

**ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΣΤΕΦΑΝΗΣ**



**ΑΝΟΣΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ ΟΙΚΟΓΕΝΟΥΣ
ΜΟΡΦΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ
ΠΛΗΘΥΣΜΟ, ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΑ
ΚΑΙ ΠΑΡΑΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

**ΣΕΡΑΦΕΙΜ ΚΑΤΣΑΒΟΣ
ΝΕΥΡΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2020

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ) είναι μία νόσος με πολυπαραγοντική αιτιοπαθογένεια, καθώς πληθώρα γενετικών/ανοσογενετικών [1,2], επιγενετικών [3,4], και περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως νευροτρόποι ιοί [5-8], μικροβίωμα [9], Βιταμίνη D [10,11], κάπνισμα [12], ακόμη και έκθεση σε οργανικούς διαλύτες [13] θεωρείται ότι εμπλέκονται σε αυτήν σε άλλοτε άλλο βαθμό. Παρόλα αυτά, το εκάστοτε υποκείμενο ανοσογενετικό υπόβαθρο της νόσου φαίνεται να διαδραματίζει πρωταρχικό ρόλο. Γενετικοί πολυμορφισμοί στο *Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex – MHC)*, που ενδεχομένως προδιαθέτουν στην εκδήλωση της νόσου, προτάθηκαν άλλωστε για πρώτη φορά ήδη πριν από 40 χρόνια [14,15].

Οι μέχρι στιγμής προσπάθειες ταυτοποίησης του ακριβούς τρόπου κληρονόμησης της νόσου, εμπλέκουν σε μεγαλύτερο βαθμό πολυμορφισμούς μορίων MHC Τάξης II. Πιο συγκεκριμένα, η φορεία του *απλοτύπου DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02* αναγνωρίστηκε αρχικά ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης ΣκΠ, σε πολλούς πληθυσμούς, κυρίως Καυκασιανής προέλευσης [16,17]. Ακολούθως διαπιστώθηκε ότι η φορεία του αλληλίου *HLA-DRB1*15:01* προδιαθέτει ανεξάρτητα και ισχυρότερα από οποιαδήποτε άλλο πολυμορφισμό στην ανάπτυξη της νόσου. [18-24]. Η ανακάλυψη αυτή επιβεβαιώθηκε και πάλι σε πολλούς και ετερογενείς πληθυσμούς, όπως και στον Ελληνικό [25]. Άλλωστε το ίδιο αλληλίο έχει συνδυαστεί και με συγκεκριμένα κλινικά και απεικονιστικά χαρακτηριστικά της πάθησης, όπως η ηλικία έναρξης, ο βαθμός αναπηρίας, οι γνωσιακές λειτουργίες, η απάντηση στην ανοσοτροποποιητική αγωγή και η εγκεφαλική ατροφία [26-28]. Έχει επίσης αναφερθεί ότι και έτερα DRB1 αλληλία πιθανώς επηρεάζουν φαινοτυπικά τη ΣκΠ, όπως το *DRB1*04*, που έχει βρεθεί σε αυξημένα ποσοστά σε ασθενείς με θετικό οικογενειακό υπόβαθρο αυτοανοσίας [29], ή το *DRB1*01* που έχει χαρακτηριστεί ως προστατευτικό έναντι της κακοήθους ΣκΠ [30]. Για τον Ελληνικό πληθυσμό, πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί πιθανός

προστατευτικός ρόλος της φορείας του *DRB1*11* [25,31], όπως και σε χώρες της Μέσης Ανατολής και της Βορείου Αφρικής [32] και πιθανή αύξηση του κινδύνου για ΣκΠ πρώιμης έναρξης από τη φορεία *DRB1*03* [25]. Εξετάζοντας τη διεθνή βιβλιογραφία είναι προφανές ότι ανάλογα με τον εκάστοτε υπό εξέταση πληθυσμό, προτείνονται και διαφορετικά *DRB1* αλληλία ως προστατευτικά / επιβαρυντικά για ανάπτυξη ΣκΠ, με την εξαίρεση του *DRB1*15:01*, του οποίου ο ρόλος ως παράγοντα κινδύνου επαληθεύεται με καθολικό τρόπο [33].

Εκτός βέβαια από το ρόλο των *DRB1* πολυμορφισμών στη ΣκΠ, η σύγχρονη πρόοδος στις επιστημονικές τεχνικές με την εφαρμογή Μεθόδων Συσχέτισης Γονιδιώματος Ευρείας Κλίμακας (Genome-Wide Association Studies – GWAS), έχει αποδείξει ότι υπάρχουν και άλλοι γονιδιακοί τόποι εντός του MHC (Non-*DRB1* Τάξης II, όπως ο *DPB1*, αλλά και Τάξης I), αλλά και εκτός του MHC που επηρεάζουν την ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου [1,34]. Έκαστος των υπό εξέταση πολυμορφισμών επιδρά ξεχωριστά σε μικρό βαθμό στην πάθηση [35]. Συνολικά ωστόσο αθροιζόμενοι, μπορούν να αυξήσουν σημαντικά το γενετικό φορτίο της ΣκΠ, και να επηρεάσουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της [35].

Η σημασία του γενετικού/ανοσογενετικού υποβάθρου στην παθοφυσιολογία της ΣκΠ υποστηρίζεται άλλωστε από το ποσοστό εμφάνισης της νόσου στους μονοωογενείς διδύμους [36] και από τη συχνότητα των περιπτώσεων οικογενούς μορφής ΣκΠ (familial Multiple Sclerosis – fMS), που υπολογίζεται διεθνώς στο αξιοσημείωτο ποσοστό του 12.6% των συνολικών περιστατικών της νόσου [37,38]. Οι 1^{ου} βαθμού συγγενείς ασθενών με ΣκΠ, μάλιστα, διατρέχουν 30-50 φορές περισσότερο κίνδυνο σε σχέση με το γενικό πληθυσμό να αναπτύξουν και αυτοί τη νόσο, γεγονός που έχει αποδοθεί στη συνάθροιση πολλαπλών ετερογενών επιβαρυντικών πολυμορφισμών που αυξάνουν το συνολικό φερόμενο «γενετικό φορτίο» [39].

Λαμβάνοντας υπόψη την προαναφερθείσα συχνότητα της fMS, προκαλεί εντύπωση το γεγονός ότι οι μέχρι στιγμής υπάρχουσες πληροφορίες για αυτή τη μορφή της νόσου προέρχονται από μη συστηματοποιημένες μελέτες και αφορούν κυρίως φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Έχει για παράδειγμα αναφερθεί ότι οι πάσχοντες από fMS εμφανίζουν πιο επιθετική πορεία με ταχύτερη εξέλιξη της αναπηρίας [40]. Δεν λείπουν ωστόσο και αναφορές σχετικά με παρόμοια πορεία της fMS σε σχέση με τις σποραδικές περιπτώσεις (sporadic Multiple Sclerosis – sMS) [41]. Έχει επίσης υποστηριχθεί ότι η συχνότητα της Πρωτοπαθώς Προϊούσας

Μορφής της νόσου (Primary Progressive MS – PPMS) είναι διαφορετική μεταξύ των περιστατικών fMS, σε σχέση με τη σποραδική πάθηση, είτε μεγαλύτερη [42,43], είτε μικρότερη [44]. Άλλοι ερευνητές έχουν προτείνει αυξημένη συννοσηρότητα της fMS με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα [45]. Τέλος, έχουν περιγραφεί χαρακτηριστικά επίσπευσης στην ηλικία έναρξης της ΣκΠ, σε περιπτώσεις fMS με κάθετη μεταβίβαση (πρόγονοι – απόγονοι) [46,47], αλλά και γενικότερα μικρότερη ηλικία έναρξης νόσου στην fMS σε σχέση με την sMS [47].

Ο πρωτογενής στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής, λοιπόν, έχει δύο σκέλη: α. Το πρώτο σκέλος είναι η μελέτη της οικογενούς μορφής της ΣκΠ (fMS) και η εντόπιση πιθανών διαφορών στο ανοσογενετικό πρότυπο (προφίλ) αυτής και της sMS, αλλά και σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό (κυρίως σε ό,τι αφορά την κατανομή συχνότητων των DRB1 αλληλίων, που είναι και ο γενετικός τόπος με τη μεγαλύτερη γνωστή εμπλοκή στην παθοφυσιολογία της ΣκΠ). β. Το δεύτερο σκέλος είναι η όσο το δυνατόν καλύτερη περιγραφή των κλινικών και παρακλινικών φαινοτυπικών διαφορών της fMS με τη σποραδική μορφή της νόσου (sMS). Να σημειωθεί ότι μέχρι στιγμής δεν έχει γίνει άλλη ανάλογη προσπάθεια σε δείγμα Ελλήνων ασθενών με ΣκΠ. Δευτερογενής, τέλος, στόχος, της μελέτης είναι η διερεύνηση της ύπαρξης πιθανών συσχετίσεων μεταξύ της παρουσίας συγκεκριμένων DRB1 αλληλομόρφων και της εμφάνισης επιμέρους κλινικών χαρακτηριστικών της ΣκΠ εν γένει, είτε fMS, είτε sMS.

1.2 ΔΙΑΡΘΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το υπόλοιπο της διατριβής ακολουθεί την εξής διάρθρωση:

- Στο 2^ο Κεφάλαιο αναλύεται το επιστημονικό υπόβαθρο της μελέτης, ώστε να μπορούν να γίνουν κατανοητές οι έννοιες και τα μεγέθη που αναφέρονται στο Ειδικό της Μέρους (Κεφάλαια 3 έως 5). Αποτελείται από δύο βασικές υποπαραγράφους, την 2.1 όπου παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικές με το MHC, και την 2.2 όπου παραθέτονται εισαγωγικά στοιχεία εξοικείωσης με τη ΣκΠ. Όλα τα εν λόγω στοιχεία προέκυψαν ύστερα από κριτική σταχυολόγηση της πρόσφατης αλλά και παλαιότερης διεθνούς επιστημονικής βιβλιογραφίας.
- Στο 3^ο Κεφάλαιο αναλύεται ο τρόπος συλλογής των δεδομένων, κλινικών, παρακλινικών και ανοσογενετικών (‘Υλικό’), που αποτέλεσαν τη βάση για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης. Περιγράφεται ακόμα με λεπτομέρεια η

εργαστηριακή μέθοδος διαχείρισης του γενετικού υλικού που συλλέχθηκε από τους συμμετέχοντες ασθενείς, από το επίπεδο της αιμοληψίας μέχρι το επίπεδο της γενετικής τυποποίησης.

- Στο 4^ο Κεφάλαιο παρουσιάζονται διεξοδικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν ύστερα από τη στατιστική επεξεργασία των συλλεγθέντων κλινικών, παρακλινικών και ανοσογενετικών δεδομένων. Η παρουσίαση γίνεται τόσο με τη μορφή ελεύθερου κειμένου, όσο και με παράθεση συμπληρωματικών δεδομένων σε μορφή πινάκων.

- Στο 5^ο Κεφάλαιο γίνεται αναλυτική συζήτηση αναφορικά με τα αποτελέσματα του 4^{ου} Κεφαλαίου, με σκοπό την όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστη εξαγωγή συμπερασμάτων και διατύπωση υποθέσεων. Αξιολογείται η δυνατότητα γενίκευσης των εν λόγω συμπερασμάτων και υποθέσεων για το σύνολο του Ελληνικού πληθυσμού ασθενών με ΣκΠ (fMS και sMS) και γίνεται σύγκριση με ανάλογα δημοσιευμένα επιστημονικά δεδομένα άλλων πληθυσμών. Στην κατακλείδα του 5^{ου} Κεφαλαίου παραθέτονται συγκεντρωτικά και συνοπτικά οι βασικότερες διαπιστώσεις που προκύπτουν μετά την ολοκλήρωση αυτής της διδακτορικής διατριβής, σύμφωνα πάντα με την κρίση και την άποψη των ερευνητών που έλαβαν μέρος σε αυτήν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

2.1 ΤΟ ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ (MHC)

2.1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Πριν από περίπου εκατό χρόνια, υπήρχε έντονο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα για την σε βάθος μελέτη και καλύτερη κατανόηση της καρκινογένεσης. Οι ερευνητές βιολόγοι της εποχής, αναζητώντας τρόπους πιο μακρόχρονης παρατήρησης των καρκινικών κυττάρων σε προσβεβλημένα ποντίκια του εργαστηρίου, προσπάθησαν να επιτύχουν μεταμόσχευση των όγκων σε μη προσβεβλημένους λήπτες του ίδιου είδους. Παρατηρήθηκε τότε το εξής φαινομενικά παράδοξο: η μεταμόσχευση ήταν επιτυχημένη σε πολύ λίγες περιπτώσεις, και μάλιστα μόνο όταν δότης και λήπτης ήταν μέλη της ίδιας εργαστηριακής ‘οικογένειας’ ποντικών. Διαπιστώθηκε σχετικά γρήγορα, στη συνέχεια, ότι η απόρριψη των μοσχευμάτων ήταν αποτέλεσμα μιας ανοσιακής – φλεγμονώδους απάντησης. Τελικά, η έρευνα επεκτάθηκε και στη μεταμόσχευση υγιών ιστών, μόνο για να επιβεβαιώσει το ίδιο πρότυπο ανοσιακής απόρριψης, εκτός από τις περιπτώσεις τρωκτικών που ήταν προϊόν καλλιέργειας του ίδιου εργαστηριακού κλώνου [48].

Αναπόφευκτα, οι παραπάνω επιστημονικές παρατηρήσεις, οδήγησαν στη θεμελιώδη υπόθεση ότι το ενδεχόμενο αποδοχής ή απόρριψης ενός ιστού - μοσχεύματος μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους, με άλλα λόγια οι πιθανότητες **συμβατότητας**, ελέγχονται από κάποιους σημαντικούς υποκείμενους γενετικούς - κληρονομικούς μηχανισμούς. Μια σειρά μάλιστα από μελέτες αναπαραγωγής και συνδυασμών ποικίλων διαφορετικών κλώνων από πειραματόζωα, με διαβαθμίσεις συγγένειας, κατέληξαν στο συμπέρασμα ενός πρωταρχικού γενετικού τύπου που ασκεί σημαντική επίδραση στα υπό συζήτηση φαινόμενα, ο οποίος και πήρε το όνομα Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC). Άλλοι 20 περίπου γενετικοί τύποι, με λιγότερο σημαντική επιρροή ονομάστηκαν συλλογικά «Ελάσσονες Τόποι Ιστοσυμβατότητας» [48].

Σύντομα διαπιστώθηκε, με ορολογικές τεχνικές, ότι τα γενετικά μόρια που υπαγόρευαν τα φαινόμενα συμβατότητας ήταν ουσιαστικά πολυμορφικές γλυκοπρωτεΐνες επιφανείας κυττάρων, που είχαν την ιδιότητα να δρουν ως *αλλοαντιγόνα*, να ανοσοποιούν δηλαδή τους μη ταυτόσημους γενετικά λήπτες, με αποτέλεσμα την παραγωγή *αλλοαντισωμάτων*. Η ερευνητική προσοχή τελικά μεταφέρθηκε στους ανθρώπους, και έδωσε ικανοποιητική εξήγηση σε φαινόμενα ανοσοποίησης μεταγγίσεων, καθώς και πολυτόκων γυναικών έναντι αλλοαντιγόνων των συζύγων τους *in utero*, κατά την εγκυμοσύνη.

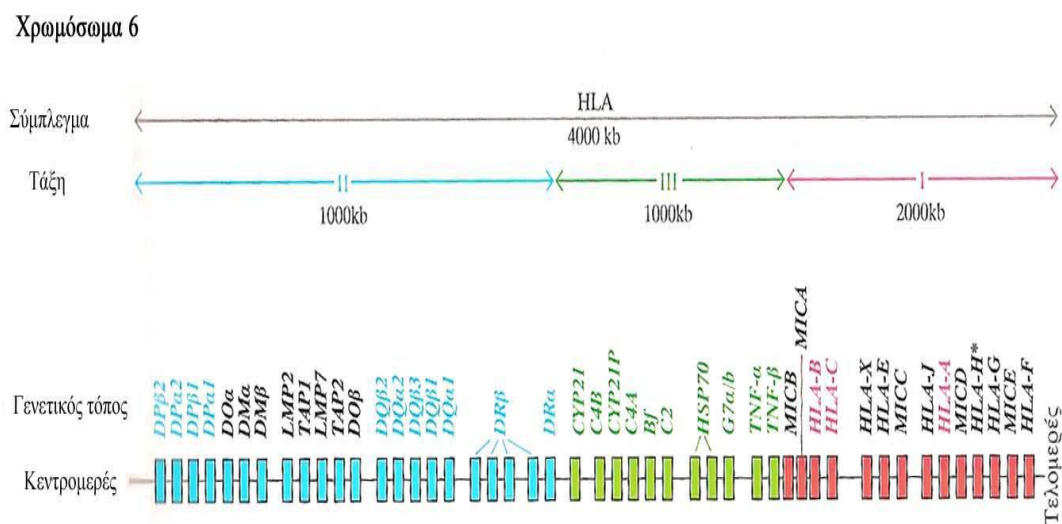
Προοδευτικά καθορίστηκαν δύο τύποι MHC αντιγόνων, τα *Τάξης I* που εκφράζονται στους περισσότερους τύπους κυττάρων των θηλαστικών, και τα *Τάξης II*, που ανακαλύφθηκαν αργότερα, καθώς εκφράζονται σχεδόν κατ' αποκλειστικότητα από τα Β-λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Επειδή μάλιστα διαπιστώθηκε ότι ο άνθρωπος, σε αντίθεση με τα τρωκτικά, δεν εκφράζει MHC αντιγόνα στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων του, σε αναντιστοιχία με τα λευκοκύτταρα όπου υπάρχουν σε αφθονία, δεν άργησε να εδραιωθεί η χρήση του όρου *Ανθρώπινα Λευκοκυτταρικά Αντιγόνα (Human Leucocyte Antigens – HLA)*, Τάξης I και Τάξης II [49].

Η σε βάθος μελέτη των HLA αντιγόνων δεν αποτέλεσε ποτέ, και εξακολουθεί να μην αποτελεί, μία εύκολη υπόθεση. Υπάρχει αναρίθμητο εύρος γενετικών πολυμορφισμών στα εμπλεκόμενα αλληλία, που εγγυάται ουσιαστικά ότι το κάθε ανθρώπινο όν θα κληρονομήσει ένα μοναδικό γενετικό συνδυασμό, οπότε και θα εκφράσει ένα μοναδικό φάσμα αντιγόνων (ή αλλιώς *αλλοτύπων*), που συνολικά καλούνται *HLA τύπος* του ατόμου. Η εν λόγω ποικιλομορφία δεν προέκυψε καθόλου τυχαία: είναι αποτέλεσμα χιλιάδων ετών προσαρμογής του ανθρωπίνου είδους στις λοιμώξεις. Αντικατοπτρίζει τον τρόπο με τον οποίο η φυσική επιλογή προστάτευσε το ανθρώπινο είδος από μαζικό αφανισμό έναντι των επιδημιών, καθώς όπως θα αναλυθεί παρακάτω, τα HLA μόρια, με όχημα την αντιγονοπαρουσίαση, έχουν κομβικό ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι των εισβολέων. Μέσω των διαφοροποιήσεων στο MHC σύστημα διασφαλίζεται αέναα η διαφορετική ικανότητα των ατόμων του ιδίου είδους στο να αναγνωρίζουν και να αντιμετωπίζουν τους εκάστοτε λοιμογόνους παράγοντες. Καθώς μάλιστα οι άνθρωποι πληθυσμοί στις διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Γης αντιμετώπισαν ιστορικά διαφορετικές επιδημίες, η γενετική ταυτότητα των εκάστοτε φυλών έχει επίσης τροποποιηθεί [48].

Ο καθορισμός, σε επίπεδο εργαστηρίου, των αντιγονικών διαφορών μεταξύ των ατόμων ήταν αρχικά ιδιαίτερα εργώδης, καθώς βασιζόταν σε ορολογικές τεχνικές επί ζώντων λεμφοκυττάρων (έμμεση εκτίμηση του γονότυπου από το φαινότυπο) [50]. Ευτυχώς, η σύγχρονη επιστημονική πρόοδος οδήγησε στην ανάπτυξη μοριακών τεχνικών, που έδωσαν τη δυνατότητα απευθείας μελέτης των HLA γονιδίων, μέσω άμεσης χρήσης του ατομικού DNA. Αυτή η αλματώδης εξέλιξη σε επίπεδο διαδικασιών, έχει συμπαρασύρει στις μέρες μας την παραγωγή έργου σε δύο κυρίως επιστημονικούς τομείς: α) Την γενετική των μεταμοσχεύσεων και β) Την κατανόηση των γενετικών και εν τέλει νευροανοσολογικών μηχανισμών που καθορίζουν την επιρρέπεια των ατόμων στο να αναπτύσσουν διάφορα νοσήματα, όπως οι αυτοάνοσες παθήσεις, και δη η ΣκΠ, ζήτημα που μάλιστα πραγματεύεται και η παρούσα εργασία.

2.1.2 Η ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ HLA ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕΣΑ ΣΤΟ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΚΑΙ Η ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥΣ

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα HLA Τάξης I και II εδράζονται, στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους, στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6, κατά το τελομερικό τμήμα αυτού. Η εν λόγω περιοχή καταλαμβάνει κατά προσέγγιση έκταση 3.500kb, δηλαδή σχεδόν 4 εκατομμυρίων ζευγών βάσεων (Εικόνα 1) [51].



Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics: Foundations, 7th ed. 2019 [51]

Εικόνα 1

Τρεις επιμέρους περιοχές διακρίνονται εντός του συμπλέγματος. Κοντά στο κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος βρίσκεται η περιοχή των γονιδίων των HLA Τάξης II ενώ κοντά στο τελομερικό τμήμα βρίσκονται τα γονίδια των HLA Τάξης I. Μεταξύ των περιοχών αυτών βρίσκονται γονίδια που συνολικά χαρακτηρίζονται ως **Τάξης III** [50]. Τα τελευταία αυτά γονίδια, περίπου 75 στον αριθμό, κωδικοποιούν διάφορες πρωτεΐνες με ιδιαίτερη λειτουργική σημασία για το ανοσοποιητικό σύστημα, όπως τα επιμέρους στοιχεία του συστήματος του συμπληρώματος C4, C2 και ο παράγοντας B [50]. Να διευκρινισθεί εδώ ότι και στις περιοχές Τάξης I και Τάξης II κωδικοποιούνται και πρωτεΐνες που διαφέρουν δομικά από τα HLA μόρια. Ωστόσο, όλες οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από την περιοχή Τάξης II έχουν ανοσολογικές δράσεις που βρίσκονται σε συνάφεια με αυτές των γλυκοπρωτεϊνών Τάξης I και II [48].

2.1.2α Η περιοχή Τάξης I

Τα μόρια HLA Τάξης I αποτελούνται από μια βαρεία α-αλυσίδα, μεγέθους 45kDa, η οποία συνδέεται μη ομοιοπολικά με ένα μόριο β-μικροσφαιρίνης, μεγέθους 12 kDa. Η α-αλυσίδα κωδικοποιείται από τα πολυμορφικά γονίδια τάξης I, που εδράζονται στην υπό συζήτηση περιοχή, τα προϊόντα των οποίων είναι οι ισομορφές: HLA-A, -B, -C, -E, -F και -G (Εικόνα 1). Όλα τα ανθρώπινα χρωμοσώματα 6 διαθέτουν και τα 6 προαναφερθέντα γονίδια [52]. Στην περιοχή τάξης I βρίσκονται και μη λειτουργικά γονίδια (ψευδογονίδια), όπως τα HLA-H, και -J. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων αυτών είναι παρόμοια με την αλληλουχία των λειτουργικών γονιδίων τάξης I. Σε αντίθεση με την α-αλυσίδα, η β-μικροσφαιρίνη, κωδικοποιείται από ένα αρκετά συντηρημένο γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 15.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν την α-αλυσίδα των HLA Τάξης I ακολουθούν οργάνωση εξονίων – εσονίων. Κάθε εξόνιο κωδικοποιεί και ένα συγκεκριμένο τομέα της πρωτεΐνης, ενδοκυττάριο, εξωκυττάριο ή διαμεμβρανικό (δείτε και παρ. 2.1.3 παρακάτω). Έκαστο γονίδιο α-αλυσίδας των Τάξης I HLA αριθμεί συνολικά 8 εξόνια.

2.1.2β Η περιοχή Τάξης II

Τα τάξης II HLA-μόρια είναι ετεροδιμερή αποτελούμενα από μια α- και μια β-αλυσίδα σχεδόν ίδιου μεγέθους. Στην HLA-II περιοχή βρίσκονται τα γονίδια τα

οποία κωδικοποιούν πέντε ισομορφές: HLA-DM, -DO, DP, DQ και -DR (Εικόνα 1). Στην περιοχή αυτή, μάλιστα, βρίσκονται όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν τόσο την α-, όσο και τη β-αλυσίδα έκαστης ισομορφής, οργανωμένα χωροταξικά κατά ζεύγη. Κάθε ζεύγος, δηλαδή, κωδικοποιεί μια α- και μια β-αλυσίδα για την ίδια ισομορφή, εκτός από την περίπτωση της -DO, όπου η α- και η β- αλυσίδα κωδικοποιούνται εκατέρωθεν της περιοχής -DM [53].

Σε αντίθεση με τα HLA-I ο πολυμορφισμός των HLA-II μορίων μπορεί να προκύπτει τόσο από την α-, όσο και από την β-αλυσίδα αλλά αυτό εξαρτάται και από την ισομορφή. Έτσι στα HLA-DR η α-αλυσίδα είναι μονομορφική και ο πολυμορφισμός προκύπτει από την β-αλυσίδα. Το πιο πολυμορφικό γονίδιο τάξης II είναι αυτό του HLA-DRB1 για το οποίο μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί πάνω από 400 *αλληλόμορφα* [54]. Για την περίπτωση των HLA-DP και HLA-DQ, τόσο η α- όσο και η β- αλυσίδα είναι πολυμορφικές. Σε αντιδιαστολή με τα παραπάνω, τα HLA-DO και HLA-DM δεν εμφανίζουν μεγάλο πολυμορφισμό [48].

Η HLA Τάξης II περιοχή όπου κωδικοποιούνται τα μόρια HLA-DR είναι κατά γενική παραδοχή η πιο πολύπλοκη. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στο ότι υπάρχουν διάφορα λειτουργικά DRB γονίδια και ψευδογονίδια, οι συνδυασμοί των οποίων ποικίλουν μεταξύ των διαφόρων χρωμοσωμάτων 6. Οι διαφορετικοί συνδυασμοί DRB γονιδίων, που δύνανται να απαντώνται στο ανθρώπινο είδος, καλούνται *DRB απλότυποι* [48]. Στο 5' άκρο όλων των απλοτύπων υπάρχει πάντα γονίδιο DRB1, ενώ στο 3' άκρο υπάρχει πάντα γονίδιο DRA και ακριβώς δίπλα σε αυτό, DRB9 ψευδογονίδιο. Μεταξύ των DRB1 και DRB9 γονιδίων συναντάται κυμαινόμενος αριθμός άλλων DRB γονιδίων, ανάλογα με τον απλότυπο. Μπορεί να υπάρχουν 0-3 γονίδια από τα DRB3, DRB4, DRB5 (λειτουργικά), ή DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 (ψευδογονίδια). Κανείς ωστόσο απλότυπος δεν περιέχει ταυτόχρονα περισσότερα του ενός γονιδίων εκ των DRB3, DRB4, DRB5 [48].

Όπως και στην περίπτωση των Τάξης I HLA, έτσι και τα γονίδια που κωδικοποιούν τις α- και β- αλυσίδες των HLA Τάξης II ακολουθούν οργάνωση εξονίων-εσονίων, όπου κάθε εξόνιο κωδικοποιεί και μια συγκεκριμένη περιοχή της αντίστοιχης πρωτεΐνης (δείτε και παρ. 2.1.3 παρακάτω). Το γονίδιο της β-αλυσίδας αριθμεί 5 εξόνια, ενώ αυτό της α-αλυσίδας 4, καθώς στο τελευταίο ο διαμεμβρανικός τομέας της πρωτεΐνης και η κυτταροπλασματική της 'ουρά' κωδικοποιούνται από κοινό εξόνιο.

2.1.2γ Ονοματολογία HLA

Ήδη από την εποχή των ορολογικών μεθόδων τυποποίησης των HLA αντιγόνων, άρχισε να διαφαίνεται η επιτακτική ανάγκη τυποποίησης του τρόπου ονοματολογίας του διαρκώς αυξανόμενου αριθμού αναγνωρισμένων αλληλομόρφων. Ο βέλτιστος τρόπος χαρακτηρισμού τους έχει μεταβληθεί διαχρονικά, παρακολουθώντας τον εκσυγχρονισμό των μεθόδων τυποποίησης και την πρόοδο της επιστημονικής γνώσης. Από το 1964 έχει δημιουργηθεί η Επιτροπή Ονοματολογίας HLA (HLA Nomenclature Committee), υπό την αιγίδα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization - WHO), η οποία και συνεδριάζει στο πλαίσιο των Διεθνών HLA Workshops που διοργανώνονται περιοδικά από τότε έως και σήμερα, και ανανεώνει τακτικά τον κατάλογο των αναγνωρισμένων αλληλίων [55-58].

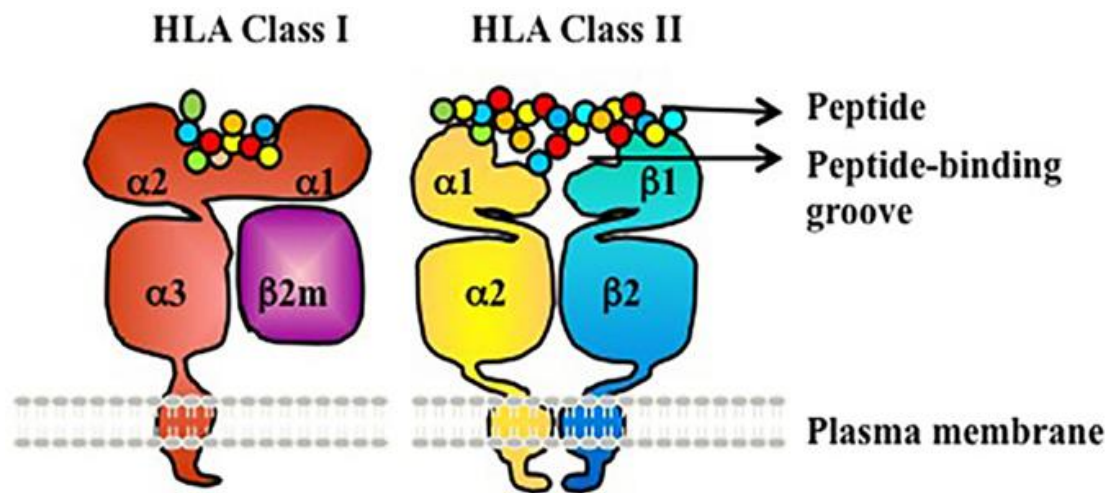
Σύμφωνα με τη κρατούσα, τρέχουσα πρακτική ονοματολογίας τα αντιγόνα HLA χαρακτηρίζονται από ένα κεφαλαίο γράμμα (για τα Τάξης I) ή τρία κεφαλαία γράμματα (για τα Τάξης II), που ορίζει/-ουν το γονιδιακό τόπο από τον οποίο κωδικοποιούνται, ακολουθούμενο/-α από έναν αριθμό. Οι γονιδιακοί τόποι για τα HLA τάξης I είναι οι A,-B,-C και για τα HLA τάξης II είναι οι DR-DQ-DP (και έπεται το γράμμα A ή B ανάλογα με την αλυσίδα του ετεροδιμερούς), ενώ ο αριθμός που ακολουθεί βασίζεται στη σειρά ανακάλυψης του συγκεκριμένου αντιγόνου. Κάθε τεκμηριωμένο αλληλόμορφο καθορίζεται από το/τα κεφαλαίο/-α γράμμα/-α που ορίζει/-ουν το γονιδιακό του τόπο και τον αριθμό ανακάλυψής του, στοιχεία που ακολουθούνται από έναν αστερίσκο (*) και τέσσερις αριθμούς. Οι δυο πρώτοι αριθμοί αντιστοιχούν στην ορολογική ειδικότητα του αντιγόνου και χωρίζονται από τους δύο επόμενους με άνω και κάτω τελεία (:). Τέλος, οι δυο επόμενοι αριθμοί καθορίζουν τα αλληλόμορφα, με βάσει την αλληλουχία των αμινοξέων για το ίδιο ορολογικό αντιγόνο, όπως στο παρακάτω παράδειγμα (Πίνακας 1).

HLA	Ένδειξη γονιδίου/γονιδιακής περιοχής
HLA-DRB1*	Ξεχωριστός HLA τύπος
HLA-DRB1*04:	Αλληλόμορφα που κωδικοποιούν την DRB1*04 ειδικότητα
HLA-DRB1*04:01	Ξεχωριστό HLA αλληλόμορφο
HLA-DRB1*04:01N	Μηδενικό αλληλόμορφο
HLA-DRB1*04:012	Αλληλόμορφο που διαφέρει σε συνώνυμη μετάλλαξη
HLA-DRB1*04:01102	Αλληλόμορφο που περιέχει μετάλλαξη πέραν της κωδικοποιούμενης περιοχής
HLA-DRB1*04:01102N	Μηδενικό αλληλόμορφο που περιέχει μετάλλαξη πέραν της κωδικοποιούμενης περιοχής
HLA-DRB1*04:01103L	Αλληλόμορφο με μετάλλαξη πέραν της κωδικοποιούμενης περιοχής με χαμηλότερο επίπεδο έκφρασης

Πίνακας 1

2.1.3. Η ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ HLA ΣΤΟ ΧΩΡΟ

Τα HLA μόρια, όπως ήδη ειπώθηκε, είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, και ως τέτοιες έχουν εξωκυττάριο και ενδοκυττάριο τμήμα [48]. Στα μεν μόρια Τάξης I, η α-αλυσίδα διαθέτει τρεις εξωκυττάριους τομείς, τους α1, α2 και α3. Η β2-μικροσφαιρίνη και το α3 πεδίο της βαριάς αλυσίδας πρόσκεινται στην κυτταρική μεμβράνη και χρησιμεύουν για τη στήριξη του μορίου. Επιπρόσθετα, στο α3 πεδίο βρίσκεται και θέση αλληλεπίδρασης με το CD8 αντιγόνο επιφανείας του T-λεμφοκυττάρου (**συνδιεγερτικό μόριο**) [59]. Αντίθετα, τα άπω πεδία α1 και α2 σχηματίζουν στην κορυφή του μορίου τη λεγόμενη **σχισμοειδή θήκη (groove cleft)** δηλαδή τη θέση σύνδεσης του αντιγονικού πεπτιδίου που θα παρουσιαστεί στο T-λεμφοκύτταρο (Εικόνα 2) [60]. Η σχισμοειδής θήκη των τάξης I HLA μορίων εμφανίζεται κλειστή κατά τα δύο άκρα της και υποδέχεται πεπτίδια μεγέθους 8-10 αμινοξέων. Τα αντιγονικά πεπτίδια συνδέονται μέσω αμινοξικών **αλληλουχιών (binding motifs)**, οι οποίες εφαρμόζουν στις συμπληρωματικές προς αυτές πολυμορφικές εσοχές της θήκης.



Hickey MJ et al. Front Immunol. 2016 [60]

Εικόνα 2

Σε αντίθεση με τα μόρια τάξης I, η σχισμοειδής θήκη των τάξης II HLA μορίων σχηματίζεται από τα άπω πεδία των α- και β- αλυσίδων, που ονομάζονται α1 και β1 αντιστοίχως (Εικόνα 2). Η περιοχή πρόσδεσης της θήκης εμφανίζεται ανοικτή και στα δύο της άκρα, με αποτέλεσμα να δέχεται μεγαλύτερα αντιγονικά πεπτιδία (12-24 αμινοξέα). Γενικά, η σύνδεση των αντιγονικών πεπτιδίων με τα τάξης II HLA-μόρια είναι χαλαρότερη από εκείνη με τα τάξης I. Στο β2 πεδίο της β- αλυσίδας εντοπίζεται το σημείο αλληλεπίδρασης με το CD4 μόριο του T- λεμφοκυττάρου (συνδιεγερτικό μόριο) [59].

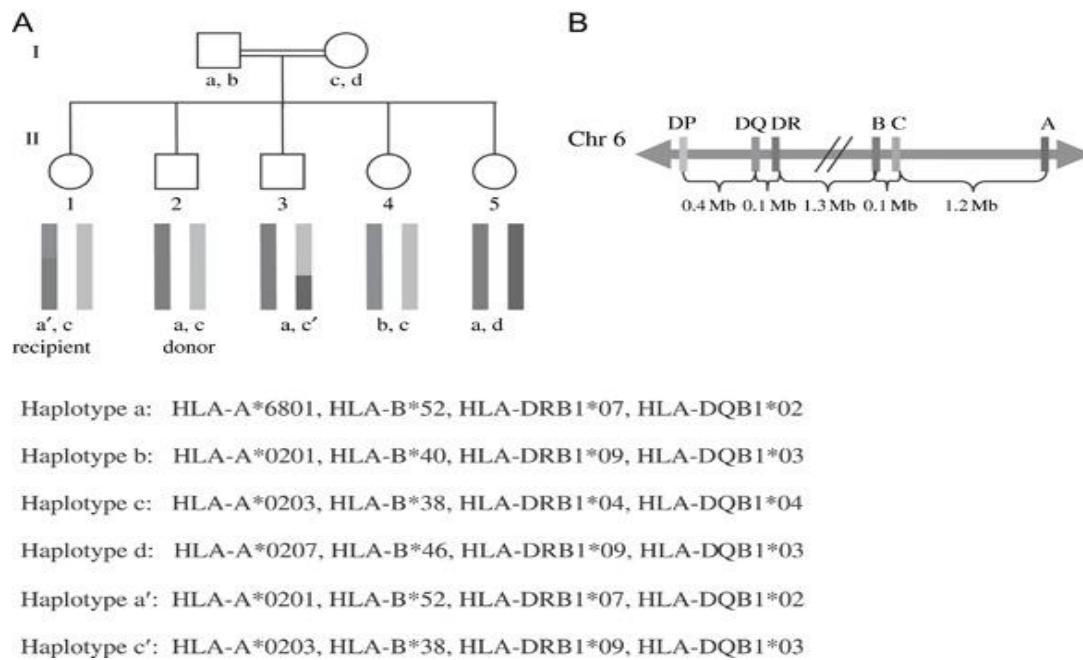
2.1.3α Θέσεις πρόσδεσης του αντιγόνου εντός της σχισμοειδούς θήκης

Ο σχετικά περιορισμένος αριθμός των HLA μορίων που εκφράζονται στα κύτταρα του κάθε ξεχωριστού ατόμου είναι ικανός να συνδέεται και να παρουσιάζει στα T-λεμφοκύτταρα την τεράστια ποικιλία των αντιγονικών πεπτιδίων που θα συναντήσει ο οργανισμός στη διάρκεια της ζωής του. Ως εκ τούτου, κάθε HLA μόριο έχει τη δυνατότητα να συνδέεται εναλλακτικά με διαφορετικά πεπτιδία. Η σύνδεση των αντιγονικών πεπτιδίων με τη σχισμοειδή θήκη των HLA μορίων επιτυγχάνεται με τη συμμετοχή υδρόφοβων αμινοξέων που διατηρούνται εξελικτικά σε συγκεκριμένες θέσης της αλληλουχίας των πεπτιδίων και τα οποία παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα με τις εσοχές του δαπέδου της θήκης. Αυτές οι περιοχές ονομάζονται **θέσεις πρόσδεσης (anchor positions)** [48]. Η σύνδεση με τα HLA μόρια δεν απαιτεί πλήρη συμπληρωματικότητα των πεπτιδίων κατά μήκος ολόκληρης της

αμινοξικής τους αλληλουχίας, αλλά μόνο ως προς τις θέσεις πρόσδεσης. Είναι επόμενο ότι με το ίδιο HLA μόριο είναι δυνατόν να συνδέονται εναλλακτικά όλα τα πεπτίδια που διαθέτουν ανάλογες θέσεις πρόσδεσης. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι έκαστο αλληλόμορφο HLA Τάξης I δυνατόν να προσδένει 2000 – 10000 διαφορετικά πεπτίδια. Τα πεπτίδια που προσδένονται από τα Τάξης II μόρια δε, είναι ακόμα πιο ετερογενή, λόγω και των δομικών διαφορών στη διαμόρφωση της σχισμοειδούς θήκης.

2.1.4 ΚΑΝΟΝΕΣ ΚΛΗΡΟΝΟΜΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ HLA

Οι γενετικές θέσεις κωδικοποίησης των HLA είναι υψηλά πολυμορφικές. Δηλαδή, υπάρχουν πολλές εναλλακτικές μορφές έκαστου γονιδίου, ή αλληλόμορφα, για κάθε γενετικό τόπο μέσα σε έναν πληθυσμό. Τα γονίδια του MHC εδράζονται σε πολύ κοντινές περιοχές. Λόγω αυτής της στενής γειτνίασης, ο συνδυασμός των αλληλίων του MHC που υπάρχουν σε ένα χρωμόσωμα, κληρονομείται ως ενιαία μονάδα (en bloc), που ονομάζεται **απλότυπος**. Ένα άτομο κληρονομεί τον έναν απλότυπο από τη μητέρα και τον άλλο απλότυπο από τον πατέρα. Σε μη ομομεικτικούς πληθυσμούς, οι απόγονοι γενικά είναι ετερόζυγοι σε πολλές θέσεις και εκφράζουν τόσο τα μητρικά όσο και τα πατρικά MHC αλληλόμορφα. Τα αλληλόμορφα παρουσιάζουν συνεπικρατητική έκφραση, δηλαδή, τόσο τα μητρικά όσο και τα πατρικά γονιδιακά προϊόντα εκφράζονται στα ίδια κύτταρα. Η στατιστική πιθανότητα συνδυασμού ενός συγκεκριμένου αλληλίου σε έναν HLA-τόπο, μαζί με ένα άλλο, στον αντίστοιχο HLA-τόπο του άλλου χρωμοσώματος, εξαρτάται από τη συχνότητα αυτών των αλληλίων στον πληθυσμό. Διαχωρισμός (ανασυνδυασμός) των απλοτύπων παρατηρείται σχετικά σπάνια σε σύγκριση με άλλες περιοχές του γονιδιώματος [61], συνηθέστερα στις γυναίκες [62], με αποτέλεσμα να προκύπτουν νέοι απλότυποι (Εικόνα 3, παράδειγμα) [63]. Φαίνεται μάλιστα, πως τα σημεία ανασυνδυασμού δεν είναι τυχαία, αλλά διαφέρουν σημαντικά μεταξύ ετερογενών γεωγραφικά πληθυσμών [64].



Sun YY et al. *Tissue Antigens* 2007 [63]

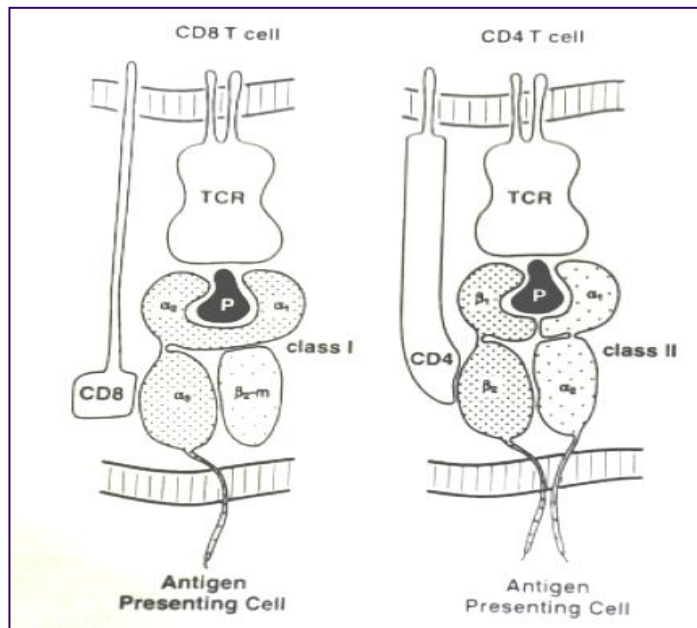
Εικόνα 3

Παρόλο που η συχνότητα ανασυνδυασμού είναι χαμηλή μεταξύ των HLA απλοτύπων, συμβάλλει διαχρονικά σημαντικά στη δημιουργία γενετικής ποικιλομορφίας στον ανθρώπινο πληθυσμό. Ο γενετικός ανασυνδυασμός δημιουργεί νέους συνδυασμούς αλληλομορφών και ο υψηλός αριθμός των γενεών που μεσολάβησαν από την πρώτη εμφάνιση του ανθρώπινου είδους, έχει επιτρέψει μία ευρεία ανακατανομή, έτσι ώστε να είναι πλέον σπάνιο για δύο μη συγγενικά άτομα να διαθέτουν πανομοιότυπες ομάδες HLA γονιδίων. Παρά ταύτα, ορισμένοι συνδυασμοί HLA αλληλίων ανευρίσκονται σε συχνότητα μεγαλύτερη από την αναμενόμενη. Το φαινόμενο αυτό, μέτρο του οποίου αποτελεί η διαφορά μεταξύ της παρατηρούμενης και της αναμενόμενης συχνότητας, ονομάζεται ανισορροπία σύνδεσης (**linkage disequilibrium**) [65]. Ως ανισορροπία σύνδεσης ορίζεται η προτίμηση κατάληψης ανεξάρτητων γενετικών τόπων από συγκεκριμένα αλληλόμορφα. Η ανισορροπία σύνδεσης δημιουργείται όταν ένας συγκεκριμένος συνδυασμός αλληλομόρφων προσδίδει στον οργανισμό μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα. Συνεπώς, αποδίδεται το πιθανότερο στην εκλεκτική υπεροχή ορισμένων απλοτύπων, ως ιστορικό αποτέλεσμα συγκεκριμένων μετακινήσεων και μείξεων πληθυσμών, ή και λιγότερο συχνά σε τυχαίες στατιστικές παρεκκλίσεις του γονιδιακού συνόλου.

2.1.5 ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΩΝ HLA ΤΑΞΗΣ I ΚΑΙ II ΜΕ ΤΟ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ - ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΓΟΝΟΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ

Ο βασικός ρόλος των HLA μορίων συνίσταται στο σχηματισμό συμπλέγματος με τα πεπτίδια των επεξεργασμένων αντιγόνων και στην παρουσίαση τους στην επιφάνεια των *αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (Antigen Presenting Cells - APCs)* [66]. Μόνο υπό τη μορφή αυτού του συμπλέγματος τα αντιγονικά πεπτίδια μπορούν να ‘γίνονται ορατά’ από τα T-λεμφοκύτταρα και να τα ενεργοποιούν, μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα επιφανείας τους (T-Cell Receptor - TCR). Τα γονίδια MHC Τάξης I κωδικοποιούν γλυκοπρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια σχεδόν όλων των εμπύρηνων κυττάρων. Η κύρια λειτουργία των προϊόντων των γονιδίων Τάξης I είναι η παρουσίαση πεπτιδικών αντιγόνων στα T-κυτταροτοξικά (T-cytotoxic) λεμφοκύτταρα (Tc-cells), τα οποία φέρουν το CD8 αντιγόνο επιφανείας (CD8+T - λεμφοκύτταρα) [59]. Βασικός ρόλος των CD8+T - λεμφοκυττάρων είναι η απευθείας καταστροφή κυττάρων μολυσμένων με ιούς και άλλα ενδοκυττάρια παθογόνα. Τα γονίδια MHC τάξης II αντίθετα, κωδικοποιούν γλυκοπρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια συγκεκριμένων μόνο αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (μακροφάγων, δενδριτικών κυττάρων και B-λεμφοκυττάρων). Τα τελευταία αυτά κύτταρα, είναι επιφορτισμένα με την παρουσίαση επεξεργασμένων αντιγονικών πεπτιδίων στα T-βοηθητικά (T-helper) λεμφοκύτταρα (Th-cells), που φέρουν το CD4 αντιγόνο επιφανείας (CD4+T - λεμφοκύτταρα) [59]. Οι ανοσολογικές δράσεις των CD4+T - λεμφοκυττάρων είναι πιο πολύπλοκες και ετερογενείς, όπως θα αναλυθεί παρακάτω, σε σχέση με αυτές των CD8+T, και πραγματοποιούνται κυρίως μέσω της απελευθέρωσης συγκεκριμένων *κυτταροκινών*.

Η προαναφερθείσα εξειδίκευση των HLA μορίων τάξης I και II στην παρουσίαση αντιγόνων στα CD8+ και CD4+ T - λεμφοκύτταρα αντιστοίχως καλείται *MHC περιορισμός*, ενώ το σύμπλεγμα T κυττάρου, αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου και αντιγόνου καλείται και *τριμοριακό σύμπλεγμα*. Τα CD4 και CD8 μόρια επιφανείας έχουν ουσιαστικό ρόλο στη λειτουργία του τριμοριακού συμπλέγματος, ως περιγράφηκε και στην παρ. 2.1.3, δρώντας ως συνδιεγερτικά μόρια, χωρίς τη δράση των οποίων, η σύνδεση δε θα ήταν λειτουργικά επιτυχής (Εικόνα 4) [48].



The HLA FactsBook, 1st ed. 2000 [48]

Εικόνα 4

Να επισημανθεί σε αυτό το σημείο ότι τα Τ-λεμφοκύτταρα αναπτύσσονται, ή καλύτερα ‘εκπαιδεύονται’, στο θύμο αδέν. Μπορούν εκεί να εκφράσουν δύο τύπους υποδοχέων επιφανείας, είτε τον αβ, είτε τον γδ υποδοχέα [67]. Τα γδ Τ-λεμφοκύτταρα βρίσκονται στο μεταίχμιο μεταξύ της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας, έχουν δράση κυρίως στους βλεννογόνους, και μπορούν να αναγνωρίζουν τους στόχους τους χωρίς τη μεσολάβηση επεξεργασίας (αντιγονοπαρουσίασης) [68]. Τα αβ Τ-λεμφοκύτταρα, αντιθέτως, εκφράζουν είτε το CD4 είτε το CD8 αντιγόνο επιφανείας, και είναι εκείνα που εκπαιδεύονται στο θύμο, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τις αντίστοιχες Τάξεις HLA μορίων, ώστε να διακρίνουν τα ξένα από τα εαυτά αντιγόνα. Τα λεμφοκύτταρα που εμφανίζουν πολύ υψηλή ή πολύ χαμηλή συνάφεια με το αντίστοιχο HLA δεν ωριμάζουν και απορρίπτονται (αρνητική επιλογή), ενώ εκείνα που εμφανίζουν ενδιάμεση συνάφεια επιλέγονται θετικά, ωριμάζουν και τελικά βγαίνουν στην περιφέρεια [48]. Έκαστο κυκλοφορούν λεμφοκύτταρο είναι λειτουργικά μονοκλωνικό, φέρει δηλαδή έναν μόνο τύπο λειτουργικού TCR, που μπορεί να αλληλεπιδράσει με ένα μόνο ομόλογο HLA.

Σύμφωνα με την κρατούσα θεωρία, οι πολυμορφισμοί των μορίων HLA που φέρει ο κάθε άνθρωπος, μπορούν να επηρεάσουν τις ικανότητες αντιγονοπαρουσίασης στα εκπαιδευόμενα εντός του θύμου αβ Τ-λεμφοκύτταρα, και συνεπώς της μελλοντικής ανοσοανοχής που θα αναπτυχθεί έναντι των αντιγόνων του

εαυτού [48]. Ο μηχανισμός αυτός σκιαγραφεί με σαφήνεια το ρόλο που μπορεί να έχει το MHC στην επιρρέπεια του κάθε οργανισμού για ανάπτυξη αυτοανοσίας.

2.1.6 Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ HLA ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ

Όπως επισημάνθηκε ήδη, πέρα από την ποικιλομορφία των απλοτύπων που μπορεί να φέρει το κάθε άτομο, κάθε ξεχωριστός γενετικός τύπος παρουσιάζει επίσης υψηλό πολυμορφισμό, με αποτέλεσμα να έχουν αναγνωριστεί πολλά διαφορετικά αλληλόμορφα του ίδιου αλληλίου. Κινητήριος δύναμη αυτής της διαδικασίας είναι η φυσική επιλογή, με σκοπό την εξέλιξη των μηχανισμών διαφυγής απέναντι στα διαρκώς μεταλλασσόμενα παθογόνα. Το συμπέρασμα αυτό, άλλωστε, υποστηρίζεται περαιτέρω και από το γεγονός ότι οι αντικαταστάσεις των νουκλεοτιδίων που οδηγούν στον πολυμορφισμό είναι κατά συντριπτική πλειοψηφία συγκεντρωμένες σε περιοχές των εξονίων που κωδικοποιούν τις θέσεις πρόσδεσης πεπτιδίων εντός της σχισμοειδούς θήκης, και τις θέσεις αλληλεπίδρασης με τον TCR [69,70].

Τα HLA γονίδια εξελίσσονται μέσω μηχανισμών *σύγκλισης (gene conversion)*, που αποτελούν ουσιαστικά μια μορφή γενετικού ανασυνδυασμού μεταξύ κοντινών αλληλουχιών. Λειτουργικά μοτίβα ανταλλάσσονται με σκοπό τη δημιουργία νέων αλληλομόρφων [48]. Στην περίπτωση των HLA γονιδίων μάλιστα, ισχύει και το φαινόμενο της *επιλογής του ετεροζυγώτη (heterozygous selection - πλεονέκτημα του ετεροζυγώτη έναντι του ομοζυγώτη)* [71]. Εντέλει, η θετική ή αρνητική επιλογή των αλληλομόρφων αλλά και η εξελικτική επιλογή του αριθμού των HLA-γενετικών τύπων που διαθέτει ο κάθε οργανισμός, φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν ως προς την παρουσίαση ενός αυξημένου αριθμού ξένων αντιγονικών πεπτιδίων, αφενός, και των μειονεκτημάτων που δημιουργούν ως προς την παρουσίαση ενός επίσης αυξημένου αριθμού «ιδίων» αντιγονικών πεπτιδίων. Αυτή η τελευταία αναπόφευκτη συνέπεια, είναι η βάση πάνω στην οποία εξηγείται η συσχέτιση της φορείας συγκεκριμένων HLA πολυμορφισμών με την επιρρέπεια για ανάπτυξη συγκεκριμένων νοσημάτων και δη αυτοάνοσων.

2.1.7 HLA ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Η προσπάθεια συσχέτισης συγκεκριμένων HLA πολυμορφισμών με την επιρρέπεια ή την προστασία έναντι συγκεκριμένων νοσημάτων ξεκίνησε αρκετά νωρίς, ήδη από την εποχή που ήταν διαθέσιμη μόνο η ορολογική τυποποίηση των Τάξης I και όχι των Τάξης II αλληλίων. Η πρώτη ανακάλυψη – σταθμός ήρθε περί το 1975, όταν διαπιστώθηκε ότι οι πάσχοντες από αγκυλοποιητική σπονδυλαρθρίτιδα φέρουν το HLA-B27 σε ποσοστό 95%, έναντι του αντίστοιχου 2% που παρατηρείται στο γενικό πληθυσμό [72,73]. Προοδευτικά εντοπίστηκαν πολυάριθμες συσχετίσεις με ετερόκλητες παθήσεις, αλλά κυρίως με αυτοάνοσες διαταραχές, διαταραχές του συμπληρώματος, διαφόρων τύπων αλλεργίες και ευαισθησίες σε συγκεκριμένες λοιμώξεις [74].

Ενώ αρχικά η πλειοψηφία των υπό μελέτη παθήσεων είχε συσχετισθεί με πολυμορφισμούς των HLA Τάξης I, στην πορεία και με την πρόοδο των μεθόδων τυποποίησης, διαπιστώθηκε ότι για τις περισσότερες από αυτές, η πραγματική συσχέτιση αφορούσε Τάξης II αλλήλια, που συν-κληρονομούνται με τα αρχικά ενοχοποιημένα Τάξης I λόγω ανισορροπίας σύνδεσης. Κατ' επέκταση, για κάθε μία από τις εντοπισμένες και σύγχρονα αποδεκτές συνδέσεις ασθενειών – HLA, υπάρχει πάντα ο προβληματισμός αν η στατιστικά σημαντική συσχέτιση είναι τελικά και κλινικά σημαντική, ή απλώς δευτερογενής δείκτης της σημασίας ενός πολυμορφισμού σε κάποιο άλλο, άγνωστο ακόμα, συνδεδεμένο γονίδιο (κλασικό παράδειγμα η αρχική συσχέτιση της αιμοχρωμάτωσης με το HLA-A3 αποδείχθηκε ότι τελικά οφείλεται στην εγγύτητα της HLA-A περιοχής με το λειτουργικά ανεξάρτητο γονίδιο HFE, πολυμορφισμοί του οποίου ευθύνονται για τη νόσο [75]).

Η μόνη ασφαλής διαπίστωση σχετικά με την εκτεταμένη εμπλοκή του MHC ως σύνολο, στην προδιάθεση για ανάπτυξη νοσημάτων, είναι ότι αυτή αποτελεί πραγματικό γεγονός και όχι επίπλαστο αποτέλεσμα του υπερβολικού επιστημονικού ενδιαφέροντος για αυτήν την περιοχή του χρωμοσώματος 6. Η εκτεταμένη δυνατότητα ανάλυσης του γονιδιώματος που παρέχεται στις μέρες μας, χάρη και στις Genome-Wide Association Studies (GWAS), έχει αποτύχει να αναδείξει ισοδύναμη εμπλοκή οποιουδήποτε άλλου γονιδιακού τόπου στην επιρρέπεια εκδήλωσης παθήσεων [1,76]. Επιπρόσθετα, η σύγχρονη επιστημονική παραγωγή έχει οδηγήσει στην παραδοχή ότι ο ρόλος συγκεκριμένων HLA πολυμορφισμών στην παθοφυσιολογία των αυτοανόσων ασθενειών, τουλάχιστον, είναι αιτιολογικός και όχι

επιφανιόμενο. Σύμφωνα με το γενικό προτεινόμενο μηχανισμό, η αυτοανοσία πυροδοτείται, όταν αυτοαντιδραστικά T-λεμφοκύτταρα, τα οποία σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται υπό τον έλεγχο ρυθμιστικών διαδικασιών, ενεργοποιούνται από κάποιο μικροβιακό ή ιικό αντιγόνο, που μοιάζει αρκετά με κάποιο πεπτίδιο του εαυτού (**διασταυρούμενη αντίδραση**) [48]. Οι ρυθμιστικές διαδικασίες για κάποιο λόγο αποτυγχάνουν και τα αυτοαντιδραστικά T λεμφοκύτταρα εκφεύγουν της αρνητικής επιλογής. Πιστεύεται ότι διαφορετικά HLA αλληλόμορφα εμφανίζουν διαφορετικές συγγένειες με αυτοαντιγονικά πεπτίδια. Έτσι, συγκεκριμένα αλληλόμορφα μπορεί να επιτρέπουν στο αυτοαντιγονικό πεπτίδιο να δεσμευτεί στην αύλακα σύνδεσης και να αναγνωριστεί από τον TCR, ενώ άλλα όχι [77]. Το γεγονός, λοιπόν, ότι τα αυτοαντιγονικά πεπτίδια είναι συνδεδεμένα και παρουσιάζονται από μερικά αλλά όχι από άλλα HLA μόρια παρέχει τη βάση για τη συσχέτιση κάθε πάθησης με ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο ή αλληλόμορφα [78,79]. Ενώ στη θεωρία αυτός ο μηχανισμός μοιάζει σχετικά απλός, στην πράξη το ακριβές παθοφυσιολογικό μονοπάτι που οδηγεί σε κάθε αυτοάνοση πάθηση είναι δύσκολο να διαλευκανθεί, καθώς η κλινική έναρξη της νόσου γίνεται κατά κανόνα αρκετά χρόνια μετά το αρχικό πυροδοτικό γεγονός. Σε αυτή πλέον τη φάση η φλεγμονώδης απάντηση έχει προ πολλού γενικευθεί και η κυτταρική καταστροφή έχει φέρει στην επιφάνεια πολλούς νέους επιτόπους, περιπλέκοντας την εικόνα (**επιτοπική διασπορά – epitope spreading**).

Παραδοσιακά το HLA σύμπλεγμα θεωρείται ότι συσχετίζεται με μία πάθηση, όταν ένα ή περισσότερα HLA αλληλόμορφα εμφανίζονται σημαντικά αυξημένα ή ελαττωμένα στους ασθενείς συγκριτικά με μία κατάλληλη ομάδα ελέγχου [74]. Όταν οι συσχετίσεις μεταξύ των αλληλομόρφων HLA και της ασθένειας είναι μικρές, κάτι που αντικατοπτρίζεται σε χαμηλές τιμές σχετικού κινδύνου, είναι πολύ πιθανό η ευαισθησία στη νόσο να επηρεάζεται από πολλαπλά γονίδια, από τα οποία μόνο ένα είναι εντός του MHC. Το γεγονός ότι αυτές οι ασθένειες δεν κληρονομούνται σύμφωνα με τον απλό διαχωρισμό κατά Mendel των αλληλομόρφων HLA, μπορεί να φανεί στα ομοζυγωτικά δίδυμα. Και τα δύο κληρονομούν τον παράγοντα κινδύνου του HLA, αλλά δεν είναι με κανένα τρόπο βέβαιο ότι και τα δύο θα αναπτύξουν τη νόσο. Αυτό το εύρημα προτείνει ότι για την ανάπτυξη μιας ασθένειας, ιδίως αυτοάνοσης, συνδυάζονται πολλαπλοί γενετικοί, επιγενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες, με το HLA να παίζει ένα σημαντικό αλλά όχι αποκλειστικό ρόλο.

2.1.7α Γενετική Προδιάθεση Εκδήλωσης Σκλήρυνσης κατά Πλάκας

Η ύπαρξη γενετικού υποβάθρου στην παθοφυσιολογία της Σκλήρυνσης κατά Πλάκας θεωρείται στις μέρες μας αδιαμφισβήτητη. Η εμπλοκή των γενετικών παραγόντων υποστηρίζεται καταρχάς από τα αποτελέσματα μελετών που πραγματοποιήθηκαν σε συγγενείς ασθενών διαγνωσμένων με τη νόσο, και που ανέδειξαν συνολικό κίνδυνο εμφάνισης αυτής στο 2.77%, 1.02% και 0.88% για τους 1^{ου}, 2^{ου} και 3^{ου} βαθμού συγγενείς αντιστοίχως [80]. Οι συχνότητες αυτές είναι σαφώς ανώτερες του 0.3% που αποτελεί το συνολικό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου στο γενικό πληθυσμό [80]. Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί συνολική συχνότητα εμφάνισης ΣκΠ γύρω στο 3-5% σε αδελφούς πασχόντων, ποσοστό που εκτοξεύεται στο 24-30% στην περίπτωση των μονοζυγωτικών διδύμων [81]. Προφανώς, το γεγονός ότι ο κίνδυνος εκδήλωσης ΣκΠ στην περίπτωση μονοζυγωτικού διδύμου με αδελφό πάσχοντα, όπου το γενετικό υλικό είναι πανομοιότυπο, κυμαίνεται γύρω στο 30% και όχι γύρω στο 100%, αποδεικνύει πως η γενετική προδιάθεση δεν είναι από μόνη της ικανή να οδηγήσει στη νόσο. Το υπολειπόμενο, διόλου ευκαταφρόνητο, 70% καθορίζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες που πρέπει να αλληλεπιδράσουν με το γενετικό υπόβαθρο για να προκύψει η αυτοάνοση εκτροπή, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω (δείτε ενότητα 2.2).

Η πρώτη απόπειρα σύνδεσης της ΣκΠ με το σύμπλεγμα HLA έγινε τη δεκαετία του 1970, και αφορούσε αλληλόμορφα τάξης I, και πιο συγκεκριμένα τα HLA-A3 και HLA-B7 [14,82]. Στη συνέχεια προτάθηκε ισχυρότερη συσχέτιση με πολυμορφισμούς των τάξης II HLA, ενώ οι αρχικές συσχετίσεις με αλληλόμορφα Τάξης I αποδόθηκαν σε ανισορροπία σύνδεσης. Ακολούθως, εδραιώθηκε η σχέση του DR2 απλότυπου *DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02* με την ΣκΠ [16,17], χωρίς να είναι αρχικά σαφές ποιο από τα τρία, στενά συνδεδεμένα αλληλία, προσδίδει το υψηλότερο γενετικό κίνδυνο. Σύντομα, ωστόσο, αποσαφηνίσθηκε ότι τα DRB1 αλληλόμορφα έχουν ανεξάρτητο και ισχυρότερο ρόλο στην τροποποίηση του γενετικού φορτίου της νόσου, σε σχέση με τα DQA1 και DQB1 αλληλόμορφα. Τελικά, πολλαπλές μελέτες ενοχοποίησαν το αλληλίο *DRB1*15:01* ως το σημαντικότερο παράγοντα γενετικού κινδύνου για εκδήλωση ΣκΠ [18-25]. Η σύγχρονη επιστημονική γνώση που αποκτήθηκε χάρη στις GWAS, επιβεβαίωσε μεν αυτή την πρωτοκαθεδρία του *HLA-DRB1*15:01*, οδήγησε ωστόσο και στη αναγνώριση 230 τουλάχιστον ακόμα γενετικών τόπων, HLA και non-HLA, που

παίζουν μικρότερο αλλά αθροιστικά σημαντικό ρόλο στην προδιάθεση για τη νόσο [83,84].

2.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ

2.2.1 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

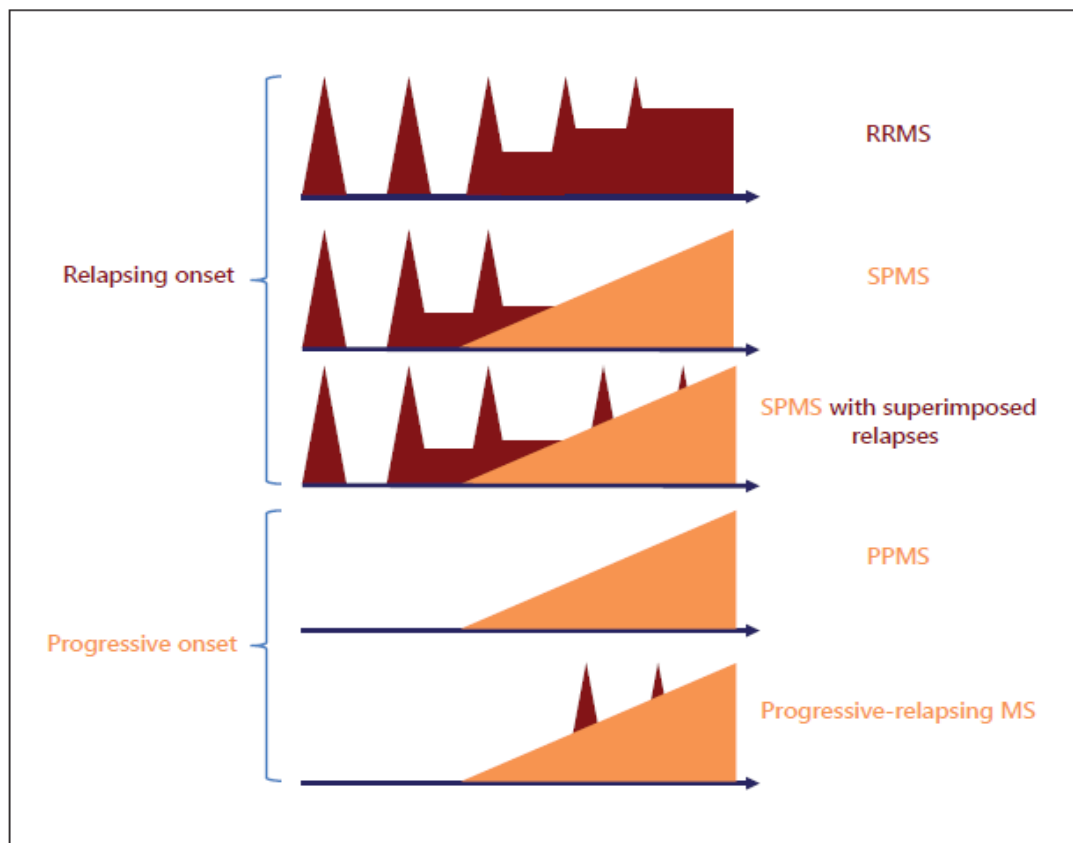
Η ΣκΠ είναι χρόνια φλεγμονώδης νόσος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), και αποτελεί το συχνότερο μη τραυματικό αίτιο αναπηρίας σε νέους ενήλικες [85]. Ο επιπολασμός της νόσου κυμαίνεται στο 0.1-0.2%, στις χώρες της Βόρειας Ευρώπης και Βόρειας Αμερικής [86], ενώ η ετήσια επίπτωσή της κυμαίνεται περίπου στα 5 με 6 νέα περιστατικά ανά 100.000 [86]. Η τυπική ηλικία έναρξης της ΣκΠ βρίσκεται μεταξύ 20 και 40 ετών, με μέση τιμή στα 30 έτη ζωής, ωστόσο έχει περιγραφεί έναρξη ήδη από τη νηπιακή ηλικία, ή ακόμα και στην 7^η δεκαετία της ζωής [8,87]. Πρόκειται για νόσημα που εμφανίζεται συχνότερα σε γυναίκες και μάλιστα ο δείκτης σχετικής συχνότητας μεταξύ ανδρών και γυναικών έχει μεταβληθεί από το 1.4 το 1955 στο 2.3 το 2000 [88,89]. Η συχνότητα διάγνωσης της ΣκΠ έχει γενικά αυξηθεί τις τελευταίες 10ετίες, ωστόσο δεν είναι σαφές αν πρόκειται για πραγματική αύξηση του κινδύνου εμφάνισης ή απλά για συνέπεια των αποτελεσματικότερων διαγνωστικών μεθόδων της σύγχρονης εποχής [7]. Η ΣκΠ δε θεωρείται άμεσα θανατηφόρος, ωστόσο το προσδόκιμο ζωής των ασθενών φαίνεται να μειώνεται κατά 7-10 χρόνια, κατά μέσο όρο [7], προφανώς λόγω προβλημάτων υγείας που εμφανίζονται δευτερογενώς, αυξανομένου του βαθμού αναπηρίας.

2.2.2 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

2.2.2α Βασικοί Ορισμοί – Κλινικές Μορφές και Στάδια

Πριν προχωρήσει κανείς στην κατανόηση των διαφορετικών κλινικών μορφών της νόσου, χρήσιμο είναι να δοθούν οι εννοιολογικοί ορισμοί δύο βασικών χαρακτηριστικών που τις διέπουν σε άλλοτε άλλο βαθμό, της *υποτροπής ή ώσης* και της *προοδευτικής επιδείνωσης*. Υποτροπή, λοιπόν, ονομάζεται ένα νεοεμφανιζόμενο νευρολογικό σύμπτωμα ή ένα σύνολο ταυτόχρονα νεοεμφανιζόμενων νευρολογικών

συμπτωμάτων, που διαρκεί τουλάχιστον 24 ώρες, απουσία ενεργού λοίμωξης ή πυρετού. Ο όρος προοδευτική επιδείνωση, από την άλλη, υποδηλώνει τη σταθερή, μέρα με τη μέρα, επιδείνωση νευρολογικών συμπτωμάτων και σημείων για μία χρονική περίοδο τουλάχιστον 6 μηνών [7]. Η ενσωμάτωση των νευρολογικών σημείων, πέρα από τα νευρολογικά συμπτώματα, στον τελευταίο ορισμό υπονοεί προφανώς και την ανάγκη της αξιολόγησης από ειδικό νευρολόγο, πέρα από την εντύπωση του ασθενή, ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη προοδευτικής επιδείνωσης. Η αναπηρία που προοδευτικά αθροίζουν οι ασθενείς κατά την εξέλιξη της νόσου, υπολογίζεται με τη βοήθεια της διεθνώς αναγνωρισμένης κλίμακας EDSS (Expanded Disability Status Scale) [90], που αξιολογεί τη νευρολογική επίδοση του ασθενή σε κάποια επιμέρους λειτουργικά υποσυστήματα, εξάγοντας τελικά και μία γενική βαθμολογία – χαρακτηρισμό, από το 0 έως το 10 (μικρότερη τιμή ισοδυναμεί με λιγότερη αναπηρία). Περισσότερες λεπτομέρειες επί της EDSS δε θα δοθούν, καθώς εκφεύγουν του αντικειμένου της παρούσας μελέτης.



Kamm CP, et al. Eur Neurol 2014 [7]

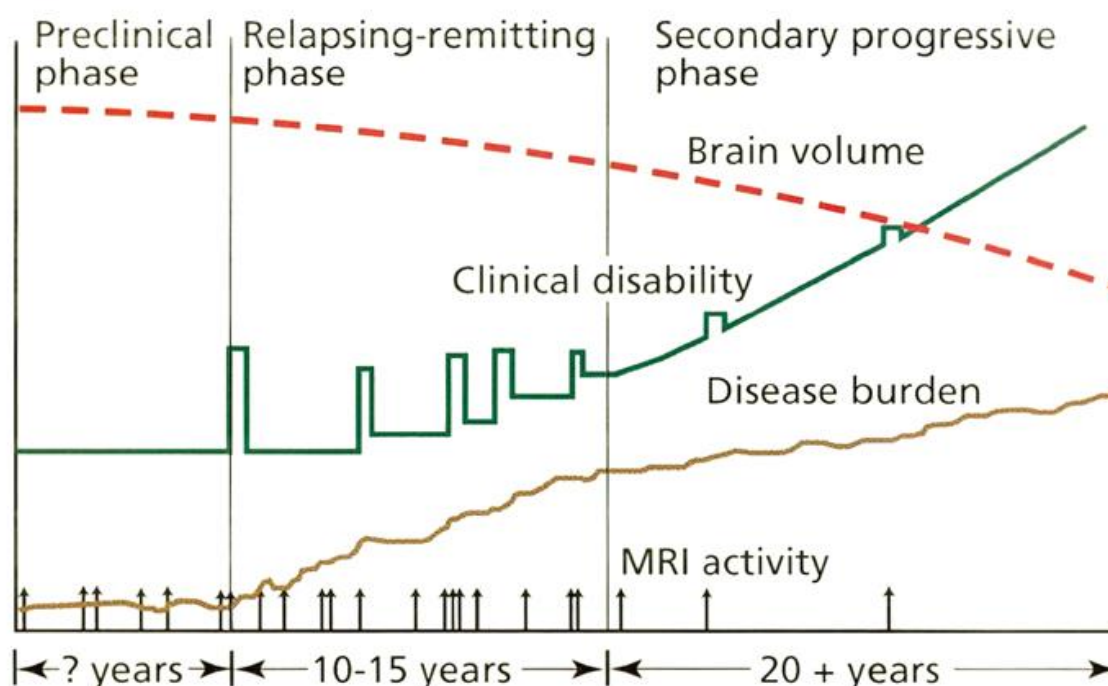
Εικόνα 5

Στο 85% των περιπτώσεων η ΣκΠ εισβάλλει με τη μορφή υποτροπής [7,87] και ακολουθεί υποτροπιάζουσα – διαλείπουσα πορεία (Relapsing – Remitting Multiple Sclerosis / RRMS). Ο ασθενής δηλαδή παρουσιάζει υποτροπές που διαρκούν κάποιες μέρες ή εβδομάδες, και στη συνέχεια υποχωρούν πλήρως ή μερικώς, καταλείποντας στην τελευταία περίπτωση υπολειμματική αναπηρία. Στα μεσοδιαστήματα μεταξύ των υποτροπών υπάρχει κλινική στασιμότητα και όχι προοδευτική επιδείνωση (Εικόνα 5, περίπτωση 1) [7]. Μετά από μία ικανή χρονική περίοδο, που στις διάφορες μελέτες προσεγγίζει τα 19 έτη κατά διάμεση τιμή, η RRMS μεταπίπτει στη δευτεροπαθώς προϊούσα μορφή της νόσου (Secondary Progressive Multiple Sclerosis / SPMS), στο 75% των περιπτώσεων. Σε αυτή τη μορφή της νόσου η προοδευτική επιδείνωση επικρατεί στην εικόνα, ωστόσο σε ένα 40% των ασθενών μπορεί να επικάθονται σε αυτήν και κάποιες υποτροπές (Εικόνα 5, περίπτωση 2 και 3), ειδικά τα πρώτα χρόνια μετά το σημείο μετάπτωσης από RRMS σε SPMS [7,87].

Αντίθετα, στο 15% των περιπτώσεων, η νόσος εισβάλλει εξ αρχής με προοδευτική επιδείνωση, ακολουθώντας το πρότυπο της πρωτοπαθώς προϊούσας μορφής (Primary Progressive Multiple Sclerosis / PPMS, Εικόνα 5, περίπτωση 4). Το 40% περίπου των ασθενών, που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία, βιώνουν και κάποιες υποτροπές που επικάθονται επί της προοδευτικής επιδείνωσης, οπότε και υπάγονται στην προϊούσα διαλείπουσα μορφή της νόσου (Progressive-Relapsing Multiple Sclerosis, Εικόνα 5, περίπτωση 5) [7,91]. Η PPMS ξεκινά, χαρακτηριστικά, πιο όψιμα σε σχέση με το γενικό μέσο όρο της νόσου, με μέση ηλικία έναρξης τα 40 έτη [7], ενώ εμφανίζει συνήθως πιο επιθετική πορεία σε σύγκριση με τις άλλες μορφές της ΣκΠ, με ταχύτερη επιδείνωση της EDSS [87]. Προφανώς, η τελευταία διαπίστωση είναι προϊόν στατιστικής, και η φυσική πορεία και εξέλιξη της νόσου για τον κάθε ασθενή ξεχωριστά είναι αδύνατο να προβλεφθεί με ακρίβεια [92].

Κλείνοντας, αξίζει να αναφερθεί κανείς στη γενική παραδοχή πως η ΣκΠ, όλων των μορφών, έχει και προ-κλινική φάση ασαφούς διάρκειας, που προηγείται της εκδήλωσης των πρώτων συμπτωμάτων (Εικόνα 6) [93]. Αυτό αποδεικνύεται από τις περιπτώσεις ασθενών που υποβλήθηκαν σε MRI εγκεφάλου για λόγους μη συνδεόμενους με τη συμπτωματολογία της νόσου (π.χ. σταδιοποίηση έτερων νοσημάτων), όπου ανεβρέθησαν ‘σιωπηλές’ εστίες απομυελίνωσης, πολύ πριν την κλινική εκδήλωση ΣκΠ. Τα ευρήματα αυτά χαρακτηρίζονται ‘ακτινολογικά μεμονωμένο σύνδρομο’ (Radiologically Isolated Syndrome / RIS) [94], σε

αντιδιαστολή με το πρώτο διαπιστωμένο επεισόδιο της νόσου που ακούει στον όρο ‘κλινικά μεμονωμένο σύνδρομο’ (Clinically Isolated Syndrome / CIS).

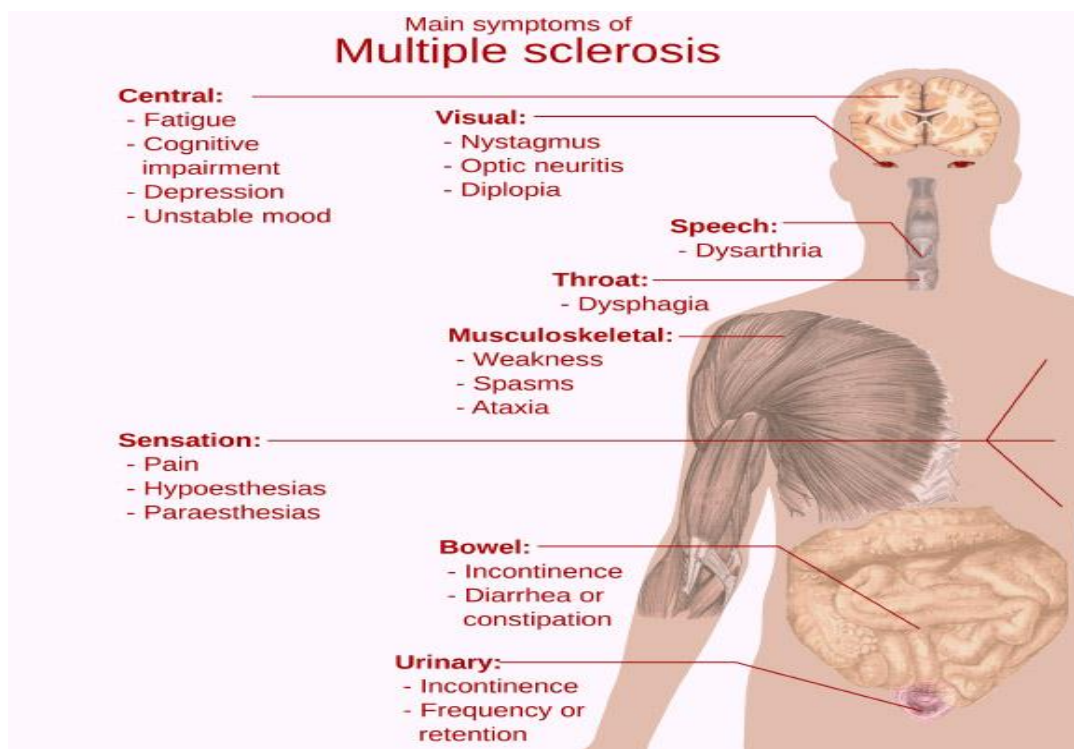


Fox RJ & Cohen JA. Cleve Clin J Med. 2001 [93]

Εικόνα 6

2.2.2β Φάσμα Κλινικών Συμπτωμάτων

Η ΣκΠ μπορεί να προσβάλλει δυνητικά κάθε περιοχή του ΚΝΣ, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στην αξιοσημείωτη ποικιλομορφία των πιθανών κλινικών συμπτωμάτων (Εικόνα 7) [87]. Στο κλινικό φάσμα περιλαμβάνονται συμπτώματα οπτικά και από τις λοιπές εγκεφαλικές συζυγίες, συμπτώματα αισθητικότητας, κινητικότητας ή συνέργειας, ορθοκυστική δυσλειτουργία, έκπτωση γνωσιακών λειτουργιών κλπ. Τυπικότερος τρόπος εισβολής μίας κλινικής περίπτωσης ασθενούς με RRMS είναι με μία οπτική νευρίτιδα, με ένα αισθητικό ή ένα παρεγκεφαλιδικό σύμπτωμα [87]. Αντίθετα, μία κλινική περίπτωση ασθενούς με PPMS εισβάλλει συνήθως με συμπτωματολογία από το Νωτιαίο Μυελό, όπως αταξία βάδισης, παράσεις και σπαστικότητα [87].



Confavreux C & Vukusic S. Brain 2006 [87]

Εικόνα 7

2.2.3 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Παρά την αδιάκοπη επιστημονική παραγωγή επί δεκαετίες, στο πεδίο της διαγνωστικής της ΣκΠ, δεν έχει ακόμα καταστεί ακόμα δυνατή η εξεύρεση μίας και μοναδικής κλινικής ή παρακλινικής εξέτασης / δοκιμασίας, που θα έχει τη δυνατότητα βέβαιης διάγνωσης ή αποκλεισμού της νόσου. Για την ακρίβεια, η διάγνωση της ΣκΠ γίνεται με τη βοήθεια της εφαρμογής συγκεκριμένων κριτηρίων, που βασίζονται σε κλινικά, νευροαπεικονιστικά και εργαστηριακά στοιχεία. Η διαρκής, άλλωστε, εξέλιξη της τεχνολογίας, που συμπαρασύρει και την επιστημονική γνώση, επιβάλλει την περιοδική επαναξιολόγηση και αναθεώρηση των διαγνωστικών κριτηρίων, ώστε η διαγνωστική διαδικασία να είναι όσο το δυνατόν πιο πρόωμη, πιο ευαίσθητη και πιο ειδική. Έτσι, την αρχική θέσπιση των κριτηρίων Poser [95], διαδέχθηκαν τα κριτήρια Barkhof [96], που αποτέλεσαν αντικατοπτρισμό της επανάστασης που έφερε η MRI στη διάγνωση της ΣκΠ. Από το 2001 περάσαμε στην εποχή της εφαρμογής των κριτηρίων McDonald [97], που και αυτά με τη σειρά τους αναθεωρήθηκαν τρεις φορές [98-100], η πιο πρόσφατη εξ αυτών εντός του 2017.

Η διάγνωση της ΣκΠ με τη βοήθεια κριτηρίων απαιτεί την απόδειξη της διασποράς της νόσου στο χώρο και το χρόνο. Στις περιπτώσεις που η εισβολή της

νόσου γίνεται με τη μορφή ώσης, η διασπορά τόσο στο χώρο, όσο και στο χρόνο επιβεβαιώνεται με τη βοήθεια του νευρολογικού ιστορικού, της νευρολογικής εξέτασης και της νευροαπεικόνισης με MRI (Πίνακας 2) [100]. Σύμφωνα με την πρόσφατη αναθεώρηση του 2017, στις περιπτώσεις με μία μόνο κλινική προσβολή, όπου πληρείται ωστόσο απεικονιστικά το κριτήριο της διασποράς στο χώρο, η διασπορά στο χρόνο μπορεί να υποκατασταθεί από την ανεύρεση ολιγοκλωνικών ζωνών (OligoClonal Bands - OCBs) στο Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό (ENY). Για την μορφή της PPMS, η διάγνωση απαιτεί ένα έτος κλινικής επιδείνωσης (αναδρομικά ή προδρομικά), σε συνδυασμό με το να βρίσκονται σε ισχύ 2 τουλάχιστον από 3 κριτήρια που αφορούν MRI ευρήματα σε εγκέφαλο και νωτιαίο μυελό, και την ύπαρξη OCBs (Πίνακας 3) [100].

Number of lesions with objective clinical evidence		Additional data needed for a diagnosis of multiple sclerosis
≥2 clinical attacks	≥2	None*
≥2 clinical attacks	1 (as well as clear-cut historical evidence of a previous attack involving a lesion in a distinct anatomical location†)	None*
≥2 clinical attacks	1	Dissemination in space demonstrated by an additional clinical attack implicating a different CNS site or by MRI‡
1 clinical attack	≥2	Dissemination in time demonstrated by an additional clinical attack or by MRI§ OR demonstration of CSF-specific oligoclonal bands¶
1 clinical attack	1	Dissemination in space demonstrated by an additional clinical attack implicating a different CNS site or by MRI‡ AND Dissemination in time demonstrated by an additional clinical attack or by MRI§ OR demonstration of CSF-specific oligoclonal bands¶

If the 2017 McDonald Criteria are fulfilled and there is no better explanation for the clinical presentation, the diagnosis is multiple sclerosis. If multiple sclerosis is suspected by virtue of a clinically isolated syndrome but the 2017 McDonald Criteria are not completely met, the diagnosis is possible multiple sclerosis. If another diagnosis arises during the evaluation that better explains the clinical presentation, the diagnosis is not multiple sclerosis. An attack is defined in panel 1. *No additional tests are required to demonstrate dissemination in space and time. However, unless MRI is not possible, brain MRI should be obtained in all patients in whom the diagnosis of multiple sclerosis is being considered. In addition, spinal cord MRI or CSF examination should be considered in patients with insufficient clinical and MRI evidence supporting multiple sclerosis, with a presentation other than a typical clinically isolated syndrome, or with atypical features. If imaging or other tests (eg, CSF) are undertaken and are negative, caution needs to be taken before making a diagnosis of multiple sclerosis, and alternative diagnoses should be considered. †Clinical diagnosis based on objective clinical findings for two attacks is most secure. Reasonable historical evidence for one past attack, in the absence of documented objective neurological findings, can include historical events with symptoms and evolution characteristic for a previous inflammatory demyelinating attack; at least one attack, however, must be supported by objective findings. In the absence of residual objective evidence, caution is needed. ‡The MRI criteria for dissemination in space are described in panel 5. §The MRI criteria for dissemination in time are described in panel 5. ¶The presence of CSF-specific oligoclonal bands does not demonstrate dissemination in time per se but can substitute for the requirement for demonstration of this measure.

Table: The 2017 McDonald criteria for diagnosis of multiple sclerosis in patients with an attack at onset

Thompson A, et al. *Lancet Neurol.* 2018 [100]

Πίνακας 2

Panel 6: 2017 McDonald criteria for diagnosis of multiple sclerosis in patients with a disease course characterised by progression from onset (primary progressive multiple sclerosis)

Primary progressive multiple sclerosis can be diagnosed in patients with:

- 1 year of disability progression (retrospectively or prospectively determined) independent of clinical relapse

Plus two of the following criteria:

- One or more T2-hyperintense lesions* characteristic of multiple sclerosis in one or more of the following brain regions: periventricular, cortical or juxtacortical, or infratentorial
- Two or more T2-hyperintense lesions* in the spinal cord
- Presence of CSF-specific oligoclonal bands

*Unlike the 2010 McDonald criteria, no distinction between symptomatic and asymptomatic MRI lesions is required.

Thompson A, et al. Lancet Neurol. 2018 [100]

Πίνακας 3

2.2.4 ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΣ

Ο θεραπευτικός χειρισμός των πασχόντων από ΣκΠ μπορεί να διακριθεί περαιτέρω σε θεραπεία των υποτροπών, ανοσοτροποποιητική θεραπεία και συμπτωματική θεραπεία. Καθώς η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη θεραπευτική ανταπόκριση των ασθενών που έλαβαν μέρος στην παρούσα μελέτη, δεν βρίσκεται μεταξύ των στόχων αυτής, θα ακολουθήσει μία συνοπτική, μόνο, παρουσίαση των τριών προαναφερόμενων κατηγοριών.

2.2.4α Θεραπεία των υποτροπών

Οι υποτροπές τις νόσου αντιμετωπίζονται τυπικά με τη χορήγηση 3-5 ημερών Μεθυλπρεδνιζολόνης, 1gr ή 500mg ανά ημέρα ενδοφλεβίως, με ή χωρίς την επακόλουθη προοδευτική μείωση από του στόματος (tapering). Ίδια δοσολογία Μεθυλπρεδνιζολόνης, αναλόγως των διαθέσιμων φαρμακοτεχνικών μορφών κάθε χώρας, μπορεί να χορηγηθεί και από του στόματος, με ισοδύναμα αποτελέσματα [101]. Επί μη ικανοποιητικής βελτίωσης των συμπτωμάτων, δύναται να επαναληφθεί κύκλος ενδοφλέβιας αγωγής, με δόσεις φαρμάκου που μπορεί να φτάσουν έως και τα 2gr ημερησίως. Εναλλακτικά, μπορεί να αξιολογηθεί το ενδεχόμενο αντιμετώπισης με σχήμα πλασμαφαίρεσης [102].

2.2.4β Ανοσοτροποποιητική θεραπεία

Στις μέρες μας υπάρχουν πλέον αρκετές διαφορετικές θεραπευτικές επιλογές, που στοχεύουν στη βελτίωση της φυσικής ιστορίας της ΣκΠ. Οι ενδείξεις χορήγησης των φαρμάκων αυτών έχουν να κάνουν με την κλινική πορεία, το στάδιο της νόσου, τον τύπο νόσου και την ανίχνευση ή όχι δραστηριότητας νόσου. Γενικά, είναι δόκιμη η έναρξη αγωγής το νωρίτερο δυνατό και επιτρεπτό. Οι διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές διακρίνονται σε 1^{ης} και 2^{ης} γραμμής. Τα φάρμακα 1^{ης} γραμμής είναι ασφαλέστερα από πλευράς παρενεργειών και στη μεγάλη πλειοψηφία των περιπτώσεων είναι αυτά που δοκιμάζονται πρώτα στην προσπάθεια ελέγχου της εξέλιξης της νόσου. Τα φάρμακα 2^{ης} γραμμής, μολονότι λιγότερο ασφαλή, είναι πιο αποτελεσματικά από τα 1^{ης}, γι' αυτό και επιλέγονται όταν τα τελευταία αποτυγχάνουν. Εκτός από την περιγραφείσα λογική *κλιμάκωσης* των θεραπειών (*escalation*), υπάρχει και η τακτική της θεραπείας *εφόδου* (*induction*), η χορήγηση δηλαδή ενός ισχυρού φαρμάκου ήδη από την αρχή με σκοπό τον άμεσο έλεγχο της κλινικής εικόνας, που μπορεί ή όχι να ακολουθείται από αποκλιμάκωση [7]. Η επιλογή αυτή, που εφαρμόζεται προφανώς σε λιγότερες περιπτώσεις, υπαγορεύεται από τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων του εκάστοτε υποψηφίου ασθενή.

Τα σκευάσματα Ιντερφερόνης-B (IFN-B), σε όλες τις διαφορετικές φαρμακοτεχνικές μορφές (Avonex®, Plegridy®, Betaferon ®/Betaseron®/ Extavia® και Rebif®), μαζί με το Glatiramer Acetate (Copaxone®), αποτελούν τις πλέον καθιερωμένες θεραπείες 1^{ης} γραμμής, με περισσότερα από 20 χρόνια κλινικής εμπειρίας στη χρήση τους (εκτός του Plegridy® που εισήχθη στην αγορά πιο πρόσφατα). Σύμφωνα με κλινικές μελέτες, μειώνουν τον ετησιοποιημένο ρυθμό υποτροπών (Annualized Relapse Rate-ARR), περίπου κατά 30%, και δεν ευθύνονται, σε γενικές γραμμές, για απειλητικές για τη ζωή ανεπιθύμητες ενέργειες [103]. Παράλληλα, τα σκευάσματα IFN-B έχουν ένδειξη και στην SPMS, μειώνοντας τον κίνδυνο υποτροπών κατά τη διάρκεια αυτής [104]. Τα τελευταία χρόνια έχουν κυκλοφορήσει στην αγορά νέα φάρμακα 1^{ης} γραμμής, που χορηγούνται από το στόμα, γεγονός με σαφές αντίκτυπο στην ποιότητα ζωής των ασθενών. Η Τεριφλουνομίδη (Aubagio®) μειώνει τη δραστηριότητα του μιτοχονδριακού ενζύμου διυδρο-οροτική αφυδρογονάση, που παίζει βασικό ρόλο στη σύνθεση των πυριμιδινών και στον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων [105]. Ο φουμαρικός διμεθυλεστέρας

(Tecfidera®) ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα Nrf2, γεγονός που οδηγεί στην ενίσχυση αντιοξειδωτικού μονοπατιού στους νευρώνες, προστατεύοντας τους έτσι από το οξειδωτικό stress [106]. Ο τρίτος παράγοντας από του στόματος που κυκλοφορεί, η Φιγκολιμόδη (Gilenya®), χρησιμοποιείται συνήθως ως φάρμακο 2^{ης} γραμμής, ωστόσο βάσει ενδείξεων υπάρχει δυνατότητα χορήγησης της ήδη από την αρχή, σε περίπτωση εισβολής της ΣκΠ με χαρακτηριστικά επιθετικής νόσου. Δρα μέσω δέσμησης των S1P υποδοχέων, που αναστέλλουν την έξοδο των λεμφοκυττάρων από τους λεμφαδένες [107,108]. Οδηγεί σε μείωση του ARR κατά 52%, ωστόσο συνοδεύεται σε κάποιες περιπτώσεις από ένα συγκεκριμένο προφίλ παρενεργειών, σημαντικότερες των οποίων είναι τα αρρυθμολογικά συμβάντα κατά την αρχική χορήγηση και το οίδημα οπτικής θηλής [107,108].

Πλην της Φιγκολιμόδης, ως φάρμακα 2^{ης} γραμμής μπορούν να επιλεγούν και κάποιοι παράγοντες που χορηγούνται με τη μορφή εγχύσεων. Η Ναταλιζουμάμπη (Tysabri®) είναι ένα ανασυνδυασμένο εξανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της α4-Ιντεγκρίνης, η οποία βοηθά στην προσκόλληση και μετανάστευση των λεμφοκυττάρων μέσα από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Blood-Brain-Barrier / BBB). Χορηγείται μηνιαίως και μειώνει τον ARR κατά 68% [109]. Η πολύ καλή της αποτελεσματικότητα αντισταθμίζεται από τον κίνδυνο ανάπτυξης Προϊούσας Πολυεστιακής Λευκοεγκεφαλοπάθειας (Progressive Multifocal Leucoencephalopathy / PML), ειδικά μετά τα δύο πρώτα χρόνια χορήγησης σε ασθενείς με προηγούμενη προσβολή από τον ιό JCV (John Cunningham Virus). Έτερη επιλογή αποτελεί το αντι-CD52 μονοκλωνικό αντίσωμα Alemtuzumab (Lemtrada®), που χορηγείται σε δύο ετήσιους κύκλους εγχύσεων, έναν πενθήμερο και έναν τριήμερο. Η εξίσου υψηλή του αποτελεσματικότητα, που αγγίζει το 55% μείωσης του ARR, επισκιάζεται από αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης αυτοάνοσων συμβαμάτων δευτερογενώς, με κύριο στόχο το θυρεοειδή, και σπανιότερα τα αιμοπετάλια και τους νεφρούς [110-112]. Πρέπει ακόμη να γίνει μνεία στα αντι-CD20 μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν θέση στη θεραπευτική της ΣκΠ, όπως το Rituximab (Mabthera®) [113] και το Ocrelizumab (Ocrevus®). Το τελευταίο αυτό φάρμακο, είναι μάλιστα το πρώτο που έχει ένδειξη χορήγησης, πέρα από την RRMS και στην PPMS, εφόσον υπάρχουν απεικονιστικά ευρήματα φλεγμονώδους δραστηριότητας [114]. Άλλη θεραπευτική επιλογή αποτελεί και η Μιτοξανδρόνη (Novantrone®). Πρόκειται για ανοσοκατασταλτικό φάρμακο που μπορεί να χορηγηθεί σε επιδεινούμενη RRMS, SPMS ή προϊούσα – διαλείπουσα ΣκΠ. Η συνολική της δόση, αθροιστικά, δεν μπορεί

να ξεπερνά τα 140mg ανά m² επιφανείας σώματος, εξαιτίας των πιθανοτήτων καρδιοτοξικότητας και αιματολογικών κακοηθειών [115]. Τέλος, μνεία θα πρέπει να γίνει και στην Κυκλοφωσφαμίδη (Endoxan®), που αποτελεί off label, 3^{ης} γραμμής, θεραπευτική επιλογή σε περιπτώσεις κακοήθους πορείας νόσου, ή σε ειδικές περιπτώσεις φαινοτύπου της νόσου, όπως η ογκόμορφη ΣκΠ. Το εύρος των ενδείξεων χορήγησής της περιορίζεται σημαντικά από τις πιθανές σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως είναι καταστολή του μυελού, η αιμορραγία του ουροποιητικού και η υπογονιμότητα [116].

Πλήθος ακόμα θεραπευτικών επιλογών που βρίσκονται ήδη καθ'οδόν, σε επίπεδο μελετών φάσης 3 και 4, όπως η Κλαδριβίνη (Mavenclad®) [117] και το Siponimod [118], αναμένεται να ισχυροποιήσουν ακόμη περισσότερο τα όπλα του κλινικού νευρολόγου ενάντια στην αντιμετώπιση της νόσου.

2.2.4γ Συμπτωματική θεραπεία

Οι ασθενείς που πάσχουν από ΣκΠ ταλαιπωρούνται από διάφορες νευρολογικές επιπλοκές, ανεξάρτητα από τη δραστηριότητα της νόσου τους, όπως κόπωση, κατάθλιψη, σπαστικότητα, τρόμο, επιληπτικές κρίσεις, πόνο και διαταραχές ουροποιογεννητικού. Τα προβλήματα αυτά μπορούν να τεθούν υπό μερικό ή πλήρη έλεγχο με τη βοήθεια στοχευμένης φαρμακευτικής αγωγής (αμανταδίνη, αντικαταθλιπτικά, σπασμολυτικά, νταλφραμπριδίνη, αντιεπιληπτικά, σολιφενασίνη κλπ), ή/και με τη βοήθεια εργοθεραπευτικών προγραμμάτων και παρεμβάσεων (ορθωτήρες, συσκευές FES κλπ). Η επιτυχημένη και ολοκληρωμένη συμπτωματική θεραπεία είναι πρωταρχικής σημασίας στη ΣκΠ, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί να διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο στη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών από την ανοσοτροποποιητική θεραπεία, σε κάποιες τουλάχιστον περιπτώσεις [119].

2.2.5 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ

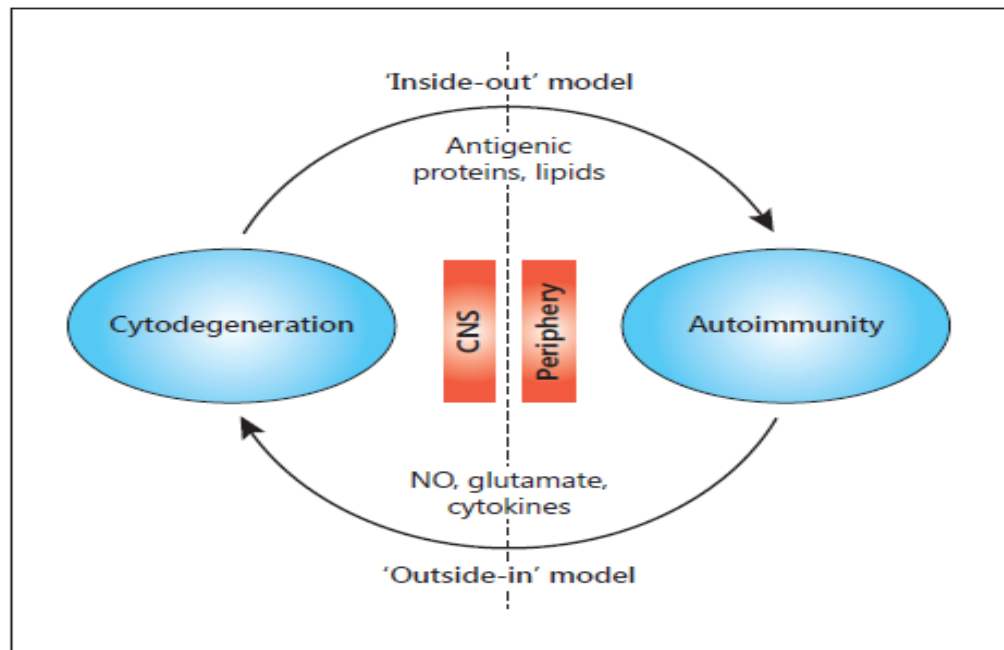
Παρά τα επιστημονικά άλματα που έχουν γίνει τις τελευταίες δεκαετίες προς την καλύτερη κατανόηση της αιτιολογίας της ΣκΠ, βρισκόμαστε ακόμη μακριά από τη διατύπωση μίας ολοκληρωμένης θεώρησης της πολύπλευρης και πολυεπίπεδης παθοφυσιολογίας της νόσου. Ανεξάρτητα από την ανομοιογένεια των μηχανισμών

που έχουν περιγραφεί μέχρι στιγμής, η επιστημονική κοινότητα φαίνεται να αποδέχεται σχεδόν ομόφωνα τον αιτιολογικό ρόλο της αυτοανοσίας στη γένεση της νόσου.

Η ‘αυτοάνοση’ θεωρία υποστηρίζεται καταρχήν από τα παθολογοανατομικά ευρήματα στις ενεργές πλάκες της ΣκΠ, όπου βρίθει η παρουσία κυττάρων φλεγμονής. Όταν μάλιστα οι εν λόγω πλάκες μεταπίπτουν χρονικά από την οξεία στην υποξεία τους φάση, δημιουργείται σε αυτές ένα ανενεργό κέντρο, με σπανιότερη παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων, που περιβάλλεται από μία ζώνη ενεργότητας, με εντονότερη φλεγμονώδη δραστηριότητα [120]. Αντιστοίχως, τα κλινικά φαινόμενα ακολουθούν τη ζώνη φλεγμονής. Επιπρόσθετα, βασικό χαρακτηριστικό των ενεργών πλακών είναι ο διασπασμένος αιματοεγκεφαλικός φραγμός (BBB), μέσω του οποίου τα φλεγμονώδη κύτταρα αποκτούν πρόσβαση στο ΚΝΣ. Ένα ακόμη υποστηρικτικό στοιχείο αυτοανοσίας είναι η αυξημένη έκφραση μορίων HLA Τάξης I και II εντός των πλακών [120]. Τα MHC αντιγόνα, όπως αναλύθηκε και παραπάνω στην ενότητα 2.1.5, παίζουν πρωταρχικό ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού, με βασικό τους όχημα την αντιγονοπαρουσίαση. Ακόμη, η ενδοθηλική παραγωγή ολιγοκλωνικών ζωνών στην ευρεία πλειοψηφία των ασθενών, υποδηλώνει και την ενεργοποίηση μηχανισμών χυμικής ανοσίας αποκλειστικά εντός του ΚΝΣ αυτών. Συνεπικουρικά, πολυάριθμες πληροφορίες για τον αυτοάνοσο χαρακτήρα της ΣκΠ έχει προσφέρει και το πειραματικό μοντέλο της, η Πειραματική Αλλεργική Εγκεφαλομυελίτιδα (Experimental Allergic Encephalomyelitis – EAE) [120]. Η EAE προκύπτει από την έγχυση πεπτιδίων μυελίνης εντός πειραματοζώων, η οποία οδηγεί σε καταρράκτη αυτοάνοσων γεγονότων, και τα κλινικά της χαρακτηριστικά προσομοιάζουν ιδιαίτερος εκείνα της ΣκΠ. Τέλος, στις ισχυρές ενδείξεις υπέρ της αυτοάνοσης θεωρίας θα πρέπει να ενταχθεί και η καλή απάντηση του μεγαλύτερου ποσοστού των πασχόντων από ΣκΠ στο θεραπευτικό χειρισμό με ανοσοτροποποιητικά ή ανοσοκατασταλτικά φάρμακα [120].

Όπως κάθε θεωρία που σέβεται τον εαυτό της, έτσι και αυτή της ‘αυτοάνοσης αρχής της ΣκΠ’ έχει το δικό της αντίλογο. Έτσι υπήρξαν συγγραφείς στο παρελθόν που την αντιμετώπισαν με σκεπτικισμό, προβάλλοντας ως επιχείρημα την ανίχνευση δευτερογενών ανοσιακών γεγονότων και σε νευρολογικά νοσήματα λοιμώδους και εκφυλιστικής αρχής (πχ φλεγμονώδεις κυτταρικές διηθήσεις στην πολιομυελίτιδα και στη νόσο Κινητικού Νευρώνα), ή ακόμα και ισχαιμικής αρχής (πχ εναποθέσεις συμπληρώματος σε Αγγειακά Εγκεφαλικά Επεισόδια) [120,121]. Στο ίδιο σκεπτικό,

έχει περιγραφεί το ‘inside-out’ παθοφυσιολογικό μοντέλο, όπου το πρωταρχικό γεγονός συμβαίνει εντός του ΚΝΣ και δεν είναι αυτοάνοσο, σε αντίθεση με το ‘outside-in’ μοντέλο, όπου η αρχή γίνεται στην περιφέρεια και αφορά εκτροπή του ανοσοποιητικού (Εικόνα 8) [122]. Έχει μάλιστα προταθεί ότι το πρώτο γεγονός, που συμβαίνει εντός του ΚΝΣ, θα μπορούσε να αφορά σε πρωτογενή απορρύθμιση μηχανισμών απόπτωσης [122], που καθιστά αντιγονικά ορατούς νέους επιτόπους των νευρώνων ή των ολιγοδενδροκυττάρων.



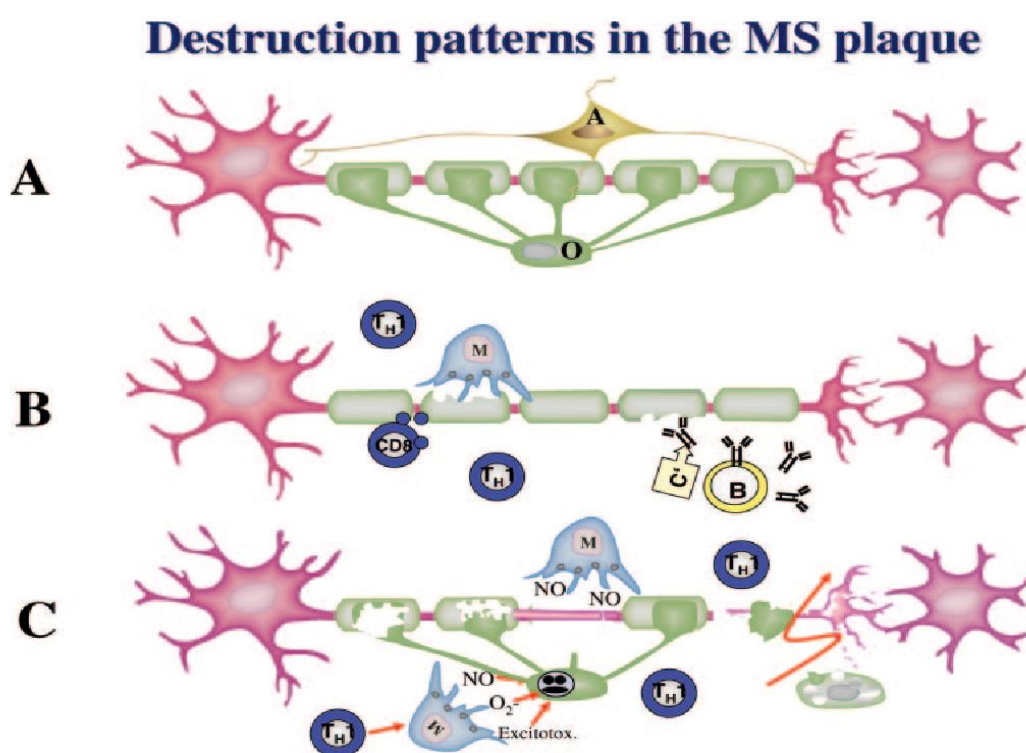
Stys PK, et al. *Nat Rev Neurosci.* 2012 [122]

Εικόνα 8

Άλλα επιχειρήματα που έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί κατά της ‘αυτοάνοσης θεωρίας’ είναι η ανίχνευση αυτοαντιδραστικών T-λεμφοκυττάρων και αντιμυελινικών αντισωμάτων σε μικρά ποσοστά υγιών μαρτύρων, που θέτει υπό αμφισβήτηση την παθογονικότητά τους ή έστω την αποκλειστική παθογονικότητα τους στην έναρξη αυτοανοσίας [120]. Ακόμη, το γεγονός ότι όσα ισχύουν στην ΕΑΕ δεν επιβεβαιώνονται πάντα στη ΣκΠ, υποδηλώνει την ύπαρξη κενών στην κατανόηση του αυτοανόσου καταρράκτη [120]. Τέλος, η σχετική αποτυχία των διαθέσιμων θεραπευτικών παραγόντων να ελέγξουν την προοδευτική επιδείνωση στη ΣκΠ, παραπέμπει στην επικράτηση των νευροεκφυλιστικών γεγονότων επί των φλεγμονωδών, τουλάχιστον σε αυτή τη συνιστώσα της νόσου [120].

2.2.5a Θέσεις Προσβολής σε κυτταρικό και μακροκυτταρικό επίπεδο

Η ΣκΠ ή Απομυελινωτική Νόσος του ΚΝΣ, θεωρείται παραδοσιακά μία νόσος που προσβάλλει κυρίως και πρωταρχικά τη μυελίνη, το προστατευτικό έλυτρο δηλαδή των νευρικών κυττάρων του ΚΝΣ, που δημιουργείται από τα ολιγοδενδροκύτταρα (Εικόνα 9) [123]. Μέχρι προσφάτως, η επικρατούσα άποψη ήθελε την αξονική και νευρωνική βλάβη και εκφύλιση να έρχεται όψιμα, συμβαδίζοντας μάλιστα με την πρόοδο της αναπηρίας. Πλέον, ωστόσο, είναι σαφές

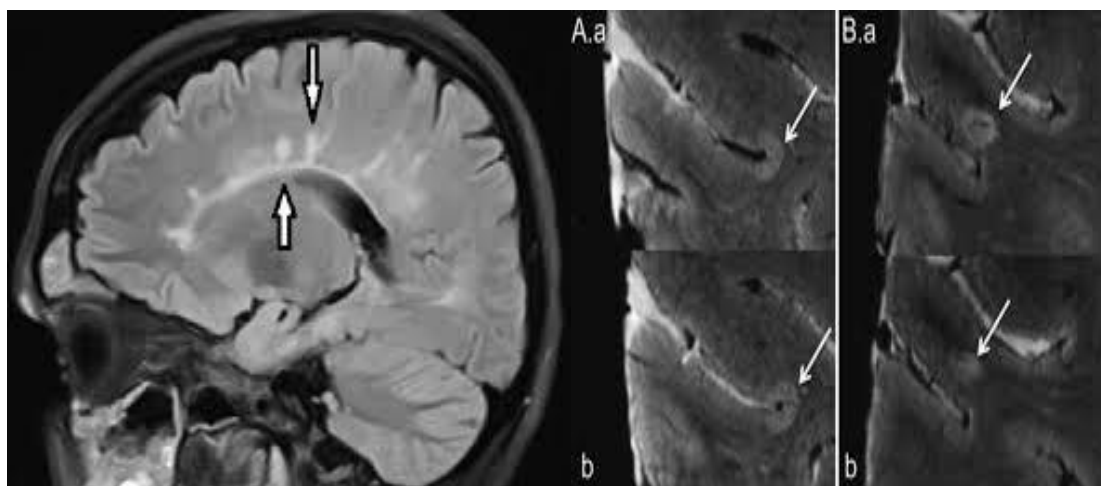


Gold R et al. Brain. 2006 [123]

Εικόνα 9

ότι αξονική και νευρωνική βλάβη είναι παρούσες ακόμα και σε πολύ πρώιμα στάδια της RRMS, παράλληλα με τη μυελινική προσβολή [122,124,125]. Η απώλεια μάλιστα κυττάρων και νευραξόνων φαίνεται να συμβαδίζει καλύτερα με την απώλεια εγκεφαλικού όγκου, που ως προγνωστικός παράγοντας προόδου αναπηρίας και έκπτωσης γνωστικών λειτουργιών, αποτελεί έναν από τους βασικούς στόχους των σύγχρονων ανοσοτροποποιητικών παραγόντων [126-130]. Να επισημανθεί ότι οι υποκείμενοι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της αξονικής και νευρωνικής βλάβης είναι διακριτοί των αντίστοιχων της απομυελίνωσης, με μεγαλύτερη εμπλοκή

κυτταροτοξικών CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων, ενεργοποιημένης μικρογλοίας και κυττάρων φυσικής ανοσίας (μέσω ενεργοποίησης Toll-Like Receptors ή TLRs) [131-135]. Έχουν επίσης αναγνωριστεί και ανεξάρτητοι αντισωματικοί στόχοι από τους κλασσικούς μυελινικούς (π.χ. Βασική Πρωτεΐνη της Μυελίνης), κυρίως σε παρακομβικές περιοχές, όπως η Contactin-2 και η Neurofascin [136,137].



Kizilca Ö, et al. Korean J Radiol. 2017 [138]

Nielsen AS, et al. Neurology 2013 [139]

Εικόνα 10α

Εικόνα 10β

Σε μακροκυτταρικό επίπεδο, τώρα, η ΣκΠ αντιμετωπίστηκε για πολλά χρόνια ως αμιγής νόσος της λευκής ουσίας, με τυπικότερη εντόπιση των απομυελινωτικών πλακών την περικοιλιακή. Οι τυπικές πλάκες περιγράφονται με σχήμα ωοειδές, και με τον επιμήκη άξονά τους κάθετο στον αντίστοιχο των πλαγίων κοιλιών. Απομυελινωτικές βλάβες αναπτύσσονται κλασσικά και επί του μεσολοβίου, με τον Dawson να τις παρομοιάζει στη θέση αυτή με δάκτυλα, εξ' ου και η ονομασία δάκτυλοι Dawson (Εικόνα 10α) [138]. Οι σύγχρονες τεχνικές νευροαπεικόνισης, ωστόσο, έχουν καταστήσει πλέον σαφές το ότι η ΣκΠ είναι μία πάθηση όχι μόνο της λευκής, αλλά και της φαιάς ουσίας. Η φαιά ουσία μπορεί να προσβληθεί οπουδήποτε στο ΚΝΣ, αρκετά πρώιμα χρονικά, με πιο επιρρεπείς στόχους ωστόσο το φλοιό (Εικόνα 10β) [139], το Νωτιαίο Μυελό και την Παρεγκεφαλίδα [140]. Οι φλοιώδεις, υπο-χοριοειδείς πλάκες μάλιστα, φαίνεται να συνοδεύονται συχνά από υπερκείμενους μηνιγγικούς θύλακες έκτοπων Β-λεμφοκυττάρων, που ίσως ευθύνονται για την ενδοθητική παραγωγή των ολιγοκλωνικών ζωνών [141,142]. Οι βλάβες της φαιάς ουσίας έχουν τύχει, προσφάτως, αυξημένης επιστημονικής προσοχής λόγω της

φαινομενικά καλύτερης συσχέτισής τους με τα γνωσιακά συμπτώματα της νόσου [143].

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι πέραν των ανιχνεύσιμων βλαβών με τις συμβατικές τεχνικές νευροαπεικόνισης, αλλαγές αναδεικνύονται και στη φαινομενικά υγιή λευκή (Normal Appearing White Matter – NAWM) και φαιά ουσία (Normal Appearing Grey Matter – NAGM) ως διαπιστώνεται με τις νεώτερες, μη συμβατικές νευροαπεικονιστικές μεθόδους [144,145]. Αυτές αφορούν σε μειωμένη πυκνότητα μυελίνης και νευραξόνων, καθώς και σε χρόνια ενεργοποίηση μικρογλοιακών κυττάρων. Μάλιστα, η μεγαλύτερη βαθμού παρουσία αυτής της ασαφούς, μη περιχαρακωμένης, φλεγμονής, φαίνεται να προαναγγέλει ταχύτερους ρυθμούς εξέλιξης της κλινικής αναπηρίας [124,141].

2.2.5β Φυσική και Ειδική / Προσαρμοστική Ανοσία

Η ανοσιακή απάντηση διακρίνεται σε δύο βασικούς τύπους, τη *φυσική ή ενδογενή (innate)* και την *ειδική ή προσαρμοστική (adaptive)*. Στην παθοφυσιολογία της ΣκΠ συμμετέχουν και οι δύο τύποι, σε διαφορετικό βαθμό [146,147]. Η φυσική ανοσιακή απάντηση ξεκινά με την ενεργοποίηση συγκεκριμένων κυττάρων (μακροφάγων, δενδριτικών, μαστοκυττάρων κλπ) από μικροβιακά προϊόντα, μέσω υποδοχέων επιφανείας, με μη αντιγονοειδικό τρόπο (TLRs). Τα εν λόγω κύτταρα παράγουν κυτταροκίνες, που μπορούν να εκτρέψουν την ειδική ανοσιακή απάντηση, μέσω αλληλεπίδρασης με τα B- και T- λεμφοκύτταρα προς διαφορετικά μονοπάτια. Για παράδειγμα, έχει υποστηριχθεί ότι η παρουσία του Glatiramer Acetate μπορεί να οδηγεί στην παραγωγή κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα που επάγουν αφενός την παραγωγή T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (T-regulatory / Tregs) και αφετέρου ενισχύουν την αντιφλεγμονώδη Th2 ανοσιακή απάντηση έναντι της προφλεγμονώδους Th1 [θα αναλυθούν παρακάτω, στην § 2.2.5γ(ι)] [148].

Έτερος τύπος κυττάρων φυσικής ανοσίας που επηρεάζονται στη ΣκΠ είναι τα κύτταρα *φυσικοί φονείς* (Natural Killers – NK). Πρόκειται ουσιαστικά για έναν ειδικό τύπο λεμφοκυττάρων που δεν εκφράζουν τα αντιγόνο επιφανείας CD3, αλλά το αντιγόνο CD16, ή/και CD56, ανάλογα με τη φάση ενεργοποίησής τους. Τα NK κύτταρα, που φυσιολογικά καταστέλλουν την Th1 προφλεγμονώδη ανοσιακή απάντηση, μέσω παραγωγής ιντερλευκινών (Interleukines – IL) IL-5 και IL-13, έχουν περιγραφεί ως αριθμητικά και λειτουργικά υστερούντα στη ΣκΠ [149]. Αξίζει,

τέλος, να γίνει μνεία και σε έναν ακόμη ειδικό τύπο λεμφοκυττάρων, που φέρουν γδ υποδοχέα επιφανείας, και που δεν αναγνωρίζουν αντιγόνα μέσω HLA αντιγονοπαρουσίασης. Τα κύτταρα αυτά βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε περιφερειακούς βλεννογόνους, όπως στο έντερο [68]. Εκεί μπορούν να καταπολεμούν βακτήρια, τα οποία με τη σειρά τους εκφράζουν πρωτεΐνες θερμικού stress (heat-shock proteins – hs), όπως τις hs 65 και 70. Τέτοιες πρωτεΐνες δυνατόν να παρουσιάζουν ομολογία με τις ενδογενείς, που παράγονται από τα ολιγοδενδροκύτταρα μιας ενεργού απομυελινωτικής πλάκας, γεγονός που μπορεί να εξηγήει τη συμμετοχή τέτοιων γδ λεμφοκυττάρων σε αυτοαντιδραστικούς μηχανισμούς εντός του ΚΝΣ. Έχουν ανιχνευθεί μάλιστα γδ λεμφοκύτταρα, σε υψηλές συγκεντρώσεις, στο ΕΝΥ ασθενών με ΣκΠ [150].

Από την άλλη πλευρά η ειδική ή προσαρμοστική ανοσιακή απάντηση, μπορεί να διακριθεί περαιτέρω στη χυμική και την κυτταρική ανοσία [151]. Η χυμική ανοσία αφορά τις δράσεις των Β-λεμφοκυττάρων που σχετίζονται με την παραγωγή αντισωμάτων. Πλην αυτών, τα Β-λεμφοκύτταρα παίζουν ρόλο και στην κυτταρική ανοσία, μέσω αντιγονοπαρουσίασης, ενώ επίσης παράγουν και προφλεγμονώδεις ή/και αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Κομβικό γεγονός της κυτταρικής ανοσίας είναι η αντιγονοπαρουσίαση στα αβ Τ-λεμφοκύτταρα. Στα μεν CD4⁺ Τ-λεμφοκύτταρα παρουσιάζονται αντιγόνα μέσω μορίων HLA Τάξης II, στα δε CD8⁺ Τ-λεμφοκύτταρα μέσω μορίων HLA Τάξης I. Τα *εκτελεστικά* CD4⁺ Τ-λεμφοκύτταρα, ανάλογα με τις ιντερλευκίνες στις οποίες θα εκτεθούν, μπορούν να εκτραπούν σε μία εκ των τριών ανοσιακών απαντήσεων, Th1, Th2 ή Th17. [151]. Οι δράσεις έκαστου κυτταρικού υποτύπου που συμμετέχει στην ειδική ανοσιακή απάντηση θα εκτεθούν με μεγαλύτερη λεπτομέρεια στην επόμενη ενότητα.

2.2.5γ Κυτταρικοί υπότυποι που εμπλέκονται στην ειδική ανοσία

ι. Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα

Όπως περιγράφηκε ήδη στην παράγραφο 2.1.5, η αντιγονοπαρουσίαση είναι κομβικής σημασίας διεργασία της επίκτητης ανοσιακής απάντησης, που αφορά στην επεξεργασία αντιγόνων και την αναγνώρισή τους από τα Τ-λεμφοκύτταρα, με τη μεσολάβηση των πρωτεϊνών του MHC. Έχει μάλιστα καταδειχθεί στην ΕΑΕ ότι η απομυελίνωση δεν προχωρά χωρίς την ύπαρξη APCs, ακόμα και με την παρουσία ενεργοποιημένων CD4⁺ Τ-λεμφοκυττάρων, αντιδραστικών έναντι μυελίνης

[152,153]. Πιστεύεται ακόμη ότι τα αυτοαντιδραστικά CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται σε δύο φάσεις, μία πρωτογενή στην περιφέρεια και μία δευτερογενή εντός του ΚΝΣ [124]. Τη ‘μερίδα του λέοντος’ της αντιγονοπαρουσίασης εντός του ΚΝΣ φαίνεται να έχουν τα δενδριτικά κύτταρα. Η δράση τους αυτή ξεκινά ήδη από τους περιαγγειακούς χώρους πέριξ του BBB, κατευθύνοντας τη δημιουργία απομυελινωτικών πλακών [154].

Έτερος τύπος APC κυττάρου που αξίζει να μνημονευθεί είναι τα μικρογλοιακά κύτταρα, που βρίσκονται μόνιμα εντός του ΚΝΣ. Βρίσκονται ενεργοποιημένα τόσο σε οξείες πλάκες RRMS, όσο και πιο ασαφώς περιχαράκωμένες περιοχές στους τύπους προοδευτικής ΣκΠ. Οι T κυτταρικές απαντήσεις που επάγονται από τα μικρογλοιακά κύτταρα δεν είναι τόσο ισχυρές, ωστόσο οι δράση τους είναι σημαντική, λόγω των αλλαγών που προκαλούν στο μικροπεριβάλλον του ΚΝΣ, μέσω της χρόνιας ενεργοποίησής τους [155,156]. Τέλος, όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα B-λεμφοκύτταρα δρουν επίσης ως APCs και αυτή η αλληλεπίδραση τους με τα T-λεμφοκύτταρα δεν επηρεάζει μόνο τις ανοσιακές απαντήσεις των τελευταίων, αλλά και τη μετάπτωση των παραγόμενων Ig αντισωματικών υποτάξεων από IgM σε IgG [124]. Πάντως, τα B-λεμφοκύτταρα ως APCs έχουν διττό ρόλο, αναπτύσσοντας άλλοτε προ-φλεγμονώδεις και άλλοτε αντιφλεγμονώδεις δράσεις [157].

ii. Αυτοαντιδραστικά CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα και T- ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Tregs)

Άμεσο αποτέλεσμα της αντιγονοπαρουσίασης στα CD4⁺ αυτοαντιδραστικά εκτελεστικά κύτταρα είναι η πόλωσή τους σε κύτταρα μίας εκ των τριών απαντήσεων Th1, Th2 και Th17, ανάλογα με την έκθεσή τους σε διαφορετικές κάθε φορά ιντερλευκίνες. Βασικά αυτοαντιγόνα – στόχοι που κινητοποιούν τη διαδικασία είναι διάφορες πρωτεΐνες της μυελίνης, όπως η MBP (Myelin Basic Protein), η PLP (ProteoLipid Protein), η MOG(Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) και η MOBP (Myelin-associated Oligodendrocyte Basic Protein) [158-161], άλλα και μη μυελινικοί στόχοι όπως η αΒ κρυσταλλίνη [162] και νευρωνικές πρωτεΐνες, όπως η contactin-2 και η neurofascin [136,137]. Τα πολωμένα κύτταρα έκαστης απάντησης, με τη σειρά τους, παράγουν διαφορετικές κυτταροκίνες. Στην Th1 απάντηση παράγονται προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η Ιντερφερόνη-γ (IFN-γ), σε

αντίθεση με την Th2, όπου κυριαρχεί η παραγωγή των αντιφλεγμονωδών IL-4 και IL-13 [151].

Ο υποπληθυσμός των Th17 CD4⁺ T κυττάρων έχει αναγνωριστεί σχετικά πρόσφατα, και η ανάπτυξη του προϋποθέτει την επαγωγή από την IL-23. Οι βασικές κυτταροκίνες που παράγονται ως απάντηση είναι η IL-17A και η IL-17F [163]. Η Th17 απάντηση είναι ισχυρά προφλεγμονώδης, και διαθέτει κύτταρα με ενισχυμένες ικανότητες διάσπασης του BBB, σε σχέση με τα κύτταρα των άλλων απαντήσεων. Επιπρόσθετα, τα Th17 κύτταρα φαίνεται να διαθέτουν αναβαθμισμένες δυνατότητες αξονικής και νευρωνικής βλάβης στη ΣκΠ [164]. Μελέτες στο πειραματικό μοντέλο της ΕΑΕ υποστηρίζουν ότι στη ΣκΠ η Th1 είναι πολύ πιο ενισχυμένη έναντι της Th2 [151]. Ταυτόχρονα, τα επίπεδα των Th17 κυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΣκΠ σε υποτροπή έχουν καταδειχθεί αυξημένα [165], όπως ενισχυμένη έχει βρεθεί και η έκφραση του γονιδίου της IL-17 στις εστίες ΣκΠ [166].

Ένας ακόμη υποπληθυσμός CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων, ο ρόλος του οποίου πρέπει να μνημονευθεί, είναι τα T-ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs). Τα Tregs εμπλέκονται στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ των Th1, Th2 και Th17 απαντήσεων. Στη ΣκΠ τα Tregs δε διαφέρουν αριθμητικά από εκείνα των υγιών μαρτύρων, είναι πιθανόν ωστόσο να υπολείπονται λειτουργικά [167].

iii. Αυτοαντιδραστικά CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα

Πέρα από τα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα, τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα έχουν επίσης έντονη παρουσία εντός των απομυελινωτικών πλακών. Μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στους νευράξονες μέσω απελευθέρωσης τοξικών κοκκίων, κυτταροκινών όπως ο TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) ή και μέσω απευθείας προσβολής και κατάτμησής τους [131]. Δύνανται ακόμη να επάγουν την απόπτωση και τον κυτταρικό θάνατο ολιγοδενδροκυττάρων, μέσω αλληλεπίδρασης με υποδοχείς επιφανείας Fas, ‘απογυμνώνοντας’ τους νευράξονες, αλλά και να αυξάνουν την αγγειακή διαπερατότητα [147]. Από την άλλη πλευρά, ωστόσο, έχει διαπιστωθεί και κατασταλτική τους δράση επί του πολλαπλασιασμού των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων, μέσω της απελευθέρωσης της τοξικής για αυτά πρωτεΐνης Περφορίνης [147].

iv. B-λεμφοκύτταρα

Ο ρόλος των B-λεμφοκυττάρων στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της ΣκΠ είναι αδιαμφισβήτητος. Επιβεβαιώνεται, καταρχάς, από την παρουσία

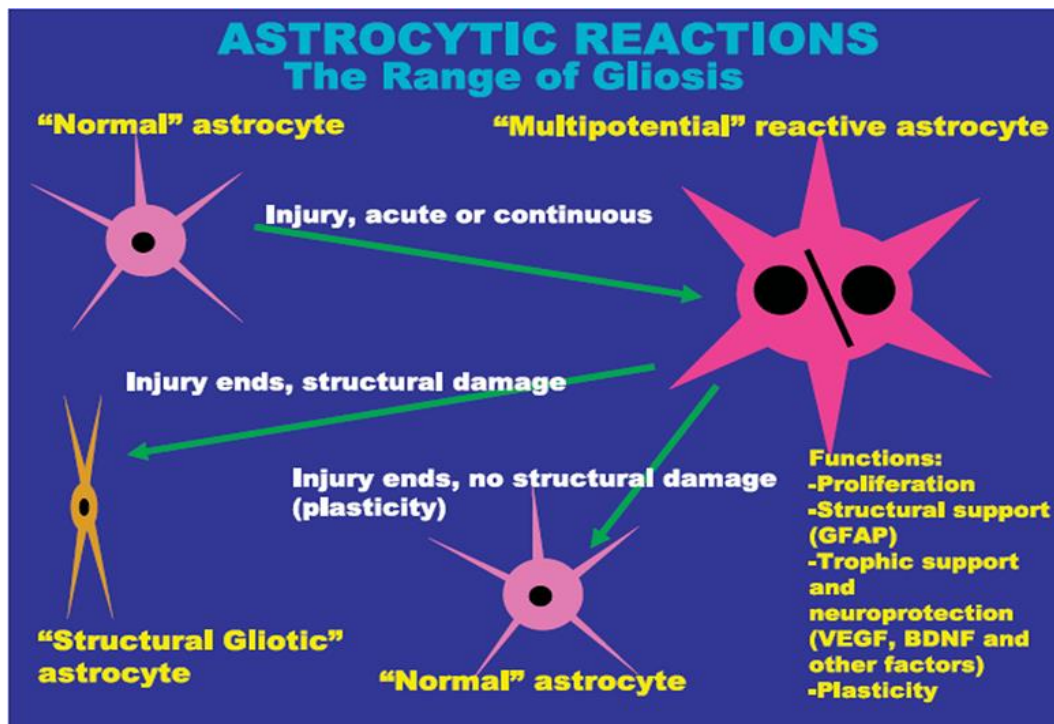
πλασματοκυττάρων, ανοσοσφαιρινών και εναποθέσεων συμπληρώματος στα παθολογοανατομικά παρασκευάσματα των απομυελινωτικών πλακών [168,169]. Αποδεικνύεται, ακόμη, από την ανεύρεση OCBs στο ENY, στο 90% τουλάχιστον των ασθενών που πάσχουν από RRMS [170], με την απουσία τους μάλιστα να αποτελεί δείκτη ηπιότερης νόσου [171]. Θεωρείται ότι οι OCBs παράγονται από κλώνους B-λεμφοκυττάρων που βρίσκονται εντός του ΚΝΣ, σε επικοινωνία με τους χώρους που περιβάλλουν το ENY. Έχει για παράδειγμα διαπιστωθεί η ύπαρξη έκτοπων θυλάκων B-λεμφοκυττάρων στις μήνιγγες ασθενών με SPMS, που ενίοτε βρίσκονται σε άμεση γειτνίαση με φλοιώδεις απομυελινωτικές πλάκες [142], και που θα μπορούσαν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των OCBs. Ένα εξίσου σημαντικό στοιχείο που υποστηρίζει τη σημασία των B-λεμφοκυττάρων στην ΣκΠ, είναι η αποτελεσματικότητα της αντι-CD20 θεραπείας, στον έλεγχο του φλεγμονώδους στοιχείου της νόσου [113,114,172]. Μάλιστα, καθώς τα πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνες δεν φέρουν πλέον CD20, φαίνεται ότι η δράση της αντι-CD20 θεραπείας δεν έχει να κάνει τόσο με την καταστολή της παραγωγής αντισωμάτων, αλλά με τον έλεγχο των άμεσων και έμμεσων δράσεων των B-λεμφοκυττάρων επί των T-λεμφοκυττάρων [170].

Συνολικά, οι λειτουργίες των B-λεμφοκυττάρων στην παθοφυσιολογία της ΣκΠ μπορούν να διακριθούν σε τρεις άξονες. Ο πρώτος άξονας αφορά την αντιγονοπαρουσίαση στα T-λεμφοκύτταρα, όπως έχει ήδη μνημονευθεί πολλάκις, παραπάνω. Ο δεύτερος άξονας αναφέρεται στη χυμική ανοσία, και πιο συγκεκριμένα στην παραγωγή αντισωμάτων έναντι μυελινικών και νευρωνικών στόχων, πρωτεϊνικών και λιπιδικών [173-175]. Τέλος, ο τρίτος άξονας έχει να κάνει με δράσεις διαμεσολαβούμενες από κυτταροκίνες, είτε προφλεγμονώδεις (λεμφοτοξίνη και TNF- α που παράγονται από B-λεμφοκύτταρα μνήμης), είτε αντιφλεγμονώδεις (IL-10 που παράγεται από άωρα B-λεμφοκύτταρα) [176].

2.2.5δ Ο ρόλος των αστροκυττάρων

Τα αστροκύτταρα έχουν ίσως τον πιο παραγνωρισμένο, διαχρονικά, ρόλο στις παθοφυσιολογικές διαδικασίες της ΣκΠ. Πλέον γνωρίζουμε ότι δεν είναι απλά τα κύτταρα που ‘γεμίζουν τα κενά’ στις χρόνιες πλάκες – μαύρες οπές, αλλά ότι εμπλέκονται ενεργά σε διάφορες διαδικασίες, ανάλογα και με τη χρονική φάση της φλεγμονής. Στις οξείες πλάκες τα φυσιολογικά αστροκύτταρα διογκώνονται και υπερ-παράγουν GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) δρώντας καταρχάς υποστηρικτικά

[177]. Επιπρόσθετα, βοηθούν τους επαπειλούμενους νευρώνες με την έκκριση νευροτροφικών και νευροπροστατευτικών παραγόντων, όπως BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) και VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) [177,178]. Έχει μάλιστα ειπωθεί ότι μπορεί να υπάρχει και πιθανός ρόλος τους στην αντιγονοπαρουσίαση [179]. Τα αστροκύτταρα έχουν φυσιολογικά ένα βαθμό πλαστικότητας, ώστε εάν η οξεία φλεγμονή καταπολεμηθεί με επιτυχία, να μπορούν να επανέλθουν στην αρχική μορφολογική και λειτουργική τους κατάσταση. Όταν ωστόσο η φλεγμονή αρχίσει να χρονίζει, τα αστροκύτταρα χάνουν σταδιακά την πλαστικότητά τους, γίνονται πιο δύσκαμπτα και ατροφούν. Τελικά, η παρουσία τους στη γλοιωτική ουλή γίνεται τροχοπέδη για την επαναμυελίνωση και η βλάβη οδηγείται σε μονιμότητα (Εικόνα 11) [120].



Ludwin SK. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006 [120]

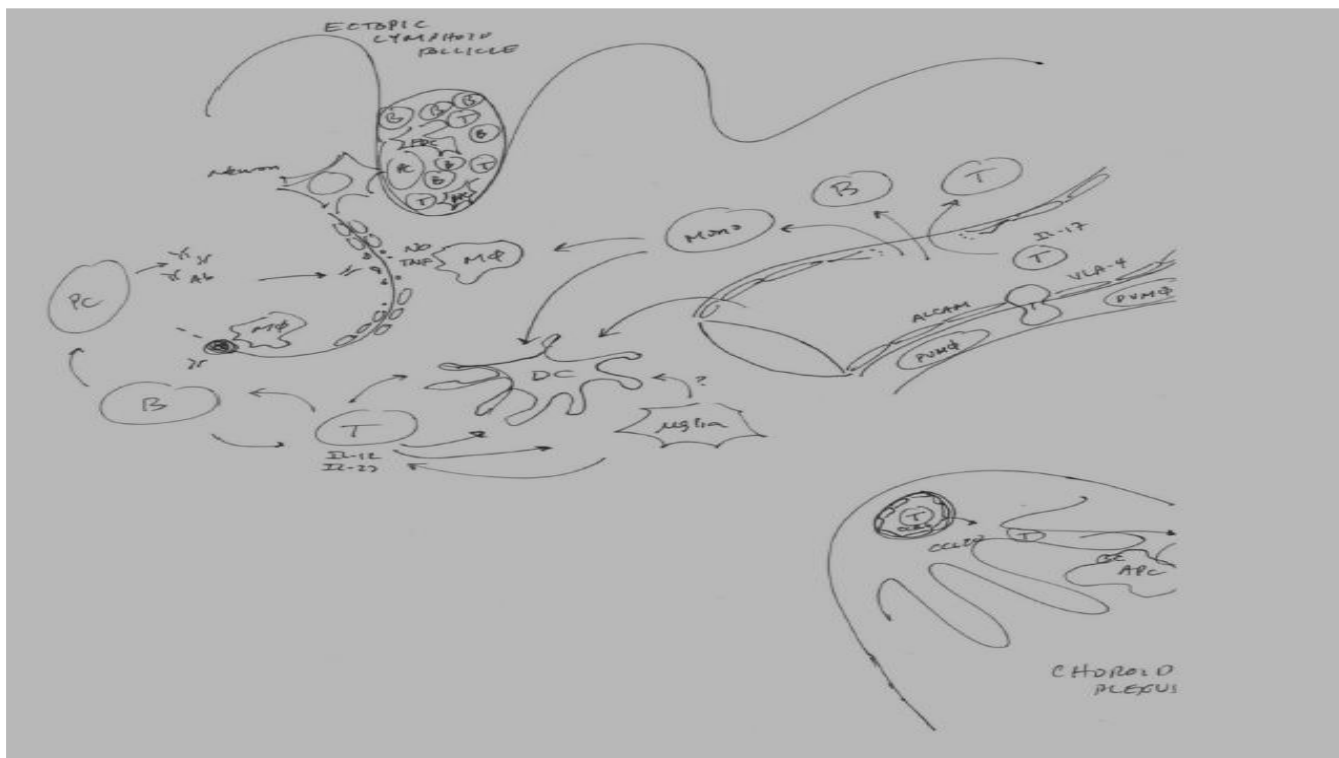
Εικόνα 11

2.2.5ε Αιματοεγκεφαλικός Φραγμός (BBB)

Το ΚΝΣ αντιμετωπιζόταν επί μακρόν ως ένα σύστημα απομονωμένο από το ανοσοποιητικό. Είναι ωστόσο πια σαφές ότι αυτή η απομόνωση δεν είναι πλήρης, και ότι η πρόσβαση των κυττάρων ανοσίας εντός του ΚΝΣ υπόκειται μεν σε περιορισμούς, ακολουθεί δε συγκεκριμένους κανόνες, μοναδικούς για όλον τον

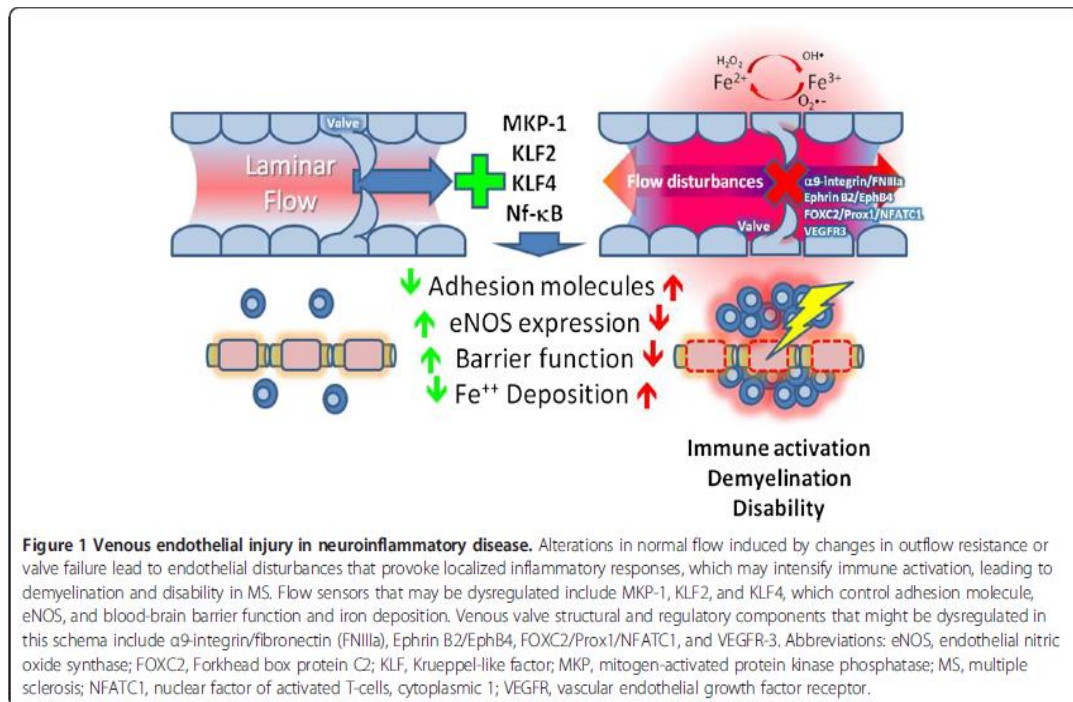
οργανισμό. Βασικός ρυθμιστής αυτής της επικοινωνίας, τόσο στην υγεία όσο και στη νόσο, είναι ο BBB, τα γεγονότα διάσπασης του οποίου έχουν πολύ εύγλωττα χαρακτηριστεί ως ‘ο δούρειος ίππος’ της ΣκΠ.

Φυσιολογικά, ο BBB παρεμποδίζει ενεργητικά τη δίοδο κυττάρων και μακρομοριακών ενώσεων εντός του ΚΝΣ, μέσω στενών ανατομικών συνδέσεων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, τροποποίησης της έκφρασης συγκεκριμένων κυτταρικών μεταφορέων και περιφρούρησης της παρεγχυματικής πλευράς του από απεσταλμένα γι’ αυτό το σκοπό κύτταρα ανοσίας [180]. Στη ΣκΠ, ωστόσο, έχει διαπιστωθεί αυξημένη κυτταρική έκφραση επιφανειακών μορίων προσκόλλησης, όπως είναι τα ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule 1), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1), ALCAM-1 (Activated Leucocyte Cell Adhesion Molecule 1) και η E-selectin, και άλλων συναφούς λειτουργίας μορίων, όπως η Οστεοποντίνη και η MMP-9 (Matrix MetalloProteinase 9) [120,181,182]. Τα προαναφερθέντα μόρια μπορεί να αλληλεπιδρούν με αντίστοιχα μόρια της επιφάνειας των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων, όπως είναι για παράδειγμα οι Ιντεγκρίνες, γεγονός που οδηγεί σε ευκολότερη καθήλωση των κυττάρων αυτών επί του BBB [124]. Η α4 υποομάδα της Ιντεγκρίνης VLA-4 (Very Late Antigen 4), που αναγνωρίζεται από το VCAM-1, αποτελεί μάλιστα το στόχο του μονοκλωνικού αντισώματος Natalizumab (δες και παρ. 2.2.4β).



Ανάλογα, στη ΣκΠ φαίνεται να είναι τροποποιημένη και η έκφραση των χημειοκινών πέριξ του BBB. Οι χημειοκίνες είναι ουσιαστικά κυτταροκίνες που κινητοποιούν και κατευθύνουν τα κύτταρα- στόχους μέσω χημειοταξίας. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ανακατανομή της της CXCL12 (C-X-C motif Ligand 12) στην ενδαυλική πλευρά του BBB, κάτι που φαίνεται να παίζει ρόλο στην εισροή λεμφοκυττάρων εντός του παρεγχύματος [183]. Ακόμη, η αυξημένη διεισδυτική ικανότητα των Th17 CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων έχει αποδοθεί στην αναγνώριση της CCL20 (C-C motif Ligand 20) των χοριοειδών πλεγμάτων από τον CCR6 (C-C Chemokine Receptor 6) υποδοχέα τους [124]. Αξίζει εδώ να αναφερθεί ότι η αυξημένη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν όλα τα παραπάνω μόρια στη ΣκΠ, βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο των κυκλοφορούντων προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών. Ο πολύπλοκος ρόλος των στοιχείων του BBB σκιαγραφείται σχηματικά στην Εικόνα 12 [124].

Η πολυσχιδής εμπλοκή των γεγονότων πέριξ του BBB στην παθοφυσιολογία της ΣκΠ οδήγησε ερευνητές κατά το πρόσφατο παρελθόν στη διατύπωση θεωριών που υποδεικνύουν την απορρύθμιση της λειτουργίας των ενδοθηλιακών κυττάρων, και πιο συγκεκριμένα εκείνων του φλεβικού ενδοθηλίου, ως το γενεσιουργό αίτιο της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, οι εν λόγω θεωρίες βασίζονται στην εντόπιση των απομυελινωτικών βλαβών περιφλεβικά, και όχι περι-αρτηριακά [184]. Επιπρόσθετα υποστηρικτικά στοιχεία προκύπτουν από τις διαπιστωμένες διαφορές μεταξύ φλεβικού και αρτηριακού ενδοθηλίου στην έκφραση μορίων προσκόλλησης και στην απαντήσεις που δύνανται να επάγονται από διάφορες κυτταροκίνες. Για παράδειγμα, TNF- α και λιποπολυσακχαρίτες (lipopolysaccharide - LPS) μπορούν να επάγουν την έκφραση ICAM-1, VCAM-1 και E-selectin στο αρτηριακό και όχι στο φλεβικό ενδοθήλιο [184]. Έτσι, σύμφωνα με την ‘υδροστατική’ θεωρία, πιθανά κωλύματα στη φλεβική παροχέτευση του εγκεφαλικού παρεγχύματος θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε εντοπισμένη φλεγμονώδη απάντηση, που υπό συνθήκες και σε συγκεκριμένο υπόβαθρο αυτοάνοσης προδιάθεσης θα μπορούσε να γενικευθεί (Εικόνα 13) [184]. Φυσικά, η υπερ-απλούστευση των δεδομένων, που οδήγησε σε δοκιμή χειρουργικών επεμβάσεων επί του φλεβικού παροχετευτικού δικτύου ως θεραπεία της ΣκΠ, αποδείχθηκε κάθε άλλο παρά ακίνδυνη, καθώς είχε απογοητευτικά αποτελέσματα [185].



Alexander JS, et al. BMC Med. 2013 [184]

Εικόνα 13

2.2.6 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΠΟΜΥΕΛΙΝΩΤΙΚΩΝ ΠΛΑΚΩΝ

Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά των απομυελινωτικών πλακών διαφέρουν ανάλογα με την ηλικία τους και φυσικά ανάλογα με τη μορφή της νόσου (υποτροπιάζουσα ή προοδευτική) [124]. Οι οξείες - ενεργές πλάκες χαρακτηρίζονται από ασαφή όρια, έντονη διήθηση από λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και μακροφάγα, και από απόπτωση ολιγοδενδροκυττάρων. Τα αστροκύτταρα είναι υπερτροφικά, υπάρχει ποικίλου βαθμού αξονική βλάβη, καθώς και υψηλά επίπεδα έκφρασης μορίων MHC II [124,154,168]. Στις χρόνιες - ανενεργές πλάκες, από την άλλη, παρατηρούνται μειωμένες συγκεντρώσεις φλεγμονωδών κυττάρων, μείωση της αξονικής πυκνότητας και αστροκυτταρικές ουλές [124]. Μία υποξεία - χρονίως ενεργή απομυελινωτική πλάκα διαφέρει στο ότι διατηρεί ανενεργό κέντρο και ενεργό περιφερειακό δακτύλιο [124]. Τέλος, στην περίπτωση της PPMS διαπιστώνονται πολύ πιο ασαφείς και εκτεταμένες περιοχές διατήρησης χαμηλού βαθμού φλεγμονής, με διάχυτη μικρογλοιακή ενεργοποίηση και με την εν γένει εισβολή της παθολογίας εντός της NAWM να είναι πολύ πιο μεγάλη [186].

Ήδη πριν από δεκαπέντε χρόνια περιγράφηκαν τέσσερα διακριτά ιστολογικά πρότυπα απομυελινωτικών πλακών, ανάλογα με το βαθμό παρουσίας της χυμικής και

κυτταρικής ανοσίας, την τοπογραφία και τη διαπιστούμενη παθολογία των ολιγοδενδροκυττάρων (Πίνακας 4: μετάφραση από το αρχικό) [169]. Διατυπώθηκε μάλιστα η άποψη, βασισμένη σε δεδομένα βιοψιών, πως κάθε ασθενής μπορεί να παρουσιάζει ένα μόνο τύπο βλαβών [169]. Η θεωρία αυτή αντιμετώπισε ισχυρό αντίλογο από μελέτη των Barnett και Prineas, που βασίστηκε σε διαδοχικές βιοψίες πλακών, επί του ίδιου ασθενή, όπου φάνηκε ότι το ακολουθούμενο ιστολογικό πρότυπο ήταν διαφορετικό σε διαφορετικές χρονικές στιγμές [187].

Πρότυπο I	Φλεγμονώδεις διηθήσεις (ενεργή πλάκα): Διηθήσεις T-λεμφοκυττάρων, μακροφάγων και ενεργοποιημένων μικρογλοιακών κυττάρων Απομυελίνωση: Περιφλεβική φλεγμονή με σαφή όρια Ολιγοδεντροκύτταρα: Διάσωση σχετικά μεγάλου αριθμού Επαναμυελίνωση (ανενεργή πλάκα): Σκαιώδεις πλάκες
Πρότυπο II	Φλεγμονώδεις διηθήσεις (ενεργή πλάκα): Διηθήσεις T-λεμφοκυττάρων, μακροφάγων ενεργοποιημένων μικρογλοιακών κυττάρων και πλασματοκυττάρων. Ύπαρξη αντισωμάτων και συστατικών του συμπληρώματος Απομυελίνωση: Περιφλεβική φλεγμονή με σαφή όρια Ολιγοδεντροκύτταρα: Διάσωση σχετικά μεγάλου αριθμού Επαναμυελίνωση (ανενεργή πλάκα): Σκαιώδεις πλάκες
Πρότυπο III	Φλεγμονώδεις διηθήσεις (ενεργή πλάκα): Διηθήσεις T-λεμφοκυττάρων, μακροφάγων και ενεργοποιημένων μικρογλοιακών κυττάρων Απομυελίνωση: Ασαφή όρια και όχι περιφλεβική. Συγκεντρικές ταινιοειδείς περιοχές στην περιφέρεια της πλάκας Ολιγοδεντροκύτταρα: Σημαντική απόπτωση Επαναμυελίνωση (ανενεργή πλάκα): -
Πρότυπο IV	Φλεγμονώδεις διηθήσεις (ενεργή πλάκα): Διηθήσεις T-λεμφοκυττάρων, μακροφάγων και ενεργοποιημένων μικρογλοιακών κυττάρων Απομυελίνωση: Περιφλεβική ή μη, φλεγμονή με σαφή όρια Ολιγοδεντροκύτταρα: Απώλεια σημαντικού αριθμού χωρίς σημάδια απόπτωσης Επαναμυελίνωση (ανενεργή πλάκα): -

Lucchinetti CF, et al. Ann Neurol. 2004 [169, μετάφραση από το αρχικό]

Πίνακας 4

2.2.7 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΙ - ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΚΠ

2.2.7α Γενετικοί Παράγοντες

Δες την παράγραφο 2.1.7α

2.2.7β Περιβαλλοντικοί Μη Λοιμογόνοι Παράγοντες

Τόσο ο επιπολασμός, όσο και η επίπτωση της ΣκΠ, εμφανίζουν ισχυρή συσχέτιση με το γεωγραφικό πλάτος μίας χώρας ή περιοχής, με την απόστασή της δηλαδή από τον ισημερινό [88,188,189]. Η απλούστερη εξήγηση για αυτήν την εδραιωμένη διαπίστωση είναι η αιτιολογική σύνδεση της νόσου με τα επίπεδα έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία, και κατ' αναλογία με τα επίπεδα της ενδογενώς παραγόμενης Βιταμίνης D με τη βοήθεια του UVB (UltraViolet B) κλάσματος αυτής. Ο προστατευτικός ρόλος της εν λόγω Βιταμίνης στην εκδήλωση της νόσου είναι αποτέλεσμα πολλαπλών ετερογενών δράσεων της στον οργανισμό, άλλων ανεξάρτητων και άλλων εξαρτώμενων από το γονιδίωμα, όπως θα αναλυθεί παρακάτω στην παρ. 2.2.7γ. Η θεραπευτική μάλιστα χρήση της Βιταμίνης D στη ΣκΠ είναι αντικείμενο αρκετών κλινικών μελετών σε εξέλιξη, ενώ συστήνεται από τους περισσότερους συγγραφείς η πρόσληψη έως και 4000 IU ημερησίως [190].

Έτερος περιβαλλοντικός παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης ΣκΠ που έχει ταυτοποιηθεί είναι το κάπνισμα [12], και μάλιστα η επίδρασή του φαίνεται να ακολουθεί δοσοεξαρτώμενο πρότυπο [Odds Ratio (OR) 1.2 – 1.8] [7]. Έχει ακόμα διαπιστωθεί σε πολυεθνική μελέτη ότι η συνεργική δράση του καπνίσματος και της φορείας *HLA-DRB1*15*, σε συνδυασμό με την απουσία του προστατευτικού *HLA-A*02* δύναται να αυξήσει τον κίνδυνο για ΣκΠ έως και 13 φορές σε σχέση με μη καπνιστές, που έχουν διαφορετικό γενετικό profil [191,192]. Ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου, συνεργικός ωστόσο με το κάπνισμα και το προαναφερθέν γενετικό υπόβαθρο, έχει πρόσφατα περιγραφεί και η έκθεση σε οργανικούς διαλύτες [13]. Έχουν επίσης αναφερθεί σχέσεις του καπνίσματος με τον κίνδυνο μετάπτωσης σε SPMS και την ταχύτητα προόδου της αναπηρίας [12]. Η τελευταία αυτή παρατήρηση μπορεί να οφείλεται στις αγγειακές βλάβες των καπνιστών ασθενών, που κάνουν τα πράγματα χειρότερα για το επιβαρυνόμενο τους ΚΝΣ [193].

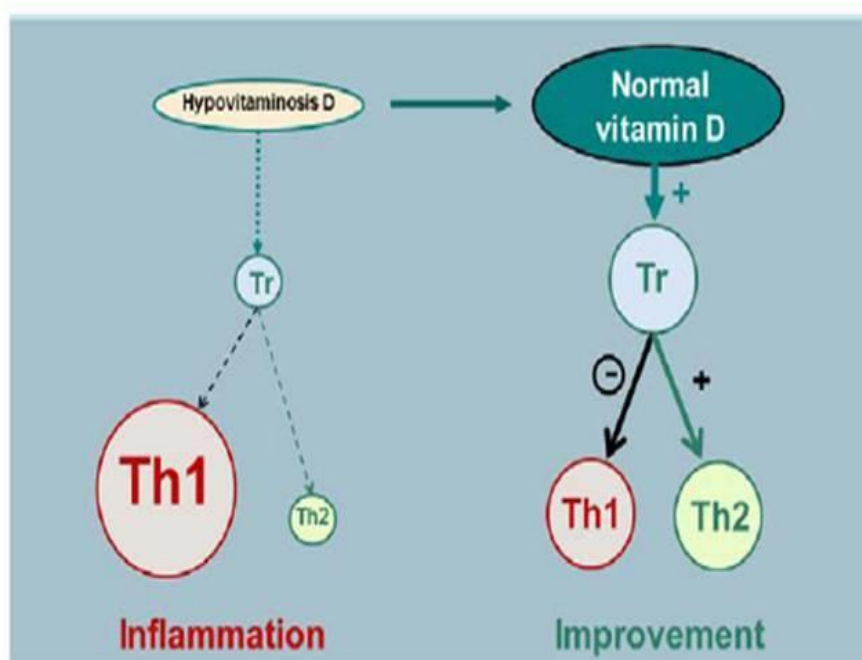
Μελέτες σε πληθυσμούς με ΣκΠ παιδικής έναρξης έχουν αναγνωρίσει την παιδική παχυσαρκία, ειδικά των εφήβων κοριτσιών, ως έναν ακόμη παράγοντα κινδύνου για εκδήλωση της νόσου [194]. Πέρα από την παιδική παχυσαρκία, ο αυξημένος δείκτης μάζας σώματος των μητέρων, καθώς και ο διαβήτης κύησης, προδιαθέτουν ενδεχομένως στη μελλοντική εμφάνιση ΣκΠ από τα τέκνα τους [195]. Η περίοδος της εγκυμοσύνης βεβαίως για τις ίδιες τις ασθενείς παρέχει σχετική προστασία έναντι των υποτροπών της πάθησης, σε αντίθεση με τη λοχεία,

υποδηλώνοντας και ένα ρόλο των ορμονολογικών διακυμάνσεων, τουλάχιστον στο επίπεδο της ενεργοποίησης της ΣκΠ [196].

2.2.7γ Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της Βιταμίνης D

Ο βασικός και συνάμα πολυσχιδής ρόλος της Βιταμίνης D στις φλεγμονώδεις διαδικασίες καθίσταται προφανής αν αναλογιστεί κανείς την παρουσία υποδοχέων της (Vitamin D Receptors – VDRs) στην επιφάνεια όλων σχεδόν των κυττάρων του οργανισμού [11]. Πιο συγκεκριμένα, VDRs έχουν εντοπιστεί τόσο σε κύτταρα ανοσίας, όπως μακροφάγα, μονοκύτταρα, δενδριτικά, NK- κύτταρα, B- και T- λεμφοκύτταρα, όσο και σε κύτταρα του Νευρικού Συστήματος, όπως ολιγοδενδροκύτταρα και αστροκύτταρα [11,197-200]. Ένα μέρος των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της είναι αποτέλεσμα ρυθμιστικών δράσεων επί των κυτταροκινών, όπως για παράδειγμα καταστολή της παραγωγής IL-6 και IL-17 και επαγωγή της IL-10 [201].

Επιπρόσθετα, η Βιταμίνη φαίνεται να επηρεάζει απευθείας τη διαφοροποίηση και μετανάστευση κυττάρων φυσικής ανοσίας (μονοκυττάρων, μακροφάγων, δενδριτικών) , και την ισορροπία μεταξύ των Th1 και Th2 εκτελεστικών απαντήσεων της ειδικής ανοσίας, μέσω επιδράσεων επί των Tregs (Εικόνα 14) [11]. Έχει μάλιστα

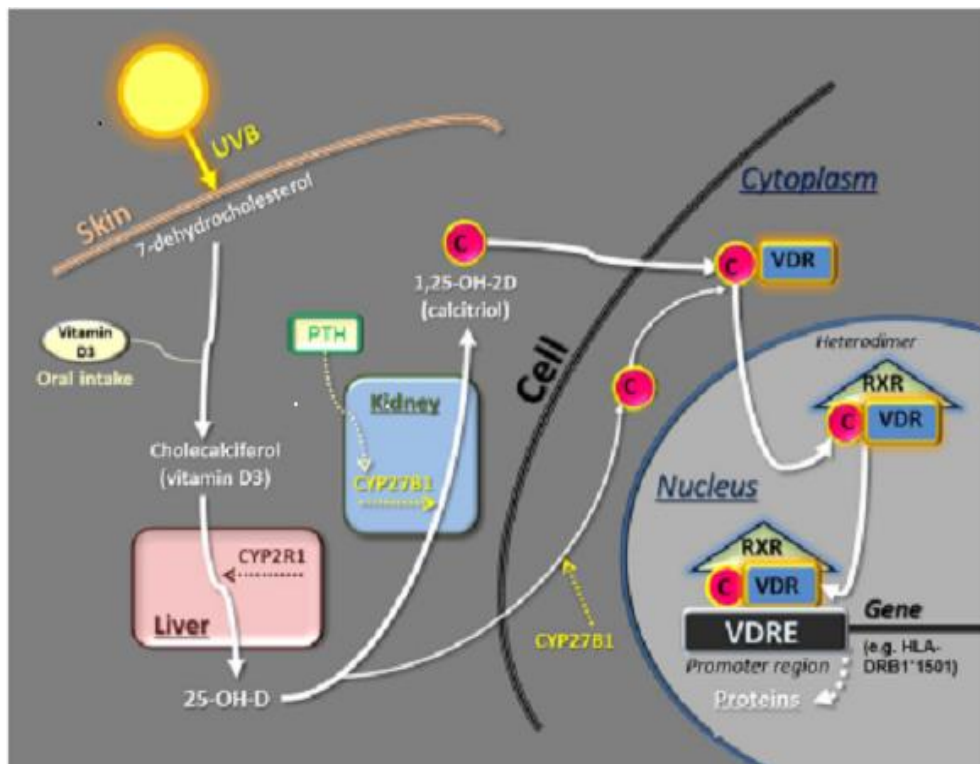


Pierrot-Deseilligny C & Souberbielle JC. Ther Adv Neurol Disord 2013 [11]

Εικόνα 14

διαπιστωθεί συνεργικό μονοπάτι της Καλσιτριόλης [1,25(OH)₂ Vit-D] με τη 17-β Οιστραδιόλη που ισχυροποιεί τους ανωτέρω ρυθμιστικούς μηχανισμούς, γεγονός που εξηγεί εν μέρει την πιο ισχυρή επίδραση των επιπέδων Βιταμίνης D στις γυναίκες ασθενείς [202]. Για την περίπτωση των ολιγοδενδροκυττάρων, τόσο του εγκεφάλου όσο και του νωτιαίου μυελού, έχει διατυπωθεί η θεωρία της πρώιμης επιρροής της Βιταμίνης D στην ωρίμανση και κυτταρική προσκόλλησή τους [203]. Ενδεχόμενη μειωμένη έκθεση στη Βιταμίνη σε παιδική ηλικία, θα μπορούσε να οδηγήσει μελλοντικά σε ισχυρότερους μηχανισμούς απόπτωσης με πιο ‘ευάλωτα’ ολιγοδενδροκύτταρα στις επιθέσεις της ΣκΠ.

Εκτός από τα παραπάνω, ανεξάρτητα του γονιδιώματος, σημεία παρέμβασης της Βιταμίνης D στην παθοφυσιολογία της ΣκΠ, έχει πρόσφατα περιγραφεί και ρυθμιστικός μηχανισμός επί του γενετικού υποβάθρου της νόσου. Ειδικότερα, αναλύσεις αλληλουχίων στην περιοχή κωδικοποίησης των HLA Τάξης II έχουν αποδείξει την ύπαρξη ενός στοιχείου απάντησης στη Βιταμίνη D (Vitamin D Response Element – VDRE), στην περιοχή εκκίνησης του HLA-DRB1 (Εικόνα 15) [11]. Διαπιστώθηκε μάλιστα ότι το εν λόγω στοιχείο έχει διατηρηθεί σταθερό, χωρίς



Pierrot-Deseilligny C & Souberbielle JC. Ther Adv Neurol Disord 2013 [11]

Εικόνα 15

μεταλλάξεις, σε πολύ υψηλό ποσοστό, στην περιοχή εκκίνησης του σχετιζόμενου με τη ΣκΠ *HLA-DRB1*15* αλληλίου, σε αντίθεση με ότι συμβαίνει με αλληλία μη σχετιζόμενα με τη νόσο [10]. VDRE έχουν βρεθεί και στις περιοχές εκκίνησης άλλων γονιδίων, και η σύνδεσή τους με τη Βιταμίνη D οδηγεί σε διαφορετικά, κατά περίπτωση, αποτελέσματα. Στην περίπτωση του *DRB1*15*, η αλληλεπίδραση Βιταμίνης και VDRE οδηγεί σε αυξημένη έκφραση. Υποθετικά, μειωμένα επίπεδα Βιταμίνης D σε παιδική ηλικία, θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μειωμένη αντιπροσώπευση του αλληλίου στον εκπαιδευόμενο θύμο, με συνεπακόλουθα μελλοντικά φαινόμενα μειωμένης ανοχής [204].

2.2.7δ Λοιμογόνοι Παράγοντες

Κατά τη διάρκεια των πολλών χρόνων έρευνας με αντικείμενο της ανοσοπαθογένεια της ΣκΠ έχουν διατυπωθεί θεωρίες συσχέτισης με πολλούς διαφορετικούς λοιμογόνους παράγοντες, όπως ο EBV (Epstein Barr Virus) [205], διάφοροι Ερπητοϊοί [206], διάφορα Χλαμύδια [207] ή και στοιχεία της εντερικής χλωρίδας [208] (Πίνακας 5) [8]. Πλην ελαχίστων εξαιρέσεων, όπου η συσχέτιση είναι αδιαμφισβήτητη, τα διαχρονικά δεδομένα για τη σημασία των περισσότερων από αυτές τις λοιμώξεις στη ΣκΠ είναι αντικρουόμενα.

Virus	Virus + MS cases (%)	Virus + controls (%)	P value	OR
Adults with MS				
EBV [†]	1741/1749 (99.5)	2267/2406 (94.2)	<10 ⁻²³	13.3
HSV [‡]	507/666 (76.1)	997/1287 (77.4)	ns	0.93
HSV1 [‡]	109/138 (79.0)	159/205 (77.6)	ns	1.09
HSV2 [‡]	40/138 (29.0)	29/205 (14.1)	<0.01	2.5
VZV [‡]	516/637 (81.0)	1004/1179 (85.2)	ns	0.74
CMV [‡]	312/693 (45.0)	447/854 (52.3)	ns	0.74
Measles [‡]	661/749 (88.3)	1309/1609 (81.4)	ns	1.72
Mumps [‡]	224/386 (58.0)	305/524 (58.2)	ns	0.99
Rubella [‡]	226/235 (96.2)	299/307 (97.4)	ns	0.67
<i>Chlamydia pneumoniae</i> [§]	85/129 (65.9)	160/258 (62.0)	ns	1.18
Children with MS				
EBV [†]	145/147 (98.6)	106/147 (72.1)	<0.001	27.3
HSV 1/2	68/133 (51.0)	7/152 (46.7)	ns	1.19
HSV 2 [‡]	65/149 (43.5)	7/152 (36.2)	<0.0001	1.36
VZV [‡]	88/99 (88.4)	147/152 (96.7)	<0.0001	0.26
Measles [‡]	70/82 (85.6)	122/152 (80.1)	<0.0001	0.65
Mumps [‡]	74/90 (82.0)	7/152 (73.0)	ns	1.68
Rubella [‡]	101/122 (82.5)	123/152 (80.9)	ns	1.11
HHV8 [‡]	126/132 (95.6)	144/152 (94.7)	ns	1.22
Adenovirus [‡]	8/127 (6.3)	20/152 (13.2)	ns	0.44
Influenza A [‡]	24/127 (18.9)	15/152 (9.9)	<0.05	2.12
Parainfluenza 2 [‡]	27/123 (22.0)	30/152 (19.7)	<0.05	1.15

*Epstein-Barr Virus (EBV); Herpes Simplex Virus (HSV); Varicella-Zoster Virus (VZV); Human Herpes Virus (HHV).
[†]Data from Table 1.
[‡]Data from Aschiero et al.⁶².
[§]Data from Munger, et al.⁷⁹.
[‡]Data from Krone, et al.⁷⁷ This is data from children with MS. A (?) appears when the numbers provided do not make sense completely. Data on EBV are partly derived from Pohl, et al.⁷⁶.

Η περίπτωση του EBV είναι ίσως η χαρακτηριστικότερη από τις εξαιρέσεις, όπου όλα τα δεδομένα συγκλίνουν σχεδόν ομόφωνα υπέρ μίας ξεκάθαρης σχέσης με τη ΣκΠ. Πρόκειται για έναν DNA ιό διπλής έλικας που προσβάλλει πολύ συχνά το γενικό πληθυσμό σε ποσοστό που κυμαίνεται περί το 90% [8]. Η λοίμωξη συμβαίνει συχνά κατά τη παιδική ηλικία ή και κατά την εφηβεία και μπορεί να είναι είτε ασυμπτωματική, είτε να παράγει το κλινικό σύνδρομο της λοιμώδους μονοπυρήνωσης. Ο ιός αρχικά στοχεύει στα επιθηλιακά κύτταρα του ρινοφάρυγγα, στη συνέχεια όμως προσβάλλει τα Β-λεμφοκύτταρα, που γίνονται μετέπειτα και το βασικό 'ορμητήριο' της χρόνιας λανθάνουσας λοίμωξης. Παρά το υψηλό προαναφερθέν ποσοστό προσβολής του γενικού πληθυσμού από τον EBV, φαίνεται ότι τα ποσοστά προηγούμενης λοίμωξης από τον ιό των ασθενών με ΣκΠ είναι ακόμα υψηλότερα και προσεγγίζουν το 100%, ξεπερνώντας κατά πολύ τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας στις διάφορες μελέτες (Πίνακας 6). [8]. Τα αντισώματα έναντι των EBV αντιγόνων είναι σχεδόν κατά κανόνα IgG και όχι IgM, γεγονός που υποδηλώνει ότι η λοίμωξη συμβαίνει πολύ καιρό πριν την κλινική έναρξη της νόσου [209-211]. Από την άλλη πλευρά, φαίνεται ότι λιγότεροι από 1 στους 900 ανθρώπους που θα προσβληθούν από EBV θα αναπτύξουν ΣκΠ [8].

Table 1 Prevalence of antibodies to Epstein-Barr virus (EBV) in the sera of patients and controls

Study	EBV + MS cases (%)	EBV + controls (%)	P value
Sumaya (1980) ^{66,*}	155/157 (98.7)	76/81 (93.8)	0.05
Blay, (1983) ^{67,*}	309/313 (98.7)	363/406 (89.4)	0.0001
Larson (1984) ^{68,*}	93/93 (100)	78/93 (83.9)	0.0001
Sumaya, 1985 ^{69,†}	104/104 (100)	23/26 (88.5)	0.007
Shirodaria (1987) ^{70,‡}	26/26 (100)	24/26 (92.3)	—
Munch (1998) ^{71,§}	137/138 (99.3)	124/138 (89.9)	0.0004
Myhr (1998) ^{72,†}	144/144 (100)	162/170 (95.3)	0.008
Wagner (2000) ^{73,§}	107/107 (100)	153/163 (93.9)	0.01
Ascherio (2001) ^{74,¶}	143/144 (99.3)	269/287 (93.7)	0.008
Sundström, 2004 ⁵⁸	234/234 (100)	693/702 (98.7)	ns
Haahr (2004) ^{74,§}	153/153 (100)	50/53 (94.3)	0.05
Ponsonby (2005) ^{77,‡}	136/136 (100)	252/261 (96.6)	0.05
Total	1741/1749 (99.5)	2267/2406 (94.2)	<10 ⁻²³

*Study measured antibodies only against VCA.

†Study measured antibodies against the Epstein-Barr nuclear antigens (EBNA), the viral capsid antigen (VCA), and the early antigens (EA).

‡Study measured antibodies only against EBNA and VCA.

§Study measured antibodies only against EBNA and EA.

¶Study measured antibodies only against EBNA and VCA. One person was antibody negative to each antigen but it is unclear from the text whether they were the same person. The review by Haahr in 2006 (74) suggests they were not.

Goodin DS. Clin Exp Neuroimmunol 2015 [8]

Πίνακας 6

Συμπερασματικά, η παρελθούσα EBV λοίμωξη μοιάζει να είναι αναγκαία, αλλά όχι επαρκής συνθήκη για τη μελλοντική εκδήλωση της νόσου. Κάπου εδώ αξίζει να γίνει μνεία στις ενδεχόμενες συνεργικές δράσεις μεταξύ EBV και συγκεκριμένων γενετικών πολυμορφισμών στην εκκίνηση του παθοφυσιολογικού μονοπατιού που οδηγεί σε ΣκΠ [6,26].

Οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους οι λοιμογόνοι παράγοντες εκτρέπουν το ανοσοποιητικό σύστημα προς την εκδήλωση ΣκΠ είναι πολλοί. Η επικρατέστερη θεωρία της **μοριακής μίμησης** βασίζεται στο ότι κάποια αντιγόνα του εαυτού παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντίδραση με έτερα αντιγόνα ιών ή μικροβίων στη δέσμευση μορίων του MHC, λόγω δομικής συγγένειας [212,213]. Επίσης, η χρόνια ιογενής λοίμωξη κυττάρων, ειδικά του νευρικού συστήματος, μπορεί να φέρει στην επιφάνεια νέους επιτόπους – στόχους, καθιστώντας τους αντιγονικά ορατούς, με το φαινόμενο της **επιτοπικής διασποράς** [214-216]. Συναφής είναι και η περίπτωση της αΒ κρυσταλλίνης, μίας ενδοκυττάριας πρωτεΐνης που εξωτερικεύεται σε συνθήκες stress και κυτταρικής λύσης, και η οποία μπορεί να εκφράζεται και από ολιγοδενδροκύτταρα και από αστροκύτταρα [162, 217]. Έτερη διαδικασία με την οποία μη αντιγονικές πρωτεΐνες καθίστανται ορατές σε συνθήκες λοιμώδους stress (**οψωνοποίηση**), εμπλέκει τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (μεθυλίωση, φωσφορυλίωση κλπ) [218]. Τέλος, κάποιοι λοιμογόνοι παράγοντες μπορούν να ενεργοποιούν τα γδ T-λεμφοκύτταρα απευθείας με τη βοήθεια **υπερ-αντιγόνων**, χωρίς τη μεσολάβηση δηλαδή αντιγονοπαρουσίασης [150].

2.2.7ε Θεωρία τριών χρονικών σημείων αλληλεπίδρασης γονιδιώματος - περιβάλλοντος

Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η εκδήλωση της ΣκΠ είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του γενετικού υποβάθρου με κάποιον/κάποιους από τους παραπάνω περιβαλλοντικούς παράγοντες σε τρία διαφορετικά χρονικά σημεία: κοντά στη γέννηση, κοντά στην εφηβεία και κατά την ενήλικη ζωή [8]. Η σημασία των περιγεννητικών γεγονότων αλληλεπίδρασης υποστηρίζεται περαιτέρω από τα αποτελέσματα τριών τύπων επιδημιολογικών μελετών. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες σύγκρισης της συχνότητας νόσου μεταξύ διζυγωτικών διδύμων και μη διδύμων αμφιθαλών αδελφών έχουν δείξει στατιστικά σημαντική υπεροχή της πρώτης ομάδας, κάτι που παραπέμπει σε *in utero* επιδράσεις [219]. Ακόμη, μελέτες μήνα γέννησης ασθενών του βορείου ημισφαιρίου αποκαλύπτουν διακύμανση συχνότητας με

μέγιστη αύξηση για το Μάιο – Ιούνιο και μέγιστη μείωση για το Νοέμβριο, ενώ στους ασθενείς του νοτίου ημισφαιρίου οι συχνότητες αυτές αντιστρέφονται [220-223]. Η παρατήρηση αυτή έχει ερμηνευθεί ως αποτέλεσμα του βαθμού έκθεσης των μητέρων τον ασθενών στην ηλιακή ακτινοβολία κατά την εγκυμοσύνη, ανάλογα με τον τόπο διαμονής [220-223]. Τέλος, μελέτες ετεροθαλών αδελφών έχουν καταδείξει υπεροχή από πλευράς συχνότητας των μητέρων, ως κοινού γονέα, που θα μπορούσε να αποδίδεται σε περιγεννητικές περιβαλλοντικές επιδράσεις [224]. Ως επικρατέστερος περιβαλλοντικός παράγοντας σε αυτό το χρονικό σημείο αλληλεπίδρασης προβάλλει η Βιταμίνη D και δευτερευόντως οι ενδομήτριες λοιμώξεις.

Η σημασία των γεγονότων περίξ ή προ της εφηβείας υποστηρίζεται από επιδημιολογικές μελέτες μετανάστευσης ασθενών. Σύμφωνα με αυτές, μετανάστευση προ της εφηβείας οδηγεί σε μετέπειτα κίνδυνο ανάπτυξης νόσου με συχνότητα όμοια με εκείνη της χώρας προορισμού. Αντίθετα, σε περίπτωση μετανάστευσης μετά την εφηβεία, η συχνότητα παραμένει ίδια με εκείνη της χώρας προέλευσης [225-228]. Πιθανοί περιβαλλοντικοί παράγοντες που παίζουν ρόλο σε αυτές τις διαπιστώσεις είναι και πάλι η Βιταμίνη D, αλλά και οι διάφορες λοιμώξεις. Κλείνοντας, θεωρείται ότι μία τρίτη περιβαλλοντική επίδραση πρέπει να συμβαίνει κατά την ενήλικη ζωή, κοντά στην ηλικία της κλινικής εκδήλωσης της νόσου. Οι υπεύθυνοι περιβαλλοντικοί παράγοντες αυτής της χρονικής φάσης είναι λίγο ως πολύ αταυτοποιήτοι. Οποιοδήποτε σωματικό stress ωστόσο, όπως κάποια λοίμωξη, τοξικότητα ή και το κάπνισμα θα μπορούσε να δράσει ως πυροδοτικός μηχανισμός σε αυτό το σημείο [8].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

3.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η ένταξη και αξιολόγηση των συμμετεχόντων ασθενών στη διδακτορική διατριβή έγινε κατά τη χρονική περίοδο ‘Μάρτιος 2013 – Μάρτιος 2018’, πρωτίστως στο χώρο των Ειδικών Ιατρικών Απομυελινωτικών Νοσημάτων του Αιγινήτειου Νοσοκομείου, κάτω από την επίβλεψη της υπεύθυνης της διατριβής Επίκουρης Καθηγήτριας Νευρολογίας κας Μαρίας Αναγνωστούλη, και δευτερευόντως στο Τμήμα Απομυελινωτικών Νοσημάτων της 1^{ης} Παν/κής Νευρολογικής Κλινικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), στο Αιγινήτειο Νοσοκομείο. Ως απαραίτητο κριτήριο ένταξης, οι ασθενείς έπρεπε να έχουν διάγνωση βέβαιας ΣκΠ (CDMS), σύμφωνα με τα κριτήρια McDonald 2010 [99]. Καθώς η πρόσφατη αναθεώρηση των εν λόγω κριτηρίων δημοσιεύθηκε προ της ολοκλήρωσης της διατριβής, να σημειωθεί ότι η διάγνωση της CDMS στο σύνολο των συμμετεχόντων στη μελέτη επιβεβαιώθηκε από τους ερευνητές και μετά από την εφαρμογή των αναθεωρημένων κριτηρίων του 2017 [100], σε μεταγενέστερο στάδιο. Έτερο κριτήριο ένταξης στη μελέτη ήταν η Ελληνική καταγωγή των συμμετεχόντων ασθενών. Να επισημανθεί ότι στο τελικό διαμορφωθέν δείγμα συμμετείχαν ασθενείς από όλα τα γεωγραφικά διαμερίσματα της Ελλάδας, καθώς η 1^η Παν/κή Νευρολογική Κλινική του Αιγινήτειου Νοσοκομείου είναι το μεγαλύτερο κέντρο προσέλευσης αλλά και παραπομπής ασθενών με ΣκΠ στη χώρα, και έτσι οι ασθενείς που προσέρχονται ή παραπέμπονται σε αυτήν έχουν ικανοποιητική διασπορά ως προς τον τόπο καταγωγής τους.

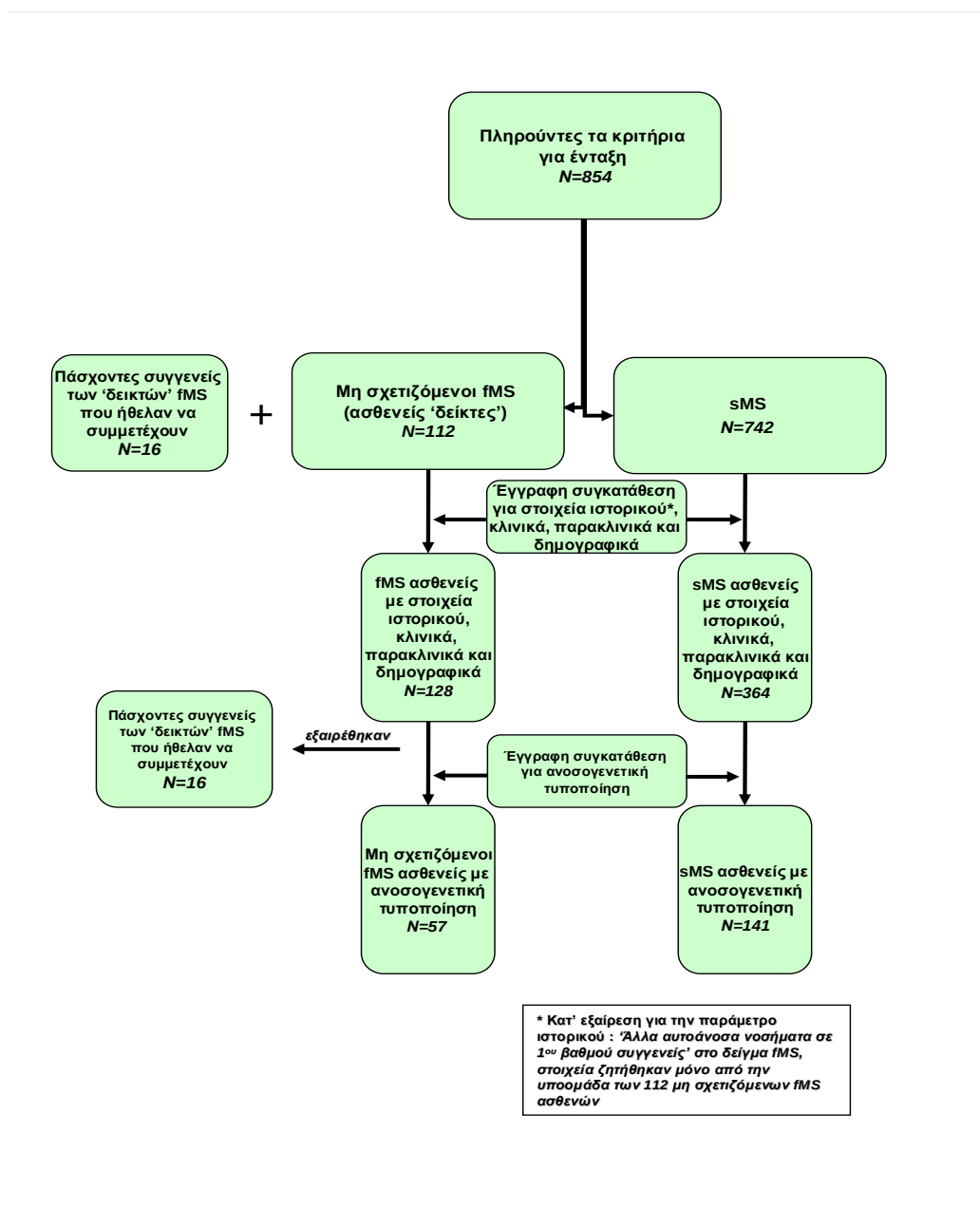
Μετά την ενημέρωση έκαστου συμμετέχοντα για τους σκοπούς της μελέτης και τη λήψη συγκατάθεσης (δείτε αναλυτικά την παρ. 3.2) ακολουθούσε η συλλογή δημογραφικών στοιχείων και στοιχείων ατομικού και οικογενειακού ιστορικού [τρέχουσα ηλικία, φύλο, ηλικία έναρξης νόσου, τύπος νόσου, πρώτα συμπτώματα νόσου, αριθμός υποτροπών, ετησιοποιημένος ρυθμός υποτροπών (Annualized Relapse Rate (ARR), συνοδά αυτοάνοσα νοσήματα, λαμβανόμενη φαρμακευτική αγωγή, άλλα μέλη της οικογένειας που ενδεχομένως νοσούν από ΣκΠ και βαθμός

συγγένειας με αυτά, άλλα αυτοάνοσα νοσήματα σε 1^{ου} βαθμού συγγενείς]. Επόμενο βήμα την ημέρα της ένταξης του κάθε ασθενή ήταν η κλινική του αξιολόγηση και εκτίμηση του υπάρχοντα βαθμού αναπηρίας, με την εφαρμογή της κλίμακας EDSS [90]. Με βάση τη γενική υπολογισθείσα τιμή στην υπόψη κλίμακα και τη διάρκεια νόσου ήταν στη συνέχεια δυνατό για τον κάθε ασθενή να εκτιμηθεί ο ρυθμός προόδου αναπηρίας (EDSS Progression Rate).

Στη συνέχεια, σειρά είχε η συλλογή των παρακλινικών δεδομένων της μελέτης. Πιο συγκεκριμένα κρατούνταν στοιχεία ως προς την παρουσία ή απουσία ολιγοκλωνικών ζωνών (OCBs) στο ENY, όπου αυτό ήταν γνωστό, καθώς και πληροφορίες νευροαπεικόνισης, όπου αυτές ήταν δυνατό να αντληθούν από τις ήδη υπάρχουσες MRI εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού. Να διευκρινισθεί ότι τα εν λόγω νευροαπεικονιστικά στοιχεία γινόνταν αποδεκτά μόνο εφόσον οι MRI είχαν γίνει τον τελευταίο χρόνο προς της αξιολόγησης των ασθενών. Σε κάθε άλλη περίπτωση προτεινόταν η διενέργεια των απαιτούμενων επιθυμητών εξετάσεων, στο αμέσως επόμενο χρονικό διάστημα και προσκόμιση των αποτελεσμάτων σε μία μεταγενέστερη επίσκεψη, ωστόσο αυτό δεν ήταν για όλους τους συμμετέχοντες ασθενείς εφικτό, για οικονομικούς κυρίως λόγους. Τα MRI στοιχεία που τελικά αξιοποιήθηκαν είχαν να κάνουν με την ποιοτική, και όχι ποσοτική, κατανομή απομυελινωτικών βλαβών στις ακόλουθες περιοχές του ΚΝΣ: περικοιλιακές εγκεφάλου, υποφλοιώδεις εγκεφάλου, στέλεχος, παρεγκεφαλίδα, αυχενικός μυελός και θωρακικός μυελός. Επιπρόσθετα διερευνήθηκε και η ύπαρξη ή όχι ογκόμορφων απομυελινωτικών βλαβών (tumefactive MS) [229-231].

Τελικά, έκαστος των συμμετεχόντων που συναίνεσε και σε γενετικό έλεγχο (δείτε αναλυτικά την παρ. 3.2) υποβλήθηκε σε αιμοληψία 8 cc ολικού αίματος, το οποίο και τοποθετήθηκε σε ειδικά σωληνάρια ACD περιέχοντα κιτρικό νάτριο (ACD Vacutainer®), με σκοπό την HLA-DRB1 τυποποίηση (δείτε αναλυτικά την παρ. 3.4) κατά προτίμηση όχι αργότερα από μία εβδομάδα μετά από την ημέρα της συλλογής. Να διευκρινισθεί ότι γενετική τυποποίηση έγινε μόνο στους ασθενείς δείκτες σε κάθε επιβεβαιωμένο ζεύγος συγγενών – ασθενών (δείτε και παρακάτω αναλυτικά στο διάγραμμα ροής ασθενών της μελέτης – Εικόνα 16), ώστε να μην επηρεαστεί η στατιστική εγκυρότητα των κατανομών συχνοτήτων των DRB1 αλληλίων στις υποομάδες της μελέτης. Ανάλογη ήταν και η προσέγγιση, για προφανείς λόγους, και στην περίπτωση της συλλογής δεδομένων σχετικά με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα σε 1^{ου} βαθμού συγγενείς των συμμετεχόντων.

Εν κατακλείδι, όλα τα συλλεγθέντα δεδομένα αποθηκεύτηκαν σε μία ενιαία βάση επεξεργασίας H/Y, με σκοπό τη μετέπειτα διευκόλυνση της στατιστικής ανάλυσης.



Εικόνα 16. Διάγραμμα ροής ασθενών της μελέτης (Flowchart)

3.2 ΔΕΟΝΤΟΛΟΓΙΑ

Το πρωτόκολλο της υπόψη ερευνητικής εργασίας – διδακτορικής διατριβής εγκρίθηκε από την Ιατρική Σχολή Αθηνών και από την Επιτροπή Δεοντολογίας και

Επιστημονική Επιτροπή της 1^{ης} Παν/κής Νευρολογικής Κλινικής του Αιγινήτειου Νοσοκομείου (Αρ. Πρωτ. Έγκρισης 117/2-4-13), καθώς βρέθηκε να είναι σύμφωνο με τα προβλεπόμενα από τη Διακήρυξη του Ελσίνκι [232,233]. Όλοι οι ασθενείς που εντάχθηκαν στη μελέτη, είτε ως νέοι ασθενείς για το Εργαστήριο Ανοσογενετικής,

Φόρμα Συγκατάθεσης Συμμετοχής σε Έρευνα

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένος/-η.....συμφωνώ να συμμετέχω στη μελέτη που πραγματοποιείται από τους επιστήμονες Κατσαβό Σεραφείμ, Αναγνωστούλη Μαρία, Δαβάκη Παναγιώτα και Σταμπούλη Ελευθέριο στο Αιγινήτειο Νοσοκομείο, **στα πλαίσια του ερευνητικού πρωτοκόλλου με τίτλο: «Ανοσογενετική μελέτη των περιστατικών οικογενούς μορφής Σκλήρυνσης κατά Πλάκας στον ελληνικό πληθυσμό, και συσχέτιση με κλινικά και παρακλινικά δεδομένα.»**.

Συμφωνώ/Δε συμφωνώ (κυκλώστε ότι ισχύει) στο να παρέχω αίμα που θα χρησιμοποιηθεί για σκοπούς γενετικού ελέγχου.

Όροι Συμμετοχής

- Αναγνωρίζω ότι τα προσωπικά και ιατρικά μου στοιχεία θα καταγραφούν από τους ερευνητές και ότι έχω το δικαίωμα να σταματήσω τη συμμετοχή μου για οποιοδήποτε λόγο.
- Αναγνωρίζω ότι τα στοιχεία αυτά θα χρησιμοποιηθούν στην έρευνα, αλλά δεν μπορούν να κοινοποιηθούν ονομαστικά σε κανέναν πέραν από τους άνωθεν ερευνητές.
- Αποδέχομαι την τηλεφωνική ή προσωπική επικοινωνία με τους ερευνητές.

Ο Ερευνητής

Ο/Η Συμμετέχων/-ουσα στην Έρευνα

Ημερομηνία:/...../.....

Εικόνα 17. Έντυπο συγκατάθεσης ασθενών

είτε αντλούμενοι από παλαιότερα πρωτόκολλα του Εργαστηρίου, ενημερώθηκαν αναλυτικά για τους στόχους αυτής και για τα επιμέρους στοιχεία που επρόκειτο να συλλεχθούν και τους ζητήθηκε να παράσχουν την έγγραφη συγκατάθεσή τους, προ της συμμετοχής (Εικόνα 17).

Το σύνολο των fMS ασθενών – ‘δεικτών’ (112 μη σχετιζόμενοι ασθενείς) καθώς και 16 πάσχοντες συγγενείς τους συγκατατέθηκαν στην παροχή κλινικών,

παρακλινικών και δημογραφικών στοιχείων, καθώς και στοιχείων ιστορικού. Αντίστοιχη συγκατάθεση έδωσαν περίπου οι μισοί (N=364) από τους αρχικώς υποψήφιους sMS ασθενείς. Τέλος, σε γενετική τυποποίηση συναίνεσαν συνολικά 57 μη σχετιζόμενοι fMS ασθενείς – ‘δείκτες’, καθώς και 141 sMS ασθενείς. (διάγραμμα ροής – Εικόνα 16).

Η δεύτερη ομάδα ελέγχου που χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση της παρούσας διατριβής, αποτελούνταν από 246 υγιείς μάρτυρες Ελληνικής καταγωγής, από όλη τη χώρα, για τους οποίους είχε προηγηθεί HLA-DRB1 τυποποίηση σε παλαιότερη μελέτη άλλης ερευνητικής ομάδας [234]. Παρότι στη βάση δεδομένων του Εργαστηρίου Ανοσογενετικής υπάρχουν από ετών 123 δείγματα υγιών μαρτύρων, τυποποιημένα για το HLA-DRB1, με συχνότητες εύρεσης αλληλίων παρόμοιες ή και σχεδόν ταυτόσημες με αυτές της προαναφερθείσας μελέτης, προτιμήθηκε η χρησιμοποίηση του εν λόγω δείγματος, λόγω σαφώς μεγαλύτερου αριθμού συμμετεχόντων. Για λόγους ομοιογένειας δεν έγινε άθροιση των δύο δειγμάτων υγιών μαρτύρων. Άλλωστε ο σκοπός της προαναφερθείσας παλαιότερης εργασίας [234] ήταν ακριβώς να δημιουργήσει βάση HLA-τυποποιημένων υγιών μαρτύρων από όλον τον ελλαδικό χώρο, ώστε να μη χρειάζεται κάθε φορά κάθε νέα ερευνητική ομάδα να επανατυποποιεί υγιείς μάρτυρες. Η ευρεία συνεργασία των δύο Εργαστηρίων Ανοσογενετικής κατέστησε τη χρήση των εν λόγω δεδομένων ευπρόσδεκτη.

3.3 ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Προκειμένου να αποφευχθεί η λάθος κατηγοριοποίηση των συμμετεχόντων ασθενών στην ομάδα των fMS, η επαλήθευση της διάγνωσης στους συγγενείς τους έγινε είτε με την πραγματοποίηση μίας μεμονωμένης συνάντησης με αυτούς στο χώρο των Ειδικών Ιατρείων Απομυελινωτικών Νοσημάτων, είτε μέσω πρόσβασης στους ιατρικούς τους φακέλους (πάντοτε κατόπιν έγκρισης από τους ίδιους και από τη θεράπουσα νευρολόγο τους, που στο μεγαλύτερο ποσοστό ήταν η επιβλέπουσα της διατριβής, κα Μαρία Αναγνωστούλη, είτε από άλλο θεράποντα νευρολόγο). Αναλόγως, για ασθενείς που κατανεμήθηκαν αρχικά στην ομάδα των sMS, έγινε εκ νέου επικοινωνία μαζί τους προ της ολοκλήρωσης της μελέτης, οπότε και ερωτήθηκαν για τυχόν νέες διαγνώσεις ΣκΠ στην οικογένειά τους.

3.4. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

3.4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.

Έγινε απομόνωση του DNA 198 ασθενών (57 fMS και 141 sMS) με τη χρήση του εμπορικού πακέτου “QIAamp Blood Maxi Kit” (Qiagen, Germany), όπως περιγράφεται στα ακόλουθα βήματα:

A. Φυγοκέντρωση στα 1850 g επί 15 λεπτά, και συλλογή της απομονωθείσας λευκοκυτταρικής στοιβάδας (buffy coat) σε κωνικό σωληνάριο τύπου falcon. Επανάληψη της φυγοκέντρωσης για 3 λεπτά, και συλλογή του εναπομείναντος υλικού.

B. Λύση κυττάρων και των πυρήνων τους με χρήση πρωτεΐνάσης K.

Γ. Επώαση σε υδατόλουτρο στους 70°C για 10 λεπτά.

Δ. Αφυδάτωση με προσθήκη απόλυτης αλκοόλης 10 ml.

Ε. Μεταφορά του υλικού σε κωνικό σωληνάριο που περιέχει ειδική στήλη συγκράτησης DNA. Διαδοχικός καθαρισμός του απομονωθέντος DNA με την προσθήκη των Buffer AW1 και AW2 του kit, με επαναλαμβανόμενες φυγοκεντρήσεις.

ΣΤ. Συλλογή του υλικού σε σωληνάριο Eppendorf, του 1.8 ml.

Ζ. Έλεγχος της συγκέντρωσης του DNA με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος, σε ειδικό φωτόμετρο (απαιτούμενο κλάσμα φωτομέτρησης το 1.7, για αντίστοιχη καθαρότητα του δείγματος).

Η. Φύλαξη του τελικού δείγματος DNA, στους -80°C για μελλοντική τυποποίηση.

3.4.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction - PCR).

Αποτελεί μέθοδο που επιτρέπει τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό των υπό μελέτη αλληλουχιών του DNA στα συλλεγθέντα δείγματα. Κατά τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται οι εν λόγω αλληλουχίες DNA για τη δημιουργία συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, που χρησιμεύουν ως εκκινητές (primers) οριοθετώντας τα άκρα του τελικού προϊόντος. Η ενίσχυση και η αλληλοδιάδοχη πολλαπλή σύνθεση των επιθυμητών τμημάτων DNA καταλύονται από DNA πολυμεράση, με τη χρήση

διαδοχικών μεταβολών θερμοκρασίας, σε επαναλαμβανόμενους κύκλους και με τη βοήθεια δείγματος δεοξυνουκλεοτιδίων, για παροχή “δομικού υλικού”.

3.4.3 ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ HLA-DRB1

Ακολούθησε τυποποίηση HLA-DRB1 πολυμορφισμών στα προαναφερθέντα 198 δείγματα ασθενών, σύμφωνα με τους κανόνες ονοματολογίας του 2012 [235], με τη βοήθεια του εμπορικού πακέτου INNO-Lipa HLA-DRB1 Plus [Line Probe Assay, INNO-LiPA, SSO (Sequence Specific Oligonucleotide), Low Resolution, DRB1 Amp Plus, Innogenetics, Fujirebio, Europe], βασισμένου στη μέθοδο του ανάστροφου υβριδισμού. Να διευκρινισθεί άλλωστε ότι οι κανόνες ονοματολογίας, στο επίπεδο της low resolution τυποποίησης τουλάχιστον, δεν έχουν μεταβληθεί έκτοτε και έως σήμερα [55-57]. Το ενισχυμένο μέσω PCR, στο προηγούμενο βήμα, προϊόν DNA, κατά τη μέθοδο αυτή μετουσιώνεται χημικά, και οι αποσυνδεδεμένες πλέον έλικες υπόκεινται σε διαδικασία υβριδισμού με ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές (probes) που βρίσκονται ακινητοποιημένοι σε ταινίες μεμβράνης (membrane-based strips). Ακολουθεί έκλυση και απομάκρυνση του ασύνδετου ενισχυμένου υλικού (stringent wash). Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη στο υβριδοποιημένο υλικό στρεπταβιδίνης, που είναι συζευγμένη με αλκαλική φωσφατάση. Τελικά γίνεται επώαση σε διάλυμα που περιέχει χρωμογόνο (substrate solution), η οποία και οδηγεί στην ανάπτυξη περιοχών μωβ/καφέ χρώματος επί των ταινιών. Η τελευταία αυτή αντίδραση διακόπτεται με τη βοήθεια βήματος έκπλυσης και το τελικό αποτέλεσμα ερμηνεύεται με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (LiRAS interpretation software).

Να επισημανθεί ότι η διαδικασία HLA-DRB1 τυποποίησης, κατά τη διάρκεια της διατριβής, ξεκίνησε αρχικά με τη χρήση διαφορετικού εμπορικού πακέτου, του Elpha Kit (Bio-Rad-Elpha, High Resolution). Με το εν λόγω εμπορικό πακέτο πραγματοποιήθηκαν συνολικά 20 τυποποιήσεις fMS ασθενών. Η διαδικασία τυποποίησης των υπολοίπων δειγμάτων, ωστόσο, με αυτό δεν ήταν εφικτή, λόγω της απόσυρσής του από την εταιρεία παραγωγής κατά τη διάρκεια εξέλιξης της διατριβής. Θεωρήθηκε προτιμότερη η ολοκλήρωση των εργασιών με ένα καινούριο εμπορικό πακέτο, με ταυτόχρονη επανάληψη – επαλήθευση των 20 ήδη ολοκληρωμένων τυποποιήσεων, για λόγους ομοιογένειας της μεθόδου.

3.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Η στατιστική επεξεργασία στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού SPSS 21 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Έγινε εισαγωγή των συλλεχθέντων στοιχείων σε βάση δεδομένων με σκοπό την περιγραφική στατιστική ανάλυση και τη διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ οικογενούς μορφής νόσου (fMS) και διαφορών της κατανομής συχνοτήτων των αλληλίων HLA-DRB1, συσχετίσεων με διαφορές στα δημογραφικά χαρακτηριστικά, τη φυσική ιστορία της νόσου, τα παρακλινικά και απεικονιστικά χαρακτηριστικά, καθώς και με τη συννοσηρότητα με άλλα νοσήματα, πάντοτε σε σύγκριση με τη σποραδική μορφή της νόσου (sMS). Οι συγκρίσεις που αφορούσαν την κατανομή συχνοτήτων HLA-DRB1 αλληλίων περιλάμβαναν και δεύτερη ομάδα ελέγχου, πλην της sMS, εκείνη των υγιών μαρτύρων. Η κατανομή συχνοτήτων στη ομάδα των υγιών μαρτύρων, ως προαναφέρθηκε, έχει δημοσιευθεί ήδη από προηγούμενη ερευνητική ομάδα [234]. Εξετάσθηκε, ακόμη, η διαφορά κατανομής ετεροζυγωτίας / ομοζυγωτίας DRB1 αλληλίων, μεταξύ των υποομάδων της μελέτης, ώστε να αποσαφηνισθεί εάν υφίσταται κάποιος ρόλος της στην εμφάνιση της fMS. Μεταξύ των δευτερευόντων στόχων της μελέτης, επίσης, ήταν και η διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ της φορείας συγκεκριμένων HLA-DRB1 αλληλίων και της εμφάνισης ιδιαίτερων φαινοτύπων (στα υπό ανάλυση κλινικά, παρακλινικά και δημογραφικά στοιχεία), είτε σε συνάρτηση με την ομαδοποίηση σε fMS και sMS ασθενείς, είτε και ανεξάρτητα από αυτήν.

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των δύο υποομάδων ασθενών της μελέτης (fMS – sMS) παρουσιάζονται παρακάτω με τη βοήθεια μεγεθών περιγραφικής στατιστικής όπως μέσες και διάμεσες τιμές (ελάχιστο – μέγιστο), τυπικές αποκλίσεις (SD) και συχνότητες. Η υποομάδα fMS διαστρωματώθηκε περαιτέρω σε ασθενείς fMS με 1^{ου} βαθμού συγγενείς πάσχοντες (fMS 1st) και ασθενείς fMS με πάσχοντες συγγενείς 2^{ου} ή/και 3^{ου} βαθμού (fMS 2nd/3rd). Η προσέγγιση αυτή ακολουθήθηκε ώστε να διερευνηθεί εάν το DRB1 ανοσογενετικό προφίλ των fMS ασθενών διαφέρει σημαντικά, ανάλογα με την εγγύτητα των προσβεβλημένων συγγενών. Με άλλα λόγια, θέλαμε να ελέγξουμε εάν η έκφραση της νόσου σε στενότερους συγγενείς είναι πρωταρχικά το αποτέλεσμα DRB1 πολυμορφισμών ή όχι, παραπέμποντας επομένως σε έτερους γενετικούς τόπους ή/και σε αταυτοποίητους επιστατικούς μηχανισμούς. Περαιτέρω διαστρωμάτωση της fMS 2nd/3rd σε δύο ξεχωριστές ομάδες θεωρήθηκε ότι

δεν είχε νόημα, καθώς δεν ήταν δυνατό να οδηγήσει σε στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις λόγω του μικρού αριθμού συμμετεχόντων.

Οι συγκρίσεις συχνοτήτων των HLA-DRB1 αλληλίων έγιναν με τη βοήθεια δοκιμασιών Fisher και χ^2 (με διόρθωση κατά Yates για πίνακες 2X2), για μικρότερες και μεγαλύτερες ομάδες ασθενών αντίστοιχα. Συγκρίσεις έγιναν επίσης με τις συχνότητες των αλληλίων στην ομάδα των υγιών μαρτύρων [234]. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε στο επίπεδο του $p \leq 0.05$, με την τιμή του p να διορθώνεται σύμφωνα με τη μέθοδο Benjamini–Yekutieli (B–Y) για πολλαπλές συγκρίσεις συχνοτήτων εμφάνισης αλληλίων, παρά με την κλασική μέθοδο Bonferroni, σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο: $p(B-Y) = a / (\Sigma i)$, όπου i ο αριθμός των συγκρίσεων και $a = 0.05$ [236-238]. Και οι δύο μέθοδοι διόρθωσης έχουν σκοπό την αποφυγή στατιστικών λαθών Τύπου I σε αναλύσεις ελέγχου της μηδενικής υπόθεσης (Null Hypothesis), ωστόσο η επιλεγθείσα μέθοδος (B–Y) είναι λιγότερο συντηρητική από την Bonferroni και θεωρείται πιο κατάλληλη για χρήση, σε μελέτες όπου ελέγχεται μεγάλος αριθμός συσχετίσεων ως προς το μέγεθος του δείγματος [237]. Έχει ήδη χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε μία πλειάδα επιστημονικών συγγραμμάτων, είτε με στόχο τη διερεύνηση γενετικών πολυμορφισμών, είτε σε έτερα μη γενετικά αντικείμενα [239-241].

Μονοπαραγοντικές συσχετίσεις μεταξύ των υπόλοιπων μεταβλητών της μελέτης έγιναν με τη βοήθεια Student's t-tests και χ^2 (με διόρθωση κατά Yates για πίνακες 2X2), για συνεχείς και κατηγορικές μεταβλητές αντιστοίχως. Σε περιπτώσεις μη κανονικής κατανομής κατηγορικών μεγεθών έγινε χρήση του Mann-Whitney test. Οι ισορροπίες Hardy-Weinberg (Hardy-Weinberg Proportions – HWP) για τους DRB1 απλότυπους επιβεβαιώθηκαν με τη βοήθεια λογισμικού PyPoP, που έχει αναπτυχθεί με το σκοπό της ανάλυσης πολυμορφικών γενετικών δεδομένων, ιδιαίτερα με προέλευση από την περιοχή του MHC [242,243]. Οι εν λόγω ισορροπίες αναφέρονται στη στατιστική αρχή που υποστηρίζει ότι οι συχνότητες εμφάνισης αλληλομόρφων ενός γενετικού τόπου μέσα σε ένα πληθυσμό οφείλουν να παραμένουν σταθερές μεταξύ γενεών, εφόσον ο πληθυσμός αυτός δεν έχει υποστεί στο μεταξύ σημαντικές εξελικτικές επιδράσεις (π.χ. μεγάλες μεταναστεύσεις, μη τυχαία επιλογή ζευγών, υψηλό ποσοστό αιμομιξίας κλπ) [244,245]. Έγινε, τέλος, έλεγχος της ουδετερότητας (Null Hypothesis) στην επιλογή ομοζυγωτίας / ετεροζυγωτίας στις υποομάδες της μελέτης, με τη βοήθεια του test ουδετερότητας στην ομοζυγωτία Ewens-Watterson (EW) [246]. Με τη δοκιμασία αυτή υπολογίζεται

μία διορθωμένη απόκλιση (F_{nd}) από την αναμενόμενη συχνότητα εμφάνισης ομοζυγωτίας σε ένα γενετικό τόπο, εντός του εκάστοτε υπό μελέτη πληθυσμού. Θετικές ή αρνητικές τιμές της F_{nd} υποδηλώνουν θετική επιλογή (positive/directional selection) ή εξισορροπητική / τυχαία επιλογή (balancing selection) αντίστοιχα. Σε ελεύθερη ερμηνεία, θετικές τιμές της F_{nd} υποδηλώνουν ότι ευνοείται η ομοζυγωτία έναντι της ετεροζυγωτίας στον υπό μελέτη διπλότυπο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ – ΜΗ ΑΝΟΣΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ

Η συχνότητα εντόπισης fMS περιστατικών δεικτών (δε συμπεριλήφθηκαν οι 16 σχετιζόμενοι συμμετέχοντες συγγενείς, δείτε Εικόνα 16) μεταξύ του αρχικού δείγματος (N=854) υποψηφίων συμμετεχόντων υπολογίσθηκε στο 13.1%. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα δημογραφικά, κλινικά και παρακλινικά (ENY, MRI) χαρακτηριστικά, καθώς και τα συλλεγθέντα στοιχεία ιστορικού των δύο ομάδων σύγκρισης της μελέτης (fMS και sMS). Παρουσιάζονται ακόμη οι στατιστικές συσχετίσεις για τα χαρακτηριστικά αυτά με συγκρίσεις μεταξύ των δύο βασικών ομάδων συνολικά, αλλά και μετά από διαστρωμάτωση της fMS ανάλογα με την εγγύτητα των προσβεβλημένων συγγενών. Πιο συγκεκριμένα, οι fMS 1st ασθενείς αποτελούσαν το 45.3% του συνολικού fMS δείγματος (οι υπόλοιποι ανήκαν στην κατηγορία fMS 2nd/3rd). Στις περιπτώσεις εκείνες των μη σχετιζόμενων fMS ασθενών (N=112) όπου μπορούσε από το ιστορικό να διαπιστωθεί ο γονεϊκός τρόπος μεταβίβασης (εξαιρέθηκαν 12 ασθενείς δείκτες με αδέρφια πάσχοντες), αυτός βρέθηκε προεξάρχοντως μητρικός (59%). Οι συμμετέχοντες ασθενείς ήταν κατά κύριο λόγο γυναίκες (fMS 65.6% - sMS 64.3%), με μέση ηλικία περί τα 41 έτη και μέση τιμή EDSS λίγο μεγαλύτερη από το 3 (fMS 3.1 – sMS 3.3). Ο συχνότερος τύπος νόσου μεταξύ των συμμετεχόντων ήταν η υποτροπιάζουσα – διαλείπουσα ΣκΠ (fMS 88.3% - sMS 84.3%). Το 69.5% του συνόλου των ασθενών βρισκόταν σε φαρμακευτική αγωγή 1^{ης}, 2^{ης} ή 3^{ης} γραμμής (fMS 67.8% - sMS 70.2%).

Η ηλικία έναρξης της νόσου βρέθηκε περίπου ίδια μεταξύ fMS και sMS ($p=0.675$), με μία τάση ωστόσο για νεώτερη έναρξη στην fMS με 1^{ου} βαθμού συγγενείς νοσούντες (fMS 1st vs sMS: 28.3 vs 30.8 έτη, $p=0.122$). Δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα λοιπά κλινικά χαρακτηριστικά των ομάδων (τύπος νόσου, αναπηρία, ρυθμός εξέλιξης αναπηρίας, αριθμός υποτροπών, ARR), εκτός από το χρόνο μετάπτωσης από το κλινικά μεμονωμένο σύνδρομο (Clinically Isolated Syndrome – CIS) στην βέβαια νόσο (Clinically Definite MS – CDMS), που

βρέθηκε σημαντικά μεγαλύτερος στη υποομάδα fMS 1st σε σύγκριση με την υποομάδα fMS 2nd/3rd (43.6 vs 27.9 μήνες, $p=0.047$).

Σε ό,τι αφορά τα πρώτα συμπτώματα της ΣκΠ, οι αιμωδίες βρέθηκε να έχουν την υψηλότερη συχνότητα όλων (38.3%) στο σύνολο των συμμετεχόντων ασθενών, ακολουθούμενες από το θάμβος όρασης σε έδαφος οπτικής νευρίτιδας (22.2%) και τις παρέσεις (13.4%). Τα διάφορα πιθανά πρώτα συμπτώματα της πάθησης δεν διέφεραν σημαντικά, από πλευράς συχνότητας, μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων εκτός από την περίπτωση της διπλωπίας που παρατηρήθηκε σπανιότερα στους fMS ασθενείς (fMS 3.1% vs sMS 13.7%, $p=0.003$). Αναφορικά με την παράμετρο της γενικής προδιάθεσης για αυτοάνοσα νοσήματα (ατομικά στους συμμετέχοντες και στις οικογένειες τους), αυτή δε φάνηκε να διαφέρει ιδιαίτερα μεταξύ των ομάδων ελέγχου. Συχνότερο συνοδό αυτοάνοσο νόσημα στην ΣκΠ για τους συμμετέχοντες ασθενείς βρέθηκε η θυρεοειδίτιδα Hashimoto (7.1%), ακολουθούμενη από την ψωρίαση (2.8%). Από την άλλη, συχνότερο αυτοάνοσο νόσημα στους 1^{ου} βαθμού συγγενείς των συμμετεχόντων ήταν η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα (6%), ακολουθούμενη από τη θυρεοειδίτιδα Hashimoto (5.4%) και την ψωρίαση (3.5%). Να επισημανθεί ότι στην περίπτωση της θυρεοειδίτιδας Hashimoto, συγκεκριμένα, εντοπίστηκε σημαντικά υψηλότερη συχνότητα στους 1^{ου} βαθμού συγγενείς των fMS ασθενών, σε σχέση με εκείνους των sMS ασθενών (9.8% vs 3.3%, $p=0.033$). Για το εν λόγω αποτέλεσμα ήταν κυρίως υπεύθυνη η υποομάδα fMS 2nd/3rd (13.6% vs 3.3%, $p=0.007$). Αξίζει ακόμη να σημειωθεί ότι για τις στατιστικές συγκρίσεις που αφορούσαν την τελευταία μεταβλητή ('αυτοάνοσα νοσήματα σε 1^{ου} βαθμού συγγενείς') στην ομάδα fMS χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι αρχικοί 112 μη σχετιζόμενοι ασθενείς-δείκτες, και όχι οι 16 fMS συγγενείς (δείτε και Εικόνα 16 – διάγραμμα ροής).

Από τον έλεγχο των παρακλινικών χαρακτηριστικών των συμμετεχόντων στη μελέτη, δε διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στις συχνότητες των θετικών ολιγοκλωνικών ζωνών ENY. Πιο συγκεκριμένα, οι fMS ασθενείς είχαν ανιχνεύσιμες ολιγοκλωνικές ζώνες σε ποσοστό 80.4%, με σχετική ισοκατανομή μεταξύ των υποομάδων fMS 1st και fMS 2nd/3rd, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τους sMS ασθενείς υπολογίστηκε στο 75.9%. Σε σχέση με τη νευροαπεικόνιση, ωστόσο, οι fMS ασθενείς βρέθηκαν να έχουν σημαντικά σπανιότερα στελεχιαίες βλάβες (49.6% vs 64.8%, $p=0.006$), αλλά και υποσκληνιδιακές βλάβες εν γένει (64.5% vs 74.8%, $p=0.048$). Δε διαπιστώθηκαν άλλες σημαντικές διαφορές κατανομής βλαβών στις υπό μελέτη περιοχές του ΚΝΣ (περικολιλιακά, υποφλοιωδώς, αυχενικός μυελός,

θωρακικός μυελός), αλλά ούτε και διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης ογκόμορφων βλαβών (δείτε και Πιν. 7).

Πίνακας 7. Δημογραφικά, κλινικά και παρακλινικά χαρακτηριστικά των ομάδων και υποομάδων της μελέτης και οι μεταξύ τους συσχετίσεις.

<i>ΜΕΡΟΣ I</i>	fMS (N=128)	sMS (N=364)	fMS 1 st (N=58)	fMS 2 nd or 3 rd (N=70)	fMS vs. sMS Sig.	fMS 1 st vs. sMS Sig.	fMS 2 nd /3 rd vs. sMS Sig.	fMS 1 st vs. fMS 2 nd /3 rd Sig.
Ηλικία	40.7±13.6	41.7±11.4	40.2±12.9	40.9±13.9	0.474	0.361	0.665	0.769
Γυναίκες	84 (65.6)	234 (64.3)	36 (62.1)	48 (68.6)	0.955	0.562	0.572	0.450
Ηλικία έναρξης	30.3±12.1	30.8±10	28.3±11.4	31.6±12	0.675	0.122	0.616	0.124
RRMS	113 (88.3)	307 (84.3)	53 (91.4)	60 (85.7)	0.174	0.214	0.547	0.773
Διάρκεια νόσου	122.1±100.2	130.4±104.2	136.2±92.4	111.4±106.9	0.441	0.695	0.182	0.179
EDSS	3.1±1.9	3.3±1.7	3.3±1.9	2.9±1.9	0.275	0.939	0.113	0.264
Πρόοδος EDSS	0.5±0.6	0.6±0.7	0.5±0.6	0.6±0.7	0.564	0.245	0.864	0.277
Από CIS σε CDMS (μήνες)	35.4±37.6	38.5±47.8	43.6±43.4	27.9±29.9	0.582	0.516	0.140	0.047*
1 ^ο σύμπτωμα Αιμωδία	52 (40.6)	129 (35.4)	26 (44.8)	26 (37.1)	0.295	0.111	0.994	0.261
1 ^ο σύμπτωμα Οπτ. Νευρίτιδα	22 (17.2)	84 (23.1)	8 (13.8)	14 (20)	0.579	0.112	0.842	0.478
1 ^ο σύμπτωμα Διπλωπία	4 (3.1)	50 (13.7)	2 (3.4)	2 (2.9)	0.003*	0.054*	0.023*	0.845
Αριθμός υποτροπών	4.2±2.9	4.4±3.9	4.7±3.4	3.7±2.3	0.594	0.582	0.076	0.086

ΜΕΡΟΣ 2	fMS (N=128)	sMS (N=364)	fMS 1 st (N=58)	fMS 2 nd or 3 rd (N=70)	fMS vs. sMS Sig.	fMS 1 st vs. sMS Sig.	fMS 2 nd /3 rd vs. sMS Sig.	fMS 1 st vs. fMS 2 nd /3 rd Sig.
ARR	0.43 (0.09-4)	0.46 (0.01-6)	0.40 (0.09-2.5)	0.46 (0.12-4)	0.857	0.911	1.0	0.956
Ολιγοκλωνικές ζώνες ¥	74 (80.4)	164 (75.9)	34 (82.9)	40 (78)	0.474	0.419	0.855	0.606
Περικοιλιακές εστίες ¥	119 (98.3)	266 (98.9)	55 (100)	62 (96.9)	1.0	1.0	0.246	0.499
Υποφλοιώδεις εστίες ¥	86 (71.1)	204 (75.8)	38 (69.1)	48 (75)	0.384	0.309	0.872	0.540
Εστίες Στελέχους ¥	60 (49.6)	175 (64.8)	28 (50.9)	32 (49.5)	0.006*	0.066	0.032*	1.0
Παρεγκεφαλιδικές εστίες ¥	67 (55.4)	165 (61.1)	29 (52.7)	38 (59.4)	0.339	0.291	0.887	0.578
Ογκόμορφες εστίες ¥	6 (5.3)	11 (5.4)	3 (5.8)	3 (4.8)	1.0	1.0	1.0	1.0
Εστίες Αυχ. Μυελού ¥	95 (84.1)	232 (80.6)	44 (89.8)	50 (80.6)	0.501	0.159	1.0	0.278
Εστίες Θωρ. Μυελού ¥	63 (71.6)	159 (66.3)	26 (70.3)	36 (72)	0.434	0.710	0.509	1.0
Υποσκηνιδιακές εστίες ¥	78 (64.5)	202 (74.8)	34 (61.8)	44 (68.8)	0.048*	0.067	0.345	0.446
Εστίες Νωτιαίου Μυελού ¥	103 (89.6)	252 (86)	46 (90.2)	55 (88.7)	0.425	0.509	0.685	1.0
Άλλα αυτοάνοσα στον ασθενή	19 (14.8)	60 (16.5)	7 (12.1)	12 (17.1)	0.671	0.423	0.998	0.457

ΜΕΡΟΣ 3	fMS (N=128)	sMS (N=364)	fMS 1 st (N=58)	fMS 2 nd or 3 rd (N=70)	fMS vs. sMS Sig.	fMS 1 st vs. sMS Sig.	fMS 2 nd /3 rd vs. sMS Sig.	fMS 1 st vs. fMS 2 nd /3 rd Sig.
Hashimoto στον ασθενή	10 (7.8)	25 (6.9)	4 (6.9)	6 (8.6)	0.854	1.0	0.822	0.967
Άλλα αυτοάνοσα σε 1 ^{ου} βαθμού συγγενείς	36 (32.1) N ^R =112	60 (28.2) N ^R =213	14 (26.4) N ^R =53	23 (38.9) N ^R =59	0.640	0.491	0.12	0.072
Hashimoto σε 1 ^{ου} βαθμού συγγενείς	11 (9.8) N ^R =112	7 (3.3) N ^R =213	3 (5.7) N ^R =53	8 (13.6) N ^R =59	0.033*	0.636	0.007*	0.152

Σε κάθε μεταβλητή παραθέτεται η μέση τιμή ± τυπική απόκλιση, η διάμεση τιμή (ελάχιστο – μέγιστο) ή η απόλυτη τιμή και η επί τοις εκατό (%) συχνότητα, ανάλογα με τη φύση του υπό εξέταση μεγέθους. Οι στατιστικές συσχετίσεις έγιναν με t-tests ή Mann Whitney tests στην περίπτωση συνεχών μεταβλητών (ανάλογα με τον τρόπο κατανομής των μεγεθών) και με X² (με διόρθωση κατά Yates ή δοκιμασία Fisher) στην περίπτωση των κατηγορικών μεταβλητών. *p≤0.05

fMS = Οικογενής Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ), fMS 1st = fMS με 1^{ου} βαθμού συγγενή/-είς πάσχοντα/-ες, fMS 2nd/3rd = fMS με 2^{ου} ή/και 3^{ου} βαθμού συγγενή/-είς πάσχοντα/-ες, sMS =Σποραδική ΣκΠ

ARR = Ετησιοποιημένος Ρυθμός Υποτροπών (Annualized Relapse Rate) CIS = Κλινικά Μεμονωμένο Σύνδρομο (Clinically Isolated Syndrome), CDMS = Κλινικά Βέβαια Νόσος (Clinically Definite Multiple Sclerosis), EDSS = Expanded Disability Status Scale (Κλίμακα Μέτρησης Αναπηρίας στη ΣκΠ), RRMS = Υποτροπιάζουσα – Διαλείπουσα ΣκΠ (Relapsing – Remitting Multiple Sclerosis)

✖ Αναπόφευκτα, στις υπόψη παρακλινικές μεταβλητές δεν ήταν δυνατή η συλλογή δεδομένων για το σύνολο των συμμετεχόντων, λόγω στοιχείων που έλειπαν (missing values). Τα παρατιθέμενα ποσοστά εντός παρενθέσεως αποτελούν αναγωγή στο πραγματικό N (N^R) για κάθε μεταβλητή (όπου στην περίπτωση αυτή N^R = N- missing values)

Οι περιπτώσεις εκείνες των fMS ασθενών όπου υπήρχε κάθετη μεταβίβαση της νόσου ήταν συνολικά 32 (12 γονείς / 1^η γενιά, 20 απόγονοι / 2^η γενιά), όπως φαίνεται στον Πίνακα 8. Στη στατιστική σύγκριση των δύο αυτών υποομάδων

Πίνακας 8. Επιλεγμένες συσχετίσεις δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών μεταξύ υποομάδων fMS ασθενών με κάθετη μεταβίβαση.

	1 ^η Γενιά (N=12)	2 ^η Γενιά (N=20)	Sig.
Ηλικία	56.6±7.5	34.8±8.9	<0.001
Ηλικία έναρξης νόσου	39.7±11.1	24.5±7.4	<0.001
Από CIS σε CDMS (μήνες)	83.3±59.2	30.1±27	0.037

Mann-Whitney U tests, $p \leq 0.05$

fMS = Οικογενής Σκλήρυνση κατά Πλάκας, CIS = Κλινικά Μεμονωμένο Σύνδρομο (Clinically Isolated Syndrome), CDMS = Κλινικά Βέβαια Νόσος (Clinically Definite Multiple Sclerosis)

διαπιστώθηκε σημαντικά μικρότερη ηλικία έναρξης νόσου στους ασθενείς 2^{ης} γενιάς (24.5 vs 39.7 έτη, $p=0.001$). Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκρίσεις των κλινικών, δημογραφικών και απεικονιστικών χαρακτηριστικών αλλά και των στοιχείων ιστορικού των δύο αυτών υποομάδων, εκτός από το χρόνο μετάπτωσης από CIS σε CDMS που βρέθηκε σημαντικά μικρότερος στους ασθενείς 2^{ης} γενιάς (30.1 vs 83.3 μήνες, $p=0.037$).

4.2 ΑΝΟΣΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ

4.2.1 ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΩΝ DRB1 ΑΛΛΗΛΙΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ fMS ΚΑΙ sMS

Στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται οι κατανομές συχνοτήτων των διαφορετικών DRB1 αλληλίων στις ομάδες ασθενών της μελέτης και οι μεταξύ τους στατιστικές συσχετίσεις. Το *DRB1*11* ήταν σταθερά το αλληλίο που ανιχνεύθηκε πιο συχνά σε όλες τις ομάδες, με μεγαλύτερη εύρεση της συχνότητάς του, ωστόσο, στους fMS σε σχέση με τους sMS ασθενείς (49.1% vs 31.9%), κάτι που ήταν, δε, ακόμα πιο εμφανές στην υποομάδα fMS 1st (58.6%). Το αλληλίο *DRB1*15* βρέθηκε σε παρόμοιες συχνότητες μεταξύ των ομάδων fMS και sMS (31.6% vs 31.2%). Σε αυτή την περίπτωση, μάλιστα η συχνότητα του αλληλίου *DRB1*15* στην fMS ομάδα φάνηκε να είναι περισσότερο αποτέλεσμα της υποομάδας fMS 2nd/3rd (39.3%), και

λιγότερο της υποομάδας fMS 1st (24.1%). Έγιναν πολλαπλές συγκρίσεις συχνοτήτων αλληλίων μεταξύ των ομάδων fMS και sMS, με τη βοήθεια δοκιμασιών Fisher, με το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας στο $p=0.05$, που ανέδειξαν σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα *DRB1*11* ($p=0.034$) και σημαντικά μικρότερη συχνότητα *DRB1*14* ($p=0.027$) στην πρώτη ομάδα. Από την άλλη, η υποομάδα fMS 1st είχε αυξημένη συχνότητα εύρεσης των αλληλίων *DRB1*08* ($p=0.028$) και *DRB1*11* ($p=0.01$) σε σχέση με την ομάδα sMS. Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα έχασαν τη στατιστική τους σημαντικότητα μετά από διόρθωση Benjamini–Yekutieli (B-Y), εκτός από την περίπτωση της συχνότερης εύρεσης *DRB1*11* στην fMS 1st σε σύγκριση με την sMS. Όλες οι υπόλοιπες συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων / υποομάδων fMS και sMS δεν αποκάλυψαν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα. Διαστρωμάτωση των fMS ασθενών ανάλογα με το γονεϊκό τρόπο μεταβίβασης επίσης δε μετέβαλε ουσιαστικά τα παραπάνω αποτελέσματα.

Πίνακας 9. Κατανομή συχνοτήτων HLA-DRB1 αλληλίων στις ομάδες και υποομάδες ασθενών της μελέτης και οι μεταξύ τους στατιστικές συσχετίσεις.

<i>ΜΕΡΟΣ 1</i>								
HLADRB1*	fMS (N=57)	sMS (N=141)	fMS 1 st degree (N=29)	fMS 2 nd or 3 rd degree (N=28)	fMS vs. sMS OR, 95%CI Sig.	fMS 1 st vs. sMS OR, 95%CI Sig.	fMS 2 nd /3 rd vs. sMS OR, 95%CI Sig.	fMS 1 st vs. fMS 2 nd /3 rd OR, 95%CI Sig.
01	5 (8.8)	20 (14.2)	2 (6.9)	3 (10.7)	0.58, 0.21- 1.63 0.353	0.45, 0.1- 2.03 0.375	0.86, 0.24- 3.17 0.998	0.52, 0.08-3.39 0.649
03	10 (17.5)	24 (17)	7 (24.1)	2 (7.1)	1.04, 0.46- 2.34 1.0	1.55, 0.6- 4.04 0.428	0.44, 0.1- 2.01 0.374	3.5, 0.65- 18.76 0.160

<i>MEPOΣ 2</i>								
HLADRB1*	fMS (N=57)	sMS (N=141)	fMS 1st degree (N=29)	fMS 2nd or 3rd degree (N=28)	fMS vs. sMS OR, 95%CI Sig.	fMS 1st vs. sMS OR, 95%CI Sig.	fMS 2nd/3rd vs. sMS OR, 95%CI Sig.	fMS 1st vs. fMS 2nd/3rd OR, 95%CI Sig.
04	12 (21.2)	30 (21.3)	7 (24.1)	5 (17.9)	0.99, 0.46- 2.1 1.0	1.18, 0.46- 3.02 0.805	0.74, 0.24- 2.33 0.787	1.59, 0.4- 6.26 0.735
07	3 (5.3)	12 (8.5)	1 (3.4)	2 (7.1)	0.6, 0.16- 2.2 0.561	0.38, 0.05- 3.08 0.7	0.98, 0.21- 4.67 0.997	0.39, 0.03-4.62 0.584
08	2 (3.5)	0 (0)	2 (6.9)	0 (0)	0.97, 0.92- 1.01 0.082	- 0.028*	-	- 0.495
10	4 (7)	4 (2.8)	2 (6.9)	2 (7.1)	2.59, 0.62- 10.7 0.231	2.54, 0.44- 14.55 0.272	3.11, 0.54- 18.03 0.211	0.82, 0.11-6.26 1.0
11	28 (49.1)	45 (31.9)	17 (58.6)	12 (42.9)	2.06, 1.1- 3.86 0.034*	3.02, 1.33- 6.86 0.01*¥	1.28, 0.52- 3.15 0.64	2.36, 0.78-7.16 0.17

MEPOΣ 3								
HLADRB1*	fMS (N=57)	sMS (N=141)	fMS 1st degree (N=29)	fMS 2nd or 3rd degree (N=28)	fMS vs. sMS OR, 95%CI Sig.	fMS 1st vs. sMS OR, 95%CI Sig.	fMS 2nd/3rd vs. sMS OR, 95%CI Sig.	fMS 1st vs. fMS 2nd/3rd OR, 95%CI Sig.
12	1 (1.8)	7 (5)	0 (0)	1 (3.6)	0.34, 0.04- 2.84 0.443	- 0.604	0.83, 0.1- 7.09 0.995	- 0.453
13	10 (17.5)	21 (14.9)	4 (13.8)	6 (21.4)	1.22, 0.53- 2.78 0.668	0.91, 0.29- 2.9 1.0	1.91, 0.68- 5.36 0.235	0.48, 0.12-1.95 0.482
14	1 (1.8)	16 (11.3)	0 (0)	1 (3.6)	- 0.027*	- 0.077	0.34, 0.04- 2.69 0.472	- 0.453
15	18 (31.6)	44 (31.2)	7 (24.1)	11 (39.3)	1.02, 0.53- 1.97 1.0	0.7, 0.28- 1.76 0.512	1.32, 0.54- 3.25 0.637	0.53, 0.16-1.74 0.372
16	15 (26.3)	40 (28.4)	7 (24.1)	8 (28.6)	0.9, 0.45- 1.81 0.862	0.8, 0.32- 2.03 0.82	1.04, 0.4-2.7 1.0	0.77, 0.23-2.63 0.76

ΜΕΡΟΣ 4 (Επεξηγήσεις)

Οι απόλυτες τιμές αναπαριστούν τη συχνότητα εμφάνισης του κάθε αλληλίου στην εκάστοτε ομάδα, ενώ οι τιμές εντός παρενθέσεως το % ποσοστό. Σε ομοζυγώτες ασθενείς, το ευρεθέν αλληλίο προσμετρήθηκε μία μόνο φορά. Το άθροισμα των % ποσοστών είναι κοντά στο 200%, αφού ο κάθε ασθενής έχει δύο αλλήλια. Οι στατιστικές συσχετίσεις έγιναν με δοκιμασίες Fisher. * $p \leq 0.05$ $\forall p \leq 0.016$ σύμφωνα με τη μέθοδο διόρθωσης B-Y.

fMS = Οικογενής Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ), fMS 1st = fMS με 1^{ου} βαθμού συγγενή/-είς πάσχοντα/-ες, fMS 2nd/3rd = fMS με 2^{ου} ή/και 3^{ου} βαθμού συγγενή/-είς πάσχοντα/-ες, SMS = Σποραδική ΣκΠ.

OR= Odds Ratio (λόγος πιθανοτήτων) CI= Confidence Interval (διάστημα εμπιστοσύνης)

4.2.2 ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΩΝ DRB1 ΑΛΛΗΛΙΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ - ΥΠΟΟΜΑΔΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται οι στατιστικές συσχετίσεις συχνοτήτων των HLA-DRB1 αλληλίων των ομάδων και υποομάδων ασθενών της παρούσας διατριβής, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες συχνότητες στο γενικό πληθυσμό στην Ελλάδα, όπως αυτές δημοσιεύθηκαν σε προγενέστερη μελέτη [234]. Οι fMS ασθενείς γενικά εμφάνιζαν σημαντικά συχνότερα τα αλλήλια *DRB1*10* ($p=0.033$) και *DRB1*15* ($p=0.002$), και σημαντικά σπανιότερα το αλληλίο *DRB1*14* ($p=0.048$), σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Μετά από διόρθωση B-Y, μόνο η συσχέτιση ως προς το αλληλίο *DRB1*15* διατήρησε τη σημαντικότητά της. Περαιτέρω διαστρωμάτωση των ασθενών fMS ως προς την εγγύτητα των προσβεβλημένων συγγενών αποκάλυψε ότι η αυξημένη συχνότητα του *DRB1*15* οφειλόταν κυρίως στην υποομάδα fMS 2nd/3rd ($p=0.012$), ενώ η σύγκριση της υποομάδας fMS 1st με το γενικό πληθυσμό δεν έδωσε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Διαστρωμάτωση των fMS ασθενών ανάλογα με το γονεϊκό τρόπο μεταβίβασης δε μετέβαλε ουσιαστικά τα παραπάνω αποτελέσματα. Αντίστοιχα, οι SMS ασθενείς παρουσίαζαν σημαντικά συχνότερα τα αλλήλια *DRB1*15* ($p=0.001$) και *DRB1*12* ($p=0.013$), και σημαντικά σπανιότερα το *DRB1*11* ($p=0.001$), σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, ακόμη και μετά από διόρθωση

B-Y. Όλες οι υπόλοιπες συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων / υποομάδων fMS και sMS με τους υγιείς μάρτυρες δεν αποκάλυψαν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.

Πίνακας 10. Στατιστικές συσχετίσεις συχνοτήτων HLA-DRB1 αλληλίων των ομάδων και υποομάδων ασθενών της μελέτης, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες συχνότητες στο γενικό Ελληνικό πληθυσμό, όπως αυτές δημοσιεύθηκαν σε προγενέστερη μελέτη [234].

HLADRB1*	Υγιείς μάρτυρες (N=246) %	fMS vs. υγιείς μάρτυρες Sig.	sMS vs. υγιείς μάρτυρες Sig.	fMS 1 st vs. υγιείς μάρτυρες Sig.	fMS 2 nd /3 rd vs. υγιείς μάρτυρες Sig.
01	14.7	0.141	0.478	0.178	0.522
03	12.6	0.177	0.073	0.056	0.402
04	18.3	0.357	0.21	0.283	0.545
07	13.4	0.054	0.057	0.097	0.358
08	2.0	0.367	0.081	0.111	0.616
10	2.4	0.033*	0.475	0.165	0.112
11	52.0	0.281	<0.001*Ψ	0.299	0.112
12	2	0.5	0.013*Ψ	0.458	0.384
13	17.8	0.5	0.214	0.374	0.246
14	8.9	0.048*	0.191	0.087	0.357
15	16.7	0.002*Ψ	<0.001*Ψ	0.205	0.012*Ψ
16	26.5	0.5	0.342	0.469	0.46

Το άθροισμα των % ποσοστών εμφάνισης αλληλίων στους υγιείς μάρτυρες είναι κοντά στο 200%, αφού ο κάθε ασθενής έχει δύο αλλήλια (σε ομοζυγώτες ασθενείς, το ευρεθέν αλλήλιο προσμετρήθηκε μία μόνο φορά). Οι στατιστικές συσχετίσεις έγιναν με δοκιμασίες X². *p≤0.05 Ψp≤0.016 σύμφωνα με τη μέθοδο διόρθωσης B-Y .

Η στατιστική σημαντικότητα στις συσχετίσεις μεταξύ των υποομάδων της μελέτης και της ομάδας των υγιών μαρτύρων περιγράφονται μόνο με τις τιμές p. ORs (λόγοι πιθανοτήτων) και CIs (διαστήματα εμπιστοσύνης) δεν μπορούν να δοθούν, καθώς δεν είναι γνωστά περαιτέρω χαρακτηριστικά του δείγματος των υγιών μαρτύρων).

fMS = Οικογενής Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ), fMS 1st = fMS με 1^ο βαθμού συγγενή/-είς πάσχοντα/-ες, fMS 2nd/3rd = fMS με 2^ο ή/και 3^ο βαθμού συγγενή/-είς πάσχοντα/-ες, sMS =Σποραδική ΣκΠ.

4.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ HLA ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ – ΚΛΙΝΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ

Σε αυτή την παράγραφο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εκείνα της στατιστικής επεξεργασίας, που προέκυψαν από τις συσχετίσεις των διαφορών υπό διερεύνηση DRB1 αλληλομόρφων με τα επιμέρους συλλεγθέντα δημογραφικά, κλινικά και παρακλινικά στοιχεία καθώς και τα στοιχεία ιστορικού των ομάδων της μελέτης. Πιο συγκεκριμένα οι συμμετέχοντες ασθενείς ομαδοποιήθηκαν ως θετικοί ή αρνητικοί για τα αλληλία *DRB1*03*, **04*, **11*, **13*, **14*, **15*, και **16*, που ήταν άλλωστε και τα συχνότερα εμφανιζόμενα, και ακολούθως εξετάστηκε αν οι ομάδες που προέκυψαν εμφάνιζαν διαφορές ως προς τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά αφενός στο συνολικό δείγμα, και αφετέρου για τις ομάδες fMS και sMS.

Οι συσχετίσεις που πέτυχαν στατιστική σημαντικότητα, στο επίπεδο του $p \leq 0.05$, παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 11. Στο συνολικό δείγμα ασθενών οι *DRB1*03* θετικοί ασθενείς παρουσίαζαν σημαντικά μικρότερη ηλικία έναρξης (26.4 vs 30.3 έτη, $p=0.04$). Αυτή η σημαντικότητα διατηρήθηκε και για την ομάδα sMS (24.7 vs 30.5 έτη, $p=0.02$), όχι όμως και για την ομάδα fMS. Οι *DRB1*04* θετικοί ασθενείς είχαν σημαντικά συχνότερα 1^{ου} βαθμού συγγενείς πάσχοντες από αυτοάνοσες παθήσεις (61.1% vs 26%, $p=0.01$) στο συνολικό δείγμα, ωστόσο αυτή η σημαντικότητα δε διατηρήθηκε σε καμία από τις δύο επιμέρους ομάδες (fMS και sMS). Η φορεία του *DRB1*13* βρέθηκε να είναι προστατευτική έναντι της οπτικής νευρίτιδας ως πρώτο σύμπτωμα της νόσου, στο σύνολο των συμμετεχόντων (3.6% vs 24%, $p=0.011$), αλλά και σε αυτή την περίπτωση η σημαντικότητα δε διατηρήθηκε στις ομάδες fMS και sMS. Διαπιστώθηκε, ακόμη, ότι οι *DRB1*14* θετικοί ασθενείς είχαν σημαντικά σπανιότερα απομυελινωτικές βλάβες στο θωρακικό μυελό (28.6% vs 73.3%, $p=0.024$), αλλά και στο νωτιαίο μυελό εν γένει (66.7% vs 91.7%, $p=0.047$), σε ότι αφορούσε, και πάλι, το σύνολο, μόνο, του δείγματος. Τέλος, οι *DRB1*16* θετικοί ασθενείς στο σύνολο των συμμετεχόντων εμφάνιζαν επίσης σημαντικά σπανιότερα θωρακικές βλάβες (53.6% vs 76.9%, $p=0.029$), χωρίς όμως η σημαντικότητα αυτή να επιβεβαιώνεται στις ομάδες fMS και sMS. Στην ομάδα sMS, από την άλλη, η φορεία του εν λόγω αλληλίου ήταν συνδεδεμένη με σημαντικά βραχύτερο χρόνο μετάβασης από το CIS στην CDMS (14.1 vs 33.9 μήνες, $p=0.02$), καθώς και με συχνότερη εμφάνιση ογκόμορφων απομυελινωτικών βλαβών (23.1% vs 0%, $p=0.025$).

Όλα τα υπόλοιπα δημογραφικά, κλινικά και παρακλινικά χαρακτηριστικά, καθώς και στοιχεία ιστορικού δεν παρουσίασαν σημαντικές συσχετίσεις με τον υπό

μελέτη γονότυπο. Να επισημανθεί ότι δεν διαπιστώθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση των υπό διερεύνηση χαρακτηριστικών με τη φορεία του *DRB1*15* αλληλίου στο σύνολο και τις ομάδες της μελέτης, αλλά ούτε με το *DRB1* γονότυπο γενικότερα στην ομάδα fMS.

Πίνακας 11. Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις HLA γονοτύπου – κλινικού φαινοτύπου			
Συνολικό δείγμα τυποποιημένων ασθενών (N=198)			
	<i>DRB1*03</i> ΘΕΤΙΚΟΙ	<i>DRB1*03</i> ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	Sig.
Ηλικία έναρξης ΣκΠ	26.4±13.2	30.3±11.1	0.04*
	<i>DRB1*04</i> ΘΕΤΙΚΟΙ	<i>DRB1*04</i> ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	
Συγγενείς 1 ^{ου} βαθμού με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα	11 (61.1%)	20 (26%)	0.01*
	<i>DRB1*13</i> ΘΕΤΙΚΟΙ	<i>DRB1*13</i> ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	
1 ^ο σύμπτωμα Οπτική Νευρίτιδα	1 (3.2%)	35 (20.9%)	0.011*
	<i>DRB1*14</i> ΘΕΤΙΚΟΙ	<i>DRB1*14</i> ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	
Εστίες Θωρακικού Μυελού ☒	2 (28.6%)	63 (73.3%)	0.024*
Εστίες Νωτιαίου Μυελού ☒	6 (66.7%)	110 (91.7%)	0.047*
	<i>DRB1*16</i> ΘΕΤΙΚΟΙ	<i>DRB1*16</i> ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	
Εστίες Θωρακικού Μυελού ☒	15 (53.6%)	50 (76.9%)	0.029*
Ασθενείς με Σποραδική ΣκΠ (N=141)			
	<i>DRB1*03</i> ΘΕΤΙΚΟΙ	<i>DRB1*03</i> ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	Sig.
Ηλικία έναρξης ΣκΠ	24.7±10.5	30.5±10.6	0.02*
	<i>DRB1*16</i> ΘΕΤΙΚΟΙ	<i>DRB1*16</i> ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	
Χρόνος μετάπτωσης από CIS σε CDMS	14.1±16.8	33.9±31.4	0.02*
Ογκομορφες εστίες ☒	3 (23.1%)	0 (0%)	0.025*
Ασθενείς με Οικογενή ΣκΠ (N=57)			
Δε διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις			
Διενεργήθηκαν Mann-Whitney U tests και Fisher chi-square exact tests ανάλογα με τη φύση της εκάστοτε υπό διερεύνηση μεταβλητής.			
ΣκΠ = Σκλήρυνση κατά Πλάκας CIS = Κλινικά Μεμονωμένο Σύνδρομο (Clinically Isolated Syndrome), CDMS = Κλινικά Βέβαια Νόσος (Clinically Definite Multiple Sclerosis)			
☒ Αναπόφευκτα, στις υπόψη παρακλινικές μεταβλητές δεν ήταν δυνατή η συλλογή δεδομένων για το σύνολο των συμμετεχόντων, λόγω στοιχείων που έλειπαν (missing values). Τα παρατιθέμενα ποσοστά εντός παρενθέσεως αποτελούν αναγωγή στο πραγματικό N (N ^R) για κάθε μεταβλητή (όπου στην περίπτωση αυτή N ^R = N- missing values)			

4.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΜΟΖΥΓΩΤΙΑΣ – ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑΣ HLA-DRB1 ΑΛΛΗΛΙΩΝ ΣΤΟ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΓΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Όπως παρουσιάστηκε ήδη παραπάνω, εντοπίστηκαν δώδεκα (12) διαφορετικά HLA-DRB1 αλληλόμορφα στο υπό εξέταση δείγμα (συνολικά 198 ασθενείς, και άρα 396 αλληλίες). Μεταξύ των ασθενών βρέθηκαν 22 ομοζυγώτες και 176 ετεροζυγώτες. Ο πιο κοινός διπλότυπος μεταξύ των εμφανισθέντων ήταν ο *DRB1*15/11* (6.9%). Σε ότι αφορά το συνολικό δείγμα ασθενών, δεν εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg (HWP, δείτε και παρ. 3.5) [$F(1)=6.5$, $p=0.5916$]. Επιπρόσθετα, η απόκλιση Fnd στη δοκιμασία ουδετερότητας ομοζυγωτίας / ετεροζυγωτίας EW (Ewens-Watterson), για το συνολικό δείγμα, βρέθηκε σημαντικά αρνητική (Fnd= -1.5, $p=0.014$).

Πίνακας 12. Ανάλυση ομοζυγωτίας / ετεροζυγωτίας στις ομάδες fMS και sMS της μελέτης		
	fMS (N=57)	sMS (N=141)
Αριθμός αλληλίων	114	282
Διακριτά αλληλόμορφα	12	11
HWP για ομοζυγώτες	$F(1)=1.43$, $p=0.232$	$F(1)=0.02$, $p=0.886$
HWP για ετεροζυγώτες	$F(1)=0.25$, $p=0.617$	$F(1)=0.0$, $p=0.957$
Δοκιμασία ουδετερότητας EW	Fnd=-1.036, $p=0.81$	Fnd=-1.61, $p=0.0003^*$
$^*p \leq 0.05$ EW = Ewens-Watterson, HWP = Hardy-Weinberg proportions, fMS = Οικογενής Σκλήρυνση κατά Πλάκα (ΣκΠ), sMS = Σποραδική ΣκΠ		

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται οι αντίστοιχες τιμές των HWP και EW tests για τις ομάδες fMS και sMS των συμμετεχόντων στη μελέτη. Καταρχάς, δεν εντοπίστηκε σημαντική απόκλιση από τις HWP ούτε στους ασθενείς fMS ($p=0.232$ για fMS ομοζυγώτες, $p=0.617$ για fMS ετεροζυγώτες), αλλά ούτε και στους ασθενείς sMS ($p=0.886$ για sMS ομοζυγώτες, $p=0.957$ για sMS ετεροζυγώτες). Ακόμη, οι τιμές Fnd βρέθηκαν αρνητικές, τόσο για την ομάδα fMS (Fnd= -1.036, $p=0.81$) όσο και για την ομάδα sMS (Fnd= -1.61, $p=0.0003$). Από το τελευταίο αυτό αποτέλεσμα γίνεται προφανές και ότι η στατιστική σημαντικότητα της αρνητικής Fnd του συνολικού δείγματος οφείλεται κυρίως στην ομάδα sMS, και λιγότερο στην ομάδα fMS.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο διδακτορικής διατριβής με τίτλο “Ανοσογενετική μελέτη των περιστατικών οικογενούς μορφής Σκλήρυνσης κατά Πλάκας στον ελληνικό πληθυσμό, και συσχέτιση με κλινικά και παρακλινικά δεδομένα”, που εκπονήθηκε στην 1^η Παν/κη Νευρολογική Κλινική ΕΚΠΑ υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Νευρολογίας κας Μαρίας Αναγνωστούλη. Η ένταξη και αξιολόγηση των συμμετεχόντων ασθενών έγινε κατά τη χρονική περίοδο από Μάρτιο 2013 – έως Μάρτιο 2018, πρωτίστως στο χώρο των Ειδικών Ιατρείων Απομυελινωτικών Νοσημάτων του Αιγινήτειου Νοσοκομείου. Μετά την ολοκλήρωση της συλλογής των απαραίτητων δεδομένων, τόσο ανοσογενετικών (HLA-DRB1 τυποποιήσεις) όσο και μη-ανοσογενετικών (δημογραφικών, κλινικών, παρακλινικών, ιατρικού ιστορικού), για τους συμμετέχοντες fMS και sMS ασθενείς, ακολούθησε η στατιστική επεξεργασία αυτών και η εξαγωγή αποτελεσμάτων. Για τις ανάγκες των ανοσογενετικών συσχετίσεων συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε και έτερη ομάδα ελέγχου, αποτελούμενη από 246 υγιείς μάρτυρες Ελληνικής καταγωγής, που είχαν υποβληθεί σε DRB1 τυποποίηση στο πλαίσιο παλαιότερης μελέτης συνεργαζόμενης ερευνητικής ομάδας [234].

Όπως αναλύθηκε διεξοδικά παραπάνω, η ερευνητική εργασία αυτή δεν σχεδιάστηκε ως πληθυσμιακή μελέτη, συνεπώς δεν είναι δυνατό να εξαχθούν επίσημα συμπεράσματα ως προς τον επιπολασμό της fMS μεταξύ των πασχόντων Ελληνικής καταγωγής και την επίπτωσή της για τον Ελληνικό πληθυσμό. Αξίζει να αναφερθεί, ωστόσο, ότι η παρατηρηθείσα συχνότητα της fMS μεταξύ των αρχικών υποψηφίων συμμετεχόντων στη μελέτη υπολογίσθηκε στο 13.1%, ποσοστό που προσεγγίζει κατά πολύ το αντίστοιχο 12.6% που αναφέρεται στην πρόσφατη διεθνή βιβλιογραφία [37,38]. Όπως θα αναπτυχθεί λεπτομερώς και στη συνέχεια, εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε αρκετές μη-ανοσογενετικές παραμέτρους υπό διερεύνηση, μεταξύ των ομάδων fMS και sMS, οι οποίες και έτυχαν ήδη παρουσίασης σε διεθνές επιστημονικό συνέδριο συναφούς αντικειμένου

[247], όπως και αναλυτικής δημοσίευσης σε διεθνές επιστημονικό περιοδικό [248], αφού πρώτα αξιολογήθηκαν από ανεξάρτητους επιστήμονες του πεδίου της νευροανοσολογίας (review). Διαπιστώθηκαν ακόμη διαφορές στην κατανομή συχνοτήτων των DRB1 αλληλίων μεταξύ των δειγμάτων fMS και sMS, αλλά και στη σύγκριση αυτών με το γενικό πληθυσμό, οι οποίες και δημοσιεύθηκαν αναλυτικά σε έτερο διεθνές επιστημονικό περιοδικό [249], και πάλι ύστερα από ανεξάρτητη αξιολόγηση. Επισημάνθηκαν τέλος, στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ συγκεκριμένων DRB1 πολυμορφισμών και κάποιων εκ των υπό διερεύνηση φαινοτυπικών (μη-ανοσογενετικών) χαρακτηριστικών, οι οποίες και θα παρατεθούν με κριτικό τρόπο στην ενότητα 5.4 του τρέχοντος κεφαλαίου.

5.2 ΜΗ-ΑΝΟΣΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

5.2.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΝΟΣΟΥ

Όπως γίνεται σαφές από τα αποτελέσματα του Πίνακα 7, η μέση τιμή ηλικίας έναρξης νόσου των fMS ασθενών ήταν περίπου ίδια με εκείνη των sMS (30.3 vs 30.8 έτη). Έπειτα από διαστρωμάτωση του fMS δείγματος φάνηκε ότι η υποομάδα fMS ασθενών με 1^{ου} βαθμού συγγενείς πάσχοντες εμφάνιζε μία σαφέστερη τάση πρωιμότερης έναρξης (μέση τιμή 28.3 έτη, $p=0.122$ ως προς sMS). Κατά την ενδιάμεση στατιστική ανάλυση μάλιστα (interim analysis), αποτελέσματα της οποίας ήταν το αντικείμενο της 1^{ης} επιστημονικής δημοσίευσης αυτής της διατριβής [248], η εν λόγω συσχέτιση (ηλικία έναρξης σε fMS 1st vs sMS) κατείχε στατιστική σημαντικότητα ($p=0.036$), η οποία ωστόσο αμβλύθηκε και χάθηκε έπειτα από τη συνολική ενσωμάτωση των δεδομένων. Έτερες ερευνητικές ομάδες έχουν δημοσιεύσει στο παρελθόν ανάλογες παρατηρήσεις μικρότερης ηλικίας έναρξης νόσου σε fMS ασθενείς ευρωπαϊκής καταγωγής και μη, είτε με επιβεβαίωση στατιστικά σημαντικής διαφοράς ως προς την sMS ομάδα ελέγχου [47], είτε χωρίς αυτή [46]. Δεν είναι σαφές εάν αυτή η τάση αντικατοπτρίζει πραγματική παθοφυσιολογική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο υποτύπων ΣκΠ. Δεδομένης της στατιστικής αμφισημίας του εν λόγω ευρήματος, θεωρείται πιθανότερο, τουλάχιστον με βάση την παρούσα σειρά δεδομένων, να αποτελεί επίπλαστη συνέπεια της αυξημένης ‘εγρήγορσης’ που έχουν οι fMS ασθενείς ως προς την πρώιμη

αναγνώριση συμπτωμάτων της νόσου, λόγω της σχετικής εξοικείωσης τους με αυτήν (η πάθηση είναι ήδη ‘γνωστή’ στην οικογένεια).

Συμπληρωματικά με τα παραπάνω, η μελέτη της διεθνούς βιβλιογραφίας αποκαλύπτει ότι η πρόωγη ηλικία έναρξης νόσου μπορεί να προβλεφθεί πιο ικανοποιητικά ως συνάρτηση του αυξημένου ‘γενετικού φορτίου νόσου’, του συνδυασμού δηλαδή της φορείας πολλαπλών, ήδη γνωστών, επιβαρυντικών HLA (και κυρίως του *HLA-DRB1*1501*) και non-HLA πολυμορφισμών [35,250,251]. Έκπληξη, ωστόσο, αποτελεί το γεγονός ότι αυξημένο γενετικό φορτίο νόσου, δε συνεπάγεται αυτόματα και μεγαλύτερη επιρρέπεια στην οικογενή μορφή της ΣκΠ (fMS). Έχει περιγραφεί τόσο αυξημένο γενετικό φορτίο στην fMS σε σύγκριση με την sMS [250], όσο και παρόμοιες συναθροίσεις πολυμορφισμών μεταξύ των δύο μορφών [251], ενώ έχει αναφερθεί ακόμα και μικρότερο φορτίο νόσου σε περιπτώσεις fMS με 1^{ου} βαθμού συγγενείς προσβεβλημένους, πάντοτε αναφορικά με την sMS [251]. Οι ερευνητές που έκαναν αυτή τη φαινομενικά παράδοξη διαπίστωση, οδηγήθηκαν στην υπόθεση πως η οικογενής εμφάνιση της ΣκΠ πιθανώς καθορίζεται από άγνωστους μέχρι στιγμής γενετικούς πολυμορφισμούς, το πιθανότερο έξω από το MHC, ή και από μη ταυτοποιημένους περιβαλλοντικούς παράγοντες [251]. Να επισημανθεί τέλος πως ενώ το υψηλότερο γενετικό φορτίο νόσου στην sMS είναι αντιστρόφως ανάλογο της ηλικίας έναρξης της πάθησης, η συνάρτηση αυτή διαταράσσεται στην fMS [250], υποδηλώνοντας την ενδεχόμενη ύπαρξη διαφορετικών παθοφυσιολογικών δρόμων στην τελευταία.

Σαφέστερη διαφοροποίηση ως προς την ηλικία έναρξης ΣκΠ παρατηρήθηκε μεταξύ των ασθενών fMS διαφορετικών γενεών. Πιο συγκεκριμένα, έγινε έλεγχος στους ασθενείς εκείνους της υποομάδας fMS 1st που συνδέονταν με τον προσβεβλημένο συγγενή τους με κάθετο τρόπο (12 γονείς ή 1^{ης} γενιάς, 20 απόγονοι ή 2^{ης} γενιάς, δείτε Πίνακα 8). Οι ασθενείς 2^{ης} γενιάς είχαν σαφώς νεώτερη ηλικία έναρξης και μάλιστα το υπόψη αποτέλεσμα φάνηκε αρκετά ισχυρό, από στατιστικής πλευράς ($p < 0.001$). Η διαπίστωση αυτή είναι, εξ όσων γνωρίζουμε, πρωτότυπη για τον ελληνικό fMS πληθυσμό. Επίσης, βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με ανάλογες παλαιότερες παρατηρήσεις επίσπευσης μεταξύ γενεών από άλλους ανεξάρτητους ερευνητές, που είναι βασισμένες σε διάφορες ετερόκλητες, από πλευράς καταγωγής, ομάδες fMS ασθενών [46,47]. Και σε αυτή την περίπτωση, το εύρημα επιδέχεται πολλών διαφορετικών ερμηνειών. Θα μπορούσε να είναι αντικατοπτρισμός της σύγχρονης αλματώδους εξέλιξης των διαγνωστικών εργαλείων στη ΣκΠ, που κάνει

την πρόωμη διάγνωση της πάθησης στους ασθενείς νέας γενιάς περισσότερο εφικτή. Ίσως ακόμη να οφείλεται στην αυξημένη εγρήγορση των ασθενών 2^{ης} γενιάς, όπως αναλύθηκε και παραπάνω, ή/και στην καλύτερη ενημέρωση του ευρέως κοινού, στις μέρες μας, ως προς τα συμπτώματα της πάθησης γενικότερα, που οδηγεί σε ταχύτερη αναζήτηση ιατρικής βοήθειας. Από την άλλη πλευρά, θα μπορούσε να αποτελεί συνέπεια πραγματικών αλλαγών στους παθοφυσιολογικούς παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης της νόσου, με την πάροδο των δεκαετιών. Δεδομένου του διαπιστωθέντος σταθερού γενετικού υποβάθρου μεταξύ των γενεών (δείτε παρ. 4.4), η υπό εξέταση αλλαγή είναι πιθανότερο να αφορά σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, λοιμογόνους ή μη-λοιμογόνους, παρά σε γενετικούς (δείτε ενότητα 2.2.7).

Η εκτίμηση των ερευνητών της παρούσας διατριβής κλίνει υπέρ της ύπαρξης πραγματικής παθοφυσιολογικής αλλαγής πίσω από την επίσπευση στην ηλικία έναρξης νόσου στους fMS ασθενείς 2^{ης} γενιάς. Η αιτιολόγηση έχει να κάνει με την ταυτόχρονη διαπίστωση στατιστικής διαφοροποίησης και σε ένα ακόμη χρονικό χαρακτηριστικό μεταξύ των γενεών fMS, που είναι ο μέσος χρόνος μετάβασης από το CIS στη βέβαια νόσο (CDMS). Περισσότερα στοιχεία θα παρατεθούν στην αμέσως επόμενη παράγραφο, 5.2.2.

5.2.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΧΡΟΝΟ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΑΠΟ CIS ΣΕ CDMS

Μία ακόμη, άξια προς συζήτηση, διαφορά μεταξύ των ασθενών fMS παλαιότερης και νεότερης γενιάς ήταν και ο χρόνος μετάπτωσης από το CIS στη CDMS, που βρέθηκε σημαντικά μικρότερος στους τελευταίους (δείτε Πίνακα 8). Όπως και προηγουμένως, αυτή η διαπίστωση μπορεί να έχει δύο διαφορετικές αναγνώσεις. Σύμφωνα με την πρώτη ανάγνωση, η διαφορά αυτή οφείλεται στην καλύτερη ενημέρωση και αυξημένη εγρήγορση των ασθενών νέας γενιάς, ή/και στις αποτελεσματικότερες διαγνωστικές πρακτικές. Ωστόσο, πρέπει να τονισθεί ότι τα δεδομένα της εν λόγω παραμέτρου συλλέχθηκαν αναδρομικά, στους ήδη διαγνωσμένους fMS ασθενείς τόσο 1^{ης} όσο και 2^{ης} γενιάς, οπότε μπορεί να θεωρηθεί ότι στο χρόνο των συνεντεύξεων όλοι οι συμμετέχοντες ήταν εξίσου ‘εκπαιδευμένοι’ στα συμπτώματα της πάθησης, και άρα εξίσου ικανοί να τα αναγνωρίσουν εκ των υστέρων. Ακόμη, να διευκρινισθεί ότι η αναδρομική καταγραφή ενός επεισοδίου ως ‘πρώτου’ (CIS) ή δεύτερου (μετάπτωση στη CDMS), αφορούσε κυρίως την κλινική

περιγραφή και όχι τα εκάστοτε διαγνωστικά εργαλεία που είχαν χρησιμοποιηθεί στο χρόνο των γεγονότων, σε κάθε περίπτωση. Συμπερασματικά, ούτε και η ικανότητα των διαγνωστικών μεθόδων είναι πολύ πιθανό να έχει παίξει ιδιαίτερο ρόλο στα καταγραφόμενα. Τέλος, η ύπαρξη υποκείμενων ετερογενών μηχανισμών για το υπό συζήτηση μέγεθος, τουλάχιστον στην περίπτωση της fMS, υποστηρίζεται και από την εύρεση στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των υποομάδων fMS 1st και fMS 2nd/3rd (δείτε Πίνακα 7). Πιο συγκεκριμένα, ο χρόνος μετάπτωσης από το CIS στην CDMS βρέθηκε σημαντικά μεγαλύτερος στην πρώτη σε σύγκριση με τη δεύτερη υποομάδα. Θα περίμενε κανείς, επί ύπαρξης σημαντικού bias αυξημένης εγρήγορσης και ανυπαρξίας παθοφυσιολογικής διαφοράς, την εύρεση στατιστικά μη σημαντικού αποτελέσματος ή σημαντικού, αλλά αντίστροφου (βραχύτερος χρόνος στους fMS 1st σε σχέση τους fMS 2nd/3rd, λόγω μεγαλύτερης ‘οικειότητας’ με τη ΣκΠ).

Όλα τα παραπάνω, συνηγορούν ως προς την πιθανή ύπαρξη πραγματικών, ακόμη μη διευκρινισμένων, παραγόντων κινδύνου που επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο τους fMS παλαιότερης σε σχέση με τους fMS νεώτερης γενιάς, αλλά και τους fMS 1st σε σχέση τους fMS 2nd/3rd. Μεγάλες ανοσογενετικές διαφορές ανάμεσα στις υπόψη fMS υποομάδες δεν παρατηρήθηκαν, όπως θα αναπτυχθεί αναλυτικότερα και στην ενότητα 5.3, τουλάχιστον ικανές να επηρεάζουν το υπό συζήτηση μέγεθος. Επομένως, οι διαφορετικοί παράγοντες κινδύνου που εικάζονται είτε αφορούν άλλες περιοχές του γονιδιώματος, που δε μελετήθηκαν σε αυτή τη διατριβή, ή περιβαλλοντικές ετερογένειες. Είναι άλλωστε ήδη γνωστό ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου, όπως το κάπνισμα, είναι ικανοί να τροποποιούν τη μετάπτωση από το CIS στην CDMS [252].

Η διατύπωση περαιτέρω υποθέσεων σε σχέση με τα αποτελέσματα που μνημονεύθηκαν σε αυτή την παράγραφο θεωρείται επισφαλής, δεδομένου του μικρού μεγέθους των υποομάδων που εξετάστηκαν. Ακόμη, θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι υποομάδες αυτές δεν ήταν σταθμισμένες μεταξύ τους ως προς τις λαμβανόμενες θεραπείες στη φάση του CIS, παράγοντα που θα μπορούσε να τροποποιήσει την τελική έκβαση του μεγέθους του χρονικού διαστήματος μετάπτωσης.

5.2.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΕΠΙΡΡΕΠΕΙΑ ΓΙΑ ΑΛΛΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ, ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ ΤΟΥΣ

Η αυξημένη προδιάθεση γενικής αυτοανοσίας, τόσο για τους πάσχοντες από ΣκΠ (fMS ή sMS), όσο και για τους συγγενείς τους, είναι μια παρατήρηση που έχει διερευνηθεί από διάφορες ερευνητικές ομάδες κατά το παρελθόν, με αντικρουόμενα αποτελέσματα [29,45,253-256]. Ως επί το πλείστον, η διχογνωμία αφορά την πιθανότητα των ίδιων των ασθενών για ανάπτυξη έτερου αυτοανόσου νοσήματος [29,45,253-256], ενώ οι περισσότερες απόψεις συγκλίνουν υπέρ μιας αυξημένης επίπτωσης των παθήσεων αυτών στους συγγενείς τους [29,45,253,255,256]. Μεταξύ των προτεινόμενων συνυπαρχουσών διαταραχών ρευματολογικού ενδιαφέροντος, η συχνότερη διάγνωση παθήσεων του θυρεοειδούς στις οικογένειες όπου υπάρχει ΣκΠ (fMS ή sMS) φαίνεται να χαίρει γενικής αποδοχής [253,255,256].

Σε ό,τι αφορά τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όπου διερευνήθηκε η πιθανότητα εμφάνισης έτερων αυτοανόσων παθήσεων σε fMS ασθενείς και στους 1^{ου} βαθμού συγγενείς τους, σε σύγκριση με την ομάδα sMS, αυτά βρίσκονταν σε γενικές γραμμές σε συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι οι ίδιοι οι fMS ασθενείς είχαν τον ίδιο περίπου κίνδυνο εμφάνισης έτερων αυτοανόσων νοσημάτων σε σχέση με τους sMS, ωστόσο οι 1^{ου} βαθμού συγγενείς τους διαγιγνώσκονται συχνότερα με θυρεοειδίτιδα Hashimoto. Ανάλογη παρατήρηση έχει δημοσιευθεί και σε παλαιότερη έρευνα που βασιζόταν σε δείγμα ασθενών από το Ηνωμένο Βασίλειο [253]. Άλλη ερευνητική ομάδα έχει κατά το παρελθόν υποστηρίξει ότι οι συγγενείς fMS ασθενών νοσούν συχνότερα από Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου Ι σε σχέση με τις σποραδικές περιπτώσεις [45], κάτι που ωστόσο δεν επιβεβαιώθηκε στο δικό μας δείγμα.

Έχει μάλιστα αναφερθεί, ότι η αυξημένη οικογενειακή προδιάθεση για αυτοανοσία στη ΣκΠ γενικά είναι ελεγχόμενη από DRB1 πολυμορφισμούς και πιο ειδικά από τη φορεία του αλληλίου *DRB1*04* [29]. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και στο δικό μας γενικό δείγμα ασθενών, όπως θα αναλυθεί διεξοδικά στην ενότητα 5.4. Δεν εντοπίστηκαν ωστόσο αξιόλογες διαφορές στη συχνότητα φορείας του εν λόγω αλληλομόρφου μεταξύ των υποομάδων fMS και sMS, που θα μπορούσαν να εξηγήσουν εύκολα τη διαπιστωθείσα αυξημένη επίπτωση της θυρεοειδίτιδας Hashimoto στους συγγενείς της πρώτης υποομάδας. Επομένως, θα πρέπει να υποτεθεί ότι η αυξημένη προδιάθεση εμφάνισης της θυρεοειδίτιδας στις

οικογένειες fMS υπαγορεύεται από γενετικά φαινόμενα ανεξάρτητα του DRB1 τύπου, ή/και από φαινόμενα περιβάλλοντος. Δεν μπορεί βέβαια να αποκλεισθεί και ο πιθανός ρόλος διαφορετικών επιστατικών μηχανισμών ή μηχανισμών ανισορροπίας σύνδεσης, σε σχέση με το *DRB1*04*, μεταξύ των οικογενειών fMS και sMS, καθώς η μελέτη τέτοιων φαινομένων δεν αποτελούσε το αντικείμενο της παρούσας διατριβής.

Να επισημανθεί, τέλος, ότι η υποομάδα fMS 2nd/3rd ήταν ουσιαστικά η κυρίως υπεύθυνη για το υπό συζήτηση αποτέλεσμα (Hashimoto σε 1^{ou} βαθμού συγγενείς 13.6% / δείτε Πίνακα 7), σε αντιδιαστολή με την υποομάδα fMS 1st, όπου η συχνότητα της θυρεοειδίτιδας σε 1^{ou} βαθμού συγγενείς ήταν πολύ πιο κοντά σε εκείνη του δείγματος sMS ασθενών (5.7% vs 3.3%, $p=0.636$ / δείτε Πίνακα 7). Δεδομένου του ότι η συννοσηρότητα ΣκΠ και Hashimoto το πιθανότερο υπαγορεύεται από συγκεκριμένους γενετικούς παράγοντες, η παρατήρηση αυτή αποτελεί ένα ακόμη στοιχείο υπέρ της γενετικής ετερογένειας fMS 1st και fMS 2nd/3rd. Εάν άλλωστε υπήρχε κάποιος ισχυρός περιβαλλοντικός παράγοντας πίσω από την υπόψη συννοσηρότητα, θα περίμενε κανείς να βρει αυξημένη συχνότητα θυρεοειδίτιδας στους συγγενείς των fMS 1st σε σχέση με εκείνους των fMS 2nd/3rd, λόγω μεγαλύτερων ομοιοτήτων στο περιβάλλον ανάπτυξης και γενικότερης διαβίωσης, και όχι το αντίστροφο, όπως πραγματικά συνέβη.

5.2.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Σταχυολογώντας τη διεθνή βιβλιογραφία γίνεται προφανές ότι δεν υπάρχει ομοφωνία ως προς τις πιθανές κλινικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα στην fMS και την sMS. Ανάλογα με τον εκάστοτε υπό μελέτη πληθυσμό, έχουν κατά καιρούς αναφερθεί παρατηρήσεις πιο επιθετικής πορείας νόσου στην fMS [40], ή παρόμοιας πορείας νόσου σε σχέση με την sMS [41]. Έχει επίσης υποστηριχθεί διαφορετική ποσώσωση των τύπων νόσου μεταξύ των οικογενών και των σποραδικών περιπτώσεων, είτε με συχνότερη εμφάνιση RRMS [44] είτε με συχνότερη εμφάνιση PPMS [42,43] στην πρώτη κατηγορία ασθενών. Καμία από τις παραπάνω κλινικές διαφοροποιήσεις, ωστόσο, δεν επιβεβαιώθηκε από τη σύγκριση των υποομάδων fMS και sMS, που αποτέλεσαν το δείγμα της παρούσας διατριβής (δείτε Πίνακα 7). Πιο συγκεκριμένα, τόσο οι οικογενείς όσο και οι σποραδικοί ασθενείς εμφάνιζαν σε παρόμοια συχνότητα τις επιμέρους μορφές ΣκΠ (υποτροπιάζουσα διαλείπουσα,

πρωτοπαθώς προϊούσα, δευτεροπαθώς προϊούσα, προϊούσα διαλείπουσα). Ανάλογα, η φυσική ιστορία νόσου, όπως αυτή σκιαγραφείται με τη βοήθεια των δεικτών προόδου EDSS, ετησιοποιημένου ρυθμού υποτροπών (ARR) και χρόνου μετάπτωσης από CIS σε CDMS, ήταν παρόμοια μεταξύ των υπό συζήτηση ομάδων.

Το μόνο κλινικό χαρακτηριστικό που βρέθηκε να διαφέρει σε κάποιο βαθμό μεταξύ των fMS και των sMS ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη ήταν το πρώτο νευρολογικό σύμπτωμα με το οποίο εισέβαλε η νόσος τους (δείτε Πίνακα 7). Ειδικότερα, ενώ δεν εντοπίστηκαν σημαντικές αλλαγές στα εν γένει συχνότερα συμπτώματα εισβολής, ήτοι τις αιμωδίες και το θάμβος όρασης, η διπλωπία φάνηκε να απασχολεί πολύ πιο σπάνια τους πάσχοντες από fMS. Θα πρέπει στο σημείο αυτό να επισημανθεί ότι η διαπίστωση αυτής της σπανιότητας στην εμφάνιση της διπλωπίας, που είναι ένα σύμπτωμα κατεξοχήν δηλωτικό στελεχιαίας παθολογίας, είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα νευροαπεικονιστικά ευρήματα της μελέτης. Όπως θα αναλυθεί διεξοδικά στην επόμενη παράγραφο (5.2.5), η fMS είναι ενδεχόμενα σαφώς ‘πιο υπερσκηνιδιακή’ νόσος σε σχέση με την sMS.

. Η πιθανότητα να είναι αυτή η σπανιότητα εύρεσης της διπλωπίας στην fMS επίπλαστη, λόγω αυξημένης ‘οικειότητας’ των ασθενών με την πάθηση δε θεωρείται ιδιαίτερα πιθανή, καθώς οι συχνότητες των λοιπών καταγεγραμμένων πρώτων συμπτωμάτων δε βρέθηκαν επηρεασμένες. Θα περίμενε, με λίγα λόγια, κανείς, αν υπήρχε σημαντικό **συστηματικό σφάλμα (bias)** ‘αυξημένης εγρήγορσης’ στους fMS ασθενείς, να ευνοούνται από πλευράς συχνότητας άλλα, λιγότερο θορυβώδη συμπτώματα, όπως οι αιμωδίες, πράγμα που δε διαπιστώθηκε. Στον αντίλογο, αξίζει να ειπωθεί ότι ανάλογη διαφοροποίηση δεν εντοπίστηκε σε άλλα πρώτα συμπτώματα στελεχιαίας προέλευσης, όπως ο ίλιγγος, η κώφωση και η νευραλγία τριδύμου. Τα συμπτώματα αυτά βεβαίως ήταν ιδιαίτερα σπάνια ως συμπτώματα εισβολής και για την ομάδα sMS, οπότε η διαπίστωση στατιστικά σημαντικών διαφορών στην εμφάνισή τους μεταξύ των ομάδων σύγκρισης θα απαιτούσε την εξέταση πολύ μεγαλύτερου δείγματος ασθενών από το διαθέσιμο σε αυτή τη μελέτη.

5.2.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΠΑΡΑΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ (ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΑ)

Τα παρακλινικά χαρακτηριστικά που συλλέχθηκαν κατά τη διεξαγωγή αυτής της μελέτης, αφορούσαν αφενός στην συχνότητα απομόνωσης ολιγοκλωνικών ζωνών στο ENY το ασθενών και αφετέρου στην τοπογραφία και μορφολογία των απομυελινωτικών τους βλαβών στις διαθέσιμες MRI εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού. Πιο συγκεκριμένα, ως προς το τελευταίο χαρακτηριστικό, εξετάσαμε την ποιοτική, και όχι την ποσοτική, παρουσία βλαβών ξεχωριστά σε καθεμιά από τις ακόλουθες περιοχές του ΚΝΣ: υποφλοιώδεις εγκεφάλου, περικοιλιακές εγκεφάλου, στέλεχος, παρεγκεφαλίδα, αυχενικό μυελό και θωρακικό μυελό. Σε σχέση με τη μορφολογία των εστιών, εξετάσαμε μόνο την ύπαρξη ή ανυπαρξία βλαβών που πληρούσαν τα κριτήρια ώστε να χαρακτηριστούν ογκόμορφες [229-231]. Τόσο οι fMS όσο και οι sMS ασθενείς είχαν παρόμοιες πιθανότητες να φέρουν ολιγοκλωνικές ζώνες στο ENY τους (δείτε Πίνακα 7). Ογκόμορφες απομυελινωτικές βλάβες βρέθηκαν εξίσου σπάνια και στις δύο ομάδες (η μικρή συχνότητα εμφάνισης του υπόψη φαινομένου άλλωστε κατέστησε την ισχύ του οποιουδήποτε σχετικού με αυτό στατιστικού ευρήματος, στο παρόν δείγμα, αναξιόπιστη). Σημαντικές διαπιστώσεις προέκυψαν ωστόσο σε σχέση με την τοπογραφία των εστιών, οι οποίες και θα αναλυθούν στις αμέσως επόμενες παραγράφους.

Ειδικότερα, οι πάσχοντες από fMS βρέθηκαν να εμφανίζουν σημαντικά σπανιότερα απομυελινωτικές εστίες στελέχους σε σχέση με τους sMS μάρτυρες. Ανάλογη τάση, χωρίς στατιστική σημαντικότητα ωστόσο, παρατηρήθηκε και για τις παρεγκεφαλιδικές εστίες (βλέπε Πίνακα 7). Έπειτα από ομαδοποίηση των βλαβών σε υποσκηνίδιες και υπερσκηνίδιες, διαπιστώθηκε ότι η ομάδα fMS εξακολουθούσε να διατηρεί στατιστικά σημαντική προστασία έναντι των πρώτων. Αντίστροφη, αλλά όχι στατιστικά ισχυρή, τάση παρατηρήθηκε για τις εστίες αυχενικού και θωρακικού μυελού, που ήταν σχετικά συχνότερες στους fMS ασθενείς σε σύγκριση με τους sMS.

Να σημειωθεί μάλιστα ότι οι υπό συζήτηση τοπογραφικές διαφοροποιήσεις, με την παρατηρηθείσα υποσκηνιδιακή 'προστασία' στην fMS, ήταν σε συμφωνία με το κλινικό εύρημα της σπανιότερης έναρξης νόσου με διπλωπία, που σχολιάστηκε παραπάνω, στην παράγραφο 5.2.4. Δε φάνηκε, ωστόσο, να επηρεάζουν ιδιαίτερα τη γενικότερη πορεία νόσου, τουλάχιστον σε ό,τι αφορά τις υποτροπές και την πρόοδο της αναπηρίας, μεταξύ της fMS και της sMS. Προφανώς, ο συγχυτικός παράγοντας

των λαμβανόμενων θεραπειών μπορεί να έπαιξε κάποιο ρόλο σε αυτό, καθώς οι δύο ομάδες ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη δεν ήταν μεταξύ τους σταθμισμένες ως προς τη θεραπευτική αγωγή. Επιπρόσθετα, δεν μπορεί κανείς να αποκλείσει το ενδεχόμενο διαφοροποιήσεων των δύο ομάδων σε γνωσιακά ελλείμματα, καθώς δεν είχε περιληφθεί εξαρχής, από πλευράς πρωτοκόλλου της μελέτης, η νευροψυχολογική αξιολόγηση των συμμετεχόντων. Να σημειωθεί ότι έχουν περιγραφεί κατά το παρελθόν διαφοροποιημένα νευροψυχολογικά πρότυπα σε οικογένειες με πολλούς πάσχοντες από ΣκΠ [31], καθώς και οικογένειες ΣκΠ με προεξάρχουσα φλοιώδη προσβολή [257]. Να ξεκαθαριστεί, τέλος, ότι οι δύο ομάδες της μελέτης (fMS και sMS) ήταν σταθμισμένες ως προς τη διάρκεια νόσου, ώστε να ελαχιστοποιηθεί το ενδεχόμενο χρονικού *bias*, κατά την αξιολόγηση των MRI των συμμετεχόντων.

Αναπόφευκτα, η οποιαδήποτε προσπάθεια ερμηνείας των υποκείμενων παθοφυσιολογικών μηχανισμών που οδηγούν στη διαφορετική τοπογραφία βλαβών μεταξύ fMS και sMS δεν μπορεί παρά να είναι εξαιρετικά πολύπλοκη. Τα αίτια θα πρέπει να αναζητηθούν στα επιμέρους χαρακτηριστικά των αντιγονικών στόχων εντός του ΚΝΣ, των επιτόπιων μηχανισμών ανοσίας, των κυκλοφορούντων κυττάρων φλεγμονής και των σημείων εισόδου αυτών διαμέσου του BBB, που είναι και οι παράγοντες που επηρεάζουν αυτήν την τοπογραφία, κατά γενική ομολογία [258]. Περαιτέρω ανάλυση επί του θέματος δε δύναται να γίνει, καθώς εκφεύγει των διαπιστώσεων και των αντικειμενικών στόχων της παρούσας μελέτης. Αξίζει μόνο να αναφερθεί, ως κατακλείδα, ότι η τοπογραφία των βλαβών στη ΣκΠ έχει προηγουμένως συνδεθεί και με συγκεκριμένους γονιδιακούς πολυμορφισμούς, MHC και non-MHC, με τη βοήθεια GWAS [259,260]. Τα λειτουργικά προϊόντα των εν λόγω non-MHC πολυμορφισμών, αφορούν σε πρωτεΐνες κυττάρων φλεγμονής και σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε μηχανισμούς νευρωνικής ωρίμανσης και αναγέννησης. Δε θα ήταν παράλογο λοιπόν να υποθέσει κανείς πως κάποιος ή κάποιοι από αυτούς τους πολυμορφισμούς αφενός προδιαθέτει/-ουν στην εκδήλωση fMS, και αφετέρου τροποποιεί/-ούν τις θέσεις εκδήλωσης των βλαβών της πάθησης.

5.2.6 ΓΟΝΕΪΚΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Όπως ήδη αναφέρθηκε στην ενότητα 4.1, ο τρόπος μεταβίβασης της νόσου, όπου αυτός ήταν δυνατό να διαπιστωθεί για τους υπό μελέτη fMS ασθενείς (N=100), βρέθηκε προεξάρχοντως μητρικός (59%). Το αποτέλεσμα αυτό αφορούσε αφενός

ζεύγη ασθενών που συνδεόταν με 1^ο βαθμό συγγένειας (γονέας – τέκνο) και αφετέρου ζεύγη 2^{ου}/3^{ου} βαθμού συγγένειας (γιαγιά/παππούς – εγγονός/εγγονή, θείος/θεία – ανηψιός/ανηψιά, ξαδέλφια). Στην τελευταία αυτή κατηγορία εξετάστηκε εάν ο μη-προσβεβλημένος γονέας συνδετικός κρίκος μεταξύ των ασθενών ήταν πατέρας ή μητέρα.

Το υπόψη αποτέλεσμα βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες επιδημιολογικές μελέτες στη ΣκΠ, βασισμένες σε διαφορετικούς πληθυσμούς, που έχουν επίσης αναδείξει παρόμοια προτίμηση στη μητρική μεταβίβαση (parent-of-origin effect). Για παράδειγμα, μελέτες προσβεβλημένων γονέων-απογόνων έχουν δείξει ότι τα ζεύγη μητέρας-κόρης είναι πολύ πιο συχνά σε σχέση με εκείνα πατέρα-γιού [261,262]. Επιπρόσθετα, σε οικογένειες με προσβεβλημένους γονέα-παιδί ήταν πολύ πιο πιθανό να εμφανιστεί και άλλο τέκνο με τη νόσο, όταν ο πάσχων γονέας ήταν μητέρα [263]. Ακόμη, ετεροθαλή αδέρφια ασθενών βρέθηκε ότι διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν την νόσο σε περιπτώσεις κοινής μητέρας, παρά πατέρα [224]. Τέλος, οι εν λόγω παρατηρήσεις έχουν επιβεβαιωθεί και σε περιπτώσεις ζευγών θείου/θείας-ανηψιού/ανηψιάς, όπου ο μη προσβεβλημένος γονέας συνδετικός κρίκος ήταν πολύ συχνότερα μητέρα [264].

Να επισημανθεί μάλιστα ότι παλαιότερες ανοσογενετικές μελέτες σε προσβεβλημένα ζεύγη ασθενών έχουν συνδέσει τη μητρική προτίμηση στον τρόπο κληρονόμησης της νόσου με τη μεταβίβαση συγκεκριμένων HLA-DRB1 πολυμορφισμών, και κυρίως του *DRB1*15* [265]. Συμπληρωματικά, έχει υποστηριχθεί η μητρική μεταβίβαση DRB1 πολυμορφισμών, επηρεάζει τη σημασία που παίζουν συγκεκριμένες επιστατικές αλληλεπιδράσεις στα τέκνα. Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε ότι το αλλήλιο *DRB1*08* αύξανε τον κίνδυνο εκδήλωσης ΣκΠ σε γυναίκες φορείς, μόνο όταν κληρονομούνταν από τις μητέρες αυτών, και μόνο μέσω επιστατικής συνεργασίας με άλλο συνυπάρχον αλλήλιο το *DRB1*15* (από τον πατέρα) [265]. Δεν θα έπρεπε να παραληφθεί, βεβαίως, ότι παρόμοιες επιστατικές αλληλεπιδράσεις, εξαρτώμενες από τη γονεϊκή μεταβίβαση, έχουν παρατηρηθεί και σε πατρικό τρόπο μεταβίβασης, σε συγκεκριμένους πληθυσμούς ΣκΠ. Λόγου χάρη, το αλλήλιο *HLA-DRB1*17* έχει χαρακτηριστεί ως ο πιο συνδεδεμένος με τη ΣκΠ απλότυπος σε ασθενείς από τη Σαρδηνία [266]. Βρέθηκε ότι η επίδρασή του αυτή στον κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου ισχύει κυρίως όταν κληρονομείται από πατέρα σε κόρη [267]. Αρνητικές συνέπειες εξακολουθούν να υπάρχουν και σε περιπτώσεις

μετάδοσης πατέρα-γιού, μόνο σε απουσία του *DRB1*15* ως έτερου απλότυπου (από τη μητέρα) [265].

Προφανώς, επιβεβαίωση ή αμφισβήτηση των παραπάνω παρατηρήσεων δεν μπορεί να γίνει στο δείγμα της παρούσας διατριβής, καθώς η γενετική τυποποίηση που έγινε αφορούσε μόνο τον ασθενή-δείκτη από κάθε προσβεβλημένο ζεύγος, και όχι τους συγγενείς αυτού. Η συγκεκριμένη μελέτη, άλλωστε, δεν είχε ως πρωταρχικό της στόχο τη διερεύνηση του τρόπου κληρονόμησης *DRB1* πολυμορφισμών, αλλά τη σύγκριση του ανοσογενετικού υποβάθρου ασθενών πασχόντων από fMS και sMS.

5.3 ΑΝΟΣΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

5.3.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΟΥ ΑΛΛΗΛΙΟΥ *HLA-DRB1*15*

Η πρώτη σημαντική διαπίστωση που προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση των ανοσογενετικών δεδομένων, και στην οποία αξίζει να επικεντρωθεί κανείς, είναι η διατήρηση της σημασίας του αλληλίου *DRB1*15* στο κίνδυνο ανάπτυξης της fMS, κατά τρόπο παρόμοιο με την sMS. Τα ευρήματά μας αυτά συμφωνούν με εκείνα προηγούμενων ερευνών, σε δείγματα fMS ασθενών από τη Βραζιλία [268] και την Ιταλία [269], και είναι πρωτότυπα για τον ελληνικό πληθυσμό. Από τη στατιστική επεξεργασία, μάλιστα, της παρούσας διατριβής προκύπτουν περαιτέρω πληροφορίες, από τις απευθείας συγκρίσεις των ομάδων fMS και sMS και τη διαστρωμάτωση του fMS δείγματος ανάλογα με την εγγύτητα των προσβεβλημένων συγγενών. Πιο συγκεκριμένα, ενώ η συχνότητα του *DRB1*15* ήταν σχεδόν η ίδια μεταξύ των γενικών ομάδων fMS και sMS, και ταυτόχρονα σημαντικά αυξημένη και στις δύο περιπτώσεις ως προς την ομάδα αναφοράς των υγιών μαρτύρων, φαίνεται ότι το αποτέλεσμα για την fMS αποδίδεται κατά πολύ περισσότερο στην υποομάδα fMS 2nd/3rd σε σύγκριση με την fMS 1st (δείτε Πίνακες 9 και 10). Είναι μάλιστα ιδιαίτερα εντυπωσιακό το εύρημα της έλλειψης στατιστικής σημαντικότητας στη σύγκριση συχνοτήτων εμφάνισης του υπό συζήτηση αλληλίου, μεταξύ της υποομάδας fMS 1st και της ομάδας των υγιών μαρτύρων.

Θα μπορούσε λοιπόν δικαιολογημένα να υποθέσει κανείς ότι το *DRB1*15* επηρεάζει ασθενέστερα τις οικογένειες όπου η νόσος εκδηλώνεται σε πολλαπλούς,

πιο στενά συνδεδεμένους συγγενείς, σε σχέση με ζεύγη συγγενών μακρυνότερης συγγένειας, αλλά και σε σχέση με τις σποραδικές περιπτώσεις. Επιχειρώντας μία πρώτη ερμηνεία της παρατήρησης αυτής θα μπορούσε να ειπωθεί ότι προκειμένου να προσβληθούν στενοί συγγενείς από τη νόσο δεν αρκεί μόνο η φορεία του *DRB1*15* από πλευράς γενετικής προδιάθεσης, αλλά πρέπει να συναθροιστούν και πολλαπλοί HLA non-*DRB1* ή/και non-HLA γενετικοί πολυμορφισμοί. Από την άλλη πλευρά είναι γνωστό ότι υπάρχουν επιστατικοί μηχανισμοί μεταξύ των διαφορετικών γενετικών τόπων του MHC που μπορούν επίσης να τροποποιούν τον κίνδυνο ανάπτυξης ΣκΠ, όπως η αλληλεπίδραση ανάμεσα σε *HLA-DRB1*15:01*, *HLA-DQA1*01:02* και *HLA-DQB1*06:02* [270-272]. Ο γονεϊκός τρόπος μεταβίβασης, όπως αναφέρθηκε ήδη και στην προηγούμενη παράγραφο 5.2.6, δύναται επίσης να τροποποιεί τη σημασία και την ισχύ τέτοιων φαινομένων επίστασης. Η πιθανότητα ύπαρξης ανάλογων μηχανισμών στην περίπτωση της fMS δεν μπορεί να αποκλεισθεί, καθώς η τυποποίηση έτερων γονιδιακών τόπων δεν ήταν στα αντικείμενα αυτής της μελέτης, αλλά ούτε και η διερεύνηση του τρόπου κληρονόμησης των *DRB1* αλληλομόρφων μεταξύ των γενεών. Η μεμονωμένη επίδραση πάντως του αλληλίου *HLA-DRB1*15* στην ανάπτυξη fMS δε φαίνεται να είναι ούτε καθαρά ‘ποσοτική’, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω, στην παράγραφο 5.3.4, περί ομοζυγωτίας και ετεροζυγωτίας. Με άλλα λόγια, αν κάτι τέτοιο ήταν αλήθεια, θα περίμενε κανείς οι ομοζυγώτες *DRB1*15* να είναι πιο συχνοί μεταξύ του fMS δείγματος, σε σύγκριση με το δείγμα sMS, κάτι που όμως δεν παρατηρήθηκε.

Δεν δύναται τέλος να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο μεγαλύτερης επιρροής αταυτοποίητων περιβαλλοντικών παραγόντων στις περιπτώσεις fMS 1st, σε σχέση με τις άλλες υπό μελέτη ομάδες ασθενών, οι οποίοι και δύνανται να υποβαθμίζουν σε ένα ποσοστό το γενετικό υπόβαθρο. Η σημασία των περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου στη ΣκΠ έχει διεξοδικά συζητηθεί στο 2^ο κεφάλαιο της διατριβής και αποδεικνύεται εύκολα από τα αποτελέσματα προηγούμενων επιδημιολογικών ερευνών, όπως για παράδειγμα μελετών μήνα γέννησης ασθενών και μελετών πρώιμης και όψιμης μετανάστευσης [δείτε παρ. 2.2.7ε]. Μελέτες μονοζυγωτικών διδύμων μάλιστα, έχουν αποδείξει ότι ακόμη και επί πανομοιότυπου γενετικού υλικού, το 70% της πιθανότητας ανάπτυξης της πάθησης καθορίζεται από το περιβάλλον [81]. Συμπερασματικά, είναι λογικό οι συγγενείς πρώτου βαθμού, που στις περισσότερες περιπτώσεις ζουν κάτω από την ίδια στέγη, να επηρεάζονται και πιο αποφασιστικά από κάποιον κοινό επιβλαβή περιβαλλοντικό παράγοντα, σε σχέση

με άλλους υποψήφιους ασθενείς (με ιστορικό μακρυνών συγγενών προσβεβλημένων ή χωρίς).

5.3.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΟΥ ΑΛΛΗΛΙΟΥ *HLA-DRB1*11*

Έτερη σημαντική παρατήρηση που προέκυψε από τη μελέτη των αποτελεσμάτων της ανοσογενετικής τυποποίησης των συμμετεχόντων αφορά την συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου *HLA-DRB1*11*. Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί πιθανός προστατευτικός ρόλος του εν λόγω αλληλίου έναντι της εκδήλωσης ΣκΠ, έπειτα από επιδημιολογικές μελέτες ασθενών από χώρες της Μέσης Ανατολής και της Βορείου Αφρικής [32], αλλά και σε μελέτες πληθυσμών Καυκασιανής προέλευσης [273,274]. Ανάλογες ήταν και οι παρατηρήσεις του δικού μας Εργαστηρίου, έπειτα από παλαιότερες μελέτες ανοσογενετικής τυποποίησης ασθενών Ελληνικής καταγωγής [25,31].

Αναφορικά με το παρόν δείγμα ασθενών, ο πιθανός προστατευτικός ρόλος του *DRB1*11* επιβεβαιώθηκε μόνο για την υποομάδα των sMS ασθενών, με στατιστικά σημαντική μείωση της συχνότητας εμφάνισης του σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (δείτε Πίνακες 9 και 10). Η αντίστοιχη συχνότητα του αλληλίου στην ομάδα fMS βρέθηκε να προσεγγίζει εκείνη του γενικού πληθυσμού, με αποτέλεσμα την εξάλειψη της στατιστικής σημαντικότητας στη μεταξύ τους σύγκριση. Το αποτέλεσμα αυτό φάνηκε να αποδίδεται πρωτίστως στην υποομάδα fMS 1st, και λιγότερο στην ομάδα fMS 2nd/3rd όπου η συχνότητα του *DRB1*11* βρέθηκε κάπου μεταξύ εκείνων του γενικού πληθυσμού και της sMS.

Η προσπάθεια ερμηνείας της συγκεκριμένης παρατήρησης κινείται στο ίδιο μήκος κύματος με όσα συζητήθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο σχετικά με τις διακυμάνσεις στη συχνότητα αντίχνευσης του *HLA-DRB1*15*. Με άλλα λόγια, αποτελεί ένα ακόμη στοιχείο υπέρ της σχετικά υποβαθμισμένης επίδρασης του *DRB1* τύπου στην fMS. Όπως το *DRB1*15* δεν είναι ικανό από μόνο του να προκαλέσει fMS, αλλά χρειάζεται τη συνύπαρξη έτερων γενετικών πολυμορφισμών, επιστατικών αλληλεπιδράσεων, ή/και συγκεκριμένων επιβαρυντικών περιβαλλοντικών παραγόντων, έτσι και το *DRB1*11* δεν είναι αρκούντως ισχυρό για να προστατεύσει απόλυτα έναντι της γένεσης της πάθησης. Στον αντίλογο, βεβαίως, θα μπορούσε να

ειπωθεί ότι αυτό το αποτέλεσμα οφείλεται σε τύπου I στατιστικό λάθος, δεδομένης της γενικά αυξημένης συχνότητας του *DRB1*11* στο γενικό πληθυσμό (ήταν το συχνότερα ευρισκόμενο *DRB1* αλληλίο σε όλες τις ομάδες της μελέτης (δείτε πίνακες 9 και 10). Παρόλα αυτά, η ισχύς των στατιστικών παρατηρήσεων που μόλις αναφέρθηκαν δικαιολογεί περαιτέρω μελλοντικό έλεγχο της υπό συζήτηση υπόθεσης σε μεγαλύτερα δείγματα ασθενών.

5.3.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΟΥ ΑΛΛΗΛΙΟΥ *HLA-DRB1*12*

Τελευταίο στατιστικά σημαντικό εύρημα της ανάλυσης των ανοσογενετικών δεδομένων της μελέτης, μετά και από διόρθωση B-Y, ήταν εκείνο της συχνότερης εμφάνισης του αλληλίου *DRB1*12* στην ομάδα των sMS ασθενών, σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό (δείτε Πίνακες 9 και 10). Ανάλογη διαπίστωση δεν έγινε σε σχέση με τη γενική ομάδα fMS, ή τις υποομάδες αυτής. Προφανώς, η ερμηνεία του υπόψη αποτελέσματος οφείλει να γίνει με ιδιαίτερη προσοχή, λόγω της εν γένει χαμηλής συχνότητας εύρεσης του αλληλίου στον Ελληνικό πληθυσμό (εντοπίσθηκε στο 2% του δείγματος των υγιών μαρτύρων και στο 5% του δείγματος sMS).

Με άλλα λόγια, δεν μπορούν να διατυπωθούν αξιόπιστες υποθέσεις ως προς τον αιτιοπαθογενετικό ρόλο του *DRB1*12* στη ΣκΠ, με βάση τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης και μόνο. Μεγαλύτερα δείγματα ασθενών πρέπει να εξετασθούν ώστε να διαπιστωθεί εάν η φορεία του εν λόγω αλληλίου λειτουργεί ως παράγοντας κινδύνου, τουλάχιστον για ανάπτυξη sMS στον Ελληνικό πληθυσμό. Ανατρέχοντας στη διεθνή βιβλιογραφία, γίνεται προφανές ότι το *DRB1*12* συναντάται συχνότερα σε πληθυσμούς Ασιατικής καταγωγής, όπου η αύξηση της συχνότητας του έχει συσχετισθεί με κάποια νοσήματα αυτοάνοσης αρχής, όπως η PR3-ANCA (Proteinase-3 Antineutrophil Cytoplasmic Antibody) θετική αγγειίτιδα [275]. Σε σχέση με τη ΣκΠ, συγκεκριμένος ρόλος του αλληλίου έχει υποστηριχθεί σε δείγμα ασθενών από την Ιαπωνία. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι η φορεία του *DRB1*12*, και κυρίως όταν αυτό συνυπήρχε με το *DRB1*15*, προδιέθετε στη συχνότερη αντίχνευση αντισωμάτων έναντι Ακουαπορίνης-4 σε ασθενείς που κατά τα άλλα παρουσίαζαν σύνδρομο με κλινικό φαινότυπο περισσότερο συμβατό με ΣκΠ [276]. Προφανώς, ανάλογος παραλληλισμός για το δικό μας πληθυσμό δεν μπορεί να

υποστηριχθεί, καθώς κάτι τέτοιο εκφεύγει πολύ των στόχων της παρούσας διατριβής. Έχει, τέλος, αναφερθεί πιθανή συσχέτιση του *DRB1*12* με το απεικονιστικό φορτίο νόσου [277], εύρημα που επίσης δεν επιβεβαιώθηκε στη δική μας μελέτη.

5.3.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΟΜΟΖΥΓΩΤΙΑΣ / ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑΣ *DRB1* ΑΠΛΟΤΥΠΩΝ.

Προτού διερευνηθεί η ποσόστωση και η ενδεχόμενη σημασία των φαινομένων ομοζυγωτίας ή ετεροζυγωτίας των *DRB1* αλληλίων, στις υπό διερεύνηση ομάδες ασθενών, έπρεπε πρώτα να ξεκαθαριστεί ότι το δείγμα ΣκΠ πληθυσμού που συμμετείχε στη διατριβή ήταν ομοιογενές μεταξύ γενεών. Έπρεπε ακόμη να αποκλεισθεί η περίπτωση μη τυχαίου συνδυασμού διπλοτύπων (π.χ. αιμομιξία, μη τυχαία επιλογή ζευγών κλπ / δείτε και παράγραφο 3.5). Η εν λόγω στατιστική καταλληλότητα, επιβεβαιώθηκε με τη βοήθεια των ισορροπιών Hardy-Weinberg, για τις οποίες δε βρέθηκαν σημαντικές αποκλίσεις ούτε για το συνολικό δείγμα ασθενών, αλλά ούτε και για τις επιμέρους ανιχνευθείσες υποομάδες ομοζυγωτών και ετεροζυγωτών (δείτε παράγραφο 4.4 και Πίνακα 12).

Σε ένα δεύτερο βήμα, εξετάστηκαν οι δοκιμασίες ουδετερότητας ομοζυγωτίας /ετεροζυγωτίας EW που ανέδειξαν σημαντικά αρνητικές αποκλίσεις Fnd τόσο για το συνολικό δείγμα, όσο και για την ομάδα sMS. Η Fnd για την ομάδα fMS ήταν επίσης αρνητική, χωρίς ωστόσο να ανιχνευθεί στατιστική σημαντικότητα. Όπως ήδη αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.4, τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να ερμηνευθούν ως προτίμηση της ετεροζυγωτίας έναντι της ομοζυγωτίας στον υπό διερεύνηση πληθυσμό, ή έστω ως ανυπαρξία οποιασδήποτε προτίμησης (σε κάθε περίπτωση, σίγουρα δεν προτιμάται η ομοζυγωτία *DRB1* ούτε στους fMS ούτε στους sMS ασθενείς). Η παρατήρηση αυτή είναι σε αρμονία με τις υπόλοιπες ανοσογενετικές παρατηρήσεις της διατριβής, καθώς υποστηρίζει ότι η *DRB1* περιοχή του MHC δεν είναι ικανή από μόνη της να προκαλέσει fMS. Με άλλα λόγια, αν κάτι τέτοιο ήταν αλήθεια, θα περίμενε κανείς η ομοζυγωτία του *DRB1*15*, του κατεξοχήν αλληλομόρφου κινδύνου για ανάπτυξη ΣκΠ, να ευνοείται στο fMS δείγμα τουλάχιστον, τροποποιώντας τα παραπάνω αποτελέσματα. Κάτι τέτοιο ωστόσο δε βρέθηκε καθώς όπως φαίνεται η γενετική προδιάθεση στην fMS δεν είναι συνέπεια ποσοτικής άθροισης ενός μόνο πολυμορφισμού κινδύνου, αλλά ταυτόχρονης

συνεύρεσης πολλαπλών ανεξάρτητων πολυμορφισμών ή/και επιστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους.

Να σημειωθεί, μάλιστα, ότι οι ομοζυγωτίες πολυμορφισμών εντός του MHC έχουν κατά το παρελθόν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη άλλων αυτοανόσων παθήσεων, όπως η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα [278], η κοιλιοκάκη [279], ή και με διαταραχές όπως η νόσος μοσχεύματος κατά ξενιστή [280]. Κάποιες από τις υπόψη ομοζυγωτίες βέβαια αφορούσαν ακολουθίες νουκλεοτιδίων [278], εκφεύγοντας του στενού ορισμού του μεμονωμένου γενετικού τόπου (μπορεί να ήταν μεγαλύτερες ή μικρότερες από αυτόν). Τέτοιες ακολουθίες φάνηκε ότι μπορεί να έχουν συμπεριφορά υπολειπόμενου γονιδίου, και άρα η ομοζυγωτία τους πιθανόν επαυξάνει το παραγόμενο ‘επιβλαβές’ παθοφυσιολογικό αποτέλεσμα. Αντίστοιχη ‘υπολειπόμενη’ συμπεριφορά δε διαπιστώσαμε για την περιοχή DRB1 στη ΣκΠ, τουλάχιστον για τα πλήρη αλληλόμορφα. Από την παρούσα μελέτη βέβαια δεν δύναται να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο κάποια επιμέρους, μη πλήρη, τμήματα των DRB1 αλληλίων να παρουσιάζουν ανάλογες ιδιότητες ‘υπολειπόμενων γονιδίων’.

5.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΗΛΑ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ – ΚΛΙΝΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ

Στην παράγραφο αυτή συζητούνται οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις επιμέρους DRB1 πολυμορφισμών και συγκεκριμένων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, όπως αυτές εντοπίστηκαν στο υπό μελέτη δείγμα. Πρώτη διαπίστωση που αξίζει να σχολιαστεί είναι η εύρεση αρνητικής σχέσης μεταξύ της παρουσίας του *DRB1*03* και της ηλικίας έναρξης της ΣκΠ στο συνολικό δείγμα ασθενών (πρωιμότερη ηλικία έναρξης στους φορείς του αλληλίου). Αυτό το εύρημα είναι σε συμφωνία με τις διαπιστώσεις παλαιότερης μελέτης του Εργαστηρίου Ανοσογενετικής της 1^{ης} Παν/κης Νευρολογικής Κλινικής ΕΚΠΑ, σε γενικό δείγμα ασθενών ΣκΠ Ελληνικής καταγωγής [25]. Η συσχέτιση αυτή επιβεβαιώθηκε και για την υποομάδα των sMS ασθενών, αλλά έχασε τη σημαντικότητά της στην περίπτωση της υποομάδας fMS (δείτε Πίνακα 11). Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι το *DRB1*03* έχει πολλάκις περιγραφεί και ως αλληλίο κινδύνου ανάπτυξης ΣκΠ, σε διάφορες μελέτες ετερογενών πληθυσμών νοσούντων από τη νόσο [1,32,281,282], και θεωρείται ως το μοναδικό άλλο επιβεβαιωμένο DRB1 αλληλίο κινδύνου για εκδήλωση ΣκΠ εκτός του *DRB1*15* [281,282]. Στην περίπτωση του δείγματος ασθενών αυτής της διατριβής, επιβεβαιώθηκε ανάλογη ισχυρή τάση αυξημένης

συχνότητας εύρεσης του αλληλίου στις ομάδες fMS και sMS, σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό (δείτε Πίνακες 9 και 10) χωρίς ωστόσο να ξεπεραστεί το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ($p=0.056$ στη σύγκριση fMS 1st με την ομάδα υγιών μαρτύρων).

Η επόμενη παρατήρηση που θα πρέπει να μνημονευθεί είναι η εύρεση σημαντικά θετικής συσχέτισης μεταξύ φορείας του *DRB1*04* από τους ασθενείς του δείγματος και εμφάνισης αυτοανώσων νοσημάτων στους 1^{ου} βαθμού συγγενείς τους. Η υπό συζήτηση σημαντικότητα αφορούσε το συνολικό δείγμα της μελέτης και όχι τις επιμέρους ομάδες fMS και sMS (δείτε Πίνακα 11). Ανάλογα ευρήματα έχουν δημοσιευθεί στο παρελθόν και σε μελέτη δείγματος ΣκΠ ασθενών από τη βορειοανατολική Ιταλία, ως προς τη φορεία του αλληλίου *DRB1*04:01* [29]. Άλλες βιβλιογραφικές αναφορές αποδίδουν στα *DRB1*04* αλληλόμορφα ρόλο στην παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι των Ιντερφερονών [283], και στην δημιουργία φλοιωδών απομυελινωτικών εστιών [284]. Έχει ακόμη υποστηριχθεί αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης της ΣκΠ για τους φορείς του *DRB1*04* [32,285], αλλά και ηπιότερη βαρύτητα νόσου [286], παρατηρήσεις που δεν επιβεβαιώθηκαν, ωστόσο, στο δικό μας δείγμα ασθενών.

Ένα ακόμη εύρημα που είναι σκόπιμο να αναφερθεί έχει να κάνει με την αρνητική συσχέτιση μεταξύ του αλληλίου *DRB1*13* και της συχνότητας της οπτικής νευρίτιδας, ως πρώτου συμπτώματος της ΣκΠ. Και πάλι, η συγκεκριμένη παρατήρηση ξεπέρασε το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας μόνο για το συνολικό δείγμα ασθενών και όχι για τις επιμέρους ομάδες fMS και sMS (Πίνακας 11). Το *DRB1*13* δε φάνηκε να επηρεάζει τη συχνότητα άλλων πιθανών πρώτων συμπτωμάτων της πάθησης, ούτε και την εξέλιξη των υπολοίπων, υπό εξέταση, κλινικών μεγεθών. Η συγκεκριμένη παρατήρηση σχετικά με το ρόλο του *DRB1*13* στην οπτική νευρίτιδα είναι πρωτότυπη βιβλιογραφικά, σύμφωνα τουλάχιστον με όσα γνωρίζουν οι ερευνητές της παρούσας μελέτης. Υπάρχει μία μόνο αναφορά σχετική με επιδράσεις *DRB1* αλληλίων στην οπτική νευρομυελίτιδα, όπου όμως η συχνότητα εμφάνισης του *DRB1*13* στους πάσχοντες ήταν ανάλογη εκείνης του γενικού πληθυσμού [287]. Από την άλλη έχει υποστηριχθεί πιθανός προστατευτικός ρόλος του αλληλίου έναντι της εκδήλωσης ρευματολογικών νοσημάτων γενικότερα, αλλά κυρίως έναντι του Συστηματικού Ερυθρηματώδους Λύκου, της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας, του Σκληροδέρματος, της Ψωριάσης και της Ψωριασικής αρθρίτιδας [288,289], ακόμη και με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (μεγαλύτερη προστασία στους

ομοζυγώτες) [288]. Μια ανάλογη παρατήρηση έχει δημοσιευθεί και για πληθυσμό ΣκΠ ασθενών από τη Σλοβακία [290]. Στο δικό μας δείγμα ασθενών, παρόλα αυτά, δεν επιβεβαιώθηκε υποαντιπροσώπηση του *DRB1*13* στις ομάδες fMS και sMS, σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (δείτε Πίνακες 9 και 10).

Σημαντικές στατιστικά συσχετίσεις εντοπίστηκαν επίσης και σε σχέση με την παρουσία του αλληλίου *DRB1*14*. Λεπτομερέστερα, βρέθηκε ότι οι φέροντες το αλληλίο απολάμβαναν σχετική προστασία έναντι της εμφάνισης απομυελινωτικών βλαβών στο θωρακικό τους μυελό, αλλά και γενικότερα στο νωτιαίο τους μυελό. Και σε αυτή την περίπτωση, η παρατήρηση αφορούσε το συνολικό δείγμα συμμετεχόντων, και όχι τις επιμέρους ομάδες fMS και sMS (δείτε Πίνακα 11). Ανάλογη διαπίστωση δεν έχει δημοσιευθεί, εξ όσων γνωρίζουμε, μέχρι στιγμής από άλλες ερευνητικές ομάδες. Ως προς την κατανομή των απομυελινωτικών βλαβών έχει μόνο υποστηριχθεί ότι η παρουσία του αλληλίου μπορεί να σχετίζεται με αυξημένο συνολικό όγκο T2 βλαβών στις MRI εγκεφάλου των πασχόντων [291]. Επαλήθευση αυτού του ισχυρισμού στο δικό μας δείγμα ασθενών δεν ήταν δυνατόν να γίνει, καθώς η καταγραφή των νευροαπεικονιστικών δεδομένων ήταν, από πλευράς πρωτοκόλλου, ποιοτική (παρουσία/ απουσία – ναι/όχι σε συγκεκριμένες περιοχές του ΚΝΣ) και όχι ποσοτική. Επισημαίνεται ακόμη ότι το *DRB1*14* συγκαταλέγεται από διάφορους μελετητές μεταξύ των αλληλίων που έχουν πιθανώς προστατευτικό ρόλο έναντι της εκδήλωσης ΣκΠ, σε ασθενείς Καυκασιανής [282] ή Νοτιοαμερικανικής προέλευσης [292]. Η υπόθεση αυτή επαληθεύθηκε μερικώς για την fMS ομάδα της διατριβής, που παρουσίαζε σαφώς χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης του αλληλίου σε σχέση με την ομάδα υγιών μαρτύρων ($p=0.048$), με τη στατιστική σημαντικότητα της σύγκρισης ωστόσο να χάνεται έπειτα από τη εφαρμογή της διόρθωσης B-Y. Ενδεχομένως μεγαλύτερα δείγματα ασθενών να οδηγούσαν και σε ισχυρότερα στατιστικά αποτελέσματα ως προς το ρόλο του *DRB1*14* στον πληθυσμό των Ελλήνων ΣκΠ ασθενών. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι η φορεία τόσο του *DRB1*14*, όπως και του προαναφερθέντος *DRB1*13* αλληλίου, μπορεί να σχετίζεται με αντιδράσεις αντιδράσεις αναφυλακτικού τύπου σε ασθενείς που λαμβάνουν Natalizumab [293].

Κλείνοντας αυτή την ενότητα, θα πρέπει να επισημανθούν κάποιες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις που εντοπίστηκαν στο υπό μελέτη δείγμα ασθενών, ως προς την παρουσία ή απουσία του αλληλίου *DRB1*16* (δείτε Πίνακα 11). Πρώτον, οι φέροντες το αλληλίο στο συνολικό δείγμα (fMS και sMS) εμφάνιζαν σημαντικά

σπανιότερα απομυελινωτικές βλάβες θωρακικού μυελού. Δεύτερον, οι *DRB1*16* θετικοί ασθενείς της ομάδας sMS παρουσίαζαν σημαντικά ταχύτερη μετάβαση από τη φάση του CIS στη φάση της CDMS. Τέλος, οι *DRB1*16* θετικοί sMS ασθενείς, και πάλι, παρουσίαζαν σημαντικά συχνότερα ογκόμορφες απομυελινωτικές βλάβες σε σχέση με τους μη φέροντες το αλληλίο. Θα πρέπει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι καμία από τις παραπάνω παρατηρήσεις δεν έχει ξανά αναφερθεί σε παλαιότερες ανοσογενετικές μελέτες, τουλάχιστον σε γνώση των ερευνητών της παρούσας διατριβής. Ο ρόλος του *DRB1*16* στη ΣκΠ εν γένει, άλλωστε, είναι λίγο – πολύ αδιευκρίνιστος. Έχει μονάχα περιγραφεί προηγουμένως ως πιθανός προστατευτικός παράγοντας έναντι της νόσου, όχι ξεχωριστά αλλά ως μέρος του απλοτύπου *DRB1*16:01-DQB1*05:02*, σε πληθυσμό ΣκΠ ασθενών από τη Σαρδηνία [294]. Κατά τα άλλα, το *DRB1*16* έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης έτερων αυτοανώσων διαταραχών, όπως η anti-NMDAR (N-methyl-D-aspartate Receptor antibody) εγκεφαλίτιδα [295] και η όψιμης έναρξης, μη θυμωματοώδης, AChR Ab (+) Βαριά Μυασθένεια [296], ή και με εμπλοκή στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό άλλων μη-αυτοανώσων νευρολογικών διαταραχών, όπως η φυλοσύνδετη Αδρενολευκοδυστροφία [297]. Έχει, ωστόσο, υποστηριχθεί και προστατευτικός ρόλος του αλληλίου έναντι εκδήλωσης Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας, ως μέρους του γονοτύπου *DRB1*07/DRB1*16* [298].

Ως κατακλείδα είναι απαραίτητο να επισημανθεί ότι δεν εντοπίστηκε καμία απολύτως συσχέτιση *DRB1* γονοτύπου – φαινοτύπου ανεξάρτητα για την ομάδα fMS. Το γεγονός αυτό μπορεί να είναι είτε επίπλαστο, αντανakλώντας το σχετικά μικρό από στατιστικής πλευράς πλήθος του εξετασθέντος fMS δείγματος, είτε πραγματικό, υποστηρίζοντας τη γενικότερη μας εντύπωση ότι η προδιάθεση για ανάπτυξη fMS, αλλά και ο κλινικός φαινότυπος αυτής, καθορίζονται ουσιαστικά από πολλούς περισσότερους γενετικούς τύπους, πέρα από τον υπό διερεύνηση *DRB1* τύπο.

5.5 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην ενότητα αυτή απαριθμούνται οι βασικότεροι περιορισμοί της παρούσας διατριβής, οι οποίοι και θα πρέπει να ληφθούν υπόψη με στόχο την όσο το δυνατόν αντικειμενικότερη ερμηνεία των παραπάνω αποτελεσμάτων. Αρχικά λοιπόν, είναι σκόπιμο να επισημανθεί η αναπόφευκτη ύπαρξη μιας κάποιας αβεβαιότητας στην

κατηγοριοποίηση των συμμετεχόντων ασθενών στις ομάδες fMS και sMS. Πιο συγκεκριμένα, η καταγραφή ενός περιστατικού ως fMS βασιζόταν αρχικά στο παρεχόμενο ιστορικό από τους ασθενείς-δείκτες. Στη συνέχεια, ακολουθούσε επιβεβαίωση είτε μέσω μίας και μοναδικής αξιολόγησης των υποτιθέμενων συγγενών πασχόντων, είτε μέσω επικοινωνίας με τους θεράποντες ιατρούς αυτών και αίτησης πρόσβασης στους ιατρικούς τους φακέλους. Θα μπορούσε να πει κανείς ότι η διάγνωση της ΣκΠ στους συγγενείς πάσχοντες δε θα μπορούσε να είναι απόλυτα ασφαλής στις περιπτώσεις μη απευθείας αξιολόγησης. Αξίζει ωστόσο να αναφερθεί ότι στις περισσότερες των περιπτώσεων θεράπουσα Ιατρός των συγγενών-πασχόντων ήταν η επιβλέπουσα της διατριβής, Επίκουρη Καθηγήτρια Νευρολογίας κα Μ. Αναγνωστούλη, οπότε και υπήρχε δυνατότητα νευρολογικής εκτίμησης. Από την άλλη πλευρά, είναι πιθανό κάποιοι από τους συμμετέχοντες που καταχωρήθηκαν στην ομάδα sMS, για τους σκοπούς της παρούσας στατιστικής ανάλυσης, να ανήκουν τελικά στην ομάδα fMS, με συγγενείς που πρόκειται να εκδηλώσουν τη νόσο στο μέλλον (ή που έχουν ήδη εκδηλώσει τη νόσο, αλλά αυτό δεν έχει γίνει γνωστό προς το παρόν στους ασθενείς δείκτες). Προκειμένου να ελαχιστοποιήσουμε, όσο ήταν εφικτό, αυτό το σφάλμα κατηγοριοποίησης, επικοινωνήσαμε με όλους τους ασθενείς sMS και μία δεύτερη φορά τουλάχιστον, προ της ολοκλήρωσης της συλλογής του δείγματος, ζητώντας τους να μας γνωρίσουν πιθανές πρόσφατες διαγνώσεις ΣκΠ σε μέλη της οικογένειάς τους, που έγιναν γνωστές μετά από την ημέρα αρχικής ένταξης στη μελέτη.

Ένα δεύτερο σημείο στο οποίο αξίζει να σταθεί κανείς αφορά τη μη στάθμιση των ομάδων της μελέτης ως προς τις λαμβανόμενες ανοσοτροποποιητικές ή ανοσοκατασταλτικές θεραπείες, γεγονός που ενδεχομένως να έχει επηρεάσει κάποια από τα μη-ανοσογενετικά αποτελέσματα, όπως οι διαπιστωθείσες διαφορές στους χρόνους μετάβασης από το CIS στην CDMS, μεταξύ κάποιων ομάδων και υποομάδων. Τέτοια στάθμιση βέβαια θα περιόριζε δραστικά το διαθέσιμο δείγμα ασθενών της μελέτης, γι'αυτό και δεν θα μπορούσε να εφαρμοσθεί. Οι ομάδες των συμμετεχόντων ασθενών, πάντως, ήταν σταθμισμένες ως προς τη διάρκεια νόσου, οπότε θεωρούμε ότι δεν υπήρχε bias σε σχέση με τον χρόνο τέλεσης των απεικονιστικών εξετάσεων, που θα μπορούσε να επηρεάσει τις διαπιστωθείσες νευροαπεικονιστικές διαφορές. Δύναται βέβαια να υποστηριχθεί ότι παρά τη συγκρίσιμη μέση διάρκεια νόσου μεταξύ fMS και sMS, από το χρόνο της διάγνωσης, οι fMS ασθενείς βρίσκονταν σε πιο πρώιμο στάδιο της νόσου τους. Και αυτό γιατί,

όντας σε μεγαλύτερη εγρήγορση για τα συμπτώματα της ΣκΠ, θα μπορούσαν να πετύχουν πιο πρόωμη διάγνωση σε σχέση με τους SMS ασθενείς. Αυτός ο συγκυτικός παράγοντας, αν υποθέσουμε ότι πραγματικά ισχύει, δεν συνιστά μεθοδολογικό λάθος, καθώς είναι δύσκολο έως αδύνατο τόσο να επιβεβαιωθεί όσο και να αποφευχθεί.

Μία ακόμη ‘αδυναμία’ της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η έλλειψη αναλυτικής νευροψυχολογικής αξιολόγησης των συμμετεχόντων ασθενών. Όπως φάνηκε από τη στατιστική επεξεργασία των τελικών δεδομένων, μία από τις πιο κομβικές μη-ανοσογενετικές παρατηρήσεις ήταν η διαπίστωση της διαφοράς κατανομής απομυελινωτικών βλαβών μεταξύ των ομάδων fMS και SMS. Με βάση αυτή την παρατήρηση διατυπώσαμε την υπόθεση ότι η fMS είναι περισσότερο ‘υπερσκηνιδιακή νόσος’ σε σχέση με την SMS. Η σκιαγράφηση του νευροψυχολογικού profil των δύο ομάδων θα μπορούσε ίσως να αναδείξει πληρέστερα ή και να ποσοτικοποιήσει αυτή την υπόθεση. Γι’ αυτόν ακριβώς το λόγο, η νευροψυχολογική διερεύνηση των συμμετεχόντων ασθενών στη μέλετη αποτελεί έναν από τους μελλοντικούς ερευνητικούς στόχους του εργαστηρίου μας, ανεξάρτητα από την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Κλείνοντας, θα πρέπει να υπενθυμίσουμε ότι η παρούσα μελέτη δεν ήταν από το σχεδιασμό της επιδημιολογική, ούτε πολυκεντρική, και επομένως τα συμπεράσματά της δεν μπορούν να γενικευθούν αβασάνιστα για τον ευρύτερο πληθυσμό ΣκΠ ασθενών Ελληνικής καταγωγής. Παρόλα αυτά, οι σχεδόν 500 συμμετέχοντες ασθενείς στη διατριβή αποτελούν ένα πολύ ικανοποιητικό δείγμα, δεδομένου του ότι αποτελούν περίπου το ένα δέκατο έκτο με ένα εικοστό του συνόλου των περίπου 8000-10000 ασθενών που διαβιούν πανελλαδικά [299,300]. Άλλωστε, όπως ήδη σχολιάστηκε στην παράγραφο 3.1, στο τελικό διαμορφωθέν δείγμα της διατριβής συμμετείχαν ασθενείς από όλα τα γεωγραφικά διαμερίσματα της Ελλάδας, καθώς η 1^η Παν/κή Νευρολογική Κλινική του Αιγινήτειου Νοσοκομείου είναι το μεγαλύτερο κέντρο προσέλευσης και παραπομπής ασθενών με ΣκΠ στη χώρα, και έτσι οι ασθενείς που προσέρχονται ή παραπέμπονται σε αυτήν έχουν ικανοποιητική διασπορά ως προς τον τόπο καταγωγής τους.

5.6 ΣΥΝΟΨΗ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ – ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Η γενική εντύπωση που προκύπτει ως κατακλείδα του παρόντος ερευνητικού συγγράμματος είναι ότι η fMS αποτελεί μία ιδιαίτερη υποκατηγορία της ΣκΠ, με σαφείς διαφορές στην κλινική εικόνα, τα απεικονιστικά χαρακτηριστικά και το ανοσογενετικό υπόβαθρο, σε σύγκριση με την sMS. Οι πάσχοντες από fMS αποτελούν μία σημαντική μειοψηφία ασθενών, που υπολογίζεται αδρά κοντά στο ένα όγδοο του συνόλου των προσβεβλημένων ατόμων. Προφανώς, τα συμπεράσματα αυτής της διατριβής δεν μπορούν να γενικευθούν αβασάνιστα σε ολόκληρο τον Ελληνικό ΣκΠ πληθυσμό, πόσο μάλλον στον παγκόσμιο πληθυσμό νοσούντων. Αποτελούν ωστόσο ένα καλό έναυσμα για περαιτέρω σε βάθος διερεύνηση, σε μεγαλύτερα δείγματα ασθενών διαφορετικών εθνικοτήτων. Πιο αναλυτικά, οι διαπιστώσεις μας συνοψίζονται στα παρακάτω σημεία:

1. Η fMS διαφέρει με την sMS ως προς την τοπογραφία των απομυελινωτικών βλαβών. Ειδικότερα, φαίνεται ότι οι υποσκηνίδιες εγκεφαλικές περιοχές χαίρουν σχετικής προστασίας στους νοσούντες από fMS ασθενείς, και άρα προσβάλλονται πιο σπάνια σε αυτούς.
2. Η fMS εισβάλλει πολύ πιο σπάνια με διπλωπία, σε σύγκριση με την sMS. Το εύρημα αυτό, κατά τη γνώμη των ερευνητών, υποστηρίζει ακόμη περισσότερο το χαρακτηρισμό της fMS ως ‘κατεξοχήν υπερσκηδιακής νόσου’, καθώς η διπλωπία είναι ένα από τα πιο αντιπροσωπευτικά συμπτώματα της παθολογίας του στελέχους, και των υποσκηνίδιων εγκεφαλικών περιοχών γενικότερα, στη ΣκΠ.
3. Η παρουσία fMS είναι ενδεικτική ενισχυμένου υποβάθρου αυτοανοσίας στις προσβεβλημένες από αυτήν οικογένειες, κυρίως όμως σε ό,τι αφορά ρευματολογικές διαταραχές του θυρεοειδούς, και πιο συγκεκριμένα την θυρεοειδίτιδα Hashimoto. Οι ίδιοι οι ασθενείς που πάσχουν από fMS δε φαίνεται να έχουν αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης και δεύτερου αυτοάνοσου νοσήματος, σε σχέση με τους νοσούντες από sMS.
4. Ο γονεϊκός τρόπος μεταβίβασης της fMS πιθανολογείται ότι είναι προεξάρχοντως μητρικός. Η διαπίστωση αυτή, που υποστηρίζεται βιβλιογραφικά από αντίστοιχες

παλαιότερες παρατηρήσεις άλλων ερευνητικών ομάδων, είναι πιθανό να αντικατοπτρίζει επιστατικούς μηχανισμούς μεταξύ εμπλεκόμενων στην παθοφυσιολογία της fMS γενετικών τόπων (συμπεριλαμβανομένου του DRB1), που τίθενται σε ισχύ μόνο διαμέσου μητρικής κληρονόμησης.

5. Η fMS εμφανίζει εσωτερική ανομοιογένεια σε κάποια κλινικά της χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το χρόνο, ανάλογα με το βαθμό εγγύτητας των προσβεβλημένων συγγενών και ανάλογα με τη γενιά, σε περιπτώσεις κάθετης μεταβίβασης. Ειδικότερα, οι ασθενείς fMS 2nd/3rd εμφανίζουν ταχύτερη μετάπτωση από τη φάση του CIS στη φάση της CDMS, σε σύγκριση με τους fMS 1st. Ακόμη, οι fMS ασθενείς 2^{ης} γενιάς έχουν μικρότερη ηλικία έναρξης νόσου (φαινόμενο επίσπευσης ;) και μικρότερο χρόνο μετάπτωσης από το CIS στην CDMS, σε σύγκριση με τους fMS ασθενείς 1^{ης} γενιάς.

6. Το *HLA-DRB1*15* διατηρεί καθολικά το ρόλο του ως αλληλίο κινδύνου για τη ΣκΠ, και αρά προδιαθέτει στην εκδήλωση τόσο fMS, όσο και sMS. Αυτή του η σημασία, ωστόσο, στην fMS φαίνεται να είναι σχετικά υποβαθμισμένη σε σύγκριση με την sMS. Η εν λόγω υποβάθμιση γίνεται πιο έντονη όσο αυξάνεται η εγγύτητα των προσβεβλημένων συγγενών πασχόντων (δηλαδή πιο πολύ στην fMS 1st σε σχέση με την fMS 2nd/3rd).

7. Το *HLA-DRB1*11* έχει πιθανόν προστατευτικό ρόλο έναντι της εκδήλωσης sMS, ο οποίος όμως δεν επιβεβαιώνεται και στην περίπτωση της fMS (παρατηρήθηκαν παρόμοιες συχνότητες εμφάνισης του αλληλίου σε fMS και γενικό πληθυσμό). Ειδικότερα, στην υποομάδα fMS 1st το υπόψη αλληλίο εμφανίζεται το ίδιο ή και περισσότερο συχνά αναφορικά με το γενικό πληθυσμό, ενώ στην υποομάδα fMS 2nd/3rd βρίσκεται σε συχνότητα μεταξύ των αντιστοίχων του γενικού πληθυσμού και της sMS. Συναξιολογώντας τα σημεία 6 και 7, πιστεύουμε ότι προκειμένου να εμφανιστούν πολλαπλές περιπτώσεις προσβεβλημένων στενών συγγενών από ΣκΠ σε μια οικογένεια, δεν αρκεί από μόνο του το DRB1* επιβαρυντικό ανοσογενετικό υπόβαθρο. Χρειάζεται συνάμα να επιδράσουν και κάποιοι επιστατικοί μηχανισμοί (πιθανόν εντός του MHC) ή/και να συνυπάρξουν άλλοι HLA και non-HLA επιβαρυντικοί πολυμορφισμοί ή τέλος και κάποιοι ιδιαίτεροι επιβλαβείς περιβαλλοντικοί παράγοντες.

8. Τόσο στην fMS όσο και στην sMS δε φαίνεται να ευνοείται η ομοζυγωτία DRB1 αλληλομόρφων έναντι της ετεροζυγωτίας. Η παρατήρηση αυτή υποστηρίζει εξίσου τη θεωρία περί ανοσογενετικού υποβάθρου της fMS που διατυπώθηκε παραπάνω, στο σημείο 7, καθώς τυχόν αποκλειστικότητα του DRB1 τύπου στη γενετική προδιάθεση της fMS θα σήμαινε και ισχυρότερη τάση ομοζυγωτίας των DRB1 αλληλίων κινδύνου, όπως του *DRB1*15* (dose effect).

Εκτός από τις παραπάνω διαπιστώσεις, που αφορούσαν τον πρωτογενή στόχο της διατριβής, δηλαδή την περιγραφή της fMS ως υπομορφής της ΣκΠ, αξίζει να επισημανθούν και οι ακόλουθες παρατηρήσεις σημαντικών συσχετίσεων HLA γονοτύπου – κλινικού φαινοτύπου στο γενικό δείγμα ασθενών και στην ομάδα sMS:

- 1.** Το αλληλίο *DRB1*03* βρέθηκε να σχετίζεται με πρωιμότερη ηλικία έναρξης νόσου στο γενικό δείγμα ασθενών και στην ομάδα sMS, σε συμφωνία με προηγούμενη δημοσιευμένη παρατήρηση του Εργαστηρίου Ανοσογενετικής.
- 2.** Το αλληλίο *DRB1*04* βρέθηκε να σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα εκδήλωσης έτερων αυτοάνοσων διαταραχών στους 1^{ου} βαθμού συγγενείς των φορέων ασθενών, στο συνολικό δείγμα της μελέτης. Ανάλογη παρατήρηση έχει παλαιότερα δημοσιευθεί και για δείγμα ΣκΠ ασθενών Ιταλικής καταγωγής.
- 3.** Το αλληλίο *DRB1*13* βρέθηκε να προστατεύει έναντι της εισβολής της ΣκΠ με οπτική νευρίτιδα, στο συνολικό δείγμα ασθενών. Ανάλογη παρατήρηση δεν έχει επαναληφθεί βιβλιογραφικά σε άλλο δείγμα ΣκΠ ασθενών, τουλάχιστον σε γνώση των συγγραφέων.
- 4.** Το αλληλίο *DRB1*14* βρέθηκε να προστατεύει έναντι της εμφάνισης απομυελινωτικών βλαβών στο θωρακικό μυελό, αλλά και στο νωτιαίο μυελό γενικότερα, στο συνολικό δείγμα ασθενών. Ανάλογη παρατήρηση δεν έχει επαναληφθεί βιβλιογραφικά σε άλλο δείγμα ΣκΠ ασθενών, τουλάχιστον σε γνώση των συγγραφέων.

5. Το αλληλίο *DRB1*16* βρέθηκε επίσης να προστατεύει έναντι της εμφάνισης απομυελινωτικών βλαβών θωρακικού μυελού, στο συνολικό δείγμα ασθενών. Στην ομάδα των sMS ασθενών το εν λόγω αλληλίο φάνηκε να συσχετίζεται με ταχύτερη μετάπτωση από το CIS στην CDMS και με συχνότερη εμφάνιση ογκόμορφων απομυελινωτικών βλαβών. Καμία από τις υπόψη παρατηρήσεις δεν έχει επαναληφθεί βιβλιογραφικά σε άλλο δείγμα ΣκΠ ασθενών, τουλάχιστον σε γνώση των συγγραφέων.

6. Η παντελής έλλειψη συσχετίσεων HLA γονοτύπου – κλινικού φαινοτύπου, ανεξάρτητα για την ομάδα fMS, θα μπορούσε να είναι ενδεικτική του γενικότερου υποβαθμισμένου ρόλου της *DRB1* περιοχής στον έλεγχο της εκδήλωσης και των επιμέρους χαρακτηριστικών αυτής της ιδιαίτερης υπομορφής ΣκΠ.

Κλείνοντας, οι μελετητές που έλαβαν μέρος στην παρούσα διατριβή εισηγούνται τις ακόλουθες προτάσεις μελλοντικής έρευνας, που απορρέουν ως λογική συνέχεια των προηγούμενων παρατηρήσεων για την fMS:

1. Οι ανοσογενετικές διαφορές μεταξύ της fMS και της sMS θα ήταν σκόπιμο να διερευνηθούν περαιτέρω με GWAS, για καλύτερο έλεγχο τόσο του ευρύτερου MHC, όσο και του υπόλοιπου γονιδιώματος. Εντός του MHC, θα πρέπει να αναζητηθούν πιθανοί επιστατικοί μηχανισμοί μεταξύ γονιδίων, που διαφοροποιούνται ανάμεσα στις δύο αυτές μορφές ΣκΠ.

2. Καθώς οι διαπιστωθείσες διαφορές στην κατανομή των απομυελινωτικών βλαβών μεταξύ fMS και sMS είναι πιθανό να επηρεάζουν ετερογενώς τις επιμέρους γνωσιακές λειτουργίες των ασθενών, κρίνεται ως σημαντικό να ελεγχθούν οι δύο αυτές διαφορετικές μορφές ΣκΠ για πιθανές διαφορές και στα αντίστοιχα νευροψυχολογικά τους πρότυπα.

3. Από όλη την παραπάνω ανάλυση στοιχειοθετείται επαρκώς, κατά τη γνώμη των συγγραφέων, η ύπαρξη παθοφυσιολογικής ανομοιογένειας μεταξύ fMS και sMS. Ξεκινώντας από αυτή την παραδοχή, θα είχε ενδιαφέρον να ελεγχθεί η ύπαρξη ενδεχόμενων διαφορετικών απαντήσεων των fMS και των sMS ασθενών στις υπάρχουσες επιλογές ανοσοτροποποιητικών φαρμάκων για τη ΣκΠ (personalized

therapeutics – pharmacogenomics). Η τυχόν εύρεση σημαντικών διαφορών θα μπορούσε να έχει σημαντικές προεκτάσεις στην εξέλιξη της θεραπευτικής του νοσήματος. Προφανώς κάτι τέτοιο μπορεί να γίνει μόνο στο πλαίσιο μελετών προοπτικού σχεδιασμού, σε μεγαλύτερα και πιο ετερογενή από πλευράς καταγωγής δείγματα ασθενών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΥΠΟΒΑΘΡΟ - ΣΚΟΠΟΣ: Η παθοφυσιολογία της Σκλήρυνσης κατά Πλάκας (ΣκΠ) ή Πολλαπλής Σκλήρυνσης με τη νεώτερη ορολογία, θεωρείται εξαιρετικά πολύπλοκη, γι' αυτό και συγκεντρώνει πάνω της τα φώτα του επιστημονικού ενδιαφέροντος τα τελευταία πενήντα χρόνια. Η πάθηση προκύπτει ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης πολλαπλών ετερογενών εξωγενών και ενδογενών προδιαθεσικών παραγόντων, μεταξύ των οποίων το ανοσογενετικό υπόβαθρο επιβεβαιωμένα διαδραματίζει πρωταρχικό ρόλο. Έχει επανειλημμένα διαπιστωθεί ότι ο κίνδυνος εκδήλωσης ΣκΠ σχετίζεται σαφώς με συγκεκριμένους πολυμορφισμούς αλληλίων Τάξης II του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex – MHC), και ειδικότερα με τη φορεία του *HLA-DRB1*15:01*. Παρόλα αυτά, πληθώρα έτερων HLA Ταξης I και Τάξης II, αλλά και non-HLA γενετικών τόπων, όπως και οι μεταξύ τους επιστατικοί μηχανισμοί, φαίνεται να συμβάλλουν επίσης στο καθορισμό του γενετικού φορτίου της νόσου. Ένα ακόμη γεγονός, που υπογραμμίζει τη μεγάλη σημασία του γονιδιώματος στην περίπτωση της ΣκΠ, έχει να κάνει με τη μεγάλη συχνότητα των οικογενών περιπτώσεων (familial Multiple Sclerosis –fMS) μεταξύ του συνόλου των ασθενών, που σύμφωνα με διεθνείς μελέτες αγγίζει το ποσοστό του 12.6%. Προκαλεί συνεπώς έκπληξη η σχετική βιβλιογραφική ένδεια πληροφοριών σχετικά με τις ιδιαιτερότητες της fMS σε σύγκριση με την κοινή – σποραδική μορφή της νόσου (sporadic Multiple Sclerosis –sMS), τόσο σε ότι αφορά τα ανοσογενετικά, όσα και τα μη ανοσογενετικά (δημογραφικά, κλινικά, παρακλινικά) χαρακτηριστικά τους. Πρωτογενής στόχος της παρούσας διατριβής λοιπόν αποτελούσε η διερεύνηση και περιγραφή των πιθανών ανοσογενετικών (αναφορικά με τον DRB1 τόπο) και μη ανοσογενετικών διαφορών μεταξύ fMS και sMS, για πρώτη φορά σε δείγμα ασθενών Ελληνικής καταγωγής. Δευτερογενής στόχος ήταν η ανεύρεση πιθανών συσχετίσεων συγκεκριμένων HLA-DRB1 πολυμορφισμών με επιμέρους δημογραφικά, κλινικά ή/και παρακλινικά χαρακτηριστικά της ΣκΠ γενικότερα.

ΥΛΙΚΟ - ΜΕΘΟΔΟΣ: 128 fMS και 364 sMS ασθενείς Ελληνικής καταγωγής με επιβεβαιωμένη ΣκΠ, σύμφωνα με τα αναθεωρημένα κριτήρια McDonald 2017, έλαβαν μέρος στη μελέτη, και παρείχαν πληροφορίες σχετικά με παραμέτρους

δημογραφικές (ηλικία, φύλο, ηλικία έναρξης νόσου, έτερα αυτοάνοσα νοσήματα στους ίδιους και σε 1^{ου} βαθμού συγγενείς τους), κλινικές [τύπος νόσου, πρώτο σύμπτωμα, αριθμός / ρυθμός υποτροπών, χρόνος μετάπτωσης από το κλινικά μεμονωμένο σύνδρομο (CIS) στη βέβαια νόσο (CDMS), φαρμακευτική αγωγή, βαθμός αναπηρίας και ρυθμός εξέλιξης αναπηρίας] και παρακλινικές [παρουσία ολιγοκλωνικών ζωνών στο Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό (ENY), κατανομή βλαβών σε MRI εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού, παρουσία ογκόμορφων απομυελινωτικών βλαβών]. Εξ αυτών, 57 μη σχετιζόμενοι fMS και 141 sMS ασθενείς έδωσαν συγκατάθεση για DRB1 ανοσογενετική τυποποίηση, που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια low-resolution SSO τεχνικής. Οι ευρεθείσες συχνότητες αλληλίων στα υπόψη δείγματα συγκρίθηκαν, μεταξύ άλλων, και με τις αντίστοιχες συχνότητες σε δείγμα 246 Ελλήνων υγιών μαρτύρων προηγούμενης μελέτης, κατόπιν σχετικής συγκατάθεσης. Η στατιστική επεξεργασία του υλικού έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου SPSS v.21.0. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 0.05, ενώ η τιμή του p για τις πολλαπλές συγκρίσεις συχνοτήτων αλληλίων διορθώθηκε περαιτέρω με τη βοήθεια της μεθόδου Benjamini–Yekutieli. Οι ισορροπίες Hardy-Weinberg για τους DRB1 απλότυπους επιβεβαιώθηκαν με τη βοήθεια λογισμικού PyPoP, ενώ ο έλεγχος ουδετερότητας ομοζυγωτίας / ετεροζυγωτίας πραγματοποιήθηκε με tests Ewens-Watterson.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Η συχνότητα των fMS περιστατικών μεταξύ του αρχικού δείγματος υποψηφίων συμμετεχόντων ασθενών υπολογίστηκε στο 13.1%. Ο γονεϊκός τρόπος μεταβίβασης της νόσου στο fMS δείγμα βρέθηκε μητρικός στο 59% των περιπτώσεων. Η fMS εισέβαλε σημαντικά σπανιότερα με διπλωπία σε σύγκριση με την sMS (3.1% vs 13.7%, $p=0.003$), ενώ ταυτόχρονα εμφάνιζε λιγότερο συχνά απομυελινωτικές βλάβες σε στέλεχος (49.6% vs 64.8%, $p=0.006$), και σε υποσκληνίδιες εγκεφαλικές περιοχές εν γένει (64.5% vs 74.8%, $p=0.048$). Οι πρώτου βαθμού συγγενείς των fMS ασθενών έπασχαν σημαντικά συχνότερα από θυρεοειδίτιδα Hashimoto, σε σύγκριση με εκείνους των sMS ασθενών (9.8% vs 3.3%, $p=0.033$). Η fMS βρέθηκε να παρουσιάζει εσωτερική ανομοιογένεια, με επίσπευση στην ηλικία έναρξης μεταξύ παλαιότερης και νεώτερης γενιάς (39.7 vs 24.5 έτη, $p=0.001$), και με ταχύτερη μετάβαση από το CIS στην CDMS στη δεύτερη περίπτωση (30.1 vs 83.3 μήνες, $p=0.037$). Ταχύτερη μετάβαση από το CIS στην CDMS διαπιστώθηκε και για τους fMS ασθενείς με συγγενείς πάσχοντες 2^{ου}/3^{ου}

βαθμού (fMS 2nd/3rd), σε σχέση με τους fMS 1st, που είχαν συγγενή 1^{ou} βαθμού πάσχοντα (27.9 vs 43.6 μήνες, $p=0.047$). Η συχνότητα του *HLA-DRB1*15* ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, τόσο στην ομάδα των fMS (31.6% vs 16.7%, $p=0.002$), όσο και στην ομάδα των sMS ασθενών (31.2% vs 16.7%, $p<0.001$), αποτέλεσμα που φάνηκε να αποδυναμώνεται ωστόσο στην υποομάδα των fMS 1st (24.1% vs 16.7%, $p=0.205$), αναλογικά με την fMS 2nd/3rd (39.3% vs 16.7%, $p=0.012$). Αντίθετα, η συχνότητα του *HLA-DRB1*11* βρέθηκε σημαντικά μικρότερη ως προς τους υγιείς μάρτυρες, μόνο στην περίπτωση του sMS δείγματος (31.9% vs 52%, $p<0.001$), ενώ οι fMS ασθενείς παρουσίαζαν σε μεγαλύτερη συχνότητα το αλλήλιο (49.1%), κυρίως λόγω της υποομάδας fMS 1st (58.6%). Δεν εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg, αλλά ούτε και στατιστικά σημαντική εύνοια της ομοζυγωτίας στο συνολικό δείγμα και στις επιμέρους ομάδες της μελέτης. Αναφορικά με το δευτερογενή στόχο της μελέτης διαπιστώθηκαν, στο συνολικό δείγμα ασθενών, θετική συσχέτιση φορείας *DRB1*03* με πρωιμότερη ηλικία έναρξης νόσου (26.4 vs 30.3 έτη, $p=0.04$), θετική συσχέτιση φορείας *DRB1*04* με εύρεση 1^{ou} βαθμού συγγενών πασχόντων από άλλες αυτοάνοσες παθήσεις (61.1% vs 26%, $p=0.01$), αρνητική συσχέτιση φορείας *DRB1*13* με οπτική νευρίτιδα ως πρώτο σύμπτωμα νόσου (3.6% vs 24%, $p=0.011$), αρνητική συσχέτιση φορείας *DRB1*14* με απομυελινωτικές βλάβες θωρακικού μυελού (28.6% vs 73.3%, $p=0.024$), όπως και αρνητική συσχέτιση φορείας *DRB1*16* με απομυελινωτικές βλάβες θωρακικού μυελού (53.6% vs 76.9%, $p=0.029$).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Η fMS αποτελούσε μία σημαντική μειοψηφία του δείγματος ασθενών ΣκΠ Ελληνικής καταγωγής (1 στους 8 περίπου), μεταβιβαζόμενη συνήθως με μητρικό τρόπο. Από πλευράς φαινοτύπου, φάνηκε να είναι πιο περιορισμένη υπερσκηνιδικά, σε σύγκριση με την sMS, και να συνδυάζεται συχνότερα με οικογενειακή προδιάθεση θυρεοειδίτιδας Hashimoto. Από πλευράς γονοτύπου, η επίδραση του *DRB1* τόπου βρέθηκε σχετικά υποβαθμισμένη στην fMS, αναλογικά με την sMS, με την εξαίρεση του ρόλου που διαδραματίζει το αλλήλιο κινδύνου *DRB1*15*. Οι συσχετίσεις HLA γονοτύπου – κλινικού φαινοτύπου, που ήταν ο δευτερογενής στόχος της μελέτης, δεν έφτασαν σε καμία περίπτωση το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας, ανεξάρτητα για την ομάδα fMS, γεγονός που υποστηρίζει περαιτέρω την πραγματική ύπαρξη της εν λόγω υποβάθμισης. Σε μία

πρώτη απόπειρα ερμηνείας αυτής της διαπίστωσης, πιστεύουμε ότι προκειμένου να εμφανιστούν πολλαπλές περιπτώσεις προσβεβλημένων στενών συγγενών από ΣκΠ σε μια οικογένεια, δεν αρκεί από μόνος του ο DRB1 τύπος, ως επιβαρυντικό ανοσογενετικό υπόβαθρο. Χρειάζεται συνάμα να επιδράσουν και κάποιοι επιστατικοί μηχανισμοί (πιθανόν εντός του MHC) ή/και να συνυπάρξουν άλλοι HLA και non-HLA επιβαρυντικοί πολυμορφισμοί, ή τέλος και κάποιοι ιδιαίτεροι επιβλαβείς περιβαλλοντικοί παράγοντες.

SUMMARY

BACKGROUND - AIMS: Multiple Sclerosis (MS), the main Demyelinating Disease of the Central Nervous System (CNS), is considered to have a very complex pathophysiology, which gathers scientific attention during the last fifty years. The disease comes as the result of the interaction of multiple endogenous and exogenous predisposing factors, among which the immunogenetic background holds a leading position. It has been repeatedly observed that the risk of developing MS is correlated with certain class II allelic polymorphisms within the Major Histocompatibility Complex (MHC), mainly the carriage of *HLA-DRB1*15:01*. Nevertheless, it seems that numerous different Human-Leucocyte-Antigens (HLA) Class I and II, as well as non-HLA genetic loci, and the epistatic mechanisms among them, are also implicated in the overall MS genetic burden. Another fact, that underlines the great significance of the genome in MS, is made obvious by the considerable percentage of familial cases (familial Multiple Sclerosis –fMS), that is estimated around 12.6% of all incidents in the international literature. Hence, the relative lack of scientific information regarding differences between fMS and sporadic Multiple Sclerosis (sMS), concerning their immunogenetic and non-immunogenetic (demographic, clinical, laboratorial and imaging) characteristics, comes as a big surprise. Principal goal of this thesis was the investigation and description of possible immunogenetic (regarding DRB1 locus) and non-immunogenetic differences between fMS and sMS, performed for the first time in a sample of MS patients of Greek origin, from all over Greece. Observation of possible correlations between certain DRB1 polymorphisms and specific demographic, clinical, imaging and laboratorial traits of MS in general, was an additional secondary goal.

MATERIALS - METHODS: 128 fMS and 364 sMS patients of Greek origin, diagnosed with Clinically Definite MS (CDMS) according to 2017 revised McDonald criteria, were included in this study and gave information regarding demographic (age, gender, age at disease onset, other autoimmune disorders in themselves and their 1st degree relatives), clinical [disease type, first symptoms, number of relapses, relapse rate, time of conversion from Clinically Isolated Syndrome (CIS) to CDMS, treatment, degree of disability and disability progression rate], laboratorial [presence

of Oligoclonal Bands in the Cerebrospinal Fluid (CSF)], and imaging (lesion distribution in brain and spinal cord, tumefactive lesions) parameters. Among them, 57 non-related fMS and 141 sMS patients gave consent for DRB1 immunogenetic typing, which was performed by a low-resolution SSO technique. Allelic frequencies in the above samples were also compared with the corresponding frequencies of a sample of 246 Greek origin healthy controls, which were described in a previous study, after obtaining the appropriate permissions. Statistical analyses were done with the use of SPSS v.21.0. The level of statistical significance was set at 0.05, while p value was further corrected by the Benjamini–Yekutieli method, in the case of multiple allelic frequency correlations. Hardy-Weinberg proportions (HWP) for DRB1 haplotypes were confirmed by a PyPoP software, while Ewens-Watterson (EW) homozygosity tests for neutrality were also performed.

RESULTS: fMS was found in a frequency of 13.1% among the initially screened sample of candidate participants. 59% of fMS cases were linked to their affected relatives maternally. fMS started less frequently with double vision (3.1% vs 13.7%, $p=0.003$), and was linked less frequently with brainstem lesions (49.6% vs 64.8%, $p=0.006$), and subtentorial lesions in general (64.5% vs 74.8%, $p=0.048$), in comparison to sMS. 1st degree relatives of fMS patients were more frequently diagnosed with Hashimoto's thyroiditis, with reference to those of sMS patients (9.8% vs 3.3%, $p=0.033$). fMS displayed internal heterogeneity, with anticipation effects in age at disease onset, between older and younger generation (39.7 vs 24.5 years, $p=0.001$), and earlier progression from CIS to CDMS in younger generation patients (30.1 vs 83.3 months, $p=0.037$). Earlier progression from CIS to CDMS was also noted for the fMS subgroup with 2nd or 3rd degree relatives affected (fMS 2nd/3rd) in comparison to the fMS 1st subgroup (1st degree relatives affected, 27.9 vs 43.6 months, $p=0.047$). *HLA-DRB1*15* allelic frequency was significantly higher with reference to normal controls, for both the fMS (31.6% vs 16.7%, $p=0.002$), and the sMS (31.2% vs 16.7%, $p<0.001$) study groups, although the statistical power of this finding was degraded in the fMS 1st subgroup (24.1% vs 16.7%, $p=0.205$), but not in the fMS 2nd/3rd subgroup (39.3% vs 16.7%, $p=0.012$). On the contrary, *HLA-DRB1*11* allelic frequency was found significantly lower, with reference to normal controls, only in the case of the sMS group (31.9% vs 52%, $p<0.001$), while the fMS patients were carrying the allele in a greater percentage (49.1%), mainly due to the

fMS 1st subgroup (58.6%). No significant deviations from the HWPs were detected, while the EW tests for neutrality did not show any preference for homozygosity over heterozygosity, for all the groups and subgroups of patients in the study. In regards to the study's secondary goal, we found positive correlation of *DRB1*03* carriage with younger age at disease onset (26.4 vs 30.3 years, $p=0.04$), positive correlation of *DRB1*04* carriage with presence of 1st degree relatives diagnosed with other autoimmune disorders (61.1% vs 26%, $p=0.01$), negative correlation of *DRB1*13* carriage with optic neuritis as first MS symptom (3.6% vs 24%, $p=0.011$), negative correlation of *DRB1*14* carriage with presence of thoracic demyelinating lesions (28.6% vs 73.3%, $p=0.024$), and negative correlation of *DRB1*16* carriage with presence of thoracic demyelinating lesions (53.6% vs 76.9%, $p=0.029$), in the total sample of MS patients.

CONCLUSIONS: fMS was found to represent a significant minority in our sample of MS patients of Greek origin (1 out of 8 approximately), and was inherited more frequently through a maternal line. Regarding its phenotype, it was shown to be relatively more isolated in the supratentorial areas in comparison to sMS, as well as more commonly related with familial predisposition for Hashimoto's thyroiditis. With reference to the immunophenotype, the influence of the *DRB1* locus was somewhat degraded in fMS, compared to sMS, with the exception of the *DRB1*15* risk allele. HLA genotype – clinical phenotype correlations, which represented the secondary goal of this study, did not reach the level of statistical significance, independently for the fMS group, fact which is further supportive of the true existence of the above mentioned degradation. Making a first attempt of interpreting this observation, we believe that a predisposing *DRB1* immunogenetic background is not sufficient on its own to lead to MS development by multiple close relatives within the same family. Several epistatic mechanisms are also required (probably within the MHC), as well as the concomitant carriage of several other HLA and non-HLA predisposing polymorphisms, additionally to the possible influence of certain superimposed, deleterious, environmental factors.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Patsopoulos NA, Barcellos LF, Hintzen RQ et al. Fine-Mapping the Genetic Association of the Major Histocompatibility Complex in Multiple Sclerosis: HLA and Non-HLA Effects. *PLoS Genet.* 2013;9(11):e1003926. doi:10.1371/journal.pgen.1003926.
2. Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL et al. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev* 2012;248:87–103.
3. Artemiadis AK, Anagnostouli MC. Apoptosis of oligodendrocytes and post-translational modifications of myelin basic protein in multiple sclerosis: possible role for the early stages of multiple sclerosis. *Eur Neurol.* 2010;63(2):65-72.
4. He H, Hu Z, Xiao H et al. The tale of histone modifications and its role in multiple sclerosis. *Hum Genomics.* 2018;12(1):31
5. Kakalacheva K, Münz C, Lünemann JD. Viral triggers of multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812(2):132-40.
6. Nielsen TR, Rostgaard K, Askling J et al. Effects of infectious mononucleosis and HLA-DRB1*15 in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 2009;15:431-36.
7. Kamm CP, Uitdehaag BM, Polman CH. Multiple Sclerosis: Current Knowledge and Future Outlook. *Eur Neurol* 2014;72:132-141
8. Goodin DS. The pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Clin Exp Neuroimmunol* 2015;6(Suppl. 1):2-22
9. Planas R, Santos R, Tomas-Ojer P et al. GDP-l-fucose synthase is a CD4+ T cell-specific autoantigen in DRB3*02:02 patients with multiple sclerosis. *Sci Transl Med.* 2018;10(462) doi:10.1126/scitranslmed.aat4301.
10. Ramagopalan S, Maugeri N, Handunnetthi L et al. Expression of the multiple sclerosis associated MHC class II allele HLA-DRB1*1501 is regulated by vitamin D. *PLoS Genet.* 2009;5:e1000369.iss doi:10.1371/journal.pgen.1000369.
11. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Contribution of vitamin D insufficiency to the pathogenesis of multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 2013;6(2):81-116.
12. Wingerchuk DM. Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. *Ther Adv Neurol Disord* 2012;5:13-22.
13. Hedström AK, Hössjer O, Katsoulis M et al. Organic solvents and MS Susceptibility. *Neurology* 2018;91:e455-e462.

14. Nato S, Namerow N, Mickey MR et al. Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue Antigens* 1972;2:1-4.
15. Alter M, Harshe M, Anderson VE et al. Genetic association of multiple sclerosis and HL-A determinants. *Neurology* 1976;26(1):31-6.
16. Olerup O, Hillert J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 1995;38:1-15.
17. Schmidt H, Williamson D, Ashley-Koch A. HLA-DR15 Haplotype and Multiple Sclerosis: A HuGE Review. *Am J Epidemiol* 2006;165:1097-1109.
18. Cocco E, Murru R, Costa G, et al. Interaction between HLA-DRB1-DQB1 Haplotypes in sardinian Multiple Sclerosis population. *PloS One* 2013;8(4):e59750.
19. Messadi A, Najiba FM, Ouerhani S et al. HLA Class II alleles and multiple sclerosis in Tunisian patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 2010;112(10):849-852.
20. Rojas OL, Rojas-Villaraga A, Cruz-Tapias P et al. HLA Class II polymorphism in Latin American patients with multiple sclerosis. *Autoimm Rev.* 2010;9(6):407-413.
21. Oksenberg JR, Barcellos LF, Cree BA et al. Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. *Am J Hum Genet.* 2004;74(1):160-167.
22. Alves-Leon SV, Papais-Alvarenga R, Magalhaes M et al. Ethnicity-dependent association of HLA DRB1-DQA1-DQB1 alleles in Brazilian multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand.* 2007;115(5):306-311.
23. Al-Din ASN, El-Khateeb M, Kurdi A et al. Multiple sclerosis in Arabs in Jordan. *J Neurol Sci.* 1995;131(2):144-149.
24. Kwon OJ, Karni A, Israel et al. HLA Class II susceptibility to multiple sclerosis among Ashkenazi and non-Ashkenazi Jews. *Arch Neurol.* 1999;56(5):555-560.
25. Anagnostouli MC, Manouseli A, Artemiadis AK et al. HLA-DRB1* Allele Frequencies in Pediatric, Adolescent and Adult-Onset Multiple Sclerosis Patients, in a Hellenic Sample. Evidence for New and Established Associations. *J Mult Scler* 2014;1:104. doi: 10.4172/jmso.1000104.
26. Katsavos S, Anagnostouli M. Biomarkers in Multiple Sclerosis: An Up-to-Date Overview. *Mult Scler Int.* 2013;2013:340508. doi: 10.1155/2013/340508.
27. Stamatelos P, Anagnostouli M. HLA-Genotype in Multiple Sclerosis: The Role in Disease onset, Clinical Course, Cognitive Status and Response to Treatment: A Clear Step Towards Personalized Therapeutics. *Immunogenet open access* 2017;2:116.

28. Zivadinov R, Uxa L, Bratina A et al. HLA-DRB1*1501, -DQB1*0301, -DQB1*0302, -DQB1*0602, and – DQB1*0603 alleles are associated with more severe disease outcome on MRI in patients with multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol.* 2007;79:521-535.
29. Laroni A, Calabrese M, Perini P, et al. Multiple sclerosis and autoimmune diseases. Epidemiology and HLA-DR association in North-east Italy. *J Neurol.* 2006;253:636-639.
30. DeLuca GC, Ramagopalan SV, Herrera BM et al. An extremes of outcome strategy provides evidence that multiple sclerosis severity is determined by alleles at the HLA-DRB1 locus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(52):20896-20901.
31. Bozikas V, Anagnostouli M, Petrikis P et al. Familial bipolar disorder and multiple sclerosis: a three generation HLA family study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;2:835-9.
32. Mohajer B, Abbasi N, Pishgar F et al. HLA-DRB1 polymorphism and susceptibility to multiple sclerosis in the Middle East North Africa region: A systematic review and meta-analysis. *J Neuroimmunol.* 2018;321:117-124.
33. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH et al. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2015;47(10):1107-1113.
34. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011;476:214-219.
35. Harbo HF, Isobe N, Berg-Hansen P, et al. Oligoclonal bands and age at onset correlate with genetic risk score in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2014;20: 660-668.
36. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2002;359(9313) :1221-1231.
37. Harirchian MH, Fatehi F, Sarraf P et al. Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord.* 2018;20:43-47.
38. Eskandarieh S, Molazadeh N, Moghadasi AN et al. The prevalence, incidence and familial recurrence of multiple sclerosis in Tehran, Iran. *Mutl Scler Relat Disord* 2018;25:143.
39. Sadovnick AD, Baird PA. Multiple sclerosis: Updated risks for relatives. *Am J Med Genet.* 1988;29:533-41.
40. Bartulos Iglesias M, Marzo Sola ME, Estrella Ruiz LA et al. Epidemiological study of multiple sclerosis in La Rioja. *Neurologia* 2015;30:552-560.

41. Amela-Peris R, Aladro Y, Conde-Sendin MA et al. Familial multiple sclerosis in Canary Islands. *Rev Neurol*. 2004;39(10):911-914.
42. Papais-Alvarenga RM, Pereira FF, Bernandes MS, et al. Familial forms of multiple sclerosis and neuromyelitis optica at an MS center in Rio de Janeiro State, Brazil. *J Neurol Sci*. 2015;356:196-201.
43. Hensiek AE, Seaman SR, Barcellos LF, et al. Familial effects on the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology* 2007;68(5):376-383.
44. Steenhof M, Nielsen NM, Stenager E et al. Distribution of disease courses in familial vs sporadic multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2019;139(3):231-237.
45. Marrosu MG, Cocco E, Lai M, et al. Patients with multiple sclerosis and risk of type 1 diabetes mellitus in Sardinia, Italy: a cohort study. *Lancet* 2002; 359: 1461-1465.
46. Rojas JI, Patrucco L, Miguez J, et al. Disease onset in familial and sporadic multiple sclerosis in Argentina. *Mult Scler Relat Disord* 2016;6:54-56.
47. Romero-Pinel L, Martinez-Yelamos S, Gubieras L, et al. Anticipation of age at onset in familial multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2010;17(4):572-575.
48. Marsh S, Parham P, Barber L. The HLA FactsBook, 1st ed. Academic Press, London 2000, pp.1-90.
49. Hackel E, Mallory D. Theoretical Aspects of HLA: a technical workshop. American Association of Blood Banks, Anaheim, California 1982, pp.1-141.
50. Browning M, McMichael A. HLA and MHC: Genes, Molecules and Function. Bios Scientific Publishers, Oxford 1996, pp.1-438.
51. Graziano D, Trucco M. Transplantation Genetics, in: Pyeritz RE, Korf BR, Grody WW (eds.) Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics: Foundations, 7th ed. Academic Press, San Diego 2019, pp.229-263.
52. Shiina T, Tamiya G, Oka A, et al. Genome sequencing analysis of the 1.8 Mb entire human MHC class I region. *Immunol Rev*. 1999;167:193-199.
53. Beck S, Trowsdale J. Sequence organisation of the class II region of the human MHC. *Immunol Rev*. 1999;167:201-210.
54. von Salome J, Gyllesten U, Bergström TF. Full-length sequence analysis of the HLA-DRB1 locus suggests a recent origin of alleles. *Immunogenetics* 2007;59:261-271.

55. Marsh SGE, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA system. Nomenclature for factors of the HLA system, update April, May and June 2019. HLA 2019;94(2):188-271.
56. Marsh SGE, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA system. Nomenclature for factors of the HLA system, update January, February and March 2019. HLA 2019;93(6):511-541.
57. Marsh SGE, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA system. Nomenclature for factors of the HLA system, update October, November and December 2018. HLA 2019;93(2-3):140-181.
58. Nomenclature for factors of the HLA system. Bull World Health Organ. 1975;52(3):261-265.
59. Ellmeier W, Sawada S, Littman DR. The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development. Ann Rev Immunol. 1999;17:523-524.
60. Hickey MJ, Valenzuela NM, Reed EF. Alloantibody Generation and Effector Function Following Sensitization to Human Leucocyte Antigen. Front Immunol. 2016;7:30.
61. Traherne JA. Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. Int J Immunogenet. 2008;35(3):179-192.
62. Taylan F, Altioek E. Meiotic recombinations within the major histocompatibility complex of human embryos. Immunogenetics 2012;64(11):839-844.
63. Sun YY, Kong FH, Ren S, et al. Severe acute graft-vs-host disease in a patient with acute monocytic leukemia having a recombination event between HLA-A/B loci from a multiple recombinant family. Tissue Antigens 2007;70(6):499-505.
64. Lam TH, Shen M, Chia J-M, et al. Population specific recombination sites within the human MHC region. Heredity 2013;111:131-138.
65. Slatkin M. Linkage disequilibrium – understanding the evolutionary past and mapping the medical future. Nat Rev Genet. 2008;9(6):477-485.
66. Jensen PE. Mechanisms of antigen presentation. Clin Chem Lab Med 1999;37(3):179-186..
67. Fehling HJ, Gilfillan S, Ceredig R. Alpha beta/gamma delta lineage commitment in the thymus of normal and genetically manipulated mice. Adv Immunol 1999;71:1-76.
68. Holtmeier W, Kabelitz D. Gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. Chem Immunol Allergy. 2005;86:151-183.

69. Hughes AL, Nei M. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* 1988;335(6186):167-170.
70. Hughes AL, Nei M. Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86(3):958-962.
71. Penn D, Potts W. How do major histocompatibility complex genes influence odor and mating preferences? *Adv Immunol*. 1998;69:411-436.
72. Russel AS, Percy JS, Schlaut J, et al. Transplantation antigens in Crohn's disease: Linkage of associated ankylosing spondylitis with HLA-Aw27. *Am J Dig Dis*. 1975;20(4):359-361.
73. Cohen LM, Mittal KK, Schmid FR, et al. Increased risk for spondylitis stigmata in apparently healthy HL-AW27 men. *Ann Intern Med*. 1976;84(1):1-7.
74. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, and Kuby J. in: Freeman WH (ed) *Kuby Immunology*, 6th ed. WH Freeman and Co, New York, 2007.
75. Ten Elshof AE, Brittenham GM, Chorney KA, et al. Gamma delta intraepithelial lymphocytes drive tumor necrosis factor-alpha responsiveness to intestinal iron challenge: relevance to hemochromatosis. *Immunol Rev*. 1999;167:223-232.
76. Price P, Witt C, Allcock R, et al. The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunol Rev*. 1999;167:257-274.
77. Faas S, Trucco M. The genes influencing the susceptibility to IDDM in humans. *J Endocrinol Invest*. 1994;17(7):477-495.
78. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(10):702-709.
79. Klein J, Sato A. The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(11):782-786.
80. Robertson NP, Fraser M, Deans J, et al. Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain* 1996;119:449-455.
81. Hansen T, Skytthe A, Stenager E, et al. Concordance for multiple sclerosis in Danish twins: an update of a nationwide study. *Mult Scler* 2005;11:504-510.
82. Jersild C, Svejgaard A, Fog T. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet* 1972;1(7762):1240-1241.

83. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Low-Frequency and Rare-Coding Variation Contributes to Multiple Sclerosis Risk. *Cell* 2018;175(6):1679-1687.
84. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia susceptibility. *Science* 2019;365(6460).
85. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, et al. Multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000;343:938–952.
86. Worthington J, Jones R, Crawford M, et al. Pregnancy and multiple sclerosis: a 3-year prospective study. *J Neurol*. 1994;241:228–233.
87. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain* 2006;129:606–616.
88. Alonso A, Hernán MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology* 2008;71:129–135.
89. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* 2010;9:520–532.
90. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33(11):1444–1452.
91. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996;46:907–911.
92. Vukusic S, Confavreux C. Natural history of multiple sclerosis: risk factors and prognostic indicators. *Curr Opin Neurol* 2007;20:269–274.
93. Fox RJ, Cohen JA. Multiple Sclerosis: the importance of early recognition and treatment. *Cleve Clin J Med*. 2001;68:157-170.
94. Labiano-Fontcuberta A, Benito-Leon J. Radiologically isolated syndrome: An update on a rare entity. *Mult Scler*. 2016;22(12):1514-1521.
95. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13(3):227-231.
96. Barkhof F, Filippi M, Miller D, et al. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 1997;120(11):2059-2069.

97. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50(1):121-127.
98. Polman C, Reingold S, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the 'McDonald Criteria'. *Ann Neurol*. 2005;58(6):840-846.
99. Polman C, Reingold S, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69(2):292-302.
100. Thompson A, Banwell B, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):162-173.
101. Burton JM, O'Connor PW, Hohol M, et al. Oral versus intravenous steroids for treatment of relapses in multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 12:CD006921.
102. Cortese I, Chaudhry V, So YT, et al. Evidence-based guideline update: plasmapheresis in neurologic disorders: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2011;76:294–300.
103. McGraw CA, Lublin FD. Interferon beta and glatiramer acetate therapy. *Neurotherapeutics* 2013;10:2–18.
104. La Mantia L, Vacchi L, Rovaris M, et al. Interferon β for secondary progressive multiple sclerosis: a systematic review. *J Neurol Neurosurg Psych* 2013;84(4):420-426.
105. O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, et al. TEMSO Trial Group: Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. TEMSO Trial Group. *N Engl J Med* 2011;365:1293–1303.
106. Gold R, Kappos L, Arnold DL, et al. DEFINE Study Investigators: Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012;367:1098– 1107, erratum p2362.
107. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, et al. FREEDOMS Study Group: A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010;362:387–401.
108. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, et al. TRANSFORMS Study Group: Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010;362:402–415.

109. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, et al. AFFIRM Investigators: A randomized, placebo controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006;354:899–910.
110. Cohen JA, Coles AJ, Arnold DL, et al. CARE-MS I Investigators: Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 2012;380:1819–1828.
111. Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, et al. CARE-MS II Investigators: Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 2012;380:1829–1839.
112. Katsavos S, Coles A. Alemtuzumab as Treatment for Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(10). pii:a032029.
113. Rommer PS, Dörner T, Freivogel K, et al. Safety and Clinical Outcomes of Rituximab Treatment in Patients with Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica: Experience from a National Online Registry (GRAID). *J Neuroimmune Pharmacol*. 2016;11(1):1-8.
114. Stahnke AM, Holt KM. Ocrelizumab: A new B-cell therapy for Relapsing Remitting and Primary Progressive Multiple Sclerosis. *Ann Pharmacother*. 2018;52(5):473-483.
115. Hartung HP, Gonsette R, König N, et al. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 2002;360:2018–2025.
116. Aly L, Hemmer B, Korn T. From Leflunomide to Teriflunomide: Drug development and immunosuppressive oral drugs in the treatment of Multiple Sclerosis. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(6):874-891.
117. Giovannoni G, Soelberg Sorensen P, Cook S, et al. Safety and efficacy of cladribine tablets in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: Results from the randomized extension trial of the CLARITY study. *Mult Scler*. 2018;24(12):1594-1604.
118. Al-Salama ZT. Siponimod: First Global Approval. *Drugs* 2019;79(9):1009-1015.
119. de Sa JC, Airas L, Bartholome E, et al. Symptomatic therapy in multiple sclerosis: a review for a multimodal approach in clinical practice. *Ther Adv Neurol Disord*. 2011;4:139–168.

120. Ludwin SK. The pathogenesis of Multiple Sclerosis: Relating human pathology to experimental studies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(4):305-318.
121. Chaudhuri A, Behan PO. Multiple sclerosis is not an autoimmune disease. *Arch Neurol*. 2004;61:1610-1612.
122. Stys PK, Zamponi GW, van Minnen J, et al. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci*. 2012;13:507– 514, erratum 2012;13:597.
123. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*. 2006;129(Pt 8):1953-1971.
124. Wu GF, Alvarez E. The immunopathophysiology of Multiple Sclerosis. *Neurol Clin* 2011;29(2):257-278.
125. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, et al. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain*. 2002;125:2202-2012.
126. Fujimori J, Fujihara K, Ogawa R, et al. Patterns of regional brain volume loss in multiple sclerosis: a cluster analysis. *J Neurol*. 2019 doi:10.1007/s00415-019-09595-4. (Epub ahead of print)
127. Van Wijmeersch B, Singer BA, Boster A, et al. Efficacy of alemtuzumab over 6 years in relapsing-remitting multiple sclerosis patients who relapsed between courses 1 and 2: Post hoc analysis of the CARE-MS studies. *Mult Scler*. 2019; doi:10.1177/1352458519881759. (Epub ahead of print)
128. Sprenger T, Kappos L, Radue EW, et al. Association of brain volume loss and long-term disability outcomes in patients with multiple sclerosis treated with teriflunomide. *Mult Scler*. 2019; doi:10.1177/1352458519855722 (Epub ahead of print)
129. Crescenzo F, Marastoni D, Zucco C, et al. Effect of glatiramer acetate on cerebral grey matter pathology in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;27:305-311.
130. Zivadinov R, Medin J, Khan N, et al. Fingolimod's impact on MRI Brain Volume measures in Multiple Sclerosis: Results from MS-MRIUS. *J Neuroimaging*. 2018;28(4):399-405.
131. Medana I, Martinic MA, Wekerle H, et al. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol*. 2001;159(3):809-815.

132. Neumann H, Medana IM, Bauer J, et al. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci.* 2002;25(6):313-319.
133. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2002;1(4):232-241.
134. Fernandez M, Montalban X, Comabella M. Orchestrating innate immune responses in multiple sclerosis: Molecular players. *J Neuroimmunol.* 2010;225(1-2):5-12.
135. Sloane JA, Batt C, Ma Y, et al. Hyaluronan blocks oligodendrocyte progenitor maturation and remyelination through TLR2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(25):11555-11560.
136. Mathey EK, Derfuss T, Storch MK, et al. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med.* 2007; 204(10):2363-2372.
137. Derfuss T, Linington C, Hohlfeld R, et al. Axo-glial antigens as targets in multiple sclerosis: implications for axonal and grey matter injury. *J Mol Med.* 2010;88(8):753-761.
138. Kizilca Ö, Öztekin A, Kesimal U, et al. Signs in Neuroradiology: a pictorial review. *Korean J Radiol.* 2017;18(6):992-1004.
139. Nielsen AS, Kinkel RP, Madigan N, et al. Contribution of cortical lesion subtypes at 7T MRI to physical and cognitive performance in MS. *Neurology* 2013;81(7):641-649.
140. Gilmore CP, Donaldson I, Bo L, et al. Regional variations in the extent and pattern of grey matter demyelination in multiple sclerosis: a comparison between the cerebral cortex, cerebellar cortex, deep grey matter nuclei and the spinal cord. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009; 80:182-187.
141. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain.* 2005;128:2705-2712.
142. Magliozzi R, Howell O, Vora A, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.* 2007;130:1089-1104.
143. Amato MP, Portaccio E, Goretti B, et al. Association of neocortical volume changes with cognitive deterioration in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2007; 64:1157-1161.
144. Filippi M, Campi A, Dousset V, et al. A magnetization transfer imaging study of normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Neurology.* 1995; 45:478-482.

145. Ceccarelli A, Rocca MA, Falini A, et al. Normal-appearing white and grey matter damage in MS. A volumetric and diffusion tensor MRI study at 3.0 Tesla. *J Neurol*. 2007;254:513-518.
146. Gandhi R, Laroni A, Weiner HL. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2009;221:7-14.
147. Kasper L, Shoemaker J. Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs the MS immune system. *Neurology* 2010;74:S2-S8.
148. Weber MS, Prod'homme T, Youssef S, et al. Type II monocytes modulate T cell mediated central nervous system autoimmune disease. *Nat Med*. 2007;13:935-943.
149. Laroni A, Armentani E, Kerlero de Rosbo N, et al. Dysregulation of regulatory CD56(bright) NK cells/T cells interactions in multiple sclerosis. *J Autoimmun*. 2016;72:8-18.
150. Blink SE, Miller SD. The contribution of $\gamma\delta$ cells to the pathogenesis of EAE and MS. *Curr Mol Med*. 2009;9(1):15-22.
151. Loma I, Heyman R. Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment. *Curr Neuropharmacol*. 2011;9:409-416.
152. Slavin AJ, Soos JM, Stuve O, et al. Requirement for endocytic antigen processing and influence of invariant chain and H-2M deficiencies in CNS autoimmunity. *J Clin Invest*. 2001; 108:1133-1139.
153. Tompkins SM, Padilla J, Dal Canto MC, et al. De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2002; 168:4173-4183.
154. Henderson AP, Barnett MH, Parratt JD, et al. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol*. 2009;66:739-753.
155. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med*. 2001;7:115-121.
156. McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, et al. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med*. 2005;11:335-339.
157. Gabilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(3):162-174.
158. Pette M, Fujita K, Wilkinson D, et al. Myelin autoreactivity in multiple sclerosis: recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T

lymphocytes of multiple-sclerosis patients and healthy donors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(20):7968-7972.

159. Greer JM, Csurhes PA, Cameron KD, et al. Increased immunoreactivity to two overlapping peptides of myelin proteolipid protein in multiple sclerosis. *Brain*. 1997; 120(Pt 8):1447-1460.

160. Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, et al. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*. 1994;179(3):973-984.

161. de Rosbo NK, Kaye JF, Eisenstein M, et al. The myelin-associated oligodendrocytic basic protein region MOBP15-36 encompasses the immunodominant major encephalitogenic epitope(s) for SJL/ J mice and predicted epitope(s) for multiple sclerosis-associated HLA-DRB1*1501. *J Immunol*. 2004; 173(2):1426-1435.

162. Bajramovic JJ, Plomp AC, Goes A, et al. Presentation of alpha B-crystallin to T cells in active multiple sclerosis lesions: an early event following inflammatory demyelination. *J Immunol*. 2000;164(8):4359-4366.

163. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*. 2009;361(9):888-898.

164. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*. 2007;13(10):1173-1175.

165. Durelli L, Conti L, Clerico M, et al. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann Neurol*. 2009;65(5):499-509.

166. Lock C, Hermans G, Pedotti R, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*. 2002;8(5):500-508.

167. Haas J, Hug A, Veihover A, et al. Reduced suppressive effect of CD4+CD25 high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2005;35:3343-3352.

168. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med*. 2006;354(9):942-955.

169. Lucchinetti CF, Bruck W, Lassmann H. Evidence for pathogenic heterogeneity in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2004;56(2):308.

170. Franciotta D, Salvetti M, Lolli F, et al. B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2008;7(9):852-858.
171. Avasarala JR, Cross AH, Trotter JL. Oligoclonal band number as a marker for prognosis in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2001;58(12):2044-2045.
172. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2008; 358(7):676-688.
173. Warren KG, Catz I. Autoantibodies to myelin basic protein within multiple sclerosis central nervous system tissue. *J Neurol Sci.* 1993;115(2):169-176.
174. O'Connor KC, Appel H, Bregoli L, et al. Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Immunol.* 2005;175(3):1974-1982.
175. Villar LM, Sadaba MC, Roldan E, et al. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest.* 2005; 115(1):187-194.
176. Duddy M, Niino M, Adatia F, et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2007;178:6092-6099.
177. Ludwin SK. Neuropathology of multiple sclerosis. *Neuroimag Clin N Am.* 2000;10:625-648.
178. Stadelmann C, Kerschensteiner M, Misgeld T, et al. BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: Neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? *Brain* 2002;125:75-85.
179. De Keyser J, Zeinstra E, Frohman E. Are astrocytes central players in the pathophysiology of multiple sclerosis? *Arch Neurol.* 2003;60:132-136.
180. Daneman R, Rescigno M. The gut immune barrier and the blood-brain barrier: are they so different? *Immunity.* 2009;31(5):722-735.
181. Piccio L, Rossi B, Scarpini E, et al. Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G(i)-linked receptors. *J Immunol.* 2002;168(4):1940-1949.
182. Sato W, Tomita A, Ichikawa D, et al. CCR2⁺CCR5⁺ T cells produce matrix metalloproteinase-9 and osteopontin in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Immunol.* 2012;189(10):5057-5065.

183. McCandless EE, Piccio L, Woerner BM, et al. Pathological expression of CXCL12 at the bloodbrain barrier correlates with severity of multiple sclerosis. *Am J Pathol.* 2008;172(3):799-808.
184. Alexander JS, Prouty L, Tsunoda I, et al. Venous endothelial injury in central nervous system diseases. *BMC Med.* 2013;11:219 doi:10.1186/1741-7015-11-219.
185. Zivadinov R, Weinstock-Guttman B. Multiple sclerosis: Extracranial venous angioplasty is ineffective to treat MS. *Nat Rev Neurol.* 2018;14(3):129-130.
186. Allen IV, McQuaid S, Mirakhur M, et al. Pathological abnormalities in the normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Neurol Sci.* 2001;22(2):141-144.
187. Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol.* 2004;55(4):458-468.
188. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, et al. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol.* 2006;13:700–722.
189. Evans C, Beland SG, Kulaga S, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the Americas: a systematic review. *Neuroepidemiology* 2013;40:195–210.
190. Sintzel MB, Rametta M, Reder AT. Vitamin D and Multiple Sclerosis: a comprehensive review. *Neurol Ther.* 2018;7(1):59-85.
191. Hedström AK, Sundqvist E, Bäärnhielm M, et al. Smoking and two human leucocyte antigen genes interact to increase the risk for multiple sclerosis. *Brain* 2011;134(Pt 3):653-664.
192. Hedström AK, Hössjer O, Hillert J, et al. The influence of human leucocyte antigen-DRB1*15:01 and its interaction with smoking in MS development is dependent on DQA1*01:01 status. *Mult Scler.* 2019;135248519877685 doi:10.1177/1352458519877685 [Epub ahead of print].
193. Marrie RA, Rudick R, Horwitz R, et al. Vascular comorbidity is associated with more rapid disability progression in multiple sclerosis. *Neurology* 2010;74:1041–1047.
194. Langer-Gould A, Brara SM, Beaber BE, et al. Childhood obesity and risk of pediatric multiple sclerosis and clinically isolated syndrome. *Neurology* 2013;80(6):548-552.
195. Gardener H, Munger KL, Chitnis T, et al. Prenatal and perinatal factors and risk of multiple sclerosis. *Epidemiology* 2009;20(4):611-618.

196. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, The Pregnancy in Multiple Sclerosis Group, et al. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 1998;339:285–291.
197. Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 2000;374(2):334-338.
198. Chen S, Sims GP, Chen XX, et al. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol.* 2007;179(3):1634-1647.
199. Garcion E, Wion-Barbot N, Montero-Menei CN, et al. New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(3):100-105.
200. Eyles DW, Smith S, Kinobe R, et al. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat.* 2005;29(1):21-30.
201. Correale J, Ysraelit M, Gaitan M. Immunomodulatory aspects of vitamin D in multiple sclerosis. *Brain* 2009;132:1146-1160.
202. Correale J, Ysraelit M, Gaitan M. Gender differences in 1,25 dihydroxyvitamin D3 immunomodulatory effects in multiple sclerosis patients and healthy subjects. *J Immunol.* 2010;185:4948-4958.
203. Chaudhuri A. Why we should offer routine vitamin D supplementation in pregnancy and childhood to prevent multiple sclerosis. *Med Hypotheses* 2005;64(3):608-618.
204. Handunnetthi L, Ramagopalan SV, Ebers GC. Multiple sclerosis, vitamin D, and HLA-DRB1*15. *Neurology* 2010;74(23):1905-1910.
205. Ascherio A, Munger KL. EBV and autoimmunity. *Curr Top Microbiol.* 2015;390(Pt 1): 365-385.
206. Christensen T. Human herpesviruses in MS. *Int MS J.* 2007;14(2):41-47.
207. Swanborg RH, Whittum-Hudson JA, Hudson AP. Infectious agents and multiple sclerosis--are *Chlamydia pneumoniae* and human herpes virus 6 involved? *J Neuroimmunol.* 2003;136(1-2):1-8.
208. Ventura RE, Iizumi T, Battaglia T, et al. Gut microbiome of treatment naive MS patients of different ethnicities early in disease course. *Sci Rep.* 2019;9:16396 doi:10.1038/s41598-019-52894-z
209. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, et al. Epstein-Barr virus antibodies and the risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA* 2001;286:3083–3088.
210. Ponsonby AL, van der Mei I, Dwyer T, et al. Exposure to infant siblings during early life and risk of multiple sclerosis. *JAMA.* 2005;293:463–469.

211. Sundström P, Juto G, Wadell G, et al. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology* 2004;62:2277–2282.
212. Gran B, Hemmer B, Vergelli M, et al. Molecular mimicry and multiple sclerosis: degenerate T-cell recognition and the induction of autoimmunity. *Ann Neurol*. 1999;45(5):559-567.
213. Tengvall K, Huang J, Helström C, et al. Molecular mimicry between Anoctamin 2 and Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 associates with multiple sclerosis risk. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;116(34):16955-16960.
214. Redwine JM, Buchmeier MJ, Evans CF. In vivo expression of major histocompatibility complex molecules on oligodendrocytes and neurons during viral infection. *Am J Pathol* 2001;159(4):1219-1224.
215. Vanderlugt CL, Begolka WS, Neville KL, et al. The functional significance of epitope spreading and its regulation by co-stimulatory molecules. *Immunol Rev*. 1998;164:63-72.
216. Quintana FJ, Patel B, Yeste A, et al. Epitope spreading as an early pathogenic event in pediatric multiple sclerosis. *Neurology* 2014;83(24):2219-2226.
217. van Noort JM, Verbeek R, Meilof JF, et al. Autoantibodies against alpha B-crystallin, a candidate autoantigen in multiple sclerosis, are part of a normal human immune repertoire. *Mult Scler* 2006;12(3):287-293.
218. Cloos PA, Christgau S. Post-translational modifications of proteins: implications for aging, antigen recognition, and autoimmunity. *Biogerontology* 2004;5(3):139-158.
219. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, et al, Canadian Collaborative Study Group. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:12877–12882.
220. Willer CJ, Dyment DA, Sadovnick AD, et al, Canadian Collaborative Study Group. Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study. *BMJ*. 2005;330:120–1244.
221. Staples J, Ponsonby AL, Lim L. Prenatal ultraviolet radiation exposure, month of birth and subsequent risk of multiple sclerosis: a longitudinal analysis. *BMJ*. 2010;340:c1640.
222. Templer DI, Trent NH, Spencer DA, et al. Season of birth in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 1992;85:107–109.

223. Torkildsen Ø, Aarseth J, Benjaminsen E, et al. Month of birth and risk of multiple sclerosis: confounding and adjustments. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014;1:141–144.
224. Ebers GC, Sadovnick AD, Dyment DA, et al. Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations in half-siblings. *Lancet*. 2004;363:1773–1774.
225. Dean G, Kurtzke JF. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *BMJ*. 1971;3:725–729.
226. Cabre P, Signate A, Olindo S, et al. Role of return migration in the emergence of multiple sclerosis in the French West Indies. *Brain*. 2005;128:2899–2910.
227. Elian M, Nightingale S, Dean G. Multiple sclerosis among United Kingdom-born children of immigrants from the Indian subcontinent, Africa, and the West Indies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1990;53:906–911.
228. Alter M, Kahana E, Loewenson R. Migration and risk of multiple sclerosis. *Neurology*. 1978;28:1089–1093.
229. Lucchinetti CF, Gavrilova RH, Metz I, et al. Clinical and radiographic spectrum of pathologically confirmed tumefactive multiple sclerosis. *Brain* 2008;131(Pt 7):1759–1775.
230. Altintas A, Petek B, Isik N, et al. Clinical and radiological characteristics of tumefactive demyelinating lesions: follow-up study. *Mult Scler*. 2012;18(10):1448–1453.
231. Saini J, Chatterjee S, Thomas B, et al. Conventional and advanced imaging in tumefactive demyelination. *Acta Radiol*. 2011;52(10):1159–1168.
232. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310(20):2191–2194.
233. Tadd W. The Helsinki Declaration: why all the fuss? *Nurs Ethics* 2000;7(5):439–450.
234. Papassavas EC, Spyropoulou-Vlachou M, Papassavas AC et al. MHC class I and class II phenotype, gene, and haplotype frequencies in Greeks using molecular typing data. *Hum Immunol*. 2000;61:615–623.
235. Marsh SG, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA system. Nomenclature for factors of the HLA system, update December 2012. *Tissue Antigens* 2013;81(4):253–257.

236. Benjamini Y, Yekutieli D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann Statist.* 2001;29(4):1165-1188.
237. Benjamini Y, Drai D, Elmer G et al. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res.* 2001;125:279–284.
238. Tanious R, De TK, Onghena P. A multiple randomization testing procedure for level, trend, variability, overlap, immediacy, and consistency in single-case phase designs. *Behav Res Ther.* 2019;119:103414 doi:10.1016/j.brat.2019.103414
239. Pescatello LS, Schifano ED, Ash GI, et al. Deep-targeted exon sequencing reveals renal polymorphisms associate with postexercise hypotension among African Americans. *Physiol Rep.* 2016;4(19):e12992.
240. Huart J, Leenders J, Taminiau B, et al. Gut Microbiota and Fecal Levels of Short-Chain Fatty Acids differ upon 24-hour Blood Pressure levels in men. *Hypertension* 2019;74(4):1005-1013.
241. Nguyen N, Vanderbroucke L, Hernandez A, et al. Early-onset neonatal sepsis is associated with a high heart rate during automatically selected stationary periods. *Acta Paediatr.* 2017; 106(5):749-754.
242. Lancaster AK, Nelson MP, Meyer D, et al. PyPoP: a software framework for population genomics: analyzing large-scale multi-locus genotype data. *Pac Symp Biocomput.* 2013;514-525.
243. Lancaster AK, Single RM, Solberg OD, et al. PyPoP update--a software pipeline for large-scale multilocus population genomics. *Tissue Antigens* 2007;69(Suppl 1):192-197.
244. Wang J, Shete S. Testing departure from Hardy-Weinberg proportions. *Methods Mol Biol.* 2012;850:77-102.
245. Graffelman J, Weir BS. On the testing of Hardy-Weinberg proportions and equality of allele frequencies in males and females at biallelic genetic markers. *Genet Epidemiol.* 2018;42(1):34-48.
246. Watterson GA. The homozygosity test for neutrality. *Genetics* 1978;88(2):405-417.
247. Katsavos S, Davaki P, Stamboulis E, et al. Clinical and neuroimaging characteristics in a sample of patients with familial multiple sclerosis: a Hellenic retrospective cohort study. *ECTRIMS Online library* 2015;115699. 31st ECTRIMS Congress, Barcelona 2015. P:777.

248. Katsavos S, Artemiadis A, Davaki P, et al. Familial multiple sclerosis in Greece: Distinct clinical and imaging characteristics in comparison with the sporadic disease. *Clin Neurol Neurosurg*. 2018;173:144-149.
249. Katsavos S, Artemiadis A, Gontika M, et al. HLA-DRB1 differences in allelic distribution between familial and sporadic multiple sclerosis in a Hellenic cohort. *Postgrad Med*. 2019;131(7):490-495.
250. Mescheriakova JY, Broer L, Wahedi S, et al. Burden of genetic risk variants in multiple sclerosis families in the Netherlands. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2016;2:2055217316648721. doi:10.1177/2055217316648721.
251. Esposito F, Guaschino C, Sorosina M, et al. Impact of MS genetic loci on familial aggregation, clinical phenotype, and disease prediction. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2015;2:e129; doi: 10.1212/NXI.0000000000000129
252. van der Vuurst de Vries RM, Mescheriakova JY, Runia TF, et al. Smoking at time of CIS increases the risk of clinically definite multiple sclerosis. *J Neurol*. 2018;265(5):1010-1015.
253. Broadley SA, Deans J, Sawcer SJ, et al. Autoimmune disease in first-degree relatives of patients with multiple sclerosis. A UK survey. *Brain* 2000;123:1102-1111.
254. Ramagopalan SV, Dymment DA, Valdar W, et al. Autoimmune disease in families with multiple sclerosis: a population study. *Lancet Neurol*. 2007;6(7):604-610.
255. Barcellos LF, Kamdar BB, Ramsay PP, et al. Clustering of autoimmune diseases in families with a high-risk for multiple sclerosis: a descriptive study. *Lancet Neurol*. 2006;5(11):924-931.
256. Dobson R, Giovannoni G. Autoimmune disease in people with multiple sclerosis and their relatives: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol*. 2013;260(5):1272-1285.
257. Calabrese M, Seppi D, Cocco E et al. Cortical pathology in RRMS: Taking a Cue from Four Sisters. *Mult Scler Int*. 2012;2012:760254.
258. Lindner M, Klotz L, Wiendl H. Mechanisms underlying lesion development and lesion distribution in CNS autoimmunity. *J Neurochem*. 2018;146(2):122-132.
259. Sombekke MH, Velling MM, Uitdehaag BMJ, et al. Genetic correlations of brain lesion distribution in Multiple Sclerosis: an exploratory study. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011;32(4):695-703.

260. Gourraud PA, Sdika M, Khankhanian P, et al. A genome-wide association study of brain lesion distribution in multiple sclerosis. *Brain* 2013;136(Pt 4):1012-1024.
261. Roth MP, Clayton J, Patois E, et al. Gender distributions in parents and children concordant for multiple sclerosis. *Neuroepidemiology* 1994;13:211-215.
262. Sadovnick AD, Bulman D, Ebers GC. Parent-child concordance in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1991;29:252-255.
263. Sadovnick AD, Yee IM, Ebers GC. Factors influencing sib risks for multiple sclerosis. *Clin Genet.* 2000;58:431-435.
264. Herrera BM, Ramagopalan SV, Lincoln MR, et al. Parent-of-origin effects in MS: observations from avuncular pairs. *Neurology* 2008;71:799-803.
265. Chao MJ, Herrera BM, Ramagopalan SV, et al. Parent-of-origin effects at the major histocompatibility complex in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2010;19(18):3679-3689.
266. Marrosu MG, Murru MR, Costa G, et al. Multiple sclerosis in Sardinia is associated and in linkage disequilibrium with HLA-DR3 and –DR4 alleles. *Am J Hum Genet.* 1997;61:454-457.
267. Marrosu MG, Sardu C, Cocco E, et al. Bias in parental transmission of the HLA-DR3 allele in Sardinian multiple sclerosis. *Neurology* 2004;63:1084-1086.
268. da Silva Bernandes M, Antao Paiva CL, Paradela R et al. Familial multiple sclerosis in a Brazilian sample: Is HLA-DR15 involved in susceptibility to the disease? *J Neuroimmunol.* 2019;330:74-80.
269. Mosca L, Mantero V, Penco S et al. HLA-DRB1*15 association with multiple sclerosis is confirmed in a multigenerational Italian family. *Funct Neurol.* 2017;32(2):83-88.
270. Lincoln MR, Ramagopalan SV, Chao MJ et al. Epistasis among HLA-DRB1, HLA-DQA1 and HLA-DQB1 loci determines multiple sclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:7542-7547.
271. Romero-Pinel L, Pujal JM, Martinez-Yelamos S, et al. Epistasis between HLA-DRB1 parental alleles in a Spanish cohort with multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2010;298(1-2):96-100.
272. Gregersen JW, Kranc KR, Ke X, et al. Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis. *Nature* 2006; 443(7111):574-577.

273. De Silvestri A, Capittini C, Mallucci G, et al. The involvement of HLA Class II alleles in Multiple Sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Dis Markers* 2019;2019:1409069. doi:10.1155/2019/1409069.
274. Kaimen-Maciel DR, Reiche EMV, Borelli SD, et al. HLA-DRB1* allele-associated genetic susceptibility and protection against multiple sclerosis in Brazilian patients. *Mol Med Rep.* 2009;2(6):993-998.
275. Luo H, Chen M, Yang R, et al. The association of HLA-DRB1 alleles with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated systemic vasculitis in Chinese patients. *Hum Immunol.* 2011;72(5):422-425.
276. Isobe N, Matsushita T, Yamasaki R, et al. Influence of HLA-DRB1 alleles on the susceptibility and resistance to multiple sclerosis in Japanese patients with respect to anti-aquaporin 4 antibody status. *Mult Scler.* 2010;16(2):147-155.
277. Zivadinov R, Uxa L, Zacchi T, et al. HLA genotypes and disease severity assessed by magnetic resonance imaging findings in patients with multiple sclerosis. *J Neurol.* 2003;250(9):1099-1106.
278. Yang HC, Chang LC, Liang YJ, et al. A genome-wide homozygosity association study identifies runs of homozygosity associated with Rheumatoid Arthritis in the human Major Histocompatibility Complex. *PLoS One.* 2012;7(4):e34840.
279. Ruiz-Ortiz E, Montraveta M, Cabre E, et al. HLA-DQ2/DQ8 and HLA-DQB1*02 homozygosity typing by real-time polymerase chain reaction for the assessment of celiac disease genetic risk: evaluation of a Spanish celiac population. *Tissue Antigens* 2014;84(6):546-553.
280. Shivdasani RA, Anderson KC. HLA homozygosity and shared HLA haplotypes in the development of transfusion-associated graft-versus-host disease. *Leuk Lymphoma* 1994;15(3-4):227-234.
281. de la Concha EG, Cavanillas ML, Cenit MC, et al. *DRB1*03:01* haplotypes: differential contribution to Multiple Sclerosis risk and specific association with the presence of intrathecal IgM bands. *PLoS One.* 2012;7(2):e31018.
282. Zhang Q, Lin CY, Dong Q, et al. Relationship between HLA-DRB1 polymorphism and susceptibility or resistance to multiple sclerosis in Caucasians: a meta-analysis of non-family-based studies. *Autoimmun Rev.* 2011;10(8):474-481.
283. Buck D, Cepok S, Hoffmann S, et al. Influence of the HLA-DRB1 genotype on antibody development to interferon beta in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2011;68(4):480-487.

284. Shinoda K, Matsushita T, Nakamura Y, et al. *HLA-DRB1*04:05* allele is associated with intracortical lesions on three-dimensional double inversion recovery images in Japanese patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2018;24(6):710-720.
285. Ogawa K, Okuno T, Hosomichi K, et al. Next-generation sequencing identifies contribution of both class I and II HLA genes on susceptibility of multiple sclerosis in Japanese. *J Neuroinflammation* 2019;16(1):162 doi: 10.1186/s12974-019-1551-z.
286. Nakamura Y, Matsushita T, Sato S, et al. Latitude and *HLA-DRB1*04:05* independently influence disease severity in Japanese multiple sclerosis: a cross-sectional study. *J Neuroinflammation* 2016;13(1):239
287. Alonso VR, de Jesus Flores Rivera J, Garci YR, et al. Neuromyelitis Optica (NMO IgG+) and genetic susceptibility, potential ethnic influences. *Centr Nerv Syst Med Chem* 2018;18(1):4-7.
288. Furukawa H, Oka s, Tsuchiya N, et al. The role of common protective alleles HLA-DRB1*13 among systemic autoimmune diseases. *Genes Immun.* 2017;18(1):1-7.
289. Bettencourt A, Carvalho C, Leal B, et al. The protective role of HLA-DRB1(*)13 in autoimmune diseases. *J Immunol Res.* 2015;2015;948723. doi:10.1155/2015/948723.
290. Michalik J, Cierny D, Kantorova E, et al. The association of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles with genetic susceptibility to multiple sclerosis in the Slovak population. *Neurol Res.* 2015;37(12):1060-1067.
291. Liguori M, Healy BC, Glanz BI, et al. HLA (A-B-C and –DRB1) alleles and brain MRI changes in multiple sclerosis: a longitudinal study. *Genes Immun.* 2011;12(3):183-190.
292. Toro J, Cuellar-Giraldo D, Diaz-Cruz C, et al. HLA-DRB1*14 is a protective allele for multiple sclerosis in an admixed Colombian population. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2015;3(1):e192.
293. de la Hera B, Urcelay E, Brassat D, et al. Natalizumab-related anaphylactoid reactions in MS patients are associated with HLA class II alleles. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2014;1(4):e47. doi:10.1212/NXI.0000000000000047.
294. Kumar A, Melis p, Genna V, et al. Antigenic peptide molecular recognition by the DRB1-DQB1 haplotype modulates multiple sclerosis susceptibility. *Mol Biosyst.* 2014;10(8):2043-2054.

295. Shu Y, Qiu W, Zheng J, et al. HLA class II allele *DRB1*16:02* is associated with anti-NMDAR encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2019;90(6):652-658.
296. Testi M, Terracciano C, Guagnano A, et al. Association of HLA-DQB1*05:02 and *DRB1*16* alleles with Late-Onset, Nonthymomatous, AChR-Ab-Positive Myasthenia Gravis. *Autoimmun Dis.* 2012;2012:541760.
297. Berger J, Bernheimer H, Fae I, et al. Association of X-linked adrenoleukodystrophy with HLA *DRB1* alleles. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;216(2):447-451.
298. Klimenta B, Nefic H, Prodanovic N, et al. Association of biomarkers of inflammation and HLA-*DRB1* gene locus with risk of developing rheumatoid arthritis in females. *Rheumatol Int.* 2019;39(12):2147-2157.
299. Vozikis A, Sotiropoulou E. Multiple sclerosis in Greece: An analysis of out-of-pocket payments. *Arch Hellen Med.* 2012;29(4):448-453.
300. Papathanasopoulos P, Goutzoulidou E, Messinis L, et al. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in western Greece: a 23-year survey. *Neuroepidemiology* 2008;30(3):167-173.