



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: «Αντιγονοειδικές ανοσιακές αποκρίσεις παθογόνων σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα»

υπό

Παπαγιάννη Ευαγγελία

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Διευθυντής Κλινικής Ρευματολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, Επιβλέπων
- Ρηγοπούλου Ειρήνη, Καθηγήτρια Παθολογίας Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Δαρδιώτης Ευθύμιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Διευθυντής Νευρολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο ΠΜΣ «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»

Λάρισα, Οκτώβριος 2023



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

FACULTY OF MEDICINE

MASTER PROGRAM IN

“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**TITLE: “ANTIGEN-SPECIFIC IMMUNE RESPONSES AGAINST
PATHOGENS IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNE DISEASES”**

By

Papagianni Evangelia

Thesis' Committee:

- Bogdanos Dimitrios, Professor of Pathology and Autoimmune Diseases of Faculty of Medicine of University of Thessaly, Director of Department of Rheumatology and Autoimmune Diseases of University General Hospital of Larissa, Supervisor
- Rigopoulou Eirini, Professor of Pathology of Faculty of Medicine of University of Thessaly
- Dardiotis Efthymios, Associate Professor of Neurology of Faculty of Medicine of University of Thessaly, Director of Department of Neurology of University General Hospital of Larissa

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in MSc “Clinical Applications of Molecular Medicine”

Larissa, October 2023

Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική εργασία θα ήταν αδύνατο να διεξαχθεί, χωρίς την αρωγή τόσο των συνεργατών μου στο εργαστήριο και στην κλινική που την πραγματοποίησα, όσο και της οικογένειάς μου. Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Ρευματολογίας και Αυτοάνοσων νοσημάτων του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κύριο Μπόγδανο Δημήτριο, που μου έδωσε την ευκαρία να ενταχθώ στο δυναμικό του ερευνητικού εργαστηρίου του και να ολοκληρώσω με επιτυχία την διπλωματική ερευνητική εργασία μου. Οι πολύτιμες συμβουλές, η καθοδήγηση και το ενδιαφέρον του αποτέλεσαν σημαντική βοήθεια κατά την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου, όντας ο ίδιος επιβλέπωντας καθηγητής. Θερμά ευχαριστώ επιθυμώ να αποδώσω και στα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νευρολογίας κύριο Δαρδιώτη Ευθύμιο και την Καθηγήτρια Παθολογίας κυρία Ρηγοπούλου Ειρήνη, που δέχθηκαν να συμμετέχουν ολοκληρώνοντας την σύσταση της τριμελούς επιτροπής της διπλωματικής εργασίας μου. Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τον ιατρό και βιολόγο κύριο Λιάσκο Χρήστο για την πάντοτε έγκαιρη ανταπόκριση όποτε τον χρειάστηκα κατά την διεξαγωγή του πειράματος της εργασίας μου στο εργαστήριο, καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές του στην συγγραφή της επίσης. Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδακτορικό φοιτητή του εργαστηρίου μας, ιατρό και μοριακό βιολόγο κύριο Ευθυμίου Γεώργιο για την συμβολή του σε συγγραφικό και πειραματικό επίπεδο της εργασίας, αλλά συγχρόνως και για την προθυμία του να με βοηθήσει όποτε το χρειαζόμουν, εμψυχώνοντας με κάθε φορά. Ακόμη τον ευχαριστώ και για την παροχή των δεδομένων και των αποτελεσμάτων του πειράματος για τους υγιείς μάρτυρες που μου επέτρεψε και ενέταξα στη δική μου εργασία, βοηθώντας με στην ολοκλήρωση της μελέτης μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου μας, απόφοιτο των ιατρικών εργαστηρίων κυρία Πατρικίου Ελένη, τόσο για την καθοδήγηση που μου προσέφερε στο πειραματικό πρωτόκολλο της εργασίας μου, όσο και για την άμεση πρόσβαση στις κλινικές πληροφορίες του βιολογικού υλικού της εργασίας μου αλλά και την καθημερινή της στήριξη σε προσωπικό επίπεδο. Θα ήταν παράλειψη να μην αποδώσω την ευγνωμοσύνη μου στους ιατρούς και νοσηλευτές των κλινικών Ρευματολογίας και Αυτοάνοσων νοσημάτων και Νευρολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας για την βοήθειά τους στην συλλογή του βιολογικού υλικού και των κλινικών πληροφοριών των ατόμων που χρησιμοποίησα στην διπλωματική εργασία μου. Ευχαριστώ την ειδικεύομενη ιατρό κυρία Ασλανίδου Παρασκευή για την παροχή των δημογραφικών και κλινικών πληροφοριών του βιολογικού υλικού της μελέτης μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συνεργάτιδες μου στο εργαστήριο προπτυχιακές φοιτήτριες Ζάχαρη Σοφία και Καριπίδου Αθανασία για την καθημερινή ψυχολογική υποστήριξη και άψογη

συνεργασία μας κατά τη διάρκεια της πραγμάτωσης της εργασίας μου στα πλαίσια του εργαστήριου. Τέλος, ευχαριστώ εκ βάθέων την οικογένειά μου, τον πατέρα μου Παπαγιάννη Δημήτριο, τη μητέρα μου Σίμου Ανθή και την αδερφή μου Παπαγιάννη Χριστίνα, που παραμένουν δίπλα μου σε κάθε επιστημονικό και μη εγχείρημά μου, βοηθώντας με να ολοκληρώσω τους στόχους μου.

Περίληψη

Η παρούσα ερευνητική εργασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια διερεύνησης της πιθανής συσχέτισης μεταξύ των χυμικών αντιγονοειδικών ανοσοαποκρίσεων έναντι των παθογόνων Epstein-Barr (EBV), Human Cytomegalovirus (HCMV) και *Helicobacter pylori* (HP) και της παθογένειας της μυασθένειας Gravis (MG). Η μυασθένεια Gravis είναι μία αυτοάνοση νόσος με μυική αδυναμία που μπορεί να προκληθεί από λοιμώξεις. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσει την πιθανή συσχέτιση μεταξύ των ανοσοεπικρατούντων χυμικών αντιγονοειδικών ανοσοαποκρίσεων έναντι των ιών EBV, HCMV και του βακτηρίου HP σε ασθενείς με MG. Δεκαοκτώ ασθενείς με MG και 22, 36 και 49 υγιείς μάρτυρες (HC) δοκιμάστηκαν για αντιγονοειδική αντιδραστικότητα IgG αντισώματος έναντι των EBV, HCMV και HP αντίστοιχα διαμέσου της ανοσοαποτύπωσης (Euroimmun, Γερμανία). Όσον αφορά τον EBV στους MG, υψηλότερες αντιδραστικότητες και τίτλοι εμφανίστηκαν έναντι του p79.EBNA-1 (100% p=0,053, 57,8±21,3 AU p=0,053) και του p41.VCA (55,6% p=0,004, 21,7±8,1 AU, p=0,006), συγκρινόμενα με τους υγιείς μάρτυρες HCs (77,3% p=0,053, 74,9±28,4 AU, p=0,053 και 9,1% p=0,004, 12,5±0,7 AU, p=0,006 αντίστοιχα). Αντίστοιχα για τον HCMV στους MG μόνο τα αντισώματα αντι-UL57 (38,5%, p<0,001) και αντι-UL83 (61,5%, p=0,011) έδειξαν χαμηλότερη συχνότητα στους MG σε σύγκριση με τους HCs (96,2%, p<0,001 και 96,2%, p=0,011 αντίστοιχα). Τέλος, για το HP στους MG, τα αντισώματα αντι-p120-CagA (52,5±28,7 AU, p=0,034), αντι-p67-FSH (24,8±9,6 AU, p=0,004), αντι-p50 (19,2±7,1 AU, p<0,001), αντι-p41 (22,5±0,7 AU, p=0,004), αντι-p29-OMP (26±6,1 AU, p=0,003), αντι-p19-OMP (19,4±5,2 AU, p=0,05) και αντι-p17 (21±4,6 AU, p=0,018) είχαν χαμηλότερους τίτλους στους MGs συγκρινόμενα με τους HCs (77,7±42,3 AU, p=0,034, 46,4±32,1 AU, p=0,004, 40,8±22,1 AU, p<0,001, 43,1±24,4 AU, p=0,004, 61,8±49,8 AU, p=0,003, 42,7±32,1 AU, p=0,005) και (42,2±24,1 AU, p=0,018) αντίστοιχα. Σε αντίθεση με τον HCMV και το HP, οι αντιγονοειδικές αντιδραστικότητες έναντι του EBV ήταν πιο διαδεδομένες και ισχυρότερες στους MGs σε σύγκριση με τους HCs, γεγονός που υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο σε αυτή τη νόσο.

Λέξεις-κλειδιά: Μυασθένεια Gravis, EBV, HCMV, HP, αντιγόνα, ανοσοαποτύπωση κατά Western, ανοσοαπόκριση, αυτοάνοσα νοσήματα.

Abstract

This research work is the first attempt to investigate the possible correlation between humoral antigen-specific immune responses against the pathogens Epstein-Barr (EBV), Human Cytomegalovirus (HCMV) and *Helicobacter pylori* (HP) and the pathogenesis of myasthenia Gravis. Myasthenia Gravis (MG) is an autoimmune disease with muscular weakness which can be triggered by infections. The aim of this study was to investigate the possible correlation between concurrent humoral antigen-specific immune responses EBV, HCMV and HP in patients with MG. Eighteen patients with MG and 22, 36 and 49 healthy controls (HC) were tested for antigen-specific IgG antibody reactivity against EBV, HCMV and HP respectively by immunoblotting (Euroimmun, Germany). Concerning EBV in MG, higher reactivities and magnitudes were shown against p79.EBNA-1 (100% $p=0.053$, 57.8 ± 21.3 AU $p=0.053$) and p41.VCA (55.6% $p=0.004$, 21.7 ± 8.1 AU $p=0.006$), compared to HCs (77.3% $p=0.053$, 74.9 ± 28.4 AU, $p=0.053$ and 9.1% $p=0.004$, 12.5 ± 0.7 AU $p=0.006$ respectively). Accordingly, for HCMV in MG only anti-UL57 (38.5%, $p<0.001$) and anti-UL83 antibodies (61.5%, $p=0.011$) showed a lower frequency in MGs compared to HCs (96.2%, $p<0.001$ and 96.2%, $p=0.011$ respectively). Finally, for HP in MG anti-p120-CagA (52.5 ± 28.7 AU, $p=0.034$), anti-p67-FSH (24.8 ± 9.6 AU, $p=0.004$), anti-p50 (19.2 ± 7.1 AU, $p<0.001$), anti-p41 (22.5 ± 0.7 AU, $p=0.004$), anti-p29-OMP (26.0 ± 6.1 AU, $p=0.003$), anti-p19-OMP (19.4 ± 5.2 AU, $p=0.05$) and anti-p17 (21.0 ± 4.6 AU, $p=0.018$) antibodies had lower magnitudes in MGs compared to HCs (77.7 ± 42.3 AU, $p=0.034$, 46.4 ± 32.1 AU, $p=0.004$, 40.8 ± 22.1 AU, $p<0.001$, 43.1 ± 24.4 AU, $p=0.004$, 61.8 ± 49.8 AU, $p=0.003$, 42.7 ± 32.1 AU, $p=0.05$) and (42.2 ± 24.1 AU, $p=0.018$) respectively. In contrast to HCMV and HP, antigen-dependent EBV reactivities were more prevalent and stronger in MG compared to HCs pointing towards a putative role in that disease.

Keywords: Myasthenia Gravis, EBV, HCMV, HP, antigens, Western blot immunoprinting, immune response, autoimmune diseases.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	2
Περίληψη	4
Abstract	5
Περιεχόμενα	6
Συντομογραφίες/Συντμήσεις	10
A. Γενικό μέρος-Εισαγωγή	14
1. Ανοσοποιητικό σύστημα και αυτοανοσία	14
1.1. Μηχανισμοί με τους οποίους επάγεται η αυτοανοσία	17
1.2. Αυτοανοσία και αυτοαντισώματα	21
1.3. Δομή αυτοαντισωμάτων	21
1.4. Τάξεις & ισότυποι των αντισωμάτων	23
2. Μυασθένεια Gravis	24
2.1. Φυσιολογική δομή νευρομυικής σύναψης	25
2.2. Λειτουργία φυσιολογικής σε δομή νευρομυικής σύναψης	26
2.3. Δομή της νευρομυικής σύναψης στην μυασθένεια Gravis	26
2.4. Δομή του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (Achetylcholine Receptor, AChR)	27
2.5. Ταξινόμηση της μυασθένειας Gravis σε υποτύπους	28
2.5.1. Ταξινόμηση της ασθένειας με βάση την ηλικία των μυασθενικών ατόμων	29
2.5.2. Ταξινόμηση με βάση το αντιγόνο-στόχο των αυτοαντισωμάτων που δημιουργούνται	29
2.5.3. Ταξινόμηση με βάση την σοβαρότητα των συμπτωμάτων της μυασθένειας Gravis	29
2.5.4. Ταξινόμηση με βάση τις ανωμαλίες του θύμου αδένος	30
2.5.5. Ταξινόμηση με βάση το προφίλ των υποομάδων των IgG ανοσοσφαιρινών των μυασθενικών	30
2.6. Συννοσηρότητες και επιπολασμός της μυασθένειας Gravis	30
2.7. Διάγνωση και διαφοροδιάγνωση της μυασθένειας Gravis	31
2.7.1. Διάγνωση της μυασθένειας Gravis	31
2.7.2. Διαφοροδιάγνωση της μυασθένειας Gravis	33
2.8. Θεραπεία της μυασθένειας Gravis	35
2.9. Αιτιοπαθολογία της μυασθένειας Gravis	38
2.9.1. Γενετική βάση της μυασθένειας Gravis	38

2.9.2.	Επιγενετική βάση της μυασθένειας Gravis	39
2.9.3.	Περιβαλλοντική βάση της μυασθένειας Gravis	43
2.9.4.	Ανοσολογικό υπόβαθρο για την παθογένεια της μυασθένειας Gravis	45
3.	Δομή παθογόνων μικροοργανισμών της υπό μελέτη εργασίας	47
3.1.	Epstein-Barr ιός (Epstein-Barr virus, EBV)	47
3.2.	Ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (Human Cytomegalovirus, HCMV)	50
3.3.	Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (<i>Helicobacter pylori</i> , HP)	54
4.	Σκοπός της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας	58
B.	Ειδικό μέρος	60
5.	Υλικά	60
5.1.1.	Πειραματική διαδικασία που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία.....	62
5.1.2.	Για τον EBV ιό	72
5.1.3.	Για τον HCMV ιό.....	76
5.1.4.	Για το HP βακτήριο.....	78
5.2.	Μέθοδοι.....	83
5.2.1.	Βιολογικό υλικό ασθενών με MG και υγιών μαρτύρων	83
5.2.2.	Ανίχνευση IgG αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western ⁸⁴	
6.	Αποτελέσματα	85
6.1.	Για τον HCMV.....	85
6.1.1.	Υλικά.....	85
6.1.2.	Μέθοδοι	85
6.1.3.	Κλινικές συσχετίσεις	87
6.1.4.	Στατιστική ανάλυση	87
6.1.5.	IgG αντι-HCMV αντισώματα σε ασθενείς με MG	87
6.1.6.	Συχνότητες IgG αντιγονοειδικών HCMV αντισωμάτων σε ασθενείς με MG.....	89
6.1.7.	Τίτλοι IgG αντιγονοειδικών HCMV αντισωμάτων σε ασθενείς με MG	94
6.1.8.	Συσχετίσεις των αντιγονοειδικών HCMV ανοσολογικών αποκρίσεων.....	98
6.2.	Για τον EBV	99
6.2.1.	Κλινικές συσχετίσεις	101
6.2.2.	Στατιστική ανάλυση	101
6.2.3.	IgG αντι-EBV αντισώματα σε MG ασθενείς.....	101
6.2.4.	Συχνότητες IgG αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων σε ασθενείς με MG	102
6.2.5.	Συχνότητες IgG αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων σε ασθενείς με MG	104
6.2.6.	Τίτλοι IgG αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων σε ασθενείς με MG.....	109

6.2.7.	Συσχετίσεις των αντιγονοειδικών EBV ανοσολογικών αποκρίσεων	115
6.3.	Για το <i>HP</i>	116
6.3.1.	Κλινικές συσχετίσεις.....	118
6.3.2.	Στατιστική ανάλυση	118
6.3.3.	IgG αντι- <i>HP</i> αντισώματα σε ασθενείς με MG	118
6.3.4.	Συχνότητες IgG αντιγονοειδικών <i>HP</i> αντισωμάτων σε ασθενείς με MG.....	120
6.3.5.	Τίτλοι IgG αντιγονοειδικών <i>HP</i> αντισωμάτων σε ασθενείς με MG	125
6.3.6.	Συσχετίσεις των αντιγονοειδικών <i>HP</i> ανοσολογικών αποκρίσεων	132
7.	Συζήτηση	133
	Βιβλιογραφία	141

Επισημαίνεται πως η πειραματική διαδικασία, η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων καθώς και η δημιουργία των γραφικών των εικόνων της παρούσας ερευνητικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν από την υποψήφια (με μοναδική εξαίρεση τα δεδομένα και τα αποτελέσματα του πειράματος που αφορούν τους υγιείς μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας και πραγματοποιήθηκαν από τον Δρ. Ευθυμίου Γεώργιο). Ως εκ τούτου, τα πνευματικά δικαιώματα του συνόλου της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας ανήκουν στην υποψήφια, σύμφωνα με τον Κώδικα Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Συντομογραφίες/Συντμήσεις

MG: Myasthenia Gravis

HC: Healthy Controls

APCs: Antigen Presentig Cells

DCs: Dendritic Cells

MCs: Macrophages Cells

NKs: Natural Killers

NKTs: Natural Killers T Lymphocyte Cells

B cells: B Lymphocyte Cells

T cells: T Lymphocyte Cells

PRRs: Pattern Recognition Receptors

TLRs: T Cell Ligant Receptors

MHC-I: Major Histocompability Complex I

MHC-II: Major Histocompability Complex II

TCR: T Cell Receptor

Abs: Antibodies

CDR: Complementarity-determining regions

IgG: Immunoglobulin G

IgM: Immunoglobulin M

IgA: Immunoglobulin A

AChR: Achetylocholine Receptor

ACh: Achetylocholine

MuSK: Muskarinic Kinase

LRP4: Low density lipoprotein receptor-related protein 4

miRNAs: micro RNAs

lncRNAs: long non-coding RNAs

tRNAs: transporter RNAs

circRNAs: circular RNA

IFN- γ : Interferone- γ

IL: Interleukin

HLA: Human Leukocyte Antigen

Th: T helper Cells

EBV: Epstein-Barr Virus

HCMV: Human Cytomegalovirus

HP: Helicobacter pylori

EBNA-1: Epstein-Barr nuclear antigen

EA: Early Epstein-Barr antigen

VCA: Viral capsid antigen of Epstein-Barr

DNA: Deoxyribonucleic acid

RNA: Ribonucleic acid

CpGs: CG islands

GWAS: Genome Wide Association Studies

nm: nanometers

kg: kilogrammes

g: grammes

mg: milligrammes

gp/g: glycoprotein

kb: kilobase

n/N: number

sig: significance

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

W.B.: Western Blot

ATPase: Adenosine triphosphate (ATP)ase

RIG-I: Retinoic acid-inducible gene I

CIP: Calf Intestinal Alkaline Phosphatase for nucleic acid

NAG: N-acetylglycosamine

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

BAFF: B cell activating factor belonging to the TNF family

m²: meters

Da/U: Daltons

DMSO: Dimethyl sulfoxide

RPMI medium: Roswell park memorial institute medium

FBS: Fetal bone serum

FCS: Fetal calf serum

AIRE: Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy

CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4

AGRN: Agrin

CHRNA1: Cholinergic receptor nicotinic alpha 1 subunit (human)

PTPN22: Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 22

TNIP1: TNFAIP3 Interacting Protein 1

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNFR: Tumor Necrosis Factor's Receptor

A. Γενικό μέρος-Εισαγωγή

1. Ανοσοποιητικό σύστημα και αυτοανοσία

Σκοπός του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η αναγνώριση και η αντιμετώπιση των πιθανών μολύνσεων από ξένους για τον οργανισμό μικροοργανισμούς. Η άμυνα του οργανισμού σε τέτοιου είδους απειλές βασίζεται στις δύο μορφές ανοσίας, τη φυσική και την επίκτητη. Η φυσική ανοσία περιλαμβάνει προστατευτικούς μηχανισμούς, όπως είναι το δέρμα του ανθρώπου, οι βλεννογόνοι των οργάνων καθώς και κύτταρα, όπως είναι τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen Presenting Cells, APCs) στα οποία ανήκουν τα δενδριτικά κύτταρα (Dendritic cells, DCs), τα μακροφάγα (Macrophages, MCs), τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (Natural Killers, NKs) και πολλά άλλα. Η φυσική ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή προστασίας του οργανισμού και κυρίως για μολύνσεις που προκαλούνται από μικροοργανισμούς σαν τα βακτήρια. Στην περίπτωση όμως, λοιμώξεων από πιο επίμονους και προσαρμοστικούς μικροοργανισμούς όπως είναι οι ιοί, αναλαμβάνει δράση το σύστημα της επίκτητης ανοσίας. Σε αυτό κύριοι πρωταγωνιστές είναι τα B και T λεμφοκύτταρα, με τα παράγωγά τους, τις κυτταροκίνες και χημειοκίνες. Η ικανότητα του οργανισμού-ξενιστή να αμύνεται έναντι παθογόνων μικροοργανισμών αποδίδεται στην ύπαρξη ενός συνόλου υποδοχέων που αυτός φέρει, γνωστοί ως υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων (pattern-recognition receptors-PRRs). Μέσα σε αυτούς περιλαμβάνονται οι υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors-TLRs), οι υποδοχείς που προσδένουν νουκλεοτίδια και έχουν επικράτεια ολιγομερισμού (Nucleotide-binding and oligomerization domain(NOD)-like receptors-NLRs), οι RIG-I τύπου ελικάσες και μία ομάδα υποδοχέων λεκτίνης τύπου C. Αυτοί ευθύνονται για τη μετάδοση σήματος εντός των κυττάρων του ξενιστή, αυξάνοντας την ικανότητα της αντιγονοπαρουσίασης (Εικόνα 2).

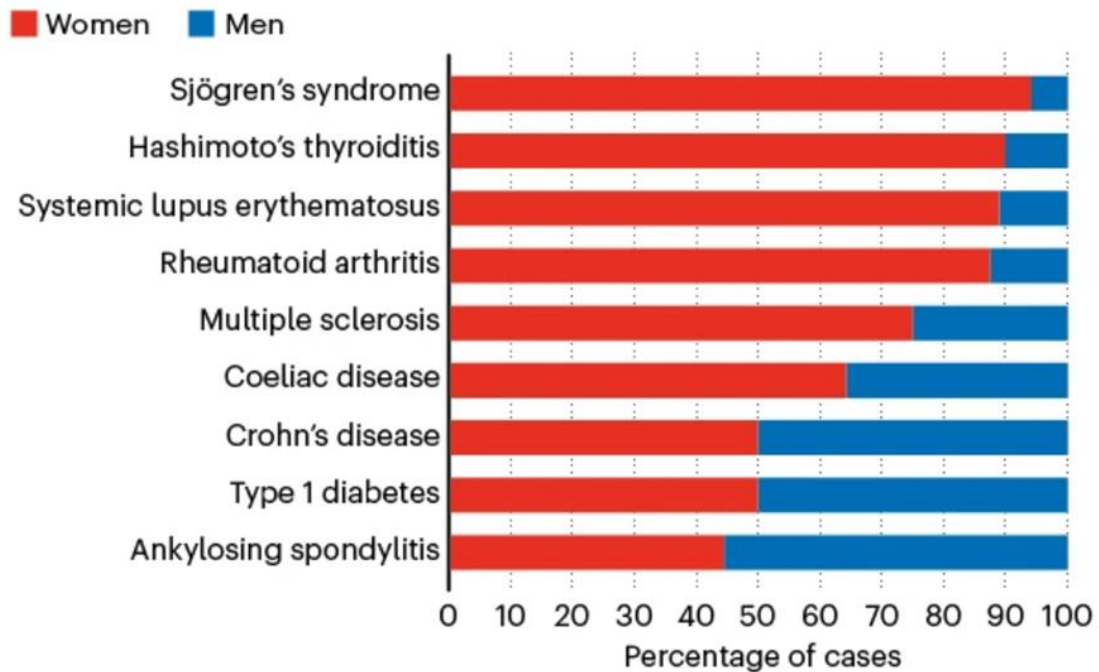
Πολλές φορές, όμως, το ανοσοποιητικό σύστημα διαφεύγει του πρωταρχικού του ρόλου και αντί να αναγνωρίζει αποκλειστικά ξένα, ανιχνεύει μόρια και ουσίες του ίδιου οργανισμού. Τότε καθίσταται το φαινόμενο της αυτοανοσίας, που ορίζεται σύμφωνα με την επιστήμη της ανοσολογίας ως η συνθήκη εκείνη, στην οποία το ίδιο ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει τους δικούς του ιστούς ως ξένους και επιτίθεται σε αυτούς, με αποκορύφωμα την εμφάνιση των αυτοάνοσων νοσημάτων. Η έννοια της αυτοανοσίας περιγράφηκε για πρώτη φορά από την Γερμανό επιστήμονα Πάουλ Έρλιχ (Paul Ehrlich) στα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Ο Έρλιχ, αρχικά, πρότεινε ότι το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να διακρίνει τον εαυτό του από τα ξένα σώματα, ώστε να μην επιτίθεται ενάντια στα δικά του κύτταρα και στην συνέχεια περιέγραψε ορισμένες περιπτώσεις, όπου το ανοσοποιητικό αποτύγχανε να αναγνωρίσει τον εαυτό του ως «φίλικό» και

κατά συνέπεια του επιτίθεντο, μία κατάσταση που την ονόμασε «horror autotoxicus» (1). Έχουν αναπτυχθεί μέχρι στιγμής δύο μοντέλα-θεωρίες σχετικά με τη δημιουργία της αυτοανοσίας. Το πρώτο μοντέλο του εαυτού-μη εαυτού αναφέρει πως οποιοδήποτε μη εαυτό αντιγόνο μπορεί να προκαλέσει την ανοσολογική αντίδραση στον οργανισμό-ξενιστή, σε αντίθεση με τα εαυτά ενδογενή αντιγόνα. Η αντίθετη θεωρία διατυπώθηκε από τον Jenre το 1985, στην οποία προτάθηκε πως είναι απαραίτητη μία συνεχή ανοσολογική αντίδραση που να αγνοείται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και να αφορά τα εαυτά αντιγόνα, με στόχο τη φυσιολογική ανοσολογική επιτήρηση. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, τα κύτταρα που αναγνωρίζουν σε θύμο αδένες ή σπλήνα, τα εαυτά αντιγόνα, θα είναι τα μοναδικά που θα επιβιώνουν. Το δεύτερο μοντέλο αφορά τη θεωρία των δύο σημάτων, όπως έχει ονομαστεί. Μάλιστα, αναφέρει πως τα Β και τα Τ λεμφοκύτταρα, απαιτούν εκτός από την αναγνώριση του αντιγόνου, επιπλέον την ύπαρξη συνδιεγερτικών και συνκατασταλτικών σημάτων, για την επιτυχή ανοσολογική απόκριση. Τέλος, η θεωρία κινδύνου, όπως διατυπώθηκε από την Polly Matzinger, πρότεινε πως το ανοσοποιητικό σύστημα είναι απασχολημένο με την προστασία του οργανισμού-ξενιστή από ενδογενείς παράγοντες φθοράς του κυττάρου, από ότι με τη διάκριση εαυτού και μη αντιγόνου. Ενδογενή σήματα θεωρούνται το μηχανικό στρες, η καταστροφή DNA, η υποξία και η διαφορά θερμοκρασίας (2). Σήμερα, τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα αποτελούν πρόκληση ως προς τη διάγνωση και τη θεραπεία των ασθενών κι έτσι η αυτοανοσία εξακολουθεί να προκαλεί το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας.

Το ανοσοποιητικό σύστημα βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία, μεταξύ διεγερτικών και κατασταλτικών σημάτων των ανοσοκυττάρων. Φυσιολογικά η αυτοανοσία εμπεριέχεται σε αυτήν την ισορροπία. Όταν όμως ξεπεραστεί το όριο του ουδού που δημιουργούν τα σήματα αυτά, τότε η φυσιολογική αυτοανοσία καθίσταται παθολογική για τον οργανισμό (3). Στο πλαίσιο της αυτοανοσίας, το ανοσοποιητικό σύστημα βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο και τη ρύθμιση των κυττάρων που συμμετέχουν σε μία διαδικασία, που καλείται φλεγμονή και είναι αρκετά κοινή κατάσταση σε πολλά αυτοάνοσα νοσήματα. Η φλεγμονή χαρακτηρίζεται από την παραγωγή ουσιών (κυτταροκινών, χημειοκινών και ιντερλευκινών) και τη μετανάστευση κυττάρων (λευκοκυττάρων, κυρίως ουδετεροφίλων) σε μία περιοχή όπου έχει υπάρξει κάποια μόλυνση ή τραυματισμός, έπειτα της ύπαρξης ενός ερεθίσματος (εξωγενούς ή ενδογενούς για τον οργανισμό). Τα κύτταρα που συμμετέχουν στη διαδικασία της φλεγμονής, μπορεί να έχουν διττό ρόλο: προστατευτικό ή καταστροφικό σχετικά με την αυτοανοσία, στην οποία τα εαυτά αντιγόνα αναγνωρίζονται ως ξένα ή αλλιώως αντιγονικά για τον οργανισμό. Αναφορικά με τις δύο μορφές της ανοσίας, η φυσική έχει ως σκοπό την άμεση αναγνώριση του ξένου αντιγόνου, με μηχανισμό που στερείται της ανοσολογικής μνήμης. Αντίθετα, η επίκτητη ανοσία, είναι

αντιγονοεξαρτώμενη και ενέχει την ανοσολογική μνήμη, με την τελευταία να επιτυγχάνει την ανοσολογική αντίδραση έναντι του αντιγόνου. Φυσιολογικά, λοιπόν, τα κύτταρα της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας αναγνωρίζουν ξένα για τον οργανισμό-ξενιστή αντιγόνα και εκκινούν τη διαδικασία της ανοσολογικής απόκρισης, με απώτερο σκοπό την εξάλειψη της απειλής από το αντιγόνο. Μάλιστα, τα κύτταρα της επίκτητης ανοσίας εκπαιδεύονται στα πρωτογενή όργανα, όπως είναι ο θύμος αδένας και ο σπλήνας (όπου ωριμάζουν τα T και B λεμφοκύτταρα αντίστοιχα), να αναγνωρίζουν ξένα αντιγόνα και μάλιστα με το σωστό βαθμό χημικής συγγένειας. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας, είναι η δημιουργία ώριμων κλώνων T και B λεμφοκυττάρων, που όποτε χρειαστεί, διαφεύγουν στην περιφέρεια για την αντιμετώπιση μίας πιθανής απειλής. Η άνωθεν διαδικασία είναι αυτή της θετικής επιλογής.

Υπάρχει αντίστοιχα και αυτή της αρνητικής, κατά την οποία, απαλοίζονται κλώνοι T και B λεμφοκυττάρων που προσδένουν σε εαυτά αντιγόνα. Εξαίρεση στα παραπάνω αποτελεί η ύπαρξη των T και B λεμφοκυττάρων, που δεν απαλοίζονται είτε στην περιφέρεια είτε στα πρωτογενή όργανα. Η προστασία έναντι της αυτοανοσίας εξασφαλίζεται στον οργανισμό μέσω της αρνητικής επιλογής των αυτοδραστικών T και B κυττάρων και επίτευξη της ανοσολογικής ανοχής σε αυτά τα κύτταρα. Όσα λεμφοκύτταρα δεν απαλοίζονται με την αρνητική επιλογή και παραμένουν ανεκτικά σε αυτοαντιγόνα που μπορεί να εκτίθενται χωρίς να τα αναγνωρίζουν ονομάζονται κύτταρα σε ανεργία και τα αντιγόνα αυτά κρυπτικά. Η ικανότητα των υποδοχέων των B και T λεμφοκυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος για αναγνώριση του αντιγόνου, βασίζεται στο ίδιο το αντιγόνο που ενεργοποιεί την απόκριση των κυττάρων αυτών προς αυτό κάθε φορά. Το ίδιο το αντιγόνο συγκεκριμένα δύναται να επιλέγει, προσδένεται και ενεργοποιεί την κατάλληλη ομάδα λεμφοκυττάρων, προκαλώντας τα να πολλαπλασιάζονται και να παράξουν τελικά έναν κλώνο, ο οποίος θα φέρει τον ίδιο υποδοχέα έναντι του συγκεκριμένου αντιγόνου στην επιφάνειά του, καταρρίπτοντας την ανοσολογική ανοχή. Ωστόσο, αυτή ως διαδικασία είναι ελλιπής τόσο στα B όσο και στα T λεμφοκύτταρα. Το γεγονός αυτό εγείρει ερωτήματα σχετικά με τους μηχανισμούς και τα αίτια που προκαλούν τη διαταραχή της ανοσολογικής περιφερικής ανοχής, δημιουργώντας πρόσφορο έδαφος για την εμφάνιση των αυτοάνοσων νοσημάτων. Ένα ακόμη παράδοξο γεγονός έρχεται να προστεθεί, σχετικά με την προτίμηση των αυτοάνοσων νοσημάτων στο γυναικείο φύλο, αφού όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, η πλειοψηφία των αυτοάνοσων νοσημάτων εκδηλώνεται στο θηλυκό, παρά στο αντρικό φύλο (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Η διαφορετική συχνότητα εμφάνισης μερικών αυτοάνοσων νοσημάτων ανάμεσα στα δύο φύλα, παρουσιάζοντας μία κυριαρχία στο γυναικείο φύλο.

Για παράδειγμα, το σύνδρομο Sjogren's είναι 16 φορές πιο συχνό στις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες, ενώ η νόσος του Crohn και ο διαβήτης τύπου 1 θεωρείται ότι εμφανίζονται με την ίδια συχνότητα ανάμεσα στα δύο φύλα (4).

1.1. Μηχανισμοί με τους οποίους επάγεται η αυτοανοσία

Η αυτοανοσία έχει συσχετιστεί με την μόλυνση από έναν μολυσματικό παράγοντα σε άτομα που έχουν κάποια γενετική προδιάθεση για αυτή και αυτό έχει αποδειχθεί μέσα από κάποιους μηχανισμούς (5). Η αυτοανοσία που επάγεται από μία μικροβιακή μόλυνση έχει βρεθεί πως προκαλείται μέσα από μια σειρά μηχανισμών, όπως είναι οι κάτωθι:

1. Μοριακή μίμηση (ενεργοποίηση των αυτοδραστικών Β και/ή Τ κυττάρων από μικροβιακά πεπτίδια που έχουν δομικές ομοιότητες με εαυτά πεπτίδια)
2. Επέκταση επιτόπου (επαγόμενη παρουσίαση επιπρόσθετων αυτοαντιγόνων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα σε αυτοδραστικά Τ λεμφοκύτταρα, που έχουν ενεργοποιηθεί από τη φλεγμονή σε μία περιοχή όπου ο ιστός υφίσταται βλάβη, εξαιτίας προηγούμενης ανοσολογικής απόκρισης) (6).
3. Bystander ενεργοποίηση (επέκταση των ήδη ενεργοποιημένων Τ κυττάρων, εξαιτίας του «καταρράκτη» των κυτταροκινών και των χημειοκινών της φλεγμονής, στα πλαίσια μίας μη ειδικής αντιμικροβιακής ανοσολογικής απόκρισης) (6).

4. Ιικά και βακτηριακά υπεραντιγόνα (ενεργοποίηση μεγάλου αριθμού T λεμφοκυττάρων από διαφορετικά αντιγόνα, προερχόμενα από διαφορετικούς παθογόνους μικροοργανισμούς, τα οποία προσδένουν στον υποδοχέα T κυττάρων, ανεξάρτητα της αντιγονικής ειδικότητας του)
5. Κρυπτικά αντιγόνα (ενεργοποίηση των αυτοδραστικών κλώνων των T λεμφοκυττάρων από εαυτά αντιγόνα που βρίσκονται σε χαμηλότερη συγκέντρωση στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και ονομάζονται κρυπτικά επειδή δεν προκαλούν απαλοιφή των κλώνων αυτών. Αντιθέτως, θα ευνοήσουν την επιβίωση και την συμμετοχή τους στο ρεπερτόριο των υπόλοιπων κλώνων των T λεμφοκυττάρων του κάθε ατόμου) (5, 7).

Παρακάτω θα αναλυθούν εκτενέστερα οι τρεις πρώτοι μηχανισμοί, που έχουν βρεθεί να σχετίζονται αρκετά και με την παρουσία της φλεγμονής στο νευρικό σύστημα (5, 6, 8, 9) και ενέχουν ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον (10, 11) για την παθογένεια νευρολογικών αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως είναι αυτό της μυασθένειας Gravis.

Μοριακή μίμηση

Η δυνατότητα των υποδοχέων των T λεμφοκυττάρων να ενεργοποιούνται από διαφορετικά πεπτιδία ενός ή περισσότερων συμπλόκων μείζονος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) των APCs, δημιουργεί πρόσφορο έδαφος για την διασταυρούμενη αντίδραση των ξένων με αντιγόνα εαυτού, που ενεργοποιούν εξίσου τα ίδια T λεμφοκύτταρα. Κάτι αντίστοιχο παρατηρείται και στην περίπτωση των αντισωμάτων των B λεμφοκυττάρων. Στην παραπάνω ιδέα βασίζεται η θεωρία της μοριακής μίμησης, που προτάθηκε από τους Fujinami και Oldstone το 1985 και το 1998 αντίστοιχα. Απαραίτητη προϋπόθεση της θεωρίας αυτής είναι η ύπαρξη της ομοιότητας σε αμινοξική αλληλουχία και γενικότερο σχήμα μεταξύ των πεπτιδίων που προσδένονται σε συμπλέγματα MHC. Αποτέλεσμα αυτού είναι η ενεργοποίηση των αυτοδραστικών T ή B λεμφοκυττάρων, προωθώντας την αυτοανοσία (12).

Η ικανότητα των T κυττάρων να διαφεύγουν των μηχανισμών της κεντρικής ανοχής στο θύμο αδένα, αλλά και αυτής στην περιφέρεια μέσω των T ρυθμιστικών κυττάρων, δείχνει τη δυνατότητά τους να συμμετέχουν στην αιτιοπαθολογία πολλών αυτοάνοσων νοσημάτων. Η δημιουργία μίας ανοσολογικής αντίδρασης μπορεί να επιτευχθεί μέσω του μηχανισμού της μοριακής μίμησης και πολλών μη ειδικών μηχανισμών, όπως είναι το bystander φαινόμενο και τα υπεραντιγόνα. Η ειδοποιός διαφορά μεταξύ των άλλων μη ειδικών μηχανισμών και αυτού της μοριακής μίμησης που εκκινούν την αυτοανοσία έγκειται στο γεγονός πως η μοριακή μίμηση κατευθύνει την ανοσοαντίδραση σε έναν συγκεκριμένο ιστό ή/και όργανο (13). Παρόλο που η

μοριακή μίμηση προτάθηκε ως εξήγηση της αυτοανοσίας που προκαλείται από βακτήρια και ιούς, εντούτοις, επικράτησε ως θεωρία για τους δεύτερους. Ο μηχανισμός της μοριακής μίμησης αποτελεί μέρος της γενικότερης ομπρέλας της διασταυρούμενης αντίδρασης που δύναται να λαμβάνει χώρα μεταξύ των TCR υποδοχέων των T λεμφοκυττάρων και των MHC συμπλόκων, μέσω δομικών ομοιοτήτων. Ωστόσο, η μοριακή μίμηση αφορά ομοιότητες στην αμινοξική αλληλουχία που ενδέχεται να υπάρχει μεταξύ δύο πεπτιδίων, που δεσμεύονται από τον ίδιο TCR υποδοχέα (13). Δυστυχώς, ο μηχανισμός της μοριακής μίμησης δε μπορεί να δώσει όλες τις εξηγήσεις σχετικά με την αιτιοπαθολογία όλων των αυτοάνοσων νοσημάτων. Αυτό δικαιολογείται και από το γεγονός πως απαιτούνται τέσσερις προϋποθέσεις, για να θεωρηθεί ως κύριος μηχανισμός που προκαλεί την αυτοανοσία. Αυτές οι προϋποθέσεις περιλαμβάνουν τα εξής:

- α) ομοιότητα μεταξύ του επιτόπου του εαυτού πεπτιδίου και αυτού του ξένου αντιγόνου
- β) ανίχνευση των αντισωμάτων ή των T λεμφοκυττάρων που αντιδρούν διασταυρούμενα και με τους δύο επιτόπους σε ασθενείς με αυτοάνοσο νόσημα
- γ) επιδημιολογική σύνδεση μεταξύ της έκθεσης σε περιβαλλοντικό παράγοντα ή παθογόνο και της ανάπτυξης του αυτοάνοσου νοσήματος
- δ) επαγωγή της αυτοανοσίας σε πειραματικό ζωικό μοντέλο, εφαρμόζοντας την ενεργοποίηση του ξενιστή-πειραματόζωου με το παθογόνο (14).

Επέκταση επιτόπου

Η επέκταση του επιτόπου ορίζεται ως η διαφοροποίηση της ειδικότητας ενός επίτοπου από τον αρχικό επικρατή επίτοπο, όπως έχει αυτός προκύψει από την ειδική ανοσολογική αντίδραση, έναντι ενός εαυτού ή ξένου αντιγόνου-στόχου, σε μία ποικιλία άλλων ή/και κρυπτικών επιτόπων (ενδομοριακή επέκταση επιτόπου) ή άλλων πρωτεϊνών (διαμοριακή επέκταση επιτόπου) (15). Ουσιαστικά, κατά την συνεχή καταστροφή του ιστού του ξενιστή που μολύνεται από κάποιο παθογόνο μικροοργανισμό, παράγονται επιπρόσθετα αυτοαντιγόνα, εκτός από τα αρχικά που είχαν παραχθεί με την πρώτη ανοσολογική απόκριση. Συνέπεια αυτού είναι η περαιτέρω ενεργοποίηση των ήδη ενεργοποιημένων κλώνων των αυτοδραστικών T λεμφοκυττάρων. Κατά επέκταση, η αρχική μόλυνση οδηγεί στην ενεργοποίηση περισσότερων κλώνων T κυττάρων με επιπλέον εαυτούς επιτόπους (6).

Φαινόμενο της Bystander ενεργοποίησης

Φυσιολογικά η ενεργοποίηση και η διαφοροποίηση των αδιαφοροποίητων CD4⁺ και CD8⁺ T λεμφοκυττάρων σε δραστικά T κύτταρα απαιτεί τρία διαδοχικά σήματα: την σύνδεση των πεπτιδίων των αντιγόνων με το MHC II και I σύμπλοκα αντίστοιχα στους TCRs των T κυττάρων, την ενεργοποίηση των συνδεδεμένων σημάτων ενεργοποίησης και τέλος τη διαφοροποίηση των αδιαφοροποίητων T κυττάρων σε επιμέρους ξεχωριστές ομάδες βοηθητικών και κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων, ανάλογα με το περιβάλλον των κυτταροκινών που επικρατεί. Στην περίπτωση του Bystander φαινομένου, η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων είναι ανεξάρτητη της σηματοδότησης από τον TCR υποδοχέα τους (16). Ουσιαστικά, το φαινόμενο αυτό περιγράφει την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων, δίχως την αναγνώριση ενός ξένου για τον οργανισμό ξενιστή αντιγόνου. Η ενεργοποίηση των CD4⁺ ή/και των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων πραγματοποιείται χάριν της παρουσίας διαφόρων ρυθμιστών της φλεγμονής σε μία περιοχή με βλάβη. Τέτοιοι ρυθμιστές είναι οι κυτταροκίνες ή μόρια σηματοδότησης των TLR υποδοχέων, σε απουσία της ενεργοποίησης των TCR υποδοχέων από κάποιο μικροβιακό αντιγόνο (16). Η ύπαρξη μίας προηγούμενης χρονικά λοίμωξης στον ξενιστή μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών μορίων ανταγωνιστών των TLR υποδοχέων των T κυττάρων. Διαφορετικές κυτταροκίνες προκαλούν την ενεργοποίηση των αυτοδραστικών κλώνων των CD4⁺ και CD8⁺ T λεμφοκυττάρων (ενδεικτικά IL-12, IL18 και IL18,IL-15 για CD4⁺ και CD8⁺ αντίστοιχα) Το Bystander φαινόμενο ενεργοποίησης δύναται να έχει είτε προστατευτικό είτε ενισχυτικό ρόλο στην αυτοανοσία. Εντούτοις, ο ρόλος του εξαρτάται από παράγοντες, μέσα στους οποίους συγκαταλέγονται το είδος του παθογόνου μικροοργανισμού που μολύνει τον ξενιστή, καθώς και ποια είναι η περιοχή της μόλυνσης, τους τύπους των κυτταροκινών που βρίσκονται σε αυξημένη έκφραση κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, το μέγεθος και τη διαφορετικότητα της δεξαμενής με τα CD4⁺ και CD8⁺ T κύτταρα μνήμης που έχει το κάθε άτομο, την φυσιολογική κατάσταση των ιστών, όπου μπορεί να γίνει μία μόλυνση (17).

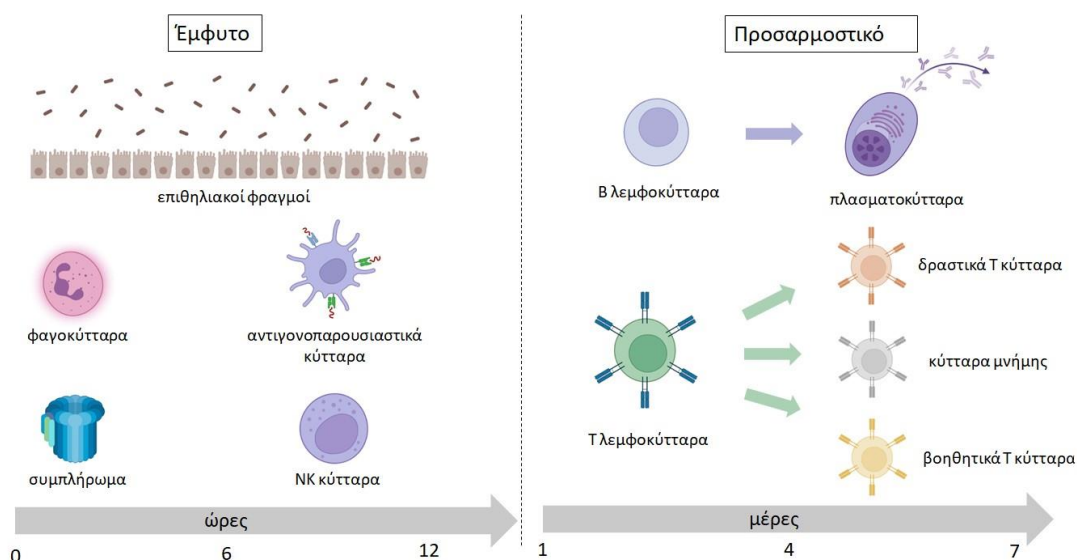
1.2. Αυτοανοσία και αυτοαντισώματα

Η αυτοανοσία ως κατάσταση συνεπάγεται της ενεργοποίησης των Β και Τ λεμφοκυττάρων σε έναν οργανισμό. Τα αντισώματα δείχνουν τη δραστηριότητα των Β λεμφοκυττάρων που έχουν ενεργοποιηθεί, μετά από την συνάντησή τους με κάποιο αντιγόνο. Ως εκ τούτου, ο ποσοτικός και ο ποιοτικός προσδιορισμός τους, αποτελεί σημαντικό όπλο στη φαρέτρα των ερευνητών που ασχολούνται με τη διαχείριση των αυτοάνοσων νοσημάτων. Στα αυτοάνοσα νοσήματα, τα αντισώματα που δημιουργούνται αποκαλούνται αυτοαντισώματα, αφού είναι πρωτεΐνες που επιτίθενται σε ουσίες και μόρια του ίδιου οργανισμού, τα γνωστά εαυτά αντιγόνα. Οι απαρχές της ανίχνευσης των αντισωμάτων μπορούν να αναζητηθούν στα τέλη της δεκαετίας του 50', όπου ο Astrid Fagraeus αναγνώρισε πλασματοκύτταρα που ήταν ενεργά, φτιάχνοντας αντισώματα, αλλά και οι Frank Burnet και David Talmage που διατύπωσαν την θεωρία της επιλογής των κλώνων το 1957. Οι Donath και Landsteiner υπήρξαν οι πρώτοι που αναγνώρισαν μία αυτοάνοση ασθένεια, γνωστή ως Donath-Landsteiner αιμολυτική αναιμία. Εκτός όμως από ετερόλογα, ξένα αντιγόνα που προκαλούσαν την παραγωγή των αντισωμάτων, έχουν βρεθεί και αυτόλογα αντιγόνα. Η μέτρηση των αυτοαντισωμάτων, λοιπόν, είναι αρκετά σημαντική ιδιαίτερα για αυτοάνοσα νοσήματα, στα οποία το παθολογικό ανοσολογικό αίτιο είναι ο σχηματισμός των αυτοαντισωμάτων. Σε αυτά τα νοσήματα συγκαταλέγεται και η μυασθένεια Gravis, που θα αποτελέσει μάλιστα το υπό μελέτη νόσημα της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

1.3. Δομή αυτοαντισωμάτων

Ένα αυτοαντίσωμα έχει φυσιολογικά τη δομή ενός αντισώματος (Εικόνα 3). Αναλυτικότερα, το αντίσωμα ή ανοσοσφαιρίνη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται φυσιολογικά στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων, ενώ συναντάται και σε μορφή διαλυτής πρωτεΐνης, όταν αυτό εκκρίνεται στο αίμα και στους βλεννογόνους. Διακρίνεται για την υψηλή ειδικότητα και χημική συνάφειά του με το αντιγόνο-στόχο που αναγνωρίζει. Η παραγωγή των ανοσοσφαιρινών κωδικοποιείται από συγκεκριμένα γονίδια, που υπάρχουν στο γονιδίωμα του ανθρώπου. Τα παράγωγα των γονιδίων αυτών είναι οι μεταβλητές και οι σταθερές περιοχές, με τις πρώτες να έχουν ως κύριο ρόλο την αναγνώριση του αντιγόνο-στόχου και τις δεύτερες την σύνδεση με άλλα μόρια που συμμετέχουν στην εξάλειψη των αντιγόνων. Τέτοια μόρια είναι αυτά που περιλαμβάνουν υποδοχείς στα φαγοκύτταρα και πρωτεΐνες του συστήματος του συμπληρώματος. Δομικά ένα αυτοαντίσωμα αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες: δύο πανομοιότυπες βαριές (Heavy, H) και δύο πανομοιότυπες ελαφριές (Light, L) αλυσίδες. Κάθε μία από αυτές τις αλυσίδες περιέχει μία μεταβλητή (Variable, V) και μία σταθερή

(Constant, C) περιοχή. Οι τέσσερις αλυσίδες συνδέονται, με σκοπό να σχηματίσουν ένα μόριο με μορφή Y. Κάθε ελαφριά αλυσίδα συνδέεται με μία βαριά και οι δύο βαριές μεταξύ τους. Όλες οι συνδέσεις επισφραγίζονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η κάθε ελαφριά αλυσίδα αποτελείται από μία μεταβλητή και μία σταθερή περιοχή, ενώ η βαριά έχει μία μεταβλητή και τρεις ή τέσσερις σταθερές περιοχές (Εικόνα 2). Η κάθε περιοχή αναδιπλώνεται παίρνοντας μία χαρακτηριστική τρισδιάστατη μορφή στο χώρο, που ονομάζεται περιοχή ανοσοσφαιρίνης. Η περιοχή της ανοσοσφαιρίνης αποτελείται από δύο δομές β-πτυχωτού φύλλου, που συγκρατούνται μεταξύ τους με δισουλφδική γέφυρα. Οι διαδοχικές αλυσίδες κάθε β-πτυχωτού φύλλου συνδέονται με μικρές, προεξέχουσες θηλιές. Στη μεταβλητή περιοχή των ανοσοσφαιρινών, αυτές οι θηλιές δημιουργούν τις τρεις υπερμεταβλητές περιοχές (CDRs), που είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση των αντιγόνων. Κάθε μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας (VH) ή της ελαφριάς αλυσίδας (VL), περιέχει τρεις υπερμεταβλητές περιοχές ή CDRs. Από αυτές, η μεγαλύτερη μεταβλητότητα εμφανίζεται στην CDR3 περιοχή και συνεισφέρει περισσότερο στην πρόσδεση του αντιγόνου. Επιπρόσθετο στοιχείο στη δομή ενός αυτοαντισώματος είναι η ύπαρξη των λειτουργικά διακριτών περιοχών του, όπως προκύπτει μετά από πρωτεόλυση. Το κλάσμα ενός αυτοαντισώματος που περιέχει μία ολόκληρη ελαφριά αλυσίδα (με μονήρεις V και C περιοχές), συνδεδεμένη με την V περιοχή και τις πρώτες C περιοχές της βαριάς αλυσίδας, είναι αυτό που περιέχει το τμήμα του αντισώματος που απαιτείται για την αναγνώριση το αντιγόνου και ονομάζεται Fab (fragment, antigen-binding) ή αλλιώς κλάσμα πρόσδεσης αντιγόνου. Οι υπόλοιπες C περιοχές της βαριάς αλυσίδας αποτελούν την κρυσταλλική περιοχή (fragment, crystalline, Fc) ή αλλιώς κρυσταλλικό κλάσμα. Κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης έχει δύο πανομοιότυπα Fab τμήματα που προσδένονται με το αντιγόνο και ένα Fc τμήμα που είναι υπεύθυνο για τις περισσότερες βιολογικές δραστικές λειτουργίες του αντισώματος. Μεταξύ των Fab και Fc περιοχών υπάρχει συνήθως ένα ευλύγιστο τμήμα, που ονομάζεται περιοχή άρθρωσης, επιτρέποντας την ανεξάρτητη κίνηση της κάθε περιοχής και την πρόσδεσή τους σε αντιγονικούς επιτόπους που απέχουν μεταξύ τους (18).



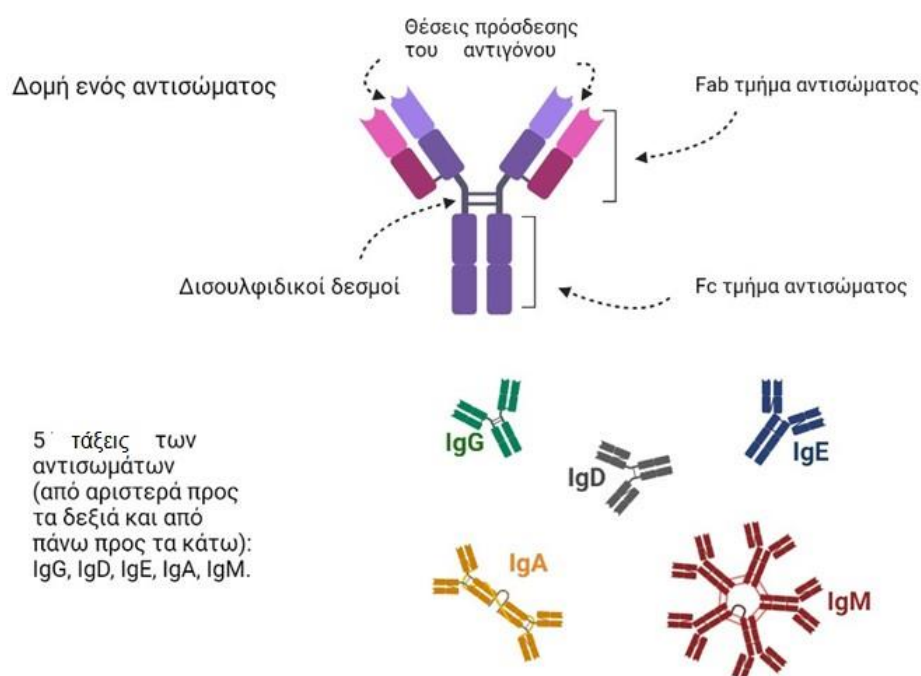
Εικόνα 2: Περιγραφική απεικόνιση των συστατικών στοιχείων του έμφυτου και του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος, που συμμετέχουν στην οργανωμένη ανοσολογική απόκριση ενός οργανισμού-ξενιστή.

1.4. Τάξεις & ισότυποι των αντισωμάτων

Έχουν αναγνωριστεί πέντε διαφορετικοί ισότυποι ανοσοσφαιρινών, με τον κάθε έναν να φέρει μοναδική δομή και λειτουργία. Η διάκριση στους ισότυπους γίνεται με βάση τους διαφορετικούς τύπους βαριών αλυσίδων (μ , δ , γ , ϵ και α), με συνέπεια να προκύπτουν οι εξής τύποι ανοσοσφαιρινών: IgM, IgD, IgG, IgE και IgA (Εικόνα 3). Κάθε ισότυπος έχει διακριτές φυσικές, βιολογικές ιδιότητες και δραστικές λειτουργίες. Όσα ώριμα B λεμφοκύτταρα δεν έχουν συναντήσει κάποιο αντιγόνο, έχουν μεμβρανικά IgM και IgG αντισώματα. Μετά τη διέγερση από ένα αντιγόνο, οι ειδικοί για το αντιγόνο κλώνοι των B λεμφοκυττάρων εξαπλώνονται και διαφοροποιούνται σε απογόνους που εκκρίνουν αντισώματα. Τέλος, η δυνατότητα για μεταστροφή του ισότυπου ή αλλιώς μεταστροφή της τάξης της βαριάς αλυσίδας, μπορεί να παράξει διαφορετικούς τύπους αντισωμάτων από τα αρχικά IgM και IgG. Τη δομή των ανοσοσφαιρινών ολοκληρώνουν οι κ και λ ελαφριές αλυσίδες (είτε κ είτε λ στη κάθε ανοσοσφαιρίνη). Κυρίως στις λοιμώξεις από παθογόνους μικροοργανισμούς μετρώνται τα IgG, IgM και IgA αντισώματα, με σκοπό να προσδιοριστεί ο τύπος και ο χρόνος της λοίμωξης, με τα IgG να είναι ο συχνότερα προσδιοριζόμενος ισότυπος. Από τους τέσσερις IgG ισότυπους (IgG₁, IgG₂, IgG₃ και IgG₄), ο IgG₁ είναι ο πιο συχνός (60-65% των συνολικών υποομάδων IgG) και είναι υπεύθυνος μαζί με τον IgG₃ υπότυπο για τη ρυθμιζόμενη από τον θύμο αδένες ανοσοαπόκριση έναντι των πρωτεϊνικών και πολυπεπτιδικών αντιγόνων. Τα αντίστοιχα ποσοστά

των άλλων ισοτύπων είναι ίσα με 20-25%, 5-10% και 4% για τους IgG₂, IgG₃ και IgG₄ ισοτύπους αντίστοιχα.

