

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXIX
2009
SUPPLEMENT 1**

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Aneta Szczerkowska-Dobosz

**ANALIZA KLINICZNA ŁUSZCZYCY
Z POCZĄTKIEM PO TRZYDZIESTYM ROKU ŻYCIA
ORAZ ZNACZENIE ZMODYFIKOWANEJ METODY
PCR DO OZNACZANIA ALLELU HLA-Cw*06
– WSKAŹNIKA GENETYCZNEGO
ZRÓŻNICOWANIA TEJ CHOROBY**

*Clinical study of psoriasis with an age of onset above 30 years
and the value of the modified PCR procedure
of typing of HLA-Cw*06 allele
– a marker of genetic heterogeneity of the disease*

Rozprawa habilitacyjna

Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii AM w Gdańsku
Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. med. Jadwiga Roszkiewicz

GDAŃSK 2009

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

REDAKTOR NACZELNY
EDITOR-IN-CHIEF
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
Z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Marek Latoszek
sekretarz redakcji – dr Włodzimierz Kuta,
prof. dr Andrzej Hellmann, prof. dr Józef Jordan, prof. AMG,
mgr Józefa de Laval, prof. dr Jerzy Łukasiak,
prof. dr Zbigniew Machaliński, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,
80-210 Gdańsk, Poland
e-mail: annaes@amg.gda.pl

Artykuły opublikowane w Annales AMG
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published in Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Akademia Medyczna w Gdańsku

*Pragnę podziękować
Pani Profesor Jadwidze Roszkiewicz
za życzliwe wsparcie
oraz Wszystkim, którzy przyczynili się
do powstania tej pracy*

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP.....	11
1.1. Epidemiologia łuszczycy	11
1.1.1. Łuszczyca wczesna i późna	11
1.2. Obraz kliniczny i naturalny przebieg łuszczycy	12
1.3. Patogeneza łuszczycy	13
1.3.1. Genetyczne uwarunkowania łuszczycy	15
1.3.1.1. Rodzinne występowanie łuszczycy	15
1.3.1.2. Badania bliźniąt	16
1.3.1.3. Antygeny zgodności tkankowej - markery podatności na łuszczycę.....	16
1.3.1.4. Struktura i funkcja antygenów zgodności tkankowej.....	17
1.3.1.5. Locus PSORS1.....	19
1.3.1.6. Występowanie allelu HLA-Cw*06 jako kryterium podziału łuszczycy i wskaźnika jej ciężkości.....	21
1.3.1.7. Znaczenie allelu HLA-Cw*06 w patogenezie łuszczycy	22
1.4. Zastosowanie metod molekularnych do oznaczania allelu HLA-Cw*06	23
1.4.1. Analiza PCR-RFLP	23
1.4.2. Analiza PCR-SSOP	24
1.4.3. Analiza PCR-SSP	24
2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	25
3. MATERIAŁ I METODY.....	27
3.1. Materiał	27
3.1.1. Populacja chorych	27
3.1.2. Populacja kontrolna.....	29
3.2. Metody.....	30
3.2.1. Kliniczna ocena chorych	30
3.2.1.1. Wywiad.....	30
3.2.1.2. Badanie przedmiotowe.....	30
3.2.2. Metody badań molekularnych	32
3.2.2.1. Izolacja DNA	32
3.2.2.2. Oznaczanie jakości DNA	33
3.2.2.3. Metody oznaczania alleli HLA-Cw.....	33
3.2.3. Metody statystyczne	38
4. WYNIKI.....	39
4.1. Analiza kliniczna 404 chorych z łuszczycą zwyczajną rozpoczynającą się powyżej trzydziestego roku życia.....	39
4.2. Opracowanie i ocena przydatności zoptymalizowanej techniki PCR-SSP i PCR-RFLP do przesiewowego oznaczania allelu HLA-Cw*06 u chorych na łuszczycę.....	53
4.3. Porównanie częstości występowania allelu HLA-Cw*06 oznaczonego przy użyciu zoptymalizowanej techniki PCR-SSP i PCR-RFLP u pacjentów z łuszczycą zwyczajną, chorych z <i>pustulosis palmo-plantaris</i> i pacjentów z łuszczycą kropelkową z częstościami występowania tego allelu w grupach kontrolnych.	58

4.4. Korelacja występowania allelu HLA–Cw*06 z wywiadem rodzinnym i z wybranymi klinicznymi cechami łuszczycy zwyczajnej z początkiem powyżej 30. roku życia.....	60
5. DYSKUSJA	63
6. PODSUMOWANIE	78
7. WNIOSKI	81
8. STRESZCZENIE	82
9. SUMMARY	85
10. PIŚMIENNICTWO	87
11. ZAŁĄCZNIK.....	105

OBJAŚNIENIE UŻYTYCH SKRÓTÓW

- A** – adenina (*adenine*)
- ASO** – odczyn antystreptolizynowy (*antistreptolysin titer*)
- BMI** – wskaźnik masy ciała (*body mass index*)
- bp** – para zasad (*base pair*)
- BSA** – powierzchnia ciała (*body surface area*)
- C** – cytozyna (*cytosine*)
- DNA** – kwas deoksyrybonukleinowy (*deoxyribonucleic acid*)
- dNTP** – trójfosforany dezoksynukleotydów (*deoxynucleotide triphosphate*)
- EDTA** – kwas etylenodwuaminoczteroocowy (*ethylenediaminetetraacetic acid*)
- G** – guanina (*guanine*)
- kb** – tysiąc par zasad (*kilo base*)
- HLA** – ludzkie antygeny leukocytarne (*human leukocyte antigens*)
- l.d.** – niezrównoważenie sprzężeń (*linkage disequilibrium*)
- locus** – miejsce genu na chromosomie (*locus*)
- lzs** – łuszczycowe zapalenie stawów (*psoriatic arthritis*)
- MHC** – główny kompleks układu zgodności tkankowej (*major histocompatibility complex*)
- PASI** – wskaźnik rozległości i ciężkości łuszczycy (*psoriasis area and severity index*)
- PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy (*polymerase chain reaction*)
- PCR-SSP** – metoda specyficznej sekwencji starterów (*sequence specific primers*)

- PGA** – ogólna ocena lekarska pacjentów (*Physician Global Assessment*)
- PPP** – krostkowica dłoni i stóp, łuszczyca krostkowa dłoni i stóp (*pustulosis palmo-plantaris*)
- PSORS** – *locus* podatności na łuszczycę (*Psoriasis Susceptibility Locus*)
- RFLP** – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (*restriction fragment length polymorphism*)
- rpm** – obroty na minutę (*revolution per minute*)
- SDS** – dodecylosiarczan sodu (*sodium dodecyl sulphate*)
- t** – symbol nukleotydu tyminy (*thymine*)
- TBE** – bufor Tris-boran-EDTA (*tris borate EDTA buffer*)
- TEMED** – N,N,N',N'-czterometyloetylenodwuamina (*N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamine*)
- Tris** – tris-(hydroksymetylo)-aminometan (*tris-(hydroxymethyl)-aminomethane*)
- u** – jednostka (*unit*)

1. WSTĘP

Łuszczyca jako odrębna jednostka chorobowa została po raz pierwszy opisana w 1808 roku przez angielskiego dermatologa Roberta Willana. Termin *psoriasis*, pochodzący od łacińskiego słowa *psora* – świąd opisujący znany do dzisiaj obraz choroby wprowadził Hebra 33 lata później.

Łuszczyca rzadko zagraża życiu, jednak stygmatyzacja dotkniętych nią osób oraz świadomość przewlekłego i jak dotąd nieuleczalnego charakteru schorzenia w istotny sposób obniża jakość życia chorych [45].

Pomimo olbrzymiego postępu w poznaniu patogenetyki łuszczycy przyczyna choroby nadal pozostaje nieznana.

1.1. Epidemiologia łuszczycy

Łuszczyca jest częstą chorobą skóry. Jej występowanie zależy m.in. od czynników geograficznych, etnicznych i rasowych. W krajach Europy północnej, Skandynawii, Ameryce północnej i Australii dermatozą tą dotyczy 1,5 do ok. 3% populacji [34, 57, 61, 123, 157, 178]. Łuszczyca występuje najczęściej u osób rasy kaukaskiej, rzadziej pochodzenia orientального, sporadycznie obserwowana jest w populacjach negroidalnych. Przyczyna tej zróżnicowanej częstości występowania choroby nie jest w pełni poznana, wydaje się być zależna zarówno od czynników genetycznych, jak i środowiskowych.

Łuszczyca występuje z podobną częstością u obu płci. Różnice obserwowane są jedynie w odniesieniu do wieku, w którym choroba się rozpoczyna [40, 57, 74, 85, 97, 157, 178, 190].

1.1.1. Łuszczyca wczesna i późna

Łuszczyca może rozpocząć się w każdym wieku jednak najczęściej, u ok. 85% chorych zaczyna się przed 30. rokiem życia. W większości badań epidemiologicznych analizujących duże populacje chorych stwierdzono istnienie jednego wyraźnego szczytu zachorowalności na łuszczycę w drugiej lub trzeciej dekadzie życia [17, 25, 41, 57, 74, 116, 121, 141, 161, 190, 200]. Dwa szczyty zachorowalności na tę chorobę zaobserwowali po raz pierwszy w 1965 roku Burch i Rowell [25], co zostało potwierdzone dwie dekady później przez badaczy niemieckich: Henselera i Christophersa [97].

Autorzy ci wysunęli hipotezę istnienia dwóch typów łuszczycy: z wczesnym, poniżej czterdziestego roku życia (typ I) i z późnym, powyżej czterdziestego roku życia początkiem choroby (typ II). Istotna różnica między obu typami łuszczycy dotyczyła korelacji z antygenami HLA oraz częstości rodzinnego występowania choroby. Tak zwaną łuszczycę sporadyczną, bez współwystępowania u krewnych, obserwowano najczęściej u osób z chorobą rozpoczynającą się w późniejszym wieku. Badania tych autorów, potwierdzone w następnych latach przez obserwacje innych uczonych, wykazały ponadto, że wiek, w którym rozpoczyna się łuszczyca jest parametrem, od którego zależy kliniczna ekspresja choroby. Łuszczyca pojawiająca się w młodym wieku charakteryzuje się cięższym przebiegiem i poważniejszym rokowaniem w porównaniu z łuszczycą późną [20, 61, 84, 85, 202, 203].

1.2. Obraz kliniczny i naturalny przebieg łuszczycy

Charakterystyczną cechą łuszczycy jest jej fenotypowa heterogenność. Klasyfikacja tej dermatozy, podobnie jak wielu innych schorzeń o wieloczynnikowym modelu dziedziczenia napotyka wiele trudności i budzi kontrowersje zarówno wśród klinicystów, jak i badaczy patogenezy tej choroby [80, 81, 113, 159, 189].

Najczęstszą postacią, występującą u ok. 90% chorych jest łuszczycyca plackowata [81]. W większości publikacji pod pojęciem łuszczycy rozumie się tę postać choroby [27, 80, 84, 124, 161]. Przewlekła łuszczycyca plackowata nie jest klinicznie jednorodna i obejmuje różne podtypy różniące się między sobą wieloma klinicznymi cechami, między innymi umiejscowieniem zmian na skórze, średnicą i grubością ognisk łuszczycowych, występowaniem zmian paznokciowych, rolą czynników środowiskowych w prowokacji wysiewów, a także przebiegiem choroby i podatnością na leczenie [33, 81, 113].

Klasyfikacja łuszczycy zaproponowana ostatnio przez International Psoriasis Council (IPC), organizację *non-profit*, której celem jest szeroko rozumiana edukacja i współpraca dermatologów i naukowców dotycząca tej dermatozy, upraszcza i porządkuje podział choroby [81]. Dzieli ona łuszczycę na formy zlokalizowane (*localized*), obejmujące postaci z predylekcją do zajmowania określonych anatomicznych rejonów ciała oraz rozległe (*widespread*), do których zaliczono uogólnioną postać przewlekłej łuszczycy plackowatej, erytrodermię łuszczycową, łuszczycę krostkową uogólnioną oraz łuszczycę kropelkową. Ta ostatnia postać występująca najczęściej u dzieci i młodych dorosłych jest szczególną formą choroby, wykazującą związek z paciorkowcową infekcją górnych dróg oddechowych. Wysiew drobnogrudkowych zmian poprzedzony infekcją paciorkowcową może wystąpić również u chorych z przewlekłą łuszczycą plackowatą (*guttate flare of chronic plaque psoriasis*) [159]. Najcięższe postaci choroby: erytrodermia łuszczycowa i uogólniona łuszczycyca krostkowa mogą powstać *de novo* lub stanowić powikłanie przewlekłej łuszczycy plackowatej.

Podział IPC nie uwzględnia krostkowicy dłoni i stóp (PPP, *pustulosis palmo-plantaris*). PPP w podręcznikowym podziale łuszczycy sklasyfikowana jest jako ograniczona do dłoni i stóp postać łuszczycy krostkowej. Za wspólną etiologią PPP i łuszczycy przemawia ich częste (24–30%) współistnienie oraz podobne cechy obrazu histopatologicznego [53]. Jednak odmienne od łuszczycy cechy demograficzne PPP, takie jak szczyt zachorowań między 30. a 50. rokiem życia, większa częstość występowania u kobiet niż u mężczyzn, wyraźny związek choroby z paleniem tytoniu, brak ewolucji w uogólnioną łuszczycę krostkową oraz odmienne od łuszczycy korelacje genetyczne wskazują, że PPP powinna być uznawana za odrębną jednostkę chorobową [1, 8, 13, 81, 93, 119, 143, 229].

Zgodnie z klasyfikacją IPC, każdej z klinicznych postaci łuszczycy przypisane są cechy świadczące o aktywności choroby. W łuszczycy niestabilnej – aktywnej zmiany stale powiększają się lub pojawiają się nowe, niewielkie ogniska, nie przekraczające średnicy 3 cm. W łuszczycy stabilnej – nieaktywnej ogniska tego samego rozmiaru, nawet bardzo rozległe, utrzymują się w tym samym miejscu przez długi okres czasu. Parametrem charakteryzującym aktywność łuszczycy i wykazującym korelację z jej ciężkością jest także grubość ognisk łuszczycowych [33].

Fenotypowe zróżnicowanie łuszczycy przejawia się również obserwowaną u wielu chorych tendencją do zmiany klinicznej formy choroby, na przykład przekształcenia

przewlekłej łuszczycy plackowatej w postaci zapalne: łuszczycę krostkową lub kropelkową, czy też ewolucję łuszczycy kropelkowej w przewlekłą łuszczycę plackowatą [119, 137].

Łuszczycza współistnieje z wieloma schorzeniami układowymi. U 5 do 42% chorych łuszczycy towarzyszy zapalenie stawów [112, 123, 243]. Łuszczycowe zapalenie stawów (łzs) jest obecnie uważane za artropatię o ciężkim przebiegu, w wielu przypadkach prowadzącą do inwalidztwa. Ta postać choroby często współistnieje z zajęciem przez łuszczycę płytek paznokciowych [81, 194, 237].

U chorych na łuszczycę wykazano ponadto zwiększone ryzyko zachorowania na inne przewlekłe schorzenia: cukrzycę, nadciśnienie tętnicze, zespół metaboliczny, depresję [79, 130, 147]. Badania ostatnich lat wskazują na związek ciężkiej łuszczycy z chorobami układu sercowo-naczyniowego [34, 79, 128, 147, 195]. Wykazano, że ryzyko zachorowania na łuszczycę rośnie wraz ze wzrostem wskaźnika masy ciała (BMI, *body mass index*), zaś u osób palących papierosy i nadużywających alkohol choroba ma cięższy przebieg [5, 98, 123, 156, 158].

Analogicznie do obrazu klinicznego naturalny przebieg choroby różni się u poszczególnych chorych. Według różnych doniesień u 25–50% pacjentów obserwuje się pełne remisje łuszczycy, trwające od kilku miesięcy do nawet kilkudziesięciu lat [57, 124]. Mimo podejmowania wielu prób korelacji niektórych biochemicznych markerów (białko C reaktywne, rozpuszczalne cząsteczki adhezyjne, rozpuszczalne receptory cytokin) z aktywnością i przebiegiem łuszczycy nie udało się, jak dotąd, potwierdzić ich znaczenia w monitorowaniu przebiegu choroby oraz w rokowaniu [34, 35, 119].

Kliniczne ujawnienie się łuszczycy zależy od dobrze poznanych czynników środowiskowych. Wśród nich najważniejszą rolę odgrywają urazy fizyczne, stres psychiczny, infekcje oraz niektóre leki [10, 142, 155, 230]. Obserwacje kliniczne wskazują na związek poszczególnych czynników prowokujących wysiewy łuszczycy z określonym fenotypem choroby, na przykład infekcji paciorkowcowej z wysiewem łuszczycy kropelkowej, silnego stresu psychicznego z pojawieniem się łuszczycy plackowatej czy też przerwania ogólnego leczenia kortykosteroidami z wysiewem łuszczycy krostkowej [84, 129].

1.3. Patogeneza łuszczycy

Przyczyna łuszczycy, pomimo niewątpliwego postępu nauk medycznych pozostaje nadal nieznana. Należy jednak podkreślić, że w ostatnich latach dzięki intensywnie prowadzonym badaniom, wiedza na temat patogenetycznych szlaków prowadzących do powstania blaszki łuszczycowej stale się poszerza.

Łuszczycza jest obecnie uważana za chorobę mediowaną przez limfocyty T [80, 83, 192]. O roli tych komórek w jej patogenezie świadczą pionierskie obserwacje z 1979 roku, które dowiodły skuteczności cyklosporyny A w leczeniu łuszczycy [148], a także najnowsze badania, wykazujące efektywność substancji swoicie reagujących z limfocytami T – białka fuzyjnego składającego się z toksyny dyfteryjnej i IL-2 oraz przeciwciał monoklonalnych CD4 [77, 162]. Kolejnym argumentem świadczącym o roli limfocytów T w patogenezie łuszczycy są obserwacje kliniczne zarówno chorych, u których łuszczycza ustąpiła po przeszczepieniu szpiku od zdrowego dawcy [44], jak i pacjentów z pierwszym wysiewem łuszczycy po przeszczepie szpiku pobranego od osoby cierpiącej na tę

dermatozę [73]. Innym dowodem przemawiającym za rolę limfocytów T w powstaniu choroby jest wystąpienie obrzęku skóry pobranej od chorych z łuszczycą i przeszczepionej myszom SCID (*severe combinent immunodeficient*) po podaniu im aktywowanych limfocytów T pochodzących od tych osób. Reakcji takiej nie obserwowano, jeśli aktywowane limfocyty i przeszczep pochodziły od zdrowych ochotników [239].

Kluczowe znaczenie w powstawaniu i podtrzymywaniu zmian łuszczycowych odgrywa aktywacja limfocytów Th1, które dominują we wczesnych i w pełni rozwiniętych zmianach skórnych [14, 146, 192]. Komórki te wspomagają odporność komórkową, aktywując limfocyty T cytotoksyczne i makrofagi. Limfocyty Th1 wytwarzają interleukinę 2 (IL-2), interleukinę 3 (IL-3), czynnik martwicy guza α i β (TNF- α i β), interleukinę 12 (IL-12) oraz interferon γ (IFN- γ).

Jedną z cytokin, odgrywających ważną rolę w patogenezie łuszczycy jest czynnik martwicy guza TNF- α , uwalniany przez keratynocyty, komórki dendrytyczne skóry, monocyty, makrofagi, komórki tuczne i aktywowane limfocyty T. TNF- α indukuje syntezę innych prozapalnych cytokin, pobudza ekspresję naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu, zwiększającego przepuszczalność naczyń i angiogenezę, pobudzając w ten sposób proliferację keratynocytów. Cytokina ta aktywuje także czynnik transkrypcji jądrowej NF kappa B (NF- κ B), co prowadzi do transkrypcji wielu genów cytokin, cząsteczek adhezyjnych ICAM, interleukiny 8 i innych. Wprowadzenie leków anti-TNF do leczenia łuszczycy potwierdza znaczenie czynnika martwicy guza w powstawaniu zmian łuszczycowych [47, 163].

IFN- γ produkowany przez limfocyty CD4+, CD8+ i plazmocytoidalne komórki dendrytyczne jest z kolei główną cytokiną odpowiedzialną za powstanie zmian w łuszczycy wczesnej. Wykazano m.in., że IFN- γ pobudza po wstrzyknięciu śródskórnym powstanie zmian łuszczycowych [62, 163].

W indukcji powstawania limfocytów Th1 uczestniczy interleukina 12 (IL-12), heterodimer składający się z podjednostek p35 i p40. Zbliżoną strukturalnie do IL-12 (o wspólnej z IL-12 podjednostce p40) jest interleukina 23 (IL-23). Na znaczenie tej interleukiny w patogenezie łuszczycy wskazują badania, wykazujące zwiększenie jej ekspresji w skórze łuszczycowej, zmniejszającej się pod wpływem leczenia przeciwłuszczycowego [173]. Klinicznym potwierdzeniem tych odkryć są obserwacje szybkiego ustępowania zmian łuszczycowych po podaniu przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko podjednostce p40 [110, 115]. Badania na modelach zwierzęcych wykazały ponadto, że podanie interleukiny 12 myszom powoduje powstanie nacieku składającego się głównie z komórek jednojądrzastych oraz znamiennej wzrost ekspresji IFN- γ podczas, gdy IL-23 indukowała naciek złożony z limfocytów CD4+, CD8+ i neutrofilów oraz wzrost wydzielania interleukiny 17 (IL-17) w skórze zwierząt [247]. IL-23 wydaje się odgrywać zasadniczą rolę w powstawaniu i proliferacji trzeciej populacji limfocytów T pomocniczych – limfocytów Th-17, wydzielających IL-17. Na podstawie badań na modelach zwierzęcych stwierdzono, że IL-17 stymuluje migrację neutrofilów z naczyń do naskórki, co przejawia się nagromadzeniem leukocytów obojętnochłonnych w warstwie podrogowej. IL-17 pobudza wytwarzanie przez keratynocyty, komórki śródbłonka, makrofagi i fibroblasty wielu cytokin, czynników wzrostu i innych związków, których stężenie zwiększa się w łuszczycy [247].

Mimo, że rola limfocytów T w patogenezie łuszczycy jest bezsporna, nadal nie jest znany czynnik lub zdarzenie, które wywołuje ich aktywację i przeciwko któremu skierowana jest odpowiedź zapalna. Wskazuje się na inicjującą rolę superantygenu paciorkowcowych, które przyłączając się bezpośrednio do cząsteczek MHC klasy II na komór-

kach prezentujących antygen (keratynocyty, komórki dendrytyczne) pobudzają poliklonalną proliferację limfocytów T, co prowadzi do uwalniania czynników prozapalnych, powodujących stymulację keratynocytów i łuszczycową proliferację [83, 175]. Za rolę superantygenów paciorkowcowych w patogenezie łuszczycy przemawiają kliniczne obserwacje chorych, u których usunięcie migdałków podniebiennych powodowało ustępowanie zmian łuszczycowych [83]. Białko M paciorkowca wykazuje podobieństwo do białka keratyny typu I [108, 140, 217], dlatego jedna z hipotez głosi, że aktywacja auto reaktywnych limfocytów T jest wynikiem molekularnej mimikry pomiędzy białkami paciorkowca, a białkami keratyny oraz że limfocyty T mogą kierować się bezpośrednio przeciwko antygenom keratynocytów (autoantygenów) na drodze reakcji krzyżowych [86]. Koncepcję udziału superantygenów paciorkowcowych w etiopatogenezie łuszczycy udało się potwierdzić przez wyizolowanie ze zmian skórnych swoistych limfocytów T wykazujących na swej powierzchni ekspresję części zmiennej łańcucha β receptora TCR. Receptor ten stanowi miejsce superantygenowozależnej aktywacji komórek T, głównie limfocytów subpopulacji CD8⁺ z następową produkcją cytokin prozapalnych. Wydaje się, że równie istotnym z punktu widzenia immunopatologii procesu łuszczycowego, a w szczególności pośredniego aktywowania limfocytów T, jest także ekspresja skórno antygeny związane z limfocytami (CLA, *cutaneous lymphocyte-associated antigen*) na powierzchni komórek T. Jego pobudzenie za pośrednictwem superantygenów może stanowić istotny mechanizm zwiększający przyleganie limfocytów do komórek śródbłonna naczyń i migracji limfocytów T z włosniczek do naskórka, indukując tym samym miejscowy proces zapalny [15, 21, 122].

1.3.1. Genetyczne uwarunkowania łuszczycy

Zgodnie z aktualną wiedzą łuszczycyca uważana jest za chorobę kompleksową, o wielogenowym i wieloczynnikowym modelu dziedziczenia [27, 48, 49, 96, 218].

Terminem chorób kompleksowych określa się schorzenia występujące rodzinnie i nieodpowiadające wzorcom oczekiwanym dla mendlowskiego sposobu dziedziczenia [16].

Określenie genetycznego podłoża wielu chorób kompleksowych, w tym łuszczycy, ze względu na fenotypową heterogenność tych schorzeń stanowi olbrzymie wyzwanie dla badaczy [6, 150, 225].

1.3.1.1. Rodzinne występowanie łuszczycy

Pierwsze doniesienie o dziedzicznym charakterze łuszczycy sięga 1809 roku, ale dopiero 150 lat później pionierskie badanie Gunarra Lomholda, którym objął 1/3 całej populacji Wysp Owczych dowiodło genetycznego uwarunkowania tej choroby. Badacz wykazał znamienne częstsze występowanie łuszczycy u osób spokrewnionych z chorymi na tę dermatozę, niż u krewnych osób zdrowych. Wniosek Lomholda, że: „ponad wszelką wątpliwość łuszczycyca jest uwarunkowana genetycznie” zapoczątkował erę badań zmierzających do identyfikacji genu/genów łuszczycowych [124].

Częstość rodzinnego występowania choroby waha się w różnych doniesieniach od 2 do 91% [4, 9, 43, 57, 97, 116, 164, 190]. Tę olbrzymią rozpiętość tłumaczy się

odmienną metodyką badań stosowaną w prowadzonych analizach epidemiologicznych [57]. Szacuje się, że ryzyko pojawienia się łuszczycy u osoby, u której choroba ta występuje w rodzinie wynosi 41% jeśli u obojga rodziców stwierdzono tę chorobę, 14% jeśli choruje tylko jedno z rodziców, zaś 6% jeśli łuszczycę stwierdzono tylko u jednego z rodzeństwa [9]. Łuszczycę rodzinną obserwuje się częściej u osób z chorobą rozpoznającą się w młodszym wieku [4, 20, 84, 97, 198, 202, 203].

1.3.1.2. *Badania bliźniąt*

Potwierdzeniem genetycznego uwarunkowania łuszczycy są obserwacje bliźniąt, wykazujące znamienne wyższy współczynnik zgodności (*concordance rate*) występowania choroby u bliźniąt monozygotycznych w porównaniu do bliźniąt dwuzygotycznych. W pionierskim, retrospektywnym badaniu Farbera i wsp., którym objęto 61 par bliźniąt wykazano, że współczynnik zgodności u bliźniąt jednojajowych wynosił 75% i był znamienne wyższy niż u bliźniąt dwujajowych (ok. 25%) [56]. Fakt, że współczynnik ten u bliźniąt monozygotycznych nigdy nie osiąga 100% potwierdza znaczenie innych, niż genetyczne uwarunkowań wpływających na ujawnienie się choroby [22, 42].

Wyniki obserwacji par bliźniaczych wskazują nie tylko na częstsze współistnienie łuszczycy u bliźniąt jednojajowych, ale dowodzą także, że łuszczycyca ma u nich podobne cechy kliniczne, takie jak wiek bliźniąt, w którym choroba pojawia się po raz pierwszy, morfologia wykwitów łuszczycowych, umiejscowienie zmian oraz jej przebieg i ciężkość [21, 75, 172].

1.3.1.3. *Antygeny zgodności tkankowej - markery podatności na łuszczycę*

W 1972 roku Russel i White niezależnie zaobserwowali, że antygeny zgodności tkankowej mogą stanowić genetyczny marker podatności na łuszczycę [182, 235]. Autorzy ci jako pierwsi opisali związek łuszczycy z antygenami HLA klasy I: HLA-B37 i B57. Badania prowadzone w kolejnych latach wśród etnicznie i rasowo odmiennych populacji dowiodły, że związek ten ma charakter wtórny do korelacji z antygenem HLA-Cw6 i związany jest z charakterystycznym dla regionu MHC zjawiskiem nielosowego sprzęgania się alleli w haplotypach (l.d., *linkage disequilibrium*) [106, 107, 210]. Większość doniesień, które ukazały się w kolejnych latach zgodnie wskazywała na antygen HLA-Cw6 jako genetyczny marker podatności na łuszczycę [43, 51, 101, 102, 125, 133, 134, 202].

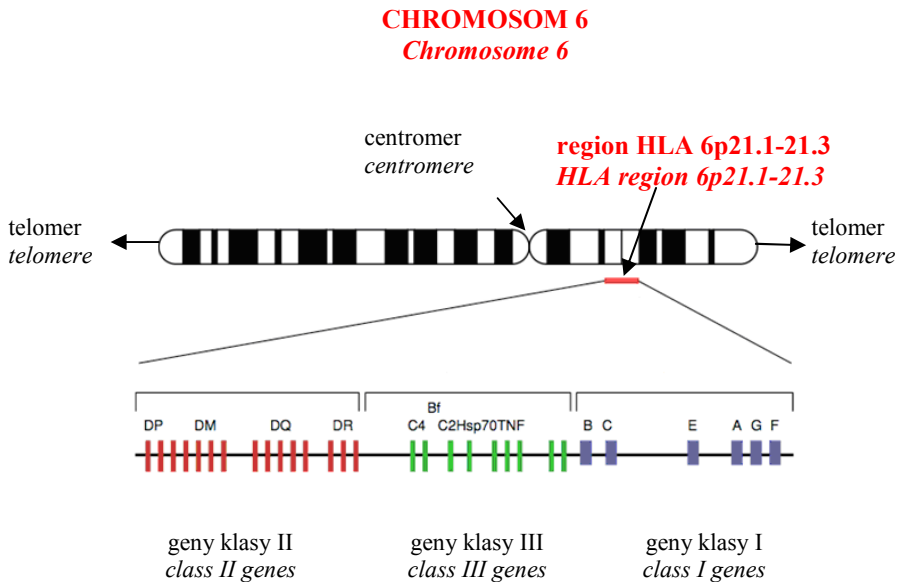
Początkowo antygen HLA-Cw6 oznaczano metodami serologicznymi. Na początku lat dziewięćdziesiątych do praktyki laboratoryjnej włączono techniki molekularne umożliwiające bezpośrednią identyfikację HLA Cw6 na poziomie sekwencji DNA.

W większości badań dotyczących populacji kaukazoidalnych allel HLA-Cw*06 występuje u 55 do 80 % chorych na łuszczycę, podczas gdy jego częstość w populacji zdrowej nie przekracza zazwyczaj 20% [43, 134, 176, 210]. Szacuje się, że ryzyko zachorowania na łuszczycę osób HLA-Cw*06 dodatnich jest do dziesięciu razy większe, w porównaniu do osobników bez allelu HLA-Cw*06 [32, 97, 202]. Wykazano ponadto, że u pacjentów homozygotycznych pod względem występowania allelu HLA-Cw*06

ryzyko zachorowania na łuszczycę jest 2,5 raza większe w porównaniu do osób heterozygotycznych [82].

1.3.1.4. Struktura i funkcja antygenów zgodności tkankowej.

Antygeny zgodności tkankowej HLA (*Human Leukocyte Antigens*) kodowane są przez geny MHC (*Major Histocompatibility Complex*, główny układ zgodności tkankowej) zlokalizowane na chromosomie szóstym w rejonie 6p21.3. Główny układ zgodności tkankowej stanowi zespół silnie sprzężonych ze sobą genów wykazujących kodominację (ryc. 1).



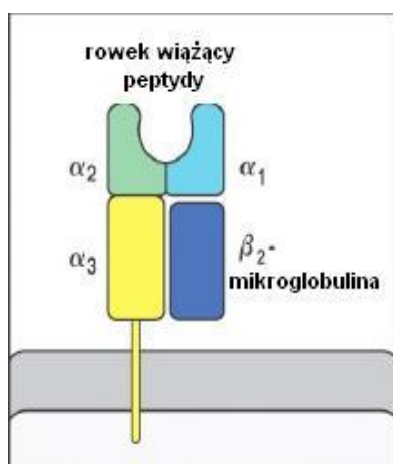
Ryc. 1. Uproszczony schemat kompleksu HLA

Fig. 1. Simplified map of the HLA complex

Cząsteczki HLA klasy I, tzw. klasyczne antygeny transplantacyjne, występują na powierzchni wszystkich komórek jądrowych. Są to glikoproteiny zbudowane z łańcucha ciężkiego α o wielkości 44 kDa warunkującego swoistość allotypową i połączonego z nim lekkiego łańcucha β –mikroglobuliny o masie 12 kDa. Łańcuch α zbudowany jest z trzech domen, z których dwie najbardziej oddalone od błony komórkowej: $\alpha 1$ i $\alpha 2$, mają budowę polimorficzną i tworzą rowek wiążący peptydy „prezentowane” następnie limfocytom T (ryc. 2). W ten sposób limfocytom CD8+ prezentowane są głównie antygeny produkowane wewnątrz komórki prezentującej, czyli tak zwane antygeny endogenne [76].

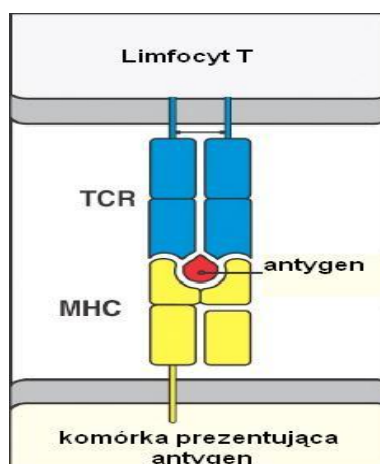
Cząsteczki HLA klasy II znajdują się głównie na powierzchni komórek prezentujących antygen (*Antigen Presenting Cell, APC*): limfocytach B, makrofagach, komórkach dendrytycznych [46]. W wyniku aktywacji lub oddziaływania niektórych cytokin na przykład interferonu γ (IFN- γ), mogą się one także pojawić na pobudzonych limfocytach T, komórkach śródbłonka, komórkach nabłonka tarczycy, fibroblastach czy keratynocytach. Antygeny klasy II są również glikoproteinami składającymi się z dwóch łańcuchów o podobnej budowie: ciężkiego β i lekkiego α o wielkości odpowiednio 34 i 29 kDa. Biorą one udział przede wszystkim w prezentacji limfocytom CD4+ antygenów pochłoniętych przez komórkę prezentującą [76].

Produkty genów klasy III obejmują wiele białek, między innymi składniki dopełniacza C2, C4, czynnik B properdyny, enzym 21-hydroksylazę steroidową.



Ryc. 2. Schemat budowy cząsteczki MHC klasy I

Fig. 2. HLA Class I structure



Ryc. 3. Schemat prezentacji antygeny przez cząsteczkę MHC klasy I limfocytom T

Fig. 3. MHC class I molecule presents peptides to T lymphocytes

Najważniejszą funkcją cząsteczek MHC jest wiązanie i prezentacja antygenów limfocytom T (ryc. 3). Wybitny polimorfizm genów układu HLA, który wytworzył się w efekcie naturalnej selekcji pod presją mikroorganizmów i wywoływanych przez nie chorób zapewnia możliwość wytwarzania różnych białek MHC, zdolnych do wiązania i prezentacji wielu różnych peptydów aktywowanym komórkom układu immunologicznego.

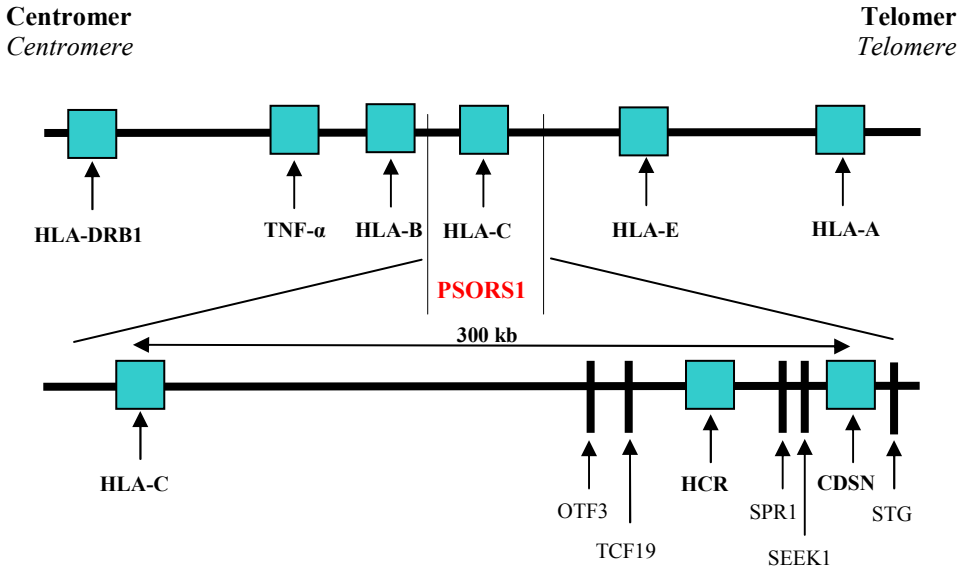
1.3.1.5. Locus PSORS1

Przeprowadzone w ostatnich latach badania analizy sprzężeń pozwoliły na identyfikację co najmniej 20 loci genowych odpowiedzialnych za podatność na łuszczycę w obrębie 15 różnych chromosomów autosomalnych. Znaczenie dziewięciu z nich potwierdzono w badaniach dotyczących odmiennych populacji. Loci te opisano jako PSORS1–PSORS9 (*Psoriasis Susceptibility Locus 1-9*) (tab. 1).

