκτης PASI συσχετίστηκε σημαντικά με το πάχος της επιδερμίδας στα προκαθορισμένα χρονικά σημεία. Στο επίπεδο των κυτταρικών καλλιιεργειών παρατηρήθηκε ελάττωση στον πολλαπλασιασμό και αύξηση στην απόπτωση των κερατινοκυττάρων στα οποία προστέθηκε infliximab μετά από προεπάση με TNF α . Στο αποτέλεσμα αυτό φαίνεται να συμμετέχει το σηματοδοτικό

μονοπάτι του NFκB. Παρόλα αυτά, το *in vitro* μοντέλο απέτυχε να προσομοιώσει τις *in vivo* συνθήκες.

Στην παρούσα μελέτη αποδείχθηκε ότι η θεραπεία με αντι- TNF παράγοντες, εκτός από την ανοσορρυθμιστική τους δράση, επηρεάζουν την διαταραγμένη αποπτωτική ισορροπία των κερατινοκυττάρων. Μετά τη θεραπεία, οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες (P53, AIF, Bax) αυξήθηκαν ενώ οι αντιαποπτωτικές (NFκB, Bcl-2, Bcl_{xL}) ελαττώθηκαν, προτρέποντας έτσι τα κερατινοκύτταρα στην υπερνίκηση της αντίστασης κατά των αποπτωτικών ερεθισμάτων. Τα γεγονότα αυτά συνόδευσαν η αποκατάσταση της αρχιτεκτονικής της επιδερμίδας, όπου η ελάττωση του επιδερμικού πάχους συσχετίστηκε σημαντικά με την βελτίωση του PASI. Τα πειράματα επιβεβαίωσαν τα αποπτωτικά αποτελέσματα του αποκλεισμού του TNFα.

ABSTRACT

THE ROLE OF TNF α IN THE APOPTOSIS OF THE PSORIATIC KERATINOCYTES

Psoriasis is a common immune-mediated skin disease affecting about 3-5% of the western population. The prominent role of the TNF α as a key mediator of the disease has been proven by the efficacy of the therapies that inhibit its activity. Prompted by previous results of our group we intended to further identify the effects of TNF-blockade in the apoptosis of the psoriatic keratinocytes.

Serial biopsies from psoriasis patients before and during the treatment with infliximab were obtained and immunohistologically stained for the apoptotic proteins P53, AIF, Bax, NF κ B, Bcl-2 and BCL_{XL}. A computerized system of pixelwise image analysis of the stainings was established. The epidermal thickness was digitally estimated and correlated with the clinical index PASI. Furthermore, primary isolated normal human keratinocytes were cultured with or without TNF α and then treated with infliximab. Cell proliferation assay, Apoptosis-ELISA, cytotoxicity assay and western-blot for the quantification of apoptotic proteins were performed.

The digital analysis system provided parametrical values of the stainings, allowing in this way, the in-depth characterisation of the differences in the expression of the proteins within the different epidermal compartments throughout the treatment.

A statistically significant upregulation of the proapoptotic proteins simultaneously with a downregulation of the antiapoptotic proteins have been observed. Before treatment a remarked difference compared with the non-lesional skin could be shown. However, after treatment lesional skin simulates the non-lesional skin. The expression of the apoptotic proteins differed significantly between the distinct epidermal compartments. PASI score was significantly correlated to the epidermal thickness at the predetermined time-points. In the level of the keratinocyte cultures decreased proliferation and increased apoptotic rates could be observed after the treatment with infliximab in TNF α pre-treated cells. The effect seemed to be driven by the NF κ B proceeding. However, the *in vitro* model failed to simulate the *in vivo* conditions.