Γενικότερα, τα αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται στην πλειοψηφία των αυτοάνοσων νοσημάτων είναι αυτά που συγκαταλέγονται στην ομάδα των γ ανοσοσφαιρινών (IgG). Όσον αφορά τη μυασθένεια Gravis, η πλειοψηφία των αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς είναι στοχευμένα προς τον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης της νευρομυϊκής σύναψης στο μυ. Στην μυασθένεια Gravis, οι ισοτύποι IgG₁, IgG₃ και IgG₄ έχουν άμεση συμμετοχή στον παθογενετικό μηχανισμό του νοσήματος, όπως αυτή θα αναλυθεί παρακάτω (18).



Εικόνα 3: Παρουσίαση της δομής ενός κλασικού αντισώματος και των τάξεων των αντισωμάτων που υπάρχουν.

2. Μυασθένεια Gravis

Αναφορικά με τη μυασθένεια Gravis, είναι γνωστό που πρόκειται για μία αυτοάνοση νόσο ρυθμιζόμενη από αυτοαντισώματα που στοχεύουν συστατικά της νευρομυϊκής σύναψης, με κυριότερα αυτά που δημιουργούνται έναντι του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (Achetylcholine Receptor, AChR), οδηγώντας κλινικά σε αδυναμία των σκελετικών μυών στους ασθενείς που

πάσχουν από το συγκεκριμένο νόσημα. Το σημείο στο οποίο εκκινεί η παθογένεια της μυασθένειας Gravis είναι η νευρομυική σύναψη. Συνεπώς, είναι απαραίτητη η γνώση της δομής αυτής ως σύνολο, αλλά και των επιμέρους συστατικών της, προκειμένου να είναι αντιληπτός ο παθογενετικός μηχανισμός της μυασθένειας Gravis, με απώτερο σκοπό τον καλύτερο σχεδιασμό της θεραπείας της. Έτσι, παρατίθενται παρακάτω η συγκριτική παρουσίαση της δομής μίας νευρομυικής σύναψης ενός υγιούς και ενός μυασθενικού ατόμου.

2.1. Φυσιολογική δομή νευρομυικής σύναψης

Η νευρομυική σύναψη είναι ο χώρος (30 nm) μεταξύ ενός κινητικού νευρώνα και των μυικών ινών ενός σκελετικού μυ. Ο κινητικός νευρώνας επικοινωνεί με τον μυ καθώς, μπορεί να μεταδίδει το ηλεκτρικό σήμα που καλείται δυναμικό ενεργείας σε ξεχωριστές μυϊκές ίνες, αφού αυτός έχει διαχωριστεί σε πολυάριθμα κλαδιά. Τα τελευταία με την σειρά τους καταμερίζονται περαιτέρω, ώστε να σχηματίσουν τα προσυναπτικά νευρικά τελικά άκρα ή αλλιώς κομβία της σύναψης στην επιφάνεια των μυϊκών ινών. Αυτά τα τελικά άκρα εμπεριέχουν πολυάριθμα κυστίδια, που αποθηκεύουν τον νευροδιαβιβαστή της ακετυλοχολίνης. Τα συγκεκριμένα κυστίδια κατανέμονται εντός του τελικού άκρου, αλλά είναι συγκεντρωμένα σε μεγαλύτερο βαθμό κοντά στην περιοχή της προσυναπτικής μεμβράνης του νευρώνα. Η μεμβράνη αυτή εμπεριέχει διαμεμβρανικά κανάλια που επιτρέπουν την διέλευση των ιόντων ασβεστίου και μπορούν να διανοίγουν αποκρινόμενα στις αλλαγές της μεμβράνης από το δυναμικό ενεργείας του νευρώνα. Η συναπτική σχισμή ή αλλιώς τελική πλάκα είναι ένας χώρος με μέγεθος περίπου 20 nm σε εύρος, που διαχωρίζει τα προσυναπτικά από τα μετασυναπτικά άκρα της κυτταρικής μεμβράνης των μυών (σαρκόλυμμα). Η κυτταρική μεμβράνη στην προσυναπτική μεμβράνη ονομάζεται τελική πλάκα και χαρακτηρίζεται από βαθιές εσοχές. Οι κορυφές των εσοχών αυτών είναι εμπλουτισμένες με υποδοχείς ακετυλοχολίνης (Achetylcholine Receptors, AChRs), ενώ τα κανάλια ιόντων ασβεστίου βρίσκονται στο βάθος τους. Άλλο συστατικό της τελικής πλάκας είναι το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης, που είναι υπεύθυνη να διασπά την ακετυλοχολίνη. Παρεμπιπτόντως, άλλες πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες (όπως είναι η αγρίνη, η ραψίνη, ο υποδοχέας χαμηλής σε πυκνότητα λιπροπρωτεΐνης 4 και η κινάση ειδική για το μυ αγγλικές ονομασίες?) ανιχνεύονται στην περιοχή της τελικής πλάκας και είναι σημαντικά για τον σχηματισμό και τη διατήρηση της δομής της νευρομυικής σύναψης (19, 20) (Εικόνα 4).

2.2. Λειτουργία φυσιολογικής σε δομή νευρομυϊκής σύναψης

Η μετάδοση του σήματος στην νευρομυϊκή σύναψη εκκινεί όταν φτάσει το δυναμικό ενεργείας στο τελικό άκρο του νευρώνα. Ουσιαστικά όμως, η αποπόλωση, δηλαδή η διαφορά στο συνολικό μεμβρανικό φορτίο της προσυναπτικής μεμβράνης προκαλεί το άνοιγμα των καναλιών ασβεστίου σε αυτή. Με το άνοιγμα τους, τα ιόντα ασβεστίου εισέρχονται από το εξωκυτταρικό υγρό στο εσωτερικό των νευρώνων, με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται τα μόρια της ακετυλοχολίνης από τα κυστίδια και κατά συνέπεια, να μετακινούνται προς τις ενεργές περιοχές, πάνω από τις σχισμές, όπου βρίσκονται οι υποδοχείς της ακετυλοχολίνης, απελευθερώνοντας την ακετυλοχολίνη εντός της συναπτικής σχισμής (20). Η ακετυλοχολίνη με την σειρά της διαχέεται κατά μήκος της συναπτικής σχισμής προς τις τελικές πλάκες του κινητικού νευρώνα, όπου προσδένει στους αντίστοιχους υποδοχείς της. Αποτέλεσμα αυτού αποτελεί η είσοδος των ιόντων νατρίου εντός των μυϊκών ινών. Αυτή η εισροή των θετικά φορτισμένων ιόντων ονομάζεται δυναμικό τελικής πλάκας και προκαλεί την αποπόλωση της μυϊκής ίνας. Το δυναμικό της τελικής πλάκας ενεργοποιεί το άνοιγμα των καναλιών ασβεστίου στις αναδιπλώσεις ή αλλιώς σχισμές, προκαλώντας μία ακόμα μεγαλύτερη εισροή ιόντων νατρίου και την εξάπλωση του δυναμικού ενεργείας κατά μήκος της μυϊκής ίνας, πυροδοτώντας την μυϊκή σύσπαση.

Ένα σύνολο παραγόντων μπορούν να επηρεάζουν το δυναμικό ενεργείας. Σε αυτούς συγκαταλέγονται η ποσότητα της ακετυλοχολίνης που απελευθερώνεται από τα συναπτικά άκρα, η ενεργότητα του ενζύμου της ακετυλοχολινστερινάσης στην συναπτική σχισμή, οι ιδιότητες αγωγιμότητας και η πυκνότητα των υποδοχέων ακετυλοχολίνης και των καναλιών ασβεστίου στη μετασυναπτική μεμβράνη (21, 22).

2.3. Δομή της νευρομυϊκής σύναψης στην μυασθένεια Gravis

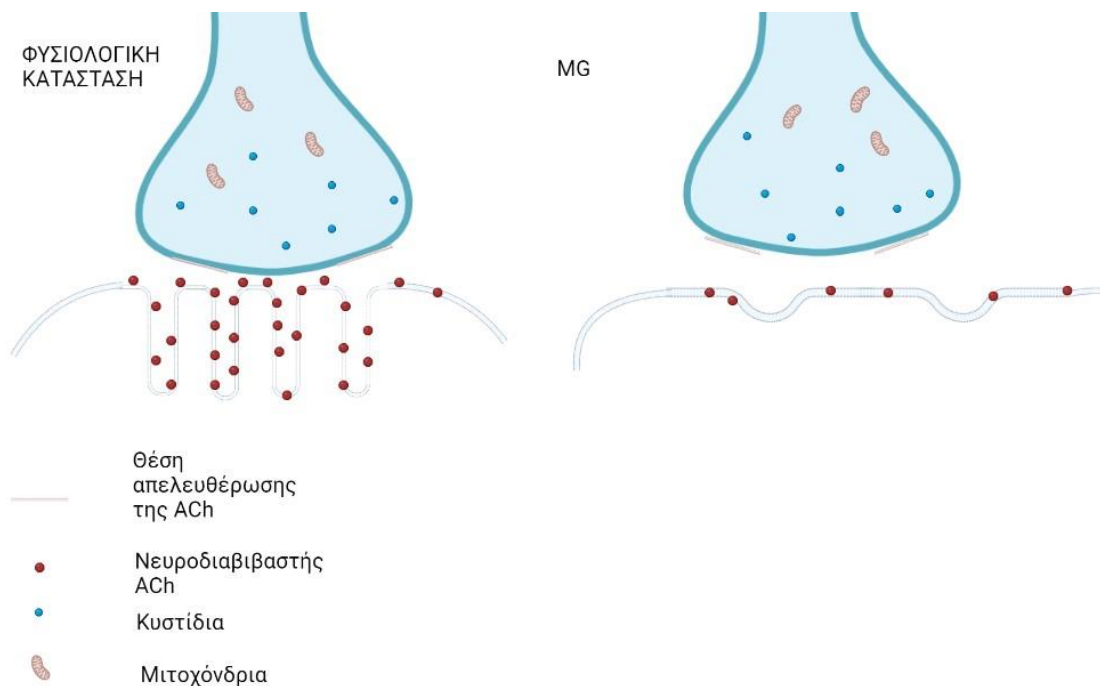
Στην περίπτωση της μυασθένειας Gravis, η νευρομυϊκή σύναψη έχει ίδια δομή, με διαφορετική λειτουργία από εκείνη των υγιών ατόμων. Η βασική αρχή για την σύσπαση του μυός έγκειται στην αποτελεσματική μετάδοση του σήματος στην νευρομυϊκή σύναψη. Η τελευταία εξαρτάται από τον αριθμό των αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν μεταξύ των μορίων της ακετυλοχολίνης και των υποδοχέων αυτής στην περιοχή της νευρομυϊκής σύναψης. Όταν η ακετυλοχολίνη προσδένει στον αντίστοιχο υποδοχέα της, ανοίγει το κανάλι ασβεστίου του υποδοχέα, δημιουργώντας ένα τοπικό ηλεκτρικό δυναμικό στην τελική πλάκα. Στην περίπτωση που το εύρος του δυναμικού αυτού είναι ικανοποιητικό, ευνοεί τη δημιουργία ενός δυναμικού ενεργείας, που εξαπλώνεται κατά μήκος της μυϊκής ίνας, απελευθερώνοντας τα ιόντα ασβεστίου

και οδηγώντας στη μυϊκή σύσπαση. Στις νευρομυϊκές συνάψεις των υγιών ατόμων, τα δυναμικά της τελικής πλάκας είναι πολύ πιο αποδοτικά, ώστε να δημιουργήσουν σταθερά δυναμικά ενεργείας του μυός, χωρίς αποτυχίες. Μελέτες βιοψίας μυών έδειξαν πως οι νευρομυϊκές συνάψεις των μυασθενικών ατόμων είχαν μόνο το 1/3 του συνόλου των υποδοχέων ακετυλοχολίνης που φέρουν οι νευρομυϊκές συνάψεις υγιών μαρτύρων HC (23). Επιπρόσθετα, οι πτυχώσεις της μετασυναπτικής μεμβράνης των μυασθενικών ατόμων είναι περισσότερο απλοποιημένες σε σύγκριση με αυτές των υγιών, καθώς επίσης και το εύρος της συναπτικής σχισμής είναι πολύ μεγαλύτερο στους μυασθενικούς, δυσχεραίνοντας την ήδη μειωμένη κύληση των μορίων της ακετυλοχολίνης (φαινόμενο rundown) εντός των πτυχώσεων που συμβαίνει ούτως άλλως φυσιολογικά (23). Απόρροια των παραπάνω είναι το μειωμένο εύρος των δυναμικών της τελικής πλάκας στις συνάψεις των μυασθενικών ατόμων, οδηγώντας σε αδυναμία να πυροδοτήσουν το δυναμικό ενεργείας σε ορισμένες μυϊκές ίνες. Επακόλουθο αυτού φυσικά είναι η αποτυχία της μετάδοσης του σήματος σε πολλές νευρομυϊκές συνάψεις, έτσι ώστε να είναι ορατή η μειωμένη ισχύς του συνόλου του μυός, που είναι εμφανής κλινικά ως αδυναμία (Εικόνα 4).

2.4. Δομή του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (Achetylcholine Receptor, AChR)

Το συστατικό της νευρομυϊκής σύναψης που επηρεάζεται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων της μυασθένειας Gravis είναι ο υποδοχέας της ακετυλοχολίνης (Achetylcholine Receptor, AChR) (80-85% των περιπτώσεων). Ο νευροδιαβιβαστής ακετυλοχολίνη δύναται να προσδεθεί σε δύο τύπων υποδοχείς: νικοτινικό ή μουσκαρινικό υποδοχέα. Αναλόγως την περιοχή ή μέρος του σώματος, όπου χρειάζεται η ακετυλοχολίνη να δράσει, συναντάται διαφορετικός τύπος υποδοχέα ποιοτικά και ποσοτικά. Τα μόρια της ακετυλοχολίνης είναι παρόντα στην περιοχή του εγκεφάλου αλλά και των σκελετικών μυών. Στην περίπτωση των σκελετικών μυών η παρουσία των νικοτινικών υποδοχέων είναι η συχνότερη και αποτελεί και τον στόχο της ανοσολογικής απόκρισης για την παθογένεια της μυασθένειας Gravis. Αναφορικά με τη δομή της, ο υποδοχέας της ακετυλοχολίνης είναι μία γλυκοπρωτεΐνη, με μοριακό βάρος ίσο με 250.000 Kb, που διέρχεται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης του μυός και συντίθεται από πέντε υπομονάδες, που σχηματίζουν στο χώρο μία δομή βαρελιού γύρω από ένα κεντρικό κανάλι. Κάθε μόριο υποδοχέα ακετυλοχολίνης αποτελείται από δύο α υπομονάδες, μία β υπομονάδα, μία δ υπομονάδα και μία γ ή ε υπομονάδα. Μάλιστα, κάθε μία από τις δύο α υπομονάδες εμπεριέχει μία εξωκυτταρική θέση πρόσδεσης για το μόριο της ακετυλοχολίνης, με μέγεθος 192-193 αμινοξέα. Επιπλέον, ένας φυσιολογικός τέτοιος υποδοχέας φέρει ένα κανάλι ιόντων ασβεστίου, που παραμένει κλειστό σε κατάσταση ηρεμίας. Αυτό αλλάζει όταν οι θέσεις πρόσδεσης των α

υπομονάδων καταληφθούν από ακετυλοχολίνη, με συνέπεια να επιτραπεί η ταχύτατη διέλευση των ιόντων ασβεστίου. Φυσιολογικά, στην περιοχή της συναπτικής σχισμής υπάρχει και το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης, που είναι υπεύθυνο για τη διάσπαση της ακετυλοχολίνης, βοηθώντας στον τερματισμό της μετάδοσης του σήματος στην περιοχή της νευρομυϊκής σύναψης.



Εικόνα 4: Γραφική αναπαράσταση της φυσιολογικής νευρομυϊκής σύναψης και της σύναψης στην περίπτωση της μυασθένειας Gravis, τονίζοντας τις δομικές και μορφολογικές διαφορές μεταξύ τους.

2.5. Ταξινόμηση της μυασθένειας Gravis σε υποτύπους

Η μυασθένεια Gravis μπορεί να κατηγοριοποιηθεί με κριτήριο την ηλικία έναρξης του νοσήματος, το αντιγόνο-στόχο των αντισωμάτων που δημιουργούνται, τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων της κλινικής εικόνας, τις ανωμαλίες που σχετίζονται με το θύμο αδένι των ασθενών και το προφίλ των αντισωμάτων έναντι της ανοσοσφαιρίνης γ (Immunoglobulin G, IgG) που φέρουν τα άτομα με μυασθένεια Gravis.

2.5.1. Ταξινόμηση της ασθένειας με βάση την ηλικία των μυασθενικών ατόμων

Η μυασθένεια Gravis αφορά τα δύο φύλα εξίσου και όλο το ηλικιακό εύρος των ατόμων. Υπάρχει κάποια προτίμηση στο ένα από τα δύο φύλα σχετικά με την ηλικία εμφάνισης του νοσήματος. Το 60-70% των περιπτώσεων της μυασθένειας Gravis πριν τα 50 έτη αφορούν το γυναικείο φύλο, ενώ σε μεγαλύτερες ηλικίες το αντρικό. Ανάλογα με την ηλικία εμφάνισης του νοσήματος, διακρίνονται τρεις τύποι μυασθένειας Gravis. Αναλυτικότερα, η μυασθένεια Gravis διακρίνεται σε πρώιμης εμφάνισης (ηλικία εμφάνισης μικρότερη των 45-50 ετών), μεταγενέστερης ηλικίας (ηλικίας 50-65) και αρκετά μεταγενέστερης (ηλικίας μεγαλύτερης των 65-70). Υπάρχει μία προτίμηση στο γυναικείο φύλο για τη μυασθένεια Gravis πρώιμης εμφάνισης και μία αντίστοιχη στο αντρικό για την αρκετά μεταγενέστερης εμφάνισης. Η μεταγενέστερης εμφάνισης μυασθένεια Gravis εμφανίζεται με την ίδια συχνότητα και στα δύο φύλα (24).

2.5.2. Ταξινόμηση με βάση το αντιγόνο-στόχο των αυτοαντισωμάτων που δημιουργούνται

Η μυασθένεια Gravis δημιουργείται εξαιτίας των αυτοαντισωμάτων που δημιουργούνται από τα B λεμφοκύτταρα στο θύμο αδένα και στοχεύουν συστατικά της νευρομυϊκής σύναψης στη μετασυναπτική μεμβράνη των γραμμωτών σκελετικών μυών. Τα αντιγόνα στόχοι περιλαμβάνουν τον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, την ειδική κινάση του μυός και την πρωτεΐνη 4 που σχετίζεται με χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (24). Το ποσοστό των ατόμων που έχουν αυτοαντισώματα έναντι του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης αντιστοιχούν στο 80-85% των περιπτώσεων μυασθένειας Gravis, ενώ το αντίστοιχο για την κινάση του μυός (MuSK) είναι ίσο με 5-10% (αφορώντας κυρίως γυναίκες). Οι μασθενικοί με αυτοαντισώματα ειδικά για την σχετική με τη λιποπρωτεΐνη πρωτεΐνη 4 (LRP4) αντιστοιχούν στο 2-5% του συνόλου. Μεταξύ των αντιγόνων-στόχων των αυτοαντισωμάτων συγκαταλέγονται η αγρίνη, η τιτίνη, οι υποδοχείς ρυανοδίνης, ραψίνης, κονεκτίνης και κολλαγόνου Q ή κολλαγόνου XII (25).

2.5.3. Ταξινόμηση με βάση την σοβαρότητα των συμπτωμάτων της μυασθένειας Gravis

Η μυασθένεια Gravis είναι μία ετερογενής σε συμπτώματα πάθηση, με τοπική ή γενικευμένη αδυναμία, καθώς διαφορετικά αντιγόνα της νευρομυϊκής σύναψης στοχεύονται κάθε φορά. Τα κλινικά συμπτώματα εκκινούν από οφθαλμικούς μυς και σε μερικούς μασθενικούς ασθενείς παραμένουν τοπικά (οφθαλμική μυασθένεια Gravis, OMG), ενώ η πλειοψηφία αυτών εμφανίζουν συμπτώματα και στους λοιπούς σκελετικούς μυς εντός δύο χρόνων (γενικευμένη

μυασθένεια Gravis, GMG) (25). Μυασθενικά άτομα με MuSK και LRP4 θετικά αντισώματα εμφανίζουν σοβαρή και μέτρια σε σοβαρότητα κλινική εικόνα αντίστοιχα (26). Υπάρχουν επίσης και οι οροαρνητικοί ασθενείς με μυασθένεια Gravis, που έχουν οπτική ή γενικευμένη μορφή του νοσήματος. Άτομα αυτής της κατηγορίας ασθενών, έχουν αντισώματα AChRs σε ποσοστό έως 60% αυτών, χωρίς να είναι ανιχνεύσιμα όμως στη φυσική τους διαμόρφωση (27).

2.5.4. Ταξινόμηση με βάση τις ανωμαλίες του θύμου αδένος

Ο θύμος αδένος περιλαμβάνει διαφορετικές ομάδες κυττάρων. Μεταξύ αυτών, τα επιθηλιακά και τα μυελοειδή κύτταρα, εκφράζουν ως ιστοειδικά αντιγόνα διαφορετικές υπομονάδες των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης (28, 29). Σε ασθενείς με μυασθένεια Gravis και θετικά αντισώματα έναντι AChRs, ο θύμος αδένος θεωρείται ως το δραστικό όργανο και εμφανίζει ανωμαλίες. Αυτό δεν ισχύει σε αυτούς που έχουν θετικά MuSK αντισώματα (30). Ο θύμος αδένος δύναται να εμφανίζει αλλαγές κυρίως σε περιπτώσεις ασθενών με πρώιμης εμφάνισης μυασθένεια Gravis και ειδικότερα υπερπλασία σε 50-60% του θύμου αδένος, όπου μάλιστα αναπτύσσονται τα Β πλασματοκύτταρα και Β κύτταρα μνήμης σε ειδικά κέντρα. Τα κέντρα αυτά είναι σχετιζόμενα με τον τίτλο των αυτοαντισωμάτων (31) έναντι AChRs. Μεταξύ των ασθενών με θύμωμα, το 90% αυτών εμφανίζουν αυτοάνοσο νόσημα, με το 30% αυτών να είναι ασθενείς με μυασθένεια Gravis με θετικά αντισώματα AChRs (32). Αντίστροφα, το 10-20% των μυασθενικών ατόμων εμφανίζουν θύμωμα αφορώντας και τα δύο φύλα, σε ηλικίες κάτω των 50 ετών, παρουσιάζοντας σοβαρά συμπτώματα (33).

2.5.5. Ταξινόμηση με βάση το προφίλ των υποομάδων των IgG ανοσοσφαιρινών των μυασθενικών

Έχουν βρεθεί διαφορετικές μορφές IgG ανοσοσφαιρίνης σε ομάδες μυασθενικών ατόμων που κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με το προφίλ των αυτοαντισωμάτων τους. Ειδικότερα, ασθενείς με θετικά αντισώματα έναντι AChRs φέρουν κυρίως IgG₁ και IgG₃ αντισώματα, ενώ αυτοί με MuSK και LRP4, IgG₄ και IgG₁ αντίστοιχα (34).

2.6. Συννοσηρότητες και επιπολασμός της μυασθένειας Gravis

Η μυασθένεια Gravis είναι μία σπάνια ασθένεια με επιπολασμό της τάξης του 150-300 άτομα ανά εκατομμύριο πληθυσμού ανά χρόνο, ενώ επίσης, θεωρείται ένα πρότυπο ασθένειας ρυθμιζόμενο από αντισώματα, που είναι καλά χαρακτηρισμένα. Οι συννοσηρότητες είναι ένας σημαντικός παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη τόσο στην διαδικασία της κατηγοριοποίησης των μυασθενικών ασθενών, όσο και στη θεραπευτική προσέγγισή τους.

Ειδικότερα, υπάρχουν κάποιοι ασθενείς που φέρουν άλλα συνοδά νοσήματα που συνυπάρχουν με τη Gravis και άλλοι που στερούνται αυτών. Όπως είναι κατανοητό αυτές οι δύο κατηγορίες μυασθενικών ατόμων δε χρήζει να λαμβάνουν την ίδια θεραπεία. Ακόμα, οι συννοσηρότητες μπορούν να διακριθούν σε δύο τύπους: στις συννοσηρότητες του ανοσοποιητικού συστήματος και στις αντίστοιχες εκτός ανοσοποιητικού. Ενδεικτικά, σε μία πρόσφατη μελέτη έγινε φανερό πως σε δείγμα 81 μυασθενικών ατόμων, το 88% αυτών (71/81 άτομα) εμφάνισαν συννοσηρότητες, με το 10% (8/81 άτομα) του συνόλου να φέρει συννοσηρότητες σχετιζόμενες με το ανοσοποιητικό σύστημα και το 88% (71/81 άτομα) συννοσηρότητες διαφορετικές του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον, οι ιατρογενείς επιπλοκές ταυτοποιήθηκαν στο 67% (54/81 άτομα) του συνόλου, ενώ επίσης, η θυμεκτομή αφορούσε 19 ασθενείς, εκ των οποίων οι 16 είχαν θύμωμα και οι 3 υπερπλασία του θύμου αδένα. Η μυασθενική κρίση (δυσλειτουργία του αναπνευστικού συστήματος) αφορούσε τα 28 άτομα του συνόλου των ασθενών, εκ των οποίων το 18% (5/28 άτομα) είχαν συννοσηρότητες σχετιζόμενες με το ανοσοποιητικό σύστημα και το 100% (28/28 άτομα) αυτών άλλες συννοσηρότητες. Αποτέλεσμα της μελέτης αυτής ήταν η απόδειξη της συσχέτισης των συννοσηροτήτων με την παθογένεια της μυασθένειας Gravis και δη αυτής που εμφανίζεται σε μεταγενέστερο στάδιο ηλικίας των ασθενών. Τέλος, έγινε αντιληπτό πως περισσότερες από δύο συννοσηρότητες σχετίζονται με το αποτέλεσμα του νοσήματος (35). Μεταξύ των συννοσηροτήτων συγκαταλέγονται αυτές που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα, οι αγνώστου μηχανισμού δημιουργίας συννοσηρότητες, η υπέρταση, ο διαβήτης τύπου I, η υπερλιπιδαιμία, η χρόνια αποφρακτική πνευμονική νόσος, οι ιατρογενείς επιπλοκές, οι μυασθενικές κρίσεις και οι μολύνσεις από παθογόνα, όπως παραδείγματος χάριν είναι ο EBV, ο HCMV και το HP.

2.7. Διάγνωση και διαφοροδιάγνωση της μυασθένειας Gravis

2.7.1. Διάγνωση της μυασθένειας Gravis

Η διαδικασία της διάγνωσης των μυασθενικών ατόμων περιλαμβάνει κυρίως τον προσδιορισμό των αυτοαντισωμάτων στον ορό τους. Ωστόσο, στην περίπτωση των οροαρνητικών ασθενών χρειάζονται η διενέργεια του ηλεκτρομυογραφήματος (Electromyography, EMG) και η κλινική απόκριση στον έλεγχο του πάγου (Ice-pack test) και του Endrophonium (Testilon), προκειμένου να αποφευχθεί η λανθασμένη διάγνωση μίας άλλης νευρολογικής διαταραχής (36). Μάλιστα, η συνολική πρόγνωση έχει βελτιωθεί δραματικά τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες, δεδομένου πως η συχνότητα θνησιμότητας έχει μειωθεί σημαντικά από 75% σε 4,5% (37).

1. Προσδιορισμός των αυτοαντισωμάτων του ορού ασθενών με μυασθένεια Gravis

Ο καθορισμός του τύπου των αυτοαντισωμάτων είναι το πρώτο βήμα για τη διάγνωση του νοσήματος σε άτομα υποψήφια να πάσχουν από μυασθένεια Gravis. Η πιο ευαίσθητη διαγνωστική μέθοδος για τον τύπο των αυτοαντισωμάτων είναι η ραδιοανοσοστοιχία (Radioimmunoassay, RIA). Ως μέθοδος χρησιμοποιείται για τη διάγνωση των αντισωμάτων έναντι των AChRs και MuSK. Πρόσφατα, αναπτύχθηκε μία ταχύτατη και αρκετά απλή τεχνική ανοσοστοιχημείας (ELISA) για τον ποιοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων έναντι AChRs και MuSK στον ορό από ολικό περιφερικό αίμα, με 99,1% ειδικότητα και 9,11% ευαισθησία, σχετικά με την ανίχνευση τους. Η ταυτοποίηση των αντισωμάτων έναντι της τιτίνης και του υποδοχέα της ρυανοδίνης, με τη χρήση της ELISA και του Western Blot αντίστοιχα χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις συνύπαρξης θυμώματος και μεταγενέστερης εμφάνισης μυασθένειας Gravis στα άτομα. Τέλος, η χρήση της κυτταρομετρίας ροής έδωσε την ευκαιρία για την ταυτοποίηση των αντισωμάτων ειδικών για την τιτίνη και τον υποδοχέα της ρυανοδίνης σε περιπτώσεις ατόμων με θύωμα, μεταγενέστερης εμφάνισης μυασθένειας Gravis και μυασθένειας Gravis με συνυπάρχουσες μυοσίτιδα ή/και μυοκαρδίτιδα.

Ο καθορισμός των αυτοαντισωμάτων έναντι AChRs και MuSK αντιπροσωπεύει το 80-85% και το 5-10% των μυασθενικών ατόμων αντίστοιχα. Τα αντισώματα που είναι ειδικά για την LRP4 πρωτεΐνη είναι οι πιο πρόσφατοι διαγνωστικοί δείκτες για τη μυασθένεια Gravis και θα πρέπει να ελέγχονται στην περίπτωση των διπλά οροαρνητικών ατόμων για AChRs/MuSK αντισώματα (37).

2. Νευροηλεκτροφυσιολογικοί διαγνωστικοί έλεγχοι

Στην περίπτωση των οροαρνητικών ατόμων για AChRs και MuSK αντισώματα συστήνεται η διενέργεια του νευροηλεκτροφυσιολογικού ελέγχου για τη διάγνωση της μυασθένειας Gravis. Ο συγκεκριμένος έλεγχος περιλαμβάνει την συνεχόμενη ευαισθητοποίηση των νεύρων (Repetitive Nerve Stimulation, RNS) και το ηλεκτρομυογράφημα απλής μυικής ίνας (Single-Fibre Electromyography, SF-EMG). Σε μυασθενικούς ασθενείς, ένα θετικό RNS σε χαμηλή συχνότητα (2-5 Hz) είναι μειωμένο στη 4^η -5^η αντίδραση. Τέτοιο θετικό αποτέλεσμα, όπως το προαναφερθέν είναι λιγότερο συχνά υπαρκτό σε ασθενείς που έχουν διαγνωσθεί πρόσφατα με το νόσημα (χρόνος;<4 εβδομάδες), ενώ απουσιάζει εντελώς από ασθενείς με μυασθενική κρίση. Το 90% των περιπτώσεων που εξετάζονται με αυτό τον έλεγχο παρουσιάζει θετικά αποτελέσματα για τη διάγνωση της μυασθένειας Gravis (37).

3. Προσδιορισμός τύπου μυασθένειας Gravis μέσω του ελέγχου του πάγου (ice-pack test) και του Testilon ελέγχου

Στο 15% του συνόλου των ατόμων με γενικευμένη μυασθένεια Gravis και το 50% των ασθενών με μυασθένεια οφθαλμού, δεν βρίσκονται αντισώματα ειδικά για AChR και MuSK (38). Αυτή η περίπτωση των ασθενών καθιστά μία νέα κατηγορία ασθενών, που ονομάζεται διπλά-αρνητικοί ασθενείς με μυασθένεια Gravis (double-seronegative MG, dSNMG). Η απώλεια των ανιχνεύσιμων παθογενετικών αντισωμάτων ή ενός βιοδείκτη του ανοσοποιητικού συστήματος στους dSNMG ασθενείς, έχει καταστήσει απαραίτητη την ανάγκη για την ευρύτερη διάγνωση αυτών των ασθενών αλλά και τη διαχείριση της κλινικής τους εικόνας. Συχνά, χρησιμοποιείται ο έλεγχος με πάγο, που περιέχει την τοποθέτηση μίας μικρής συσκευασίας πάγου πάνω σε ένα οφθαλμό που είναι σε πτώση για χρονικό διάστημα 2-5 λεπτών και την εκτίμηση του βαθμού της βελτίωσης της πτώσης. Ως έλεγχος δεν είναι αρκετά αποδοτικός για την διαχείριση της αδυναμίας στην κίνηση του οφθαλμού. Αναφορικά με τον έλεγχο Tensilon, αυτός χρησιμοποιείται κυρίως για ασθενείς με πτώση ή πάρεση του οφθαλμού. Η ουσία Endrophonium είναι ένας μικρής χρονικής διάρκειας παρεμποδιστής της ακετυλοχολινεστεράσης, που χορηγείται ενδοφλέβια σε ασθενή που δείχνει βελτίωση σε κάποιο βαθμό σχετικά με την μυική αδυναμία. Παρενέργεια του τελευταίου ελέγχου όμως αποτελούν η δημιουργία αρρυθμιών και υπότασης στους ασθενείς (37).

4. Διάγνωση με βάση την κλινική εικόνα των συμπτωμάτων των μυασθενικών ατόμων

Η κλινική εικόνα των ασθενών με μυασθένεια Gravis περιλαμβάνει την αδυναμία του μυός, οδηγώντας τελικά στην κόπωση. Παρόλα αυτά, τα συμπτώματα και κυρίως η αδυναμία μπορούν να διαφέρουν από ασθενή σε ασθενή και μάλιστα ακόμα και στον ίδιο ασθενή, κατά τη διάρκεια της ημέρας και μεγαλύτερων χρονικά περιόδων (37). Αρκετοί ασθενείς εμφανίζουν αδυναμία συγκεκριμένων μυικών ομάδων. Ο πόνος είναι γενικά ένα μη ύποπτο σύμπτωμα και η γενικευμένη κόπωση, χωρίς αντικειμενική αδυναμία είναι μη συμβατή με τη μυασθένεια Gravis. Τα σημάδια της μυικής αδυναμίας μπορεί να περιλαμβάνουν βλεφαρίδες σε πτώσεις, διπλοπία, ανικανότητα να διατηρηθεί το κεφάλι σε όρθια στάση, δυσκολία για κατάποση ή μάσηση, δυσκολία για ομιλία και για αναπνοή, καθώς και δυσκολία για ύψωση των ώμων ή ανασήκωση ολόκληρου του σώματος από την στάση καθίσματος. Τέλος, αναφέρεται η εναλλασσόμενη πτώση του ενός εκ των δύο οφθαλμών ως συχνό κλινικό χαρακτηριστικό της μυασθένειας Gravis (37).

2.7.2. Διαφοροδιάγνωση της μυασθένειας Gravis

Η μυασθένεια Gravis είναι μία διαταραχή με μυϊκή αδυναμία, που παράγει κυμαινόμενα συμπτώματα. Συχνά, όμως, η διάγνωση του νοσήματος είναι εφικτή μέσα από τη διάγνωση διαφορετικών διαταραχών ή/και παθήσεων των εξεταζόμενων ατόμων από τον κλινικό γιατρό. Αυτό συμβαίνει γιατί πολλές παθήσεις παρουσιάζουν κοινά κλινικά χαρακτηριστικά ή συμπτώματα με τα αντίστοιχα της μυασθένειας Gravis. Τα βασικότερα κοινά συμπτώματα περιλαμβάνουν την πτώση, τη διπλοπία, τη δυσαρθρία, τη δυσφαγία και την μυϊκή αδυναμία στους μυς του άνω σώματος. Μεταξύ των διαφορετικών διαγνώσεων συμπεριλαμβάνονται η θυροειδική οφθαλμοπάθεια, η μυοτονική δυστροφία, η νόσος του κινητικού νευρώνα, το σύνδρομο Guillain-Barre και άλλα επίσης (37).

Πίνακας 1: Συγκεντρωτική παρουσίαση των κύριων συμπτωμάτων, της διαφοροδιάγνωσης και των διαφορετικών κλινικών χαρακτηριστικών που μπορεί να ανιχνεύονται κατά την εξέταση ενός υποψήφιου ασθενή με MG, από τον νευρολόγο ιατρό.

Κύρια συμπτώματα	Διαφοροδιάγνωση	Κλινικά χαρακτηριστικά που διαφέρουν από την αυτοάνοση μυασθένεια Gravis
Πτώση και διπλοπία	Θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια Μιτοχονδριακή μυοπάθεια Δυστροφία οφθαλμική Δυστροφία μυοτονική	Σταθερά περιορισμένη οφθαλμοπάθεια Χρόνια προοδευτική πτώση και οφθαλμοπάρεση Σπανίως διπλοπία, αργή κίνηση Αυτοσωμική επικρατής κληρονομικότητα Αργά προοδευτική πτώση και δυσφαγία για 4-5 δεκαετίες Αυτοσωμική επικρατής κληρονομικότητα Χαρακτηριστικές μορφές του προσώπου

		Αδυναμία, μυοτονία
Δυσαρθρία και δυσφαγία	Εγκεφαλίτιδα ή Ασθένεια κινητικού νευρώνα	Υπερευλυγισία Σπαστική δυσαρθρία, ατροφία γλώσσας, υπερευλυγισία, ασυμπτωματική αδυναμία
Αδυναμία στους μύς του άνω σώματος	Lambert-Eaton μυασθενικό σύνδρομο Μυασθενικά συγγενή σύνδρομα	Αδυναμία των κάτω άκρων μεγαλύτερη από τα άνω άκρα, αυτόνομη δυσλειτουργία (ξηροστομία) Θετικό οικογενειακό ιστορικό, πρόωμη έναρξη στην παιδική ηλικία με αργή και σταθερή πρόοδο

2.8. Θεραπεία της μυασθένειας Gravis

Η θεραπεία της μυασθένειας Gravis περιλαμβάνει ένα σύνολο θεραπευτικών στρατηγικών, που εφαρμόζονται συνδυαστικά ή με σειρά προτεραιότητας, κλιμακούμενα, ανάλογα με την υπάρχουσα συμπτωματολογία των μυασθενικών ασθενών. Εντούτοις, η θεραπεία του νοσήματος βασίζεται στη χορήγηση των παρεμποδιστών της ακετυλοχολινεστεράσης, της ανοσορρυθμιστικής θεραπείας, των ενδοφλέβιων ανοσοσφαιρινών, των κορτικοστεροειδών, της αζαθιοπρίνης, της κυκλοσπορίνης, της μεθοτρεξάτης, της κυκλοσφαμίδης, αλλά και της εφαρμογής της πλασμαφαίρεσης, της θυμεκτομής καθώς και των βιολογικών παραγόντων, όπως είναι αυτός της ριτουξιμάβης. Αυτά αναλύονται κάτωθι:

1. Παρεμποδιστές της ακετυλοχολίνης

Σαν πρώτος σταθμός θεραπείας σε μέτριας σοβαρότητας μυασθένεια Gravis είναι η χρήση των παρεμποδιστών της ακετυλοχολινεστεράσης, με σκοπό την επιβράδυνση της αποικοδόμησης των μορίων της ακετυλοχολίνης και της δράσης της στην νευρομυική σύναψη. Η πυριδοστιγμίνη είναι ο πιο συχνός παρεμποδιστής ακετυλοχολίνης που χρησιμοποιείται, με διάρκεια δράσης 3 με 4 ώρες και αποτελεσματική δόση ίση με 60 έως 90 mg για διάστημα 3-6 ωρών. Ένα

φαρμακευτικό σκεύασμα της πυριδοστιγμίνης που χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπεία της μυασθένειας Gravis είναι το Mestinon (37).

2. Ανοσορρυθμιστική θεραπεία

Στη φαρέτρα των θεραπειών προστίθεται η ανοσορρυθμιστική θεραπεία για τις περιπτώσεις μέτριας έως σοβαρής σε συμπτωματολογία μυασθένειας Gravis. Συγκεκριμένα, η πλασμαφαίρεση και οι ενδοφλέβιες ανοσοσφαιρίνες χορηγούνται σε ασθενείς με σοβαρή κλινική εικόνα ή ταχύτατη επιδείνωση της ασθένειας, εξαιτίας των ευεργετικών αποτελεσμάτων τους που είναι εμφανή εντός της πρώτης εβδομάδας της θεραπείας. Ωστόσο, η ευεργετική δράση τους διαρκεί μόνο μερικές εβδομάδες. Χρησιμοποιούνται συνήθως σε περιστατικά ασθενών με μυασθενική κρίση. Η πλασμαφαίρεση παρουσιάζει αποτελεσματικότητα στο 80% των ασθενών με γενικευμένη μυασθένεια Gravis (39, 40). Αναφορικά με τη χορήγηση της ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης, η συνιστάμενη δοσολογία κυμαίνεται από 1 έως 2 g/kg. Κλινικές μελέτες, όμως, έδειξαν πως δεν υπάρχει διαφοροποίηση στην αποτελεσματικότητα μεταξύ της θεραπείας με πλασμαφαίρεση και αυτής με ενδοφλέβιες ανοσοσφαιρίνες (41, 42). Η επιλογή μίας εκ των δύο προαναφερόμενων θεραπειών βασίζεται στην αντοχή της κάθε θεραπείας (η ενδοφλέβια ανοσοθεραπεία έχει λιγότερες παρενέργειες) και στην εύκολη προσβασιμότητα στη διαδικασία της πλασμαφαίρεσης για τους ασθενείς στα θεραπευτικά κέντρα. Άλλες ανοσοθεραπείες με μεγαλύτερη διάρκεια, όπως είναι τα κορτικοστεροειδή και η αζαθιοπρίνη εμφανίζουν πιο αργή έναρξη απόκρισης στη θεραπεία για τους ασθενείς, παρέχοντας όμως καλά αποτελέσματα για μεγάλο διάστημα χρόνου.

Τα κορτικοστεροειδή ανήκουν στις ανοσορρυθμιστικές θεραπείες. Χαρακτηριστικός εκπρόσωπός τους είναι η πρεδνιζόνη ή πρεδνιζολόνη, που βοηθά στην βελτίωση της κλινικής εικόνας των ασθενών με γενικευμένη ή μυασθένεια Gravis οφθαλμού σε ποσοστό 70 έως 80% (43). Μπορεί ακόμα να μειώσει την πιθανότητα εξέλιξης της οφθαλμικής σε γενικευμένη μυασθένεια Gravis (44). Η αποτελεσματική δόση της πρεδνιζόνης εξαρτάται από την σοβαρότητα και την κατανομή των συμπτωμάτων. Μερικοί ασθενείς χρειάζονται μέχρι και 1,0 mg/kg/ημέρα (συνήθως 50-80 mg/ημέρα). Σε ασθενείς με μέτρια προς σοβαρή σε συμπτώματα μυασθένεια Gravis, μία χαμηλότερη δόση όπως είναι αυτή των 20-40 mg/ημέρα θεωρείται ικανοποιητική. Ένα φαρμακευτικό σκεύασμα που έχει ως βάση την πρεδνιζολόνη είναι το Prezolon και χρησιμοποιείται κατά κόρον στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της μυασθένειας Gravis.

Η αζαθιοπρίνη είναι ένα από τα ανοσορρυθμιστικά φάρμακα, που αποκτά τη μέγιστη αποτελεσματικότητά της μόνο μετά από 1 έως 2 χρόνια θεραπείας (45). Σε μία μελέτη με 78 ασθενείς με μυασθένεια Gravis, το 91% αυτών έδειξε βελτίωση στην κλινική του εικόνα, μετά από τη θεραπεία του με αζαθιοπρίνη ή αζαθιοπρίνη και πρεδνιζόνη συνδυαστικά (46). Η συνιστώμενη δοσολογία για το φάρμακο αυτό είναι μεταξύ 2 με 3 mg/kg/ημέρα. Ωστόσο, η χρήση της αζαθιοπρίνης μπορεί να έχει παρενέργειες όπως είναι η ναυτία, η τάση για έμετο, οι αιματολογικές ανωμαλίες, η δυσλειτουργία του ήπατος και η παγκρεατίτιδα. Τέλος, σημαντικό να αναφερθεί είναι πως σε ασθενείς με γονότυπο ομόζυγο για το σιωπηλό αλληλόμορφο του γονιδίου της μεθυλοτρανσφεράσης της θειοπουρίνης (*Thiopurine S-Methyltransferase, TPMT gene*), δε μπορεί να εφαρμοστεί η θεραπεία με αζαθιοπρίνη, εξαιτίας του αυξημένου κινδύνου για την καταστολή του μυελού των οστών (47).

3. Κυκλοσπορίνη

Η κυκλοσπορίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί συχνά ως μονοθεραπεία για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της μυασθένειας Gravis. Η δράση του φαρμάκου αυτού είναι πολύ πιο ταχεία, σε σύγκριση με άλλους χορηγούμενους παράγοντες που διαλύουν τα κορτικοστεροειδή. Επιπλέον, η βελτίωση της κλινικής εικόνας των ασθενών είναι εφικτή σε αυτήν την περίπτωση εντός 1 έως 2 μηνών και η δόση που προβλέπεται κυμαίνεται στα 5 mg/kg/ημέρα. Δυστυχώς, παρενέργειες όπως είναι η τοξικότητα σε ήπαρ και αίμα, αποτρέπουν συχνά από την ευρεία χρήση του φαρμάκου αυτού (48).

4. Μεθοτρεξάτη

Η μεθοτρεξάτη λειτουργεί, όπως και η αζαθιοπρίνη ως παράγοντας διάσπασης στεροειδών ορμονών, συνδυαζόμενη με την αζαθιοπρίνη (49, 50).

5. Ριτουξιμάβη

Η ριτουξιμάβη είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που έχει δημιουργηθεί ειδικά για τον δείκτη επιφανείας CD₂₀ των Β λεμφοκυττάρων. Η αποτελεσματικότητά της έγκειται στην αντιμετώπιση περιπτώσεων γενικευμένης μυασθένειας Gravis και ιδιαίτερα για ασθενείς με θετικά αντισώματα έναντι της MuSK πρωτεΐνης (51, 52). Η προβλεπόμενη δοσολογία είναι ίση με 375 mg/m²/εβδομάδα για τέσσερις συναπτές εβδομάδες. Μετά την πρώτη χορήγηση της ριτουξιμάβης, τα Β λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος τείνουν να μειώνονται εντός 2 εβδομάδων, ενώ ο πληθυσμός των Τ λεμφοκυττάρων παραμένει σταθερός.

6. Κυκλοφωσφαμίδη

Η κυκλοφωσφαμίδη είναι ένας αλκυλικός παράγοντας που ελαττώνει τη διαδικασία του πολλαπλασιασμού των Β και Τ λεμφοκυττάρων, κάτι που είναι αποτελεσματικό για τη μυασθένεια Gravis μεν, αλλά με σοβαρές παρενέργειες δε (37).

7. Θυμεκτομή

Τα μυασθενικά άτομα που εμφανίζουν θύμωμα παράλληλα, υφίστανται χειρουργική επέμβαση. Σε περίπτωση αποτυχίας του χειρουργείου, ο όγκος αντιμετωπίζεται με χημειοαδιοθεραπεία, με αποτέλεσμα την αντιμετώπιση τόσο της μυασθένειας Gravis, όσο και του όγκου. Για μυασθενικούς ασθενείς με ηλικία κάτω των 60 ετών, δίχως θύμωμα, η θυμεκτομή πιθανότατα είναι μία ικανοποιητική λύση για την αντιμετώπιση της γενικευμένης μυασθένειας Gravis. Παρόλα αυτά, χρειάζεται πολλές φορές αρκετά χρόνια για να γίνουν εμφανή τα πλεονεκτήματα της θυμεκτομής αναφορικά με τη θεραπεία. Επιπλέον, η θυμεκτομή δεν εξασφαλίζει απαραίτητα την παρεμπόδιση δημιουργίας των θετικών αντισωμάτων για τους AChRs στους ασθενείς στο μέλλον. Ο χρόνος για να τελεστεί η θυμεκτομή εκτιμάται στα 3 χρόνια μετά τη διάγνωση του νοσήματος και φαίνεται να είναι άκρως επιτυχημένη θεραπευτική λύση για ασθενείς θετικούς για AChRs και όχι MuSK αντισώματα (53, 54, 55).

2.9. Αιτιοπαθολογία της μυασθένειας Gravis

2.9.1. Γενετική βάση της μυασθένειας Gravis

Στην προσπάθεια αναζήτησης των αιτιών της παθογένειας της μυασθένειας Gravis, πραγματοποιήθηκαν από πολύ νωρίς μελέτες διερεύνησης του ρόλου του γενετικού υπόβαθρου των ασθενών με μυασθένεια Gravis, τόσο στην εμφάνιση όσο και στην πρόοδο της νόσου. Μελέτες σε μονοζυγωτικούς και διζυγωτικούς δίδυμους απέδειξαν αφενός την επίδραση του γονιδιώματος στην αιτιοπαθολογία της μυασθένειας Gravis και αφετέρου την κοινή υπαιτιότητα ορισμένων γονιδίων για την παθογένεια και άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων (56). Μονοζυγωτικοί δίδυμοι με μυασθένεια Gravis εμφανίζουν ομολογία της τάξης του 35% στο γονιδιώμα τους για την νόσο (57), σε αντίθεση με τους αντίστοιχους διζυγωτικούς που φέρουν μόνο 14% ομοιότητα (58). Επίσης, το ποσοστό της οικογενειακής Gravis στο γενικό πληθυσμό ανέρχεται στο 3-4% (57, 59). Την συμβολή του γενετικού υλικού στην παθογένεια της νόσου επισφραγίζουν οι μελέτες ευρείας ανάλυσης του γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies, GWAS), στις οποίες φανερώνεται μία σειρά από γενετικούς τόπους συγκεκριμένων γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης της μυασθένειας Gravis στον γενικό πληθυσμό. Αρκετοί γενετικοί τόποι, περιλαμβάνοντας γονίδια εντός και εκτός του

MHC συμπλόκου έχουν συσχετιστεί με τη μυασθένεια Gravis, με αυτά των απλοτύπων HLA-A₁, B₈ και DR₃ να σχετίζονται περισσότερο για την EOMG, συνοδευόμενη από υπερπλασία του θύμου αδένος (60). Ειδικότερα, στη GWAS μελέτη του Gregensen και της ομάδας του, ανακαλύφθηκε μια ισχυρή συσχέτιση του απλότυπου HLA 8.1 (HLA-B*08) στη θέση rs7750641 με την παθογένεια της νόσου και ειδικότερα του υποτύπου της πρώιμης εμφάνισης αυτής (EOMG). Επιπλέον, δύο πρόσθετες συσχετίσεις αφορούν δύο γενετικούς τόπους εκτός της HLA περιοχής του MHC συμπλόκου και ειδικότερα στις θέσεις rs2476601 και rs495881 των γονιδίων *PTPN22* και *TNIP1* αντίστοιχα (61).

Το πρώτο γονίδιο σχετίζεται με τη μετάδοση του σήματος από το εξωτερικό ενός λευκοκυττάρου στο πυρήνα αυτού και το δεύτερο με την ρύθμιση του NF-κB παράγοντα, επομένως τη φλεγμονή και την αυτοανοσία. Ομοίως, ο Renton και οι συνεργάτες του αναγνώρισαν τέσσερις πολυμορφισμούς: τους rs4263037, rs231770, rs9271871 και rs601006 για τα γονίδια *TNFRSF11A*, *CTLA4* και *HLA-DQA1* (οι δύο τελευταίοι σε σειρά πολυμορφισμοί), με το τελευταίο γονίδιο να αφορά περιπτώσεις EOMG (62). Είναι γνωστή η αξία του υποδοχέα του παράγοντα TNF, ενός μορίου που συμμετέχει στη φλεγμονή καθώς και του μορίου *CTLA4* που δημιουργεί κατασταλτικά σήματα στα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα. Πιο πρόσφατες GWAS μελέτες επιβεβαιώνουν το ρόλο των *TNFRSF11A*, *HLA-B* και *HLA-DRB1* γενετικών τόπων στην παθογένεια της Gravis καθώς και την συσχέτιση ενός νέου γονιδίου, του *AGRN* ως υποψήφιο γονίδιο υψηλού κινδύνου για τη νόσο (63). Σημαντική αξία παρουσιάζει η εύρεση διαφορετικών πολυμορφισμών σε κάθε μία από τις τρεις ομάδες ασθενών, με βάση την ηλικία εμφάνισης της μυασθένειας Gravis. Εξαιτίας της μεγάλης ετερογένειας όμως στο φύλο και την ηλικία των ασθενών, υπάρχουν και διαφορετικά γονίδια που συμμετέχουν σε κάθε ομάδα (63, 56). Αναλυτικότερα, πολυμορφισμοί στον γενετικό τόπο HLA και στο γονίδιο *TNFRSF11A* συσχετίζονται περισσότερο με ασθενείς με EOMG (68), ενώ πολυμορφισμοί στα γονίδια *PTPN22* και *CHRNA1* με ασθενείς με LOMG (61). Το γονίδιο *CHRNA1* που κωδικοποιεί την α υπομονάδα του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης έχει συσχετιστεί με την παθογένεια της μυασθένειας Gravis και σε άλλες μελέτες (64, 65). Τέλος, το φαινόμενο της επίστασης (δηλαδή, της συνεργατικής και επικαλυπτόμενης δράσης ορισμένων γονιδίων: *CHRNA1* (rs16862847), *AIRE* (rs3761389) και *CTLA-4* (rs733618)) έχει καταστεί πλέον σαφές στην παθογένεια της μυασθένειας Gravis (Εικόνα 5) (65).

2.9.2. Επιγενετική βάση της μυασθένειας Gravis

Παρόλο που αρκετοί πολυμορφισμοί, σχετικά με τη μυασθένεια Gravis, έχουν ταυτοποιηθεί μέσα από τις GWAS μελέτες, εντούτοις, η παθολογία του νοσήματος αυτού δεν δύναται να

περιγραφεί εξ ολοκλήρου από τα διαφοροποιημένα γονίδια. Σε αυτό το σημείο τη λύση παρέχει η επιγενετική, που όπως έχει αποδειχθεί μέσα από μελέτες διδύμων, η απορρύθμιση των επιγενετικών μηχανισμών, συνεισφέρει στην γενετική προδιάθεση των ατόμων που πρόκειται να εμφανίσουν στο μέλλον πιθανώς τη μυασθένεια Gravis, εξηγώντας την ποικιλία των φαινοτύπων των μυασθενικών ασθενών (66, 67). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του κάθε ατόμου, ένα σύνολο από επιγενετικούς παράγοντες, μπορούν να διαφοροποιήσουν την ενεργότητα συγκεκριμένων γονιδίων ή ολόκληρων περιοχών του γονιδιώματος, οδηγώντας σε κληρονομούμενες τροποποιήσεις του γενετικού υλικού (67). Στους επιγενετικούς παράγοντες συγκαταλέγονται ο μηχανισμός της μεθυλίωσης του DNA, η δράση των μη-κωδικών μορίων RNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών. Οι παράγοντες αυτοί αποτελούν ουσιαστικά τη διασύνδεση του γονιδιώματος και του περιβάλλοντος του κάθε ατόμου, με τα δύο τελευταία να δρουν συνεργατικά προωθώντας την απώλεια της ανοσολογικής ανοχής του εκάστοτε ασθενή και την εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων της μυασθένειας Gravis (Εικόνα 5). Αναλυτικότερα, η επίδραση των τριών βασικών επιγενετικών μηχανισμών στην παθογένεια της Gravis περιγράφεται ως εξής:

1. Μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση του DNA είναι μία χημική διαδικασία κατά την οποία προστίθεται μία μεθυλική ομάδα σε ένα νουκλεοτίδιο με βάση κυτοσίνη στην 5^η θέση του άνθρακα της δεσοξυριβόζης, τροποποιώντας την έκφραση του κωδικοποιούντος RNA, αλλά διατηρώντας την αλληλουχία του DNA ανεπηρέαστη (68). Οι αλλαγές που προκαλούνται στο πρότυπο της μεθυλίωσης του DNA (σε νησίδες CpG, σε ποσοστό 70-80% του συνολικού ανθρώπινου γονιδιώματος) γίνονται χάριν στα κυτταρικά ένζυμα-μεθυλοτρανσφεράσες και είναι κληρονομήσιμες, με δυνατότητα αναστροφής τους (69). Στόχοι της μεθυλίωσης του DNA είναι η ενεργότητα του X χρωμοσώματος και η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Η υποψία της διασύνδεσης του μηχανισμού της μεθυλίωσης του DNA και της υπαιτιότητας των αυτοάνοσων νοσημάτων φάνηκε να είναι βάσιμη (70, 71, 72). Σχετικά με τη μυασθένεια Gravis, μία πρωτότυπη μελέτη του Mamrut για την σύγκριση του μεταγραφώματος και του μεθυλιώματος από μονοκύτταρα σε μονοζυγωτικά δίδυμα θηλυκού γένους με μυασθένεια Gravis, έδειξε πως η αλλαγή στην γονιδιακή έκφραση ή αλλιώς στα επίπεδα της μεθυλίωσης μπορεί να προκαλέσει τη μυασθένεια Gravis, ενισχύοντας την συμμετοχή του γενετικού υπόβαθρου στην παθογένεια του νοσήματος (73). Σε μία πρόσφατη GWAS μελέτη για την μυασθένεια Gravis, γίνεται για πρώτη φορά η ταυτοποίηση και συγχρόνως η σύγκριση του προφίλ της

μεθυσίωσης μεταξύ μυασθενικών και υγιών μαρτύρων, με την ταυτοποίηση των διαφορετικών μεθυλιωμένων CpG νησίδων στις δύο ομάδες ατόμων (68).

