



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ *COL17A1* ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΔΗΛΩΣΗ
ΠΟΜΦΟΥΛΥΓΩΔΟΥΣ ΠΕΜΦΙΓΟΕΙΔΟΥΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ»**

ΠΑΡΘΕΝΑ ΜΕΛΤΖΑΝΙΔΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ *COL17A1* ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΔΗΛΩΣΗ
ΠΟΜΦΟΥΛΥΓΩΔΟΥΣ ΠΕΜΦΙΓΟΕΙΔΟΥΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ»**

ΠΑΡΘΕΝΑ ΜΕΛΤΖΑΝΙΔΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

2023

Δηλώνω υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του Ν. 2121/1993 και του Ν. 4777/221 4777/2021, ότι η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι εξ ολοκλήρου αποτέλεσμα δικής μου ερευνητικής εργασίας, δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής, ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Όλες οι πηγές που χρησιμοποιήθηκαν (κάθε είδους, μορφής και προέλευσης) για τη συγγραφή της περιλαμβάνονται στη βιβλιογραφία.

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα, Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κ. Μελτζανίδου Παρθένας: 28-11-2016

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 794^ο/31-01-2017

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα:

Σύρρου Μαρίκα, Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής

Μέλη:

Λαμπρόπουλος Αλέξανδρος, Καθηγητής Γενικής Βιολογίας-Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του ΑΠΘ
Πατσατσά Αικατερίνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του ΑΠΘ

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 01-03-2017

«Συσχέτιση της γενετικής ποικιλότητας του Col17A1, με την εκδήλωση Πομφολυγώδους Πεμφιγοειδούς σε ασθενείς με Νευρολογικές Παθήσεις»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 1061^ο/04-07-2023

1. Σύρρου Μαρίκα, Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Πατσατσά Αικατερίνη, Καθηγήτρια Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του ΑΠΘ
3. Λαμπρόπουλος Αλέξανδρος, Καθηγητής Γενικής Βιολογίας-Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Λαζαρίδου Ελισάβετ, Καθηγήτρια Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας
6. Γαϊτάνης Γεώργιος, Καθηγητής Δερματολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Τσάμης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 17-07-2023

Ιωάννινα 03-11-2023

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κονιτσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



**Στους γονείς και τον αδερφό μου,
με αναγνώριση**

**Στο σύζυγό μου Αντώνη και
τη μπέμπα μας που έρχεται,
με αγάπη**

«Σημασία δεν έχει ο προορισμός, αλλά το ταξίδι». Κ. Καβάφης

Για όλο αυτό το όμορφο ταξίδι, χρωστάω θερμές ευχαριστίες...

Ευχαριστώ ολόψυχα την Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής κα Μαρίκα Σύρρου, η οποία με εμπιστεύτηκε και με στήριξε για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Είναι τιμή και χαρά μου που ήταν η επιβλέπουσα της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής και πάντα δίπλα μου σε ότι και αν χρειάστηκα, προσπαθώντας να διευκολύνει το έργο μου.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στην Καθηγήτρια Δερματολογίας και Αφροδισιολογίας κα Αικατερίνη Πατσατσή. Τα λόγια είναι φτωχά για να εκφράσω την αναγνώριση, τον σεβασμό και την αγάπη μου προς το πρόσωπό της. Η κα Πατσατσή μου έδωσε την ιδέα για την έρευνα αυτή, ενώ παρακολούθησε από την αρχή έως το τέλος την πορεία της, δίνοντας πολύτιμες συμβουλές και την ουσιαστική της βοήθεια, όποτε την χρειάστηκα. Θα την θεωρώ πάντα οικογένειά μου.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στον Καθηγητή Ιατρικής Βιολογίας-Γενετικής και Διευθυντή της Μονάδας Γενετικής του ΓΝΘ Παπαγεωργίου κο Αλέξανδρο Λαμπρόπουλο. Μέσα από την πολυετή μας συνεργασία με ενέπνευσε και μου έδωσε τις βάσεις ενός σωστού επιστήμονα, τόσο θεωρητικά, όσο και πρακτικά, διδάσκοντάς μου τις αρχές και την τεχνογνωσία και καλλιεργώντας την αγάπη για την επιστήμη της Βιολογίας. Ήταν πάντα δίπλα μου, συνοδοιπόρος όλης αυτής της προσπάθειας, δίνοντας λύσεις σε οποιοδήποτε σκόπελο προέκυπτε και εποπτεύοντας κάθε βήμα της πορείας μου. Θα αποτελεί πάντα ένα σπουδαίο άνθρωπο στην πορεία της ζωής μου.

Η Μονάδα Γενετικής θα αποτελεί πάντα το εργασιακό μου σπίτι και τα μέλη της φίλους ζωής. Συγκεκριμένα ένα μεγάλο ευχαριστώ στους δύο Βιολόγους, κα Χρυσούλα Ντάιου και κο Σωκράτη Καταφυγιώτη για την βοήθεια και την στήριξή τους στην πορεία των ετών. Οι δεσμοί που αναπτύξαμε θα μας συντροφεύουν.

Ευχαριστώ την Διευθύντρια της Νευρολογικής Κλινικής του ΓΝΘ Παπαγεωργίου κα Γεωργία Δερετζή, η οποία από την πρώτη στιγμή που της αναπτύξαμε την ιδέα της διατριβής, μας στήριξε και η βοήθειά της, καθώς και οι συμβουλές της, υπήρξαν πολύτιμες. Γενικά θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη τη Νευρολογική Κλινική, που όποτε χρειάστηκα οποιοδήποτε μέλος της, με στήριξε με χαμόγελο και συναδελφικότητα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Β' Δερματολογική Κλινική του ΑΠΘ και όλα τα μέλη της χωριστά, από τους αγαπημένους μου ειδικούς και ειδικευόμενους ιατρούς, μέχρι το αξιότιμο νοσηλευτικό προσωπικό, που με βοήθησαν ποικιλοτρόπως όλα αυτά τα χρόνια και που χωρίς τη βοήθειά τους, δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής κα Ελισσάβητ Λαζαρίδου, Καθηγήτρια Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας, κο Γεωργίου Ιωάννη, Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Κλινικής Εμβρυολογίας, κο Γεώργιο Γαϊτάνη, Αν. Καθηγητή Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας και κο Τσάμη Κωνσταντίνο, Επ. Καθηγητή Φυσιολογίας, για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην αξιολόγηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το δέρμα αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο του ανθρωπίνου σώματος και τον πρώτο φραγμό του ανοσοποιητικού συστήματος. Η διασφάλιση της ακεραιότητάς του αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο για την προάσπιση της υγείας του οργανισμού. Για το λόγο αυτό, τα δερματικά νοσήματα θα πρέπει να αποτελούν στόχο της σύγχρονης ιατρικής επιστήμης και έρευνας, καθότι τα ποσοστά των ασθενών που νοσούν από αυτά, ολοένα και αυξάνονται. Μια μεγάλη κατηγορία νοσημάτων του δέρματος αποτελούν τα «Πομφολυγώδη Νοσήματα», με το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (ΠΠ) να χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή και μέριμνα, καθώς οι περισσότεροι ασθενείς χρήζουν νοσηλείας, ενώ στην πλειοψηφία τους είναι ηλικιωμένοι, με βεβαρυσμένη υγεία και συνυπάρχουσες παθήσεις.

Το Πομφολυγώδες Πεμφιγοειδές αποτελεί μια αυτοάνοση δερματική νόσο που εκδηλώνεται με την παρουσία υποεπιδερμικών φυσαλίδων. Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός της νόσου σχετίζεται με την παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι δομικών πρωτεϊνών των ημιδεσμοσωματίων της βασικής μεμβράνης και συγκεκριμένα έναντι των BP180 (BP αντιγόνο 2 ή κολλαγόνο XVII) και BP230 (BP αντιγόνο 1). Η δέσμευση των πρωτεϊνών αυτών με τα παραγόμενα λόγω της ασθένειας αυτοαντισώματα, οδηγεί στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος και των φλεγμονωδών κυττάρων, καθώς και στην απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων. Το αποτέλεσμα όλων αυτών των διεργασιών είναι η κατάργηση της συνοχής επιδερμίδας – βασικής μεμβράνης και η δημιουργία των χαρακτηριστικών πομφολύγων. Η απαρχή και η πορεία της νόσου εξαρτάται από την ποικιλότητα αλληλεπίδραση μεταξύ προδιαθεσικών και επαγωγικών παραγόντων, ενώ οι δερματικές αλλοιώσεις παρουσιάζουν εξαιρετική ποικιλομορφία.

Μελέτες σε ασθενείς με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές έχουν δείξει ότι σε στατιστικά σημαντικό ποσοστό, οι ασθενείς αυτοί έχουν εκδηλώσει νευρολογικές και ψυχιατρικές διαταραχές, ήδη πριν την εκδήλωση του ΠΠ. Πολυάριθμες μελέτες έχουν συνδέσει το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές με διάφορες νευρολογικές διαταραχές, ενώ υπάρχει ακόμα και περιγραφή εντοπισμένης εκδήλωσης της νόσου σε θέσεις νευρολογικής βλάβης σε ασθενή με ημιπάρεση.

Στη παρούσα μελέτη γίνεται μια προσπάθεια αναγνώρισης του παθοφυσιολογικού μηχανισμού της άνωθεν συσχέτισης. Πιθανή κοινή αιτία εκδήλωσης των δύο νοσημάτων ενδέχεται να είναι το κολλαγόνο XVII, λειτουργώντας ως κοινό αντιγόνο που πυροδοτεί μια ανοσολογική απόκριση έναντι του δέρματος και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η γενετική ποικιλότητα ενός γονιδίου, όπως του *COL17A1*, μπορεί να επηρεάσει την έκφραση της πρωτεΐνης και την ικανότητα των μορίων MHC να παρουσιάσουν το κολλαγόνο XVII στο ανοσοποιητικό σύστημα. Εναλλακτικά, η γενετική ποικιλότητα του γονιδίου, εάν περιλαμβάνει

υποκατάσταση κάποιου αμινοξέος, θα μπορούσε να επηρεάσει την τάση των περιφερειακών αυτοαντισωμάτων να δεσμεύονται με το μόριο.

Το γενικό μέρος περιλαμβάνει μια βιβλιογραφική ανασκόπηση και ανάλυση του ΠΠ και των εξεταζόμενων νευρολογικών παθήσεων, καθώς και των γενετικών μηχανισμών και των βιομορίων που εμπλέκονται στο ερευνητικό ερώτημα.

Το ειδικό μέρος περιλαμβάνει την ανάλυση της μεθοδολογίας, την παράθεση των αποτελεσμάτων, καθώς και τη συζήτηση και το τελικό συμπέρασμα της εν λόγω μελέτης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- Εισαγωγή..... σ.7

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- Βασικές αρχές ανοσοποιητικού συστήματος..... σ.10
- Αυτοανοσία..... σ.10
- Διασπορά επιτόπων (epitope spreading)..... σ.11
- Πολλαπλοί αντιγονικοί στόχοι..... σ.12
- Πομφολυγώδεις δερματοπάθειες και τύποι..... σ.14
 - Ιστορική αναδρομή..... σ.15
- Πομφολυγώδες πεμφιγοειδές..... σ.16
 - Ορισμός..... σ.16
 - Επιδημιολογία..... σ.16
 - Κλινική εικόνα - μορφές..... σ.17
 - Παθογένεια..... σ.20
 - Διάγνωση..... σ.23
 - Άμεσος ανοσοφθορισμός..... σ.23
 - Έμμεσος ανοσοφθορισμός..... σ.24
 - Ιστολογική εξέταση..... σ.24
 - ELISA..... σ.25
 - Western blot..... σ.25
 - Τεχνική διαχωρισμού δέρματος (Split skin)..... σ.26
 - Διαφορική διάγνωση..... σ.29
 - Επιβαρυντικοί παράγοντες και συσχέτιση με άλλα νοσήματα..... σ.29
 - Πορεία – πρόγνωση..... σ.30
 - Θεραπεία..... σ.31
 - Επιπλοκές – θνητότητα..... σ.33
- Νευρολογικά νοσήματα..... σ.34
 - Ορισμός..... σ.34
 - Νόσος Parkinson..... σ.34
 - Ορισμός..... σ.34
 - Κλινική εικόνα..... σ.34
 - Παθογένεια..... σ.35
 - Διάγνωση..... σ.36
 - Θεραπεία..... σ.36
 - Πρόγνωση..... σ.36
 - Ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια..... σ.37

▪ Ορισμός.....	σ.37
▪ Κλινική εικόνα.....	σ.37
▪ Παθογένεια.....	σ.37
▪ Διάγνωση.....	σ.38
▪ Θεραπεία και αντιμετώπιση.....	σ.39
▪ Πρόγνωση.....	σ.39
○ Άνοια.....	σ.40
▪ Ορισμός.....	σ.40
▪ Κλινική εικόνα.....	σ.40
○ Alzheimer.....	σ.41
▪ Ορισμός.....	σ.41
▪ Κλινική εικόνα.....	σ.41
▪ Παθογένεια.....	σ.41
▪ Διάγνωση.....	σ.42
▪ Θεραπεία.....	σ.42
▪ Πρόγνωση.....	σ.43
○ Πολλαπλή σκλήρυνση.....	σ.44
▪ Ορισμός.....	σ.44
▪ Κλινική εικόνα.....	σ.44
▪ Παθογένεια.....	σ.45
▪ Διάγνωση.....	σ.46
▪ Θεραπεία.....	σ.47
▪ Επιπλοκές και πρόγνωση.....	σ.48
• Συσχέτιση Πομφολυγώδους Πεμφιγοειδούς με νευρολογικές παθήσεις.....	σ.49
• Γενετική ποικιλότητα.....	σ.53
○ Ορισμός - ανίχνευση.....	σ.53
○ Σημασία για τα αυτοάνοσα νοσήματα.....	σ.53
○ Γενετική ποικιλότητα του <i>COL17A1</i>	σ.53
• Αντιγόνο BP 180.....	σ.54
○ Γενικά χαρακτηριστικά.....	σ.54
○ Σημασία του BP180.....	σ.55

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

• Σκοπός της μελέτης.....	σ.60
• Δευτερογενές ερώτημα.....	σ.60
• Υλικό.....	σ.61
○ Ασθενείς με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευροεκφυλιστικό νόσημα (BPN).....	σ.61

○ Ασθενείς με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (BP).....	σ.63
○ Ασθενείς με νευροεκφυλιστικά νοσήματα (N).....	σ.64
○ Υγιείς μάρτυρες (C).....	σ.64
● Βιοηθική.....	σ.64
● Μέθοδοι ανάλυσης και τεχνικές Μοριακής Βιολογίας.....	σ.65
○ Απομόνωση γονιδιακού DNA.....	σ.65
○ Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	σ.66
▪ Πειραματικό πρωτόκολλο μελέτης.....	σ.67
▪ Εξώνιο 10.....	σ.68
▪ Εξώνιο 27.....	σ.69
▪ Εξώνιο 52.....	σ.70
○ Ανάλυση παραλλαγών μήκους θραύσματος από ένζυμα περιορισμού (RFLP).....	σ.72
▪ Πειραματικό πρωτόκολλο μελέτης.....	σ.72
▪ Εξώνιο 10.....	σ.72
▪ Εξώνιο 27.....	σ.75
▪ Εξώνιο 52.....	σ.77
○ Ανοσοαποτύπωση (Western blot).....	σ.80
▪ Πειραματική διαδικασία – προετοιμασία.....	σ.80
▪ Πειραματική διαδικασία.....	σ.83
● Προγράμματα.....	σ.86
● Στατιστική ανάλυση.....	σ.86
● Υπολογισμός ισορροπίας Hardy – Weinberg.....	σ.87
● Αποτελέσματα.....	σ.89
○ Ομάδα ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευρολογικά νοσήματα (BPN).....	σ.89
○ Ομάδα ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (BP).....	σ.92
○ Ομάδα ασθενών με νευρολογικά νοσήματα (N).....	σ.95
○ Ομάδα υγιών μαρτύρων (C).....	σ.98
○ Συγκριτική αναπαράσταση και συσχέτιση των ομάδων ελέγχου για κάθε υπό μελέτη παραλλαγή.....	σ.101
○ Πίνακες αποτελεσμάτων στατιστικής ανάλυσης.....	σ.103
○ Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης (Western Blot).....	σ.113
● Συζήτηση.....	σ.114
● Συμπέρασμα.....	σ.124
● Περίληψη.....	σ.127
● Summary.....	σ.129
● Βιβλιογραφία.....	σ.131

- Παράρτημα.....σ.145
 - Παράρτημα Ι: δήλωση συγκατάθεσης ασθενή.....σ.147

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το Πομφολυγώδες Πεμφιγοειδές (ΠΠ) είναι μια αυτοάνοση δερματική νόσος που προκαλείται από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι συστατικών των ημιδεσμοσωματίων της βασικής μεμβράνης. Αρκετές μελέτες αναφέρονται στο συσχετισμό μεταξύ του Π.Π. και νευρολογικών διαταραχών ή/και ψυχιατρικών ασθενειών. Η επιδερμίδα καθώς και το κεντρικό νευρικό σύστημα έχουν κοινή εμβρυολογική καταβολή εκ του εξωδέρματος. Κοινό στοιχείο μεταξύ των ασθενών που πάσχουν και από τις δύο παθήσεις είναι η παρουσία αυτοαντισωμάτων στον ορό τους, έναντι της πρωτεΐνης BP180 (κολλαγόνο XVII). Η πρωτεΐνη BP180 συναντάται κυρίως στο δέρμα ως δομικό συστατικό των ημιδεσμοσωμάτων, ενώ έχει ανιχνευθεί και στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Μια από τις πιθανές αιτίες εκδήλωσης των δύο παθήσεων ενδέχεται να είναι η δημιουργία αυτοαντισωμάτων έναντι του κολλαγόνου XVII. Η πρωτεΐνη BP180 μπορεί να λειτουργεί ως κοινό αντιγόνο, με αποτέλεσμα την πυροδότηση μίας ανοσολογικής απόκρισης έναντι του δέρματος και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η γενετική ποικιλότητα του γονιδίου *COL17A1*, μπορεί να επηρεάσει την έκφραση της πρωτεΐνης, την ικανότητα των μορίων MHC να παρουσιάσουν το κολλαγόνο XVII στο ανοσοποιητικό σύστημα και εναλλακτικά, η γενετική ποικιλότητα του γονιδίου, εάν περιλαμβάνει υποκατάσταση κάποιου αμινοξέος, θα μπορούσε να επηρεάσει την τάση των περιφερικών αυτοαντισωμάτων να δεσμεύονται στο μόριο.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί η σύνδεση των παραλλαγών του γονιδίου *COL17A1*, με την ανάπτυξη του ΠΠ σε ασθενείς με νευρολογικές παθήσεις.

Για το *COL17A1* έχουν ταυτοποιηθεί έως τώρα 19 παραλλαγές μεμονωμένων νουκλεοτιδίων (SNVs) εκ των οποίων οι 3 αφορούν αλλαγές σε κωδικές περιοχές του γονιδίου και οδηγούν σε υποκατάσταση αμινοξέος (Exon 10-ros 734, Exon 27-ros 2212, Exon 52-ros 4214). Στην παρούσα μελέτη θα γίνει γονοτύπηση με την χρήση μοριακών τεχνικών, των 3 αυτών παραλλαγών σε 4 ομάδες ασθενών: α) Ασθενείς με ΠΠ και νευρολογική πάθηση, β) Ασθενείς μόνο με ΠΠ, γ) Ασθενείς μόνο με νευρολογική πάθηση και δ) υγιείς μάρτυρες ως προς τα δύο νοσήματα.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Βασικές αρχές ανοσοποιητικού συστήματος

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από δύο επιμέρους συστήματα τα οποία λειτουργούν ενιαία: τη μη ειδική ή φυσική ανοσία και την ειδική ή επίκτητη ανοσία. Τα δύο αυτά συστήματα λειτουργούν αρμονικά και αλληλεπιδρούν για να υπάρχει αποτελεσματική ανοσιακή απόκριση, ενώ η ισορροπία των δύο είναι αυτή που αλλάζει ανάλογα με τον στόχο του συστήματος (1).

Η μη ειδική ανοσία (innate immunity) διεκπεραιώνεται από τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα κύτταρα φονείς (NKs). Τα δύο πρώτα αναγνωρίζουν μία ομάδα αντιγονικών δομών (PAMPs) οι οποίες βρίσκονται στην επιφάνεια των μικροοργανισμών και τα οποία χαρακτηρίζουν τα κύτταρα αυτά ως ξένα – εισβολείς, προκαλώντας ανοσιακή απόκριση (2). Οι δομές αυτές δεν ανευρίσκονται στα κύτταρα του οργανισμού και με τον τρόπο αυτό διαχωρίζει ο οργανισμός τα κύτταρά του από τους ξενιστές τους οποίους πρέπει να εξουδετερώσει. Η αναγνώριση γίνεται μέσω ειδικών υποδοχέων στα κύτταρα της μη ειδικής ανοσίας τα οποία ονομάζονται PRRs. Η φυσική ανοσία είναι πρώιμο σύστημα το οποίο ενεργοποιείται άμεσα με την αναγνώριση του «εισβολέα» και δρα, είτε μέσω άμεσης επίθεσης, είτε μέσω έκλυσης μεσολαβητών της φλεγμονής (1, 3).

Η ειδική ή επίκτητη ανοσία (adaptive immunity) διεκπεραιώνεται από τα Β και Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένα αντιγόνα από τα ξένα προς τον οργανισμό κύτταρα, ενεργοποιούνται και τα εξουδετερώνουν (3). Διακρίνεται στην χυμική και την κυτταρική ανοσία. Η πρώτη έγκειται στην διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων προς πλασματοκύτταρα, τα οποία παράγουν ειδικά αντισώματα προς τα αντιγόνα τα οποία έδωσαν το ερέθισμα στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η κυτταρική ανοσία αφορά τα CD4+ και CD8+ Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία είναι βοηθητικά και κυτταροτοξικά αντίστοιχα. Τα κύτταρα αυτά συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα στην καταστροφή των προσβεβλημένων κυττάρων (1, 4).

Αυτοανοσία

Η αυτοανοσία αποτελεί διαταραχή του φυσιολογικού ανοσιακού συστήματος, κατά την οποία καταργείται η ανοχή απέναντι στα αντιγόνα του οργανισμού, με αποτέλεσμα ο οργανισμός να μη μπορεί να διαχωρίσει το εαυτό από το ξένο, καταλήγοντας να επιτίθεται σε αμφότερα. Τα αυτοαντισώματα που παράγονται μπορεί να προσβάλλουν είτε συγκεκριμένα όργανα και ιστούς, όπως για παράδειγμα στο πομφολυγώδες πεμφιγοειδές ή την θυρεοειδίτιδα Hashimoto, είτε διαφορετικά μεταξύ τους κύτταρα όπως στην περίπτωση του συστηματικού ερυθματώδους λύκου ή των IgG4 σχετιζόμενων νοσημάτων (5). Αυτό οφείλεται σε διαταραχή της κεντρικής και περιφερικής ανοχής κατά την οποία οι κλώνοι των Τ

λεμφοκυττάρων οι οποίοι αναγνωρίζουν ίδια αντιγόνα, δεν αδρανοποιούνται όπως θα ήταν φυσιολογικό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή αυτοαντισωμάτων από τα Β λεμφοκύτταρα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ορισμένα Β λεμφοκύτταρα παράγουν αντισώματα έναντι ξένων κυττάρων τα οποία προσομοιάζουν μοριακά με αυτοαντιγόνα (μοριακή μίμηση), εμφανίζοντας διασταυρούμενη αντίδραση. Αυτό αποτελεί φυσιολογική διεργασία με ανεπιθύμητες ενέργειες. Αποτέλεσμα και των δύο διεργασιών είναι η επίθεση σε κύτταρα και όργανα του οργανισμού, με εκδήλωση αυτοάνοσων νοσημάτων (1, 3, 4). Το δέρμα είναι συχνά ένας καθρέφτης των νοσημάτων και των διαταραχών ενός οργανισμού και η αυτοανοσία δεν αποτελεί εξαίρεση, καθώς τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα έχουν και δερματικές εκδηλώσεις (5).

Διασπορά επιτόπων (epitope spreading)

Η διασπορά επιτόπων (epitope spreading) αφορά την διαδικασία διαφοροποίησης των Β και Τ- λεμφοκυττάρων, κατά την οποία αναγνωρίζουν διαφορετικό αντιγονικό επίτοπο (δευτερεύων) από τον αρχικό (επικρατή). Αυτή είναι μία διαδικασία που συμβαίνει με την πάροδο του χρόνου και μπορεί να αφορά, είτε ένα μεμονωμένο αντιγόνο (ενδομοριακό epitope spreading), είτε διαφορετικά αντιγόνα (διαμοριακό epitope spreading). Το πρώτο αφορά την διαφορετική ανοσιακή απόκριση στο ίδιο αντιγόνο (διαφορετική περιοχή της ίδιας πρωτεΐνης), ενώ το δεύτερο διαφορετικά αντιγόνα της ίδιας οικογένειας ή περιοχής/ιστού (διαφορετικές πρωτεΐνες).

Η μεταβολή του ανοσοποιητικού συστήματος κατά την οποία δεν αντιδρά μόνο σε ένα αυτοαντιγόνο, αλλά σε πολλαπλά μέσω της διασταυρούμενης αντίδρασης, δεν αποτελεί epitope spreading, αλλά ενδεχομένως να είναι το αίτιο μίας τέτοιας διαδικασίας.

Το αίτιο του epitope spreading ενδεχομένως να έγκειται στην απελευθέρωση αντιγόνων ή τμημάτων τους κατά την ανοσιακή απόκριση σε χρόνιες φλεγμονώδεις διεργασίες, αυτοάνοσες ή μη. Κατά τη χρόνια δηλαδή φλεγμονή, εκτίθεται το ανοσοποιητικό σε πρωτεΐνες και τμήματα αυτών λόγω της ιστικής καταστροφής, με αποτέλεσμα να επιστρατεύονται και να ενεργοποιούνται λεμφοκύτταρα τα οποία παράγουν αυτοαντισώματα έναντι επιτόπων διαφορετικών από αυτών που προκαλούν τη νόσο.

Στην περίπτωση του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς, πιθανολογείται ότι η αρχική αναγνώριση του εξωκυτταρίου τμήματος του BP 180 (πρώιμο στάδιο, πριν την εμφάνιση συμπτωμάτων), ακολουθείται από σταδιακή διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων (ενδο- και δια-μοριακό epitope spreading) οδηγώντας εν κατακλείδι στην ανάπτυξη του ΠΠ. Βάσει των

αλλαγών που συμβαίνουν στα λεμφοκύτταρα και κατ' επέκτασιν τα αντιγόνα-στόχους, καθορίζεται και η μορφή και η πορεία του νοσήματος.

Η κατανόηση του epitope spreading και της ανοσιακής απάντησης έναντι των νέων επιτόπων είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών της νόσου, αλλά και για την ανάπτυξη νέων στοχευμένων θεραπειών. Για το λόγο αυτό έχουν γίνει πολλές μελέτες σε ζώα, όχι όμως σε ανθρώπους, κάτι που ενδεχομένως να ρίξει φως στον λειτουργικό ρόλο του epitope spreading. (6-9).

Πολλαπλοί αντιγονικοί στόχοι

Στα αυτοάνοσα νοσήματα υπάρχουν τα λεγόμενα εαυτά αντιγόνα – στόχοι έναντι των οποίων δρουν τα αυτοαντισώματα, τα οποία μπορεί να είναι πολλαπλά. Για το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές υπάρχουν δύο κύριοι αντιγονικοί στόχοι: οι πρωτεΐνες BP 180 και 230. Σε πολλούς ασθενείς παρατηρήθηκε ότι, ενώ εμφάνιζαν την τυπική κλινική εικόνα της νόσου, καθώς και θετικό άμεσο και έμμεσο ανοσοφθορισμό και ιστολογική επιβεβαίωση, είχαν αρνητικό τίτλο αντισωμάτων έναντι των 2 αυτών πρωτεϊνών (τεχνική ELISA). Αυτό οδήγησε στην προσπάθεια ταυτοποίησης νέων πιθανών αντιγονικών επιτόπων που να προκαλούν τη νόσο. Μία τεχνική που συνέβαλε στην αναγνώρισή τους, είναι η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Western blot ή immunoblotting). Μέσω της τεχνικής αυτής, αναγνωρίστηκαν πολλαπλοί νέοι αντιγονικοί στόχοι, διαφορετικών μοριακών βαρών, σε ασθενείς με αρνητική ELISA, χωρίς όμως να μπορεί να γίνει η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών στις οποίες αντιστοιχούν. Με τον τρόπο αυτό, δίνεται μία ένδειξη για τις πρωτεΐνες που ενδεχομένως εμπλέκονται, χωρίς όμως να μπορεί να επιβεβαιωθεί η ταυτότητά τους.

Επιπλέον, ασθενείς με ανθεκτική μορφή της νόσου, στη συνήθη θεραπεία, ελέγχθηκαν με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης για την παρουσία επιπλέον αντιγονικών στόχων. Σε πολλούς από αυτούς, επιβεβαιώθηκε η παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών πέραν των 2 βασικών.



Εικόνα 01. Γυναίκα ασθενής 82 ετών, παρουσιάζει ερυθματώδεις πλάκες με επιφανειακές διαβρώσεις και εφελκίδες στην πλάτη, την κοιλιακή χώρα και τα άνω άκρα, BPDAI: 11. Γραμμικός φθορισμός βασικής μεμβράνης με C3 και IgG και θετικός έμμεσος ανοσοφθορισμός, αρνητική ELISA. Western blot θετική για πρωτεΐνες 140 kDa και 190 kDa (προφορική ανακοίνωση, “The open blister/mind meeting Pre-Symposium to the 46th ESDR-Meeting, PPP”, Μόναχο, Γερμανία, 2016).



Εικόνα 02. Άνδρας ασθενής 68 ετών, παρουσιάζει πολλαπλές τεταμένες πομφόλυγες στον κορμό και τα άκρα. Θετικός άμεσος και έμμεσος ανοσοφθορισμός, θετική ELISA για BP 180. Ο ασθενής εμφάνισε ανθεκτική μορφή πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς και ελέγχθηκε με Western blot για την παρουσία επιπλέον αντιγονικών στόχων: θετική για 4 πρωτεΐνες στα 135

και 190 kDa (εκχύλισμα δέρματος) και στα 160 και 180 kDa (εκχύλισμα επιδερμίδας) (προφορική ανακοίνωση, “The open blister/mind meeting Pre-Symposium to the 46th ESDR-Meeting, PPP”, Μόναχο, Γερμανία, 2016).

Πομφολυγώδεις δερματοπάθειες και τύποι

Τα πομφολυγώδη νοσήματα είναι μία ομάδα αυτοάνοσων δερματοπαθειών που χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση πομφολύγων και διαβρώσεων στο δέρμα και τους βλεννογόνους. Προκαλούνται από αυτοαντισώματα έναντι των δομικών πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για τη συνοχή του δέρματος. Το πιο κοινό από αυτά τα νοσήματα είναι το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές, το οποίο εμφανίζεται σε άτομα μεγάλης ηλικίας και η επίπτωση του οποίου έχει αυξηθεί πολύ τα τελευταία χρόνια (10). Τα αυτοάνοσα πομφολυγώδη νοσήματα είναι τα πιο απειλητικά για τη ζωή δερματικά φλεγμονώδη νοσήματα και για το λόγο αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία η κατανόηση και αντιμετώπισή τους (3). Μία λίστα με τις πομφολυγώδεις δερματοπάθειες αναγράφονται στον πίνακα 01 (3).

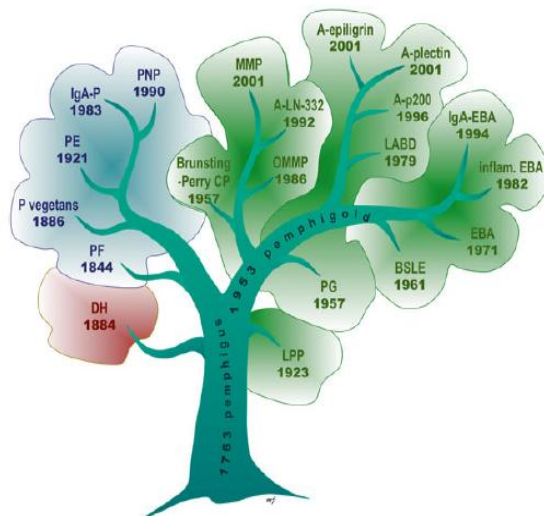
Πίνακας 01. Πομφολυγώδεις δερματοπάθειες (3).

Πέμφιγα	Κοινή πέμφιγα
	Φυλλώδης πέμφιγα
	Παρανεοπλασματική πέμφιγα
	Βλαστική πέμφιγα
	IgA πέμφιγα
Πεμφιγοειδές	Πομφολυγώδες πεμφιγοειδές
	Ουλωτικό πεμφιγοειδές
	Πεμφιγοειδές της κύησης
	Μη πομφολυγώδες δερματικό πεμφιγοειδές
	Ουλωτικό πεμφιγοειδές Brunsting-Perry
	Πεμφιγοειδής ομαλός λειχήνας
	Πεμφιγοειδές anti-P200
	Πεμφιγοειδές Anti-plectin
	Καλοήθες πεμφιγοειδές των βλεννογόνων
	Επίκτητη πομφολυγώδης επιδερμόλυση
	Πεμφιγοειδές των βλεννογόνων anti-laminin 332
	Οφθαλμικό ουλωτικό πεμφιγοειδές

Λοιπές δερματοπάθειες	Πομφολυγώδης συστηματικός ερυθματώδης λύκος
	Σύνδρομο Stevens-Johnson
	Φαρμακοεπαγόμενο πεμφιγοειδές
	Ερπητοειδής δερματίτιδα
	Γραμμική πομφολυγώδης IgA δερματοπάθεια
	Τοξική επιδερμόλυση
	Πολύμορφο ερύθημα
	Όψιμη δερματική πορφύρα
	Ψευδοπορφύρα

Ιστορική αναδρομή

Η πρώτη αναφορά φυσαλιδώδους δερματοπάθειας έγινε το 1763 από τον Francois Boissier de la Croix de Sauvages, ο οποίος εισήγαγε τον όρο «πέμφιγα». Σχεδόν 200 χρόνια αργότερα, το 1953, ο Walter Frederick Lever δημοσίευσε μία ανασκοπική έρευνα - ορόσημο για τη Δερματολογία, με την οποία διαχώρισε το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές από την πέμφιγα. Ο διαχωρισμός έγινε βάσει του επιπέδου στο οποίο γίνεται η αποκόλληση, με τη μεν πέμφιγα να έχει ενδοεπιδερμικές φυσαλίδες, ενώ το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές υποεπιδερμικές. Με την ρήση «η γνώση της ιστορίας μίας νόσου, συμβάλλει σημαντικά στην κατανόησή της», ξεκίνησε την σημαντικότερη δημοσίευσή του η οποία αποτέλεσε την αρχή της ανάλυσης και κατ' επέκτασιν κατανόησης της νόσου, φτάνοντας στο σημείο σήμερα να αναγνωρίζονται πάνω από 22 διαφορετικά αυτοάνοσα πομφολυγώδη νοσήματα, με διαφορετική παθογένεια, κλινική εικόνα και αντιμετώπιση (11-13). Ιατροί άλλων ειδικοτήτων είναι σε θέση να αναγνωρίσουν ένα νόσημα μόνο: την πέμφιγα, την οποία και συγχέουν με το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (3). Περίπου 10 χρόνια αργότερα αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά τα αυτοαντισώματα που προκαλούν τη νόσο (14).



Εικόνα 03. Το δέντρο των αυτοάνοσων πομφολυγωδών νοσημάτων (3).

Πομφολυγώδες πεμφιγοειδές

Το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (ΠΠ) είναι το πιο συχνό αυτοάνοσο πομφολυγώδες δερματικό νόσημα και εμφανίζεται κυρίως στην τρίτη ηλικία, επηρεάζοντας ως επί το πλείστον τον κορμό και τα άκρα. Προκαλείται από αντισώματα IgG και IgE τα οποία δρουν κυρίως ενάντια στις πρωτεΐνες των ημιδεσμοσωματίων BP 180 και 230, προκαλώντας τη δημιουργία υποεπιδερμικών φυσαλίδων (10, 14, 15).

Επιδημιολογία

Το ΠΠ είναι το συχνότερο αυτοάνοσο πομφολυγώδες δερματικό νόσημα και προσβάλλει κυρίως υπερήλικες τους οποίους και καταβάλλει (16, 17). Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 80 έτη, επηρεάζοντας τις γυναίκες ελαφρώς περισσότερο σε σχέση με τους άνδρες. Η θνητότητα στους ασθενείς αυτούς είναι 2-6 φορές μεγαλύτερη από αυτή του γενικού πληθυσμού, με την ετήσια επιβίωση να είναι λίγο πάνω από 60% (18-20). Παρ' όλα αυτά, έχει εμφανιστεί και σε άτομα κάτω των 60 ετών και πολύ σπάνια σε παιδιά (21, 22). Στην Ευρώπη διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο 2.5-42.8 νέα περιστατικά ανά 1.000.000 κατοίκους, ενώ τα ποσοστά σε άτομα άνω των 80 ετών είναι σαφώς υψηλότερα, αγγίζοντας τα 150-330. Σε άλλες περιοχές τα ποσοστά είναι μικρότερα, όπως στην Ασία, όπου οι νέοι ασθενείς ετησίως είναι μόλις 2,6-7,5 ανά 1.000.000 κατοίκους. Παρατηρείται αύξηση στην επίπτωση της νόσου, η οποία έχει διπλασιαστεί και οι διαφορές αυτές, τόσο στους απόλυτους αριθμούς, όσο και μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών, ενδεχομένως να οφείλονται τόσο σε στατιστικούς λόγους, όπως ο

διαφορετικός τρόπος καταγραφής και ανάλυσης των δεδομένων, όσο και σε κοινωνικοοικονομικά κριτήρια όπως η πρόσβαση στην Υγεία και η αύξηση της επιβίωσης (23-27). Καθότι το ΠΠ είναι ένα νόσημα που προσβάλλει άτομα μεγαλύτερης ηλικίας και δεδομένου ότι η διάρκεια ζωής στις ανεπτυγμένες χώρες αυξάνεται συνεχώς, τόσο το ΠΠ όσο και οι σχετιζόμενες με αυτό διαταραχές, αποτελούν ένα αυξανόμενο κοινωνικοοικονομικό πρόβλημα, το οποίο χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση και αντιμετώπιση (19, 20). Η αύξηση της επίπτωσης-επιπολασμού της νόσου, ενδεχομένως να οφείλεται και σε άλλους παράγοντες, όπως η βελτίωση των διαγνωστικών τεχνικών, οι οποίες επιτρέπουν την αναγνώριση των αυτοαντισωμάτων έναντι των ημιδεσμοσωματίων, επιβεβαιώνοντας την υποψία των κλινικών ιατρών (10).

Κλινική εικόνα – μορφές

Το ΠΠ χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση πομφολύγων στον κορμό και τα άκρα, λιγότερο συχνά στους βλεννογόνους (10-20%), καθώς και ερυθρότητα στο δέρμα και απολέπιση. Συχνά συνυπάρχουν κνιδωτικές πλάκες. Οι πομφόλυγες, με διάμετρο 1-3 εκ., μπορεί να εμφανίζονται είτε επί φυσιολογικού, είτε επί ερυθματώδους δέρματος και πολύ συχνά υπάρχει κνησμός, ενώ το περιεχόμενό τους μπορεί να είναι είτε διαυγές, είτε αιμορραγικό. Συνήθως η νόσος εμφανίζεται με μία πρόδρομη μορφή η οποία χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση κνησμού και σε κάποιες περιπτώσεις δερματικές βλάβες με απολέπιση ή εικόνα κνίδωσης, η οποία μπορεί να διαρκέσει ακόμα και για μήνες (10, 28-30). Αναγνωρίζονται 4 μορφές της νόσου:

1. Κλασική μορφή

Αφορά ασθενείς τρίτης ηλικίας, συνήθως άνω των 70 ετών και εκδηλώνεται με πομφόλυγες και κνησμό επί υγιούς, ή οιδηματώδους-ερυθηματώδους δέρματος. Επηρεάζονται, τόσο ο κορμός, όσο και τα άκρα, με κύρια εντόπιση στις μασχαλιαίες και βουβωνικές πτυχές, την κοιλιακή χώρα (ιδίως στην περιοχή του επιγαστρίου) και την έσω επιφάνεια των μηρών. Ο βλεννογόνος επηρεάζεται στο 10-30% των περιπτώσεων και αφορά την στοματική κοιλότητα, τον οισοφάγο και τις γεννητικές περιοχές. Συχνά η νόσος άρχεται με ένα πρόδρομο εξάνθημα, κνιδωτικού χαρακτήρα, το οποίο σιγά-σιγά λαμβάνει τη μορφή πομφόλυγας, η οποία σταδιακά ρήγνυται, εφελκιδοποιείται ή καταλείπει διάβρωση (30-32).



Εικόνα 04. Τυπική κλινική εικόνα γυναίκας ασθενούς με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές.

2. Μη πομφολυγώδης μορφή

Η μη πομφολυγώδης μορφή είναι μια ιδιαίτερη εκδήλωση της νόσου (20-40% των περιπτώσεων) και η οποία έχει προκαλέσει διχογνωμία για το εάν πρέπει να θεωρείται χωριστή οντότητα ΠΠ, ή η κλασική μορφή σε πρόδρομο στάδιο. Αυτό υποστηρίχθηκε από το γεγονός ότι ορισμένοι ασθενείς εμφάνισαν πομφόλυγες σε βάθος χρόνου, οι οποίοι όμως αποτελούν μόνο το 9,8% των ασθενών, στους οποίους οι βλεννογονικές εκδηλώσεις είναι πολύ σπάνιες. Κύρια εκδήλωση της μορφής αυτής είναι ο κνησμός, το κνιδωτικό εξάνθημα, η απολέπιση του δέρματος και οι βλατίδες (33, 34).



Εικόνα 05. Κλινική εικόνα ασθενούς με μη πομφολυγώδη μορφή πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς.

3. Ερυθροδερμία

Αποτελεί μία σπάνια μορφή της νόσου κατά την οποία οι ασθενείς εμφανίζουν γενικευμένο ερύθημα και απολέπιση του δέρματος, χωρίς να εμφανίζονται πομφόλυγες (σπάνια εκδήλωση). Καθότι υπάρχουν πολλά δερματικά νοσήματα με παρόμοια εκδήλωση, τα περισσότερα από τα οποία είναι συχνότερα από το ΠΠ, η διάγνωση είναι δύσκολο να τεθεί (35).

4. Νεογνική – παιδική μορφή

Το ΠΠ σπάνια εμφανίζεται στην παιδική και νεογνική ηλικία, με μόλις 100 περιπτώσεις να έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία. Η παθογένεια είναι ίδια με αυτή των ενηλίκων και οι επίτοποι που εμπλέκονται είναι οι ίδιοι, ενώ έχουν παρατηρηθεί διαφορές στην πορεία της νόσου και την ανταπόκριση στην θεραπεία (36).



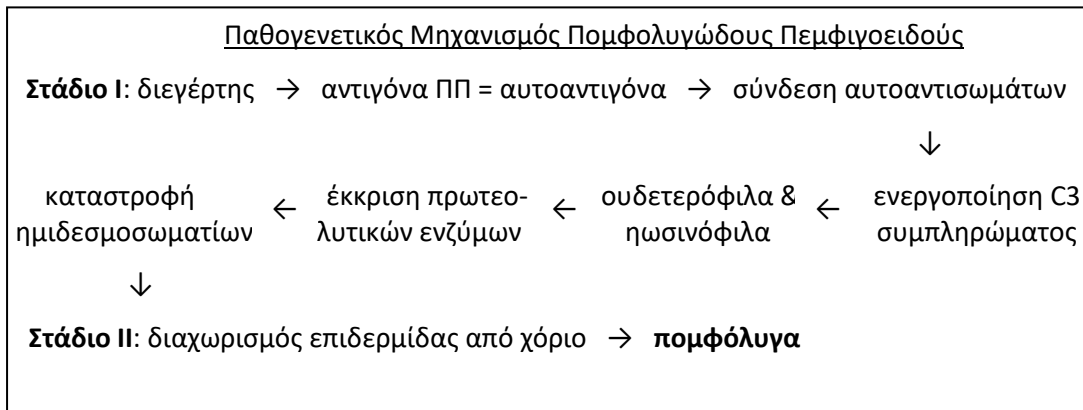
Εικόνα 06. Κλινική εικόνα νεογνικής μορφής πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς.

Παθογένεια

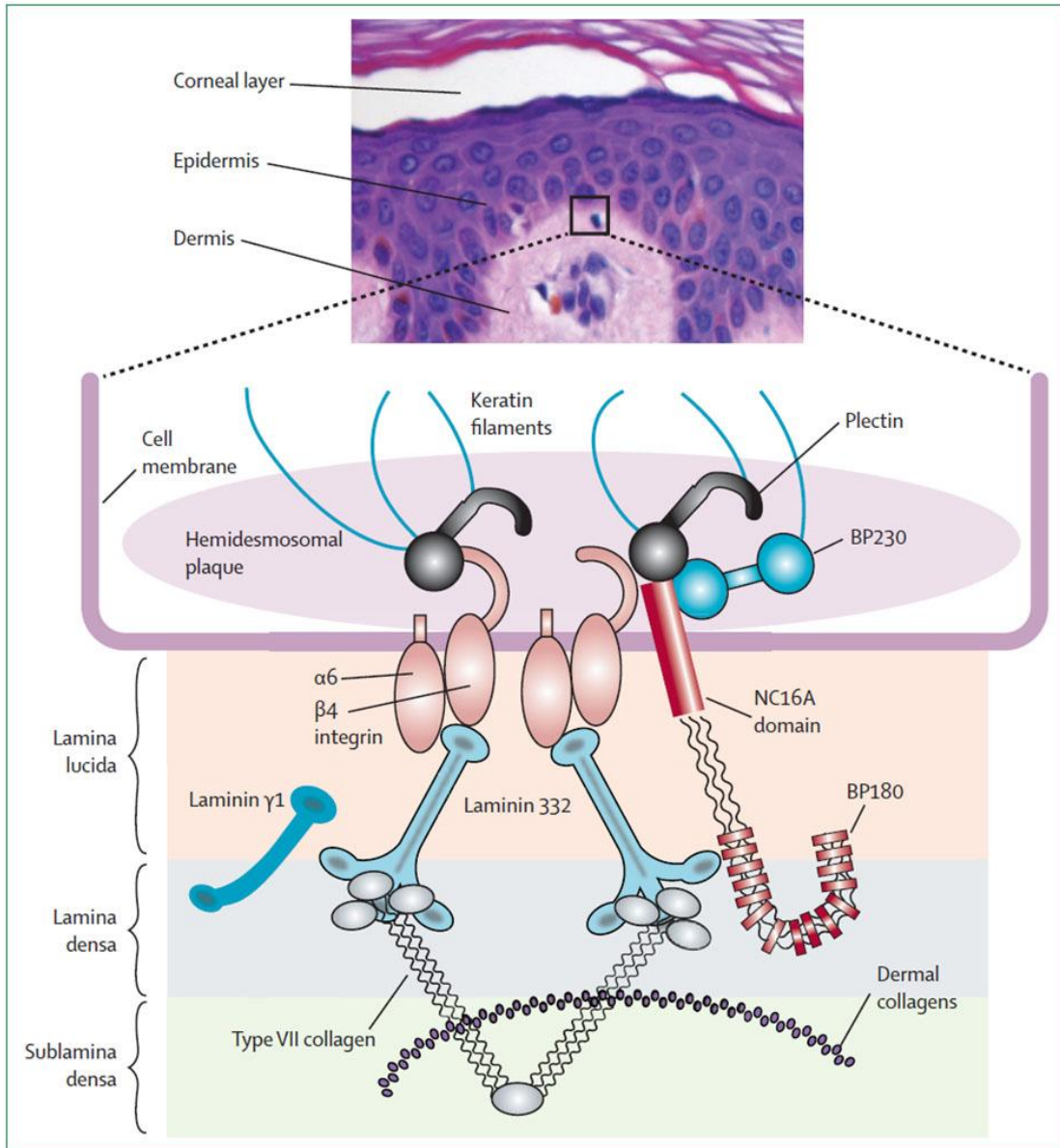
Τα κερατινοκύτταρα και τα λοιπά επιθηλιακά κύτταρα της επιδερμίδας προσκολλώνται στην βασική μεμβράνη, η οποία βρίσκεται μεταξύ επιδερμίδας και δέρματος, μέσω των ημιδεσμοσωματίων. Αυτές οι δομές αποτελούνται κυρίως από κολλαγόνο τύπου XVII, το οποίο είναι γνωστό και ως αντιγόνο του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς 2 (BPAG2) ή BP 180, μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία αλληλεπιδρά με την β4-ιντεγκρίνη και το BPAG1 (BP 230) για να δημιουργήσει μία σταθερή ένωση με τα ενδιάμεσα ινίδια κερατίνης εντός των κυττάρων, το ημιδεσμοσωμάτιο (37-40).