In the present project, it could be shown that anti-TNF treatments – besides their immunomodulating effects – they influenced the impaired apoptotic balance of the psoriatic keratinocytes. Proapoptotic proteins (P53, AIF, Bax) were upregulated, whereas the antiapoptotic ones (NF κ B, Bcl-2, Bcl_{XL}) were suppressed, inciting the keratinocytes to overcome the resistance to apoptotic stimuli. These events occurred in line with the restoration of the epidermal architecture and the decrease of the epidermal thickness correlated with the improvement of the PASI score. The in vitro experiments verified the apoptotic effect of TNF-blockade.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Christophers E: **Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum.** *Clinical and experimental dermatology* 2001, **26**(4):314-320.
2. Griffiths CE, Barker JN: **Pathogenesis and clinical features of psoriasis.** *Lancet* 2007, **370**(9583):263-271.
3. Rosen CF, Mussani F, Chandran V, Eder L, Thavaneswaran A, Gladman DD: **Patients with psoriatic arthritis have worse quality of life than those with psoriasis alone.** *Rheumatology (Oxford)* 2012, **51**(3):571-576.
4. Rapp SR, Feldman SR, Exum ML, Fleischer AB, Jr., Reboussin DM: **Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases.** *Journal of the American Academy of Dermatology* 1999, **41**(3 Pt 1):401-407.
5. Liu Y, Krueger JG, Bowcock AM: **Psoriasis: genetic associations and immune system changes.** *Genes and immunity* 2007, **8**(1):1-12.
6. Reich K, Westphal G, Schulz T, Muller M, Zipprich S, Fuchs T, Hallier E, Neumann C: **Combined analysis of polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter regions and polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes in psoriasis.** *The Journal of investigative dermatology* 1999, **113**(2):214-220.
7. Sabat R, Philipp S, Hoflich C, Kreutzer S, Wallace E, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Wolk K: **Immunopathogenesis of psoriasis.** *Experimental dermatology* 2007, **16**(10):779-798.
8. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG: **Pathogenesis and therapy of psoriasis.** *Nature* 2007, **445**(7130):866-873.
9. Wrone-Smith T, Mitra RS, Thompson CB, Jasty R, Castle VP, Nickoloff BJ: **Keratinocytes derived from psoriatic plaques are resistant to apoptosis compared with normal skin.** *The American journal of pathology* 1997, **151**(5):1321-1329.
10. Avramidis G, Kruger-Krasagakis S, Krasagakis K, Fragiadaki I, Kokolakis G, Tosca A: **The role of endothelial cell apoptosis in the effect of etanercept in psoriasis.** *The British journal of dermatology* 2010, **163**(5):928-934.
11. Mueller W, Herrmann B: **Cyclosporin A for psoriasis.** *The New England journal of medicine* 1979, **301**(10):555.
12. Arican O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P: **Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity.** *Mediators of inflammation* 2005, **2005**(5):273-279.
13. Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Kriegler M: **A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact.** *Cell* 1990, **63**(2):251-258.
14. Tartaglia LA, Goeddel DV: **Tumor necrosis factor receptor signaling. A dominant negative mutation suppresses the activation of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor.** *The Journal of biological chemistry* 1992, **267**(7):4304-4307.
15. Schling P, Rudolph C, Heimerl S, Fruth S, Schmitz G: **Expression of tumor necrosis factor alpha and its receptors during cellular differentiation.** *Cytokine* 2006, **33**(5):239-245.
16. Kondo S, Sauder DN: **Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNF-alpha-induced skin inflammation.** *European journal of immunology* 1997, **27**(7):1713-1718.
17. Aufiero B, Guo M, Young C, Duanmu Z, Talwar H, Lee HK, Murakawa GJ: **Staphylococcus aureus induces the expression of tumor necrosis factor-alpha in primary human keratinocytes.** *International journal of dermatology* 2007, **46**(7):687-694.
18. Li H, Lin X: **Positive and negative signaling components involved in TNFalpha-induced NF-kappaB activation.** *Cytokine* 2008, **41**(1):1-8.