2. Μη-κωδικά μόρια RNA

Τα μη-κωδικά μόρια RNA είναι λειτουργικά μετάγραφα και η πλειοψηφία αυτών δεν σχετίζεται με τη διαδικασία της μετάφρασης (74). Διαχωρίζονται σε δύο ομάδες μορίων, τα housekeeping και τα ρυθμιστικά μη-κωδικά μόρια RNA. Τα πρώτα περιλαμβάνουν μεταφορικά μόρια RNAs και τα ριβοσωμικά μόρια RNAs. Τα δεύτερα μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες, με βάση το μέγεθος τους: τα γραμμικά βραχεία (microRNAs), τα γραμμικά μακριά σε μήκος RNAs (lncRNAs) και τα κυκλικά μόρια RNAs (circRNAs) (75). Έχουν βρεθεί συνολικά 1.879, 17.748 και 25.000 γονίδια που κωδικοποιούν miRNAs, lncRNAs και circRNAs αντίστοιχα στο ανθρώπινο γονιδίωμα (76). Αυτές οι κατηγορίες μορίων RNAs ελέγχουν διαδικασίες, όπως είναι η απόπτωση, η ρύθμιση του ανοσίας και η εμφάνιση κάποιας ασθένειας (74). Η ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος από τέτοια μόρια είναι εμφανής μέσα από την τροποποιητική τους δράση στην έκφραση ορισμένων γονιδίων, που φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεια αρκετών αυτοάνοσων νοσημάτων (77). Αναφορικά για την περίπτωση της μυασθένειας Gravis, μόρια miRNAs (με μέγεθος 20-22 νουκλεοτίδια) έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση της ασθένειας αυτής μέσω διαφόρων μηχανισμών και ειδικότερα της αλληλεπίδρασής τους με κυτταροκίνες και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (78). Η ανίχνευση σταθερών μορίων miRNAs στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών με Gravis, έχει θεωρηθεί ως σημαντικό εργαλείο για τη διάγνωση του νοσήματος (79). Τα miRNAs που έχουν συσχετιστεί με την παθογένεια της νόσου διαφέρουν, ανάλογα με το προφίλ των παθολογικών αυτοαντισωμάτων του κάθε ασθενή. Συγκεκριμένα, σε άτομα με μυασθένεια Gravis και θετικά AChR⁺ αντισώματα, ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα των mir-150-5p, mir-21-5p και χαμηλότερα του mir-27a-3p (80, 81). Αντίθετα, σε μυασθενικούς με θετικά MuSK⁺ αντισώματα, τα επίπεδα των μορίων mir-328-3p, mir-151a-3p και mir-423-5p ήταν υψηλότερα και τα αντίστοιχα των mir-210-3p και mir-324-3p μικρότερα σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (82, 83). MiRNAs όπως είναι τα μόρια mir-124, mir-155 και mir-689 βρέθηκαν σε συσχετίζονται ισχυρά με προφλεγμονώδη σήματα και ενεργοποίηση της μικρογλοίας, συνεισφέροντας στην νευρολογική φλεγμονή (84). Τα μόρια miRNAs δύνανται να ελέγχουν την έκκριση των κυτταροκινών από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, διαμέσου μηχανισμών, όπως είναι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης για τα επίπεδα ενεργοποίησης των συνυποδοχέων, αλλά και των μεταγραφικών παραγόντων των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων (78). Εκτός από τα μόρια miRNAs, αρκετά γονίδια που κωδικοποιούν lncRNAs, έχουν βρεθεί σε υψηλή έκφραση στον ορό ασθενών με

μυασθένεια Gravis. Συγκεκριμένα, 4.360 γονίδια lncRNAs μορίων έχουν διαφορετική έκφραση σε μυασθενικούς ασθενείς (85). Στο πλαίσιο αυτό, σε μία πρόσφατη μελέτη του Jianjian Wang και των συνεργατών του ταυτοποιήθηκε πως το μόριο SNHG16 (lncRNAs μόριο) είναι αυξημένο σε έκφραση στους μυασθενικούς σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και αποτελεί μάλιστα στόχο για το miRNA let-7c-5p, ενώ ταυτόχρονα ελέγχει την έκφραση του γονιδίου της ιντερλευκίνης 10 (Interleukin 10, IL-10) (86).

3. Τροποποιήσεις των ιστονών

Οι ιστόνες είναι μία ομάδα πρωτεϊνών που φυσιολογικά συμμετέχουν στο πακετάρισμα του DNA για τον σχηματισμό των νουκλεοσωμάτων στον πυρήνα του κάθε κυττάρου. Πέντε μορφές ιστονών συνεργάζονται για το τελικό αποτέλεσμα, με τις τέσσερις (H2A, H2B, H3 και H4) να σχηματίζουν ένα οκταμερές γύρω από κάθε μόριο DNA και την H1 να συνδέεται στο εξωτερικό του νουκλεοσώματος για σταθεροποίηση της δομής (87). Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν στις ιστόνες έχουν ως αποτέλεσμα να επηρεάζουν το βαθμό συμπύκνωσης της χρωματίνης και τη διαθεσιμότητα αυτής για την αλληλεπίδραση με μεταγραφικούς παράγοντες, επηρεάζοντας την γονιδιακή έκφραση εν τέλει (87). Οι τροποποιήσεις των ιστονών (φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, μεθυλίωση, ουμπικουιτινοποίηση, ριβοσυλίωση, απαμίνωση, σουμουλίωση και προλινιοισομερισμός) είτε συμβαίνουν μεμονωμένα είτε συνδυαστικά, λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου και ελέγχουν αρκετές κυτταρικές διαδικασίες, συμπεριλαμβάνοντας τη γονιδιακή έκφραση. Έχει αποδειχθεί πως συγκεκριμένες τροποποιήσεις των ιστονών που έχουν συσχετιστεί με την απόπτωση, μπορεί να εμπλέκονται και σε παθολογικές συνθήκες, όπως είναι αυτή της αυτοανοσίας. Αναλυτικότερα, έχουν περιγραφεί ορισμένοι αυτοεπίτοποι σε γονίδια των τεσσάρων ιστονών (H2A, H2B, H3, H4) που υφίστανται μεμεταφραστικές τροποποιήσεις και μπορούν να λειτουργήσουν ως στόχος των αυτοαντισωμάτων (88). Ένζυμα όπως είναι οι αποκετυλάσες των ιστονών δρουν ως επιγενετικοί ρυθμιστές της έκφρασης των προφλεγμονωδών γονιδίων (89). Στην περίπτωση της μυασθένειας Gravis, μία πρόσφατη μελέτη έδειξε διαφορετικές και αλληλοεπικαλυπτόμενες βιολογικές λειτουργίες ισομορφών των αποκετυλασών των ιστονών να εμπλέκονται τόσο στη διαδικασία της φλεγμονής όσο και σε αυτή της σηματοδότησης από τα αυτοαντισώματα σε πειραματικό μοντέλο ποντικού με μυασθένεια Gravis, θέτοντας τα θεμέλια για την ανάπτυξη νέων θεραπειών (90). Αντίστοιχα, ο Shuang Li με την ομάδα του, απέδειξε πως η μεταμεταφραστική τροποποίηση της προσθήκης μιας μεθυλομάδας σε νουκλεοτίδιο αδενίνης (γονίδιο μεθυλοαδενοσίνης 6) (που είναι μεν βασικός ρυθμιστής της νευρικής

ενεργότητας και δε της σταθερότητας των mRNAs, microRNAs και tRNAs) έχει συμμετοχή στους ανοσιακούς μοριακούς μηχανισμούς της μυασθένειας Gravis (91).

2.9.3. Περιβαλλοντική βάση της μυασθένειας Gravis

Βιταμίνη D

Οι μελέτες των διδύμων πιστοποιούν τον πιθανό ρόλο που μπορεί να έχουν το περιβάλλον στο οποίο διαβίει και ο τρόπος ζωής που ακολουθεί το κάθε άτομο, σχετικά με την πιθανότητα εμφάνισης της μυασθένειας Gravis (92, 93, 94). Μεταξύ των περιβαλλοντικών παραγόντων που φαίνεται να εμπλέκονται στην αιτιοπαθολογία της μυασθένειας Gravis είναι η βιταμίνη D. Τα χαμηλά επίπεδα της είναι ένας παράγοντας κινδύνου για την εκδήλωση ενός αυτοάνοσου νοσήματος (95). Ειδικότερα, σε μία μελέτη δεκατρείς ασθενείς με μυασθένεια Gravis είχαν χαμηλότερα επίπεδα βιταμίνης D σε σύγκριση με τους υγιείς και το 38% των πρώτων έδειξε σημαντική βελτίωση μετά από τη χορηγούμενη θεραπεία (96). Η μελέτη του Yuyang Dai σε κινεζικό πληθυσμό με μυασθένεια Gravis έδειξε πως ο πολυμορφισμός rs7975232 στον υποδοχέα του γονιδίου που κωδικοποιεί την σύνθεση της βιταμίνης D στον οργανισμό, συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση της Gravis (Εικόνα 5) (97).

Ορμόνες του φύλου και ο ρόλος τους στην παθογένεια της μυασθένειας Gravis

Άλλη μία σημαντική περιβαλλοντική παράμετρος που φαίνεται να έχει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη της παθογένειας της μυασθένειας Gravis είναι η δυναμική ισορροπία των ορμονών του κάθε ατόμου. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ της παθολογίας του θύμου αδένου και του φύλου σε περιπτώσεις της πρώιμης εμφάνισης της μυασθένειας Gravis. Η υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων του θύμου αδένου αφορά ως επί το πλείστον ασθενείς θηλυκού γένους, με μία συχνότητα 9:1 μεταξύ θηλυκών και αρσενικών ατόμων με μυασθένεια Gravis, κατά τη γόνιμη περίοδο της ζωής τους (98). Ορμόνες που περιλαμβάνουν τα οιστρογόνα, την προγεστερόνη και την τεστοστερόνη επιδρούν στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και ειδικότερα στην παραγωγή των κυτταροκινών από αυτά. Μελέτες όπως αυτή του Oertelt-Prigione και της ομάδας του, απέδειξαν την επίδραση των ορμονών στην παραγωγή των κυτταροκινών από διαφορετικές ομάδες δραστικών κυττάρων και στη δημιουργία των αντισωμάτων από Β λεμφοκύτταρα (99). Τα οιστρογόνα λειτουργούν ως παράγοντας προώθησης της ωρίμανσης, επιλογής και έκκρισης των αντισωμάτων από τα Β λεμφοκύτταρα. Πιθανολογείται ακόμα πως ως ορμόνες επιτρέπουν στα αυτοδραστικά Β λεμφοκύτταρα να διαφεύγουν τους μηχανισμούς της ανοχής, αυξάνοντας τα σε αριθμό, με αποτέλεσμα την αυτοανοσία (100). Μάλιστα, σε φυσιολογικές συνθήκες, τα κανονικά επίπεδα των οιστρογόνων

βοηθούν στην αύξηση των CD4⁺ και CD25⁺ T ρυθμιστικών κυττάρων, που συνεισφέρουν στη εξασφάλιση της ανοχής σε εαυτά αντιγόνα (101). Η ισορροπία των ορμονών μπορεί να διαταράσσεται κατά τη διάρκεια ζωής των ατόμων, και ειδικότερα μετά από περιόδους όπως είναι αυτή της εγκυμοσύνης στα θηλυκά άτομα, κατά την οποία μπορεί να υπάρξει η παρόξυνση των κλινικών συμπτωμάτων των μυασθενικών ασθενών (Εικόνα 5) (102).

Φάρμακα που προκαλούν ή επάγουν τη μυασθένεια Gravis de novo

Έχει βρεθεί πως ένα σύνολο φαρμάκων που χορηγούνται σε άτομα δύνανται να επάγουν μία de novo μυασθένεια Gravis ή να προκαλέσουν επιδείνωση στην κλινική εικόνα των μυασθενικών ατόμων ή να επάγουν την εκδήλωση μίας μη διαγνωσμένης μέχρις στιγμής μυασθένειας Gravis (103). Μεταξύ των φαρμάκων που έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν είτε de novo μυασθένεια Gravis είτε επιδείνωση της ήδη υπάρχουσας συγκαταλέγονται η D-πενικιλαμίνη, οι παρεμποδιστές της κινάσης τυροσίνης, οι ιντερφερόνες, οι στατίνες και οι παρεμποδιστές των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος. Αντίστοιχα, στα φάρμακα που σχετίζονται με την εκδήλωση συμπτωμάτων τύπου μυασθένειας Gravis ή μίας κεκαλυμμένης μυασθένειας Gravis ανήκουν η πενικιλίνη, οι παρεμποδιστές β-αδρενεργικών υποδοχέων, οι παρεμποδιστές των καναλιών ασβεστίου L τύπου, οι παρεμποδιστές της νευρομυικής σύναψης, τα κορτικοστεροειδή, τα αντιψυχωτικά φάρμακα, το μαγνήσιο, το λίθιο αλλά και η τοξίνη Botulinum. Κοινό στοιχείο και των δύο κατηγοριών φαρμάκων είναι η διαταραχή του ανοσολογικού προφίλ του ατόμου που θα εμφανίσει μυασθένεια Gravis, επηρεάζοντας το σύνολο των κυτταροκινών και των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος εξίσου. Δύο είναι οι βασικοί μηχανισμοί με τους οποίους μπορεί να επιτευχθεί αυτό, με τον πρώτο να περιλαμβάνει την επαγωγή μίας αυτοάνοσης αντίδρασης ενάντια της νευρομυικής σύναψης και το δεύτερο την παρεμπόδιση της μετάδοσης του σήματος από τη νευρομυική σύναψη που συμβαίνει φυσιολογικά. Η πρώτη στρατηγική συναντάται συνήθως σε φάρμακα όπως είναι αυτά των παρεμποδιστών της κινάσης τυροσίνης, ενώ η δεύτερη σε αντίστοιχα όπως είναι οι παρεμποδιστές καναλιού ασβεστίου. Μερικά φάρμακα από τα παραπάνω μπορούν να δρουν μέσα και από τους δύο μηχανισμούς βέβαια (103). Πρόσφατη μελέτη έδειξε πως η χορήγηση της τοξίνης Botulinum πρέπει να γίνεται με προσοχή, εφόσον είναι ικανή να προκαλέσει την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων της μυασθένειας Gravis σε άτομα που έχουν λάβει με έγχυση την συγκεκριμένη ουσία (104). Επίσης, στην ερευνητική εργασία του Kanai και της ομάδας του έγινε εμφανές πως η χορήγηση των κορτικοστεροειδών ευνόησε την επιδείνωση της κλινικής εικόνας των μυασθενικών ασθενών (Εικόνα 5) (105, 106).

Μολύνσεις από παθογόνα και συσχέτιση με μυασθένεια Gravis

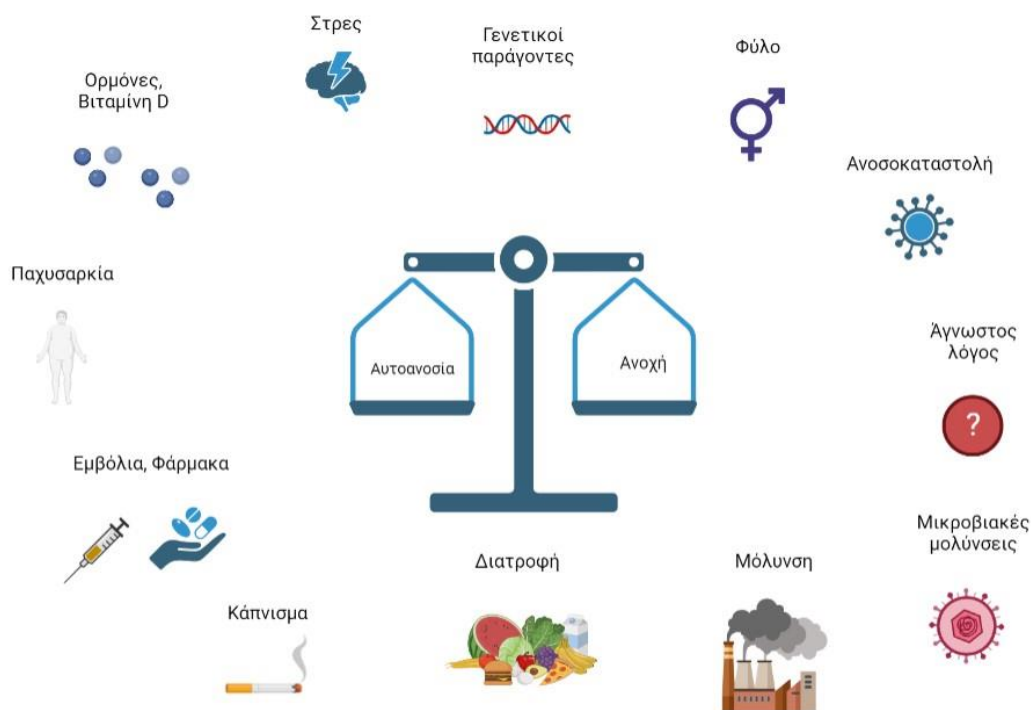
Έχει προταθεί η υπόθεση πως ένας μολυσματικός παράγοντας συμμετέχει στην παθογένεια της μυασθένειας Gravis, αφού ο θύμος αδένας που εμπλέκεται στην δημιουργία του νοσήματος είναι ευάλωτος σε μολύνσεις (107). Έχει βρεθεί η παρουσία των μολυσμένων από ιό Epstein-Barr B λεμφοκυττάρων σε θύμο αδένα με υπερπλασία σε μυασθενικά άτομα αποκλειστικά (108). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει πως και άλλοι ιοί, όπως είναι ο κυταρομεγαλοιός και ο ιός του δυτικού Νείλου σχετίζονται με την παθογένεια της μυασθένειας Gravis (109, 110). Ωστόσο, επειδή τα κλινικά συμπτώματα του νοσήματος μπορεί να συμβούν αρκετά χρόνια μετά από μία πιθανή μόλυνση, είναι δύσκολο να γίνει η διασύνδεση της παθογένειας της μυασθένειας Gravis και μίας συγκεκριμένης μόλυνσης από έναν μικροοργανισμό (Εικόνα 5) (111).

2.9.4. Ανοσολογικό υπόβαθρο για την παθογένεια της μυασθένειας Gravis

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα περισσότερα κύτταρα του θύμου αδένος είναι θυμοκύτταρα και κύτταρα του στρώματος, ενώ συγχρόνως ο αριθμός των B λεμφοκυττάρων είναι αρκετά μικρός. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων των ατόμων με μυασθένεια Gravis, ο θύμος αδένας παρουσιάζει δομικές και λειτουργικές αλλαγές που οδηγούν συχνά στη δημιουργία ενός όγκου, του γνωστού θυμώματος ή στην ανάπτυξη των κέντρων που εμπεριέχουν μεγάλους πληθυσμούς B λεμφοκυττάρων (γνωστή ως υπερπλασία του θύμου αδένος) (80-95% των ασθενών εμφανίζουν ανωμαλίες στο θύμο αδένος και το 20-25% θύωμα) (112, 113). Η υπερπλασία είναι συχνή σε περιπτώσεις πρώιμης εμφάνισης μυασθένειας Gravis, ενώ το θύωμα σε αντίστοιχες μεταγενέστερης εμφάνισης. Και οι δύο συνθήκες φαίνεται να σχετίζονται με την ύπαρξη αντισωμάτων έναντι των υποδοχέων ακετυλοχολίνης και της φλεγμονής στους μυασθενικούς ασθενείς (111). Ως εκ τούτου, οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα έχουν καθοριστικό ρόλο στην αιτιοπαθολογία του νοσήματος.

Έχει βρεθεί πως αρκετά γονίδια επαγόμενα από την ιντερφερόνη-I υπερεκφράζονται στο θύμο αδένος των μυασθενικών ατόμων (114, 115) και αναφέρονται περιπτώσεις μυασθένειας Gravis έπειτα από εφαρμογή θεραπείας με ιντερφερόνη α- ή β- (116, 117), καθώς έχουν βρεθεί αντισώματα έναντι ιντερφερόνης-I σε μερικούς ασθενείς με μυασθένεια Gravis (114, 118). Η ιντερφερόνη-I μπορεί να έχει αντικρούμενες επιδράσεις στα B λεμφοκύτταρα: παρεμποδίζοντας την ωρίμανση και την επιβίωση των ανώριμων B λεμφοκυττάρων ή ευνοώντας την ενεργοποίησή τους, την μεταστροφή του ισοτύπου και την παραγωγή των αντισωμάτων (119). Η φλεγμονή του θύμου αδένος είναι ορατή μέσω της υπερέκφρασης των γονιδίων της ιντερφερόνης-γ, αφού είναι ικανή να επάγει την α- υπομονάδα των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης, που αποτελούν την πιο ανοσογονική περιοχή αυτών (114, 120). Επίσης,

ασθενείς με μυασθένεια Gravis έχουν μεγαλύτερα σε μέγεθος Th₁ και Th₂ κύτταρα, που εκφράζουν IFN-γ και IL-4 σε μεγάλο βαθμό (121). Ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει σε μία ιδιαίτερη ομάδα των Β λεμφοκυττάρων, τα ρυθμιστικά Β λεμφοκύτταρα που φαίνεται να είναι μειωμένα σε αριθμό στο περιφερικό αίμα των ασθενών με μυασθένεια Gravis (122). Έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι στιγμής 11 μέλη της οικογένειας των ανθρώπινων υποδοχέων TLR, με τον τελευταίο να κινητοποιεί την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, μέσα από σηματοδοτικά μονοπάτια, ενεργοποιώντας κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή (123). Στην περίπτωση του υπερπλαστικού θύμου αδένος των μυασθενικών ατόμων, υπάρχει υπερέκφραση των υποδοχέων TLR₃, TLR₄, TLR₇ και TLR₉, σε συγχρονισμό με τη χρόνια φλεγμονή. Σε δύο πρόσφατες μελέτες φάνηκε πως υπάρχει υπερέκφραση των TLR₃ και TLR₄ υποδοχέων σε θύμο αδένος μυασθενικών ασθενών, υποδηλώνοντας έτσι, πως οι μικροβιακές λοιμώξεις συμμετέχουν στη δημιουργία αυτοαντισωμάτων έναντι AChR, ευνοώντας την εμφάνιση της μυασθένειας Gravis (Εικόνα 5) (124,125). Μεταξύ των παθογόνων που δύνανται να συμμετέχουν στην παθογένεια της μυασθένειας Gravis μπορούν να συμπεριληφθούν οι ιοί Epstein-Barr και Human Cytomegalovirus καθώς και το βακτήριο *Helicobacter pylori* (108, 109).



Εικόνα 5: Παρουσίαση των ενδογενών και των εξωγενών παραγόντων που ευθύνονται για την αιτιοπαθολογία των περισσότερων αυτοάνοσων νοσημάτων (126).

3. Δομή παθογόνων μικροοργανισμών της υπό μελέτη εργασίας

3.1. Epstein-Barr ιός (Epstein-Barr virus, EBV)

Οικογένεια, επιπολασμός και δομή του EBV

Παράγοντας κινδύνου που συμμετέχει στην αιτιοπαθολογία πολλών αυτοάνοσων νοσημάτων είναι οι μολύνσεις από παθογόνους μικροοργανισμούς που υφίσταται το κάθε άτομο ετησίως (127, 128). Μεταξύ των παθογόνων που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης της αυτοανοσίας είναι ο ιός του Epstein-Barr (Epstein-Barr Virus, EBV). Ο συγκεκριμένος ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των ερπητοιών ανθρώπου (Human Herpes Viruses, HHVs) που φέρει τρεις υποοικογένειες: αλφα, βήτα και γάμμα και προκαλεί τη νόσο της λοιμώδους μονοκυρήνωσης στα άτομα που μολύνει, με τα τυπικά συμπτώματα να εκδηλώνονται εντός 4-6 εβδομάδων μετά τη λοίμωξη (129, 130, 131, 132). Η πλειοψηφία των ανθρώπων έχει μολυνθεί από το ιό Epstein-Barr, με επιπολασμό της τάξης του 90% σε παγκόσμιο επίπεδο σε όλο το χρόνο ζωής των ατόμων. Μάλιστα, το μεγαλύτερο σύνολο των παιδιών παρουσιάζει λοίμωξη νωρίς χρονικά στη ζωή, με τις περισσότερες περιπτώσεις να παραμένουν μη ανιχνεύσιμες. Αμέσως μετά η επόμενη χρονική περίοδος που εμφανίζει την πλειοψηφία των μολύνσεων με EBV αφορά την εφηβεία, εξαιτίας της επαφής με ήδη μολυσμένα με τον ιό άτομα (133, 134, 135, 136). Το ενδεχόμενο της μόλυνσης από τον EBV ιό εξαρτάται από το γενετικό υπόβαθρο του οργανισμού-ξενιστή και την ισορροπία μεταξύ των δύο φάσεων του κύκλου ζωής του ιού, σε συνδυασμό με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και τον τρόπο ζωής που αυτός εκτίθεται (137, 138) επιδρώντας στους κυτταρικούς πληθυσμούς του ανοσοποιητικού συστήματος του (λόγου χάριν CD8⁺ T λεμφοκύτταρα).

Το γονιδίωμα του είναι κυκλικό με διπλή έλικα DNA και μέγεθος περίπου ίσο με 172 kb. Αυτό εμπεριέχει χιλιάδες γονίδια, που κωδικοποιούν περίπου 85 πρωτεΐνες και 50 μη-κωδικά μόρια RNAs (139, 140, 141, 142, 143). Η δομή του EBV είναι η κλασική αυτής των HHVs. Αναλυτικότερα, ο ιός φέρει ένα εξωτερικό λιπιδικό περίβλημα, με πρωτεΐνες της μεμβράνης του μολυσμένου κυττάρου του οργανισμού-ξενιστή και του ίδιου ιού (οι 9 γλυκοπρωτεΐνες εισόδου στο κύτταρο-ξενιστή κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του ιού). Οι 13 πρωτεΐνες του περιβλήματος είναι γλυκοπρωτεΐνες, με τις 12 να εκφράζονται αποκλειστικά κατά τη διάρκεια του παραγωγικού σταδίου της ζωής, του λυτικού κύκλου και της λυσιγονίας του ιού (144). Εντός του περιβλήματος, υπάρχουν το ιικό κυτταρόπλασμα και το καψίδιο που είναι ένας χώρος, περιβαλλόμενος από μεμβράνη και περιέχει το γονιδίωμα και τις πρωτεΐνες του ιού.

Κύκλος ζωής του EBV

Ο κύκλος ζωής του EBV είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ενός ιού με DNA γονιδίωμα, περιλαμβάνοντας την πρωταρχική μόλυνση του οργανισμού-ξενιστή και τις φάσεις της λυσιγονίας και του λυτικού κύκλου. Το πλεονέκτημα του EBV ιού, όμως, σε σύγκριση με άλλους ιούς, έγκειται στην ικανότητά του να μολύνει διαφορετικούς τύπους κυττάρων (145). Τα κύρια κύτταρα που μολύνονται από τον ιό αυτό είναι τα επιθηλιακά και τα Β λεμφοκύτταρα, με τα πρώτα να είναι η πρώτη ομάδα κυττάρων που βάλλεται, δεδομένου πως ο EBV μεταδίδεται κυρίως μέσω του σάλιου. Μόλις ο ιός αποκτήσει πρόσβαση στον υποκείμενο ιστό μετά την απελευθέρωση από το στομαφαρυγγικό επιθήλιο, μολύνονται τα Β λεμφοκύτταρα (146, 147, 148, 149, 150). Τα ιοσωμάτια που απελευθερώνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα προσανατολίζονται προς τα Β λεμφοκύτταρα και το αντίστροφο, εξαιτίας των γλυκοπρωτεϊνών του περιβλήματος που αυτά φέρουν (151, 152, 153). Η μόλυνση των δύο τύπων κυττάρων πραγματοποιείται με τη δράση διαφορετικών γλυκοπρωτεϊνών του περιβλήματος των κυττάρων κάθε φορά. Το κοινό στοιχείο όμως στη μόλυνση των δύο τύπων κυττάρων από τον EBV, έγκειται στο μηχανισμό με τον οποίο συμβαίνει η μόλυνση, όπου χρησιμοποιείται η διαδικασία της ενδοκυττάρωσης της σύντηξης της μεμβράνης του ιού με αυτήν του κυττάρου ξενιστή και της εισαγωγής του καψιδίου του ιού εντός του κυττάρου ξενιστή. Επακόλουθο αυτής της διαδικασίας είναι η μεταγραφή των ιικών γονιδίων, η μετάφραση των ιικών mRNAs και τελικά η αναπαραγωγή του ιικού DNA, η συγκρότηση των νέων ιών και η εξωκυττάρωση τους, με σκοπό τη μόλυνση άλλων κυττάρων. Μία άλλη σημαντική πλεονεκτική στρατηγική του EBV αποτελεί η ικανότητά του να διαφεύγει των μηχανισμών επιτήρησης της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας του οργανισμού-ξενιστή. Συγκεκριμένα, ο ιός μπορεί να εισέρχεται στη φάση της λυσιγονίας, έχοντας μία μικρή έκφραση λίγων γονιδίων του, επομένως και μικρή παρουσίαση κάποιων ιικών πεπτιδίων του. Με αυτόν τον τρόπο καταφέρνει να καταστεί «αόρατος» από τον οργανισμό-ξενιστή. Αυτή η μέθοδος είναι συχνά ορατή στα Β λεμφοκύτταρα, ενώ συμβαίνει και στα επιθηλιακά κύτταρα εξίσου. Η ευάλωτη θέση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, όμως, σε συνδυασμό με κάποια περιβαλλοντικά ερεθίσματα, μπορούν να προσφέρουν εύφορο έδαφος στον ιό να μεταβεί από τη λυσιγονία στο λυτικό κύκλο και να ενεργοποιηθεί, πυροδοτώντας τη μόλυνση περισσότερων κυττάρων και εκκινώντας μία ανοσολογική απόκριση στον οργανισμό-ξενιστή είτε άμεσα είτε έμμεσα μολύνοντας άλλα κύτταρα.

EBV και διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο EBV έχει αναπτύξει στρατηγικές, προκειμένου να αποφεύγει την αντιμετώπισή του από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού-ξενιστή. Ανάμεσα σε αυτές συγκαταλέγονται η περιτύλιξη του ιού γύρω από τις πρωτεΐνες του κυττάρου-

ξενιστή (εξωτερικό περίβλημα) και η ικανότητά του να μεταβαίνει από τη λυσιγονία στο λυτικό κύκλο (154, 155). Στη φάση της λυσιγονίας, η μόνη ιική πρωτεΐνη που εκφράζεται είναι το EBNA-1 πυρηνικό αντιγόνο, που εξασφαλίζει τη διατήρηση και αναπαραγωγή του γονιδιώματος του ιού. Ο ιός επιτυγχάνει να αποφύγει την παρουσίαση του EBNA-1 αντιγόνου στο MHC-I σύμπλοκο, χάριν στην αλληλεπίδραση των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών AG του EBNA-1 με το πρωτεάσωμα και το νουκλεόσωμα του ξενιστή, για καταστολή του τελευταίου. Επίσης, το EBNA-1 εμπεριέχει χαρακτηριστικές RG επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην εισβολή στον ξενιστή. Κατά τη μετάβαση από τη λυσιγονία στο λυτικό κύκλο μέσω της παραγωγής των ιικών πρωτεϊνών, ο ιός μειώνει την έκφραση του MHC-I συμπλόκου και εμποδίζει την αντιγονοπαρουσίαση των ιικών πεπτιδίων στο σύμπλοκο, μέσω της επαγόμενης από την εξωνουκλεάση BDLF-3 ουμπιτικοινοποίησης του συμπλόκου (156). Αντίστοιχα, το ίδιο συμβαίνει και στο MHC-II σύμπλοκο των Β λεμφοκυττάρων και στον TCR υποδοχέα των Τ λεμφοκυττάρων (157, 158). Μεταξύ των μεθόδων διαφυγής του ιού περιλαμβάνεται ο αποκλεισμός της απόπτωσης από τον οργανισμό-ξενιστή μέσω της μειωμένης έκφρασης και της παρεμπόδισης της δράσης των TLR υποδοχέων (159, 160, 161, 162, 163, 164). Τέλος, ο EBV παράγει διαλυτά μόρια-ρυθμιστές, όπως είναι το BCRF-1 μόριο που είναι ομόλογο με την ιική IL-10 και έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της φλεγμονής (165-168) και την ενεργοποίηση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (169, 170). Επίσης, το ιικό εξωτερικό περίβλημα του EBV επειδή φέρει και πρωτεΐνες του ξενιστή προσφέρει επιπρόσθετη προστασία, ενώ ταυτόχρονα φέρει δομική ομοιότητα με ένα εξωκυτταρικό κυστίδιο του ξενιστή. Άλλος μηχανισμός προστασίας του EBV αποτελεί η ύπαρξη ορισμένων γλυκοπρωτεϊνών του ξενιστή στο περίβλημα του, αποφεύγοντας έτσι τη δημιουργία των ειδικών αντισωμάτων από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Παρόλο όμως, όλους τους προστατευτικούς μηχανισμούς που διακρίνουν τον EBV ιό, το ανοσοποιητικό σύστημα βρίσκει δικλίδες ασφαλείας, ωθώντας τον ιό σε λυσιγονία (με άγνωστο ακόμη μηχανισμό), καθώς και στρατολογώντας την κυτταρική ανοσία (Τ λεμφοκύτταρα, NK και NKT κύτταρα) για την καταπολέμηση της λοίμωξης από τον EBV.

Συσχέτιση της EBV λοίμωξης με την παθογένεια της μυασθένειας Gravis

Αναζητώντας τα αίτια της παθογένειας της μυασθένειας Gravis, έχει προταθεί πως η λοίμωξη από τον Epstein-Barr ιό συνεισφέρει σημαντικά στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης του νοσήματος. Υπό το πρίσμα αυτής της υπόθεσης, η Cavalcante και οι συνεργάτες της, πρότειναν σε μία μελέτη τους το 2011, πως η συνεργατική δράση της μόλυνσης από τον EBV ιό και της ύπαρξης της φλεγμονής στον θύμο αδέν, αποτελεί σημαντικό τμήμα της αιτιοπαθογένειας της μυασθένειας Gravis (169). Τα αποτελέσματα αυτής και μιας παλαιότερης μελέτης της ίδιας

ομάδας το 2010, συνηγορούν πως ο EBV ιός χρησιμοποιεί κυρίως τη φάση II της λυσιγονίας, προκειμένου να την εγκαθιδρύσει στο θύμο αδένια μυασθενικών ατόμων (169, 168). Αυτό είναι εμφανές μέσα από την ανίχνευση των ικών αντιγόνων EBNA-1, EBNA-2, LMP-1 και LMP-2 από τους ερευνητές σε θύμο αδένια αποκλειστικά μυασθενικών ατόμων, που πιστοποιεί την παρουσία του ιού στα άτομα και μάλιστα στη φάση της λυσιγονίας. Επιπλέον, η εύρεση του αντιγόνου BZLF-1, που είναι ένας πρωτεϊνικός ενεργοποιητής των πρώιμων γονιδίων του λυτικού κύκλου του EBV, στην πλειοψηφία των ασθενών με μυασθένεια Gravis (16/19 άτομα) και η απουσία του από τα υγιή άτομα, δείχνει πως η παρούσα λοίμωξη από τον ιό μπορεί να οδηγήσει σε μία νέα λοίμωξη, ακόμα και μετά από τη θεραπεία των ασθενών (168). Αυτό συμβαίνει γιατί ο BZLF-1 μαζί με τον BRLF-1 παράγοντα ενεργοποιούν ικούς μεταγραφικούς παράγοντες που ενορχηστρώνουν τη μετάβαση από τη λυσιγονία στο λυτικό κύκλο του EBV ιού, ωθώντας νέα σχηματιζόμενα ιοσωμάτια EBV να μολύνουν B λεμφοκύτταρα, μέσω της πρόσδεσης της gp35 ιικής γλυκοπρωτεΐνης στο CD₂₁ μόριο των B κυττάρων (170).

3.2. Ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (Human Cytomegalovirus, HCMV)

Οικογένεια, επιπολασμός και δομή του HCMV

Ο ιός Human Cytomegalovirus (HCMV) ή αλλιώς Human Herpesvirus 5 (HHV5) ανήκει στην υποοικογένεια των β-herpesvirinae της οικογένειας *Herpesviridae* και εμφανίζει επιπολασμό της τάξης του 90% παγκοσμίως (171, 172). Μάλιστα, το 60% των αναπτυγμένων και το 90% των αναπτυσσόμενων χωρών εμφανίζουν IgG αντισώματα ειδικά για τον HCMV ιό, έχοντας μία προτίμηση στους μη Καυκάσιους πληθυσμούς (173). Σε υγιείς ενήλικες και παιδιά, η λοίμωξη HCMV είναι συχνά ασυμπτωματική ή προκαλεί μέτριας σοβαρότητας συμπτώματα, χάριν στους ανοσορρυθμιστικούς μηχανισμούς του οργανισμού-ξενιστή. Αντιθέτως, προκαλεί σοβαρά συμπτώματα σε ομάδες ανοσοκατασταλμένων ατόμων και άρρωστων νεογνών. Ο ιός HCMV χαρακτηρίζεται από μία δομή τριών στρωμάτων. Το πρώτο είναι ένα εξωτερικό περίβλημα με διπλό στρώμα λιπιδίων, το δεύτερο ένα εσωτερικό ψευδο-εικοσαεδρικό νουκλεοκαψίδιο και το τρίτο που είναι το ενδιάμεσο των δύο προηγούμενων στρώμα, πλούσιο σε πρωτεΐνες. Το νουκλεοκαψίδιο σχηματίζεται από ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και εμπεριέχει εντός του το γονιδίωμα του ιού, που είναι ένα γραμμικό μόριο διπλής έλικας DNA, που κωδικοποιεί 751 πρωτεΐνες και μη-κωδικά μόρια RNAs (174). Εντός του νουκλεοκαψιδίου βρίσκεται το γονιδίωμα του ιού, που είναι μία διπλή έλικα του DNA και έχει μέγεθος 230-240 kb κωδικοποιώντας 156 γονίδια, αποτελώντας το μεγαλύτερο DNA των ανθρώπινων ερπητοϊών (175, 176, 177). Σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της δομής του νουκλεοκαψιδίου παίζει η ειδική για τον ιό πρωτεΐνη pp150. Βασικές λειτουργίες του

νουκλεοκαψιδίου είναι η αποθήκευση και η μεταφορά του ιικού γονιδιώματος, τις οποίες επιτυγχάνει μέσω των αλλαγών που υφίσταται, ανάλογα με το φυσικοχημικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται.

Κύκλος ζωής του HCMV

Ο ιός HCMV μεταδίδεται μέσω του σάλιου, της σεξουαλικής επαφής, του πλακούντα, του θηλασμού, της μετάγγισης αίματος και της μεταμόσχευσης οργάνων ή αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων. Ο κύκλος αναπαραγωγής του ιού έχει διάρκεια 48-72 ωρών (178). Από την στιγμή της μόλυνσης του οργανισμού-ξενιστή με τον ιό HCMV δύο ενδεχόμενα είναι πιθανά να συμβούν: είτε να εισέλθει ο ιός στη φάση του λυτικού κύκλου, είτε να παραμείνει στη φάση της λυσιγονίας (179). Ο ιός HCMV είναι ικανός να προκαλέσει μόλυνση των κυττάρων του οργανισμού-ξενιστή, εκθέτοντας κάποιες πρωτεΐνες-αντιγόνα του. Κάποια εξ αυτών παράγονται κατά τη διάρκεια του λυτικού κύκλου του ιού, ενώ άλλα κατά το στάδιο της λυσιγονίας του. Μεταξύ τους βέβαια έχουν διαφορετικές λειτουργίες. Ειδικότερα, άτομα που έχουν μολυνθεί από τον HCMV ιό, φέρουν IgG αντισώματα, ειδικά για τις γλυκοπρωτεΐνη B (glycoprotein B, gB, UL55), pp52 (UL44), pp150 (UL32), pp130 (UL57), pp28 (UL99), pp65 (UL83) και IE1 (UL123).

Λυτικός κύκλος HCMV

Ο HCMV προσκολλάται στην επιφάνεια ενός κυττάρου του ξενιστή (επιθηλιακά κύτταρα για αρχή) μέσω ειδικών γλυκοπρωτεϊνών (glycoproteins, gs) (gB και gH συμπλέγματα) της εξωτερικής πλευράς της μεμβράνης του πάνω σε ειδικούς κυτταρικούς υποδοχείς επιφάνειας των κυττάρων του ξενιστή (επιδερμικούς υποδοχείς του παράγοντα αύξησης των κυττάρων EGFR και των κυτταρικών ιντεγκρινών), ενεργοποιώντας την κυτταρική σηματοδότηση και τις κυτταρικές λειτουργικές αλλαγές (180). Οι σημαντικότερες γλυκοπρωτεΐνες που χρησιμοποιεί ο HCMV είναι η gB (UL55), gH (UL75) ή gL (UL115) ή gO (UL174), η gH/gL (UL128-131) και η gM (UL100)/gN (UL73) (180). Μόλις γίνει η επαφή του ιού με την μεμβράνη των κυττάρων του ξενιστή, το καψίδιο του ενοποιείται με τη μεμβράνη του κυττάρου του ξενιστή και με ενδοκυττάρωση ο ιός εισέρχεται εντός του κυτταροπλάσματος του δεύτερου. Αμέσως μετά, το ιικό γονιδίωμα μετατοπίζεται εντός του πυρήνα του κυττάρου του ξενιστή και εκκινεί η διαδικασία της μεταγραφής των γονιδίων, με κυριότερο την παραγωγή της πρωτεΐνης IE1. Η μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος αποτελεί την αρχή του λυτικού κύκλου του HCMV, απαιτώντας τη μεταγραφή έξι συντηρημένων πρωτεϊνών μεταγραφής για το γένος *Herpesviridae*: την ιική πολυμεράση DNA (UL54), τον παράγοντα ενεργοποίησης της αντιγραφής (UL44), την πρωτεΐνη πρόσδεσης στη μονή αλυσίδα DNA (UL57) και το

σύμπλεγμα ελικάσης/πριμάσης του ιού (UL70, UL102 και UL105) (181). Στην αντιγραφή του DNA του ιού παίζουν καθοριστικό ρόλο και οι ιικές πρωτεΐνες IE2 (ως ιικός συνενεργοποιητής) και UL84. Πρωτεΐνες του καψιδίου έχουν προκύψει μετά την μεταγραφή των αντίστοιχων γονιδίων και πακετάρωνται στο σύμπλεγμα του Golgi του κυττάρου του ξενιστή, με σκοπό τη δημιουργία των λειτουργικών ισωμάτων του ιού. Αποτέλεσμα όλων των παραπάνω είναι η σύσταση των νέων ισωμάτων και η έξοδος αυτών από το κύτταρο του ξενιστή με εξωκυττάρωση.

Λυσιγονία του HCMV

Παρόλη την άμεση ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή στην πρωτογενή μόλυνση του από τον HCMV, ο ιός δεν απομακρύνεται εντελώς από τον πρώτο, παρά παραμένει για το υπόλοιπο της ζωής του σε μία φάση, που καλείται λυσιγονία. Στη λυσιγονία ο ξενιστής φέρει τον ιό σε μία σιωπηλή κατάσταση σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων του, δίχως να παράγονται νέα ισωμάτια (179). Κατά τη διάρκεια της λυσιγονίας, εκφράζονται επίσης γονίδια, απλώς σε χαμηλότερο βαθμό σε σχέση με αυτά του λυτικού κύκλου. Οι μηχανισμοί με τους οποίους ο HCMV δημιουργεί και διατηρεί τη λυσιγονία, καθώς και προκαλεί την επανεργοποίηση του ίδιου παραμένουν υπό διερεύνηση ακόμα. Είναι όμως πιθανό το ενδεχόμενο της περιοδικής επανεργοποίησης του ιού, με τη διαφορά πως στα ανοσοκατασταλμένα άτομα, τα γεγονότα ενεργοποίησης εμφανίζονται υποκλινικά ή αλλιώς ασυμπτωματικά. Η επανεργοποίηση από τη φάση της λυσιγονίας συμβαίνει μετά από την ύπαρξη εξωτερικών ερεθισμάτων, όπως είναι οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, οι οποίες δύνανται να αλλάζουν το ενδοκυτταρικό περιβάλλον με τέτοιο τρόπο που να ευνοεί την επανέκφραση των IE, E και L ιικών γονιδιακών προϊόντων (182). Το σημείο που λαμβάνει χώρα η λυσιγονία φαίνεται να είναι στα κύτταρα της μυελογενούς σειράς, κινητοποιώντας τη διαφοροποίηση αυτών σε ιστοειδικά μαρκοφάγα κύτταρα, επάγοντας την έκφραση ιικών γονιδίων και την παραγωγή των νέων μολυσματικών ισωμάτων (174).

Τρόποι επαγωγής της αυτοανοσίας από τον HCMV ιό

Ο HCMV δύναται να επάγει την αυτοανοσία στον οργανισμό-ξενιστή διαμέσου διαφορετικών διαδικασιών, οι οποίες μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: τις αντιγονοειδικές (όπως είναι η μοριακή μίμηση) και τις μη-αντιγονοειδικές διαδικασίες (λόγου χάριν το bystander φαινόμενο). Από την σκοπιά της ανοσοπαθολογίας, ο ιός μπορεί να προκαλέσει ή να συντηρήσει την αυτοανοσία, μέσω τριών μηχανισμών: της παραγωγής αυτοαντισωμάτων, της επαγόμενης φλεγμονής και της καταστροφής των αγγείων (183).

A. Παραγωγή αυτοαντισωμάτων

Η παραγωγή αυτοαντισωμάτων είναι το αποτέλεσμα της επαγόμενης από τον HCMV μοριακής μίμησης, στην οποία η λοίμωξη ενεργοποιεί τα T λεμφοκύτταρα, που αντιδρούν διασταυρούμενα με εαυτά αντιγόνα. Υπάρχουν μελέτες που συσχετίζουν τα αντισώματα έναντι δομών του HCMV και των εαυτών-αντιγόνων σε περιπτώσεις αυτοάνοσων νοσημάτων (184, 185). Επιπρόσθετα, η χυμική αυτοανοσία μπορεί να επαχθεί από μη-ειδική ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων, καθώς ο HCMV μπορεί να θεωρηθεί ως ενεργοποιητής των πολυκλωνικών B λεμφοκυττάρων. Στο πλαίσιο αυτό, ο ιός έχει την ικανότητα να προωθήσει τον πολλαπλασιασμό των B λεμφοκυττάρων και κατά επέκταση την παραγωγή των αυτοαντισωμάτων, μέσω της αλληλεπίδρασης του ίδιου με τον TLR 7/9 υποδοχέα σε δενδριτικά κύτταρα του πλάσματος (186). Τέλος, σε μία πρόσφατη μελέτη αποδείχθηκε η αλληλεπίδραση του παράγοντα BAFF των B λεμφοκυττάρων και του TLR υποδοχέα, με αποτέλεσμα την έκκριση των IgG ανοσοσφαιρινών και τη μόλυνση των μη μολυσμένων B λεμφοκυττάρων από τον HCMV ιό (187).

B. Επαγόμενη φλεγμονή

Συχνά ιοί, στους οποίους συγκαταλέγεται και ο HCMV, δύνανται να προκαλέσουν μία μη ειδική αντική ανοσοαπόκριση, βασιζόμενη στο μηχανισμό της bystander ενεργοποίησης. Στην τελευταία παρατηρείται η ενεργοποίηση των κλώνων αυτοδραστικών T λεμφοκυττάρων από εαυτά αντιγόνα που παρουσιάζονται σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Η επανεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός του HCMV σε ιστό με φλεγμονή φαίνεται να επάγει τη διαφοροποίηση των απορρυθμισμένων $CD4^+CD28^-$ T λεμφοκυττάρων σε συνθήκες αυτοανοσίας (188). Μάλιστα, η μελέτη του Liu και των συνεργατών του έδειξε την ύπαρξη αντισώματος έναντι του pp150 αντιγόνου του HCMV σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα. Το ίδιο αντιγόνο μπορεί να αναγνωρίζει την μεμβρανική πρωτεΐνη CIP2A, προωθώντας τον κυτταρικό θάνατο των $CD56^+BRIGHT$ NKs, ένα σύνολο κυττάρων που συναντάται συχνά στην αυτοανοσία. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα αυτοαντισώματα για τον HCMV μπορεί να είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση των αυτοάνοσων νοσημάτων (189). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις πως τα γδ T λεμφοκύτταρα συνδέονται με τη λοίμωξη από τον HCMV και την κυτταροπενία που παρατηρείται στην αυτοανοσία (190).

Γ. Καταστροφή των αγγείων

Έχει βρεθεί πως ο HCMV παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην καταστροφή των αγγείων, διαμέσου του κυτταρικού θανάτου των επιθηλιακών κυττάρων, της διήθησης των κυττάρων της

φλεγμονής και του πολλαπλασιασμού των μυϊκών κυττάρων. Ο μηχανισμός της επαγόμενης από τον HCMV καταστροφής των αγγείων έχει συσχετιστεί με τη μοριακή μίμηση που χαρακτηρίζεται από το ρόλο των επιθηλιακών κυττάρων στην απελευθέρωση των αυτοαντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών NAG-2/UL94 (191).

Συσχέτιση του HCMV με την παθογένεια της μυασθένειας Gravis

Ο κίνδυνος εμφάνισης ενός αυτοάνοσου νοσήματος, όπως είναι αυτό της μυασθένειας Gravis, οφείλεται σε γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, αλλά επίσης αυξάνεται αρκετά με την έκθεση του οργανισμού-ξενιστή στους παθογόνους μικροοργανισμούς. Στην περίπτωση της μυασθένειας Gravis, οι ιοί εμπλέκονται στην εμφάνιση του νοσήματος, μέσω της μοριακής μίμησης ή/και της χρόνιας φλεγμονής. Σε μία πρόσφατη μελέτη των Probst και των συνεργατών της αποδείχθηκε η συσχέτιση του τίτλου των IgG αντισωμάτων που δημιουργούνται έναντι του HCMV και της εμφάνισης της μυασθένειας Gravis (192). Σε μία αντίστοιχη μελέτη του Xu Yanqui και των συνεργατών του φάνηκε πως μία ενεργή HCMV λοίμωξη πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην περίπτωση της εφαρμοζόμενης θεραπείας με αζαθιοπρίνη σε έναν μυασθενικό ασθενή (193). Αντίστοιχα σε δύο μελέτες που διεξήχθησαν το 2020 και 2022, έγινε εμφανής η αιτιολογική σχέση μεταξύ της λοίμωξης με HCMV ιό και της έναρξης της μυασθένειας Gravis (194, 195). Συμπερασματικά, λοιπόν, η μυασθένεια Gravis πιθανώς σχετίζεται με τον περιορισμένο έλεγχο της λοίμωξης του HCMV και της διαρκούς επανεργοποίησης του ιού στους μυασθενικούς ασθενείς.

3.3. Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*, HP)

Οικογένεια, επιπολασμός και δομή του HP

Μεταξύ των παθογόνων μικροοργανισμών, το *Helicobacter pylori* (HP) έχει διερευνηθεί τόσο για τα οργανοειδικά όσο και τα μη-οργανοειδικά αυτοάνοσα νοσήματα (196). Ανήκει στην τάξη των *Campylobacterales* και την οικογένεια *Helicobacteraceae*. Η μόλυνση με HP είναι αρκετά συχνή, δεδομένου πως το 50% του παγκόσμιου πληθυσμού φαίνεται να έχει μολυνθεί με αυτό. Η λοίμωξη με HP συμβαίνει συνήθως στην παιδική ηλικία και μπορεί να διατηρηθεί μέχρι την ενηλικίωση, αν δεν αντιμετωπιστεί εγκαίρως. Η διάρκεια της οξείας φλεγμονής από τη λοίμωξη διαρκεί δύο εβδομάδες χρονικά (197). Σε μία πρόσφατη μελέτη του Lai Hooi και των συνεργατών του αποδείχθηκε πως ο υψηλότερος επιπολασμός εμφανίζεται στην Αφρική (70.1%), ενώ μετά ακολουθούν η Νότια Αμερική (69.4%) και η Δυτική Ασία (66.6%). Αντιθέτως, η πιο σπάνια παρουσία του βακτηρίου συναντάται στην Ωκεανία (24.4%), στη Δυτική Ευρώπη (34.3%) και στη Βόρεια Αμερική (37.1%). Η διαφορά αυτή στον επιπολασμό

του βακτηρίου οφείλεται στις διαφορετικές κοινωνικοοικονομικές συνθήκες και κατά επέκταση τις συνθήκες της υγιεινής που επικρατούν σε κάθε περίπτωση, που φαίνεται να αυξάνουν τον κίνδυνο της μόλυνσης από το *HP* (198). Η μόλυνση με *HP* μεταδίδεται είτε μέσω του σάλιου μεταξύ των ατόμων είτε μέσω μολυσματικής τροφής ή νερού. Έτσι, ο συνδυασμός των μολυσμένων υδάτων, του συνωστισμού των ατόμων και της περιορισμένης υγιεινής ευνοεί την ύπαρξη περιστατικών λοίμωξης με *HP*.

Ως μικροοργανισμός το *HP* είναι ένα μικροαερόφιλο, Gram αρνητικό βακτήριο, το οποίο αποικίζει το βλεννογόνο του στομάχου. Προκαλεί πολυάριθμες διαταραχές του πεπτικού συστήματος, των οποίων η σοβαρότητα και ο τύπος εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες (199). Ανάμεσα σε αυτούς περιλαμβάνονται η κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, η παθογένεια των αλυσίδων του βακτηρίου και η επίδραση διάφορων περιβαλλοντικών ερεθισμάτων (200). Η λοιμογόνος δράση του βακτηρίου οφείλεται στα γονίδια A που σχετίζεται με την κυτταροτοξίνη A (Cag A) και την κενοτοπιώδη κυτταροτοξίνη A (Vac A), καθώς και τα μόρια προσκόλλησης που βοηθούν στην προσκόλληση του βακτηρίου στο βλεννογόνο του γαστρεντερικού συστήματος. Το *HP* τόσο σε *in vivo* όσο σε *in vitro* συνθήκες έχει S σχήμα με 1-3 στροφές, μήκος 0,5 x 5 μm και διάμετρο 0,5 μm, ενώ φέρει μαστίγιο εντός περιβλήματος. Η πλειοψηφία των ελικοβακτηριδίων εμφανίζει τη βασική μορφή του S σχήματος, πολικότητα, μαστίγιο με περίβλημα και ποικιλία στο σχήμα και στον αριθμό των περιστροφών που φέρει το μαστίγιο. Τα συγκεκριμένα δύο χαρακτηριστικά του βακτηρίου, που αφορούν τη μορφολογία και την κινητικότητά του, του δίνουν πλεονεκτήματα στην πρόσβασή του στο βλεννογόνο του γαστρεντερικού συστήματος (201).

Τυπικά το *HP* έχει τη δομή ενός κλασικού Gram⁻ βακτηρίου. Ειδικότερα, αποτελείται από το κυτταρικό τοίχωμα από πεπτιδογλυκάνη, που περιβάλλεται από μία επιπλέον εξωτερική μεμβράνη από λιποπολυσακχαρίτες και φωσφολιπίδια και μία εσωτερική, την πλασματική μεμβράνη, που αποτελείται φυσιολογικά από μία διπλή στοιβάδα φωσφολιπιδίων. Την πλασματική μεμβράνη ακολουθεί το κυτταρόπλασμα, με κυτταρικά οργάνδια όπως είναι τα μιτοχόνδρια και τα ριβοσώματα και τέλος το γενετικό υλικό (DNA) του βακτηρίου. Το *HP* αποτελείται από τέσσερα ως έξι ίδιας πολικότητας μαστίγια, που είναι σημαντικά για την κίνηση του βακτηρίου, καθώς και τη δημιουργία του βακτηριακού βιοφιλμ σε μία επιφάνεια, όπως είναι το εσωτερικό του βλεννογόνου του εντέρου. Επίσης, έχει αποδειχθεί η συνδρομή των πρωτεϊνών του βακτηρίου στην προσκόλληση του ίδιου στα κύτταρα του ξενιστή και στην ανθεκτικότητα του στις ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες στην περιοχή του εντέρου. Ενδεικτικά τέσσερις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης, οι HopS, HopT και οι HopC, HopB βοηθούν στην προσκόλληση του βακτηρίου στην μεμβράνη και τις λαμινίνες των κυττάρων του ξενιστή

αντίστοιχα. Τέλος, κάποια γονίδια του γονιδιώματος του *HP* κωδικοποιούν την παραγωγή της ουρεάσης, η οποία υδρολύει την ουρία σε αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα. Η ουρεάση είναι εντοπισμένη στην επιφάνεια του βακτηρίου ή στο κυτταρόπλασμα, όταν αυτό απελευθερώνεται μετά από τη βακτηριακή λύση και ευθύνεται για τον αποικισμό και τη χημειοτακτική δράση του βακτηρίου, με σκοπό την προσέλκυση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή (202).

Τρόποι μόλυνσης του οργανισμού-ξενιστή από το *HP*

Η μόλυνση με *HP* διακρίνεται σε τρία επιμέρους στάδια: τον αποικισμό του βλεννογόνου του στομάχου, την επακόλουθη ανοσολογική απόκριση και την εμφάνιση της ασθένειας. Στο πρώτο στάδιο της μόλυνσης, το βακτήριο *HP* κατευθύνεται προς την μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων, μόλις εισέλθει στο στόμαχο, εκμεταλλευόμενο τις τραυματισμένες περιοχές του στομάχου (202, 203). Αυτό είναι εφικτό από το βακτήριο, καθώς το ίδιο χρησιμοποιεί τον υποδοχέα TlpB, για να ρυθμίσει την κίνηση του μαστιγίου του σύμφωνα με τα χημικά σήματα (ουρία, γαστρικό οξύ, γαλακτικό οξύ) του περιβάλλοντος των κυττάρων στο οποίο βρίσκεται το βακτήριο, με βασικότερο σήμα την ουρία. Ακολουθεί η φάση της προσκόλλησης του βακτηρίου *HP* στα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου. Το ενδεχόμενο μία λοίμωξη από το βακτήριο *HP* να αποβεί καταστροφική για την υγεία του ατόμου βασίζεται σε μία λεπτή ισορροπία, που καθορίζει εάν θα καταφέρει το βακτήριο να διαφύγει των αμυντικών μηχανισμών του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή ή θα αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά από αυτό, επάγοντας εν τέλει την ανοσολογική αντίδραση στον ξενιστή. Στον άξονα αυτό τρεις παράγοντες θα καθορίσουν την ισορροπία: οι λοιμογόνοι παράγοντες του *HP* που ελέγχουν τη μη-ειδική αντίδραση των επιθηλιακών κυττάρων του γαστρεντερικού συστήματος μαζί με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, το μικροβίωμα του γαστρεντερικού συστήματος και οι πολυμορφισμοί των γονιδίων που επηρεάζουν την πορεία της ενδεχόμενης νόσου (204). Η μόλυνση από το *HP* μπορεί να προκαλέσει μία κατάσταση οξείας φλεγμονής στον ξενιστή, που αν δεν αντιμετωπιστεί εγκαίρως μπορεί να μετατραπεί σε χρόνια φλεγμονή. Οι περισσότερες αλυσίδες του *HP* φέρουν το γονίδιο που σχετίζεται με την κυτταροτοξικότητα Cag και την νησίδα παθογένειας CagPAI, που εμπεριέχει γονίδια που κωδικοποιούν το εκκριτικό σύστημα τύπου IV και το λοιμογόνο παράγοντα CagA. Αμέσως μετά τη μόλυνση του εκάστοτε κυττάρου του ξενιστή από το βακτήριο, το CagA εισέρχεται εντός του κυτταροπλάσματος του πρώτου, φωσφορυλιώνεται από τις τυροσίνες και προσδένει στο μόριο SHP2, που δίνει σήματα στις πρωτεΐνες ERK1/2 για να εκκινήσουν οι αλλαγές του κυτταροσκελετού και η παραγωγή κυτταρικών ουσιών και μορίων. Το βακτήριο αυτό δύναται να χρησιμοποιήσει πολλούς

διαφορετικούς μηχανισμούς, ώστε να επάξει την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών στον ξενιστή.