Το BP230 (BPAG1), σημαντικό συστατικό των ημιδεσμοσωματίων, είναι μία ενδοκυττάρια πρωτεΐνη της οικογένειας της πλεκτίνης, η οποία συνδέει την πρωτεΐνη BP180 με την πλεκτίνη και τα ενδιάμεσα ινίδια. Στο πομφολυγώδες πεμφιγοειδές αναπτύσσονται αυτοαντισώματα έναντι κυρίως του κολλαγόνου XVII (BP180) καθώς και του BP230, τα οποία αλληλεπιδρώντας με τα αντίστοιχα αντιγόνα προκαλούν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος στην βασική μεμβράνη, την διείσδυση κυττάρων του ανοσοποιητικού στο δέρμα και την έκκριση ενζύμων και ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των ημιδεσμοσωματίων και των υπολοίπων συστατικών της βασικής μεμβράνης, με απώλεια της συνοχής του δέρματος και τη δημιουργία πομφολύγων και δερματικών βλαβών (41, 42). Κύριο αντιγονικό επίτοπο αποτελεί το εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης BP180, ενώ αντιδραστικότητα έναντι άλλων επιτόπων σχετίζεται με βλεννογονικές εκδηλώσεις, ή/και πρόωμη εμφάνιση της νόσου (10). Τα αντισώματα που αναπτύσσονται στο ΠΠ είναι κυρίως IgG

(έως και 90% των ασθενών) και IgE, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις απομονώθηκαν και αντισώματα IgA, σε μικρότερες όμως συγκεντρώσεις. Παρά του ότι τα κύρια κυκλοφορούντα αντισώματα είναι IgG, η IgE είναι ικανή να προκαλέσει την δημιουργία πομφολύγων, το οποίο εξηγεί και την διείδυση των δερματικών βλαβών από ηωσινόφιλα, κύριο εύρημα κατά την ιστοπαθολογική εξέταση μετά από βιοψία (43-46). Σύμφωνα με κάποιες έρευνες, ασθενείς που ανέπτυξαν IgE αυτοαντισώματα εμφάνιζαν βαρύτερη μορφή της νόσου και σε μία περίπτωση υπήρχε ανθεκτικό στην κορτιζόνη ΠΠ, υποδηλώνοντας ότι ενδεχομένως η διαφορετική παθογένεια για τη νόσο, επηρεάζει τη μορφή και εξέλιξη αυτής (47-49). Επιπλέον, σε περισσότερο από 90% των ασθενών αναγνωρίζονται αντισώματα έναντι του BP180, ενώ μόνο στο 60% έναντι του BP230 (50).



Εικόνα 07. Σχηματική αναπαράσταση του παθογενετικού μηχανισμού για την δημιουργία των πομφολύγων στο πομφολυγώδες πεμφιγοειδές.

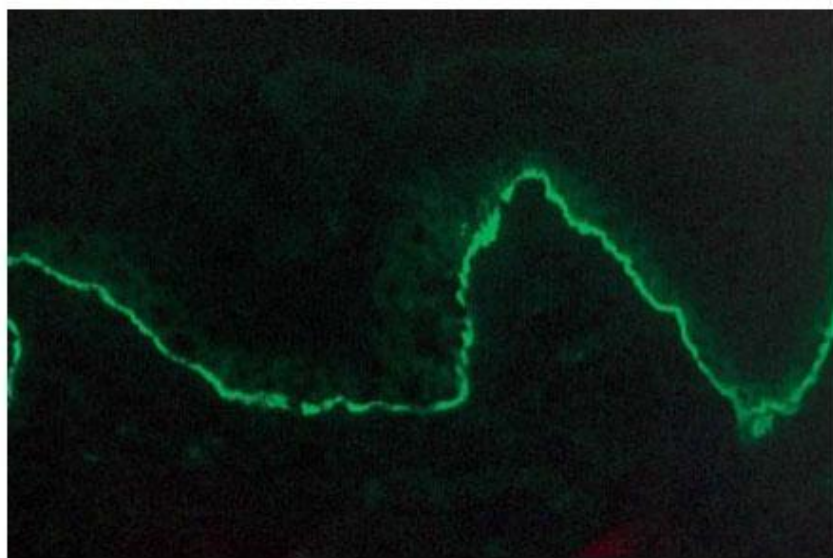


Εικόνα 08. Σχηματική αναπαράσταση του δερμο-επιδερμικού φραγμού. Αναδεικνύονται μόνο τα μόρια που αποτελούν αντιγονικούς επιτόπους στα πομφολυγώδη νοσήματα. Ως συστατικό των ημιδεσμοσωματίων, το εξωκυττάριο τμήμα του BP180 συνδέεται με την ιντεγκρίνη α6, τη λαμινίνη 332 και το κολλαγόνο IV με τα οποία γίνεται η σύνδεση με τα ινίδια αγκυροβόλησης της βασικής μεμβράνης. Το ενδοκυττάριο τμήμα συνδέεται με την κερατίνη μέσω της πλεκτίνης και του BP 230. Schmidt E, et al (10).

Διάγνωση

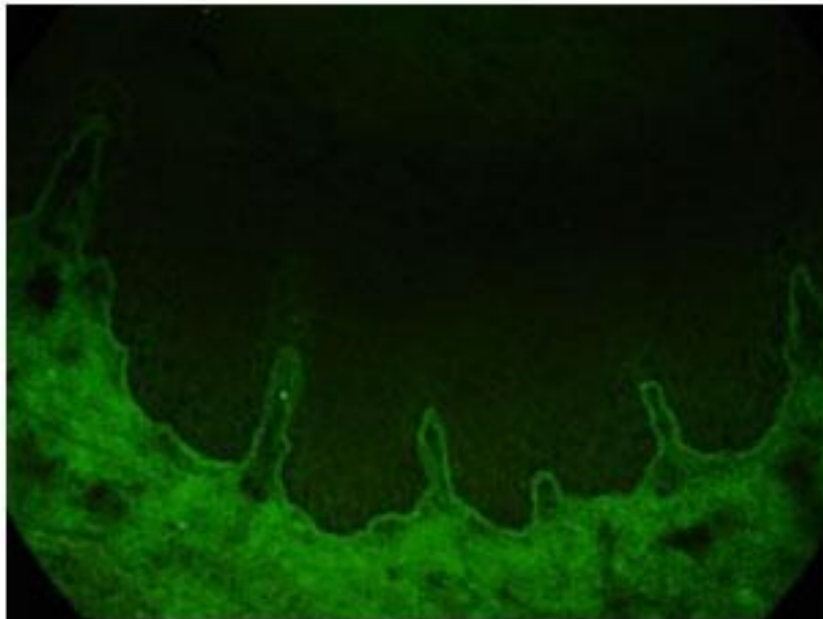
Η διάγνωση του ΠΠ είναι ένα δύσκολο έργο καθότι υπάρχουν πολλά νοσήματα με παρόμοια κλινική εικόνα από τα οποία πρέπει να διαφοροδιαγνωσθεί. Ως εκ τούτου, στην φαρέτρα της διάγνωσης, με εξίσου σημαντικό ρόλο, ανήκουν η κλινική εξέταση, ο άμεσος και έμμεσος ανοσοφθορισμός, η ιστολογική εξέταση των βλαβών μετά από βιοψία και η χρήση της ELISA. Η ενδεδειγμένη κλινική εξέταση παίζει πολύ σημαντικό ρόλο και υπάρχουν 2 ερωτηματολόγια για την εκτίμηση της έκτασης και της βαρύτητας της νόσου, το BPDAI και το ABSIS αντίστοιχα (εικόνες 13, 14), ενώ μεγάλη σημασία έχει και η εκτίμηση των βλεννογόνων, για την οποία ενδεχομένως να χρειαστεί και η συμβολή άλλων ειδικοτήτων (51-53). Το BPDAI έχει ένα score από 0 έως και 360, εξετάζοντας 3 παραμέτρους: τις πομφόλυγες, τις ερυθρηματώδεις πλάκες και την συμμετοχή των βλεννογόνων (120 πόντοι για κάθε παράμετρο) (54).

Ο άμεσος και έμμεσος ανοσοφθορισμός χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών των ημιδεσμοσωματίων, *in situ* ή στον ορό του ασθενούς αντίστοιχα. Κατά τον άμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιείται τμήμα δέρματος από πάσχοντα ασθενή από περιβλαβικό ερύθημα (όχι από βλάβη), στο οποίο γίνεται η σύνδεση των αυτοαντισωμάτων στα αντιγόνα BP 180 και BP 230 της βασικής μεμβράνης. Με τη χρήση σημασμένων αντισωμάτων έναντι των IgG αυτοαντισωμάτων του ασθενούς, αναδεικνύεται με φθορισμό η σύνδεση και επομένως η παρουσία τους, θέτοντας την διάγνωση. Χαρακτηριστική εικόνα είναι η γραμμική εναπόθεση IgG και C3 κλάσματος του συμπληρώματος κατά μήκος της βασικής μεμβράνης (εικόνα 9) (5, 55).



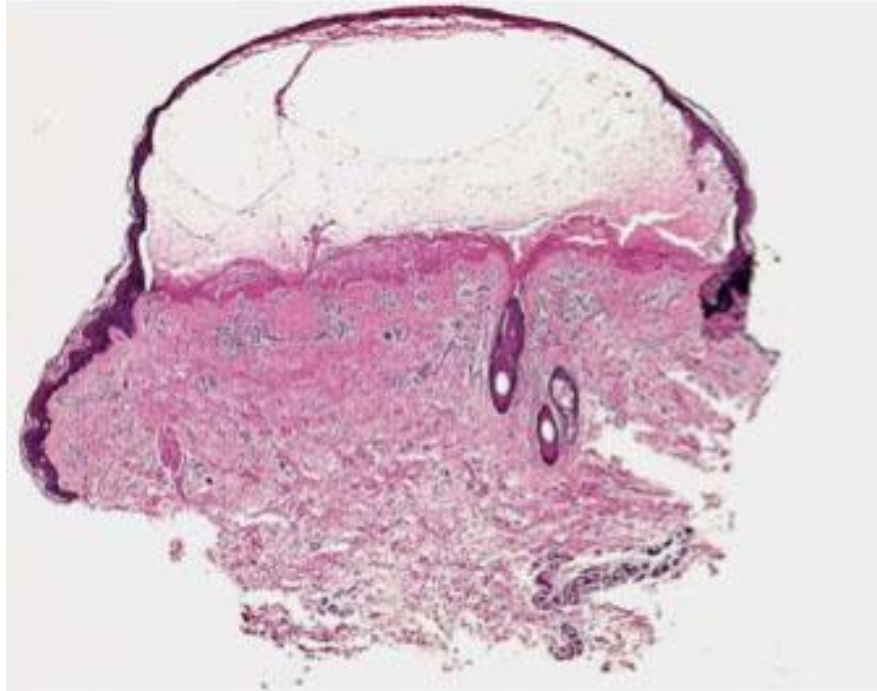
Εικόνα 09. Εικόνα άμεσου ανοσοφθορισμού από μικροσκόπιο φθορισμού ασθενούς με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές.

Στον έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιείται τμήμα φυσιολογικού δέρματος, ανθρώπινου ή ζωικού (σε ορισμένες περιπτώσεις και οισοφάγος πιθήκου), στο οποίο εφαρμόζεται ορός ασθενούς. Τα αυτοαντισώματα συνδέονται με τα αντιγόνα του ιστοτεμαχίου και με τη χρήση ειδικά σημασμένων αντισωμάτων έναντι των αυτοαντισωμάτων τα οποία προκαλούν φθορισμό, επιβεβαιώνουν την σύνδεση. Το θετικό αποτέλεσμα αναδεικνύεται ως γραμμική εναπόθεση μεταξύ δέρματος και επιδερμίδας (εικόνα 10) (5, 55).



Εικόνα 10. Εικόνα έμμεσου ανοσοφθορισμού από μικροσκόπιο φθορισμού, σε ασθενή με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές. Γραμμικός φθορισμός βασικής μεμβράνης σε υπόστρωμα οισοφάγου πιθήκου.

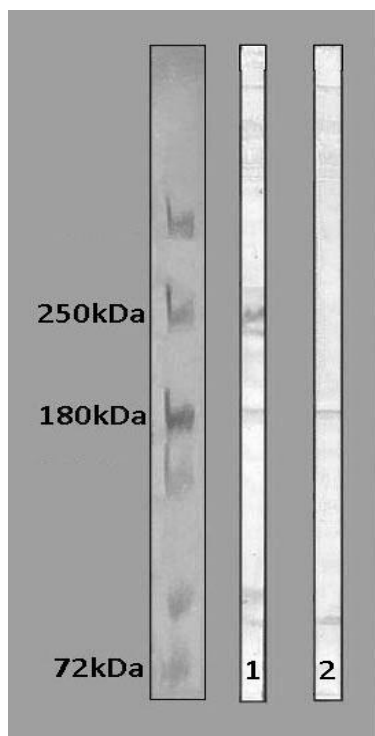
Η ιστολογική εξέταση παίζει σημαντικό ρόλο στη διάγνωση. Στις μη πομφολυγώδεις βλάβες, παρατηρείται παρουσία ηωσινοφιλικής σπογγίωσης με φλεγμονώδη διήθηση των ιστών. Στην περίπτωση των πομφολύγων αναγνωρίζεται ινώδες περιεχόμενο εντός αυτών, με υπο-επιδερμική αποκόλληση και διήθηση της περιοχής από ηωσινόφιλα και ουδετερόφιλα. Φλεγμονώδης διήθηση παρατηρείται και στην περιοχή του δέρματος (33).



Εικόνα 11. Ιστολογική εικόνα βιοψίας δερματικής βλάβης σε ασθενή με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές. Αναδεικνύεται η υπο-επιδερμική αποκόλληση και η διήθηση της περιοχής από ηωσινόφιλα και ουδετερόφιλα.

Αυτοαντισώματα έναντι των BP 180 και BP 230 είναι δυνατό να ανιχνευθούν και να ποσοτικοποιηθούν στον ορό ασθενών με τη χρήση της ELISA, η οποία αποτελεί μία πολύ ευαίσθητη τεχνική (55).

Μία ακόμα τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του ΠΠ, είναι η ανοσοαποτύπωση (western blotting, ή immunoblotting), κατά το οποίο ανιχνεύεται με έμμεσο τρόπο το αντίσωμα έναντι του ΠΠ το οποίο συγκρίνεται με μόρια γνωστών μεγεθών (56, 57).



Εικόνα 12. Χαρακτηριστική εικόνα αποτελέσματος ανοσοαποτύπωσης (western blot) με ανίχνευση πρωτεΐνης κατά προσέγγιση στα 180kDa. Οι ταινίες 1 και 2 έχουν επωαστεί με ορό ασθενούς με τυπική εικόνα πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς, σε αραιώση 1:50. Στα αριστερά της εικόνας βρίσκεται ο μάρτυρας των πρότυπων μοριακών βαρών.

Τέλος, μία λιγότερο χρησιμοποιούμενη τεχνική είναι αυτή του διαχωρισμού δέρματος (split skin), η οποία είναι ιδιαίτερη χρήσιμη για την διαφοροδιάγνωση μεταξύ ΠΠ και επίκτητης πομφολυγώδους επιδερμόλυσης (ΕΠΠ). Στην τεχνική αυτή, αφού προηγηθεί ο διαχωρισμός της επιδερμίδας από το χόριο, εφαρμόζεται φθορίζουσα IgG, η οποία καθηλώνεται είτε στην επιδερμική πλευρά (ΠΠ), είτε στην χοριακή (ΕΠΠ) (58).

BULLOUS PEMPHIGOID DISEASE AREA INDEX (BPDAI)					
SKIN	ACTIVITY		ACTIVITY		DAMAGE
Anatomical location	Erosions / Blisters	Number of lesions if <3	Urticaria / Erythema / other	Number of lesions if <3	Pigmentation / Other
	0 absent		0 absent		
	1 1-3 lesions, none >1cm diameter		1 1-3 lesions, none >6cm diameter		
	2 1-3 lesions, at least one > 1cm diameter		2 1-3 lesions, at least one > 6cm diameter		
	3 >3 lesions, none > 2cm diameter		3 >3 lesions, none > 10cm diameter		
	5 >3 lesions and at least one > 2cm		5 >3 lesions and at least one > 25cm		
	10 >3 lesions, at least one lesion >5cm diameter or entire area		10 >3 lesions, at least one lesion >50cm diameter or entire area		
Head					
Neck					
Chest					
Left arm					
Right arm					
Hands					
Abdomen					
Genitals					
Back/Buttocks					
Left leg					
Right leg					
Feet					
Total skin	/120		/120		
MUCOSA	Erosions/Blisters				
	1 1 lesion				
	2 2-3 lesions				
	5 >3 lesions, or 2 lesions > 2cm				
	10 entire area				
Eyes					
Nose					
Buccal mucosa					
Hard palate					
Soft palate					
Upper gingival					
Lower gingival					
Tongue					
Floor of mouth					
Labial mucosa					
Posterior pharynx					
Anogenital					
Total Mucosa	/120				

Εικόνα 13. ερωτηματολόγιο BPDAI για την εκτίμηση της έκτασης των βλαβών για ΠΠ (59).

ABSIS SCORING TEST

Date:

Patient's weight (kg):

Legend for weighing factor (most dominant appearance of skin lesions):	
1.5	Erosive, exudative lesions
1	Erosive, dry lesions
0.5	Reepithelialized lesions (incl post inflamm erythema &/or hyperpigmentation)

Skin involvement (Max BSA)	Patient's BSA	Weighing factor
Head & neck (9%)		
L Arm including hand (9%)		
R Arm including hand (9%)		
Trunk (front & back) (36%)		
L Leg (18%)		
R Leg (18%)		
Genitals (1%)		

(Skin involvement total score: % BSA x weighing factor = 0 – 150 points)

Oral involvement:

I. Extent (enter 1 for presence of lesions, 0 for absence of any lesion):

Upper gingival mucosa		Tongue	
Lower gingival mucosa		Floor of the mouth	
Upper lip mucosa		Hard palate	
Lower lip mucosa		Soft palate	
Left buccal mucosa		Pharynx	
Right buccal mucosa			

(Total score ranges from 0-11)

Severity (discomfort during eating/drinking)

Food	Level	Factor of discomfort	Severity Score
Water	1		
Soup	2		
Yogurt	3		
Custard	4		
Mashed potatoes /scrambled eggs	5		
Baked fish	6		
White bread	7		
Apple/ raw carrot	8		
Fried steak/ whole grain bread	9		

(Severity score = Level multiplied by the factor of discomfort= 0-45 points)

Legend for factor of discomfort	
1	Pain/bleeding occurred always
0.5	Pain/bleeding occurred sometimes
0	Never experienced problems

Εικόνα 14. Ερωτηματολόγιο ABSIS για την εκτίμηση της έκτασης/βαρύτητας του ΠΠ (60).

Διαφορική διάγνωση

Το ΠΠ εμφανίζεται με μία ποικιλία κλινικών εκδηλώσεων, το οποίο δημιουργεί ένα διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα. Νοσήματα τα οποία ομοιάζουν ως προς την κλινική εικόνα είναι η φυλλώδης και η ερπητοειδής πέμφιγα, η γραμμική IgA πομφολυγώδης δερματοπάθεια, η επίκτητη πομφολυγώδης επιδερμόλυση, ο πομφολυγώδης ερυθηματώδης λύκος, το έκζεμα, η κνίδωση, ο κνησμός, το μολυσματικό κηρίο, το πολύμορφο ερύθημα, το σύνδρομο Sweet και η τοξική επιδερμική νεκρόλυση. Η διαφορική διάγνωση θα βασιστεί τόσο στην κλινική εξέταση όσο και τις εργαστηριακές εξετάσεις (33, 45).

Επιβαρυντικοί παράγοντες και συσχέτιση με άλλα νοσήματα

Το ΠΠ είναι ένα αυτοάνοσο νόσημα που εμφανίζεται κυρίως σε άτομα τρίτης ηλικίας. Επιβαρυντικούς παράγοντες για την εμφάνισή του, πέραν της ηλικίας, αποτελούν η ακτινοβολία (UVA, UVB), οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις όπως η άνοια και η νόσος του Parkinson, η διπολική διαταραχή, η σχιζοφρένια, η κατάκλιση, οι τραυματισμοί, τα εγκαύματα, καθώς και η λήψη φαρμάκων. Έχει αναγνωριστεί πληθώρα φαρμάκων η οποία σχετίζεται με την εμφάνιση ΠΠ, όπως οι αναστολείς DPP-IV για τον σακχαρώδη διαβήτη, ορισμένα αντινεοπλασματικά φάρμακα όπως οι αναστολείς PD1 και PD-L1, τα διουρητικά φουροσεμίδη και σπιρονολακτόνη, αναλγητικά και μυοχαλαρωτικά, αντιβιοτικά όπως η αμοξυκιλλίνη και η συπροφλοξασίνη, καθώς και κάποια αντιψυχωσικά όπως η φαινοδιαζίνη με αλειφατική πλευρική αλυσή. Επιπλέον, έχει συσχετιστεί με την παρουσία άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, ο υποθυρεοειδισμός, η λεύκη, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ρευματική πολυμυαλγία, η πρωτοπαθής χολική κίρρωση, η πολυμυοσίτιδα, η μασθένεια Gravis και ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (61-75).

Σε έρευνα που διεξήχθη το 2006 αναγνωρίστηκε συσχέτιση μεταξύ της ανεύρεσης αυτοαντισωμάτων έναντι του κολλαγόνου XVII με χαμηλό mini-mental test, ενδεικτικό άνοιας (76). Επίσης έχει επιβεβαιωθεί στατιστικά η συσχέτιση με την ψωρίαση, ενώ έχει πιθανολογηθεί και για νεοπλάσματα και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, χωρίς όμως να αποδειχθεί μέσω της στατιστικής ανάλυσης (66, 75, 77, 78). Ως προς τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα, η συχνότητα εμφάνισής τους σε ασθενείς με ΠΠ σε σχέση με το γενικό πληθυσμό είναι διπλάσια για τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, τριπλάσια για τη νόσο του Parkinson, τετραπλάσια για την άνοια και ακόμα και δωδεκαπλάσια για την πολλαπλή σκλήρυνση. Η πιθανότητα εμφάνισης οποιουδήποτε νευρολογικού νοσήματος είναι πενταπλάσια και η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του BP180 είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την εμφάνιση τέτοιων νοσημάτων. Κατ' επέκτασιν, τα υψηλά επίπεδα BP 180 και ο αυξημένος

τίτλος ηωσινοφίλων στο αίμα, σχετίζονται με την εμφάνιση νευρολογικών νοσημάτων σε ασθενείς με ΠΠ και θεωρούνται ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες (31, 79).

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μελέτη που έγινε το 2011, διαπιστώθηκε ότι σε όλους τους ασθενείς που εμφάνισαν ΠΠ και νευροεκφυλιστικά νοσήματα, τα δεύτερα προϋπήρχαν, ενώ σε κανέναν ασθενή δεν έγινε διάγνωση νευρολογικού νοσήματος μετά τη διάγνωση του ΠΠ (80). Επιπλέον, οι ασθενείς με νευρολογικές παθήσεις, εμφάνιζαν βαρύτερη μορφή ΠΠ και μεγαλύτερη θνητότητα (64, 65, 81-83).

Επιπλέον, συσχετίσεις που αναγνωρίστηκαν και προκαλούν ενδιαφέρον για τους πολύπλοκους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην διαδικασία εμφάνισης ενός νοσήματος, είναι αυτές με την φωτοθεραπεία λόγω ψωρίασης, καθώς και του ομαλού λειχήνα. Η φωτοθεραπεία δύναται να πυροδοτήσει την έκθεση των BP αντιγόνων και την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού μηχανισμού μέσω της υπεριώδους ακτινοβολίας, οδηγώντας στην δημιουργία αυτοαντισωμάτων έναντι νέων αντιγονικών επιτόπων (epitope spreading) (84-86). Στην περίπτωση του ομαλού λειχήνα, ασθενείς οι οποίοι δεν έχουν αναπτύξει αυτοαντισώματα έναντι του BP180, μπορεί να εκδηλώσουν ΠΠ σε βάθος χρόνου, υποδηλώνοντας ότι ενδεχομένως η βλάβη των κυττάρων της βασικής στιβάδας μπορεί να προκαλέσει έκθεση του ανοσοποιητικού σε αυτοαντιγόνα τα οποία ήταν προηγουμένως κατεσταλμένα, οδηγώντας στην ανάπτυξη ΠΠ (87).

Πορεία - πρόγνωση

Η πορεία της νόσου σε ασθενείς με ΠΠ που εμφανίζουν anti-BP180 μπορεί να διαφέρει από αυτούς που εμφανίζουν μόνο anti-BP230 ή αυτούς που εμφανίζουν και τα δύο (88). Σύμφωνα με κάποιες έρευνες, έχει φανεί συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων IgG και IgE στον ορό των ασθενών και της ενεργότητας της νόσου, ή της πιθανότητας υποτροπής. Αυτό θα μπορούσε στο μέλλον να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός παράγοντας για την ανταπόκριση σε συγκεκριμένες αγωγές, καθώς και την ρύθμιση των δόσεων των φαρμάκων που ήδη λαμβάνουν (89, 90). Δεν έχει αναγνωριστεί συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των αντισωμάτων στον ορό και της εμφάνισης νευροεκφυλιστικού νοσήματος, μία σημαντική συσχέτιση η οποία έχει παρατηρηθεί, χωρίς όμως να έχει ελεγχθεί το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, το οποίο ίσως να έχει ενδιαφέρον (88, 91).

Η νόσος είναι χρόνια με συχνές υποτροπές, οι οποίες αφορούν το 27,87-53%, με την πλειοψηφία να λαμβάνει χώρα εντός 6 μηνών από την ύφεση των συμπτωμάτων. Ως υποτροπή ορίζεται, είτε η εμφάνιση τουλάχιστον 3 νέων βλαβών εντός 1 μηνός, είτε 1 μεγάλης βλάβης (άνω των 10εκ. σε διάμετρο) η οποία δεν υφίεται εντός εβδομάδος, είτε, τέλος, η

επέκταση των υπαρχόντων βλαβών σε ασθενείς που βρίσκονται σε σταθερή κατά τα άλλα κλινική κατάσταση (59).

Παράγοντες κινδύνου υποτροπής είναι η ηλικία, η σοβαρότητα της νόσου, η ύπαρξη νευροεκφυλιστικών νοσημάτων και ιδιαίτερα της άνοιας, τα επίπεδα ECP, BAFF, IL-17, IL-23, CXCL10, καθώς και τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του BP-180 (81, 92). Μεγαλύτερη πιθανότητα εμφανίζουν οι ασθενείς με εντονότερη κλινική εικόνα κατά τη διάγνωση, όσο και αυτοί που πάσχουν ταυτόχρονα από άνοια, εν αντιθέσει με αυτούς που λαμβάνουν κορτικοστεροειδή σε χαμηλή δόση για μεγάλο διάστημα, σε συνδυασμό με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (81, 92). Οι υποτροπές σε συνδυασμό με την αυξημένη ηλικία στην οποία εμφανίζονται, επηρεάζουν σημαντικά την ποιότητα ζωής (93). Παράγοντα πρόγνωσης αποτελεί η συνύπαρξη νόσου Alzheimer με αυξημένους τίτλους αντισωμάτων έναντι του BP-180 (94). Η θνητότητα αγγίζει το 23,5% ανά έτος και αυξάνεται με την άνοδο της ηλικίας, τις συννοσηρότητες και ιδιαίτερα την άνοια και τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, καθώς και τα κυκλοφορούντα επίπεδα IgG. Είναι υψηλότερη στην Ευρώπη συγκριτικά με την Ασία και την Αμερική (95-99). Παρ' όλα αυτά, στις περισσότερες περιπτώσεις η πάθηση αυτοπεριορίζεται σε διάστημα 5 ετών, με ύφεση των συμπτωμάτων (100).

Η βαρύτητα της νόσου σχετίζεται και με την συγκέντρωση των ηωσινοφίλων και των ιστιοκυττάρων, τα επίπεδα των εκκρινόμενων από αυτά πρωτεϊνών (ECP-MBP και τρυπτάση αντίστοιχα), καθώς και με τους προθρομβωτικούς δείκτες, όπως οι παράγοντες F1+2 και τα d-dimers. Πιθανολογείται επίσης, ότι μόρια της φλεγμονώδους απόκρισης, όπως οι κυτταροκίνες και οι χημειοκίνες, είναι αυξημένα τόσο στον ορό, όσο και στην περιοχή των δερματικών βλαβών (101-105). Ενδιαφέρον προκαλούν τα αποτελέσματα μίας έρευνας κατά την οποία αναγνωρίστηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των IgG αντισωμάτων έναντι του BP180 και της βαρύτητας της νόσου, εν αντιθέσει με τα επίπεδα έναντι του BP230 τα οποία δεν συσχετιζόνταν (106).

Τέλος, οι ασθενείς με ΠΠ εμφανίζουν αυξημένη πιθανότητα για θρομβοεμβολικά επεισόδια, όπως εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση, η οποία μπορεί να είναι έως και 4 φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό (107).

Θεραπεία

Η θεραπεία του ΠΠ στοχεύει στην μείωση εμφάνισης νέων βλαβών και την βελτίωση των υπαρχόντων, διεγείροντας την επούλωση και βελτιώνοντας τα συμπτώματα (45). Κύριο θεραπευτικό μέσο αποτέλεσαν για πολλά χρόνια τα κορτικοστεροειδή, τοπικά ή συστηματικά, ενώ τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί βαρύτητα στην ανεύρεση άλλων θεραπειών. Στις περισσότερες έρευνες μελετήθηκε η αζαθειοπρίνη, η πλασμαφαίρεση, η μυκοφαινόλη

μοφετίλ, ο συνδυασμός νικοτιναμίδης με τετρακυκλίνη, η δαψόνη, η μεθοτρεξάτη, η χλωραμβουκίλη και η κυκλοφωσφαμίδη (108-113). Έμφαση έχει δοθεί και στα μονοκλωνικά αντισώματα, όπως για παράδειγμα η ομαλιζουμάμπη η οποία χρησιμοποιήθηκε σε ασθενείς με IgE αντισώματα, καθότι αναστέλλει την σύνδεσή τους στους υποδοχείς των βασεόφιλων και των ιστιοκυττάρων (50). Πολυάριθμες κλινικές μελέτες φάσης II και III πραγματοποιούνται σε κέντρα αναφοράς σε όλον τον κόσμο δοκιμάζοντας νέους βιολογικούς παράγοντες, με σκοπό να δώσουν μία νέα θεραπευτική προσέγγιση. Στον πίνακα 02 αναφέρονται οι αγωγές και δοσολογίες για την αντιμετώπιση του ΠΠ. Αν και οι νέες θεραπείες κερδίζουν συνεχώς έδαφος, τα κορτικοστεροειδή παραμένουν σημαντικό όπλο για την αντιμετώπιση του νοσήματος.

Πίνακας 02. Θεραπευτική αντιμετώπιση του ΠΠ. SD-R εξαρτώμενη από κορτικο-στεροειδή ή υποτροπιάζουσα μορφή (steroid dependent or relapsing), IC: αντένδειξη χορήγησης ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων (Immunosuppressive drugs contraindication).

Αγωγή 1^{ης} γραμμής	
Αγωγή	Βαρύτητα νόσου
Τοπικά κορτικοστεροειδή υψηλής συγκέντρωσης (προπιονική κλοβεταζόλη) (114, 115)	Ήπια – μέτρια (τοπική)
Πρεδνιζόνη (συστηματικά) (116-118)	Ήπια – μέτρια (γενικευμένη)
Πρεδνιζόνη + τοπικά κορτικοστεροειδή (119)	Σοβαρή
Αγωγή 2^{ης} γραμμής	
Δοξυκυκλίνη (119-121)	Ήπια – μέτρια IC
Δαψόνη (119, 122)	Ήπια – μέτρια IC
Μεθοτρεξάτη (45, 119)	SD-R Ανθεκτική
Αζαθιοπρίνη (117, 119, 122)	SD-R Ανθεκτική
Μυκοφαινόλη μοφετίλ (45, 119)	SD-R Ανθεκτική
Ανοσοσφαιρίνες (ενδοφλεβίως) (123, 124)	Σοβαρή
Ριτουξιμάμπη (125)	Σοβαρή
Ομαλιζουμάμπη (45, 119, 126)	Σοβαρή IC
Παλιότερες αγωγές	
Τετρακυκλίνη (100)	Μέτρια – σοβαρή
Τετρακυκλίνη + νικοτιναμίδη (100)	Μέτρια – σοβαρή
Σουλφαπυριδίνη (100)	Μέτρια

Επιπλοκές – Θνητότητα

Οι ασθενείς με ΠΠ βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης επιπλοκών. Αυτές αφορούν κυρίως λοιμώξεις, είτε λόγω των δερματικών βλαβών οι οποίες ενέχουν τον κίνδυνο επιμόλυνσης, είτε λόγω της χρόνιας λήψης κορτικοστεροειδών η οποία επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημα. Επιπλέον, υπάρχουν οι κίνδυνοι από την μακροχρόνια χρήση κορτιζόνης, όπως η εμφάνιση οστεοπόρωσης, σακχαρώδους διαβήτη (με δυσκολία στη ρύθμισή του), υπέρτασης και πεπτικού έλκους. Εξίσου σημαντικές είναι και οι ψυχολογικές επιπτώσεις λόγω της νόσου, η οποία προκαλεί έκπτωση της ποιότητας ζωής, με αποτέλεσμα οι ασθενείς αυτοί αρκετά συχνά να εμφανίζουν καταθλιπτική διαταραχή, η οποία με την σειρά της καθυλώνει τους ασθενείς δημιουργώντας έναν φαύλο κύκλο (127-130).

Νευρολογικά νοσήματα

Οι νευρολογικές παθήσεις και συγκεκριμένα τα εκφυλιστικά νευρολογικά νοσήματα, είναι μία ομάδα παθήσεων που προκαλούνται από εκφύλιση του εγκεφαλικού παρεγχύματος και του νωτιαίου μυελού. Οφείλονται σε αυτοάνοσους, ή τραυματικούς μηχανισμούς και εμφανίζονται με μεγάλη ποικιλία συμπτωμάτων, βάσει τον προσβαλλόμενων περιοχών του κεντρικού νευρικού συστήματος. Στη διατριβή αυτή θα αναλυθούν συγκεκριμένα νευροεκφυλιστικά νοσήματα τα οποία φαίνεται να συσχετίζονται με το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές.

Νόσος Parkinson

Η νόσος του Parkinson αποτελεί μία νευροεκφυλιστική νόσο η οποία εμφανίζεται με τρόπο κατά την ηρεμία, βραδυκινησία και δυσκαμψία, καθώς και διαταραχή των αντανακλαστικών, του ύπνου και αισθητηριακών διαταραχών. Περιγράφηκε το 1817 από τον James Parkinson και εμφανίζεται σε περίπου 200 άτομα ανά 200.000 κατοίκους. Η συχνότητα είναι υψηλότερη στις δυτικές κοινωνίες (Βόρεια Ευρώπη, Βόρεια Αμερική), ενώ προσβάλλει συχνότερα στους άνδρες με έως και διπλάσια συχνότητα (131, 132).

Κλινική εικόνα

Η νόσος του Parkinson εμφανίζεται με συνδυασμό τρόμου ηρεμίας (το συχνότερο σύμπτωμα, το οποίο μειώνεται κατά την εκτέλεση κινήσεων), δυσκαμψίας λόγω αυξημένου μυϊκού τόνου και βραδυκινησίας. Επίσης εμφανίζονται μειωμένα αντανακλαστικά, διαταραχή ισορροπίας και συμπτώματα από το αυτόνομο νευρικό σύστημα (133). Βάσει των συμπτωμάτων αναγνωρίζονται 3 διαφορετικοί τύποι της νόσου: α) ο ισομερής τύπος όπου τα συμπτώματα εμφανίζονται εξίσου, β) ο τρομώδης, όπου υπερισχύει ο τρόμος ηρεμίας και γ) ο δυσκαμπτικός, όπου υπερισχύει η δυσκαμψία και η βραδυκινησία, ενώ ο τρόμος εμφανίζεται με πολύ μικρή ένταση. Συνήθως τα συμπτώματα αρχίζουν από το ένα ημιμόριο του σώματος και όσο η νόσος εξελίσσεται, εμφανίζονται και ετερόπλευρα. Σε προχωρημένα στάδια, το σώμα αποκτά κάμψη του κορμού και του αυχένα. Χαρακτηριστικό φαινόμενο είναι αυτό του «οδοντωτού τροχού», το οποίο οφείλεται στον σπασμό όλων των μυών (αγωνιστών και ανταγωνιστών), το οποίο προκαλεί διακεκομμένη κίνηση στις αρθρώσεις, αντί ομαλής-συνεχούς κίνησης (134). Πέραν των συμπτωμάτων του μυοσκελετικού συστήματος, μπορούν να εμφανιστούν και συμπτώματα από άλλα συστήματα, όπως κατάθλιψη, απάθεια, άνοια, ψυχωτικά συμπτώματα, δυσλειτουργία της ουροδόχου κύστης, δυσκοιλιότητα, αϋπνία, διαταραχές όρασης και άλλα (133, 135) .

Συμπτώματα Νόσου Parkinson



Εικόνα 15. Τα κινητικά συμπτώματα της νόσου του Parkinson.

Παθογένεια

Η ασθένεια εμφανίζεται σποραδικά και προκαλείται από την εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων των βασικών γαγγλίων και της μέλαινας ουσίας, που έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων της ντοπαμίνης στους νευρώνες. Καθότι η ντοπαμίνη έχει ανασταλτική δράση προς τους νευρώνες συγκριτικά με το Γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), η μείωση της συγκέντρωσής της προκαλεί έμμεσα υπερδραστηριότητα των νευρώνων και κατ' επέκταση αυξημένο μυϊκό τόνο στους αντίστοιχους μύες λόγω αύξησης της αναλογίας GABA/ντοπαμίνης (136, 137). Πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες που έχουν αναγνωριστεί είναι το οξειδωτικό στρες, η συσσώρευση πρωτεϊνών, η φλεγμονή, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων (πιθανώς γενετικά σχετιζόμενη) και η διεγερτική τοξικότητα, δηλαδή η τοξικότητα από αυξημένη συγκέντρωση νευροδιαβιβαστών με αποτέλεσμα την υπερβολική διέγερση των υποδοχέων (133, 138). Αν και η νόσος του Parkinson θεωρούνταν εξ αρχής σποραδική, έχει αναγνωριστεί τα τελευταία χρόνια γενετική συσχέτιση, καθώς σε έως και 10% των περιπτώσεων, υπάρχει θετικό οικογενειακό ιστορικό. Έχουν αναγνωριστεί τα τελευταία χρόνια μεταλλάξεις γονιδίων που φαίνεται να σχετίζονται με τη μετάδοση και εμφάνιση της νόσου (139).

Διάγνωση

Για την διάγνωση της νόσου, παθογνωμονικό σημείο αποτελεί η χαρακτηριστική κλινική εικόνα, η οποία συνοδεύεται από έλλειψη κινήσεων και εκφράσεων. Διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα δημιουργεί η έλλειψη τρόμου σε ορισμένους ασθενείς, η οποία φτάνει ακόμα και το 30%. Πέραν την κλινικής εξέτασης, η μόνη δοκιμασία η οποία μπορεί να διαφοροδιαγνώσει τη νόσο του Parkinson από άλλες παθήσεις με παρόμοια κλινική εικόνα, είναι το τεστ ντοπαμίνης. Για το δοκιμασία αυτή, χορηγείται διάλυμα ντοπαμίνης, με το οποίο βελτιώνονται τα συμπτώματα της νόσου, θέτοντας τη διάγνωση. Οι απεικονιστικές μέθοδοι (αξονική και μαγνητική τομογραφία, ηλεκτροεγκεφαλογράφημα) αναδεικνύουν μη ειδικά ευρήματα, μη επιτρέποντας το διαχωρισμό της νόσου από άλλες νευρολογικές παθήσεις (140-142).

Θεραπεία

Η θεραπεία της νόσου του Parkinson είναι ως επί το πλείστον φαρμακευτική, ενώ βοηθητικό ρόλο παίζει η φυσικοθεραπεία. Τα πιο βασικά φάρμακα στη φαρέτρα των Νευρολόγων είναι η λεβοντόπα, η οποία αποτελεί πρόδρομο μεταβολίτη της ντοπαμίνης και η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων ντοπαμίνης στον εγκέφαλο, καθώς και οι αγωνιστές ντοπαμίνης, οι οποίοι διεγείρουν τους αντίστοιχους υποδοχείς με παρόμοια αποτελέσματα. Ο καθορισμός της αγωγής προσαρμόζεται και εξατομικεύεται βάσει της ηλικίας, των συμπτωμάτων καθώς και της ανταπόκρισης του ασθενούς στην θεραπεία (143). Σε ορισμένες περιπτώσεις, χορηγούνται και άλλοι φαρμακευτικοί παράγοντες, όπως: α) αναστολείς της μονοαμινοξειδάσης-B, β) αναστολείς απελευθέρωσης ακετυλοχολίνης, γ) αναστολείς της κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράσης και δ) αντιχολινεργικά (144-146). Η φυσικοθεραπεία έχει ως στόχο την βελτίωση των συμπτωμάτων και κυρίως της δυσκαμψίας, ενώ δεν επηρεάζει τόσο συμπτώματα όπως ο τρόμος. Είναι πολύ σημαντική για την αυτονομία των ασθενών, καθώς τους επιτρέπει να εκτελούν καθημερινές εργασίες και βελτιώνει την ποιότητα ζωής και τις ψυχολογικές επιπτώσεις που αυτή επιφέρει (147).

Πρόγνωση

Η νόσος του Parkinson είναι μία προοδευτική εκφυλιστική νόσος του κεντρικού νευρικού συστήματος και έχει συνήθως αργή εξέλιξη. Οι ασθενείς συνήθως επιβιώνουν για περίπου 15 έτη από την έναρξη των συμπτωμάτων. Οι διαταραχές στάσης και βάδισης αποτελούν κακό προγνωστικό παράγοντα, καθώς σχετίζονται με σοβαρότερη νόσο με ταχύτερη επιδείνωση, ενώ οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης άνοιας. Επίσης σοβαρότερη νόσο εμφανίζουν και οι ασθενείς με καθυστερημένη εκδήλωση συμπτωμάτων

(μετά τα 60 έτη). Αντίθετα, ευνοϊκότερη εξέλιξη έχουν οι ασθενείς στους οποίους υπερισχύουν τα συμπτώματα τρόμου, οι οποίοι έχουν την βραδύτερη εξέλιξη (133, 148).

Ισχαιμικά Αγγειακά Εγκεφαλικά Επεισόδια

Τα ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια (ΙΑΕΕ) είναι σύνδρομα οξείας απώλειας εστιακής εγκεφαλικής λειτουργίας λόγω ανεπαρκούς αιμάτωσης συγκεκριμένης περιοχής του εγκεφάλου, με συμπτώματα που διαρκούν πάνω από 24 ώρες (133). Είναι η Τρίτη συχνότερη αιτία θανάτου και επηρεάζει περίπου 15.000.000 άτομα κάθε χρόνο. Η νόσος έχει ελαφρώς μεγαλύτερη επίπτωση στους άνδρες (149, 150).

Κλινική εικόνα

Η κλινική εικόνα των εγκεφαλικών επεισοδίων εξαρτάται από την προσβεβλημένη περιοχή. Η συνήθης συμπτωματολογία περιλαμβάνει μυϊκή αδυναμία ή παράλυση σε ένα άκρο, ή μία πλευρά του σώματος (ημιπάρεση), παράλυση στα κάτω άκρα (παραπάρεση), διαταραχές αισθητικότητας (αιμωδίες, παραισθησίες), διαταραχές ισορροπίας, δυσαρθρία, διαταραχές επικοινωνίας (αφασία εκπομπής/λήψης), διαταραχές όρασης (μερική ή ολική απώλεια όρασης από έναν, ή και τους δύο οφθαλμούς, διπλωπία), ίλιγγο, πτώση βλεφάρου, πτώση γωνίας στόματος και κεφαλαλγία (151). Τα συμπτώματα εμφανίζονται αιφνιδίως, ή εξελίσσονται εντός δευτερολέπτων ή μερικών λεπτών, ενώ σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, η συμπτωματολογία μπορεί να είναι εμφανής κατά την αφύπνιση του ασθενούς με άγνωστη έναρξη της συμπτωματολογίας (148).

Παθογένεια

Το ΙΑΕΕ οφείλεται σε απόφραξη αγγειακού κλάδου του εγκεφάλου, μικρού ή μεγάλου, με αποτέλεσμα την μείωση ή πλήρη διακοπή της ροής αίματος στην αντίστοιχη περιοχή του εγκεφάλου. Σε περίπτωση πλήρους διακοπής της αιματικής ροής για πάνω από 4-10 λεπτά, προκαλείται νέκρωση του εγκεφαλικού παρεγχύματος, ενώ σε μειωμένη αιματική παροχή, προκαλείται ισχαιμία με ηπιότερη συμπτωματολογία. Εάν η παροχή αποκατασταθεί πριν προκληθεί μόνιμη βλάβη, υπάρχει πλήρης ύφεση των συμπτωμάτων και το επεισόδιο αποκαλείται «παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο» (152). Παράγοντες κινδύνου αποτελούν η αρτηριακή υπέρταση, η παχυσαρκία, το κάπνισμα, τα καρδιακά νοσήματα, το στρες και η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ. Έχουν αναγνωριστεί πολλοί αιτιολογικοί παράγοντες, όπως η στένωση καρωτίδων και σπονδυλικών αρτηριών (αθηροσκλήρωση), ο διαχωρισμός αρτηριών,

η κολπική μαρμαρυγή, η εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση, οι ορθοπαιδικές επεμβάσεις (διεγχειρητικός κίνδυνος λιπώδους εμβολής), η λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα, η θρομβοφιλία, η νόσος Fabry, η νόσος / σύνδρομο Moγamoγa, η νευροϊνωμάτωση, οι αρτηρίτιδες κ.α. (153, 154).

Διάγνωση

Η διάγνωση ενός ΙΑΕΕ βασίζεται αφενός στην κλινική εικόνα και αφετέρου στην απεικόνιση του εγκεφαλικού παρεγχύματος. Συμπτωματολογία με συγκεκριμένη κατανομή (τοπική, ημιμόριο σώματος ή προσώπου) είναι ενδεικτική εγκεφαλικού επεισοδίου, το οποίο πρέπει να επιβεβαιωθεί απεικονιστικά. Η αξονική τομογραφία είναι η εξέταση που διενεργείται εύκολα και χωρίς περιορισμούς, αναδεικνύοντας άμεσα μεγάλες βλάβες, ή μικρότερες εντός 72 ωρών από το συμβάν, έχει όμως περιορισμένη διακριτική ικανότητα στα αρχικά στάδια όταν η ισχαιμία αφορά περιορισμένη έκταση. Η μαγνητική τομογραφία είναι η εξέταση εκλογής καθώς μπορεί να αναδείξει ακόμα και μικρές βλάβες άμεσα από την εμφάνιση των συμπτωμάτων με τις κατάλληλες ακολουθίες, έχοντας τον περιορισμό της διαθεσιμότητας (καθότι δεν είναι διαθέσιμη σε όλα τα ιδρύματα ή όλο το εικοσιτετράωρο), αντενδείκνυται σε ασθενείς με βηματοδότη ή μεταλλικά προσθετικά υλικά και χρειάζεται την πλήρη συνεργασία του ασθενούς λόγω της διάρκειας της εξέτασης. Εξέταση εκλογής, η οποία όμως δεν εφαρμόζεται στην καθ' ημέρα πράξη, είναι και η κλασική ή αξονική αγγειογραφία του εγκεφαλικού παρεγχύματος, η οποία αναδεικνύει στενώσεις, πιέσεις, ή ανωμαλίες των αγγείων του εγκεφάλου (155). Στη διαφορική διάγνωση περιλαμβάνονται παθήσεις με παρόμοια κλινική εικόνα, όπως: ενδοεγκεφαλική αιμορραγία, επιληπτικές κρίσεις, υπερτασική εγκεφαλοπάθεια, ημικρανίες και μεταβολικές διαταραχές (148).



Εικόνα 16. Εικόνα υπολογιστικής τομογραφίας εκτεταμένου ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου. Τα βέλη αναδεικνύουν την ισχαιμική περιοχή του εγκεφάλου.

Θεραπεία και αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση των ισχαιμικών εγκεφαλικών επεισοδίων περιλαμβάνει κυρίως την αποκατάσταση της αιματικής ροής, η οποία επιτυγχάνεται με την θρομβόλυση και την χορήγηση αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων και δευτερευόντως την συμπτωματική αντιμετώπιση του ασθενούς. Η θρομβόλυση περιλαμβάνει την ενδοφλέβια χορήγηση ενός θρομβολυτικού παράγοντα, αλτεπλάσης ή τενεκτεπλάσης, εντός 4.5 ωρών από την εμφάνιση των συμπτωμάτων, με σκοπό την διάλυση του θρόμβου και την επαναϊμάτωση του προσβεβλημένου εγκεφαλικού παρεγχύματος πριν προκληθούν μόνιμες βλάβες. Οι ουσίες αυτές επάγουν την διάλυση του θρόμβου, αποκαθιστώντας την αιματική ροή (156).