Tab.1. Lokalizacja zidentyfikowanych loci podatności na łuszczycę (PSORS 1–9)
 Tab. 1. Localization of identified psoriasis susceptibility loci (PSORS 1–9)

PSORS	Lokalizacja <i>Localization</i>	Piśmiennictwo <i>References</i>
PSORS1	6q21.3	[26,152,214]
PSORS2	17q25	[211]
PSORS3	4q34	[139]
PSORS4	1q21	[29]
PSORS5	3q21	[54]
PSORS6	19p13.2	[121]
PSORS7	1p35-p34	[223]
PSORS8	16q	[152]
PSORS9	4q31	[245, 246]

Szczególne znaczenie w powstawaniu łuszczycy przypisywane jest rejonowi MHC na chromosomie szóstym w rejonie 6p21.3. Wyniki kilku niezależnych badań wskazują, że właśnie w tym obszarze lokalizuje się główne locus podatności na łuszczycę oznaczone jako PSORS1 (ryc. 4) [26, 29, 152, 154, 224]. Szacuje się, że gen/geny podatności na łuszczycę, zlokalizowane w obrębie PSORS1 odpowiadają za 35–50% genetycznej predyspozycji do łuszczycy [214].



Ryc. 4. Locus podatności na łuszczycę (PSORS1) na chromosomie 6p21.3. Zaznaczona lokalizacja niektórych genów PSORS1

Fig. 4. Psoriasis susceptibility locus 1 (PSORS1) on 6p21.3 chromosom. Some PSORS1 genes marked

Od 1999 roku, kiedy to opisano pełną sekwencję genów całego regionu MHC podejmowane są próby określenia różnie definiowanych regionów wysokiego ryzyka zachorowania na łuszczycę. W populacji kaukazyjskiej badania te utrudnione są zjawiskiem niezrównoważenia sprzężeń (l.d.) [107, 168]. Dzięki scharakteryzowaniu przez *HapMap Project* wzorców nielosowego sprzęgania się alleli w haplotypach w obrębie całego genomu ustalono, że rejon zlokalizowany telomerycznie w stosunku do HLA-C charakteryzuje się zmniejszoną o 2,3 raza częstością rekombinacji w stosunku do całego genomu [227]. Rejon ten obejmuje ok. 300 kb od genu korneodesmozyny (CDSN, *corneodesmosin*) do HLA-C (ryc. 4). W jego obrębie zidentyfikowano co najmniej 10 innych niż HLA-C genów położonych telomerycznie w stosunku do tego locus: HCR, CDSN, POU5F1, TCF19, HCG 27, PSORS1C3, PSORS1C2 (SPR1), PSORS1C1 (SEEK1), STG. Częstość zjawiska l.d. w obrębie rejonu MHC powoduje, że wiele z tych genów wykazuje silną korelację z łuszczycą [94, 100].

Sz szczególnie interesującym, ze względu na pełnione funkcje genem kandydującym w obrębie PSORS1, jest gen korneodesmozyny, określany uprzednio jako gen S [2, 13, 30, 107, 138, 168, 223]. Zlokalizowany jest on telomerycznie w odległości 160 kb w stosunku do locus HLA-C [2, 208]. Gen ten charakteryzuje się dużym polimorfizmem i koduje glikoproteinę ulegającą ekspresji w obrębie warstwy ziarnistej naskórka w późnych fazach terminalnego różnicowania się keratynocytów. Białko to odpowiada za przyleganie tych komórek. Strukturalne zmiany w skórze prowadzące do nieprawidłowego złuszczenia, będącego jedną z cech łuszczyicy mogą wskazywać, że gen CDSN może być jednym z potencjalnych, funkcjonalnych genów odpowiedzialnych za powstanie choroby. Wykazano asocjację z łuszczycą rzadkiego wariantu określanego jako allel

CDSN*5 [2, 168, 208], co jednak nie zostało potwierdzone w innych badaniach [52, 181].

Opublikowane w 2006 roku wyniki szeroko zakrojonych wielośrodkowych badań Naira i wsp., pozwoliły wykluczyć rolę innych niż HLA-C i CDSN genów PSORS1, zaś typowanie genu CDSN i HLA-C oraz dodatkowych genetycznych markerów zlokalizowanych między loci CDSN i HLA-C wskazały na HLA-Cw*06 jako główny allel podatności na łuszczycę w obrębie PSORS1 [153].

1.3.1.6. Występowanie allelu HLA-Cw*06 jako kryterium podziału łuszczycy i wskaźnika jej ciężkości

W ostatniej dekadzie ukazało się wiele prac jednoznacznie potwierdzających korelację występowania allelu HLA-Cw*06 z łuszczycą rozpoczynającą się w młodym wieku [52, 82, 84, 101, 102, 103, 132, 134, 135, 203], w tym doniesienia dotyczące populacji polskiej pochodzącej z regionu Dolnego Śląska [125] oraz z Polski Północnej [202]. Za rolę HLA-Cw*06 we wczesnym ujawnieniu się choroby przemawiają także badania rodzeństwa osób chorujących na łuszczycę. Wykazały one, że u rodzeństwa, u którego występuje allel HLA-Cw*06, łuszczycy rozpoczyna się wcześniej niż u rodzeństwa bez tego allelu [50].

Obserwacja, że w im późniejszym wieku choroba się rozpoczyna tym znaczenie HLA-Cw*06 maleje, opiera się na nielicznych doniesieniach dotyczących małych populacji chorych na łuszczycę późną. Henseler i Christophers wykazali brak różnic w częstościach HLA-Cw6 u chorych z początkiem choroby powyżej 40. roku życia i w populacji zdrowej i przyjęli obecność tego antygeny za jedno z kryteriów cytowanego powyżej podziału łuszczycy na typ I-Cw6 dodatni i typ II-Cw6 ujemny [97].

Najliczniejszą jak dotąd populację chorych z łuszczycą późną analizował pod względem korelacji z genami HLA-Cw*06, CDSN, HCR Allen i wsp.[3]. Badacz ten wykazał, że *locus* PSORS1 nie jest czynnikiem ryzyka łuszczycy rozpoczynającej się po pięćdziesiątym roku życia.

W swoim klasycznym badaniu Henseler i Christophers dowiedli, że u chorych HLA-Cw6 dodatnich łuszczycy ma cięższy przebieg i większą skłonność do nawrotów w porównaniu do chorych bez tego allelu [97]. Obserwację tę potwierdzono w nielicznych doniesieniach dotyczących innych populacji, w tym w badaniach własnych przeprowadzonych wśród chorych pochodzących z Polski Północnej [203].

Jednoznacznym potwierdzeniem wpływu występowania allelu HLA-Cw*06 na kliniczny obraz choroby były badania Gudjonssona w największej, jak dotąd, populacji chorych na łuszczycę (1008 osób pochodzących z Islandii). Ujawniły one, że u chorych HLA-Cw*06 dodatnich łuszczycy ma nie tylko wcześniejszy, niż u chorych bez tego allelu początek choroby (7,5 vs 24 lata), ale także cięższy i bardziej dynamiczny przebieg, wykazuje większą tendencję do powstawania zmian w miejscu urazu fizycznego i korzystniej reaguje na światło słoneczne. W tej grupie chorych również częściej obserwowano występowanie zapalenia stawów i łuszczycy paznokci w porównaniu do chorych HLA-Cw*06 ujemnych. Inna interesująca obserwacja autorów dotycząca ciężarnych pacjentek HLA-Cw*06 dodatnich wykazała częstsze remisje choroby w tej grupie chorych, w porównaniu do chorych w ciąży bez tego allelu, co nie było jak dotąd potwierdzone w innych doniesieniach [84].

Ważną obserwacją kliniczną wiążącą się z patogenezą choroby było stwierdzenie, że u chorych z allelem HLA–Cw*06, częściej niż u pacjentów bez HLA–Cw*06 dochodzi do wysiewu łuszczycy kropelkowej poprzedzonej paciorkowcową infekcją górnych dróg oddechowych. Wynik ten był zgodny z wcześniejszymi doniesieniami poczynionymi w oparciu o znacznie mniej liczne populacje chorych z tą formą choroby [13]. Badania te wykazały szczególnie wysoką częstość występowania allelu HLA–Cw*06 w łuszczycy kropelkowej, dotyczącą 86% [210], a nawet, w jednym z doniesień 100% chorych [135].

Związek antygeny HLA–Cw6 z *pustulosis palmo-plantaris* był przedmiotem tylko nielicznych badań prowadzonych w latach osiemdziesiątych, które nie wykazały ich wzajemnej korelacji. Dwadzieścia lat później obserwacje te potwierdziły wyniki jedynej analizy opartej na molekularnym typowaniu HLA–Cw*06 w PPP, przemawiająca za genetyczną odrębnością tej jednostki chorobowej od łuszczycy [13].

Najnowsze doniesienia wskazują na znaczenie HLA–Cw*06 w doborze chorych do leczenia biologicznego. Dowiedziono, że skuteczność terapii łuszczycy efalizumabem jest zależna od występowania tego allelu. W przeprowadzonych badaniach redukcję wskaźnika PASI o 75% po 12 tygodniach terapii tym lekiem uzyskiwano u 35% chorych HLA–Cw*06 dodatnich, w porównaniu do 17% chorych bez tego allelu. Te wstępne obserwacje, wymagające potwierdzenia na bardziej licznych populacjach chorych wskazują na znaczenie allelu HLA–Cw*06 jako potencjalnego markera odpowiedzi na leczenie biologiczne [37, 87].

1.3.1.7. Znaczenie allelu HLA–Cw*06 w patogenezie łuszczycy

Do niedawna funkcja HLA–C w porównaniu do innych produktów genów MHC była mniej poznana. Niedoceniane znaczenie HLA–C w medycynie klinicznej wynikało między innymi z trudności interpretacyjnych wyników oznaczeń serologicznych stosowanych przed erą badań molekularnych.

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie badaczy tym miejscem genomu. Udowodniono między innymi, że *locus* HLA-C, oprócz związku z chorobami o podłożu immunologicznym, pełni ważną funkcję w transplantologii [120, 151, 213]. Wykazano także, że HLA–C bierze udział w reakcjach immunologicznych związanych z infekcjami wirusowymi: cząsteczka HLA Cw7 w prezentacji cytotoksycznym limfocytom CD8+ wirusa EBV (CTL) [191], zaś HLA Cw8 i Cw4 w prezentacji białek HIV-1 [133].

Główna hipoteza dotycząca bezpośredniej roli HLA–C w patogenezie łuszczycy opiera się na zdolności tej cząsteczki do prezentowania antygenów, wykazujących podobieństwo i reakcje krzyżowe z antygenami keratyny 17 limfocytom CD8+ [83]. Mechanizm ten wydaje się odgrywać szczególną rolę w łuszczycy kropelkowej wywoływanej przez paciorkowcowe zapalenie gardła i wykazującej silną korelację z allelem HLA–Cw*06.

Za rolę HLA–Cw*06 w powstawaniu łuszczycy kropelkowej przemawiają wyniki badań Johnsona i wsp. [108]. Badacze ci wykazali, że limfocyty T w skórze pochodzącej od chorych HLA–Cw*06 dodatnich z aktywną łuszczycą, wykazują silniejszą odpowiedź na wspólne dla keratyny 17 i białka M- paciorkowców peptydy, niż limfocyty pochodzące od chorych bez allelu HLA–Cw*06.

Inną z postulowanych funkcji HLA-Cw*06 jest regulacja naturalnych komórek cytotoksycznych (NK) poprzez interakcje z ich immunoglobulinopodobnymi receptorami (KIR, *killer immunoglobulin – like receptor*). Cząsteczka HLA-Cw6 jest ligandem dla receptorów KIR2DL1 i KIR2DS1 z rodziny KIR. Białka KIR są kodowane przez geny KIR na chromosomie 19 w regionie 19q13.4. Badania wykazały korelację genu KIR2DS1 z łuszczycą i z łuszczycowym zapaleniem stawów co sugeruje, że specyficzny model komunikacji pomiędzy receptorami KIR i HLA-C może odgrywać znaczącą rolę w zmienionej reaktywności immunologicznej charakteryzującej łuszczycę [126, 236].

Niezależne badania dwóch grup badawczych wykazały także związek łuszczycy z charakterystyczną sekwencją aminokwasów cząsteczki HLA-Cw6 [11, 101]. W badanych populacjach chorych na łuszczycę wykazano zwiększoną częstość alaniny w pozycji 73 (Ala-73). Aminokwas ten zlokalizowany jest w obrębie alfa 1 domeny cząsteczki HLA-C, tworzącej rowek wiążący antygeny. Jednak badania prowadzone w kolejnych latach zweryfikowały hipotezę o roli Ala-73 w powstaniu łuszczycy. Wykazały one, że zwiększona częstość Ala-73 dotyczy również innych cząsteczek HLA-C [132, 180].

1.4. Zastosowanie metod molekularnych do oznaczania allelu HLA-Cw*06

Techniki molekularne wykorzystujące reakcję łańcuchową polimerazy (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) szeroko wprowadzone do praktyki laboratoryjnej w ostatnich latach znacznie ułatwiły badanie polimorfizmu genetycznego w obrębie locus HLA-C i przyczyniły się do rozwoju prostych i szybkich metod bezpośredniej identyfikacji HLA-C na poziomie genów [46].

Wśród metod opartych na reakcji PCR do oznaczania alleli HLA-C najczęściej wykorzystuje się następujące techniki:

- analizę restrykcyjną produktu amplifikacji – PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) [207]
- hybrydyzację z alleloswoistymi sondami – PCR-SSOP (*Sequence Specific Oligonucleotides Probes*) [23].
- metodę specyficznej sekwencji starterów – PCR-SSP (*Sequence Specific Primers*) [24]

Zastosowanie tych technik w typowaniu antygenów HLA umożliwiło identyfikację 276 alleli locus HLA-C i znacznie przyczyniło się do poszerzenia wiedzy na temat ich funkcji biologicznej [179].

1.4.1. Analiza PCR-RFLP

Pierwszą z technik analizy DNA, zastosowaną do badań alleli HLA, była metoda oparta na analizie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP*). Jest to technika pracochłonna, wymagająca dużej ilości genomowego DNA, przy czym umożliwia zidentyfikowanie tylko niektórych alleli [105].

Technika PCR-RFLP polega na amplifikacji fragmentu DNA, w obrębie którego występuje badany marker, a następnie jego trawieniu odpowiednim enzymem restryk-

cyjnym. Produkty trawienia poddaje się rozdzielaniu elektroforetycznemu na żelu poliakrylamidowym i po wybarwieniu identyfikuje się specyficzne allele [207]. Zastosowanie reakcji łańcuchowej polimerazy spowodowało, że stosunkowo duża ilość wysokocząsteczkowego DNA, wymagana w technice RFLP, mogła być znacząco zminimalizowana w metodzie PCR-RFLP.

1.4.2. Analiza PCR–SSOP

W technice hybrydyzacji z alleloswoistymi sondami (PCR-SSOP) region HLA poddawany jest amplifikacji, a następnie łączeniu z komplementarnymi sondami molekularnymi swoistymi dla poszczególnych alleli [23].

1.4.3. Analiza PCR–SSP

Metoda specyficznej sekwencji starterów-PCR–SSP (*Sequence Specific Primers*) jest obecnie jedną z najczęściej stosowanych technik identyfikacji alleli locus HLA–C. Polega ona na wykorzystaniu wysoce specyficznych starterów, posiadających na końcu 3' nukleotydy komplementarne do matrycowego DNA, które w obecności enzymu polimerazy *Taq* zapoczątkowują proces namnażania wybranych jego fragmentów. Identyfikacja poszczególnych alleli polega na stwierdzeniu obecności lub braku produktu amplifikacji po rozdzielaniu elektroforetycznym w żelu agarozowym [24].

Do określania alleli HLA-C metodą PCR-SSP wykorzystuje się komercyjny zestaw, który pozwala wprowadzić na niezawodne i szybkie typowanie alleli z pojedynczych próbek DNA, ma jednak zdecydowanie mniejszą przydatność w analizach dużej liczny próbek [46, 144]. Ograniczeniem w jego stosowaniu mogą być również wysokie koszty badań.

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Postęp badań nad patogenезą łuszczycy znacznie przybliżył perspektywę poznania przyczyny tej częstej dermatozy. W ostatnich latach opisano wiele mechanizmów prowadzących do powstania blaszki łuszczycowej, a także zidentyfikowano liczne *loci* na wielu chromosomach, wykazujące różny stopień korelacji z chorobą. Intensywnie prowadzone badania genetyczne pozwoliły zawęzić region najwyższego ryzyka rozwoju łuszczycy do odcinka PSORS1 w obrębie chromosomu szóstego i wskazać na HLA-Cw*06 jako główny allel odpowiedzialny za powstanie tej choroby [100, 153].

Znaczącym utrudnieniem prowadzonych analiz jest kliniczna heterogenność łuszczycy oraz wpływ różnych czynników środowiskowych na jej przebieg. Z tego powodu istotnym warunkiem dalszego postępu badań jest kliniczne wyodrębnienie i zdefiniowanie różnych postaci tej choroby [3, 109, 153, 169, 188, 212].

Jak dotąd, większość publikacji dotyczy łuszczycy rozpoczynającej się w młodym wieku [4, 43, 50, 88, 101, 102, 116, 160, 174, 198, 246]. Ta postać często występuje rodzinnie i wykazuje korelacje z allelem HLA-Cw*06. Znacznie mniej wiadomo na temat łuszczycy późnej, między innymi z tego powodu, że dotyczy ona zaledwie 10–20% chorych [16, 238].

Nieliczne doniesienia, oparte o mało liczebne grupy chorych wskazują na kliniczną odrębność łuszczycy późnej i sugerują, że ma ona częściej, niż łuszczycy wczesna sporadyczny charakter, zaś u osób z początkiem choroby powyżej pięćdziesiątego roku życia nie wykazuje korelacji z allelem HLA-Cw*06 [3, 61, 84]. W piśmiennictwie polskim brak doniesień na ten temat.

Z dotychczasowych badań wynika, że występowanie allelu HLA-Cw*06 stanowi ważne kryterium definiowania różnych postaci łuszczycy i potwierdzenia lub wykluczenia ich genetycznego związku [13, 84, 135]. Najnowsze obserwacje dowodzą również, że występowanie tego allelu odgrywa rolę w podatności chorych na leczenie biologiczne [37, 87]. Sugeruje się zatem, aby allel HLA-Cw*06 był oznaczany u wszystkich chorych kwalifikowanych do dalszych immunogenetycznych i klinicznych badań, a także by jego typowanie włączono do rutynowej diagnostyki łuszczycy. Wysokie koszty komercyjnych zestawów, stosowanych do oznaczania HLA-Cw*06, ograniczają ich zastosowanie do przesiewowego oznaczania tego allelu [144].

Powyższe przesłanki były powodem podjęcia badań, których celem było:

1. Charakterystyka obrazu klinicznego łuszczycy rozpoczynającej się po trzydziestym roku życia.
2. Ocena zależności obrazu klinicznego łuszczycy rozpoczynającej się po trzydziestym roku życia od wieku, w którym rozpoczęła się choroba.

3. Określenie prognostycznych czynników rozwoju łuszczycy ciężkiej w populacji chorych z początkiem choroby powyżej trzydziestego roku życia.
4. Opracowanie i ocena przydatności zoptymalizowanej techniki PCR–SSP i PCR–RFLP do przesiewowego oznaczania allelu HLA–Cw*06 u chorych na łuszczycę.
5. Ocena korelacji występowania allelu HLA–Cw*06, typowanego z zastosowaniem ww. metody z wiekiem, w którym rozpoczęła się łuszczycyca w populacji chorych z początkiem łuszczycy powyżej 30. roku życia.
6. Ocena korelacji występowania allelu HLA–Cw*06 oznaczanego ww. techniką z *pustulosis palmo-plantaris* i łuszczycą kropelkową.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

3.1.1. Populacja chorych

Ocenie klinicznej poddano 404 niespokrewnionych chorych na łuszczycę zwyczajną. Wśród badanych było 206 kobiet i 198 mężczyzn w wieku od 32 do 90 lat (średni wiek chorych $58,8 \pm 11,9$ lat, kobiety: $60,3 \pm 11,4$ lat, mężczyźni: $57,3 \pm 12,3$ lat). Dane demograficzne badanej populacji chorych poddanej analizie klinicznej przedstawiono w tabeli 2. Rozkład liczebności chorych w poszczególnych dekadach według wieku chorych przedstawia ryc. 5.

Za kryterium włączenia do badań klinicznych przyjęto łuszczycę, która rozpoczęła się powyżej trzydziestego roku życia. Średni wiek chorych, w którym rozpoczęła się choroba wynosił $49,8 \pm 12,9$ lat (kobiety: $52,0 \pm 12,8$ lat, mężczyźni: $47,6 \pm 12,6$ lat). Średni czas trwania łuszczycy wynosił $9,0 \pm 8,9$ lat. Za początek łuszczycy uznawano wiek pacjenta, w którym na skórze pojawiły się po raz pierwszy w życiu zmiany charakterystyczne dla tej choroby. U 385 chorych pierwszy wysiew łuszczycy był rozpoznany przez dermatologa. U 19 osób pojawienie się zmian łuszczycowych po raz pierwszy nie było potwierdzone przez lekarza, jednak w retrospektywnej ocenie pacjentów zmiany odpowiadały wykwitom łuszczycowym.

Warunkiem zakwalifikowania chorych do badań było stwierdzenie zmian łuszczycowych na skórze gładkiej. Do badanej populacji włączono również pacjentów z potwierdzonym przez lekarza reumatologa łuszczycowym zapaleniem stawów (zgodnie z obowiązującymi kryteriami rozpoznania łs) z obecnymi w trakcie badania kwalifikującego zmianami łuszczycowymi.

Z grupy badanej wykluczono chorych z wątpliwym rozpoznaniem łuszczycy, pacjentów ze zmianami łuszczycowymi występującymi tylko na skórze owłosionej głowy oraz osoby, u których choroba zajmowała jedynie płytki paznokciowe.

Do grupy poddanej klinicznej analizie nie włączono chorych ze zmianami krostkowymi ograniczonymi do dłoni i stóp (*pustulosis palmo-plantaris*, PPP) oraz pacjentów z pierwszym wysiewem łuszczycy występującym pod postacią erytrodermii.

U 383 osób z 404 analizowanych klinicznie chorych z łuszczycą zwyczajną oznaczano allel HLA–Cw*06 (tab. 3).

Dodatkowo allel ten oznaczano u 30. chorych z *pustulosis palmo-plantaris*. W tej grupie badanych znajdowało się 9 mężczyzn i 21 kobiet w wieku od 30. do 74. lat (średni wiek chorych: $53 \pm 10,8$ lat), u których choroba rozpoczęła się pomiędzy 30. a 67. rokiem życia (średni wiek początku PPP: $48,3 \pm 9,3$ lat). U żadnej z tych osób nie stwierdzono cech łuszczycy zwyczajnej; negatywny był także wywiad rodzinny w kierunku łuszczycy.

Allel Cw*06 oznaczono również u 25 osób z łuszczycą kropelkową. Wśród tych chorych było 16 osób płci żeńskiej i 9 chorych płci męskiej w wieku od 7. do 48. lat (średni wiek chorych: $29,9 \pm 18,9$ lat) (tab. 3). U 5. osób łuszczycy kropelkowej stanowiła pierwszą w życiu manifestację łuszczycy.

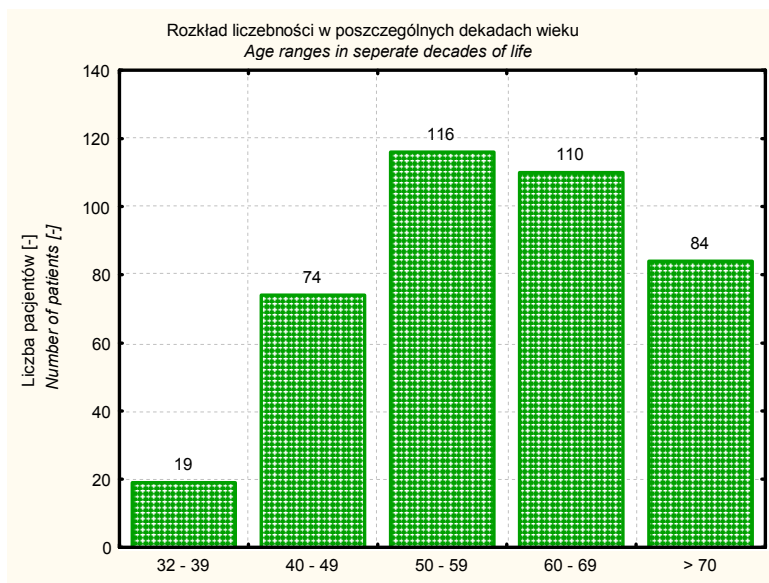
Badania, rozpoczęte w 2005 roku objęły pacjentów hospitalizowanych w Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Akademii Medycznej w Gdańsku (65 chorych) oraz chorych leczonych w Przyklinicznej Poradni Dermatologicznej w latach 2005–2007

(155 osób). Pozostałą grupę (239 osób) stanowili pacjenci poradni dermatologicznych Województwa Pomorskiego, Oddziału Dermatologii Pomorskiego Centrum Traumatologii w Gdańsku oraz chorzy, członkowie działającego przy tym oddziale Pomorskiego Stowarzyszenia Chorych na łuszczycę.

Tab. 2. Dane demograficzne populacji chorych z łuszczycą zwyczajną rozpoczynającą się po trzydziestym roku życia poddanej klinicznej ocenie (n=404)

Tab. 2. Demographic data of clinically evaluated psoriasis vulgaris patients with age of onset > 30 y (n=404)

Parametr/Parameter	Kobiety Females	Mężczyźni Males	Ogółem Total
Wiek (lata) Age (years)	60,3±11.4	57,3 ±12.3	58,8±11,9
Wiek, w którym rozpoczęła się łuszczycyca (lata) Age of onset (years)	52,0±12,8	47,6 ±12,6	49,8±12,9
Czas trwania łuszczycy (lata) Duration of psoriasis (years)	8,3 ±9,2	9,7 ±8,8	9,0 ±8,9



Ryc. 5. Rozkład wieku chorych z łuszczycą zwyczajną poddanych analizie klinicznej (n=404)

Fig. 5. Age ranges of clinically evaluated patients with psoriasis vulgaris at time of study (n=404)

Tab. 3. Populacje chorych oraz populacje kontrolne, w których oznaczano allel HLA–Cw*06
 Tab. 3. HLA- Cw*06 typed patients and controls

Chorzy/Patients						Grupa kontrolna Controls		
Grupy chorych Groups of patients	n	Wiek / Age		Średni wiek początku łuszczycy Mean age of onset		n	Średni wiek grupy kontrolnej Mean age of controls	
		\bar{x}	SD	\bar{x}	SD		\bar{x}	SD
Łuszczyca zwyczajna z początkiem >30 r.ż. <i>Psoriasis vulgaris with the age of onset >30 y</i>	383	58,8	11,9	49,8	12,9	143	57,4	16,7
Pustulozis palmo- plantaris / <i>Pustulosis palmo-plantaris</i>	30	53,0	10,8	48,3	9,3	114	56,4	16,3
Łuszczyca kropelkowata / <i>Guttate psoriasis</i>	25	29,9	18,9	23,0	16,6	69	32,4	11,6

3.1.2. Populacja kontrolna

Populację kontrolną do porównania częstości występowania allelu HLA–Cw*06 z:

1. częstościami HLA–Cw*06 u chorych z łuszczycą zwyczajną stanowiło 143 niespokrewnionych osób w wieku od 30 do 89 lat (średni wiek: 57,4±16,7 lat)
2. częstościami HLA–Cw*06 u chorych z *pustulosis palmo-plantaris* stanowiło 114 niespokrewnionych osób w wieku od 30 do 89 lat (średni wiek 56,4±16,3 lat)
3. częstościami HLA–Cw*06 u chorych z łuszczycą kropelkową stanowiło 69 niespokrewnionych osób w wieku od 7 do 50 lat (średni wiek 32,4±11,6 lat)

Grupy kontrolne nie różniły się pod względem grup badanych płcią i rozkładem wieku.

Od osób tych zbierano szczegółowy wywiad osobniczy i rodzinny dotyczący występowania chorób skóry. Osoby ze zmianami na skórze budzącymi podejrzenie łuszczycy, a także z dodatnim lub niepewnym wywiadem osobniczym i rodzinnym w kierunku tej dermatozy nie były kwalifikowane do grup kontrolnych.

Populacje badane i kontrolne pochodziły z tego samego regionu Polski Północnej.

Chorzy oraz osoby z grup kontrolnych wyraziły pisemną zgodę na udział w niniejszym badaniu.

Badanie uzyskało zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej Akademii Medycznej w Gdańsku (NKEBN/789/2005).

3.2. Metody

3.2.1. *Kliniczna ocena chorych*

3.2.1.1. *Wywiad*

Od każdego pacjenta zbierano szczegółowy wywiad (dane umieszczano w załączonej ankiecie, załącznik) uwzględniający następujące parametry: wiek, waga, wzrost, wiek, w którym rozpoczęła się łuszczyca, postać łuszczycy w trakcie pierwszego wysiewu, dane dotyczące przebiegu łuszczycy.

Za ciągły przebieg choroby przyjęto brak skłonności do pełnych remisji łuszczycy lub do występowania minimalnych zmian łuszczycowych. Za minimalne zmiany łuszczycowe przyjmowano brak wykwitów łuszczycowych na skórze gładkiej i/lub skórze owłosionej głowy i/lub paznokciach lub występowanie niewielkiego uniesienia zmian łuszczycowych o białawym, dyskretnym złuszczeniu powierzchni lub/i mało nasilonym rumieniu (odpowiadające minimalnym zmianom w statycznej ogólnej lekarskiej ocenie stanu pacjenta (*sPGA, static Physician Global Assessment*)).

Ponadto ocenie poddano występowanie świądu skóry w przebiegu łuszczycy, ogólne leczenie łuszczycy, wywiad rodzinny dotyczący łuszczycy uwzględniający pokrewieństwo pierwszego stopnia (rodzice, rodzeństwo, dzieci), drugiego stopnia (babcia, dziadek, wnukowie, rodzeństwo rodziców) oraz trzeciego stopnia (kuzyni). W klinicznej ocenie chorych uwzględniano także znaczenie infekcji, rolę sytuacji życiowych powodujących silny stres psychiczny, leków, urazów fizycznych w prowokacji pierwszego i kolejnych wysiewów łuszczycy.

Infekcję definiowano jako ostre objawy wymagające antybiotykoterapii ogólnej lub ogólnego leczenia przeciwwirusowego, poprzedzające do 20 dni wysiew łuszczycy, potwierdzone przez lekarza.

Sytuacje życiowe powodujące silny stres psychiczny definiowano jako określone wydarzenie, które silnie wpłynęło na życie chorego i poprzedziło w okresie do sześciu miesięcy pojawienie się łuszczycy po raz pierwszy lub/i nawrót/wyraźne zaostrzenie tej choroby bez współistnienia objawów infekcji paciorkowcowej. W badaniu odnoszono się do skali Holmesa i Rahe [99], uwzględniającej 43 najczęściej występujące wydarzenia życiowe powodujące silny stres psychiczny. Nie dokonywano oceny stopnia nasilenia stresu uwzględnionej w ww. skali (załącznik).

3.2.1.2. *Badanie przedmiotowe*

Na podstawie badania dermatologicznego wyróżniono następujące kliniczne postaci łuszczycy (tab. 4):

1. łuszczycę ograniczoną (*localized*), obejmującą łuszczycę fałdów, łuszczycę łojotokową, łuszczycę skóry owłosionej głowy, łuszczycę dłoni/stóp (niekrostkową) i łuszczycę ograniczoną plackową
2. łuszczycę rozległą (*widespread*), obejmującą rozległą postać łuszczycy plackowatej, łuszczycę kropelkową, uogólnioną łuszczycę krostkową i erytrodermię łuszczycową.

Tab. 4. Postacie kliniczne łuszczycy [81, zmodyfikowany]
 Tab. 4. *Psoriasis phenotypes [81, modified]*

Postacie kliniczne łuszczycy <i>Psoriasis phenotypes</i>	
Łuszczyca ograniczona <i>Localized psoriasis</i>	Łuszczyca rozległa <i>Widespread psoriasis</i>
Łuszczyca fałdów / <i>Flexural psoriasis</i>	Plackowata / <i>Plaque</i>
Łuszczyca łojotokowa / <i>Seborrheic psoriasis</i>	Kropelkowata* / <i>Guttate*</i>
Łuszczyca skóry owłosionej głowy / <i>Scalp psoriasis</i>	Uogólniona krostkowa <i>Generalized pustular</i>
Łuszczyca dłoni/stóp (niekrostkowa) / <i>Palms/soles (nonpustular)</i>	Erytrodermia <i>Erythroderma</i>
Łuszczyca plackowata ograniczona: kończyny i/lub tułów / <i>Localized plaque psoriasis: limbs and/or trunk</i>	

* oraz postacie z drobnogrudkowym wysiewem w przebiegu łuszczycy plackowatej poprzedzone infekcją paciorkowcową

Ponadto u każdego pacjenta oceniono następujące cechy łuszczycy:

1. aktywność łuszczycy (łuszczyca niestabilna, aktywna: zmiany stale powiększające się lub pojawiające się nowe, niewielkie, nie przekraczające 3 cm ogniska)
2. średnicę ognisk (łuszczyca drobnoplackowata: ogniska małe ≤ 3 cm średnicy, łuszczyca wielkoplackowata: ogniska duże > 3 cm średnicy, łuszczyca drobno i wielkoplackowata: ogniska małe ≤ 3 cm i ogniska duże > 3 cm średnicy)
3. przybliżoną grubość ognisk łuszczycowych (ogniska cienkie $\leq 0,75$ mm, ogniska grube $> 0,75$ mm)
4. zajęcie płytek paznokciowych rąk (naparstkowanie, onycholiza, dystrofia, plamy olejowe, rogowacenie podpaznokciowe)

Do oceny stopnia nasilenia łuszczycy zastosowano wskaźnik PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*) uwzględniający ocenę obszaru skóry zajętej przez zmiany łuszczycowe, nasilenie złuszczenia, rumienia i nacieku [69] (tab. 5).

Tab. 5. Schemat obliczania wskaźnika PASI
 Tab. 5. Scheme of PASI calculation

Punktacja Score	0	1	2	3	4	5	6
r – rumień / <i>erythema</i> n – naciek / <i>thickness</i> z – złuszczenie / <i>scaling</i>	brak <i>none</i>	nie- znaczne <i>slight</i>	umiar- kowane <i>moderate</i>	ciężkie <i>severe</i>	bardzo ciężkie <i>very severe</i>	–	–
p – powierzchnia / <i>area</i> (%)	0	<10	[10, 30)	[30, 50)	[50, 70)	[70, 90)	[90, 100]

$$\text{PASI} = 0,1 \cdot (r_g + n_g + z_g) \cdot p + 0,2 \cdot (r_{gk} + n_{gk} + z_{gk}) \cdot p + 0,3 \cdot (r_t + n_t + z_t) \cdot p + 0,4 \cdot (r_{dk} + n_{dk} + z_{dk}) \cdot p$$

g – głowa/head, gk – górne kończyny/upper limbs, t – tułów/trunk, dk – dolne kończyny/lower limbs

Za kryterium rozpoznania łuszczycy ciężkiej przyjęto występowanie łuszczycowego zapalenia stawów i/lub łuszczycy z PASI ≥ 15 i/lub łuszczycę aktualnie leczoną lub kwalifikującą się do leczenia metotreksatem i/lub cyklosporyną i/lub neotigasonem.

Do celów analizy klinicznej chorych podzielono w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się łuszczycza na pięć grup – z początkiem choroby między 31. a 39., 40. a 49., 50. a 59. rokiem życia oraz w/powyżej 60. roku życia.

3.2.2. Metody badań molekularnych

3.2.2.1. Izolacja DNA

Do izolacji jądrowego DNA zastosowano trzy metody:

1. nieenzymatyczną technikę wg Lahirego i Nurnbergera z niewielkimi modyfikacjami [117]. Metoda ta zapewniła możliwość uzyskania wysokiej jakości DNA bez konieczności stosowania proteinazy K oraz agresywnych rozpuszczalników organicznych, które mogłyby zaburzać dalsze etapy analizy
2. izolację z wykorzystaniem zestawu „Sherlock AX” zastosowano do ekstrakcji DNA z wymazów z nabłonka jamy ustnej; zestaw ten wykorzystuje membrany jonowymienne, które efektywnie wiążą DNA
3. metodę z użyciem żywicy Chelex; w tej metodzie wacik z wymazem umieszczano bezpośrednio w próbówce zawierającej 200 μl 5% zawiesiny Chelexu, po inkubacji i odwirowaniu do reakcji PCR stosowano 1 μl supernatantu, zaś pozostałą część przechowywano w temperaturze -20°C

3.2.2.2. Oznaczanie jakości DNA

Obecność DNA oznaczano drogą elektroforezy w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny. Rozdział prowadzono przy stałym napięciu 100V przez ok. 45 min. Wyniki elektroforezy odczytywano na transluminatorze w świetle UV (302 nm) zwracając przede wszystkim uwagę na stopień spolimeryzowania DNA.

Czystość i stężenie DNA izolowanego z krwi pełnej oraz wymazów z nabłonka jamy ustnej oznaczano spektrofotometrycznie w spektrofotometrze NanoDrop® ND-1000, pomiar odczytywano przy długości fali 260 nm, przy której absorbancja dla kwasów nukleinowych wykazuje maksimum.

3.2.2.3. Metody oznaczania alleli HLA-Cw

Allel HLA-Cw*06 typowano przy użyciu zoptymalizowanej techniki PCR-SSP i PCR-RFLP w populacji 383 chorych na łuszczycę zwyczajną z początkiem powyżej trzydziestego roku życia, u 30 osób z *pustulosis palmo-plantaris* i u 25 pacjentów z łuszczycą kropelkową. HLA-Cw*06 oznaczono również w grupach kontrolnych (liczebności grup kontrolnych - tab. 3). W celu walidacji zastosowanej w pracy metody u 64 osób z grupy kontrolnej allel HLA-Cw*06 typowano przy użyciu zestawu Dynal Allset SSP^{+TC} HLA-Cw *low resolution*.