19. Vasilopoulos Y, Manolika M, Zafiriou E, Sarafidou T, Bagiatis V, Kruger-Krasagaki S, Tosca A, Patsatsi A, Sotiriadis D, Mamuris Z *et al*: **Pharmacogenetic analysis of TNF, TNFRSF1A, and TNFRSF1B gene polymorphisms and prediction of response to anti-TNF therapy in psoriasis patients in the Greek population.** *Molecular diagnosis & therapy* 2012, **16**(1):29-34.
20. Kristensen M, Chu CQ, Eedy DJ, Feldmann M, Brennan FM, Breathnach SM: **Localization of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and its receptors in normal and psoriatic skin: epidermal cells express the 55-kD but not the 75-kD TNF receptor.** *Clinical and experimental immunology* 1993, **94**(2):354-362.
21. Lizzul PF, Aphale A, Malaviya R, Sun Y, Masud S, Dombrovskiy V, Gottlieb AB: **Differential expression of phosphorylated NF-kappaB/RelA in normal and psoriatic epidermis and downregulation of NF-kappaB in response to treatment with etanercept.** *The Journal of investigative dermatology* 2005, **124**(6):1275-1283.
22. Bayliffe AI, Brigandi RA, Wilkins HJ, Levick MP: **Emerging therapeutic targets in psoriasis.** *Current opinion in pharmacology* 2004, **4**(3):306-310.
23. Romanowska M, al Yacoub N, Seidel H, Donandt S, Gerken H, Phillip S, Haritonova N, Artuc M, Schweiger S, Sterry W *et al*: **PPARdelta enhances keratinocyte proliferation in psoriasis and induces heparin-binding EGF-like growth factor.** *The Journal of investigative dermatology* 2008, **128**(1):110-124.
24. Ogilvie AL, Antoni C, Dechant C, Manger B, Kalden JR, Schuler G, Luftl M: **Treatment of psoriatic arthritis with antitumour necrosis factor-alpha antibody clears skin lesions of psoriasis resistant to treatment with methotrexate.** *The British journal of dermatology* 2001, **144**(3):587-589.
25. Chaudhari U, Romano P, Mulcahy LD, Dooley LT, Baker DG, Gottlieb AB: **Efficacy and safety of infliximab monotherapy for plaque-type psoriasis: a randomised trial.** *Lancet* 2001, **357**(9271):1842-1847.
26. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P *et al*: **Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody.** *Molecular immunology* 1993, **30**(16):1443-1453.
27. Scallon BJ, Moore MA, Trinh H, Knight DM, Ghayeb J: **Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions.** *Cytokine* 1995, **7**(3):251-259.
28. Siegel SA, Shealy DJ, Nakada MT, Le J, Woulfe DS, Probert L, Kollias G, Ghayeb J, Vilcek J, Daddona PE: **The mouse/human chimeric monoclonal antibody cA2 neutralizes TNF in vitro and protects transgenic mice from cachexia and TNF lethality in vivo.** *Cytokine* 1995, **7**(1):15-25.
29. Lavrik I, Golks A, Krammer PH: **Death receptor signaling.** *Journal of cell science* 2005, **118**(Pt 2):265-267.
30. Tait SW, Green DR: **Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut.** *Oncogene* 2008, **27**(50):6452-6461.
31. Eberle J, Fecker LF, Forschner T, Ulrich C, Rowert-Huber J, Stockfleth E: **Apoptosis pathways as promising targets for skin cancer therapy.** *The British journal of dermatology* 2007, **156** Suppl 3:18-24.
32. Bouchier-Hayes L, Lartigue L, Newmeyer DD: **Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death.** *The Journal of clinical investigation* 2005, **115**(10):2640-2647.
33. Cho SG, Choi EJ: **Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases.** *Journal of biochemistry and molecular biology* 2002, **35**(1):24-27.
34. Pradelli LA, Beneteau M, Ricci JE: **Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death.** *Cell Mol Life Sci* 2010, **67**(10):1589-1597.
35. Antonsson B: **Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways.** *Molecular and cellular biochemistry* 2004, **256-257**(1-2):141-155.

36. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A: **Transcriptional control of human p53-regulated genes.** *Nature reviews* 2008, **9**(5):402-412.
37. Brown KD, Claudio E, Siebenlist U: **The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis.** *Arthritis research & therapy* 2008, **10**(4):212.
38. Shishodia S, Aggarwal BB: **Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death.** *Journal of biochemistry and molecular biology* 2002, **35**(1):28-40.
39. Pasparakis M, Courtois G, Hafner M, Schmidt-Supprian M, Nenci A, Toksoy A, Krampert M, Goebeler M, Gillitzer R, Israel A *et al*: **TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2.** *Nature* 2002, **417**(6891):861-866.
40. Walensky LD: **BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death.** *Cell death and differentiation* 2006, **13**(8):1339-1350.
41. Sands BE: **Why do anti-tumor necrosis factor antibodies work in Crohn's disease?** *Reviews in gastroenterological disorders* 2004, **4 Suppl 3**:S10-17.
42. Tak PP: **Effects of infliximab treatment on rheumatoid synovial tissue.** *The Journal of rheumatology* 2005, **74**:31-34.
43. Wrone-Smith T, Johnson T, Nelson B, Boise LH, Thompson CB, Nunez G, Nickoloff BJ: **Discordant expression of Bcl-x and Bcl-2 by keratinocytes in vitro and psoriatic keratinocytes in vivo.** *The American journal of pathology* 1995, **146**(5):1079-1088.
44. Abdou AG, Hanout HM: **Evaluation of survivin and NF-kappaB in psoriasis, an immunohistochemical study.** *Journal of cutaneous pathology* 2008, **35**(5):445-451.
45. Markham T, Mathews C, Rogers S, Mullan R, Bresnihan B, Fitzgerald O, Veale DJ, Fearon U: **Downregulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin in keratinocytes and endothelial cells in psoriasis skin following infliximab therapy.** *The British journal of dermatology* 2006, **155**(6):1191-1196.
46. Laporte M, Galand P, Fokan D, de Graef C, Heenen M: **Apoptosis in established and healing psoriasis.** *Dermatology (Basel, Switzerland)* 2000, **200**(4):314-316.
47. McGill A, Frank A, Emmett N, Turnbull DM, Birch-Machin MA, Reynolds NJ: **The anti-psoriatic drug anthralin accumulates in keratinocyte mitochondria, dissipates mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis through a pathway dependent on respiratory competent mitochondria.** *Faseb J* 2005, **19**(8):1012-1014.
48. Heenen M, Laporte M, Noel JC, de Graef C: **Methotrexate induces apoptotic cell death in human keratinocytes.** *Archives of dermatological research* 1998, **290**(5):240-245.
49. Kruger-Krasagakis S, Galanopoulos VK, Giannikaki L, Stefanidou M, Tosca AD: **Programmed cell death of keratinocytes in infliximab-treated plaque-type psoriasis.** *The British journal of dermatology* 2006, **154**(3):460-466.
50. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE: **Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.** *The Journal of cell biology* 1988, **106**(3):761-771.
51. Fredriksson T, Pettersson U: **Severe psoriasis--oral therapy with a new retinoid.** *Dermatologica* 1978, **157**(4):238-244.
52. Kokolakis G, Panagis L, Stathopoulos E, Giannikaki E, Tosca A, Kruger-Krasagakis S: **From the protein to the graph: how to quantify immunohistochemistry staining of the skin using digital imaging.** *Journal of immunological methods* 2008, **331**(1-2):140-146.
53. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical biochemistry* 1976, **72**:248-254.
54. Howard CV, Reed, M.G.: **Unbiased stereology. Three-Dimensional Measurement in Microscopy.** *BIOS Scientific Publishers, Oxford* 1998.