Απόρροια της αλληλεπίδρασης του *HP* με το επιθήλιο του γαστρεντερικού συστήματος του ξενιστή, αποτελεί η παραγωγή των προφλεγμονωδών χημειοκινών και κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένου της IL-8, IL-12, IL-6, IL-12, CCL2-5, CCL20, CXCL1-3 και TNFα στο βλεννογόνο του γαστρεντερικού συστήματος (205, 206). Ταυτόχρονα, παρατηρείται η μειωμένη παραγωγή της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10. Η παρουσία των χημειοκινών ευνοεί την στρατολόγηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως είναι τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα NK κύτταρα και τα λευκοκύτταρα. Όλα τα παραπάνω συγκροτούν την στρατολόγηση της φυσικής ανοσίας του ξενιστή. Αναφορικά με την επίκτητη ανοσία, ανιχνεύονται IgG και IgA αντισώματα έναντι του βακτηρίου, που εκκινούν την αυτοανοσία συνήθως. Τα αντισώματα αυτά φαίνεται πως είναι το παράγωγο του μηχανισμού της μοριακής μίμησης, κατά τον οποίο, αντισώματα που δημιουργούνται μετά από μία μόλυνση από το *HP* αντιδρούν διασταυρούμενα με αντιγόνα στο βλεννογόνο του γαστρεντερικού συστήματος (H^+ , K^+ -ATPase κλπ) και αυξάνουν τη φλεγμονή τοπικά, προκαλώντας καταστροφή στον στόμαχο (207). Τέλος, διαφορετικές ομάδες των T λεμφοκυττάρων ενεργοποιούνται και πολλαπλασιάζονται, παράγοντας διαφορετικές κυτταροκίνες. Ενδεικτικά, τα Th₁ και Th₁₇ κύτταρα επάγονται και εκκρίνουν IFN-γ, TNFα και IL-17, IL-22 αντίστοιχα (208, 209). Όλα τα παραπάνω δημιουργούν και συντηρούν τη φλεγμονή, μετατρέποντας την από οξεία σε χρόνια πολλές φορές.

Συσχέτιση της λοίμωξης από το *HP* και της παθογένειας της μυασθένειας Gravis

Μέχρις στιγμής δεν έχει βρεθεί κάποια ερευνητική εργασία, αναφορικά με την πιθανότητα συσχέτισης της μόλυνσης από το βακτήριο *HP* και της παθογένειας της μυασθένειας Gravis. Βέβαια, μία μελέτη πρότεινε την ύπαρξη των κοινών γενετικών πολυμορφισμών μεταξύ της μυασθένειας Gravis και του καρκίνου του γαστρεντερικού συστήματος, που πιθανότατα μπορεί να αποδίδεται στη μόλυνση από το βακτήριο *HP* (210).

4. Σκοπός της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας

Γενικός σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας:

Ο σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας έγκειται στη μελέτη της πιθανής αιτιολογικής συσχέτισης των ιών EBV, HCMV και του βακτηρίου *HP* με την μυασθένεια Gravis.

Ειδικός σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας:

Η δεδομένη διπλωματική μεταπτυχιακή εργασία στοχεύει στην διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης που δύναται να υπάρχει μεταξύ των ανοσοεπικρατούντων αντιγόνων των παθογόνων EBV, HCMV και *HP* και των μηχανισμών παθογένειας της μυασθένειας Gravis.

Στόχοι της υπό μελέτη διπλωματικής εργασίας αποτέλεσαν οι εξής:

- 1) Να μελετηθούν οι χυμικές ανοσιακές αποκρίσεις έναντι των ανοσοεπικρατούντων αντιγόνων των EBV, HCMV και *HP* σε ασθενείς με μυασθένεια Gravis και υγιείς μάρτυρες.

και

- 2) Να μελετηθούν οι πιθανές συσχετίσεις των χυμικών ανοσιακών αποκρίσεων έναντι των ανοσοεπικρατούντων αντιγόνων των EBV, HCMV και *HP* με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους της νόσου της μυασθένειας Gravis.

B. Ειδικό μέρος

5. Υλικά

Πίνακας 2: Παρουσίαση των υλικών, πλαστικών και αναλώσιμων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Υλικό	Εταιρεία
Ακρορύγχια πιπετών	Gilson Inc., Γουισκόνσιν, ΗΠΑ
Απορροφητικό χαρτί τύπου Whatman	Bio-Rad Laboratories Inc., Καλιφόρνια, ΗΠΑ
Πιπέτες τύπου Pasteur 3 ml	Greiner Bio-One GmbH, Γερμανία
Πλακίδια 24 φρεατίων (24-well plate)	Corning Inc., Νέα Υόρκη, ΗΠΑ
Φορέας επώασης ταινιών δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης 30 καναλιών	Euroimmun AG, Γερμανία
Σύριγγα 20 ml με βελόνα 21 gauge	Webest Medical Product Co., Ltd., Κίνα
Σωληνάρια κρυοαποθήκευσης (cryovials) 1,5 ml	Corning Inc., Νέα Υόρκη, ΗΠΑ
Σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5 ml	FL Medical, Ιταλία
Σωληνάρια τύπου Falcon 15 ml	Corning Inc., Νέα Υόρκη, ΗΠΑ
Σωληνάρια τύπου Falcon 50 ml	Corning Inc., Νέα Υόρκη, ΗΠΑ
Ταινία εργαστηρίου «Parafilm»	Pechivey Plastic Packaging, ,Ιλινόι, ΗΠΑ

Πίνακας 3: Αναφορά των χρησιμοποιούμενων μηχανημάτων και εργαλείων της δεδομένης εργασίας.

Μηχάνημα/εργαλείο	Εταιρεία
Αναδευτήρας τύπου Rocker	Heidolph Instruments, Γερμανία
Αναδευτήρας τύπου Vortex	Velp Scientifica, Ιταλία
Δοχείο κατάψυξης κυττάρων «Mr. Frosty»	Nagle Nunc, Νέα Υόρκη, ΗΠΑ
Επιτραπέζια φυγόκεντρος Z400 (με ρότορες για σωληνάρια τύπου Falcon 15 ml και 50 ml)	HERMLE Labortechnik, GmbH, Γερμανία

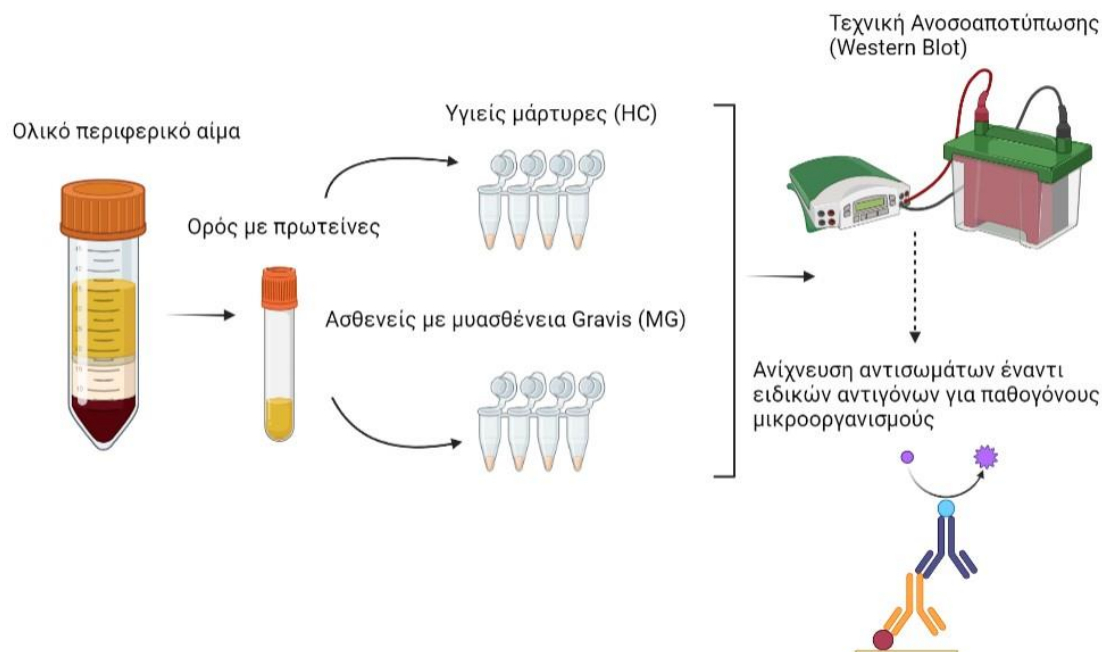
Εργαστηριακός απαγωγός αερίων	Daihan Labtech Co. Ltd, Νότια Κορέα
Ηλεκτρονικό χρονόμετρο	QIAGEN, Γερμανία
Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας	Velp Scientifica, Ιταλία
Καταψύκτης -20°C	Whirlpool, Μίσιγκαν, ΗΠΑ
Καταψύκτης -80°C	Daihan Labtech Co. Ltd, Νότια Κορέα
Πιπέτες Finnpiettes	ThermoFisher Scientific Inc., Μασαχουσέτη, ΗΠΑ

Πίνακας 4: Παρουσίαση των εμπορικά διαθέσιμων δοκιμασιών (kit) που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία.

Δοκιμασία	Εταιρεία
Anti-EBV WESTERNBLOT	Euroimmun AG, Γερμανία
Anti-HCMV WESTERN BLOT	Euroimmun AG, Γερμανία
Anti- <i>H. PYLORI</i> WESTERN BLOT	Euroimmun AG, Γερμανία

Πίνακας 5: Αναφορά των εμπορικά διαθέσιμων αντιδραστηρίων, χημικών και μέσων της καλλιέργειας των κυττάρων, που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή.

Αντιδραστήριο	Εταιρεία
Fetal Bovine Serum (FBS), εμβρυικός ορός βοδινού	Gibco, ThermoFisher Scientific Inc., Μασαχουσέτη, ΗΠΑ
PBS (1x) pH 7,4	Gibco, ThermoFisher Scientific Inc., Μασαχουσέτη, ΗΠΑ
Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)	Sigma Aldrich, Μιζούρι, ΗΠΑ
Ηπαρίνη (5000 IU/ml)	LEO Pharma A/S, Δανία
Θρεπτικό μέσο RPMI-1640 (1x) με L-Glutamine	Gibco, ThermoFisher Scientific Inc., Μασαχουσέτη, ΗΠΑ
Φικόλη Pancoll human-Lymphosep Lymphocyte Separation Media	PAN BIOTECH, Γερμανία



Εικόνα 6: Σύντομη σχηματική απεικόνιση της πειραματικής μεθόδου της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, όπως αυτή εφαρμόστηκε στην συγκεκριμένη ερευνητική εργασία για την προσμέτρηση των ανοσοεπικρατούντων ειδικών για επιλεγμένα αντιγόνα παθογόνων.

5.1.1. Πειραματική διαδικασία που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία

1. Βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη

Στην παρούσα ερευνητική εργασία χρησιμοποιήθηκαν οροί ατόμων από τη Νευρολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου της Λάρισας. Το δειγματοληπτικό υλικό της εργασίας περιλάμβανε 18 ασθενείς με μυασθένεια Gravis και 22, 36 και 49 υγιείς μάρτυρες στην περίπτωση της μελέτης του EBV, HCMV HP αντίστοιχα. Όλα τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν συγκρίσιμα δημογραφικά στοιχεία (ηλικία, φύλο και Καυκάσιας φυλής προέλευση). Επίσης, υπήρξε συγκατάθεση των ατόμων για συμμετοχή στη μελέτη αυτή. Τέλος, το ερευνητικό πρωτόκολλο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας διεξήχθη σύμφωνα με τις αρχές και τους κανονισμούς της Διακήρυξης του Ελσίνκι και έλαβε την έγκριση από την Επιτροπή της Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

2. Σχεδιασμός του ερευνητικού πειραματικού πρωτόκολλου της συγκεκριμένης μελέτης (Εικόνα 6)

A. Απομόνωση λευκοκυττάρων από ολικό περιφερικό αίμα των ασθενών με μυασθένεια Gravis και των υγιών μαρτύρων.

B. Διενέργεια Western Blot σε ορούς των ασθενών με μυασθένεια Gravis και των υγιών μαρτύρων.

3. Εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, με τη χρήση κατάλληλου υπολογιστικού προγράμματος EUROLinScan 2019.

Έγινε η χρήση του συγκεκριμένου προγράμματος, προκειμένου να οπτικοποιηθεί και ποσοτικοποιηθεί το αποτέλεσμα των strips (ταινιών) μετά από την ολοκλήρωση της Western blot τεχνικής.

4. Επεξεργασία και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS-PASW Statistics 2018

Χρησιμοποιήθηκε το συγκεκριμένο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης για να γίνει η επεξεργασία και η συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων των strips, μετά την διενέργεια της Western blot τεχνικής σε δείγματα των μυασθενικών ατόμων και των υγιών μαρτύρων.

5. Γραφική αποτύπωση των αποτελεσμάτων με τη χρήση των υπολογιστικών προγραμμάτων Graphpad Prism 6 2023 και InteractiVenn 2023.

Τα προγράμματα Graphpad Prism 6 και InteractiVenn χρησιμοποιήθηκαν για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της μεθόδου της ανοσοαποτύπωσης κατά Western Blot.

6. Επιλογή των παθογόνων μικροοργανισμών

Υπό το πρίσμα της δημιουργίας της συγκεκριμένης εργασίας, επιλέχθηκε η ενασχόληση με συγκεκριμένους παθογόνους μικροοργανισμούς, προκειμένου να διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος τους στην παθογένεια του υπό μελέτη νοσήματος, της μυασθένειας Gravis. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι εξής παθογόνοι μικροοργανισμοί: Epstein-Barr ιός (EBV), Human Cytomegalovirus ιός (HCMV) και το βακτήριο *Helicobacter pylori* (HP). Η επιλογή των συγκεκριμένων παθογόνων βασίστηκε τόσο στην πρωθύστερη οικειότητα του εργαστηρίου μας με αυτά, όσο και στην περιορισμένη γνώση της ερευνητικής κοινότητας για την συσχέτιση της ενδεχόμενης μόλυνσης από τους ιούς και το βακτήριο που αναφέρθηκαν και του παθογενετικού ρόλου των αυτοαντισωμάτων των

μυασθενικών ατόμων ενισχύοντας την ανάγκη για την περαιτέρω διερεύνηση τους στη μυασθένεια Gravis.

Σύσταση του ανθρώπινου ολικού περιφερικού αίματος

Το ολικό περιφερικό αίμα αποτελεί ένα αρκετά εύκολο, γρήγορο, άμεσο και κοινό μέσο σε δοκιμές δειγματοληψίας. Μάλιστα, δίνει τη δυνατότητα για μελέτη πολλών διαφορετικών στοιχείων: DNA, RNA, πρωτεΐνες, κύτταρα καθώς και παράγωγα αυτών. Τα κύρια συστατικά του μετά από κατάλληλη επεξεργασία και διαδικασία διαχωρισμού είναι το πλάσμα, ο ορός και τα έμμορφα στοιχεία του, με βασικότερα τα κύτταρα και τα κυτταρικά θραύσματα (ή αλλιώς αιμοπετάλια). Το πλάσμα εμπεριέχει νερό σε ποσοστό 92%, πρωτεΐνες σε ποσοστό 7% (με κυριότερες την αλβουμίνη, τη γ-σφαιρίνη και τον αντιαιμοφιλικό παράγοντα) και τα άλατα, σάκχαρα, ιχνοστοιχεία, λίπη, ορμόνες και βιταμίνες σε ποσοστό 1%. Ο ορός εμπεριέχει ταυτόσημα συστατικά με το πλάσμα, με μόνη διαφορά την προσθήκη του παράγοντα πήξης, του ινωδογόνου. Τα έμμορφα στοιχεία του αίματος αποτελούν τα λευκά αιμοσφαίρια, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Βασικές λειτουργίες του αίματος είναι η μεταφορά του οξυγόνου και των θρεπτικών στοιχείων στα κύτταρα και κατά επέκταση στους ιστούς του σώματος και ο σχηματισμός των θρόμβων για την αποφυγή της απώλειας μεγάλης ποσότητας αίματος. Συχνά διαταραχές σε συστατικά του αίματος ή αναλογίες αυτών, ερμηνεύουν ή υποδηλώνουν κάποια παθολογική διαταραχή ή ασθένεια στο άτομο. Συνεπώς, η εξέταση και η επεξεργασία του αίματος και των συστατικών του αίματος βοηθά στην εξιχνίαση των ερευνητικών και κλινικών ερωτημάτων (Εικόνα 7).

Μετά το διαχωρισμό του, το ολικό περιφερικό αίμα κλασματοποιείται σε τρεις στιβάδες (πλάσμα, λεμφοκύτταρα και ερυθροκύτταρα) με φυγοκέντρηση σε φικόλη (Ficoll) και μετριμιζίδη (Hydraque) (Εικόνα 7). Ο διαχωρισμός βασίζεται στο ότι το πλάσμα και τα λεμφοκύτταρα έχουν μικρότερη πυκνότητα τόσο από τα ερυθροκύτταρα όσο και από τη φικόλη, οπότε και δε την διαπερνούν ($\rho_{\text{πλάσματος}} < \rho_{\text{λεμφοκυττάρων}} < \rho_{\text{φικόλης}} < \rho_{\text{ερυθροκυττάρων}}$). Μετά τη φυγοκέντρηση τα ερυθροκύτταρα και τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα διέρχονται διαμέσου της φικόλης, ενώ τα λεμφοκύτταρα παραμένουν στη μεσοστιβάδα ανάμεσα του ορού και της φικόλης. Τα κύτταρα αυτά της μεσοστιβάδας αποτελούν τα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs).

Τα PBMCs που απομονώνονται δύνανται να αποθηκευτούν για μελλοντική χρήση σε βαθιά κατάψυξη. Η κατάψυξη των λεμφοκυττάρων σε θερμοκρασίες κατώτερες των -100°C στοχεύει στη μακροπρόθεσμη αποθήκευση τους, δίχως να είναι αναγκαία η καθημερινή καλλιέργεια τους. Τα κύτταρα στη θερμοκρασία αυτή, επίσης, δεν εμφανίζουν τα αποτελέσματα της κυτταρικής

γήρανσης, που εμφανίζονται σε κυτταροκαλλιέργειες φυσιολογικά, καθώς παύουν να υπάρχουν όταν τα κύτταρα διατηρούνται σε θερμοκρασίες υπό των -130°C . Καθώς τα κύτταρα αρχίζουν να ψύχονται από τη θερμοκρασία δωματίου ($+18^{\circ}\text{C}$ - $+25^{\circ}\text{C}$), ο κυτταρικός μεταβολισμός επιβραδύνεται και η ενδοκυτταρική μεταφορά και η διαμεμβρανική ανταλλαγή ιόντων διακόπτονται. Καθώς η θερμοκρασία συνεχίζει να πέφτει από τους 0°C ως τους -20°C , οι κρύσταλλοι πάγου σχηματίζονται στον εξωκυτταρικό χώρο, αυξάνοντας τη συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών, δημιουργώντας ωσμωτική πίεση, οδηγώντας το νερό έξω από τα κύτταρα. Όταν η θερμοκρασία ελαττώνεται πολύ αργά, η ωσμωτική πίεση που δημιουργείται είναι τόσο μεγάλη που το νερό από το εσωτερικό του κυττάρου οδεύει προς τα έξω, καταλήγοντας σε ολική αφυδάτωση, υπερβολική συρρίκνωση του κυττάρου και κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) κατά την απόψυξη. Η απόψυξη σε συνδυασμό με την υψηλή συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών στο εξωκυττάριο διάλυμα, προκαλούν την κυτταρική αποδιοργάνωση, εξαιτίας των προκαλούμενων βλαβών στην κυτταρική μεμβράνη λόγω της υπερβολικής συρρίκνωσης. Αντίθετα, όταν η θερμοκρασία ελαττώνεται πολύ γρήγορα, οι κρύσταλλοι πάγου σχηματίζονται μέσα στο κύτταρο πριν ολοκληρωθεί η αφυδάτωση. Αποτέλεσμα αυτού είναι η καταστροφή των κυτταρικών οργανιδίων και των μεμβρανών των κυττάρων, με αποκορύφωμα την απόπτωση των κυττάρων. Αντίστοιχα, όταν ο ρυθμός ψύξης είναι αρκετά αργός ώστε να μη δημιουργηθούν κρύσταλλοι πάγου ενδοκυτταρικά, αλλά και αρκετά γρήγορος ώστε να αποφευχθεί η υπερβολική αφυδάτωση, τότε τα κύτταρα επιβιώνουν την ψύξη και την επακόλουθη απόψυξη τους. Επίσης, η χρήση του διμεθυλοσουλφοξειδίου (Dimethyl sulfoxide, DMSO) στην απομόνωση του ολικού αίματος, προστατεύει τα κύτταρα από τις επιπτώσεις της αργής ψύξης, δηλαδή τη συρρίκνωση και την αφυδάτωση. Τέλος, η χρήση του ειδικού δοχείου κατάψυξης κυττάρων «Mr.Frosty» με την ισοπροπυλική αλκοόλη, βοηθά στην αργή και ομοιόμορφη κατάψυξη των κυττάρων (-1°C - $-3^{\circ}\text{C}/\text{λεπτό}$).

Ολικό περιφερικό αίμα



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων και συστατικών του ολικού περιφερικού αίματος, όπως αυτά προκύπτουν μετά από τη διαδικασία της απομόνωσης του αίματος, σύμφωνα με το εργαστηριακό πειραματικό πρωτόκολλο της παρούσας εργασίας.

A. Απομόνωση λευκοκυττάρων από ολικό περιφερικό αίμα των ατόμων

Βήμα 1: Αρχικά, το δειγματικό υλικό που χρησιμοποιείται ήταν το ολικό περιφερικό αίμα και στην συνέχεια ο ορός, τόσο για τους ασθενείς με μυασθένεια Gravis, όσο και τους υγιείς μάρτυρες της μελέτης μας. Με κατάλληλη ηπαρινισμένη σύριγγα γίνεται η λήψη του ολικού περιφερικού αίματος από τα άτομα (ποσότητα 15-20 ml). Η ηπαρίνη (τελική συγκέντρωση=10 U/ml) είναι αναγκαία, προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός του θρόμβου στο αίμα. Η ηπαρίνη διαλυτοποιείται 1-3 φορές, σύμφωνα με τα επίπεδα του αιματοκρίτη στο δείγμα του αίματος του κάθε ατόμου. Στην συνέχεια, ακολουθήθηκαν τα εξής διαδοχικά βήματα.

Βήμα 2: Σε 50 ml κατάλληλο αποστειρωμένο δοχείο Falcon, τοποθετείται ποσότητα αποστειρωμένης φικόλης (Pancoll human, PAN BIOTECH), με περιεκτικότητα 1.077 g/ml. Η φικόλη εμπεριέχει έναν πολυσακχαρίτη με μοριακό βάρος ίσο με 400.000 Daltons (Da) και είναι απαραίτητη, για να εξασφαλιστεί ο επιτυχημένος διαχωρισμός των επιμέρους συστατικών του ολικού αίματος. Η ποσότητα της φικόλης που καταναλώνεται για την απομόνωση ενός δείγματος αίματος κάθε φορά ισούται με την μισή της αντίστοιχης του δείγματος. Ενδεικτικά, για την απομόνωση 20 ml περιφερικού ολικού αίματος χρησιμοποιούνται 10 ml φικόλης LymphoPrep.

Βήμα 3: Το αίμα επιστρώνεται προσεκτικά, έχοντας υπό κλίση το Falcon δοχείο (~45° γωνία), πάνω από το στρώμα της φικόλης, με σκοπό φυσικά τη δημιουργία δύο διαφορετικών φάσεων: αυτής του αίματος και αυτής της υποκείμενης φικόλης, χωρίς να αναμειγνύονται μεταξύ τους.

Βήμα 4: Στην συνέχεια το δοχείο Falcon με το αίμα υπόκειται σε φυγοκέντρηση, με κατάλληλο μηχανήμα φυγοκέντρησης (Thermo Fisher Scientific HERAEUS MEGAFUGE 16R), χρησιμοποιώντας αντίβαρο ίσης ποσότητας με το αίμα. Οι συνθήκες της φυγοκέντρησης ρυθμίζονται σε: 1800/λεπτό στροφές και χρόνο ίσο με 20 λεπτά, έχοντας επιτάχυνση και επιβράδυνση ίσες με 9 και 3-5 αντίστοιχα, σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C). Η διαδικασία αυτή βοηθάει στον ομαλό διαχωρισμό των συστατικών του ολικού αίματος, με αποτέλεσμα να λαμβάνεται ένα τελικό διάλυμα με τέσσερις διακριτές φάσεις/στρώματα: από πάνω προς τα κάτω, το ανώτερο στρώμα αποτελείται από πλάσμα του αίματος, το δεύτερο από τον ορό, το τρίτο από τα συγκεντρωμένα λευκοκύτταρα, που βρίσκονται περιμετρικά του δοχείου, σχηματίζοντας έναν νοητό δακτύλιο, το τέταρτο που εμπεριέχει τη φικόλη και το τελευταίο που συγκροτείται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια (θραύσματα κυττάρων) και τα μονοκύτταρα. Ο διαχωρισμός των φάσεων αυτών είναι εφικτός, χάριν στη διαφορετική πυκνότητα των επιμέρους συστατικών του ολικού αίματος. Κατά τη φυγοκέντρηση, τα κύτταρα του ολικού αίματος μεταναστεύουν στο στρώμα της φικόλης και εκεί έρχονται σε επαφή με τον πολυσακχαρίτη που αυτή εμπεριέχει. Ως εκ τούτου, τα ερυθρά αιμοσφαίρια συγκεντρώνονται σε ομάδα εξαιτίας της φικόλης, άμεσα σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτή η συγκέντρωση προκαλεί την αύξηση της ταχύτητας καθίζησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, που συγκεντρώνονται μαζί με τα γρανουλοκύτταρα ως ένα ίζημα στον πυθμένα του Falcon. Τα λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και αιμοπετάλια δεν έχουν τόσο μεγάλη πυκνότητα, έτσι ώστε να διαπεράσουν το στρώμα της φικόλης και να καθιζάνουν ως ίζημα. Αντιθέτως, σχηματίζουν συγκεντρωμένα, πάνω από το στρώμα της φικόλης, ένα ορατό στρώμα λεμφοκυττάρων, που προσομοιάζει σε νέφος σε σχήμα δακτυλίου (211).

Βήμα 5: Ευθύς αμέσως, το στρώμα του πλάσματος αφαιρείται με κατάλληλο, αποστειρωμένο Pasteur πιπέτα και αποθηκεύεται σε μικρά Eppendorfs δοχεία για μελλοντική χρήση. Το πλάσμα αποθηκεύεται σε κατάψυξη στους -20°C.

Βήμα 6: Διαδοχικά, η ίδια αποστειρωμένη πιπέτα χρησιμοποιείται για τη λήψη και την εναπόθεση του ορού με τα λεμφοκύτταρα σε αποστειρωμένο Falcon δοχείο χωρητικότητας 15 ml.

Βήμα 7: Στο Falcon με τον ορό, προστίθεται ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος Roswell Park Memorial Institute (1x RPMI-1640), μέχρι την πλήρωση του χώρου του Falcon 15 ml. Το RPMI

χρησιμοποιείται για τη βελτίωση της καλλιέργειας κυττάρων όπως αυτή των λεμφοκυττάρων, αλλά και τη χρησιμότητα του ως διάλυμα επιβίωσης αυτών.

Βήμα 8: Γίνεται η ήπια ανακίνηση του Falcon 15 ml 5 με 6 φορές και αυτό μετά τοποθετείται με αντίβαρο ίσης ποσότητας εντός του μηχανήματος φυγοκέντρωσης. Οι συνθήκες φυγοκέντρωσης ρυθμίζονται στις εξής: 2200 στροφές σε χρόνο ίσο με 5 λεπτά, με επιτάχυνση και επιβράδυνση ίσες με 9 και 9 αντίστοιχα. Η θερμοκρασία παραμένει ίση με αυτή του δωματίου.

Βήμα 9: Μετά το πέρας της δεύτερης κατά σειράς φυγοκέντρωσης, το διάλυμα του Falcon 15 ml αφαιρείται με αποστειρωμένη πιπέτα με προσοχή και στον πυθμένα, όπου έχουν συγκεντρωθεί τα λεμφοκύτταρα αναδεύουμε προσεκτικά με πιπέτα ποσότητα του διαλύματος ανάπτυξης των κυττάρων, ίση με 3 ml. Η ανάδευση πρέπει να είναι μεν προσεκτική και μη βίαιη, προκειμένου να διαλυθεί μεν το συσσωμάτωμα των κυττάρων που δημιουργείται μετά από τη δεύτερη φυγοκέντρωση, αλλά να αποφευχθεί δε το ενδεχόμενο του κυτταρικού θανάτου, λόγω μηχανικής πίεσης κατά τη χρήση της πιπέτας. Το διάλυμα ανάπτυξης ή αλλιώς freezing διάλυμα δημιουργείται με την ανάμιξη τριών συστατικών: του ρυθμιστικού διαλύματος RPMI, του διαλύματος DMSO και του ζωμού βοειδών ή μόσχου (Fetal bovine serum/Fetal calf serum, FBS/FCS), σε ποσότητες ίσες με 2, 1 και 7 ml αντίστοιχα, με τελικό όγκο διαλύματος ίσο με 10 ml. Το κάθε ένα από αυτά τα τρία συστατικά έχει το δικό του ρόλο. Το 1x RPMI-1640 διάλυμα λειτουργεί ως ρυθμιστικό διάλυμα, επιτρέποντας την καλλιέργεια των λεμφοκυττάρων. Το DMSO είναι ένα χημικό που διαλύει πολλές οργανικές και μη ουσίες και δημιουργεί ένα περιβάλλον που προσομοιάζει του φυσιολογικού των κυττάρων, ευνοώντας τη δημιουργία τοξινών σε μικρό βαθμό. Τέλος, το FBS/FCS διάλυμα είναι απαραίτητο για τη θρέψη των λεμφοκυττάρων. Σημαντικό είναι να σημειωθεί πως, πριν τη χρήση του τελευταίου, γίνεται η είσοδος του σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 56°C για μίαμιση ώρα, ώστε να γίνει η επιτυχημένη απενεργοποίηση των πρωτεϊνών του συστήματος του συμπληρώματος του ζωμού. Το διάλυμα freezing ή αλλιώς κρυοπροστατευτικό διάλυμα χρειάζεται για την επαναδιαλυτοποίηση των PBMCs κυττάρων, με στόχο την επίτευξη της τελικής συγκέντρωσης των κυττάρων σε τιμή ίση με $\sim 10^6$ κύτταρα/ml.

Βήμα 10: Τελικά, λαμβάνεται από τα 3 ml, 1 ml κάθε φορά με την πιπέτα και κατανέμεται σε τρία αποστειρωμένα σωληνάρια αποθήκευσης (aliquots), τα cryovials. Κάθε ένα από αυτά εμπεριέχει κατά μέσο όρο ίδιο αριθμό λεμφοκυττάρων.

Βήμα 11: Τα τρία δοχεία cryovials τοποθετούνται σε δοχείο κατάψυξης «Mr. Frosty», που είναι γεμάτο με καθαρό 100% διάλυμα ισοπροπανόλης στο εσωτερικό και μετά στο ψυγείο με -80°C για ψήξη με διάρκεια 48 ωρών. Το διάλυμα ισοπροπανόλης χρησιμοποιείται γιατί, η ίδια παρέχει

το πλεονέκτημα του ρυθμού ψήξης στους $-1^{\circ}\text{C}/1\text{ min}$ για τα λεμφοκύτταρα. Τέλος, τα cryovials μεταφέρθηκαν σε δεξαμενή υγρού αζώτου. Ο ορός χρησιμοποιήθηκε στην συνέχεια για το πειραματικό τμήμα της μεταπτυχιακής εργασίας, όπως αναλύεται ακολούθως.

B. Western Blot σε πρωτεΐνες-αυτοαντισώματα έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων των παθογόνων EBV, HCMV και HP.

Έχοντας κάνει λήψη του ορού από το ολικό αίμα των ασθενών και των υγιών μαρτύρων, χρησιμοποιούμε τον ορό ως μέσο δειγματοληψίας για την τεχνική Western blot. Αυτή η επιλογή γίνεται γιατί ο ορός εμπεριέχει το αντικείμενο μελέτης της εργασίας αυτής, που είναι τα αυτοαντισώματα, που έχουν πρωτεϊνική φύση. Τα αυτοαντισώματα υπάρχουν φυσιολογικά στον ορό των ασθενών από μόνον αποκλειστικά και όταν συναντήσουν το ανάλογο αντιγόνο τους, δημιουργούν σύμπλοκο με αυτό. Την ιδιότητα αυτή εκμεταλλεύεται η τεχνική της Western Blot ή αλλιώς της μεθόδου της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών, όπως είναι ο ελληνικός όρος. Στη τεχνική αυτή, η βασική αρχή είναι η δημιουργία του συμπλόκου δύο πρωτεϊνών σε ένα σύνθετο μίγμα, εκμεταλλευόμενη χημικές και φυσικές ιδιότητες των χρησιμοποιούμενων χημικών αντιδραστηρίων, με τέτοιο τρόπο ώστε να καταστεί ορατό το σύμπλοκο στα μάτια του ερευνητή ή του επαγγελματία υγείας. Το Western Blot επιτρέπει με μεγάλη ευαισθησία και ακρίβεια την ορολογική ανίχνευση μίας ποικιλίας πρωτεϊνών (εδώ αντισωμάτων), μετά την επαφή του προς εξέταση ορού με τα αντιγόνα του εκάστοτε παθογόνου (εδώ των ιών Epstein-Barr και Human Cytomegalovirus και του βακτηρίου *Helicobacter pylori*), που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, με γνώμονα το μοριακό βάρος ή το ισοηλεκτρικό τους σημείο και έχουν μεταφερθεί σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανιχνευθεί με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα. Ως μέθοδος συνδυάζει την υψηλή αναλυτική ικανότητα της ηλεκτροφόρησης σε πολυακρυλαμίδη, την ειδικότητα των αντισωμάτων και την ευαισθησία των ενζυματικών μεθόδων (212). Συγκριτικά με άλλες τεχνικές, όπως είναι αυτή της Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), η Western Blot επιτρέπει την ανίχνευση των αντισωμάτων και τον καθορισμό ενός προτύπου αντισωμάτων, που μπορεί να διαφέρει από ασθενή σε ασθενή με την ίδια λοίμωξη για το ίδιο παθογόνο (213). Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου έγκειται στο ότι οι πρωτεΐνες είναι περισσότερο προσβάσιμες στα αντισώματα όταν αυτά βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια της μεμβράνης, παρά στο πήκτωμα. Η ανίχνευση ενός προσδεμένου αντισώματος στη μεμβράνη πραγματοποιείται με τη χρήση του δευτερογενούς αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει την σταθερή περιοχή Fc του πρωτογενούς ανθρώπινου αντισώματος. Συνήθως, το δευτερογενές αντίσωμα είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με κάποιο ένζυμο, όπως είναι η αλκαλική φωσφατάση ή η υπεροξειδάση του χρένου, το οποίο μετατρέπει το άχρωμο διαλυτό υπόστρωμα του ενζύμου σε έγχρωμο ίζημα μέσω μιας

αντίδρασης χρώσης. Μάλιστα, μεγάλο πλεονέκτημα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western blot αποτελεί η ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών αντιγόνων ενός παθογόνου που μελετάται με τη διενέργεια ενός μόνο ελέγχου ανά φορά δοκιμής, στοιχείο που στερείται η τεχνική της ELISA.

Η ποσοτικοποίηση των τίτλων των αντισωμάτων στο διάλυμα προς εξέταση επιτυγχάνεται με πυκνομέτρηση των επιμέρους ζωνών της μεμβράνης με λογισμικό πυκνομετρικής σάρωσης και επεξεργασίας εικόνας. Αφού σαρωθεί η μεμβράνη που φέρει το σήμα της ανοσοεντόπισης, επεξεργάζεται με τη βοήθεια του λογισμικού πυκνομέτρησης, το οποίο αναγνωρίζει τις περιοχές αντίδρασης στη μεμβράνη ως ζώνες συλλέγοντας πληροφορίες, όπως η απόσταση των ζωνών από την αρχή της μεμβράνης και το εμβαδόν τους. Στη συνέχεια αξιολογεί, κανονικοποιεί με βάση το σήμα υποβάθρου (background signal) και ποσοτικοποιεί το άθροισμα της έντασης των εικονοστοιχείων (pixels) που περιλαμβάνονται στις ζώνες. Για την ποσοτικοποίηση είναι απαραίτητη η επεξεργασία εσωτερικών μαρτύρων του πειράματος, δηλαδή μια πρωτεΐνη γνωστής συγκέντρωσης και ανιχνεύεται με τον ίδιο τρόπο όπως η πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος. Ένας θετικός ορός ελέγχου ανθρώπινης IgG ανοσοσφαιρίνης χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της επιτυχίας του πειράματος.

Στην συγκεκριμένη ερευνητική εργασία, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον *in vitro* ποιοτικό κα ποσοτικό προσδιορισμό των ανθρώπινων αντισωμάτων έναντι αντιγόνων των EBV, HCMV, HP σε ασθενείς με μυασθένεια Gravis. Χρησιμοποιήθηκε το ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο Western Blot, με τα ίδια χημικά αντιδραστήρια για τους τρεις υπό μελέτη παθογόνους μικροοργανισμούς (EBV, HCMV, HP), με τη μόνη διαφορά να υπάρχει στο σύνολο των αντιγόνων-στόχων φυσικά. Το πρωτόκολλο Western Blot που εφαρμόστηκε ήταν αυτό της εταιρείας Euroimmun. Η διαδικασία που εφαρμόστηκε με τα απαιτούμενα χημικά αντιδραστήρια της παραπάνω εταιρείας, παρουσιάζεται με τα κάτωθι βήματα:

Βήμα 1: Αρχικά γίνεται η αραίωση του ορού του ατόμου σε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer της εταιρείας Euroimmun, με αναλογία αραίωσης 1:51, χρησιμοποιώντας μία καθαρή πιπέτα. Η ποσότητα του Universal Buffer διαλύματος και του ορού ισούται με 1,5 ml και 30 μl αντίστοιχα. Να σημειωθεί πως οι οροί πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία 2-8°C για 14 μέρες τουλάχιστον, ενώ τα αραιωμένα διαλύματα αυτών να χρησιμοποιούνται εντός 1 ημέρας.

Βήμα 2: Το τελικό διάλυμα που δημιουργείται μετά την αραίωση, υφίσταται ανάδευση με μηχανήμα Vortex, προκειμένου αυτό να ομογενοποιηθεί.

Βήμα 3: Γίνεται η αφαίρεση των ταινιών (strips) από το αντίστοιχο σκεύασμα της εταιρείας Euroimmun και τοποθετείται σε κατάλληλο κανάλι μιας κατασκευής και επικαλύπτεται με

ποσότητα 1,5 ml Universal Buffer διαλύματος, τοποθετούμενο σε μηχανήμα ανάδευσης για χρονικό διάστημα 5 λεπτών, σε θερμοκρασία 18-25°C. Τα strips αυτά είναι ουσιαστικά ταινίες, που έχουν επιστρωμένα πάνω τους αντιγόνα έναντι ειδικών μορίων και ουσιών ενός παθογόνου, και έχουν παραταχθεί σε σειρά με βάση το μοριακό βάρος αυτών, από το μικρότερο στο μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Τα strips αυτά είναι το αποτέλεσμα του εκχυλίσματος των πρωτεϊνών του υπό μελέτη παθογόνου, μετά την αποτύπωσή τους σε πήκτωμα γέλης.

Βήμα 4: Μετά το πέρας των 5 λεπτών, η ποσότητα του Universal Buffer διαλύματος απορρίπτεται και στην συνέχεια στο κανάλι με το strip αφήνεται το αραιωμένο διάλυμα με τον ορό του ατόμου για χρόνο ίσο με 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου στον αναδευτήρα.

Βήμα 5: Στην συνέχεια, το αραιωμένο διάλυμα απομακρύνεται και γίνεται η διαδικασία της πλύσης με 1,5 ml διάλυμα Universal Buffer (10x αραιωμένο με Water for Injection) επί τρεις φορές για διάρκεια 5 λεπτών κάθε φορά πάνω στον αναδευτήρα.

Βήμα 6: Μετά την απόρριψη του υγρού πλύσης, τοποθετείται 1,5 ml διαλύματος πρωτογενούς αντισώματος (Conjugate) (10x αραιωμένο με Sample Buffer) στο κανάλι με το αντίστοιχο strip, ενώ αυτό βρίσκεται επί του αναδευτήρα και αφήνεται εκεί για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 7: Επαναλαμβάνεται η απόρριψη του διαλύματος Conjugate, μετά το πέρας των 30 λεπτών επώασης και γίνεται εκ νέου η διαδικασία των τριών πλύσεων με τις ακριβώς ίδιες συνθήκες που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

Βήμα 8: Τέλος, γίνεται η απόρριψη του διαλύματος πλύσης και τοποθετείται το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος εντός του καναλιού (Substrate Dilution), που είναι έτοιμο για χρήση, για διάστημα 5-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ αυτό αναδεύεται στον αναδευτήρα. Όταν διαπιστωθεί πως έχει δώσει μία θετική γραμμή/ζώνη το Control, συμπεραίνουμε πως έχει δουλέψει κανονικά η τεχνική. Προσέχουμε πάντοτε να μη μείνει αρκετό χρονικό διάστημα το strip εντός του Substrate διαλύματος, για να μην αλλοιωθεί το χρώμα του και συνεπώς και η ερμηνεία του αποτελέσματος, με στόχο την αποφυγή οποιουδήποτε σφάλματος.

Πίνακας 6: Παρουσίαση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της Western blot τεχνικής και είναι κοινά και για τα τρία παθογόνα (EBV, HCMV, HP).

Συστατικά	Δομή	Σύσταση/Περιεκτικότητα
Θετικό δείγμα	16 x 1	-

ελέγχου (Positive control)		
Ταινίες (strips) με ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένα αντιγόνα του κάθε παθογόνου	16 x 1	-
Υλικό αξιολόγησης με strip για έλεγχο	1	1 μοτίβο που έχει προκύψει από το μίγμα εκχυλίσματος θετικών ατόμων για διαφορετικά αντιγόνα έναντι του παθογόνου
Conjugate διάλυμα ενζύμου	1 x 3 ml	10x συμπυκνωμένο διάλυμα
Διάλυμα υποστρώματος (Substrate)	1 x 30 ml	Έτοιμο για χρήση
Ρυθμιστικό διάλυμα (Universal Buffer)	1 x 50 ml	10x συμπυκνωμένο διάλυμα

Τα χημικά αντιδραστήρια ενδείκνυται να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία μεταξύ 2-8°C, χωρίς να υφίστανται ψύξη.

Για κάθε έναν παθογόνο μικροοργανισμό στοχεύονται διαφορετικά αντιγόνα, με κοινό χαρακτηριστικό τον λοιμογόνο ρόλο αυτών στη μόλυνση και πιθανώς στην αυτοανοσία των ατόμων, εδώ των μυσθενικών. Αυτά παρατίθενται παρακάτω.

5.1.2. Για τον EBV ιό

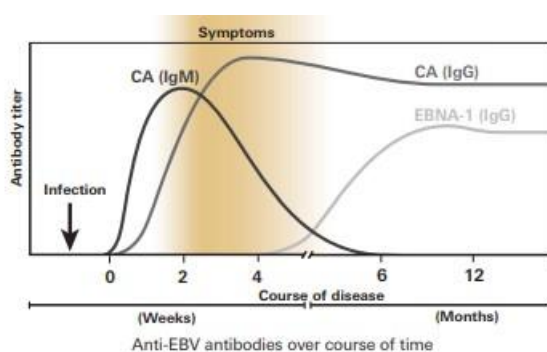
Είναι γνωστό πως η μεταγενέστερη φάση της μόλυνσης από τον EBV ιό μπορεί να αναγνωριστεί από την αντίχνευση των αντισωμάτων της τάξης IgG έναντι των VCA αντιγόνων

(και ειδικότερα του αντιγόνου VCA p22) καθώς και του EBNA-1. Με την απώλεια των αντισωμάτων έναντι του EBNA-1, η παρουσία των αντισωμάτων της τάξης IgG έναντι του VCA p22 είναι μία ένδειξη για την ύπαρξη μεταγενέστερης φάσης της EBV λοίμωξης.

Μία πρόωμη, ενεργή μόλυνση χαρακτηρίζεται από τα αντισώματα της τάξης IgG και IgM έναντι των VCA αντιγόνων. Τα αντισώματα της τάξης IgG έναντι των EAD αντιγόνων μπορούν να είναι παρόντα εξίσου.

Επανεργοποιήσεις του EBV ιού μπορούν να διαφοροποιούνται στις περισσότερες περιπτώσεις της μεταγενέστερης φάσης της λοίμωξης από τον ιό, εξαιτίας της παρουσίας των αντισωμάτων της τάξης IgG έναντι του EA.

Οι επανεργοποιήσεις διαχωρίζονται από την αρχική, ενεργή φάση της λοίμωξης χάριν στη χαμηλή επικράτηση των αντισωμάτων της τάξης IgM έναντι των VCA αντιγόνων και της ύπαρξης των αντισωμάτων της τάξης IgG έναντι του EBNA-1 και/ή του VCA p22.



Εικόνα 8: Παρουσίαση της διακύμανσης των VCA IgM, VCA IgG και EBNA-1 IgG αντισωμάτων κατά τη διάρκεια μίας λοίμωξης από τον Epstein-Barr (EBV) ιό.

Όπως φαίνεται, κατά το στάδιο της ενεργής πρώτης φάσης της λοίμωξης, δε παράγονται αντισώματα. Μετά το πέρας των 2 εβδομάδων από την πρωταρχική μόλυνση, δημιουργούνται τα VCA IgM αντισώματα σε μεγάλες ποσότητες, ενώ μετά το χρονικό διάστημα των 4 εβδομάδων παράγονται τα VCA IgG αντισώματα, παράλληλα με την παρουσία των προαναφερόμενων VCA IgM αντισωμάτων σε μειωμένη συγκέντρωση. Μόλις περάσουν 8-10 μήνες από την πρωταρχική λοίμωξη, παράγονται τα EBNA-1 IgG αντισώματα, ενώ τα VCA IgG αντισώματα συνεχίζουν να υπάρχουν, απλώς σε μικρότερες ποσότητες σε σχέση με πριν (214).

Αντιγόνα: Η πηγή των αντιγόνων για τη δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τη χρήση του αντι-EBV WESTERNBLOT από την Euroimmun AG (Γερμανία) είναι ένα

εκχύλισμα του EBV ιού (αλυσίδα: P₃HR₁). Το παράγωγο του ιού έχει διαχωριστεί σύμφωνα με το μοριακό βάρος μέσω της ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης σε τζελ πολυακρυλαμίδης και της μεταφοράς του σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Από κάθε πακέτο ελέγχου (kit), ξεχωρίζουν δύο ταινίες που λειτουργούν ως μάρτυρες (Control) που έχουν απομονωθεί και επωαστεί με έναν ορό αναφοράς, που χρησιμοποιείται για σύγκριση με το εκάστοτε υπό μελέτη δείγμα ορού του κάθε ατόμου. Να σημειωθεί πως αυτός ο ορός αναφοράς έχει προκύψει ως αποτέλεσμα της ανάμιξης των ορών ενός αριθμού ατόμων που έχουν υποστεί λοίμωξη από τον ιό EBV και έχουν αναπτύξει θετικά αντισώματα έναντι διαφορετικών αντιγόνων του ιού.

Πίνακας 7: Αναφορά στα ιικά αντιγόνα του ιού Epstein-Barr (EBV).

VCA (Virus Capsid Antigen)	EA (Early Antigen)	EBNA (EB Nuclear Antigen)	Λοιπά αντιγόνα
p123, p65, p42, p41, p40, p33, p22	EAR p93, EAD p45, EAD p43	EBNA-1 p79	p27

Εκτός από την θέση της ταινίας που αντιστοιχεί στον μάρτυρα, η ταινία εμπεριέχει επιπλέον μία θέση που αντιστοιχεί στην μεμβράνη ελέγχου για το IgG αντίσωμα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως μία σωστή ταυτοποίηση των αντισωμάτων της τάξης IgG έναντι των αντιγόνων που περιγράφονται στον Πίνακα 7, φαίνεται από την θετική αντίδραση της ζώνης του μάρτυρα και αυτής της ζώνης που αντιστοιχεί στο αντίσωμα IgG. Αν μία εκ των δύο αυτών ζωνών δίνει αδύναμο σήμα ή κανένα σήμα, τότε το αποτέλεσμα της δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης κατά Western δεν είναι αξιόπιστο.

Πίνακας 8: Αναφορά των αντισωμάτων της τάξης IgG έναντι των ανοσοεπικρατούντων αντιγόνων του EBV ιού και του αριθμού των ζωνών που ανιχνεύονται στη διενέργεια του Western Blot, μετά από μία EBV λοίμωξη των ατόμων.

Θετικότητα με βάση την κατηγορία αντιγόνου του EBV	Χαρακτηρισμός αποτελέσματος των ζωνών στο Western Blot
VCA	Καμία από τις VCA-ζώνες είναι θετική
Αρνητικό	
Οριακά θετικό ή αρνητικό	Τουλάχιστον μια από τις VCA-ζώνες είναι θετική με μέτριας έντασης

	θετικότητα
Θετικό	Τουλάχιστον μία από τις VCA-ζώνες είναι θετική με ισχυρής έντασης θετικότητα
EA	Καμία από τις EA-ζώνες είναι θετική
Αρνητικό	
Θετικό	Τουλάχιστον μία από τις EA-ζώνες είναι θετική με ισχυρής έντασης θετικότητα
EBNA-1	Η ζώνη EBNA-1 είναι αρνητική
Αρνητικό	
Οριακά θετικό ή αρνητικό	Η ζώνη EBNA-1 είναι θετική με μέτριας έντασης θετικότητα
Θετικό	Η ζώνη EBNA-1 είναι θετική με ισχυρής έντασης θετικότητα

Πίνακας 9: Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης κατά Western Blot.

Κατάσταση μόλυνσης	Τυπικά αποτελέσματα στη EBV WESTERNBLOT ανοσοαποτύπωση
Αρνητικό	Απουσία αντισωμάτων της τάξης IgG έναντι των αντιγόνων EBNA-1, VCA και EA
Πρώιμη λοίμωξη Συμπτώματα που υπάρχουν σε χρονικό διάστημα μικρότερο ή ίσο των 3 εβδομάδων	Αντισώματα της τάξης IgG έναντι των αντιγόνων VCA (συχνά αντισώματα της τάξης IgG έναντι EA και απουσία αυτών του IgG p22) και απουσία των αντισωμάτων έναντι του EBNA-1
Μεταγενέστερη μόλυνση	Αντισώματα της τάξης IgG έναντι EBNA-1 και αντιγόνων VCA (θετική ζώνη για το p22)
Ενεργοποιημένη μόλυνση	Για τον χαρακτηρισμό των ενεργοποιημένων λοιμώξεων από EBV ιό σε ανοσοκατασταλμένα άτομα ή άτομα

	με εξασθετισμένο ανοσοποιητικό σύστημα, συστήνεται ο καθορισμός του ιικού φορτίου, καθώς τα ορολογικά αποτελέσματα συχνά δε σχετίζονται με τα αποτελέσματα των άμεσων ελέγχων
--	---

Πίνακας 10: Μία συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης κατά Western Blot.

	Σχετιζόμενα αντισώματα			
Κατάσταση λοίμωξης	Αντι-VCA (IgG)	Αντι-EBNA-1 (IgG)	Αντι-p22 (IgG)	Αντι-EA-D (IgG)
Αρνητικό	-	-	-	-
Πρώιμη μόλυνση	+	-	-	+/-
Μεταγενέστερης φάσης της μόλυνσης	+	+	+	-
Ενεργοποιημένη μόλυνση	Για τον χαρακτηρισμό των ενεργοποιημένων λοιμώξεων από EBV ιό σε ανοσοκατασταλμένα άτομα ή άτομα με εξασθετισμένο ανοσοποιητικό σύστημα, συστήνεται ο καθορισμός του ιικού φορτίου. Πιθανές αντιγονοειδικές αντιδράσεις είναι σαν τις ακόλουθες:			
	+	+	+	+

Για τη διάγνωση της κλινικής εικόνας του κάθε ασθενούς χρειάζεται πάντοτε να ληφθούν υπόψη και τα ορολογικά ευρήματα για αυτόν.

5.1.3. Για τον HCMV ιό

Πίνακας 11: Αναφορά της ειδικότητας των αντιγόνων του HCMV σε κάθε δοκιμή Western Blot με τα strips.

Μέγεθος ζώνης	Αντιγόνο	Περιγραφή	Κατηγορία
130 kDa	pp130	Αντιγόνο φωσφοπρωτεΐνης: UL57	3
65 kDa	pp65	Αντιγόνο φωσφοπρωτεΐνης του καψιδίου: UL83	1
55 kDa	pp55	Αντιγόνο gB γλυκοπρωτεΐνης B: UL55	2
52 kDa	pp52	Αντιγόνο φωσφοπρωτεΐνης: UL44	2
38 kDa	p38		2
28 kDa	pp28	Αντιγόνο πρωτεΐνης του καψιδίου: UL99	3

Στην προσπάθεια να αξιολογηθούν τα σήματα που δίνουν οι ζώνες των αντιγόνων, πρέπει να ληφθούν υπόψη οι θέσεις των ζωνών και η ένταση (πάχος και χρώμα) των ζωνών, μετά από τη Western Blot τεχνική. Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός πως οροί ατόμων που κάποιες φορές φέρουν αδύναμα σήματα σε μεμονωμένες ζώνες αντιγόνων. Οπότε, τα αντιγόνα έναντι του HCMV μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες γενικά (Πίνακας 12).

Πίνακας 12: Αναφορά των κατηγοριών και των επιμέρους χαρακτηριστικών των αντιγόνων του HCMV που ανιχνεύονται σε ορούς ατόμων που υποβάλλονται σε διαδικασία Western Blot.

Κατηγορία	Χαρακτηριστικά
1	Αντιγόνο που προκαλεί τη διασταυρούμενη αντίδραση, έχοντας μοριακό βάρος (M.B.) ίσο με 65 kDa και μη αναγνωρισμένα αντιγόνα.
2	Αντιγόνο με χαμηλή ειδικότητα και M.B. ίσα με 55 kDa, 52 kDa και 38 kDa.
3	Αντιγόνα με υψηλή ειδικότητα και M.B. ίσα με 130 kDa και 28 kDa.

Αναφορικά με τα αποτελέσματα του Western Blot για τα HCMV αντιγόνα, αυτά μπορούν να διακριθούν σε τρεις επιμέρους κατηγορίες: αρνητικό, οριακά αρνητικό και θετικό, ανάλογα με το σήμα που αυτά δίνουν στις αντίστοιχες ζώνες τους (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Περιγραφή του αποτελέσματος του Western Blot και του συνόλου των ζωνών που ανιχνεύονται σε ορούς ασθενών με μυασθένεια Gravis.

Αποτέλεσμα	Χαρακτηριστικά
Αρνητικό	Καμία ζώνη/ζώνες από την κατηγορία 1 ή μία αδύναμη σε σήμα ζώνη από την κατηγορία 2 των αντιγόνων.
Οριακά αρνητικό	Μία αδύναμη σε σήμα ζώνη από την κατηγορία 3 ή περισσότερες από μία ζώνες από την κατηγορία 2 των αντιγόνων.
Θετικό	Μία ζώνη από την κατηγορία 3 των αντιγόνων. Επιπλέον ζώνες από την κατηγορία 1 και 2 των αντιγόνων μπορεί να παρατηρούνται.

5.1.4. Για το *HP* βακτήριο

Αντίστοιχα για το *HP* παρουσιάζεται ο κάτωθι πίνακας που αναφέρεται στην ειδικότητα των αντιγόνων κατά τη διενέργεια του Western Blot.

Πίνακας 14: Αναφορά στην ειδικότητα των αντιγόνων του βακτηρίου *HP*.

Ζώνες	Αντιγόνα	Ειδικότητα
120 kDa	CagA, p120	Κυτταροτοξίνη A, σχετιζόμενη με την παραγωγή του γοιδιώματος του <i>HP</i> . Έχει υψηλή ειδικότητα.
95 kDa	VacA, p95	Κυτταροτοξίνη A, σχετιζόμενη με τα κυστίδια μεταφοράς του βακτηρίου. Έχει υψηλή

		ειδικότητα.
75 kDa	p75	Μη αναγνωρισμένη λειτουργία ακόμα.
67 kDa	FSH,p67	Πρωτεΐνη του περιβλήματος του μαστιγίου του βακτηρίου. Μη ειδικό αντιγόνο, εξαιτίας της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας με άλλα βακτήρια.
66 kDa	UreB, p66	Υπομονάδα της ουρεάσης. Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με την ουρεάση άλλων βακτηρίων.
57 kDa	HSP ομόλογο, p57	Ομόλογο της πρωτεΐνης Heat sock. Μη ειδικό αντιγόνο.
54 kDa	Φλαγγελίνη (Flagelin), p54	Φλαγγελίνη. Μη ειδικό αντιγόνο, εξαιτίας της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας με άλλα βακτήρια που έχουν φλαγγελίνη.
50 kDa	p50	Μη ειδικό αντιγόνο.
41 kDa	p41	Μη ειδικό αντιγόνο.
33 kDa	p33	Πιθανότατα ειδικό αντιγόνο του <i>HP</i> .
30 kDa	OMP, p30	Πρωτεΐνη εξωτερικής μεμβράνης βακτηρίου. Ειδικό αντιγόνο του <i>HP</i> .
29 kDa	UreA,p29	Ελαφριά υπομονάδα ουρεάσης. Υψηλή

		ειδικότητα για το <i>HP</i> .
26 kDa	p26	Υψηλή ειδικότητα για το <i>HP</i> .
19 kDa	OMP, p19	Πρωτεΐνη εξωτερικής μεμβράνης βακτηρίου. Ειδικό αντιγόνο του <i>HP</i> .
17 kDa	p17	Πιθανότατα ειδικό αντιγόνο για το <i>HP</i> .

Η ειδικότητα των αντιγόνων για το *HP* μπορεί να διακριθεί σε τρεις επιμέρους κατηγορίες (Πίνακας 15).

Πίνακας 15: Παρουσίαση των τριών κατηγοριών της ειδικότητας των αντιγόνων του *HP*.

Κατηγορία	Αντιγόνα
1	Αντιγόνα που αντιδρούν διασταυρούμενα και μη αναγνωρισμένα αντιγόνα με μοριακά βάρη ίσα (M.B.) με: 41 kDa, 50 kDa, 54 kDa, 57 kDa, 67 kDa και 75 kDa.
2	Αντιγόνα με M.B. ίσα με 66 kDa (UreB).
3	Ειδικά για το είδος και με υψηλή ειδικότητα αντιγόνα με M.B. ίσα με: 17 kDa, 19 kDa, 26 kDa, 29 kDa, 30 kDa, 33 kDa, VacA και CagA.

Το αποτέλεσμα του Western Blot αποδίδεται με την ύπαρξη ή όχι της ζώνης για το εκάστοτε αντιγόνο-στόχο στο αντίστοιχο strip που χρησιμοποιείται. Η αξιολόγηση του αποτελέσματος μπορεί να το κατατάξει σε τρεις εν δυνάμει κατηγορίες: αρνητικό, οριακά θετικό και θετικό. Στην προσπάθεια να αξιολογηθούν τα σήματα που δίνουν οι ζώνες των αντιγόνων, πρέπει να ληφθούν υπόψη οι θέσεις των ζωνών και η ένταση (πάχος και χρώμα) των ζωνών, μετά από τη Western Blot τεχνική (Πίνακας 16).

Πίνακας 16: Ερμηνεία του αποτελέσματος του Western Blot και των χαρακτηριστικών των ζωνών των αντιγόνων του *HP* που ανιχνεύονται με την τεχνική του Western Blot.