Analiza z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Dynal Allset SSP^{+TC} HLA-Cw low resolution

Wykorzystany w badaniach zestaw Dynal Allset SSP^{+TC} HLA-Cw *low resolution* zawiera 24 pary starterów, w tym 23 pary starterów dla *locus* HLA-C i 1 parę starterów dla wewnętrznej kontroli pozytywnej w celu określenia wydajności reakcji amplifikacji. Kontrolę pozytywną stanowiła para starterów amplifikująca fragment DNA dla HGH (*human growth hormone*, ludzki hormon wzrostu -1070 pz), negatywną zaś próbka niezawierająca starterów.

Mieszanina reakcyjna dostarczona przez producenta zawierała 224 µl roztworu MasterMix (z wszystkimi składnikami do reakcji PCR). Do amplifikacji użyto 50 µl DNA (stężenie końcowe 50 ng/µl) i 2,24 µl polimerazy *Taq* (5 U/µl). Całość worteksowano i rozdzielano po 10 µl do 0,2 ml próbek Eppendorf, w których znajdowały się allelo-specyficzne pary starterów. Reakcję amplifikacji przeprowadzano w aparacie Mastercycler Gradient firmy Eppendorf według parametrów podanych przez producenta (tab. 6).

Tab. 6. Warunki amplifikacji alleli locus HLA-C
 Tab. 6. Conditions of amplification of HLA-C alleles

Etapy reakcji PCR Stages of PCR reaction	Temperatura [°C] Temperature	Czas [s] Time	Liczba cykli Number of cycles
Wstępna denaturacja <i>Initial denaturation</i>	96	120	1
Denaturacja/ Denaturation, Hybrydyzacja i elongacja <i>Hybridisation and extension</i>	96 65	15 60	10
Denaturacja/Denaturation Hybrydyzacja/Hybridization Elongacja/Extension	96 61 72	10 50 30	20

Produkty PCR rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym przy 180 V przez około 30 minut. Wyniki odczytywano w transiluminatorze w świetle UV, z wykorzystaniem programu komputerowego Dynal Biotech SSPTool v3.

Oznaczanie allelu HLA–Cw*06 metodami PCR-SSP i PCR-RFLP

Do oznaczania obecności i zgotyczności allelu HLA–Cw*06 w populacjach chorych i w grupach kontrolnych wykorzystano metody PCR–SSP i PCR–RFLP.

Pierwszy etap badania polegał na swoistej detekcji allelu HLA–Cw*06, do której wykorzystano metodę PCR–SSP. Aby wykluczyć wyniki fałszywie ujemne, w reakcji zastosowano wewnętrzną dodatnią kontrolę amplifikacji. Oba produkty, allel HLA–Cw*06 i wewnętrzną kontrolę amplifikacji w postaci fragmentu genu HLA–C, powieliła metodą kompleksowej reakcji PCR, której warunki zoptymalizowano tak, aby sygnał amplifikacji allelu HLA–Cw*06 dla heterozygoty był nieco silniejszy niż sygnał amplifikacji kontroli dodatniej. Reakcję prowadzono w 13 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej 16 mM (NH)₂SO₄, 50 mM Tris-HCl (pH 9,2), 1,75 mM MgCl₂, 350 µM dNTP, 0,5 µM starterów allelospecyficznych, 0,064 µM starterów wewnętrznej kontroli amplifikacji, 10 ng matrycowego DNA oraz 0,1875 U polimerazy *Taq*. Profil temperaturowy reakcji PCR obejmował 2 min wstępnej denaturacji w 96°C, 30 cykli amplifikacji (25 s w 96°C, 1 min w 60°C, 2 min w 72 C) oraz 5 min końcowej elongacji w 72 C.

W kolejnym etapie wszystkie próbki DNA, w których wykryto allel HLA–Cw*06 poddano analizie metodą PCR–RFLP w celu wykrycia heterozygot. W tym celu powielony fragment genu HLA–C (ten sam, który w pierwszym etapie stanowił wewnętrzną kontrolę amplifikacji) poddawano analizie restrykcyjnej z użyciem enzymu *Sma* I. Amplifikację prowadzono w 10 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9,1), 0,01% Triton X–100, 1,25 mM MgCl₂, 0,625 U polimerazy *Taq*, 200 µM dNTP, 0,75 µM startery oraz 2,5 ng matrycowego DNA. Reakcja obejmowała 2 min w 95°C, 30 cykli amplifikacji (1 min w 95°C, 1 min w 62°C, 30 s w 72°C) oraz 5 min w 75°C. Ostatecznie 5 µl tak uzyskanego produktu PCR poddawano trawieniu przez 4 h w 25°C w 10 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej 5 U enzymu *Sma* I, 15 mM KCl, 10

mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ditiotreitol oraz 100 µg/ml BSA. W przypadku homozygot pod wpływem restryktazy *Sma* I z produktu PCR wielkości 618 bp powstawały fragmenty wielkości 348, 196 i 74 bp, natomiast w przypadku heterozygot obserwowano dodatkowy fragment wielkości 270 bp.

W końcowym etapie należało wykluczyć u homozygot HLA-Cw*06 niespecyficzne trawienie enzymem *Sma* I, który oprócz Cw*06 dodatkowo rozpoznawał również allele Cw*07 i Cw*18. W tym celu zmodyfikowano allelospecyficzny starter *reverse* użyty w pierwszym etapie tak, by razem z niezmienionym starterem *forward* umożliwiał amplifikację alleli Cw*07 i Cw*18. Analizę prowadzono metodą PCR-SSP, przy czym warunki reakcji pozostały identyczne jak w pierwszym etapie badania.

Na każdym z trzech etapów genotypy badanych próbek oznaczano poprzez barwienie DNA srebrem po rozdziale elektroforetycznym w 13% żelu poliakrylamidowym (tab. 7).

Tab. 7. Etapy oznaczania allelu HLA-Cw*06 i jego zygotywności
 Tab. 7. Stages of detection and zygosity status verification of HLA-Cw*06

Etap analizy <i>Stage of analysis</i>	Startery (wielkość produktów) <i>Primers (product size)</i>	Sekwencja starterów <i>Primer sequences</i>	Pismienn. <i>Ref.</i>	Stężenie <i>Concentration</i>	Wykrywane allele HLA-C <i>Detected HLA-C alleles</i>
1. Oznaczenie obecności Cw*06 <i>Detection of Cw*06</i>	Produkt allelospecyficzny (297 bp) <i>Allele specific product (297)</i> Kontrola pozytywna (618 bp) <i>Positive control (618 bp)</i>	TACTACAACCAGAGCGAGGA GGTCGCAGCCATACATCCA TTGAGGATTCTCCACTCCCCTGAG CTGTGCCTGGCGCTTGACTT	[24] [208]	500 nM 64 nM	Cw*06 (wszystkie) Cw*0731 (bardzo rzadki allele) Cw*06 (all) Cw*0731 (a very rare allele)
2. Oznaczenie homo i heterozygot (tylko próbki z Cw*06) <i>Discrimination of homo- and heterozygotes (only samples with Cw*06)</i>	PCR (618 bp), Trawienie <i>Sma</i> I (obecność lub brak produktu 270 bp) <i>PCR (618 bp), Digestion with Sma I (270 bp present or absent)</i>	TTGAGGATTCTCCACTCCCCTGAG CTGTGCCTGGCGCTTGACTT	[208]	750 nM	Cw*06 (wszystkie z wyjątkiem bardzo rzadkiego produktu rekombinacji Cw*060202) Cw*0704, 0711, 0712, 0745 Cw*18 (wszystkie) Cw*06 (all except for a very rare product of recombination Cw*060202) Cw*0704, 0711, 0712, 0745, Cw*18 (all)

Etap analizy <i>Stage of analysis</i>	Startery (wielkość produktów) <i>Primers (product size)</i>	Sekwencja starterów <i>Primers sequences</i>	Piśmienn. <i>Ref.</i>	Stężenie <i>Concentration</i>	Wykrywane allele HLA-C <i>Detected HLA-C alleles</i>
3. Wykluczenie niespecyficznego trawionych Cw*07 i Cw*18 (tylko próbki bez 270 bp po trawieniu Sma I) <i>Exclusion of un-specifically digested Cw*07 and Cw*18</i>	Produkt allelospecyficzny (297 bp) <i>Allele specific product (297 bp)</i>	TACTACAACCAGAGCGAGGA GGTCGCAGCCAWACATCCT	[*]	500 nM	Cw*0315, 0332 Cw*04 (wszystkie z wyjątkiem 0411) Cw*07 (wszystkie z wyjątkiem 0707, 0716, 0731) Cw*18 (wszystkie) Cw*0315, 0332 Cw*04 (all except for 0411) Cw*07 (all except for 0707, 0716, 0731) Cw*18 (all)
<i>(only samples without 270 bp after digestion with Sma I)</i>	Kontrola pozytywna (618 bp) <i>Positive control (618 bp)</i>	TTGAGGATTCCTCCACTCCCCCTGAG CTGTGCCTGGCGCTTGTACTT	[208]	64 nM	-

* metoda opisana w tej rozprawie habilitacyjnej
* method described in this manuscript

3.2.3. Metody statystyczne

Obszerny materiał uzyskany w trakcie badań (liczne parametry kliniczne oznaczane u 404 pacjentów) stanowił właściwy punkt wyjścia do przeprowadzenia analiz statystycznych. Większość analizowanych parametrów miała charakter jakościowy (występowanie lub brak danej cechy klinicznej). Parametrami ilościowymi był wiek, czas trwania choroby, PASI oraz wyliczony wskaźnik BMI.

Pierwszym etapem analizy statystycznej było uporządkowanie materiału poprzez podział chorych na grupy pod względem płci, wieku, w którym choroba się rozpoczęła i aktualnego wieku chorych. Wynikiem tego było uzyskanie tablic wielozmiennych, określających częstość występowania analizowanych parametrów (w przypadku zmiennych jakościowych) lub średnie wartości zmiennych ilościowych dla wyodrębnionych poprzez podziały grup (kobiety/mężczyźni, przedziały związane z wiekiem początku choroby). Tablice te następnie posłużyły do dalszych analiz [196].

Ocena rozkładu parametrów ilościowych przeprowadzona została w oparciu o histogramy oraz **test Shapiro – Wilka**. Analizowane parametry nie miały rozkładów normalnych – konsekwencją tego faktu był wybór odpowiednich metod analizy statystycznej.

Ze względu na charakter analizowanych zmiennych (ilościowe, nie z rozkładem normalnym oraz jakościowe) zastosowano następujące testy nieparametryczne:

1. Do porównania parametrów ilościowych zastosowany został **test U Manna – Whitneya** dla dwóch niezależnych próbek.
2. Do porównania parametrów jakościowych wykorzystany został **test zgodności Pearsona χ^2** .
3. **Test Q trendu Kruskala- Wallisa dla n próbek** użyty został jako tzw. test trendu dla określenia wpływu wieku, w którym ujawnia się choroba na wybrane parametry charakteryzujące obraz i przebieg kliniczny choroby.
4. **Regresja logistyczna** wykorzystana została do ustalenia czynników ryzyka wystąpienia ciężkiej postaci łuszczycy oraz łuszczycowego zapalenia stawów.

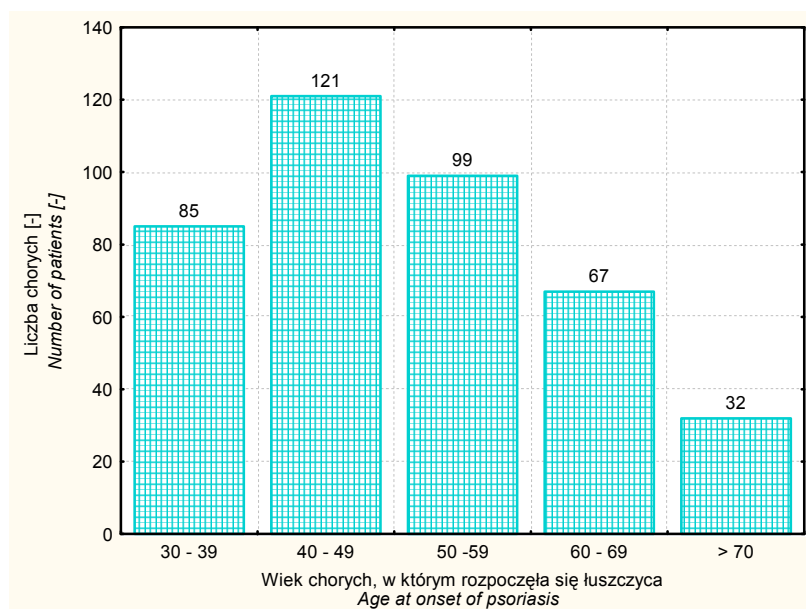
Znamienność różnic w występowaniu allelu HLA-Cw*06 pomiędzy populacją chorych a populacją kontrolną oraz wyodrębnionymi podgrupami mierzono przy pomocy dokładnego testu Fishera. W przypadku testów wielokrotnych stosowano poprawkę Bonferroniego, obliczając wartość p skorygowaną (p_{corr}) jako iloczyn wartości p dla testu przed poprawką oraz liczby przeprowadzonych testów.

Obliczenia zostały wykonane z wykorzystaniem pakietu oprogramowania statystycznego STATISTICA PL wersja 6.0. Uzyskane wyniki analiz przedstawione zostały w postaci tabel i rycin.

4. WYNIKI

4.1. Analiza kliniczna 404 chorych z łuszczycą zwyczajną rozpoczynającą się powyżej trzydziestego roku życia

W analizowanej populacji 404 chorych z łuszczycą rozpoczynającą się po trzydziestym roku życia choroba najczęściej, u 121 pacjentów, rozpoczęła się w piątej dekadzie życia, najmniej liczną grupę stanowili chorzy z początkiem łuszczycy po siedemdziesiątym roku życia (32 chorych) (ryc. 6).



Ryc. 6. Rozkład liczebności chorych w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się łuszczyca
Fig. 6. Age ranges of patients at onset of psoriasis

W badanej populacji chorych dodatni wywiad rodzinny w kierunku łuszczycy stwierdzono u 139 pacjentów (34,5%). Najczęściej, u 28,6% chorych, łuszczyca występowała u krewnych pierwszego stopnia, u 32 osób na łuszczycę chorował więcej, niż jeden krewny pierwszego stopnia. U odpowiednio 5,2 i 6,2% chorych łuszczyca występowała u osób z pokrewieństwem drugiego i trzeciego stopnia (tab. 8, ryc. 7).

Częstość rodzinnego występowania łuszczycy zależała od wieku, w którym choroba się rozpoczęła ($p=0,002$, test trendu Kruskala-Wallisa). Dodatni wywiad rodzinny najczęściej występował u chorych z początkiem łuszczycy poniżej 40. roku życia (u 47,6%), najrzadziej zaś u chorych z początkiem choroby powyżej 60. roku życia (21,2%).

Znamienną zależność zaobserwowano również pomiędzy wiekiem początku łuszczycy, a jej występowaniem u członków rodzin z pokrewieństwem I stopnia ($p=0,0002$, test trendu Kruskala-Wallisa).

Tab. 8. Dodatni wywiad rodzinny w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się łuszczyca
 Tab. 8. Positive familial history in correlation with age of onset

Wywiad rodzinny/ <i>Familial history</i>	Początek łuszczycy - wiek (lata) / <i>Age of onset (years)</i>				Ogółem <i>Total</i>
	30 - 39	40 - 49	50 - 59	≥60	
Dodatni wywiad rodzinny (%) * <i>Positive familial history (%)</i>	47,6	42,2	27,3	21,2	34,5
Pokrewieństwo I° (%) ** <i>Relationship I° (%)</i>	40,5	36,4	20,4	17,2	28,6
Pokrewieństwo II° (%) <i>Relationship II° (%)</i>	6,0	5,8	6,1	3,0	5,2
Pokrewieństwo III° (%) <i>Relationship III° (%)</i>	11,9	5,0	6,1	3,0	6,2

* $p=0,002$, $p^{**}=0,0002$, test trendu Kruskala- Wallisa

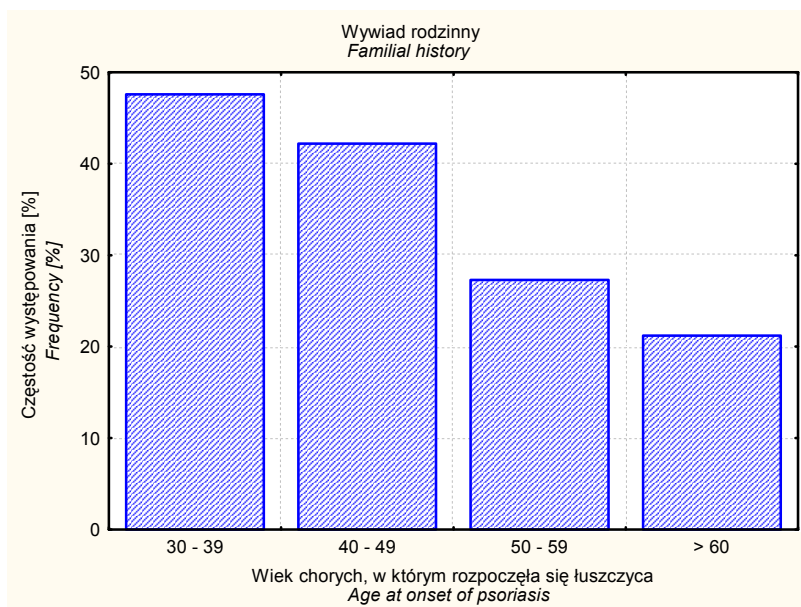
* $p=0,002$, $p^{**}=0,0002$, *Kruskal-Wallis trend test*

Tab. 9. Czynniki prowokujące: pierwszy i kolejne wysiewy łuszczycy
 Tab. 9. Precipitating factors in the onset and exacerbations of psoriasis

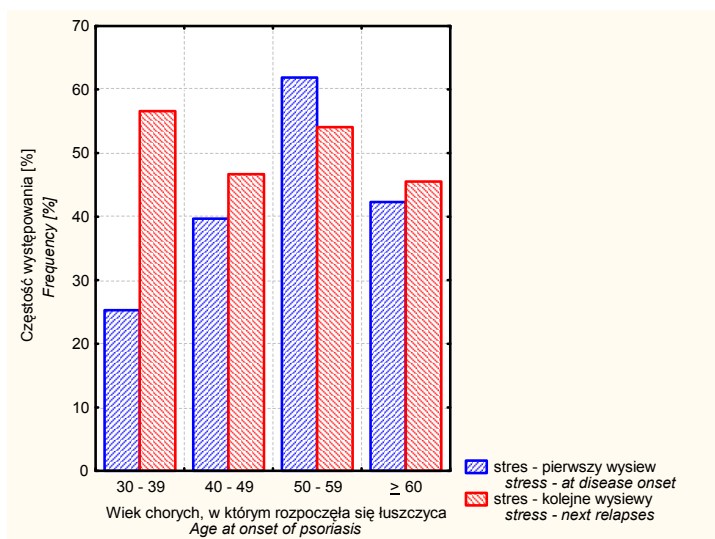
Czynniki prowokują- ce/ <i>Precipitating factors</i>	Początek choroby – wiek (lata) <i>Age of onset (years)</i>				Ogółem <i>Total</i>
	30 - 39	40 -49	50-59	≥60	
Silny stres psychiczny (%) pierwszy***/kolejne wysiewy <i>Strong psychological stress (%)</i> <i>first ***/next relapses</i>	25,3 / 56,6	39,7 / 46,7	61,9 / 54,1	42,3 / 45,5	42,7 / 50,3
Infekcje (%) pierwszy**/kolejne wysiewy <i>Infections (%)</i> <i>first **/next relapses*</i>	22,0/ 28,1	9,1 / 15,0	7,1 / 14,3	8,2 / 15,2	11,0 / 20,6
Silny stres psychiczny + infekcja (%) pierwszy*/kolejne wysiewy <i>Strong psychological stress</i> <i>+infections first*/next relapses</i>	45,1 / 67,5	47,1 / 57,5	67,0 / 65,3	48,5 / 53,5	51,9 / 60,5
Inne (urazy fizyczne,leki) (%) pierw- szy/kolejne wysiewy <i>Others (physical trauma, drugs) (%)</i> <i>first/next relapses</i>	1,2 / 7,2	5,8 / 10,8	5,1 / 5,2	16,3 / 12,1	7,3 / 9,0

* $p < 0,05$, ** $p < 0,0001$, *** $p < 0,00001$ test trendu Kruskala – Wallisa

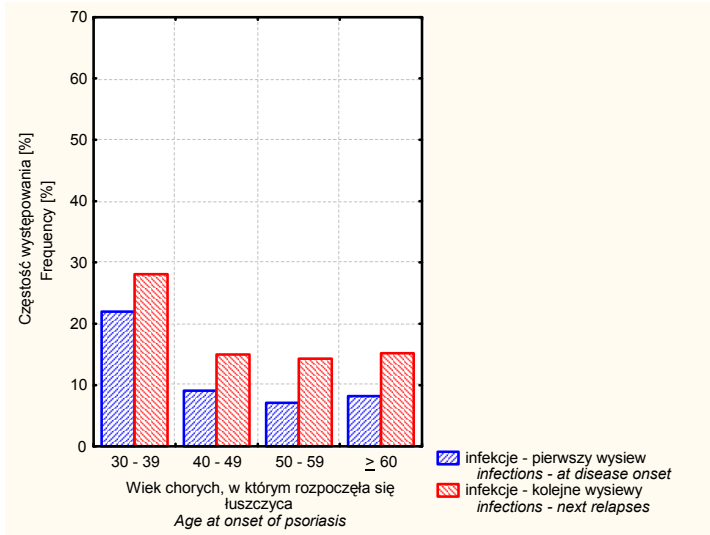
* $p < 0,05$, ** $p < 0,0001$, *** $p < 0,00001$ *Kruskal- Wallis trend test*



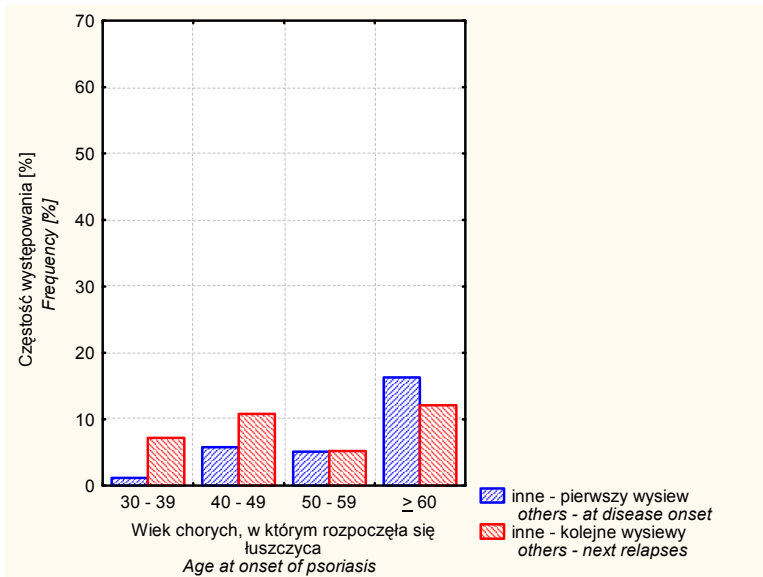
Ryc. 7. Dodatni wywiad rodzinny w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się łuszczyca
Fig. 7. Positive familial history in correlation with age of onset



Ryc. 8. Odsetek chorych wskazujących na silny stres psychiczny w prowokacji pierwszego i kolejnych nawrotów łuszczycy w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się choroba
Fig. 8. Percentage of patients indicating strong psychological stress preceding first and next relapses of psoriasis



Ryc. 9. Odsetek chorych wskazujących na infekcje poprzedzające pierwszy i kolejne nawroty łuszczycy w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się łuszczyca
 Fig. 9. Percentage of patients indicating infections preceding first and next relapses of psoriasis



Ryc. 10. Odsetek chorych wskazujących na inne, niż stres i/lub infekcje czynniki poprzedzające pierwszy i kolejne nawroty łuszczycy w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się łuszczyca
 Fig. 10. Percentage of patients indicating other factors than stress and/or infections preceding first and next relapses of psoriasis

U 42,7% chorych pojawienie się łuszczycy po raz pierwszy w życiu wiązało z poprzedzającym je silnym stresem psychicznym, najczęściej spowodowanym śmiercią/chorobą współmałżonka lub bliskiego krewnego, rozwodem/separacją, przejściem na emeryturę, zwolnieniem z pracy, zmianą warunków zatrudnienia, zmianą poziomu życia lub inną chorobą własną.

Występowanie stresu psychicznego jako czynnika prowokującego pierwszy wysiew łuszczycy zależało od wieku, w którym choroba się rozpoczęła ($p < 0,00001$, test trendu Kruskala-Wallisa). Znaczenie tego czynnika w prowokacji zmian łuszczycowych rosło z wiekiem, w którym choroba się rozpoczęła, malało natomiast u chorych z początkiem łuszczycy w wieku ≥ 60 . lat (tab. 9, ryc. 8). Najczęściej na silny stres psychiczny poprzedzający ujawnienie się łuszczycy wskazywali chorzy z początkiem choroby w szóstej dekadzie życia (61,9%).

Najmniej chorych (25,3%) wskazujących na silny stres psychiczny jako czynnik poprzedzający pierwszy wysiew łuszczycy stwierdzono w grupie osób z początkiem łuszczycy w czwartej dekadzie życia.

U 11% chorych pierwszy w życiu wysiew łuszczycy poprzedzony był infekcją bakteryjną lub wirusową, najczęściej (30 chorych) górnych dróg oddechowych. Dziewiętnastu chorych z tej grupy pierwszy wysiew zmian łuszczycowych wiązało z zapaleniem migdałków podniebiennych. Paciorkowcowe zapalenie migdałków podniebiennych potwierdzone dodatnim wynikiem posiewu i/lub podwyższonymi wartościami ASO stwierdzono u 15 chorych. Byli to w większości (13 osób) chorzy z łuszczycą rozpoczynającą się poniżej 40. roku życia. Pierwszy wysiew łuszczycy w piątej i szóstej dekadzie życia poprzedzony paciorkowcowym zapaleniem migdałków podniebiennych rozpoznano u dwóch chorych. U dziesięciu pacjentów paciorkowcowe zapalenie gardła poprzedziło wysiew łuszczycy kropelkowatej, u 5 zaś drobnogrudkowy wysiew w przebiegu łuszczycy plackowatej. Znaczenie infekcji w prowokacji pierwszego w życiu wysiewu łuszczycy malało z wiekiem, w których choroba się rozpoczęła ($p < 0,0001$, test trendu Kruskala-Wallisa). Na ten czynnik wskazywało 22% chorych w grupie z początkiem łuszczycy poniżej 40. roku życia i 8,2% w populacji pacjentów z chorobą rozpoczynającą się w wieku ≥ 60 . lat (tab. 9, ryc. 9).

Dwudziestu dziewięciu chorych (7,3%) wiązało pojawienie się łuszczycy z innymi, niż stres psychiczny i/lub infekcje czynnikami, najczęściej z lekami (19 chorych) - beta blokerami (10 chorych) i kortykosteroidami przyjmowanymi ogólnie (6 chorych). U 3 chorych łuszczycy ujawniła się w trakcie leczenia interferonem wirusowego zapalenia wątroby typu C.

U 10 chorych z badanej populacji pojawienie się zmian na skórze było poprzedzone urazami fizycznymi o różnym charakterze (oparzenie termiczne – 2 chorych, interwencje chirurgiczne – 4 chorych, inne urazy – 4 osoby) (tab. 9, ryc. 10)

Z danych uzyskanych od chorych i/lub z dokumentacji medycznej wynikało, że u 72,1% chorych pierwsze zmiany na skórze miały charakter ograniczony i występowały najczęściej (43,5%) w postaci pojedynczych ognisk plackowatych, zajmujących skórę kończyn i/lub tułowia (tab. 10, ryc. 11). U 18,9% chorych łuszczycy rozpoczęła się zajęciem skóry owłosionej głowy. Łuszczycy fałdów, łuszczycy łojotokowa, łuszczycy dłoni i stóp jako pierwsza manifestacja choroby występowała u odpowiednio 3,4%, 0,6% i 5,7% badanych chorych. 20,6% pacjentów zgłaszało, że pierwszy wysiew łuszczycy miał charakter uogólnionych zmian plackowatych. Łuszczycy kropelkowata, erythrodermia łuszczycowa i uogólniona łuszczycy krostkowa jako pierwsze kliniczne ujawnienie

się choroby występowało u odpowiednio 3,1%, 0,9% i 1,1% chorych. Stwierdzono, że pierwszy w życiu wysiew łuszczycy występujący pod postacią łuszczycy kropelkowej zależy od wieku, w którym rozpoczyna się łuszczyca ($p < 0,05$, test trendu Kruskala-Wallisa). U 2,3% chorych pierwszym objawem łuszczycy było zajęcie płytek paznokciowych.

Na podstawie przeprowadzonego badania dermatologicznego u 62,8% osób stwierdzono ograniczoną, zaś u 36,7% rozległą formę choroby. Spośród postaci uogólnionych, najczęściej – u 29,8 % chorych rozpoznawano łuszczycę plackowatą. Erytdermię łuszczycową, łuszczycę kropelkową i łuszczycę krostkowa uogólnioną stwierdzono u odpowiednio 5,1%, 2,0% i 1,5% pacjentów (tab.10, ryc.14). Znamienne różnice w częstości występowania erytrodemii łuszczycowej obserwowano u chorych z początkiem choroby w szóstej dekadzie życia oraz w wieku ≥ 60 . (8,4% vs 1,0%) ($p < 0,05$).

Wśród postaci ograniczonych, najczęściej występowała łuszczyca plackowata ograniczona do skóry kończyn i/lub tułowia (48,9%), najrzadziej zaś łuszczyca łojotokowa (1,3%). Łuszczycę fałdów stwierdzono u 37 chorych (9,1%) (tab.10, ryc.13). Częstość tej lokalizacji różniła się znamienne w grupach chorych z łuszczycą rozpoczynającą się w czwartej (3,6%) i w piątej dekadzie życia (12,5%) ($p = 0,03$). U 58,3% chorych z ograniczoną postacią łuszczycy stwierdzono zajęcie przez pojedyncze, zajmujące niewielki obszar zmiany łuszczycowe tylko jednej anatomicznej okolicy ciała, u 36,3% - dwóch – (najczęściej łuszczycę głowy z obecnością pojedynczych zmian plackowatych na skórze tułowia i/lub kończyn), u 4,3% zajęte były trzy obszary anatomiczne, zaś u 1,1% cztery.

U 33,9 % chorych stwierdzono łuszczycowe zmiany paznokci dłoni i/ lub stóp. Istotne różnice w częstości zajęcia płytek paznokciowych dotyczyły chorych z początkiem łuszczycy w szóstej (34,7%) i w wieku ≥ 60 . lat (18,6%) ($p = 0,01$).

Tab. 10. Postać łuszczycy w trakcie pierwszego pojawienia się zmian na skórze i w trakcie badania, w zależności od wieku, w którym choroba się rozpoczęła

Tab. 10. *Psoriasis phenotype at disease onset and at dermatologic evaluation in correlation with age of onset*

Początek choroby – wiek (lata) <i>Age of onset (years)</i>					
Postać łuszczycy: pierwszy wysiew / w trakcie badania <i>Psoriasis phenotype: at onset / dermatologic evaluation</i>	30 – 39	40 – 49	50 – 59	≥60	Ogółem Total
Ograniczona (%) <i>Localized (%)</i>	68,4 / 59,0	74,3 / 62,5	76,5 / 60,0	68,2 / 69,1	72,1 / 62,8
Fałdów (%) <i>Intertriginous</i>	1,3 / 3,6 [#]	2,9 / 12,5 [#]	4,7 / 7,4	4,6 / 11,3	3,4 / 9,1
Łojotokowa (%) <i>Seborrhoic (%)</i>	0,0 / 1,2	1,9 / 3,3	0,0 / 0,0	0,0 / 0,0	0,6 / 1,3
Głowy (%) <i>Scalp (%)</i>	15,8 / 21,7	21,0 / 30,0	21,2 / 26,3	17,1 / 30,9	18,9 / 27,6
Dłoni i stóp (%) <i>Palms/soles (%)</i>	4,0 / 7,2	6,7 / 7,5	4,7 / 4,2	6,8 / 10,3	5,7 / 7,3
Plackowata ograniczona (%) <i>Plaque localized (%)</i>	47,3 / 50,6	41,9 / 47,5	45,8 / 42,1	43,8 / 55,7	43,5 / 48,9
Rozległa (%) <i>Whidespread (%)</i>	30,2 / 40,9	24,8 / 36,7	17,7 / 38,9	30,7 / 30,9	25,7 / 36,7
Plackowata (%) <i>Plaque (%)</i>	22,4 / 30,1	19,0 / 30,8	12,9 / 28,4	28,4 / 29,9	20,6 / 29,8
Kropelkowata (%) [*] <i>Guttate (%)</i>	7,9 / 4,8	2,9 / 2,5	1,2 / 1,1	1,1 / 0,0	3,1 / 2,0
Erytrodemia (%) <i>Erythroderma (%)</i>	0,0 / 7,2	1,0 / 4,1	1,2 / 8,4 [#]	1,1 / 1,0 [#]	0,9 / 5,1
Krostkowa uogólniona (%) <i>Pustular generalized (%)</i>	0,0 / 1,2	1,9 / 1,7	2,4 / 2,1	0,0 / 1,0	1,1 / 1,5
Łuszczyca paznokci (%) <i>Nail psoriasis (%)</i>	1,3 / 39,8	1,0 / 41,7	5,9 / 34,7 [#]	1,1 / 18,6 [#]	2,3 / 33,9

* p<0,05 pierwszy wysiew, test trendu Kruskala-Wallisa / p<0.05 *first relapse, Kruskal-Wallis trend test*

[#] p<0,05, test χ^2 / p<0.05, χ^2 test

U 32,7% chorych stwierdzono łuszczycę niestabilną, aktywną. Występowanie tej cechy zależało od wieku, w którym choroba się rozpoczęła ($p < 0,05$, test trendu Kruskala-Wallisa). Częstość występowania łuszczycy niestabilnej rosła z wiekiem, w którym rozpoczęła się choroba, malała natomiast u osób z początkiem łuszczycy w/powyżej 60. roku życia. W tej grupie chorych łuszczycę niestabilną obserwowano najrzadziej – u 19,7% chorych (tab. 11, ryc. 15). Grubość ognisk łuszczycowych zależała od wieku, w którym rozpoczęła się łuszczycyca ($p = 0,015$, test trendu Kruskala-Wallisa). Ogniska cienkie obserwowano najczęściej u chorych z początkiem łuszczycy w czwartej dekadzie życia – u 81,9% chorych, najrzadziej (62,1%) w wieku ≥ 60 . lat (tab. 11, ryc. 17).

Ogniska wielkoplackowate stwierdzono najczęściej – u 43,3% chorych. Wielkość ognisk łuszczycowych nie zależała od wieku, w którym rozpoczęła się łuszczycyca (tab. 11, ryc. 16).

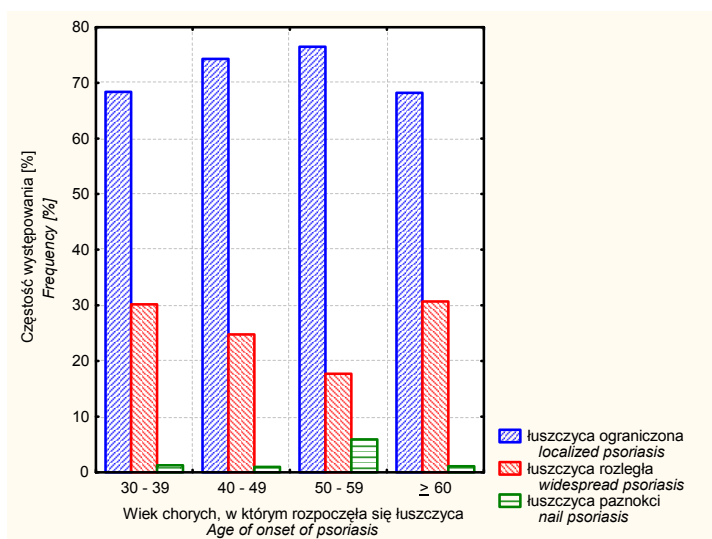
Na podstawie wywiadu ustalono, że u 73,5% łuszczycyca miała ciągły przebieg. Cecha ta zależała od wieku, w którym choroba się rozpoczęła ($p = 0,008$, test trendu Kruskala-Wallisa). U 82,2% chorych z łuszczycą rozpoczynającą się w/po sześćdziesiątym roku życia zmiany nigdy nie ustąpiły całkowicie, podczas gdy u osób z początkiem choroby w czwartej dekadzie życia zmiany utrzymywały się stale u 62,5% badanych.

Świąd zgłaszało 77,7 % chorych, częściej kobiety, niż mężczyźni. Różnica w częstości występowania świądu u obu płci była statystycznie znamienne ($p = 0,01$). Częstość występowania świądu nie zależała od wieku, w którym łuszczycyca się rozpoczęła ($p = 0,42$, test trendu Kruskala-Wallisa).

U 14,9% chorych badanej populacji występowało łuszczycowe zapalenie stawów (tab. 11, ryc. 13). Łzs stwierdzono częściej u kobiet (16,6%), niż u mężczyzn (13,1%). Zwiększone ryzyko wystąpienia łuszczycowego zapalenia stawów stwierdzono u chorych z zajęciem przez łuszczycę płytek paznokciowych dłoni i/lub stóp ($p = 0,0009$, regresja logistyczna). Ryzyka tego nie zwiększał natomiast wiek, w którym choroba się rozpoczęła, płeć oraz rodzinne występowanie łuszczycy (tab. 12).