Σημαντικό όπλο για αντιμετώπιση ενός ΙΑΕΕ, είναι η χορήγηση αντιαιμοπεταλιακών και συγκεκριμένα ασπιρίνης. Η χορήγηση ασπιρίνης φαίνεται, όχι μόνο να μειώνει τη θνητότητα, όταν χορηγείται εντός 48 ωρών, αλλά μειώνει σημαντικά και την πιθανότητα εμφάνισης νέου επεισοδίου. Πρέπει να χορηγείται άμεσα μετά την επιβεβαίωση ότι το ΑΕΕ είναι ισχαιμικής αιτιολογίας και όχι αιμορραγικής, ενώ στην περίπτωση που ο ασθενής υποβληθεί σε θρομβόλυση, η έναρξη της θεραπείας αναβάλλεται για 24 ώρες, με την προϋπόθεση ότι δεν εμφανίζει επιπλοκές από την θεραπευτική αυτή διαδικασία. Νεότερα αντιαιμοπεταλιακά σκευάσματα, όπως η κλοπιδογρέλη, παίζουν σημαντικό ρόλο στην μακροχρόνια προφυλακτική αγωγή του ασθενούς, αλλά δεν έχουν μελετηθεί για την αποτελεσματικότητά τους στην οξεία φάση (157).

Πρόγνωση

Η θνητότητα μετά από ένα ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο είναι ιδιαίτερα αυξημένη τις πρώτες 30 ημέρες από την εμφάνιση των συμπτωμάτων και αγγίζει το 20% (148, 158). Μετά την πάροδο της πρώτης αυτής κρίσιμης περιόδου, το ποσοστό πέφτει σημαντικά (5-8%), παραμένοντας όμως 3-5 φορές μεγαλύτερο συγκριτικά με άτομα αντίστοιχης ηλικίας, νοσηροτήτων και χαρακτηριστικών. Παράγοντες κακής πρόγνωση αποτελούν επίσης οι συννοσηρότητες (καρδιοπάθειες, καρκίνος, μειωμένη κινητικότητα), η αυξημένη ηλικία, το μειωμένο επίπεδο επικοινωνίας και η σοβαρή ή πλήρης μυϊκή αδυναμία (148).

Σημαντικός δυσμενής προγνωστικός παράγοντας για την πορεία ενός ασθενούς είναι η εμφάνιση νέου επεισοδίου. Ο κίνδυνος αυτός είναι ιδιαίτερα αυξημένος κατά τον πρώτο μήνα, σε ποσοστό που κυμαίνεται από 3 έως 10%. Οι ασθενείς που κινδυνεύουν περισσότερο είναι αυτοί με αθηροσκλήρωση, καθότι είναι πιο εύκολο για τα ήδη στενωμένα αγγεία να αποφραχθούν (148). Εξίσου δυσμενής παράγοντας είναι και η αιμορραγική μετατροπή ενός ισχαιμικού ΑΕΕ, κατά την οποία η ισχαιμική περιοχή του εγκεφάλου εμφανίζει αιμορραγία, η οποία πολύ συχνά είναι δύσκολη στην αντιμετώπισή της (133, 159).

Άνοια

Η άνοια, ή πιο σωστά τα ανοϊκά σύνδρομα, είναι μια ομάδα παθήσεων που εκδηλώνονται με διαταραχές μνήμης, αφηρημένης σκέψης, και προσωπικότητας (160). Βάσει της περιοχής η οποία επηρεάζεται, χαρακτηρίζεται ως φλοιική ή υποφλοιώδης, με εκφύλιση του φλοιού ή υποφλοιού του εγκεφαλικού παρεγχύματος αντίστοιχα και η οποία συμβαίνει πρωιμότερα σε σχέση με την φυσιολογική εκφύλιση λόγω γήρατος. Ως εκ τούτου είναι σημαντικό να διαχωριστεί από την τελευταία (134, 148).

Η συχνότερη μορφή άνοιας είναι η νόσος Alzheimer, η οποία αφορά έως και το 60% των περιπτώσεων, ενώ δεύτερη ακολουθεί η αγγειακή άνοια η οποία οφείλεται σε ισχαιμία, ιδίως μετά από ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια. Άλλες συχνές μορφές είναι η άνοια των σωματιδίων Lewy και η μετωποβρεγματική, ενώ πιο σπάνιες είναι η άνοια του Parkinson, η προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση, ο υδροκέφαλος φυσιολογικής πίεσης και η παροδική σφαιρική αμνησία (161). Σε αρκετές περιπτώσεις ο αιτιολογικός παράγοντας είναι μεικτός (162).

Κλινική εικόνα

Η άνοια εκδηλώνεται ως επί το πλείστον με διαταραχές μνήμης: αρχικά της ορθόδρομης, δηλαδή της εγγραφής νέων πληροφοριών και σταδιακά της οπισθόδρομης, των ήδη αποθηκευμένων δηλαδή πληροφοριών. Με την πάροδο του χρόνου προστίθενται στα συμπτώματα διαταραχές της αφηρημένης σκέψης, της προσωπικότητας με ευερεθιστότητα και παρανοϊκή συμπεριφορά και η κατάθλιψη (148). Ανάλογα με το υποκείμενο ανοϊκό σύνδρομο, υπάρχουν και τα αντίστοιχα συμπτώματα, όπως ο τρόμος και η δυσκινησία σε ασθενείς με Parkinson, ή η επηρεασμένη λειτουργία των προσβεβλημένων περιοχών στην αγγειακή άνοια.

Στις φλοιώδεις άνοιες, με κύριο εκπρόσωπο τη νόσο Alzheimer και την μετωποβρεγματική άνοια, επηρεάζεται ο λόγος και ο προσανατολισμός, ενώ δεν επηρεάζεται τόσο η προσοχή, η σκέψη και η κίνηση. Αντίθετα, στις υποφλοιώδεις άνοιες (προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση, υδροκέφαλος φυσιολογικής πίεσης, άνοια του Parkinson, κ.α.) επηρεάζεται η κίνηση και η στάση του σώματος, η προσοχή/συγκέντρωση και η ταχύτητα της σκέψης, ενώ δεν επηρεάζεται ο λόγος και ο προσανατολισμός. Η μνήμη επηρεάζεται και στις δύο κατηγορίες εξίσου (148, 163).

Τόσο η διάγνωση, όσο και η αντιμετώπιση/θεραπεία της άνοιας, εξαρτάται από το νόσημα που την προκαλεί, και εξατομικεύεται βάσει των συμπτωμάτων.

Νόσος Alzheimer

Η νόσος Alzheimer είναι μια εκφυλιστική νόσος του κεντρικού νευρικού συστήματος η οποία εκδηλώνεται με άνοια και οφείλεται σε ατροφία του εγκεφαλικού παρεγχύματος. Είναι η συχνότερη μορφή άνοιας και χαρακτηρίζεται παθολογοανατομικά από γεροντικές πλάκες λόγω συσσώρευσης αμυλοειδούς-β, ανάπτυξης νευροϊνδιακών τολυπίων Τ-πρωτεΐνης και εκφύλισης νευροκυττάρων από ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση της μικρογλοίας (134, 164, 165). Συνήθως εκδηλώνεται μετά το 65^ο έτος της ηλικίας με βαθμιαία επιδεινούμενη κλινική εικόνα. Η συχνότητα εμφάνισης σχετίζεται αναλογικά με την ηλικία: λιγότερο από 0.1% για άτομα κάτω των 65 ετών, 0.28% για άτομα 65-69 ετών και 5.61% για άτομα άνω των 90 ετών, ενώ η συχνότητα είναι λίγο πιο αυξημένη στις γυναίκες συγκριτικά με τους άνδρες (133, 134).

Κλινική εικόνα

Η κλινική εικόνα της νόσου χαρακτηρίζεται από σταδιακή και προοδευτική έκπτωση της γνωστικής λειτουργίας, με επιρροή τόσο στη μνήμη, όσο και στην αντίληψη και την ικανότητα επίλυσης προβλημάτων, με προεξάρχον σύμπτωμα την επηρεασμένη βραχυπρόθεσμη μνήμη, ενώ σταδιακά επηρεάζεται και η πιο μακροπρόθεσμη (133, 148). Σύμφωνα με μελέτες παρατήρησης ασθενών, οι ασθενείς στα αρχικά στάδια εμφανίζουν δυσκολία ανάκλησης λέξεων και προσανατολισμού στο χώρο, ενώ στη συνέχεια εμφανίζεται δυσκολία προσοχής και συγκέντρωσης. Σε μετέπειτα στάδια προστίθενται στην κλινική εικόνα διαταραχές ομιλίας, απραξία, διαταραχές μακροπρόθεσμης μνήμης και ύπνου, καθώς και αλλαγές συμπεριφοράς, όπως κατάθλιψη, παρανοϊκή συμπεριφορά, καχυποψία, θυμός και επιθετικότητα (148, 166).

Παθογένεια

Σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου παίζει η συσσώρευση 2 πρωτεϊνών: του αμυλοειδούς Β (εξωκυττάρια) και της πρωτεΐνης Τ (ενδοκυττάρια). Η συσσώρευση των 2 αυτών πρωτεϊνών προκαλεί δυσλειτουργία των νευρώνων και συγκεκριμένα των συνάψεων, με μείωση των επιπέδων ακετυλοχολίνης (167).

Το αμυλοειδές Β (Αβ) είναι μία πρωτεΐνη 40-42 αμινοξέων η οποία εκτείνεται από την εξωκυττάρια πλευρά έως και την μεσότητα της μεμβράνης και προέρχεται από μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, την APP (Amyloid precursor protein). Μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί την συγκεκριμένη πρωτεΐνη σχετίζονται με αυξημένη παραγωγή της πρωτεΐνης Αβ 1-42, με αποτέλεσμα την συσσώρευσή της, η οποία είναι τοξική προς τους νευρώνες (168).

Η πρωτεΐνη Ταυ ανήκει στις πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους που σχετίζονται με μικροσωληνίσκους (microtubule associated protein Ταυ ΜΑΡΤ) και βρίσκεται σε αφθονία στα κύτταρα του νευρικού συστήματος. Μεταλλάξεις του γονιδίου προκαλούν την συσσώρευση υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Τ εντός των νευρικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την δημιουργία νευροϊνιδιακών τολυπίων (169).

Διάγνωση

Η διάγνωση της νόσου βασίζεται σε έναν αριθμό εξετάσεων: απεικονιστικών, ορολογικών και ψυχομετρικών, καθότι είναι μία πάθηση με πληθώρα συμπτωμάτων και δύσκολη διαφορική διάγνωση. Πολύ σημαντική είναι η νευροψυχολογική εξέταση, με την οποία αποκαλύπτεται μεγάλο εύρος των συμπτωμάτων και των διαταραχών. Ανοϊκά συμπτώματα αποκαλύπτονται ή επιβεβαιώνονται και με απλές μεθόδους όπως το mini mental test, το οποίο όμως δε μπορεί να διαχωρίσει νοσήματα που προκαλούν συμπτώματα άνοιας μεταξύ τους (170). Έδαφος κερδίζουν και νεότερες τεχνικές, όπως η μέτρηση των επιπέδων του αμυλοειδούς Β και της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Τ στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, καθώς και ο υπολογισμός της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Τ 181, 127, Ρ231 & ολικής Τ πρωτεΐνης στον ορό του αίματος (171-176).

Οι απεικονιστικές μέθοδοι, όπως η αξονική (υπολογιστική) τομογραφία και η μαγνητική τομογραφία αναδεικνύουν ατροφία του εγκεφαλικού παρεγχύματος, με μείωση της φαιάς ουσίας του υποκάμπου, χωρίς όμως να είναι ικανές να θέσουν τη διάγνωση με βεβαιότητα σε σχέση με άλλα νοσήματα που εμφανίζουν παρόμοια συμπτωματολογία. Βοηθητικό ρόλο παίζουν επίσης μέθοδοι όπως η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων και η λειτουργική μαγνητική τομογραφία (173, 177).

Θεραπεία

Η νόσος του Alzheimer είναι μία νευροεκφυλιστική νόσος, για την οποία δεν έχει βρεθεί ακόμα θεραπεία. Η αντιμετώπιση, φαρμακευτική και μη, στοχεύει στην βελτίωση των συμπτωμάτων και της ποιότητας ζωής στις πιο ήπιες μορφές της νόσου (173).

Η φαρμακευτική αγωγή για την συγκεκριμένη νόσο αποτελείται ως επί το πλείστον από αναστολείς ακετυλοχολινεστεράσης, ενός ενζύμου που είναι υπεύθυνο για την αποδόμηση της ακετυλοχολίνης στη νευρική σύναψη. Με την αναστολή του ενζύμου, τα επίπεδα της ακετυλοχολίνης αυξάνονται, βελτιώνοντας με τον τρόπο αυτό τα συμπτώματα της νόσου. Τέτοιοι αναστολείς είναι 1) η donepezil, η οποία αποτελεί φάρμακο εκλογής το οποίο

επιβραδύνει την εξέλιξη της νόσου και βελτιώνει την συμπεριφορά, β) η γαλανταμίνη, γ) η ριβαστιγμίνη και δ) η μεμαντίνη (178, 179).

Η έρευνα πλέον στρέφεται σε νεότερες μεθόδους οι οποίες στοχεύουν στους αιτιολογικούς παράγοντες της νόσου, δηλαδή του αμυλοειδούς β και της πρωτεΐνης T. Στόχος αυτών είναι τόσο η μείωση της υπερπαραγωγής αμυλοειδούς β42, όσο και η αναστολή της ανώμαλης φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης T (180).

Σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της νόσου έχει και η μη φαρμακευτική θεραπεία. Αυτή έχει επικουρικό ρόλο και στηρίζεται σε ψυχοθεραπεία, κινησιοθεραπεία και εργασιοθεραπεία, οι οποίες βοηθούν τους ασθενείς να γίνουν πιο αυτόνομοι, να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής τους και να καθυστερήσουν την εξέλιξη της νόσου (181).

Πρόγνωση

Η νόσος συνήθως διαρκεί από 7 έως 10 χρόνια από την εμφάνιση των συμπτωμάτων, με σταδιακή επιδείνωση της κλινικής εικόνας, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί η διάρκεια να φτάσει τα 3-5 (ραγδαία επιδείνωση), ή και τα 20 έτη (βραδείας εξέλιξης). Στα τελευταία στάδια της νόσου ο ασθενής έχει χάσει τις περισσότερες αναμνήσεις, δεν αναγνωρίζει οικεία πρόσωπα και είναι πλήρως εξαρτώμενος από το περιβάλλον του ακόμα και για τις βασικές ανάγκες. Ο θάνατος συνήθως είναι αποτέλεσμα από λοιμώξεις αναπνευστικού, υποθρεψία – καχεξία και αφυδάτωση (148).

Πολλαπλή σκλήρυνση

Η πολλαπλή σκλήρυνση, σκλήρυνση κατά πλάκας, ή νόσος του Charcot, είναι μία αυτοάνοση νευροεκφυλιστική απομυελινωτική νόσος του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), η οποία εμφανίζεται κυρίως σε νέους ενήλικες. Οι γυναίκες εμφανίζουν διπλάσια-τριπλάσια επίπτωση σε σχέση με τους άνδρες, ενώ είναι σπάνια η εμφάνιση σε παιδιά. Η συχνότητα εμφάνισης αυξάνεται από την ενηλικίωση έως και τα 35 έτη, ενώ μετά μειώνεται, με το νόσημα να εμφανίζεται εξαιρετικά σπάνια μετά τα 65.

Ανάμεσα στους προδιαθεσικούς παράγοντες που έχουν αναγνωριστεί περιλαμβάνονται η απόσταση από τον Ισημερινό, η έλλειψη βιταμίνης D, ο υψηλός τίτλος αντισωμάτων έναντι του Iού Epstein Barr και η παχυσαρκία. Ως προς την γεωγραφική συσχέτιση, παρατηρείται αύξηση της επίπτωσης όσο αυξάνεται η απόσταση από τον Ισημερινό, δηλαδή στις ΗΠΑ, την Ευρώπη, την Ιαπωνία, την Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία, ενώ εμφανίζεται σπάνια σε χώρες του Ισημερινού. Ενδεχομένως η γεωγραφική αυτή κατανομή, να σχετίζεται έμμεσα με τα επίπεδα βιταμίνης D. Επιπλέον, φαίνεται να υπάρχει φυλετική συσχέτιση, καθότι εμφανίζεται συχνότερα σε Ευρωπαίους συγκριτικά με άλλους πληθυσμούς, ακόμα και στην ίδια γεωγραφική περιοχή (182, 183).

Κλινική εικόνα

Η πολλαπλή σκλήρυνση μπορεί να εμφανιστεί είτε αιφνιδίως, είτε σταδιακά, με μία πληθώρα συμπτωμάτων. Τα συχνότερα (κατά την αρχική εμφάνιση της νόσου) είναι αισθητηριακές διαταραχές, όπως παραισθησίες (αίσθημα νυγμού από βελόνες ή μυρμηγκιάσματα), δυσαισθησίες (καύσος, ή αίσθηση υγρού δέρματος), ή υπαισθησίες (μειωμένη αντίληψη των ερεθισμάτων). Εξίσου συχνά συμπτώματα αποτελούν η μυϊκή αδυναμία, η απώλεια όρασης, η αταξία και η διπλωπία, ενώ λιγότερα συχνά είναι ο ίλιγγος, η εύκολη κόπωση, ο πονοκέφαλος και το άλγος στο πρόσωπο. Σε μεταγενέστερα στάδια εμφανίζονται και άλλα συμπτώματα όπως οι διαταραχές της ουροδόχου κύστης, οι κράμπες, η δυσκοιλιότητα, η δυσαρθρία, οι διαταραχές μνήμης και οι διαταραχές ακοής. Τα συμπτώματα μπορεί να είναι συνεχή ή διαλείποντα με τάση να εμφανίζονται ετερόπλευρα και να επεκτείνονται αντιστοίχως σταδιακά. Συχνή εκδήλωση της νόσου είναι η εμφάνιση αιμωδιών στο ένα άκρο, με σταδιακή επέκταση στο ετερόπλευρο, λόγω εμφάνισης απομυελινωτικής πλάκας στο νωτιαίο μυελό, με την αύξηση της οποίας επηρεάζονται αμφότερες οι ρίζες, ενώ λόγω κάθετης επέκτασης, εμφανίζονται παρόμοια συμπτώματα σε γειτονικές περιοχές.

Το συχνότερο σύμπτωμα αποτελούν οι αισθητηριακές διαταραχές, ακολουθούμενες από τις κινητικές, ενώ τρίτο στην σειρά εμφάνισης είναι η οπτική νευρίτιδα.

Αναγνωρίζονται 4 μορφές της νόσου(184):

1. Η υποτροπιάζουσα διαλείπουσα πολλαπλή σκλήρυνση (RRMS) η οποία αφορά το 90%, με εξάρσεις και υφέσεις των συμπτωμάτων. Υπάρχει περίπτωση κατά την διάγνωση να υπάρχουν και «σιωπηλές πλάκες», πλάκες δηλαδή οι οποίες λόγω θέσης δεν προκαλούν συμπτώματα. Η μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου είναι τα 30 έτη (183, 185).

2. Το κλινικά μεμονωμένο σύνδρομο το οποίο αφορά το 1^ο επεισόδιο απομυελίνωσης και οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν πολύ υψηλό κίνδυνο εμφάνισης πολλαπλής σκλήρυνσης. Οι ασθενείς μπορεί, είτε να μεταπέσουν στην υποτροπιάζουσα διαλείπουσα μορφή, είτε να μην εμφανίσουν άλλο επεισόδιο. Η πιθανότητα εμφάνισης 2^{ου} επεισοδίου εντός 14 ετών, είναι 88% για τους ασθενείς που εμφανίζουν πλάκες στη μαγνητική τομογραφία και 19% όταν η απεικόνιση είναι φυσιολογική (183, 186).

3. Η δευτεροπαθής προοδευτική πολλαπλή σκλήρυνση (SPMS), η οποία είναι το αποτέλεσμα για το 85-90% των ασθενών με RRMS, όπου προοδευτικά τα νευρολογικά συμπτώματα και ελλείμματα επιδεινώνονται και προκαλούν σημαντικού βαθμού αναπηρία, τόσο κινητική όσο και γνωστικού επιπέδου/αντιλήψεως. Αυτό συμβαίνει συνήθως εντός 20 ετών από την έναρξη των συμπτωμάτων. Ο ρυθμός εμφάνισης εξάρσεων μειώνεται σημαντικά, τα συμπτώματα όμως δεν υφίστανται και οι ασθενείς σταδιακά επιδεινώνονται μέχρις ότου καταλήξουν ακινητοποιημένοι στο κρεβάτι (184, 187-189).

4. Η πρωτοπαθής προοδευτική πολλαπλή σκλήρυνση (PPMS) αφορά περίπου το 10% των ασθενών, οι οποίοι έχουν προοδευτική πορεία εξ αρχής, χωρίς να περάσουν από το στάδιο των εξάρσεων και υφέσεων. Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 40 έτη και εν αντιθέσει με τις άλλες μορφές της νόσου, έχει ίδια επίπτωση σε άνδρες και γυναίκες. Οι ασθενείς εμφανίζουν ταχύτερα κινητικά προβλήματα και καταλήγουν σε αναπηρία σε έως και το μισό χρονικό διάστημα (183, 186, 190).

Παθογένεια

Η νόσος προσβάλλει μόνο το κεντρικό, ενώ δεν επηρεάζει το περιφερικό ή αυτόνομο νευρικό σύστημα. Στα νεύρα που προσβάλλονται καταστρέφονται τα έλυτρα μυελίνης, τα οποία περιβάλλουν τους νευρώνες, επηρεάζοντας την μετάδοση των νευρικών ώσεων. Οι προσβεβλημένες περιοχές σχηματίζουν πλάκες στις οποίες αναπτύσσεται φλεγμονώδης διεργασία με διείσδυση λεμφοκυττάρων και μακροφάγων και ενεργοποίηση της μικρογλοίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη αυτών των πλακών οι οποίες έχουν ροζ ή γκρι χρώμα και σκληρή ή ελαστική σύσταση. Μπορούν να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε περιοχή του ΚΝΣ, η συχνότερη όμως εντόπισή τους είναι περικοιλιακά, στο μεσολόβιο, στα οπτικά νεύρα και

στην ραχιαία επιφάνεια του νωτιαίου μυελού. Δεν έχει αναγνωριστεί αίτιο το οποίο να προκαλεί τη νόσο (183, 190-192).

Διάγνωση

Η πολλαπλή σκλήρυνση είναι ένα νόσημα με δύσκολη διάγνωση η οποία στηρίζεται ως επί το πλείστον στην κλινική εξέταση και το ιστορικό. Συμπτώματα συμβατά με τη νόσο και τη συγκεκριμένη πορεία (π.χ. ιστορικό εμφάνισης συχνών υποτροπών με εξάρσεις και υφέσεις) είναι παθογνωμονικό, καθότι η εμφάνιση μίας εστίας προκαλεί συμπτώματα, τα οποία υφίστανται ή βελτιώνονται με την υποχώρηση της οξείας φλεγμονής.

Σημαντικό ρόλο στη διάγνωση παίζει και η μαγνητική τομογραφία, η οποία είναι παθολογική στο 95-99% των ασθενών με RRMS. Τα απεικονιστικά ευρήματα είναι περιοχές παθολογικού σήματος (T2 ακολουθίες), κυκλικού ή ωοειδούς σχήματος και οι οποίες βρίσκονται κυρίως στο μεσολόβιο, περικολιακά και στην υποφλοιώδη λευκή ουσία του εγκεφαλικού παρεγχύματος. Η εξέταση αυτή, ενώ έχει υψηλή ευαισθησία, δεν έχει υψηλή ειδικότητα, καθότι δε μπορεί να διαχωρίσει την πολλαπλή σκλήρυνση από άλλα νευροεκφυλιστικά απομυελινωτικά νοσήματα.

Η οσφυονωτιαία παρακέντηση είναι παθολογική στο 85-90% των περιπτώσεων και είναι πολύ βοηθητική, ιδιαίτερα όταν η μαγνητική τομογραφία, είτε δεν ανιχνεύει βλάβες, είτε δεν αναδεικνύει τυπική εικόνα για πολλαπλή σκλήρυνση. Τα ευρήματα είναι αυξημένος τίτλος IgG, αυξημένη αναλογία IgG και η παρουσία 2 ή περισσότερων ολιγοκλωνικών ταινιών, οι οποίες δεν ανευρίσκονται στον ορό του ασθενούς.



Εικόνα 17. Εικόνα μαγνητικής τομογραφίας από ασθενή με πολλαπλή σκλήρυνση. Αναδεικνύονται 2 απομυελινωτικές πλάκες.

Θεραπεία

Η πολλαπλή σκλήρυνση είναι ένα αυτοάνοσο νόσημα για το οποίο δεν έχει βρεθεί θεραπεία. Χρησιμοποιείται ένας αριθμός φαρμάκων τα οποία επιβραδύνουν όμως την εξέλιξη της νόσου με πολύ καλά αποτελέσματα (185):

1. Οι Ιντερφερόνες (IFN) είναι κυτταροκίνες οι οποίες εκκρίνονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού ως απόκριση σε ιογενείς λοιμώξεις, για να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των ιών. Η IFNB μειώνει τον ρυθμό εξάρσεων κατά 30% και επιβραδύνει την δημιουργία νέων βλαβών-πλακών (193). Αντίθετα, η IFNγ επιδεινώνει τα συμπτώματα της νόσου (148, 194).

2. Τα γλυκοκορτικοειδή αποτέλεσαν την κύρια θεραπεία των εξάρσεων της νόσου, βελτιώνοντας τα συμπτώματα και μειώνοντας τις εξάρσεις καθώς και τον χρόνο που διαρκούν, μέσω της αντιφλεγμονώδους δράσης τους. Η απότομη διακοπή τους ενίοτε προκαλεί υποτροπή της νόσου (rebound). Η χρήση έχει μειωθεί τα τελευταία χρόνια, λόγω της ανάπτυξης νέων φαρμάκων (148).

3. Η οξείκη γκλατιραμέρη είναι ένα συνθετικό πολυμερές αμινοξέων το οποίο μειώνει την εμφάνιση εξάρσεων στην RRMS κατά 29% και μειώνει την εμφάνιση πλακών στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, μέσω τροποποίησης της ανοσιακής απόκρισης (195, 196).

5. Η ναταλιζουμάμπη είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα με δράση έναντι της α -αλυσίδας της $\alpha 4\beta 1$ ιντεγκρίνης. Αποτέλεσμα είναι η μείωση της φλεγμονώδους διεργασίας. Τόσο οι εξάρσεις της νόσου, όσο και η εμφάνιση νέων πλακών μειώθηκαν σημαντικά στους ασθενείς που έλαβαν τη συγκεκριμένη αγωγή (197).

6. Οι τροποποιητές του υποδοχέα της 1-φωσφορικής σφιγγοσίνης (S1P), όπως η φινγκολιμόδη (fingolimod) και οι εκλεκτικοί τροποποιητές όπως η οζανιμόδη (ozanimod), η σιπονιμόδη (sipniod) και η πονεσιμόδη (ponesimod), αναστέλλουν την συσσώρευση λεμφοκυττάρων στο εγκεφαλικό παρέγχυμα και κατ' επέκτασιν την φλεγμονώδη διεργασία (198, 199). Τα φάρμακα αυτά προκαλούν έως και 48% μείωση των ετήσιων υποτροπών της νόσου (200, 201).

7. Η ριτουξιμάμπη είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο στοχεύει το CD20, ένα δείκτη των B λεμφοκυττάρων. Η χρήση της είχε ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση εμφάνισης νέων βλαβών και τη μείωση των υποτροπών/εξάρσεων της νόσου (202).

8. Η κλαδριβίνη είναι προφάρμακο του οποίου ο δραστικός μεταβολίτης προκαλεί απόπτωση των CD4 και CD8 T-λεμφοκυττάρων, καθώς και των CD19 B-λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα την μείωση της φλεγμονώδους διεργασίας (203, 204).

9. Η τεριφλουνομίδη αναστέλλει την σύνθεση πυριμιδινών, εμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό των ενεργοποιημένων T και B λεμφοκυττάρων, αναστέλλοντας την φλεγμονώδη διεργασία που υφίσταται στην πολλαπλή σκλήρυνση. Σύμφωνα με μελέτες μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης υποτροπών έως και 30% (205).

Επιπλοκές και πρόγνωση

Η πορεία της νόσου έχει βελτιωθεί σημαντικά με την πάροδο του χρόνου, με την εξέλιξη της φαρμακολογίας και την ανεύρεση των ανοσοτροποποιητικών φαρμάκων, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση των εξάρσεων και την καθυστέρηση της εμφάνισης νέων βλαβών. Παρ' όλα αυτά, οι μακροχρόνιες επιπτώσεις των φαρμάκων αυτών δεν έχουν μελετηθεί ακόμα, αφήνοντας ένα ερωτηματικό για το μέλλον, παρά τα παρατηρούμενα οφέλη. Επιπροσθέτως, η φαρμακευτική αγωγή που υφίσταται στις μέρες μας έχει ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της εξέλιξής της και όχι την θεραπεία της, επομένως οι ασθενείς θα επιδεινωθούν σταδιακά, εμφανίζοντας, αν και καθυστερημένα, τις μακροχρόνιες επιπλοκές της νόσου, όπως η κατάργηση της αυτοεξυπηρέτησης, της κινητικότητας και η εμφάνιση λοιμώξεων κυρίως του αναπνευστικού.

Συσχέτιση Πομφολυγώδους Πεμφιγοειδούς με Νευρολογικές Παθήσεις

Το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές είναι ένα αυτοάνοσο πομφολυγώδες νόσημα το οποίο εμφανίζεται στην τρίτη κυρίως ηλικία και σχετίζεται με τις πρωτεΐνες BP180 και 230. Οι πρωτεΐνες αυτές εμφανίζονται τόσο στο δέρμα, όσο και στο νευρικό ιστό (με κοινή καταβολή των δύο ιστών από το εξώδερμα) και για το λόγο αυτό πιθανολογήθηκε η συσχέτιση του ΠΠ με νευροεκφυλιστικά νοσήματα (206, 207). Καθότι η αύξηση της διάρκειας ζωής σχετίζεται άμεσα με την αυξανόμενη εμφάνιση του ΠΠ λόγω του ανοσολογισμού (γήρανση του ανοσοποιητικού συστήματος), η πιθανή συσχέτιση των δύο νοσημάτων αποτέλεσε προτροπή για περαιτέρω διερεύνηση (88).

Έχει αναφερθεί σε πολυάριθμες μελέτες η πιθανή συσχέτιση του ΠΠ με τις νευροεκφυλιστικές παθήσεις, οι οποίες συνήθως προηγούνται, όπως η νόσος του Parkinson, τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, η άνοια και η νόσος Alzheimer, η πολλαπλή σκλήρυνση, η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση, κ.ά., σε ποσοστό έως και 72% (57, 62, 64, 66, 67, 70, 80, 88, 208-215). Η συνύπαρξη άνοιας σε ασθενείς με ΠΠ είναι έως και 7 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό (62, 64, 65, 80, 211, 216). Η συσχέτιση με την πολλαπλή σκλήρυνση δεν έχει μελετηθεί τόσο όσο με τα άλλα νοσήματα, λόγω του μικρού αριθμού ασθενών που εμφανίζουν και τα δύο νοσήματα στις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν (80). Επιπλέον, σε πρόσφατες έρευνες φάνηκε ότι σε ασθενείς με νόσο Alzheimer, άνοια ή/και νόσο του Parkinson, χωρίς ΠΠ, αναπτύχθηκαν αντισώματα έναντι του BP 180 στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και τον ορό του αίματος, σε ποσοστό έως και 20% (94, 217). Η συγκέντρωση των αντισωμάτων στο ορό των ασθενών που εμφάνιζαν μόνο ΠΠ δεν διέφερε συγκριτικά με αυτήν των ασθενών που εμφάνιζαν παράλληλα και νευροεκφυλιστικά νοσήματα (57). Ως προς τους ασθενείς με αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, έχει φανεί να υπάρχει αυξημένος τίτλος αντισωμάτων έναντι του BP 180, τα οποία αντιδρούν έναντι του δερματικού αντιγόνου, υποδηλώνοντας ότι το αντιγόνο είναι κοινό για τα ΑΕΕ και το ΠΠ (218).

Σε μελέτες με ασθενείς που εμφανίζουν ΠΠ, μελετήθηκε η συχνότητα συνύπαρξης νευροεκφυλιστικών νοσημάτων: αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο 12,77-15%, νόσος του Parkinson στο 5-9%, άνοια στο 5-20%, πολλαπλή σκλήρυνση 5%, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις υπήρχαν άνω των 2 νοσημάτων (65, 88). Αναλυτικά αναφέρονται οι έρευνες που μελέτησαν την συσχέτιση αυτή στον πίνακα 03.

Τόσο οι παθογενετικοί μηχανισμοί που διασυνδέουν το ΠΠ με τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα, όσο και οι εκλυτικοί παράγοντες παραμένουν άγνωστοι. Παρ' όλα αυτά, ίσως εμπλέκονται αυτοαντιγόνα τα οποία είναι κοινά στο κεντρικό νευρικό σύστημα και το δέρμα (88, 219, 220). Αυτό υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι υπάρχουν διαφορετικές ισομορφές του αντιγόνου BPAG2, εκ των οποίων μία βρίσκεται στον επιθηλιακό και μία στο νευρικό ιστό (221). Τα διαφορετικά αυτά μόρια προκύπτουν από διαφορετικό μάτισμα ή διαφορετική

έναρξη μετάφρασης (222, 223). Η έκθεση στη νευρονική μορφή, όπως για παράδειγμα μετά από την νευρική εκφύλιση, ή την καταστροφή του εγκεφαλικού παρεγχύματος, οι οποίες προκαλούν φλεγμονώδη διεργασία στο νευρικό ιστό, θα μπορούσαν να προκαλέσουν ανοσιακή απόκριση έναντι της επιθηλιακής (57, 80, 94, 222, 224-227). Το παράδειγμα αυτό εξηγεί την καθυστερημένη εμφάνιση του ΠΠ και υποστηρίζεται από την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων έναντι του BPAG2 σε ανοϊκούς ασθενείς οι οποίοι δεν έχουν κλινικές εκδηλώσεις ΠΠ, στους οποίους τα επίπεδα των κυκλοφορούντων αντισωμάτων σχετίζονται αναλογικά με την βαρύτητα της νόσου Alzheimer (94, 212). Ορισμένοι από τους ασθενείς χωρίς δερματικές εκδηλώσεις, ενδεχομένως να καταλήγουν πριν προλάβουν να τις εκφράσουν, καθότι η επιβίωσή τους είναι μειωμένη συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό (228).

Το BPAG1 ή BP 230 επίσης φαίνεται να έχει ισομορφές που εκφράζονται και στα δύο είδη ιστών, καθιστώντας το ένα πιθανό αίτιο για την συνύπαρξη νευρολογικών παθήσεων και ΠΠ, εύρημα τόσο σε μελέτες με ζώα, όσο και σε μελέτη με ανθρώπινο εγκεφαλικό ιστό από τους Chen και συνεργάτες. Λόγω του ότι δεν αναγνωρίζεται ένα και μοναδικό αντιγόνο το οποίο να είναι κοινό για τα δύο νοσήματα, ενδεχομένως η συσχέτιση που ερευνάται να οφείλεται και στα δύο αντιγόνα, ή τις ισομορφές τους, τα οποία ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα και προκαλούν την εκδήλωση της ανοσιακής απόκρισης (57, 219, 225, 229-231). Ιδιαίτερη ήταν μία περίπτωση κατά την οποία ασθενής με ιστορικό ΑΕΕ και ημιπάρεσης, εμφάνισε εικόνα ΠΠ στο ημιπαρετικό άνω άκρο, χωρίς λοιπές βλάβες. Η διάγνωση τέθηκε με λήψη βιοψιών και χρήση ELISA. Οι μηχανισμοί που προκάλεσαν την εντοπισμένη εμφάνιση βλαβών, δεν κατέστη δυνατό να αποσαφηνιστούν και πιθανολογήθηκε η εντοπισμένη φλεγμονώδης αντίδραση στο παρετικό άκρο λόγω του χρόνιου λεμφοειδήματος (232). Την αντίθετη άποψη εξέφρασαν ορισμένοι επιστήμονες, διότι η παρουσία αυτοαντισωμάτων δε μπορεί να εξηγήσει την παρουσία του υψηλού φορτίου ηωσινοφίλων και ουδετεροφίλων στην περιοχή των βλαβών, οι οποίες δεν δύναται να δημιουργηθούν εν απουσία τους (233).

Σε μία έρευνα μελετήθηκε για την πιθανή συσχέτιση το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας και συγκεκριμένα το αλληλίο HLA-DQB1*03:01. Ασθενείς με το αλληλίο αυτό και οι οποίοι πάσχουν από νευροεκφυλιστικά νοσήματα, εμφανίζουν αυξημένη δραστηριότητα των T-κυττάρων σε διάφορους επιτόπους του BP 180 και ιδιαίτερα στο εξωκυττάριο τμήμα του. Η σύνδεση του μορίου αυτού, το οποίο βρίσκεται αγκυροβολημένο στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, με τον αντιγονικό επίτοπο του BP 180, πιθανώς αποτελεί τον μηχανισμό κατά τον οποίο η έκθεση στην νευρονική μορφή, προκαλεί λόγω του epitope spreading τις δερματικές εκδηλώσεις, δηλαδή το πομφολυγώδες πεμφιοειδές. Πιθανώς λοιπόν να αναγνωρίζεται γενετικό υπόβαθρο σε ασθενείς με νευροεκφυλιστικά νοσήματα, που τους προδιαθέτει στην εμφάνιση/ ανάπτυξη ΠΠ (234-237). Αυτή η παρατήρηση εξηγεί εν μέρει το γιατί οι διάφορες έρευνες, άλλοτε υποστηρίζουν την συσχέτιση των 2 νοσημάτων και άλλοτε όχι. Δεδομένου ότι σε μία

πρόσφατη έρευνα σχετικά με την συσχέτιση αυτή, ανευρέθη ότι το 33% των ασθενών με νόσο του Parkinson εμφάνιζε στον ορό αντισώματα IgG έναντι του BP180 τα οποία δεν αντιδρούσαν με το δέρμα, πιθανολογείται εν τέλει ότι ο παθογενετικός μηχανισμός είναι πολυπαραγοντικός (217, 238). Η εμπλοκή του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας θα μπορούσε να είναι ο συνδετικός κρίκος μεταξύ των διαφόρων παθογενετικών μονοπατιών που έχουν προταθεί.

Ένα σημαντικό ερώτημα προέκυψε από μία έρευνα κατά την οποία μελετήθηκαν οι μεταλλάξεις του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του κολλαγόνου XVII. Παρατηρήθηκε ότι ορισμένες μεταλλάξεις προκαλούν την έκφραση διαφορετικού μορίου, για το οποίο τα αυτοαντισώματα εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια. Η μεταβολή της έκφρασης μπορεί να υποκρύπτει την διαταραχή της ανοσοανοχής (239).

Διάφορες υποθέσεις έχουν διατυπωθεί σε μία προσπάθεια κατανόησης της παρατηρούμενης συσχέτισης, όπως για παράδειγμα η λήψη φαρμάκων για νοσήματα του ΚΝΣ τα οποία πυροδοτούν την εμφάνιση ΠΠ, χωρίς όμως να αναγνωρίζεται χρονική συσχέτιση με τον χρόνο λήψης του φαρμάκου (208). Παρ' όλα αυτά, οι ασθενείς στους οποίους ενοχοποιήθηκε η λήψη φαρμάκου ως αιτιολογικός παράγοντας για την εμφάνιση του νοσήματος, εμφανίζουν καλύτερη πρόγνωση και ανταπόκριση στην θεραπεία, ειδικά μετά την διακοπή του αιτίου. Στις περιπτώσεις αυτές, υπάρχει ένδειξη για γενετική προδιάθεση, χωρίς όμως να έχει καταστεί δυνατό να εντοπιστεί η μετάλλαξη (73).

Εξίσου ενδιαφέρουσα ήταν η υπόθεση ότι η καταστροφή του δερμο-επιδερμικού φραγμού λόγω της κατάκλισης, η οποία προκαλεί έκθεση του ανοσοποιητικού σε νέα αντιγόνα, σε συνδυασμό με τον ανοσολογισμό λόγω της ηλικίας, προκάλεσαν την δημιουργία αυτοαντισωμάτων έναντι του νευρικού ιστού και του δέρματος (88). Πιθανώς, επομένως, η «γήρανση» του ανοσοποιητικού (ανοσολογισμός) να είναι ο συνδετικός κρίκος για τα νοσήματα αυτά. Οι αλλαγές στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα (μέσω αλλαγής της λειτουργίας των T- λεμφοκυττάρων) καθώς και η χρόνια φλεγμονώδης διεργασία μπορεί να πυροδοτήσουν την εκφύλιση των ιστών που είναι υπεύθυνοι για τα νοσήματα αυτά (240).

Τα αποτελέσματα από πολλές έρευνες υποδηλώνουν την συσχέτιση των νευρολογικών παθήσεων με το ΠΠ, για την οποία πιθανολογείται ότι εμπλέκονται κοινοί αντιγονικοί επίτοποι και συγκεκριμένα των BP 180 και BP 230. Χρειάζονται επιπλέον έρευνες για την ανάλυση του υποκείμενου αιτίου, το οποίο εάν ανευρεθεί, θα βοηθήσει στην κατανόηση και αντιμετώπιση των ασθενειών αυτών (222). Κάποιοι ερευνητές ασχολήθηκαν με αυτόν τον τομέα, καθώς βρέθηκε ότι η νευρονική μορφή του BP230 προκύπτει από το γονίδιο της δυστονίνης, το οποίο σχετίζεται με την εμφάνιση της μυϊκής δυστονίας, ενός νευροεκφυλιστικού νοσήματος των ποντικών (224). Σε δύο πειραματικές έρευνες σε ποντίκια, με χρήση αυτοαντισωμάτων έναντι του BP230, φάνηκαν αντίθετα αποτελέσματα, καθότι στην πρώτη προκλήθηκαν πομφόλυγες και ερυθροδερμία, ενώ στην δεύτερη δεν αναπαράχθηκαν παρόμοια αποτελέσματα. Τα

ευρήματα αυτά δείχνουν ότι, ενώ πιθανώς εμπλέκεται το BP230 στην παθογένεια της νόσου, επηρεάζεται και από άλλους και ίσως ισχυρότερους παράγοντες (241, 242).

Πίνακας 03. Η συσχέτιση του Πομφολυγώδους Πεμφιγοειδούς με τα Νευροεκφυλιστικά Νοσήματα. MS: Πολλαπλή σκλήρυνση, ALS: πλάγια μυατροφική σκλήρυνση, AD: Νόσος Alzheimer, AEE: Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο, PD: Νόσος Parkinson, MG: Μυασθένεια Gravis, PD*: μη στατιστικά σημαντική συσχέτιση με νόσο Parkinson.

Ερευνητής	Έτος	Χώρα Μελέτης	Αριθμός ασθενών	Συσχετίσεις
Masouye I. et al (67)	1989	Ελβετία	3	MS
Kirtschig G. et al (70)	1995	Γερμανία	3	MS
Chosidow O. et al (210)	2000	Γαλλία	3	ALS
Foureur N. et al (212)	2001	Γαλλία	46	Άνοια, AD, AEE, MS, PD, τρόμος, δυσκινησία
Stinco G. et al (208)	2005	Ιταλία	238	MS, PD
Cordel N. et al (65)	2007	Γαλλία	341	Άνοια, AEE, PD
Taghipour K. et al (57)	2010	Ηνωμένο Βασίλειο	90	Άνοια, εγκεφαλική ισχαιμία
Jedlickova H. et al (211)	2010	Τσεχική Δημοκρατία	89	Άνοια, AEE, PD
Langan SM et al (80)	2011	Ηνωμένο Βασίλειο	868	Άνοια, PD, AEE, επιληψία, MS
Bastuji-Garin S. et al (62)	2011	Γαλλία	201	PD, AEE, διπολική διαταραχή, νευροληπτικά φάρμακα
Chen YJ et al (66)	2011	Ταϊβάν	3485	Άνοια, AEE, σχιζοφρένεια, επιληψία, PD, MG, MS, ALS, διπολική διαταραχή
Kulthanan K, et al (243)	2011	Ταϊλάνδη	58	AEE, άνοια, PD, AD
Teixeira VB et al (209)	2014	Πορτογαλία	77	Άνοια, AEE, PD*
Brick KE et al (64)	2014	ΗΠΑ	87	Άνοια, PD
Casas-de-la-Asuncion E, et al (244)	2014	Ισπανία	54	AEE, άνοια, PD
Tarazona MJ, et al (17)	2015	Βραζιλία	25	AEE, άνοια, επιληψία
Kwan Z, et al (245)	2015	Μαλαισία	43	Άνοια, AEE, PD, επιληψία
Pietkiewicz P. et al (88)	2016	Πολωνία	94	Άνοια, PD, AEE, MS, επιληψία
Yu Phuan et al (216)	2017	Σιγκαπούρη	103	Άνοια
Shen AL, et al (215)	2017	Ταϊβάν	38	AEE

Γενετική ποικιλότητα

Η γενετική ποικιλότητα ορίζεται ως το σύνολο των διαφορετικών αλληλομόρφων που παρατηρούνται σε ένα πληθυσμό, τόσο στα γονίδια, όσο και στα χρωμοσώματα. Αποτέλεσμα αυτής είναι η εμφάνιση των διαφορετικών χαρακτηριστικών ενός οργανισμού. Κλασικοί μέθοδοι ανίχνευσής της, είναι η αλληλούχιση του γονιδιώματος (DNA sequencing) και η χρήση περιοριστικών ενζύμων (RFLP) μετά από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση συγκεκριμένου γονιδίου.

Σημασία για τα αυτοάνοσα νοσήματα

Η ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων φαίνεται να σχετίζεται με το επίπεδο έκφρασης των πρωτεϊνών του οργανισμού στον θύμο αδένα, την σύνδεσή τους στα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) και την παρουσίασή τους στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η γενετική ποικιλότητα ενός γονιδίου μπορεί να επηρεάσει την αντιγονοπαρουσίαση στο ανοσοποιητικό, είτε μέσω αλλαγών στην έκφραση των πρωτεϊνών, είτε μέσω υποκατάστασης αμινοξέων, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την σύνδεση με τα μόρια του MHC (246).

Γενετική ποικιλότητα του COL17A1

Το γονίδιο *COL17A1* κωδικοποιεί το κολλαγόνο XVII (BP 180). Έχουν ανιχνευτεί 19 παραλλαγές μεμονωμένων νουκλεοτιδίων (SNVs), εκ των οποίων οι 12 αφορούν μη κωδικές περιοχές (εσώνια) και 7 κωδικές (εξώνια). Από τις 7 μεταλλάξεις που αφορούν εξώνια, μόνο 3 αφορούν υποκατάσταση αμινοξέος, ενώ οι άλλες 4 είναι σιωπηλές μεταλλάξεις (πίνακας 04) (246-248).

Πίνακας 04. Σύνολο γνωστών μεταλλάξεων για το γονίδιο *COL17A1*. Με έντονη γραφή σημειώνονται οι μεταλλάξεις υποκατάστασης αμινοξέος (246-248).

Περιοχή	Θέση	Αλλαγή
Εξώνιο 10	734	ATG (Met) → ACG (Thr)
Εξώνιο 14	1168	GCT (Ala) → GCC (Ala)
Εξώνιο 27	2212	GTG (Val) → ATG (Met)
Εξώνιο 37	2700	CGT (Arg) → CGC (Arg)
Εξώνιο 43	2988	CCA (Pro) → CCC (Pro)
Εξώνιο 44	3008	CCG (Pro) → CCA (Pro)

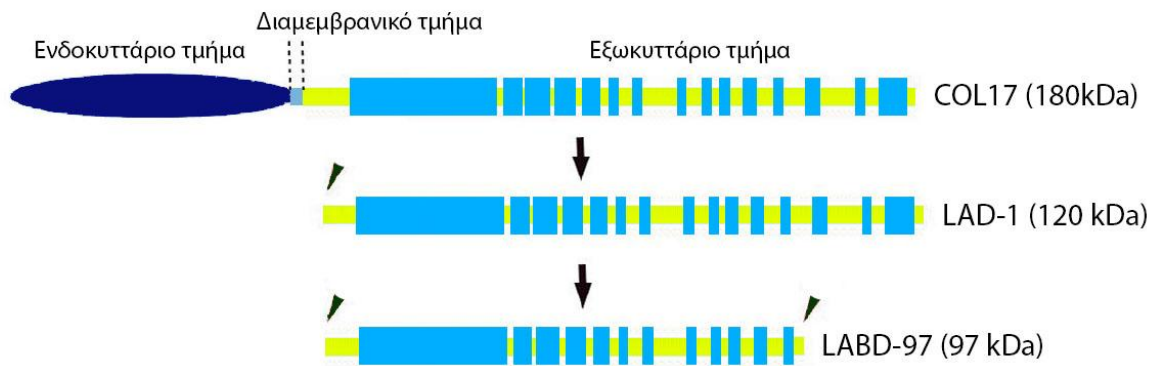
Εξώνιο 52	4214	GAT (Asp) → GGT (Gly)
Εσώνιο 16	1372 + 13	C → T
Εσώνιο 19	1822 + 14	T → C
Εσώνιο 20	1823 - 62	T → G
Εσώνιο 23	2044 + 98	C → G
Εσώνιο 25	2143 + 21	A → T
Εσώνιο 28	2268 + 120	T → C
Εσώνιο 33	2503 + 19	A → G
Εσώνιο 41	2867 - 51	C → A
Εσώνιο 45	3175 + 34	G → A
Εσώνιο 46	3313 + 16	T → C
Εσώνιο 55	4463 - 27	T → C
Εσώνιο 56	4544 - 32	T → C

Αντιγόνο BP 180

Το αντιγόνο BP 180, BPAG2 (αντιγόνο 2 του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς) ή κολλαγόνο XVII, είναι μία γλυκοπρωτεΐνη 180 kDa η οποία ανήκει στα διαμεμβρανικά κολλαγόνα. Αποτελείται από περίπου 1500 αμινοξέα και 3 α-αλυσίδες των 180kDa, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς Υδρογόνου, καθεμία εκ των οποίων αποτελείται από ένα εξωκυττάριο, ένα διαμεμβρανικό και ένα ενδοκυττάριο τμήμα (37, 38, 249, 250). Το N- άκρο γλυκοζυλιώνεται και συγκεκριμένα το αμινοξύ ασπαραγίνη 1421, ώστε το μόριο να ωριμάσει και να μπορεί να προωθηθεί διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Η σημασία της διαδικασίας αυτής αναδεικνύεται από την παραλλαγή Asn1421Thr (αντικατάσταση της ασπαραγίνης 1421 από θρεονίνη) η οποία εμποδίζει την γλυκοζυλίωση του μορίου, το οποίο συσσωρεύεται ενδοκυττάρια (251).

Ο κύριος αντιγονικός επίτοπος στο πομφολυγώδες πεμφιγοειδές είναι το εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα με το μη κολλαγόνο-εξαρτώμενο NC16a τμήμα (10). Το κολλαγόνο XVII υφίσταται τροποποιήσεις και συγκεκριμένα τμήματά του αποκόπτονται, τα οποία αφορούν το εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης. Κάτι που έχει ενδιαφέρον, είναι οι διαφορές στα τμήματα που λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός, τα οποία μπορεί να είναι διαφορετικά σε πρωτεΐνες από γονίδια που έχουν υποστεί μετάλλαξη (252). Σε περιπτώσεις μεταλλάξεων που αφορούν το σημείο αναδίπλωσης του κολλαγόνου σε σχήμα ελατηρίου, το κολλαγόνο δεν αναδιπλώνεται και συσσωρεύεται ενδοκυττάρια. Εν τέλει «τεμαχίζεται» σε μικρότερου μεγέθους μόρια κολλαγόνου των 120 και 97kDa, τα επονομαζόμενα LAD-1 και

LABD-97, τα οποία αποβάλλονται από τα κύτταρα, έχοντας όμως υποστεί αλλαγές στην ποιότητα των μορίων (253). Σε ορισμένες περιπτώσεις ΠΠ, τα αυτοαντισώματα εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια έναντι του LAD-1 συγκριτικά με το φυσιολογικό BP180, υποδηλώνοντας ότι το σημείο διατομής του μορίου εντός της περιοχής NC16a φέρει σημαντικές δομικές αλλαγές στο μόριο (254-256). In vitro μελέτες σε δείγματα από δερματικές βλάβες ΠΠ έχουν αναδείξει την παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων, τα οποία δύνανται να διατάμουν το κολλαγόνο XVII και ορισμένα από αυτά στοχεύουν το σημείο NC16a (10, 254, 257-259) .



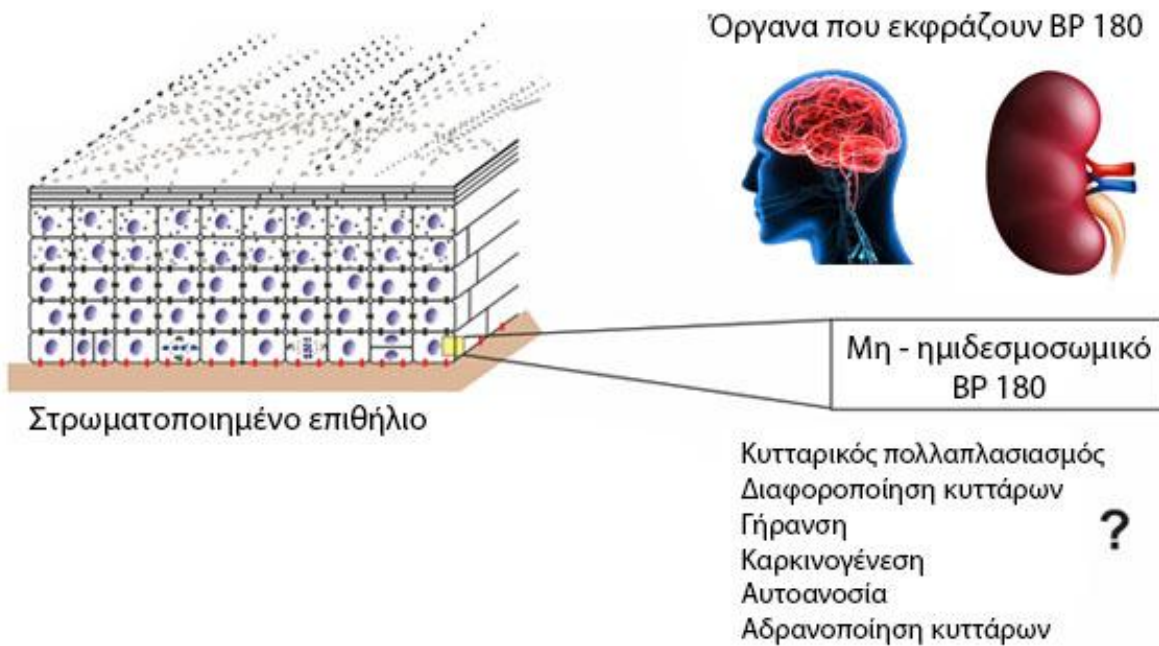
Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση του φυσιολογικού COL17 και των πολυπεπτιδίων LAD-1 και LABD-97 που προέρχονται από τον «τεμαχισμό» του συσσωρευμένου ενδοκυττάριου κολλαγόνου XVII. Το κίτρινο χρώμα αντιστοιχεί στις μη κολλαγονικές περιοχές, ενώ το γαλάζιο στις κολλαγονικές. Οι 3 ακίδες υποδηλώνουν τα σημεία «τεμαχισμού» του μορίου. Η αρχική μοίρα του εξωκυτταρίου τμήματος (σε επαφή με το διαμεμβρανικό τμήμα) αποτελεί την περιοχή NC16A (μη κολλαγονική).

Σημασία του BP 180

Το αντιγόνο BP180 βρίσκεται σε αφθονία στην επιδερμίδα, καθότι είναι βασικό συστατικό των ημιδεσμοσωματίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την προσκόλληση των επιθηλιακών κυττάρων της επιδερμίδας στη βασική μεμβράνη (μεταξύ δέρματος και επιδερμίδας) (39, 40). Ως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες της επιδερμίδας, συμμετέχουν ενεργά στην διατήρηση της ομοιόστασης του δέρματος, είτε επηρεάζοντας την επιδιόρθωση και επούλωση, είτε εμπλεκόμενα στο γήρας, αλληλεπιδρώντας με τα βλαστοκύτταρα τα οποία περιβάλλουν τα κύτταρα του δέρματος (260).

Εξίσου σημαντικός είναι ο ρόλος του στο νευρικό ιστό, κυρίως στο κυτταρικό σώμα και τους κεντρικούς νευράξονες. Η συγκέντρωση ποικίλει μεταξύ των διαφόρων περιοχών του κεντρικού νευρικού συστήματος και συγκεντρώνεται ενδοκυττάρια κυρίως πέριξ του πυρήνα με τη μορφή λιποφουσκίνης (207, 223, 261).

Οι νευρονικές μορφές των πρωτεϊνών BP 180 (κολλαγόνο XVII, BPAG2) και BP 230 (δυστονίνη, BPAG1n, BPAG1a) βρίσκονται φυσιολογικά στο νευρικό ιστό και είναι ζωτικής σημασίας για την διατήρηση της οργάνωσης του νευρικού κυτταροσκελετού. Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη BP180 σχετίζεται με την σταθεροποίηση των συνάψεων, την συναπτική πλαστικότητα και τη νευρωνική μετανάστευση (207, 262).



Εικόνα 19. Οι θέσεις και οι πιθανές λειτουργίες του BP 180. Ο ρόλος του σε μη επιθηλιακούς ιστούς δεν είναι πλήρως κατανοητός.

Μεταλλάξεις του γονιδίου *COL17A1*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του κολλαγόνου XVII (BP 180), έχει φανεί ότι προκαλεί έναν υπότυπο της πομφολυγώδους επιδερμόλυσης, η οποία χαρακτηρίζεται κλινικά από παρουσία πομφολύγων και ανωμαλιών στους οδόντες και τα μαλλιά. Γνωρίζοντας ότι η αυτοανοσία έναντι του BP180 προκαλεί το ΠΠ,

εγέρθηκε το ερώτημα του πως οι μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη αυτή, σχετίζονται με τα δερματικά νοσήματα (239, 263).

Η βλάβη του κολλαγόνου XVII δεν εξηγεί από μόνη της τα συμπτώματα, τόσο από το ΚΝΣ, όσο και από το δέρμα. Έχει φανεί από μελέτες όμως, ότι επηρεάζει άμεσα και σημαντικά την φλεγμονώδη απόκριση, την οποία και ρυθμίζει μέσω των επιπέδων έκφρασής του στους διάφορους ιστούς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, άλλοτε την καταστολή και άλλοτε την ενίσχυση της παραγωγής ιντερλευκίνης 8, η οποία είναι προφλεγμονώδης χημειοκίνη, επηρεάζοντας άμεσα την φλεγμονώδη διεργασία (264).

Ένα φαινόμενο που παρατηρείται είναι ότι, σε ορισμένους ασθενείς, τα αντισώματα έναντι της νευρωνικής μορφής του BP 180 δεν συνδέονται με το BP 180 των ημιδεσμοσωματίων του δέρματος. Η απάντηση μπορεί να βρίσκεται στην ανάλυση των αντισωμάτων, έναντι της νευρωνικής και της δερματικής μορφής του BP 180, η οποία θα μπορούσε να αναδείξει μοριακές διαφορές, που εν τέλει να εξηγούν την παθογένεια της συσχέτισης των δύο νοσημάτων (94).

Το BP 180 σχετίζεται με την εμφάνιση διαφόρων παθήσεων, όπως αυτές περιγράφονται στον πίνακα 05 (265).

Πίνακας 05. Συσχέτιση του BP180 με δερματικά νοσήματα και νεοπλάσματα (265).

Πομφολυγώδες πεμφιγοειδές	Αυτοαντισώματα έναντι του εξωκυττάριου BP180 και άλλων επιτόπων
Πεμφιγοειδές των βλεννογόνων	
Πεμφιγοειδές της κύησης	
Γραμμική IgA πομφολυγώδης δερματοπάθεια	
Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα	Τροποποιημένη έκφραση του BP 180
Βασικοκυτταρικό καρκίνωμα	
Μελάνωμα	
Καρκίνος παχέος εντέρου	
Καρκίνος πνεύμονα	
Αμελοβλάστωμα	

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της μελέτης

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε μία προσπάθεια να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των γενετικών παραλλαγών (SNVs) του γονιδίου *COL17A1*, σε ασθενείς που πάσχουν από πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και αναφέρεται στο ιστορικό τους προσβολή από κάποιο νευροεκφυλιστικό νόσημα. Είναι γνωστές από την υπάρχουσα βιβλιογραφία οι παραλλαγές του γονιδίου *COL17A1*. Για πρώτη φορά όμως, ελέγχονται για την πιθανή παθογένειά τους σε ομάδα ασθενών που πάσχουν ταυτόχρονα και από τα δύο νοσήματα, έχοντας ως βασικό εργαστηριακό εύρημα τον υψηλό τίτλο αντισωμάτων έναντι της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης BP180 (κολλαγόνο XVII).

Ο παθογενετικός μηχανισμός των αυτοάνοσων νοσημάτων γενικά και συγκεκριμένα του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς, δεν είναι πλήρως κατανοητός. Η κατανόησή του είναι σημαντική για την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών και ενδεχομένως προγνωστικών εξετάσεων και ουσιαστική για την δημιουργία νέων θεραπευτικών μονοπατιών. Καινοτόμες θεραπείες μπορεί να βελτιώσουν την πορεία της νόσου, καθώς και την ποιότητα ζωής των ασθενών.

Δευτερογενές ερώτημα

Βασική ομάδα ελέγχου στην εν λόγω διδακτορική διατριβή, αποτέλεσε η ομάδα των ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (ΠΠ) και νευροεκφυλιστικά νοσήματα. Βασικό εύρημα και σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο για την εργαστηριακή τεκμηρίωση του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς, αποτελεί στην καθ' ημέρα πράξη ο θετικός τίτλος αυτοαντισωμάτων έναντι των κύριων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου BP 180 και BP 230. Η ανεύρεση των εν λόγω αυτοαντισωμάτων πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο με την χρήση της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA.

Κατά την συλλογή του δείγματος αναφοράς παρατηρήθηκε ότι ασθενείς οι οποίοι είχαν την τυπική κλινική εικόνα του ΠΠ, θετικά ιστολογικά και εργαστηριακά ευρήματα τα οποία τεκμηρίωναν την διάγνωση, είχαν αρνητικό τίτλο αυτοαντισωμάτων έναντι των 2 πρωτεϊνών. Αυτομάτως, γεννήθηκε το ερώτημα για την πιθανή ύπαρξη νέων αντιγονικών επιτόπων που θα μπορούσε να εμπλέκονται στην παθογένεια του ΠΠ. Δηλαδή, η δημιουργία αυτοαντισωμάτων έναντι άλλων πρωτεϊνών συνοχής του χορίου με την επιδερμίδα, πέραν των ήδη γνωστών. Το αποτέλεσμα παραμένει ίδιο: ενζυμική καταστροφή των πρωτεϊνών που διατηρούν άρρηκτο τον δεσμό μεταξύ του χορίου με την επιδερμίδα, με αποτέλεσμα την δημιουργία της πομφόλυγας.

Υλικό

Η μελέτη είναι επιδημιολογική. Το δείγμα προερχόταν από την Β' Δερματολογική Κλινική του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (με έδρα το ΓΝΘ Παπαγεωργίου). Η οργάνωση και ο σχεδιασμός της μελέτης, καθώς και η γενετική ανάλυση έγιναν σε συνεργασία του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και της Μονάδας Γενετικής της Α' Μαιευτικής - Γυναικολογικής Κλινικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Το υλικό της παρούσας μελέτης – διδακτορικής διατριβής αποτελούν άτομα πάσχοντα από πομφολυγώδες πεμφιγοειδές με ιστορικό νευροεκφυλιστικού νοσήματος, άτομα πάσχοντα από πομφολυγώδες πεμφιγοειδές, άτομα πάσχοντα από νευροεκφυλιστικό νόσημα και υγιείς μάρτυρες. Όλοι οι συμμετέχοντες ανήκουν στην Καυκάσια φυλή. Δυσκολία στην συγκέντρωση του υλικού της μελέτης αποτέλεσε η λήψη συγκατάθεσης από υποψηφίους ασθενείς. Οι ασθενείς που δεν επιθυμούσαν να υπογράψουν το έντυπο συγκατάθεσης, το υλικό που είχε συλλεχθεί προγενέστερα της μελέτης για διαγνωστικούς σκοπούς και οι ασθενείς οι οποίοι σταμάτησαν την τακτική παρακολούθηση στο ειδικό ιατρείο (lost to follow-up), αποκλείστηκαν αυτόματα από τη μελέτη.

Τα μέλη της κάθε ομάδας ελέγχου υπέγραψαν την δήλωση συγκατάθεσης (παράρτημα Ι), αφού τους εξηγήθηκε ο σκοπός της μελέτης και ο λόγος συμμετοχής τους. Μετά την υπογραφή, έγινε καταγραφή του ονοματεπωνύμου, του φύλου, της ηλικίας, του τόπου καταγωγής, του ατομικού ιστορικού, του ιστορικού εμφάνισης της νόσου (ΠΠ, ή/και νευροεκφυλιστικού νοσήματος) και της κλινικής κατάστασης για τους ασθενείς που έλαβαν μέρος. Εν συνεχεία έγινε η συλλογή δείγματος αίματος (2 φιαλίδια, γενικής αίματος και βιοχημικής ανάλυσης).

Ασθενείς με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευροεκφυλιστικό νόσημα (BPN)

Εξετάστηκαν συνολικά 61 ασθενείς πάσχοντες από πομφολυγώδες πεμφιγοειδές, οι οποίοι στο ιστορικό τους είχαν νοσήσει από κάποια νευροεκφυλιστική ασθένεια. Οι ασθενείς αυτοί νοσηλεύτηκαν, κατά πλειοψηφία, στην Β' Πανεπιστημιακή Δερματολογική Κλινική ΑΠΘ, του Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης Παπαγεωργίου. Οι υπόλοιποι ασθενείς της ομάδας ανευρέθηκαν από τα Εξωτερικά Ιατρεία της κλινικής. Οι ασθενείς που νοσηλεύονται με ΠΠ, λόγω της φύσης της ασθένειας και της συνήθους θεραπείας, νοσηλεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα στην κλινική, ενώ παρακολουθούνται κατά τακτά χρονικά διαστήματα στο Ειδικό

Ιατρείο αυτοάνοσων πομφολυγωδών νοσημάτων της κλινικής. Ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών αυτών παρακολουθείται μέχρι και σήμερα.

Βασική προϋπόθεση ένταξης των ασθενών στην εν λόγω ομάδα ήταν η τυπική κλινική εικόνα του ΠΠ, καθώς και ο θετικός εργαστηριακός έλεγχος. Συγκεκριμένα οι ασθενείς είχαν θετικό άμεσο και έμμεσο ανοσοφθορισμό, ιστολογική εξέταση η οποία να αναφέρει ευρήματα συμβατά με τη διάγνωση του ΠΠ (με παρουσία, ή όχι ηωσινοφίλων στο άνω χόριο) και θετικό τίτλο αυτοαντισωμάτων έναντι τουλάχιστον της πρωτεΐνης BP 180 (κολλαγόνο XVII).

Ο θετικός άμεσος ανοσοφθορισμός ορίζεται ως γραμμικές εναποθέσεις IgG ή/και C3 κατά μήκος της βασικής μεμβράνης. Ο θετικός έμμεσος ανοσοφθορισμός ορίζεται ως γραμμικός φθορισμός με IgG ή/και C3 της βασικής μεμβράνης, ή του επιδερμδικού πετάλου (laminal lucida) μετά από διαχωρισμό των δύο πετάλων της βασικής μεμβράνης με τη μέθοδο split-skin.

Η διάγνωση των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων είχε τεθεί από Νευρολόγους βάσει των κλινικών και απεικονιστικών ευρημάτων και πολλοί μάλιστα λάμβαναν και την ανάλογη αγωγή.

Συνολικά καταγράφηκαν 28 άνδρες και 33 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας τα 76.3 και τα 78.8 έτη αντίστοιχα. Τα νευρολογικά νοσήματα που καταγράφηκαν σε ασθενείς με ΠΠ ήταν η άνοια, η νόσος Alzheimer, η νόσος Parkinson, η πολλαπλή σκλήρυνση και τα ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια. Τα δημογραφικά τους στοιχεία, το νευρολογικό νόσημα και η ηλικία διάγνωσης του ΠΠ, αναγράφονται στον πίνακα 06. Το μεσοδιάστημα διάγνωσης των δύο παθήσεων ήταν μεταξύ 3 και 6 ετών από την διάγνωση του νευρολογικού νοσήματος έως την εκδήλωση των πρώτων συμπτωμάτων του ΠΠ.

Πίνακας 06. Σύνολο ασθενών βασικής ομάδας μελέτης BPN (ασθενείς με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευροεκφυλιστικό νόσημα). Α: άνδρας, Γ: γυναίκα, ΝΑ: Νόσος Alzheimer, Αν: άνοια, ΠΣ: πολλαπλή σκλήρυνση, ΑΕΕ: αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, ΝΠ: νόσος Parkinson.

A/A	Φύλο	Ηλικία διάγνωσης ΠΠ	Είδος NN	A/A	Φύλο	Ηλικία διάγνωσης ΠΠ	Είδος NN
1	A	62	NA	32	Γ	78	ΑΕΕ
2	Γ	86	Αν	33	Γ	75	Αν
3	Γ	76	Αν	34	A	80	ΠΣ
4	Γ	83	Αν	35	Γ	79	ΝΠ
5	Γ	83	Αν	36	A	83	ΑΕΕ
6	Γ	18	ΠΣ	37	A	70	Αν, ΑΕΕ
7	Γ	77	ΑΕΕ	38	A	75	ΝΠ
8	Γ	69	ΑΕΕ	39	Γ	82	ΝΠ
9	A	78	ΑΕΕ	40	A	86	Αν
10	Γ	75	Αν	41	A	84	ΑΕΕ

11	Γ	85	Av	42	A	74	ΑΕΕ
12	A	85	ΑΕΕ	43	Γ	82	Av, ΑΕΕ
13	Γ	86	Av	44	A	81	ΑΕΕ
14	Γ	86	ΑΕΕ	45	Γ	76	ΑΕΕ
15	A	73	ΑΕΕ	46	A	81	ΝΠ
16	A	74	Av	47	A	69	ΑΕΕ
17	A	75	NA, ΝΠ	48	A	78	ΝΠ
18	A	79	ΑΕΕ	49	Γ	82	Av, ΑΕΕ
19	Γ	85	Av	50	A	73	ΑΕΕ
20	Γ	85	Av	51	A	73	ΝΠ
21	A	79	ΝΠ	52	Γ	86	Av
22	Γ	76	Av, ΝΠ	53	Γ	82	Av
23	Γ	81	Av	54	A	79	Av
24	A	83	ΑΕΕ	55	Γ	89	Av, ΑΕΕ
25	Γ	85	ΑΕΕ	56	Γ	80	Av, ΝΠ
26	Γ	81	Av	57	A	86	Av
27	Γ	80	Av	58	Γ	86	ΑΕΕ
28	Γ	89	Av	59	Γ	67	Av, ΑΕΕ
29	A	82	NA, ΝΠ	60	A	82	ΝΠ
30	A	74	ΑΕΕ	61	A	37	ΠΣ
31	Γ	71	ΑΕΕ				

Ασθενείς με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (BP)

Στην ομάδα αυτή συγκαταλέχθηκαν ασθενείς με τυπική εικόνα πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς και επιβεβαίωση της διάγνωσης με θετικό εργαστηριακό έλεγχο και ιστολογική εξέταση. Συγκεκριμένα για τον εργαστηριακό έλεγχο, είχαν θετικό άμεσο και έμμεσο ανοσοφθορισμό και θετικό τίτλο αντισωμάτων έναντι τουλάχιστον του BP180 (κολλαγόνο XVII). Από το ιστορικό τους, οι ασθενείς αυτοί δεν ελάμβαναν γλυπτίνη ως αντιδιαβητικό φάρμακο, ούτε κάποια άλλη αγωγή που βιβλιογραφικά να έχει αιτιολογηθεί ως πιθανός παράγοντας / διεγέρτης εκδήλωσης του ΠΠ. Οι ασθενείς δεν είχαν στο ιστορικό τους ή την κλινική εξέταση ευρήματα συμβατά με νευροεκφυλιστικά νοσήματα. Η εν λόγω αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε από τους ιατρούς της Δερματολογικής Κλινικής, με τη συμβολή Ιατρών της Νευρολογικής κλινικής, όπου αυτό θεωρήθηκε αναγκαίο.

Συνολικά επιλέχθηκαν 57 ασθενείς, 26 άνδρες και 31 γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας τα 75.2 και 73.4 έτη αντίστοιχα.

Ασθενείς με νευροεκφυλιστικά νοσήματα (N)

Η ομάδα αυτή αφορά ασθενείς με νευροεκφυλιστικά νοσήματα, τα οποία επιλέχθηκαν σύμφωνα με τα νοσήματα που έχουν συσχετιστεί με το ΠΠ. Στην ομάδα αυτή, βασικό κριτήριο ήταν οι ασθενείς που θα επιλεγούν, να μην έχουν ιστορικό ή κλινικά ευρήματα συμβατά με ΠΠ ή κάποια άλλη δερματολογική πάθηση που να ομοιάζει με αυτό.

Η στρατολόγηση των ασθενών έγινε σε συνεργασία με την κρατική Νευρολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Παπαγεωργίου. Οι ασθενείς ήταν, είτε νοσηλευόμενοι, που όμως η κατάσταση της πνευματικής τους υγείας τους επέτρεπε να συγκαταθέσουν υπεύθυνα για τη μελέτη, είτε ασθενείς από τα εξωτερικά ιατρεία, ειδικά και μη, της κλινικής. Υπήρξαν κάποιες περιπτώσεις που συλλέχθηκαν δείγματα από ασθενείς που δεν ήταν δυνατό λόγω της κλινικής τους κατάστασης, να δώσουν συγκατάθεση για τη μελέτη. Αντ' αυτών υπέγραψαν οι νόμιμοι εκπρόσωποί τους από το συγγενικό περιβάλλον, που ήταν κατά κύριο λόγο οι σύζυγοι.

Επιλέχθηκαν 53 ασθενείς, από τους οποίους λήφθηκε πλήρες ιστορικό. Το δείγμα περιλαμβάνει 23 άνδρες και 30 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας τα 64.9 και 72.7 έτη αντίστοιχα.

Υγιείς μάρτυρες (C)

Στην ομάδα αυτή επιλέχθηκαν ασθενείς με φύλο και μέσο όρο ηλικίας ίδιο με αυτόν των άλλων ομάδων. Τα μέλη της ομάδας αυτής έχουν ελεύθερο ιστορικό από πλευράς δερματολογικών και νευρολογικών νοσημάτων. Η επιλογή έγινε μεταξύ μη συγγενικών ατόμων και από διάφορες γεωγραφικές περιοχές. Βασικό στοιχείο ήταν η λήψη λεπτομερούς ατομικού ιστορικού και ιστορικού λήψης φαρμάκων. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει 60 άτομα, εκ των οποίων τα 29 είναι άνδρες και 31 γυναίκες, με μέση ηλικία τα 76.7 και 78.6 έτη αντίστοιχα.

Βιοηθική

Όλες οι πληροφορίες σχετικά με την ταυτότητα των ασθενών κρυπτογραφήθηκαν για την διασφάλιση της ανωνυμίας τους και κάθε ασθενής έλαβε συγκεκριμένο αναγνωριστικό βάσει της ομάδας στην οποία ανήκε. Ο αριθμός αυτός χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις διαδικασίες της μελέτης, συμπεριλαμβανομένης της πειραματικής διαδικασίας και της στατιστικής ανάλυσης. Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τους κανόνες ηθικής βάσει της

Διακήρυξης του Ελσίνκι, ενώ η διδακτορική διατριβή εγκρίθηκε από την 3^η ΥΠΕ (αρ.πρωτ. 29285/20-06-2018) και το Επιστημονικό Συμβούλιο του ΓΝΘ Παπαγεωργίου (αρ. πρωτ. 273/16-03-2017, 290/20-12-2017).

Όλες οι φωτογραφίες που απεικονίζονται στην παρούσα μελέτη, προέρχονται από το αρχείο της κλινικής στο οποίο υπάρχουν, μετά από συγκατάθεση των ασθενών.

Όλες οι σχηματικές απεικονίσεις, διαγράμματα και πίνακες δημιουργήθηκαν για την παρούσα μελέτη και υπάγονται στα πνευματικά δικαιώματα της συγγραφέως.

Μέθοδοι ανάλυσης και τεχνικές Μοριακής Βιολογίας

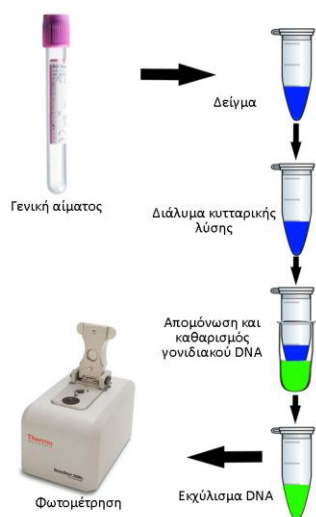
Απομόνωση γονιδιακού DNA

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε kit απομόνωσης για την εκχύλιση του γονιδιακού DNA από τα μέλη των ομάδων ελέγχου (Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit). Η μέθοδος αυτή παρέχει απομονωθέν πυρηνικό DNA κατάλληλο για τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Σε όλους τους ασθενείς και τους μάρτυρες, αφού υπογράφηκε το έντυπο συγκατάθεσης, έγινε αιμοληψία (περιφερικό φλεβικό αίμα) που περιελάμβανε ένα σωληνάριο με αντιπηκτικό παράγοντα EDTA και ένα σωληνάριο για βιοχημικό έλεγχο. Αφού πρώτα δόθηκαν τα διακριτικά του δείγματος, ώστε να εξασφαλίζεται η ανωνυμία των συμμετεχόντων, το σωληνάριο με το αντιπηκτικό τοποθετήθηκε στους -80°C, ενώ από το σωληνάριο του βιοχημικού ελέγχου, απομονώθηκε ο ορός του αίματος και κατόπιν, αφού διαμοιράστηκε σε σωληνάκια, φυλάχθηκε στους -80°C.

Από το σωληνάριο με το αντιπηκτικό πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γενετικού υλικού, το οποίο και φυλάχθηκε στους -20°C. Πριν την τελική αποθήκευση του εκχυλίσματος του DNA στους -20°C, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) με σκοπό την αξιολόγηση του δείγματος, τόσο για τη συγκέντρωση του DNA που απομονώθηκε, όσο και για την καθαρότητα του δείγματος.

Από την οπτική πυκνότητα στα 260nm υπολογίστηκε η συγκέντρωση του DNA στο εκχυλισμένο δείγμα σε ng/μl. Ο λόγος OD 260nm/280nm υπολογίστηκε για να αξιολογηθεί η καθαρότητα του DNA από την παρουσία πρωτεϊνικών προσμίξεων. Λόγος OD \geq 1.7 υποδηλώνει δείγμα με ικανοποιητική καθαρότητα. Στόχος κατά την διαδικασία της απομόνωσης ήταν μία ικανοποιητική συγκέντρωση που να είναι υψηλότερη από τα 50ng/μl. Για την καθαρότητα, επιθυμητές ήταν οι τιμές λόγου OD $>$ 1.8. Για τα δείγματα που δεν

πληρούσαν τις ανωτέρω απαιτήσεις, η διαδικασία της απομόνωσης του DNA επαναλαμβανόταν, αποσκοπώντας στην βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων. Τα δείγματα που πληρούσαν τα κριτήρια, φυλάσσονταν στους -20°C . Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στη μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μηχανήματος φωτομέτρησης Thermofischer™ NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση της απομόνωση του γονιδιακού DNA.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία επαναστατική τεχνική της Μοριακής Βιολογίας που επιτρέπει την αντιγραφή τμήματος αλληλουχίας του DNA σε πολλαπλά αντίγραφα. Η χρήση της έδωσε μεγάλες δυνατότητες, τόσο στην έρευνα, όσο και στην καθ' ημέρα διαγνωστική πράξη, καθώς είναι γρήγορη και απλοποιημένη πλέον διαδικασία. Απαραίτητη είναι η χρήση των κατάλληλων εκκινήτων (primers) οι οποίοι στοχεύουν το επιθυμητό γονίδιο/τμήμα DNA, αποκλείοντας τα υπόλοιπα τμήματα από αντιγραφή.

Στην παρούσα μελέτη έγινε έλεγχος της γενετικής ποικιλότητας του γονιδίου *COL17A1* σε όλους τους ασθενείς και μάρτυρες που συμμετείχαν. Για το *COL17A1* έχουν ταυτοποιηθεί 19 παραλλαγές (SNVs), εκ των οποίων μόνο 3 αφορούν αλλαγές σε κωδικές περιοχές του γονιδίου και οδηγούν σε υποκατάσταση αμινοξέος στα εξόνια 10, 27 και 52 (rs805708, rs805722 και rs17116350 αντίστοιχα) (246). Η γονοτύπηση των 3 αυτών SNVs ξεκίνησε με τη χρήση της τεχνικής PCR.

Πειραματικό πρωτόκολλο μελέτης – PCR

Κατά τη διαδικασία της PCR χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Prime Thermal Cycler® της εταιρείας Techne-Cole-Palmer™. Οι παράμετροι που τέθηκαν για την περάτωση της διαδικασίας, είναι οι ακόλουθοι:

- 96°C / 4min
- +35x (95°C / 45sec, 55°C / 45sec, 72°C / 1min)
- +72°C / 7min
- 4°C hold (διατήρηση)

Δημιουργήθηκε το μείγμα (master mix) με τα ακόλουθα αντιδραστήρια και αναλογίες:

Αντιδραστήρια:	Συγκέντρωση ΣΤΟΚ	x 1(μl)
Buffer	10x	5
dNTPs	10mM	0.4
Primer F	100μM	0.2
Primer R	100μM	0.2
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	1.1g/ml	2.0
DreamTaq πολυμεράση	5IU/μl	0.3
H ₂ O		36.9

Σε μικροσωληνάρια erppendorf™ των 200μl, μοιράστηκε ποσότητα 45μl από το master mix, στο οποίο προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα δείγματος DNA, ανάλογα με την συγκέντρωσή του. Η επιθυμητή ποσότητα γονιδιακού DNA για κάθε αντίδραση, υπολογίστηκε στα περίπου 200ng.

Μετά το τέλος της διαδικασίας, τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αραρόζης 2%, ώστε να ελεγχθεί η επιτυχία της πειραματικής διαδικασίας για το κάθε δείγμα και να γίνει μια ποιοτική αξιολόγηση της απόδοσης αντιγραφής. Εν συνεχεία τα προϊόντα της PCR φυλάχθηκαν στους -20°C.

➤ Εξώνιο 10

Το εξώνιο 10 του γονιδίου *COL17A1* έχει μέγεθος 159 ζευγών βάσεων (bp). Για τον πολλαπλασιασμό του εξωνίου χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές για τις δύο αλυσίδες, οι οποίοι συνδέονται σε τμήματα πλησίον του εξωνίου:

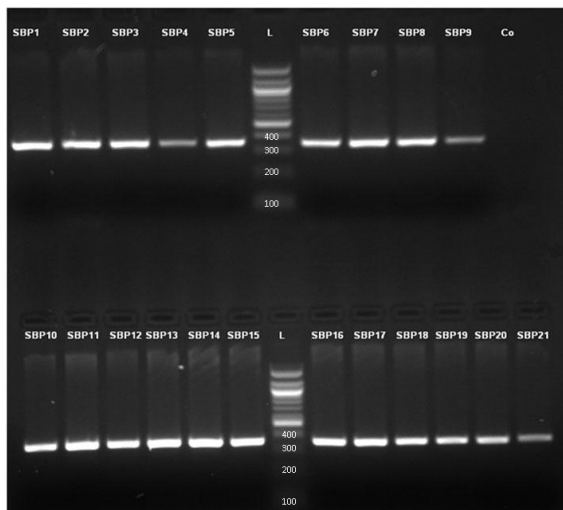
Exon10For: 5' - gct ttc aat gcc caa acc agg - 3' (21 βάσεις)

Exon10Rev: 5' - atg gca aac att ctg agg gtc - 3' (21 βάσεις)

Στην αλληλουχία του τμήματος του *COL17A1* που περιλαμβάνει το εξώνιο 10 που ακολουθεί, με κεφαλαία μαύρα γράμματα συμβολίζεται η αλληλουχία του εξωνίου 10, με μικρά μπλε γράμματα συμβολίζονται οι αλληλουχίες των γειτονικών εσωνίων, ενώ με μικρά κόκκινα γράμματα συμβολίζονται οι δύο περιοχές σύνδεσης των εκκινητών.

ttcaccagctctgagatttcagatggaaactacccaggttctggactgagaaagttcctgaaatgtggggctttcaatgcccaaacag
gaaatcccagcaaaatgaggtgactagattcccagcagggagtgattgtctctcactggggtgtgtgcatgtgtctgtttccag
TGTCAGGCACCTACGATGCAATGATCCTGGATGCCAACCTTCCCTCCCATGTGTGGTCTCCACCCTGCC
CGCGGGGTCTCCATGGGGACCTATCACAACAACATGACAACCCAGAGCTCATCCCTCCTCAACACCA
ATGCCTACTCTGCGGGATCAG
gtacctggcgggcagcccacaccctctcaccctgaactcggcatgcctctatcctggagctggatgacctcagaatgtttgccatcct
cagggcctcctggagaggctttctgtggccaacatcccaggagattcccctggaactcagttcaattcaatctagaaggtattgc

Με τη χρήση της τεχνικής PCR, με τους προαναφερθέντες εκκινητές, πολλαπλασιάστηκε τμήμα DNA μεγέθους 342bp (εικόνα 21).



Εικόνα 21. Εικόνα ηλεκτροφόρησης PCR του εξωνίου 10 του γονιδίου *COL17A1*. Ανιχνεύεται τμήμα γονιδιακού DNA μεγέθους 342bp.

➤ Εξώνιο 27

Το εξώνιο 27 του γονιδίου *COL17A1* έχει μέγεθος 36 ζευγών βάσεων (bp). Για τον πολλαπλασιασμό του εξωνίου χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές για τις δύο αλυσίδες, οι οποίοι συνδέονται σε τμήματα πλησίον του εξωνίου:

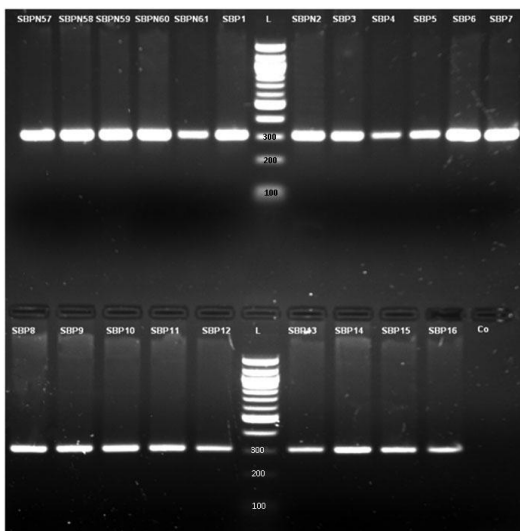
Exon27For: 5' – tga ggg tct gat gga cac ga - 3' (20 βάσεις)

Exon27Rev: 5' – tct tgg tcc agg tcc tgt gc - 3' (20 βάσεις)

Στην αλληλουχία του τμήματος του *COL17A1* που περιλαμβάνει το εξώνιο 27 που ακολουθεί, με κεφαλαία μαύρα γράμματα συμβολίζεται η αλληλουχία του εξωνίου 27, με μικρά μπλε γράμματα συμβολίζονται οι αλληλουχίες των γειτονικών εσωνίων, ενώ με μικρά κόκκινα γράμματα συμβολίζονται οι δύο περιοχές σύνδεσης των εκκινητών.

```
ggaggcctggggggacagtgagggtctgatggacacgacccacagcctatgcaggctgacaagtgcaagaggggaagaagaagtcag
gattgaggagcctgtcttcagagacagacattgcccttctggttgccctttagggcattttacaccaaggtgtccatttccttttag
GTGACAAAGGACCAGTGGGACCACCAGGACCCAAAG
gtatgccactcactgctgctctgtcattaccaggcctgctcactcctgggagccagatgggaccctcactgtagggctgagggtgca
caggacctggaccaagatctcattctaatccaacctctcagatagggaaactgaggcacaagaagggaacaaagcactaacatcac
a
```

Με τη χρήση της τεχνικής PCR, με τους προαναφερθέντες εκκινητές, πολλαπλασιάστηκε τμήμα DNA μεγέθους 306bp (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Εικόνα ηλεκτροφόρησης PCR του εξωνίου 27 του γονιδίου *COL17A1*. Ανιχνεύεται τμήμα γονιδιακού DNA μεγέθους 306bp.

➤ Εξώνιο 52

Το εξώνιο 52 του γονιδίου *COL17A1* έχει μέγεθος 390 ζευγών βάσεων (bp). Για τον πολλαπλασιασμό του εξωνίου χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές για τις δύο αλυσίδες, οι οποίοι συνδέονται σε τμήματα πλησίον του εξωνίου:

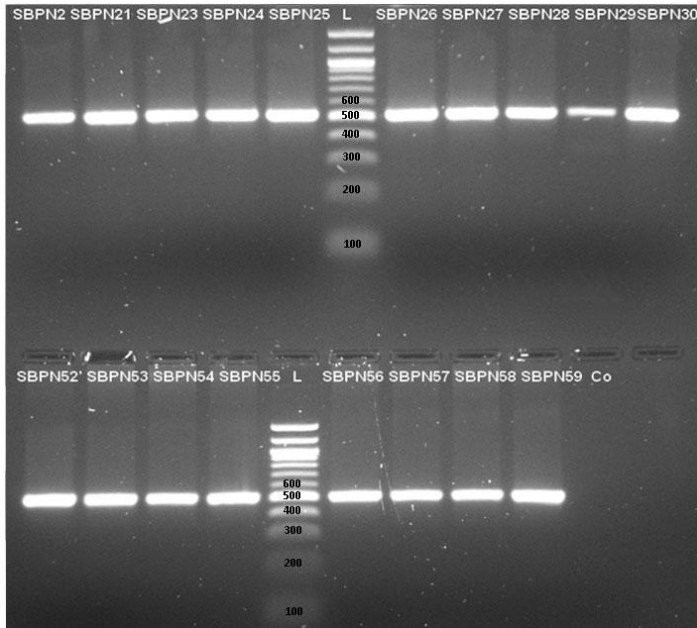
Exon52For: 5' – caa gtc ttt ctc tcc acc ga - 3' (20 βάσεις)

Exon52Rev: 5' – cca caa aca aga aag cca gt - 3' (20 βάσεις)

Στην αλληλουχία του τμήματος του *COL17A1* που περιλαμβάνει το εξώνιο 52 που ακολουθεί, με κεφαλαία μαύρα γράμματα συμβολίζεται η αλληλουχία του εξωνίου 52, με μικρά μπλε γράμματα συμβολίζονται οι αλληλουχίες των γειτονικών εσωνίων, ενώ με μικρά κόκκινα γράμματα συμβολίζονται οι δύο περιοχές σύνδεσης των εκκινητών.

```
cactggtgggtaagcccgtttccttccacacaaaattctcccactcgggtacaagaaccctgaagttcacttctggtctctcaggggc  
attgacaccctgggagagactccctaactccaagtcttctctccaccgagatctgagctcccactcatgcagcttctcacccctgcag  
GTCCTGATGTGCGCAGCTTCATTGTTGGCCCCCAGGCCCTCCTGGGCCGAGGGACCCCTGGGGAC  
AGCCGCCTCCTGTCCACGGATGCCTCCACAGTCGGGGTAGCAGCTCCTCCTCACACAGCTCATCTGTC  
AGGCGGGGCAGCTCCTACAGCTTTCATGAGCACAGGAGGAGGTGGTGCAGGCTCCCTGGGTGCAG  
GCGGTGCCTTTGGTGAAGCTGCAGGAGACAGGGTCCCTATGGCACTGACATCGGCCAGGCGGAGG  
CTATGGGGCAGCAGCAGAAGGCGGCATGTATGCTGGCAATGGCGGACTATTGGGAGCTGACTTTGCT  
GGAGATCTGGATTACAATGAGCTGGCTGTGAGGGTGTGAGAGAGCATGCAGC  
gtaagtggggacatttagccttggtgctgggggaaggagcgtgggagcatctccagactggcttctgtttgtggaacccccaggctg  
tgaagacagaatcaagcaggcaggggctggaggggacaggcagccccagcctagctctcagcctactcagcttaaggagccccagctcc  
t
```

Με τη χρήση της τεχνικής PCR, με τους προαναφερθέντες εκκινητές, πολλαπλασιάστηκε τμήμα DNA μεγέθους 526bp (εικόνα 23).



Εικόνα 23. Εικόνα ηλεκτροφόρησης PCR του εξωνίου 52 του γονιδίου *COL17A1*. Ανιχνεύεται τμήμα γονιδιακού DNA μεγέθους 526bp.

Ανάλυση παραλλαγών μήκους θραύσματος από ένζυμα περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP analysis)

Το 1984 αναπτύχθηκε μία τεχνική από τον Άγγλο επιστήμονα Alec Jeffreys, ο οποίος χρησιμοποίησε βακτηριακά ένζυμα για την ανάλυση γονιδιακού DNA. Τα ένζυμα αυτά αποτελούν τον αμυντικό μηχανισμό των βακτηρίων για την επιλεκτική διάσπαση του ξένου DNA που εισβάλλει σε αυτά. Ονομάζονται ενδονουκλεάσες περιορισμού και συμβολίζονται με γράμματα που αναφέρονται στον οργανισμό από τον οποίο προέρχονται. Συνδέονται σε περιοχές του DNA, αναγνωρίζοντας συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων. Αποτέλεσμα, είναι η διάσπαση δύο φωσφοδιεστερικών δεσμών, έναν σε κάθε αλυσίδα, προκαλώντας διατομή του μορίου DNA.

Στην παρούσα μελέτη, οι ενδονουκλεάσες περιορισμού χρησιμοποιήθηκαν για την γονοτύπηση των υπό μελέτη θέσεων παραλλαγής στα δείγματα.

Πειραματικό πρωτόκολλο μελέτης

➤ Εξώνιο 10

Για το εξώνιο 10 ανιχνεύεται παραλλαγή στην θέση c.734T>C(rs805708). Η παραλλαγή αφορά αλλαγή της θυμίνης (T) σε κυτοσίνη (C), η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση της μεθειονίνης (Met) από θρενονίνη (Thr). Σύμφωνα με την μέχρι τώρα βιβλιογραφία, η παραλλαγή αυτή δεν φαίνεται να είναι επιβλαβής, προκαλώντας κάποιο γενετικό νόσημα.

Στην αλληλουχία του τμήματος του *COL17A1* που περιλαμβάνει το εξώνιο 10 που ακολουθεί, με κεφαλαία μαύρα γράμματα συμβολίζεται η αλληλουχία του εξωνίου 10, ενώ έχει σημειωθεί με πράσινο χρώμα το σημείο αναγνώρισης και σύνδεσης του ενζύμου περιορισμού, που περιλαμβάνει την παραλλαγή.

```
ttcaccagctctgagatttcagatggaaactacccaggttctggactgagaaagttcctgaaatgtggggctttcaatgcccaccag  
gaaatcccagcaaatgaggtgactagattcccagcagggagtgtgattgtctctcactgggggtgtgcatgtgtctgtttccag  
TGTCAGGCACCTACGATGCAATGATCCTGGATGCCAACCTTCCCTCCCATGTGTGGTCTCCACCCTGCC  
CGCGGGGTCCTCCATGGGGACCTATCACAAACATGACAACCCAGAGCTCATCCCTCCTCAACACCA  
ATGCCTACTCTGCGGGATCAG  
gtacctggcgggcagcccacacctctctaccctgaactcggcatgcctctatcctggagctggatgacctcagaatgtttgccatcct  
cagggcctcctggagaggctttctgtggccaacatcccaggagattcccctggaactcagttcaattcaatctagaaggattg
```

Για την αναγνώριση της παραλλαγής rs805708 του εξωνίου 10, χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση BsrDI. Κατά την αναγνώριση της θυμίνης (T), το προϊόν των 342bp της PCR διατέμενεται σε δύο τμήματα των 220bp και 122bp. Παρουσία κυτοσίνης, το προϊόν της PCR παραμένει άπεπτο.

Χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο BsrDI από την εταιρεία New England Biolabs Inc[®]. Το ένζυμο αναγνωρίζει την ακολουθία:

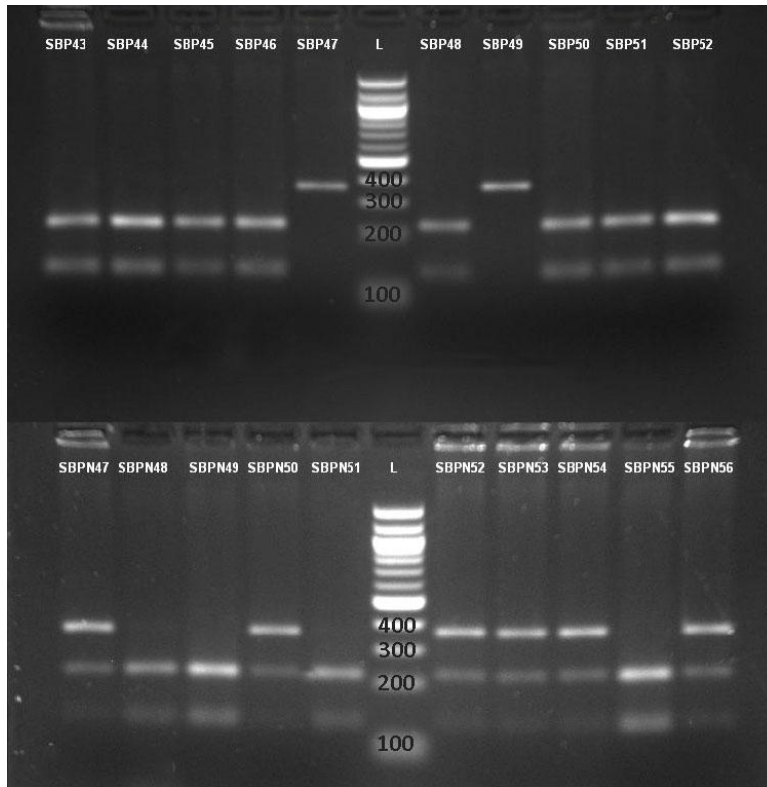


Πειραματική διαδικασία:

- Το μείγμα (master mix) για την διαδικασία της πέψης κάθε δείγματος δημιουργήθηκε σε μικροσωληνάρια erpendorfTM των 500μl.
- 2 IU (0.4μl) BsrDI
- 2 μl 10x NEBufferTM r3.1
- 8μl ενισχυμένου DNA
- 9.6μl H₂O
- Τελικός όγκος αντίδρασης 20μl
- Η πέψη πραγματοποιήθηκε στους 65°C. Η πέψη διήρκεσε 4 ώρες, σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του ενζύμου.
- Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2.5%, παρουσία μάρτυρα πρότυπων μοριακών βαρών.

Αποτέλεσμα την άνωθεν πειραματικής διαδικασίας, ήταν η εμφάνιση κατά την ηλεκτροφόρηση τμημάτων του ενισχυμένου DNA, σύμφωνα με τα παρακάτω:

Προϊόν PCR + BsrDI	Αποτέλεσμα
Τμήμα 342bp	CC – ομοζυγώτης μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου
Τμήματα 220bp + 122 bp	TT – ομοζυγώτης αγρίου τύπου αλληλομόρφου
Τμήματα 342bp + 220bp + 122bp	T/C – ετεροζυγώτης



Εικόνα 24. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης του εξωνίου 10 του γονιδίου *COL17A1* μετά από επώαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση *BsrDI*. Αναγνωρίζονται 3 πρότυπα πέψης: α) 2 τμήματα των 220 και 122kDa (TT – ομοζυγώτες αγρίου τύπου αλληλομόρφου), β) 1 τμήμα των 342kDa (CC – ομοζυγώτης μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου) και γ) 3 τμήματα των 342, 220 και 122kDa (T/C – ετεροζυγώτης).

➤ Εξώνιο 27

Για το εξώνιο 27 ανιχνεύεται παραλλαγή στην θέση c.2212G>A(rs805722). Η παραλλαγή αφορά αλλαγή της γουανίνης (G) σε αδενίνη (A), η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση της βαλίνης (Val) από μεθειονίνη (Met). Σύμφωνα με την μέχρι τώρα βιβλιογραφία, η παραλλαγή αυτή δεν φαίνεται να είναι επιβλαβής, προκαλώντας κάποιο γενετικό νόσημα.

Στην αλληλουχία του τμήματος του *COL17A1* που περιλαμβάνει το εξώνιο 27 που ακολουθεί, με κεφαλαία μαύρα γράμματα συμβολίζεται η αλληλουχία του εξωνίου 27, ενώ έχει σημειωθεί με πράσινο χρώμα το σημείο αναγνώρισης και σύνδεσης του ενζύμου περιορισμού, που περιλαμβάνει την παραλλαγή.

```
ggaggcctggggggacagtgagggtctgatggacacgacccacagcctatgcaggctgacaagtgcaagagggaagaagaagtcag
gattgagggagcctgtcttcagagacagacattgcccttctctggtgtccctttagggcattttacaccaaggtgtccatttccttttag
GTGACAAAGGACCAGTGGGACCACCAGGACCCAAAG
gtatgccactcactgctgctctgtcattaccagggcctgcctcactcctgggagccagatgggaccctcactgtagggctctgagggtgca
caggacctggaccaagatctcattctaatacctctcagatagggaaactgaggcacaagaagggaacaagcactaacatcac
a
```

Για την αναγνώριση της παραλλαγής rs805722 του εξωνίου 27, χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση BsrI. Κατά την αναγνώριση της γουανίνης (G), το προϊόν των 306bp της PCR διατέμνεται σε δύο τμήματα των 173bp και 133bp. Παρουσία αδενίνης (A), το προϊόν της PCR παραμένει άπεπτο.

Χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο BsrI από την εταιρεία New England Biolabs Inc[®]. Το ένζυμο αναγνωρίζει την ακολουθία:



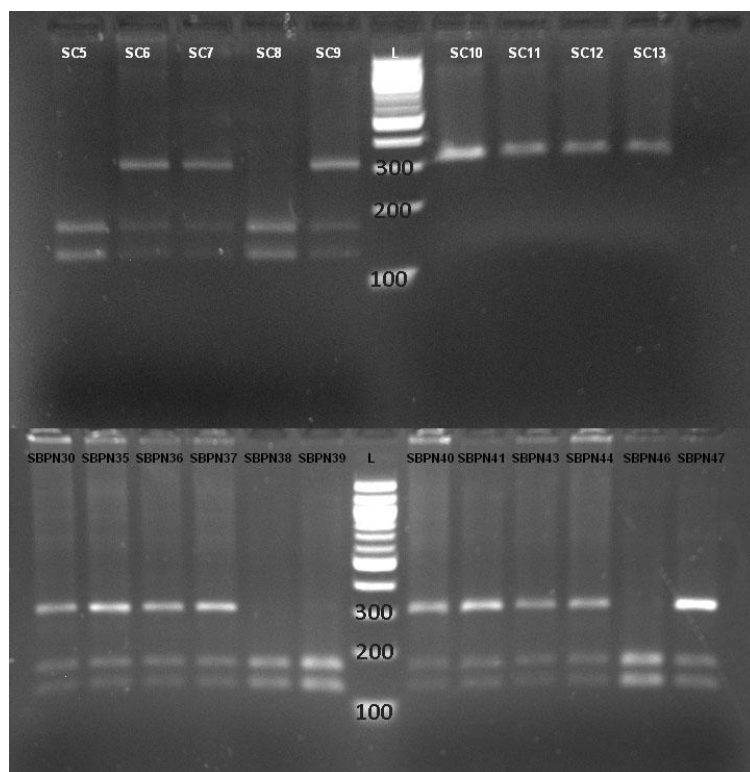
Πειραματική διαδικασία:

- Το μείγμα (master mix) για την διαδικασία της πέψης κάθε δείγματος δημιουργήθηκε σε μικροσωληνάρια erpendorfTM των 500μl.
- 2 IU (0.4μl) BsrI
- 2 μl 10x NEBufferTM r3.1
- 8μl ενισχυμένου DNA

- 9.6μl H₂O
- Τελικός όγκος αντίδρασης 20μl
- Η πέψη πραγματοποιήθηκε στους 65°C. Η πέψη διήρκεσε 4 ώρες, σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του ενζύμου.
- Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2.5%, παρουσία μάρτυρα πρότυπων μοριακών βαρών.

Αποτέλεσμα την άνωθεν πειραματικής διαδικασίας, ήταν η εμφάνιση κατά την ηλεκτροφόρηση τμημάτων του ενισχυμένου DNA, σύμφωνα με τα παρακάτω:

Προϊόν PCR + BsrI	Αποτέλεσμα
Τμήμα 306bp	AA – ομοζυγώτης μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου
Τμήματα 173bp + 133 bp	GG – ομοζυγώτης αγρίου τύπου αλληλομόρφου
Τμήματα 306bp + 173bp + 133bp	G/A – ετεροζυγώτης



Εικόνα 25. Ηλεκτροφόρηση προ-ϊόντων πέψης του εξωνίου 27 του γονιδίου *COL17A1* μετά από επώαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση BsrI. Αναγνωρίζονται 3 πρότυπα πέψης: α) 2 τμήματα των 173 και 133kDa (GG – ομοζυγώτες αγρίου τύπου αλληλομόρφου), β) 1 τμήμα των 306kDa (AA – ομοζυγώτης μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου) και γ) 3 τμήματα των 306, 173 και 133kDa (G/A – ετεροζυγώτης).

➤ Εξώνιο 52

Για το εξώνιο 52 ανιχνεύεται παραλλαγή στην θέση c.4214A>G(rs17116350). Η παραλλαγή αφορά αλλαγή της αδενίνης (A) σε γουανίνη (G), η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση της ασπαραγίνης (Asp) από γλυκίνη (Gly). Σύμφωνα με την μέχρι τώρα βιβλιογραφία, η παραλλαγή αυτή δεν φαίνεται να είναι επιβλαβής, προκαλώντας κάποιο γενετικό νόσημα.

Στην αλληλουχία του τμήματος του *COL17A1* που περιλαμβάνει το εξώνιο 52 που ακολουθεί, με κεφαλαία μαύρα γράμματα συμβολίζεται η αλληλουχία του εξωνίου 52, ενώ έχει σημειωθεί με πράσινο χρώμα το σημείο αναγνώρισης και σύνδεσης του ενζύμου περιορισμού, που περιλαμβάνει την παραλλαγή.

```
cactggtgggtaagcccgtttcctccacaccaaatttcccactcgggtacaagaacctgaagttcacttctggtctctcaggggc  
attgacaccctgggagagactccctaactccaagtccttctctccacggagatctgagctcccactcatgcagcttctcacccctgcag  
GTCCTGATGTGCGCAGCTTCATTGTTGGCCCCCAGGCCCTCCTGGGCCGCAGGGACCCCCTGGGGAC  
AGCCGCCTCCTGTCCACGGATGCCTCCACAGTCGGGGTAGCAGCTCCTCCTCACACAGCTCATCTGTC  
AGGCGGGGCAGCTCCTACAGCTTTCATGAGCACAGGAGGAGGTGGTGCAGGCTCCCTGGGTGCAG  
GCGGTGCCTTTGGTGAAGCTGCAGGAGACAGGGGTCCCTATGGCACTGACATCGGCCCAGGCGGAGG  
CTATGGGGCAGCAGCAGAAGGCGGCATGTATGCTGGCAATGGCGGACTATTGGGAGCTGACTTTGCT  
GGAGATCTGGATTACAATGAGCTGGCTGTGAGGGTGTGAGAGAGCATGCAGC  
gtaagtggggacatttagccttgggtgctggggggaaggagcgtgggagcatctccagactggccttctgtttgtggaacccccaggctg  
tgaagacagaatcaagcagggcaggggctggaggggacaggcagccccagcctagctctcagcctactcagcttaaggagccccagtc  
t
```

Για την αναγνώριση της παραλλαγής rs17116350 του εξωνίου 52, χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση BgIII. Κατά την αναγνώριση της αδενίνης (A), το προϊόν των 526bp της PCR διατέμνεται σε δύο τμήματα των 399bp και 127bp. Παρουσία γουανίνης (G), το προϊόν της PCR παραμένει άπεπτο.

Χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο BgIII από την εταιρεία New England Biolabs Inc®. Το ένζυμο αναγνωρίζει την ακολουθία:

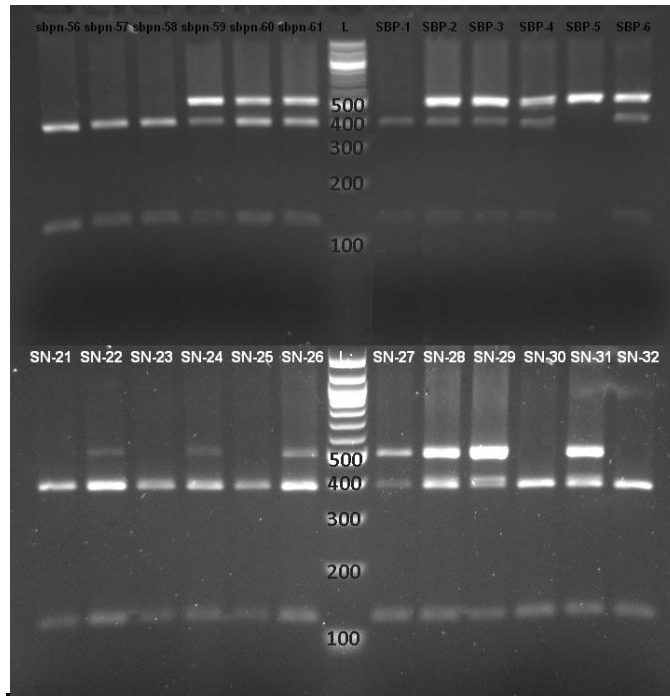


Πειραματική διαδικασία:

- Το μείγμα (master mix) για την διαδικασία της πέψης κάθε δείγματος δημιουργήθηκε σε μικροσωληνάρια erpendorf™ των 500μl.
- 2 IU BglIII
- 2 μl 10x NEBuffer™ r3.1
- 8μl ενισχυμένου DNA
- 9.6μl H₂O
- Τελικός όγκος αντίδρασης 20μl
- Η πέψη πραγματοποιήθηκε στους 37°C. Η πέψη διήρκεσε 4 ώρες, σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του ενζύμου.
- Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2.5%, παρουσία μάρτυρα πρότυπων μοριακών βαρών.

Αποτέλεσμα την άνωθεν πειραματικής διαδικασίας, ήταν η εμφάνιση κατά την ηλεκτροφόρηση τμημάτων του ενισχυμένου DNA, σύμφωνα με τα παρακάτω:

Προϊόν PCR + BglIII	Αποτέλεσμα
Τμήμα 526bp	GG – ομοζυγώτης μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου
Τμήματα 399bp + 127 bp	AA – ομοζυγώτης αγρίου τύπου αλληλομόρφου
Τμήματα 526bp + 399bp + 127bp	A/G – ετεροζυγώτης



Εικόνα 26. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης του εξωνίου 52 του γονιδίου *COL17A1* μετά από επώαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση BglII. Αναγνωρίζονται 3 πρότυπα πέψης: α) 2 τμήματα των 399 και 127kDa (AA – ομοζυγώτες αγρίου τύπου αλληλομόρφου), β) 1 τμήμα των 526kDa (GG – ομοζυγώτης μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου) και γ) 3 τμήματα των 526, 399 και 127kDa (A/G – ετεροζυγώτης).

Ανοσοαποτύπωση (Immunoblotting ή Western Blot)

Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (western blot – WB) είναι μία τεχνική της Μοριακής Βιολογίας και Ανοσογενετικής με την οποία επιτυγχάνεται η ανίχνευση πρωτεΐνης – στόχου με την χρήση των κατάλληλων αντισωμάτων. Η μέθοδος περιλαμβάνει την ηλεκτροφορητική ανάλυση του δείγματος σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και τέλος τη δέσμευση των ειδικών αντισωμάτων (πρωτοταγή αντισώματα) στο αντιγόνο και των μη ειδικών – σημασμένων αντισωμάτων (δευτεροταγή αντισώματα) στα άνω ειδικά αντισώματα. Το πρώτο και πολύ σημαντικό βήμα της διαδικασίας, είναι το στάδιο «μπλοκαρίσματος» (Blocking) της μεμβράνης κατά το οποίο δεσμεύονται οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης της μεμβράνης (θέσεις στις οποίες δεσμεύονται τα πρωτοταγή αντισώματα, χωρίς να υπάρχει το αντίστοιχο αντιγόνο), ώστε να αποφευχθεί το ψευδώς θετικό αποτέλεσμα, ο επονομαζόμενος «θόρυβος», στην τελική μεμβράνη.

Πειραματική διαδικασία – προετοιμασία WB

Στην παρούσα μελέτη, η τεχνική του WB χρησιμοποιήθηκε για την ανεύρεση νέων αντιγονικών επιτόπων σε ασθενείς που πάσχουν από πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευροεκφυλιστικά νοσήματα, όπου η τεχνική της ELISA ήταν αρνητική για τις δύο συνήθεις πρωτεΐνες – στόχους (BP180, BP 230). Είναι μία πολύπλοκη τεχνική, για την περάτωση της οποίας χρειάζεται να προηγηθούν συγκεκριμένες πειραματικές διαδικασίες.

Η διαδικασία αρχίζει πολλά βήματα πριν, με την εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών του δέρματος από δότες ιστοτεμαχίου που δεν φέρουν δερματικές βλάβες. Τα δείγματα των φυσιολογικών ιστών λήφθηκαν από ασθενείς του τμήματος Πλαστικής Χειρουργικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, αφού υπέγραψαν την σχετική συγκατάθεση. Με τη λήψη του δείγματος, ακολούθησε άμεσα η διαδικασία του διαχωρισμού του δέρματος από την επιδερμίδα, μέσω της τεχνικής του salt-split.

Για την τεχνική του διαχωρισμού δέρματος – επιδερμίδας (salt split), πραγματοποιήθηκε άμεση τοποθέτηση του ιστοτεμαχίου, μετά τη λήψη του, σε σωληνάριο τύπου falcon των 50ml. Το σωληνάριο περιείχε το διάλυμα του salt split (η ποσότητα εξαρτάται από το μέγεθος του δείγματος ιστού). Το δείγμα επώαζεται για 4-5 ημέρες στους 4°C.

Για 30ml διαλύματος διαχωρισμού:

- 1.75gr NaCl
- 300μl EDTA 0.5M
- 300μl PMSF 0.1M
- Σε 30ml PBS

Αφού αφαιρέθηκε η επιδερμίδα, πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση των πρωτεϊνών από το τμήμα του δέρματος. Μετά το πέρας των 4-5 ημερών επώασης, το δείγμα του ιστού είναι έτοιμο για το διαχωρισμό του δέρματος από την επιδερμίδα.

Το δείγμα τοποθετήθηκε με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας σε τρυβλίο petri το οποίο περιείχε PBS, ώστε να καλυφθεί πλήρως. Με την χρήση δύο αποστειρωμένων λαβίδων επιτεύχθηκε ο πλήρης διαχωρισμός του δέρματος από την επιδερμίδα. Το κομμάτι του δέρματος τεμαχίστηκε σε τμήματα των 2x2εκ. και κάθε τμήμα τοποθετήθηκε στην συσκευή εκχύλισης (αυτοσχέδια κατασκευή από plexiglass, εικόνα 27). Η διαδικασία της εκχύλισης περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Τοποθέτηση 500μl διαλύματος Buffer A στη συσκευή εκχύλισης για 10', σε θερμοκρασία δωματίου (RT).

Διάλυμα Buffer A:

- 125μl Tris 1M, pH: 6.8
- 2.424gr ουρίας (4M)
- 100μl EDTA 0.5M
- 100μl PMSF 0.1M
- Σε 10ml απεσταγμένου ύδατος

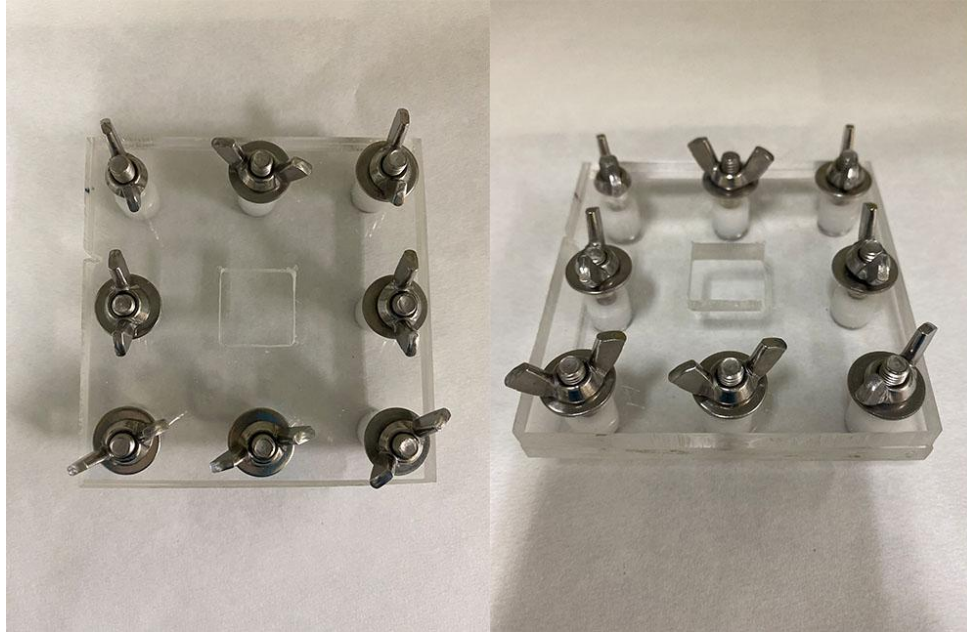
2. Απόρριψη του διαλύματος Buffer A και τοποθέτηση 350μl διαλύματος Buffer B για 1 ώρα εντός του απαγωγού.

Διάλυμα Buffer B:

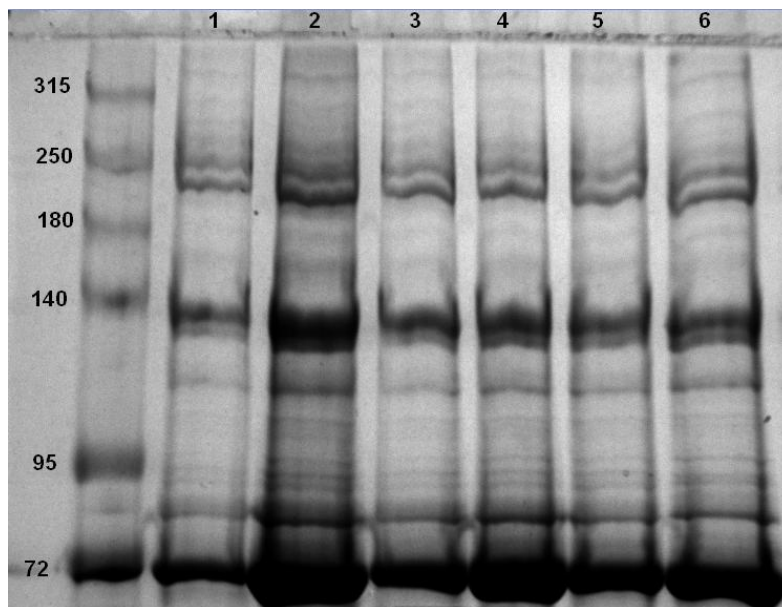
- 125μl Tris 1M, pH: 6.8
- 5.454gr ουρίας (9M)
- 100μl EDTA 0.5M
- 100μl PMSF 0.1M
- 2ml διαλύματος SDS 10%
- 1ml β-Mercaptoethanol 10%
- 6.6ml Απεσταγμένο ύδωρ (τελικός όγκος διαλύματος 10ml)

3. Συλλογή του διαλύματος Buffer B, το οποίο αποτελεί πλέον το εκχύλισμα των πρωτεϊνών (dermal extract) (εικόνα 28).

4. Φύλαξη του διαλύματος στους -80°C.



Εικόνα 27. Συσκευή εκχύλισης πρωτεϊνών από επιφάνεια δέρματος, μετά το διαχωρισμό του από την επιδερμίδα. Αυτοσχέδια κατασκευή από plexiglass.



Εικόνα 28. Εικόνα ηλεκτροφορητικού προτύπου εκχυλίσματος πρωτεϊνών συνοχής δέρματος – επιδερμίδας (dermal extract) σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 6%.

Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα που απομονώθηκε (dermal extract), ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE), ώστε να γίνει ο έλεγχος για την παρουσία πρωτεϊνών με μοριακά βάρη που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες συνοχής δέρματος – επιδερμίδας. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με σύγκριση με γνωστά πρότυπα βάσει της σχετικής βιβλιογραφίας. Η ηλεκτροφόρηση διενεργήθηκε σε συσκευή Mini-PROTEAN® Tetra Cell της εταιρείας BIORAD™.

Τελικό στάδιο για την προετοιμασία της WB, αποτελεί η ηλεκτρομεταφορά του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Mini Trans-Blot® Cell Assembly της εταιρείας BIORAD™. Με το τέλος της διαδικασίας, το πρωτεϊνικό εκχύλισμα είχε μεταφερθεί στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η οποία φυλάχθηκε στους 4°C, ενώ έχει «διάρκεια ζωής» έως και 4 μήνες. Η μεμβράνη αυτή, κόπηκε σε μικρότερες λωρίδες (strips) κάθε μία από τις οποίες επώαστηκε με τον ορό διαφορετικού ασθενούς.

Πειραματική διαδικασία – WB

Για την διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης, ως πρωτοταγή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν οι οροί ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευροεκφυλιστικά νοσήματα. Για την διαδικασία, ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

1. Επώαση της μεμβράνης – strip με 1ml διαλύματος «μπλοκαρίσματος» (Blocking Buffer) και τοποθέτηση σε πλατφόρμα ανακίνησης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (RT).

Διάλυμα μπλοκαρίσματος (Blocking Buffer):

- 5% w/v αποβουτυρωμένο γάλα (skimmed milk)
- 1% w/v BSA
- 0.1% v/v Tween 20
- 0.5mmol/L CaCl₂
- Σε διάλυμα 20mM Tris-Buffered Saline (TBS), pH 7.5

2. Απομάκρυνση του διαλύματος «μπλοκαρίσματος» και προσθήκη 1ml διαλύματος πλύσης για 5 λεπτά στην ανακινούμενη πλατφόρμα, σε θερμοκρασία δωματίου (RT).

Διάλυμα πλύσης:

- 0.1% w/v Tween 20
- 0.5mmol/L CaCl₂
- Σε διάλυμα 20mM Tris-Buffered Saline (TBS), pH 7.5

3. Προετοιμασία πρωτοταγούς αντισώματος: ο ορός κάθε ασθενούς εξετάστηκε με δύο διαφορετικές αραιώσεις (1:50 και 1:100) σε διάλυμα Blocking Buffer για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας του αποτελέσματος.
4. Επώαση της μεμβράνης με 1ml από το διάλυμα του πρωτοταγούς αντισώματος για μία νύχτα (overnight) στους 4°C στην πλατφόρμα ανακίνησης. Το αντίσωμα προσδένεται ειδικά στην πρωτεΐνη που φέρει τον κατάλληλο επίτοπο.
5. Απομάκρυνση του πρωτοταγούς αντισώματος και πλύση της μεμβράνης (strips) με το διάλυμα πλύσης. Η μεμβράνη αφέθηκε στο διάλυμα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT) στην πλατφόρμα ανακίνησης. Το διάλυμα πλύσης ανανεώθηκε 2 φορές στο διάστημα των 15 λεπτών. Με αυτό τον τρόπο απομακρύνεται η επιπλέον ποσότητα του αντισώματος, για να αποφευχθεί η εμφάνιση μη ειδικού σήματος στα παρακάτω στάδια.
6. Προετοιμασία δευτεροταγούς αντισώματος: χρησιμοποιήθηκε το μη ειδικό αντίσωμα Anti-Human IgG (Fc specific)–Alkaline Phosphatase antibody produced in goat της εταιρείας Sigma-Aldrich® Solutions. Η αραιώση του δευτεροταγούς έγινε στο 1:40.000.

Διάλυμα αραιώσης:

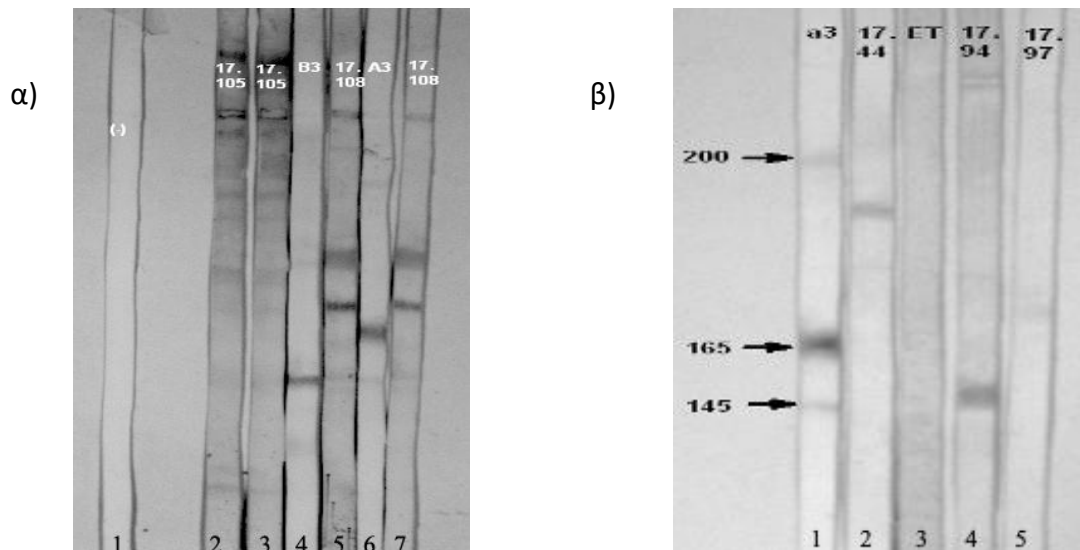
- 0.1% w/v Tween 20
 - 5% w/v αποβουτυρωμένο γάλα (skimmed milk)
 - Σε διάλυμα 20mM Tris-Buffered Saline (TBS), pH 7.5
7. Επώαση της μεμβράνης με το διάλυμα του δευτεροταγούς αντισώματος για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (RT) στην πλατφόρμα ανακίνησης. Το κάθε μη ειδικό αντι-αντίσωμα προσδένεται ειδικά στη σταθερή περιοχή των ειδικών αντισωμάτων.
 8. Απομάκρυνση του διαλύματος του δευτεροταγούς αντισώματος και πλύση της μεμβράνης. Η μεμβράνη αφέθηκε στο διάλυμα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT) στην πλατφόρμα ανακίνησης. Το διάλυμα πλύσης ανανεώθηκε 2 φορές στο διάστημα των 15 λεπτών. Με τον τρόπο αυτό απομακρύνεται η επιπλέον ποσότητα του αντισώματος, για να αποφευχθεί η εμφάνιση μη ειδικού σήματος στα παρακάτω στάδια.
 9. Εμφάνιση του ανοσοαποτυπώματος με τη χρήση του υποστρώματος NBT (nitro-blue tetrazolium chloride) / BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt) το οποίο αντιδρά με την αλκαλική φωσφατάση, ένζυμο συνδεδεμένο στο δευτεροταγές αντίσωμα, αποδίδοντας ένα μαύρο-ιώδες χρώμα.

10. Επώαση με 1ml διαλύματος χρωμογόνου μέχρι την τελική εμφάνιση ζωνών, στην πλατφόρμα ανακίνησης. Η χρήση του χρωμογόνου αποτελεί μια φωτοευαίσθητη διαδικασία και για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε σε σκιερό περιβάλλον. Η διαδικασία της επώασης με το χρωμογόνο διήρκεσε από 10 έως 20 λεπτά. Οι ζώνες που εμφανίστηκαν αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν με τα ειδικά αντισώματα.

Διάλυμα χρωμογόνου ανίχνευσης:

- 2% v/v χρωμογόνο NBT (nitro-blue tetrazolium chloride) / BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt)
- Σε διάλυμα 20mM Tris-Buffered Saline (TBS), pH 9.5

Μετά το πέρας της διαδικασίας, αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματα, ξεχωριστά για το κάθε δείγμα – ορό ασθενούς.



Εικόνα 29. Παραδείγματα αποτελέσματος ανοσοαποτύπωσης Western Blot σε ασθενείς που πάσχουν από πομφολυγώδες pemfigοειδές. α) Θέση 1 αρνητικό δείγμα (control). Θέση 2,3: δείγμα ορού ασθενούς σε αραιώση 1:50 και 1:100 αντίστοιχα. Θέση 5,7: δείγμα ορού ασθενούς σε αραιώση 1:50 και 1:100 αντίστοιχα. Θέση 4,6: αντίσωμα έναντι της λαμινίνης 332, υπομονάδες B3 και A3 αντίστοιχα. β) Θέση 1: αντίσωμα έναντι λαμινίνης 332 υπομονάδα A3. Θέση 2-5: δείγμα ορού ασθενών σε αραιώση 1:50.

Το WB αποτελεί μία ποιοτική μέθοδο ανίχνευσης, η οποία μας δίνει ενδείξεις για την παρουσία αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών σύμφωνα με τα μοριακά βάρη των ζωνών που ανιχνεύονται, χωρίς να γίνεται απόλυτη ταυτοποίηση. Επομένως, αποτελεί ένδειξη αποτελέσματος και όχι απόδειξη.

Προγράμματα

Η συγγραφή της εργασίας έγινε σε πρόγραμμα Microsoft® Office Word 2007 Enterprise (v. 12.0.4518.1014), ενώ για την διαχείριση της βιβλιογραφίας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Endnote™ 20 (bld 14672) της εταιρείας Clarivate™.

Για την καταγραφή και ταξινόμηση των δεδομένων και ευρημάτων της μελέτης, καθώς και τον υπολογισμό βασικών στατιστικών παραμέτρων, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Microsoft® Office Excel 2007 Enterprise (v. 12.0.4518.1014).

Για την δημιουργία εικόνων και σχεδιαγραμμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Adobe® Photoshop 2020 (v. 21.0.2).

Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν η γλώσσα προγραμματισμού R (v. 4.3.0), καθώς και το πρόγραμμα Microsoft® Office Excel® 2007 (έκδοση 12.0.4518.1014).

Χρησιμοποιήθηκε η **δοκιμασία χ^2** , καθώς το δείγμα ήταν τυχαίο και οι μεταβλητές που μελετήθηκαν, ήταν αφενός ποιοτικές (παρουσία ή μη των μεταλλάξεων) και αφετέρου μη συσχετιζόμενες μεταξύ τους (η ύπαρξη παραλλαγής σε ένα από τα εξώνια, είναι ανεξάρτητη από την ύπαρξη παραλλαγών στα υπόλοιπα). Αφού ορίστηκε η μηδενική υπόθεση ότι «τα ποσοστά μεταξύ των ομάδων ελέγχου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους», υπολογίστηκε για κάθε συσχέτιση η τιμή χ^2 , από την οποία υπολογίστηκε με τη σειρά της η τιμή P value. Ως κρίσιμη τιμή P, ορίστηκε το 0.05, δηλαδή η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε ως P value μικρότερη του 0.05. Εάν αντίθετα, η P value ήταν μεγαλύτερη του 0.05, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Υπολογίστηκε ο **λόγος απόδοσης (odds ratio – OR)** για διάστημα εμπιστοσύνης (confidence interval CI) 95% για τον έλεγχο της πιθανής συσχέτισης μεταξύ των παραλλαγών που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή και της εμφάνισης πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς ή/και νευροεκφυλιστικού νοσήματος.

Ελέγχθηκε εάν ισχύει η **ισορροπία / νόμος Hardy-Weinberg** για την κάθε ομάδα ελέγχου σε κάθε υπό μελέτη παραλλαγή. Ως κρίσιμη τιμή P, ορίστηκε το 0.05. Για τιμή $P > 0.05$, ο υπό μελέτη πληθυσμός βρίσκεται σε ισορροπία. Η ισορροπία Hardy-Weinberg (HW) περιγράφει την κληρονομικότητα των αυτοσωμικών αλληλομόρφων από γενιά σε γενιά. Οι συχνότητες εμφάνισης ομοζυγωτών και ετεροζυγωτών μεταξύ των γενεών παραμένουν σταθερές, εφόσον δεν υπάρχουν παράγοντες που να τις επηρεάζουν, όπως νέες μεταλλάξεις, η φυσική επιλογή, η κατευθυνόμενη επιλογή συντρόφου, κ.ά.

Στις επιδημιολογικές μελέτες ελέγχεται η ισχύς της ισορροπίας HW στις ομάδες ελέγχου των υγιών μαρτύρων, προς αποκλεισμό παραγόντων που επηρεάζουν την συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων. Στις περιπτώσεις όπου η ομάδα ελέγχου ακολουθεί την ισορροπία, ενώ η ομάδα μελέτης – ασθενών δεν την ακολουθεί, το φαινόμενο μπορεί να εξηγηθεί από πραγματική συσχέτιση μεταξύ του γονιδίου και της νόσου. Αντίθετα, στις περιπτώσεις όπου καμία από τις δύο ομάδες δεν ακολουθεί την ισορροπία, πιθανώς να εξηγείται είτε από παράγοντες που επηρεάζουν την κληρονόμηση του γονιδίου, είτε από τεχνικά θέματα όπως η επιλογή του δείγματος, ή και τεχνικά θέματα κατά τη γονοτύπηση (266).

Υπολογισμός ισορροπίας Hardy – Weinberg

Για κάθε ομάδα της μελέτης και για κάθε παραλλαγή χωριστά, υπολογίστηκε η ισορροπία Hardy – Weinberg (HW), για να ελεγχθεί το κατά πόσο οι συχνότητες των αλληλομόρφων, ακολουθούν το νόμο αυτό. Για κάθε υποομάδα, υπολογίστηκε η τιμή χ^2 και από αυτήν η τιμή P Value, η οποία συγκρίθηκε με την τιμή $P=0.05$. Για τιμές P value > 0.05 , ισχύει η ισορροπία/νόμος HW, ενώ για τις τιμές P value < 0.05 η ισορροπία δεν ισχύει.

Πίνακας 07. Υπολογισμός της ισορροπίας Hardy – Weinberg για κάθε παραλλαγή στις ομάδες μελέτης.

Ομάδα ελέγχου	Παραλλαγή	χ^2	P value	Νόμος HW
BPN	rs805708	0.78354	0.67586	Ισχύει
BPN	rs805722	2.07958	0.35353	Ισχύει
BPN	rs17116350	0.10487	0.94892	Ισχύει
BP	rs805708	2.70856	0.25813	Ισχύει
BP	rs805722	4.21804	0.12136	Ισχύει
BP	rs17116350	7.10861	0.0286	Δεν ισχύει
N	rs805708	0.76135	0.6834	Ισχύει
N	rs805722	0.01337	0.99334	Ισχύει
N	rs17116350	0.57583	0.74983	Ισχύει
C	rs805708	0.8190933	0.66395	Ισχύει
C	rs805722	8.60635	0.01353	Δεν ισχύει
C	rs17116350	4.31393642	0.11568	Ισχύει

Αποτελέσματα

Ομάδα ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευρολογικά νοσήματα (BPN)

Στην ομάδα συμπεριλήφθηκαν 61 ασθενείς, 28 άνδρες και 33 γυναίκες. Πραγματοποιήθηκε γονοτυπική μελέτη των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του γονιδίου *COL17A1* στα εξώνια 10, 27 και 52 αντίστοιχα. Με την χρήση των κατάλληλων περιοριστικών ενδονουκλεασών ανευρέθη η αλληλουχία στις θέσεις: εξώνιο 10-θέση 734T>C, εξώνιο 27-θέση 2212G>A και εξώνιο 52-θέση 4214A>G. Στον πίνακα που ακολουθεί, αναγράφονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης:

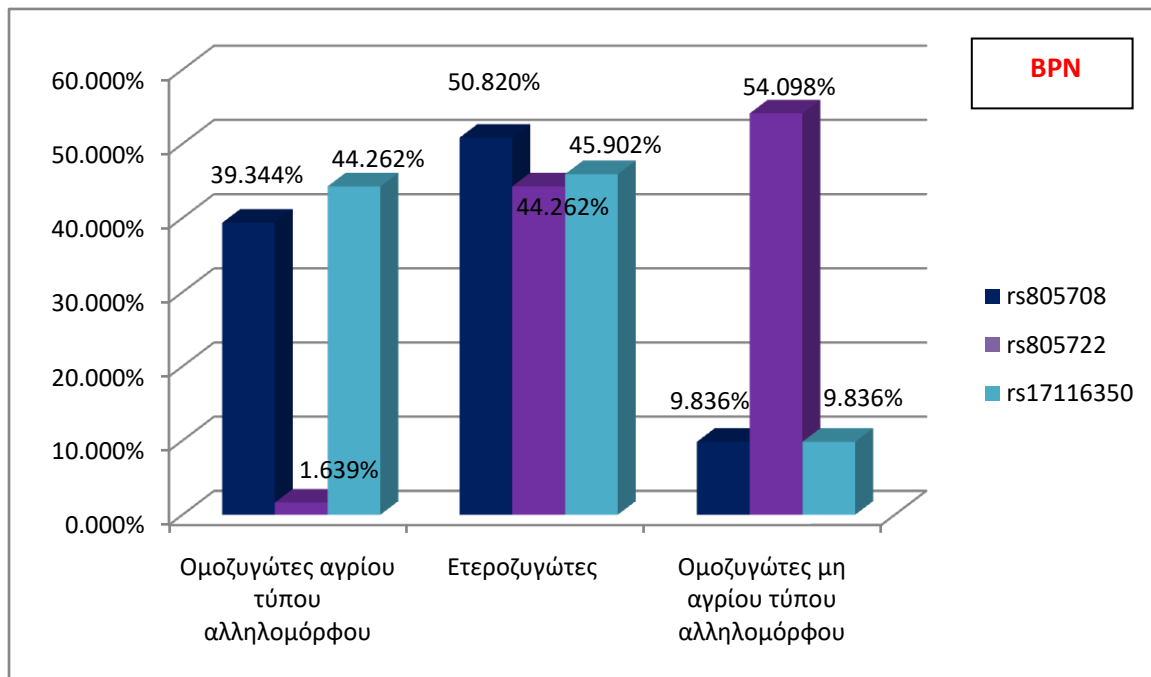
Ασθενείς	Φύλο	Ηλικία	rs805708	rs805722	rs17116350
BPN-01	A	62	T/C	G/A	AA
BPN-02	Γ	86	T/C	G/A	AA
BPN-03	Γ	76	TT	AA	GG
BPN-04	Γ	83	CC	G/A	A/G
BPN-05	Γ	83	TT	AA	A/G
BPN-06	Γ	18	T/C	AA	A/G
BPN-07	Γ	77	TT	AA	A/G
BPN-08	Γ	69	TT	AA	GG
BPN-09	A	78	T/C	G/A	AA
BPN-10	Γ	75	T/C	G/A	AA
BPN-11	Γ	85	T/C	AA	AA
BPN-12	A	85	TT	AA	AA
BPN-13	Γ	86	T/C	G/A	A/G
BPN-14	Γ	86	TT	AA	AA
BPN-15	A	73	TT	AA	AA
BPN-16	A	74	T/C	G/A	A/G
BPN-17	A	75	T/C	G/A	A/G
BPN-18	A	79	TT	AA	A/G
BPN-19	Γ	85	T/C	G/A	AA
BPN-20	Γ	85	TT	AA	A/G
BPN-21	A	79	TT	AA	A/G
BPN-22	Γ	76	TT	AA	A/G
BPN-23	Γ	81	T/C	G/A	A/G
BPN-24	A	83	T/C	G/A	AA
BPN-25	Γ	85	TT	AA	AA
BPN-26	Γ	81	T/C	G/A	GG
BPN-27	Γ	80	TT	AA	A/G

BPN-28	Γ	89	ΤΤ	ΑΑ	GG
BPN-29	A	82	T/C	ΑΑ	A/G
BPN-30	A	74	T/C	G/A	A/G
BPN-31	Γ	71	ΤΤ	ΑΑ	ΑΑ
BPN-32	Γ	78	T/C	G/A	ΑΑ
BPN-33	Γ	75	T/C	ΑΑ	ΑΑ
BPN-34	A	80	T/C	G/A	A/G
BPN-35	Γ	79	ΤΤ	ΑΑ	A/G
BPN-36	A	83	ΤΤ	ΑΑ	ΑΑ
BPN-37	A	70	T/C	ΑΑ	ΑΑ
BPN-38	A	75	T/C	G/A	A/G
BPN-39	Γ	82	T/C	ΑΑ	ΑΑ
BPN-40	A	86	CC	GG	ΑΑ
BPN-41	A	84	ΤΤ	ΑΑ	A/G
BPN-42	A	74	T/C	ΑΑ	A/G
BPN-43	Γ	82	T/C	G/A	ΑΑ
BPN-44	A	81	CC	G/A	A/G
BPN-45	Γ	76	ΤΤ	ΑΑ	ΑΑ
BPN-46	A	81	CC	G/A	ΑΑ
BPN-47	A	69	T/C	G/A	ΑΑ
BPN-48	A	78	ΤΤ	ΑΑ	A/G
BPN-49	Γ	82	T/C	G/A	ΑΑ
BPN-50	A	73	T/C	G/A	GG
BPN-51	A	73	ΤΤ	ΑΑ	A/G
BPN-52	Γ	86	T/C	G/A	ΑΑ
BPN-53	Γ	82	ΤΤ	ΑΑ	A/G
BPN-54	A	79	T/C	G/A	A/G
BPN-55	Γ	89	ΤΤ	ΑΑ	A/G
BPN-56	Γ	80	T/C	G/A	ΑΑ
BPN-57	A	86	ΤΤ	ΑΑ	GG
BPN-58	Γ	86	T/C	ΑΑ	ΑΑ
BPN-59	Γ	67	CC	ΑΑ	ΑΑ
BPN-60	A	82	CC	G/A	A/G
BPN-61	A	37	T/C	G/A	A/G

Από την ανάλυση για την παραλλαγή rs805708 ταυτοποιήθηκαν 24 ομοζυγώτες αγρίου τύπου αλληλομόρφου – ΤΤ, 31 ετεροζυγώτες – TC και 6 ομοζυγώτες μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου – CC. Τα αντίστοιχα ποσοστά υπολογίστηκαν ως: 39,344%, 50,820% και 9,836%.

Από την ανάλυση για την παραλλαγή rs805722 ταυτοποιήθηκε 1 ομοζυγώτης αγρίου τύπου – GG, 27 ετεροζυγώτες – GA και 33 ομοζυγώτες μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου – AA. Τα αντίστοιχα ποσοστά υπολογίστηκαν ως: 1,639%, 44,262% και 54,098%.

Από την ανάλυση για την παραλλαγή rs17113650 ταυτοποιήθηκαν 27 ομοζυγώτες αγρίου τύπου αλληλομόρφου – AA, 28 ετεροζυγώτες – AG και 6 ομοζυγώτες μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου – GG. Τα αντίστοιχα ποσοστά υπολογίστηκαν ως: 44,262%, 45,902% και 9,836%.



Διάγραμμα 01. Κατανομή συχνοτήτων των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 των ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευρολογικά νοσήματα (ομάδα BPN).

Ομάδα ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (BP)

Στην ομάδα συμπεριλήφθηκαν 57 ασθενείς, 26 άνδρες και 31 γυναίκες. Πραγματοποιήθηκε γονοτυπική μελέτη των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του γονιδίου *COL17A1* στα εξώνια 10, 27 και 52 αντίστοιχα. Με την χρήση των κατάλληλων περιοριστικών ενδονουκλεασών ανευρέθη η αλληλουχία στις θέσεις: εξώνιο 10-θέση 734T>C, εξώνιο 27-θέση 2212G>A και εξώνιο 52-θέση 4214A>G. Στον πίνακα που ακολουθεί, αναγράφονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης:

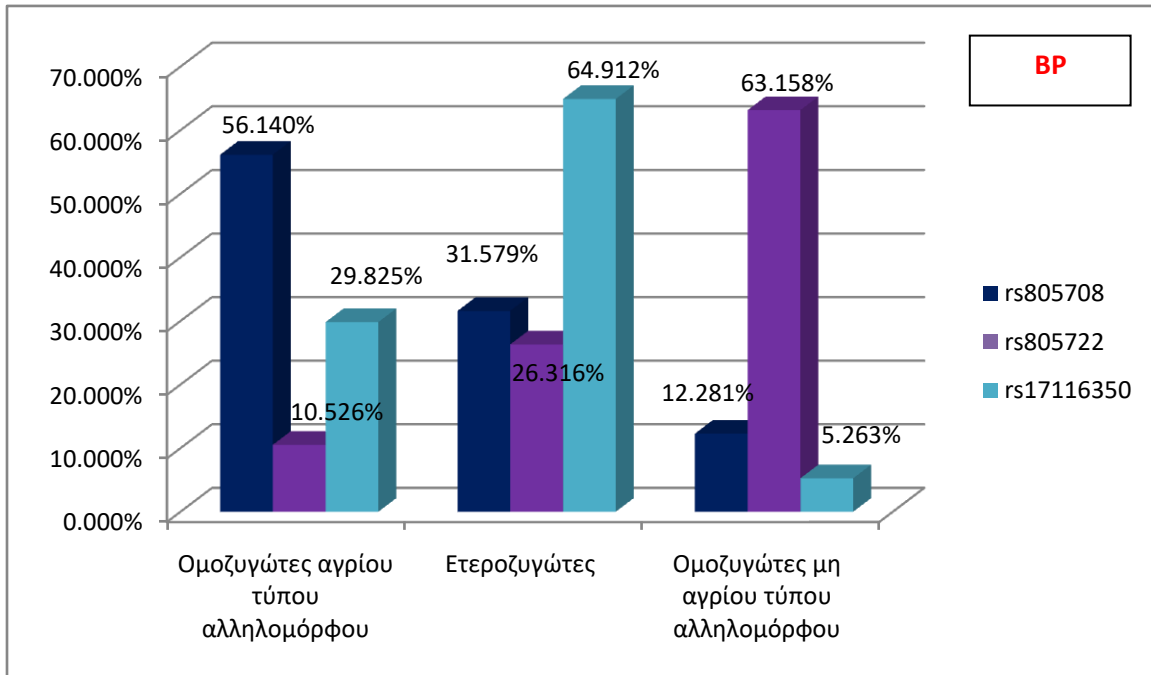
Ασθενείς	Φύλο	Ηλικία	rs805708	rs805722	rs17116350
BP-01	A	82	TT	AA	AA
BP-02	A	80	CC	AA	A/G
BP-03	Γ	86	TT	AA	A/G
BP-04	Γ	83	TT	AA	A/G
BP-05	A	69	TT	AA	A/G
BP-06	Γ	84	TT	AA	A/G
BP-07	Γ	82	TT	AA	A/G
BP-08	Γ	80	TT	AA	A/G
BP-09	Γ	74	T/C	AA	AA
BP-10	A	81	TT	G/A	A/G
BP-11	A	77	T/C	G/A	A/G
BP-12	Γ	49	T/C	G/A	A/G
BP-13	A	72	T/C	G/A	A/G
BP-14	A	72	T/C	G/A	A/G
BP-15	Γ	66	T/C	AA	A/G
BP-16	Γ	73	TT	AA	A/G
BP-17	A	71	TT	G/A	AA
BP-18	Γ	73	CC	G/A	A/G
BP-19	A	85	T/C	AA	A/G
BP-20	A	85	TT	AA	AA
BP-21	Γ	70	T/C	G/A	A/G
BP-22	A	84	T/C	AA	AA
BP-23	A	73	TT	AA	A/G
BP-24	Γ	78	TT	AA	GG
BP-25	A	70	TT	AA	A/G
BP-26	Γ	82	TT	AA	A/G
BP-27	A	83	TT	AA	AA
BP-28	Γ	48	T/C	AA	A/G
BP-29	Γ	83	TT	G/A	A/G
BP-30	Γ	79	T/C	AA	AA

BP-31	A	74	T/C	AA	GG
BP-32	A	71	TT	AA	A/G
BP-33	A	84	TT	G/A	AA
BP-34	Γ	83	T/C	GG	A/G
BP-35	Γ	82	CC	AA	AA
BP-36	Γ	67	TT	GG	A/G
BP-37	A	93	CC	GG	A/G
BP-38	Γ	55	T/C	AA	A/G
BP-39	Γ	81	TT	GG	A/G
BP-40	Γ	81	CC	AA	A/G
BP-41	A	67	TT	AA	A/G
BP-42	A	65	TT	AA	A/G
BP-43	A	77	TT	AA	AA
BP-44	Γ	82	TT	AA	A/G
BP-45	A	61	TT	AA	A/G
BP-46	A	56	TT	G/A	AA
BP-47	Γ	77	CC	AA	AA
BP-48	A	73	TT	GG	AA
BP-49	Γ	61	CC	AA	GG
BP-50	Γ	76	TT	AA	AA
BP-51	Γ	71	TT	AA	A/G
BP-52	Γ	60	TT	AA	A/G
BP-53	Γ	55	TT	G/A	AA
BP-54	Γ	77	T/C	G/A	A/G
BP-55	Γ	79	T/C	G/A	A/G
BP-56	A	62	T/C	GG	AA
BP-57	A	89	T/C	G/A	AA

Από την ανάλυση για την παραλλαγή rs805708, ταυτοποιήθηκαν 32 ομοζυγώτες αγρίου τύπου αλληλομόρφου – TT, 18 ετεροζυγώτες – TC και 7 ομοζυγώτες μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου – CC. Τα αντίστοιχα ποσοστά υπολογίστηκαν ως: 56,140%, 31,579% και 12,281%.

Από την ανάλυση για την παραλλαγή rs805722, ταυτοποιήθηκαν 6 ομοζυγώτες αγρίου τύπου αλληλομόρφου – GG, 15 ετεροζυγώτες – GA και 36 ομοζυγώτες μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου – AA. Τα αντίστοιχα ποσοστά υπολογίστηκαν ως: 10,526%, 26,316% και 63,158%.

Από την ανάλυση για την παραλλαγή rs17116350, ταυτοποιήθηκαν 17 ομοζυγώτες αγρίου τύπου αλληλομόρφου – AA, 37 ετεροζυγώτες – AG και 3 ομοζυγώτες μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου – GG. Τα αντίστοιχα ποσοστά υπολογίστηκαν ως: 29,825%, 64,912% και 5,263%.



Διάγραμμα 02. Κατανομή συχνοτήτων των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 των ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (ομάδα BP).

Ομάδα ασθενών με νευρολογικά νοσήματα (N)

Στην ομάδα συμπεριλήφθηκαν 53 ασθενείς, 23 άνδρες και 30 γυναίκες. Πραγματοποιήθηκε γονοτυπική μελέτη των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του *COL17A1* στα εξώνια 10, 27 και 52 αντίστοιχα. Με την χρήση των κατάλληλων περιοριστικών ενδονουκλεασών ανευρέθη η αλληλουχία στις θέσεις: εξώνιο 10-θέση 734T>C, εξώνιο 27-θέση 2212G>A και εξώνιο 52-θέση 4214A>G. Στον πίνακα που ακολουθεί, αναγράφονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης:

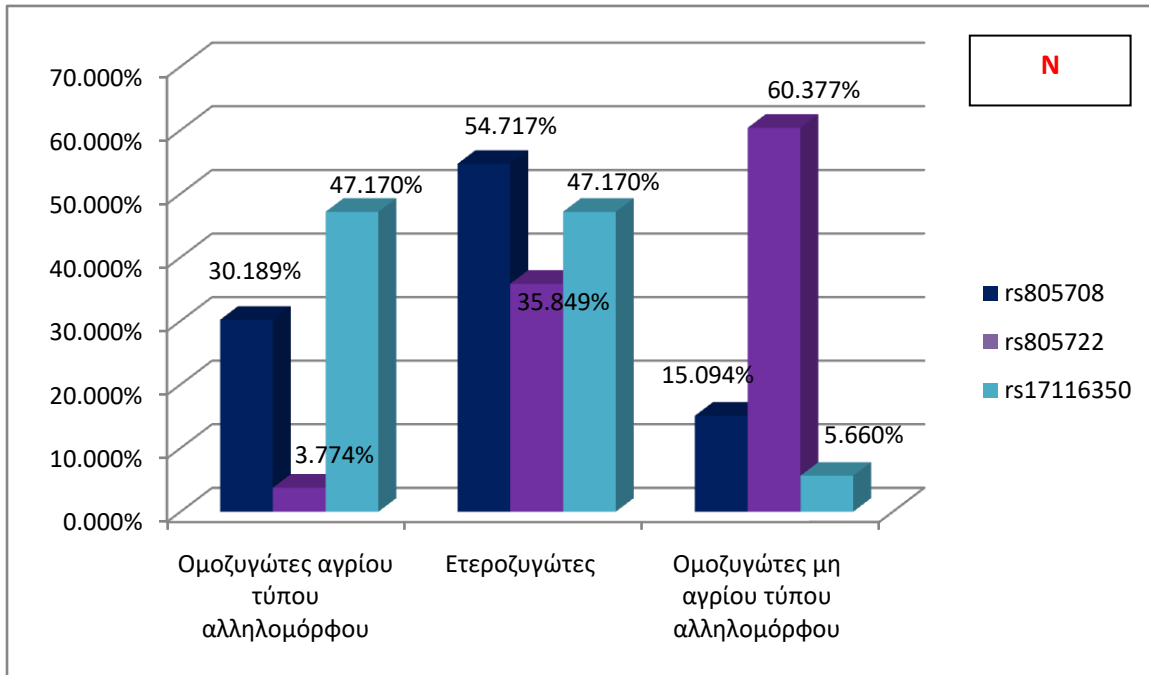
Ασθενείς	Φύλο	Ηλικία	rs805708	rs805722	rs17116350
N-01	A	68	CC	GG	AA
N-02	A	65	TT	AA	A/G
N-03	A	58	TT	AA	A/G
N-04	A	77	T/C	G/A	AA
N-05	A	75	TT	AA	A/G
N-06	Γ	63	CC	AA	AA
N-07	Γ	74	T/C	G/A	AA
N-08	Γ	78	T/C	G/A	A/G
N-09	Γ	68	T/C	G/A	A/G
N-10	A	79	TT	AA	A/G
N-11	A	77	CC	G/A	AA
N-12	Γ	69	T/C	AA	A/G
N-13	Γ	53	TT	AA	A/G
N-14	A	71	TT	AA	AA
N-15	Γ	80	T/C	AA	GG
N-16	Γ	81	T/C	G/A	A/G
N-17	Γ	85	T/C	AA	GG
N-18	Γ	65	T/C	G/A	AA
N-19	Γ	79	TT	AA	AA
N-20	Γ	85	T/C	G/A	AA
N-21	Γ	82	TT	AA	AA
N-22	Γ	84	CC	AA	AA
N-23	Γ	79	TT	AA	AA
N-24	Γ	80	T/C	AA	AA
N-25	Γ	83	T/C	AA	AA
N-26	Γ	83	T/C	G/A	AA
N-27	Γ	76	T/C	AA	A/G
N-28	A	39	TT	AA	A/G
N-29	Γ	58	T/C	AA	A/G
N-30	A	55	TT	AA	AA

N-31	A	60	T/C	AA	A/G
N-32	Γ	62	TT	AA	AA
N-33	A	68	T/C	G/A	AA
N-34	Γ	63	T/C	AA	GG
N-35	A	67	TT	AA	A/G
N-36	A	64	TT	AA	AA
N-37	A	50	T/C	G/A	A/G
N-38	Γ	88	T/C	AA	A/G
N-39	A	70	CC	G/A	A/G
N-40	A	56	CC	G/A	A/G
N-41	A	65	T/C	AA	A/G
N-42	A	82	T/C	AA	AA
N-43	A	60	T/C	G/A	A/G
N-44	Γ	61	TT	AA	A/G
N-45	Γ	42	T/C	G/A	AA
N-46	A	61	CC	GG	A/G
N-47	A	79	CC	G/A	A/G
N-48	Γ	40	T/C	G/A	AA
N-49	Γ	84	T/C	AA	A/G
N-50	A	47	T/C	G/A	A/G
N-51	Γ	84	TT	AA	AA
N-52	Γ	78	T/C	AA	AA
N-53	Γ	74	T/C	G/A	AA

Από την ανάλυση για την παραλλαγή rs805708, ταυτοποιήθηκαν 16 ομοζυγώτες αγρίου τύπου αλληλομόρφου – TT, 29 ετεροζυγώτες – TC και 8 ομοζυγώτες μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου – CC. Τα αντίστοιχα ποσοστά υπολογίστηκαν ως: 30,189%, 54,717% και 15,094%.

Από την ανάλυση για την παραλλαγή rs805722, ταυτοποιήθηκαν 2 ομοζυγώτες αγρίου τύπου αλληλομόρφου – GG, 19 ετεροζυγώτες – GA και 32 ομοζυγώτες μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου – AA. Τα αντίστοιχα ποσοστά υπολογίστηκαν ως: 3,774%, 35,849% και 60,377%.

Από την ανάλυση για την παραλλαγή rs17116350, ταυτοποιήθηκαν 25 ομοζυγώτες αγρίου τύπου αλληλομόρφου – AA, 25 ετεροζυγώτες – AG και 3 ομοζυγώτες μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου – GG. Τα αντίστοιχα ποσοστά υπολογίστηκαν ως: 47,170%, 47,170% και 5,660%.



Διάγραμμα 03. Κατανομή συχνοτήτων των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 των ασθενών με νευρολογικά νοσήματα (ομάδα N).

Ομάδα υγιών μαρτύρων (C)

Στην ομάδα συμπεριλήφθηκαν 60 άτομα, φυσιολογικά ως προς τα δερματολογικά και νευρολογικά νοσήματα, 29 άνδρες και 31 γυναίκες. Πραγματοποιήθηκε γονοτυπική μελέτη των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του γονιδίου *COL17A1* στα εξώνια 10, 27 και 52 αντίστοιχα. Με την χρήση των κατάλληλων περιοριστικών ενδονουκλεασών ανευρέθη η αλληλουχία στις θέσεις: εξώνιο 10-θέση 734T>C, εξώνιο 27-θέση 2212G>A και εξώνιο 52-θέση 4214A>G. Στον πίνακα που ακολουθεί, αναγράφονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης:

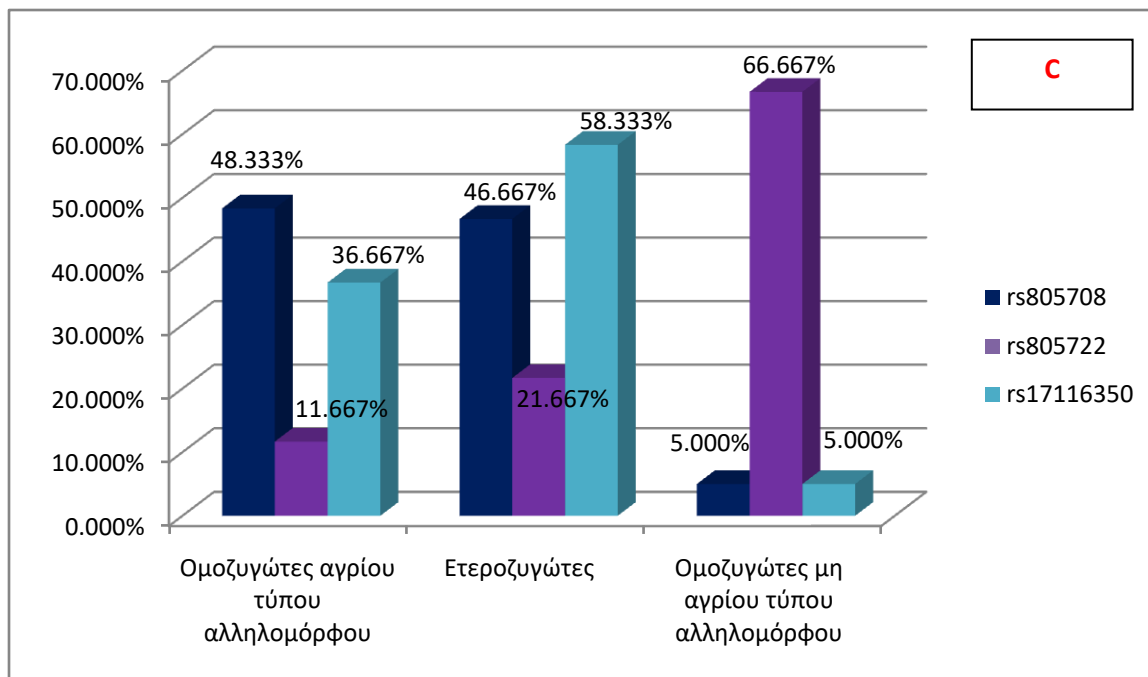
Ασθενείς	Φύλο	Ηλικία	rs805708	rs805722	rs17116350
C-01	A	72	TT	AA	A/G
C-02	A	74	T/C	AA	AA
C-03	A	86	T/C	AA	A/G
C-04	A	75	TT	AA	A/G
C-05	Γ	79	TT	AA	AA
C-06	A	82	T/C	G/A	AA
C-07	Γ	73	T/C	G/A	AA
C-08	Γ	75	TT	AA	AA
C-09	Γ	83	T/C	G/A	GG
C-10	A	85	TT	GG	A/G
C-11	A	75	TT	GG	GG
C-12	Γ	84	T/C	GG	AA
C-13	A	76	T/C	GG	AA
C-14	Γ	82	T/C	AA	A/G
C-15	A	76	TT	AA	AA
C-16	A	78	T/C	G/A	A/G
C-17	Γ	68	TT	AA	A/G
C-18	Γ	82	T/C	AA	A/G
C-19	Γ	70	T/C	AA	A/G
C-20	A	71	TT	AA	A/G
C-21	A	75	T/C	AA	A/G
C-22	Γ	73	T/C	G/A	A/G
C-23	A	72	TT	AA	A/G
C-24	A	80	TT	AA	AA
C-25	A	81	T/C	AA	AA
C-26	Γ	79	TT	AA	AA
C-27	Γ	83	TT	AA	A/G
C-28	Γ	68	TT	AA	A/G
C-29	A	87	TT	AA	AA
C-30	Γ	83	T/C	G/A	AA

C-31	A	85	T/C	AA	AA
C-32	Γ	76	ΤΤ	AA	A/G
C-33	Γ	66	ΤΤ	AA	GG
C-34	A	79	T/C	G/A	A/G
C-35	A	70	T/C	AA	A/G
C-36	A	75	ΤΤ	AA	A/G
C-37	A	79	CC	GG	A/G
C-38	Γ	80	T/C	AA	A/G
C-39	A	78	ΤΤ	AA	A/G
C-40	Γ	70	CC	AA	A/G
C-41	Γ	77	ΤΤ	AA	A/G
C-42	Γ	84	T/C	GG	A/G
C-43	A	86	T/C	G/A	A/G
C-44	A	71	ΤΤ	AA	AA
C-45	Γ	87	T/C	GG	A/G
C-46	A	75	ΤΤ	AA	AA
C-47	Γ	87	CC	G/A	AA
C-48	A	90	ΤΤ	AA	A/G
C-49	Γ	85	ΤΤ	AA	A/G
C-50	Γ	82	T/C	G/A	A/G
C-51	Γ	81	T/C	AA	AA
C-52	Γ	83	T/C	G/A	A/G
C-53	Γ	82	ΤΤ	AA	A/G
C-54	Γ	85	T/C	AA	AA
C-55	A	60	T/C	G/A	AA
C-56	A	58	ΤΤ	AA	A/G
C-57	Γ	73	ΤΤ	AA	A/G
C-58	Γ	81	ΤΤ	AA	A/G
C-59	Γ	76	ΤΤ	AA	AA
C-60	A	84	T/C	G/A	AA

Από την ανάλυση για την παραλλαγή rs805708, ταυτοποιήθηκαν 29 ομοζυγώτες αγρίου τύπου αλληλομόρφου – ΤΤ, 28 ετεροζυγώτες – TC και 3 ομοζυγώτες μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου – CC. Τα αντίστοιχα ποσοστά υπολογίστηκαν ως: 48,333%, 46,667% και 5,000%.

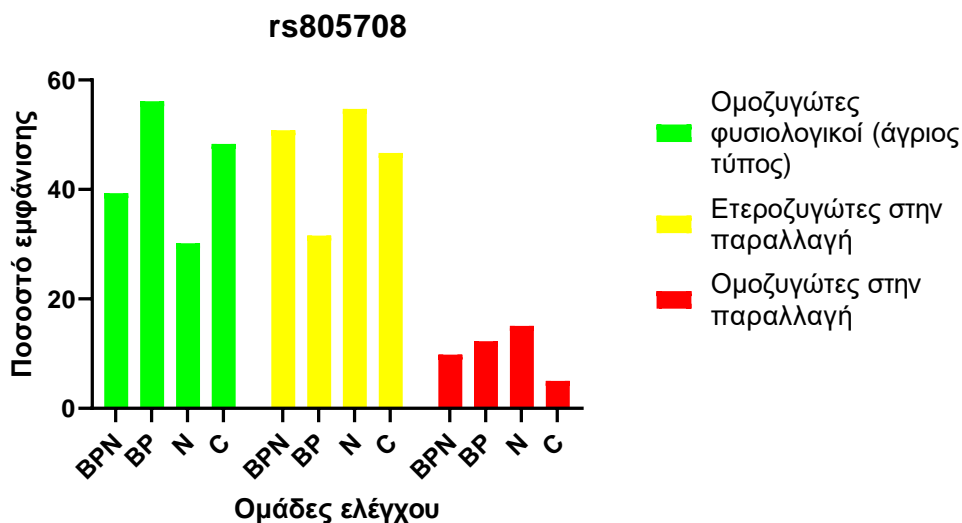
Από την ανάλυση για την παραλλαγή rs805722, ταυτοποιήθηκαν 7 ομοζυγώτες αγρίου τύπου αλληλομόρφου – GG, 13 ετεροζυγώτες – GA και 40 ομοζυγώτες μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου – AA. Τα αντίστοιχα ποσοστά υπολογίστηκαν ως: 11,667%, 21,667% και 66,667%.

Από την ανάλυση για την παραλλαγή rs17116350, ταυτοποιήθηκαν 22 ομοζυγώτες – AA, 35 ετεροζυγώτες – AG και 3 ομοζυγώτες μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου – GG. Τα αντίστοιχα ποσοστά υπολογίστηκαν ως: 36,667%, 58,333% και 5,000%.

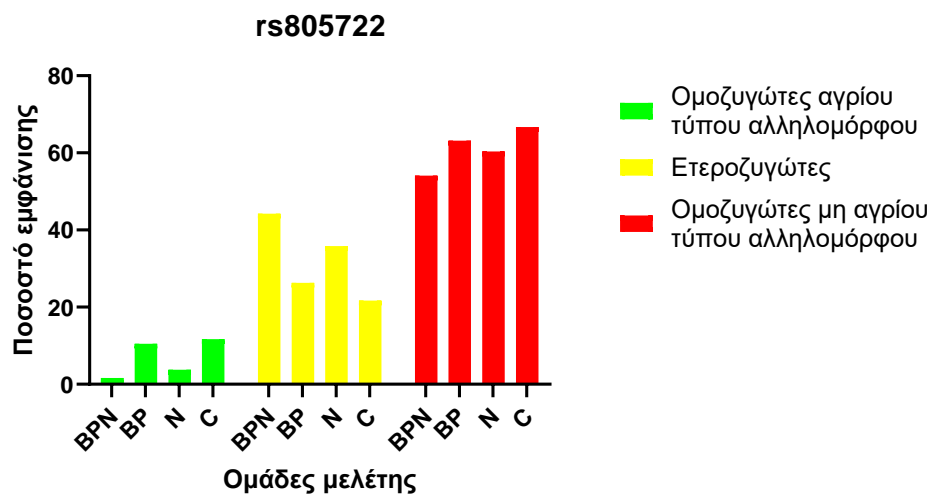


Διάγραμμα 04. Κατανομή συχνοτήτων των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 στους υγιείς μάρτυρες (ομάδα C).

Συγκριτική αναπαράσταση και συσχέτιση των ομάδων ελέγχου για κάθε υπό μελέτη παραλλαγή

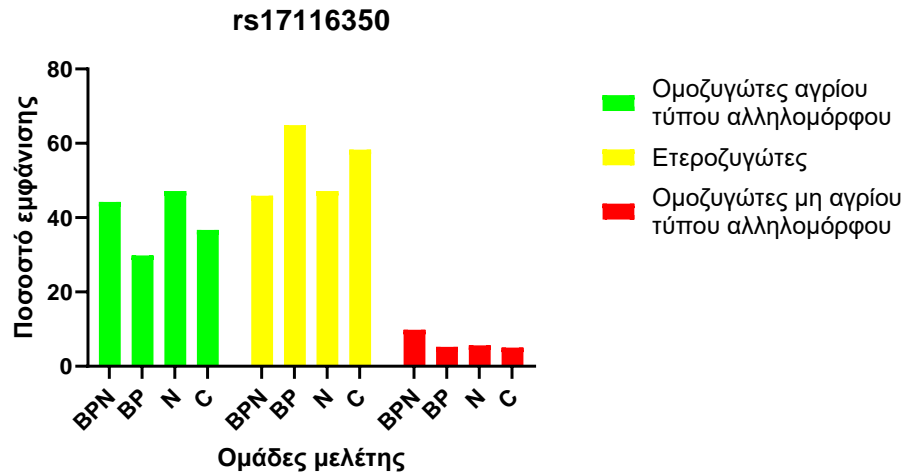


Διάγραμμα 05. Κατανομή συχνοτήτων των γονοτύπων της παραλλαγής rs805708 μεταξύ των 4 ομάδων μελέτης (BPN: ομάδα ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευρολογικά νοσήματα, BP: ομάδα ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές, N: ομάδα ασθενών με νευρολογικά νοσήματα, C: ομάδα υγιών μαρτύρων).



Διάγραμμα 06. Κατανομή συχνοτήτων των γονοτύπων της παραλλαγής rs805722 μεταξύ των 4 ομάδων μελέτης (BPN: ομάδα ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και

νευρολογικά νοσήματα, BP: ομάδα ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές, N: ομάδα ασθενών με νευρολογικά νοσήματα, C: ομάδα υγιών μαρτύρων).



Διάγραμμα 07. Κατανομή συχνοτήτων των γονοτύπων της παραλλαγής rs805708 μεταξύ των 4 ομάδων μελέτης (BPN: ομάδα ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευρολογικά νοσήματα, BP: ομάδα ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές, N: ομάδα ασθενών με νευρολογικά νοσήματα, C: ομάδα υγιών μαρτύρων).

Πίνακες αποτελεσμάτων στατιστικής ανάλυσης

Πίνακας 08. Στατιστική ανάλυση των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του γονιδίου *COL17A1* μεταξύ ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευρολογικά νοσήματα (BPN) και της ομάδας ελέγχου BP (ασθενείς με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές) (* άγριος τύπος, YC: διόρθωση του Yates, OR: λόγος απόδοσης, CI: διάστημα εμπιστοσύνης).

	rs805708			rs805722			rs17116350		
	Γονότυποι			Γονότυποι			Γονότυποι		
	TT*	TC	CC	GG*	GA	AA	AA*	AG	GG
BPN ασθενείς (n=61)	24	31	6	1	27	33	27	28	6
BP ασθενείς (n=57)	32	18	7	6	15	36	17	37	3
P-value	0.1033958			0.0301538			0.1114516		
	Αλληλία		Αλληλία		Αλληλία				
	T	C	G	A	A	G			
BPN ασθενείς (n=122)	79	43	29	93	82	40			
BP ασθενείς (n=114)	82	32	27	87	71	43			
P-value (YC)	0.296861		0.890611		0.511451				
OR, 95% CI	1.395 (0.803-2.423)		0.995 (0.546-1.814)		0.805 (0.472-1.375)				

Από την στατιστική ανάλυση των γονοτύπων και των αλληλίων για τις 3 υπό μελέτη παραλλαγές, μεταξύ των ασθενών της ομάδας BPN και BP, ανευρέθη στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο κατά τη γονοτυπική ανάλυση για την παραλλαγή rs805722.

Πίνακας 09. Στατιστική ανάλυση των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του γονιδίου *COL17A1* μεταξύ ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευρολογικά νοσήματα (BPN) και της ομάδας ελέγχου BP (ασθενείς με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές) μεταξύ ομοζυγωτών αγρίου τύπου αλληλομόρφου και ατόμων που εμφανίζουν την παραλλαγή (είτε σε ετεροζυγωτία, είτε σε ομοζυγωτία), καθώς και των ομοζυγωτών για το μη άγριο τύπο αλληλομόρφου με τα άτομα που φέρουν αλληλόμορφο αγρίου τύπου (σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία) (* άγριος τύπος, YC: διόρθωση του Yates).

	rs805708		rs805722		rs17116350	
	Γονότυποι		Γονότυποι		Γονότυποι	
	TT*	TC+CC	GG*	GA+AA	AA*	AG+GG
BPN ασθενείς (n=61)	24	37	1	60	27	34
BP ασθενείς (n=57)	32	25	6	51	17	40
P-value (YC)	0.100719		0.098489		0.152656	

	rs805708		rs805722		rs17116350	
	Γονότυποι		Γονότυποι		Γονότυποι	
	CC	TC+TT*	AA	GA+GG*	GG	AG+AA*
BPN ασθενείς (n=61)	6	55	33	28	6	55
BP ασθενείς (n=57)	7	50	36	21	3	54
P-value (YC)	0.89685		0.417328		0.556417	

Από την στατιστική ανάλυση των γονοτύπων για τις 3 υπό μελέτη παραλλαγές, μεταξύ των ασθενών της ομάδας BPN και BP, δεν ανευρέθη κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 10. Στατιστική ανάλυση των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του γονιδίου *COL17A1* μεταξύ ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευρολογικά νοσήματα (BPN) και της ομάδας ελέγχου N (ασθενείς με νευρολογικά νοσήματα) (* άγριος τύπος, YC: διόρθωση του Yates, OR: λόγος απόδοσης, CI: διάστημα εμπιστοσύνης).

	rs805708			rs805722			rs17116350		
	Γονότυποι			Γονότυποι			Γονότυποι		
	TT*	TC	CC	GG*	GA	AA	AA*	AG	GG
BPN ασθενείς (n=61)	24	31	6	1	27	33	27	28	6
N ασθενείς (n=53)	16	29	8	2	19	32	25	25	3
P-value	0.4971166			0.5530948			0.7086729		

	Αλληλία		Αλληλία		Αλληλία	
	T	C	G	A	A	G
BPN ασθενείς (n=122)	79	43	29	93	82	40
N ασθενείς (n=106)	61	45	23	83	75	31
P-value (YC)	0.327803		0.830745		0.665285	
OR, 95% CI	0.738 (0.432-1.260)		0.889 (0.477-1.656)		1.180 (0.672-2.074)	

Από την στατιστική ανάλυση των γονοτύπων και των αλληλίων για τις 3 υπό μελέτη παραλλαγές, μεταξύ των ασθενών της ομάδας BPN και N, δεν ανευρέθη κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ή συσχέτιση.

Πίνακας 11. Στατιστική ανάλυση των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του γονιδίου *COL17A1* μεταξύ ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευρολογικά νοσήματα (BPN) και της ομάδας ελέγχου N (ασθενείς με νευρολογικά νοσήματα) μεταξύ ομοζυγωτών αγρίου τύπου αλληλομόρφου και ατόμων που εμφανίζουν την παραλλαγή (είτε σε ετεροζυγωτία, είτε σε ομοζυγωτία), καθώς και των ομοζυγωτών για το μη άγριο τύπο αλληλομόρφου με τα άτομα που φέρουν αλληλόμορφο αγρίου τύπου (σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία) (* άγριος τύπος, YC: διόρθωση του Yates).

	rs805708		rs805722		rs17116350	
	Γονότυποι		Γονότυποι		Γονότυποι	
	TT*	TC+CC	GG*	GA+AA	AA*	AG+GG
BPN ασθενείς (n=61)	24	37	1	60	27	34
N ασθενείς (n=53)	16	37	2	51	25	28
P-value (YC)	0.409428		0.901724		0.902611	

	Γονότυποι		Γονότυποι		Γονότυποι	
	CC	TC+TT*	AA	GA+GG*	GG	AG+AA*
BPN ασθενείς (n=61)	6	55	33	28	6	55
N ασθενείς (n=53)	8	45	32	21	3	50
P-value (YC)	0.570642		0.627117		0.633745	

Από την στατιστική ανάλυση των γονοτύπων για τις 3 υπό μελέτη παραλλαγές, μεταξύ των ασθενών της ομάδας BPN και N, δεν ανευρέθη κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 12. Στατιστική ανάλυση των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του γονιδίου *COL17A1* μεταξύ ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευρολογικά νοσήματα (BPN) και της ομάδας ελέγχου C (υγιείς μάρτυρες) (* άγριος τύπος, YC: διόρθωση του Yates, OR: λόγος απόδοσης, CI: διάστημα εμπιστοσύνης).

	rs805708			rs805722			rs17116350		
	Γονότυποι			Γονότυποι			Γονότυποι		
	TT*	TC	CC	GG*	GA	AA	AA*	AG	GG
BPN ασθενείς (n=61)	24	31	6	1	27	33	27	28	6
C μάρτυρες (n=60)	29	28	3	7	13	40	22	35	3
P-value	0.4457294			0.0065269			0.3198393		

	rs805708		rs805722		rs17116350	
	Αλληλία		Αλληλία		Αλληλία	
	T	C	G	A	A	G
BPN ασθενείς (n=122)	79	43	29	93	82	40
C μάρτυρες (n=120)	86	34	27	93	79	41
P-value (YC)	0.30948		0.934739		0.927338	
OR, 95% CI	1.377 (0.799-2.371)		0.931 (0.512-1.693)		0.940 (0.551-1.603)	

Από την στατιστική ανάλυση των γονοτύπων και των αλληλίων για τις 3 υπό μελέτη παραλλαγές, μεταξύ των ασθενών της ομάδας BPN και C, ανευρέθη στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο κατά τη γονοτυπική ανάλυση για την παραλλαγή rs805722.

Πίνακας 13. Στατιστική ανάλυση των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του γονιδίου *COL17A1* μεταξύ ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευρολογικά νοσήματα (BPN) και της ομάδας ελέγχου C (υγιείς μάρτυρες) μεταξύ ομοζυγωτών αγρίου τύπου αλληλομόρφου και ατόμων που εμφανίζουν την παραλλαγή (είτε σε ετεροζυγωτία, είτε σε ομοζυγωτία), καθώς και των ομοζυγωτών για το μη άγριο τύπο αλληλομόρφου με τα άτομα που φέρουν αλληλόμορφο αγρίου τύπου (σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία) (* άγριος τύπος, YC: διόρθωση του Yates).

	rs805708		rs805722		rs17116350	
	Γονότυποι		Γονότυποι		Γονότυποι	
	TT*	TC+CC	GG*	GA+AA	AA*	AG+GG
BPN ασθενείς (n=61)	24	37	1	60	27	34
C μάρτυρες (n=60)	29	31	7	53	22	38
P-value (YC)	0.416096		0.063807		0.505536	

	Γονότυποι		Γονότυποι		Γονότυποι	
	CC	TC+TT*	AA	GA+GG*	GG	AG+AA*
BPN ασθενείς (n=61)	6	55	33	28	6	55
C μάρτυρες (n=60)	3	57	40	20	3	57
P-value (YC)	0.504652		0.219778		0.504652	

Από την στατιστική ανάλυση των γονοτύπων για τις 3 υπό μελέτη παραλλαγές, μεταξύ των ασθενών της ομάδας BPN και C, δεν ανευρέθη στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 14. Στατιστική ανάλυση των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του γονιδίου *COL17A1* μεταξύ ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (BP) και της ομάδας ελέγχου C (υγιείς μάρτυρες) (* άγριος τύπος, YC: διόρθωση του Yates, OR: λόγος απόδοσης, CI: διάστημα εμπιστοσύνης).

	rs805708			rs805722			rs17116350		
	Γονότυποι			Γονότυποι			Γονότυποι		
	TT*	TC	CC	GG*	GA	AA	AA*	AG	GG
BP ασθενείς (n=57)	32	18	7	6	15	36	17	37	3
C μάρτυρες (n=60)	29	28	3	7	13	40	22	35	3
P-value	0.14609			0.837941			0.733423		
	Αλληλία		Αλληλία		Αλληλία				
	T	C	G	A	A	G			
BP ασθενείς (n=114)	82	32	27	87	71	43			
C μάρτυρες (n=120)	86	34	27	93	79	41			
P-value (YC)	0.919863		0.952398		0.667241				
OR, 95% CI	0.987 (0.558-1.745)		0.936 (0.509-1.719)		1.167 (0.684-1.992)				

Από την στατιστική ανάλυση των γονοτύπων και των αλληλιών για τις 3 υπό μελέτη παραλλαγές, μεταξύ των ασθενών της ομάδας BP και των ατόμων της ομάδας C, δεν ανευρέθη στατιστικά σημαντική διαφορά ή συσχέτιση.

Πίνακας 15. Στατιστική ανάλυση των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του γονιδίου *COL17A1* μεταξύ ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (BP) και της ομάδας ελέγχου C (υγιείς μάρτυρες) μεταξύ ομοζυγωτών αγρίου τύπου αλληλομόρφου και ατόμων που εμφανίζουν την παραλλαγή (είτε σε ετεροζυγωτία, είτε σε ομοζυγωτία), καθώς και των ομοζυγωτών για το μη άγριο τύπο αλληλομόρφου με τα άτομα που φέρουν αλληλόμορφο αγρίου τύπου (σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία) (* άγριος τύπος, YC: διόρθωση του Yates).

	rs805708		rs805722		rs17116350	
	Γονότυποι		Γονότυποι		Γονότυποι	
	TT*	TC+CC	GG*	GA+AA	AA*	AG+GG
BP ασθενείς (n=57)	32	25	6	51	17	40
C μάρτυρες (n=60)	29	31	7	53	22	38
P-value (YC)	0.509368		0.921861		0.556169	

	rs805708		rs805722		rs17116350	
	Γονότυποι		Γονότυποι		Γονότυποι	
	CC	TC+TT*	AA	GA+GG*	GG	AG+AA*
BP ασθενείς (n=57)	7	50	36	21	3	54
C μάρτυρες (n=60)	3	57	40	20	3	57
P-value (YC)	0.281406		0.838527		0.722761	

Από την στατιστική ανάλυση των γονοτύπων για τις 3 υπό μελέτη παραλλαγές, μεταξύ των ασθενών της ομάδας BP και των ατόμων της ομάδας C, δεν ανευρέθη στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 16. Στατιστική ανάλυση των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του γονιδίου *COL17A1* μεταξύ ασθενών με νευρολογικά νοσήματα (N) και της ομάδας ελέγχου C (υγιείς μάρτυρες) (* άγριος τύπος, YC: διόρθωση του Yates, OR: λόγος απόδοσης, CI: διάστημα εμπιστοσύνης).

	rs805708			rs805722			rs17116350		
	Γονότυποι			Γονότυποι			Γονότυποι		
	TT*	TC	CC	GG*	GA	AA	AA*	AG	GG
N ασθενείς (n=53)	16	29	8	2	19	32	25	25	3
C μάρτυρες (n=60)	29	28	3	7	13	40	22	35	3
P-value	0.05979			0.112207			0.489188		

	Αλληλία		Αλληλία		Αλληλία	
	T	C	G	A	A	G
N ασθενείς (n=106)	61	45	23	83	75	31
C μάρτυρες (n=120)	86	34	27	93	79	41
P-value (YC)	0.037368		0.987529		0.51609	
OR, 95% CI	1.866 (1.073-3.245)		1.048 (0.558-1.967)		0.796 (0.453-1.399)	

Από την στατιστική ανάλυση των γονοτύπων και των αλληλίων για τις 3 υπό μελέτη παραλλαγές, μεταξύ των ασθενών της ομάδας N και των ατόμων της ομάδας C, προκύπτει ότι η παραλλαγή rs805708 σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης νευρολογικού νοσήματος.

Πίνακας 17. Στατιστική ανάλυση των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του γονιδίου *COL17A1* μεταξύ ασθενών με νευρολογικά νοσήματα (N) και της ομάδας ελέγχου C (υγιείς μάρτυρες) μεταξύ ομοζυγωτών αγρίου τύπου αλληλομόρφου και ατόμων που εμφανίζουν την παραλλαγή (είτε σε ετεροζυγωτία, είτε σε ομοζυγωτία), καθώς και των ομοζυγωτών για το μη άγριο τύπο αλληλομόρφου με τα άτομα που φέρουν αλληλόμορφο αγρίου τύπου (σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία) (* άγριος τύπος, YC: διόρθωση του Yates).

	rs805708		rs805722		rs17116350	
	Γονότυποι		Γονότυποι		Γονότυποι	
	TT*	TC+CC	GG*	GA+AA	AA*	AG+GG
N ασθενείς (n=53)	16	37	2	51	25	28
C μάρτυρες (n=60)	29	31	7	53	22	38
P-value (YC)	0.076109		0.230755		0.347617	

	Γονότυποι		Γονότυποι		Γονότυποι	
	CC	TC+TT*	AA	GA+GG*	GG	AG+AA*
N ασθενείς (n=53)	8	45	32	21	3	50
C μάρτυρες (n=60)	3	57	40	20	3	57
P-value (YC)	0.136614		0.618573		0.791694	

Από την στατιστική ανάλυση των γονοτύπων για τις 3 υπό μελέτη παραλλαγές, μεταξύ των ασθενών της ομάδας N και των ατόμων της ομάδας C, δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Με βάση τα δεδομένα της μελέτης, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των συχνοτήτων εμφάνισης των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350, των εξωνίων 10, 27 και 52 αντίστοιχα που μελετήθηκαν, μεταξύ διευρυμένων ομάδων ελέγχου. Οι ομάδες αυτές είναι οι ασθενείς που εμφανίζουν πομφολυγώδες πεμφιγοειδές συγκριτικά με αυτούς που δεν εμφανίζουν (BPN+BP συγκριτικά με N+C), καθώς και αυτοί που εμφανίζουν νευροεκφυλιστικά νοσήματα σε σχέση με αυτούς που δεν εμφανίζουν (BPN+N συγκριτικά με BP+C). Η σύγκριση αυτή αποσκοπεί στο να μελετηθεί το κατά πόσο υπάρχει αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης, είτε πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς, είτε νευροεκφυλιστικού νοσήματος, σε άτομα που εμφανίζουν κάποιον από τις υπό μελέτη παραλλαγές.

Πίνακας 18. Στατιστική ανάλυση των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του γονιδίου *COL17A1* μεταξύ του συνόλου των ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (BPN και BP) και των ατόμων της μελέτης που δεν εμφανίζουν πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (N και C) (* άγριος τύπος, YC: διόρθωση του Yates, OR: λόγος απόδοσης, CI: διάστημα εμπιστοσύνης).

	rs805708			rs805722			rs17116350		
	Γονότυποι			Γονότυποι			Γονότυποι		
	TT*	TC	CC	GG*	GA	AA	AA*	AG	GG
BPN+BP άτομα (n=118)	56	49	13	7	42	69	44	65	9
N+C άτομα (n=113)	45	57	11	9	32	72	47	60	6
P-value	0.3943354			0.4589367			0.6733276		
	Αλληλία		Αλληλία		Αλληλία				
	T	C	G	A	A	G			
BPN+BP άτομα (n=236)	161	75	56	180	153	83			
N+C άτομα (n=226)	147	79	50	176	154	72			
P-value (YC)	0.531839		0.764603		0.512523				
OR, 95% CI	0.867 (0.589-1.277)		0.913 (0.592-1.410)		1.160 (0.788-1.709)				

Από την στατιστική ανάλυση των γονοτύπων και των αλληλίων για τις διευρυμένες ομάδες ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (BPN+BP) έναντι των μη νοσοούντων (N+C) δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ή συσχέτιση.

Πίνακας 19. Στατιστική ανάλυση των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του γονιδίου *COL17A1* μεταξύ του συνόλου των ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (BPN και BP) και των ατόμων της μελέτης που δεν εμφανίζουν πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (N και C) μεταξύ ομοζυγωτών αγρίου τύπου αλληλομόρφου και ατόμων που εμφανίζουν την παραλλαγή (είτε σε ετεροζυγωτία, είτε σε ομοζυγωτία), καθώς και των ομοζυγωτών για το μη άγριο τύπο αλληλομόρφου με τα άτομα που φέρουν αλληλόμορφο αγρίου τύπου (σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία) (* άγριος τύπος, YC: διόρθωση του Yates).

	rs805708		rs805722		rs17116350	
	Γονότυποι		Γονότυποι		Γονότυποι	
	TT*	TC+CC	GG*	GA+AA	AA*	AG+GG
BPN+BP άτομα (n=118)	56	62	7	111	44	74
N+C άτομα (n=113)	45	68	9	104	47	66
P-value (YC)	0.29989		0.727119		0.592883	

	rs805708		rs805722		rs17116350	
	Γονότυποι		Γονότυποι		Γονότυποι	
	CC	TC+TT*	AA	GA+GG*	GG	AG+AA*
BPN+BP άτομα (n=118)	13	105	69	49	9	109
N+C άτομα (n=113)	11	102	72	41	6	107
P-value (YC)	0.917455		0.495386		0.654558	

Από την στατιστική ανάλυση των γονοτύπων για τις διευρυμένες ομάδες ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (BPN+BP) έναντι των μη νοσούντων (N+C) δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 20. Στατιστική ανάλυση των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του γονιδίου *COL17A1* μεταξύ του συνόλου των ασθενών με νευροεκφυλιστικά νοσήματα (BPN και N) και των ατόμων της μελέτης που δεν εμφανίζουν νευρολογικά νοσήματα (BPN και C) (*άγριος τύπος, YC: διόρθωση του Yates, OR: λόγος απόδοσης, CI: διάστημα εμπιστοσύνης).

	rs805708			rs805722			rs17116350		
	Γονότυποι			Γονότυποι			Γονότυποι		
	TT*	TC	CC	GG*	GA	AA	AA*	AG	GG
BPN+N άτομα (n=114)	40	60	14	3	46	65	52	53	9
BP+C άτομα (n=117)	61	46	10	13	28	76	39	72	6
P-value	0.0326429			0.0034242			0.0704017		

	Αλληλία		Αλληλία		Αλληλία	
	T	C	G	A	A	G
BPN+N άτομα (n=228)	140	88	52	176	157	71
BP+C άτομα (n=234)	168	66	54	180	150	84
P-value (YC)	0.0232		0.966757		0.325045	
OR, 95% CI	1.600 (1.083-2.363)		1.015 (0.658-1.567)		0.808 (0.548-1.189)	

Από την στατιστική ανάλυση των γονοτύπων και των αλληλίων για τις διευρυμένες ομάδες ασθενών με νευρολογικό νόσημα (BPN+N) έναντι των μη νοσούντων (BP+C) προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά για τις παραλλαγές rs805708 και rs805722. Επιπλέον, προκύπτει ότι η παραλλαγή rs805708 σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης νευρολογικού νοσήματος.

Πίνακας 21. Στατιστική ανάλυση των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 του γονιδίου *COL17A1* μεταξύ του συνόλου των ασθενών με νευροεκφυλιστικά νοσήματα (BPN και N) και των ατόμων της μελέτης που δεν εμφανίζουν νευρολογικά νοσήματα (BPN και C) μεταξύ ομοζυγωτών αγρίου τύπου αλληλομόρφου και ατόμων που εμφανίζουν την παραλλαγή (είτε σε ετεροζυγωτία, είτε σε ομοζυγωτία), καθώς και των ομοζυγωτών για το μη άγριο τύπο αλληλομόρφου με τα άτομα που φέρουν αλληλόμορφο αγρίου τύπου (σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία) (* άγριος τύπος, YC: διόρθωση του Yates).

	rs805708		rs805722		rs17116350	
	Γονότυποι		Γονότυποι		Γονότυποι	
	TT*	TC+CC	GG*	GA+AA	AA*	AG+GG
BPN+N άτομα (n=114)	40	74	3	111	52	62
BP+C άτομα (n=117)	61	56	13	104	39	78
P-value (YC)	0.013174		0.022693		0.075874	

	Γονότυποι		Γονότυποι		Γονότυποι	
	CC	TC+TT*	AA	GA+GG*	GG	AG+AA*
BPN+N άτομα (n=114)	14	100	65	49	9	105
BP+C άτομα (n=117)	10	107	76	41	6	111
P-value (YC)	0.475122		0.270362		0.557813	

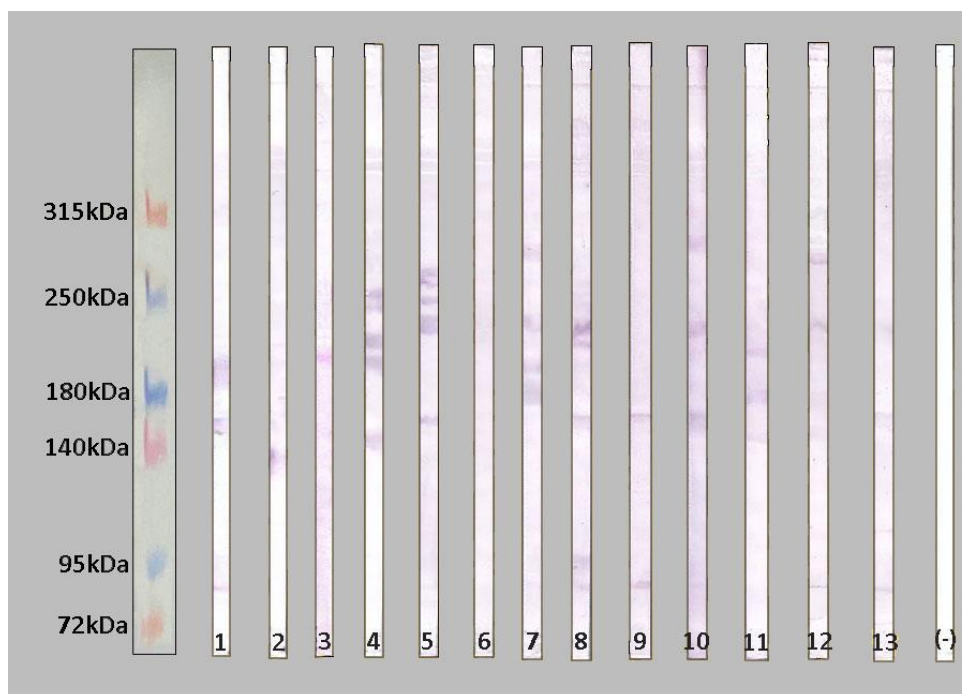
Από την στατιστική ανάλυση των γονοτύπων για τις διευρυμένες ομάδες ασθενών με νευρολογικό νόσημα (BPN+N) έναντι των μη νοσοούντων (BP+C) προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά για τις παραλλαγές rs805708 και rs805722.

Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης (Western Blot)

Στους ασθενείς που πάσχουν τεκμηριωμένα από πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευροεκφυλιστικό νόσημα, οι οποίοι όμως είχαν αρνητικό τίτλο αντισωμάτων έναντι του BP180 και BP230 (ELISA), ελέγχθηκε ο ορός του αίματος για την ύπαρξη αυτοαντισωμάτων έναντι άλλων αντιγονικών επιτόπων μέσω της τεχνικής Western Blot.

Για την ομάδα της μελέτης BPN συλλέχθηκε ορός από 71 ασθενείς, εκ των οποίων οι 61 είχαν υψηλό τίτλο αντισωμάτων (ELISA) έναντι της πρωτεΐνης BP180, ενώ 9 από αυτούς είχαν θετικό τίτλο και για την πρωτεΐνη BP230. Ανιχνεύθηκαν 10 ασθενείς οι οποίοι είχαν αρνητικό τίτλο και για τις δύο πρωτεΐνες. Οι ασθενείς αυτοί δεν συμπεριλήφθηκαν στην ομάδα μελέτης (BPN). Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε κατά την περίοδο έξαρσης της νόσου, κατά την οποία αναμένεται θετικό αποτέλεσμα της εξέτασης.

Ο ορός των 10 αυτών ασθενών εξετάστηκε με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Western Blot).



Εικόνα 30. Αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης (Western Blot) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με εκχύλισμα πρωτεϊνών δέρματος (dermal extract). Αριστερά παρουσιάζεται η αποτύπωση των πρότυπων μοριακών βαρών της μεμβράνης, η οποία διεταιμή σε λωρίδες (strips). Οι λωρίδες 1 και 2 επώαστηκαν με πρωτοταγές αντίσωμα έναντι της λαμινίνης 332, υπομονάδα A3 και B3 αντίστοιχα, ενώ η λωρίδα 3 με αντίσωμα έναντι της λαμινίνης γ1. Οι λωρίδες 4 – 13 επώαστηκαν με τον ορό των ασθενών σε αραιώση 1:50. Η τελευταία λωρίδα δεν επώαστηκε με αντισώματα (αρνητικός μάρτυρας).

Συζήτηση

Τα αυτοάνοσα νοσήματα αποτελούν πρόκληση για την επιστήμη, καθώς ακόμα και σήμερα, δεν έχει αποσαφηνιστεί ακριβώς η αιτιοπαθογένειά τους. Μελέτες που μπορούν να βοηθήσουν στην κατανόηση των μονοπατιών που συμμετέχουν στην εμφάνιση των αυτοάνοσων νοσημάτων, θα συμβάλλουν σημαντικά στην αντιμετώπισή τους, μέσω της ανάπτυξης νέων θεραπειών, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής και την πρόγνωση των ασθενών.

Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο όργανο του ανθρωπίνου σώματος και αποτελεί τον βασικό φραγμό του οργανισμού έναντι του περιβάλλοντος και των παθογόνων μικροοργανισμών. Η συνοχή του βασίζεται στις συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων (κερατινοκύτταρα), καθώς και την προσκόλληση της επιδερμίδας στο δέρμα (δερμο-επιδερμικός φραγμός). Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στις δομές αυτές αποτελούν αντιγόνα-στόχους σε πολλά αυτοάνοσα πομφολυγώδη νοσήματα, συμπεριλαμβανομένου του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς (10, 267).

Το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (ΠΠ) είναι το συχνότερο αυτοάνοσο πομφολυγώδες νόσημα, δεδομένου ότι με την πάροδο των ετών ο αριθμός των νέων περιστατικών συνεχώς αυξάνεται. Προσβάλλει κυρίως άτομα της τρίτης ηλικίας, τα οποία είναι εξ ορισμού πιο ευάλωτα, καθώς στην πλειοψηφία τους, πάσχουν και από άλλα συνοδά νοσήματα, επηρεάζοντας αρνητικά την ποιότητα ζωής και μειώνοντας το προσδόκιμό της. Η θνητότητα είναι σχεδόν διπλάσια στους ασθενείς που πάσχουν από καρδιοπάθειες, σακχαρώδη διαβήτη και παρουσιάζουν υψηλό τίτλο αντισωμάτων έναντι του BP 180, ενώ το φύλο, η αρτηριακή υπέρταση και ο θετικός έμμεσος ανοσοφθορισμός δεν φαίνεται να επηρεάζουν την επιβίωση (268).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν αναδείξει την στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς και μίας σειράς νευροεκφυλιστικών νοσημάτων (NN). Η πρώτη αναφορά έγινε το 1989 από τους Masouge και συνεργάτες στην Ελβετία και αφορούσε ασθενείς που έπασχαν από πολλαπλή σκλήρυνση. Έκτοτε, ανευρέθηκαν και άλλα νευρολογικά νοσήματα τα οποία συσχετίστηκαν με τη νόσο, όπως η άνοια, η νόσος Alzheimer, τα ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια και η νόσος Parkinson. Με μικρότερη συχνότητα, αναφέρθηκαν παθήσεις όπως η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση, η μυασθένεια Gravis, ο τρόμος, η επιληψία και η διπολική διαταραχή. Στην πληθώρα των περιστατικών (έως και 72%), τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα προηγούνται της εμφάνισης του ΠΠ κατά περίπου 5.5 έτη, υποδηλώνοντας ότι ο πιθανός εκλυτικός παράγοντας για την ανάπτυξη του ΠΠ, είναι τα νευρολογικά νοσήματα (66, 214).

Στη μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών με ΠΠ και NN, ανευρίσκεται θετικός τίτλος αντισωμάτων (ELISA) έναντι της πρωτεΐνης BP 180 (κολλαγόνο XVII – col17), καθώς και της BP

230, σε μικρότερο όμως ποσοστό. Η πρωτεΐνη BP 180 εκφράζεται και στους δύο ιστούς, επιθηλιακό και νευρικό, με διαφορετικές λειτουργίες, οι οποίες ακόμα μελετώνται. Πιθανή κοινή αιτία εκδήλωσης των δύο νοσημάτων, ενδέχεται να είναι το κολλαγόνο XVII, λειτουργώντας ως κοινό αντιγόνο που πυροδοτεί μία ανοσολογική απόκριση έναντι του δέρματος και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η γενετική ποικιλότητα του *COL17A1* (γονίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη BP180) μπορεί να επηρεάσει την έκφραση της πρωτεΐνης και στην περίπτωση υποκατάστασης κάποιου αμινοξέος, την ικανότητα των μορίων MHC να παρουσιάσουν το Col17 στο ανοσοποιητικό σύστημα και εναλλακτικά την τάση των περιφερειακών αυτοαντισωμάτων να δεσμεύονται με το μόριο.

Από τις 19 παραλλαγές που έχουν αναγνωρισθεί για το γονίδιο *COL17A1*, μόνο 3 αφορούν υποκατάσταση αμινοξέος σε κωδικές περιοχές, με rs805708, rs805722 και rs17116350 και αφορούν τα εξώνια 10 (θέση 734T>C), 27 (θέση 2212G>A) και 52 (θέση 4214A>G) αντίστοιχα. Για τους ανωτέρω λόγους, κρίθηκε σημαντική η διερεύνηση της συσχέτισης των 3 αυτών παραλλαγών με την εκδήλωση πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς σε ασθενείς με νευροεκφυλιστικά νοσήματα. Έχει προταθεί από πολλούς ερευνητές η περαιτέρω έρευνα, για την ανάλυση του BP180 ως μόριο στο νευρικό ιστό, καθώς και για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην κατάργηση της ανοσοανοχής. Επιπλέον, έχει προταθεί η μελέτη των παραλλαγών στο γονίδιο *COL17A1* το οποίο κωδικοποιεί την BP180 (269, 270).

Το αντιγόνο BP 180 σχετίζεται με την εμφάνιση, όχι μόνο του ΠΠ, αλλά και άλλων πομφολυγωδών νοσημάτων, όπως της πομφολυγώδους επιδερμόλυσης, η οποία εμφανίζεται κατά την γέννηση, ή τα πρώτα χρόνια της ζωής (271). Παραλλαγές του γονιδίου *COL17A1* έχουν συσχετιστεί με διάφορα πομφολυγώδη νοσήματα και νεοπλασίες (10, 272-276). Κάποιες από τις παραλλαγές που έχουν ταυτοποιηθεί επηρεάζουν την αλληλεπίδραση του BP180 με άλλα συστατικά της βασικής μεμβράνης, ενώ κάποιες άλλες προκαλούν τροποποίηση του μορίου. Συγκεκριμένα, δημιουργία κολλαγόνου μικρότερου σε μέγεθος και με μειωμένη δραστικότητα, έως και πλήρη εξάλειψή του, λόγω αναστολής της ικανότητάς του να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη (277). Η παραλλαγή Arg1303Gln έχει ως αποτέλεσμα την κατάργηση της ικανότητας πρόσδεσης με τη λαμινίνη 332, ενώ το μόριο παραμένει σταθερό ως προς την δομή του, χωρίς να επηρεάζεται η έκφρασή του, ενώ η παραλλαγή Asn1421Thr εμποδίζει την γλυκοζυλίωση του μορίου, το οποίο συσσωρεύεται ενδοκυττάρια. Και οι δύο παραλλαγές προκαλούν την συνδεσμική πομφολυγώδη επιδερμόλυση (JEB), η οποία κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο (251, 278, 279). Σε περιπτώσεις τροποποιήσεων που αφορούν το σημείο αναδίπλωσης του κολλαγόνου σε σχήμα ελατηρίου, το κολλαγόνο δεν αναδιπλώνεται και συσσωρεύεται ενδοκυττάρια, ενώ εν τέλει «τεμαχίζεται» σε μικρότερου μεγέθους κολλαγόνα (LAD-1 και LABD-97), προκαλώντας την γραμμική IgA δερματοπάθεια, ένα σπάνιο αυτοάνοσο δερματικό νόσημα (253, 280).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, υπάρχει περιορισμένος αριθμός μελετών που συσχετίζουν την γενετική ποικιλότητα του γονιδίου *COL17A1* με την εκδήλωση πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς. Δεν έχει πραγματοποιηθεί, όμως, μελέτη που να συσχετίζει τις παραλλαγές του γονιδίου με την εκδήλωση πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς σε ασθενείς με νευρολογικές παθήσεις, το οποίο ελέγχθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν συνολικά 61 ασθενείς που πάσχουν από πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευροεκφυλιστικά νοσήματα (ομάδα BPN), συγκριτικά με τις τρεις ομάδες ελέγχου: α) ασθενείς με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (BP 57 ασθενείς), β) ασθενείς με νευροεκφυλιστικά νοσήματα (N 53 ασθενείς) και γ) υγιείς μάρτυρες (C 60 άτομα).

Ισορροπία Hardy-Weinberg (HW)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος στην ομάδα ελέγχου υγιών μαρτύρων (C) για κάθε υπό μελέτη παραλλαγή. Για τις παραλλαγές rs805708 και rs17116350, στα εξώνια 10 και 52 αντίστοιχα, το δείγμα ακολουθούσε την ισορροπία HW, ενώ αυτή δεν ίσχυε για την παραλλαγή rs805722 στο εξώνιο 27. Για τη μη ισορροπία HW της ομάδας αυτής, ενδεχομένως βασική παράμετρος να είναι η επικράτηση της παραλλαγής rs805722 στον συνολικό πληθυσμό της μελέτης (γενετική εκτροπή του πληθυσμού – genetic drift), καθώς και το μέγεθος του δείγματος που μπορεί να μην επιτρέπει την επέλευση ισορροπίας για την παραλλαγή.

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος στις λοιπές ομάδες, με την ομάδα ελέγχου ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (BP) να είναι η μόνη που δεν ακολουθεί την ισορροπία HW για την παραλλαγή rs17116350. Η απόκλιση της ισορροπίας, καθότι δεν ανευρέθη κάποια στατιστική συσχέτιση με τα νοσήματα που μελετήθηκαν, πιθανώς να οφείλεται σε άλλους παράγοντες, οι οποίοι δεν δύνανται να διευκρινιστούν στην παρούσα μελέτη.

Στατιστική ανάλυση

Οι παραλλαγές c.734T>C (rs805708), c.2212G>A (rs805722) και c4214A>G (rs17116350) αποτελούν παραλλαγές σε κωδικές περιοχές του γονιδίου *COL17A1*, που οδηγούν στην υποκατάσταση των αμινοξέων Met734Thr, Val2212Met και Asp4214Gly αντίστοιχα. Οι παραλλαγές rs805708, rs805722 και rs17116350 βιβλιογραφικά φαίνεται με τα έως τώρα δεδομένα να μην είναι επιβλαβείς (καλοήθειες παραλλαγές) στη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης col17 (BP180), η οποία εκφράζεται από το γονίδιο *COL17A1*.

Οι συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων και αλληλίων των παραλλαγών rs805708, rs805722 και rs17116350 μελετήθηκαν σε ασθενείς που πάσχουν από πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευροεκφυλιστικά νοσήματα (κύρια ομάδα μελέτης), καθώς και στις 3 ομάδες ελέγχου, τους ασθενείς με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές, τους ασθενείς με νευροεκφυλιστικά νοσήματα και τους υγιείς μάρτυρες.

Η συχνότητα εμφάνισης στον υγιή πληθυσμό (ομάδα ελέγχου C) της ομοζυγωτίας αγρίου τύπου αλληλομόρφου βρέθηκε 48.33%, της ετεροζυγωτίας 46.67% και της ομοζυγωτίας μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου 5% για την παραλλαγή rs805708. Για την παραλλαγή rs805722 οι ομοζυγώτες αγρίου τύπου αλληλομόρφου ήταν 11.67%, οι ετεροζυγώτες 21.67% και οι ομοζυγώτες μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου 66.67%, ενώ για την παραλλαγή rs17116350 ήταν 36.67%, 58.33% και 5% αντίστοιχα. Σε μελέτη πληθυσμού 200 υγιών μαρτύρων Βορειοευρωπαϊκής Καυκάσιας φυλής, από τους Winsey και συνεργάτες, για την παραλλαγή rs805708 ανευρέθηκαν παρόμοιες συχνότητες εμφάνισης ομοζυγωτίας αγρίου τύπου αλληλομόρφου 51%, ετεροζυγωτίας 41% και ομοζυγωτίας μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου 8%. Για τις παραλλαγές rs805722 και rs17116350 ανευρέθη ομοζυγωτία αγρίου τύπου αλληλομόρφου 75% και 6%, ετεροζυγωτία 23% και 34% και ομοζυγωτία μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου 2% και 60% αντίστοιχα, ποσοστά τα οποία διαφέρουν σημαντικά από τα αποτελέσματά μας. Στον πληθυσμό που εξετάστηκε στην παραπάνω μελέτη (Winsey και συνεργάτες), παρατηρήθηκε επικράτηση του αγρίου τύπου για την παραλλαγή rs805722, και του μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου για την παραλλαγή rs17116350 (246). Τα αποτελέσματα αυτά, έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματά μας, καθότι ανευρέθη επικράτηση του μη αγρίου τύπου για την παραλλαγή rs805722 και του αγρίου τύπου αλληλομόρφου για την παραλλαγή rs17116350.

Τα αποτελέσματα στην παρούσα διατριβή διαφέρουν σημαντικά και για τις 3 υπό μελέτη παραλλαγές, σε σχέση με μια πρόσφατη μελέτη από τους Tabatabaei-Ranaei και συνεργάτες, στην οποία μελετήθηκαν 40 υγιείς μάρτυρες Ιρανικής καταγωγής (281). Ο μικρός αριθμός ατόμων της ομάδας ελέγχου θα μπορούσε να επηρεάσει τη σημαντικότητα αυτού του αποτελέσματος.

Οι διαφορές που αναδεικνύονται κατά τον έλεγχο συχνότητας των γονοτύπων στον υπό μελέτη πληθυσμό της παρούσας διδακτορικής διατριβής, σε σχέση με τις δύο προαναφερθείσες μελέτες, ενδεχομένως αντικατοπτρίζει την διαφορετική κατανομή των παραλλαγών, μεταξύ των διαφόρων εθνοικοτήτων και γεωγραφικών περιοχών.

Και στις 4 ομάδες της μελέτης μας παρατηρήθηκαν μικρά ποσοστά ομοζυγωτίας μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου για τις παραλλαγές rs805708 και rs17116350 (διαγράμματα 5 και 7), ενώ παρατηρήθηκε σαφής επικράτηση του μη αγρίου τύπου για την παραλλαγή rs805722 (διάγραμμα 6).

Για την παραλλαγή rs805708 δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά κατά τις συσχετίσεις της κύριας ομάδας μελέτης, των ασθενών που πάσχουν από πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευρολογικά νοσήματα, με τις 3 ομάδες ελέγχου, των ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές, των ασθενών με νευρολογικά νοσήματα και των υγιών-μαρτύρων. Σύμφωνα με το εν λόγω στατιστικό εύρημα, η παραλλαγή rs805708, δεν φαίνεται να σχετίζεται με την εμφάνιση πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς σε ασθενείς με νευρολογικές παθήσεις. Στην προσπάθεια αποσαφήνισης της παραπάνω σχέσης, πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές δοκιμασίες συσχέτισης, τόσο μεταξύ των τεσσάρων ομάδων της μελέτης σε συνδυασμούς των δύο, όσο και μετά τον διαχωρισμό αυτών σε διευρυμένες ομάδες, που είχαν ως κοινό γνώμονα την παρουσία ενός εκ των δύο νοσημάτων που εξετάζονται στη παρούσα διατριβή (πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευρολογικά νοσήματα).

Συγκρίνοντας την ομάδα των ασθενών που πάσχουν από νευρολογικά νοσήματα με αυτήν των μαρτύρων, ανευρέθη στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P = 0.037$, $OR = 1.866$, $95\% CI: 1.073-3.245$). Σύμφωνα με αυτήν, τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο μη αγρίου τύπου-C, διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης νευρολογικού νοσήματος. Στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P = 0.033$) ανευρέθη και κατά τη γονοτυπική ανάλυση μεταξύ των ασθενών που πάσχουν από νευρολογικά νοσήματα (BPN+N) και της διευρυμένης ομάδας ελέγχου των μη πασχόντων (BP+C). Το στατιστικά σημαντικό αυτό εύρημα παρατηρήθηκε στις δύο αυτές ομάδες και κατά την μελέτη των αλληλίων ($P=0.023$, $OR=1.6$, $95\% CI: 1.083-2.363$). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει θετική συσχέτιση, σύμφωνα με την οποία τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο μη αγρίου τύπου-C, διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης νευρολογικού νοσήματος κατά 1.6 φορές. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με πρόσφατη έρευνα σε ασθενείς με νόσο Alzheimer, στους οποίους αναγνωρίστηκε αυξημένος τίτλος αυτοαντισωμάτων έναντι του BP180, συγκριτικά με ασθενείς που δεν έπασχαν από νευρολογικό νόσημα. Επιπλέον, φάνηκε να υπάρχει θετική συσχέτιση του τίτλου αντισωμάτων στον ορό των ασθενών με την βαρύτητα της άνοιας. Στην ομάδα αυτή, κανένας ασθενής δεν εμφάνιζε κλινική εικόνα πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς (94).

Παρά το γεγονός ότι η μελέτη δεν ανέδειξε συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης παραλλαγών του γονιδίου *COL17A1* και της εμφάνισης πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς σε ασθενείς με νευροεκφυλιστικά νοσήματα, υπήρξαν σημαντικές παρατηρήσεις. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι από την στατιστική ανάλυση δεν ανευρέθησαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευρολογικά νοσήματα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και την ομάδα ελέγχου υγιών μαρτύρων. Η στατιστικά σημαντική διαφορά προήλθε με την δημιουργία των διευρυμένων ομάδων, με την προσθήκη των ασθενών με νευρολογικά νοσήματα, επιβεβαιώνοντας την συσχέτιση της παραλλαγής rs805708 με την εμφάνιση νευρολογικών νοσημάτων (ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή μη πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς) στον υπό μελέτη πληθυσμό.

Μία πολυκεντρική μελέτη σε ασθενείς που πάσχουν από νευροεκφυλιστικά νοσήματα, θα μπορούσε να επιβεβαιώσει, ή να απορρίψει την παραπάνω συσχέτιση με την παραλλαγή rs805708 στον γενικό πληθυσμό, αυξάνοντας το μέγεθος του δείγματος και μειώνοντας την πιθανότητα στατιστικού σφάλματος.

Για την παραλλαγή rs805722 ανευρέθη στατιστικά σημαντική διαφορά κατά την συσχέτιση της κύριας ομάδας μελέτης, των ασθενών που πάσχουν από πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευρολογικά νοσήματα, με την ομάδα ελέγχου ασθενών που πάσχουν από πομφολυγώδες πεμφιγοειδές ($P = 0.030$) και την ομάδα ελέγχου υγιών μαρτύρων ($P = 0.007$). Δεν ανευρέθη συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης του μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου και των δύο υπό μελέτη νοσημάτων, σε καμία από τις δύο ομάδες.

Κατά τη γονοτυπική ανάλυση για την παραλλαγή rs805722 μεταξύ των διευρυμένων ομάδων, ανευρέθη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών με νευρολογικά νοσήματα (BPN+N) και της διευρυμένης ομάδας μη πασχόντων (BP+C) ($P = 0.003$). Δεν ανευρέθη συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης του μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου και των δύο υπό μελέτη νοσημάτων.

Από την γονοτυπική ανάλυση των 4 ομάδων της μελέτης μας για την παραλλαγή rs805722, αναγνωρίστηκε πολύ μικρός αριθμός ομοζυγωτών αγρίου τύπου αλληλομόρφου-GG και σαφής επικράτηση του μη αγρίου τύπου αλληλομόρφου (είτε σε ομοζυγωτία-AA, είτε σε ετεροζυγωτία-GA) με ποσοστό από 88.33 έως 98.36%. Το αποτέλεσμα αυτό ενδεχομένως να οφείλεται σε γενετική εκτροπή του πληθυσμού (genetic drift) και ίσως να εξηγεί τον λόγο για τον οποίο δεν ισχύει η ισορροπία Hardy-Weinberg για την παραλλαγή rs805722 στην ομάδα των υγιών μαρτύρων. Κατά την στατιστική ανάλυση των συχνοτήτων εμφάνισης των αλληλίων στο δείγμα, δεν ανευρέθη συσχέτιση, το οποίο υποστηρίζει την επικράτηση αυτή. Επομένως, τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να μην έχουν στατιστική ισχύ για την υπόθεση της μελέτης, καθώς το δείγμα BPN εμφανίζει σχεδόν διπλάσια συχνότητα ετεροζυγωτών, χωρίς όμως σημαντικές διαφορές στους ομοζυγώτες για την παραλλαγή, που θεωρητικά θα είχε

μεγαλύτερο αντίκτυπο για τη νόσο/τις νόσους. Επιπλέον, λόγω του μικρού αριθμού ομοζυγωτών για τον άγριο τύπο αλληλομόρφου, υπάρχει υψηλός κίνδυνος στατιστικού σφάλματος κατά τη σύγκριση των ποσοστών.

Το αποτέλεσμα για την παραλλαγή rs805722 στο εξώνιο 27 δείχνει την τάση της γενετικής ποικιλότητας να καθιστά κάποιες γενετικές παραλλαγές ως τα επικρατή αλληλία εντός ενός πληθυσμού.

Για την παραλλαγή rs17116350 δεν ανευρέθη στατιστικά σημαντική διαφορά κατά τις συσχετίσεις της κύριας ομάδας μελέτης, των ασθενών που πάσχουν από πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και νευρολογικά νοσήματα, με τις 3 ομάδες ελέγχου, των ασθενών με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές, των ασθενών με νευρολογικά νοσήματα και την ομάδα των υγιών μαρτύρων. Σύμφωνα με το εν λόγω στατιστικό εύρημα, η παραλλαγή rs17116350 δεν φαίνεται να σχετίζεται με την εμφάνιση πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς σε ασθενείς με νευρολογικές παθήσεις. Επιπλέον, δεν ανευρέθη καμία στατιστικά σημαντική διαφορά, τόσο μεταξύ των ομάδων ελέγχου μεταξύ τους, όσο και μεταξύ των διευρυμένων ομάδων ελέγχου.

Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης (Western Blot)

Από τον πληθυσμό της ομάδας μελέτης (BPN), ανιχνεύθηκαν 10 ασθενείς οι οποίοι είχαν αρνητικό τίτλο (ELISA) για τις δύο πρωτεΐνες BP 180 και BP 230. Από αυτούς συλλέχθηκε ορός αίματος κατά την περίοδο έξαρσης της νόσου, κατά την οποία αναμένεται θετικό αποτέλεσμα της εξέτασης, ο οποίος εξετάστηκε με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Western Blot – WB).

Μετά την σήμανση με το χρωμογόνο, κατά το τελικό στάδιο της τεχνικής, ανιχνεύτηκαν ζώνες κατά μήκος των τμημάτων της μεμβράνης σε διάφορα μοριακά βάρη. Οι ζώνες αυτές υποδηλώνουν την πιθανή ύπαρξη αυτοαντισωμάτων στον ορό των ασθενών, έναντι κάποιων πρωτεϊνών του εκχυλίσματος δέρματος (dermal extract). Τα μεγέθη των πρωτεϊνών αυτών, μπορούν να υπολογιστούν αδρά με την χρήση των πρότυπων μοριακών βαρών (ladder).

Οι διάφορες ζώνες στα αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται και στο φαινόμενο του epitope spreading, καθώς στην πορεία της νόσου δημιουργούνται αντισώματα έναντι νέων αντιγονικών επιτόπων, ακόμα και στην ίδια πρωτεΐνη. Η εύρεση πολλαπλών αντιγονικών στόχων μπορεί να είναι ένα πιθανό αίτιο για τις περιπτώσεις ανθεκτικών μορφών ΠΠ προς τις συνήθεις θεραπείες. Ζώνες χαμηλών μοριακών βαρών μπορεί να αποτελούν και τμήματα κατακερματισμένων πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου και όχι νέων αντιγονικών επιτόπων.

Σε έναν ασθενή δεν ανιχνεύτηκαν ζώνες, το οποίο σημαίνει, θεωρητικά, απουσία αντισωμάτων στον ορό του έναντι του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (dermal extract). Ο ασθενής αυτός είχε τυπική εικόνα πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς, θετικό άμεσο/έμμεσο ανοσοφθορισμό και ιστολογική επιβεβαίωση της νόσου. Ως εκ τούτου, το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει, είτε την παρουσία αντισωμάτων έναντι άλλων πρωτεϊνών (εκτός dermal extract), είτε παρουσία αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών χαμηλότερου μοριακού βάρους (μικρότερο των 72kDa).

Στην εν λόγω μελέτη, τα πρότυπα μοριακά βάρη που χρησιμοποιήθηκαν δεν είναι αρκετά ώστε να γίνει έστω και ένας αδρός υπολογισμός του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών – στόχων των αντισωμάτων. Για τον λόγο αυτό, η τεχνική αυτή δίνει μία ισχυρή ένδειξη για την παρουσία αντισωμάτων στον ορό των ασθενών που εξετάζονται, χωρίς όμως να μπορεί να αποδείξει και να αναδείξει ένα ασφαλές και ακριβές αποτέλεσμα.

Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Σε μία συστηματική ανασκόπηση για την συσχέτιση του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς (ΠΠ) και των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, με μετα-ανάλυση των διάφορων μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί παγκοσμίως, υποστηρίζεται έντονα η συσχέτιση του ΠΠ με τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη (31). Παρά του ότι οι παθογενετικοί μηχανισμοί δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί, πιστεύεται ότι έγκεινται στην παρουσία αυτοαντιγόνων έναντι του ΠΠ στο νευρικό ιστό. Στους ασθενείς με νευρολογικά νοσήματα, ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός έχει διαταραχθεί, οδηγώντας στη απελευθέρωση αυτοαντιγόνων τα οποία πυροδοτούν ανοσολογική αντίδραση και ενδεχομένως προκαλούν την εκδήλωση ΠΠ. Το φαινόμενο αυτό δεν σχετίζεται αποκλειστικά με την αυξημένη ηλικία, καθώς έχουν αναγνωριστεί και αρκετά νεότεροι ασθενείς που πάσχουν από τα νοσήματα αυτά (282, 283). Αυτός ο παθογενετικός μηχανισμός πιθανολογείται και από άλλες έρευνες και εξηγεί το γιατί τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα προηγούνται κατά κάποια έτη (62, 65, 66, 79, 80, 214).

Έχει αναγνωριστεί η έκφραση των BP180 και BP230, τόσο στο δέρμα, όσο και στο νευρικό ιστό, πράγμα που υποδεικνύει ότι, παρά τις αρχικές σκέψεις, και τα δύο αντιγόνα εμπλέκονται στην παθογένεια του ΠΠ, αλλά και στη συσχέτισή του με τα νευρολογικά νοσήματα (31, 230). Στις περισσότερες έρευνες πιθανολογείται η δημιουργία αυτοαντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του νευρικού ιστού, τα οποία διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και δημιουργούν το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές. Παρ' όλα αυτά, έχουν αναγνωριστεί

περιπτώσεις στις οποίες τα αντισώματα αυτά, δεν συνδέονται στις δερματικές ισομορφές (269).

Σε πειραματική έρευνα που διεξήχθη στη Γερμανία, επιβεβαιώθηκε η στατιστικά σημαντικά αυξημένη εμφάνιση νευροεκφυλιστικών νοσημάτων σε ασθενείς με ΠΠ. Παράλληλα αναγνωρίστηκε ο αυξημένος τίτλος αντισωμάτων και ηωσινοφίλων ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για τη συνύπαρξη των 2 νοσημάτων. Παρ' όλα αυτά, από την πειραματική διαδικασία δεν επιβεβαιώθηκε η σύνδεση των BPAG2 (BP180) αντισωμάτων στο νευρικό ιστό ως παθογενετικός μηχανισμός για την ανάπτυξη των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων (79).

Τα αυτοαντισώματα έναντι του BP180 εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια, αναλόγως του ισοτύπου, της υποκλάσης της IgG ανοσοσφαιρίνης και της γλυκοζυλίωσης ή μη του μορίου. Κάθε αντίσωμα προκαλεί διαφορετική ανοσιακή απόκριση και σχετίζεται με διαφορετικό πομφολυγώδες νόσημα, καθώς στοχεύει σε διαφορετικό σημείο του BP180. Διαφορές στους αντιγονικούς επιτόπους – στόχους εμφανίζονται και με την εξέλιξη της νόσου, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να εξηγήσει τις αλλαγές στην κλινική εικόνα, όπως για παράδειγμα την εμφάνιση νέων βλαβών στους βλεννογόνους, οι οποίες δεν υπήρχαν στα αρχικά στάδια της νόσου. Η κατανόηση των μηχανισμών που προκαλούν τα φαινόμενα αυτά, ίσως βοηθήσουν στη δημιουργία νέων στοχευμένων θεραπειών και συμβάλλουν με τον τρόπο αυτό στον έλεγχο της νόσου (42).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν αναδείξει την συσχέτιση του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς με τη χρόνια λήψη φαρμάκων, διαφόρων κατηγοριών. Η χρόνια έκθεση στις αγωγές αυτές μπορεί να πυροδοτήσει την εμφάνιση ΠΠ. Στα σκευάσματα που έχουν ενοχοποιηθεί, περιλαμβάνονται ακόμα και φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία και συμπτωματική αντιμετώπιση των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων (31).

Πολύ σημαντική είναι η συσχέτιση που έχει αναγνωριστεί μεταξύ του ΠΠ και της πολλαπλής σκλήρυνσης. Ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας έχουν 5.9-15.4 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν ΠΠ συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό, ενώ εμφανίζουν τη νόσο πάνω από μία δεκαετία νωρίτερα. Επιπλέον, η πολλαπλή σκλήρυνση είναι μακράν το συχνότερο αυτοάνοσο νόσημα που εμφανίζουν ασθενείς με ΠΠ. Παρά του ότι είναι συχνό ασθενείς να εμφανίζουν δύο ή περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα, ανεξάρτητα μεταξύ τους, η στατιστική συσχέτιση που αναδεικνύεται μεταξύ των δύο συγκεκριμένων νοσημάτων ενδεχομένως να κρύβει απαντήσεις για την παθογένεια της νόσου (269, 284). Στην Β' Δερματολογική Κλινική ΑΠΘ, του ΓΝΘ Παπαγεωργίου, όπου διεξήχθη η μελέτη, διαγιγνώσθησαν πολύ λίγοι ασθενείς με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές, που έπασχαν ταυτόχρονα από πολλαπλή σκλήρυνση. Το φαινόμενο αυτό ίσως να εξηγείται από τη νεότερη ηλικία των ασθενών με ΠΠ, ή την ηπιότερη μορφή της νόσου, εξ αιτίας των οποίων δεν

χρήζουν νοσηλείας και η αντιμετώπισή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί και εκτός Νοσοκομείου.

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Στην παρούσα διατριβή εξετάστηκαν μόνο οι τρεις παραλλαγές που αφορούν υποκατάσταση αμινοξέος σε κωδικές περιοχές εξωνίων. Μία επέκταση της μελέτης, θα ήταν ο έλεγχος των παραλλαγών που αφορούν αλλαγή βάσης στις μη κωδικές περιοχές (εσώνια), οι οποίες ενδεχομένως να επηρεάζουν την έκφραση της πρωτεΐνης. Μία τέτοια μελέτη, εξετάζοντας 4 από τις 12 γνωστές παραλλαγές σε περιοχές εσωνίων του γονιδίου *COL17A1*, ανέδειξε συσχέτιση μεταξύ της παραλλαγής c.2268+120T>C (rs34422866) του εσωνίου 28 με την ανάπτυξη πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς (281).

Πέραν της πρωτεΐνης BP180, φαίνεται ότι και η πρωτεΐνη BP 230 εμπλέκεται στην συσχέτιση των δύο νοσημάτων. Θα είχε επομένως ενδιαφέρον η μελέτη των παραλλαγών του γονιδίου *DST* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BP 230, η οποία ίσως δώσει πληροφορίες για την κατανόηση της παθογένειας της συσχέτισης αυτής (219). Αυτό υποστηρίχθηκε και από έρευνα, κατά την οποία ανεδείχθη ότι, οι ασθενείς που εμφάνιζαν αμφότερα τα νοσήματα, παρουσίαζαν ανοσιακή απόκριση έναντι και των δύο αντιγόνων, δηλαδή του BP180 και του BP230. Πιθανώς αυτό να εξηγείται από έκθεση του ανοσοποιητικού στο BP230 που εκφράζεται στο νευρικό ιστό, το οποίο λόγω διασταυρούμενης αντίδρασης, επιτίθεται στις πρωτεΐνες συνοχής του δέρματος, προκαλώντας την εμφάνιση ΠΠ. Αυτό ίσως να υποδηλώνει ότι ο συνδετικός κρίκος των νοσημάτων δεν σχετίζεται με ένα μόνο συγκεκριμένο αντιγόνο (57, 95, 219, 230).

Παρατηρείται στην βιβλιογραφία ότι έχει δοθεί μεγαλύτερη έμφαση στις γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *COL17A1* και τα αντιγόνα και λιγότερη στη μελέτη της βιοχημείας της πρωτεΐνης BP180, η οποία ίσως δώσει ορισμένες απαντήσεις στην κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών των νοσημάτων στα οποία εμπλέκεται. Επιπλέον, δεν έχει μελετηθεί ο ρόλος του BP180 στα διάφορα όργανα, καθότι πέραν των ημιδεσμοσωματίων του δέρματος, το κολλαγόνο αυτό ανευρίσκεται σε πληθώρα ιστών και οργάνων, με άγνωστο ρόλο (265). Σημαντικό βήμα θα ήταν η μελέτη της συσχέτισης της βαρύτητας του ΠΠ και με τα επίπεδα των κυτταροκινών, που ίσως να αναδείξει έναν πιθανό φαρμακευτικό στόχο (101).

Συμπέρασμα

Από τα συνολικά αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, δεν κατέστη δυνατή η εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος για την υπόθεση της συσχέτισης της γενετικής ποικιλότητας του γονιδίου *COL17A1*, με την εκδήλωση πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς σε ασθενείς με νευρολογικές παθήσεις. Κατά την στατιστική ανάλυση, οι περισσότερες συγκρίσεις δεν φάνηκε να έχουν στατιστική σημαντικότητα. Ανευρέθηκαν συσχετίσεις μόνο μεταξύ της κύριας ομάδας μελέτης (BPN) και των ομάδων ελέγχου (BP, C) για την παραλλαγή c.2212G>A (rs805722), οι οποίες όμως δε μπορούν από μόνες τους να αξιολογηθούν, λόγω της μη ισορροπίας Hardy – Weinberg μεταξύ των υγιών μαρτύρων για την παραλλαγή αυτή και της επικράτησής της στον υπό μελέτη πληθυσμό. Η επικράτηση της παραλλαγής rs805722 επηρεάζει αρνητικά την στατιστική ανάλυση των δειγμάτων, οδηγώντας σε πιθανό στατιστικό σφάλμα. Θα ήταν χρήσιμη η περαιτέρω μελέτη των συσχετίσεων αυτών σε μεγαλύτερο δείγμα, για την επιβεβαίωση ή διάψευση των αποτελεσμάτων.

Στους ασθενείς που εμφανίζουν την παραλλαγή rs805708, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα εμφάνισης νευρολογικών νοσημάτων, η οποία είναι 1.6 φορές μεγαλύτερη. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ασθενείς με νόσο Alzheimer, στους οποίους υπήρχε σημαντική διαφορά στην ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό των ασθενών έναντι της πρωτεΐνης BP 180, συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες που δεν εμφάνιζαν νόσημα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Επιπλέον, ο τίτλος αντισωμάτων στον ορό των ασθενών, έχει συσχετιστεί με την βαρύτητα της άνοιας.

Για την παραλλαγή rs17116350 δεν αναγνωρίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων.

Η πρωτεΐνη BP180 επιτελεί πολλές και διαφορετικές διεργασίες, σε ποικιλία οργάνων και ιστών, κάποιες από τις οποίες μελετώνται ακόμη. Η πολυπλοκότητα του μορίου ενδεχομένως να μην επιτρέπει την πλήρη κατανόηση των επιπτώσεων των παραλλαγών υποκατάστασης αμινοξέος (missense mutation) στη συμπεριφορά του μορίου.

Η συνύπαρξη του ΠΠ με τα νευρολογικά νοσήματα έχει αντίκτυπο και στην καθ' ημέρα πράξη. Οι ασθενείς αυτοί πρέπει να αντιμετωπίζονται λαμβάνοντας υπόψιν τους περιορισμούς στην αντιμετώπισή τους λόγω της συννοσηρότητάς τους, καθώς και της αυξημένης θνητότητάς τους. Επιπλέον, η σχέση αυτή είναι χρήσιμη ώστε να μην διαφεύγουν άτυπες μορφές του ΠΠ σε νευρολογικούς ασθενείς.

Η παθογένεια του ΠΠ είναι πολύπλοκη και τα δεδομένα από τις διάφορες μελέτες ολοένα αλλάζουν, άλλοτε αποσαφηνίζοντας τις υπάρχουσες υποθέσεις και άλλοτε απορρίπτοντας τις παλιές, οδηγώντας σε νέες.

Στις περισσότερες μελέτες, λόγω της σπανιότητας του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς, ο αριθμός του δείγματος που ελέγχθηκε είναι σχετικά μικρός, γεγονός που θέτει περιορισμούς στην στατιστική ανάλυση για να αναγνωριστεί η πραγματική συσχέτιση των δύο νοσημάτων και των παθογενετικών μηχανισμών με ασφάλεια.

Ακόμα δεν έχει αποσαφηνιστεί επίσης κατά πόσο η μία νόσος προηγείται της άλλης, ή κατά πόσο αμφότερες είναι το αποτέλεσμα άλλων παθογενετικών μονοπατιών και αιτιών. Χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για να αναγνωριστεί ο ανοσολογικός συνδετικός κρίκος μεταξύ των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων και του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς.

Περίληψη

Το Πομφολυγώδες Πεμφιγοειδές (ΠΠ) είναι μια αυτοάνοση δερματική νόσος, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία υποεπιδερμικών πομφολύγων (φουσαλίδων) και παρουσιάζει αυξημένη επίπτωση σε ηλικιωμένα άτομα. Προκαλείται από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι συστατικών των ημιδεσμοσωματίων της βασικής μεμβράνης, διαταράσσοντας την συνοχή δέρματος – επιδερμίδας.

Πολυάριθμες μελέτες αναφέρονται στην συσχέτιση μεταξύ του ΠΠ και νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. Οι συχνότερες νευρολογικές παθήσεις που έχουν συσχετιστεί με το ΠΠ μέχρι σήμερα, είναι η άνοια, η πολλαπλή σκλήρυνση, τα ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, η νόσος του Parkinson και η νόσος Alzheimer. Η επιδερμίδα, καθώς και το κεντρικό νευρικό σύστημα, έχουν κοινή εμβρυολογική προέλευση εκ του εξωδέρματος. Κοινό εργαστηριακό εύρημα στους ασθενείς που πάσχουν και από τις δύο παθήσεις, είναι η παρουσία αυτοαντισωμάτων στον ορό τους, έναντι κυρίως της πρωτεΐνης BP180 (Col17). Η πρωτεΐνη BP180 έχει κυτταρογενετική θέση στο γονίδιο *COL17A1* του χρωμοσώματος 10 (10q25.1) και ο κυριότερος ρόλος της είναι ως δομικό συστατικό των ημιδεσμοσωματίων. Συναντάται επίσης ως δομικό υλικό και στο κεντρικό νευρικό σύστημα, καθώς και σε άλλους ιστούς με άγνωστη όμως λειτουργία.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης της γενετικής ποικιλότητας του γονιδίου *COL17A1*, με την εκδήλωση πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς σε ασθενείς με νευρολογικές παθήσεις. Η μελέτη αποσκοπεί στην έρευνα της υπόθεσης ότι η πρωτεΐνη Col17 (BP 180) λειτουργεί ως κοινό αντιγόνο που πυροδοτεί μια ανοσολογική απόκριση έναντι του δέρματος και του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Η γενετική ποικιλότητα μπορεί να επηρεάσει την έκφραση της πρωτεΐνης, καθώς και στην περίπτωση υποκατάστασης κάποιου αμινοξέος, την ικανότητα των μορίων MHC να παρουσιάσουν το κολλαγόνο XVII στο ανοσοποιητικό σύστημα και την τάση των περιφερειακών αυτοαντισωμάτων να δεσμεύονται με το μόριο.

Για το γονίδιο *COL17A1* έχουν ταυτοποιηθεί έως τώρα 19 παραλλαγές μεμονωμένων νουκλεοτιδίων (SNVs) εκ των οποίων οι 3 αφορούν αλλαγές σε κωδικές περιοχές του γονιδιώματος και οδηγούν σε υποκατάσταση αμινοξέος (rs805708, rs805722, rs17116350). Στην παρούσα μελέτη έγινε γονοτύπηση των 3 αυτών παραλλαγών σε 4 ομάδες ασθενών:

1. Ασθενείς με ΠΠ και νευρολογικά νοσήματα (BPN - 61 ασθενείς)
2. Ασθενείς με ΠΠ (BP - 57 ασθενείς)
3. Ασθενείς με νευρολογικά νοσήματα (N - 53 ασθενείς)
4. Υγιείς μάρτυρες (C - 60 άτομα)

Ο έλεγχος της γενετικής ποικιλότητας έγινε με τη χρήση μοριακών τεχνικών. Από όλους τους συμμετέχοντες της μελέτης, μετά την συγκατάθεσή τους, έγινε λήψη δείγματος αίματος. Από το κάθε δείγμα απομονώθηκε το γονιδιακό DNA. Με τη χρήση της τεχνικής της PCR πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός των 3 τμημάτων του γονιδίου *COL17A1* που περιλαμβάνουν τα 3 προς εξέταση εξώνια. Για κάθε εξώνιο χωριστά, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ώστε να ταυτοποιηθεί η αλληλουχία στην θέση της παραλλαγής.

Από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, δεν κατέστη δυνατή η εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος για την υπόθεση της συσχέτισης της γενετικής ποικιλότητας του γονιδίου *COL17A1* με την εκδήλωση πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς σε ασθενείς με νευρολογικές παθήσεις. Οι περισσότερες συγκρίσεις δεν φάνηκε να έχουν στατιστική σημαντικότητα. Ανευρέθηκαν ορισμένες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις, οι οποίες όμως δε μπορούν από μόνες τους να αξιολογηθούν, λόγω της μη ισορροπίας Hardy – Weinberg μεταξύ των υγιών μαρτύρων για την παραλλαγή αυτή και της επικράτησής της στον υπό μελέτη πληθυσμό.

Αξιόλογο εύρημα ήταν η επικράτηση της παραλλαγής rs805722 του εξωνίου 27 στον υπό μελέτη πληθυσμό. Η επικράτηση αυτή επηρεάζει αρνητικά την στατιστική ανάλυση των δειγμάτων, οδηγώντας σε πιθανό στατιστικό σφάλμα. Εξίσου σημαντικό αποτέλεσμα, ήταν η αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης νευρολογικού νοσήματος στους ασθενείς που εμφανίζουν την παραλλαγή rs805708 του εξωνίου 10, κατά 1.6 φορές.

Στην βασική ομάδα ελέγχου BPN ανιχνεύθηκαν 10 ασθενείς με αρνητικό τίτλο αντισωμάτων (ELISA) έναντι των πρωτεϊνών BP 180 και BP 230. Στους ασθενείς αυτούς, αφού εξαιρέθηκαν από την ομάδα της μελέτης, ελέγχθηκε ο ορός του αίματος με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Western Blot) για την παρουσία νέων αντιγονικών επιτόπων. Στον ορό των ασθενών ανευρέθηκαν αντισώματα έναντι πρωτεϊνών δέρματος (dermal extract) διαφόρων μοριακών βαρών, οι οποίες όμως δεν κατέστη δυνατό να ταυτοποιηθούν.

Ακόμη, δεν έχει αποσαφηνιστεί το κατά πόσο η μία νόσος προηγείται της άλλης, ή κατά πόσο αμφότερες είναι το αποτέλεσμα άλλων παθογενετικών μονοπατιών και αιτιών. Χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για να αναγνωριστεί ο ανοσολογικός συνδετικός κρίκος μεταξύ των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων και του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς.

Summary

Bullous pemphigoid (BP) is an autoimmune disease of the skin, characterized by the presence of subepidermal bullae, with higher predominance in the elderly. It is caused by autoantibodies against the structural components of the hemidesmosomes of the basal membrane, compromising the dermal-epidermal cohesion.

Correlation between BP and neurodegenerative disorders has been reported in multiple studies. The most common neurological diseases that have been correlated to this day include dementia, multiple sclerosis, stroke, Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Both the epidermis and the central nervous system have common embryologic origin from the ectoderm. Common laboratory finding among the patients suffering from both diseases is the presence of autoantibodies in the serum, mostly against the protein BP 180 (Col17). Protein BP 180 is encoded by the gene *COL17A1* within the chromosome 10 (10q25.1) and its main role is as structural material of the hemidesmosomes. It can also be found as structural material within the central nervous system, as well as in other types of tissue, in which its role remains unknown.

The purpose of this dissertation is the investigation of the possible correlation between the genetic variation of the gene *COL17A1* with the development of bullous pemphigoid in patients with neurological disorders. The study aims to examine the hypothesis that the protein Col17 (BP 180) acts as common antigen which stimulates an immune response against the skin and the central nervous system.

Genetic variation can affect the expression of the protein, and in the case of amino-acid substitution, the ability of the MHC molecules to present collagen XVII to the immune system, as well as the ability of the peripheral autoantibodies to connect with the molecule.

Regarding gene *COL17A1*, 19 variants (SNVs) have been identified, from which only 3 result in changes within coding regions involving amino-acid substitution (rs805708, rs805722 and rs17116350). In this study, these 3 variants were genotyped in 4 groups of patients:

1. Patients with BP and neurological disorders (BPN – 61 patients)
2. Patient with BP (BP – 57 patients)
3. Patient with neurological diseases (N – 53 patients)
4. Controls (C – 60 patients)

Molecular techniques were used to detect the genetic variation. Blood samples were collected from all the participants, after consent was given. From each sample, genomic DNA

was isolated. Using PCR technique, the 3 segments of the gene *COL17A1* containing the exons of interest were multiplied. For each exon, a specific restriction endonuclease was used in order for the sequence at the site of the variant to be identified.

Statistical analysis of the results wasn't able to reveal statistically safe conclusions regarding the hypothesis of the correlation between genetic variation of the gene *COL17A1* and the development of BP in patient with neurological disorders. Most comparisons were not statistically significant. A few statistically significant correlations emerged, which could not be evaluated on their own, due to the Hardy-Weinberg disequilibrium of the control group regarding variant rs805722, as well as the predominance of this variant in the studied population.

A significant finding was the predominance of the variant rs805722 of the exon 27 in the studied population. This predominance had a negative impact on the statistical analysis, leading to possible statistical bias. An equally remarkable result was the increased incidence of neurological disorders, by 1.6 times, in patients presenting the variant rs805708 in exon 10.

In the main group study (BPN), 10 patients were identified with negative ELISA test for BP 180 and BP 230 autoantibodies. The serum of these patients, who were excluded from the group, was tested with immunoblotting (Western Blot) for the presence of new epitopes. Autoantibodies against numerous proteins, of different molecular weights, were found in the serum of the patients, which could not be identified though.

To this day, it is not clear whether one disease precedes the other, or whether both are the result of other pathogenetic pathways and causes. Further investigation is required in order for the immunologic link between neurodegenerative disorders and bullous pemphigoid to be identified.

Βιβλιογραφία

1. Mpoura M, Garyfallos A, Daniilidis M, et al. *Clinical Immunology*. 2nd ed: University Studio Press; 2011.
2. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, et al. *Robbins & Cotran pathologic basis of disease*. 8th ed: Elsevier Saunders; 2010. 185 p.
3. *Autoimmune Bullous Diseases*: Springer. 221 p.
4. Gitlin AD, Nussenzweig MC. Fifty years of B-lymphocytes. *Nature*. 2015;517:139-41.
5. Gawkrödger DJ. Autoimmunity and skin disease. *Brit Med J*. 1987;295:1471-4.
6. Didona D., Di Zenzo G. Humoral Epitope Spreading in Autoimmune Bullous Diseases. *Front Immunol*. 2018;9:779.
7. Elkon K, Skelly S, Parnassa A, et al. Identification and chemical synthesis of a ribosomal protein antigenic determinant in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83(19):7419-23.
8. Prasad S, Kohm AP, McMahon JS, et al. Pathogenesis of NOD diabetes is initiated by reactivity to the insulin B chain 9-23 epitope and involves functional epitope spreading. (201 2) 3 9(4):3 47–53 .
doi:10.1016/j.jaut.2012.04.005. *J Autoimmun*. 2012;39(4):347-53.
9. Chan L., Vanderlugt CJ, Hashimoto T., et al. Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases. *J Invest Dermatol*. 1998;110(2):103-9.
10. Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid diseases. *Lancet*. 2013;381:320-32.
11. Boissier de la Croix de Sauvages F. *Nosologia methodica sistens morborum classes: Juxtà Sydenhami Mentem & Botanicorum Ordinem.: Sumptibus Fratrum de Tournes; 1763*. 382 p.
12. Lever WF. Pemphigus. *Medicine (Baltimore)*. 1953;32(1):1-123.
13. Kershenovich R, Hodak E, Mimouni D. Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid. *Autoimmun Rev*. 2014;13:477-81.
14. Jordon RE, Beutner EH, Witebsky E, et al. Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. *JAMA*. 1967;200:751-6.
15. Tambe S, Haflinger S, Borradori L. Clinical challenges and recent advances in the diagnosis of bullous pemphigoid. *Expert Rev Dermatol*. 2013;8:407-16.
16. Lo Schiavo A, Ruocco E, Brancaccio G, et al. Bullous pemphigoid: etiology, pathogenesis, and inducing factors: facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2013;31:391-9.
17. Tarazona MJM, de Mota ANCM, Gripp AC, et al.. Bullous pemphigoid and neurological disease: statistics from a dermatology service. *An Bras Dermatol*. 2015;90:280-2.
18. Gudi V, White M, Cruickshank N, et al.. Annual incidence and mortality of bullous pemphigoid in the Grampian Region of North-east Scotland. *Br J Dermatol*. 2005;153:424-7.
19. Joly P, Baricault S, Sparsa A, et al.. Incidence and mortality of bullous pemphigoid in France. *J Invest Dermatol*. 2012;132:1998-2004.
20. Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, et al. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris – incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ*. 2008;337:a180.
21. Bourdon-Lanoy E, Roujeau JC, Joly P, et al. Bullous pemphigoid in young patients: a retrospective study of 74 cases. *Ann Dermatol Venereol*. 2005;132(2):115-22.
22. Taquin H, Chiaverini C, JP. L. Spectrum of Clinical Responses to Therapies in Infantile Bullous Pemphigoid. *Pediatr Dermatol*. 2016;33:77-81.
23. Alpsoy E, Akman-Karakas A, Uzun S. Geographic variations in epidemiology of two autoimmune bullous diseases: pemphigus and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res*. 2015;307:291-8.
24. Baican A, Baican C, Chiriac G, et al. Pemphigus vulgaris is the most common autoimmune bullous disease in Northwestern Romania. *Int J Dermatol*. 2010;49:768-74.

25. Nanda A, Dvorak R, Al-Saeed K, et al. Spectrum of autoimmune bullous diseases in Kuwait. *Int J Dermatol.* 2004;43:876-81.
26. Wong SN, Chua SH. Spectrum of subepidermal immunobullous disorders seen at the National Skin Centre, Singapore: a 2-year review. *Br J Dermatol.* 2002;147:476-80.
27. Kridin K, Ludwig RJ. The growing incidence of bullous pemphigoid: overview and potential explanations. *Front Med (Lausanne).* 2018(5):220.
28. Baum S, Sakka N, Artsi O, et al. Diagnosis and classification of autoimmune blistering diseases. *Autoimmun Rev.* 2014;13:482-9.
29. Schmidt E, della Torre R, Borradori L. Clinical features and practical diagnosis of bullous pemphigoid. *Dermatol Clin.* 2011;29:427-38.
30. Korman NJ. Bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol.* 1987;16:907-24.
31. Lai YC, Yew YW, Lambert WC. Bullous pemphigoid and its association with neurological diseases: a systematic review and meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30:2007-15.
32. Washio K, Nakamura A, Fukuda S, et al. A case of lichen planus pemphigoides successfully treated with a combination of cyclosporine a and prednisolone. *Case Rep Dermatol.* 2013;5(1):84-7.
33. Lamberts A, Meijer JM, Jonkman MF. Nonbullous pemphigoid: A systematic review. *J Am Acad Dermatol.* 2018;78:989-95.
34. Schmidt T, Sitaru C, Amber K, et al. BP180- and BP230-specific IgG autoantibodies in pruritic disorders of the elderly: a preclinical stage of bullous pemphigoid? *Br J Dermatol.* 2014;171:212-9.
35. Miyamoto D, Batista DI, Santi CG, et al. Exfoliative erythroderma as a clinical manifestation of autoimmune bullous diseases. *Int J Dermatol.* 2016;55:112-4.
36. Chimanovitch I, Hamm H, Georgi M, et al. Bullous pemphigoid of childhood: autoantibodies target the same epitopes within the NC16A domain of BP180 as autoantibodies in bullous pemphigoid of adulthood. *Arch Dermatol.* 2000;136:527-32.
37. Hooper NM, Karran EH, Turner AJ. Membrane protein secretases. *Biochem J.* 1997;321(2):265-79.
38. Franzke CW, Tasanen K, Schumann H, et al. Collagenous transmembrane proteins: collagen XVII as a prototype. *Matrix Biol.* 2003;22(4):299-309.
39. Hopkinson SB, Findlay K, DeHart GW, et al. Interaction of BP180 (type XVII collagen) and CC6 integrin is necessary for stabilization of hemidesmosome structure. *J Invest Dermatol.* 1998;111(6):1015-22.
40. Hopkinson SB, Jones JCR. The N terminus of the transmembrane protein BP180 interacts with the N-terminal domain of BP230, thereby mediating keratin cytoskeleton anchorage to the cell surface at the site of the hemidesmosome. *Mol Biol Cell.* 2000;11(1):277-86.
41. Ujiie H, Nishie W, Shimizu H. Pathogenesis of bullous pemphigoid. *Dermatol Clin.* 2011;29:439-46.
42. Opelka B., Schmidt E., Goletz S. Type XVII collagen: Relevance of distinct epitopes, complement-independent effects, and association with neurological disorders in pemphigoid disorders. *Front Immunol.* 2022;13:948108.
43. Saniklidou AH, Tighe PJ, Fairclough LC, et al. IgE autoantibodies and their association with the disease activity and phenotype in bullous pemphigoid: a systematic review. *Arch Dermatol Res.* 2018;310:11-28.
44. Holgate S, Smith N, Massanari M, et al. Effects of omalizumab on markers of inflammation in patients with allergic asthma. *Allergy.* 2009;64:1728-36.
45. Miyamoto D, Santi CG, Aoki V, et al. Bullous pemphigoid. *An Bras Dermatol.* 2019;94(2):133-46.
46. Ishiura N, Fujimoto M, Watanabe R, et al. Serum levels of IgE anti-BP180 and anti-BP230 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 2008;49:153-61.

47. Dopp R, Schmidt E, Chimanovitch I, et al. IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in Bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42:577-83.
48. Fairley JA, Baum CL, Brandt DS, et al. Pathogenicity of IgE in autoimmunity: successful treatment of bullous pemphigoid with omalizumab. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:704-5.
49. Iwata Y, Komura K, Kodera M, et al. Correlation of IgE autoantibody to BP180 with a severe form of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol.* 2008;144:41-8.
50. Fang H, Zhang Y, Li N, et al. The autoimmune skin disease bullous pemphigoid: the role of mast cells in autoantibody-induced tissue injury. *Front Immunol.* 2018;9:407.
51. Murrell DF, Daniel BS, Joly P, et al. Definitions and outcome measures for bullous pemphigoid: recommendations by an international panel of experts. *J Am Acad Dermatol.* 2012;66:479-85.
52. Pfitze M, Niedermeier A, Hertl M, et al. Introducing a novel Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) in pemphigus. *Eur J Dermatol.* 2007;17:4-11.
53. Wijayanti A, Zhao CY, Boettiger D, et al. The Reliability, Validity and Responsiveness of Two Disease Scores (BPDAl and ABSIS) for Bullous Pemphigoid: Which One to Use? *Acta Derm Venereol.* 2017;97:24-31.
54. Zhao CY, Murrell DF. Outcome measures for autoimmune blistering diseases. *J Dermatol.* 2015;42(1):31-6.
55. Sárdy M, Kostaki D, Varga R, et al. Comparative study of direct and indirect immunofluorescence and of bullous pemphigoid 180 and 230 enzymelinked immunosorbent assays for diagnosis of bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol Clin.* 2013;69:748-53.
56. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76:4350-4.
57. Taghipour K, Chi CC, Bhogal B, et al. Immunopathological characteristics of patients with bullous pemphigoid and neurological disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013;28(5):569-73.
58. Gammon WR, Fine JD, Forbes M, et al. Immunofluorescence on split skin for the detection and differentiation of basement membrane zone autoantibodies. *J Am Acad Dermatol Clin.* 1992;27:79-87.
59. Murrell DF, Marinovic B., Caux F., et al. Definitions and outcome measures for mucous membrane pemphigoid: recommendations of an international panel of experts. *J Am Acad Dermatol.* 2015;72:168-74.
60. Deaneshpazhooh M., Ghiasi M., Lajevardi V., et al. BPDAl and ABSIS correlate with serum anti-BP180 NC16A IgG but not with anti-BP230 IgG in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res.* 2018;310(3):255-9.
61. Lloyd-Lavery A, Chi CC, Wojnarowska F, et al. The associations between bullous pemphigoid and drug use: a UK case-control study. *JAMA Dermatol.* 2013;149(1):58-62.
62. Bastuji-Garin S, Joly P, Lemordant P, et al. Risk Factors for Bullous Pemphigoid in the Elderly: A Prospective Case-Control Study. *J Invest Dermatol.* 2011;131:637-43.
63. Lopez AT, Khanna T, Antonov N, et al. A review of bullous pemphigoid associated with PD-1 and PD-L1 inhibitors. *Int J Dermatol.* 2018;57:664-9.
64. Brick KE, Weaver CH, Savica R, et al. A population-based study of the association between bullous pemphigoid and neurologic disorders. *J Am Acad Dermatol.* 2014;71:1191-7.
65. Cordel N, Chosidow O, Hellot M, et al. Neurological disorders in patients with bullous pemphigoid. *Dermatology.* 2007;215:187-91.
66. Chen YJ, Wu CY, Lin MW, et al. Comorbidity profiles among patients with bullous pemphigoid: nationwide population-based study. *Br J Dermatol.* 2011;165:593-9.
67. Masouye I, Schmied E, Didierjean L, et al. Bullous pemphigoid and multiple sclerosis: more than a coincidence? Report of three cases. *J Am Acad Dermatol.* 1989;21:63-8.

68. Gebauer K, Cox J, Gartside J, et al. Bullous pemphigoid and multiple sclerosis. *J Am Acad Dermatol.* 1990;23:329.
69. Machet L, Vailiant L, de Muret A, et al. Pemphigoïde bulleuse et sclérose en plaques. A propos d'un cas. *Ann Dermatol Venereol.* 1991;118:47.
70. Kirtschig G, Walkden VM, Venning VA, et al. Bullous pemphigoid and multiple sclerosis: a report of three cases and review of the literature. *Clin Exp Dermatol.* 1995;20:449-53.
71. Kridin K, Cohen AD. Dipeptidyl-peptidase IV inhibitor-associated bullous pemphigoid: A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol.* 2018;2:501-3.
72. Vassilieva S. Drug-induced pemphigoid: bullous and cicatricial. *Clin Dermatol.* 1998;16:379-87.
73. Stavropoulos PG, Soura E, Antoniou C. Drug-induced pemphigoid: a review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014;9:1133-40.
74. Forsti AK, Jokelainen J., Ansakorpi H., et al. Psychiatric and neurological disorders are associated with bullous pemphigoid - a nationwide Finnish Care Register study. *Sci Rep.* 2016;6:37125.
75. Taylor G, Venning V, Wojnarowska F, et al. Bullous pemphigoid and autoimmunity. *J Am Acad Dermatol* 1993;29:181-4.
76. Foureur N, Mignot S, Senet P, et al. Correlation between the presence of type-2 anti-pemphigoid antibodies and dementia in elderly subjects with no clinical signs of pemphigoid. *Ann Dermatol Venereol.* 2006;133(5):439-43.
77. Lindelof B, Islam N, Eklund G, et al. Pemphigoid and cancer. *Arch Dermatol.* 1990;126:66-8.
78. Ogawa H, Sakuma M, Morioka S, et al. The incidence of internal malignancies in pemphigus and bullous pemphigoid in Japan. *J Dermatol Sci.* 1995;9:136-41.
79. Gambichler T, Segert H, Hoxtermann S, et al. Neurological disorders in patients with bullous pemphigoid: clinical and experimental investigations. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29:1758-62.
80. Langan SM, Groves RW, West J. The relationship between neurological disease and bullous pemphigoid: a population-based case-control study. *J Invest Dermatol.* 2011;131:631-6.
81. Fichel F, Barbe C, Joly P, et al. Clinical and immunologic factors associated with bullous pemphigoid relapse during the first year of treatment: a multicenter, prospective study. *JAMA Dermatol.* 2014;150:25-33.
82. Chevalier V, Barbe C, Reguiat Z, et al. Impact of neurological diseases on the prognosis of bullous pemphigoid: a retrospective study of 178 patients. *Ann Dermatol Venereol* 2016;143:179-86.
83. Milani-Nejad N, Zhang M, Kaffenberger J. The association between bullous pemphigoid and neurological disorders: a systematic review. *Eur J Dermatol.* 2017;27(5):472-81.
84. Wilczek A, Sticherling M. Concomitant psoriasis and bullous pemphigoid: coincidence or thogenic relationship? *Int J Dermatol.* 2006;45:1353-7.
85. Muramatsu T, Yamashina Y, Shirai T, et al. UVB irradiation reduces the expression of pemphigoid antigens in organ-cultured normal human skin. *Arch Dermatol Res.* 1994;286:142-4.
86. Vanderlugt CJ, Miller SD. Epitope spreading. *Curr Opin Immunol.* 1996;8:831-6.
87. Sekiya A, Kodera M, Yamaoka T, et al. A case of lichen planus pemphigoides with autoantibodies to the NC16a and C-terminal domains of BP180 and to desmoglein-1. *Br J Dermatol.* 2014;171:1230-5.
88. Pietkiewicz P, Gornowicz-Porowska J, Bowszyc-Dmochowska M, et al. Bullous pemphigoid and neurodegenerative diseases: a study in a setting of a Central European university dermatology department. *Aging Clin Exp Res.* 2016;28:659-63.
89. van Beek N, Lüttmann N, Huebner F, et al. Correlation of Serum Levels of IgE Autoantibodies Against BP180 With Bullous Pemphigoid Disease Activity. *JAMA Dermatol.* 2017;153:30-8.
90. Bernard P, Reguiat Z, Tancrede-Bohin E, et al. Risk factors for relapse in patients with bullous pemphigoid in clinical remission: a multicenter, prospective, cohort study. *Arch Dermatol.* 2009;145:537-42.

91. Chen J, Duan Y, Chen L, et al. Anti-bullous pemphigoid autoantigen BP180 antibodies exist in sera and cerebrospinal fluid samples of patients with stroke and dementia. *J Invest Dermatol*. 2014;134:S26.
92. Wang Y., Mao X., Wang Y., et al. Relapse of Bullous Pemphigoid: An Update on this Stubborn Clinical Problem. *Annals of Medicine*. 2018;50(3):234-9.
93. Sim B, Fook-Chong S, Phoon YW, et al. Multimorbidity in bullous pemphigoid: a case-control analysis of bullous pemphigoid patients with age- and gender-matched controls. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017;31:1709-14.
94. Kokkonen N, Herukka SK, Huilaja L, et al. Increased Levels of the Bullous Pemphigoid BP180 Autoantibody Are Associated with More Severe Dementia in Alzheimer's Disease. *J Invest Dermatol*. 2017;137:71-6.
95. Liu YD, Wang YH, Ye YC, et al. Prognostic factors for mortality in patients with bullous pemphigoid: a meta-analysis. *Arch Dermatol Res*. 2017;309:335-47.
96. Holtsche MM, Goletz S, van Beek N, et al. Prospective study in bullous pemphigoid: association of high serum anti-BP180 IgG levels with increased mortality and reduced Karnofsky score. *Br J Dermatol*. 2018;179:918-24.
97. Joly P, Benichou J, Saiag P, et al. Response to: mortality rate of bullous pemphigoid in a US medical center. *J Invest Dermatol*. 2005;124:664-5.
98. Kridin K, Shihade W, Bergman R. Mortality in Patients with Bullous Pemphigoid: A Retrospective Cohort Study, Systematic Review and Meta-analysis. *Acta Derm Venereol*. 2018;99:72-7.
99. Bystryn JC, Rudolph JL. Why is the mortality of bullous pemphigoid greater in Europe than in the US? *J Invest Dermatol*. 2005;124(3).
100. Gerodimou M., Avgerinou G., Stavropoulos P.G. Current management of bullous pemphigoid. *Hellen Dermatol Venerol Rev*. 2008;19(2):161-5.
101. Liu Y., Wang Y., Chen X., et al. Factors associated with the activity and severity of bullous pemphigoid: a review. *Annals of Medicine*. 2020;52:55-62.
102. Amber KT, Valdebran M, Kridin K, et al. The role of eosinophils in bullous pemphigoid: a developing model of eosinophil pathogenicity in mucocutaneous disease. *Front Med*. 2018;5:201.
103. Castells MC, Irani AM, Schwartz LB. Evaluation of human peripheral blood leukocytes for mast cell tryptase. *J Immunol*. 1987;138(7):2184-9.
104. Tedeschi A, Marzano AV, Lorini M, et al. Eosinophil cationic protein levels parallel coagulation activation in the blister fluid of patients with bullous pemphigoid. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29(4):813-7.
105. Fang H, Shao S, Cao T, et al. Increased expression of NLRP3 inflammasome components and interleukin-18 in patients with bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci*. 2016;83(2):116-23.
106. Chanprapaph K, Ounsakul V, Pruettivorawongse D, et al. Anti-BP180 and anti-BP230 enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis and disease activity tracking of bullous pemphigoid: a prospective cohort study. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2021;39(4):272-8.
107. Cugno M, Marzano AV, Bucciarelli P, et al. Increased risk of venous thromboembolism in patients with bullous pemphigoid. The INVENTEP (INCidence of VENous ThromboEmbolism in bullous Pemphigoid) study. *Thromb Haemost*. 2016;115:193-9.
108. Kirtschig G, Middleton P, Bennett C, et al. Interventions for bullous pemphigoid. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;10:CD002292.
109. Chave TA, Mortimer NJ, Shah DS, et al. Chlorambucil as a steroid-sparing agent in bullous pemphigoid. *Br J Dermatol*. 2004;151:1107-8.
110. Du-Thanh A, Merlet S, Maillard H, et al. Combined treatment with low-dose methotrexate and initial short-term superpotent topical steroids in bullous pemphigoid: an open, multicentre, retrospective study. *Br J Dermatol*. 2011;165:1337-43.

111. Kjellman P, Eriksson H, Berg P. A retrospective analysis of patients with bullous pemphigoid treated with methotrexate. *Arch Dermatol.* 2008;144:612-6.
112. Schmidt E, Kraensel R, Goebeler M, et al. Treatment of bullous pemphigoid with dapsone, methylprednisolone, and topical clobetasol propionate: a retrospective study of 62 cases. *Cutis.* 2005;76:205-9.
113. Bernard P, Antonicelli F. Bullous Pemphigoid: A Review of its Diagnosis, Associations and Treatment. *Am J Clin Dermatol.* 2017;18(4):513-28.
114. Joly P, Roujeau JC, Benichou J, et al. A comparison of oral and topical corticosteroids in patients with bullous pemphigoid. *N Engl J Med.* 2002;346:321-7.
115. Joly P, Roujeau JC, Benichou J, et al. A comparison of two regimens of topical corticosteroids in the treatment of patients with bullous pemphigoid: a multicenter randomized study. *J Invest Dermatol.* 2009;129:1681-7.
116. Venning VA, Taghipour K, Mohd Mustapa MF, et al. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of bullous pemphigoid 2012. *Br J Dermatol.* 2012;167:1200-14.
117. Eming R, Sticherling M, Hofmann SC, et al. S2k guidelines for the treatment of pemphigus vulgaris/foiaceus and bullous pemphigoid. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2015;13:833-44.
118. Feliciani C, Joly P, Jonkman MF, et al. Management of bullous pemphigoid: the European Dermatology Forum consensus in collaboration with the European Academy of Dermatology and Venereology. *Br J Dermatol.* 2015;172:867-77.
119. Borradori L., Van Beek N., Feliciani C., et al. Updated S2 K guidelines for the management of bullous pemphigoid initiated by the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). *JEADV.* 2022;36:1689-704.
120. Williams HC, Wojnarowska F, Kirtschig G, et al. Doxycycline versus prednisolone as an initial treatment strategy for bullous pemphigoid: a pragmatic, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet.* 2017;389:1630-8.
121. Monk E, Shalita A, Siegel DM. Clinical applications of non-antimicrobial tetracyclines in dermatology. *Pharmacol Res.* 2011;63:130-45.
122. Sticherling M, Franke A, Aberer E, et al. An open, multicentre, randomized clinical study in patients with bullous pemphigoid comparing methylprednisolone and azathioprine with methylprednisolone and dapsone. *Br J Dermatol.* 2017;177:1299-305.
123. Li N, Zhao M, Hilario-Vargas J, et al. Complete FcRn dependence for intravenous Ig therapy in autoimmune skin blistering diseases. *J Clin Invest.* 2005;115:3440-50.
124. Li N, Culton D, Diaz LA, et al. Modes of Action of Intravenous Immunoglobulin in Bullous Pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 2018;138:1249-51.
125. Ronaghy A, Streilein RD 3rd. HR. Rituximab decreases without preference all subclasses of IgG anti-BP180 autoantibodies in refractory bullous pemphigoid (BP). *J Dermatol Sci.* 2014;74:93-4.
126. Fuertes de Vega I, Iranzo-Fernández P, Mascaro-Galy JM. Bullous pemphigoid: clinical practice guidelines. *Actas Dermosifiliogr.* 2014;105:328-46.
127. Cai SC, Allen JC, Lim YL, et al. Mortality of bullous pemphigoid in Singapore: risk factors and causes of death in 359 patients seen at the National Skin Centre. *Br J Dermatol.* 2014;170:1319-26.
128. Cortes B, Marazza G, Naldi L, et al. Mortality of bullous pemphigoid in Switzerland: a prospective study. *Br J Dermatol.* 2011;165:368-74.
129. Gual A, Mascaro JM Jr, Rojas-Farreras S, et al. Mortality of bullous pemphigoid in the first year after diagnosis: a retrospective study in a Spanish medical centre. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014;28:500-6.
130. Penha MA, Farat JG, Miot HA, et al. Quality of life index in autoimmune bullous dermatosis patients. *An Bras Dermatol.* 2015;90:190-4.

131. Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, et al. Parkinson's disease and Parkinsonism in a longitudinal study: Two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology*. 2000;55:1358-63.
132. Radhakrishnan DM, Goyal V. Parkinson's disease: A review. *Neurol India*. 2018;66:26-35.
133. Gorelick PB, Testai FD, Hankey GJ, et al.. *Hankey's Clinical Neurology*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2014.
134. Mashur KF, Neuman M. *Duale Reihe Neurologie (Νευρολογία)*. 6th ed: Ippokratis; 2011.
135. Weintraub D, Aarsland D, Chaudhuri KR. The neuropsychiatry of Parkinson's disease: advances and challenges. *Lancet Neurol*. 2022;21(1):89-102.
136. Hall J. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 12th ed: Parisianou; 2013.
137. Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, et al. 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol*. 2012;9:13-24.
138. Liu TW, Chen CM, Chang KH. Biomarker of neuroinflammation in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2022;23(8):4148.
139. Warner TT, Schapira AH. Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003;53:16-23.
140. Aludin S, Schmill LPA. MRI Signs of Parkinson's Disease and Atypical Parkinsonism. *Rofo*. 2021;193(12):1403-10.
141. Rizzo G, Copetti M, Arcuti S, et al. Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson's disease: A systematic review and meta- analysis. *Neurology*. 2016;86:566-76.
142. Mahlkecht P, Hotter A, Hussl A, et al. Significance of MRI in diagnosis and differential diagnosis of Parkinson's disease. *Neurodegener Dis*. 2010;7:300-18.
143. LeWitt PA, Fahn S. Levodopa therapy for Parkinson's disease: A look backward and forward. *Neurology*. 2016;86:3-12.
144. Palhagen S, Heinonen E. Use of selegiline as monotherapy and in combination with levodopa in the management of Parkinson's disease: Perspectives from the MONOCOMB study. *Progress in Neurotherapeutics and Neuropsychopharmacology*. 2008;3:49-71.
145. Muller T. Catechol-O-methyltransferase inhibitors in Parkinson's disease. *Drugs*. 2015;75:157-74.
146. Jagadeesan AJ, Murugesan R, Vimala Devi S, et al. Current trends in etiology, prognosis and therapeutic aspects of Parkinson's disease: a review. *Acta Biomed*. 2017;88(3):249-62.
147. Abbruzzese G, Marchese R, Avanzino L, et al. Rehabilitation for Parkinson's disease: Current outlook and future challenges. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016;22(1):60-4.
148. Brust J et al. *Current Neurology, Diagnosis and Treatment*. 2nd ed: McGraw Hill.
149. Donkor ES. Stroke in the 21(st) Century: A Snapshot of the Burden, Epidemiology, and Quality of Life. *Stroke Res Treat*. 2018.
150. Katan M., Luft A. Global Burden of Stroke. *Semin Neurol*. 2018;38:208-11.
151. Herpich F., Rincon F. Management of Acute Ischemic Stroke. *Crit Care Med*. 2020;48(11):1654-63.
152. Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. 1999;22:391-7.
153. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24:35-41.
154. O'Donnell MJ, Chin SL, Rangarajan S., et al. Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. *Lancet*. 2016;388(10046):761-75.
155. Longo DL, et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18th ed. New York: McGraw Hill; 2011.

156. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, et al. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2018;49:46-99.
157. Sandercock PAG. The International Stroke Trial (IST): A randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19 435 patients with acute ischaemic stroke. *Lancet*. 1997;349:1569-81.
158. Lugaresi E, Medori R, Montagna P, et al.. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamiv nuclei. *New England Journal of Medicine*. 1986;315(16):997-1003.
159. Morin CM, Vallieres A, Guay B, et al.. Cognitive behavioral therapy, singly and combined with medicatino, for persistent insomnia: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2009;301(19):2005-15.
160. McGilton KS, Davis AM, Naglie G, et al.. Evaluation of patient-centered rehabilitation model targeting older persons with a hip fracture, including those with cognitive impairment. *BMC Geriatrics*. 2013;13(1):1-8.
161. Draper B. *Understanding Alzheimer's disease and other dementias*. 1st ed: Jessica Kingsley Publishers; 2013.
162. Hall AJ, BFebrey S, Goodwin VA. Physical interventions for people with more advanced dementia - a scoping review. *BMC Geriatrics*. 2021;21:675.
163. Raz L., Knoefel J., Bhaskar K. The neuropathology and cerebrovascular mechanisms of dementia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36:172-86.
164. Li Q, Wu Y, Chen J, et al.. Microglia and immunotherapy in Alzheimer's Disease. *Acta Neurol Scand*. 2022;145(3):273-8.
165. Spanic E, Langer HL, Hof PR, et al.. Role of microglial cells in Alzheimer's disease tau propagation. *Front Aging Neurosci*. 2019;11:271.
166. Monfared AATM, Byrnes MJ, White LA, et al. Alzheimer's Disease: Epidemiology and Clinical Progression. *Neurol Ther*. 2022;11:553-69.
167. Abubakar MT, Sanusi KO, Ugusman A, et al. Alzheimer's Disease: An Update and Insights Into Pathophysiology. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2022;14.
168. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:101-12.
169. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, et al. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3. 1989:519-26.
170. Hayman BT, Phelps CH, Beach TG, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2012;8(1):1-13.
171. Orterga RL, Dakterzada F, Arias A, et al. Usefulness of CSF Biomarkers in Predicting the Progression of Amnesic and Nonamnesic Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease. *Curr Aging Sci*. 2019;12(1):35-42.
172. Rauchmann BS, Schneider-Axmann T, Perneczky R. Associations of longitudinal plasma p-tau181 and NfL with tau-PET, Abeta-PET and cognition. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2021;92:1289-95.
173. Garcia-Morales V, Gonzalez-Acedo A, Melguizo-Rodriguez L, et al. Current Understanding of the physiology, Diagnosis and Therapeutic Approach to Alzheimer's Disease. *Biomedicines*. 2021;9.
174. Singh K, Cheung BM, Xu A. Ultrasensitive detection of blood biomarkers of Alzheimer's and Parkinson's diseases: A systematic review. *Biomark Med*. 2021;15:1693-708.
175. Thijssen EH, La Joie R, Strom A, et al. Plasma phosphorylated tau 217 and phosphorylated tau 181 as biomarkers in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration: A retrospective diagnostic performance study. *Lancet Neurol*. 2021;20:739-52.
176. Leuzy A, Janelidze S, Mattsson-Carlgrén N, et al. Comparing the Clinical Utility and Diagnostic Performance of CSF P-Tau181, P-Tau217, and P-Tau231 Assays. *Neurology*. 2021;97:e1681-94.

177. Karas GB, Scheltens P, Rombouts SA, et al. Global and local gray matter loss in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *NeuroImage*. 2004;23:708-16.
178. Liu Y, Zhang Y, Zheng X, et al. Galantamine improves cognition, hippocampal inflammation, and synaptic plasticity impairments induced by lipopolysaccharide in mice. *J Neuroinflamm*. 2018;15:112.
179. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*. 2020;25:5789.
180. Chang CW, Shao E, Mucke L. Tau: Enabler of diverse brain disorders and target of rapidly evolving therapeutic strategies. *Science*. 2021;371.
181. Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG. Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *J Cent Nerv Syst Dis*. 2020;12.
182. Ascherio A, Munger KL. Epidemiology of multiple sclerosis: from risk factors to prevention-an update. *Semin Neurol*. 2016;36:103-14.
183. Reich DS, Lucchinetti CF, VCalabresi PA. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2018;378:169-80.
184. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple Sclerosis: 2017 revisions of the McDonald Criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17:162-73.
185. Li H, Hu F, Zhang Y, et al. Comparative efficacy and acceptability of disease-modifying therapies in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a systematic review and network meta-analysis. *J Neurol*. 2020;267:3489-98.
186. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83:278-89.
187. McKay KA, Kwan V, Duggan T, et al. Risk factors associated with the onset of relapsing-remitting and primary progressive multiple sclerosis: a systematic review. *Biomed Res Int*. 2015.
188. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2015;14:183-93.
189. Sorensen PS, Fox RJ, Comi G. The window of opportunity for treatment of progressive multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2020;33:262-70.
190. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, et al. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*. 2000;47:707-17.
191. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2015;14:406-19.
192. Kunkl M, Frasca S, Amormino C, et al. Helper cells: the modulators of inflammation in multiple sclerosis. *Cells*. 2020;9:482.
193. Jakimovski D, Kolb C, Ramanathan M, et al. Interferon b for multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018.
194. Group TISS. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebocontrolled trial. *Neurology*. 1993;43:655.
195. Duda PW, Schmier MC, Cook SL, et al. Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2000;105:967-76.
196. Comi G, Cohen JA, Arnold DL, et al. Phase III dose-comparison study of glatiramer acetate for multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2011(69):75-82.
197. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006;354:899-910.
198. Subei AM, Cohen JA. Sphingosine 1-phosphate receptor modulators in multiple sclerosis. *CNS drugs*. 2015;29:565-75.

199. Yang JH, Rempe T, Whitmire N, et al. Therapeutic Advances in Multiple Sclerosis. *Front Neurol.* 2022;13:824926.
200. Calabresi PA, Radue E-W, Goodin D, et al. Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 2014;13:545-56.
201. Comi G, Kappos L, Selmaj KW, et al. Safety and efficacy of ozanimod versus interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis (SUNBEAM): a multicentre, randomised, minimum 12-month, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 2019;18:1009-20.
202. Granqvist M, Boremalm M, Poorghobad A, et al. Comparative effectiveness of rituximab and other initial treatment choices for multiple sclerosis. *JAMA Neurol.* 2018;75:320-7.
203. Beutler E. Cladribine (2-chlorodeoxyadenosine). *Lancet.* 1992;340:952-6.
204. Giovannoni G, Comi G, Cook S, et al. A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2010;342:416-26.
205. O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, et al. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2011;365:1293-303.
206. Claudepierre T, Manglapus MK, Marengi N, et al. Collagen XVII and BPAG1 expression in the retina: evidence for an anchoring complex in the central nervous system. *J Comp Neurol.* 2005;487:190-203.
207. Seppanen A, Autio-Harmanen H, Alafuzoff I, et al. Collagen XVII is expressed in human CNS neurons. *Matrix Biol.* 2006;25:185-8.
208. Stinco G, Codutti R, Scarbolo M, et al. A retrospective epidemiological study on the association of bullous pemphigoid and neurological diseases. *Acta Derm Venereol.* 2005;85:136-9.
209. Teixeira VB, Cabral R, Brites MM, et al. Bullous pemphigoid and comorbidities: a case-control study in Portuguese patients. *An Bras Dermatol.* 2014;89:274-9.
210. Chosidow O, Doppler V, Bensimon G, et al. Bullous pemphigoid and amyotrophic lateral sclerosis: a new clue for understanding the bullous disease? *Arch Dermatol.* 2000;136:521-4.
211. Jedlickova H, Hlubinka M, Pavlik T, et al. Bullous pemphigoid and internal diseases – A case-control study. *Eur J Dermatol.* 2010;20:96-101.
212. Foureur N, Descamps V, Lebrun-Vignes B, et al. Bullous pemphigoid in a leg affected with hemiparesia: a possible relation neurological diseases with bullous pemphigoid? *Eur J Dermatol.* 2001;11:230-3.
213. Tsuruta D, Nishikawa T, Yamagami J, et al. Unilateral bullous pemphigoid without erythema and eosinophil infiltration in a hemiplegic patient. *J Dermatol.* 2012;39:787-9.
214. Taghipour K, Chi CC, Vincent A, et al. The association of bullous pemphigoid with cerebrovascular disease and dementia: a case-control study. *Arch Dermatol.* 2010;146:1251-4.
215. Shen AL, Lin HL, Lin HC, et al. Increased Risk of Bullous Pemphigoid after First-Ever Stroke: A Population-Based Study. *Neurodegener Dis.* 2017;17(4-5):166-70.
216. Yu Phuan CZ, Yew YW, Tey HL. Bullous pemphigoid and antecedent neurological diseases: an association with dementia. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2017;83(4):457-61.
217. Messingham KAN, Aust S, Helfenberger J, et al. Autoantibodies to Collagen XVII Are Present in Parkinson's Disease and Localize to Tyrosine-Hydroxylase Positive Neurons. *J Invest Dermatol.* *J Invest Dermatol.* 2016;136:721-3.
218. Wang Y, Mao X, Wang D, et al. Anti-BP180 Autoantibodies Are Present in Stroke and Recognize Human Cutaneous BP180 and BP180-NC16A. *Front Immunol.* 2019;10:236.
219. Laffitte E, Burkhard PR, Fontao L, et al. Bullous pemphigoid antigen 1 isoforms: potential new target autoantigens in multiple sclerosis? *Br J Dermatol.* 2005;152:537-40.

220. Leung CL, Zheng M, Prater SM, et al. The BPAG1 locus: Alternative splicing produces multiple isoforms with distinct cytoskeletal linker domains, including predominant isoforms in neurons and muscles. *J Cell Biol.* 2001;154:691-7.
221. Seppanen AO. Both bullous pemphigoid antigens are expressed in the central nervous system. *Br J Dermatol.* 2012;166:683-4.
222. Seppanen A. Collagen XVII: A Shared Antigen in Neurodermatological Interactions? *Clin Dev Immunol.* 2013;ePub.
223. Seppanen A, Suuronen T, Hofmann SC, et al. Distribution of collagen XVII in the human brain. *Brain Res.* 2007;1158(1):50-6.
224. Brown A, Bernier G, Mathieu M, et al. The mouse dystonia musculorum gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1. *Nat Genet.* 1995;10:301-6.
225. Li L, Chen J, Wang B, et al. Sera from patients with bullous pemphigoid (BP) associated with neurological diseases recognized BP antigen 1 in the skin and brain. *Br J Dermatol.* 2009;160:1343-5.
226. Barrick BJ, Ida CM, Laniosz V, et al. Bullous Pemphigoid, Neurodegenerative Disease, and Hippocampal BP180 Expression: A Retrospective Postmortem Neuropathologic Study. *J Invest Dermatol Clin.* 2016;136:2090-2.
227. Kunzli K, Favre B, Chofflon M, et al. One gene but different proteins and diseases: the complexity of dystonin and bullous pemphigoid antigen 1. *Exp Dermatol.* 2016;25:10e6.
228. Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, et al. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *Lancet Neurol.* 2016;15:455e532.
229. Garcia-Estevéz DA, Peon-Curras G, Bal-Nieves F. Bullous pemphigoid and amyotrophic lateral sclerosis. *Revista de Neurologia.* 2008;47(10):525-6.
230. Chen J, Li L, Chen J, et al. Sera of elderly bullous pemphigoid patients with associated neurological diseases recognize bullous pemphigoid antigens in the human brain. *Gerontology.* 2011;57(3):211-6.
231. Taghipour K, Kirtschig G, Palace J, et al. The association of multiple sclerosis with bullous pemphigoid: is there a shared antigen response? *J Am Acad Dermatol.* 2012;67(1):160-1.
232. Vernal S., Julio T., Cruz F., et al. . Bullous Pemphigoid Associated with Ischemic Cerebrovascular Accident and Dementia: Exclusive Blistering Lesions on the Upper Hemiparetic Limb. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2018;26(2):179-82.
233. Kasperkiewicz M, Zillikens D. The pathophysiology of bullous pemphigoid. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2007;33:66-77.
234. Delgado JC, Turbay D, Yunis EJ, et al. A common major histocompatibility complex class II allele HLA-DQB1*0301 is present in clinical variants of pemphigoid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:8569-71.
235. Setterfield J, Theron J, Vaughan RW, et al. Mucous membrane pemphigoid: HLA-DQB1*0301 is associated with all clinical sites of involvement and may be linked to antibasement membrane IgG production. *Br J Dermatol.* 2001;145:406-14.
236. Yancey KB, Egan CA. Pemphigoid: clinical, histologic, immunopathologic, and therapeutic considerations. *JAMA.* 2000;284:350-6.
237. Budinger L, Borradori L, Yee C, et al. Identification and characterization of autoreactive T cell responses to bullous pemphigoid antigen 2 in patients and healthy controls. *J Clin Invest.* 1998;102:2082-9.
238. Amber KT, Zikry J, Hertl M. A multi-hit hypothesis of bullous pemphigoid and associated neurological disease: Is HLA-DQB1*03:01, a potential link between immune privileged antigen exposure and epitope spreading? *HLA.* 2017;89(3):127-34.
239. Nishie W. Collagen XVII Processing and Blistering Skin Diseases. *Acta Derm Venereol.* 2020;100(5).

240. Noe MH, Messingham K, Aust S, et al.. Bullous pemphigoid patients exhibit increased markers of immunosenescence. Annual Meeting of the SID; 6th-9th May 2015; Atlanta, USA2015.
241. Kiss M, Husz S, Janossy T, et al. Experimental bullous pemphigoid generated in mice with an antigenic epitope of the human hemidesmosomal protein BP230. *J Autoimmun.* 2005;24:1-10.
242. Feldrihan V, Licarete E, Florea F, et al. IgG antibodies against immunodominant C-terminal epitopes of BP230 do not induce skin blistering in mice. *Hum Immunol.* 2014;75:354-63.
243. Kulthanan K, Chularojanamontri L, Tuchinda P, et al. Prevalence and clinical features of Thai patients with bullous pemphigoid. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2011;29(1):66-72.
244. Casas-de-la-Asuncion E, Ruano-Ruiz J, Rodriguez-Martin AM, et al. Association between bullous pemphigoid and neurologic diseases: a case-control study. *Actas Dermosifiliogr.* 2014;105(9):860-5.
245. Kwan Z, Lai YN, Ch'ng CC, et al. The Association Between Bullous Pemphigoid and Neurological Disorders in A Selected Malaysian Population. *Med J Malaysia.* 2015;70(2):81-5.
246. Winsey S., Lonie L., Allen J., et al. Genetic variation in COL17A1 and the development of bullous pemphigoid. *Exp Dermatol.* 2004;13:140-7.
247. Gatalica B, Pulkkinen L, Kehua L, et al. Cloning of the human type XVII collagen gene (COL17A1), and detection of novel mutations in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet.* 1997;60:352-65.
248. Schumann H, Hammami-Hausli N, Pulkkinen L, et al. Three novel homozygous point mutations and a new polymorphism in the COL17A1 gene; relatio to biological and clinical phenotypes of junctional epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet.* 1997;60:1344-53.
249. Franzke CW, Bruckner P, Bruckner-Tucerman L. Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology. *J Biol Chem.* 2005;280(6):4005-8.
250. Kadler KE, Badlock C., Bella J., et al. Collagens at a glance. *Journal of Cell Science.* 2007;120(12):1955-8.
251. Franzke CW, Has C., Schulte C., et al. C-Terminal Truncation Impairs Glycosylation of Transmembrane Collagen XVII and Leads to Intracellular Accumulation. *J Biol Chem.* 2006(281):30260-8.
252. Nishie W, Natsuga K, Iwata H, et al. Context-dependent regulation of collagen XVII ectodomain shedding in skin. *Am J Pathol.* 2015;185:1361-71.
253. Nishie W, Jackow J, Hofmann SC, et al. Coiled coils ensure the physiological ectodomain shedding of collagen XVII. *J Biol Chem.* 2012;287:29940-8.
254. Hofmann SC, Voith U, Schonau V, et al. Plasmin plays a role in the in vitro generation of the linear IgA dermatosis antigen LADB97. *J Invest Dermatol.* 2009;129:1730-9.
255. Schumann H, Baetge J, Tasanen K, et al. The shed ectodomain of collagen XVII/ BP180 is targeted by autoantibodies in different blistering skin diseases. *Am J Pathol.* 2000;156:685-95.
256. Toyonaga E, Nishie W, Izumi K, et al. C-terminal processing of collagen XVII induces neoepitopes for linear IgA dermatosis autoantibodies. *J Invest Dermatol.* 2017;137:2552-9.
257. Nishie W. Update on the pathogenesis of bullous pemphigoid: an autoantibody-mediated blistering disease targeting collagen XVII. *J Dermatol Sci.* 2014;73:179-86.
258. Lin L, Betsuyaku T, Heimbach L, et al. Neutrophil elastase cleaves the murine hemidesmosomal protein BP180/type XVII collagen and generates degradation products that modulate experimental bullous pemphigoid. *Matrix Biol.* 2012;31:38-44.
259. Stahle-Backdahl M, Inoue M, Guidice GJ, et al. 92-kD gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of recombinant 180-kD bullous pemphigoid autoantigen. *J Clin Invest.* 1994;93:2022-30.
260. Liu Y., Ho C., Wen D., et al. Targeting the stem cell niche: role of collagen XVII in skin aging and wound repair. *Theranostics.* 2022;12(15):6446-54.
261. Seppanen A, Miettinen R, Alafuzoff I. Neuronal collagen XVII is localized to lipofuscin granules. *NeuroReport.* 2010;21(17):1190-4.

262. Poliakova K, Adebola A, Leung CL, et al. BPAG1a and b associate with EB1 and EB3 and modulate vesicular transport, Golgi apparatus structure, and cell migration in C2.7 myoblasts. *PLoS One*. 2014.
263. McGrath JA, Gatalica B, Christiano AM, et al. Mutations in the 180-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2), a hemidesmosomal transmembrane collagen (COL17A1), in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Nat Genet*. 1995;11:83-6.
264. Van den Bergh F, Eliason SL, Burmeister BT, et al. Collagen XVII (BP180) modulates keratinocyte expression of the proinflammatory chemokine, IL-8. *Exp Dermatol*. 2012;21:605-11.
265. Tuusa J., Kokkonen N., Tasanen K. BP180/Collagen XVII: A Molecular View. *Int J Mol Sci*. 2021;22:12233.
266. Royo JL. Hardy Weinberg Equilibrium Disturbances in Case-Control Studies Lead to Non-conclusive Results. *Cell J*. 2021;22(4):572-4.
267. Schmidt E., Kasperkiewicz M., Joly P. Pemphigus. *Lancet*. 2019;394(10201):882-94.
268. Chen X., Zhang Y., Luo Z., et al. Prognostic factors for mortality in bullous pemphigoid: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2022;17(4):e0264705.
269. Forsti AK, Huilaja L, Schmidt E, et al. Neurological and psychiatric associations in bullous pemphigoid-more than skin deep? *Exp Dermatol*. 2017;26:1228-34.
270. Hurskainen T., Kokkonen N., Sormunen R., et al. Deletion of the major bullous pemphigoid epitope region of collagen XVII induces blistering, autoimmunization and itching in mice. *J Invest Dermatol*. 2015;135:1303-10.
271. Bardhan A., Bruckner-Tuderman L., Chapple ILC, et al. Epidermolysis bullosa. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6(1):78.
272. Has C., Bauer JW, Bodemer, et al. Consensus Reclassification of Inherited Epidermolysis Bullosa and Other Disorders with Skin Fragility. *Br J Dermatol*. 2020;183:614-27.
273. Condrat I., He Y., Cosgarea R., et al. Junctional Epidermolysis Bullosa: Allelic Heterogeneity and Mutation Stratification for Precision Medicine. *Front Med*. 2019;5:363.
274. Moilanen JM, Kokkonen N., Loffek S., et al. Collagen XVII expression correlates with the invasion and metastasis of colorectal cancer. *Hum Pathol*. 2015;46:434-42.
275. Laval S., Laklai H., Fanjul M., et al. Dual roles of hemidesmosomal proteins in the pancreatic epithelium: the phosphoinositide 3-kinase decides. *Oncogene*. 2014;33:1934-44.
276. Krenacs T., Kiszner G., Stelkovic E., et al. Collagen XVII is expressed in malignant but not in benign melanocytic tumors and it can mediate antibody induced melanoma apoptosis. *Histochem Cell Biol*. 2012;138:653-67.
277. Kiritsi D., Kern JS, Schumann H., et al. Molecular Mechanisms of Phenotypic Variability in Junctional Epidermolysis Bullosa. *J Med Genet*. 2011;48:450-7.
278. Kroeger J., Hoppe E., Galiger C., et al. Amino Acid Substitution in the C-Terminal Domain of Collagen XVII Reduces Laminin-332 Interaction Causing Mild Skin Fragility with Atrophic Scarring. *Matrix Biol*. 2019;80:72-84.
279. Has C, Kiritsi D, Mellerio JE, et al. The missense mutation p.R1303Q in type XVII collagen underlies junctional epidermolysis bullosa resembling Kindler syndrome. *J Invest Dermatol*. 2014;134(3):845-9.
280. Cozzani E, Di Zenzo G, Gasparini G, et al. Autoantibody Profile of a Cohort of 54 Italian Patients with Linear IgA Bullous Dermatitis: LAD-1 Denoted as a Major Auto-antigen of the Lamina Lucida Subtype. *Acta Derm Venereol*. 2020;100(4):adv00070.
281. Tabatabaei-Panah PS, Moravvej H, Alirajab M, et al. COL17A1 gene polymorphisms are frequent in bullous pemphigoid. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2021;35(8):e535-8.
282. Ali A, Hu L, Zhao F, et al. BPAG1, a distinctive role in skin and neurological diseases. *Semin Cell Dev Biol*. 2017(69):34-9.

283. Papakonstantinou E, Limberg M M, Gehring M, et al. Neurological disorders are associated with bullous pemphigoid. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019;33(5):925-9.
284. Kibsgaard L, Rasmussen M, Lamberg A, et al. Increased frequency of multiple sclerosis among patients with bullous pemphigoid: a population-based cohort study on comorbidities anchored around the diagnosis of bullous pemphigoid. *Br J Dermatol*. 2017;176(6):1486-91.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παράρτημα Ι

ΘΕΣ/ΝΙΚΗ/...../.....

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΑΣΘΕΝΗ

Τίτλος έρευνας: «Συσχέτιση της γενετικής ποικιλότητας του Col17A1, με την εκδήλωση Πομφολυγώδους Πεμφιγοειδούς σε ασθενείς με Νευρολογικές Παθήσεις»

Ο/Η κάτωθι υπογεγραμμένος/νη.....
του..... ετών..... κάτοικος.....

μετά από λεπτομερή ενημέρωση από τους θεράποντες ιατρούς μου, συγκατατίθεμαι να συμμετάσχω στην παραπάνω μελέτη καθώς και στις κλινικές, θεραπευτικές και επιδημιολογικές πληροφορίες που αφορούν την πορεία της νόσου μου, ώστε να χρησιμοποιηθούν για ερευνητικούς λόγους, με την ελπίδα να προσφέρουν χρήσιμα επιστημονικά συμπεράσματα και υπό την προϋπόθεση ότι διασφαλίζονται απόλυτα τα ευαίσθητα προσωπικά δεδομένα μου και τηρούνται οι κανόνες ηθικής και δεοντολογίας σύμφωνα με την συνθήκη του Helsinki.

Ο συμμετέχων ερευνητής ιατρός μου, μου εξήγησε τις λεπτομέρειες της μελέτης, ενώ διατηρώ επίσης και το δικαίωμα να υποβάλω επιπρόσθετες ερωτήσεις.

Εάν επιθυμώ περισσότερες πληροφορίες για την μελέτη και για τα δικαιώματά μου ως συμμετέχων/ουσα σε αυτή, μπορώ να απευθυνθώ και στους επιβλέποντες καθηγητές για περαιτέρω ενημέρωση.

Η συμμετοχή μου στην μελέτη είναι ηθελημένη και μπορώ να διακόψω τη συμμετοχή μου σε αυτή οποιαδήποτε χρονική στιγμή, χωρίς κάποια προκατάληψη ή ποινή εναντίον μου, όσον αφορά την συνέχιση της ιατρικής μου φροντίδας και όλες τις παρεχόμενες προς το άτομο μου ιατρικές υπηρεσίες.

Ο/Η ΥΠΟΓΡΑΦΩΝ/ΟΥΣΑ

Ο ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ ΙΑΤΡΟΣ