Αποτέλεσμα	Χαρακτηριστικά
------------	----------------

Αρνητικό	Καμία ζώνη αντιγόνου δεν αναγνωρίζεται ή αναγνωρίζονται αδύναμες σε σήμα ζώνες αντιγόνων από τις κατηγορίες 1 και 2 ή μία αδύναμη σε σήμα ζώνη αντιγόνου από την κατηγορία 3.
Οριακά θετικό	Αναγνωρίζεται 1 διακριτή ζώνη αντιγόνου από την κατηγορία 3 ή τουλάχιστον 2 αδύναμες σε σήμα ζώνες αντιγόνου από την κατηγορία 3.
Θετικό	Αναγνωρίζονται τουλάχιστον 2 διακριτές ζώνες αντιγόνων από την κατηγορία 3.

Ανίχνευση IgG αντι-CagA και αντι-VacA αντισωμάτων με γραμμική ανοσοαποτύπωση

Οι πρωτεΐνες CagA και VacA ανήκουν στους παθογενετικούς παράγοντες του βακτηρίου *Helicobacter pylori* (HP) και είναι αρκετά ανοσοεπικρατή αντιγόνα για τα αντι-HP αντισώματα. Ωστόσο, επειδή η έκφραση τους στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα που χρησιμοποιείται στη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης κατά Western είναι μη ικανοποιητική σχετικά με την ανίχνευση τους από τα αντίστοιχα αντισώματα, η ταυτοποίηση των αντισωμάτων έναντι αυτών πραγματοποιείται με τη μέθοδο της γραμμικής ανοσοαποτύπωσης. Στην τελευταία, οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες CagA και VacA μεταφέρονται σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, οι οποίες στην συνέχεια τοποθετούνται στην άκρη των strips της δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης κατά Western της Euroimmun AG (Γερμανία). Το πειραματικό πρωτόκολλο της ανίχνευσης των αντι-CagA και αντι-VacA αντισωμάτων είναι το ίδιο με αυτό της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, όπως αυτό παρουσιάζεται στην Ενότητα Υλικά-Μέθοδοι-Υλικά.

Κλινικές συσχετίσεις

Τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων των Epstein-Barr (EBV), Human Cytomegalovirus (HCMV) και *Helicobacter pylori* (HP) αναλύθηκαν για πιθανές συσχετίσεις με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με μυασθένεια Gravis και πιο συγκεκριμένα: την ηλικία εμφάνισης της νόσου, την συνολική θετικότητα στα αντιγόνα-στόχους του εκάστοτε παθογόνου που μελετάται, τον τύπο των αυτοαντισωμάτων έναντι διαφορετικού αντιγόνου-στόχου (εδώ τον AChR ή MuSK ή LRP4) και τον τύπο της χορηγούμενης στους ασθενείς θεραπείας (Mestinon, Prezolon, Azathioprine ή συνδυασμό αυτών). Οι αναλύσεις αυτές έγιναν χρησιμοποιώντας το γραμμικό συντελεστή R του Pearson (Pearson's correlation R).

Στατιστική ανάλυση

Όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά την στατιστική ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα Υλικά-Μέθοδοι-Μέθοδοι.

Τα κατηγορικά δεδομένα παρουσιάζονται ως απόλυτες τιμές περιπτώσεων και ως συχνότητες εμφάνισης με τη μορφή εκατοστιαίου ποσοστού. Οι διαφορές μεταξύ των ανεξάρτητων κατηγορικών μεταβλητών καθορίζονται χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Η παρουσίαση των αριθμητικών δεδομένων γίνεται με τη μορφή μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση (mean $\pm$ standard deviation). Οι διαφορές ανάμεσα σε ανεξάρτητες αριθμητικές μεταβλητές με κανονική κατανομή προσδιορίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). Η ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ αριθμητικών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το γραμμικό συντελεστή R του Pearson (Pearson's correlation R). Ως στατιστικά σημαντικές χαρακτηρίστηκαν όλες οι διαφορές με τιμή σημαντικότητας (p.value) $<0,05$, ενώ διαφορές με $0,1 > p \geq 0,05$ χαρακτηρίστηκαν πως έχουν τάση να είναι στατιστικά σημαντικές. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα στατιστικών αναλύσεων SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Όλα τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με το SPSS και με το πρόγραμμα γραφημάτων και στατιστικής ανάλυσης GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, USA), εκτός από τα διαγράμματα τύπου Venn, τα οποία έγιναν με τη χρήση του προγράμματος InteractiVenn (215).

Εκτέλεση πειραματικής διαδικασίας και στατιστικής ανάλυσης

Όλη η προετοιμασία των πειραμάτων, τα πειράματα και οι στατιστικές αναλύσεις τελέστηκαν από την υποψήφια, με εξαίρεση τα εξής:

- 1) Η συλλογή του βιολογικού υλικού από τους ασθενείς με μυασθένεια Gravis και τους υγιείς μάρτυρες ολοκληρώθηκε από ιατρούς, ειδικευόμενες, ειδικευόμενους, ειδικές και ειδικούς από την Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική και την Κλινική Ρευματολογίας και Αυτοάνοσων νοσημάτων (Διευθυντές: Αναπληρωτής Καθηγητής Δαρδιώτης Ευθύμιος και Καθηγητής Μπόγδανος Δημήτριος αντίστοιχα) στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας. Σημαντική υπήρξε η βοήθεια του νοσηλευτικού προσωπικού σε αυτό επίσης.

- 2) Η συλλογή των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με μυασθένεια Gravis και των υγιών μαρτύρων πραγματοποιήθηκε από τους ιατρούς των δύο κλινικών, που αναφέρονται παραπάνω.

5.2. Μέθοδοι

5.2.1. Βιολογικό υλικό ασθενών με MG και υγιών μαρτύρων

Βιολογικό υλικό των ασθενών με μυασθένεια Gravis και των υγιών μαρτύρων

Συνολικά, συλλέχθηκαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος από 18 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) (12 γυναίκες (66,7%) με διάμεση ηλικία 63 έτη και εύρος ηλικίας 47-79 έτη). Ο Πίνακας 17 παρουσιάζει τα δημογραφικά και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με μυασθένεια Gravis. Η διάγνωση της μυασθένειας Gravis βασίστηκε στις κατευθυντήριες οδηγίες (Guidelines), όπως αυτές ορίστηκαν από μία επιτροπή ειδικών νευρολόγων ιατρών, τον Οκτώβριο του 2013 και το Νοέμβριο του 2020 από το διεθνές συμπόσιο οδηγιών για τη διαχείριση της μυασθένειας Gravis από τον οργανισμό για τη μυασθένεια Gravis των ΗΠΑ. Κατά την αιμοληψία, μόνο 14 εκ των 18 ασθενών με μυασθένεια Gravis (77,8%) λάμβαναν κάποια θεραπευτική αγωγή είτε ως μονοθεραπεία είτε συνδυαστικά. Μάλιστα, από τους 14, οι 3 (21,43%) ασθενείς λάμβαναν Mestinon, ο 1 (7,14%) Prezolon, ο 1 (7,14%) συνδυαστική θεραπεία με Azathioprine και Mestinon, οι 6 (42,86%) Mestinon και Prezolon και τέλος οι 3 (21,43%) Azathioprine και Mestinon. Όλοι οι ασθενείς παρακολουθούνταν σε τακτική βάση στην Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική (Διευθυντής: Αναπληρωτής Καθηγητής Δαρδιώτης Ευθύμιος) και στην Πανεπιστημιακή Κλινική Ρευματολογίας και των Αυτοάνοσων Νοσημάτων (Διευθυντής: Καθηγητής Μπόγδανος Δημήτριος) στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

Ως υγιή δείγματα ελέγχου (Healthy controls, HC) χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος από 22, 36 και 49 υγιείς μάρτυρες, για τη μελέτη των EBV, CMV και HP αντίστοιχα (EBV: 14 γυναίκες (63,6%) με διάμεση ηλικία ίση με 54 έτη και εύρος ηλικίας 44-65 έτη), (HCMV: 25 γυναίκες (69,4%) με διάμεση ηλικία ίση με 55 έτη και εύρος ηλικίας 45-66 έτη), (HP: 27 γυναίκες (55,1%) με διάμεση ηλικία ίση με 55 έτη και εύρος ηλικίας 46-65 έτη). Οι Πίνακες 17, 18 και 26 παρουσιάζουν τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των υγιών μαρτύρων. Οι υγιείς μάρτυρες ήταν μέλη του προσωπικού του Εργαστηρίου και της Κλινικής της Ρευματολογίας και των Αυτοάνοσων Νοσημάτων, καθώς και συνοδοί ασθενών. Κανένας υγιής μάρτυρας δεν είχε οικογενειακό ιστορικό αυτοάνοσης νόσου, ούτε άλλη συννοσηρότητα ή

χρόνια νόσο, όπως καρκίνο, αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη ή χρόνια καρδιαγγειακή νόσο.

Όλοι οι ασθενείς με μυασθένεια Gravis και οι υγιείς μάρτυρες ήταν Λευκοί Καυκάσιοι. Όλα τα δείγματα ολικού περιφερικού αίματος διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση σε φικόλη και τα παράγωγα του αίματος (όπως και ο ορός που χρησιμοποιήθηκε ως βιολογικό υλικό μελέτης) αποθηκεύτηκαν κατάλληλα στους -20°C όπως αναφέρεται στην Ενότητα Υλικά-Μέθοδοι-Υλικά της παρούσας εργασίας.

5.2.2. Ανίχνευση IgG αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία «Anti-EBV WESTERNBLOT (IgG)» της Euroimmun AG (Γερμανία), η οποία χρησιμοποιεί ως αντιγονική πηγή το πρωτεϊνικό εκχύλισμα του στελέχους P₃HR₁ του EBV: p125.VCA, p93.EAR, p79.EBNA-1, p65.VCA, p45.EAD, p43.EAD, p42.VCA, p41.VCA, p40.VCA, p33.VCA, EBV.p27 και p22.VCA. Τα αντιγόνα του ιού ταξινομήθηκαν σε τρεις κατηγορίες: τα αντιγόνα του καψιδίου του ιού (Viral Capsid Antigens, VCA) που ήταν σε αριθμό ίσα με επτά (p125, p65, p42, p41, p40, p33 και p22), τα πρόωρα αντιγόνα του ιού (Early Antigens, EA) που ήταν τρία (p39, p45 και p43), και το ένα πυρηνικό αντιγόνο (EBV nuclear antigen, EBNA), το EBNA-1. Το αντιγόνο EBV.p27 δεν κατατάχθηκε σε κάποια από τις τρεις κατηγορίες. Το πειραματικό πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western Blot παρουσιάζεται στην Ενότητα Υλικά-Μέθοδοι-Μέθοδοι.

Πίνακας 17: Αναφορά των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των 18 ασθενών με μυασθένεια Gravis (Myasthenia Gravis, MG) και των υγιών μαρτύρων (Healthy controls, HC).

Χαρακτηριστικά	MG (n=18)	HC (n=22)	<i>p</i> MG vs HC
Ηλικία	62,9 ± 16,2	54,4 ± 10,9	0,066
Φύλο			
Άρρεν	6 (33,3%)	8 (36,4%)	Ns
Θήλυ	12 (66,7%)	14 (63,6%)	
VCA θετικότητα	18 (100%)	22 (100%)	Na
EA θετικότητα	10 (55,6%)	1 (4,5%)	<0,001
EBNA θετικότητα	18 (100%)	17 (77,3%)	0,053

Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή

κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομεύσεις: na (not applicable)=Μη διαθέσιμο, ns (not significant)=Μη σημαντικό στατιστικά.

IgG αντι-EBV αντισώματα σε ασθενείς με MG

Η θετικότητα για αντισώματα έναντι των τριών κατηγοριών αντιγόνων του EBV εκτιμήθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Πίνακας 17). Από τους 18 ασθενείς με MG, ο 1 (5,6%) είχε αντισώματα θετικά για VCA και EA, 9 (50%) θετικά για VCA, EA και EBNA-1, 1 (5,6%) για κανένα από τα τρία αντιγόνα και 7 (38,9%) για VCA και EBNA-1. Ορισμένα αντι-VCA αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε 18 (100%) ασθενείς και 22 (100%) υγιείς μάρτυρες. Αντίστοιχα, κάποια αντι-EA αντισώματα σε 9 (50%) ασθενείς και 1 (4,5%) υγιείς μάρτυρες ($p=0,002$) και τα αντι-EBNA-1 αντισώματα σε 18 (100%) ασθενείς και 17 (77,3%) υγιείς μάρτυρες ($p=0,053$).

Η τριπλή θετικότητα (VCA+/EA+/EBNA+) για τις τρεις κατηγορίες αντιγόνων παρατηρήθηκε πιο συχνά στους ασθενείς με μυασθένεια Gravis, σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (50% έναντι 4,5%).

6. Αποτελέσματα

6.1. Για τον HCMV

6.1.1. Υλικά

Αναλύθηκαν όλα στην αντίστοιχη ενότητα Υλικά-Μέθοδοι- Υλικά.

6.1.2. Μέθοδοι

Πίνακας 18: Παρουσίαση των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των 18 ασθενών με MG και των 36 υγιών δειγμάτων ελέγχου HC.

Χαρακτηριστικά	MG (n=18)	HC (n=36)	<i>p</i> MG vs HC
Ηλικία	62,9 ± 16,2	55,3 ± 10,8	0,084
Φύλο			
Άρρεν	6 (33,3%)	11 (30,6%)	Ns
Θήλυ	12 (66,7%)	25 (69,4%)	
Οροθετικότητα για HCMV	13 (72,2%)	26 (72,2%)	Ns

18 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και 36 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα του φύλου και της θετικότητας έναντι του συνόλου των ιικών αντιγόνων έναντι του HCMV ιού αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή των εκατοστιαίων ποσοστών. Τα δεδομένα της ηλικίας αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean $\pm$ standard deviation). * Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed), ενώ η ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). ** Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher Exact Test). Συντομεύσεις: ns (not significant)=μη σημαντικό, p (p.value)=στάθμη σημαντικότητας, HCMV (Human Cytomegalovirus)=Ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός, MG=Myasthenia Gravis, HC (Healthy Controls)=Υγιείς μάρτυρες, n (number)=αριθμός ατόμων.

Πίνακας 19: Κλινικά χαρακτηριστικά και συχνότητες των 18 ασθενών με μυασθένεια Gravis (MG), που αναφέρονται στον τύπο του χορηγούμενου φαρμάκου, την παρουσία ή απουσία των αντισωμάτων έναντι των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης (nAChRs) και την ηλικία έναρξης της μυασθένειας Gravis.

Χαρακτηριστικό	MG (n=18)
Τύπος φαρμάκου	Αριθμός ατόμων
Mestinon	3 (21,43%)
Prezolon	1 (7,14%)
Azathioprine and Mestinon	1 (7,14%)
Mestinon and Prezolon	6 (42,86%)
Azathioprine and Mestinon	3 (21,43%)
Σύνολο	14 (100%)
nAChR abs	Αριθμός ατόμων
Ύπαρξη αντισωμάτων έναντι nAChR	8 (72,73%)
Απουσία αντισωμάτων έναντι nAChR	3 (27,27%)
Σύνολο	11 (100%)

Ηλικία έναρξης της MG Μέση ηλικία: 51,3 έτη Εύρος ηλικίας: 20-83 έτη	Αριθμός ατόμων 15 (100%)
---	------------------------------------

Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομεύσεις: n (number of patients)=αριθμός ασθενών, $nAChR\ abs$ (number of Achetylcholine Receptors' antibodies)=αριθμός των αντισωμάτων έναντι των υποδοχέων της Ακετυλοχολίνης.

6.1.3. Κλινικές συσχετίσεις

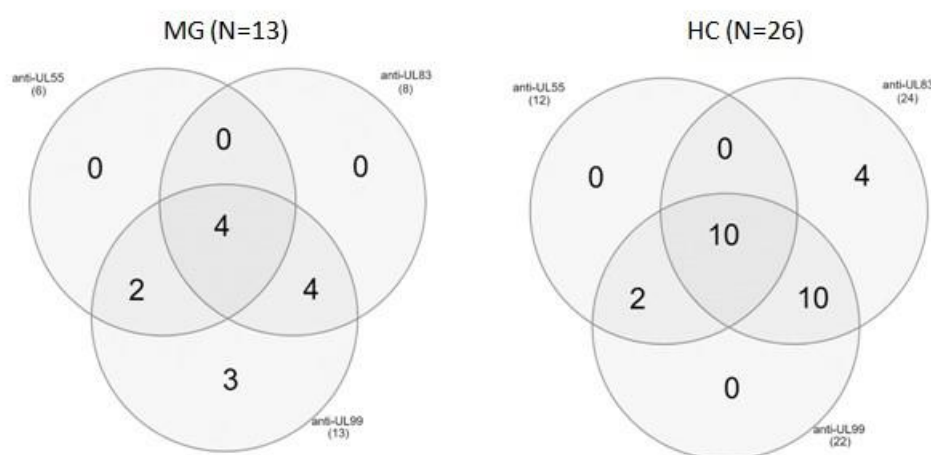
Τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του HCMV αναλύθηκαν για πιθανές συσχετίσεις με τα κλινικά και τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά της MG. Τα κλινικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ήταν ο τύπος του φαρμάκου που χορηγήθηκε ως θεραπεία στους ασθενείς με μυασθένεια Gravis (η επιλογή έγινε μεταξύ των: Mestinon, Prezolon, Azathioprine ή τον συνδυασμό αυτών από τον κλινικό νευρολόγο ιατρό) και η ηλικία έναρξης του νοσήματος. Το ανοσολογικό χαρακτηριστικό αντίστοιχα ήταν η παρουσία ή η απουσία των αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (που αποτελεί τον στόχο των αυτοαντισωμάτων στην πλειοψηφία των περιπτώσεων των ασθενών με MG) στον ορό των ασθενών με MG (Πίνακας 19).

6.1.4. Στατιστική ανάλυση

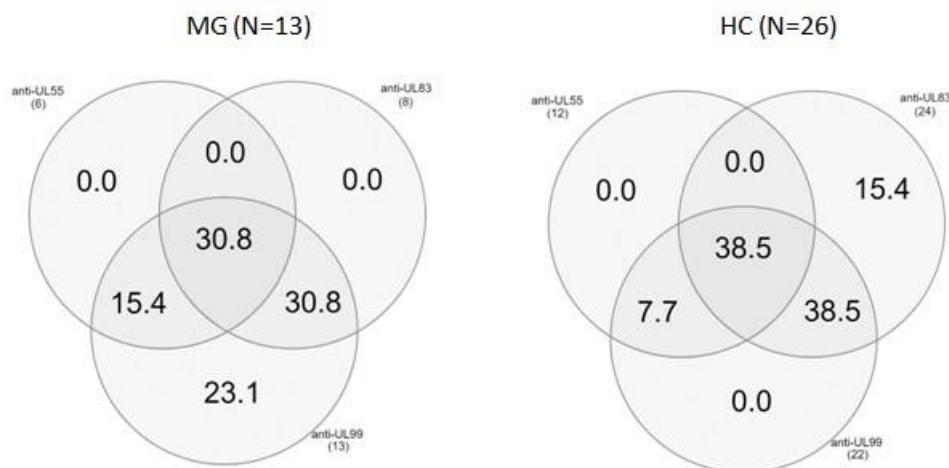
Όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα Υλικά-Μέθοδοι-Μέθοδοι

6.1.5. IgG αντι-HCMV αντισώματα σε ασθενείς με MG

Η θετικότητα για αντισώματα έναντι των έξι αντιγόνων του HCMV εκτιμήθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Πίνακας 18). Από τους 18 ασθενείς με MG, οι 13 (72,2% του συνόλου των ασθενών) ήταν θετικοί για τα αντιγόνα του HCMV ιού. Εξ αυτών των ατόμων, οι 5 ήταν θετικοί για το UL57 αντιγόνο (38,5%, με $p < 0,001$), οι 8 για το UL83 (61,5%, με $p = 0,011$), οι 6 για το UL55 (46,2%, με $p =$ μη σημαντικό), οι 3 για το UL44 (23,1%, με $p =$ μη σημαντικό), ο 1 για το p38 (7,7%, με $p =$ μη σημαντικό) και οι 13 για το UL99 (100%, με $p =$ μη σημαντικό). Αντίστοιχα, για τους υγιείς μάρτυρες (HC), ανιχνεύθηκαν θετικά 26 (96,2% του συνόλου) άτομα για τα αντιγόνα του HCMV, εκ των οποίων τα 25 ήταν θετικά για το UL57 (96,2%, με $p < 0,001$), οι 25 για το UL83 (96,2%, με $p = 0,011$), οι 13 για το UL55 (50%, με $p =$ μη σημαντικό), οι 8 για το UL44 (30,8%, με $p =$ μη σημαντικό), οι 10 για το p38 (38,5%, με $p =$ μη σημαντικό) και οι 23 για το UL99 (88,5%, με $p =$ μη σημαντικό). Συγκριτικά, ανάμεσα στα έξι αντιγόνα του HCMV, τα τρία αντιγόνα: UL55, UL83 και UL99 εμφανίζονται περισσότερο συχνά στην ομάδα των ασθενών με MG (Εικόνα 9), σε αντίθεση με τα αντιγόνα: UL57, UL83 και UL99 που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στην ομάδα των υγιών μαρτύρων HC (Εικόνα 9). Αξιοσημείωτο είναι πως η συχνότητα των UL57, UL83 και p38 παρουσιάζεται πολύ μεγαλύτερη στην ομάδα των υγιών μαρτύρων HC, σε σχέση με αυτή των ασθενών με MG, ενώ αντίθετα η συχνότητα του UL99 είναι μεγαλύτερη στην ομάδα των ασθενών με MG από ότι στους υγιείς μάρτυρες HC, σε ποσοστό μάλιστα 100% και αποτελεί τη μόνη θετικότητα που παρατηρήθηκε περισσότερο συχνά στους MG σε σύγκριση με τους HC.



f



Εικόνα 9: Διαγράμματα Venn των προτύπων θετικότητας των αντι-HCMV αντισωμάτων και συγκεκριμένα των αντι-UL57, -UL83 και -UL99.

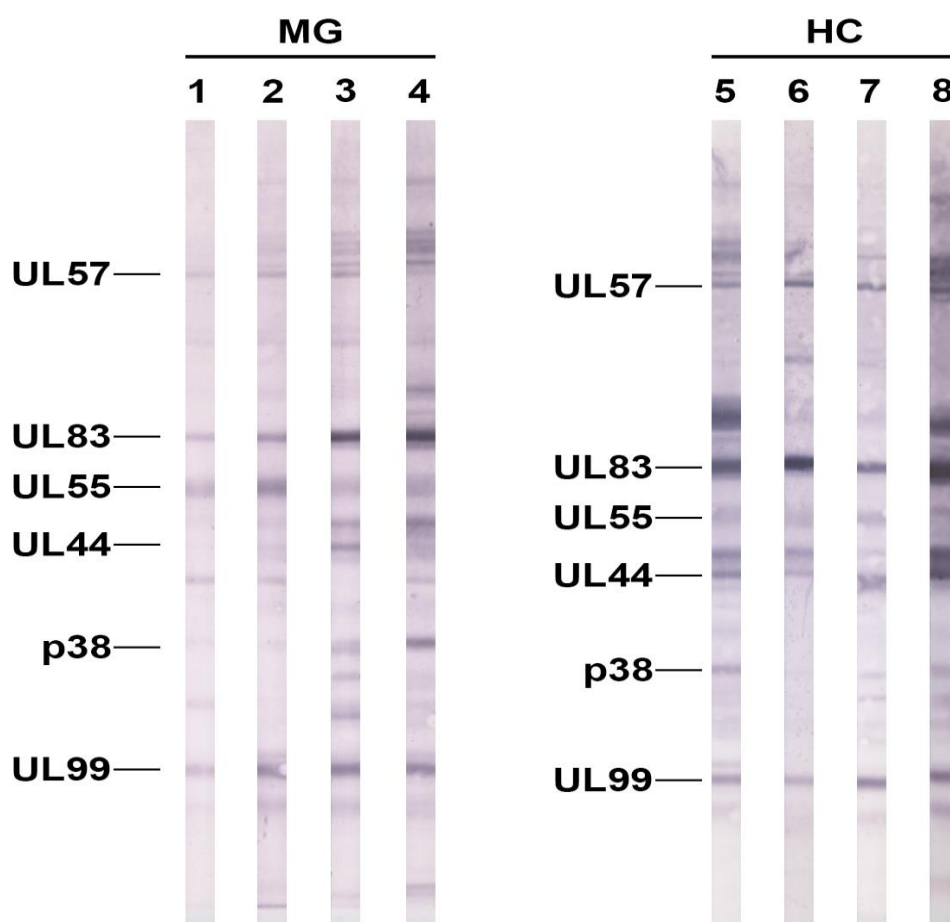
13 εκ των 18 ασθενών με MG, καθώς και 26 εκ των 39 υγιών δειγμάτων ελέγχου HC είναι θετικοί για τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του HCMV UL55, UL83 και UL99. Η πάνω εικόνα, με σειρά από αριστερά προς τα δεξιά αναφέρεται στον αριθμό των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων UL55, UL83 και UL99 των MG και HC δειγμάτων, ενώ η κάτω εικόνα, με την ίδια σειρά στο ποσοστό των αντισωμάτων αυτών για τους MG και HC επίσης.

6.1.6. Συχνότητες IgG αντιγονοειδικών HCMV αντισωμάτων σε ασθενείς με MG

Η παρουσία αντισωμάτων έναντι χαρακτηριστικών αντιγόνων του HCMV εξετάστηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντιγόνα αυτά ήταν τα p38, UL44, UL55, UL57, UL83 και UL99. Η εικόνα (Εικόνα 10) αποτυπώνει τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western από 8 αντιπροσωπευτικά δείγματα (4 MG και 4 HC), ενώ ο Πίνακας 20 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των συχνοτήτων εμφάνισης των αντισωμάτων σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες. Στην MG τα πιο ανοσοεπικρατή αντιγόνα ήταν τα UL99 (100%), UL83 (61,5%) και UL55 (46,2%).

Το αντίσωμα που βρέθηκε πιο συχνά σε ασθενείς με MG συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες ήταν το αντι-UL99 (100% έναντι 88,5%, με p =μη σημαντικό). Ακόμη, τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων UL57 και UL83 ήταν λιγότερο συχνά στην ομάδα των ασθενών με MG παρά σε αυτή των υγιών ατόμων HC (38,5% έναντι 96,2% και 61,5% έναντι 96,2% αντίστοιχα). Οι αντιδραστικότητες έναντι των αντιγόνων p38 και UL55 του HCMV ήταν μη συγκρίσιμες ανάμεσα στους ασθενείς με MG και τους υγιείς μάρτυρες HC.

Στην σύγκριση μεταξύ των MG και των HC, αυξημένη συχνότητα είχε μόνο του UL99 για τους MG (100% έναντι 88,5%, με p =μη σημαντικό). Αντίθετα, χαμηλότερη συχνότητα για τους MG είχαν τα αντι-p38 και αντι-UL44 αντισώματα (7,7% έναντι 38,5% και 23,1% έναντι 30,8%). Ακολούθως, τα αντιγόνα UL57 και UL83 ήταν χαμηλότερα στην ομάδα των MG ασθενών σε σχέση με αυτή των HC υγιών δειγμάτων (38,5% έναντι 96,2% και 61,5% έναντι 96,2% αντίστοιχα), ενώ η αντιδραστικότητα έναντι του UL55 υπήρξε μη συγκρίσιμη ανάμεσα στους ασθενείς με MG και τους υγιείς μάρτυρες HC (46,2% έναντι 50%).



Εικόνα 10: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τα αντισώματα έναντι αντιγόνων του HCMV σε 8 αντιπροσωπευτικά δείγματα, 4 από ασθενείς με μνσασθένεια Gravis (MG) και 4 από υγιή δείγματα ελέγχου (HC).

Η εικόνα αυτή παρουσιάζει ενδεικτικά τα strips (ταινίες) των μνσασθενικών ατόμων και των υγιών μαρτύρων που έχουν επιλεγεί μεταξύ άλλων, γιατί φέρουν αντιπροσωπευτικές θετικές ζώνες σε ειδικά αντιγόνα-στόχους έναντι του Human Cytomegalovirus (HCMV) ιού. Από αριστερά προς τα

δεξιά αναπαριστώνται τα 4 strips μυασθενικών ασθενών (MG) (1-4 αριθμοί) και στην συνέχεια ακολουθούν τα 4 strips των υγιών μαρτύρων (HC) (5-8 αριθμοί), που έχουν επιλεγεί.

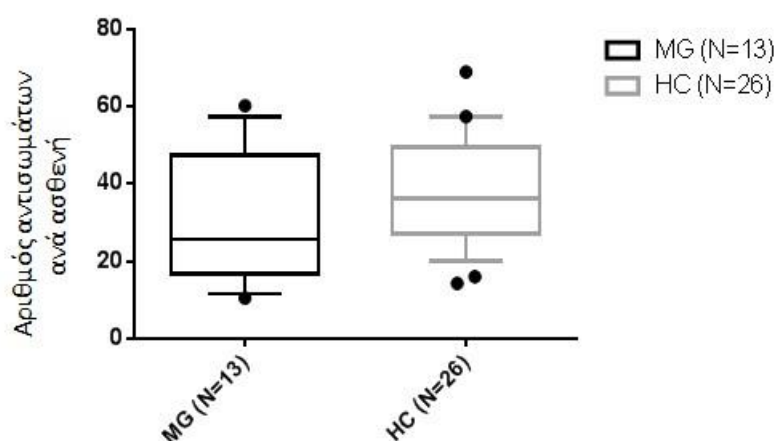
Πίνακας 20: Συχνότητες εμφάνισης των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HCMV σε 13 θετικούς ασθενείς και 26 θετικά υγιή δείγματα ελέγχου.

Αποτέλεσμα αντιγόνων	MG (n=13)	HC (n=26)	p MG vs HC
UL57 θετικότητα	5 (38,5%)	25 (96,2%)	<0,001
UL83 θετικότητα	8 (61,5%)	25 (96,2%)	0,011
UL55 θετικότητα	6 (46,2%)	13 (50%)	ns
UL44 θετικότητα	3 (23,1 %)	8 (30,8%)	ns
p38 θετικότητα	1 (7,7 %)	10 (38,5%)	ns
UL99 θετικότητα	13 (100%)	23 (88,5%)	ns

13 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και 26 υγιείς μάρτυρες (HC) όπως ανιχνεύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή των εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομεύσεις: n (number of people)=αριθμός ατόμων, ns (not significant)=στατιστικά μη σημαντικό, na (not available)=μη διαθέσιμο στατιστικά, MG (Myasthenia Gravis)=Μυασθένεια Gravis, HC (Healthy Controls)=Υγιείς μάρτυρες, p (p.value)=στάθμη σημαντικότητας.

Διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των ασθενών με MG και των υγιών δειγμάτων HC. Ειδικότερα, πιο συχνά στην MG ήταν τα αντι-UL99 (100% έναντι 88,5%, $p=ns$), αντι-UL83 (61,5% έναντι 96,2%, $p=0,011$), αντι-UL57 (38,5% έναντι 96,2%, $p<0,011$) και αντι-UL55 (46,2% έναντι 50%, $p=ns$). Αντίθετα, τα αντισώματα έναντι του αντιγόνου UL99 του HCMV παρατηρήθηκαν να είναι να είναι περισσότερο συχνά στους ασθενείς με MG σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες HC (100% έναντι 88,5%, $p=ns$), ενώ τα αντισώματα έναντι του UL44 αντιγόνου ήταν περισσότερο συχνά στους MG σε σχέση με τους HC (23,1% έναντι 30,8%

αντίστοιχα). Η ανάλυση του συνολικού αριθμού αντισωμάτων ανά ασθενή έδειξε πως οι ασθενείς με MG είχαν λιγότερες αντιδραστικότητες έναντι αντιγόνων του HCMV σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες HC, με τη διαφορά να είναι στατιστικά μη σημαντικές ($29,7 \pm 16,7$ για MG έναντι $38,4 \pm 14,2$ για HC, με $p=ns$) (Εικόνα 11 και Πίνακας 21). Οι ασθενείς με MG είχαν λιγότερες αντιδραστικότητες έναντι των αντισωμάτων συγκριτικά με τα υγιή άτομα HC.



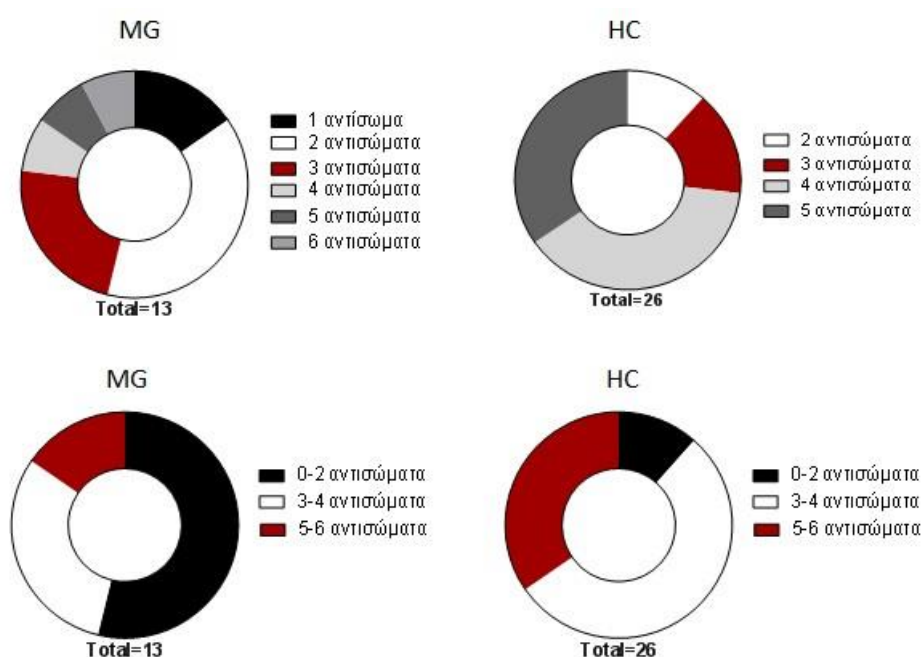
Εικόνα 11: Γραφική αναπαράσταση του αριθμού των αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του HCMV ανά ασθενή.

*Αριθμός των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HCMV ανά ασθενή, όπως ανιχνεύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, στον ορό των 13 θετικών για HCMV ασθενών με MG και των 26 θετικών για HCMV υγιών δειγμάτων ελέγχου HC. Οι γραμμές αναφέρονται στη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean $\pm$ standard deviation) * $p=ns$.*

Πίνακας 21: Παρουσίαση του αριθμού των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HCMV ανά ασθενή.

Συνολική θετικότητα για τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του HCMV	MG (n=13)	HC (n=26)	p MG vs HC
mean $\pm$ standard deviation	29,7 $\pm$ 16,7	38,4 $\pm$ 14,2	p.value=ns

Αριθμός των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HCMV ανά ασθενή, όπως ανιχνεύθηκαν με την ανοσοαποτύπωση κατά Western, στον ορό των 13 θετικών για τον ιό ασθενών με MG και των 26 θετικών για τον ιό υγιών δειγμάτων ελέγχου HC. Τα δεδομένα αναφέρονται στη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean $\pm$ standard deviation) * p =ns. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (Student's t -test, equal variances not assumed), ενώ για την ανάλυση των ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές (p =ns) δεν παρατηρήθηκαν. Συντομογραφία: ns (not significant)= Μη σημαντικό στατιστικά, MG (Myasthenia Gravis)= Μυασθένεια Gravis, HC (Healthy Controls)= Υγιή δείγματα ελέγχου, mean= μέση τιμή, Standard deviation= τυπική απόκλιση.



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση των διαγραμμάτων δακτυλίου που απεικονίζουν την ύπαρξη των μεμονωμένων και των πολλαπλών αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HCMV ιού.

Υπαρξη των μεμονωμένων και των πολλαπλών αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HCMV σε ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και σε υγιείς μάρτυρες (HC), όπως ανιχνεύθηκαν με την ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Πίνακας 22: Παράθεση των συχνοτήτων ύπαρξης των μεμονωμένων και των πολλαπλών αντιγονοειδικών HCMV αντισωμάτων.

Αριθμός των αντισωμάτων έναντι των	MG (n=13)	HC (n=26)	Σύνολο	p MG vs HC

αντιγόνων του HCMV				
1	2 (15,4%)	0 (0%)	2 (5,1%)	p. value=0,012
2	5 (38,5%)	3 (11,5%)	8 (20,5%)	
3	3 (23,1%)	4 (15,4%)	7 (17,9%)	
4	1 (7,7%)	10 (38,5%)	11 (28,2%)	
5	1 (7,7%)	9 (34,6%)	10 (25,6%)	
6	1 (7,7%)	0 (0%)	1 (2,6%)	
Σύνολο	13 (100%)	26 (100%)	39 (100%)	

Συχνότητες παρουσίας των μεμονωμένων και των πολλαπλών αντιγονοειδικών HCMV αντισωμάτων, σε ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG), καθώς και σε υγιή δείγματα ελέγχου (HC), όπως ανιχνεύθηκαν με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή των εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) για πίνακα 3x2. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντόμευση: ns (not significant)=μη σημαντικό στατιστικά, p (p.value)=στάθμη σημαντικότητας.

6.1.7. Τίτλοι IgG αντιγονοειδικών HCMV αντισωμάτων σε ασθενείς με MG

Τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HCMV παρουσιάζονται στον Πίνακα 24 και απεικονίζονται στην Εικόνα 13. Μεταξύ των ασθενών με MG και των υγιών μαρτύρων HC υπήρχε διαφορά στα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου UL83, με υψηλότερους τίτλους στην MG ($87,5 \pm 42,6$ έναντι $67,0 \pm 32,6$, $p=ns$). Αναφορικά με τα υπόλοιπα αντιγόνα του HCMV, τα επίπεδα των αντι-UL55, -UL57, -UL44 και -p38 ήταν μεγαλύτερα στην ομάδα των υγιών μαρτύρων HC, σε σύγκριση με εκείνα αυτής των ασθενών με MG ($34,0 \pm 11,2$ έναντι $45,6 \pm 13,1$, $p=ns$, $37,8 \pm 11,1$ έναντι $45,1 \pm 14$, $p=ns$, $53 \pm 25,5$ έναντι $60 \pm 27,2$, $p=ns$ και 25 έναντι $50,1 \pm 18,8$, $p=ns$ αντίστοιχα). Τέλος, οι τίτλοι των αντισωμάτων για το αντιγόνο UL99 είναι συγκρίσιμοι μεταξύ τους, χωρίς να υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ($53,9 \pm 20$ έναντι $53 \pm 20,4$, $p=ns$) ανάμεσα στους ασθενείς με MG και τα υγιή δείγματα ελέγχου HC.

Για την καλύτερη εκτίμηση του συνολικού μεγέθους της χυμικής αντίδρασης στους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες, αυτοί κατατάχθηκαν σε έξι διακριτές κατηγορίες, σύμφωνα με την παρουσία 0-2, 3-4 και 5-6 πολλαπλών αντισωμάτων (Πίνακας 25). Τα αποτελέσματα όπως αυτά

παρουσιάζονται στον Πίνακα 25, δείχνουν πως αντισώματα για 0-2 διαφορετικά αντιγόνα ανιχνεύονται συχνότερα στους ασθενείς με MG, παρά στους υγιείς μάρτυρες HC με συχνότητα 53,8% για τους πρώτους έναντι 11,5% για τους δεύτερους αντίστοιχα. Αντιθέτως, τα αντισώματα για την πρόσδεση 3-4 και 5-6 πολλαπλών αντισωμάτων ανιχνεύονται σε χαμηλότερες τιμές στους ασθενείς με MG και στις δύο περιπτώσεις, σε σύγκριση με τα υγιή δείγματα ελέγχου HC (30,8% έναντι 53,8% και 15,4% έναντι 34,6% κατά αντιστοιχία). Τα αποτελέσματα αυτά βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικά, με την στάθμη σημαντικότητας του ελέγχου p να είναι μικρότερη του 0,05 ($p=0,017$).

Αρκετές συσχετίσεις φάνηκαν ανάμεσα στους τίτλους διαφορετικών αντιγονοειδικών HCMV αντισωμάτων των ασθενών με MG, όπως παρουσιάζονται στους Πίνακες 23 και 24.

Πίνακας 23: Παρουσίαση των τίτλων των διαφορετικών αντιγονοειδικών HCMV αντισωμάτων των 13 ασθενών με MG, που είναι θετικοί για τα αντιγόνα του HCMV ιού.

		pp130.UL57	pp65.UL83	pp55.UL55	pp52.UL44	p38	pp28.UL99
pp130.UL57	Pearson Correlation Sig (2-tailed)	1	0,786 0	-0,011 0,965	0,715 0,001	0,248 0,321	0,709 0,001
pp65.UL83	Pearson Correlation Sig (2-tailed)		1	-0,183 0,467	0,723 0,001	0,292 0,239	0,507 0,032
pp55.UL55	Pearson Correlation Sig (2-tailed)			1	-0,089 0,724	0,023 0,928	0,219 0,384
pp52.UL44	Pearson Correlation Sig (2-tailed)				1	0,335 0,174	0,588 0,010
p38	Pearson Correlation Sig (2-tailed)					1	0,243 0,332
pp28.UL99	Pearson Correlation Sig (2-tailed)						1

Τα δεδομένα αναπαριστούν το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson (R). Το p είναι η τιμή p (2 tailed) της συσχέτισης. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομεύσεις: HCMV (Human Cytomegalovirus)=Ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός, na (not applicable)=Μη υπολογίσιμο, sig./p (p.value)=στάθμη σημαντικότητας.

Πίνακας 24: Συσχέτιση των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του ιού HCMV και των κλινικοεργαστηριακών χαρακτηριστικών των 13 θετικών για τον HCMV ασθενών με MG.

		Ηλικία έναρξη ς του νοσήμα τος	nAch R	Τύπος φαρμάκου	pp130.UL57	pp65.UL83	pp55.UL55	pp52.UL44	p38	pp28.UL99
Ηλικία έναρξης του νοσήματος	Pearson Correlation Sig. (2- tailed)	1	0,853 0,001	-0,649 0,012	-0,395 0,145	-0,168 0,549	-0,370 0,175	-0,302 0,275	-0,364 0,182	-0,197 0,482
nAchR	Pearson Correlation Sig. (2- tailed)		1 0	-0,898 0	-0,344 0,3	-0,235 0,488	-0,091 0,791	-0,109 0,749	-0,303 0,364	-0,278 0,408
Τύπος φαρμάκου	Pearson Correlation Sig. (2- tailed)			1 0	0,163 0,577	-0,188 0,519	0,394 0,164	-0,086 0,769	0,408 0,148	0,217 0,456

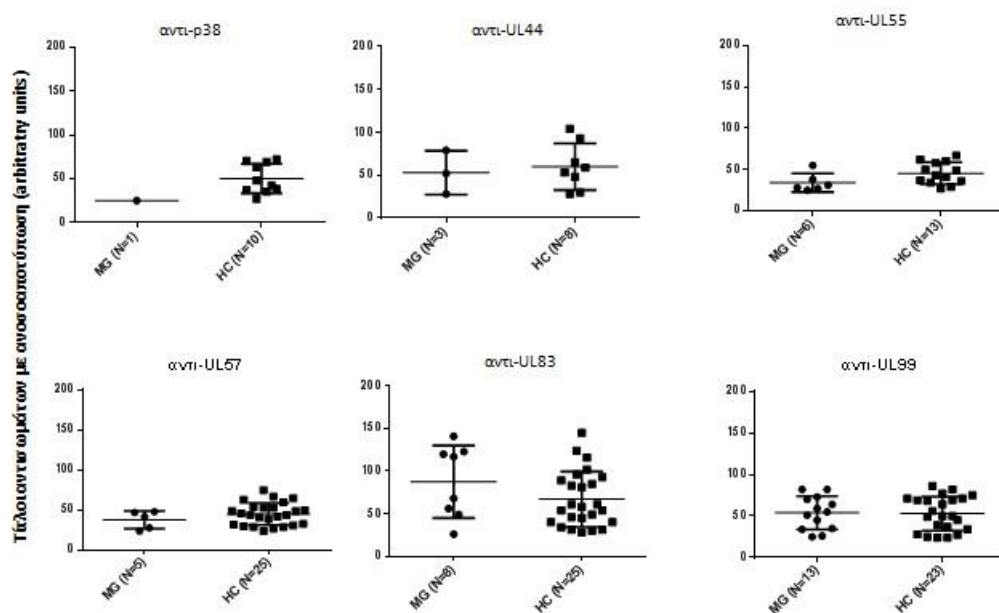
Τα δεδομένα αναπαριστούν το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson (R). Το p είναι η τιμή p (2 tailed) της συσχέτισης. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομεύσεις: HCMV (Human Cytomegalovirus)=Ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός, na: (not applicable)=μη υπολογίσιμο, sig./p (p.value)=στάθμη σημαντικότητας.

Πίνακας 25: Παράθεση των τίτλων των αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του HCMV σε ασθενείς με MG και υγιή δείγματα ελέγχου HC με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Αντιγόνο	MG (n=13)	HC (n=26)	p MG vs HC
UL57	37,8 ± 11,1 AU	45,2 ± 14 AU	Ns

UL83	87,5 ± 42,6 AU	67 ± 32,6 AU	Ns
UL55	34 ± 11,2 AU	45,6 ± 13,1 AU	Ns
UL44	53 ± 25,5 AU	60 ± 27,2 AU	Ns
p38	25 AU	50,1 ± 16,8 AU	Ns
UL99	53,9 ± 20 AU	53 ± 20,4 AU	Ns

13 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και 26 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean ± standard deviation). Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (Student's t-test, two-tailed equal variances not assumed), ενώ για η ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομοίσεις: MG (Myasthenia Gravis)=Μυασθένεια Gravis, HC (Healthy Controls)=Υγιή δείγματα ελέγχου, ns (not significant)=Μη σημαντικό στατιστικά, n (number of people)=αριθμός των ατόμων, na (not applicable)=Μη υπολογίσιμο, p (p.value)=στάθμη σημαντικότητας.



Εικόνα 13: Διαγραμματική απεικόνιση της διασποράς που απεικονίζουν τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HCMV με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

13 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και 26 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Οι γραμμές αναπαριστούν τη διάμεσο τιμή με το εύρος.

Πίνακας 26: Παρουσίαση των συχνοτήτων των αντιγόνων, σύμφωνα με την παρουσία 0-2, 3-4 και 5-6 πολλαπλών αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HCMV σε ασθενείς με MG και υγιείς μάρτυρες HC.

Αριθμός αντισωμάτων έναντι αντιγόνων HCMV	MG (n=13)	HC (n=26)	Σύνολο	p.value=0,017
0-2 αντισώματα	7 (53,8%)	3 (11,5%)	10 (25,6%)	
3-4 αντισώματα	4 (30,8%)	14 (53,8%)	18 (46,2%)	
5-6 αντισώματα	2 (15,4%)	9 (34,6%)	11 (28,2%)	
Σύνολο	13 (100%)	26 (100%)	39 (100%)	

13 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και 26 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean $\pm$ standard deviation). Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (Student's t-test, two-tailed equal variances not assumed), ενώ για η ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομεύσεις: MG (Myasthenia Gravis)=Μυασθένεια Gravis, HC (Healthy Controls)=Υγιή δείγματα ελέγχου, ns (not significant)=μη σημαντικό στατιστικά, n (number of people)=αριθμός των ατόμων, na (not applicable)=μη υπολογίσιμο, p (p.value)=στάθμη σημαντικότητας.

6.1.8. Συσχετίσεις των αντιγονοειδικών HCMV ανοσολογικών αποκρίσεων

Διερευνήθηκαν οι συσχετίσεις ανάμεσα στις αντιγονοειδικές HCMV χυμικές ανοσοαποκρίσεις και σε κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά της MG (Πίνακες 18 και 19), συμπεριλαμβάνοντας τον τύπο των φαρμάκων που χορηγήθηκε σε κάθε ασθενή με MG ως θεραπεία και την ηλικία έναρξης του νοσήματος, καθώς και τον τύπο των αντισωμάτων και ειδικότερα αυτού έναντι του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (που αποτελεί και την πλειοψηφία των περιπτώσεων των ασθενών με MG), που ανιχνεύθηκε στον ορό των ασθενών με MG.

Ανάμεσα στους 18 ασθενείς με MG, οι 6 είχαν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HCMV και συγχρόνως είχαν λάβει θεραπεία με

Mestinon και Prezolon σε ποσοστό της τάξης του 42,86%. Τα αμέσως επόμενα σε ποσοστό αφορούσαν τη χορήγηση των φαρμακευτικών σκευασμάτων Mestinon και συνδυασμός Mestinon με Azathioprine (σε ποσοστό ίσο με 21,43% και στις δύο περιπτώσεις αντίστοιχα), με στάθμη σημαντικότητας p ίση με ns. Τέλος, για τη χορήγηση των Prezolon και Azathioprine με Mestinon (σε ποσοστό ίσο με 7,14% και στις δύο περιπτώσεις) βρέθηκαν λιγότεροι σε αριθμό ασθενείς με MG, με μόλις 1 άτομο για κάθε μια περίπτωση να έχει λάβει την αντίστοιχη θεραπεία (σε όλες τις αναλύσεις η στάθμη σημαντικότητας ήταν ίση με $p=ns$).

Όσον αφορά τον τύπο των αντισωμάτων που ανιχνεύθηκαν έναντι του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης αποκλειστικά, φαίνεται πως 8 εκ των 18 ατόμων (στους υπόλοιπους ασθενείς απουσίαζαν οι κλινικές πληροφορίες σχετικά με τον τύπο των αντισωμάτων που είναι ειδικά για τον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης) ήταν θετικοί για αντισώματα έναντι του AChR (44,4% ποσοστό, με $p=ns$).

Τέλος, σχετικά με την ηλικία έναρξης του νοσήματος, υπήρχαν πληροφορίες για τους 15 εκ των 18 ασθενών με μυασθένεια Gravis, που συμμετείχαν στην διεξαγωγή της παρούσας μελέτης. Η μέση ηλικία έναρξης της Gravis υπήρξε τα 51,3 έτη, με εύρος τα 20-83 έτη μεταξύ των ασθενών με MG.

6.2. Για τον EBV

Πίνακας 27: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των 18 ασθενών με MG και των 22 υγιών δειγμάτων ελέγχου HC.

Χαρακτηριστικά	MG (n=18)	HC (n=22)	$p_{MG\ vs\ HC}$
Ηλικία	62,9 ± 16,2	54,4 ± 10,9	0,066
Φύλο			ns
Άρρεν	6 (33,3%)	8 (36,4%)	
Θήλυ	12 (66,7%)	14 (63,6%)	
VCA θετικότητα	18 (100%)	22 (100%)	na
EA θετικότητα	10 (55,6%)	1 (4,5%)	<0.001
EBNA θετικότητα	18 (100%)	17 (77,3%)	0,053

18 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και 22 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα του φύλου και της θετικότητας έναντι του συνόλου των ιικών αντιγόνων έναντι του EBV ιού αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή των εκατοστιαίων ποσοστών. Τα δεδομένα της ηλικίας αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean ± standard deviation). * Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (Student's t -test, two-tailed, equal variances not assumed), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη

παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). ** Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher Exact Test). Συντομεύσεις: ns (not significant)=μη σημαντικό στατιστικά, na (not applicable)=μη υπολογίσιμο, p (p.value)=στάθμη σημαντικότητας, EBV (Epstein-Barr Virus)=Epstein-Barr ιός, MG (Myasthenia Gravis)=Μυασθένεια Gravis, HC (Healthy Controls)=Υγιείς μάρτυρες, n (number)=αριθμός ατόμων.

Πίνακας 28: Αναφορά των κλινικών χαρακτηριστικών των 18 ασθενών με μυασθένεια Gravis (MG), που αναφέρονται στον τύπο του χορηγούμενου φαρμάκου, την παρουσία ή απουσία των αντισωμάτων έναντι των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης (nAChRs) και την ηλικία έναρξης της μυασθένειας Gravis.

Χαρακτηριστικό	MG (n=18)
Τύπος φαρμάκου	Αριθμός ατόμων
Mestinon	3 (21,43%)
Prezolon	1 (7,14%)
Azathioprine and Mestinon	1 (7,14%)
Mestinon and Prezolon	6 (42,86%)
Azathioprine and Mestinon	3 (21,43%)
Σύνολο	14 (100%)
nAChR abs	Αριθμός ατόμων
Ύπαρξη αντισωμάτων έναντι nAChR	8 (72,73%)
Απουσία αντισωμάτων έναντι nAChR	3 (27,27%)
Σύνολο	11 (100%)
Ηλικία έναρξης της MG	Αριθμός ατόμων
Μέση ηλικία: 51,3 έτη Εύρος ηλικίας: 20-83 έτη	15 (100%)

Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Στατιστικά

σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομεύσεις: *n* (number of patients)=αριθμός ασθενών, *nAChR abs* (number of Achetylcholine Receptors' antibodies)=αριθμός των αντισωμάτων έναντι των υποδοχέων της Ακετυλοχολίνης.

6.2.1. Κλινικές συσχετίσεις

Τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του EBV αναλύθηκαν για πιθανές συσχετίσεις με τα κλινικά και τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά της MG. Τα κλινικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ήταν ο τύπος του φαρμάκου που χορηγήθηκε ως θεραπεία στους ασθενείς με μυασθένεια Gravis (η επιλογή έγινε μεταξύ των: Mestinon, Prezolon, Azathioprine ή τον συνδυασμό αυτών από τον κλινικό νευρολόγο ιατρό) και η ηλικία εμφάνισης του νοσήματος. Το ανοσολογικό χαρακτηριστικό αντίστοιχα ήταν η παρουσία ή η απουσία των αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (που αποτελεί τον στόχο των αυτοαντισωμάτων στην πλειοψηφία των περιπτώσεων των ασθενών με MG) στον ορό των ασθενών με MG.

6.2.2. Στατιστική ανάλυση

Όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα Υλικά-Μέθοδοι-Μέθοδοι.

6.2.3. IgG αντι-EBV αντισώματα σε MG ασθενείς

Πίνακας 29: Ερμηνεία του αποτελέσματος των IgG αντι-EBV αντισωμάτων σε ασθενείς με MG.

EBV result	MG (n=18)	HC (n=22)	Σύνολο
VCA+/EA-/EBNA-	0 (0%)	5 (22,7%)	5 (12,5%)
VCA+/EA+/EBNA-	1 (5,6%)	0 (0%)	1 (2,5%)
VCA+/EA+/EBNA+	9 (50%)	1 (4,5%)	10 (25%)
VCA-/EA-/EBNA-	1 (5,6%)	1 (4,5%)	1 (2,5%)
VCA+/EA-/EBNA+	7 (38,9%)	16 (72,7%)	23 (57,5%)
Σύνολο	18 (100%)	22 (100%)	40 (100%)

Η θετικότητα για αντισώματα έναντι των τριών κατηγοριών αντιγόνων του EBV εκτιμήθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Πίνακας 29). Από τους 18 ασθενείς με MG, ο 1 (5,6%) είχε αντισώματα θετικά για VCA και EA, 9 (50%) για VCA, EA και EBNA-1, 1 (5,6%) για κανένα από τα τρία αντιγόνα και 7 (38,9%) για VCA και EBNA-1. Τα αντι-VCA αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε 18 (100%) ασθενείς και 22 (100%) υγιείς μάρτυρες. Αντίστοιχα, τα αντι-EA

αντισώματα σε 10 (55,6%) ασθενείς και 1 (4,5%) υγιείς μάρτυρες ($p<0,001$) και τα αντι-EBNA-1 αντισώματα σε 18 (100%) ασθενείς και 17 (77,3%) υγιείς μάρτυρες ($p=0,053$).

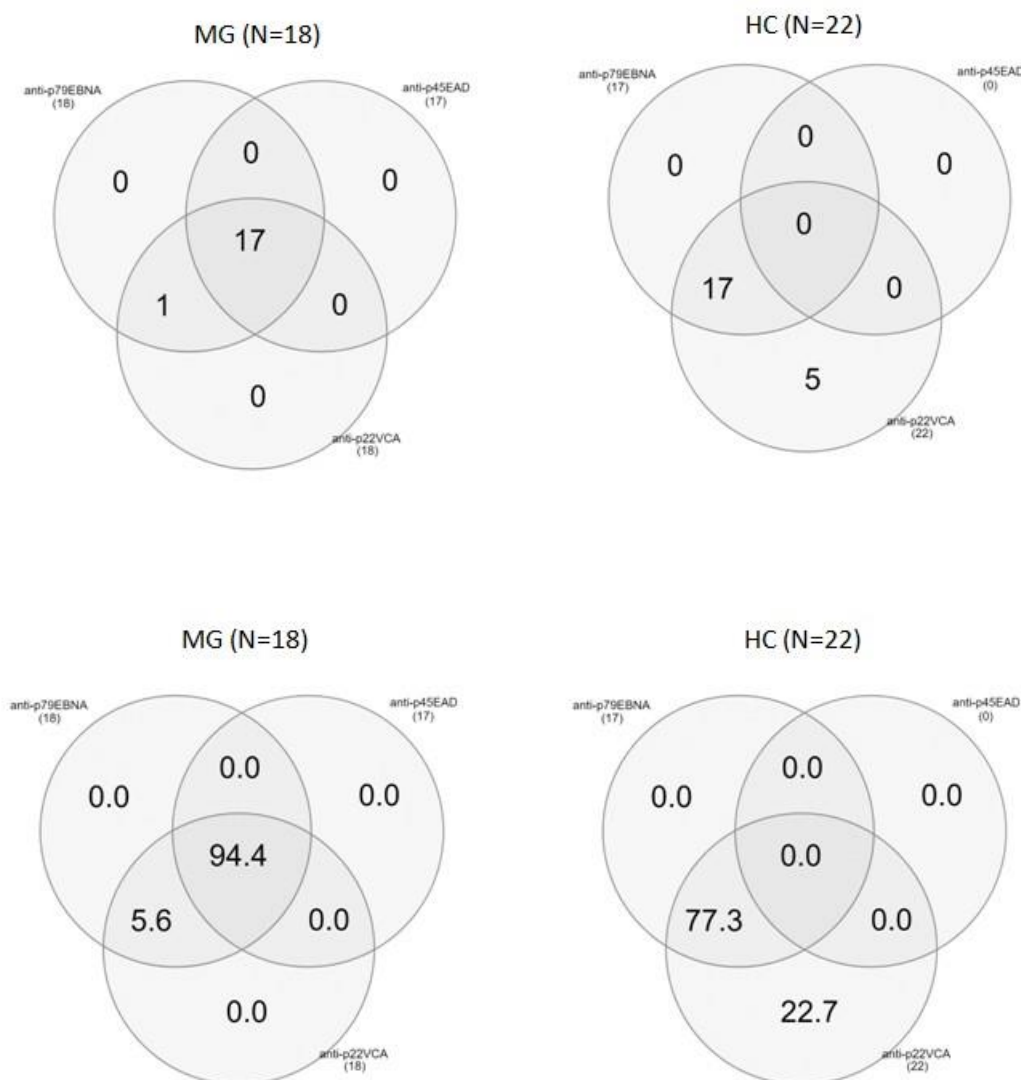
Η τριπλή θετικότητα (VCA+/EA+/EBNA+) για τις τρεις κατηγορίες αντιγόνων παρατηρήθηκε πιο συχνά στους ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG), σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (HC) (50% έναντι 4,5%, με $p=0,002$).