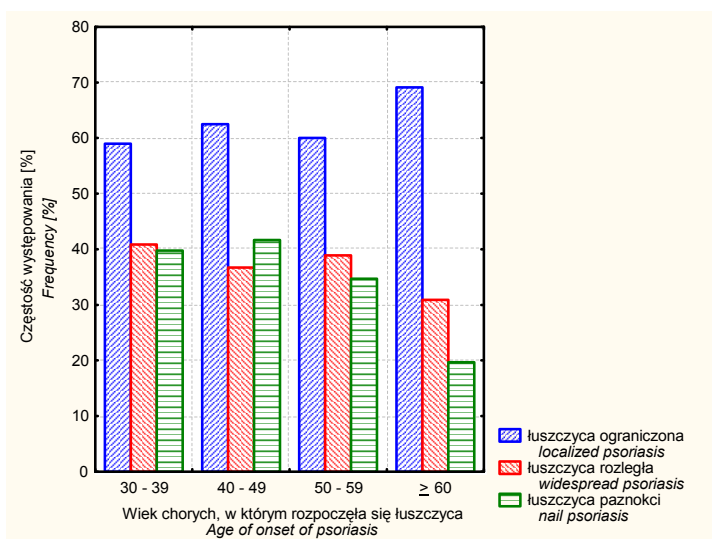
U 140 chorych rozpoznano łuszczycę ciężką. Ciężkość łuszczycy nie zależała od wieku, w którym choroba się rozpoczęła ($p = 0,67$, test trendu Kruskala-Wallisa).

Analiza statystyczna wykazała, że płeć męska ($p = 0,02$, regresja logistyczna) i zajęcie przez łuszczycę paznokci dłoni i/lub stóp ($p < 0,00001$, regresja logistyczna) stanowią czynniki prognostyczne łuszczycy ciężkiej. Ryzyka wystąpienia ciężkiej łuszczycy nie zwiększa natomiast wiek, w którym choroba się rozpoczyna i rodzinne występowanie choroby (tab. 13).



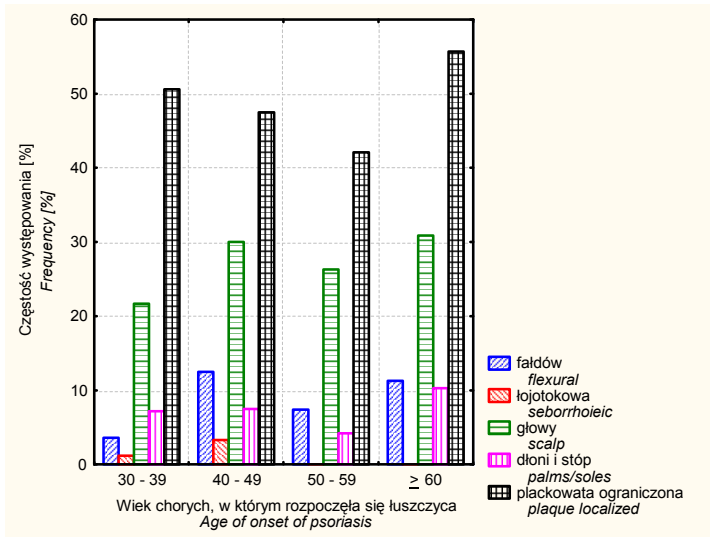
Ryc. 11. Fenotyp łuszczycy w trakcie pierwszego pojawienia się zmian na skórze w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się choroba

Fig. 11. Psoriasis phenotype at disease onset in correlation with age of onset



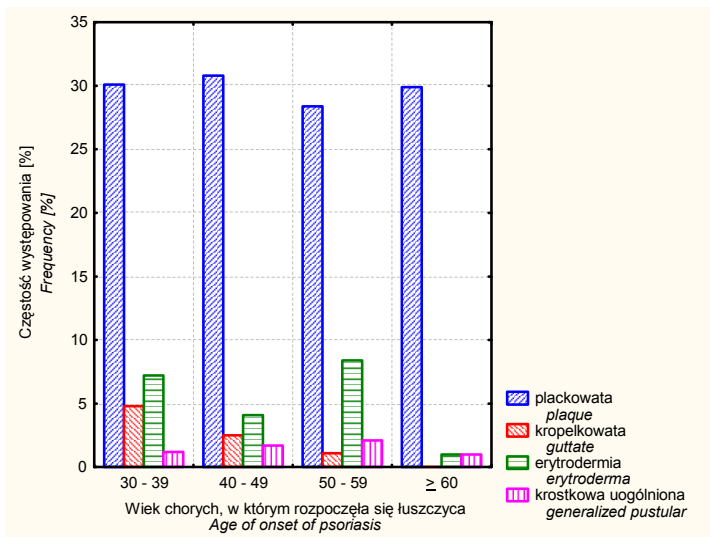
Ryc. 12. Fenotyp łuszczycy stwierdzany w trakcie badania w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się choroba

Fig. 12. Psoriasis phenotype at clinical evaluation in correlation with age of onset



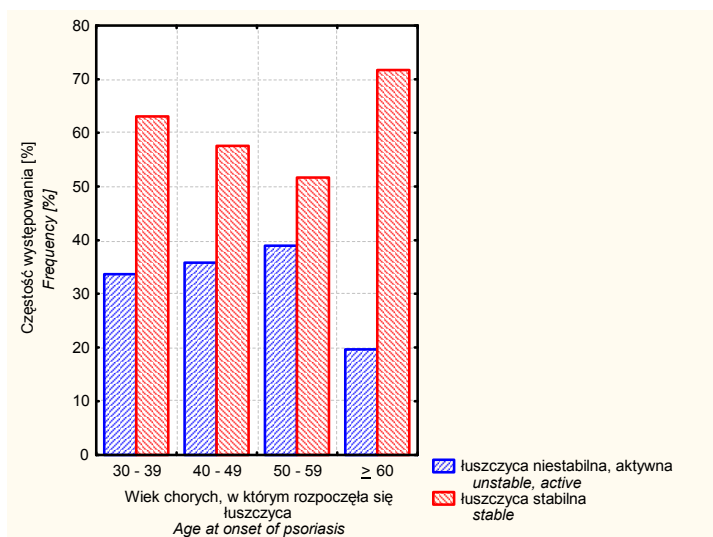
Ryc. 13. Częstość występowania poszczególnych postaci łuszczycy ograniczonej, w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się choroba

Fig. 13. Frequency of localized phenotypes of psoriasis in correlation with age of onset



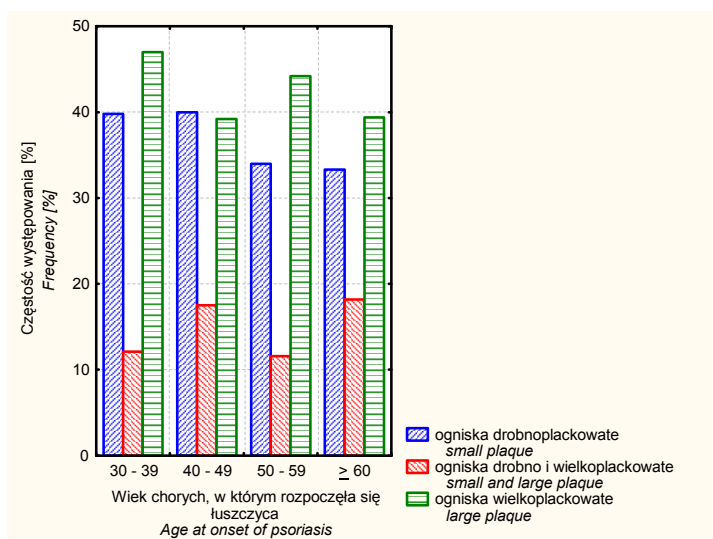
Ryc. 14. Częstość występowania poszczególnych postaci łuszczycy rozległej w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się choroba

Fig. 14. Frequency of widespread phenotypes of psoriasis in correlation with age of onset



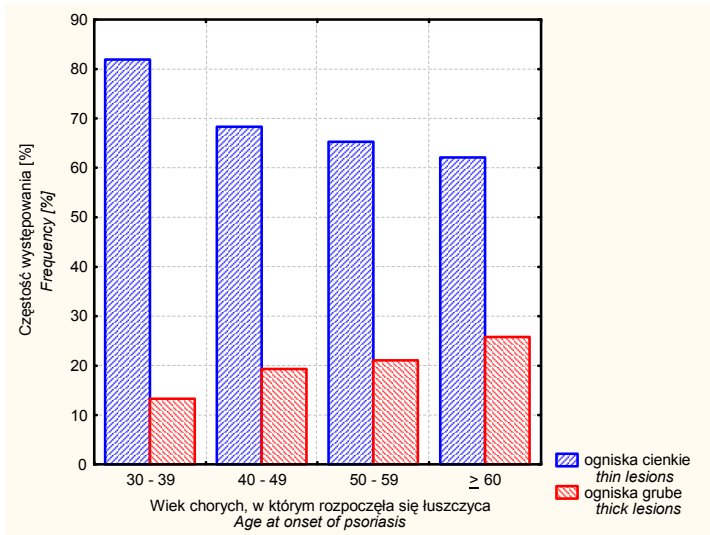
Ryc. 15. Częstość występowania łuszczycy niestabilnej i stabilnej w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się choroba

Fig. 15. Frequency of stable and unstable psoriasis in correlation with age of onset



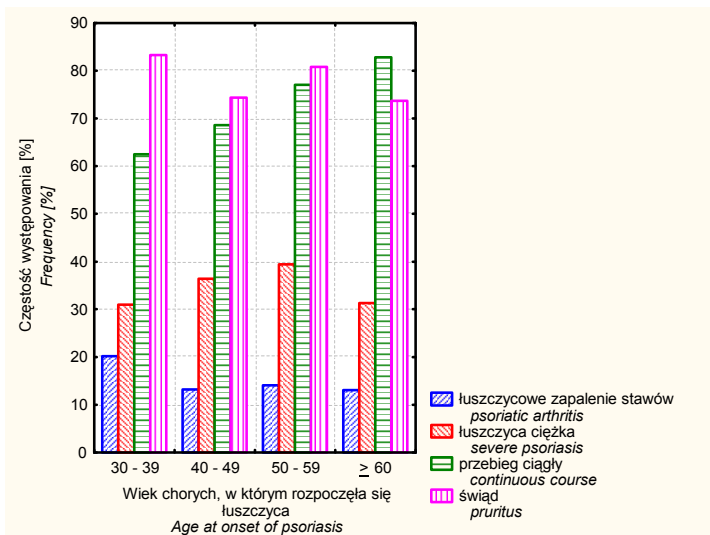
Ryc. 16. Częstość występowania łuszczycy drobnoplackowatej, drobno i wielkoplackowatej i wielkoplackowatej w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się choroba

Fig. 16. Frequency of small plaque, small and large plaque and large plaque psoriasis in correlation with age of onset



Ryc. 17. Częstość występowania cienkich i grubych ognisk łuszczycowych w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się łuszczyca

Fig. 17. Frequency of thin and thick psoriatic lesions in correlation with age of onset



Ryc. 18. Częstość występowania łuszczycowego zapalenia stawów, łuszczycy ciężkiej, łuszczycy o ciągłym przebiegu oraz świądu, w zależności od wieku, w którym choroba się rozpoczęła

Fig. 18. Frequency of psoriatic arthritis, severe psoriasis, psoriasis with continuous course and pruritus in correlation with age of onset

Tab. 11. Wybrane parametry kliniczne charakteryzujące aktywność i przebieg łuszczycy w zależności od wieku rozpoczęcia choroby

Tab. 11. Chosen clinical parameters describing activity and course of psoriasis in correlation with age of onset

Początek łuszczycy – wiek (lata) / Age of onset (years)	30 - 39	40 - 49	50 - 59	≥60	Ogółem Total
Łuszczycyca stabilna (%)* <i>Stable psoriasis (%)</i>	63,1	57,6	51,7	71,7	60,9
Łuszczycyca niestabilna (%)* <i>Unstable psoriasis (%)</i>	33,7	35,8	39,0	19,7	32,7
Ogniska drobnoplackowate (%) <i>Small plaque psoriasis (%)</i>	39,8	40,0	34,0	33,3	36,8
Ogniska drobno i wieloplackowate (%) <i>Small and large plaque psoriasis (%)</i>	12,1	17,5	11,6	18,2	14,2
Ogniska wieloplackowate(%) <i>Large plaque psoriasis (%)</i>	47,0	39,2	44,2	39,4	43,3
Ogniska cienkie(%)* <i>Thin lesions (%)</i>	81,9	68,3	65,3	62,1	68,6
Ogniska grube (%)* <i>Thick lesions (%)</i>	13,3	19,3	21,1	25,8	20,3
Ciągły przebieg (%)** <i>Continuous course (%)</i>	62,5	68,6	77,1	82,8	73,5
Świąd (%) / <i>pruritus (%)</i>	83,3	74,4	80,8	73,7	77,7
PASI	11,5± 11,3	11,4 ± 11,1	12,2 ± 12,1	8,2 ± 7,5	11,1± 11,0
Łuszczycowe zapalenie stawów (%) <i>Psoriatic arthrtis (%)</i>	20,2	13,2	14,1	13,1	14,9
Łuszczycyca ciężka (%) <i>Severe psoriasis (%)</i>	31,0	36,4	39,4	31,3	34,7

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, test trendu Kruskala – Wallisa / * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *Kraskal – Wallis trend test*

Tab. 12. Czynniki prognostyczne rozwoju łuszczycowego zapalenia stawów
 Tab. 12. Prognostic factors for joint involvement

Parametr <i>Parameter</i>	Iloraz szans <i>Odds ratio</i>	95% Przedział ufności <i>95% Confidence interval</i>		p
		Najniższy <i>Lower</i>	Najwyższy <i>Upper</i>	
Wiek początku choroby (lata) <i>Age of onset (years)</i>	0,99	0,96	1,01	0,185
Wiek początku choroby (dekady) <i>Age of onset (decades)</i>	0,85	0,65	1,09	0,197
Płeć (mężczyźni/kobiety) <i>Sex(males/females)</i>	1,32	0,76	2,29	0,331
Łuszczyca rodzinna <i>Familial psoriasis</i>	1,32	0,75	2,32	0,332
Łuszczyca paznokci <i>Nail psoriasis</i>	2,61	1,48	4,60	0,0009

Tab. 13. Czynniki prognostyczne rozwoju łuszczycy ciężkiej
 Tab. 13. Prognostic factors for development of severe psoriasis

Parametr <i>Parameter</i>	Iloraz szans <i>Odds ratio</i>	95 % Przedział ufności <i>95% Confidence interval</i>		p
		Najniższy <i>Lower</i>	Najwyższy <i>Upper</i>	
Wiek początku choroby (lata) <i>Age of onset (years)</i>	1,00	0,98	1,02	0,939
Wiek początku choroby (dekady) / <i>Age of onset (decades)</i>	1,00	0,70	1,44	0,988
Płeć (mężczyźni/kobiety) <i>Sex / males/females</i>	1,64	1,08	2,50	0,020
Łuszczyca rodzinna <i>Familial psoriasis</i>	1,14	0,74	1,75	0,551
Łuszczyca paznokci <i>Nail psoriasis</i>	2,95	1,91	4,58	< 0,0001

4.2. Opracowanie i ocena przydatności zoptymalizowanej techniki PCR–SSP i PCR–RFLP do przesiewowego oznaczania allelu HLA–Cw*06 u chorych na łuszczycę

W pierwszym etapie pracy zastosowano metodę opisaną przez Tazi Ahniniego i wsp. [208], polegającą na amplifikacji analizowanego fragmentu DNA i poddaniu go trawieniu enzymem restrykcyjnym *Sma I*, a następnie rozdziale elektroforetycznym i wybarwieniu srebrem. W celu optymalizacji reakcji i wyeliminowania niespecyficznych produktów amplifikacji zbadano wpływ takich czynników jak: skład buforu reakcyjnego, temperatura hybrydyzacji starterów, stężenie starterów w mieszaninie reakcyjnej oraz stężenie matrycowego DNA. Zoptymalizowane warunki analizy, które wykorzystano w dalszej części pracy, przedstawia tabela 14.

Tab. 14. Zoptymalizowane warunki analizy PCR-RFLP
Tab. 14. Optimised conditions of PCR-RFLP analysis

Parametr/Parametr	Reakcja PCR/PCR
Objętość mieszaniny reakcyjnej / <i>Reaction volume</i>	10 µl
Stężenie dNTP / <i>dNTP concentration</i>	200 µM
Stężenie starterów / <i>Primer concentration</i>	0,75 µM
Stężenie jonów magnezu / <i>Magnesium ion concentration</i>	1,25 mM
Ilość polimerazy DNA / <i>Amount of DNA polymerase</i>	0,625 U
Ilość matrycowego DNA / <i>Amount of template DNA</i>	2,5 ng
Liczba cykli amplifikacji / <i>Number of amplification cycles</i>	30
Wstępna denaturacja / <i>Initial denaturation</i>	2 min w 95°C / <i>2 min at 95°C</i>
Denaturacja / <i>Denaturation</i>	60 s, 95°C / <i>60 s at 95°C</i>
Hybrydyzacja / <i>Hybridisation</i>	60 s, 62°C / <i>60 s at 62°C</i>
Elongacja / <i>Elongation</i>	30 s, 72°C / <i>30 s at 72°C</i>
Końcowa elongacja / <i>Final elongation</i>	5 min, 72°C / <i>5 min at 72°C</i>
Parametr/Parameter	Analiza RFLP/Analysis RFLP
Objętość mieszaniny reakcyjnej / <i>Reaction volume</i>	10 µl
Ilość produktu PCR / <i>Amount of PCR product</i>	5 µl
Ilość enzymu <i>SmaI</i> / <i>Amount of SmaI enzyme</i>	5 U
Stężenie żelu poliakrylamidowego / <i>Polyacrylamide gel concentration</i>	13%

Zastosowana metoda umożliwiła rozróżnienie osób posiadających allel HLA–Cw*06 od osób bez tego allelu.

Wyniki interpretowano następująco:

- a. dwa produkty trawienia: 348 bp i 270 bp – brak allelu HLA–Cw*06
- b. cztery produkty trawienia: 348 bp, 270 bp, 196 bp i 74 bp – osobnik heterozygotyczny z jednym allelem Cw*06
- c. trzy produkty trawienia: 348 bp, 196 bp i 74 bp – osobnik homozygotyczny

Częstość allelu HLA–Cw*06 oznaczona tą metodą była jednak wyższa od wartości uzyskanych we wcześniejszych badaniach z użyciem komercyjnego zestawu Dynal AllsetTM SSP HLA–Cw *low resolution* [204]. Obserwacja ta skłoniła do weryfikacji specyficzności metody RFLP zaproponowanej przez Tazi - Ahniniego i wsp. [208].

W tym celu przeanalizowano wszystkie sekwencje alleli HLA–C dostępne w internetowej bazie danych IMGT/HLA [179] i zbadano potencjalny wynik ich trawienia enzymem *Sma* I. Porównanie dostępnych sekwencji wykazało, że metoda RFLP opisana przez Tazi Ahniniego i wsp. wykorzystuje polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) w sekwencji genu HLA–C:

- w przypadku większości alleli HLA–C w badanym miejscu występuje nukleotyd G w sekwencji CGCGGG, która nie jest rozpoznawana i cięta przez enzym *Sma* I;
- allele Cw*06 posiadają w tym samym miejscu nukleotyd C w sekwencji CCCGGG, która jest rozpoznawana i cięta przez enzym *Sma* I.

Metoda zaproponowana przez Tazi Ahniniego i wsp. [208] okazała się wysoce niespecyficzna, gdyż nukleotyd C posiadają również niektóre podtypy Cw*07 (0704, 0711, 0712, 0745) oraz wszystkie allele Cw*18. Podobnie jak Cw*06 są one cięte przez enzym *Sma* I. Nukleotyd G wyjątkowo występuje również w jednym z podtypów Cw*06, w allelu Cw*060202, który nie jest rozpoznawany przez enzym *Sma* I. Jest to jednak bardzo rzadko występujący allel, zaobserwowany tylko raz w populacji austriackiej jako produkt rekombinacji alleli HLA–C w obrębie egzonu 2. [179].

W dalszym etapie badań do oznaczania allelu HLA Cw*06 wykorzystano metodę PCR–SSP z użyciem pary starterów wg Bunce'a i wsp. [24] z zastosowaniem allelospecyficznych starterów oznaczonych w publikacji ww. autora numerami 367 i 127. Ten etap badań mierzył do rozróżnienia chorych posiadających allel Cw*06 od osób bez tego allelu.

Analiza dostępnych sekwencji alleli HLA–C wykazała, że starter nr 367 specyficznie rozpoznaje niektóre podtypy Cw*03 (0315, 0332), wszystkie allele Cw*04 (z wyjątkiem 0411), wszystkie allele Cw*06, wszystkie allele Cw*07 (z wyjątkiem 0707, 0716), wszystkie allele Cw*18, zaś starter nr 127 specyficznie rozpoznaje wszystkie allele Cw*01 (z wyjątkiem 0105), niektóre podtypy Cw*02 (0205, 0217), niektóre podtypy Cw*03 (0317), wszystkie allele Cw*06, niektóre podtypy Cw*07 (0731), niektóre podtypy Cw*08 (0812), część podtypów Cw*12 (1203, 1204, 1205, 1206, 1207, 1209, 1211, 1212, 1213, 1215, 1219), wszystkie allele Cw*14 oraz wszystkie allele Cw*16 (z wyjątkiem 1606, 1607).

Jednoczesne użycie pary starterów o numerach 367 i 127 umożliwia więc amplifikację praktycznie tylko i wyłącznie alleli Cw*06. Wykorzystano je w dalszym etapie pracy do specyficznej detekcji Cw*06. Niespecyficznie amplifikuje się zaledwie jeden podtyp allelu Cw*07 (0731), który jest bardzo rzadkim podtypem (został zaobserwowany tylko raz w Holandii w próbie o nieznanym pochodzeniu etnicznym) [179].

Tab. 15. Zoptymalizowane warunki amplifikacji i rozdziału elektroforetycznego allelu HLA–Cw*06

Tab. 15. *Optimized conditions of amplification and electrophoretic separation of HLA–Cw*06 allele*

Parametr/parameter	Allel HLA–Cw*06 HLA–Cw*06 allele	Kontrola pozytywna Positive control
Objętość mieszaniny reakcyjnej / <i>Reaction volume</i>	13 µl	
Bufor reakcyjny / <i>Buffer reaction</i>	160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 500 mM Tris-HCl (pH 9,2), 1,75 mM MgCl ₂	
Stężenie dNTP / <i>dNTP concentration</i>	350 µM	
Stężenie starterów / <i>Primer concentration</i>	0,5 µM	0,064 µM
Ilość polimerazy DNA <i>Amount of DNA polymerase</i>	0,1875 U	
Ilość matrycowego DNA <i>Amount of template DNA</i>	5 ng	
Liczba cykli amplifikacji <i>Number of amplification cycles</i>	30	
Wstępna denaturacja <i>Initial denaturation</i>	2 min w 96°C	
Denaturacja / <i>Denaturation</i>	25 s w 96°C	
Hybrydyzacja / <i>Hybridisation</i>	60 s w 64°C	
Elongacja / <i>Elongation</i>	120 s w 72°C	
Końcowa elongacja <i>Final elongation</i>	5 min w 72°C	
Stężenie żelu poliakrylamidowego <i>Polyacrylamide gel concentration</i>	13%	

Ważnym aspektem prowadzonych badań była konieczność optymalizacji tej metody. Amplifikacja DNA izolowanego od osób posiadających allel Cw*06, którego obecność uprzednio oznaczona była komercyjnym zestawem, nie dostarczała początkowo specyficznego produktu amplifikacji wielkości 297 bp. Dopiero zastąpienie standardowego buforu do amplifikacji (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9,1), 0,1% Triton X-100) buforem z siarczanem amonu (160 mM (NH₄)₂SO₄, 500 mM Tris-HCl pH 9,2) okazało się kluczowym czynnikiem, który pozwolił na specyficzną amplifikację allelu Cw*06 przy użyciu tej pary starterów. Dodatkowo przed rozpoczęciem rutynowych oznaczeń zoptymalizowano warunki reakcji PCR mogące wpływać na jej efektywność i specyficznosc, tj. temperaturę i czas trwania poszczególnych etapów, liczbę cykli, stęże-

nia składników mieszaniny reakcyjnej i jej objętość, a także ilość matrycowego DNA (tab. 15).

Koniecznym elementem badań było również wykluczenie wyników fałszywie ujemnych. W tym celu niezbędne było włączenie wewnętrznej kontroli pozytywnej, do amplifikacji której zastosowano tę samą parę starterów, użytą w technice PCR–RFLP, co wyeliminowało koszty syntezy dodatkowych oligonukleotydów.

Wyniki interpretowano następująco:

- jeden fragment wielkości 618 bp → pozytywna kontrola amplifikacji przy braku allelu Cw*06,
- dwa fragmenty: 618 bp i 297 bp → obecność allelu Cw*06 (ryc. 19, etap a).

Kolejny etap badań zmierzał do rozróżnienia heterozygot i homozygot u pacjentów z allelem Cw*06. W tym celu DNA pacjentów Cw*06 dodatnich poddano opisanej wcześniej analizie PCR–RFLP wg Tazi Ahniniego i wsp. [208] w zoptymalizowanych uprzednio warunkach. Ponieważ fragment wielkości 74 bp nie miał wartości różnicującej, warunki elektroforezy zoptymalizowano tak, aby fragmenty wielkości 348, 270 i 196 bp były jak najlepiej rozdzielone, co wiązało się z tym, że fragment ten migrował w żelu poza granicę analizowanych fragmentów.

Ostatecznie dla próbek Cw*06 dodatnich możliwe były dwa wyniki;

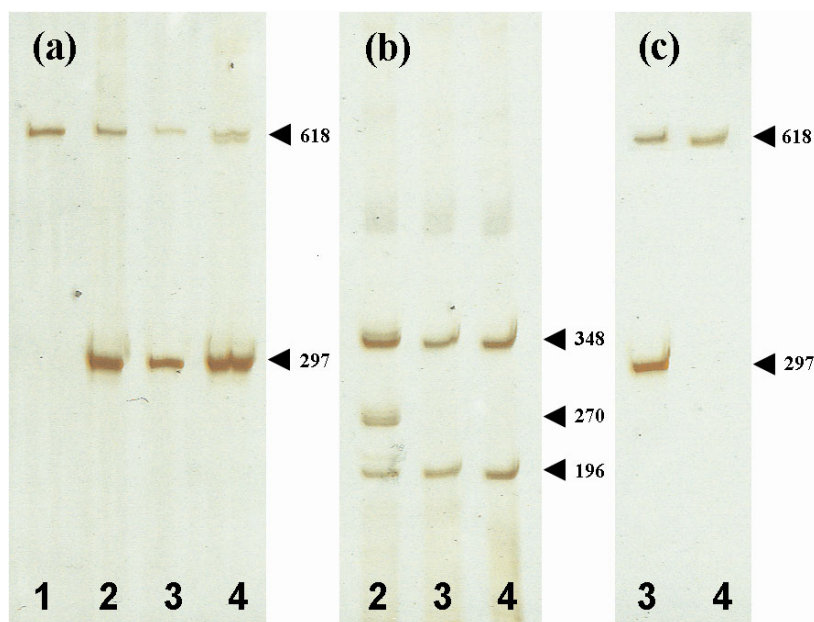
- trzy produkty trawienia: 348 bp, 270 bp i 196 bp → osobnik heterozygotyczny z tylko jednym allelem Cw*06,
- dwa produkty trawienia 348 bp i 196 bp → pacjenci z Cw*06 i drugim allelem trawionym *Sma*I (Cw*06 lub Cw*07 lub Cw*18) (ryc. 19, etap b).

Z uwagi na wykazaną niespecyficzność metody PCR–RFLP, w przypadku próbek z dwoma produktami trawienia (348 i 196 bp) należało dodatkowo zweryfikować, czy drugim allelem jest Cw*06 czy też inny allel, nieswoiście rozpoznawany przez enzym *Sma*I. W tym celu zmodyfikowano starter nr 127 zastosowany w pierwszym etapie analizy, zastępując go starterem zdegenerowanym o sekwencji GGTCGCAGCCAWACATCCT (W=A/T), przy czym nie wiązało się to z koniecznością ponownej optymalizacji.

Starter ten specyficznie rozpoznawał niektóre podtypy Cw*01 (0105), wszystkie allele Cw*02 (z wyjątkiem 0205, 0217), wszystkie allele Cw*03 (z wyjątkiem 0317), wszystkie allele Cw*04, wszystkie allele Cw*05, wszystkie allele Cw*07 (z wyjątkiem 0731), wszystkie allele Cw*08 (z wyjątkiem 0812), część podtypów Cw*12 (1202, 1208, 1210, 1214, 1216, 1217, 1218), wszystkie allele Cw*15, niektóre podtypy Cw*16 (1606, 1607), wszystkie allele Cw*17 oraz wszystkie allele Cw*18. Jednoczesne użycie startera nr 367 i zmodyfikowanego startera nr 127 umożliwiło więc amplifikację następujących alleli: niektórych podtypów Cw*03 (0315, 0332), wszystkich alleli Cw*04 (z wyjątkiem 0411), wszystkich alleli Cw*07 (z wyjątkiem 0707, 0716, 0731), wszystkich alleli Cw*18.

Powyżej opisana nowa para starterów pozwoliła na rozpoznanie wszystkich alleli niespecyficznie trawionych w analizie RFLP. Razem z kontrolą dodatnią amplifikacji (fragment genu HLA-C wielkości 618 bp) została ona wykorzystana do sprawdzania, czy drugim allelem w próbce Cw*06 dodatniej jest allel Cw*07 lub allel Cw*18.

Wyniki typowania allelu HLA–Cw*06 przy użyciu zaproponowanej metody przedstawia ryc. 19.



Ryc. 19. Ocena obecności i zygotywności allelu HLA–Cw*06.

Etap a (deteckcja Cw*06):

- ścieżka 1 – pozytywna kontrola amplifikacji (618 bp), brak allelu Cw*06;
- ścieżki 2–4 – allel Cw*06 obecny (297 bp).

Etap b (różnicowanie homo- and heterozygot):

- ścieżka 2 – widoczne trzy fragmenty (348 bp, 270 bp, 196 bp), heterozygota Cw*06;
- ścieżki 3–4 – widoczne dwa fragmenty (348 bp, 196 bp), pacjenci z Cw*06 i drugim allelem trawionym *SmaI* (Cw*06 lub Cw*07 lub Cw*18).

Etap c (deteckcja niespecyficznego trawionego Cw*07 and Cw*18):

- ścieżka 3 – obecny Cw*07 lub Cw*18 (297 bp), heterozygota Cw*06;
- ścieżka 4 – pozytywna kontrola amplifikacji (618 bp), homozygota Cw*06/Cw*06.

Fig. 19. Detection and zygosity status verification of HLA–Cw*06 allele.

Stage a (detection of Cw*06):

- sample 1 – positive control of amplification (618 bp), lack of Cw*06 allele;
- samples 2–4 – Cw*06 present (297 bp).

Stage b (discrimination of homo- and heterozygotes):

- sample 2 – three fragments visible (348 bp, 270 bp, 196 bp), heterozygote with Cw*06;
- samples 3–4 – two fragments visible (348 bp, 196 bp), patients with Cw*06 and a second allele digested by *SmaI* (Cw*06 or Cw*07 or Cw*18).

Stage c (detection of unspecifically digested Cw*07 and Cw*18):

- sample 3 – Cw*07 or Cw*18 present (297 bp), heterozygote with Cw*06
- sample 4 – positive control of amplification (618 bp), homozygota Cw*06/Cw*06

Wyniki badań interpretowano następująco:

- jeden fragment wielkości 618 bp → pozytywna kontrola amplifikacji przy braku allelu Cw*07 lub Cw*18 → homozygota Cw*06/Cw*06,
- dwa fragmenty: 618 bp i 297 bp → obecność allelu Cw*07 lub Cw*18 → heterozygota, która posiada allel Cw*06 i drugi, inny niż Cw*06 allel (Cw*07 lub Cw*18) (ryc. 19, etap c).

Ostatecznie do badań stosowano procedurę przebiegającą w trzech etapach:

1. Amplifikacja allelu HLA–Cw*06 metodą PCR–SSP (100% analizowanych próbek).
2. Analiza PCR–RFLP (ok.40% analizowanych próbek).
3. Amplifikacja alleli HLA–Cw*07 i Cw*18 metodą PCR–SSP (ok. 3,5% analizowanych próbek).

4.3. Porównanie częstości występowania allelu HLA–Cw*06 oznaczonego przy użyciu zoptymalizowanej techniki PCR–SSP i PCR–RFLP u pacjentów z łuszczycą zwyczajną, chorych z *pustulosis palmo-plantaris* i pacjentów z łuszczycą kropelkową z częstościami występowania tego allelu w grupach kontrolnych.

W celu wewnętrznej kontroli u 64 chorych, u których obecność allelu HLA–Cw*06 oznaczono z zastosowaniem zoptymalizowanej techniki PCR–SSP i PCR–RFLP allel ten oznaczono przy użyciu komercyjnego zestawu Dynal AllsetTM SSP HLA–Cw *low resolution* uzyskując pełną zgodność ocenionych genotypów.

Aby ocenić przydatność opisanej metody w dużych badaniach populacyjnych, zastosowano ją do analizy występowania allelu HLA–Cw*06 u 383 chorych na łuszczycę zwyczajną rozpoczynającą się powyżej 30. roku życia, 30 osób z *pustulosis palmo-plantaris* i 25 chorych z łuszczycą kropelkową.

Obecność tego allelu stwierdzono u 138 chorych na łuszczycę zwyczajną (36,0%). W grupie tej było 132 heterozygot i 6 homozygot. W populacji kontrolnej allel HLA–Cw*06 występował u 33 chorych (25,2%), wszyscy badani byli heterozygotami. Różnice częstości występowania allelu HLA–Cw*06 były statystycznie znamienne ($p=0,017$).

W celu sprawdzenia, czy istnieje korelacja pomiędzy występowaniem allelu HLA–Cw*06, a początkiem choroby rozpoczynającej się po 30. roku życia, pacjentów podzielono w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się łuszczycę, na 5-letnie przedziały wiekowe i porównano z występowaniem allelu HLA–Cw*06 w grupie kontrolnej. Na poziomie istotności $\alpha=0,05$, częstość HLA–Cw*06 była znamienne wyższa u chorych na łuszczycę w porównaniu do grupy kontrolnej w trzech pierwszych przedziałach wiekowych: z początkiem łuszczycy między 30 a 34 rokiem życia ($p=0,0003$), między 35 a 39 rokiem życia ($p=0,02$) oraz między 40 a 44 rokiem życia ($p=0,02$). Jednakże po zastosowaniu poprawki Bonferroniego dla testów wielokrotnych statystycznie istotna pozostała jedynie pierwsza z obserwowanych różnic w częstościach allelu HLA–Cw*06 (między 30 a 34 rokiem życia). Aby zredukować możliwość niewykrycia znamienności

różnic w częstościach allelu HLA–Cw*06, wynikającą z zastosowania poprawki Bonferroniego o wysokiej zachowawczości, pacjenci i chorzy zostali pogrupowani ponownie w przedziały 10-letnie w ten sposób, że oba przedziały o różnicy w częstości HLA–Cw*06, która była statystycznie istotna przed zastosowaniem poprawki Bonferroniego (czyli z początkiem łuszczycy między 35 a 39 oraz między 40 a 44 rokiem życia), zostały połączone w jeden przedział wiekowy (tab. 16). Różnice w częstości HLA–Cw*06 okazały się wówczas znamienne wyższe u pacjentów z łuszczycą w porównaniu do grupy kontrolnej aż do 44 roku życia, nawet po zastosowaniu poprawki Bonferroniego ($p_{\text{corr}} \leq 0,04$). Wszystkie pozostałe przedziały wiekowe nie wykazywały korelacji z allelem HLA–Cw*06.

Tab. 16. Porównanie częstości występowania allelu HLA–Cw*06 oznaczonego przy użyciu zoptimalizowanej techniki PCR-SSP i PCR-RFLP u pacjentów z łuszczycą zwyczajną (n=383) i w grupie kontrolnej (n=143)

Tab. 16. Comparison of HLA–Cw*06 allele frequencies typed with optimised PCR-SSP and PCR-RFLP in patients with psoriasis vulgaris (n=383) and controls (n=143)

Wiek początku łuszczycy <i>Age of onset</i>	30-34	35-44	45-54	55-64	≥65	Razem <i>Total</i>
Pacjenci / <i>Patients</i>	44	99	105	78	57	383
Częstość Cw*06 w grupie pacjentów <i>Cw*06 frequency among patients [%]</i>	30,7	22,2	16,2	14,1	14,9	18,8
Grupa kontrolna - osoby, które osiągnęły wiek początku łuszczycy pacjentów <i>Controls who reached the age of psoriasis onset among patients</i>	143	126	109	80	49	143
Częstość Cw*06 w grupie kontrolnej <i>Cw*06 frequency among controls [%]</i>	12,6	12,3	11,9	8,8	7,1	12,6
Wartość p (test dokładny Fishera) / <i>P value (Fisher's exact test)</i>	0,0003*	0,0072 [†]	0,2132	0,1578	0,0851	0,0168

* $p_{\text{corr}} = 0,0013$

[†] $p_{\text{corr}} = 0,0358$

Porównanie częstości występowania allelu HLA–Cw*06 w populacji 30 chorych z PPP i w grupie kontrolnej (n=114) nie wykazało statystycznie istotnych różnic w obu grupach (test dokładny Fishera, $p=1,000$).