55. Kokolakis G, Giannikaki E, Stathopoulos E, Avramidis G, Tosca AD, Kruger-Krasagakis S: **Infliximab restores the balance between pro- and anti-apoptotic proteins in regressing psoriatic lesions.** *The British journal of dermatology* 2012, **166**(3):491-497.
56. Noriega J, Bedaiwy M, Sharma R, Falcone T: **Effect of tumor necrosis factor-alpha blocker (infliximab) on blastocyst development in vitro.** *Fertility and sterility* 2004, **81**(6):1704-1706.
57. Takahashi H, Manabe A, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Iizuka H: **Aberrant expression of apoptosis-related molecules in psoriatic epidermis.** *J Dermatol Sci* 2002, **28**(3):187-197.
58. Malaviya R, Sun Y, Tan JK, Wang A, Magliocco M, Yao M, Krueger JG, Gottlieb AB: **Etanercept induces apoptosis of dermal dendritic cells in psoriatic plaques of responding patients.** *Journal of the American Academy of Dermatology* 2006, **55**(4):590-597.
59. Bedini C, Nasorri F, Girolomoni G, Pita O, Cavani A: **Antitumour necrosis factor-alpha chimeric antibody (infliximab) inhibits activation of skin-homing CD4+ and CD8+ T lymphocytes and impairs dendritic cell function.** *Br J Dermatol* 2007, **157**(2):249-258.
60. Yang J, Li Y, Liu YQ, Long JW, Tian F, Dong J, Shen GX, Tu YT, Tao J: **Expression of antiapoptotic protein c-FLIP is upregulated in psoriasis epidermis.** *Eur J Dermatol* 2009, **19**(1):29-33.
61. Banno T, Gazel A, Blumenberg M: **Pathway-specific profiling identifies the NF-kappa B-dependent tumor necrosis factor alpha-regulated genes in epidermal keratinocytes.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(19):18973-18980.
62. Green DR, Kroemer G: **Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53.** *Nature* 2009, **458**(7242):1127-1130.
63. Stambolsky P, Weisz L, Shats I, Klein Y, Goldfinger N, Oren M, Rotter V: **Regulation of AIF expression by p53.** *Cell death and differentiation* 2006, **13**(12):2140-2149.
64. Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Lowes MA, Krueger JG: **Resolved psoriasis lesions retain expression of a subset of disease-related genes.** *J Invest Dermatol* 2011, **131**(2):391-400.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δημοσιεύτηκαν στα παρακάτω διεθνή περιοδικά και συνέδρια:

1. Kokolakis G, Panagis L, Stathopoulos E, Giannikaki E, Tosca A, Krueger-Krasagakis S. From the protein to the graph: How to quantify immunohistochemistry staining of the skin using digital imaging. *Journal of Immunological Methods* 2008 Feb 29;331(1-2):140-6. Original Paper
2. Avramidis G, Krueger-Krasagakis S, Krasagakis K, Fragiadaki I, Kokolakis G, Tosca A. The role of endothelial cell apoptosis in the effect of etanercept in psoriasis. *British Journal of Dermatology* 2010 Nov;163(5):928-34. Original Paper
3. Kokolakis G, Giannikaki E, Stathopoulos E, Avramidis G, Tosca AD, Krueger-Krasagakis S. Infliximab restores the balance between pro- and anti-apoptotic proteins in regressing psoriatic lesions. *British Journal of Dermatology* 2012 Mar;166(3):491-7. Original Paper
4. Kokolakis G, Giannikaki E, Tosca A, Philipp S, Sterry W, Krüger-Krasagakis S. Intrinsic apoptosis induction in regressing psoriasis lesions under treatment with infliximab. 22nd World Congress of Dermatology, May 2011, Seoul, Korea. Oral presentation
5. Κοκολάκης Γ, Κρύγκερ-Κρασάγάκη Σ, Τόσκα Α, Eberle J. Η αντιφατική επίδραση του TNFα στην απόπτωση φυσιολογικών και κακώθων κερατινοκυττάρων. 1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Υποειδικοτήτων στη Δερματολογία, Αθήνα 2009. Ελεύθερη ανακοίνωση.
6. Kokolakis G, Krueger-Krasagakis S, Fecker L, Stockfleth E, Eberle J. Ambivalent effects of TNF alpha on apoptosis of normal vs. malignant human keratinocytes. *Experimental Dermatology* 2010 Feb;19(2):212. 37th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Berlin, Germany. Poster presentation
7. Kokolakis G, Philipp S, Tosca A, Krueger-Krasagakis S. Inversed expression pattern of pro- and anti-apoptotic proteins in the psoriatic plaques after infliximab treatment.

Experimental Dermatology 2010 Feb;19(2):176. 37th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Berlin, Germany. Poster presentation