6.2.4. Συχνότητες IgG αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων σε ασθενείς με MG

Η θετικότητα για αντισώματα έναντι των δώδεκα αντιγόνων του EBV εκτιμήθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Πίνακες 29,30). Από τους 18 ασθενείς με MG, και οι 18 ήταν θετικοί για κάποια αντιγόνα του EBV ιού. Οι 18 ασθενείς με MG ήταν θετικοί για το αντιγόνο p79-EBNA-1 (100%, με $p=0,053$) και το p22.VCA (100%, με $p=na$), οι 17 θετικοί για το p45.EAD (94,4%, με $p<0,001$), οι 9 θετικοί για το p43.EAD (50%, με $p=0,002$), οι 8 θετικοί για το p42.VCA (44,4%, με $p=ns$), οι 5 θετικοί για το p65.VCA (27,8%, με $p=ns$), οι 2 θετικοί για το p125.VCA (11,1%, με $p=ns$), οι 10 θετικοί για το p41.VCA (55,6%, με $p=0,004$), οι 16 θετικοί για το p40.VCA (88,9%, με $p=ns$) και οι 15 θετικοί για το p33.VCA (83,3%, με $p=ns$). Για το αντιγόνο p93.EAR δεν βρέθηκε κάποιος ασθενής με MG να έχει αντισώματα ειδικά έναντι αυτού. Τέλος, για το αντιγόνο EBV.p27 έγινε η μέτρηση μόνο σε 3 εκ των 18 ασθενών με MG (100%, με $p=na$), στα οποία βρέθηκε να υπάρχει κιάλας αριθμός αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου αυτού (χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά εκχυλίσματα του ιού EBV στην επώαση με τους ορούς των ασθενών στην ανοσοαποτύπωση κατά Western).

Αντίστοιχα, για τα υγιή δείγματα ελέγχου (HC), ανιχνεύθηκαν θετικά 22 άτομα για τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του EBV ιού, εκ των οποίων όλοι (22 άτομα) ήταν θετικά για τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων p33.VCA, EBV.p27 και p22.VCA (100% ποσοστό για το κάθε ένα, με $p=ns$, na και na αντίστοιχα). Επιπλέον, για τα αντιγόνα p79-EBNA-1 και p42.VCA ανιχνεύθηκαν 17 και 16 θετικά άτομα από την ομάδα των ασθενών με MG (σε ποσοστά 77,3% και 72,7%, με $p=0,053$ και $p=ns$ αντίστοιχα). Βρέθηκαν μάλιστα 13 ασθενείς με MG να είναι θετικοί για το αντιγόνο p40.VCA (59,1, με $p=ns$), 2 θετικοί για το p41.VCA (9,1%, με $p=0,004$) και μόλις 1 θετικός για κάθε ένα από τα τρία αντιγόνα των p125.VCA, p93.EAR, p65.VCA και p43.EAD (σε ποσοστό 4,5% για το κάθε ένα, με $p=ns$ για τα τρία πρώτα και $p=0,002$ για το τελευταίο αντιγόνο αντιστοίχως). Συγκριτικά, ανάμεσα στα δώδεκα αντιγόνα του EBV, τα αντιγόνα p79-EBNA-1, p33, p22.VCA και p40.VCA παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης τόσο στην ομάδα των ασθενών με MG, όσο και στην ομάδα των υγιών μαρτύρων HC

(Εικόνα 14). Αξίζει να αναφερθεί πως η συχνότητα των p125.VCA, p79.EBNA-1, p65.VCA, p45.EAD, p43.EAD, p41.VCA, p40.VCA αντιγόνων ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς με MG, σε σύγκριση με τα υγιή δείγματα ελέγχου HC. Αντιθέτως, η συχνότητα των p93.EAR, p42.VCA και p33.VCA αντιγόνων βρέθηκε υψηλότερη στα υγιή δείγματα ελέγχου HC σε σύγκριση με τους ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG). Επίσης, για τα αντιγόνα EBV.p27 και p22.VCA οι συχνότητες ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους, αφού εμφανίζονται στο σύνολο των ασθενών με MG και των υγιών μαρτύρων HC (ποσοστό 100%, με $p=na$).



Εικόνα 14: Διαγραμματική απεικόνιση των προτύπων θετικότητας των αντι-p22.VCA, των αντι-p45.EAD και των αντι-p79.EBNA-1 αντισωμάτων με τη μορφή των διαγραμμάτων Venn.

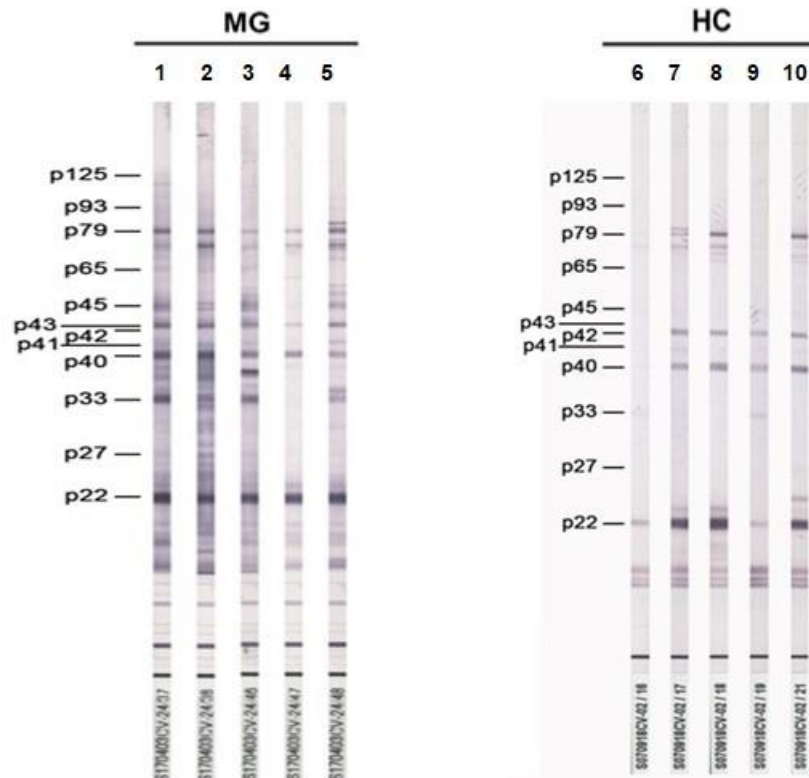
18 ασθενείς με MG, καθώς και 22 υγιείς μάρτυρες HC είναι θετικοί για τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του EBV p22.VCA, p45.EAD και p79.EBNA-1. Η πάνω εικόνα, με σειρά από αριστερά προς τα δεξιά αναφέρεται στον αριθμό των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων p22.VCA,

p45.EAD και p79.EBNA-1 των MG και HC δειγμάτων, ενώ η κάτω εικόνα, με την ίδια σειρά στο ποσοστό των αντισωμάτων αυτών για τους MG και HC επίσης.

6.2.5. Συχνότητες IgG αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων σε ασθενείς με MG

Η παρουσία αντισωμάτων έναντι χαρακτηριστικών αντιγόνων του EBV εξετάστηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot. Τα αντιγόνα αυτά ήταν τα p125.VCA, p93.EAR, p79.EBNA-1, p65.VCA, p45.EAD, p43.EAD, p42.VCA, p41.VCA, p40.VCA, p33.VCA, EBV.p27 και p22.VCA. Η εικόνα (Εικόνα 15) αποτυπώνει τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western από 10 αντιπροσωπευτικά δείγματα (5 MG και 5 HC), ενώ ο Πίνακας 30 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των αντισωμάτων σε ασθενείς και σε υγιείς μάρτυρες. Στην MG τα πιο ανοσοεπικρατή αντιγόνα ήταν τα p22.VCA (100%), p45.EAD (94,4%), p79.EBNA-1 (100%), p40.VCA (88,9%) και p33.VCA (83,3%), με τα τρία πρώτα να χρησιμοποιούνται στα γραφήματα στις εικόνες (Εικόνα 14).

Το αντίσωμα που βρέθηκε πιο συχνά σε ασθενείς με MG συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες ήταν το αντι-p45.EAD (94,4% έναντι 0%, με $p < 0,001$). Ακόμη, τα αντισώματα έναντι των p79.EBNA-1 (100% έναντι 77,3%, $p = ns$), p43.EAD (50% έναντι 4,5%, $p = ns$), p41.EAD (55,6% έναντι 9,1%, $p = 0,004$) και p40.VCA (88,9% έναντι 59,1%, $p = ns$) ήταν μεγαλύτερα στην ομάδα των ασθενών με MG σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες HC. Αντίθετα, τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων p93.EAR p42.VCA και p33.VCA υπήρξαν υψηλότερα σε συχνότητες στους υγιείς μάρτυρες, παρά στους ασθενείς με MG (ποσοστά 0% έναντι 4,5%, 44,4% έναντι 72,7% και 83,3% έναντι 100% αντίστοιχα, με $p = ns$ και στις τρεις περιπτώσεις). Οι αντιδραστικότητες έναντι των αντιγόνων EBV.p27 και p22.VCA του EBV ήταν συγκρίσιμη ανάμεσα στους ασθενείς με MG και τους υγιείς μάρτυρες HC.



Εικόνα 15: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων ανοσοαποτύπωσης κατά Western για αντισώματα έναντι αντιγόνων του EBV σε 10 αντιπροσωπευτικά δείγματα, 5 από ασθενείς με μυσσθένεια Gravis (MG) και 5 από υγιή δείγματα ελέγχου (HC).

Η εικόνα αυτή παρουσιάζει ενδεικτικά τα strips (ταινίες) των μυσσθενικών ατόμων και των υγιών μαρτύρων που έχουν επιλεγεί μεταξύ άλλων, γιατί φέρουν αντιπροσωπευτικές θετικές ζώνες σε ειδικά αντιγόνα-στόχους έναντι του Epstein-Barr (EBV) ιού. Από αριστερά προς τα δεξιά αναπαριστώνται τα 5 strips μυσσθενικών ασθενών (MG) (1-5 αριθμοί) και στην συνέχεια ακολουθούν τα 5 strips των υγιών μαρτύρων (HC) (6-10 αριθμοί), που έχουν επιλεγεί.

Πίνακας 31: Παρουσίαση των συχνοτήτων εμφάνισης των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 18 θετικούς ασθενείς και 22 θετικά υγιή δείγματα ελέγχου.

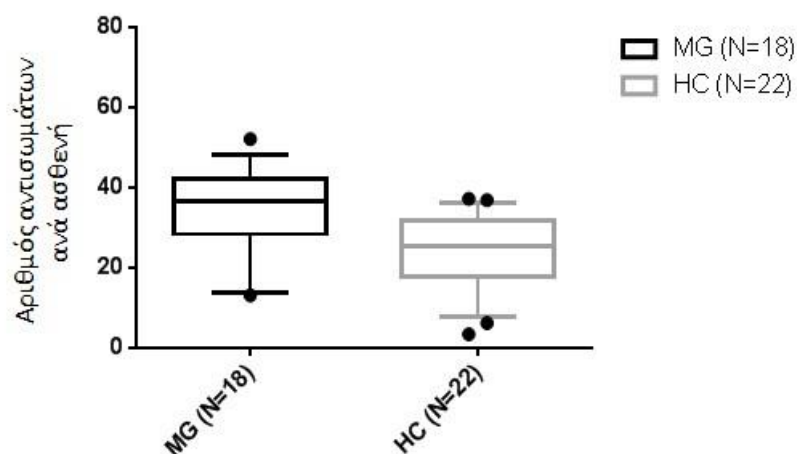
Αντιγόνο	MG (n=18)	HC (n=22)	p MG vs HC
p125.VCA	2 (11,1%)	1 (4,5%)	ns
p93.EAR	0 (0%)	1 (4,5%)	ns
p79.EBNA-1	18 (100%)	17 (77,3%)	<u>0,053</u>
p65.VCA	5 (27,8%)	1 (4,5%)	ns
p45.EAD	17 (94,4%)	0 (0%)	<0,001
p43.EAD	9 (50%)	1 (4,5%)	0,002
p42.VCA	8 (44,4%)	16 (72,7%)	ns
p41.VCA	10 (55,6%)	2 (9,1%)	0,004
p40.VCA	16 (88,9%)	13 (59,1%)	ns
p33.VCA	15 (83,3%)	13 (59,1%)	ns
EBV.p27	3 (100%)	22 (100%)	na

p22.VCA	18 (100%)	22 (100%)	na
---------	-----------	-----------	----

18 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και 22 υγιείς μάρτυρες (HC) όπως ανιχνεύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή των εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομεύσεις: n (number of people)=αριθμός ατόμων, ns (not significant)=στατιστικά μη σημαντικό, na (not applicable)=Μη υπολογίσιμο, MG (Myasthenia Gravis)=Μυασθένεια Gravis, HC (Healthy Cotrols)=Υγιείς μάρτυρες, p (p.value)=στάθμη σημαντικότητας.

Διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των ασθενών με MG και των υγιών δειγμάτων HC. Ειδικότερα, πιο συχνά στην MG ήταν τα αντι-p45.EAD (94,4% έναντι 0%, $p < 0,001$), αντι-p79-EBNA-1 (100% έναντι 77,3%, $p = 0,053$), αντι-43.EAD (50% έναντι 4,5%, $p = 0,002$) και αντι-p41 (55,6% έναντι 9,1%, $p = 0,004$). Αντίθετα, τα αντισώματα έναντι του αντιγόνου p42.VCA του EBV παρατηρήθηκαν να είναι πιο συχνά στους υγιείς μάρτυρες HC (44,4% έναντι 72,7%, $p = ns$), ενώ οι διαφορές για τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων EBV.p27 και p22.VCA (με $p = na$ και στις δύο περιπτώσεις) ήταν μη συγκρίσιμες μεταξύ των δύο ομάδων ατόμων (MG και HC).

Η ανάλυση του συνολικού αριθμού αντισωμάτων ανά ασθενή έδειξε πως οι ασθενείς με MG είχαν περισσότερες αντιδραστικότητες έναντι αντιγόνων του EBV από τους υγιείς μάρτυρες, με τη διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική ($34,5 \pm 10,8$ για MG έναντι $23,0 \pm 22,8$ για HC, με $p = 0,001$) (Εικόνα 16 και Πίνακας 32). Οι ασθενείς με MG είχαν περισσότερα αντισώματα σε αριθμό συγκριτικά με τα υγιή άτομα.



Εικόνα 16: Αποτύπωση του αριθμού αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV ανά ασθενή.

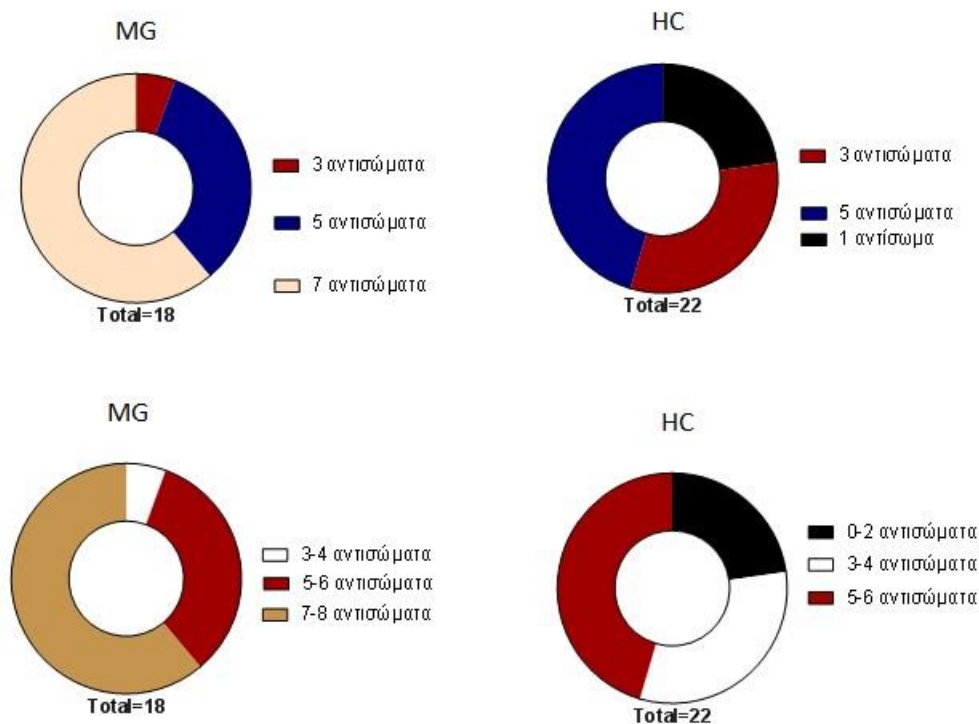
Αριθμός των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV ανά ασθενή, όπως ανιχνεύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, στον ορό των 18 θετικών για EBV ασθενών με MG και των 22 θετικών για EBV υγιών δειγμάτων ελέγχου HC. Οι γραμμές αναφέρονται στη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean $\pm$ standard deviation) * p =ns.

Πίνακας 32: Παρουσίαση του αριθμού αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV ανά ασθενή.

Συνολική θετικότητα για τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του EBV	MG (n=18)	HC (n=22)	p MG vs HC
mean $\pm$ standard deviation	34,5 $\pm$ 10,8	23 $\pm$ 22,8	p.value=0,001

Αριθμός των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV ανά ασθενή, όπως ανιχνεύθηκαν με την ανοσοαποτύπωση κατά Western, στον ορό των 18 θετικών για τον ιό ασθενών με MG και των 22 θετικών για τον ιό υγιών δειγμάτων ελέγχου HC. Τα δεδομένα αναφέρονται στη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean $\pm$ standard deviation) * p =ns. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (Student's t -test, equal variances not assumed), ενώ για την ανάλυση των ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-

Whitney (Mann-Whitney test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p=ns$) δεν παρατηρήθηκαν. Συντομογραφία: p (p.value)=στάθμη σημαντικότητας, MG (Myasthenia Gravis)=Μυασθένεια Gravis, HC (Healthy Controls)=Υγιή δείγματα ελέγχου, mean=μέση τιμή, standard deviation=τυπική απόκλιση.



Εικόνα 17: Αναπαράσταση της ύπαρξης των μεμονωμένων και των πολλαπλών αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV ιού με τη μορφή των διαγραμμάτων δακτυλίου.

Υπαρξη των μεμονωμένων και των πολλαπλών αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και σε υγιείς μάρτυρες (HC), όπως ανιχνεύθηκαν με την ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Πίνακας 33: Παρουσίαση των συχνοτήτων ύπαρξης των μεμονωμένων και των πολλαπλών αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων.

Αριθμός των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV	MG (n=18)	HC (n=22)	Σύνολο	$p_{MG \text{ vs } HC}$
0-2 αντισώματα	0 (0%)	5 (22,7%)	5 (12,5%)	p. value<0,001
3-4 αντισώματα	1 (5,6%)	7 (31,8%)	8 (20%)	
5-6	6 (33,3%)	10 (45,5%)	16 (40%)	

αντισώματα				
7-8 αντισώματα	11 (61,1%)	0 (0%)	11 (27,5%)	
Σύνολο	18 (100%)	22 (100%)	40 (100%)	

Συχνότητες παρουσίας των μεμονωμένων και των πολλαπλών αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων, σε ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG), καθώς και σε υγιή δείγματα ελέγχου (HC), όπως ανιχνεύθηκαν με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή των εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) για πίνακα 3x2. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντόμευση: ns (not significant)=μη σημαντικό στατιστικά, p ($p.value$)=στάθμη σημαντικότητας.

6.2.6. Τίτλοι IgG αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων σε ασθενείς με MG

Τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV παρουσιάζονται στον Πίνακα 34 και απεικονίζονται στην Εικόνα 18. Μεταξύ των ασθενών με MG και των υγιών μαρτύρων HC υπήρχε διαφορά στα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου p45.EAD, με υψηλότερους τίτλους αυτού στην MG και απουσία του στην ομάδα των HC (94,4% έναντι 0%, με $p < 0,001$). Ακολουθώς, για τα αντιγόνα p43.EAD και p41.VCA οι διαφορές είναι αρκετά μεγάλες μεταξύ των δύο ομάδων ατόμων MG και HC, με τους υψηλότερους τίτλους των αντισωμάτων να εμφανίζονται στους MG (50% έναντι 4,5%, με $p = 0,002$ και 55,6% έναντι 9,1%, με $p = 0,004$ αντίστοιχα). Οι τίτλοι των αντισωμάτων p79.EBNA-1, p65.VCA, p40.VCA και p33.VCA είναι εξίσου μεγαλύτεροι στους MG σε σχέση με τους HC, αλλά με πολύ μικρότερη διαφορά στις τιμές μεταξύ των δύο ομάδων των ατόμων, συγκριτικά με τη διαφορά των παραπάνω τίτλων των αντιγόνων (100% έναντι 77,3%, με $p = 0,053$, 27,8% έναντι 4,5%, με $p = ns$, 88,9% έναντι 59,1%, με $p = ns$ και 83,3% έναντι 59,1%, με $p = ns$). Μικρή διαφορά εντοπίζεται και στους τίτλους του αντιγόνου p93.EAR ανάμεσα στους MG και HC (0% έναντι 4,5%, με $p = ns$). Καμία διαφορά στους τίτλους των αντιγόνων EBV.p27 και p22.VCA δεν παρατηρείται μεταξύ των MG και HC ομάδων (100% έναντι 100%, με $p = na$ και στις δύο περιπτώσεις). Το αντίθετο σενάριο φαίνεται να ισχύει για το αντιγόνο p42.VCA, του οποίου οι τίτλοι εμφανίζονται να είναι χαμηλότεροι στους MG, σε σύγκριση με τους HC (44,4% έναντι 72,7%, με $p = ns$).

Για την καλύτερη εκτίμηση του συνολικού μεγέθους της χυμικής αντίδρασης στους ασθενείς και τους μάρτυρες, αυτοί κατατάχθηκαν σε οκτώ διακριτές κατηγορίες, σύμφωνα με την παρουσία 0-2, 3-4, 5-6 και 7-8 πολλαπλών αντισωμάτων (Πίνακες 31 και 34-37). Τα αποτελέσματα όπως αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 33, δείχνουν πως αντισώματα για 0-2 διαφορετικά αντιγόνα ανιχνεύονται λιγότερο συχνά στους ασθενείς με MG, παρά στους υγιείς μάρτυρες HC με συχνότητα 0% για τους πρώτους έναντι 22,7% για τους δεύτερους αντίστοιχα. Τα αντισώματα για την πρόσδεση 3-4 και 5-6 πολλαπλών αντισωμάτων ανιχνεύονται σε χαμηλότερες τιμές στους ασθενείς με MG και στις δύο περιπτώσεις, σε σύγκριση με τα υγιή δείγματα ελέγχου HC (5,6% έναντι 31,8% και 33,3% έναντι 45,5% κατά αντιστοιχία). Τέλος, τα αντισώματα για την σύνδεση σε 7-8 αντιγόνα ανιχνεύονται αποκλειστικά στους ασθενείς με MG (100% έναντι 0%). Τα αποτελέσματα αυτά βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικά, με την στάθμη σημαντικότητας του ελέγχου p να είναι μικρότερη του 0,001 ($p < 0,001$).

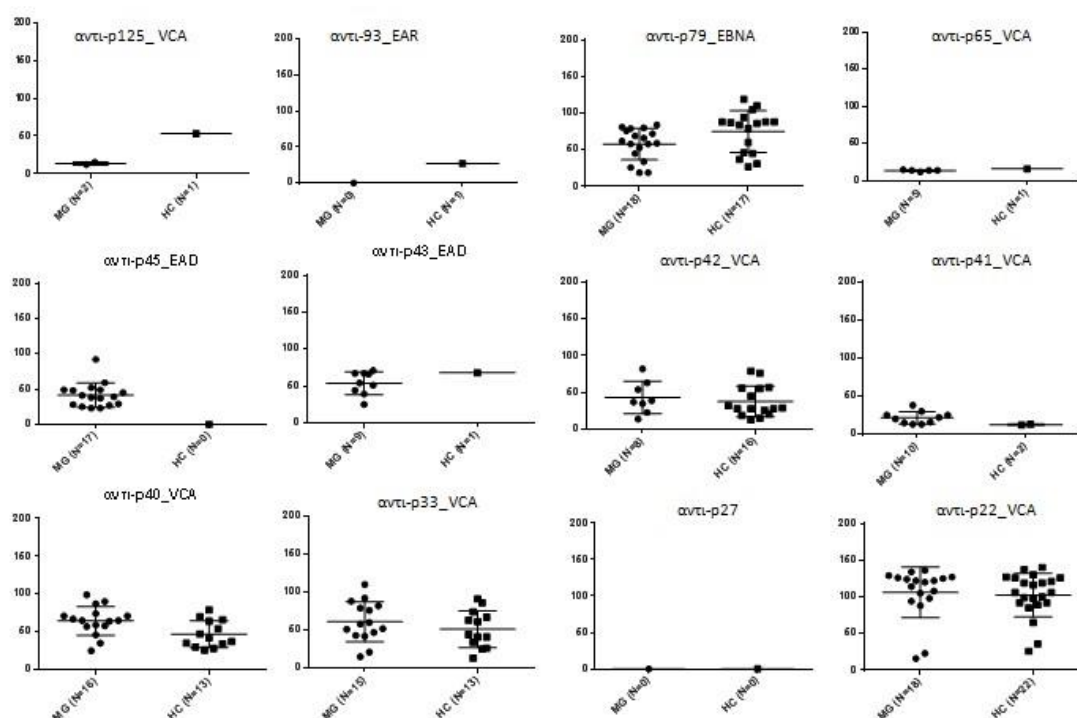
Αρκετές συσχετίσεις φάνηκαν ανάμεσα στους τίτλους διαφορετικών αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων των ασθενών με MG, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 34.

Πίνακας 34: Παράθεση των τίτλων αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV σε ασθενείς με MG και υγιή δείγματα ελέγχου με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Αντιγόνο	MG (n=18)	HC (n=22)	$p_{MG \text{ vs } HC}$
p125.VCA	13,5 ± 2,1 AU	53 AU	na
p93.EAR	-	27 AU	na
p79.EBNA-1	57,8 ± 21,3 AU	74,9 ± 28,4 AU	<u>0.053</u>
p65.VCA	13,8 ± 1,1 AU	16 AU	na
p45.EAD	41,4 ± 17,1 AU	-	na
p43.EAD	53,8 ± 15,6 AU	68 AU	na
p42.VCA	43,4 ± 22 AU	37,9 ± 20,8 AU	ns
p41.VCA	21,7 ± 8,1 AU	12,5 ± 0,7 AU	0,006
p40.VCA	64,6 ± 19 AU	47,1 ± 17,8 AU	0,017
p33.VCA	61,1 ± 26,6 AU	51,2 ± 24,4 AU	ns
EBV.p27	-	-	na
p22.VCA	106,2 ± 34,3 AU	102,5 ± 29,7 AU	ns

18 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και 22 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean ± standard deviation). Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (Student's t -test, two-tailed equal variances not assumed), ενώ για η ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομεύσεις: MG (Myasthenia Gravis)=Μυασθένεια Gravis, HC

(Healthy Controls)=Υγιή δείγματα ελέγχου, ns (Not Significant)=μη σημαντικό στατιστικά, n (number of people)=αριθμός των ατόμων, na (not applicable)=μη υπολογίσιμο, p (p.value)=στάθμη σημαντικότητας.



Εικόνα 18: Γραφική αναπράσταση των τίτλων των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV με ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot με τη μορφή των διαγραμμάτων διασποράς.

18 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και 22 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Οι γραμμές αναπαριστούν τη διάμεσο τιμή με το εύρος.

Πίνακες 35-38: Αναπαριστούν τις συχνότητες της παρουσίας των 0-2, 3-4 και 5-6 πολλαπλών αντισωμάτων και την κατηγοριοποίηση με βάση τον ελάχιστο αριθμό των αντισωμάτων που ανιχνεύονται κάθε φορά στον ορό των ασθενών με MG έναντι των αντιγόνων του EBV.

Τουλάχιστον 1 αντίσωμα	MG (n=18)	HC (n=22)	Σύνολο	p MG vs HC
Ναι	18 (100%)	22 (100%)	40 (100%)	p=na
Όχι	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Σύνολο	18 (100%)	23 (100%)	40 (100%)	

Τουλάχιστον 3 αντισώματα	MG (n=18)	HC (n=22)	Σύνολο	p MG vs HC
Ναι	18 (100%)	17 (77,3%)	35 (87,5%)	p=0,053
Όχι	0 (0%)	5 (22,7%)	5 (12,5%)	
Σύνολο	18 (100%)	22 (100%)	40 (100%)	

Τουλάχιστον 5 αντισώματα	MG (n=18)	HC (n=22)	Σύνολο	<i>p</i> MG vs HC
Ναι	17 (94,4%)	10 (45,5%)	26 (65%)	p=0,003
Όχι	1 (5,6%)	12 (54,5%)	14 (35%)	
Σύνολο	18 (100%)	22 (100%)	40 (100%)	

Τουλάχιστον 7 αντισώματα	MG (n=18)	HC (n=22)	Σύνολο	<i>p</i> MG vs HC
Ναι	11 (61,1%)	0 (0%)	11 (27,5%)	p<0,001
Όχι	7 (38,9%)	22 (100%)	29 (72,5%)	
Σύνολο	18 (100%)	22 (100%)	40 (100%)	

18 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και 22 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean ± standard deviation). Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία *t* του Student (Student's *t*-test, two-tailed equal variances not assumed), ενώ για η ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομεύσεις: MG (Myasthenia Gravis)=Μυασθένεια Gravis, HC (Healthy Controls)=Υγιή δείγματα ελέγχου, ns (not significant)=μη σημαντικό στατιστικά, , na (not applicable)=μη υπολογίσιμο, *n* (number of people)=αριθμός των ατόμων, *p* (*p*.value)=στάθμη σημαντικότητας.

Πίνακας 39: Αναφορά στις συσχετίσεις ανάμεσα στους τίτλους των αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV αναμεταξύ στους 18 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG), που είναι θετικά για τα αντιγόνα του EBV ιού.

		p125. VCA_ positi vity	p93.E AR_p ositivi ty	p79.E BNA_ positiv ity	p65.V CA_p ositivi ty	p45.E AD_p ositivi ty	p43.E AD_p ositivi ty	p42.V CA_p ositivi ty	p41.V CA_p ositivi ty	p40.V CA_p ositivi ty	p33.V CA_p ositivi ty	EBV. p27_p ositivi ty	p22.V CA_p ositivi ty
p125. VCA_ positiv ity	Pear son Corr elatio n Sig (2- taile d)	1	0,253	-0,042	0,202	0,083	-0,253	0,155	-0,332	-0,443	-0,269	.a	-0,288
			0,311	0,867	0,422	0,743	0,311	0,540	0,178	0,066	0,280		0,247
p93.E	Pear		1	-0,267	-0,308	-0,131	-0,128	0,016	-0,179	-0,725	-0,461	.a	-0,734

AR_p ositivit y	son Corr elatio n Sig (2- taile d)			0,283	0,214	0,603	0,614	0,951	0,476	0,001	0,054		0,001
p79.E BNA_ positiv ity	Pear son Corr elatio n Sig (2- taile d)			1	0,133	0,272	0,188	0,288	-0,134	0,554	0,658	.a	0,422
					0,598	0,275	0,455	0,247	0,597	0,017	0,003		0,081
p65.V CA_p ositivit y	Pear son Corr elatio n Sig (2- taile d)				1	0,273	0,411	-0,117	0,049	0,326	0,397	.a	0,295
						0,274	0,090	0,645	0,846	0,187	0,103		0,235
p45.E AD_p ositivit y	Pear son Corr elatio n Sig (2- taile d)					1	-0,267	0,350	0,431	0	0,414	.a	0,238
							0,284	0,155	0,074	0,999	0,088		0,341
p43.E AD_p ositivit y	Pear son Corr elatio n Sig (2- taile d)						1	-0,752	-0,194	0,430	0,296	.a	0,417
								0	0,441	0,075	0,234		0,085
p42.V CA_p ositivit	Pear son Corr							1	0,355	0,058	0,180	.a	-0,230

y	elation n Sig (2- taile d)								0,148	0,820	0,475		0,358
p41.V CA_p ositivit y	Pear son Corr elatio n Sig (2- taile d)								1	0,251 0,315	0,156 0,536	.a	-0,490 0,847
p40.V CA_p ositivit y	Pear son Corr elatio n Sig (2- taile d)									1 0,001	0,715 0,001	.a	0,641 0,004
p33.V CA_p ositivit y	Pear son Corr elatio n Sig (2- taile d)										1	.a	0,310 0,261
EBV.p 27 positiv ity	Pera son Corr elatio n Sig (2- taile d)											1	a.
p22.V CA_p ositivit y	Pear son Corr elatio n Sig												1

	(2-tailed)													
--	------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Τα δεδομένα αναπαριστούν το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson (R). Το p είναι η τιμή p (2 tailed) της συσχέτισης. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομεύσεις: EBV (Epstein-Barr Virus)= Epstein-Barr ιός, a: na (not applicable)=μη υπολογίσιμο, sig/p (p.value)=στάθμη σημαντικότητας.

Πίνακας 40: Παράθεση των συσχετίσεων μεταξύ των αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του ιού EBV και των κλινικοεργαστηριακών παραμέτρων των ασθενών με MG, όπως αυτές μετρήθηκαν.

		Ηλικία έναρξης του νοσήματος	nAChR	Τύπος φαρμάκου	p125.VCA	p93.EAR	p79.VCA	p65.VCA	p45.EAD	p43.EAD	p42.VCA	p41.VCA	p40.VCA	p33.VCA	EBV.p27	p22.VCA
Ηλικία έναρξης του νοσήματος	Pearson Correlation Sig (2-tailed)	1	0,853 0,001	-0,649 0,012	0,038 0,894	-0,149 0,597	0,390 0,151	0,147 0,601	-0,461 0,084	0,253 0,364	0,076 0,787	-0,372 0,173	0,310 0,261	0,147 0,602	a.	0,137 0,627
nAChR	Pearson Correlation Sig (2-tailed)		1	-0,898 0	-0,374 0,258	-0,194 0,568	0,434 0,182	0,185 0,586	-0,348 0,294	0,522 0,100	-0,173 0,611	-0,357 0,282	0,406 0,215	0,297 0,375	a.	0,089 0,795
Τύπος φαρμάκου	Pearson Correlation Sig (2-tailed)			1	-0,116 0,693	0 1	-0,124 0,673	-0,110 0,707	0,351 0,218	-0,453 0,104	0,325 0,257	0,376 0,185	0,012 0,968	0,034 0,909	a.	-0,065 0,827

Τα δεδομένα αναπαριστούν το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson (R). Το p είναι η τιμή p (2 tailed) της συσχέτισης. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομεύσεις: EBV (Epstein-Barr Virus)= Epstein-Barr ιός, a: na (not applicable)=μη υπολογίσιμο, sig/p (p.value)=στάθμη σημαντικότητας.

6.2.7. Συσχετίσεις των αντιγονοειδικών EBV ανοσολογικών αποκρίσεων

Διερευνήθηκαν οι συσχετίσεις ανάμεσα στις αντιγονοειδικές EBV ανοσοαποκρίσεις και σε κλινικά χαρακτηριστικά της MG (Πίνακες 28 και 40), συμπεριλαμβάνοντας τον τύπο των φαρμάκων που χορηγήθηκε σε κάθε ασθενή με MG ως θεραπεία, καθώς και τον τύπο των αντισωμάτων και ειδικότερα αυτού έναντι του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (που αποτελεί και την πλειοψηφία των περιπτώσεων των ασθενών με MG), που ανιχνεύθηκε στον ορό των ασθενών με MG.

Ανάμεσα στους 18 ασθενείς με MG, οι 6 είχαν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV και συγχρόνως είχαν λάβει θεραπεία με Mestinon και Prezolon σε ποσοστό της τάξης του 42,86%. Τα αμέσως επόμενα σε ποσοστό αφορούσαν τη χορήγηση των φαρμακευτικών σκευασμάτων Mestinon και συνδυασμός Mestinon με Azathioprine (σε ποσοστό ίσο με 21,43% και στις δύο περιπτώσεις αντίστοιχα), με στάθμη σημαντικότητας p ίση με ns. Τέλος, για τη χορήγηση των Prezolon και Azathioprine με Mestinon (σε ποσοστό ίσο με 7,14% και στις δύο περιπτώσεις κατά αναλογία) βρέθηκαν λιγότεροι σε αριθμό ασθενείς με MG, με μόλις 1 άτομο για κάθε μια περίπτωση να έχει λάβει την αντίστοιχη θεραπεία (σε όλες τις αναλύσεις η στάθμη σημαντικότητας ήταν ίση με $p=ns$).

Όσον αφορά τον τύπο των αντισωμάτων που ανιχνεύθηκαν έναντι του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης αποκλειστικά, φαίνεται πως 8 εκ των 18 ατόμων (στους υπόλοιπους ασθενείς απουσίαζαν οι κλινικές πληροφορίες σχετικά με τον τύπο των αντισωμάτων που είναι ειδικά για τον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης) ήταν θετικοί για αντισώματα έναντι του AChR (44,4% ποσοστό, με $p=ns$).

Τέλος, σχετικά με την ηλικία έναρξης του νοσήματος, υπήρχαν πληροφορίες για τους 15 εκ των 18 ασθενών με μυασθένεια Gravis, που συμμετείχαν στην διεξαγωγή της παρούσας μελέτης. Η μέση ηλικία έναρξης της Gravis υπήρξε τα 51,3 έτη, με εύρος τα 20-83 έτη μεταξύ των ασθενών με MG.

6.3. Για το HP

Πίνακας 41: Παρουσίαση των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των 18 ασθενών με MG και των 49 υγιών δειγμάτων ελέγχου HC.

Χαρακτηριστικό	MG (n=18)	HC (n=49)	$p_{MG \text{ vs } HC}$
Ηλικία	62,9 ± 16,2	55,4 ± 9,3	0,074
Φύλο			
Άρρεν	6 (33,3%)	22 (44,9%)	Ns
Θήλυ	12 (66,7%)	27 (55,1%)	
HP οροθετικότητα	12 (66,7%)	41 (83,7%)	Ns

18 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και 49 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα του φύλου και της θετικότητας έναντι του συνόλου των ιικών αντιγόνων έναντι του HP βακτηρίου αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή των εκατοστιαίων ποσοστών. Τα δεδομένα της ηλικίας αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean ± standard deviation). * Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student

(Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). ** Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher Exact Test). Συντομεύσεις: ns= not significant (μη σημαντικό), p = p .value, HP (*Helicobacter pylori*)=Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού, MG (*Myasthenia Gravis*)=Μυασθένεια Gravis, HC (Healthy Controls)=Υγιή δείγματα ελέγχου, n (number)=αριθμός ατόμων.

Πίνακας 42: Αναφορά στα κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά των 18 ασθενών με μυασθένεια Gravis (MG), που αναφέρονται στον τύπο του χορηγούμενου φαρμάκου, την παρουσία ή απουσία των αντισωμάτων έναντι των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης (nAChRs) και την ηλικία έναρξης της μυασθένειας Gravis.

Χαρακτηριστικό	MG (n=18)
Τύπος φαρμάκου	Αριθμός ατόμων
Mestinon	3 (21,43%)
Prezolon	1 (7,14%)
Azathioprine and Mestinon	1 (7,14%)
Mestinon and Prezolon	6 (42,86%)
Azathioprine and Mestinon	3 (21,43%)
Σύνολο	14 (100%)
nAChR abs	Αριθμός ατόμων
Ύπαρξη αντισωμάτων έναντι nAChR	8 (72,73%)
Απουσία αντισωμάτων έναντι nAChR	3 (27,27%)
Σύνολο	11 (100%)
Ηλικία έναρξης της MG	Αριθμός ατόμων
Μέση ηλικία: 51,3 έτη	15 (100%)
Εύρος ηλικίας: 20-83 έτη	

Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού

μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομεύσεις: n (number of patients)=αριθμός ασθενών, $nAChR$ abs (number of Achetylcholine Receptors' antibodies)=αριθμός των αντισωμάτων έναντι των υποδοχέων της Ακετυλοχολίνης.

6.3.1. Κλινικές συσχετίσεις

Τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του *HP* αναλύθηκαν για πιθανές συσχετίσεις με τα κλινικά και τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά της MG. Τα κλινικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ήταν ο τύπος του φαρμάκου που χορηγήθηκε ως θεραπεία στους ασθενείς με μυασθένεια Gravis (η επιλογή έγινε μεταξύ των: Mestinon, Prezolon, Azathioprine ή τον συνδυασμό αυτών από τον κλινικό νευρολόγο ιατρό) και η ηλικία εμφάνισης του νοσήματος. Το ανοσολογικό χαρακτηριστικό αντίστοιχα ήταν η παρουσία ή η απουσία των αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (που αποτελεί τον στόχο των αυτοαντισωμάτων στην πλειοψηφία των περιπτώσεων των ασθενών με MG) στον ορό των ασθενών με MG.

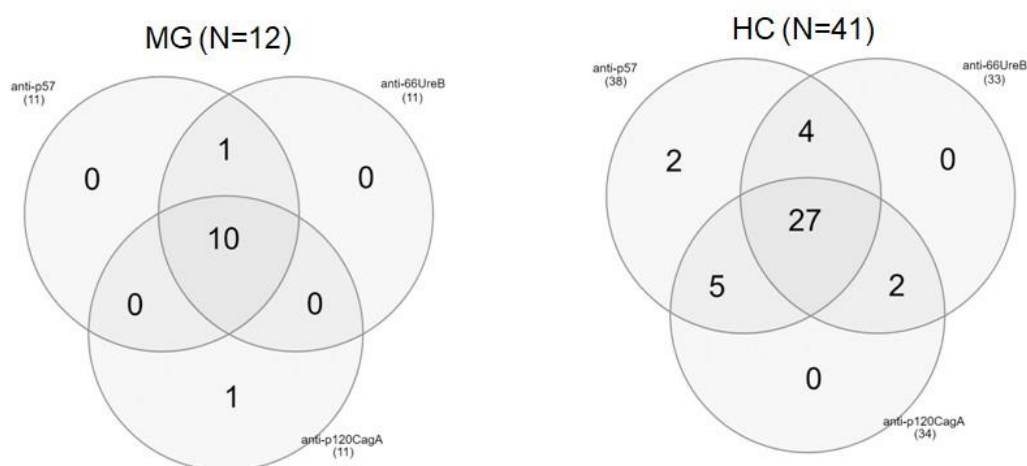
6.3.2. Στατιστική ανάλυση

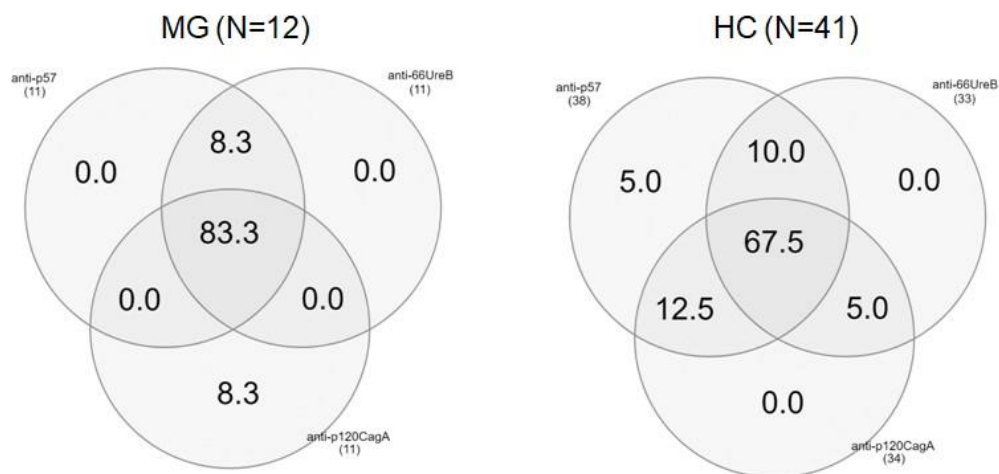
Όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα Υλικά-Μέθοδοι-Μέθοδοι.

6.3.3. IgG αντι-HP αντισώματα σε ασθενείς με MG

Η θετικότητα για αντισώματα έναντι των δεκαπέντε αντιγόνων του *HP* εκτιμήθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Πίνακας 43). Από τους 18 ασθενείς με MG, οι 12 ήταν θετικοί για τα αντιγόνα του *HP* βακτηρίου. Ανάμεσα στους 12 θετικούς ασθενείς με MG, οι 11 ήταν θετικοί για το αντιγόνο p120-CagA (91,7% με $p=ns$), οι 11 για το p55-UreB (91,7%, με $p=ns$) και άλλοι 11 για το p57 (91,7%, με $p=ns$). Ακόμη, από τους 12 θετικούς ασθενείς με MG, οι 8 βρέθηκαν θετικοί για το αντιγόνο p67-FSH (66,7%, με $p=ns$), οι 5 για το p50 (41,7%, με $p=ns$), οι 5 για τα p26 (41,7%, με $p=ns$) και άλλοι 5 για το p19-OMP (41,7%, με $p=ns$). Ακολούθως, βρέθηκαν 4 θετικοί ασθενείς με MG για το αντιγόνο p54-flagelin (33,3%, με $p=ns$), 3 για το p29-OMP (25%, με $p=ns$) και οι 3 για το p17 (25%, με $p=ns$). Ακολούθως, υπήρχαν 2 θετικοί ασθενείς με MG για το p41 (16,7%, με $p=ns$), 1 θετικός για το p95-CagA (8,3%, με $p=ns$), 1 για το p33 (8,3%, με $p=ns$) και 1 για το p30-OMP (8,3%, με $p=ns$). Όσον αφορά την ομάδα των

υγιών δειγμάτων ελέγχου HC, ανιχνεύθηκαν 39 θετικά άτομα για το αντιγόνο p57 (95,1%, με $p=ns$), 34 θετικά για το p120-CagA (82,9%, με $p=ns$), 33 θετικά για το p66-UreB (80,6%, με $p=ns$), 27 θετικά για το p67-FSH (65,9%, με $p=ns$), οι 26 θετικοί για το p50 (63,4%, με $p=ns$), οι 23 για το p29-OMP (56,1%, με $p=ns$), οι 23 για το p26 (56,1%, με $p=ns$), οι 16 για το p41 (39%, με $p=ns$), οι 15 για το p54-flagelin (36,6%, με $p=ns$), οι 11 για το p17 (26,8%, με $p=ns$), οι 10 για το p19-OMP (24,4%, με $p=ns$), οι 9 για το p33 (22%, με $p=ns$), οι 8 για το p30-OMP (56,1%, με $p=ns$), οι 5 για το p95-VacA (12,2%, με $p=ns$) και οι 4 για το p75 (9,8%, με $p=ns$). Μάλιστα, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως το τελευταίο αντιγόνο, το p75 ανιχνεύθηκε αποκλειστικά στην ομάδα των υγιών μαρτύρων. Επίσης, από τα αποτελέσματα των αντιδραστικότητων για τις δύο ομάδες ατόμων, φάνηκε πως η συχνότητα των αντιγόνων p120-CagA, p66-UreB και p19-OMP είναι υψηλότερη στους ασθενείς με MG, σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Αντίθετα, η συχνότητα των αντιγόνων p95-VacA, p75, p57, p54-flagelin, p50, p41, p33, p30-OMP, p26 και p17 βρέθηκε να είναι μικρότερη στην ομάδα των υγιών μαρτύρων HC, σε σύγκριση με αυτή των ασθενών με MG. Επιπρόσθετα, η συχνότητα των αντιγόνων p76-FSH και p17 υπήρξε μη συγκρίσιμη μεταξύ των ομάδων των MG και HC ατόμων (Εικόνα 19 και Πίνακας 43).





Εικόνα 19: Διαγράμματα Venn των προτύπων θετικότητας των αντι-HP αντισωμάτων και συγκεκριμένα των αντι-p120-CagA, -p66-UreB και -p57.

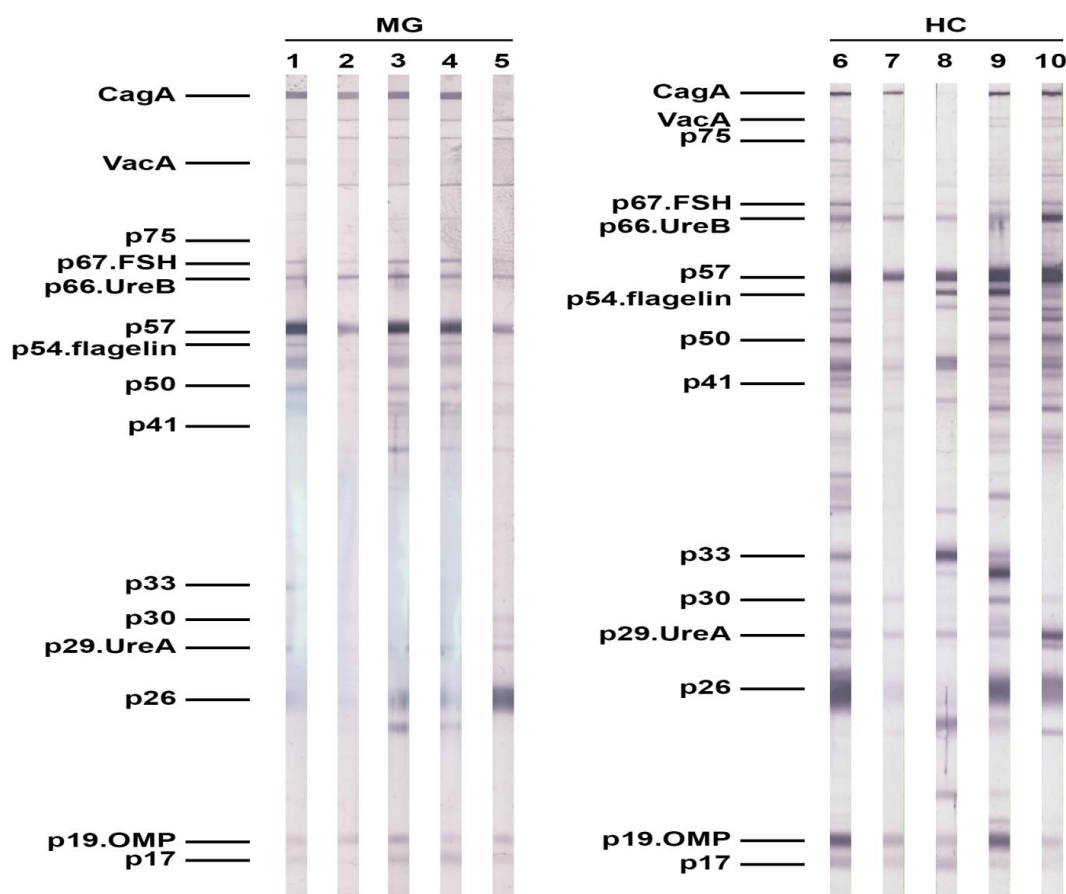
12 εκ των 18 ασθενών με MG είναι θετικοί για τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του HP p57, p66-UreB και p120-CagA, καθώς και 41 εκ των 49 υγιών δειγμάτων ελέγχου HC. Η πάνω εικόνα, με σειρά από αριστερά προς τα δεξιά αναφέρεται στον αριθμό των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων p57, p66-UreB και p120-CagA των MG και HC δειγμάτων, ενώ η κάτω εικόνα, με την ίδια σειρά στο ποσοστό των αντισωμάτων αυτών για τους MG και HC επίσης.

6.3.4. Συχνότητες IgG αντιγονοειδικών HP αντισωμάτων σε ασθενείς με MG

Η παρουσία αντισωμάτων έναντι χαρακτηριστικών αντιγόνων του HP εξετάστηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντιγόνα αυτά ήταν τα p120-CagA, p95-VacA, p75, p67-FSH, p66-UreB, p57, p54-flagelin, p50, p41, p33, p30-OMP, p29-OMP, p26, p19-OMP και p17. Η εικόνα (Εικόνα 20) αποτυπώνει τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western από 10 αντιπροσωπευτικά δείγματα (5 MG και 5 HC), ενώ ο Πίνακας 43 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των αντισωμάτων σε ασθενείς και σε υγιείς μάρτυρες. Στην MG τα πιο ανοσοεπικρατή αντιγόνα ήταν τα p120-CagA (91,7%, με p=ns), p66-UreB (91,7%, με p=ns) και p57 (91,7%, με p=ns).

Τα αντισώματα που βρέθηκαν πιο συχνά στους ασθενείς με MG συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες ήταν τα p120-CagA (91,7% έναντι 82,9%, με p=ns) και p66-UreB (91,7% έναντι 80,6%, με p=ns). Επιπλέον, τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων p95-VacA (8,3% έναντι 12,2%, με p=ns), p75 (0% έναντι 9,8%, με p=ns), p50 (41,7% έναντι 63,4%, με p=ns), p41

(16,7% έναντι 39%, με $p=ns$), p33 (8,3% έναντι 22%, με $p=ns$), p30-OMP (8,3% έναντι 19,5%, με $p=ns$), p29-OMP (25% έναντι 56,1%, με $p=ns$) και p26 (41,7% έναντι 24,4%, με $p=ns$). Η αντιδραστικότητα έναντι των p67-FSH (66,7% έναντι 65,9%, με $p=ns$), p54-flagelin (33,3% έναντι 36,6%, με $p=ns$) και p17 (25% έναντι 26,8%, με $p=ns$) υπήρξε μη συγκρίσιμη μεταξύ των ασθενών με MG και των υγιών μαρτύρων HC.



Εικόνα 20: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων ανοσοαποτύπωσης κατά Western για αντισώματα έναντι αντιγόνων του *HP* σε 10 αντιπροσωπευτικά δείγματα, 5 από ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και 5 από υγιή δείγματα ελέγχου (HC).

Η εικόνα αυτή παρουσιάζει ενδεικτικά τα strips (ταινίες) των μυασθενικών ατόμων και των υγιών μαρτύρων που έχουν επιλεγεί μεταξύ άλλων, γιατί φέρουν αντιπροσωπευτικές θετικές ζώνες σε ειδικά αντιγόνα-στόχους έναντι του *HP* βακτηρίου. Από αριστερά προς τα δεξιά αναπαριστώνται τα 5 strips μυασθενικών ασθενών (MG) (1-5 αριθμοί) και στην συνέχεια ακολουθούν τα 5 strips των υγιών μαρτύρων (HC) (6-10 αριθμοί), που έχουν επιλεγεί.

Πίνακας 43: Αναφορά στις συχνότητες εμφάνισης των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του *HP* σε 12 θετικούς ασθενείς και 41 θετικά υγιή δείγματα ελέγχου.

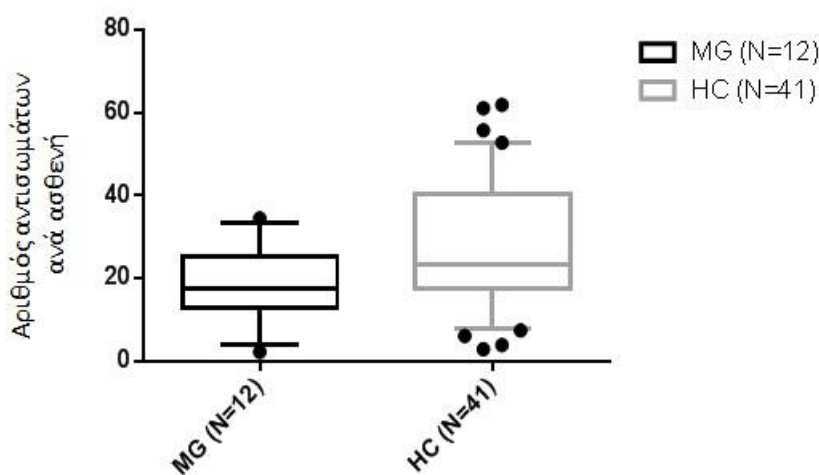
Αντιγόνο	MG (n=12)	HC (n=41)	p MG vs HC
p120-CagA	11 (91,7%)	34 (82,9%)	ns
p95-VacA	1 (8,3%)	5 (12,2%)	ns
p75	0 (0%)	4 (9,8%)	ns
p67-FSH	8 (66,7%)	27 (65,9%)	ns
p66-UreB	11 (91,7%)	33 (80,6%)	ns
p57	11 (91,7%)	39 (95,1%)	ns
p54-flagelin	4 (33,3%)	15 (36,6%)	ns
p50	5 (41,7%)	26 (63,4%)	ns
p41	2 (16,7%)	16 (39%)	ns
p33	1 (8,3%)	9 (22%)	ns
p30-OMP	1 (8,3%)	8 (19,5%)	ns
p29-UreA	3 (25%)	23 (56,1%)	ns
p26	5 (41,7%)	23 (56,1%)	ns
p19-OMP	5 (41,7%)	10 (24,4%)	ns
p17	3 (25%)	11 (26,8%)	ns

12 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και 41 υγιείς μάρτυρες (HC) όπως ανιχνεύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή των εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομεύσεις: n=number of people (αριθμός ατόμων), ns (not significant)= στατιστικά μη σημαντικό, na (not applicable)= μη διαθέσιμο στατιστικά, MG (Myasthenia Gravis)= Μυασθένεια Gravis, HC (Healthy Controls)= υγιείς μάρτυρες, p (p.value)= στάθμη σημαντικότητας.

Διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των ασθενών με MG και των υγιών δειγμάτων HC. Ειδικότερα, πιο συχνά στην MG ήταν τα αντι-p120-CagA (91,7% έναντι 82,9%, με $p=ns$), αντι-p66-UreB (91,7% έναντι 80,6%, με $p=ns$), αντι-p57 (91,7% έναντι 95,1%, με $p=ns$) και p19-OMP (41,7% έναντι 24,4%, με $p=ns$). Αντίθετα, τα αντισώματα έναντι του αντιγόνου p75 του HP παρατηρήθηκαν να είναι λιγότερο συχνά στους ασθενείς με MG, παρά στους υγιείς μάρτυρες HC (0% έναντι 9,8%, με $p=ns$). Ομοίως, για τα αντιγόνα p95-VacA (8,3% έναντι 12,2%, με $p=ns$), p50 (41,7% έναντι 63,4%, με $p=ns$), p41 (16,7% έναντι 39%, με $p=ns$), p33 (8,3% έναντι 22%, με $p=ns$), p30-OMP (8,3% έναντι 19,5%, με $p=ns$), p29-OMP (25% έναντι 56,1%, με $p=ns$) και p26 (41,7% έναντι 56,1%, με $p=ns$). Σχετικά με τις αντιδραστικότητες στα υπόλοιπα αντιγόνα, τα p67-FSH (66,7% έναντι 65,9%, με $p=ns$), p57 (91,7% έναντι 95,1%, με

p=ns), p54-flagelin (33,3% έναντι 36,6%, με p=ns) και p17 (25% έναντι 26,8% με p=ns), εμφανίζονται συγκρίσιμα όμοια σε συχνότητα μεταξύ των ασθενών με MG και των υγιών δειγμάτων ελέγχου HC.