Analiza częstości występowania allelu HLA–Cw*06 w populacji chorych na łuszczycę kropelkową (n=25) i w grupie kontrolnej (n=69) wykazała, że grupy te różnią się statystycznie znamienne. Częstość występowania allelu HLA–Cw*06 u pacjentów z łuszczycą kropelkową wynosiła 32,0%, zaś w populacji kontrolnej 18,1% (test dokładny Fishera, $p=0,049$).

4.4. Korelacja występowania allelu HLA-Cw*06 z wywiadem rodzinnym i z wybranymi klinicznymi cechami łuszczycy zwyczajnej z początkiem powyżej 30. roku życia.

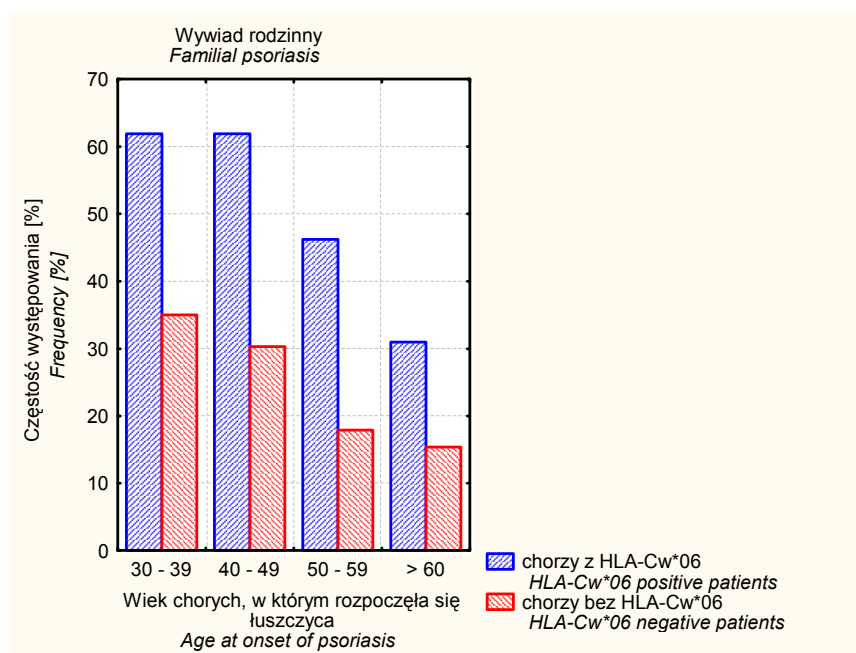
Analiza częstości występowania dodatniego wywiadu rodzinnego u chorych z allelem HLA-Cw*06 i u pacjentów bez HLA Cw*06 w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się łuszczycyca wykazała, że częstość rodzinnego występowania łuszczycy malała wraz z wiekiem, w którym rozpoczyna się choroba w obu analizowanych grupach chorych ($p=0,04$, test trendu Kruskala-Wallisa) (tab. 17, ryc. 20).

Tab. 17. Częstość rodzinnego występowania łuszczycy u chorych HLA-Cw*06(+) i HLA-Cw*06(-), w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się choroba

Tab. 17. *Familial psoriasis in HLA-Cw*06(+) and HLA-Cw*06(-) patients in correlation with age of onset*

Wywiad rodzinny <i>Familial history</i>	Początek łuszczycy <i>Age of onset of psoriasis</i>									
	30 - 39		40 - 49		50 - 59		≥ 60		Razem <i>Total</i>	
	Cw6 +	Cw6 -	Cw6 +	Cw6 -	Cw6 +	Cw6 -	Cw6 +	Cw6 -	Cw6 +	Cw6 -
Dodatni wywiad rodzinny (%) <i>Positive familial history</i>	61,9	35,0	61,9	30,3	46,2	17,9	31,0	15,4	52,6	23,6
Pokrewieństwo I° (%) <i>Relationship I° (%)</i>	57,1	25,0	52,4	26,3	28,0	15,1	24,1	12,3	43,5	19,4
Pokrewieństwo II° (%) <i>Relationship II° (%)</i>	7,1	5,0	9,5	3,9	16,0	3,0	6,9	1,6	9,5	3,3
Pokrewieństwo III° (%) <i>Relationship III° (%)</i>	16,7	10,0	7,1	3,9	19,2	1,5	6,9	1,5	11,7	3,3

* $p=0,04$, test trendu Kruskala - Wallisa / * $p=0,04$, *Kruskal - Wallis trend test*



Ryc. 20. Częstość występowania dodatniego wywiadu rodzinnego u chorych HLA-Cw*06 (+) i HLA Cw*06 (-) w zależności od wieku, w którym rozpoczęła się łuszczyca

Fig. 20. *Familial psoriasis in HLA-Cw*06 (+) and HLA-Cw*06 (-) patients in correlation with age of onset*

Porównanie chorych z allelem HLA-Cw*06 z chorymi bez tego allelu pod względem znaczenia czynników prowokujących wysiewy i wybranych cech charakteryzujących obraz kliniczny i przebieg łuszczyca wykazało, że grupy te różnią się pod względem częstości występowania łuszczyca fałdów oraz erytrodermii łuszczycowej (tab. 18). Postaci te częściej występowały u chorych Cw*06 ujemnych (odpowiednio: 11,3% i 6,3%), niż u chorych z tym allelem (4,4% i 1,0%). Różnice w częstościach występowania obu postaci łuszczyca u chorych Cw*06 (+) i Cw*06 (-) były statystycznie znaczące zarówno w odniesieniu do całej analizowanej populacji chorych (n=383), jak i wyodrębnionej populacji pacjentów z łuszczycą rozpoczynającą się poniżej 45. roku życia (n=143) (p<0,05).

Wykazano ponadto, że u chorych bez allelu HLA-Cw*06 częściej, niż u chorych z tym allelem występuje łuszczyca ciężka, łuszczyca niestabilna oraz łuszczycowe zapalenie stawów, natomiast w grupie chorych HLA-Cw*06 (+) stwierdzono występowanie łuszczyca kropelkowatej (p<0,05). Ponadto u chorych HLA-Cw*06 (+) częściej, niż u chorych HLA-Cw*06 (-) pierwszy w życiu wysiew przyjmował tę kliniczną formę choroby (p<0,05).

Tab. 18. Porównanie wybranych parametrów charakteryzujących obraz kliniczny i przebieg łuszczycy u pacjentów HLA-Cw*06 (+) i HLA-Cw*06 (-) w całej populacji (n=383) i w grupie chorych z początkiem łuszczycy <45. roku życia (n=143)

Tab. 18. Comparison of chosen parameters characterizing psoriasis phenotype and its course in HLA-Cw*06 (+) and HLA-Cw*06 (-) patients in whole population (n=383) and in group with onset <45 y (n=143)

Parametr Parameter	Wszyscy chorzy All patients (n=383)		Chorzy z początkiem łuszczy- cy <45 r.ż. Patients age of onset <45 y. (n= 143)	
	Cw*06 + n=138	Cw*06 - n=245	Cw*06 + n=69	Cw*06 - n=74
Stres /Stress	45,3/41,9	53,5/42,2	36,2/52,2	27,0/56,9
Infekcja / Infection	19,7/12,4	20,7/9,4	21,7/26,1	13,7/28,2
Stres+infekcja Stress+infection	56,2/51,5	63,0/50,6	55,1/63,8	41,1/66,7
Pierwszy/kolejne wysiewy / First and next relapses				
Ograniczona / Localized	70,7/62,7	74,1/64,6	69,4/60,9	69,2/61,6
Faldów / Intertriginous	2,4/4,4*	3,7/11,3*	1,6/5,8*	1,5/11,0*
Łojotokowa / Seborrhoeic	0,0/0,7	0,9/1,7	0,0/1,5	1,5/2,7
Głowy / Scalp	18,7/25,5	19,4/29,6	16,1/21,7	15,4/23,2
Dłoni i stóp / Palms soles	5,7/7,3	5,1/7,5	4,8/10,2	4,6/6,9
Plackowata ograniczona Plaque localized	43,9/49,6	44,9/50,0	46,8/52,2	46,2/46,6
Rozległa / Widespread	27,6/37,2	23,1/35,0	30,6/37,7	29,2/39,7
Plackowata / Plaque	19,5/32,9	20,4/27,5	17,7/30,4	23,1/28,8
Kropelkowata / Guttate	6,5*/3,7*	0,9*/1,0*	12,9*/7,3*	1,5*/1,4*
Erytrodermia /Erythroderma	0,8/1,0*	0,5/6,3*	0,0/1,5*	1,5/9,6*
Krostkowa uogólniona Pustular generalized	0,8/1,5	1,4/1,7	0,0/0,0	3,1/4,1
Łuszczyca niestabilna Unstable psoriasis	24,8*	35,0*	27,5	42,4
Ogniska cienkie Thin lesions	74,5	65,0	81,2	68,5
Łuszcza ciężka Severe psoriasis	27,7*	37,4*	27,5	43,2
PASI	9,80 ± 8,75	11,31 ±11,60	10,36±8,59	13,16±13,11
Łzs / Psoriatic arthritis	9,5*	17,5*	11,6	23,0
Zajęcie paznokci dłoni Nail psoriasis	33,6	34,2	40,6	45,2
Ciągły przebieg łuszczycy Continuous course	73,7	73,5	62,7	59,7

* $p < 0,05$, test χ^2 / $p < 0,05$, χ^2 test

5. Dyskusja

Dwieście lat temu łuszczyca została opisana jako jednorodna choroba skóry. Współcześnie wiadomo, że choroba ta obejmuje wiele podtypów klinicznych różniących się między sobą morfologią, umiejscowieniem zmian, przebiegiem, ciężkością, a także wiekiem, w którym choroba się rozpoczyna [34]. Ta ostatnia cecha stanowi jedno z kryteriów zaproponowanego w 1984 roku przez Henselera i Christophersa podziału choroby na typ I – wczesny i typ II – późny [97]. O ile łuszczyca wczesna będąca przedmiotem wielu badań jest dobrze zdefiniowanym typem choroby często kojarzącym się z dodatnim wywiadem rodzinnym i występowaniem allelu HLA-Cw*06, to na temat łuszczycy późnej, występującej u zaledwie 10-20% chorych, ukazały się nieliczne doniesienia [3, 61]. Jej charakterystyka genotypowa i fenotypowa jest jak dotąd fragmentaryczna.

Przeprowadzone badania kliniczne objęły dużą populację chorych z łuszczycą zwyczajną rozpoczynającą się po trzydziestym roku życia, którą w niniejszym opracowaniu uznano za łuszczycę z późnym początkiem. Mimo, że w większości doniesień za wiek rozgraniczający łuszczycę wczesną od późnej przyjmuje się zgodnie z klasyfikacją autorów niemieckich, czterdziesty rok życia [97], to kryterium wieku, w którym rozpoczyna się łuszczyca późna jest zmienne [49, 61].

W największej liczbie populacji poddanej analizie epidemiologicznej przez Ferrandiza i wsp. [61] przyjęto taką samą, jak w niniejszej pracy definicję łuszczycy późnej. Włączenie do badanej grupy chorych z łuszczycą rozpoczynającą się w czwartej dekadzie życia wynikało także z założonego w niniejszej pracy celu dotyczącego analizy genetycznej tej populacji pacjentów.

Do badań klinicznych włączono 404 chorych. Dane z piśmiennictwa wskazują, że liczniejszą, niż w niniejszym opracowaniu populację osób z łuszczycą rozpoczynającą się powyżej 30. roku życia objęła jedynie ocena kliniczna chorych pochodzących z Półwyspu Iberyjskiego [61].

Należy podkreślić, że analizy epidemiologiczne łuszczycy ze względu na różnorodność obrazu klinicznego i naturalny przebieg choroby, a także stosowanie różnych technik uzyskiwania danych są trudne [113, 157, 161]. Szczególnie istotny jest taki dobór chorych, aby stanowili oni grupę reprezentatywną dla całej populacji osób z łuszczycą. Z tego też względu dla celów niniejszego opracowania pacjentów rekrutowano z różnych źródeł (oddziały szpitalne, poradnie, stowarzyszenia zrzeszające chorych na łuszczycę). Nie można jednak wykluczyć, że analizowana populacja nie objęła chorych z łagodną, niewymagającą leczenia postacią łuszczycy. Fakt ten należy uwzględnić interpretując uzyskane wyniki.

Analiza publikacji dotyczących epidemiologii łuszczycy wskazuje także, że definicja początku łuszczycy nie jest precyzyjnie określona. Za początek choroby uznawany jest wiek, w którym zmiany charakterystyczne dla tej dermatozy stwierdzane są po raz pierwszy przez chorego lub też za warunek pierwszego rozpoznania łuszczycy przyjmuje się potwierdzenie choroby przez lekarza [85, 157, 158]. W niniejszej pracy za początek choroby przyjęto stwierdzenie zmian łuszczycowych na skórze gładkiej i/lub paznokciach i/lub skórze owłosionej głowy przez chorych. U większości z tych osób rozpoznanie choroby było w krótkim okresie czasu potwierdzone przez dermatologa. Nie można jednak wykluczyć, że u niewielkiego odsetka badanych zmiany rozpoznane po raz pierwszy jako łuszczycowe mogły mieć inny charakter. Interpretując wyniki należy

również wziąć pod uwagę możliwość występowania minimalnych zmian, nie rozpoznanych przez chorych jako zmiany łuszczycowe, a utrzymujących się na skórze w różnym czasie przed potwierdzeniem choroby przez lekarza.

W analizowanej populacji chorych łuszczycy rozpoczęła się wcześniej u mężczyzn, niż u kobiet, co jest zgodne z danymi z piśmiennictwa [57, 61, 97]. Odwrotną zależność, to znaczy wcześniejsze pojawienie się łuszczycy u kobiet niż u mężczyzn obserwuje się w typie wczesnym choroby [4, 57, 61, 74, 97, 116, 165] i tłumaczy się między innymi wpływem hormonów płciowych na ujawnienie się choroby u płci żeńskiej a także, zgodnie z jedną z hipotez, większą gotowością kobiet do rozwoju reakcji typu Th1 [234].

Analiza rozkładu liczebności chorych w poszczególnych dekadach wieku, w których choroba się rozpoczęła wykazała, że osoby z łuszczycą rozpoczynającą się w późniejszych okresach życia stanowiły mniejszość badanej populacji. U 23,7% chorych łuszczycy zaczęła się po sześćdziesiątym roku życia. Zaledwie 7,9% badanej grupy stanowiły osoby, u których dermatozą tą pojawiła się po raz pierwszy w ósmej dekadzie życia. Stwierdzone znaczące obniżenie zachorowalności na łuszczycę po siedemdziesiątym roku życia potwierdza obserwacje innych autorów [61, 74, 57] i może być spowodowane rzeczywistą zmniejszoną zapadalnością na tę dermatozę osób starszych z powodu mniejszego narażenia na czynniki środowiskowe prowokujące pojawienie się choroby. Nie można jednak wykluczyć, że w związku z częstym współistnieniem w tej grupie wiekowej innych przewlekłych schorzeń chorzy rezygnują z leczenia łuszczycy o niewielkim nasileniu. Za tą możliwością pośrednio przemawiają obserwacje badaczy włoskich, którzy wykazali, że pacjenci chorujący na łuszczycę i inne przewlekłe choroby akceptują tę dermatozę w większym stopniu, niż chorzy na łuszczycę bez towarzyszących schorzeń innych narządów [188]. Nie bez znaczenia wydaje się również zwiększona w porównaniu do całej populacji śmiertelność starszych osób chorujących na łuszczycę, związana z częstym współistnieniem z tą dermatozą innych przewlekłych chorób [157, 192].

Na podstawie wywiadu zabranego od pacjentów podjęto próbę retrospektywnej oceny roli czynników środowiskowych w prowokacji łuszczycy, a także ustalenia fenotypu choroby w trakcie jej pierwszego wysiewu. Badania, których celem była kliniczna charakterystyka pierwszego w życiu wysiewu łuszczycy prowadzone były jedynie w populacji szwedzkiej obejmującej 400 chorych, w tym 196 osób z łuszczycą rozpoczynającą się po czterdziestym roku życia [129]. Miały one prospektywny charakter i w związku z tym pozbawione były tzw. ryzyka błędu zapomnienia (*recall bias*) [38]. Błąd ten należy brać pod uwagę interpretując wyniki niniejszej analizy. Na uzyskane dane wpływać może także interesująca obserwacja Barzilaj [18] ujawniająca, że chorzy z łuszczycą o wieloletnim przebiegu znając czynniki środowiskowe prowokujące kolejne nawroty choroby częściej, niż wynika to z rzeczywistości wskazują na ich znaczenie w prowokacji pierwszego w życiu wysiewu łuszczycy.

Największy odsetek badanych chorych (42,7%) wiązał pojawienie się zmian na skórze po raz pierwszy w życiu z poprzedzającym je określonym wydarzeniem życiowym powodującym silny stres psychiczny. Wartość ta jest zbliżona do obserwowanej w prospektywnym badaniu Mallbrisa [129]. Znaczenie silnego stresu psychicznego w prowokacji zmian łuszczycowych rosło w poszczególnych dekadach wieku początku choroby; w grupie chorych z początkiem łuszczycy u pięćdziesięciolatków dotyczyło największego odsetka pacjentów. Kolejne nawroty łuszczycy niezależnie od wieku, w którym choroba się rozpoczęła chorzy również wiązali z silnym stresem psychicznym.

Znaczenie stresu psychicznego w prowokacji łuszczycy znane jest od dawna. W klasycznej epidemiologicznej analizie Farbera z 1984 roku obejmującej 5600 chorych na łuszczycę wykazano, że stres psychiczny poprzedził pojawienie się tej dermatozy po raz pierwszy w życiu u 40% badanych, zaś 37% chorych obserwowało wyraźne pogorszenie choroby w okresach zmartwień [57]. Od tego czasu ukazały się liczne doniesienia potwierdzające znaczenie stresu psychicznego w prowokacji i zaostrzeniach łuszczycy [10, 66, 68, 129, 161, 155]. Pojedyncze doniesienia nie potwierdziły tego związku [19, 170].

W stosowanej powszechnie skali do określenia stopnia nasilenia stresu Holmesa i Rahe – SRRS (ang. *Social Readjustment Rating Scale*), do której odnoszono się w niniejszym badaniu śmierć lub choroba współmałżonka, utrata pracy i przejście na emeryturę stanowiły życiowe sytuacje, będące przyczyną stresu psychicznego o największym nasileniu [99]. Na te stresory najczęściej wskazywali chorzy z początkiem łuszczycy w szóstej dekadzie życia.

Obserwowane u osób z początkiem łuszczycy w/powyżej 60. roku życia mniejsze znaczenie stresu psychicznego w prowokacji wysiewów łuszczycy jest zgodne z obserwacjami wykazującymi mniejszą podatność osób starszych na działanie stresu psychicznego [161,187].

Stres psychiczny może wpływać na funkcje immunologiczne zarówno u ludzi, jak i u zwierząt doświadczalnych poprzez wpływ na funkcjonowanie osi podwzgórzowo-przysadkowo, zmiany stężenia glikokortykosteroidów i w konsekwencji nadreaktywności układu immunologicznego (droga hormonalna) [209]. Wykazano, że stres psychiczny pobudza odpowiedź limfocytów T pomocniczych z polaryzacją w kierunku reakcji typu Th1 [127], wzmacnia migrację komórek dendrytycznych do węzłów chłonnych i nasila antygenowo specyficzną odpowiedź limfocytów T. To wielokierunkowe działanie stresu psychicznego ma także związek z uwalnianiem neuropeptydów z zakończeń nerwów współczulnych (droga nerwowa) [171, 184]. Badania Fortuna i wsp. [67] wykazały, że stres psychiczny stanowi nie tylko istotny czynnik prowokujący wysiewy łuszczycy, lecz wpływa także na skuteczność leczenia przeciwłuszczycowego. Autorzy dowiedli, że u podatnych na stres psychiczny chorych leczonych metodą fotochemoterapii remisje uzyskuje się później, niż u pacjentów lepiej tolerujących sytuacje stresowe.

Stwierdzona w niniejszym badaniu, a potwierdzająca obserwacje innych autorów rola silnego stresu psychicznego w prowokacji łuszczycy opiera się, podobnie jak w większości doniesień na analizie retrospektywnej. Zgodnie z obserwacjami Pikardiego [170] osoby z łuszczycą o wieloletnim przebiegu wykazują raczej tendencję do pomniejszania roli silnego stresu psychicznego w prowokacji pierwszego wysiewu łuszczycy, niż nadinterpretowania znaczenia tego czynnika. Z drugiej jednak strony analiza Fortuna [65] dotycząca wiedzy i poglądów pacjentów na temat łuszczycy wykazała ich dużą znajomość znaczenia stresu psychicznego w prowokacji nawrotów i zaostrzeń tej choroby. Możliwe jest zatem, że wielu chorych chcąc znaleźć uzasadnienie dla pojawienia się choroby po raz pierwszy, szczególnie w odległej przeszłości, fałszywie wskazuje na znaczenie sytuacji stresowych w prowokacji choroby.

Przeprowadzone badania nie uwzględniły ponadto cech osobowościowych badanych osób. Ich ocena przekracza zakres niniejszych badań. Cechy te, zgodnie z współczesną teorią stresu mają zasadnicze znaczenie w sposobach radzenia sobie z sytuacją stresową [10, 63, 64, 90, 91]. Wydaje się, że w prowokacji łuszczycy ważną, a pomijaną w badaniach rolę odgrywać mogą inne źródła stresu psychicznego, np. codzienny, przewlekły stres [170]. Ich wpływ na ujawnienie się i przebieg łuszczycy wymaga dalszych badań.

Wiele klinicznych obserwacji świadczy o znaczeniu infekcji w prowokacji i/lub zaostrzeniu przebiegu łuszczycy. Szczególne znaczenie przypisuje się infekcji wywołanej *Streptococcus pyogenes*. Inne drobnoustroje, takie jak *Staphylococcus aureus*, *Malassezia* i *Candida* wydają się odpowiadać raczej za zaostrzenia przebiegu choroby, niż jej wywołanie. W skórze łuszczycowej wykryto także wirusy HPV5, retrowirusy i HERVs, ale ich rola w patogenezie choroby jest jak dotąd niejasna [131, 136, 226].

U odpowiednio 11% i 20,6% chorych pojawienie się pierwszego i kolejnych wysiewów łuszczycy było poprzedzone chorobą infekcyjną. Infekcje jako czynnik prowokujący ujawnienie się łuszczycy stwierdzano najczęściej u osób z początkiem choroby poniżej czterdziestego roku życia. Znaczenie tego czynnika malało wraz z wiekiem, w którym rozpoczęła się łuszczycyca. Zaledwie 8,2% chorych z łuszczycą rozpoczynającą się w /po sześćdziesiątym roku życia kojarzyło pojawienie się dermatozy po raz pierwszy z przebytą infekcją górnych i dolnych dróg oddechowych, rzadziej przewodu pokarmowego i dróg moczowych. U żadnej z tych osób nie stwierdzono korelacji pierwszego i kolejnych wysiewów łuszczycy z infekcją paciorkowcową migdałków podniebiennych. Związek taki wykazano natomiast u 15 chorych, w większości z łuszczycą rozpoczynającą się między trzydziestym a czterdziestym rokiem życia. Obserwowana korelacja zapalenia gardła o paciorkowcowej etiologii (potwierdzona dodatnim wynikiem posiewu z wymazu z gardła i/lub podwyższonym poziomem przeciwciał paciorkowcowych w surowicy krwi) z wysiewem łuszczycy kropelkowej lub z kropelkowatym wysiewem w przebiegu łuszczycy plackowatej stanowi potwierdzenie etipatogenetycznego związku paciorkowców z tą szczególną postacią choroby, potwierdza także większą skłonność młodszych pacjentów do rozwoju tej klinicznej formy łuszczycy [197, 230].

Śród innych czynników prowokujących pierwszy i kolejne wysiewy łuszczycy, chorzy najrzadziej wskazywali na urazy fizyczne oraz leki. Rola urazu fizycznego w prowokacji zmian łuszczycowych w badanej grupie dotyczyła niewielkiego odsetka osób. Na znaczenie tego czynnika wskazywało zaledwie 10 chorych, w większości byli to pacjenci z aktywnymi, wysiewnymi postaciami łuszczycy. Uraz fizyczny skóry jest znanym czynnikiem indukującym powstanie grudek łuszczycowych; szacuje się, że występuje u 1/4 chorych z wysiewną postacią łuszczycy, częściej też stwierdzany jest u osób z łuszczycą wczesną, co tłumaczy sporadyczną częstość występowania tego objawu w analizowanej populacji chorych [129, 142, 178, 231].

Dziewiętnastu chorych wiązało pojawienie się łuszczycy po raz pierwszy z lekami: beta blokerami, a także kortykosteroidami przyjmowanymi ogólnie. U trzech osób łuszczycyca ujawniła się w trakcie leczenia interferonem wirusowego zapalenia wątroby typu C. Na związek łuszczycy z lekami najczęściej, co jest zgodne z oczekiwaniami, wskazywali chorzy z początkiem choroby w/powyżej sześćdziesiątego roku życia, przyjmujący leki z powodu współistnienia innych przewlekłych chorób.

Związek leków z pojawieniem się łuszczycy po raz pierwszy w życiu jest nadal przedmiotem dyskusji [36], dlatego interpretacja danych uzyskanych z wywiadu powinna być ostrożna. Nie można wykluczyć, że wśród badanych 19. osób retrospektywnie wskazujących na korelację stosowanych środków farmakologicznych z pojawieniem się łuszczycy po raz pierwszy znajdowali się chorzy z nierozpoznaną wcześniej z powodu niewielkiego nasilenia zmian na skórze łuszczycą. Lit, beta-blokery, leki antymalaryczne, niesterydowe leki przeciwzapalne oraz inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę wymieniane są najczęściej wśród leków zaostrzających łuszczycę lub powodujących jej oporność na leczenie, rzadziej wywołujących zmiany łuszczycopodobne, które wykazują pewne kliniczne i histologiczne odrębności od łuszczycy [95]. Doniesienia

dotyczące związku leków z wysiewami łuszczycy opierają się jednak o opisy pojedynczych przypadków. Tylko nieliczne badania mają kontrolowany, prospektywny charakter [36, 71].

Molekularne mechanizmy leżące u podłoża indukowanych przez środki farmakologiczne wysiewów łuszczycy również nie są w pełni poznane. Rozważa się między innymi możliwość pobudzania proliferacji naskórka związaną z obniżeniem śródskórkowego cyklicznego AMP, zwiększenia poziomu cytokin prozapalnych, hamowania naskórkowej transglutaminazy – enzymu uczestniczącego w terminalnym różnicowaniu się keratynocytów, czy też hamowania metabolizmu kwasu arachidonowego [215].

Na podstawie zebranego wywiadu i/lub danych uzyskanych w oparciu o dokumentację medyczną podjęto próbę określenia fenotypu łuszczycy w trakcie jej pierwszego pojawienia się na skórze. Ze względu na retrospektywny charakter badań i ryzyko błędu zapomnienia (średni czas trwania łuszczycy dla całej populacji wynosił 9 lat) uzyskane wyniki należy interpretować z dużą ostrożnością.

Nie istnieje jak dotąd dobra i powszechnie zaakceptowana klasyfikacja łuszczycy. Powinna ją charakteryzować prostota, łatwość zastosowania w praktyce oraz taka jej konstrukcja, aby możliwe było zakwalifikowanie chorego do jednej (i tylko jednej) z wyodrębnionych klinicznych grup [159]. Warunki te częściowo spełnia zastosowana w badaniu klasyfikacja łuszczycy oparta na podziale zaproponowanym przez IPC (International Psoriasis Council), wprowadzającym nomenklaturę choroby odnoszącą się do anatomicznej lokalizacji wykwitów łuszczycowych, ich rozkładu, rozmiaru oraz aktywności choroby [81].

Z grupy chorych z łuszczycą zwyczajną poddanej analizie klinicznej wyłączono, zgodnie z podziałem IPC pacjentów z *pustulosis palmo-plantaris* (PPP).

U niemal 3/4 badanych pierwszy wysiew choroby miał charakter łuszczycy ograniczonej i najczęściej występował w postaci pojedynczych, niewielkich ognisk łuszczycowych na skórze tułowia i/lub kończyn. U 18,9% chorych łuszczycy rozpoczęła się zmianami na skórze owłosionej głowy, nie można jednak wykluczyć, że u niektórych osób wykwity retrospektywnie oceniane jako łuszczycowe mogły mieć inny, najczęściej łojotokowy charakter.

Łuszczycy skóry owłosionej głowy jest jedną z najczęstszych form choroby występującą u 50-80% chorych; często jest to również pierwsza kliniczna manifestacja tej dermatozy [57, 194, 219, 220]. Zgodnie z klasyfikacją IPC, łuszczycy głowy wydzielona jest jako odrębny fenotyp, aczkolwiek według niektórych autorów ta postać choroby jest jedną z klinicznych odmian łuszczycy łojotokowej [219].

U 1/4 chorych pierwszy wysiew łuszczycy miał uogólniony charakter i najczęściej występował w postaci łuszczycy plackowatej. Łuszczycy kropelkowata jako pierwsza manifestacja choroby dotyczyła zaledwie 3,1% chorych. U większości badanych osób z tą postacią choroby łuszczycy rozpoczęła się przed czterdziestym rokiem życia i była poprzedzona infekcją paciorkowcową górnych dróg oddechowych. Odsetek ten był znacząco mniejszy od obserwowanego przez Mallbrisa [129]. Badacz ten u 18% chorych obserwował pierwszy wysiew łuszczycy pod postacią łuszczycy kropelkowatej, jednak u większości z badanych przez autora osób łuszczycy rozpoczęła przed trzydziestym rokiem życia, co uzasadnia obserwowane różnice.

Przeprowadzone badania wykazały, że wiek, w którym choroba się rozpoczyna nie wpływa na stwierdzany w trakcie badania dermatologicznego fenotyp choroby. Wyjątek stanowiła sporadycznie stwierdzana łuszczycy kropelkowata. Częstość występowania tej

postaci malała z wiekiem, w którym choroba się rozpoczęła. Stwierdzone w analizowanej populacji rzadkie występowanie łuszczycy kropelkowej oraz brak tej formy choroby u osób z łuszczycą rozpoczynającą się w/po sześćdziesiątym roku życia potwierdza obserwacje świadczące o tym, że ta postać choroby dotyczy szczególnie osób młodych, u których częściej, niż u dorosłych dochodzi do rozwoju infekcji paciorkowcowych.

Obserwacje te są zgodne z wynikami Gudjonssona i wsp. [84]. Ujawniły one, że jedyna wyraźna korelacja wieku, w którym choroba się rozpoczyna z jej fenotypem dotyczy łuszczycy kropelkowej oraz wyłączonej w niniejszym badaniu z analizy klinicznej PPP. Ta dermatoza najczęściej pojawia się po raz pierwszy u osób po trzydziestym roku życia [61, 129].

Łuszczycę fałdów stwierdzono u 9,1% chorych. W praktyce klinicznej ta postać choroby stwierdzana jest rzadko. Z nielicznych doniesień wynika, że występuje ona u 3 do 6,8% chorych i jeśli stanowi jedyną manifestację choroby może być przyczyną trudności diagnostycznych [116, 221, 228, 241]. Ta notowana niska częstość występowania łuszczycy fałdów może wynikać między innymi z uzasadnionej niechęci chorych do ujawniania zmian łuszczycowych zajmujących szparę pośladową i/lub zewnętrzne narządy płciowe. W analizowanej grupie chorych badanych dermatologicznie z uwzględnieniem oceny tych anatomicznych okolic ciała łuszczycy fałdów towarzyszyły zazwyczaj inne objawy choroby (łuszczycy paznokci, typowe dla łuszczycy wykwitły w innym umiejscowieniu) i/lub dodatni wywiad rodzinny. Łuszczycę fałdów występowała najczęściej u chorych z początkiem tej dermatozy powyżej czterdziestego roku życia. Ta obserwacja może mieć związek ze stwierdzoną u większości z tych osób nadwagą (średnie BMI dla tej grupy chorych: 27,6), a także częstym współistnieniem przewlekłych chorób predysponujących do kolonizacji skóry przez patogenne drobnoustroje, indukujące stany zapalne w zmacerowanych fałdach. Wyższa częstość występowania łuszczycy fałdów u osób starszych była także notowana w innych badaniach [241].

Łuszczycę łojotokową, postać w której wykwitły łuszczycowe występują na twarzy i w innych okolicach łojotokowych stwierdzano sporadycznie, u zaledwie 1,3% chorych. Tę postać najrzadziej obserwowano u pacjentów z początkiem łuszczycy po pięćdziesiątym roku życia. Dane z piśmiennictwa wskazują, że do umiejscowienia wykwitów łuszczycowych na twarzy częściej dochodzi u chorych z wczesnym początkiem łuszczycy, co jest zgodne z obserwowaną niską częstością występowania tego fenotypu w badanej populacji chorych [28, 129, 178]. Częściej też, na co wskazują badania Campolata [28], u chorych tych łuszczycę ma cięższy, wymagający leczenia ogólnego przebieg i jest skojarzona z rodzinnym występowaniem tej dermatozy.

Częstość zajęcia paznokci w przebiegu łuszczycy waha się w bardzo szerokich granicach; według różnych doniesień dotyczy od 10 do 87% chorych [58, 111, 116, 119, 192, 194]. Częściej, na co wskazują obserwacje kliniczne, występuje łuszczycę paznokci dłoni niż stóp. W analizowanej populacji u ponad 1/3 pacjentów stwierdzono zajęcie przez łuszczycę paznokci dłoni i/lub stóp, co nie odbiega od danych z piśmiennictwa [34, 61, 129].

Przeprowadzone badania wykazały, że częstość występowania łuszczycy paznokci nie zależy od wieku, w którym choroba się rozpoczyna. Znamienne różnice w częstościach zajęcia płytek paznokciowych w przebiegu łuszczycy dotyczyły jedynie chorych z początkiem choroby w szóstej dekadzie życia i w/powyżej 60. roku życia. W tej ostatniej grupie obserwowano znamienne niższą częstość łuszczycy paznokci, niż u chorych z początkiem choroby między pięćdziesiątym, a sześćdziesiątym roku życia. Wyniki obserwacji dotyczących zależności występowania łuszczycy paznokci od wieku, w którym

choroba się rozpoczyna nie są zgodne [61, 128, 198]. Większość jednak badaczy obserwowała mniejszą częstość zajęcia paznokci u chorych z łuszczycą rozpoczynającą się w późniejszych dekadach życia w porównaniu do osób z typem wczesnym choroby [61, 198].

Klinicznej ocenie poddano także dynamiczne cechy choroby charakteryzujące jej aktywność. Łuszczycę niestabilną, w której istniejące zmiany stale poszerzały się i pojawiały się nowe ogniska, najrzadziej stwierdzano u osób z początkiem choroby w/ powyżej 60. roku życia, co pośrednio potwierdza obserwacje innych autorów wykazujących, że aktywna postać choroby częściej występuje u osób z wczesnym ujawnieniem tej dermatozy [61, 97]. U chorych z początkiem łuszczycy w/powyżej 60. roku życia, częściej także, niż u chorych z początkiem choroby w młodszym wieku stwierdzano występowanie grubych ognisk łuszczycowych.

Łuszczycę, w przeciwieństwie do wielu przewlekłych chorób, nie charakteryzuje stała progresja choroby. Nie można zatem wyróżnić poszczególnych etapów schorzenia uwarunkowanych jego naturalnym przebiegiem [57]. W ocenie przebiegu łuszczycy uwzględniane są różne parametry, na przykład liczba nawrotów choroby, liczba pełnych remisji, liczba hospitalizacji w określonym przedziale czasowym, czy też tendencja do ciągłego utrzymywania się zmian na skórze.

Obserwacje przebiegu łuszczycy wskazują, że ciągły, bez skłonności do remisji przebieg choroby dotyczy ok. 3/4 chorych [57]. W analizowanej populacji u 73,5% chorych obserwowano brak pełnych remisji łuszczycy lub brak występowania okresów choroby z minimalnymi zmianami na skórze. W pracy przyjęto definicję minimalnych zmian łuszczycowych zgodną z ogólną lekarską oceną stanu pacjenta. Niektórzy badacze za minimalne zmiany łuszczycowe uznają tzw. mniejsze objawy łuszczycy, nazywając je także stygmatami łuszczycowymi lub łuszczycą *borderline*. Wśród nich wymieniane są między innymi ogniska nadmiernego rogowacenia na skórze prostowników, naporstkowanie płytek paznokciowych, nasilone złuszczenie skóry owłosionej głowy, czy wyprzenia z wyraźnie odgraniczonym od skóry zdrowej rumieniem [158].

Przeprowadzone badania wykazały znamiennej zależność występowania ciągłego przebiegu choroby od wieku, w którym choroba się rozpoczyna. Ogniska łuszczycowe najczęściej utrzymywały się stale u chorych, u których łuszczycą ujawniła się po raz pierwszy w/po 60. roku życia, zaś pełne remisje choroby najczęściej obserwowano u osób z początkiem łuszczycy w czwartej dekadzie życia. Potwierdza to obserwacje przebiegu tej dermatozy u wielu chorych – częstych wysiewów w typie wczesnym choroby poprzedzających pełne remisje, a przewlekle utrzymujących się wykwitów w typie późnym łuszczycy [61].

Interpretując powyższe wyniki nie można jednak wykluczyć, że brak remisji łuszczycy, przynajmniej u niektórych osób mógł wiązać się z niewłaściwym leczeniem tej dermatozy, czy też zaniechaniem terapii, co nakazuje wyciągnięcie ostrożnych wniosków.