Η ανάλυση του συνολικού αριθμού αντισωμάτων ανά ασθενή έδειξε πως οι ασθενείς με MG είχαν λιγότερες αντιδραστικότητες έναντι αντιγόνων του *HP* από τους υγιείς μάρτυρες HC, με τη διαφορά με τους δεύτερους να είναι στατιστικά σημαντικές ($18,4 \pm 9,3$ για MG έναντι $27,6 \pm 15,9$ για HC, με $p=0,018$) (Εικόνα 21 και Πίνακας 44). Οι ασθενείς με MG είχαν λιγότερα αντισώματα συγκριτικά με τα υγιή άτομα HC.



Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση του αριθμού αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του *HP* ανά ασθενή.

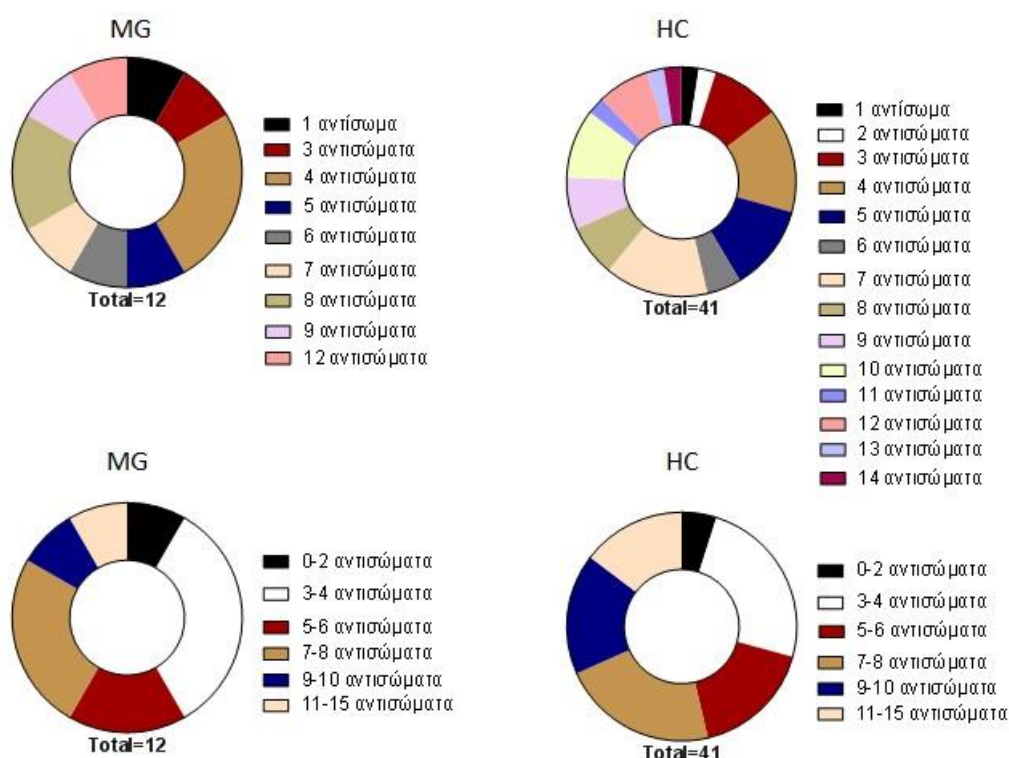
*Αριθμός των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HP ανά ασθενή, όπως ανιχνεύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, στον ορό των 12 θετικών για HCMV ασθενών με MG και των 41 θετικών για HCMV υγιών δειγμάτων ελέγχου HC. Οι γραμμές αναφέρονται στη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean $\pm$ standard deviation) * $p=0,018$.*

Πίνακας 44: Περιγραφή του αριθμού αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του *HP* ανά ασθενή.

Συνολική θετικότητα για τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του <i>HP</i>	MG (n=12)	HC (n=41)	<i>p</i> MG vs HC

mean $\pm$ standard deviation	18,4 $\pm$ 9,3	27,6 $\pm$ 15,9	p.value=0,018
-------------------------------	----------------	-----------------	---------------

Αριθμός των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HP ανά ασθενή, όπως ανιχνεύθηκαν με την ανοσοαποτύπωση κατά Western, στον ορό των 12 θετικών για το βακτήριο ασθενών με MG και των 41 θετικών για τον βακτήριο υγιών δειγμάτων ελέγχου HC. Τα δεδομένα αναφέρονται στη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean $\pm$ standard deviation) *p=NS. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (Student's t-test, equal variances not assumed), ενώ για την ανάλυση των ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές (p=ns) δεν παρατηρήθηκαν. Συντομογραφία: ns (not significant)=μη σημαντικό στατιστικά, MG (Myasthenia Gravis)=Μυασθένεια Gravis, HC (Healthy Controls)=Υγιή δείγματα ελέγχου, Mean=μέση τιμή, Standard deviation=τυπική απόκλιση.



Εικόνα 22: Γραφική αναπαράσταση της ύπαρξης των μεμονωμένων και των πολλαπλών αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HP βακτηρίου με τη μορφή των διαγραμμάτων δακτυλίου.

Υπαρξη των μεμονωμένων και των πολλαπλών αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HP σε ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και σε υγιείς μάρτυρες (HC), όπως ανιχνεύθηκαν με την ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Πίνακας 45: Αναφορά στις συχνότητες ύπαρξης των μεμονωμένων και των πολλαπλών αντιγονοειδικών *HP* αντισωμάτων.

Αριθμός των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του <i>HP</i>	MG (n=12)	HC (n=41)	Σύνολο	<i>p</i> MG vs HC
1	1 (8,3%)	1 (2,4%)	2 (3,8%)	p. value=ns
2	0 (0%)	1 (2,4%)	1 (1,9%)	
3	1 (8,3%)	4 (9,8%)	5 (9,4%)	
4	3 (25%)	6 (14,6%)	9 (17%)	
5	1 (8,3%)	5 (12,2%)	6 (11,3%)	
6	1 (8,3%)	2 (4,9%)	2 (3,8%)	
7	1 (8,3%)	6 (14,6%)	7 (13,2%)	
8	2 (16,7%)	3 (7,3%)	5 (9,4%)	
9	1 (8,3%)	3 (7,3%)	4 (7,5%)	
10	0 (0%)	4 (9,8%)	4 (7,5%)	
11	0 (0%)	1 (2,4%)	1 (1,9%)	
12	1 (8,3%)	3 (7,3%)	5 (9,4%)	
13	0 (0%)	1 (2,4%)	-	
14	0 (0%)	1 (2,4%)	1 (1,9%)	
Σύνολο	12 (100%)	41 (100%)	53 (100%)	

Συχνότητες παρουσίας των μεμονωμένων και των πολλαπλών αντιγονοειδικών αντισωμάτων του *HP*, σε ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG), καθώς και σε υγιή δείγματα ελέγχου (HC), όπως ανιχνεύθηκαν με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή των εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) για πίνακα 3x2. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντόμευση: ns (not significant)=μη σημαντικό στατιστικά, *p* (*p.value*)=στάθμη σημαντικότητας.

6.3.5. Τίτλοι IgG αντιγονοειδικών *HP* αντισωμάτων σε ασθενείς με MG

Τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του *HP* παρουσιάζονται στον Πίνακα 46 και απεικονίζονται στην Εικόνα 23. Μεταξύ των ασθενών με MG και των υγιών μαρτύρων HC υπήρχε διαφορά στα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι όλων των αντιγόνων του βακτηρίου, με εξαίρεση το αντιγόνο p57 ($91 \pm 29,5$ AU έναντι $90,5 \pm 39,8$ AU, με $p=ns$). Ειδικότερα, οι ασθενείς με MG εμφάνιζαν χαμηλότερα επίπεδα αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων p120-CagA ($52,5 \pm 28,7$ AU έναντι $77,7 \pm 42,3$ AU, με $p=0,034$), p95-VacA (14 AU έναντι 24 ± 8 AU, με

p=ns), p75 (- έναντι $24,5 \pm 10,9$ AU, με p=na), p67-FSH ($24,8 \pm 9,6$ AU έναντι $46,4 \pm 32,1$ AU, με p=0,004), p66-UreB ($44,3 \pm 22,1$ AU έναντι $57,3 \pm 28,3$ AU, με p=ns), p54-flagelin ($44,3 \pm 22,1$ AU έναντι $58,9 \pm 39,5$ AU, με p=ns), p50 ($19,2 \pm 7,1$ AU έναντι $40,8 \pm 22,1$ AU, με p<0,001), p41 ($22,5 \pm 0,7$ AU έναντι $43,1 \pm 24,4$ AU, με p=0,004), p33 (23 AU έναντι $72,9 \pm 36,5$ AU, με p=na), p30-OMP (19 AU έναντι $30,4 \pm 12,9$ AU, με p=na), p29-OMP ($26 \pm 6,1$ AU έναντι $61,8 \pm 49,8$ AU, με p=0,003), p26 ($38,2 \pm 31,5$ AU έναντι $49,5 \pm 31,9$ AU, με p=ns), p19-OMP ($19,4 \pm 5,2$ AU έναντι $42,7 \pm 32,1$ AU, με p=0,05) και p17 ($21 \pm 4,6$ AU έναντι $42,2 \pm 4,6$ AU, με p=0,018). Τέλος, οι τίτλοι των αντισωμάτων για το αντιγόνο p57 είναι συγκρίσιμοι μεταξύ τους, χωρίς να υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς με MG και τα υγιή δείγματα ελέγχου HC ($91 \pm 29,5$ AU έναντι $90,5 \pm 39,8$ AU, με p=ns).

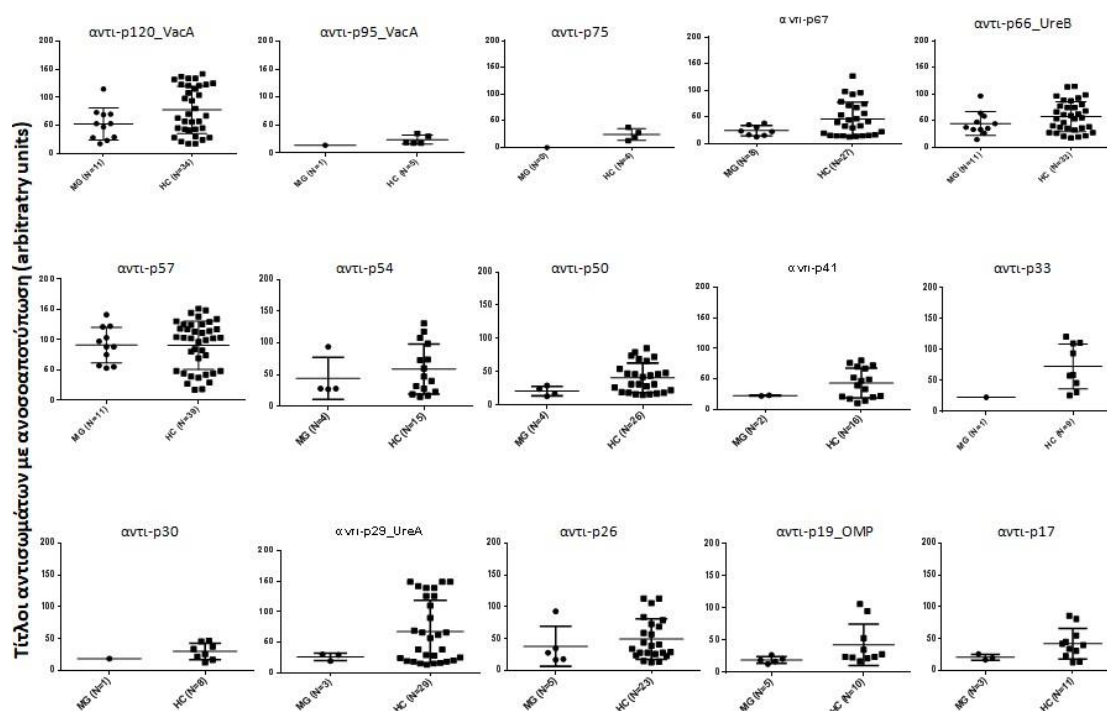
Για την καλύτερη εκτίμηση του συνολικού μεγέθους της χυμικής αντίδρασης στους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες, αυτοί κατατάχθηκαν σε οκτώ διακριτές κατηγορίες, σύμφωνα με την παρουσία μικρότερων ή ίσων των 5, 9, 11 και 15 αντισωμάτων έναντι αντίστοιχου αριθμού αντιγόνων του *HP*. Τα αποτελέσματα όπως αυτά παρουσιάζονται στους Πίνακες 45-48, που δείχνουν πως αντισώματα με αριθμό μικρότερο ή ίσο του 5, ισούνται με το 58,3% των ασθενών με MG και το 70,3% των υγιών μαρτύρων (με p=ns). Στο ίδιο πλαίσιο, τα αντισώματα με αριθμό μικρότερο ή ίσο του 9, αφορούν το 16,7% των ασθενών με MG και το 31,7% των υγιών μαρτύρων HC επίσης (με p=ns), ενώ τα αντισώματα με αριθμό μικρότερο ή ίσο του 11, αναφέρονται στο 8,3% των MG και το 14,6% των υγιών HC (με p=ns). Επίσης, τα αντισώματα με αριθμό μικρότερο ή ίσο του 15, δεν συναντώνται σε καμία από τις δύο ομάδες ατόμων, ούτε τους MG, ούτε τους HC (με p=ns).

Πίνακας 46: Αναφορά στους τίτλους αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του *HP* σε ασθενείς με MG και υγιή δείγματα ελέγχου HC με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Χαρακτηριστικό	MG (n=12)	HC (n=41)	p _{MG vs HC}
p120-CagA	$52,5 \pm 28,7$ AU	$77,7 \pm 42,3$ AU	0,034
p95-VacA	14 AU	24 ± 8 AU	Na
p75	-	$24,5 \pm 10,9$ AU	Na
p67-FSH	$24,8 \pm 9,6$ AU	$46,4 \pm 32,1$ AU	0,004
p66-UreB	$44,3 \pm 22,1$ AU	$57,3 \pm 28,3$ AU	Ns
p57	$91 \pm 29,5$ AU	$90,5 \pm 39,8$ AU	Ns
p54-flagelin	$44,3 \pm 33,2$ AU	$58,9 \pm 39,5$ AU	Ns
p50	$19,2 \pm 7,1$ AU	$40,8 \pm 22,1$ AU	<0,001
p41	$22,5 \pm 0,7$ AU	$43,1 \pm 24,4$ AU	0,004
p33	23 AU	$72,9 \pm 36,5$ AU	Na
p30-OMP	19 AU	$30,4 \pm 12,9$ AU	Na
p29-UreA	$26 \pm 6,1$ AU	$61,8 \pm 49,8$ AU	0,003
p26	$38,2 \pm 31,5$ AU	$49,5 \pm 31,9$ AU	Ns
p19-OMP	$19,4 \pm 5,2$ AU	$42,7 \pm 32,1$ AU	<u>0,050</u>

p17	21 ± 4,6 AU	42,2 ± 24,1 AU	0,018
-----	-------------	----------------	--------------

12 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και 41 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean ± standard deviation). Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (Student's t-test, two-tailed equal variances not assumed), ενώ για η ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομοίσεις: MG (Myasthenia Gravis)=Μυασθένεια Gravis, HC (Healthy Controls)=Υγιή δείγματα ελέγχου, ns (not significant)=μη σημαντικό στατιστικά, na (not applicable)=μη υπολογίσιμο, n (number of people)=αριθμός των ατόμων, p (p.value)=στάθμη σημαντικότητας.



Εικόνα 23: Διαγραμματική απεικόνιση των τίτλων των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HP με ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη μορφή των διαγραμμάτων διασποράς.

12 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και 41 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Οι γραμμές αναπαριστούν τη διάμεσο τιμή με το εύρος.

Πίνακας 47-51: Παρουσιάζουν τις συχνότητες παρουσίας πολλαπλών αντισωμάτων με αριθμό μικρότερο ή ίσο του 5, 9, 11 και 15 έναντι των αντιγόνων του HP .

Αριθμός	MG (n=12)	HC (n=41)	Σύνολο	p MG vs HC
---------	-----------	-----------	--------	-------------------

αντισωμάτων				
≥5αντισώματα	7 (58,3)	29 (70,7%)	36 (67,9%)	p=ns
< 5 αντισώματα	5 (41,7%)	12 (29,3%)	17 (32,1%)	
Σύνολο	12 (100%)	41 (100%)	53 (100%)	

Αριθμός αντισωμάτων	MG (n=12)	HC (n=41)	Σύνολο	p MG vs HC
≥9 αντισώματα	2 (16,7%)	13 (31,7%)	15 (28,3%)	p=ns
<9 αντισώματα	10 (83,3%)	28 (68,3%)	38 (71,7%)	
Σύνολο	12 (100%)	41 (100%)	53 (100%)	

Αριθμός αντισωμάτων	MG (n=12)	HC (n=41)	Σύνολο	p MG vs HC
≥11 αντισώματα	1 (8,3%)	6 (14,6%)	7 (13,2%)	p=ns
<11 αντισώματα	11 (91,7%)	35 (85,4%)	46 (86,8%)	
Σύνολο	12 (100%)	41 (100%)	53 (100%)	

Αριθμός αντισωμάτων	MG (n=12)	HC (n=41)	Σύνολο	p MG vs HC
≥15 αντισώματα	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,9%)	p=na
<15 αντισώματα	12 (100%)	41 (100%)	52 (98,1%)	
Σύνολο	12 (100%)	41 (100%)	53 (100%)	

12 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG) και 41 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean ± standard deviation). Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (Student's t-test, two-tailed equal variances not assumed), ενώ για η ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομεύσεις: MG (Myasthenia Gravis)=Μυασθένεια Gravis, HC (Healthy Controls)=Υγιή δείγματα ελέγχου, ns (not significant)=μη σημαντικό στατιστικά, na (not applicable)=μη υπολογίσιμο, n (number of people)=αριθμός των ατόμων, p (p.value)=στάθμη σημαντικότητας.

Αρκετές συσχετίσεις φάνηκαν ανάμεσα στους τίτλους διαφορετικών αντιγονοειδικών HP αντισωμάτων των ασθενών με MG, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 49.

Πίνακας 52: Παρουσίαση των συσχετίσεων ανάμεσα στους τίτλους των αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του HP αναμεταξύ στους 12 ασθενείς με μυασθένεια Gravis (MG), που είναι θετικά για τα αντιγόνα του HP βακτηρίου.

		p120_ Ca gA_ posit ivity	p95_ Vac A_p ositi vity	p75_p ositivi y	p67_ posit ivity	p66_ posit ivity	p57_ posit ivity	p54_ posit ivity	p50_ posit ivity	p41_ posit ivity	p33_ posit ivity	p30_ posit ivity	p29_ posit ivity	p26_ posit ivity	p19_ posit ivity	p17_ posit ivity
p120_ CagA_ posit ivity	Pearso n Correl ation Sig (2- tailed)	1	- 0,01 6 0,91 1	-0,079 0,574	0,14 3 0,30 8	0,09 0 0,52 1	- 0,10 3 0,46 2	- 0,01 5 0,91 8	- 0,03 4 0,80 7	0,08 0 0,57 0	- 0,06 6 0,68 3	0,05 0 0,72 0	- 0,11 3 0,41 9	0,12 9 0,35 5	- 0,08 6 0,54 0	- 0,10 6 0,45 0
p95_V acA_p ositivi ty	Pearso n Correl ation Sig (2- tailed)		1	0,349 0,010	0,25 6 0,06 4	0,16 2 0,24 8	- 0,17 0 0,22 3	0,23 0 0,09 8	0,30 1 0,02 9	0,37 2 0,00 6	0,13 2 0,34 6	- 0,00 3 0,98 3	0,12 6 0,36 9	0,21 8 0,11 6	0,43 6 0,00 1	0,19 1 0,17 0
p75_p ositivi ty	Pearso n Correl ation Sig (2- tailed)			1	0,20 5 0,14 1	0,12 9 0,35 6	0,07 0 0,61 9	0,23 3 0,09 3	0,24 1 0,08 3	0,24 8 0,07 4	0,22 7 0,10 2	0,25 1 0,10 2	0,29 1 0,03 4	0,27 0 0,05 1	0,29 6 0,03 1	0,31 5 0,02 2
p67_p ositivi ty	Pearso n Correl ation Sig (2- tailed)				1	- 0,00 6 0,96 6	0,16 9 0,22 6	0,37 0 0,00 6	0,44 7 0,00 1	0,34 6 0,01 1	0,24 4 0,07 8	0,21 8 0,11 6	0,06 6 0,63 8	0,28 0 0,04 2	0,18 5 0,18 4	0,24 9 0,07 2
p66_p ositivi ty	Pearso n Correl ation Sig (2- tailed)					1	0,10 7 0,44 7	0,33 8 0,01 3	0,33 3 0,01 5	0,21 8 0,11 6	0,90 0 0,52 3	0,20 5 0,14 2	0,44 4 0,00 1	- 0,02 5 0,86 1	0,28 4 0,03 9	0,15 7 0,26 2
p57_p ositivi ty	Pearso n Correl ation Sig (2- tailed)						1	0,18 3 0,18 9	0,12 5 0,37 2	0,00 3 0,98 2	0,11 8 0,40 0	0,11 1 0,43 0	0,07 7 0,58 3	- 0,06 8 0,62 9	- 0,02 7 0,84 6	- 0,03 8 0,78 5
p54_p ositivi ty	Pearso n Correl ation Sig (2-							1	0,39 0 0,00 4	0,37 8 0,00 5	0,14 2 0,30 9	0,18 6 0,18 3	0,44 7 0,00 1	0,23 3 0,09 2	0,31 6 0,02 1	0,44 5 0,00 1

	tailed)															
p50_positivity	Pearson Correlation Sig (2-tailed)								1	0,442 0,001	0,211 0,130	0,075 0,593	0,214 0,124	0,278 0,044	0,274 0,047	0,418 0,021
p41_positivity	Pearson Correlation Sig (2-tailed)									1	0,367 0,007	0,312 0,023	0,492 0,000	0,358 0,008	0,345 0,011	0,203 0,145
p33_positivity	Pearson Correlation Sig (2-tailed)										1	0,167 0,231	0,202 0,147	0,359 0,008	0,446 0,001	0,258 0,062
p30_positivity	Pearson Correlation Sig (2-tailed)											1	0,260 0,060	-0,076 0,589	0,051 0,719	-0,043 0,760
p29_positivity	Pearson Correlation Sig (2-tailed)												1	0,247 0,075	0,389 0,004	0,097 0,490
p26_positivity	Pearson Correlation Sig (2-tailed)													1	0,342 0,012	0,395 0,003
p19_positivity	Pearson Correlation Sig (2-tailed)														1	0,289 0,036
p17_positivity	Pearson															1

positivity	n Correlation Sig (2-tailed)																	
------------	------------------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Τα δεδομένα αναπαριστούν το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson (R). Το p είναι η τιμή p (2 tailed) της συσχέτισης. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$). Συντομεύσεις: HP (Helicobacter pylori)=Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού, α: na (not applicable)=μη υπολογίσιμο, sig/p (p.value)=στάθμη σημαντικότητας.

Πίνακας 53: Αναπαράσταση των συσχετίσεων των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του βακτηρίου HP και των κλινικοεργαστηριακών χαρακτηριστικών των ασθενών με MG.

		Ηλικία έναρξης του νοσήματος	nACHR	Τύπος του φαρμάκου	p1 20 _C ag A	p95 _V ac A	p7 5	p6 7	p66 _Ur eB	p5 7	p5 4	p5 0	p4 1	p3 3	p3 0	p2 9 _Ur eA	p2 6	p19_ OM P	p17
Ηλικία έναρξης του νοσήματος	Pearson Correlation Sig (2-tailed)	1	0,853 0,001	- 0,649 0,012	- 0,141 0,616	0,021 0,909 0,424	0,395 0,101 0,454	- 0,027 0,923	- 0,008 0,922	0,330 0,269 0,330	0,269 0,332 0,505	0,187 0,322 0,509	- 0,041 0,937	0,341 0,202 0,144	0,203 0,469 0,146	0,425 0,114 0,446	0,213 0,404 0,821	0,064 0,821 0,929	0,177 0,529
nACHR	Pearson Correlation Sig (2-tailed)		1	- 0,898 0	- 0,050 0,885	0,099 0,772 0,85	0,428 0,101 0,789	- 0,089 0,796	0,226 0,505 0,5	0,341 0,304 0,560	0,198 0,559 0,60	0,104 0,760 0,511	- 0,216 0,504	0,516 0,104 0,044	0,516 0,104 0,079	0,552 0,079 0,02	0,042 0,902 0,3	0,042 0,903 0,976	0,010 0,976
Τύπος του φαρμάκου	Pearson Correlation Sig (2-tailed)			1	0,305 0,289	0,052 0,861	- 0,156 0,594	0,189 0,518 0,577	- 0,163 0,577	- 0,299 0,299	- 0,035 0,858	0,053 0,866 0,308	0,168 0,594 0,308	- 0,294 0,308	- 0,440 0,115	- 0,715 0,59	- 0,071 0,959	0 108 78	0,039 0,976

Τα δεδομένα αναπαριστούν το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson (R). Το p είναι η τιμή p (2 tailed) της συσχέτισης. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) έχουν επισημανθεί με

έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$).
Συντομεύσεις: HP (*Helicobacter pylori*)=Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού, α: na (not applicable)=μη υπολογίσιμο, sig/p (p.value)=στάθμη σημαντικότητας.

6.3.6. Συσχετίσεις των αντιγονοειδικών HP ανοσολογικών αποκρίσεων

Διερευνήθηκαν οι συσχετίσεις ανάμεσα στις αντιγονοειδικές HP ανοσοαποκρίσεις και σε κλινικά χαρακτηριστικά της MG (Πίνακες 42 και 53), συμπεριλαμβάνοντας τον τύπο των φαρμάκων που χορηγήθηκε σε κάθε ασθενή με MG ως θεραπεία, καθώς και τον τύπο των αντισωμάτων και ειδικότερα αυτού έναντι του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (που αποτελεί και την πλειοψηφία των περιπτώσεων των ασθενών με MG), που ανιχνεύθηκε στον ορό των ασθενών με MG.

Ανάμεσα στους 18 ασθενείς με MG, οι 6 είχαν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του HP και συγχρόνως είχαν λάβει θεραπεία με Mestinon και Prezolon σε ποσοστό της τάξης του 42,86%. Τα αμέσως επόμενα σε ποσοστό αφορούσαν τη χορήγηση των φαρμακευτικών σκευασμάτων Mestinon και συνδυασμός Mestinon με Azathioprine (σε ποσοστό ίσο με 21,43% και στις δύο περιπτώσεις αντίστοιχα), με στάθμη σημαντικότητας p ίση με ns. Τέλος, για τη χορήγηση των Prezolon και Azathioprine με Mestinon (σε ποσοστό ίσο με 7,14% και στις δύο περιπτώσεις κατά αναλογία) βρέθηκαν λιγότεροι σε αριθμό ασθενείς με MG, με μόλις 1 άτομο για κάθε μια περίπτωση να έχει λάβει την αντίστοιχη θεραπεία (σε όλες τις αναλύσεις η στάθμη σημαντικότητας ήταν ίση με $p=ns$).

Όσον αφορά τον τύπο των αντισωμάτων που ανιχνεύθηκαν έναντι του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης αποκλειστικά, φαίνεται πως 8 εκ των 18 ατόμων (στους υπόλοιπους ασθενείς απουσίαζαν οι κλινικές πληροφορίες σχετικά με τον τύπο των αντισωμάτων που είναι ειδικά για τον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης) ήταν θετικοί για αντισώματα έναντι του AChR (44,4% ποσοστό, με $p=ns$).

Τέλος, σχετικά με την ηλικία έναρξης του νοσήματος, υπήρχαν πληροφορίες για τους 15 εκ των 18 ασθενών με μυασθένεια Gravis, που συμμετείχαν στην διεξαγωγή της παρούσας μελέτης. Η μέση ηλικία έναρξης της Gravis υπήρξε τα 51,3 έτη, με εύρος τα 20-83 έτη μεταξύ των ασθενών με MG.

7. Συζήτηση

Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία με βάση τα όσα γνωρίζουμε μέχρι τώρα αποτελεί την πρώτη προσπάθεια αναλυτικής μέτρησης των ανοσοεπικρατούντων αντιγόνων των παθογόνων EBV, HCMV και *HP* σε δείγμα ασθενών με MG. Τα κυριότερα ευρήματα της μελέτης περιορίζονται στα ακόλουθα:

- Την εύρεση μεγαλύτερων συχνοτήτων και τίτλων των αντισωμάτων έναντι ορισμένων ανοσοεπικρατούντων αντιγόνων του EBV ιού σε ασθενείς με MG σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες HC.
- Τον εντοπισμό χαμηλότερων συχνοτήτων των αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων ανοσοεπικρατούντων αντιγόνων του HCMV ιού σε ασθενείς με MG σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες HC.
- Την ανίχνευση χαμηλότερων τίτλων των αντισωμάτων έναντι ορισμένων ανοσοεπικρατούντων αντιγόνων του *HP* σε ασθενείς με MG σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες HC.
- Τον εντοπισμό πιο ισχυρών αντιγόνο-εξαρτώμενων αντιδραστικότητων έναντι του EBV ιού, σε σύγκριση με αυτών έναντι του HCMV ιού και του *HP* βακτηρίου.
- Την εύρεση πιθανής συσχέτισης μεταξύ της μόλυνσης από τον ιό EBV και την παθογένεια στην MG.

Τα αυτοαντισώματα έναντι των αντιγόνων που είναι συστατικά της νευρομυϊκής σύναψης, εντοπίστηκαν σε όλους τους ασθενείς με MG. Στην παρούσα ερευνητική εργασία ανιχνεύτηκαν αυτοαντισώματα έναντι του AChR σε μεγάλο ποσοστό σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες HC που δεν έφεραν τα συγκεκριμένα αυτοαντισώματα.

Όπως αναφέραμε παραπάνω, οι μολύνσεις έναντι παθογόνων έχουν συνδεθεί με την παθογένεια της MG, κάτι που αποτέλεσε και την υπόθεση που εξετάστηκε και στην παρούσα ερευνητική εργασία. Αναλυτικότερα, αρκετές συσχετίσεις εντοπίστηκαν ανάμεσα σε αυτοαντισώματα έναντι του AChR και σε αντισώματα έναντι των ανοσοεπικρατούντων αντιγόνων των ιών EBV, HCMV και του βακτηρίου *HP*. Τα IgG αντι-AChR⁺ αντισώματα ήταν συγκρίσιμα για τα αντισώματα που δημιουργούνται για τα αντιγόνα p79.EBNA-1 και p41.VCA για τον EBV και τα UL57 και UL83 του HCMV. Αναφορικά με το *HP*, οι τιμές για τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων p120-CagA, p67-FSH, p50, p41, p29-OMP και p19-OMP ήταν ανάλογες με αυτές για τα αυτοαντισώματα έναντι του AChR στους ασθενείς με MG. Πιθανότατα, η έλλειψη κλινικών πληροφοριών κάποιων εκ των ασθενών με MG και ειδικότερα της πληροφορίας

σχετικά με την παρουσία των αντι-AChR⁺ αυτοαντισωμάτων, να τροποποιήσει την εν δυνάμει αναλογία στις τιμές των αυτοαντισωμάτων έναντι AChR⁺ και των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων των τριών εξεταζόμενων παθογόνων στον ορό των ασθενών με MG.

Όσον αφορά τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του HCMV όπως αυτά ανιχνεύονται, οι θετικοί 18 ασθενείς με MG και οι θετικοί 26 υγιείς μάρτυρες HC, έχουν συχνότερη εμφάνιση στο γυναικείο φύλο σε σύγκριση με το αντρικό και συγχρόνως εξίσου υψηλή θετικότητα για τον ιό. Στην περίπτωση του *HP* οι θετικοί για αυτό 18 ασθενείς με MG και 41 υγιείς μάρτυρες HC έχουν μεγαλύτερο επιπολασμό στο γυναικείο φύλο τόσο για τους MG όσο και για τους HC, έχοντας συνολικά υψηλή θετικότητα για το *HP* και στις δύο ομάδες ατόμων αντίστοιχα. Τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του EBV εμφανίζονται συχνότερα στο γυναικείο φύλο τόσο στους 18 ασθενείς MG όσο και στους 22 υγιείς μάρτυρες HC, έχοντας μεγαλύτερη συνολικά για τον EBV τριπλή θετικότητα για τους ασθενείς με MG (τριπλή θετικότητα ορίζεται ως η θετικότητα για το σύνολο των αντιγόνων των κατηγοριών VCA, EA και EBNA, που αναπαριστούν μάλιστα τις φάσεις του κύκλου ζωής του EBV ιού). Δύο δεδομένα που προκύπτουν από τα άνωθι, αφορούν αφενός την συχνότερη εμφάνιση του νοσήματος της μυασθένειας Gravis στο γυναικείο φύλο, στοιχείο που συνάδει με την παρατήρηση πως η πλειονότητα των αυτοάνοσων νοσημάτων συναντάται στις γυναίκες εξαιτίας των ορμονικών διαταραχών που υφίστανται στο πέρας του χρόνου, και αφετέρου τη μεγαλύτερη συνολική θετικότητα για τον EBV που συναντάται στους ασθενείς με MG. Το τελευταίο είναι κάτι σύμφωνο με την υπόθεσης εργασίας μας και δείχνει πως πιθανότατα ο EBV έχει παθογενετικό ρόλο στην ομάδα των ασθενών με MG. Το αντίθετο σενάριο φαίνεται να επικρατεί στη μελέτη τόσο του HCMV, όσο και του *HP*, καθώς η συνολική θετικότητά τους ανιχνεύεται να είναι υψηλότερη στην ομάδα των υγιών μαρτύρων HC σε κάθε περίπτωση, υποδεικνύοντας κάποιο ενδεχόμενο προστατευτικού ρόλου αυτών στην ομάδα των HCs έναντι του νοσήματος της Gravis. Αναφορικά με την ηλικία των ασθενών με MG και των υγιών μαρτύρων HC, στην περίπτωση του HCMV η μέση ηλικία των ασθενών με MG είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με αυτή στους υγιείς μάρτυρες HC. Αντίστοιχα, για τον EBV και το *HP* τα δημογραφικά στοιχεία είναι ίδια με αυτά στη μελέτη του HCMV για τους ασθενείς με MG, ενώ για τους υγιείς μάρτυρες HC η ηλικία είναι επίσης μικρότερη σε σύγκριση με αυτή των MG. Αυτό που μπορεί να σημειωθεί για την ηλικία τόσο των ασθενών με MG, όσο και των υγιών μαρτύρων HC είναι πως αναφέρεται σε ένα δείγμα μεσήλικων και υπερήλικων ατόμων (μεσήλικας: ηλικία>50 έτη και υπερήλικας: ηλικία>65 έτη), κάτι που συμβαδίζει με την ηλικία έναρξης του υπό μελέτη νοσήματος, δηλαδή της μυασθένειας Gravis, όπως αυτή αναφέρεται σε αρκετές μελέτες.

Στην ομάδα των ασθενών με MG που είναι θετικοί για τον HCMV ιό, παρατηρούνται συχνότερα τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων UL99, UL55, UL83 και UL57, με τα δύο τελευταία να έχουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Αντίθετα, στους υγιείς μάρτυρες HC οι συχνότητες για τα παραπάνω αντιγόνα είναι υψηλότερες από αυτές των ασθενών με MG, με μόνη εξαίρεση την συχνότητα του αντιγόνου UL99 που είναι μικρότερη από αυτή των ασθενών με MG. Επίσης, η συχνότητα του p38 αντιγόνου είναι μεγαλύτερη στους υγιείς μάρτυρες HC σε σχέση με τους ασθενείς με MG, δεδομένο που δείχνει πως ίσως ο HCMV έχει προστατευτική δράση στους υγιείς μάρτυρες HC. Το παράδοξο παρατηρείται στην περίπτωση των τίτλων των αντισωμάτων έναντι των παραπάνω αντιγόνων, όπου φαίνεται πως μόνο το UL83 εμφανίζει μεγαλύτερο τίτλο στην ομάδα των ασθενών με MG, σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Αυτό είναι αρκετά σημαντικό, δεδομένου πως το UL83 ως αντιγόνο παίζει καθοριστικό ρόλο στην λοίμωξη του οργανισμού-ξενιστή με τον ιό HCMV. Στην περίπτωση του EBV ιού, οι ασθενείς με MG εμφανίζουν μεγαλύτερη συχνότητα στα αντιγόνα p79.EBNA-1, p45.EAD, p43.EAD, p41.VCA, p40.VCA, p33.VCA και p65.VCA, σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες HC, με την συχνότητα του p79.EBNA-1 να είναι η μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες των άλλων αντιγόνων για τους MG. Πολλά περισσότερα θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε για την συνεισφορά του EBNA-1 αντιγόνου στην MG, εάν βέβαια η μελέτη συσχέτισης πραγματοποιούνταν σε μεγαλύτερη αριθμητικά ομάδα ασθενών με MG, δεδομένου πως το EBNA-1 αντιγόνο αποτελεί παράγοντα ενεργοποίησης της λυσιογονίας του EBV ιού. Το μόνο αντιγόνο που έχει μικρότερη συχνότητα στην ομάδα των ασθενών με MG σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες HC είναι το p93.EAR. Όσον αφορά όμως τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV που αναφέρονται παραπάνω, αυτοί δεν συνάδουν πλήρως σε όλες τις περιπτώσεις με τις διαφορές των τιμών των συχνοτήτων των αντιγόνων μεταξύ των ασθενών με MG και των υγιών μαρτύρων HC. Συγκεκριμένα, μόνο στα αντιγόνα p45.EAD, p42.VCA, p41.VCA, p40.VCA, p33.VCA και p22.VCA, φαίνεται πως οι τιμές των τίτλων των αντισωμάτων έναντι των προαναφερόμενων αντιγόνων ανιχνεύονται να είναι μεγαλύτεροι στους ασθενείς με MG σε σύγκριση με αυτούς των υγιών μαρτύρων HC, δεδομένο που συμβαδίζει με την υπόθεση εργασίας μας. Όσον αφορά το *HP*, οι συχνότητες των αντιγόνων p120-CagA, p66-UreB, p57 και p67-FSH έχουν τις μεγαλύτερες συχνότητες, όπως αυτές ανιχνεύονται κατά τη διενέργεια της δοκιμασίας της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Αναφορικά με τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι των παραπάνω *HP* αντιγόνων, ξεχωρίζουν τα αντισώματα των αντιγόνων p120-CagA, p67-FSH, p50, p41, p29-UreA, p19-OMP και p17, όπου ανιχνεύονται μικρότερα σε τίτλο στην ομάδα των ασθενών με MG σε σύγκριση με την ομάδα των υγιών μαρτύρων HC, αποτελέσματα που μάλιστα έχουν στατιστική σημαντικότητα. Αυτό δείχνει πως πιθανότατα η μόλυνση με το *HP* έχει προστατευτική δράση στην ομάδα των υγιών μαρτύρων HC ενάντια στην μυασθένεια

Gravis, όπου οι τίτλοι των αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων, που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην επιτυχημένη μόλυνση με το βακτήριο, είναι πολύ μεγαλύτεροι από τους αντίστοιχους που εντοπίζονται στους ασθενείς με MG, στοιχείο που είναι σε ρίξη με την υπόθεση εργασίας μας.

Αξιίζει να αναφερθεί πως η συνολική θετικότητα για τον HCMV ανιχνεύεται να είναι αρκετά υψηλή και ίδια τόσο στους ασθενείς με MG όσο και στους HC. Στην περίπτωση του EBV η συνολική θετικότητα είναι καθολική στην ομάδα των ασθενών με MG και των υγιών μαρτύρων HC εξίσου. Επίσης, για το *HP* η συνολική θετικότητα παρουσιάζεται χαμηλότερη στην ομάδα των ασθενών με MG σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες HC.

Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως αναφορικά με την εύρεση συσχέτισης της μόλυνσης από το *HP* και της παθογένειας της μυασθένειας Gravis φαίνεται πως δεν έχει αποδειχθεί κάποια συσχέτιση σε κάποια πρόσφατη ερευνητική εργασία μέχρι στιγμής. Ωστόσο, μία μελέτη που έχει ξεχωρίσει, αναφέρει πως οι πολυμορφισμοί του γενετικού υλικού (SNPs) σχετίζονται τόσο με τη μόλυνση από το *HP* όσο και την εκδήλωση της αυτοανοσίας σε ασθενείς με MG και αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του γαστρεντερικού συστήματος (210). Σημαντικό να αναφερθεί επίσης πως μία προηγούμενη επιστημονική εργασία μετα-ανάλυσης της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου μας με ένα άλλο νόσημα του νευρικού συστήματος, της νόσου του Parkinson έδειξε πως αφενός ανιχνεύθηκε μόλυνση από το *HP* σε μεγάλο αριθμό των ασθενών και αφετέρου η μόλυνση αυτή κάθε αυτή μπορεί να συνεισφέρει στην επιδείνωση της κλινικής εικόνας των ασθενών με Parkinson (216). Ακόμη, δύο εργασίες του Efthymiou G. et al το 2017 και 2016 έδειξαν πως οι χυμικές ανοσοαποκρίσεις έναντι των επικρατούντων αντιγόνων του *HP* ήταν συχνότερες στην ομάδα ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση (Multiple Sclerosis, MS) και ιδίως σε δύο φαινοτύπους αυτής σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες HC, καθώς και ότι τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων και ειδικότερα της πρωτεΐνης HSP-60 του *HP* ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερους τίτλους στους MS ασθενείς σε σύγκριση με τους HC (217, 218). Επειδή αυτές οι μελέτες που αναφέρονται σχετίζονται με ένα αμιγώς νευρολογικό και ένα νευρομυϊκό αυτοάνοσο νόσημα, θεωρείται ορθή η ανάγκη για την αντίστοιχη διερεύνηση στην περίπτωση της μυασθένειας Gravis.

Αντίστοιχα, για τον HCMV, οι προηγούμενες ερευνητικές εργασίες του εργαστηρίου μας σχετικά με τη λοίμωξη από τον συγκεκριμένο ιό και την συσχέτιση αυτής με την παθογένεια της νόσου της συστηματικής σκλήρυνσης (Systemic Sclerosis, SSc), έδειξαν πως τα αντισώματα έναντι καθορισμένων αντιγόνων του HCMV εντοπίστηκαν συχνότερα και σε υψηλότερους τίτλους στους ασθενείς με SSc σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες HC (219). Μάλιστα, μία

επιπλέον μελέτη του 2019 από τον Efthymiou G. και την ομάδα μας, έδειξε πως τα αντισώματα έναντι των UL-57 και UL-55 αντιγόνων του HCMV εντοπίστηκαν να είναι πιο συχνά και σε μεγαλύτερους τίτλους στην ομάδα των ασθενών με SSc σε σύγκριση με τους ασθενείς με κάποιες μορφές της MS (220). Κάτι αντίστοιχο είχε φανεί και στη μελέτη της Marou E. το 2017, η οποία έδειξε πως τα αντισώματα έναντι του αντιγόνου UL-83 του HCMV είναι πιο συχνά και σε υψηλότερους τίτλους στην ομάδα των ασθενών με SSc σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες HC, όπως αυτά ανιχνεύονται (221). Δεδομένου, πως αυτά τα νοσήματα αυτά είναι αυτοάνοσης αρχής και πως ο HCMV έχει ενοχοποιηθεί για την επαγωγή της αυτοανοσίας και σε άλλες αυτοάνοσες παθήσεις είναι εύλογο να θεωρηθεί πιθανό το ενδεχόμενο η μόλυνση από τον HCMV να πυροδοτεί την ανοσοφλεγμονή σε ασθενείς με MG.

Τέλος, όσον αφορά τον EBV, δεν είχε πραγματοποιηθεί κάποια μελέτη μέχρι στιγμής στο πλαίσιο ενασχόλησης του εργαστηρίου μας με την πιθανότητα συσχέτισης της λοίμωξης από τον EBV ιό και της παθογένειας κάποιου αυτοάνοσου νευρολογικού νοσήματος. Η παρούσα εργασία λοιπόν, αποτελεί το έναυσμα για τη διερεύνηση της σύνδεσης μεταξύ της μόλυνσης από τον EBV και της αυτοανοσίας των ατόμων και ειδικότερα αυτής που μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση της μυασθένειας Gravis.

Ωστόσο, ο βασικός περιορισμός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η προσμέτρηση των επικρατούντων αντιγόνων των παθογόνων EBV, HCMV και *HP* σε περιορισμένο αριθμό δειγμάτων, που δεν επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την υπόθεση εργασίας της παρούσας μελέτης. Επομένως, είναι εύλογο να θεωρηθεί πως θα είχε πιθανότατα μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον η επέκταση της συγκεκριμένης εργασίας σε ένα διευρυμένο αριθμητικά δειγματοληπτικό υλικό ασθενών με MG αλλά και υγιών μαρτύρων HC. Έτσι, θα οδηγηθούμε σε μία διεξοδική συζήτηση για τον παθογενετικό ρόλο στην MG. Επιπρόσθετα, τα χορηγούμενα φάρμακα στους ασθενείς με MG πιθανότατα αποτέλεσαν τροχοπέδη για την εξαγωγή ασφαλών συμπεράσματος, δεδομένου πως επηρεάζουν τις ανοσολογικές μετρήσεις των ατόμων στην εργασία αυτή.

Η ανίχνευση της ενδεχόμενης χυμικής αντιδραστικότητας έναντι των αντιγόνων των παθογόνων HCMV, EBV και *HP* και η σύγκριση αυτών μεταξύ των δύο ομάδων ελέγχου (MG και HC) θα δώσει περισσότερες απαντήσεις στα ερωτήματα που τίθενται στην παρούσα διπλωματική εργασία, επεκτείνοντας την ήδη υπάρχουσα γνώση της επιστημονικής κοινότητας για το ρόλο της μόλυνσης από τα παραπάνω παθογόνα στην αιτιοπαθογένεια της μυασθένειας Gravis.

Ένα από τα ερωτήματα-στόχους της παρούσας εργασίας υπήρξε η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης μεταξύ των κλινικοεργαστηριακών χαρακτηριστικών των ασθενών με μυασθένεια

Gravis και των αντισωμάτων έναντι αντιγόνων των δύο ιών (EBV, HCMV) και του ενός βακτηρίου (*HP*) αυτών. Τα κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν η ηλικία έναρξης του νοσήματος, η παρουσία των θετικών αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης και τέλος ο τύπος του φαρμάκου που χορηγήθηκε σε κάθε έναν ασθενή με MG. Η στατιστική ανάλυση, με τη χρήση του ελέγχου συσχέτισης κατά Pearson έδειξε διαφορετικά αποτελέσματα (με στάθμη σημαντικότητας $p.value \leq 0,005$) για τις τρεις περιπτώσεις μελέτης των EBV, HCMV και *HP*. Συγκεκριμένα, για το *HP* δε βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των αντισωμάτων έναντι των 15 αντιγόνων του βακτηρίου και κάποιου εκ των τριών εξεταζόμενων χαρακτηριστικών των ασθενών με MG. Ωστόσο, βρέθηκε μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας εμφάνισης της MG και των θετικών αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης που ανιχνεύονται στους ορούς των ασθενών με MG. Αυτό υποδηλώνει πως όσο αυξάνεται η ηλικία στην οποία κάποιος ασθενής με MG εκδηλώνει το νόσημα, τόσο αυξάνεται και ο αριθμός των αντισωμάτων που δημιουργούν σύμπλοκο με τον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης στον ορό του αίματος τους. Επίσης, κάτι αντίστοιχο φαίνεται να εμφανίζεται και στην περίπτωση της συσχέτισης μεταξύ της ηλικίας εμφάνισης της MG και του χορηγούμενου φαρμάκου στους ασθενείς με MG, δείχνοντας στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Αυτό δείχνει πως όσο αυξάνεται η ηλικία εμφάνισης του νοσήματος, αυξάνεται και η ανάγκη για τη χορήγηση του κατάλληλου φαρμάκου για τη θεραπεία των ασθενών με MG. Στατιστικά σημαντική συσχέτιση εμφανίζεται και μεταξύ των θετικών αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης και του χορηγούμενου φαρμάκου στους ασθενείς με MG, υποδηλώνοντας πως η αυξημένη συγκέντρωση των αντισωμάτων αυτών απαιτεί τη χορήγηση των προαναφερόμενων φαρμάκων σε συχνή δράση για την αποτελεσματική αντιμετώπιση του νοσήματος. Αντίστοιχα, ο έλεγχος κατά Pearson για τον EBV, έδειξε πως η ηλικία εμφάνισης της MG συσχετίζεται θετικά με την παρουσία των θετικών αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης στους ασθενείς με MG, ενώ αρνητική συσχέτιση παρατηρείται στις περιπτώσεις μεταξύ της ηλικίας εμφάνισης της MG και του χορηγούμενου φαρμάκου, καθώς και του τελευταίου με τα αντισώματα έναντι AChR⁺ με στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα εξίσου. Ίδιες παρατηρήσεις με αυτές που ανιχνεύονται στις συσχέτισεις για τον EBV ιό, εμφανίζονται και στην περίπτωση μελέτης του HCMV σε ασθενείς με MG.

Οι συγκριτικές αναλύσεις για τον τύπο του χορηγούμενου φαρμάκου και την παρουσία των αντισωμάτων έναντι του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nAChR) στους ασθενείς με MG, δείχνουν πως στους δεκατέσσερις ασθενείς με MG που έχουν λάβει θεραπεία, η πλειοψηφία αυτών, δηλαδή οι έξι έλαβαν συνδυαστική θεραπεία με Mestinon-Prezolon και

λιγότεροι μονοθεραπεία ή συνδυαστική θεραπεία Azathioprine-Mestinon και Mestinon-Prezolon. Ακόμη, στο σύνολο των δεκαοκτώ ασθενών με MG, μόνο οι οκτώ έφεραν αντισώματα έναντι του nAChR. Η επέκταση της μελέτης αυτής σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών θα έδινε περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την πιθανότητα ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ του κλινικού χαρακτηριστικού του nAChR και της παθογένειας της MG αλλά και της μόλυνσης από κάποιο παθογόνο, όπως είναι ο EBV, ο HCMV και το *HP*. Η αδυναμία εύρεσης της συσχέτισης μεταξύ των κλινικοεργαστηριακών χαρακτηριστικών των ασθενών με μυασθένεια Gravis και της μόλυνσης από κάποιο από τα υπό μελέτη παθογόνα: Epstein-Barr ιό, Human Cytomegalovirus ιό και το βακτήριο *Helicobacter pylori*, μπορεί να αποδοθεί στον περιορισμένο αριθμό ατόμων που συμμετείχαν στην παρούσα ερευνητική εργασία. Η διεύρυνση της εργασίας αυτής σε μεγαλύτερο δείγμα ατόμων μπορεί να παρουσιάσει μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον σχετικά με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους των ασθενών με μυασθένεια Gravis και το ρόλο της μόλυνσης από κάποιο παθογόνο μικροοργανισμό στη διακύμανση αυτών, όταν αυτές μετρώνται. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μελέτες μεταξύ των επιμέρους αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων των ιών EBV, HCMV και του βακτηρίου *HP* που εξετάζονται ξεχωριστά. Και στις τρεις περιπτώσεις μελέτης των παθογόνων μικροοργανισμών, ανιχνεύθηκε η ύπαρξη συσχέτισης της παρουσίας δύο αντιγόνων του υπό μελέτη παθογόνου που εξετάζεται κάθε φορά. Αυτό αποτελεί μία ένδειξη πως πολλές φορές η ύπαρξη των αντισωμάτων έναντι ενός αντιγόνου, συνακολουθείται από την παρουσία των αντισωμάτων έναντι ενός επίσης ανοσοεπικρατούμενου αντιγόνου, με ίδια ή διαφορετική ανοσογονική ισχύ από το πρώτο. Τέτοιου είδους συσχετίσεις πιθανώς να έχουν κάποιο ερευνητικό ενδιαφέρον και να αξίζει να αποτελέσουν αντικείμενο μελέτης στο εγγύς μέλλον.

Συμπερασματικά, η παρούσα ερευνητική εργασία έχει προοπτικές να επεκταθεί σε μεγαλύτερο αριθμό ατόμων, με μελλοντικούς στόχους της υποψήφιας τους εξής:

- Τη πραγματοποίηση μίας προοπτικής μελέτης για την προσμέτρηση των αντισωμάτων έναντι επικρατούντων αντιγόνων των παθογόνων EBV, HCMV και *HP* σε ορούς ατόμων σε βάθος χρόνου.
- Την ολοκλήρωση της προοπτικής μελέτης για την προσμέτρηση των αντισωμάτων έναντι επικρατούντων αντιγόνων των παθογόνων EBV, HCMV και *HP* σε μεγαλύτερο αριθμό δείγματος ορών ατόμων.
- Την επέκταση της μελέτης αυτής σε πολυκεντρικό επίπεδο, με τη χρήση δείγματος ατόμων από διαφορετικά κέντρα αναφοράς της χώρας.

- Τη διεξαγωγή μίας προοπτικής μελέτης για την προσμέτρηση των παραμέτρων που συμπεριλαμβάνουν τον χρόνο, τις μονάδες (units) καθώς και τους ισοτύπους των αντισωμάτων που ανιχνεύονται.

Εν κατακλείδι και λαμβάνοντας υπόψη τους περιορισμούς που αναφέρθηκαν άνωθεν, η παρούσα ερευνητική εργασία βρήκε μία σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μόλυνσης από τον EBV ιό και της παθογένειας της μυασθένειας Gravis. Αντίθετα, δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της μόλυνσης από τον ιό HCMV και το βακτήριο *HP* και του ενδεχόμενου εμφάνισης της μυασθένειας Gravis σε άτομα. Από τα αποτελέσματα που παρατίθενται στην εργασία αυτή, συμπεραίνουμε πως τα πιο εντυπωσιακά τα επιδεικνύει η μελέτη για τον EBV ιό, όπου είναι εμφανείς οι διαφορές τόσο στις συχνότητες όσο και στους τίτλους των αντισωμάτων έναντι των περισσότερων εκ των αντιγόνων του EBV μεταξύ των ασθενών με MG και των HC, με τους πρώτους να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές σε συχνότητες και τίτλους επίσης. Ακολούθως, ο HCMV φαίνεται να έχει σημαντικές διαφορές για κάποια αντιγόνα του μεταξύ των ασθενών MG και των HC, με άξιο αναφοράς το στοιχείο πως οι συχνότητες και οι τίτλοι ορισμένων αντιγόνων HCMV δεν διαφοροποιούνται με τον ίδιο τρόπο μεταξύ των MG ασθενών. Το ίδιο παρατηρείται και στους υγιείς μάρτυρες της μελέτης, που έχουν μολυνθεί με HCMV ιό στο παρελθόν. Τέλος, κάτι παράδοξο φαίνεται να εμφανίζεται στην περίπτωση της μελέτης του HCMV και του *HP*, όπου οι συχνότητες και οι τίτλοι των αντισωμάτων αντίστοιχα έναντι των αντιγόνων αυτών, ανιχνεύονται χαμηλότεροι στην ομάδα των ασθενών με MG σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες HC. Πιθανότατα, αυτό να υποδεικνύει κάποιου είδους προστατευτική δράση των HCMV και *HP* για τους υγιείς μάρτυρες HC, μετά από μία μόλυνση τους από αυτά τα παθογόνα. Συμπερασματικά, αξίζει να επεκταθεί η παρούσα ερευνητική εργασία στα πλαίσια της προοπτικής μελέτης στο άμεσο μέλλον, με σκοπό να διερευνήσει και ιδανικά να δώσει απαντήσεις στο γνωστικό κενό της μελέτης των αυτοαντισωμάτων στην μυασθένεια Gravis.