Do niedawna sądzono, że świąd nie należy do typowych objawów podmiotowych towarzyszących łuszczycy. Jednakże badania ostatnich lat jednoznacznie wykazały, że dolegliwość tę zgłasza duży, szacowany na 63–84% odsetek chorych [7, 41, 89, 129, 185]. Obserwacje kliniczne wskazują, że świąd częściej występuje u chorych z przewlekłą łuszczycą plackowatą, niż z innymi postaciami łuszczycy [185, 240]. W analizie Szepietowskiego i wsp. [206] dotyczącej populacji polskiej świąd stwierdzono u 80% objętych badaniem chorych na łuszczycę. W badanej populacji objaw ten zgłaszało 77,7% osób. Częstość występowania świądu nie zależała od wieku, w którym rozpoczęła

się łuszczycy, natomiast dolegliwość tę częściej stwierdzano u chorych z rozległą postacią choroby. Świąd częściej występował u płci żeńskiej, niż u mężczyzn, co potwierdza obserwacje innych badaczy [7, 185].

Przeprowadzone badania wykazały ponadto, że w badanej populacji chorych wiek, w którym rozpoczyna się łuszczycy nie wpływa na ciężkość choroby, definiowanej w niniejszej pracy jako choroba z PASI ≥ 15 i/lub z występowaniem łuszczycowego zapalenia stawów i/ lub leczone/kwalifikująca się do leczenia cyklosporyną A i/lub metotreksatem i/lub neotigasonem.

W łuszczycy opisowi podlegają widoczne kliniczne cechy choroby, takie jak złuszczenie, rumień i grubość ognisk łuszczycowych. Mimo, że w porównaniu do innych schorzeń ciężkość tej dermatozy może być oceniona w względnie prosty, ilościowy sposób to jednak proponowane różne techniki obiektywnej oceny zmian łuszczycowych, takie jak badanie histopatologiczne, chronometryczna ocena rumienia, ultrasonograficzna ocena grubości nacieku, czy komputerowa analiza fotografii mierząca powierzchnię skóry zajętej przez łuszczycę nie znalazły jak dotąd praktycznego zastosowania [167].

Brak jest, jak dotąd, przejrzystych, dobrze scharakteryzowanych i zobiektywizowanych metod oceny ciężkości tej dermatozy, tak istotnych między innymi dla ujednoczenia kryteriów kwalifikacji chorych do badań klinicznych nowych leków przeciwłuszczycowych.

W praktyce ocena ciężkości łuszczycy dokonywana jest na podstawie subiektywnych kryteriów, opierających się o ocenę dokonywaną przez lekarza i/lub pacjenta. Mimo opracowywania wielu nowych schematów wskaźnik PASI jest nadal najczęściej stosowany w praktyce klinicznej [12, 59, 60, 104, 118, 193]. W większości doniesień za łuszczycę ciężką uznaje się chorobę, w której wartość PASI przekracza 15 lub wartość 12, pod warunkiem, że zmiany łuszczycowe zajmują co najmniej 10% powierzchni ciała [59, 61, 104, 114, 129].

Średnia wartość PASI w analizowanej populacji wynosiła 11,1, co oznacza, że u większości osób stwierdzono łuszczycę o średnim nasileniu. Badania epidemiologiczne wskazują, że większość chorych na łuszczycę cierpi na jej łagodną postać [7, 57, 161]. Analizowana populacja pacjentów może nie być w pełni reprezentatywna pod względem ciężkości choroby, ze względu na sposób rekrutacji. W większości przypadków były to osoby już leczone lub też aktywnie poszukujące pomocy lekarskiej.

Metoda PASI posiada ograniczenia, które należy uwzględnić interpretując uzyskane wyniki [12, 114, 166]. Wskaźnik ten opisuje w postaci jednej liczbowej wartości kilka różnych klinicznych cech choroby. Korelacja PASI z ciężkością łuszczycy nie ma liniarnego charakteru. Ciężkość łuszczycy z zajęciem tylko skóry rąk i stóp, a więc z zazwyczaj niską wartością PASI może być większa, niż postaci, w których występują na przykład uogólnione zmiany z minimalnym stanem zapalnym i niewielkim łuszczeniem.

Innym ograniczeniem wartości wskaźnika PASI jest obserwowana wysoka rozbieżność wyników uzyskiwanych od różnych osób oceniających tego samego chorego [177, 222, 232]. Szanse powtarzalności wyników zwiększa ocena PASI dokonywana przez jedną osobę. Wszyscy z włączonych do niniejszego badania chorzy byli oceniani przez autorkę pracy.

Wskaźnik PASI nie uwzględnia dolegliwości podmiotowych, które wraz z oceną jakości życia są coraz częściej wprowadzane do kwestionariuszy badania chorych na łuszczycę [186, 187, 216]. W ostatnich latach są opracowywane i wprowadzane do praktyki klinicznej nowe skale obejmujące dodatkowo subiektywną ocenę łuszczycy dokonywaną przez chorego. Są to między innymi wskaźnik SAPASI (*self-administrated Psoriasis*

Area and Severity Index), NPF-PS (*The National Psoriasis Foundation Psoriasis Score*), LS-PGA (*Lattice System Physician's Global Assessment*) [118, 186, 78]. Skale te korelują z wskaźnikiem PASI i do niego się odnoszą [12]. Ocena jakości życia chorych włączonych do niniejszych badań stanowi przedmiot odrębnej analizy.

Za jedno z kryteriów rozpoznania łuszczycy ciężkiej przyjęto występowanie łuszczycowego zapalenia stawów. Łzs stwierdzono u 14,9% badanych chorych, co odpowiada danym z piśmiennictwa [31, 41, 72, 84, 116, 129, 198, 243]. Nie można jednak wykluczyć, że częstość występowania łzs w badanej populacji jest zaniżona, ponieważ aż 39,2% chorych zgłaszało dolegliwości bólowe ze strony narządu ruchu, a w grupie osób z początkiem łuszczycy powyżej sześćdziesiątego roku życia objaw ten występował u ponad połowy badanych pacjentów. W grupie tej mogli zatem znaleźć się chorzy z nierozpoznanym łuszczycowym zapaleniem stawów. Z większym jednak prawdopodobieństwem należy uznać, że dolegliwości stawowe zgłaszane przez chorych miały inny, niż łuszczycowy charakter (na przykład zwyrodnieniowy). Za tezę tą przemawiają między innymi dane, wykazujące, że aż 25% dorosłych osób zgłaszających się do lekarza pierwszego kontaktu skarży się na bóle układu kostno-stawowego [201]. Łzs obserwowano najczęściej u pacjentów z chorobą rozpoczynającą się przed czterdziestym rokiem życia, najrzadziej zaś u chorych z łuszczycą zaczynającą się po sześćdziesiątym roku życia. Ujawniono ponadto (dane nie ujęte w wynikach), że łzs występowało zmiennie częściej u chorych z rozległą postacią choroby, w porównaniu do chorych z jej ograniczoną formą. Nie potwierdzono natomiast obserwowanej przez Ferrandiza zwiększonej częstości występowania łzs u chorych z uogólnioną łuszczycą krostkową lub erytrodermią łuszczycową, co mogło wynikać z małej liczby chorych z tymi formami choroby w objętej badaniem populacji chorych [61]. Łzs stwierdzono częściej u kobiet (16,6%), niż u mężczyzn (13,1%), aczkolwiek różnica ta nie była statystycznie znamienne.

Podjęta próba oceny czynników prognostycznych rozwoju łuszczycowego zapalenia stawów i łuszczycy ciężkiej ujawniła, że ryzyko to zwiększa zajęcie przez łuszczycę płytek paznokciowych dłoni i/lub stóp. Ze względu na fakt, że potwierdzając tę tezę doniesienia innych autorów obejmowały w większości chorych z łuszczycą wczesną [39, 61, 237], niniejszą obserwację można uznać za oryginalną. Wykazano, że wiek, w którym choroba rozpoczęła się po raz pierwszy oraz występowanie łuszczycy w rodzinie nie są czynnikami prognostycznymi rozwoju łzs i ciężkiego przebiegu łuszczycy. Wykazano natomiast, że w badanej populacji chorych ryzyko wystąpienia ciężkiej łuszczycy jest większe u mężczyzn niż u kobiet, co może wynikać z nieujętych w niniejszej pracy uzyskanych wyników, wskazujących na częstsze występowanie nadwagi u płci męskiej i częstsze, w porównaniu do kobiet stosowanie przez mężczyzn używek zwiększających, na co wskazują inne doniesienia, ryzyko ciężkiego przebiegu łuszczycy [5, 98, 149, 156].

Rodzinne występowanie łuszczycy jest charakterystyczną cechą tej dermatozy, szczególnie rozpoczynającej się w młodym wieku [4, 43, 57, 116, 164, 198]. Tak zwana łuszczycę sporadyczną, bez występowania choroby u krewnych, stwierdza się częściej w chorobie z początkiem w późniejszych dekadach życia [4, 61, 97, 115, 129, 141, 157].

Na podstawie zebranego wywiadu ustalono, że u 34,5% chorych łuszczycza występowała rodzinie, najczęściej u krewnych pokrewieństwa pierwszego stopnia. Wartość ta nie odbiegała od wyników innych doniesień dotyczących łuszczycy późnej [119, 129], natomiast znacząco różniła się od danych Henselera i Christophersa [97], którzy dodatni wywiad rodzinny stwierdzili u zaledwie 2% chorych z łuszczycą rozpoczynającą się po

sześcioletnim roku życia. Obserwacja ta stała się dla tych badaczy przesłanką do uznania występowania łuszczycy w rodzinie za jedno z kryteriów podziału choroby na typ I - rodzinny i typ II - sporadyczny. W badanej populacji chorych z początkiem łuszczycy w siódmej dekadzie życia częstość dodatniego wywiadu rodzinnego wynosiła aż 21,2%. W przeprowadzonym badaniu potwierdzono znamiennej ujemną korelację wieku, w którym rozpoczęła się łuszczycyca z występowaniem choroby w rodzinie, co jest zgodne z innymi obserwacjami [4, 61, 198, 202].

Już od prawie trzydziestu lat znany jest związek łuszczycy z częstszym występowaniem antygeny HLA-Cw6 [43, 51, 101, 102, 103, 125, 133, 134, 202]. Hipotezę, że allel HLA-Cw*06 jest genem odpowiedzialnym za powstanie łuszczycy kontrargumentowano istnieniem haplotypów wysokiego ryzyka rozwoju łuszczycy nie zawierających HLA-Cw*06, niską częstością występowania łuszczycy u nosicieli tego allelu, a także obserwacją, że u ponad 30% chorych na łuszczycę HLA-Cw*06 nie występuje.

Jednak wyniki najnowszych badań jednoznacznie wskazały, że HLA-Cw*06 w obrębie PSORS1 jest głównym genem odpowiedzialnym za powstanie łuszczycy [153], a korelacja choroby z innymi genami locus PSORS1 ma wtórny do asocjacji z tym allelem charakter [54, 153]. Występowanie HLA-Cw*06 zostało uznane za ważne kryterium definiowana różnych postaci łuszczycy oraz potwierdzenia lub wykluczenia ich genetycznego związku. Typowanie tego allelu jest jednym z rekomendowanych kryteriów klasyfikacji łuszczycy zaproponowanej przez IPC. Jak dotąd jednak, ze względu na wysokie koszty analizy opierającej się o gotowe, komercyjne zestawy, oznaczanie HLA-Cw*06 ograniczone jest prawie wyłącznie do celów naukowych. Dlatego też jednym z celów podjętych badań była próba takiego zoptymalizowania metody oznaczania allelu HLA-Cw*06, aby możliwe było wprowadzenie jej do przesiewowych badań chorych na łuszczycę.

Techniki molekularne stosowane obecnie do oznaczania alleli HLA, a wprowadzone do praktyki laboratoryjnej w latach dziewięćdziesiątych, coraz częściej zastępują metody serologiczne, które, co należy zaznaczyć, są nadal stosowane w niektórych procedurach diagnostycznych w transplantologii.

Techniki serologiczne, z powodu złożonej struktury układu zgodności tkankowej mogą stanowić przyczynę trudności technicznych i interpretacyjnych. Obniżona ekspresja cząsteczek HLA-C na powierzchni limfocytów, brak odpowiednich surowic, reakcje krzyżowe surowic z antygenami o podobnych epitopach, a także fakt, że niektórych alleli HLA (tzw. niemych alleli) nie można wykryć serologicznie utrudniały interpretację uzyskanych wyników [134, 244].

Reakcja łańcuchowa polimerazy dzięki relatywnie prostej technice i możliwości bezpośredniej identyfikacji alleli na poziomie DNA w znaczny sposób ułatwiła określanie polimorfizmu genetycznego w obrębie locus HLA-C i wyeliminowała problemy związane z typowaniem serologicznym. Opracowano szereg technik typowania alleli HLA-C o różnym stopniu rozdzielczości. Należy do nich analiza restrykcyjna produktów amplifikacji PCR-RFLP [207], a także analiza konformacyjna jednoniciowego DNA PCR-SSCP (*single strand conformation polymorphism*). Wśród metod opartych na reakcji PCR do oznaczania alleli HLA-C wykorzystywane są techniki hybrydyzacji z allelo-swoistymi sondami molekularnymi (PCR-SSOP, *sequence specific oligonucleotide probes*) [23], częściej jednak stosowana jest metoda specyficznej sekwencji starterów PCR-SSP (*sequence specific primers*) [24, 123]. Mimo, że PCR-SSP jest precyzyjną i względnie prostą techniką, to jednak ujemną jej stroną jest fakt, że amplifikacja i nastę-

pujący po niej rozdział elektroforetyczny na żelu agarozowym dotyczy wyłącznie pojedynczej próbki DNA, przy czym do analizy konieczna jest stosunkowo duża jego ilość (ok. 50 μ l DNA o stężeniu 30 ng/ μ l). Do techniki tej nie można wykorzystać DNA z wymazu z nabłonka z jamy ustnej z powodu zbyt niskiego jego stężenia w tym materiale biologicznym. Ten nieinwazyjny sposób pozyskiwania DNA zastosowano w niniejszej pracy.

Mała przydatność zestawu komercyjnego do badań przesiewowych i jego wysoki koszt był powodem, dla którego podjęto się opracowania zoptymalizowanej procedury typowania allelu HLA-Cw*06 w oparciu o metodę PCR-RFLP i PCR-SSP.

W toku badań do oznaczania HLA-Cw*06 pierwotnie zastosowano metodę PCR-RFLP opisaną przez Tazi Ahniniego w 1999 roku [208] i wykorzystywaną przez badaczy w kolejnych latach [31, 32]. Do amplifikacji fragmentu genu HLA-C (618 bp) stosowano parę starterów zaproponowanych przez autora. Amplifikowany fragment poddawano trawieniu restryktazą *Sma* I, rozpoznającą sekwencje CCC GGG, a następnie poddawano go rozdziałowi elektroforetycznemu i barwieniu srebrem, co pozwoliło na wyodrębnienie osób posiadających allel HLA-Cw*06.

Ponieważ wyniki badań wykazały, że częstość alleli HLA-Cw*06 w populacji kontrolnej oznaczana tą metodą była znacznie wyższa, niż w przypadku uzyskiwanych przy użyciu zestawu Dynal Allset⁺™ SSP HLA-Cw *low resolution* dokonano weryfikacji zaobserwowanych sprzeczności. W tym celu przeprowadzono analizę wszystkich sekwencji alleli HLA-C i zbadano potencjalny wynik trawienia enzymem *Sma* I [179]. Porównanie dostępnych sekwencji wykazało, że metoda opisana przez Tazi Ahniniego wykorzystuje polimorfizm pojedynczego nukleotydu w sekwencji HLA-C (w większości alleli HLA-C w badanym miejscu występuje nukleotyd G i sekwencja ta nie jest rozpoznawana przez enzym *Sma* I) [208].

Nieswoistość metody wynikająca z faktu, że nukleotyd C posiadają również allele Cw*07 i Cw*18 sprawiły, że do dalszych badań nad rozróżnieniem osób z obecnością allelu HLA-Cw*06 od nieposiadających tego allelu zastosowano technikę PCR-SSP opisaną przez Buncea i wsp [24]. Początkowe próby amplifikacji DNA osób z allelem HLA-Cw*06, którego obecność wykazano uprzednio komercyjnym zestawem Dynal nie dawały pozytywnego sygnału amplifikacji i dopiero zastąpienie standardowego buforu do PCR zawierającego chlorek potasu buforem z siarczanem amonu okazało się kluczowym warunkiem umożliwiającym specyficzną amplifikację allelu HLA-Cw*06 przy użyciu ww. pary starterów. Metoda ta po zoptymalizowaniu pozwoliła na specyficzne oznaczenie allelu HLA-Cw*06. Stosunkowo nieswoistą metodę PCR-RFLP zaproponowaną przez Tazi Ahniniego i wsp. [208] zastosowano jako drugi etap genotypowania do różnicowania homozygot i heterozygot Cw*06.

Kolejny, ostatni etap badań dzięki zmodyfikowaniu końca 3' jednego ze starterów pozwolił na stwierdzenie, że w przypadku obecności tylko jednego fragmentu o wielkości 618 bp występuje homozygota HLA-Cw*06/Cw*06.

Opisana metoda została pozytywnie zweryfikowana poprzez porównanie genotypów populacji kontrolnej oznaczonych ww. techniką i przy użyciu komercyjnego zestawu Dynal.

Przeprowadzone badania wykazały, że proponowana zmodyfikowana technika PCR-RFLP i PCR-SSP do oznaczania allelu HLA-Cw*06 jest przydatna w badaniach genetyczno-populacyjnych. Pozwala ona na jednoczesną analizę dużej liczby próbek, umożliwiając tym samym wykonywanie badań przesiewowych dużych populacji. Do analiz można wykorzystać DNA izolowane z wymazu z nabłonka jamy ustnej, co w porówna-

niu z pobieraniem krwi obwodowej w zdecydowany sposób upraszcza procedurę uzyskiwania materiału biologicznego.

Dodatkową istotną zaletą zaproponowanej metody jest możliwość zastosowania każdego z etapów badań oddzielnie. Już pierwszy etap analizy umożliwia wyodrębnienie osób posiadających allel HLA-Cw*06, dlatego technika ta może znaleźć zastosowanie na przykład w badaniach analizy sprzężeń allelu HLA-Cw*06 z innymi genami. Do przeprowadzenia tych badań wystarczające jest stwierdzenie obecności lub braku tego allelu.

Obie zastosowane techniki: PCR-RFLP i PCR-SSP charakteryzują się wysoką czułością i specyficznością, przy tym do wykonania analizy wystarcza niewielka ilość DNA jąder komórkowych.

Opisana procedura pozwala nie tylko na specyficzne wykrywanie allelu HLA-Cw*06, ale również umożliwia odróżnienie homozygot od heterozygot HLA-Cw*06. Ocena zygotywności może mieć praktyczne znaczenie rokownicze, ponieważ wykazano, że ryzyko zachorowania na łuszczycę jest wyższe u homozygot HLA-Cw*06 w porównaniu do osób heterozygotycznych [82].

Zgodnie z rekomendacją IPC, allel HLA-Cw*0602 należy typować przy użyciu metod o wysokim stopniu rozdzielczości, co w populacjach kaukazoidalnych wydaje się nieuzasadnione. Przeprowadzona analiza częstości alleli HLA-C zgromadzonych w internetowej bazie danych pozwoliła bowiem na stwierdzenie, że HLA-Cw*0602 jest niemal jedynym allelem HLA-Cw*06 występującym w tych populacjach [145]. Inne z alleli HLA-Cw*06 występują niezmiernie rzadko. Allel HLA-Cw*0603 był obserwowany tylko raz wśród 2113 osobników rasy kaukaskiej (całkowita częstość 0,00024). Równie sporadycznie występuje allel HLA-Cw*0604, stwierdzony u zaledwie jednego osobnika heterozygotycznego w populacji 1863 osób rasy kaukaskiej (całkowita częstość występowania allelu 0,00027). Pozostałe allele HLA-Cw*06 nie były nigdy obserwowane wśród badanych osobników tej rasy.

Można więc z dużym prawdopodobieństwem założyć, że oznaczany w niniejszym badaniu allel HLA-Cw*06 odpowiada wyłącznie allelowi HLA-Cw*0602, a potencjalna możliwość występowania innych alleli Cw*06 w badanej populacji i ich wpływ na uzyskane wyniki jest minimalny i praktycznie może być pominięty.

Podobnie w badaniach dotyczących dużych populacji chorych na łuszczycę pochodzących z Islandii Gudjonsson i wsp. do oznaczania HLA-Cw*0602 stosowali komercyjny zestaw HLA-C SSP o niskiej rozdzielczości, który w rzeczywistości wykrywa wszystkie allele HLA-Cw*06 [82, 84].

Warunkiem przydatności różnych technik do badań przesiewowych są ich niskie koszty. Przybliżony koszt pojedynczej reakcji PCR przy użyciu zaproponowanej zoptymalizowanej metody PCR-RFLP i PCR-SSP był ponad dwudziestokrotnie niższy w porównaniu do komercyjnego zestawu Dynal Allset^{TC} SSP HLA-Cw *low resolution*.

Korelacja łuszczycy wczesnej z allelem HLA-Cw*06 jest dobrze udokumentowana, także w populacji pochodzącej z rejonu Polski Północnej [202]. Występowanie antygenu HLA-Cw6 stało się jednym z kryteriów podziału łuszczycy na typ I – wczesny, HLA-Cw*06 dodatni i typ II – późny, HLA-Cw*06 ujemny [97]. Do tego podziału odnosi się wielu autorów [3, 51, 88, 174, 198, 238]. Niektórzy jednak kwestionują tę klasyfikację zwracając uwagę na istnienie trzeciej populacji chorych, spełniających kryteria obu typów łuszczycy i z tego powodu często wyłączanych z analiz klinicznych i genetycz-

nych [102, 183]. Tę populację chorych uwzględniono w zaproponowanym przez autorkę w innym doniesieniu podziale łuszczycy opierającym się na klasyfikacji Henselera i Christophersa, ale dodatkowo dzielącym chorych na typ I a (wczesny, HLA-Cw6 ujemny), I b (wczesny, HLA-Cw6-dodatni), i na typ II a (późny, HLA-Cw6-ujemny) i II b (późny, HLA-Cw6-dodatni) [202]. Do tego rozszerzonego podziału odnoszono się w innych pracach [70, 233].

Przyjęty przez badaczy niemieckich czterdziesty rok życia różnicujący łuszczycę wczesną i późną opierał się, między innymi, na znamiennej korelacji łuszczycy rozpoczynającej się przed czterdziestym rokiem życia z antygenem HLA-Cw6 [97]. Badania Allena obejmujące chorych z łuszczycą rozpoczynającą się powyżej czwartej dekady życia wykazały jednak, że znamienność różnic w częstościach występowania allelu HLA-Cw*06 w populacji chorych i w grupie kontrolnej zanika u pacjentów z początkiem łuszczycy powyżej pięćdziesiątego roku życia [3].

Inni badacze na podstawie obserwowanego w dużej grupie chorych tylko jednego szczytu zachorowania na łuszczycę kwestionują istnienie dwóch typów choroby: z wczesnym oraz późnym jej początkiem i sugerują, aby za kryterium podziału łuszczycy przyjmując jedynie występowanie allelu HLA-Cw*06 [84].

Porównanie częstości występowania HLA-Cw*06 w badanej populacji chorych z początkiem łuszczycy powyżej trzydziestego roku życia i w grupie kontrolnej ujawniła, że grupy te różnią się statystycznie znamienne. Przeprowadzona analiza wykazała także, że w łuszczycy rozpoczynającej się po trzydziestym roku życia, podobnie jak w łuszczycy wczesnej występowanie HLA-Cw*06 wykazuje ujemną korelację z wiekiem, w którym choroba się rozpoczyna. W celu ustalenia wieku początku łuszczycy rozgraniczającego chorobę wykazującą korelację z HLA-Cw*06 od łuszczycy niewykazującej takiego związku dokonano porównań częstości występowania allelu HLA-Cw*06 w pięcioletnich przedziałach wieku początku choroby. Wykazano, że HLA-Cw*06 nie jest allelem ryzyka łuszczycy rozpoczynającej się powyżej 44. roku życia. Nie można jednak wykluczyć znaczenia tego allelu w łuszczycy z początkiem przed 45. rokiem życia, dlatego populacja chorych uwzględniana w typowaniu allelu HLA-Cw*06 powinna objąć również chorych z początkiem łuszczycy między 40. a 44. rokiem życia. Wyniki wcześniej prowadzonych badań własnych, których celem było porównanie częstości HLA-Cw*06 w populacji chorych z początkiem łuszczycy powyżej 40. roku życia i w grupie kontrolnej wykazały, że HLA-Cw*06 nie jest allelem ryzyka w tej grupie chorych. W pracy tej jednak ze względu na znacznie mniej liczebną populację objętą badaniami nie podejmowano prób określenia korelacji pomiędzy występowaniem HLA-Cw*06, a wiekiem początku choroby [205].

Analiza zygotywności ujawniła, że sześciu pacjentów z badanej populacji było homozygotami HLA-Cw*06, zaś w populacji kontrolnej żadna z osób nie była homozygotą HLA-Cw*06. Stwierdzone częstości występowania homozygot HLA-Cw*06 są niższe, niż obserwowane w badaniu Gudjonssona dużej populacji chorych pochodzących z Islandii. W większości jednak byli to chorzy z łuszczycą wczesną, co tłumaczy obserwowane różnice. Badacz ten wykazał, że homozygotyczność HLA-Cw*06 dwu i półkrotnie zwiększa ryzyko zachorowania na łuszczycę oraz predysponuje do jej wcześniejszego ujawnienia się, nie wpływa natomiast na obraz kliniczny i przebieg choroby [82].

Przeprowadzone badania ujawniły ponadto, że częstość rodzinnego występowania łuszczycy wykazuje ujemną korelację z wiekiem, w którym choroba się rozpoczyna i to zarówno u chorych HLA-Cw*06 dodatnich, jak i w grupie chorych bez tego allelu. Wynik ten potwierdza obserwacje innych autorów, że występowanie łuszczycy w rodzi-

nie nie wpływa na zależność występowania allelu HLA-Cw*06 od wieku, w którym choroba się rozpoczyna [3, 84].

Podjęto również próbę odpowiedzi na pytanie czy występowanie allelu HLA-Cw*06 wpływa na obraz kliniczny i przebieg łuszczycy rozpoczynającej się po trzydziestym roku życia. W obu grupach chorych: z allelem HLA-Cw*06 i bez tego allelu wykazano znamienne różnice w częstościach występowania łuszczycy kropelkowej. Allel ten stwierdzono u 6 z 8 chorych z tą formą choroby. U wszystkich tych osób łuszczycy rozpoczęła się przed 43 rokiem życia. U dwóch pacjentów Cw*06 ujemnych z początkiem choroby w 48 i 58 roku życia wysiew łuszczycy kropelkowej był poprzedzony infekcją paciorkowcową gardła, potwierdzoną dodatnim posiewem bakteriologicznym. Obserwacja ta, opierająca się wprawdzie na pojedynczych przypadkach potwierdza wniosek Fry'a i wsp., że występowanie allelu HLA-Cw*06 nie jest konieczne do rozwoju tej indukowanej infekcją paciorkowcową postaci łuszczycy [70].

Stwierdzona znamienne wyższa częstość występowania łuszczycy fałdów i erytrodermii łuszczycowej u chorych HLA-Cw*06 ujemnych wymaga, ze względu na małą liczbę pacjentów z tymi postaciami choroby dalszych analiz i nie pozwala na sformułowanie szerszych wniosków.

Aktywność i ciężkość łuszczycy były klinicznymi cechami odróżniającymi chorych HLA-Cw*06 dodatnich od pacjentów bez allelu HLA-Cw*06. Łuszczycę niestabilną oraz ciężką obserwowano częściej u chorych Cw*06 ujemnych. Ta obserwacja jest zgodna z wynikami Gudjonssona, który jako pierwszy zanotował cięższy przebieg łuszczycy rozpoczynającej się w późniejszych latach życia u chorych bez allelu HLA-Cw*06 [84]. Wyniku tego nie potwierdziły natomiast badania dotyczące populacji fińskiej, dotyczące jednak mniejszej pod względem liczebności populacji chorych na łuszczycę [199]. Ujemna korelacja ciężkości łuszczycy z występowaniem allelu HLA-Cw*06 w łuszczycy późnej jest przeciwstawna do obserwacji chorych z łuszczycą wczesną, co wykazano również w badaniach własnych. Występowanie allelu HLA-Cw*06 kojarzyło się z cięższym, niż u chorych HLA-Cw*06 ujemnych przebiegiem choroby z wczesnym początkiem [203].

Zoptymalizowaną metodę oznaczania HLA-Cw*06 zastosowano ponadto do typowania tego allelu u 25 chorych z łuszczycą kropelkową oraz w trzydziestoosobowej populacji chorych z *pustulosis palmo-plantaris* (PPP). Przeprowadzone badania mimo że objęły małą liczbę populację, wykazały znamienne korelację występowania allelu HLA-Cw*06 z łuszczycą kropelkową, potwierdzając patogenetyczny związek cząsteczki kodowanej przez ten allel z powstaniem *psoriasis guttata*. Wykazano ponadto brak różnic w częstościach występowania allelu HLA-Cw*06 u chorych z *pustulosis palmo-plantaris* i w grupie kontrolnej.

Związek PPP z łuszczycą zwyczajną jest kontrowersyjny. Badania pochodzące z lat osiemdziesiątych ujawniły, że antygeny HLA wykazujące asocjacje z łuszczycą zwyczajną – HLA-Cw6, B13, B17 nie występują ze zwiększoną częstością u chorych z PPP. Wyniki niektórych doniesień wskazywały na korelacje PPP z antygenami HLA-B8, Bw35, DR9, TNF-B*2 [92, 229, 242]. Brak korelacji wybranych alleli PSORS1: HLA-Cw*06, CDSN*5 i HCR* WWCC z *pustulosis palmo-plantaris*, oznaczanych w największej badanej jak dotąd populacji chorych z PPP wykazał Asumalachti [13]. Dotychczas jest to jedyne doniesienie dotyczące asocjacji HLA-Cw*06 oznaczanego metodami molekularnymi z PPP, co stanowiło przesłankę do zastosowania opisanej wyżej metody do typowania HLA-Cw*06 w tej dermatozie. Stwierdzony brak różnic w częstościach występowania allelu HLA-Cw*06 u badanych chorych i w populacji kontrolnej po-

twierdza odrębność genetyczną PPP, co wraz z opisywanymi w innych doniesieniach odmiennymi cechami demograficznymi (początek w piątej dekadzie życia, częstsze występowanie u kobiet, związek z paleniem tytoniu) potwierdza słuszność sklasyfikowania PPP jako odrębnej jednostki chorobowej [1, 8, 55]. Wysoka zaś częstość współwystępowania łuszczycy zwyczajnej i PPP może być tłumaczona wspólnymi dla obu jednostek, niepoznaczonymi jak dotąd w pełni ścieżkami patogenetycznymi.

6. PODSUMOWANIE

Postęp w nauce ostatnich lat pozwolił na poznanie wielu mechanizmów patogennych prowadzących do powstania grudki łuszczycowej. Coraz doskonalsze metody analiz molekularnych przybliżają perspektywę określenia genetycznego podłoża choroby. Najnowsze wyniki wskazują, że HLA-Cw*06 jest głównym allelem odpowiedzialnym za powstanie łuszczycy.

Znacznym utrudnieniem prowadzonych badań jest szczególnie różnorodność obrazu klinicznego łuszczycy. Coraz pilniejszą potrzebą staje się zatem stratyfikacja chorych umożliwiającą ich dalszy postęp. Jak dotąd, dobrze scharakteryzowaną postacią choroby jest łuszczycyca zwyczajna rozpoczynająca się w młodym wieku, skojarzona z częstym występowaniem allelu HLA-Cw*06 oraz dodatnim wywiadem rodzinnym. Znacznie mniej wiadomo na temat rzadziej występujących typów/odmian tej dermatozy, między innymi łuszczycy zwyczajnej rozpoczynającej się w późniejszych okresach życia, czy też dermatoz krostkowych o niejasnym patogenetycznym związku z łuszczycą.

Wykazanie w niniejszym badaniu znaczenia silnego stresu psychicznego w prowokacji i zaostrzeniach łuszczycy z późnym początkiem potwierdza znaczącą rolę układu nerwowego w patogenezie choroby, uzasadnia także celowość rozszerzenia terapii o pomoc psychologiczną dla tych chorych. Uzyskany wynik, świadczący o znaczeniu zajęcia płytek paznokciowych, jako klinicznego wyznacznika ciężkiego przebiegu łuszczycy, z jednej strony potwierdza doniesienia innych autorów, z drugiej, ze względu na dobór poddanych analizie chorych, ma oryginalny charakter. Natomiast obserwacja, że ryzyko wystąpienia łuszczycy ciężkiej jest większe u mężczyzn niż u kobiet, powinna być uzupełniona o porównanie udziału czynników środowiskowych wpływających na przebieg choroby u obu płci.

Przeprowadzone badania zweryfikowały hipotezę, że u chorych z łuszczycą rozpoczynającą się powyżej 30. roku życia wiek, w którym choroba ma początek wpływa na fenotyp choroby i jej ciężkość. Wyjątek stanowiła sporadycznie stwierdzana łuszczycyca kropelkowata. Częstość występowania tej postaci choroby malała z wiekiem, w którym choroba się rozpoczęła. Natomiast obserwacja, że im późniejszy początek ma łuszczycyca, tym znaczenie infekcji w prowokacji pierwszego w życiu wysiewu jest mniejsze, ogniska łuszczycowe są grubsze, a choroba ma ciągły, bez braku skłonności do remisji przebieg wymaga potwierdzenia w oparciu o dalsze analizy.

Przeprowadzone badania wskazały również na pewną kliniczną odrębność łuszczycy pojawiającej się po raz pierwszy po sześćdziesiątym roku życia. Ta populacja chorych różniła się istotnie od chorych z początkiem choroby między 30. a 60. rokiem życia pod względem mniejszego znaczenia silnego stresu psychicznego w prowokacji choroby oraz rzadziej obserwowanej w tej grupie chorych łuszczycy niestabilnej. Te wstępne obserwacje, pośrednio potwierdzające pojedyncze doniesienia o odrębnym obrazie łuszczycy pojawiającej się u osób starszych, wymagają dalszych badań.

W ostatnich latach coraz więcej uwagi kieruje się na pozagenetyczne, środowiskowe uwarunkowania wpływające na ujawnienie się i przebieg łuszczycy. Stosowanie używek, nadwaga, współistnienie innych przewlekłych, zapalnych chorób stanowią znane czynniki modyfikujące kliniczną ekspresję choroby, jej przebieg i podatność na leczenie. Ich znaczenie rośnie wraz z wiekiem chorych, dlatego udział tych czynników w powstaniu i zaostrzeniach łuszczycy, szczególnie z późnym początkiem powinien być uwzględniany w codziennej klinicznej ocenie pacjentów. Analiza zawartych w ankiecie danych

dotyczących chorób współistniejących, a także udziału środowiskowych czynników ryzyka w łuszczycy późnej, przekracza zakres niniejszej pracy i będzie przedmiotem odrębnego badania.

W kontekście najnowszych doniesień oznaczanie allelu HLA-Cw*06 jest przydatnym narzędziem, służącym do potwierdzenia lub wykluczenia genetycznego związku różnych postaci łuszczycy. Typowanie HLA-Cw*06 w łuszczycy późnej pozwala na wyodrębnienie chorych nie wykazujących korelacji z PSORS1. Chorzy ci mogą stanowić zatem wyselekcjonowany materiał do dalszych badań potencjalnego związku tej postaci łuszczycy z genami PSORS2–PSORS9. Oznaczanie allelu HLA-Cw*06 w chorobach wykazujących niejasny patogenetyczny związek z łuszczycą, między innymi w dermatozach krostkowych może stanowić przydatne kryterium ich dokładnego sklasyfikowania.

Opracowana zmodyfikowana technika PCR jest przydatną metodą do przesiewowego oznaczania allelu HLA-Cw*06 w dużych populacjach chorych na łuszczycę prowadzonych zarówno dla celów naukowo-poznawczych, jak i w praktyce klinicznej.

Szczególną korzyścią opracowanej metody PCR-RFLP i PCR-SSP jest możliwość jednoczesnego badania dużej liczby próbek DNA z nabłonka jamy ustnej, co w porównaniu z pobieraniem krwi obwodowej, upraszcza procedurę uzyskiwania materiału biologicznego. Zaletą zaproponowanej metody badań jest możliwość, w zależności od założonego celu, zastosowania każdego z etapów analizy oddzielnie. Już pierwszy etap analizy umożliwi wyodrębnienie osób z allelem HLA-Cw*06, dlatego metoda ta może znaleźć zastosowanie między innymi w badaniach analizy sprzężeń allelu HLA-Cw*06 z innymi genami. Opisana procedura pozwala również na ocenę zygotywności, co może mieć praktyczne rokownicze znaczenie. Nie bez znaczenia są też zdecydowanie niższe koszty opisanej metody w porównaniu do komercyjnych zestawów służących do typowania alleli HLA -C. Oznaczanie allelu HLA-Cw*06 może już wkrótce okazać się rutynową procedurą w kwalifikacji chorych do terapii łuszczycy lekami biologicznymi, ponieważ wstępne obserwacje wskazują, że występowanie HLA-Cw*06 odgrywa rolę w podatności chorych na tę terapię.

Przydatność opracowanej metody oceniono stosując ją do oznaczania allelu HLA-Cw*06 w dużej populacji chorych oraz licznej grupie kontrolnej. Przeprowadzone badania wykazały, że HLA-Cw*06 nie jest allelem ryzyka łuszczycy rozpoczynającej się w powyżej 44 roku życia. Na podstawie przeprowadzonych badań nie można natomiast wykluczyć znaczenia tego allelu w łuszczycy rozpoczynającej się między czterdziestym, a czterdziestym czwartym rokiem życia, co może weryfikować uznanie 40. roku życia za wiek rozgraniczający łuszczycę związaną z HLA-Cw*06, od choroby niewykazującej takiej korelacji.

Obserwowane ponadto częstsze występowanie łuszczycy ciężkiej i niestabilnej u chorych bez allelu HLA-Cw*06 w porównaniu do pacjentów, u których allel ten występuje może wskazywać, że inne niż związane z PSORS1 genetyczne lub pozagenetyczne czynniki wpływają na przebieg choroby rozpoczynającej się w późniejszych dekadach życia.

Na podstawie stwierdzonego braku korelacji allelu HLA-Cw*06 z *pustulosis palmoplantaris* wykazano także, że dermatoza ta jest genetycznie odrębną od łuszczycy postacią choroby. Wniosek ten opiera się wprawdzie o badanie małoliczebnej, trzydziestoosobowej populacji chorych z PPP, jest jednak zgodny z wynikiem jedynego doniesienia [13] dotyczącego korelacji allelu HLA-Cw*06 z PPP, może stanowić zatem przyczynek do ustalenia pozycji klasyfikacyjnej tej jednostki chorobowej. Ujawniony znamienny

związek występowania allelu HLA–Cw*06 z łuszczycą kropelkową potwierdza szczególne znaczenie HLA–Cw*06 w predyspozycji do rozwoju tej postaci łuszczycy, wskazuje także na wspólne genetyczne podłoże *psoriasis guttata* z łuszczycą zwyczajną o wczesnym początku.

Przewlekły i nieuleczalny charakter łuszczycy jest przyczyną stale rosnących oczekiwań pacjentów wobec nowych odkryć naukowych i ich nadziei na skuteczne leczenie tej znacznie obniżającej jakość życia dermatozy. Olbrzymi postęp nauk medycznych pozwolił wprawdzie na poznanie wielu patogenetycznych ścieżek prowadzących do powstania blaszki łuszcycowej, nie wyjaśnił jednak przyczyny tej choroby. Należy mieć nadzieję, że najbliższe lata dzięki kolejnym immunogenetycznym odkryciom oraz powszechnemu stosowaniu metod biologii molekularnej pozwolą nie tylko na wczesną identyfikację osób z predyspozycją do łuszczycy i objęcie ich odpowiednią profilaktyką, lecz także na indywidualizację terapii i wprowadzenie wysoce wybiórczych metod leczenia.

7. WNIOSKI

1. Obraz kliniczny łuszczycy późnej, definiowanej jako choroba z początkiem powyżej trzydziestego roku życia, jest zróżnicowany i nie pozwala na jednoznaczne wykazanie wyróżniających ją objawów. Silny stres psychiczny jest ważnym czynnikiem prowokującym łuszczycę późną.
2. Wiek chorych, w którym łuszczycza późna pojawia się po raz pierwszy, nie wpływa na obraz kliniczny choroby.
3. Zażycie paznokci jest czynnikiem prognostycznym rozwoju ciężkiej łuszczycy późnej. Wiek, w którym łuszczycza rozpoczyna się po raz pierwszy oraz występowanie łuszczycy w rodzinie nie zwiększają ryzyka ciężkiego przebiegu choroby z późnym początkiem.
4. Zmodyfikowana technika PCR–RFLP i PCR–SSP do oznaczania allelu HLA–Cw*06 ze względu na możliwość jednoczesnej analizy dużej liczby próbek DNA i zastosowania każdego z etapów analiz oddzielnie oraz możliwość rozróżnienia homozygot od heterozygot HLA–Cw*06, a także relatywnie niskie koszty, jest przydatną techniką do badań genetyczno-populacyjnych chorych na łuszczycę.
5. HLA–Cw*06 jest allelem ryzyka łuszczycy zwyczajnej rozpoczynającej się poniżej 45. roku życia.
6. Brak korelacji występowania allelu HLA–Cw*06 z *pustulosis palmo-plantaris* przemawia za genetyczną odrębnością tej jednostki chorobowej od łuszczycy. Allel ten odgrywa istotną rolę w predyspozycji do rozwoju łuszczycy kropelkowej.

8. STRESZCZENIE

Mimo olbrzymiego postępu, jaki dokonał się w poznaniu patogenezы łuszczycy jej przyczyna nadal pozostaje enigmatyczna. Wraz z opisaniem ludzkiego genomu podejmowane są próby dokładnego określenia genetycznego podłoża tej choroby. Wyniki najnowszych badań jednoznacznie wskazują, że allel HLA-Cw*06 w obrębie PSORS1 na chromosomie szóstym jest głównym genem odpowiedzialnym za powstanie łuszczycy.

Wśród badaczy istnieje zgodne przekonanie, że genetyczne czynniki w znacznym stopniu determinują fenotyp choroby, a także wiek, w którym łuszczycy pojawia się po raz pierwszy w życiu. W dermatozie tej korelacja genotyp – fenotyp jest dodatkowo modyfikowana przez liczne czynniki środowiskowe. Znaczącym utrudnieniem prowadzonych analiz jest kliniczna heterogenność łuszczycy, dlatego też niezbędnym warunkiem dalszego postępu badań nad patogenezą tej dermatozy jest kliniczne rozróżnienie i zdefiniowanie różnych postaci łuszczycy. Jak dotąd dobrze scharakteryzowanym typem choroby jest łuszczycy zwyczajna rozpoczynająca się w młodym wieku, skojarzona z częstym występowaniem allelu HLA-Cw*06 i dodatnim wywiadem rodzinnym oraz łuszczycy kropelkowata stanowiąca model bezpośredniego, funkcjonalnego udziału cząsteczki HLA-Cw*06 w patogenezie choroby.

Znacznie mniej wiadomo na temat klinicznej i genetycznej charakterystyki łuszczycy rozpoczynającej się w późniejszych dekadach życia. Nieliczne zagraniczne publikacje dotyczące łuszczycy późnej, a zupełny brak takich w piśmiennictwie polskim był przesłanką do podjęcia próby jej klinicznego scharakteryzowania.

Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że występowanie allelu HLA-Cw*06 stanowi ważne kryterium definiowania różnych postaci łuszczycy oraz potwierdzenia lub wykluczenia ich genetycznego związku. Sugeruje się zatem, aby allel ten oznaczać u wszystkich chorych kwalifikowanych do badań klinicznych i naukowo-poznawczych, co w praktyce ograniczane jest wysokim kosztem analizy, opierającej się o stosowanie komercyjnych zestawów. Dlatego też w pracy podjęto próbę takiego zoptymalizowania techniki PCR służącej do oceny występowania allelu HLA-Cw*06, aby umożliwić jej szersze stosowanie przy niższych kosztach analizy. Przydatność metody oceniono stosując ją do typowania allelu HLA-Cw*06 w dużej populacji chorych i w grupie kontrolnej.

Materiał do klinicznej części badań stanowiło 404 chorych na łuszczycę zwyczajną rozpoczynającą się powyżej trzydziestego roku życia. Od pacjentów zbierano szczegółowy wywiad uwzględniający szereg parametrów charakteryzujących epidemiologiczne i kliniczne cechy łuszczycy. Każdego chorego badano dermatologicznie. Do oceny ciężkości łuszczycy posłużono się łuszczycowym wskaźnikiem PASI.

Przeprowadzone badania wykazały, że silny stres psychiczny był najczęstszym czynnikiem prowokującym pierwszy i kolejne wysiewy łuszczycy późnej. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że wiek, w którym choroba się rozpoczyna nie wpływa na fenotyp choroby. Badania potwierdziły ujemną korelację występowania łuszczycy w rodzinie z wiekiem początku choroby. Wykazano ponadto, że zajęcie paznokci jest czynnikiem prognostycznym ciężkiego przebiegu łuszczycy późnej, natomiast wiek, w którym łuszczycy się rozpoczyna po raz pierwszy oraz występowanie łuszczycy w rodzinie ryzyka tego nie zwiększają.

W dalszym etapie badań przystąpiono do opracowania zoptymalizowanej procedury służącej do oznaczania allelu HLA-Cw*06, łączącej techniki PCR-RFLP i PCR-SSP.

Przebiegała ona w trzech etapach:

- pierwszym z użyciem techniki PCR–SSP do specyficznego wykrycia allelu HLA–Cw*06 w wielu próbkach jednocześnie
- drugim z zastosowaniem techniki PCR–RFLP do rozróżnienia na podstawie wzoru fragmentów restrykcyjnych wśród osobników Cw*06 dodatnich homozygot od heterozygot
- w trzecim, końcowym etapie w celu wykluczenia niespecyficznego trawienia alleli Cw*07 i Cw*18 przeprowadzono amplifikację tych alleli metodą PCR–SSP przy użyciu opracowanego zdegenerowanego allelu, bez konieczności zmiany parametrów pierwszego etapu analizy

Przydatność opracowanej metody oceniono stosując ją do oznaczania allelu HLA–Cw*06 u 383. chorych z łuszczycą zwyczajną rozpoczynającą się po trzydziestym roku życia, w grupie 30. chorych z *pustulosis palmo-plantaris* (PPP) oraz u 25. osób z łuszczycą kropelkową. Częstości występowania allelu HLA–Cw*06 w ww. populacjach chorych porównano z właściwie dobranymi do wieku i płci chorych grupami kontrolnymi (liczebności grup kontrolnych odpowiednio: 143, 114 oraz 69 osób).

W celu wewnętrznej weryfikacji zastosowanej metody allel HLA–Cw*06 oznaczano u 64. osób z grupy kontrolnej za pomocą komercyjnego zestawu Dynal Allset^{+TC} SSP HLA–Cw *low resolution* uzyskując pełną zgodność genotypów.

Przeprowadzone badania wykazały statystycznie znamiennej różnicę w częstościach występowania allelu HLA–Cw*06 pomiędzy pacjentami z łuszczycą zwyczajną z początkiem powyżej 30. roku życia, a grupą kontrolną ($p=0,017$). Ujawniono, że znamienność różnicy statystycznej utrzymuje się, jeśli częstości HLA–Cw*06 porównywane są między grupą chorych z początkiem łuszczycy do 44. roku życia, a odpowiednio dobraną grupą kontrolną.

Porównanie częstości występowania allelu HLA–Cw*06 w populacji 30 chorych z PPP i w grupie kontrolnej nie wykazało statystycznie istotnych różnic ($p=1,000$).

Analiza częstości występowania allelu HLA–Cw*06 w populacji chorych na łuszczycę kropelkową i w grupie kontrolnej ujawniła, że grupy te różnią się statystycznie znamiennej ($p=0,049$).

Przeprowadzone badania wskazały na kliniczną heterogenność łuszczycy późnej i nie pozwoliły na jednoznaczne wykazanie objawów wyróżniających ten typ choroby, ujawniły natomiast istotną rolę silnego stresu psychicznego w jej prowokacji. Dokonana kliniczna analiza chorych zweryfikowała hipotezę, że wiek, w którym choroba się rozpoczyna, wpływa na fenotyp i ciężkość przebiegu łuszczycy późnej. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że zajęcie paznokci jest czynnikiem prognostycznym ciężkiego przebiegu łuszczycy późnej, natomiast wiek, w którym łuszczycą się rozpoczyna po raz pierwszy oraz występowanie łuszczycy w rodzinie ryzyka tego nie zwiększają.

Opracowana zmodyfikowana technika PCR ze względu na możliwość jednoczesnej analizy dużej liczby próbek niewielkich ilości DNA i zastosowania każdego z etapów analizy oddzielnie oraz możliwość rozróżnienia homozygot od heterozygot HLA–Cw*06 i relatywnie niskie koszty jest przydatną metodą do przesiewowego oznaczania allelu HLA–Cw*06 w dużych populacjach chorych na łuszczycę, zarówno dla celów badań genetycznych, jak i praktyki klinicznej, a także dalszych badań nad rolą HLA–C w patogenezie choroby.

HLA-Cw*06 jest allelem ryzyka łuszczycy rozpoczynającej się w poniżej 45. roku życia.

Brak związku występowania HLA-Cw*06 z *pustulosis palmo-plantaris* przemawia za genetyczną od łuszczycy odrębnością tej jednostki chorobowej. Allel ten odgrywa natomiast szczególną rolę w predyspozycji do rozwoju łuszczycy kropelkowej.

9. SUMMARY

In spite of enormous progress in understanding psoriasis pathogenesis, its cause still remains enigmatic. Together with human genome description efforts are being undertaken to determinate genetic background of the disease. According to very recent studies, it has been proven that HLA-Cw*06 is currently recognized as a major disease allele at the PSORS1 locus.

There is a strong conviction among researchers that genetic factors considerably affect disease phenotype as well as the onset of psoriasis. In this dermatosis genotype-phenotype correlation is additionally modified by multiple environmental factors. Psoriasis studies are complicated by the clinical heterogeneity of psoriasis, therefore, further progress in understanding the pathogenesis of psoriasis needs clinical stratification of patients enrolled to the studies. Up till now research has focused on psoriasis with early onset, which is associated with HLA-Cw*06 allele and positive family history, and psoriasis guttata which represents model of direct, functional contribution of HLA-Cw*06 in psoriasis pathogenesis.

Relatively little research has been done into clinical and genetic characteristic of less frequent late onset psoriasis. Only few available foreign publications and no published studies in Polish literature were the reason to undertake the attempt of clinical evaluation of this type of disease.

Recent studies have indicated that the characterization of HLA-Cw*06 gene should be used as a convenient criterion of different psoriasis phenotypes definition. It has been recommended that typing of this gene should be performed in every patient enrolled into clinical and experimental studies. In practice, it is limited by the high cost of analysis, based on commercial kits. Therefore DNA typing procedure suitable for identification of HLA-Cw*06 in large-scale analyses was worked out and optimized and tested for its robustness in a case-control study.

A total of 404 patients with psoriasis vulgaris and the age of onset above 30 years were enrolled into the study. Epidemiological and clinical data were collected from each patient. Each patient was dermatologically examined. The severity of the psoriasis was estimated by means of the Psoriasis Area and Severity Index (PASI).

Studies revealed that strong psychological stress was the most frequent provocative factor of late onset psoriasis. In the population examined, the onset age of the disease did not influence the phenotype of the disease. Negative association of familial psoriasis with age of onset was also proved. Nail psoriasis was a prognostic factor of severe course of late psoriasis, whereas the age of onset and familial psoriasis did not increase this risk.

The next step of the study was to work out and optimize a PCR-RFLP and PCR-SSP based method suitable for identification of HLA-Cw*06 allele.

It involved three stages:

- at the first stage the PCR-SSP technique was used for specific detection of HLA-Cw*06
- at the next stage PCR-RFLP was used in case of HLA-Cw*06 individuals to distinguish heterozygotes from homozygotes by comparison of the restriction fragment patterns

- at the third last stage, to exclude the presence of unspecifically digested Cw*07 and Cw*18 a degenerate primer was designed which enables amplification of these alleles by PCR–SSP without the necessity of changing parameters of the first-stage analysis

The suitability of this method was assessed using HLA–Cw*06 typing in 383 patients with psoriasis vulgaris with onset above 30 y, 30 patients with *pustulosis palmo-plantaris*, 25 patients with guttate psoriasis. The frequency of HLA–Cw*06 in those populations was compared with control populations selected according to age and gender (number of control groups respectively: 143, 114 and 69).

As internal validation, the commercial Dynal AllSet⁺™SSP HLA–Cw low resolution kit was used to determine the HLA–Cw*06 status of 64 individuals previously genotyped with the use of the described procedure. All genotypes were fully concordant.

A significant difference in the frequency of HLA–Cw*06 allele between patients and controls was observed ($p=0.017$). The difference in HLA–Cw*06 frequency remained statistically significant up to 44 years of age.

No statistical difference in HLA–Cw*06 allele frequency was observed between patients with PPP and controls ($p=1,000$).

The comparison of HLA–Cw*06 frequencies in patients with guttate psoriasis and controls revealed a statistically significant difference ($p=0,049$).

This study revealed that the clinical picture of psoriasis with onset above the age of 30 is heterogenous and does not allow to indicate its distinctive features. The significance of strong psychological stress as a provocative factor was revealed. The study showed that age of onset does not influence phenotype of the disease. It was revealed that nail involvement is a prognostic factor of severe late psoriasis, whereas age of onset and familial psoriasis do not increase this risk.

This study showed markedly that the newly developed PCR–based procedure, due to low costs of analysis, high-throughput capacity, low sample amount requirements, verification of zygosity status can be useful in rapid screening of large number of samples for typing of HLA–Cw*06 allele. It might be especially useful for the purpose of genetic studies as well as in medical practice and may also contribute to future studies in characterising the role of HLA–C locus in the psoriasis pathogenesis.

HLA–Cw*06 is a risk factor of psoriasis with onset below 45 y. No correlation of HLA–Cw*06 with *pustulosis palmo-plantaris* indicates its different from psoriasis genetic background. In contrast, this allele plays an important role in predisposition to *guttate psoriasis*.

10. PIŚMIENICTWO

1. Akiyama T, Seishima M, Watanabe H, Nakatani A, Mori S, Kitajima Y. The relationships of onset and exacerbation of pustulosis palmaris et plantaris to smoking and focal infections. *J Dermatol* 1995; 22(12): 930-934.
2. Allen MH, Veal C, Faassen A, Powis SH, Vaughan RW, Trembath RC, Barker JN. A non-HLA gene within the MHC in psoriasis. *Lancet* 1999; 353: 1589-1590.
3. Allen MH, Ameen H, Veal C, Evans J, Ramrakha-Jones VS, Marsland AM, Burden AD, Griffiths CE, Trembath RC, Barker JN. The major psoriasis susceptibility locus PSORS1 is not a risk factor for late onset psoriasis. *J Invest Dermatol* 2004; 124: 103-106.
4. Altobelli E, Petrocelli R, Marziliano C, Fagnoli M, Maccarone M, Chimenti S, Peris K. Effect of family history of psoriasis on age at onset, stratified by age group. *Br J Dermatol* 2007; 156: 1362-1402.
5. Altobelli E, Petrocelli R, Maccarone M, Altomare G, Argenziano G, Giannetti A, Peserico A, Vena GA, Tiberti S, Chimenti S, Peris K. Risk factors of hypertension, diabetes and obesity in Italian psoriasis patients: a survey on socio-demographic characteristics, smoking habits and alcohol consumption. *Eur J Dermatol* 2009. [Epub ahead of print]
6. Altmüller J, Palmer LJ, Fischer G, Scherb H, Wjst M. Genomewide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find. *Am J Hum Genet* 2001; 69(5): 936-950.
7. Amatya B, Nordlind K. Focus groups in Swedish psoriatic patients with pruritus. *J Dermatol* 2008; 5(1): 1-5.
8. Ammourey A, El Sayed F, Dhaybi R, Bazex J. Palmoplantar pustulosis should not be considered as a variant of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008; 22(3): 392-393.
9. Anderssen C, Henseler T. Inheritance of psoriasis. Analysis of 2035 family histories. *Hautarzt* 1982; 33: 214-217.
10. Arnetz BB, Fjellner B, Eneroth P, Kallner A. Stress and psoriasis: psychoendocrine and metabolic reactions in psoriatic patients during standardized stressor exposure. *Psychosom Med* 1985; 47(6): 528-541.
11. Asahina A, Kuwata S, Tokunaga K, Juji T, Nakagawa H. Study of aspartate at residue 9 of HLA-C molecules in Japanese patients with psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci* 1996; 13(2): 125-133.
12. Ashcroft DM, Wan Po AL, Williams HC, Griffiths CE. Clinical measures of disease severity and outcome in psoriasis: a critical appraisal of their quality. *Br J Dermatol* 1999; 141(2): 185-191.
13. Asumalacthi K, Ameen M, Suomela S, Hagforsen E, Michaelsson G, Evans J, Munro M i inni. Genetic analysis of PSORS1 distinguishes guttate psoriasis and palmoplantar pustulosis. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 627-632.

14. Austin LM, Ozawa M, Kikuchi T, Walters IB, Krueger JG. The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol* 1999; 113(5): 752-759.
15. Baker BS, Garioch JJ, Hardman C, Powles A, Fry L. Induction of cutaneous lymphocyte-associated antigen expression by group A streptococcal antigens in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 1997; 289: 671-676.
16. Bal J. *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki medycznej*. Warszawa. Wydawnictwo Naukowe PWN, wydanie 2008 r.
17. Barker J. Genetic aspects of psoriasis. *Clinical aspects of psoriasis. Clin Exp Dermatol* 2001; 26: 321-325.
18. Barzilai DA, Freiman A, Dellavalle RP, Weinstock MA, Mostow EN. Dermatopepidemiology. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52(4): 559-573.
19. Berg M, Svensson M, Branberg M, Nordlind K. Psoriasis and stress: a prospective study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008; 22: 670-674.
20. Bernhard JD. Clinical differences in juvenile vs adult-onset psoriasis. *Br J Dermatol* 1996; 135(3): 501-2.
21. Bos JD, de Boer OJ, Tibosch E, Das PK, Pals ST. Skin-homing T lymphocytes: detection of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) by HECA-452 in normal human skin. *Arch Dermatol Res* 1993; 285(4): 179-183.
22. Brandrup F, Holm N, Grunnet N, Henningseuk K, Hansen H. Psoriasis in monozygotic twins: variation in expression in individuals with identical genetic constitution. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1982; 62: 229-236.
23. Buhler S, Sanchez-Mazas A, Zanone R, Djavad N, Tiercy JM. PCR-SSOP molecular typing of HLA-C alleles in an Iranian population. *Tissue Antigens* 2002; 59(6): 525-530.
24. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB2, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995; 46: 355-367.
25. Burch PR, Rowell NR. Mode of inheritance in psoriasis. *Arch Dermatol* 1981; 117, 251-252.
26. Burden AD, Javed S, Bailey M, Hodgins M, Connor M, Tillman D. Genetics of psoriasis: paternal inheritance and a locus on chromosome 6p. *J Invest Dermatol* 1998; 110(6): 958-960.
27. Campalani E, Barker J. The clinical genetics of psoriasis. *Current Genomics* 2005; 6: 51-60.
28. Canpolat F, Cemil BC, Eskioglu F, Akis HK. Is facial involvement a sign of severe psoriasis? *Eur J Dermatol* 2008; 18(2): 169-167.

29. Capon F, Semprini B, Dallapiccola i inni. Evidence for interaction between psoriasis-susceptibility loci on chromosomes 6p21 and 6q21. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1798-1800.
30. Capon F, Toal IK, Evans JC, Allen MH, Patel S, Tillman D, Burden D, Barker JN, Trembath RC. Haplotype analysis of distantly related populations implicates corneodesmosin in psoriasis susceptibility. *J Med Genet* 2003; 40(6): 447-452.
31. Chang YT, Tsai SF, Lee DD, Shiao YM, Huang CY, Liu HN, Wang WJ, Wong CK. A study of candidate genes for psoriasis near HLA-C in Chinese patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 2003; 148: 418-423.
32. Chang YT, Tsai SF, Lin MW, Liu HN, Lee DD, Shiao YM, Chin PJ, Wang WJ. SPR1 gene near HLA-C is unlikely to be a psoriasis susceptibility gene. *Exp Dermatol* 2003; 12: 307-314.
33. Christensen T, Callas K, Papenfuss J, Hoffman M, Hansen Ch, Wong B, Panko J, Krueger G. Observations of psoriasis in the absence of therapeutic intervention Identifies two unappreciated morphologic variants, thin-plaque and thick-plaque psoriasis, and their associated phenotypes. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2397-2402.
34. Christophers E. Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26(4): 314-320.
35. Christophers E: Explaining phenotype heterogeneity in patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 2007; 158(3): 437-441.
36. Cohen AD, Bonnef DY, Reuveni H, Vardy DA, Naggan L, Halevy S. Drug exposure and psoriasis vulgaris: case-control and case-crossover studies. *Acta Derm Venereol* 2005; 85(4): 299-303.
37. Costanzo A, Talamonti M, Botti E. HLA-Cw6 allele confers sensitivity to efalizumab treatment in psoriasis. Psoriasis: from Gene to Clinic, 5th International Congress, London, UK, 4-6 December 2008. *Br J Dermatol* 2008; 159: 1392.
38. Coughlin SS. Recall bias in epidemiologic studies. *J Clin Epidemiol* 1990; 43(12): 1431-2.
39. de Jong EM, Seegers BA, Gulink MK, Boezeman JB, van de Kerkhof PC. Psoriasis of the nails associated with disability in a large number of patients: results of a recent interview with 1,728 patients. *Dermatology* 1996; 193(4): 300-3.
40. De Rie M, Goedkoop A, Bos J. Overview of psoriasis. *Dermatol Ther* 2004; 17: 341-349.
41. Dubertret L, Mrowietz U, Ranki A, van de Kerkhof PC, Chimenti S, Lotti T, Schäfer G; EUROPSO Patient Survey Group. European patient perspectives on the impact of psoriasis: the EUROPSO patient membership survey. *Br J Dermatol* 2006; 155(4): 729-736.
42. Duffy D, Spelman L, Martin N. Psoriasis in Australian twins. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29(3): 428-434.

43. Economidou J, Papasteriades C, Verla-Leftherioti M, Vareltzidis A, Stratigos J. Human leukocyte antigens A, B, and C in Greek patients with psoriasis: relation to age and clinical expression of the disease. *J Am Acad Dermatol* 1985; 13: 578-582.
44. Eedy DJ, Burrows D, Bridges JM, Jones FG. Clearance of severe psoriasis after allogenic bone transplantation. *BMJ* 1990; 300(6729): 908.
45. Eghlileb A, Davies E, Finlay A. Psoriasis has a major secondary impact on the lives of family members and partners. *Br J Dermatol* 2007; 156: 1245-1250.
46. Ehrlich HA, Opelz G, Hansen J. HLA DNA typing and transplantation. *Immunity* 2001; 14: 347-356.
47. Elder JT, Fisher GJ, Lindquist PB, Bennett GL, Pittelkow MR, Coffey RJ Jr, Ellingsworth L, Derynck R, Voorhees JJ. Overexpression of transforming growth factor alpha in psoriatic epidermis. *Science* 1989; 243(4892): 811-814.
48. Elder JT, Nair RP, Henseler T, Jenisch S, Stuart P, Chia N, Christophers E, Voorhees JJ. The genetics of psoriasis 2001: the odyssey continues. *Arch Dermatol* 2001; 137(11): 1447-1454.
49. Ejaz A, Raza N, Iftikhar N, Iftikhar A, Farooq M. Presentation of early onset psoriasis in comparison with late onset psoriasis: A clinical study from Pakistan. *Ind J Dermatol*, 2009; 75: 36-40.
50. Enerback CH, Martisson T, Inerot A, Wahlstrom J, Enlund F, Yhr M, Samuelsson L, Swanbeck G. Significantly earlier age at onset for the HLA-Cw6-positive than for the Cw6-negative psoriatic sibling. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 695-696.
51. Enerback CH, Martisson T, Inerot A, Wahlstrom J, Enlund F, Yhr M, and Swanbeck G. Evidence that HLA-Cw6 determines early onset of psoriasis, obtained using sequence-specific primers (PCR-SSP). *Acta Derm Venereol* 1997; 77: 273-276.
52. Enerback C, Nilsson S, Enlund F, Inerot A, Samuelsson L, Wahlstrom J, Swanbeck G, Martinsson T: Stronger association with HLA-Cw6 than corneodesmosin (S-gene) polymorphisms in Swedish psoriasis patients. *Arc Dermatol Res* 2000; 292: 525-530.
53. Enfors W, Molin L. Pustulosis palmaris et plantaris. A follow-up study of a ten-year material. *Acta Derm Venereol* 1971; 51: 289-294.
54. Enlund F, Samuelsson L, Enerbäck C, Inerot A, Wahlström J, Yhr M, Torinsson A, Riley J, Swanbeck G, Martinsson T. Psoriasis susceptibility locus in chromosome region 3q21 identified in patients from southwest Sweden. *Eur J Hum Genet* 1999; 7(7): 783-790.
55. Eriksson MO, Hagforsen E, Lundin IP, Michaëlsson G. Palmoplantar pustulosis: a clinical and immunohistological study. *Br J Dermatol* 1998; 138: 390-398.
56. Farber EM, Nall ML, Watson W. Natural history of psoriasis in 61 twin pairs. *Arch Dermatol* 1974; 109: 207-211.

57. Farber EM, Nall ML. The natural history of psoriasis in 5600 patients. *Dermatologica* 1974; 148: 1-18.
58. Farber EM, Nall ML. Nail psoriasis. *Cutis* 1992; 50(3): 174-178.
59. Feldman SR, Fleischer AB Jr, Reboussin DM, Rapp SR, Exum ML, Clark AR, Nurre L. The self-administered psoriasis area and severity index is valid and reliable. *J Invest Dermatol* 1996; 106(1): 183-186.
60. Feldman SR. A quantitative definition of severe psoriasis for use in clinical trials. *J Dermatol Treat* 2004; 15: 27-29.
61. Ferrandiz C, Pujol R, Garcia-Patos V. i inni: Psoriasis of early and late onset: a clinical and epidemiologic study from Spain. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46: 867-873.
62. Fierlbeck G, Rassner G. Treatment of psoriasis and psoriatic arthritis with interferon gamma. *J Invest Dermatol* 1990; 95(6): 138-141.
63. Folkman S, Lazarus RS, Gruen RJ, DeLongis A. Appraisal, coping, health status, and psychological symptoms. *J Pers Soc Psychol* 1986; 50(3): 571-579.
64. Folkman S, Lazarus RS, Dunkel-Schetter C, DeLongis A, Gruen RJ. Dynamics of a stressful encounter: cognitive appraisal, coping, and encounter outcomes. *J Pers Soc Psychol* 1986; 50(5): 992-1003.
65. Fortune DG, Richards H, Main C, Griffith C. What patients with psoriasis believe about their condition. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39: 196-201.
66. Fortune DG, Richards HL, Main CJ, Griffiths CE. Patients' strategies for coping with psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 2002; 27: 177-184.
67. Fortune DG, Richards HL, Kirby B, McElhone K, Markham T, Rogers S, Main CJ, Griffiths CE. Psychological distress impairs clearance of psoriasis in patients treated with photochemotherapy. *Arch Dermatol* 2003; 139: 752-756.
68. Fortune DG, Richards HL, Griffiths CE. Psychologic factors in psoriasis: consequences, mechanisms, and interventions. *Dermatol Clin* 2005; 23(4):681-694.
69. Fredriksson T, Pettersson U. Severe psoriasis-oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica* 1978; 157: 238-244.
70. Fry L, Powles A, Corcoran S, Rogers S, Ward J Unsworth D. HLA-Cw*06 is not essential for streptococcal-induced psoriasis. *Br J Dermatol* 2006; 154: 850-853.
71. Fux R, Mörke K, Pröhmer AM, Delabar U, Schaeffeler E, Gleiter CH, Schwab M. Psoriasis aggravation and metoprolol treatment -- a prospective observational case study. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2007; 45(12): 659-661.
72. García-Diez A, Foraster CF, Sebastián FV, Tudela LL, Llach XB, Fernández GS. What characterizes the severity of psoriasis? Results from an epidemiological study of over 3,300 patients in the Iberian region. *Dermatology* 2008; 216(2): 137-151.

73. Gardembas-Pain M, Ifrah N, Foussard C, Boassom M, Saint Andre JP, Verret JL. Psoriasis after allogenic bone marrow transplantation. *Arch Dermatol* 1990; 126: 1523.
74. Gelfand JM, Weinstein R, Porter SB, Neimann AL, Berlin JA, Margolis DJ. Prevalence and treatment of psoriasis in the United Kingdom: a population-based study. *Arch Dermatol* 2005; 141(12): 1537-1541.
75. Glaser R, Mrowietz U, Jenisch S, Simeoni E, Christophers E. Simultaneous onset of psoriasis vulgaris in monozygotic twins. *Am J Clin Dermatol* 2001; 2: 183-186.
76. Gołab J, Jakóbsiak M, Lasek W. *Immunologia*. Warszawa. Wydawnictwo Naukowe PWN, wydanie 2008 r.
77. Gottlieb SL, Gilleaudeau P, Johnson R, Estes L, Woodworth TG, Gottlieb AB, Krueger JG. Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin (DAB389IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis. *Nat Med* 1995; 1(5): 442-447.
78. Gottlieb AB, Chaudhari U, Baker DG, Perate M, Dooley LT. The National Psoriasis Foundation Psoriasis Score (NPF-PS) system versus the Psoriasis Area Severity Index (PASI) and Physician's Global Assessment (PGA): a comparison. *J Drugs Dermatol* 2003; 2(3): 260-266.
79. Griffith CE, Richards H. Psychological influences in psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26: 338-342.
80. Griffiths CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 2007; 370(9583): 263-271.
81. Griffiths CE, Christophers E, Barker JN, Chalmers RJ, Chimenti S, Krueger GG, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Fry L. A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. *Br J Dermatol* 2007; 156(2): 258-262.
82. Gudjonsson JE, Karason A, Antonsdottir A, Runarsdottir EH, Hauksson VB, Upmanyu R, Gulcher J, Stefansson K, Valdimarsson H. Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw*0602 allele have a 2.5-fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6 heterozygotes. *Br J Dermatol* 2003; 148(2): 233-235.
83. Gudjonsson JE, Johnston A, Sigmundsdottir H, Valdimarsson H. Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol* 2004; 135(1): 1-8.
84. Gudjonsson JE, Karason A, Runarsdottir EH, Antonsdottir AA, Hauksson VB, Jónsson HH, Gulcher J, Stefansson K, Valdimarsson H. Distinct clinical differences between HLA-Cw*0602 positive and negative psoriasis patients--an analysis of 1019 HLA-C- and HLA-B-typed patients. *J Invest Dermatol* 2006; 126(4): 740-745.
85. Gudjonsson JE, Elder JT. Psoriasis: epidemiology. *Clin Dermatol* 2007; 25(6): 535-546.

86. Gudmundsdottir AS, Sigmundsdottir H, Sigurgeirsson B, Good MF, Valdimarsson H, Jonsdottir I. Is an epitope on keratin 17 a major target for autoreactive T lymphocytes in psoriasis?. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 580-586.
87. Gulliver W, Tomi Z, Pirzada S. HLA-Cw6 and TNF- α polymorphisms may help predict response to biologic therapy in patients with chronic plaque psoriasis. 37th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Zurich, Switzerland, 5-8 September 2007. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 22.
88. Gupta MA, Gupta AK, Wateel GN. dEarly onset (< 40 years age) psoriasis is comorbid with greater psychopathology than late onset psoriasis: a study of 137 patients. *Acta Derm Venereol* 1996; 76: 464-466.
89. Gupta MA, Gupta AK, Kirkby S, Weiner HK, Mace TM, Schork NJ, Johnson EH, Ellis CN, Voorhees JJ. Pruritus in psoriasis. A prospective study of some rpsychiatric and dermatologic correlates. *Arch Dermatol* 1988; 124(7): 1052-1057.
90. Gupta MA, Gupta AK, Kirkby S, Schork NJ, Gorr SK, Ellis CN, Voorhees JJ. A psychocutaneous profile of psoriasis patients who are stress reactors. A study of 127 patients. *Gen Hosp Psychiatry* 1989; 11(3): 166-173.
91. Harvima RJ, Viinamäki H, Harvima IT, Naukkarinen A, Savolainen L, Aalto ML, Horsmanheimo M. Association of psychic stress with clinical severity and symptoms of psoriatic patients. *Acta Derm Venereol* 1996; 76(6): 467-471.
92. Hashigucci K, Yokoyama M, Niizeki H, Yamasaki Y, Akiya K, Tojo T, Urushibara T, Yamazaki Y, Shimizu H, Nishikawa T. Polymorphism in the tumor necrosis factor B gene is associated with Palmoplantar pustulosis. *Tissue Antigens*. 1999; 54(3): 288.
93. Hellgren L, Mobacken H. Pustulosis palmaris et plantaris. Prevalence, clinical observations and prognosis. *Acta Derm Venereol* 1971; 51(4): 284-288.
94. Helms C, Saccone NL, Cao L, Daw JA, Cao K, Hsu TM, Taillon-Miller P, Duan S, Gordon D, Pierce B, Ott J, Rice J, Fernandez-Vina MA, Kwok PY, Menter A, Bowcock AM. Localization of PSORS1 to a haplotype block harboring HLA-C and distinct from corneodesmosin and HCR. *Hum Genet* 2005; 118: 466-476.
95. Heng MC, Heng MK. Beta-adrenoceptor antagonist-induced psoriasiform eruption. Clinical and pathogenetic aspects. *Int J Dermatol* 1988; 27(9): 619-627.
96. Henseler T. The genetics of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1997; 37: 1-11.
97. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1985; 13: 450-456.
98. Higgins E. Alcohol, smoking, psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 2000; 25: 107-110.
99. Holmes TH, Rahe RH. The social readjustment rating scale. *J Psychosom Res* 1967; 11: 213-218.
100. Holm S, Sanchez F, Carlen L, Mallbris L, Stahvcdxle M, O'Brien K. HLA-Cw*602 associates more strongly to psoriasis in the Swedish population than

- variants of the novel 6p21.3 gene PSORS1C3. *Acta Derm Venereol* 2005; 85: 2-8.
101. Ikaheimo I, Silvennoinen-Kassinen S, Karvonen J, Tiilikainen A. Alanine at position 73 of HLA-C is associated with psoriasis vulgaris in Finland. *Br J Dermatol* 1994; 131(2): 257-259.
 102. Ikaheimo I, Tiilikainen A, Karvonen J, Silvennoinen-Kassinen S. HLA-Cw6 with reference to the clinical picture of psoriasis. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 363-365.
 103. Ikaheimo I, Tiilikainen A, Karvonen J, Silvennoinen-Kassinen S. HLA risk haplotype Cw6,DR7,DQA1*0201 and HLA-Cw6 with reference to the clinical picture of psoriasis vulgaris. *Arch Dermatol Res* 1996; 288(7): 363-365.
 104. Jacobson CC, Kimball AB. Rethinking the Psoriasis Area and Severity Index: the impact of area should be increased. *Br J Dermatol* 2004; 151(2): 381-387.
 105. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 1985; 316: 76-79.
 106. Jenisch S, Henseler T, Nair RP, Guo SW, Westphal E, Stuart P, Krönke M, Voorhees JJ, Christophers E, Elder JT. Linkage analysis of human leukocyte antigen (HLA) markers in familial psoriasis: strong disequilibrium effects provide evidence for a major determinant in the HLA-B/-C region. *Am J Hum Genet* 1999; 64(3): 895-896.
 107. Jenisch S, Koch S, Henseler T, Nair RP, Elder JT, Watts CE, Westphal E, Voorhees JJ, Christophers E, Krönke M. Corneodesmosin gene polymorphism demonstrates strong linkage disequilibrium with HLA and association with psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 1999; 54: 439-449.
 108. Johnston A, Gudjonsson JE, Sigmundsdottir H, Love TJ, Valdimarsson H. Peripheral blood T cell responses to keratin peptides that share sequences with streptococcal M proteins are largely restricted to skin-homing CD8(+) T cells. *Clin Exp Immunol* 2004; 138(1): 83-93.
 109. Karason A, Gudjonsson JE, Jónsson HH, Hauksson VB, Runarsdottir EH, Stefánsson K, Valdimarsson H, Gulcher JR. Genetics of psoriasis in Iceland: evidence for linkage of subphenotypes to distinct Loci. *J Invest Dermatol* 2005; 124(6): 1177-1185.
 110. Kauffman CL, Aria N, Toichi E, McCormick TS, Cooper KD, Gottlieb AB, Everitt DE, Frederick B, Zhu Y, Graham MA, Pendley CE, Mascelli MA. A phase I study evaluating the safety, pharmacokinetics and clinical response of a human IL-12 p40 antibody in subjects with plaque psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 2004; 123: 1037-1044.
 111. Kaur I, Saraswat A, Kumar B. Nail changes in psoriasis: a study of 167 patients. *Int J Dermatol* 2001; 40(9): 601-603.
 112. Kleinert S, Feuchtenberger M, Kneitz C, Tony HP. Psoriatic arthritis: clinical spectrum and diagnostic procedures. *Clin Dermatol* 2007; 25(6): 519-23.