Βιβλιογραφία

- (1) Silverstein, A. M. (2005). Paul Ehrlich, archives and the history of immunology. *Nature Immunology*, 6(7), 639. <https://doi.org/10.1038/ni0705-639>
- (2) Varghese (S.S) Soma Susan, Sarojini Sreenivasan Bargavan, Philips Mathew, Jayan Jacob Mathew (2018). Immunopathological Concepts Behind Autoimmunity. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, 12 (10), 1-4. BSCOHost | 131906232 | Immunopathological Concepts Behind Autoimmunity. (n.d.-c). https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=0973709X&AN=131906232&h=AOCjC2WQxC0CsI2xOfd%2Fwxxt5FxC0Q4K6Msc0i5fxU1FQpWpzGnlIiB9m8DQp%2FOq3dhDvP1jkn%2BzGgw7KfP%2Blw%3D%3D&crl=c&casa_token=HaOYhk5LqpoAAAAA:GYymIxxg_8PuaKuMBJl2ULBphKEyVp37mYwbqU4mw3QkYyooCXqLEX_VPHRBPGNtb5O6g6SewSQS
- (3) Avrameas, S., & Selmi, C. (2013). Natural autoantibodies in the physiology and pathophysiology of the immune system. *Journal of Autoimmunity*, 41, 46–49. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.01.006>
- (4) Sohn, E. (2021). Why autoimmunity is most common in women. *Nature*, 595(7867), S51–S53. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01836-9>
- (5) Rigante, D., Mazzoni, M. B. M., & Esposito, S. (2014). The cryptic interplay between systemic lupus erythematosus and infections. *Autoimmunity Reviews*, 13(2), 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.09.004>
- (6) Gupta, M., & Weaver, D. F. (2021). COVID-19 as a trigger of brain autoimmunity. *ACS Chemical Neuroscience*, 12(14), 2558–2561. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.1c00403>
- (7) Lanzavecchia, A. (1995). How can cryptic epitopes trigger autoimmunity? *Journal of Experimental Medicine*, 181(6), 1945–1948. <https://doi.org/10.1084/jem.181.6.1945>
- (8) Vanheusden, M., Broux, B., Welten, S. P. M., Peeters, L., Panagioti, E., Van Wijmeersch, B., Somers, V., Stinissen, P., Arens, R., & Hellings, N. (2017). Cytomegalovirus infection exacerbates autoimmune mediated neuroinflammation. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00645-3>

- (9) Wucherpfennig, K. W., & Strominger, J. L. (1995). Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: Viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell*, 80(5), 695–705. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90348-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90348-8)
- (10) Hong-Gyun (H.) Lee, Min Ju (M.J.) Cho, Je-Min (J.) Choi (2020). Bystander CD4⁺ T cells: crossroads between innate and adaptive immunity. *Nature Journal*, 52 (8), <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00486-7>
- (11) Vincent, A. (2002). Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. *Nature Reviews Immunology*, 2(10), 797–804. <https://doi.org/10.1038/nri916>
- (12) Münz, C. (2010). Antigen processing via autophagy—not only for MHC class II presentation anymore? *Current Opinion in Immunology*, 22(1), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.016>
- (13) Matthew F (M.F.) Cusick, Jane E.W (J.E.) Libbey, Robert S. (R.S.) Fujinami. (2011), Molecular Mimicry as a Mechanism of Autoimmunity Disease, Springer Nature, 42 (1), 102-111. <https://doi.org/10.1007/s12016-011-8294-7>
- (14) Rojas, M., Restrepo-Jiménez, P., Monsalve, D. M., Pacheco, Y., Acosta-Ampudia, Y., Ramírez-Santana, C., Leung, P. S., Ansari, A. A., Gershwin, M. E., & Anaya, J. (2018). Molecular mimicry and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 95, 100–123. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.10.012>
- (15) Vanderlugt, C. L., & Miller, S. D. (2002). Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 2(2), 85–95. <https://doi.org/10.1038/nri724>
- (16) Hong-Gyun (H.) Lee, Min Ju (M.J.) Cho, Je-Min (J.) Choi (2020). Bystander CD4⁺ T cells: crossroads between innate and adaptive immunity. *Nature Journal*, 52 (8), <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00486-7>
- (17) Pacheco, Y., Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Chang, C. J., Gershwin, M. E., & Anaya, J. (2019). Bystander activation and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 103, 102301. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.06.012>
- (18) Abbas K. Abul, Lichtman H. Andrew, Pillai Shiv. BROKEN HILL PUBLISHERS LTD, Δεκέμβριος 2018, σελ. 181-205.
- (19) Howard, J. P. (2018b). Myasthenia gravis: the role of complement at the neuromuscular junction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1412(1), 113–128. <https://doi.org/10.1111/nyas.13522>

- (20) Fagerlund, M. J., & Eriksson, L. (2009). Current concepts in neuromuscular transmission. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 103(1), 108–114. <https://doi.org/10.1093/bja/aep150>
- (21) Conti-Fine, B. M., Milani, M., & Kaminski, H. J. (2006). Myasthenia gravis: past, present, and future. *Journal of Clinical Investigation*, 116(11), 2843–2854. <https://doi.org/10.1172/jci29894>
- (22) Ruff, R. L., & Lennon, V. A. (2008). How myasthenia gravis alters the safety factor for neuromuscular transmission. *Journal of Neuroimmunology*, 201–202, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.04.038>
- (23) Drachman, D. B. (1994). Myasthenia gravis. *The New England Journal of Medicine*, 330(25), 1797–1810. <https://doi.org/10.1056/nejm199406233302507>
- (24) Payet, C. A., You, A., Fayet, O., Dragin, N., Berrih-Aknin, S., & Panse, R. L. (2022). Myasthenia gravis: an acquired interferonopathy? *Cells*, 11(7), 1218. <https://doi.org/10.3390/cells11071218>
- (25) Lazaridis, K. N., & Tzartos, S. J. (2020). Autoantibody specificities in myasthenia gravis; implications for improved diagnostics and therapeutics. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00212>
- (26) Berrih-Aknin, S., & Panse, R. L. (2014). Myasthenia gravis: A comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms. *Journal of Autoimmunity*, 52, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.12.011>
- (27) Leite, M. M. J., Jacob, S., Viegas, S., Cossins, J., Clover, L., Morgan, B. P., Beeson, D., Willcox, N., & Vincent, A. (2008). IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in ‘seronegative’ myasthenia gravis†. *Brain*, 131(7), 1940–1952. <https://doi.org/10.1093/brain/awn092>
- (28) *Expression of acetylcholine receptor genes in human thymic epithelial cells: implications for myasthenia gravis.* (1996, October 15). PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8871679/>
- (29) Mesnard-Rouiller, L., Bismuth, J., Wakkach, A., Poëa-Guyon, S., & Berrih-Aknin, S. (2004). Thymic myoid cells express high levels of muscle genes. *Journal of Neuroimmunology*, 148(1–2), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2003.11.013>
- (30) Leite, M. M. J., Ströbel, P., Jones, M. T., Micklem, K., Moritz, R. E., Gold, R., Niks, E. H., Berrih-Aknin, S., Scaravilli, F., Canelhas, Á., Marx, A., Newsom-

- Davis, J., Willcox, N., & Vincent, A. (2005). Fewer thymic changes in MuSK antibody-positive than in MuSK antibody-negative MG. *Annals of Neurology*, 57(3), 444–448. <https://doi.org/10.1002/ana.20386>
- (31) Truffault, F., De Montpréville, V. T., Eymard, B., Sharshar, T., Panse, R. L., & Berrih-Aknin, S. (2016). Thymic Germinal Centers and Corticosteroids in Myasthenia Gravis: an Immunopathological Study in 1035 Cases and a Critical Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 52(1), 108–124. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8558-3>
- (32) Filosso, P. L., Galassi, C., Ruffini, E., Margaritora, S., Spaggiari, L., Casadio, C., Anile, M., & Venuta, F. (2013). Thymoma and the increased risk of developing extrathymic malignancies: a multicentre study†. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 44(2), 219–224. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezs663>
- (33) Romi, F. (2011). Thymoma in myasthenia gravis: From diagnosis to treatment. *Autoimmune Diseases*, 2011, 1–5. <https://doi.org/10.4061/2011/474512>
- (34) Klooster, R., Plomp, J. J., Huijbers, M. G., Niks, E. H., Straasheijm, K. R., Detmers, F., Hermans, P., Sleijpen, K., Verrips, A., Losen, M., Martinez-Martinez, P., De Baets, M. H., Van Der Maarel, S. M., & Verschuuren, J. J. (2012). Muscle-specific kinase myasthenia gravis IgG4 autoantibodies cause severe neuromuscular junction dysfunction in mice. *Brain*, 135(4), 1081–1101. <https://doi.org/10.1093/brain/aws025>
- (35) Kalita, J., Singh, V., & Kumar, S. (2019). A study of comorbidities in myasthenia gravis. *Acta Neurologica Belgica*, 120(1), 59–64. <https://doi.org/10.1007/s13760-019-01102-w>
- (36) Mantegazza, R., & Cavalcante, P. (2019). Diagnosis and treatment of myasthenia gravis. *Current Opinion in Rheumatology*, 31(6), 623–633. <https://doi.org/10.1097/bor.0000000000000647>
- (37) Li, Y., Arora, Y., & Levin, K. H. (2013). Myasthenia gravis: Newer therapies offer sustained improvement. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 80(11), 711–721. <https://doi.org/10.3949/ccjm.80a.13044>
- (38) Cortés-Vicente, E., Gallardo, E., Martínez, M. J., Díaz-Manera, J., Querol, L., Rojas-García, R., & Illa, I. (2016). Clinical characteristics of patients with double-seronegative myasthenia gravis and antibodies to cortactin. *JAMA Neurology*, 73(9), 1099. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.2032>

- (39) Li, Y., Arora, Y., & Levin, K. H. (2013). Myasthenia gravis: Newer therapies offer sustained improvement. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 80(11), 711–721. <https://doi.org/10.3949/ccjm.80a.13044>
- (40) Lazo-Langner, A., Espinosa-Poblano, I., Tirado-Cárdenas, N., Ramírez-Arvizu, P., López-Salmorán, J., Peñaloza-Ramírez, P., & Sánchez-Guerrero, S. A. (2002). Therapeutic plasma exchange in Mexico: Experience from a single institution. *American Journal of Hematology*, 70(1), 16–21. <https://doi.org/10.1002/ajh.10081>
- (41) Rosana (R.) Carandina-Maffeis, Anamarli (A.) Nucci, Jose Carlos (J.C.) Marques, E (E.) Roveri, Beatriz Helena Miranda (B.H.M.) Pfeilsticker, Solange G. (S.G.) Garibaldi, Leonardo (L.) Deus-Silva (2004). Plasmapheresis in the treatment of myasthenia gravis: retrospective study of 26 patients. *Arq.Neuro-Psiquitr.* 62-(2b) (391-395). <https://doi.org/10.1590/s0004-282x2004000300003>
- (42) Jesper (J.) Ronager, Mads (M.) Ravnborg, Ingrid (I.) Hermansen, Sissel (S.) Vorstrup (2001). Immunoglobulin Treatment Versus Plasma Exchange in Patients with Chronic Moderate to Severe Myasthenia Gravis. *Artificial Organs*, 25 (12), 967-973. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1594.2001.06717.x>
- (43) Barth, D., Nouri, M. N., Ng, E. Y. K., Nwe, P., & Bril, V. (2011). Comparison of IVIg and PLEX in patients with myasthenia gravis. *Neurology*, 76(23), 2017–2023. <https://doi.org/10.1212/wnl.0b013e31821e5505>
- (44) Pascuzzi, R. M., Coslett, H. B., & Johns, T. C. (1984). Long-term corticosteroid treatment of myasthenia gravis: Report of 116 Patients. *Annals of Neurology*, 15(3), 291–298. <https://doi.org/10.1002/ana.410150316>
- (45) Monsul, N., Patwa, H. S., Knorr, A. M., Lesser, R. L., & Goldstein, J. (2004). The effect of prednisone on the progression from ocular to generalized myasthenia gravis. *Journal of the Neurological Sciences*, 217(2), 131–133. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2003.08.017>
- (46) Palace, J., Newsom-Davis, J., & Lecky, B. (1998). A randomized double-blind trial of prednisolone alone or with azathioprine in myasthenia gravis. *Neurology*, 50(6), 1778–1783. <https://doi.org/10.1212/wnl.50.6.1778>
- (47) Mertens, H., Hertel, G., Reuther, P., & Ricker, K. (1981). Effect of immunosuppressive drugs (azathioprine). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 377(1 Myasthenia Gr), 691–699. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1981.tb33767.x>

- (48) Relling, M. V., Gardner, E. E., Sandborn, W. J., Schmiegelow, K., Pui, C., Yee, S. W., Stein, C. M., Carrillo, M., Evans, W. E., & Klein, T. E. (2011). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89(3), 387–391. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.320>
- (49) Tindall, R. S. A., Cubeta, M. A., Phillips, J. L., Greenlee, R. G., Wells, L., & Belendiuk, G. (1987). Preliminary results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial of cyclosporine in myasthenia gravis. *The New England Journal of Medicine*, 316(12), 719–724. <https://doi.org/10.1056/nejm198703193161205>
- (50) Heckmann, J. M., Rawoot, A., Bateman, K., Renison, R., & Badri, M. (2011). A single-blinded trial of methotrexate versus azathioprine as steroid-sparing agents in generalized myasthenia gravis. *BMC Neurology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2377-11-97>
- (51) Pasnoor, M., He, J., Herbelin, L., Dimachkie, M. M., & Barohn, R. J. (2012). Phase II trial of methotrexate in myasthenia gravis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1275(1), 23–28. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06804.x>
- (52) Nicolas (N.) Collongues, Olivier (O.) Casez, Arnaud (A.) Lacour, Christine (C.) Tranchant, Patrick (P.) Vermersch, Jerome (J.) De Seze, Christine (C.) Lebrun (2012). Rituximab in refractory and non-refractory myasthenia: A retrospective multicenter study. *Muscle & Nerve*, 46 (5), 687-691. <https://doi.org/10.1002/mus.23412>
- (53) Díaz-Manera, J., Martinez-Hernandez, E., Querol, L., Klooster, R., Rojas-García, R., Suárez-Calvet, X., Muñoz-Blanco, J. L., Mazia, C., Straasheijm, K. R., Gallardo, E., Juárez, C., Verschuuren, J. J., & Illa, I. (2012). Long-lasting treatment effect of rituximab in MuSK myasthenia. *Neurology*, 78(3), 189–193. <https://doi.org/10.1212/wnl.0b013e3182407982>
- (54) Keesey, J. (2004). Clinical evaluation and management of myasthenia gravis. *Muscle & Nerve*, 29(4), 484–505. <https://doi.org/10.1002/mus.20030>
- (55) Kumar, V., & Kaminski, H. J. (2010). Treatment of myasthenia gravis. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 11(1), 89–96. <https://doi.org/10.1007/s11910-010-0151-1>
- (56) Pompeo, E., Tacconi, F., Massa, R., Mineo, D., Nahmias, S., & Mineo, T. C. (2009). Long-term outcome of thoracoscopic extended thymectomy for

nonthymomatous myasthenia gravis☆☆☆. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 36(1), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2009.02.021>

- (57) Chia, R., Saez-Atienzar, S., Murphy, N. J., Chiò, A., Blauwendraat, C., Roda, R. H., Tienari, P. J., Kaminski, H. J., Ricciardi, R., Guida, M., De Rosa, A., Petrucci, L., Evoli, A., Provenzano, C., Drachman, D. B., & Traynor, B. J. (2022). Identification of genetic risk loci and prioritization of genes and pathways for myasthenia gravis: a genome-wide association study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.2108672119>
- (58) Namba, T. (1971). Familial myasthenia gravis. *Archives of Neurology*, 25(1), 49. <https://doi.org/10.1001/archneur.1971.00490010059009>
- (59) Ramanujam, R., Pirskanen, R., Ramanujam, S., & Hammarström, L. (2011). Utilizing twins concordance rates to infer the predisposition to myasthenia gravis. *Twin Research and Human Genetics*, 14(2), 129–136. <https://doi.org/10.1375/twin.14.2.129>
- (60) Salvado, M., Canela, M., Ponseti, J. M., Lorenzo, L. E., Garcia, C., Cazorla, S., Gili, G., Raguer, N., & Gamez, J. (2016). Study of the prevalence of familial autoimmune myasthenia gravis in a Spanish cohort. *Journal of the Neurological Sciences*, 360, 110–114. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.11.049>
- (61) Rasool, S., Khan, T., & Haq, A. (2019). Genes involved in autoimmune disease Myasthenia Gravis. *Journal of Neurology and Stroke*. <https://doi.org/10.15406/jnsk.2019.09.00347>
- (62) Gregersen, P. K., Kosoy, R., Lee, A., Lamb, J. A., Sussman, J., McKee, D., Simpfendorfer, K. R., Pirskanen-Matell, R., Piehl, F., Pan-Hammarström, Q., Verschuuren, J. J., Titulaer, M. J., Niks, E. H., Marx, A., Ströbel, P., Tackenberg, B., Pütz, M., Maniaol, A. H., Elsaï, A., . . . Seldin, M. F. (2012). Risk for myasthenia gravis maps to a¹⁵¹Pro→Ala change in TNIP1 and to human leukocyte antigen-B*08. *Annals of Neurology*, 72(6), 927–935. <https://doi.org/10.1002/ana.23691>
- (63) Renton, A. E., Pliner, H. A., Provenzano, C., Evoli, A., Ricciardi, R., Nalls, M. A., Marangi, G., Abramzon, Y., Arepalli, S., Chong, S., Hernandez, D. G., Johnson, J. O., Bartoccioni, E., Scuderi, F., Maestri, M., Gibbs, J. R., Errichiello, E., Chiò, A., Restagno, G., . . . Traynor, B. J. (2015). A genome-wide association study of myasthenia gravis. *JAMA Neurology*, 72(4), 396. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.4103>

- (64) Topaloudi, A., Zagoriti, Z., Flint, A. C., Martinez, M., Yang, Z., Tsetsos, F., Christou, Y., Lagoumintzis, G., Yannaki, E., Zamba-Papanicolaou, E., Tzartos, S. J., Tsekmekidou, X., Kotsa, K., Maltezos, E., Wu, A. W., Papazoglou, D., Passadakis, P., Roumeliotis, A., Roumeliotis, S., . . . Paschou, P. (2021). Myasthenia gravis genome-wide association study implicates AGRN as a risk locus. *Journal of Medical Genetics*, 59(8), 801–809. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2021-107953>
- (65) Giraud, M., Vandiedonck, C., & Garchon, H. (2008). *Genetic Factors in Autoimmune Myasthenia Gravis*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1132(1), 180–192. <https://doi.org/10.1196/annals.1405.027>
- (66) Hong, Y., Li, H., Skeie, G. O., Romi, F., Hao, H., Zhang, X., Gao, X., Owe, J. F., & Gilhus, N. E. (2016). Autoantibody profile and clinical characteristics in a cohort of Chinese adult myasthenia gravis patients. *Journal of Neuroimmunology*, 298, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.07.001>
- (67) Bogdanos, D. P., Smyk, D. S., Rigopoulou, E. I., Mytilinaiou, M. G., Heneghan, M. A., Selmi, C., & Gershwin, M. E. (2012). Twin studies in autoimmune disease: Genetics, gender and environment. *Journal of Autoimmunity*, 38(2–3), J156–J169. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2011.11.003>
- (68) Golfiopoulou, R., Papageorgiou, L., Efthimiadou, A., Bacopoulou, F., Chrousos, G. P., Eliopoulos, E., & Vlachakis, D. (2021). Clinical Genomic, phenotype and epigenetic insights into the pathology, autoimmunity and weight management of patients with Myasthenia Gravis (Review). *Molecular Medicine Reports*, 24(1). <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12151>
- (69) Lin, J., Tao, L., Deng, L., Zhou, R., Lou, S., Chen, S., Chen, X., Lu, C., Li, P., & Hu, B. (2023). Epigenome-wide DNA methylation analysis of myasthenia gravis. *FEBS Open Bio*. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13656>
- (70) Zhang, L., Lu, Q., & Chang, C. J. (2020). Epigenetics in health and disease. In *Springer eBooks* (pp. 3–55). https://doi.org/10.1007/978-981-15-3449-2_1
- (71) Wang, L., Wang, F., & Gershwin, M. E. (2015). Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of Internal Medicine*, 278(4), 369–395. <https://doi.org/10.1111/joim.12395>
- (72) Cumano, A., Berthault, C., Ramond, C., Petit, M., Golub, R., Bandeira, A., & Pereira, P. (2019). New Molecular Insights into Immune Cell Development. *Annual Review of Immunology*, 37(1), 497–519. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041319>

- (73) Coit, P., Jeffries, M. A., Altorok, N., Dozmorov, M. G., Koelsch, K. A., Wren, J. D., Merrill, J. T., McCune, W., & Sawalha, A. H. (2013). Genome-wide DNA methylation study suggests epigenetic accessibility and transcriptional poisoning of interferon-regulated genes in naïve CD4⁺ T cells from lupus patients. *Journal of Autoimmunity*, 43, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.04.003>
- (74) 78) Mamrut, S., Avidan, N., Truffault, F., Staun-Ram, E., Sharshar, T., Eymard, B., Frenkian, M., Pitha, J., De Baets, M. H., Servais, L., Berrih-Aknin, S., & Miller, A. (2017). Methylome and transcriptome profiling in Myasthenia Gravis monozygotic twins. *Journal of Autoimmunity*, 82, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.05.005>
- (75) Cullen, B. R. (2004). Transcription and processing of human microRNA precursors. *Molecular Cell*, 16(6), 861–865. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.12.002>
- (76) Wu, H., Yang, L., & Chen, L. (2017). The diversity of long noncoding RNAs and their generation. *Trends in Genetics*, 33(8), 540–552. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.05.004>
- (77) *RNACentral*. (n.d.). <https://rnacentral.org/rna/URS000039DE2D/9606>
- (78) Wilusz, J. E. (2018). A 360° view of circular RNAs: From biogenesis to functions. *Wiley Interdisciplinary Reviews - Rna*, 9(4). <https://doi.org/10.1002/wrna.1478>
- (79) Golabi, M., Yousefi, Z., Jafarinia, M., Montazeri, M., Bastan, S., Ghezelbash, B., & Eskandari, N. (2022). miRNAs as the important regulators of myasthenia gravis: involvement of major cytokines and immune cells. *Immunologic Research*, 71(2), 153–163. <https://doi.org/10.1007/s12026-022-09342-4>
- (80) Cron, M. A., Guillochon, E., Kusner, L. L., & Panse, R. L. (2020). Role of Mirnas in normal and myasthenia gravis thymus. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01074>
- (81) Punga, A. R., Andersson, M., Alimohammadi, M., & Punga, T. (2015). Disease specific signature of circulating miR-150-5p and miR-21-5p in myasthenia gravis patients. *Journal of the Neurological Sciences*, 356(1–2), 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.06.019>
- (82) Punga, T., Panse, R. L., Andersson, M., Truffault, F., Berrih-Aknin, S., & Punga, A. R. (2013). Circulating miRNA s in myasthenia gravis: miR-150-5p as a

new potential biomarker. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 1(1), 49–58. <https://doi.org/10.1002/acn3.24>

- (83) (87) Sabre, L., Guptill, J. T., Russo, M. L., Juel, V. C., Massey, J. M., Howard, J. P., Hobson-Webb, L. D., & Punga, A. R. (2018). Circulating microRNA plasma profile in MuSK+ myasthenia gravis. *Journal of Neuroimmunology*, 325, 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.10.003>
- (84) Punga, T., Bartoccioni, E., Lewandowska, M. K., Damato, V., Evoli, A., & Punga, A. R. (2016). Disease specific enrichment of circulating let-7 family microRNA in MuSK+ myasthenia gravis. *Journal of Neuroimmunology*, 292, 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.01.003>
- (85) Freilich, R. H., Woodbury, M. E., & Ikezu, T. (2013). Integrated expression profiles of mRNA and MIRNA in polarized primary murine microglia. *PLOS ONE*, 8(11), e79416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079416>
- (86) Ke, J., Dong, J., Cui, J., Yu, L., & Li, H. (2021). LncRNA and mRNA expression associated with myasthenia gravis in patients with thymoma. *Thoracic Cancer*, 13(1), 15–23. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.14201>
- (87) Zhang, J., Cao, Y., Lu, X., Wang, X., Kong, X., Bo, C., Li, S., Bai, M., Jiao, Y., Gao, H., Yao, X., Ning, S., Wang, L., & Zhang, H. (2020). Identification of the regulatory role of LNCRNA SNHG16 in myasthenia gravis by constructing a competing endogenous RNA network. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 19, 1123–1133. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.01.005>
- (88) Lawrence, M., Daujat, S., & Schneider, R. J. (2016). Lateral Thinking: How Histone modifications regulate gene expression. *Trends in Genetics*, 32(1), 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.007>
- (89) Jürgen (J.) Dieker, Sylviane (S.) Muller (2009). Epigenetic Histone Code and Autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol.*, 39 (1), 78-84. <https://doi.org/10.1007/s12016-009-8173-7>
- (90) He, H., Hu, Z., Xiao, H., Zhou, F., & Yang, B. (2018). The tale of histone modifications and its role in multiple sclerosis. *Human Genomics*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s40246-018-0163-5>
- (91) Bahaiddin, A., Ivannikov, M. V., Wang, Z., Jamaluddin, M., Curtis, K., Ibtehaj, N., Yeager, L., Soong, L., Fang, X., & Huda, R. (2022). Histone deacetylase isoforms differentially modulate inflammatory and autoantibody responses in a

- mouse model of myasthenia gravis. *Frontiers in Neurology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.804113>
- (92) Li, S., Liu, H., Ruan, Z., Guo, R., Sun, C., Tang, Y., Huang, X., Gao, T., Hao, S., Li, H., Song, N., Su, Y., Ning, F., Li, Z., & Chang, T. (2023). Landscape analysis of m6A modification regulators related biological functions and immune characteristics in myasthenia gravis. *Journal of Translational Medicine*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-023-03947-5>
- (93) [Twin studies of myasthenia]. (1997). PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9343476/>
- (94) Namba (T.) Toshio, Shapiro (M.) Marjorie, Brunner (N. G.) Norman G., Grob (D.) Dieter (1971). Myasthenia gravis occurring in twins. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 34 (5) 531-534. <https://doi.org/10.1136/jnnp.34.5.531>
- (95) Ramanujam, R., Pirskanen, R., Ramanujam, S., & Hammarström, L. (2011b). Utilizing twins concordance rates to infer the predisposition to myasthenia gravis. *Twin Research and Human Genetics*, 14(2), 129–136. <https://doi.org/10.1375/twin.14.2.129>
- (96) Aranow, C. (2011). Vitamin D and the immune system. *Journal of Investigative Medicine*, 59(6), 881–886. <https://doi.org/10.2310/jim.0b013e31821b8755>
- (97) Askmark, H., Haggård, L., Nygren, I., & Punga, A. R. (2012). Vitamin D deficiency in patients with myasthenia gravis and improvement of fatigue after supplementation of vitamin D3: a pilot study. *European Journal of Neurology*, 19(12), 1554–1560. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2012.03773.x>
- (98) Dai, Y., Wu, F., Ni, S., Guo, S., Lu, L., & Zhao, X. (2023). Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with the risk and features of myasthenia gravis in the Han Chinese population. *Immunologic Research*, 71(3), 404–412. <https://doi.org/10.1007/s12026-022-09349-x>
- (99) [Role of the thymus in the physiopathology of myasthenia]. (1995, January 1). PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7676132/>
- (100) Oertelt-Prigione, S. (2012). The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmunity Reviews*, 11(6–7), A479–A485. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.11.022>

- (101) Straub, R. H. (2007). The complex role of estrogens in inflammation. *Endocrine Reviews*, 28(5), 521–574. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0001>
- (102) Tai, P., Wang, J., Jin, H., Song, X., Yan, J., Kang, Y., Zhao, L., An, X., Du, X., Chen, X., Shu, G., Xia, G., & Wang, B. (2007). Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *Journal of Cellular Physiology*, 214(2), 456–464. <https://doi.org/10.1002/jcp.21221>
- (103) Ramirez, C., De Seze, J., Delrieu, O., Stojkovic, T., Delalande, S., Fourrier, F., Leys, D., Defebvre, L., Destée, A., & Vermersch, P. (2006). Myasthénie auto-immune et grossesse : évolution clinique, accouchement et post-partum. *Revue Neurologique*, 162(3), 330–338. [https://doi.org/10.1016/s0035-3787\(06\)75019-6](https://doi.org/10.1016/s0035-3787(06)75019-6)
- (104) Sheikh, S. J., Alvi, U. S., Soliven, B., & Rezania, K. (2021). Drugs that induce or cause deterioration of myasthenia gravis: an update. *Journal of Clinical Medicine*, 10(7), 1537. <https://doi.org/10.3390/jcm10071537>
- (105) Punga, A. R., & Liik, M. (2020). Botulinum toxin injections associated with suspected myasthenia gravis: An underappreciated cause of MG-like clinical presentation. *Clinical Neurophysiology Practice*, 5, 46–49. <https://doi.org/10.1016/j.cnp.2020.01.002>
- (106) Kanai, T., Uzawa, A., Kawaguchi, N., Oda, F., Ozawa, Y., Himuro, K., & Kuwabara, S. (2019). Predictive score for oral corticosteroid-induced initial worsening of seropositive generalized myasthenia gravis. *Journal of the Neurological Sciences*, 396, 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.10.018>
- (107) Cavalcante, P., Cufi, P., Mantegazza, R., Berrih-Aknin, S., Bernasconi, P., & Panse, R. L. (2013). Etiology of myasthenia gravis: Innate immunity signature in pathological thymus. *Autoimmunity Reviews*, 12(9), 863–874. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.03.010>
- (108) Savino (W.) Wilson (2006). The Thymus Is a Common Target Organ in Infectious Diseases. *PLoS Pathog.*, 2 (6) e62. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020062>
- (109) Cavalcante, P., Cufi, P., Mantegazza, R., Berrih-Aknin, S., Bernasconi, P., & Panse, R. L. (2013b). Etiology of myasthenia gravis: Innate immunity signature in pathological thymus. *Autoimmunity Reviews*, 12(9), 863–874. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.03.010>

- (110) Leis (A. A.) A. Arturo, Szatmary (G.) Gabriella (MD), Ross (M.) Mark, Stokic (D. D. S.) DSc Dobrivoje S. (MD) (2013). West nile virus infection and myasthenia gravis. *Muscle Nerve.*, 49 (1), 26-29. <https://doi.org/10.1002/mus.23869>
- (111) Berrih-Aknin, S., & Panse, R. L. (2014b). Myasthenia gravis: A comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms. *Journal of Autoimmunity*, 52, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.12.011>
- (112) Lin, Y., Chang, T., Lin, J., Sun, C., Wei, C., Zhao, J., Liu, R., Yang, K., & Li, Z. (2022). Regulatory B cells are decreased and functionally impaired in myasthenia gravis patients. *Frontiers in Neurology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.808322>
- (113) Berrih-Aknin, S., Morel, E., Raimond, F., Safar, D., Gaud, C., Jp, B., P, L., & Bach, J. (1987). The role of the thymus in myasthenia gravis: Immunohistological and immunological studies in 115 cases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 505(1 Myasthenia Gr), 50–70. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb51282.x>
- (114) Panse, R. L., Cizeron-Clairac, G., Bismuth, J., & Berrih-Aknin, S. (2006). Microarrays reveal distinct gene signatures in the thymus of seropositive and seronegative myasthenia gravis patients and the role of CC chemokine ligand 21 in thymic hyperplasia. *Journal of Immunology*, 177(11), 7868–7879. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.7868>
- (115) Cizeron-Clairac, G., Panse, R. L., Frenkian-Cuvelier, M., Meraouna, A., Truffault, F., Bismuth, J., Mussot, S., De Rosbo, N. K., & Berrih-Aknin, S. (2008). Thymus and Myasthenia Gravis: What can we learn from DNA microarrays? *Journal of Neuroimmunology*, 201–202, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.06.028>
- (116) Piccolo, G., Franciotta, D., Versino, M., Alfonsi, E., Lombardi, M., & Poma, G. (1996). Myasthenia gravis in a patient with chronic active hepatitis C during interferon-alpha treatment. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 60(3), 348. <https://doi.org/10.1136/jnnp.60.3.348>
- (117) Donisiotis (J.) J, (2004). Development of myasthenia gravis in two patients with multiple sclerosis following interferon treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75 (7) 1079. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.028233>

- (118) Meloni, A., Furcas, M., Cetani, F., Marcocci, C., Falorni, A., Perniola, R., Pura, M., Wolff, A. S. B., Husebye, E. S., Lilic, D., Ryan, K. R., Gennery, A. R., Cant, A. J., Abinun, M., Spickett, G. P., Arkwright, P. D., Denning, D. W., Costigan, C., Dominguez, M. J., . . . Meager, A. (2008). Autoantibodies against Type I Interferons as an Additional Diagnostic Criterion for Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type I. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(11), 4389–4397. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0935>
- (119) Lin, Q., Dong, C., & Cooper, M. D. (1998). Impairment of T and B Cell Development by Treatment with a Type I Interferon. *Journal of Experimental Medicine*, 187(1), 79–87. <https://doi.org/10.1084/jem.187.1.79>
- (120) Poëa-Guyon, S., Christadoss, P., Panse, R. L., Guyon, T., De Baets, M. H., Wakkach, A., Bidault, J., Tzartos, S. J., & Berrih-Aknin, S. (2005). Effects of cytokines on acetylcholine receptor expression: Implications for myasthenia gravis. *Journal of Immunology*, 174(10), 5941–5949. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.5941>
- (121) (123) Interferon-gamma, interleukin-4 and transforming growth factor-beta mRNA expression in multiple sclerosis and myasthenia gravis. (1994). PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7732782/>
- (122) Guptil (J.T.) Jeffrey, Yi (J.S.) John S., Sanders (D.B.) Donald B., Guidon (A.C.) Amanda C., Juel (V.C.) Vern, Massey (J.M.) Janice M., Howard (J.P.) James P., Scuderi (F.) Flavia, Bartoccioni (E.) Emanuela, Evoli (A.) Amelia, Weinhold (K.J.) Kent J. (2015). Characterization of B cells in muscle-specific kinase antibody myasthenia gravis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation* 2 (2), e77. <https://doi.org/10.1212/nxi.0000000000000077>
- (123) Hosseini, A. M., Majidi, J., Baradaran, B., & Yousefi, M. (2015). Toll-like receptors in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(Suppl 1), 605–614. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.082>
- (124) Cufi, P., Dragin, N., Weiss, J., Martinez-Martinez, P., De Baets, M. H., Roussin, R., Fadel, E., Berrih-Aknin, S., & Panse, R. L. (2012). Implication of double-stranded RNA signaling in the etiology of autoimmune myasthenia gravis. *Annals of Neurology*, 73(2), 281–293. <https://doi.org/10.1002/ana.23791>
- (125) Bernasconi, P., Barberis, M., Baggi, F., Passerini, L., Cannone, M., Arnoldi, E., Novellino, L., Cornelio, F., & Mantegazza, R. (2005). Increased Toll-Like Receptor 4 Expression in Thymus of Myasthenic Patients with Thymitis and

- Thymic Involution. *American Journal of Pathology*, 167(1), 129–139.
[https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62960-4](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62960-4)
- (126) <https://www.ctsnet.org/events/17th-international-congress-autoimmunity>
- (127) Bogdanos, D. P., Smyk, D. S., Rigopoulou, E. I., Sakkas, L. I., & Shoenfeld, Y. (2015). Infectomics and autoinfectomics: a tool to study infectious-induced autoimmunity. *Lupus*, 24(4–5), 364–373. <https://doi.org/10.1177/0961203314559088>
- (128) Bogdanos, D. P., Smyk, D. S., Invernizzi, P., Rigopoulou, E. I., Blank, M., Pouria, S., & Shoenfeld, Y. (2013). Infectome: A platform to trace infectious triggers of autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 12(7), 726–740.
<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.12.005>
- (129) Rostgaard, K., Balfour, H. H., Jarrett, R. F., Erikstrup, C., Pedersen, O., Ullum, H., Nielsen, L. K., Voldstedlund, M., & Hjalgrim, H. (2019). Primary Epstein-Barr virus infection with and without infectious mononucleosis. *PLOS ONE*, 14(12), e0226436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226436>
- (130) Dunmire, S. K., Hogquist, K. A., & Balfour, H. H. (2015). Infectious mononucleosis. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 211–240). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_9
- (131) Dunmire, S. K., Verghese, P. S., & Balfour, H. H. (2018). Primary Epstein-Barr virus infection. *Journal of Clinical Virology*, 102, 84–92.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.03.001>
- (132) Chan, K. M., Tam, J. S., Peiris, J. S. M., Seto, W., & Ng, M. K. (2001). Epstein–Barr virus (EBV) infection in infancy. *Journal of Clinical Virology*, 21(1), 57–62. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(01\)00149-4](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(01)00149-4)
- (133) Pender, M. P. (2010). The essential role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of multiple sclerosis. *The Neuroscientist*, 17(4), 351–367.
<https://doi.org/10.1177/1073858410381531>
- (134) Hedström, A. K., Bomfim, I. L., Hillert, J., Olsson, T., & Alfredsson, L. (2014). Obesity interacts with infectious mononucleosis in risk of multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, 22(3), 578.
<https://doi.org/10.1111/ene.12620>
- (135) Majerciak, V., Yang, W., Zheng, J., Zhu, J., & Zheng, Z. (2019). A genome-wide Epstein-Barr virus polyadenylation map and its antisense RNA to EBNA. *Journal of Virology*, 93(2). <https://doi.org/10.1128/jvi.01593-18>

- (136) Sakamoto, K., Sekizuka, T., Uehara, T., Hishima, T., Mine, S., Fukumoto, H., Sato, Y., Hasegawa, H., Kuroda, M., & Katano, H. (2017). Next-generation sequencing of miRNAs in clinical samples of Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas. *Cancer Medicine*, 6(3), 605–618. <https://doi.org/10.1002/cam4.1006>
- (137) Moss, W. N., Lee, N., Pimienta, G., & Steitz, J. A. (2013). RNA families in Epstein–Barr virus. *RNA Biology*, 11(1), 10–17. <https://doi.org/10.4161/rna.27488>
- (138) Tarbouriech, N., Buisson, M., Géoui, T., Daenke, S., Cusack, S., & Burmeister, W. P. (2006). Structural genomics of the Epstein–Barr virus. *Acta Crystallographica Section D-biological Crystallography*, 62(10), 1276–1285. <https://doi.org/10.1107/s0907444906030034>
- (139) *Introduction to the human γ -herpesviruses*. (2007). PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21348088/>
- (140) Hutt-Fletcher, L. M. (2015). EBV glycoproteins: where are we now? *Future Virology*, 10(10), 1155–1162. <https://doi.org/10.2217/fvl.15.80>
- (141) Buschle, A., & Hammerschmidt, W. (2020). Epigenetic lifestyle of Epstein-Barr virus. *Seminars in Immunopathology*, 42(2), 131–142. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00792-2>
- (142) Hammerschmidt, W. (2015). The epigenetic life cycle of Epstein–Barr virus. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 103–117). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_6
- (143) Hatton, O., Harris-Arnold, A., Schaffert, S., Krams, S. M., & Martinez, O. M. (2014). The interplay between Epstein–Barr virus and B lymphocytes: implications for infection, immunity, and disease. *Immunologic Research*, 58(2–3), 268–276. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8496-1>
- (144) Houen, G., & Trier, N. H. (2021). Epstein-Barr virus and systemic autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.587380>
- (145) Crawford, D. H. (2001). Biology and disease associations of Epstein–Barr virus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 356(1408), 461–473. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0783>
- (146) Thorley-Lawson, D. A., & Babcock, G. J. (1999). A model for persistent infection with Epstein-Barr virus: The stealth virus of human B cells. *Life Sciences*, 65(14), 1433–1453. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(99\)00214-3](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(99)00214-3)

- (147) Structural and Mechanistic Insights into the Tropism of Epstein-Barr Virus. (2016). *Molecules and Cells*, 39(4), 286–291. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0066>
- (148) Shannon-Lowe, C., & Rowe, M. (2014). Epstein Barr virus entry; kissing and conjugation. *Current Opinion in Virology*, 4, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.12.001>
- (149) Heldwein, E. E. (2016). gH/gL supercomplexes at early stages of herpesvirus entry. *Current Opinion in Virology*, 18, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.01.010>
- (150) Rensing, M. E., Van Gent, M., Gram, A. M., Hooykaas, M. J. G., Piersma, S. J., & Wiertz, E. J. H. J. (2015). Immune evasion by Epstein-Barr virus. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 355–381). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_12
- (151) Van Gent, M., Gram, A. M., Boer, I. G. J., Geerdink, R. J., Lindenberg, M. F. S., Lebbink, R. J., Wiertz, E. J. H. J., & Rensing, M. E. (2015). Silencing the shutoff protein of Epstein–Barr virus in productively infected B cells points to (innate) targets for immune evasion. *Journal of General Virology*, 96(4), 858–865. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000021>
- (152) Wilson, J. Y., Manet, E., Gruffat, H., Busson, P., Blondel, M., & Fåhræus, R. (2018). EBNA1: Oncogenic Activity, Immune Evasion and Biochemical Functions Provide Targets for Novel Therapeutic Strategies against Epstein-Barr Virus-Associated Cancers. *Cancers*, 10(4), 109. <https://doi.org/10.3390/cancers10040109>
- (153) Lista, M. J., Martins, R., Billant, O., Contesse, M., Findakly, S., Pochard, P., Daskalogianni, C., Beauvineau, C., Guetta, C., Jamin, C., Teulade-Fichou, M., Fåhræus, R., Voisset, C., & Blondel, M. (2017). Nucleolin directly mediates Epstein-Barr virus immune evasion through binding to G-quadruplexes of EBNA1 mRNA. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms16043>
- (154) Daskalogianni, C., Pyndiah, S., Apcher, S., Mazars, A., Manoury, B., Ammari, N., Nylander, K., Voisset, C., Blondel, M., & Fåhræus, R. (2014). Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 and ZEBRA: targets for therapeutic strategies against EBV-carrying cancers. *The Journal of Pathology*, 235(2), 334–341. <https://doi.org/10.1002/path.4431>
- (155) Quinn, L. L., Williams, L., White, C. E., Forrest, C., Zuo, J., & Rowe, M. (2016). The Missing Link in Epstein-Barr Virus Immune Evasion: the BDLF3 Gene

Induces Ubiquitination and Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I (MHC-I) and MHC-II. *Journal of Virology*, 90(1), 356–367. <https://doi.org/10.1128/jvi.02183-15>

- (156) Ressing, M. E., Van Leeuwen, D., Verreck, F. a. W., Gomez, R., Heemskerk, B., Toebes, M., Mullen, M. A., Jardetzky, T. S., Longnecker, R., Schilham, M. W., Ottenhoff, T. H. M., Neefjes, J., Schumacher, T. N., Hutt-Fletcher, L. M., & Wiertz, E. J. H. J. (2003). Interference with T cell receptor–HLA-DR interactions by Epstein–Barr virus gp42 results in reduced T helper cell recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), 11583–11588. <https://doi.org/10.1073/pnas.2034960100>
- (157) Lizasa, H., Kim, H., Kartika, A. V., Kanehiro, Y., & Yoshiyama, H. (2020). Role of viral and host microRNAs in immune regulation of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00367>
- (158) Albanese, M., Tagawa, T., Buschle, A., & Hammerschmidt, W. (2017). MicroRNAs of Epstein-Barr virus control innate and adaptive antiviral immunity. *Journal of Virology*, 91(16). <https://doi.org/10.1128/jvi.01667-16>
- (159) Van Gent, M., Braem, S. G. E., De Jong, A., Delagic, N., Peeters, J. G. C., Boer, I. G. J., Moynagh, P. N., Kremmer, E., Wiertz, E. J. H. J., Ovaa, H., Griffin, B. D., & Ressing, M. E. (2014). Epstein-Barr Virus Large Tegument Protein BPLF1 Contributes to Innate Immune Evasion through Interference with Toll-Like Receptor Signaling. *PLOS Pathogens*, 10(2), e1003960. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003960>
- (160) Means, R. E. (2007). *Human gammaherpesvirus immune evasion strategies*. Human Herpesviruses - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47420/>
- (161) Fares, S., Spiess, K., Olesen, E. T. B., Zuo, J., Jackson, S. E., Kledal, T. N., Wills, M. R., & Rosenkilde, M. M. (2019). Distinct roles of extracellular domains in the Epstein-Barr virus-encoded BILF1 receptor for signaling and major histocompatibility complex Class I downregulation. *MBio*, 10(1). <https://doi.org/10.1128/mbio.01707-18>
- (162) Moore, K. R., Vieira, P. C., Fiorentino, D., Trounstein, M. L., Khan, T. M., & Mosmann, T. R. (1990). Homology of cytokine Synthesis Inhibitory Factor (IL-10)

- to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science*, 248(4960), 1230–1234.
<https://doi.org/10.1126/science.2161559>
- (163) Salek-Ardakani, S., Arrand, J. R., & Mackett, M. (2002). Epstein–Barr virus encoded interleukin-10 inhibits HLA-Class I, ICAM-1, and B7 expression on human monocytes: Implications for immune evasion by EBV. *Virology*, 304(2), 342–351.
<https://doi.org/10.1006/viro.2002.1716>
- (164) Yoon, S., Jones, B. C., Logsdon, N. J., Harris, B., Kuruganti, S., & Walter, M. R. (2012). Epstein-Barr virus IL-10 engages IL-10R1 by a two-step mechanism leading to altered signaling properties. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 26586–26595. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.376707>
- (165) Jog, N. R., Chakravarty, E. F., Guthridge, J. M., & James, J. A. (2018). Epstein Barr virus interleukin 10 suppresses anti-inflammatory phenotype in human monocytes. *Frontiers in Immunology*, 9.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02198>
- (166) Hoebe, E. K., Large, T. Y. S. L., Tarbouriech, N., Oosterhoff, D., De Gruijl, T. D., Middeldorp, J. M., & Greijer, A. E. (2012). Epstein-Barr Virus-Encoded BARTF1 Protein is a Decoy Receptor for Macrophage Colony Stimulating Factor and Interferes with Macrophage Differentiation and Activation. *Viral Immunology*, 25(6), 461–470. <https://doi.org/10.1089/vim.2012.0034>
- (167) Elegheert (J.) Jonathan, Bracke (N.) Nathalie, Pouliot (P.) Philippe, Gutsche (I.) Irina, Shkumatov (A.V.) Alexander V., Tarbouriech (N.) Nicolas, Verstraete (K.) Kenneth, Bekaert (A.) Anaïs, Burmeister (W.P.) Wim P., Svergun Dmitri (D.I.), Lambrecht Bart (B.N.), Vergauwen Bjorn (B.N.), Savvides Savvas N. (S.N.) (2012). Allosteric competitive inactivation of hematopoietic CSF-1 signaling by the viral decoy receptor BARTF1. *Nat Struct Mol Biol.*, 19 (9) 938-947.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2367>
- (168) Cavalcante, P., Panse, R. L., Berrih-Aknin, S., Maggi, L., Antozzi, C., Baggi, F., Bernasconi, P., & Mantegazza, R. (2011). The thymus in myasthenia gravis: Site of “innate autoimmunity”? *Muscle & Nerve*, 44(4), 467–484.
<https://doi.org/10.1002/mus.22103>
- (169) Cavalcante, P., Serafini, B., Rosicarelli, B., Maggi, L., Barberis, M., Antozzi, C., Berrih-Aknin, S., Bernasconi, P., Aloisi, F., & Mantegazza, R. (2009). Epstein-barr virus persistence and reactivation in myasthenia gravis thymus. *Annals of Neurology*, NA. <https://doi.org/10.1002/ana.21902>

- (170) Bortone, F., Scandiffio, L., Cavalcante, P., Mantegazza, R., & Bernasconi, P. (2021). Epstein-Barr Virus in Myasthenia Gravis: Key Contributing Factor Linking Innate Immunity with B-Cell-Mediated Autoimmunity. In *IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93777>
- (171) Ryu, W. S. (2016, April 20). *Molecular virology of human pathogenic viruses*. Yonsei University. <https://yonsei.elsevierpure.com/en/publications/molecular-virology-of-human-pathogenic-viruses>
- (172) Britt, W. J. (2008). Manifestations of human cytomegalovirus infection: Proposed mechanisms of acute and chronic disease. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 417–470). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_23
- (173) Pembrey, L., Raynor, P., Griffiths, P. D., Chaytor, S., Wright, J., & Hall, A. J. (2013). Seroprevalence of Cytomegalovirus, Epstein Barr Virus and Varicella Zoster Virus among Pregnant Women in Bradford: A Cohort Study. *PLOS ONE*, 8(11), e81881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081881>
- (174) Goodrum, F. (2016). Human cytomegalovirus latency: Approaching the gordian knot. *Annual Review of Virology*, 3(1), 333–357. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042422>
- (175) Davison, A. J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D. J., Alcendor, D. J., McGeoch, D. J., & Hayward, G. S. (2003). The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome FN1. *Journal of General Virology*, 84(1), 17–28. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18606-0>
- (176) Dolan, A., Cunningham, C. E., Hector, R. D., Hassan-Walker, A. F., Lee, L., Addison, C., Dargan, D. J., McGeoch, D. J., Gatherer, D., Emery, V. C., Griffiths, P. D., Sinzger, C., McSharry, B. P., Wilkinson, G. W. G., & Davison, A. J. (2004). Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *Journal of General Virology*, 85(5), 1301–1312. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79888-0>
- (177) Bradley, A. J., Lurain, N. S., Ghazal, P., Trivedi, U., Cunningham, C. E., Baluchova, K., Gatherer, D., Wilkinson, G. W. G., Dargan, D. J., & Davison, A. J. (2009). High-throughput sequence analysis of variants of human cytomegalovirus strains Towne and AD169. *Journal of General Virology*, 90(10), 2375–2380. <https://doi.org/10.1099/vir.0.013250-0>
- (178) Mocarski, E. S., Bonyhadi, M., Salimi, S., McCune, J. M., & Kaneshima, H. (1993). Human cytomegalovirus in a SCID-hu mouse: thymic epithelial cells are

- prominent targets of viral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(1), 104–108. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.1.104>
- (179) Poole, E., Wills, M. R., & Sinclair, J. (2014). Human Cytomegalovirus Latency: Targeting Differences in the Latently Infected Cell with a View to Clearing Latent Infection. *New Journal of Science*, 2014, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/313761>
- (180) Lee, B. H., Min, C. K., Hancock, M. H., Streblow, D. N., Caposio, P., Goodrum, F., & Yurochko, A. D. (2021). Human cytomegalovirus host interactions: EGFR and host cell signaling is a point of convergence between viral infection and functional changes in infected cells. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.660901>
- (181) Caragliano, E., Bonazza, S., Frascaroli, G., Tang, J., Soh, T. K., Grünewald, K., Bosse, J. B., & Brune, W. (2022). Human cytomegalovirus forms phase-separated compartments at viral genomes to facilitate viral replication. *Cell Reports*, 38(10), 110469. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110469>
- (182) Umashankar, M., & Goodrum, F. (2014). Hematopoietic Long-Term Culture (HLTC) for human cytomegalovirus latency and reactivation. In *Methods in molecular biology* (pp. 99–112). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-788-4_7
- (183) Gugliesi, F., Pasquero, S., Griffante, G., Scutera, S., Albano, C., Pacheco, S. M., Riva, G., Dell'Oste, V., & Biolatti, M. (2021). Human cytomegalovirus and autoimmune diseases: Where are we? *Viruses*, 13(2), 260. <https://doi.org/10.3390/v13020260>
- (184) Pak, C. Y., Cha, C. Y., Rajotte, R. V., McArthur, R. G., & Yoon, J. H. (1990). Human pancreatic islet cell specific 38 kilodalton autoantigen identified by cytomegalovirus-induced monoclonal islet cell autoantibody. *Diabetologia*, 33(9), 569–572. <https://doi.org/10.1007/bf00404146>
- (185) Recombinant cytomegalovirus glycoprotein gB (UL55) induces an autoantibody response to the U1-70 kDa small nuclear ribonucleoprotein. (1999). *PubMed*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199911\)29:11](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199911)29:11)
- (186) Varani, S., Cederarv, M., Feld, S., Tammik, C., Frascaroli, G., Landini, M. P., & Söderberg-Nauclér, C. (2007). Human Cytomegalovirus Differentially Controls B Cell and T Cell Responses through Effects on Plasmacytoid Dendritic Cells. *Journal of Immunology*, 179(11), 7767–7776. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7767>

- (187) Xu, H., Dong, P., Ma, X., Song, D., Xue, D., Xu, R., Lu, H., & He, X. (2017). B cell-activating factor regulates the survival of B lymphocytes infected with human cytomegalovirus. *Immunology Letters*, 187, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.04.013>
- (188) Bano, A. S., Pera, A., Almoukayed, A., Clarke, T., Kirmani, S., Davies, K. M., & Kern, F. (2019). CD28null CD4 T-cell expansions in autoimmune disease suggest a link with cytomegalovirus infection. *F1000Research*, 8, 327. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17119.1>
- (189) Liu, Y., Mu, R., Gao, Y., Dong, J., Zhu, L., Ma, Y., Li, Y., Zhang, H., Han, D. S., Zhang, Y., McInnes, I. B., Zhang, J., Shen, B., Yang, G., & Li, Z. (2016). A cytomegalovirus Peptide-Specific antibody alters natural killer cell homeostasis and is shared in several autoimmune diseases. *Cell Host & Microbe*, 19(3), 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.005>
- (190) Tometten, I., Felgentreff, K., Hönig, M., Hauck, F., Albert, M. H., Niehues, T., Perez, R., Ghosh, S., Gold, R., Stary, J., Formankova, R., Worth, A., Soler-Palacín, P., Garcia-Prat, M., Allende, L. M., Gonzalez-Granado, L. I., Stepensky, P., Di Cesare, S., Scarselli, A., . . . Rohr, J. (2019). Increased proportions of $\gamma\delta$ T lymphocytes in atypical SCID associate with disease manifestations. *Clinical Immunology*, 201, 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.11.006>
- (191) Lunardi, C., Dolcino, M., Peterlana, D., Bason, C., Navone, R., Tamassia, N., Beri, R., Corrocher, R., & Puccetti, A. (2005). Antibodies against Human Cytomegalovirus in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis: A Gene Array Approach. *PLOS Medicine*, 3(1), e2. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030002>
- (192) Probst, V., Trier, N. H., & Houen, G. (2021). Antibodies to cytomegalovirus are elevated in myasthenia gravis. *Clinical Immunology Communications*, 1, 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.clicom.2021.09.001>
- (193) Xu, Y., Chen, M., Xie, L., Zhang, X., Wang, Y., & Gu, X. (2021). Cytomegalovirus-Associated Nephrotic Syndrome in a Patient with Myasthenia Gravis Treated with Azathioprine: A Case Report. *American Journal of Case Reports*, 22. <https://doi.org/10.12659/ajcr.933380>
- (194) *Macrophage Activation Syndrome in a Case of Myasthenia Gravis with Concurrent Cytomegalovirus Infection*. (2020, December 1). PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34018170/>

- (195) Su, M., Jin, S., Jiao, K., Yan, C., Song, J., Xi, J., Zhao, C., Zhou, Z., Zheng, J., & Luo, S. (2022). Pneumonia in myasthenia gravis: Microbial etiology and clinical management. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1016728>
- (196) Ram, M., Barzilai, O., Shapira, Y., Anaya, J., Tincani, A., Stojanovich, L., Bombardieri, S., Bizzaro, N., Kivity, S., Levin, N., & Shoenfeld, Y. (2013). Helicobacter pylori serology in autoimmune diseases – fact or fiction? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51(5). <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0477>
- (197) White, J. M., Winter, J., & Robinson, K. A. (2015). Differential inflammatory response to Helicobacter pylori infection: etiology and clinical outcomes. *Journal of Inflammation Research*, 137. <https://doi.org/10.2147/jir.s64888>
- (198) Eusebi, L. H., Zagari, R. M., & Bazzoli, F. (2014). Epidemiology of Helicobacter pylori Infection. *Helicobacter*, 19, 1–5. <https://doi.org/10.1111/hel.12165>
- (199) Dunne, C., Dolan, B., & Clyne, M. (2014). Factors that mediate colonization of the human stomach by Helicobacter pylori. *World Journal of Gastroenterology*, 20(19), 5610. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i19.5610>
- (200) Robinson, K. A., Letley, D. P., & Kaneko, K. (2017). The Human Stomach in Health and Disease: Infection Strategies by Helicobacter pylori. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 1–26). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50520-6_1
- (201) Worku, M., Sidebotham, R. L., Walker, M., Keshavarz, T., & Karim, Q. A. (1999). The relationship between Helicobacter pylori motility, morphology and phase of growth: implications for gastric colonization and pathology. *Microbiology*, 145(10), 2803–2811. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-10-2803>
- (202) Sharndama, H. C., & Elibe, I. (2022). Helicobacter pylori: an up-to-date overview on the virulence and pathogenesis mechanisms. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(1), 33–50. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00675-0>
- (203) Cheok, Y. Y., Lee, C. Y. Q., Cheong, H. C., Vadivelu, J., Looi, C. Y., Abdullah, S., & Wong, W. F. (2021). An Overview of Helicobacter pylori Survival Tactics in the Hostile Human Stomach Environment. *Microorganisms*, 9(12), 2502. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122502>

- (204) Gobert, A. P., & Wilson, K. T. (2022). Induction and Regulation of the Innate Immune Response in *Helicobacter pylori* Infection. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 13(5), 1347–1363. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2022.01.022>
- (205) Peek, R. M., Miller, G. H., Tham, K. T., Perez-Perez, G. I., Zhao, X., Atherton, J., & Blaser, M. J. (1995). Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *PubMed*, 73(6), 760–770. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8558837>
- (206) Cook, K. F., Letley, D. P., Ingram, R., Staples, E., Skjoldmose, H., Atherton, J., & Robinson, K. A. (2014). CCL20/CCR6-mediated migration of regulatory T cells to the *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Gut*, 63(10), 1550–1559. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306253>
- (207) Smyk, D. S., Koutsoumpas, A., Mytilinaiou, M. G., Rigopoulou, E. I., Sakkas, L. I., & Bogdanos, D. P. (2014). *Helicobacter pylori* and autoimmune disease: Cause or bystander. *World Journal of Gastroenterology*, 20(3), 613. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i3.613>
- (208) Popova, A., Kzhyshkowska, J., Nurgazieva, D., Goerdt, S., & Gratchev, A. (2011). Pro- and anti-inflammatory control of M-CSF-mediated macrophage differentiation. *Immunobiology*, 216(1–2), 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.06.003>
- (209) Wilke, C. M., Bishop, K., Fox, D. A., & Zou, W. (2011). Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends in Immunology*, 32(12), 603–611. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.08.003>
- (210) Ji, J., Sundquist, J., & Sundquist, K. (2018). Family history of autoimmune diseases and risk of gastric cancer: a national cohort study. *European Journal of Cancer Prevention*. <https://doi.org/10.1097/cej.0000000000000420>
- (211) https://eemep.gr/images/Praktika_4o/16.pdf (πρωτόκολλο Πετρίδου Ευαγγελία, 1999).
- (212) Europe PMC. (n.d.). *Europe PMC*. <https://europepmc.org/article/med/3395213>
- (213) Bazillou (M.) M, Fendri (F.) C, Castel (O.) O., Ingrand (P.) Pierre, Fauchère (J. L.) J L (1994). Serum antibody response to the superficial and released components of *Helicobacter pylori*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1 (3), 310-317. <https://doi.org/10.1128/cdli.1.3.310-317.1994>

- (214) Euroimmun protocol ebv.
https://www.euroimmun.com/documents/Indications/Infections/Epstein-Barr-virus/DN_2790_D_UK_A.pdf
- (215) Ευθυμίου Γεώργιος. Διδακτορική διατριβή με τίτλο: «Ο ρόλος της μοριακής μίμησης και της κυτταρικής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας μεταξύ παθογόνων και αυτοαντιγόνων σε ασθενείς με αυτοάνοσα ρευματολογικά και νευρολογικά νοσήματα», 2021. Διαθέσιμο στο Εθνικό Κέντρο Τεκμηρίωσης <https://www.didaktorika.gr/eadd/handle/10442/50629>, <http://dx.doi.org/10.12681/eadd/50629> Τελευταία πρόσβαση: 2023.07.16.
- (216) Dardiotis, E., Tsouris, Z., Mentis, A. A., Siokas, V., Michalopoulou, A., Sokratous, M., Dastamani, M., Bogdanos, D. P., Deretzi, G., & Kountouras, J. (2018). H. pylori and Parkinson's disease: Meta-analyses including clinical severity. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 175, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2018.09.039>
- (217) Efthymiou, G., Dardiotis, E., Liaskos, C., Marou, E., Tsimourtou, V., Rigopoulou, E. I., Scheper, T., Daponte, A., Meyer, W., Sakkas, L. I., Hadjigeorgiou, G. M., & Bogdanos, D. P. (2017). Immune responses against Helicobacter pylori-specific antigens differentiate relapsing remitting from secondary progressive multiple sclerosis. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07801-9>
- (218) Efthymiou, G., Dardiotis, E., Liaskos, C., Marou, E., Tsimourtou, V., Scheper, T., Meyer, W., Daponte, A., Sakkas, L. I., Hadjigeorgiou, G. M., & Bogdanos, D. P. (2016). Anti-hsp60 antibody responses based on Helicobacter pylori in patients with multiple sclerosis: (ir)Relevance to disease pathogenesis. *Journal of Neuroimmunology*, 298, 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.06.009>
- (219) Gkoutzourelas, A., Liaskos, C., Simopoulou, T., Katsiari, C. G., Efthymiou, G., Scheper, T., Meyer, W., Tsirogianni, A., Tsigalou, C., Dardiotis, E., Daoussis, D., Sakkas, L. I., & Bogdanos, D. P. (2020). A study of antigen-specific anti-cytomegalovirus antibody reactivity in patients with systemic sclerosis and concomitant anti-Ro52 antibodies. *Rheumatology International*, 40(10), 1689–1699. <https://doi.org/10.1007/s00296-020-04643-z>
- (220) Efthymiou, G., Dardiotis, E., Liaskos, C., Marou, E., Scheper, T., Meyer, W., Daponte, A., Daoussis, D., Hadjigeorgiou, G. M., Bogdanos, D. P., & Sakkas, L. I. (2019). A comprehensive analysis of antigen-specific antibody responses against

human cytomegalovirus in patients with systemic sclerosis. *Clinical Immunology*, 207, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.07.012>

Marou E., Liaskos C., Efthymiou G., Dardiotis E., Daponte A., Scheper T., Meyer W., Hadjigeorgiou G., Bogdanos D.P., Sakkas L.I., *Increased immunoreactivity against human cytomegalovirus UL83 in systemic sclerosis*. (2017, October 1). PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28240591/>