113. Krueger GG, Duvic M. Epidemiology of psoriasis: clinical issues. *J Invest Dermatol* 1994; 102(6): 14-18.
114. Krueger GG, Feldman SR, Camisa C, Duvic M, Elder JT, Gottlieb AB, Koo J, Krueger JG, Lebwohl M, Lowe N, Menter A, Morison WL, Prystowsky JH, Shupack JL, Taylor JR, Weinstein GD, Barton TL, Rolstad T, Day RM. Two considerations for patients with psoriasis and their clinicians: what defines mild, moderate, and severe psoriasis? What constitutes a clinically significant improvement when treating psoriasis? *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 281-285.
115. Krueger GG, Langley RG, Leonardi C, Yeilding N, Guzzo C, Wang Y, Dooley LT, Lebwohl M; CNTO 1275 Psoriasis Study Group. A human interleukine-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. *N Eng J Med* 2007; 356: 580-592.
116. Kundakci N, Türsen U, Babiker MO, Gürgey E. The evaluation of the sociodemographic and clinical features of Turkish psoriasis patients. *Int J Dermatol* 2002; 41(4): 220-224.
117. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(19): 5444.
118. Langley RG, Ellis CN. Evaluating psoriasis with Psoriasis Area and Severity Index, Psoriasis Global Assessment, and Lattice System Physician's Global Assessment. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51(4): 563-569.
119. Langley RG, Krueger GG, Griffiths CE. Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(2): 18-23.
120. Lebedeva TV, Ohashi M, Huang A, Vasconcellos S, Flesch S, Yu N. Emerging new alleles suggest high diversity of HLA-C locus. *Tissue Antigens* 2005; 65: 101-106.
121. Lee YA, Rüschenhoff F, Windemuth C, Schmitt-Egenolf M, Stadelmann A, Nürnberg G, Ständer M, Wienker TF, Reis A, Traupe H. Genomewide scan in german families reveals evidence for a novel psoriasis-susceptibility locus on chromosome 19p13. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1020-1024.
122. Leung DY, Gately M, Trumble A, Ferguson-Darnell B, Schlievert PM, Picker LJ. Bacterial superantigens induce T cell expression of the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen, via stimulation of interleukin 12 production. *J Exp Med* 1995; 181(2): 747-753.
123. Lindegard B. Diseases associated with psoriasis in a general population of 159,200 middle-aged, urban, native Sweden. *Dermatologica* 1986; 172: 298-304.
124. Lomhold G. Psoriasis. Prevalence, spontaneous course and genetic: a census study on the prevalence of skin disease on the Faroe Islands. *Copenhagen G E C* 1963.
125. Łuszczek W, Kubicka W, Cisło M, Nockowski P, Woszczek G, Baran E, Kuśmierczyk P. Strong association of HLA-Cw6 allele with juvenile psoriasis in Polish patients. *Immunol Lett* 2003; 85: 59-64.

126. Łuszczek W, Manczak M, Cisko M, Nockowski P, Wisniewski A, Jasek M, Kuśnierczyk P. Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1 is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Hum Immunol* 2004; 65: 758-766.
127. Maes M, Song C, Lin A, De Jongh R, Van Gastel A, Kenis G, Bosmans E, De Meester I, Benoy I, Neels H, Demedts P, Janca A, Scharpé S, Smith RS. The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine* 1998; 10(4): 313-318.
128. Mallbris L, Acre O, Granath F, Yin L, Lindelof B, Ekbom A, Ståhle-Beckdahl M. Increased risk of cardiovascular mortality in psoriasis inpatients but not in outpatients. *Eur J Epidemiol* 2004; 19: 225-230.
129. Mallbris L, Larsson P, Gergqvist S, Vingard E, Grenath F, Ståleat M. Psoriasis phenotype at disease onset; clinical characterisation of 400 adult cases. *Inv J Dermatol* 2005; 499-504.
130. Mallbris L, Ritchlin CT, Ståhle M. Metabolic disorders in patients with psoriasis and psoriatic arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2006; 8(5): 355-363.
131. Mallon E. Retroviruses and psoriasis. *Curr Opin Infect Dis* 2000; 13(2): 103-107.
132. Mallon E, Bunce M, Wojnarowska F, Welsh K. HLA-CW*0602 is a susceptibility factor in type I psoriasis, and evidence Ala-73 is increased in male type I psoriatics. *J Invest Dermatol* 1997; 109(2): 183-186.
133. Mallon E, Young D, Bunce M, Gotch FM, Easterbrook PJ, Newson R, Bunker CB. HLA-Cw*0602 and HIV-associated psoriasis. *Br J Dermatol* 1998; 139(3): 527-533.
134. Mallon E, Newson R, Bunker CB. HLA-Cw6 and the genetic predisposition to psoriasis: a meta-analysis of published serologic studies. *J Invest Dermatol* 1999; 113(4): 693-695.
135. Mallon E, Bunce M, Savoie H, Rowe A, Newson R, Gotch F, Bunker CB. HLA-C and guttate psoriasis. *Br J Dermatol* 2000; 146: 1177-1184.
136. Marples RR, Heaton CL, Kligman AM. Staphylococcus aureus in psoriasis. *Arch Dermatol* 1973; 107(4): 568-570.
137. Martin BA, Chalmers RJG, Telfer NR. How great is the risk of further psoriasis following a single episode of a guttate psoriasis? *Arch Dermatol* 1996; 132: 717-718.
138. Martinez-Borra J, Brautbar C, Gonzalez S, Enk CD, López-Vázquez A, López-Larrea C. The region of 150 kb telomeric to HLA-C is associated with psoriasis in the Jewish population. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 928-932.
139. Matthews D, Fry L, Powles A, Weber J, McCarthy M, Fisher E, Davies K, Williamson R. Evidence that a locus for familial psoriasis may map to chromosome 4q. *Nat Genet* 1996; 14: 231-233.

140. McFadden J, Valdimarsson H, Fry L. Cross- reactivity between streptococcal M surface antigen and human skin. *Br J Dermatol* 1991; 125: 443-447.
141. Melski JW, Stern RS. The separation of susceptibility to psoriasis from age at onset. *J Invest Dermatol* 1981; 77(6): 474-477.
142. Melski JW, Bernhard JD, Stern RS. The Koebner (isomorphic) response in psoriasis. Associations with early age at onset and multiple previous therapies. *Arch Dermatol* 1983; 119(8): 655-659.
143. Michaëlsson G, Gustafsson K, Hagforsen E. The psoriasis variant palmoplantar pustulosis can be improved after cessation of smoking. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54(4): 737-738.
144. Middleton D. HLA typing from serology to sequencing era. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2005; 4: 53-66.
145. Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. New allele frequency database: <http://www.allelefreqencies.net>. *Tissue Antigens* 2003; 61(5): 403-407.
146. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol* 2005; 175(1): 5-14.
147. Mrowietz U, Elder JT, Barker J. The importance of disease associations and concomitant therapy for the long-term management of psoriasis patients. *Arch Dermatol Res* 2006; 298(7): 309-319.
148. Mueller W, Herrmann B. Cyclosporine A for psoriasis. *N Engl J Med* 1979; 301: 555.
149. Murray ML, Bergstresser PR, Adams-Huet B, Cohen JB. Relationship of psoriasis severity to obesity using same-gender siblings as controls for obesity. *Clin Exp Dermatol* 2009; 34(2): 140-144.
150. Muto M, Ohmura A, Hamamoto Y, Konishi Y, Shiozawa S, Youn JI, Tanifuji J, Furuya K, Sasazuki T, Ogawa H. Generalized pustular psoriasis: strategy for identification of psoriasis susceptibility gene. *Arch Dermatol Res* 2003; 295(1): 60-62.
151. Nagler A, Brautbar C, Slavin S, Bishara A. Bone marrow transplantation using unrelated and family related donors: the impact of HLA-C disparity. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18(5): 891-897.
152. Nair RP, Henseler T, Jenisch S, Stuart P, Bichakjian CK, Lenk W, Westphal E, Guo SW, Christophers E, Voorhees JJ, Elder JT. Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome wide scan. *Hum Mol Genet* 1997; 6(8): 1349-1356.
153. Nair RP, Stuart PE, Nistor I, Hiremagalore R, Chia NV, Jenisch S, Weichenthal M, Abecasis GR, Lim HW, Christophers E, Voorhees JJ, Elder JT. Sequence and Haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Gen* 2006; 78: 827-851.

154. Nair RP, Stuart P, Henseler T et al. Localization of psoriasis-susceptibility locus PSORS1 to a 60-kb interval telomeric to HLA-C. *Am J Hum Genet* 2000; 78: 827-851.
155. Naldi L, Peli L, Parazzini F et al. Family history of psoriasis, stressful life events, and recent infectious disease are risk factors for a first episode of acute guttate psoriasis: results of a case control study. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44 (3): 433-438.
156. Naldi L, Peli L, Parazzini F. Association of early-stage psoriasis with smoking and male alcohol consumption: evidence from an Italian case-control study. *Arch Dermatol* 1999; 135(12): 1479-84.
157. Naldi L. Epidemiology of psoriasis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004; 3(2): 121-128.
158. Naldi L, Chatenoud L. Psoriasis. *N Engl J Med* 2005; 353(8): 848-850.
159. Naldi L, Gambini D. The clinical spectrum of psoriasis. *Clin Dermatol*; 25(6): 510-518.
160. Nedoszytko B, Szczerkowska-Dobosz A, Zabłotna M, Gleń J, Rebała K, Roszkiewicz J. Associations of promoter region polymorphisms in the tumour necrosis factor- α gene and early-onset psoriasis vulgaris in a northern Polish population. *Br J Dermatol* 2007; 157: 165-167.
161. Nevitt GJ, Hutchinson PE. Psoriasis in the community: prevalence, severity and patients beliefs and attitudes towards the disease. *Br J Dermatol* 1996; 135: 533-537.
162. Nicolas JF, Chamchick N, Thivolet J, Wijdenes J, Morel P, Revillard JP. CD4 antibody treatment of severe psoriasis. *Lancet* 1991; 338(8762): 321.
163. Nickoloff BJ, Nestle FO. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 2004; 113(12): 1664-1675.
164. Nyfors A, Lemholt K. Psoriasis in children. A short review and a survey of 245 cases. *Br J Dermatol* 1975; 92(4): 437-442.
165. Olsen NJ, Kovacs WJ. Hormones, pregnancy, and rheumatoid arthritis. *J Gend Specif Med* 2002; 5(4): 28-33.
166. Okun MM. Psoriasis Area and Severity Index: nuts and bolts of measuring disease severity in psoriasis. *Clin Dermatol* 2008; 26(6): 653-656.
167. Ormerod AD, Dwyer CM, Weller R, Cox DH, Price R. A comparison of subjective and objective measures of reduction of psoriasis with the use of ultrasound, reflectance colorimetry, computerized video image analysis, and nitric oxide production. *J Am Acad Dermatol* 1997; 37(1): 51-57.
168. Orrù S, Giuressi E, Carcassi C, Casula M, Contu L. Mapping of the major psoriasis-susceptibility locus (PSORS1) in a 70-Kb interval around the corneodesmosin gene (CDSN). *Am J Hum Genet* 2005; 76(1): 164-171.

169. Osborne JE, Hutchinson PE. Demographic and clinical correlates of extent of psoriasis during stable disease and during flares in chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 2008; 158(4): 721-726.
170. Picardi A, Pasquini P, Cattaruzza MS, Gaetano P, Baliva G, Melchi CF, Tiago A, Camaioni D, Abeni D, Biondi M. Only limited support for a role of psychosomatic factors in psoriasis. Results from a case-control study. *J Psychosom Res* 2003; 55: 189-196.
171. Pincelli C, Fantini F, Magnoni C, Giannetti A. Psoriasis and the nervous system. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1994; 186: 60-61.
172. Pisani M, Rucco V. Twin psoriasis in monozygotic twins. *Arch Dermatol* 1984; 120: 1418-1419.
173. Piskin G, Sylva-Steenland RM, Bos JD, Teunissen MB. In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin. *J Immunol* 2006; 176(3): 1908-1915.
174. Plant D, Lear J, Marsland A, Worthington J, Griffiths CE. CARD15/NOD2 single nucleotide polymorphisms do not confer susceptibility to type I psoriasis. *Br J Dermatol* 2004; 151(3): 675-678.
175. Prinz JC. Psoriasis vulgaris--a sterile antibacterial skin reaction mediated by cross-reactive T cells? An immunological view of the pathophysiology of psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26(4): 326-332.
176. Prussak M, Mańczak M, Pochroń B, Nowak I, Kuśnierczyk P. Distribution of HLA-C Alleles Determined by PCR-SSP in the Population of Lower Silesia. *Arch Immunol Ther Exp* 2003; 51: 127-130.
177. Ramsay B, Lawrence CM. Measurement of involved surface area in patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 1991; 124(6): 565-570.
178. Raychaudhuri SP, Farber EM. The prevalence of psoriasis In a World. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001; 15: 16-17.
179. Robinson J, Waller MJ, Parham P, de Groot N, Bontrop R, Kennedy LJ, Stoehr P, Marsh SG. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 311-4.
180. Roitberg-Tambur A, Friedmann A, Tzfonii EE, Battat S, Ben Hammo R, Safirman C, Tokunaga K, Asahina A, Brautbar C. Do specific pockets of HLA-C molecules predispose Jewish patients to psoriasis vulgaris? *J Am Acad Dermatol* 1994; 31(6): 964-968.
181. Romphruk AV, Oka A, Romphruk A, Tomizawa M, Choonhakarn C, Naruse TK, Puapairoj C, Tamiya G, Leelayuwat C, Inoko H. Corneodesmosin gene: no evidence for PSORS 1 gene in North-eastern Thai psoriasis patients. *Tissue Antigens* 2003; 62(3): 217-224.
182. Russel TJ, Schultes LM, Kuban DJ. Histocompatibility (HL-A) antigens associated with psoriasis. *N Eng J Med* 1972; 284: 738-743.

183. Sagoo G, Cork M, Patel R, Tazi-Ahnini R. Genome-wide studies of psoriasis susceptibility loci: A review. *J Derm Science* 2004; 35: 171-179.
184. Saint-Mezard P, Chavagnac C, Bosset S, Ionescu M, Peyron E, Kaiserlian D, Nicolas JF, Bérard F. Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo. *J Immunol* 2003; 171(8): 4073-4080.
185. Sampogna F, Gisondi P, Melchi CF, Amerio P, Girolomoni G, Abeni D; IDI Multipurpose Psoriasis Research on Vital Experiences Investigators. Prevalence of symptoms experienced by patients with different clinical types of psoriasis. *Br J Dermatol* 2004; 151: 594-599.
186. Sampogna F, Sera F, Abeni D; IDI Multipurpose Psoriasis Research on Vital Experiences (IMPROVE) Investigators. Measures of clinical severity, quality of life, and psychological distress in patients with psoriasis: a cluster analysis. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 602-607.
187. Sampogna F, Tabolli S, Mastroeni S, Di Pietro C, Fortes C, Abeni D; Italian Multipurpose Psoriasis Research on Vital Experiences (IMPROVE) study group. Quality of life impairment and psychological distress in elderly patients with psoriasis. *Dermatology* 2007; 215(4): 341-347.
188. Sampogna F, Tabolli S, Abeni D; IDI Multipurpose Psoriasis Research on Vital Experiences (IMPROVE) investigators. The impact of changes in clinical severity on psychiatric morbidity in patients with psoriasis: a follow-up study. *Br J Dermatol* 2007; 157(3): 508-513.
189. Samuelsson L, Enlund F, Torinsson A, Yhr M, Inerot A, Enerbäck C, Wahlström J, Swanbeck G, Martinsson T. A genome-wide search for genes predisposing to familial psoriasis by using a stratification approach. *Hum Genet* 1999; 105(6): 523-529.
190. Schäfer T. Epidemiology of psoriasis. Review and the German perspective. *Dermatology* 2006; 212(4): 327-337.
191. Schendel DJ, Reinhardt C, Nelson PJ, Maget B, Pullen L, Bornkamm GW, Steinle A. Cytotoxic T lymphocytes show HLA-C-restricted recognition of EBV-bearing cells and allorecognition of HLA class I molecules presenting self-peptides. *J Immunol* 1992; 149(7): 2406-2414.
192. Schlaak JF, Buslau M, Jochum W, Hermann E, Girndt M, Gallati H, Meyer zum Büschenfelde KH, Fleischer B. T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J Invest Dermatol* 1994; 102(2): 145-149.
193. Schmitt J, Wozel G. The psoriasis area and severity index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis. *Dermatology* 2005; 210(3): 194-199.
194. Schön MP, Boehncke WH. Psoriasis. *N Engl J Med* 2005; 352(18): 1899-912.
195. Sommer DM, Jenisch S, Suchan M, Christophers E, Weichenthal M. Increased prevalence of the metabolic syndrome in patients with moderate to severe psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2006; 298(7): 321-328.

196. Stanisław A. Przystępny kurs statystyki w oparciu o program STATISTICA PL na przykładach z medycyny. StatSoft Polska Sp. z o.o., Kraków 1998.
197. St Sauver JL, Weaver AL, Orvidas LJ, Jacobson RM, Jacobsen SJ. Population-based prevalence of repeated group A beta-hemolytic streptococcal pharyngitis episodes. *Mayo Clin Proc* 2006; 81(9): 1172-1176.
198. Stuart P, Malick F, Nair RP, Henseler T, Lim HW, Jenisch S, Voorhees J, Christophers E, Elder JT. Analysis of phenotypic variation in psoriasis as a function of age at onset and family history. *Arch Dermatol Res* 2002; 294: 207-213.
199. Suomela S, Kainu K, Onkamo P, Tiala I, Himberg J, Koskinen L, Snellman E, Karvonen SL, Karvonen J, Uurasmaa T, Reunala T, Kivikäs K, Jansén CT, Holopainen P, Elomaa O, Kere J, Saarialho-Kere U. Clinical associations of the risk alleles of HLA-Cw6 and CCHCR1*WWCC in psoriasis. *Acta Derm Venereol* 2007; 87(2): 127-134.
200. Swanbeck G, Inerot A, Martinsson T, Wahlström J, Enerbäck C, Enlund F, Yhr M. Age at onset and different types of psoriasis. *Br J Dermatol* 1995; 133(5): 768-773.
201. Szczepański L, Piotrowski M, Chudzik D. Zespoły bólowe układu ruchu jako problem lekarza pierwszego kontaktu. *Reumatologia* 1996; 34: 377.
202. Szczerkowska Dobosz A, Placek W, Szczerkowska Z, Roszkiewicz J. Psoriasis vulgaris with the early and late onset-HLA-phenotype correlations. *Arch Immun Ther Exp* 1996; 44: 265-269.
203. Szczerkowska Dobosz A, Rębała K, Szczerkowska Z, Witkowska Tobiola A. Correlation of HLA-Cw*06 allele frequency with some clinical features of psoriasis vulgaris in the population of northern Poland. *J Appl Genet* 2004; 45(4): 473-476.
204. Szczerkowska Dobosz A, Rębała K, Szczerkowska Z, Nedoszytko B. HLA-C locus alleles distribution in patients from northern Poland with psoriatic arthritis: preliminary report. *Int J Immunogenet* 2005; 32: 389-391.
205. Szczerkowska-Dobosz A, Niespodziana K., Rębała K, Garstecka J., Lange M., Barańska-Rybak W. Lack of association of HLA-C alleles with late-onset psoriasis in the northern Polish population. *J Appl Genet* 2007; 48(3): 273-275.
206. Szepietowski JC, Reich A, Wiśnicka B. Itching in patients suffering from psoriasis. *Acta Dermatovenerol Croat* 2002; 10(4): 221-226.
207. Tatari Z, Fortier C, Bobrynina V, Loiseau P, Charron D, Raffoux C. HLA-Cw allele analysis by PCR-restriction fragment length polymorphism: study of known and additional alleles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(19): 8803-8807.
208. Tazi Ahnini R, Camp NJ, Cork MJ, Mee JB, Keohane SG, Duff GW, di Giovine FS. Novel genetic association between the corneodesmosin (MHC S) gene and susceptibility to psoriasis. *Hum Mol Genet* 1999 Jun; 8(6): 1135-40.
209. Thaller V, Vrkljan M, Hotujac L, Thakore J. The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of PTSD and psoriasis. *Coll Antropol* 1999; 23(2): 611-619.

210. Tiilikainen A, Lassus A, Karvonen J, Vartiainen P, Julin M. Psoriasis and HLA-Cw6. *Brit J Derm* 1980; 102: 179-184.
211. Tomfohrde J, Silverman A, Barnes R, Fernandez-Vina MA, Young M, Lory D, Morris L, Wuepper KD, Stastny P, Menter A. Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. *Science* 1994; 264: 1141-1145.
212. Torinsson A, Yhr M, Inerot A, Enerbäck C, Wahlström J, Swanbeck G, Martinsson T. A genome-wide search for genes predisposing to familial psoriasis by using a stratification approach. *Hum Genet* 1999; 105(6): 523-529.
213. Torío A, Moya-Quiles MR, Muro M, Montes-Ares O, Ontañón J, Minguela A, Marin L, Alemany JM, Sánchez-Bueno F, Alvarez-López MR. Discrepancies in HLA-C typing in transplantation: comparison of PCR-SSP and serology results. *Transplant Proc* 2002; 34(1): 419-420.
214. Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL, Jones AB, Camp RD, Frodsham A, Browne J, Barber R, Terwillinger J, Lathrop GM, Barker JN. Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 813-820.
215. Tsankov N, Angelova I, Kazannodjieva J. Drug-induced psoriasis: recognition and management. *Am J Clin Dermatol* 2000; 1: 159-65.
216. Unaeze J, Nijsten T, Murphy A, Ravichandran C, Stern RS. Impact of psoriasis on health-related quality of life decreases over time: an 11-year prospective study. *J Invest Dermatol* 2006; 126(7): 1480-1489.
217. Valdimarsson H, Sigmundsdottir H, Jonsdottir I. Is psoriasis induced by streptococcal superantigens and maintained by M-protein-specific T cells that cross-react with keratin? *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 21-4.
218. Valdimarsson H. The genetic basis of psoriasis. *Clin Dermatol* 2007; 25(6):563-7.
219. Van der Kerkhof PC, Franssen ME. Psoriasis of the scalp. Diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 2001; 2(3): 159-165.
220. Van der Kerkhof PC, de Hoop D, de Korte J, Kuipers MV. Scalp psoriasis, clinical presentations and therapeutic management. *Dermatology* 1998; 197(4): 326-34. Erratum in: *Dermatology* 1999; 198(2): 222.
221. Van der Kerkhof PC, Murphy GM, Austad J, Ljungberg A, Cambazard F, Duvold LB. Psoriasis of the face and flexures. *J Dermatolog Treat* 2007; 18(6): 351-360.
222. Van der Kerkhof. The Psoriasis Area and Severity Index and alternative approaches or the assessment of severity: persisting areas of confusion. *Br J Dermatol* 1997; 137: 646-663.
223. Veal CD, Clough RL, Barber RC, Mason S, Tillman D, Ferry B, Jones AB, Ameen M, Balendran N, Powis SH, Burden AD, Barker JN, Trembath RC. Identification of a novel psoriasis susceptibility locus at 1p and evidence of epistasis between PSORS1 and candidate loci. *J Med Genet* 2001; 38: 7-13.

224. Veal CD, Capon F, Allen MH, Heath EK, Evans JC, Jones A, Patel S, Burden D, Tillman D, Barker JN, Trembath RC. Family-based analysis using a dense single-nucleotide polymorphism-based map defines genetic variation at PSORS1, the major psoriasis-susceptibility locus. *Am J Hum Genet* 2002; 71(3): 554-564.
225. Vyse T, Todd J. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* 1996; 85: 311-318.
226. Walsh P, Norris DA, Abe J, Martin DK, Giorno R, Leung DY. *Candida albicans* induces selective expansion of human T lymphocytes expressing the T-cell receptor variable region V beta 5.1. *J Dermatol Sci* 1996; 12(2): 140-6.
227. Walsh EC, Mather KA, Schaffner SF, Farwell L, Daly MJ, Patterson N, Cullen M, Carrington M, Bugawan TL, Erlich H, Campbell J, Barrett J, Miller K, Thomson G, Lander ES, Rioux JD. An integrated haplotype map of the human major histocompatibility complex. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 580-590.
228. Wang G, Li C, Gao T, Liu Y. Clinical analysis of 48 cases of inverse psoriasis: a hospital-based study. *Eur J Dermatol* 2005; 15(3): 176-178.
229. Ward JM, Barnes RM. HLA antigens in persistent palmoplantar pustulosis and its relationship to psoriasis. *Br J Dermatol* 1978; 99(5): 477-483.
230. Wardop P, Weller R, Marais J, Kavanagh G. Tonsillitis and chronic psoriasis. *Clin Otolaryngol* 1998; 23: 67-68.
231. Weiss G, Shemer A, Trau H. The Koebner phenomenon: review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2002; 16(3): 241-248.
232. Weiss SC, Kimball AB, Liewehr DJ, Blauvelt A, Turner ML, Emanuel EJ. Quantifying the harmful effect of psoriasis on health-related quality of life. *J Am Acad Dermatol* 2002; 47(4): 512-518.
233. Weisenseel P, Laumbacher B, Besgen P, Ludolph-Hauser D, Herzinger T, Roecken M, Wank R, Prinz JC. Streptococcal infection distinguishes different types of psoriasis. *J Med Genet* 2002; 39(10): 767-8.
234. Whitacre CC, Reingold SC, O'Looney PA. A gender gap in autoimmunity. *Science* 1999; 283(5406): 1277-1278.
235. White HS, Newcomer VD, Mickey MR, Terasaki PI. Disturbance of HLA antigen frequency in psoriasis. *N Eng J Med* 1972; 287: 740-743.
236. Williams F, Meenagh A, Sleator C, Cook D, Fernandez-Vina M, Bowcock AM, Middleton D. Activating killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 is associated with psoriatic arthritis. *Hum Immunol* 2005; 66(7): 836-841.
237. Williamson L, Dalbeth N, Dockerty JL, Gee BC, Weatherall R, Wordsworth B. Extended report: nail disease in psoriatic arthritis – clinically important, potentially treatable and often overlooked. *Rheumatology* 2004; 43: 790-794.
238. Wongpiyabovorn J, Hirankarn N, Ruchusatsawat K, Yooyongsatit S, Asawanonda P, Poovorawan Y. Association of the interleukin-10 distal promoter (-2763A/C) polymorphism with late-onset psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 2008; 33(2): 186-189.

239. Wrone-Smith T, Nickoloff BJ. Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J Clin Invest* 1996; 98(8): 1878-1887.
240. Yosipovitch G, Tang MB. Practical management of psoriasis in the elderly: epidemiology, clinical aspects, quality of life, patient education and treatment options. *Drugs Aging* 2002; 19(11): 847-863.
241. Yosipovitch G, DeVore A, Dawn A. Obesity and the skin: skin physiology and skin manifestations of obesity. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56(6): 901-916.
242. Zachariae H, Overgaard Petersen H, Kissmeyer Nielsen F, Lamm L. HL-A antigens in pustular psoriasis. *Dermatologica* 1977; 154(2): 73-77.
243. Zachariae H. Prevalence of joint disease in patients with psoriasis: implications for therapy. *Am J Clin Dermatol* 2003; 4: 441-447.
244. Zemmour J, Parham P. Distinctive polymorphism at the HLA-C locus: Implications for the expression of HLA-C. *J Exp Med* 1992; 176: 937-950.
245. Zhang XJ, He PP, Wang ZX, Zhang J, Li YB, Wang HY, Wei SC, Chen SY, Xu SJ, Jin L, Yang S, Huang W. Evidence for a major psoriasis susceptibility locus at 6p21 (PSORS1) and a novel candidate region at 4q31 by genome-wide scan in Chinese Hans. *J Invest Derm* 2002; 119: 1361-1366.
246. Zhang XJ, He PP, Wang ZX, Zhang J, Li YB, Wang HY, Wei SC, Chen SY, Xu SJ, Jin L, Yang S, Huang W. Follow-up analysis of PSORS9 in 151 Chinese families confirmed the linkage to 4q31-32 and refined the evidence to the families of early-onset psoriasis. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 312-318.
247. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007; 445(7128): 648-651.

11. ZAŁĄCZNIK

ANKIETA

I. Wywiad

Dane pacjenta

Nazwisko, imię, data urodzenia

Adres/tel.

Pacjent ambulatoryjny, hospitalizowany, placówka

Waga ciała

Wzrost

Użytki: obecnie – alkohol, papierosy, inne

dawniej – alkohol, papierosy, inne

Pierwszy wysiew łuszczycy

<p>W wieku lat</p> <p>Rozpoznany przez lekarza: tak, nie</p>
<p>Czynnik prowokujący pierwszy wysiew:</p> <ul style="list-style-type: none"> • silny stres psychiczny (proszę zaznaczyć wydarzenie na załączonej liście) • infekcja (jaka?) rozpoznana przez lekarza/ niepotwierdzona przez lekarza, leczone: nie tak (proszę podać nazwę leku) • inne (proszę wymienić).....
<p>Postać łuszczycy podczas pierwszego wysiewu.....</p> <ul style="list-style-type: none"> • zajęcie skóry owłosionej głowy w trakcie pierwszego wysiewu: nie, jeśli tak jaki stopień nasilenia miały zmiany: mały, umiarkowany, nasilony • zajęcie paznokci w trakcie pierwszego wysiewu łuszczycy <ul style="list-style-type: none"> – dłoni: tak nie – stóp: tak nie <p>przybliżony % zajętej powierzchni skóry</p>

Leczenie pierwszego wysiewu:

tylko miejscowe, miejscowe + ogólne, szpitalne, ambulatoryjne

Dotychczasowe leczenie łuszczycy

hospitalizacje.....	ile razy?
tylko zewnętrzne (maściami)	
metotreksat.....	ile razy?
tigason (neo-tigason).....	ile razy?
cyklosporyna A (sandimmun).....	ile razy?
naświetlania: UVB, PUVA	
inne.....	

II. Badanie chorego**Postać łuszczycy**

<p>A. forma zlokalizowana łuszczycy</p> <p>łuszczycy faldów/wyprzeniowa łuszczycy lojotokowa skóra owłosiona głowy dłonie i stopy (niekrostkowe !) kończyny górne i dolne</p> <p>+ cechy poniżej</p>	<p>B. forma rozległa łuszczycy</p> <p>łuszczycy plackowata łuszczycy kropelkowata erythrodermia łuszczycowa łuszczycy krostkowa uogólniona</p> <p>+ cechy poniżej</p>
<p>łuszczycy niestabilna, aktywna (<i>powiększanie się istniejących ognisk lub i pojawienie się nowych małych ognisk plackowatych, które mogą być cienkie lub grube</i>) łuszczycy stabilna, nieaktywna (<i>zmiany o tym samym rozmiarze, nowe się nie pojawiają</i>) małe ogniska plackowate ≤ 3 cm, duże ogniska plackowate > 3 cm ogniska cienkie ($\leq 0,75$ mm), grube ($> 0,75$ mm)</p>	

Zajęcie paznokci dłoni i stóp

Dłonie	I_p	II_p	III_p	IV_p	V_p	I_l	II_l	III_l	IV_l	V_l
naparstkowanie										
rogowacenie podpaznokciowe										
dystrofia										
onycholiza										
inne										
Stopy	I_p	II_p	III_p	IV_p	V_p	I_l	II_l	III_l	IV_l	V_l
naparstkowanie										
rogowacenie podpaznokciowe										
dystrofia										
onycholiza										
inne										

p-prawa, l-lewa

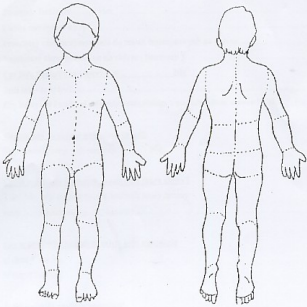
Schematyczne rozmieszczenie
zmian na skórze

Imię i nazwisko chorego
PESEL

Nr Ks. GJ/Oddz.

Wkładka dermatologiczna

1. Umiejscowienie zmian skórnych:



2. Opis zmian skórnych

Wzrost: 1,60 m, Ciężar ciała: 60 kg, Ciężar serca: 250 g, Ciężar płuc: 450 g, Ciężar wątroby: 1,5 kg, Ciężar nerek: 150 g, Ciężar pęcherzyka żółciowego: 50 g, Ciężar pęcherzyka wodnego: 10 g, Ciężar pęcherzyka śluzowego: 10 g, Ciężar pęcherzyka żółciowego: 50 g, Ciężar pęcherzyka wodnego: 10 g, Ciężar pęcherzyka śluzowego: 10 g

Opis zmian skórnych

Blank area for describing skin changes.

PASI

Punktacja	0	1	2	3	4	5	6
r – rumień n – naciek z – złuszczenie	brak	nie- znaczne	umiar- kowane	ciężkie	bardzo ciężkie	–	–
p – powierzchnia (%)	0	<10	[10, 30)	[30, 50)	[50, 70)	[70, 90)	[90, 100]

$$\text{PASI} = 0,1 \cdot (r_g + n_g + z_g) \cdot p + 0,2 \cdot (r_{gk} + n_{gk} + z_{gk}) \cdot p + 0,3 \cdot (r_t + n_t + z_t) \cdot p + 0,4 \cdot (r_{dk} + n_{dk} + z_{dk}) \cdot p$$

gdzie: g – głowa, gk – górne kończyny, t – tułów, dk – dolne kończyny

PASI =

III. Aktualne leczenie łuszczycy

Zewnętrznie:

Ogólne: proszę podać nazwę leku

Lista zdarzeń wywołujących silny stres psychiczny poprzedzający pierwszy i kolejne wysiewy łuszczycy

Lp.	Zdarzenie	Poprzedzające pierwsze pojawienie się zmian na skórze	Poprzedzające kolejne wysiewy
1.	Śmierć współmałżonka		
2.	Rozwód		
3.	Separacja małżeńska		
4.	Pobyty w więzieniu		
5.	Śmierć bliskiego członka rodziny		
6.	Uraz ciała lub choroba		
7.	Zawarcie małżeństwa		
8.	Zwolnienie z pracy		
9.	Pogodzenie się ze skłóconym małżonkiem		
10.	Przejsięcie na rentę lub emeryturę		
11.	Choroba w rodzinie		
12.	Ciąża		
13.	Kłopoty w pożyciu seksualnym		
14.	Powiększenie rodziny		

15.	Podjęcie nowej pracy zawodowej		
16.	Zmiany w dochodach finansowych		
17.	Śmierć bliskiego przyjaciela		
18.	Zmiana zawodu		
19.	Wzrost konfliktów małżeńskich		
20.	Splacanie wysokiego kredytu		
21.	Wiadomość o konieczności zwrotu większego długu lub pożyczki		
22.	Zmiana stopnia odpowiedzialności w życiu zawodowym		
23.	Opuszczenie przez dzieci domu rodzinnego		
24.	Konflikt i starcia z krewnymi współmałżonka		
25.	Wzmożenie wysiłku dla wykonania jakiegoś zadania		
26.	Początek lub zakończenie pracy zawodowej współmałżonka		
27.	Rozpoczęcie lub zakończenie nauki szkolnej		
28.	Zmiany standardu, poziomu życia		
29.	Zmiany osobistych nawyków i przyzwyczajzeń		
30.	Konflikt ze zwierzchnikiem		
31.	Zmiany warunków pracy lub najbliższego otoczenia		
32.	Przeprowadzka		
33.	Zmiana szkoły		
34.	Zmiana w sposobie spędzania wolnego czasu		
35.	Zmiany w praktykach religijnych		
36.	Zmiany w nawykach życia towarzyskiego		
37.	Hipoteka lub zaciąganie długu poniżej 10.000 dolarów (równowartość PLN)		
38.	Zmiana nawyków snu		
39.	Zmiana częstości spotkań rodzinnych		
40.	Zmiana nawyków żywieniowych		
41.	Urlop		
42.	Święta Bożego Narodzenia		
43.	Małe naruszenie przepisów prawnych		
44.	Inne		

Badanie przeprowadził:

Data: