

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΠΣΕ ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη πολυμορφισμών των γονιδίων  
τής ιντερλευκίνης-1β (IL-1β)  
και τού ανταγωνιστή τού υποδοχέα τής IL-1 (IL-1RN)  
σε ασθενείς με Σκλήρυνση κατά Πλάκας

Σπυρόπουλος Σπυρίδων

Επιβλέπων καθηγητής: Χατζηγεωργίου Γεώργιος

Επιτροπή αξιολόγησης:

Παπαδημητρίου Α., Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.  
Χατζηγεωργίου Γ., Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.  
Σίμος Γ., Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας Π.Θ.

Λάρισα 2003

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ  
Ημερομ. 01.09.2003  
Αρ. Πρωτ. 2565



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 2847/1  
Ημερ. Εισ.: 29/06/2004  
Δωρεά: \_\_\_\_\_  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ  
2003  
ΣΠΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057003



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Μονάδας Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας και Γενετικής, του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, υπό την αιγίδα της Νευρολογικής Κλινικής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ.Χατζηγεωργίου Γ., Επίκουρο Καθηγητή Νευρολογίας, για την επίβλεψη, υποστήριξη και καθοδήγηση μέσα από πολύτιμες συμβουλές καθ' όλη τη διάρκεια τής εκπόνησης τής διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και για τον καθορισμό τού θέματος αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ.Παπαδημητρίου Α., Καθηγητή Νευρολογίας και τον κ.Σίμο Γ., Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας, για τις υποδείξεις και την αξιολόγηση τού συνόλου τής εργασίας, καθώς και τους κυρίους Αγγελάκη Κ., και Δαρδιάτη Θ., για την ουσιαστική συμβολή τους και συνεργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΣΕΛΙΔΑ
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	4
ΙΣΤΟΡΙΑ	5
ΟΡΙΣΜΟΣ	9
ΜΥΕΛΙΝΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΠΛΑΚΑΣ	10
ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ, ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ	15
ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΣΚΠ	18
ΠΟΡΕΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ	20
ΘΕΡΑΠΕΙΑ	25
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΣΚΠ	27
ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	30
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	30
ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	32
IL-1A ΚΑΙ IL-1B	37
IL-1RN	40
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	43
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	44
ΑΣΘΕΝΕΙΣ	44
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	44
ΤΕΧΝΙΚΕΣ	45
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	52
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΙΣΤΟΡΙΑ

Στον αναπτυγμένο κόσμο κάνει ιδιαίτερα αισθητή την παρουσία της με επιπολασμό που στην κεντρική-βόρεια Ευρώπη, Ηνωμένες Πολιτείες και νότιο Καναδά, νότια Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία φτάνει ή και ξεπερνά τα 100 άτομα ανά 100.000 πληθυσμού. Δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις όπου είχε θεωρηθεί ότι ενέσκυψε επιδημικά (π.χ. κοινότητα Macomer στη Σαρδηνία), ενώ τα συμπτώματά της, που οφείλονται σε “διάσπαρτες στο χρόνο και στο χώρο” βλάβες τής λευκής ουσίας τού Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, είναι εμφανή και εύκολα διαγιγνώσκονται. Κι όμως, η Σκλήρυνση Κατά Πλάκας (ΣΚΠ), όπως ονόμασε τη νόσο ο Charcot το 1868, εμφανίζεται μέσα από τα ιατρικά αρχεία να έχει ηλικία μόλις 150 χρόνων, ή το πολύ έξι αιώνων κατά άλλους. Η πιο παλιά αναφορά για ασθενή με συμπτωματολογία που ίσως παραπέμπει σε ΣΚΠ χρονολογείται στον 14<sup>ο</sup> αιώνα όπου μία ολλανδή νεαρή, κατόπιν ατυχήματος, εμφάνισε σταδιακά προσωπικά άλγη, δυσκολία βάδισης και διαταραχές όρασης με φθίνουσα πορεία τής υγείας της έως τού θανάτου της. Έπειτα έχουμε αναφορές από τον 19<sup>ο</sup> πλέον αιώνα όπου μέσω τού προσωπικού ημερολογίου που διατηρούσε ο Augustus d' Este διαπιστώνουμε ότι ο ίδιος εμφάνιζε, ύστερα από ιλαρά, διαταραχές όρασης (οπτική νευρίτιδα ίσως), αδυναμία κάτω άκρων, ακράτεια και άλλα χαρακτηριστικά συμπτώματα έως της παράλυσης και τού θανάτου του ύστερα από 26 χρόνια διαρκώς επιδεινούμενης πορείας τής άγνωστης τότε ασθένειάς του.

Οι παθολογοανατόμοι, πρώτη φορά τον 19<sup>ο</sup> αιώνα, περιλαμβάνουν περιγραφές ή και εικόνες από παθολογικό υλικό που παραπέμπει σε ΣΚΠ, σε γαλλικά και αγγλικά έργα, (Cruveilhier J. και Carswell R. αντίστοιχα).

Όσον αφορά την ονοματολογία, προτού αναγνωρισθεί και καθιερωθεί ως ξεχωριστή κλινική οντότητα η ΣΚΠ, αναφέρεται στα πρώτα παθολογοανατομικά έργα ως “the French disease” (η νόσος των Γάλλων).

Σημαντικά χρονολογικά ορόσημα τής ιστορίας τής ΣΚΠ, αναφορικά προς την νοσολογική της αναγνώριση όπως περιγράφηκε πιο πάνω, αλλά και τη διαγνωστική προσέγγισή της και την τροποποιητική θεραπεία της όπως περιγράφεται σε επόμενα κεφάλαια, παρουσιάζονται συνοπτικά στον ΠΙΝΑΚΑ 1.

## Πίνακας 1

Σημαντικά χρονολογικά ορόσημα  
της ιστορίας, της διαγνωστικής προσέγγισης και της θεραπείας της ΣΚΠ.

- 14<sup>ος</sup> –18<sup>ος</sup>  
αιώνας Περιγραφές, σε προσωπικά αρχεία κυρίως και λιγότερο σε ιατρικά,  
ορισμένων περιπτώσεων που μοιάζουν με ΣΚΠ.
- 19<sup>ος</sup> αιώνας**
- 1828-1829 Περιγραφές σε γαλλικά και αγγλικά έργα παθολογοανατομικού υλικού  
που παραπέμπει σε ΣΚΠ.
- 1838 Σε έργο του Robert Carwell η πρώτη, πιθανώς, απεικόνιση παθολογικών  
βλαβών από ΣΚΠ, προερχόμενων από ανώνυμο γάλλο ασθενή.
- 1849 Ο γερμανός ιατρός Friedrich Theodor von Frerichs κάνει την πρώτη  
κλινική περιγραφή της νόσου σε ασθενή και την πρώτη αναφορά για την  
ύπαρξη υφέσεων στην πορεία της.
- 1868 Ο γάλλος νευρολόγος Jean-Marie Charcot εκδίδει μια περιγραφή  
ορόσημο της κλασσικής νόσου, δίνοντάς της για πρώτη φορά την  
ονομασία 'Σκλήρυνση κατά Πλάκας'. Πριν τον Charcot η ΣΚΠ  
επανειλημμένα συγγέρονταν με μία μορφή παράλυσης (paralysis agitans.)
- 1875 Ανώνυμες δημοσιεύσεις στο περιοδικό Lancet, από το Guy's Hospital,  
περιπτώσεων με το όνομα 'σκλήρυνση κατά νησίδες'.
- 1878 Ο Louis Ranvier ανακαλύπτει τη μυελίνη. Άλλοι ερευνητές αργότερα,  
αναγνωρίζουν μια ειδική κατηγορία κυττάρων που παράγουν μυελίνη, τα  
ολιγοδενδροκύτταρα, και διαπιστώνουν τη σημασία της μυελίνης στην  
αγωγή των νευρικών ώσεων.
- 1897 Ο πολωνός νευρολόγος Josef Francois Felix Babinski παρουσιάζει το  
εκτατικό πελματιαίο αντανακλαστικό, που έκτοτε φέρει το όνομα 'σημείο  
Babinski', που συναντάται σε βλάβες της πυραμιδικής οδού ενώ  
απουσιάζει όταν αυτή είναι άθικτη.
- 20<sup>ος</sup> αιώνας**
- 1916 Ο James Dawson αναγνωρίζει σε νέες βλάβες διήθηση από λεμφοκύτταρα,  
μακροφάγα και πλασματοκύτταρα στον εγκέφαλο, τα οποία οδηγούν σε  
απομυελίνωση.
- 1922 Ανακάλυψη της διαταραχής της σύνθεσης του εγκεφαλονωτιαίου υγρού  
(ENY) σε ασθενείς με ΣΚΠ, και παρατήρηση της ανομοιογενούς  
κατανομής της νόσου ανά τον κόσμο.

- 1935 Ο αμερικανός νευρολόγος Thomas Rivers αναπτύσσει ζωϊκό πειραματικό μοντέλο νόσου παρόμοιας με τη ΣΚΠ, ονομαζόμενη 'πειραματική αλλεργική εγκεφαλομυελίτιδα' (Experimental Allergic Encephalomyelitis, EAE), που χρησιμοποιείται έκτοτε για τη μελέτη της αιτιοπαθογένειας και της θεραπείας της νόσου. Προτείνει μια αυτοάνοση βάση της ασθένειας, όπου η μυελίνη του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) γίνεται στόχος της ανοσιακής απάντησης. Ένα ζωϊκό μοντέλο αναπτύσσεται επίσης από τον Pasteur.
- 1948 Ο ερευνητής Elvin Kabat ανακαλύπτει διαφορές του ηλεκτροφορητικού προφίλ των πρωτεϊνών του ENY ασθενών με ΣΚΠ, διαπιστώνοντας αυξημένη γ-σφαιρίνη, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη εργαστηριακής διαγνωστικής δοκιμής.
- 1955 Ο αμερικανός John Kurtzke αναπτύσσει την Κλίμακα Κατάστασης Αναπηρίας (Disability Status Scale, DSS) για την εκτίμηση της σοβαρότητας της ΣΚΠ. Η βελτίωση (1983) της κλίμακας αυτής (Expanded DSS) είναι μέχρι σήμερα η πρότυπη μέθοδος εκτίμησης της αναπηρίας.
- Πραγματοποιείται η πρώτη συνολική νευροψυχολογική μελέτη ενός μικρού αριθμού ασθενών με ΣΚΠ. Οι ερευνητές Ross και Reitan διαπιστώνουν ότι οι ασθενείς έχουν σοβαρές δυσκολίες στην εκτέλεση δοκιμασιών που απαιτούν μυϊκή ταχύτητα, δύναμη και προσανατολισμό, μέτριου βαθμού δυσκολίες στο σχηματισμό περίληψης και τη σύλληψη εννοιών, αλλά διατηρούν την ικανότητα ομιλίας.
- 1970 Η ομάδα του Augustus Rose αποδεικνύει ότι η ACTH μπορεί να επιταχύνει την ανάρρωση από τη φάση έξαρσης της νόσου. Η αναγνώριση των χαρακτηριστικών της λοίμωξης από αργό λανθάνοντα ιό στα ζώα και τους ανθρώπους οδηγεί τους ερευνητές να επανεξετάσουν το ενδεχόμενο της λοιμώδους βάσης της νόσου.
- Έτσι στα τέλη του 1970 οι επιστήμονες πιστεύουν ότι η ΣΚΠ είναι αποτέλεσμα αυτοάνοσης διαταραχής, πιθανώς προκληθείσας από ιϊκή λοίμωξη.



- 1978 Η ομάδα του Lawrence Jacobs ξεκινά πιλοτική μελέτη θεραπείας ασθενών με ΣΚΠ, με χρήση φυσικής μορφής της ιντερφερόνης-β.
- 1981 Παράγονται οι πρώτες εικόνες μαγνητικής τομογραφίας (MRI) από εγκέφαλο ασθενούς, φέρνοντας επανάσταση στον τρόπο διάγνωσης.
- 1993 Το φάρμακο Betaseron (ιντερφερόνη β-1b) εγκρίνεται στις Η.Π.Α. για τη μείωση της ταχύτητας επιδείνωσης σε περιπατητικούς ασθενείς με ΣΚΠ. Στην Ευρώπη θα κυκλοφορήσει αργότερα με το όνομα Betaferon.
- 1996 Το φάρμακο AVONEX (ιντερφερόνη β-1a) εισάγεται στη θεραπεία της ΣΚΠ με εξάρσεις στις Η.Π.Α. Φαίνεται να επιβραδύνει την εγκατάσταση αναπηρίας και να μειώνει τη συχνότητα των εξάρσεων.
- 1996 Το φάρμακο COPAXONE (glatiramer acetate) εγκρίνεται στις Η.Π.Α. για τη μείωση της συχνότητας των εξάρσεων της νόσου σε ασθενείς με τη μορφή ΣΚΠ με εξάρσεις και υφέσεις.
- 2000 Το φάρμακο NOVANTRONE (μιτοξαντρόνη) εγκρίνεται στις Η.Π.Α. για χρήση στη ΣΚΠ ενδεικνυόμενο για τη μείωση της νευρολογικής αναπηρίας και/ή της συχνότητας των εξάρσεων σε ασθενείς με δευτεροπαθή (χρόνια) προϊούσα, ή προϊούσα με εξάρσεις ΣΚΠ.
- 21<sup>ος</sup> αιώνας**
- 2002 Το φάρμακο REBIF (ιντερφερόνη β-1a) εισάγεται στη θεραπεία των μορφών της ΣΚΠ με εξάρσεις. Φαίνεται να μειώνει τη συχνότητα των εξάρσεων και να επιβραδύνει την εγκατάσταση αναπηρίας.

## ΟΡΙΣΜΟΣ

Η Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣΚΠ), ή αλλιώς πολλαπλή σκλήρυνση (Multiple Sclerosis, MS), είναι μια άγνωστης αιτιολογίας χρόνια νόσος, που εισβάλλει συνηθέστερα σε νεαρούς ενήλικες και χαρακτηρίζεται παθολογικά από πολλαπλές περιοχές φλεγμονής, ανοσολογικώς ρυθμιζόμενης απομυελίνωσης, και χαρακτηριστικών της νόσου γλοιακών «ουλών» (σκλήρυνση) που καλούνται απομυελινωτικές πλάκες. Οι βλάβες είναι λοιπόν διάσπαρτες στο χώρο.

Η κλινική πορεία ποικίλει από μία ήπια χωρίς συμπτώματα μορφή της νόσου έως μία μορφή ταχέως εξελισσόμενη (προϊούσα) και καταλείπουσα αναπηρία. Στους περισσότερους ασθενείς εισβάλλει υπό μορφή εξάρσεων και υφέσεων, όπου αρχικά η ανάρρωση από τις εξάρσεις είναι σχεδόν πλήρης, αργότερα οι νευρολογικές διαταραχές αθροίζονται σταδιακά. Οι βλάβες είναι λοιπόν διάσπαρτες στο χώρο και στο χρόνο.

Η νόσος φαίνεται ότι καθορίζεται και γενετικά, αλλά και επίκτητα μετά από έκθεση του οργανισμού, κατά την πρώιμη ηλικία του ασθενή, σε άγνωστο έως σήμερα λοιμώδη παράγοντα του περιβάλλοντος, πιθανώς ιό.

## ΜΥΕΛΙΝΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΠΛΑΚΑΣ

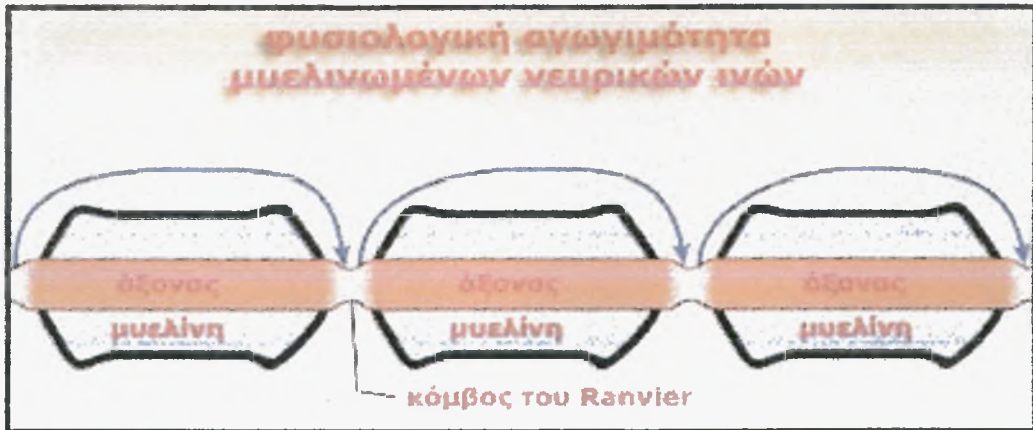
Οι αποφυάδες των αισθητικών και των κινητικών νευρώνων οι οποίες μεταφέρουν σήματα περιβάλλονται, κατά τη μεγαλύτερή τους έκταση, από έλυτρο μυελίνης, το οποίο διατάσσεται σε ομόκεντρες στιβάδες αποτελούμενες από επαναλαμβανόμενες διμοριακές στιβάδες λιπιδίων, που παρεμβάλλονται μεταξύ των πρωτεϊνικών στιβάδων. Η βιοχημική ανάλυση αποδεικνύει ότι η μυελίνη έχει παρόμοια σύσταση με την κυτταρική μεμβράνη, αποτελούμενη κατά 70% από λιπίδια και κατά 30% από πρωτεΐνες, με υψηλή συγκέντρωση χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων. Το μονωτικό μυελώδες έλυτρο του νευράξονα εμφανίζει κατά κανονικά διαστήματα διάκενα που ονομάζονται κόμβοι Ranvier. Ο κεντρικός κλάδος του νευράξονα των κυττάρων των νωτιαίων γαγγλίων είναι επίσης εμμύελος, όπως και ο νευράξονας των κινητικών νευρώνων. Η μυελίνη στο κεντρικό νευρικό σύστημα, (ΚΝΣ) όμως, διαφέρει κάπως από την αντίστοιχη περιφερική, διότι το νευρογλοιακό κύτταρο στο οποίο οφείλεται η δημιουργία της κεντρικής μυελίνης είναι το ολιγοδενδροκύτταρο, ενώ στο περιφερικό νευρικό σύστημα, η μυελίνη παράγεται από τα κύτταρα Schwann. Στα τελευταία, τα γονίδια που κωδικεύουν τη μυελίνη ενεργοποιούνται από την παρουσία νευραξόνων, ενώ στα ολιγοδενδροκύτταρα ενεργοποιούνται, κατά τα φαινόμενα, με την παρουσία αστροκυττάρων, δηλαδή του άλλου κύριου νευρογλοιακού κυτταρικού τύπου στο ΚΝΣ. Η μυελίνη τόσο στο ΚΝΣ όσο και στο περιφερικό, περιέχει την ίδια ομάδα πρωτεϊνών, τις *βασικές πρωτεΐνες μυελίνης*. Η ομάδα αυτή πρωτεϊνών αποτελείται από επτά τουλάχιστον συγγενείς πρωτεΐνες, οι οποίες παράγονται από ένα μόνο γονίδιο με εναλλακτικό μάτισμα του RNA. Οι βασικές πρωτεΐνες μυελίνης είναι ικανές να προκαλέσουν ισχυρή ανοσοαπόκριση. Όταν ενεθούν σε ζώα προκαλούν πειραματική αλλεργική εγκεφαλομυελίτιδα (Experimental Allergic Encephalomyelitis, EAE), η οποία χαρακτηρίζεται από τοπική φλεγμονή και απομυελίνωση στο ΚΝΣ, και αποτελεί το ζωικό πειραματικό μοντέλο της ΣΚΠ. Στους ασθενείς με ΣΚΠ, η απομυελίνωση των νευραξόνων καθυστερεί τη μετάδοση των νευρικών σημάτων (του δυναμικού ενέργειας) και προκαλεί προβλήματα με την αισθητική αντίληψη και τον σωστό κινητικό συντονισμό (ΕΙΚΟΝΕΣ 1, 2, 3).

# Κεντρικό νευρικό σύστημα

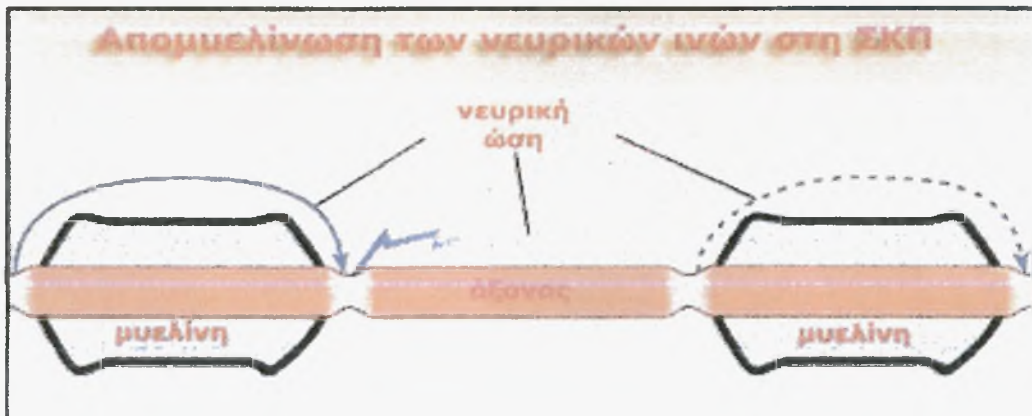


Στη ΣΚΠ το περίβλημα μυελίνης, το οποίο είναι ένα ενιαίο κύτταρο του οποίου η μεμβράνη περιτυλίγεται γύρω από τον άξονα, καταστρέφεται λόγω της φλεγμονής και της ουλοποίησης

Εικόνα 1



Εικόνα 2

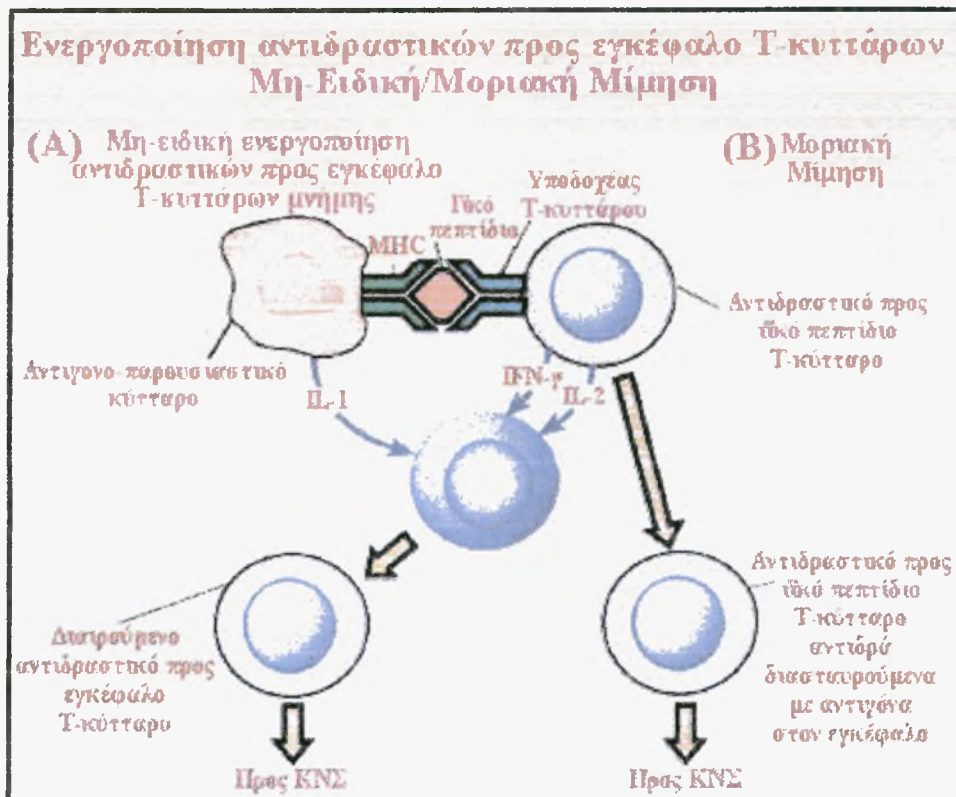


Εικόνα 3

Τα υγιή άτομα διατηρούν τα αυτό-αντιδρώντα προς τη μυελίνη T-κύτταρα υπό τον έλεγχο των T-κατασταλτικών κυττάρων. Μία υπόθεση που προσπαθεί να εξηγήσει την κατάρρευση της ανοσορύθμισης στις αυτοάνοσες νόσους, είναι η μοριακή μίμηση, η οποία προτείνει ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες (πεπτίδια) που αναγνωρίζονται από ειδικά τάξης II μόρια, είναι ανοσολογικώς μη-διακριτά από τα αυτό-αντιγόνα, και έτσι μία σωστή απόκριση στη λοίμωξη πυροδοτεί μία λανθασμένη φλεγμονή και επίθεση εναντίον συστατικών της μυελίνης (ΕΙΚΟΝΕΣ 4, 5).

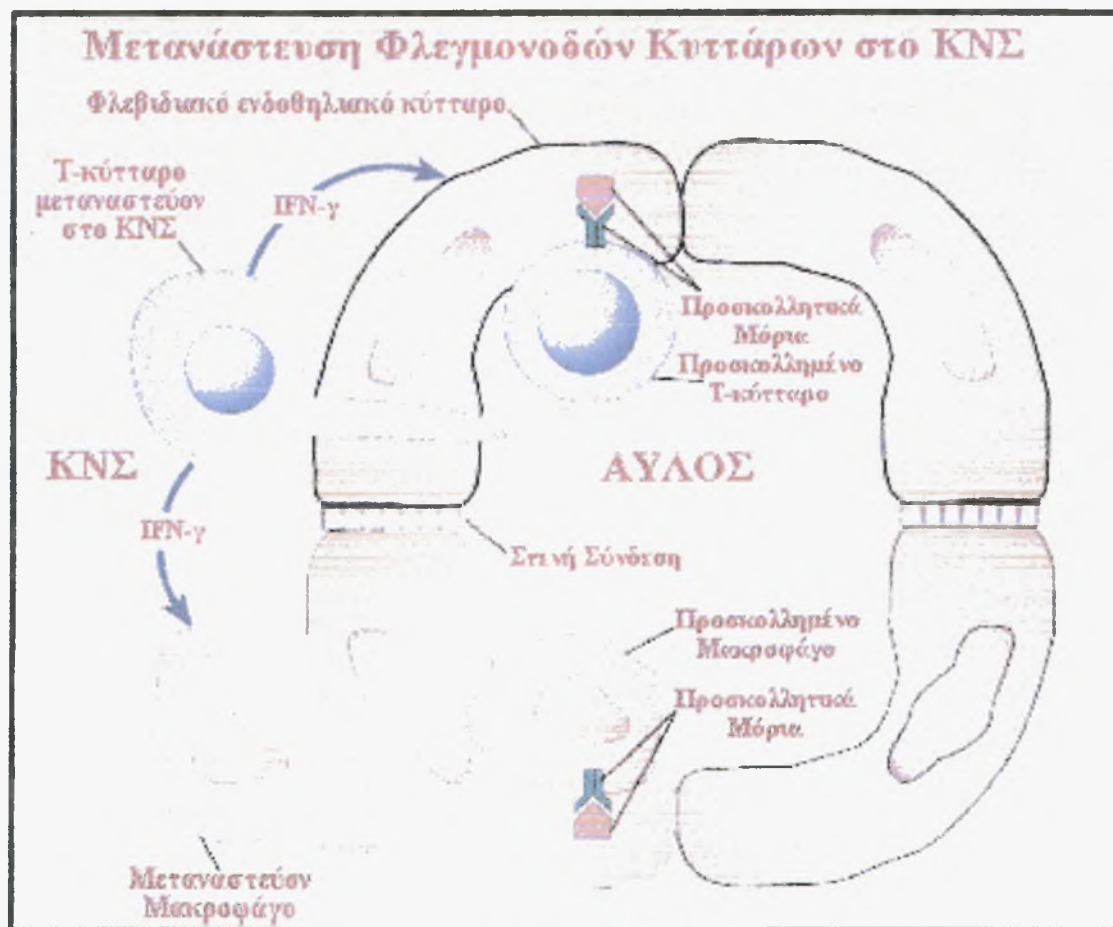


Εικόνα 4



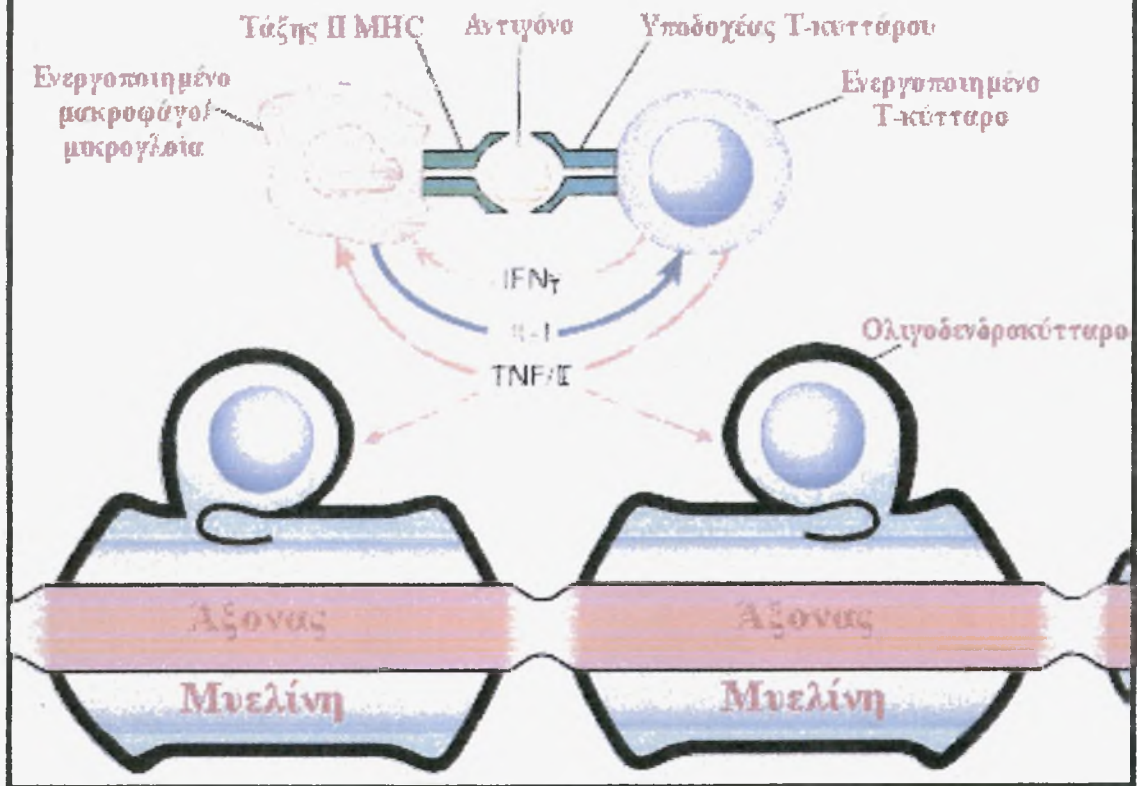
## Εικόνα 5

Η αποτυχία ρύθμισης οδηγεί σε πολλαπλασιασμό, ενεργοποίηση και είσοδο στην κυκλοφορία αυτό-αντιδρώντων Τ-κυττάρων, τα οποία εκφράζουν συγκολλητικά μόρια και προκαλούν αλλαγές στο ενδοθήλιο των αγγείων, επιτρέποντας την πρόσβαση, μέσω του αίματο-εγκεφαλικού φραγμού, στο ΚΝΣ (ΕΙΚΟΝΑ 6). Εκεί, ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα επανααναγνωρίζουν το αντιγόνο και ενεργοποιούν τα κύτταρα της μικρογλοίας (τα μακροφάγα του ΚΝΣ) τα οποία με τη σειρά τους εκφράζουν μόρια τάξης II, επαναπαρουσιάζουν το αντιγόνο σε άλλα Τ-κύτταρα (ΕΙΚΟΝΑ 7) και έτσι οργανώνεται ένας προφλεγμονώδης φαύλος κύκλος, που δημιουργεί ένα διήθημα πλούσιο σε ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα, μικρογλοία και μερικά ουδετερόφιλα.



Εικόνα 6

# Ανοσιακός μηχανισμός απομυελίνωσης



Εικόνα 7

## ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ, ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΈΝΑΡΞΗΣ

Η συμπτωματολογία της ΣΚΠ είναι ευρεία με τυπικά συχνά σημεία αλλά και άτυπα σπάνια, χωρίς όμως να υφίστανται για την νόσο αυτή παθογνωμονικά συμπτώματα. Η ευρύτητα των συμπτωμάτων αποτελεί την κλινική έκφραση των διακριτών βλαβών που βρίσκονται διάσπαρτες στο ΚΝΣ και χαρακτηρίζουν την νόσο (“...διάσπαρτες στο χώρο...”). Είναι σημαντικό το ότι η συσχέτιση της συμπτωματολογίας με τον αριθμό, τη θέση και το μέγεθος των βλαβών του ΚΝΣ είναι μικρή, χωρίς αυτό να έχει, μέχρι στιγμής, εξηγηθεί.

Οι κλινικές εκδηλώσεις μπορεί να μην παρουσιάζονται μόνιμα και ορισμένες μπορεί να φαντάζουν κατά κάποιο τρόπο παράξενες. Ο ασθενής μπορεί να βιώνει ασυνήθιστες διαταραχές της αισθητικότητας που συχνά είναι δύσκολο να τις περιγράψει και να επιβεβαιωθούν αντικειμενικά. Αυτές οι διαταραχές της αισθητικότητας είναι και το συνηθέστερο εναρκτήριο σύμπτωμα της νόσου, υπό μορφή, κυρίως, “μουδιάσματος” ενός άνω άκρου, με έναρξη από τα δάκτυλα, επέκταση μέσα σε λίγες μέρες προς τα άνω, σταθεροποίηση για λίγες εβδομάδες και ακολούθως υποχώρηση. Εντούτοις, κινητικές, αισθητηριακές ή άλλων τύπων διαταραχές μπορεί επίσης να αποτελούν το εναρκτήριο σύμπτωμα. Η έναρξη είναι συνήθως οξεία ή υποξεία, συχνότερα μονοσυμπτωματική, σπανιότερα πολυσυμπτωματική. Συνολικά στον ΠΙΝΑΚΑ 2 παρουσιάζονται τα κυριότερα συμπτώματα έναρξης με τις συχνότητες που εμφανίζονται.

### Πίνακας 2

Τα κυριότερα συμπτώματα και σημεία με τα οποία εισβάλλει η ΣΚΠ και οι συχνότητες εμφάνισής τους.

Κλινική εκδήλωση	% Συχνότητα
Μονοσυμπτωματική	45-79
Πολυσυμπτωματική	21-55
Αδυναμία	10-40
Παραισθησίες	21-40
Απώλεια αίσθησης	13-39
Οπτική νευρίτιδα	14-29
Διπλωπία	8-18
Αταξία	2-18
Κυστική δυσλειτουργία	0-13
Ήλιγγος	2-9



Πέραν των εναρκτήριων συμπτωμάτων, στη μακρόχρονη πορεία της νόσου μπορεί να εμφανισθεί πληθώρα συμπτωμάτων και σημείων, που όπως αναφέρθηκε προηγουμένως μπορεί να είναι τυπικά ή άτυπα.

Αυτά αφορούν κινητικές διαταραχές (η αδυναμία άκρου είναι το πιο κοινό σημείο), παρεγκεφαλιδικές διαταραχές, με προβλήματα βάδισης, όπου στη βαρύτερη κατάσταση ο ασθενής δεν μπορεί να σταθεί όρθιος ή να καθίσει αλλά ούτε να βαδίσει χωρίς υποστήριξη, και με τρόπο σημαντική αναπηρία που εμποδίζει τους ασθενείς να γράψουν, να σιτιστούν μόνοι και να φροντίσουν την ατομική τους υγιεινή ή να καλλωπισθούν, αισθητικές διαταραχές με παραισθησίες και δυσαισθησίες, που εκδηλώνονται με μορφή “μουδιάσματος”, “τσιμπημάτων”, “βελονιάσματος”, ή “μυρμηγκιάσματος”, και πόνο διαφόρων εντάσεων και διάρκειας, διαταραχές από το οπτικό νεύρο με μειωμένη, κυρίως μονόπλευρα, οπτική οξύτητα, που εκδηλώνεται ως θάμβος οράσεως, διαταραχές από το αυτόνομο νευρικό σύστημα, σεξουαλικές διαταραχές, και γνωσιακές διαταραχές, με πρόβλημα μνήμης ή μείωση της ταχύτητας επεξεργασίας υλικού από τον εγκέφαλό τους.

Όσον αφορά στην εκτίμηση του βαθμού αναπηρίας του ασθενούς, από όσες κλίμακες έχουν προταθεί έως σήμερα, ή συχνότερα χρησιμοποιούμενη είναι η «Βελτιωμένη Κλίμακα της Κατάστασης Αναπηρίας» (Expanded Disability Status Scale, EDSS) του Kurtzke, χωρίς βέβαια να λείπουν και κάποιες αδυναμίες από αυτήν. Πρακτικά, ο ασθενής βαθμολογείται κατά λειτουργικό σύστημα και του αποδίδεται στο τέλος της εξέτασης όλων των συστημάτων ένας βαθμός αναπηρίας από 0-10, όπως φαίνεται στον ΠΙΝΑΚΑ 3.

## Πίνακας X




### Βελτιωμένη Κλίμακα της Κατάστασης Αναπηρίας

- 0,0 Φυσιολογική νευρολογική εξέταση.
- 1,0 Χωρίς αναπηρία, ελάχιστα συμπτώματα.
- 1,5 Χωρίς αναπηρία, ελάχιστα σημεία από περισσότερα του ενός λειτουργικά συστήματα.
- 2,0 Ελαφρώς αυξημένη αναπηρία σε ένα λειτουργικό σύστημα.
- 2,5 Ελαφρώς αυξημένη αναπηρία σε δύο λειτουργικά συστήματα.
- 3,0 Μέτρια αναπηρία σε ένα λειτουργικό σύστημα, πλήρως περιπατητικός.
- 3,5 Πλήρως περιπατητικός, αλλά με μέτρια αναπηρία σε ένα σύστημα και περισσότερο από ελαφρά αναπηρία σε αρκετά άλλα.
- 4,0 Πλήρως περιπατητικός χωρίς βοήθεια, αυτό-εξυπηρετούμενος, εκτός κλίνης για 12 ώρες τη μέρα παρά τη σχετικώς σοβαρή αναπηρία, ικανότητα περιπάτου χωρίς βοήθεια ή ανάπαυση για 500 μέτρα.
- 4,5 Πλήρως περιπατητικός χωρίς βοήθεια, εκτός κλίνης για αρκετό διάστημα της μέρας, ικανότητα εργασίας ή ελαφρύς περιορισμός της πλήρους δραστηριότητας, σχετικά σοβαρή αναπηρία, ικανότητα περιπάτου χωρίς βοήθεια για 300 μέτρα.
- 5,0 Περιπατητικός χωρίς βοήθεια για 200 μέτρα, αναπηρία σοβαρή, ώστε να επηρεάζει αρκετά την ημερήσια δραστηριότητα.
- 5,5 Περιπατητικός χωρίς βοήθεια για 100 μέτρα, αναπηρία σοβαρή, ώστε να αποκλείει την ολοήμερη δραστηριότητα.
- 6,0 Περίπατος 100 μέτρων με ή χωρίς ανάπαυση απαιτεί περιοδική βοήθεια ή συνεχή υποστήριξη μονόπλευρα (δεκανίκια).
- 6,5 Περίπατος 20 μέτρων χωρίς ανάπαυση απαιτεί συνεχή υποστήριξη αμφίπλευρα.
- 7,0 Ανικανότητα βάδισης πέραν των 5 μέτρων ακόμη και με βοήθεια, περιορισμός σε αναπηρική πολυθρόνα με ικανότητα χειρισμού της χωρίς βοήθεια, εκτός κλίνης (στην πολυθρόνα) για 12 ώρες.
- 7,5 Πλήρης σχεδόν αδυναμία βάδισης, περιορισμός σε αναπηρική πολυθρόνα με μειωμένη ικανότητα χειρισμού της, πιθανώς απαιτείται αυτοκινούμενη πολυθρόνα.
- 8,0 Περιορισμός σε κλίνη ή πολυθρόνα, εκτός κλίνης (σε πολυθρόνα) για αρκετό διάστημα της μέρας, διατήρηση σχετικής ικανότητας αυτοεξυπηρέτησης, αποτελεσματική χρήση των χειρών.
- 8,5 Περιορισμός σε κλίνη για αρκετό διάστημα της μέρας, ελάχιστη ικανότητα αυτοεξυπηρέτησης και χρήσης χειρών.
- 9,0 Πλήρης περιορισμός σε κλίνη, ικανότητα επικοινωνίας και λήψης τροφής.
- 9,5 Πλήρης περιορισμός σε κλίνη, αδυναμία αποτελεσματικής επικοινωνίας και απώλεια ικανότητας λήψης τροφής και κατάποσης.
- 10 Θάνατος εξαιτίας της ΣΚΠ.

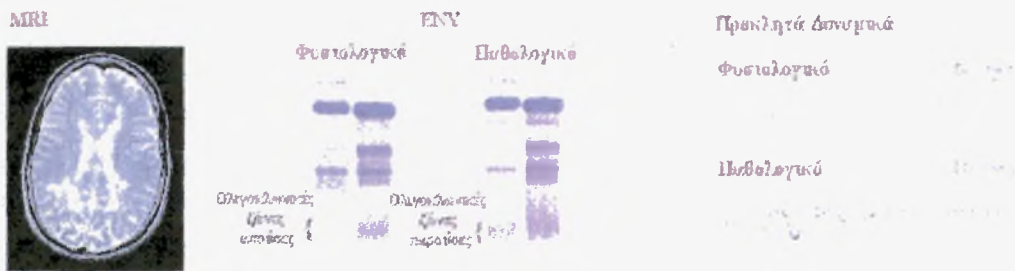
## ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΣΚΠ

Ειδικό τεστ για τη διάγνωση της ΣΚΠ δεν υφίσταται. Έτσι, κατά καιρούς (1976, 1983) έχουν συσταθεί ομάδες από ειδικούς με σκοπό να θέσουν κριτήρια για τη διάγνωση της νόσου. Η διάγνωση βασίζεται στην τεκμηρίωση της ύπαρξης χαρακτηριστικών βλαβών σε διαφορετικά σημεία του ΚΝΣ, μέσω του ιστορικού (έναρξη στη νεαρή ηλικία, χαρακτηριστικό ιστορικό εξάρσεων και υφέσεων), της νευρολογικής εξέτασης (πολυεστιακή σημειολογία με χαρακτηριστικά πολλαπλά συμπτώματα και σημεία της νόσου) και της εργαστηριακής διερεύνησης (MRI, ανάλυση ΕΝΥ, προκλητά δυναμικά). Επί του παρόντος χρησιμοποιούνται τα κριτήρια και οι οδηγίες του International Panel on the diagnosis of Multiple Sclerosis. Αυτά τα αναθεωρημένα κριτήρια κατατάσσουν τα άτομα στις καταστάσεις της νόσησης, της μη νόσησης και της πιθανής νόσησης από ΣΚΠ, ενώ ενσωματώνουν στοιχεία από την εργαστηριακή διερεύνηση. Όπως και σε παλαιότερα κριτήρια, οι χαρακτηριζόμενοι ως νοσούντες πρέπει να έχουν δύο προσβολές που να αφορούν περισσότερα του ενός ανατομικά σημεία, ενώ αν η αρχική παρουσίαση είναι ενδεικτική της ΣΚΠ, η δεύτερη βλάβη δεν είναι απαραίτητο να εκφράζεται κλινικά. Τα κριτήρια για τη διάγνωση της ΣΚΠ παρουσιάζονται στην ΕΙΚΟΝΑ 8.

Η εργαστηριακή διερεύνηση σκοπεύει στην παρατήρηση ανατομικών διεσπαρμένων βλαβών στο χώρο και το χρόνο (Μαγνητική Τομογραφία, MRI), στην εκτίμηση της υπαραχνοειδούς φλεγμονής (ανάλυση ΕΝΥ) και στην κατάδειξη ενός, συμβατού με απομυελίνωση, μοτίβου τροποποίησης της αγωγής νευρικών ώσεων (προκλητά δυναμικά).

Ένα ή περισσότερα επεισόδια	Πρώτο κλωνικό επεισόδιο	Επικρατούν κλωνικά επεισόδια	Πορτογάλια Διάσπαση
<p>Δύο</p> 	<p>1 προσβεβλημένο σημείο 1 προσβεβλημένο σημείο</p>	<p>Διαφορετικά σημεία 1 ένα σημείο</p>	<p>Δεν υποτιμάται Διασπαρτές βλάβες στο χρόνο στο MRI (αν ENY είναι, αφήστε MRI καλύτερα κωπυρό)</p>
<p>Ένα</p> 	<p>≥2 προσβεβλημένα σημεία 1 προσβεβλημένο σημείο</p>	<p>Κανένα Κανένα</p>	<p>Διασπαρτές βλάβες στο χρόνο στο MRI Διασπαρτές βλάβες στο χώρο στο MRI (αν ENY είναι, αφήστε MRI καλύτερα κωπυρό) <b>ΚΑΙ</b> Διασπαρτές βλάβες στο χρόνο στο MRI ENY βελτικό <b>ΚΑΙ</b> Διασπαρτές βλάβες στο χρόνο στο MRI <b>ΚΑΙ</b> Διασπαρτές βλάβες στο χώρο στο MRI <b>ΚΑΙ</b> Διασπαρτές βλάβες στο χρόνο στο MRI <b>Η'</b> συνεχής επιδείνωση επί 1 έτος</p>
<p>Πρόοδος εξ' αφαίρεσης</p> 	<p>Πρόοδος ή πορεία που περιγράφεται σε ΣΚΠ</p>	<p>Κανένα</p>	<p>Διασπαρτές βλάβες στο χρόνο στο MRI <b>ΚΑΙ</b> Διασπαρτές βλάβες στο χρόνο στο MRI <b>ΚΑΙ</b> Διασπαρτές βλάβες στο χρόνο στο MRI <b>Η'</b> συνεχής επιδείνωση επί 1 έτος</p>

### Διερευνήσεις



**Εικόνα 8:** Κριτήρια διάγνωσης της ΣΚΠ.

Η διάγνωση τίθεται με την τεκμηρίωση, μέσω της κλινικής ανάλυσης και της εργαστηριακής διερεύνησης, της ύπαρξης δύο ή περισσότερων επεισοδίων, τα οποία επηρεάζουν διαφορετικά σημεία του ΚΝΣ και έλαβαν χώρα σε διαφορετικές περιόδους. Ασθενείς με ενδεικτική κλινική εικόνα, αλλά μη-πλήρωση όλων των διαγνωστικών κριτηρίων, ταξινομούνται ως πιθανώς νοσούντες. MRI=Μαγνητική Τομογραφία, ENY=Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό

## ΠΟΡΕΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η κλινική πορεία της ΣΚΠ ποικίλει, καθώς η φυσική ιστορία της, δηλαδή η εξέλιξη της χωρίς φαρμακευτική ή άλλη παρέμβαση, είναι απρόβλεπτη. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, η ΣΚΠ παραμένει κλινικά σιωπηλή καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του ατόμου και μόνον κατά τη νεκροψία ανακαλύπτονται τα τυπικά παθολογικά ευρήματα. Στο άλλο άκρο, σε κάποιες περιπτώσεις η ΣΚΠ είναι τόσο ταχέως εξελισσόμενη ή κακοήθης ώστε ο ασθενής καταλήγει μέσα σε λίγους μήνες από την έναρξη της νόσου. Η κλινική παρακολούθηση της πορείας της ΣΚΠ οδήγησε στην ομαδοποίηση των πασχόντων και την περιγραφή διακριτών τύπων της νόσου. Η ομαδοποίηση αυτή, εφόσον έχει βασισθεί σε κλινικά χαρακτηριστικά, είναι εμπειρική και δεν αντανακλά ειδική βιολογική παθοφυσιολογία, παίζει όμως σημαντικό ρόλο στην επιλογή της κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής. Οι τύποι της ΣΚΠ αναφορικά προς τη μορφή πορείας της νόσου είναι οι εξής:

- *Με εξάρσεις και υφέσεις (Relapsing – Remitting)*

Παρουσιάζεται στο 80% περίπου των ασθενών. Χαρακτηρίζεται από εξάρσεις ακολουθούμενες από ποικίλου βαθμού βελτίωση που κυμαίνεται από πλήρη ανάκαμψη της νευρολογικής λειτουργίας έως συμπτωματική υπολειμματική δυσλειτουργία. Το χρονικό διάστημα από την εμφάνιση της συμπτωματολογίας μέχρι την αποδρομή της, ονομάζεται «ώση» της νόσου, έχει διάρκεια που δεν μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια και ακολουθείται από, απρόβλεπτης επίσης διάρκειας, διάστημα ύφεσης, το οποίο λήγει με την εμφάνιση μιας άλλης ώσης. Για να χαρακτηριστεί ένα νέο σύμπτωμα ή η υποτροπή ενός παλαιού, ως ώση, πρέπει να υφίσταται αδιαλείπτως επί τουλάχιστον 24 ώρες. Τυπικά, η νόσος περνά από τη φάση όπου η έξαρση ακολουθείται από επιμένουσα βλάβη και ακολούθως, σε ποσοστό 85%, μεταπίπτει στη μορφή που χαρακτηρίζεται ως δευτεροπαθής προϊούσα.

- *Πρωτοπαθής προϊούσα (primary – progressive)*

Παρουσιάζεται στο 10% έως 20% (οι στατιστικές ποικίλουν) των ασθενών. Χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι είναι προϊούσα εξαρχής και διακριτές εξάρσεις δεν υπάρχουν. Επηρεάζεται κυρίως ο νωτιαίος μυελός και λιγότερο συχνά το οπτικό νεύρο, ο εγκέφαλος, ή η παρεγκεφαλίδα. Είναι συχνότερη στους γηραιότερους. Οι εστίες στην MRI εντοπίζονται περιφερικότερα και είναι λιγότερες σε αριθμό.

- *Δευτεροπαθής προϊούσα (Secondary – Progressive)*

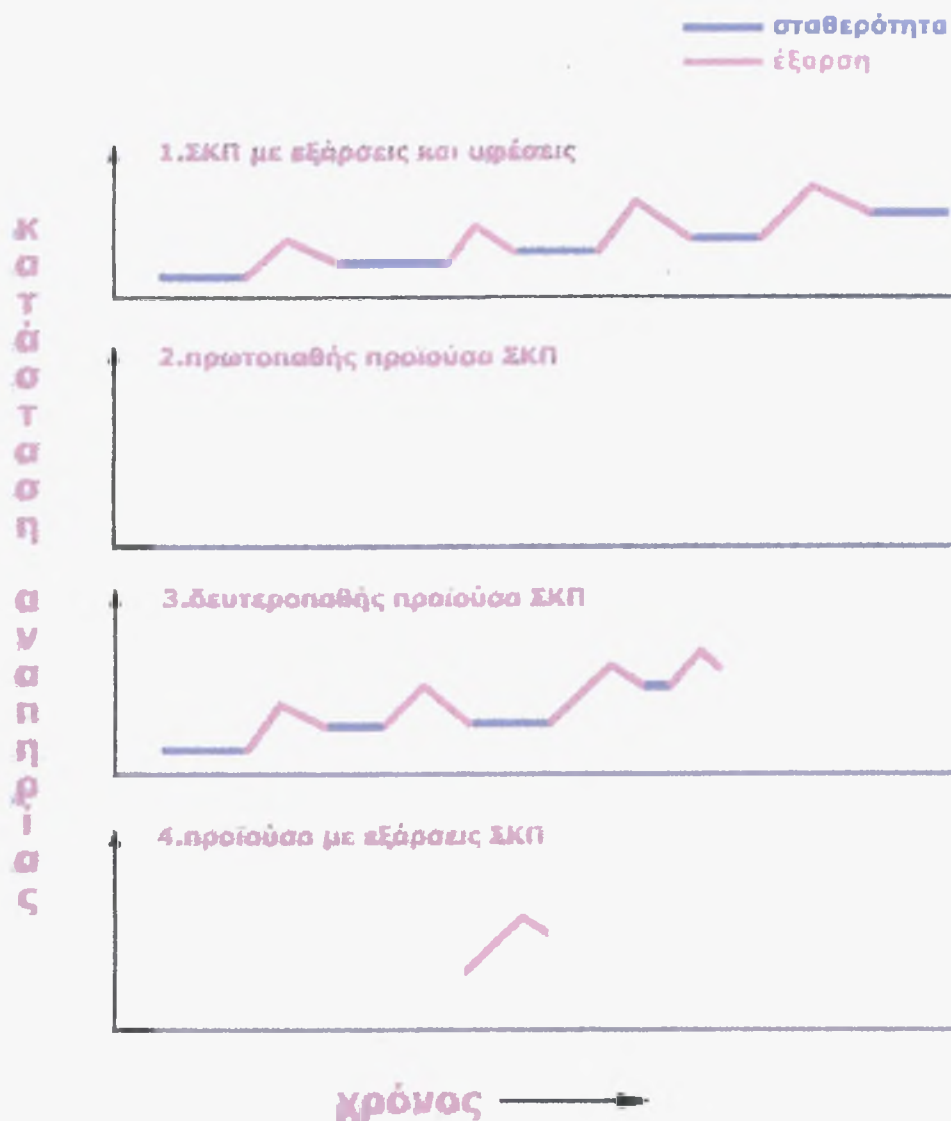
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, σε ποσοστό 85% περίπου των ασθενών που πάσχουν από ΣΚΠ με εξάρσεις και υφέσεις, ύστερα από άλλοτε άλλο χρονικό διάστημα η νόσος μεταπίπτει σε μια διαρκώς φθίνουσα κατάσταση με ή χωρίς περιόδους εξάρσεων και υφέσεων, ονομαζόμενη δευτεροπαθής προϊούσα ΣΚΠ, με μέση ηλικία έναρξης τα 37,7 ( $\pm$  10,4) έτη.

- *Προϊούσα με εξάρσεις*

Όσοι ασθενείς πάσχουν από την προϊούσα με εξάρσεις μορφή, έχουν μια φθίνουσα πορεία εξαρχής στην οποία αργότερα προστίθενται ένα ή δύο επεισόδια επιδείνωσης, με ή χωρίς επάνοδο στην προηγούμενη του επεισοδίου κατάσταση.

Η προϊούσα με εξάρσεις μορφή της νόσου και, πιθανώς, κάποιες περιπτώσεις πρωτοπαθούς προϊούσας μορφής πιθανολογείται να αντιπροσωπεύουν περιπτώσεις δευτεροπαθούς προϊούσας μορφής όπου όμως οι αρχικές εξάρσεις δεν αναγνωρίστηκαν, ξεχάστηκαν ή ήταν κλινικώς σιωπηλές.

Οι τύποι της ΣΚΠ αναφορικά προς τη μορφή πορείας της νόσου απεικονίζονται γραφικά στην ΕΙΚΟΝΑ 9.



**Εικόνα 9:**

Γραφική αναπαράσταση των τύπων της ΣΚΠ αναφορικά προς την μορφή πορείας της νόσου.

Η μέση ηλικία έναρξης της ΣΚΠ, εάν οι πάσχοντες ληφθούν ως ενιαίο σύνολο, είναι τα 31,6 ( $\pm 11,1$ ) έτη για τις γυναίκες και τα 33,7 ( $\pm 10,7$ ) έτη για τους άντρες, άρα μπορεί να χαρακτηριστεί ως νόσος των νεαρών ενηλίκων.

Όσον αφορά την πρόγνωση, δεν έχουν βρεθεί αξιόπιστοι προγνωστικοί δείκτες. Κάποιοι ενδεικτικοί δείκτες πρόγνωσης παρουσιάζονται στους ΠΙΝΑΚΕΣ 4 και 5, αλλά αυτές οι γενικεύσεις πιθανώς να μην ισχύουν για κάθε ιδιαίτερη περίπτωση.

#### **Πίνακας 4:** Δείκτες καλής πρόγνωσης στη ΣΚΠ.

Καλοί προγνωστικοί δείκτες θεωρούνται :

- Σχετικώς μικρή ηλικία (<25 ετών, όχι >40 ετών) κατά την έναρξη της νόσου.
- Μονοσυμπτωματική εισβολή της νόσου, όπου κυριαρχούν αισθητικές διαταραχές ή οπτικά συμπτώματα, ιδιαίτερα οπτική νευρίτιδα (αυτή η εικόνα της νόσου είναι συχνότερη σε νεαρές γυναίκες).
- Ταχεία αποδρομή της όψης με πλήρη επάνοδο του ασθενούς.
- Ελάχιστος βαθμός ανικανότητας την πρώτη 5ετία από την εκδήλωση της νόσου.
- Σύντομη διάρκεια της πιο πρόσφατης περιόδου έξαρσης.

#### **Πίνακας 5:** Δείκτες κακής πρόγνωσης στη ΣΚΠ.

Κακοί προγνωστικοί δείκτες θεωρούνται:

- Πολυσυμπτωματική έναρξη.
- Έναρξη με κινητική συμπτωματολογία, με παρεγκεφαλιδικά σημεία αταξίας ή τρόμου, ίλιγγο, ή σημεία από corticospinal tract.
- Έναρξη με μυελική συμπτωματολογία.
- Χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο πρώτων ώσεων μικρότερο από 6 μήνες.
- Μεγάλη σχετικώς ηλικία έναρξης της νόσου.
- Πλημμελής αποκατάσταση από μια ώση.
- Οικογενειακό ιστορικό ΣΚΠ.
- Ψυχιατρική συμπτωματολογία από την έναρξη της νόσου.
- Μεγάλο φορτίο βλαβών στην MRI εγκεφάλου κατά την έναρξη της νόσου.



Τις τελευταίες δεκαετίες η μέση επιβίωση των πασχόντων έχει αυξηθεί και κυμαίνεται μεταξύ 25 και 39 ετών μετά τη διάγνωση, με το 1/3 των ασθενών να ζει περισσότερο από 30 έτη. Αυτή η αύξηση πιθανώς οφείλεται στα αποτελεσματικότερα σχήματα θεραπείας, την καλύτερη αντιμετώπιση των λοιμώξεων και ελκών που εμφανίζονται ως επιπλοκές της νόσου, αλλά και τη βελτίωση της ποιότητας των παρεχόμενων υπηρεσιών προς άτομα με ειδικές ανάγκες. Συνολικά, η ΣΚΠ επηρεάζει λιγότερο τη διάρκεια ζωής και περισσότερο την ποιότητά της, αφού δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά στο εκτιμώμενο ποσοστό 25ετούς επιβίωσης για τους πάσχοντες από ΣΚΠ συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό του ίδιου φύλου και της ίδιας ηλικιακής κατανομής, ενώ από την άλλη πλευρά, η χρονιότητα της νόσου με τις κλινικές εκδηλώσεις της, οδηγούν το 70% των πασχόντων εκτός εργασίας εξαιτίας διαταραχών μνήμης και γνωσίας, σπαστικής παραπάρεσης, φτωχού προσανατολισμού και δυσλειτουργία σφικτήρος.

Ψυχολογικοί παράγοντες και stress δεν φαίνεται να επηρεάζουν άμεσα την πορεία της νόσου ή την έκλυση ώσεων, ενώ από την άλλη πλευρά η έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες φαίνεται να αποτελεί αιτία πρόσκαιρης επιδείνωσης της συμπτωματολογίας.

Θάνατος εξαιτίας της ΣΚΠ αυτής καθ'εαυτής πολύ σπάνια συμβαίνει και μπορεί να οφείλεται σε μια πλάκα είτε στην περιοχή του αναπνευστικού κέντρου ή στην ανώτερη μοίρα του αυχενικού μυελού με συνέπεια παράλυση του διαφράγματος. Βρογχοπνευμονία οφειλόμενη είτε σε εισρόφηση είτε σε αναπνευστική ανεπάρκεια, είναι το συχνότερο αίτιο θανάτου, κάτι στο οποίο συμβάλλει και η εξάπλωση των ασθενών λόγω της χρονιότητας της νόσου. Άλλες αιτίες θανάτου περιλαμβάνουν την καρδιακή ανακοπή, κακοήθεις εξαλλαγές, σηψαιμία συνήθως από λοίμωξη του ουροποιητικού, πνευμονική εμβολή, έλκη εκ κατακλίσεως και ακόμη αυτοκτονία (7 φορές συχνότερη απ'ότι στο γενικό πληθυσμό).

## ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Είναι γεγονός ότι έως σήμερα δεν υφίσταται θεραπεία για την ΣΚΠ., αφού δεν υφίσταται ουσία που αποδεδειγμένα να προάγει τη διαδικασία επαναμυελίνωσης. Εντούτοις, υπάρχουν διάφορες ουσίες για την αντιμετώπισή της που δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Τα θεραπευτικά σχήματα αφορούν είτε στην τροποποίηση της νόσου, είτε στην συμπτωματική αντιμετώπισή της, ενώ ιδιαίτερη αντιμετώπιση απαιτείται για την θεραπεία της οξείας φάσης της νόσου.

Έτσι, παρόλο που στην πλειοψηφία των ασθενών η οξεία φάση υφίεται αυτόματα, δίνεται θεραπευτική αγωγή με στόχο το συντομότερο και το μέγιστο της αποκατάστασης. Ως θεραπεία επιλογής χρησιμοποιούνται τα κορτικοειδή λόγω της αντιφλεγμονώδους και ανοσοκατασταλτικής τους δράσης. Συγκεκριμένα, στον ασθενή που βρίσκεται σε ώση χορηγούνται συνθετικά ανάλογα των γλυκοκορτικοειδών, όπως η μεθυλπρεδνιζολόνη και η πρεδνιζολόνη, αρχικά ενδοφλεβίως συνήθως και έπειτα από του στόματος. Φαίνεται ότι δρουν μειώνοντας την διαπερατότητα των αγγείων του ΚΝΣ εμποδίζοντας την είσοδο φλεγμονωδών κυττάρων σε αυτό και περιορίζοντας το οίδημα, πιθανώς μειώνουν την σύνθεση IgG στο ΚΝΣ και την ποσότητα των αντισωμάτων κατά της βασικής πρωτεΐνης στο ΕΝΥ, ή τροποποιούν την σύνθεση των κυτοκινών IL-2 και IFN- $\gamma$ , την έκφραση του υποδοχέα IL-2, τη δραστηριότητα των κυττάρων φονέων και την εξαρτώμενη από αντισώματα κυτταροτοξικότητα. Εναλλακτικά, μπορεί να χορηγηθεί συνθετική κορτικοτροπίνη (ACTH), δίνοντας μάλλον βραδύτερη βελτίωση σε σχέση με τα κορτικοειδή, προάγοντας την σύνθεση των τελευταίων ως τρόπο δράσης.

### Συμπτωματική θεραπεία

Πρόκειται για συμπληρωματική αγωγή που αποσκοπεί αφ'ενός στην αντιμετώπιση των χρόνιων συμπτωμάτων που εγκαθίστανται και επιμένουν στην πορεία της νόσου και αφετέρου στη βελτίωση της λειτουργικότητας και της ποιότητας ζωής των ασθενών. Εκτός από τη χορήγηση της κατάλληλης για κάθε σύμπτωμα αγωγής, στο βαθμό που αυτό μπορεί να ειπωθεί δεδομένου ότι οριστικές λύσεις δεν υφίστανται, οι ασθενείς ενθαρρύνονται να συμφιλιωθούν με κάποιες καταστάσεις, να μάθουν να ζουν με τα συμπτώματα, και να μην αποκοπούν από το κοινωνικό και εργασιακό τους περιβάλλον.

Αντιμετωπίζεται το αίσθημα κόπωσης, από τα σοβαρότερα προβλήματα των πασχόντων από ΣΚΠ, με ουσίες που δρουν αποκλείοντας τα κανάλια  $K^+$ , παρατείνοντας έτσι τη φάση επαναπόλωσης του δυναμικού ενέργειας με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της αγωγιμότητας και βελτίωση της μυϊκής ισχύος, η σπαστικότητα, με φάρμακα ή χειρουργικά, η μυϊκή αδυναμία, το χρόνιο και παροξυσμικό άλγος, με αντιεπιληπτικά και ψυχοτρόπα, οι διαταραχές της ουρήσεως, με αντιχολινεργικά, οι ψυχικές διαταραχές με τρικυκλικά και μη-τρικυκλικά αντικαταθληπτικά, ο τρόμος και οι σεξουαλικές διαταραχές.

#### Τροποποιητική της νόσου θεραπεία

Αν και δεν υπάρχει διαθέσιμη θεραπεία για την ΣΚΠ σήμερα, τα αποτελέσματα ελεγχόμενων κλινικών μελετών που αφορούν τη χορήγηση ιντερφερονών-β καταδεικνύουν τη δυνατότητα ευνοϊκής μεταβολής της φυσικής ιστορίας της νόσου. Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, ο αυτοάνοσος μηχανισμός πρόκλησης της νόσου είναι εξαιρετικά πιθανός, όπως προκύπτει από την εμφάνιση ανοσοσφαιρινών στο ENY, τη διαταραχή της λειτουργικότητας, των κυττάρων “φονέων” και την ελαττωμένη δραστηριότητα των T-κατασταλτικών κυττάρων. Έτσι τα φάρμακα που έχουν προταθεί για την αντιμετώπιση της ΣΚΠ στοχεύουν στην μείωση της δραστηριότητας των T-λέμφοκυττάρων μέσω της πρόκλησης ανοχής, ή στην ενεργοποίηση της φυσιολογικής αυτορύθμισης του οργανισμού.

Οι γλυκοπρωτεΐνες ιντερφερόνες είναι κυτοκίνες του οργανισμού με αντι-ιϊκή γενικά δράση. Από τα διάφορα είδη ιντερφερόνης που βρίσκονται στον ανθρώπινο οργανισμό (α,β,τ,ω,γ), η μόνη που αποδεδειγμένα ασκεί επωφελή δράση στη ΣΚΠ είναι η IFN-β, ενώ η IFN-γ έχει, αντιθέτως, επιδεινωτική δράση. Η φυσική IFN-β είναι γλυκοπρωτεΐνη 166 αμινοξέων που παράγεται από τους ινοβλάστες, τα μακροφάγα και τα επιθηλιακά κύτταρα, ενώ τα φαρμακευτικά σκευάσματα IFN αφορούν δύο μορφές της ανθρώπινης IFN-β, που παράγονται με τη μέθοδο του ανασυνδυασμένου DNA, την IFN-β-1b και την IFN-β-1a. Η IFN-β-1b (Betaferon στην Ευρώπη, Betaseron στις ΗΠΑ) εγκρίθηκε το 1993 στις ΗΠΑ, είναι μη-γλυκοσυλιωμένο παράγωγο της φυσικής IFN-β με 165 αμινοξέα στο μόριο της, αφού έχει αφαιρεθεί από την θέση 1 η μεθειονίνη, διαφέρει επίσης από την φυσική IFN κατά το ότι στη θέση 17 το κατάλοιπο κυστεΐνης έχει αντικατασταθεί από σερίνη.

## ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΣΚΠ

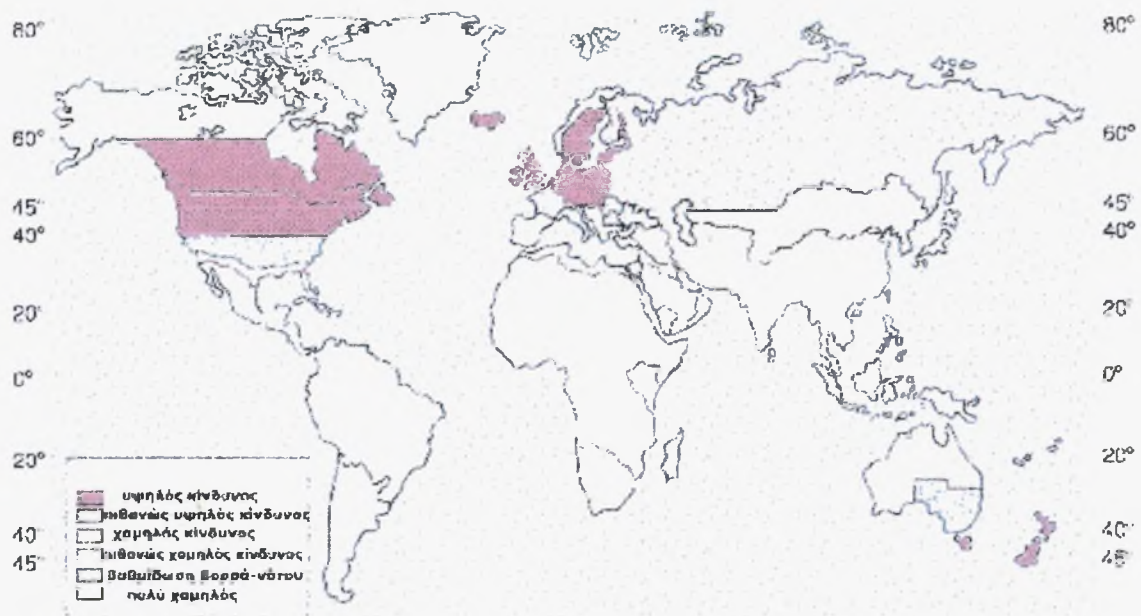
Η επιδημιολογία, και ιδιαίτερα η περιγραφική, ως επιστημονικός κλάδος συμβάλλει στη διερεύνηση της αιτιοπαθογένειας των νόσων ανιχνεύοντας, μέσα από μελέτες, διαφορές της επίπτωσης των νόσων ως προς γεωγραφικούς παράγοντες (γεωγραφικό πλάτος, επιδημική εισβολή σε απομονωμένες περιοχές κλπ), δημογραφικούς παράγοντες (φύλο, φυλή, μετανάστευση), αλλά και γενετικούς και άλλους παράγοντες.

Στη ΣΚΠ ειδικά, οι μελέτες αυτές δυσχαιρένονται σημαντικά εξαιτίας διαφορών στις μεθόδους αναγνώρισης των περιπτώσεων, όπου πολλές φορές η αναγνώρισή τους μέσα σε μεγάλους πληθυσμούς βασίζεται σε υποκειμενικά κλινικά κριτήρια, αλλά και εξαιτίας της κλινικής ποικιλομορφίας της ίδιας της ΣΚΠ τόσο μεταξύ των ασθενών όσο και μεταξύ των διαφορετικών περιόδων της νόσου.

Στην παράγραφο αυτή θα αναπτυχθούν τα αποτελέσματα των επιδημιολογικών μελετών που αφορούν τη γεωγραφική και δημογραφική κατανομή της ΣΚΠ, ενώ η γενετική της νόσου θα αναπτυχθεί ξεχωριστά στην παράγραφο της αιτιοπαθογένειας, όπου θα αναπτυχθούν και τα εξαγόμενα συμπεράσματα από τα στοιχεία της παρούσας παραγράφου, ως προς την ύπαρξη περιβαλλοντικών παραγόντων με συμβολή στην αιτιοπαθογένεια της ΣΚΠ.

Η γεωγραφική κατανομή είναι ανομοιογενής. Η συχνότητα της νόσου, γενικά, αυξάνει αναλογικώς προς το γεωγραφικό πλάτος τόσο στο βόρειο όσο και στο νότιο ημισφαίριο, παρόλο που τα ποσοστά τείνουν να μειώνονται πέραν των 65 μοιρών βορείως και νοτίως. Είναι, λοιπόν, η ΣΚΠ μια νόσος των εύκρατων κλιμάτων, αφού ο επιπολασμός αυξάνεται όσο αυξάνεται η απόσταση από τον ισημερινό, μέχρι ενός σημείου (ΕΙΚΟΝΑ 10).

Σε γενικές γραμμές η ΣΚΠ απαντάται περισσότερο συχνά στην Ευρώπη, ηπειρωτική Β.Αμερική και ειδικότερα βόρειες ΗΠΑ και Καναδά, Αυστραλία στα νότια κυρίως και Νέα Ζηλανδία με τιμές επιπολασμού μεγαλύτερες από 50/100.000 πληθυσμού. Δεν είναι συνήθης η εμφάνισή της στην Άπω Ανατολή, όπως Ιαπωνία και Κίνα, στην ηπειρωτική Ν.Αμερική, στην αραβική χερσόνησο και την Ινδία, με τιμές επιπολασμού μικρότερη από 5/100.000 πληθυσμού. Είναι πρακτικώς άγνωστη μεταξύ των γηγενών ανθρώπων της Ισημερινής Αφρικής και μεταξύ των μελών της φυλής των Inuits στην Αλάσκα.



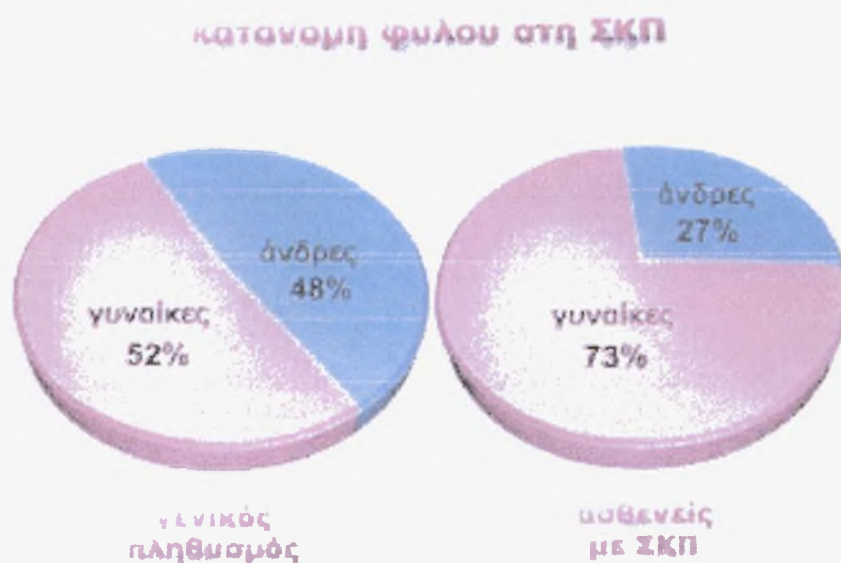
**Εικόνα 10**

Στη Β.Ελλάδα, σε μελέτη που δημοσιεύθηκε το 1990 και που αφορά τη χρονική περίοδο μεταξύ 1970-1984 αναφέρθηκαν 638 νέες περιπτώσεις ΣΚΠ στα διαμερίσματα Μακεδονίας και Θράκης. Η μέση ετήσια επίπτωση ήταν 1,79/100.000 κατοίκους αυξανόμενη όμως μεταξύ 1980-1984. στα τέλη του 1984 ο επιπολασμός ήταν 29,5/100.000 κατοίκους, αρκετά υψηλός παρόλο που η Β.Ελλάδα βρίσκεται στην ενδιάμεση ζώνη κινδύνου. Σε νεότερη μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2003 και που αφορά τη χρονική περίοδο μεταξύ 1974-1999 και πραγματοποιήθηκε όχι σε ολόκληρη τη Β.Ελλάδα αλλά στο νομό Έβρου, ο επιπολασμός εκτιμάται σε 38,9/100.000 άτομα, και τοποθετεί την περιοχή αυτή στη ζώνη υψηλού κινδύνου. Η μέση ετήσια επίπτωση μετρημένη σε διαστήματα 5ετίας, αυξήθηκε σημαντικά, από 0,66/100.000 κατά την 5ετία 1974-1978 σε 2,36/100.000 κατά την 5ετία 1994-1999. Η αύξηση του επιπολασμού θα μπορούσε ίσως να αποδοθεί σε άλλες κι όχι σε αιτιολογικές αλλαγές, αλλά η αύξηση στην ετήσια επίπτωση καταδεικνύει την πιθανότητα να υπάρχει διακύμανση των παραγόντων κινδύνου της νόσου.

Μελέτες επιπολασμού που κατέληγαν σε αρκετά χαμηλότερο επιπολασμό της νόσου στη Βουλγαρία, σε σύγκριση με γειτονικές της χώρες, έρχονται σε αντίθεση με νεότερη μελέτη που κατέληξε σε επιπολασμό περίπου 39/100.000, χωρίς σημαντική δηλαδή διαφορά από τις γείτονες χώρες. Σε αντίθεση με παλαιότερες μελέτες που ήθελαν την Ισπανία χώρα με χαμηλό επιπολασμό ΣΚΠ, πρόσφατη μελέτη μεταανάλυσης αναλύοντας τις μεθοδολογικές διαφορές των παλαιότερων μελετών και

πραγματοποιώντας μια εκτεταμένη μελέτη της επίπτωσης στη χώρα, συμπέρανε ότι η Ισπανία περιλαμβάνεται στη ζώνη του μέσου κινδύνου και ότι η επίπτωση έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια. Στις διάφορες μελέτες, οι πάσχοντες στη Γερμανία εμφανίζονται να είναι συνολικά μεταξύ 67.000 και 138.000. Μια νέα προσέγγιση υπολογισμού των ασθενών σε μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2000 υπολογίζει τους συνολικούς ασθενείς σε 122.000 και τον επιπολασμό της νόσου ίσο με 149 ασθενείς ανά 100.000 κατοίκους. Μελέτη δεδομένων περιόδου 15 έτη έδειξε υψηλότερη μέση ετήσια επίπτωση στο δυτικό μέρος της Φιλανδίας (3,3/100.000) σε σύγκριση με το νότιο (2,2/100.000), με την επίπτωση στις γυναίκες του δυτικού μέρους να αυξάνει διαρκώς, ενώ ο λόγος επίπτωσης γυναικών/ανδρών μεταβλήθηκε από 1,0 σε 2,2. Υπάρχουν, λοιπόν, ενδείξεις αυξημένης συχνότητας και ανομοιογενούς γεωγραφικής κατανομής.

Στις γυναίκες, η επίπτωση της ΣΚΠ είναι 1,4 έως 3,1 φορές υψηλότερη σε σχέση με την επίπτωση στους άνδρες. Εντούτοις, μεταξύ των ασθενών όπου εγκαθίσταται η νόσος σε μεγάλη σχετικώς ηλικία, τα ποσοστά επίπτωσης στα δύο φύλα είναι περίπου ίσα. Καί στις ΗΠΑ η ΣΚΠ είναι πιο συχνή μεταξύ των γυναικών, οι οποίες αποτελούν το 73% των περιστατικών. Οι λόγοι για αυτή την διαφορά συχνότητας στα δύο φύλα δεν είναι γνωστοί. Στην ΕΙΚΟΝΑ 11 παρουσιάζεται η αναλογία ανδρών-γυναικών στον γενικό πληθυσμό και στον πληθυσμό με ΣΚΠ, στις Η.Π.Α., από όπου υπάρχουν και τα περισσότερα στοιχεία και οι πιο εκτενείς μελέτες.



**Εικόνα 11:**

Αναλογία ανδρών-γυναικών στο γενικό πληθυσμό και στη ΣΚΠ, στις Η.Π.Α.

## ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Το αίτιο που προκαλεί την ΣΚΠ παραμένει άγνωστο έως σήμερα. Η επικρατέστερη άποψη, όπως προκύπτει μέσα από την επιδημιολογική προσέγγιση της προσπάθειας διερεύνησης της αιτιοπαθογένειας, είναι ότι ένας εξωγενής παράγοντας, πιθανώς ιός, προκαλεί σε γενετικά και ανοσολογικά προδιατεθειμένα άτομα μια παθολογική ανοσολογική αντίδραση που κατευθύνεται εναντίον των πρωτεϊνών της μυελίνης, χωρίς πάντως να έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη αυτού του εξωγενούς παράγοντα. Έτσι, τόσο περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως ιϊκές λοιμώξεις, όσο και αυτοανοσιακοί μηχανισμοί και γενετικοί προδιαθεσικοί παράγοντες δύνανται να επηρεάζουν την εμφάνιση της νόσου.

## ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Σύμφωνα με τα δεδομένα που αναφέρθηκαν στην παράγραφο της επιδημιολογίας και αφορούσαν την γεωγραφική κατανομή της ΣΚΠ ανά τον κόσμο, φαίνεται ότι η διαφορετική αυτή κατανομή συσχετίζεται θετικά με το γεωγραφικό πλάτος. Οι τιμές του επιπολασμού τείνουν να γίνονται υψηλότερες σε περιοχές με εύκρατο κλίμα και οικονομικά αναπτυγμένες, ενώ η εξάρτηση από το γεωγραφικό πλάτος είναι τόσο στενότερη όσο φυλετικά πιο ομοιογενής είναι ο πληθυσμός που εξετάζεται. Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις πως η επίπτωση και ο επιπολασμός της ΣΚΠ σε κάποιες περιοχές αυξάνονται, χωρίς αυτό να μπορεί βέβαια να αποδοθεί μόνο σε μεταβολή των διαγνωστικών μεθόδων. Δημογραφικά δεδομένα που αφορούν στην επίπτωση στα δύο φύλα καταδεικνύουν σταθερά συχνότερη εμφάνιση της νόσου στις γυναίκες απ'ότι στους άνδρες σε αναλογία περίπου 2:1. Οι ισχυρότερες όμως ενδείξεις ότι κάποιοι περιβαλλοντικοί παράγοντες υπεισέρχονται στην αιτιοπαθογένεια της ΣΚΠ προέρχονται από μελέτες που στηρίχθηκαν στη μετανάστευση. Βασίζονται στη λογική ότι η εμφάνιση μιας καθαρά γενετικής νόσου δεν θα επηρεασθεί από τη μετανάστευση, πράγμα που θα συμβεί όταν ένας περιβαλλοντογενής παράγων διαμορφώνει συνθήκες νόσησης στη χώρα υποδοχής. Παράλληλα εάν καταμετρηθεί ο επιπολασμός στους μετανάστες, κατά ομάδα ηλικιών, είναι δυνατόν να προσδιορισθεί σε ποιά ηλικία αποκτήθηκε η νόσος, ή η προδιάθεση γι'αυτήν. Βρέθηκε ότι άτομα που μετανάστευσαν σε μικρή ηλικία από χώρες με υψηλή συχνότητα, της νόσου σε χώρες με χαμηλή συχνότητα, εμφάνιζαν τη συχνότητα της χώρας προορισμού τους, ενώ αν μετανάστευαν σε ηλικία μεγαλύτερη των 15 ετών εμφάνιζαν συχνότητα ανάλογη με της χώρας από όπου ξεκινούσαν. Αυτό επιβεβαιώθηκε με μελέτες μεταναστών από τη Β.Ευρώπη,

περιοχή υψηλού κινδύνου, στη Ν.Αφρική, περιοχή χαμηλού κινδύνου. Αλλά και η χαμηλή συχνότητα των αφρικανών αυξήθηκε στην δεύτερη γενιά μεταναστών που μεγάλωσε στη Μεγάλη Βρετανία. Το γεγονός αυτό είναι ενδεικτικό της δράσης κάποιου περιβαλλοντικού παράγοντα στα πρώτα χρόνια της ζωής του πάσχοντα. Όλα τα παραπάνω συντείνουν στην εξαγωγή του συμπεράσματος ότι η ΣΚΠ δεν είναι μια αμιγώς γενετική νόσος, οι τιμές του επιπολασμού είναι δυνατόν να μεταβάλλονται με την αλλαγή του περιβάλλοντος και το ενδεχόμενο γεγονός που μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη της νόσου πρέπει να αναζητηθεί στα πρώτα χρόνια της ζωής.

Εφόσον τα επιδημιολογικά δεδομένα συγκλίνουν στην πιθανότητα ύπαρξης περιβαλλοντικής συνιστώσας στην εμφάνιση της νόσου, πιθανότερος υποψήφιος είναι κάποιος λοιμογόνος παράγων όπως κάποιος ιός. Σημαντικές ενδείξεις προς αυτή την κατεύθυνση προκύπτουν από την μελέτη επιδημικών εμφανίσεων της ΣΚΠ σε απομονωμένες περιοχές. Χαρακτηριστικές περιπτώσεις αποτελούν τα νησιά Faroe αλλά και τα νησιά Orkney και Shetlands που βρίσκονται βορείως της Σκωτίας και στην Ισλανδία. Σε αυτά τα νησιά η ΣΚΠ εμφανίστηκε επιδημικά κατά τη διάρκεια κατοχής τους από ξένα στρατεύματα χωρών με μεγάλο επιπολασμό. Εξάλλου, έχει παρατηρηθεί ότι η ιϊκή εγκεφαλίτιδα στα παιδιά μπορεί να ακολουθείται από απομυελίνωση. Ένα άλλο στοιχείο ενισχυτικό της άποψης ότι η απομυελίνωση της ΣΚΠ μπορεί να προκύπτει από ιϊκή λοίμωξη αποτελεί το πιο μελετημένο ζωικό μοντέλο επαγόμενης από ιό απομυελίνωσης. Πρόκειται για τον πικορναϊό Theiler των ποντικών. Λοίμωξη από στελέχη του ιού καταλήγει σε προσβολή των ολιγοδενδροκυττάρων με πολυεστιακή περιαγγειακή λεμφοκυτταρική διήθηση και απομυελίνωση. Γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν την προδιάθεση προς απομυελίνωση και την κλινική εικόνα της νόσου. Ιούς που έχουν ανευρεθεί σε ασθενείς με ΣΚΠ αποτελούν οι ιοί ιλαράς, ερυθράς, παρωτίτιδας, κορωναιοί, παραινφλουένζας, απλού έρπη, Epstein-Barr, και τύπου I λεμφοτροπικού ιού των Τα-κυττάρων του ανθρώπου, χωρίς όμως κανένας από αυτούς να έχει ανιχνευθεί επαναλήψιμα. Ο ανθρώπινος ερπητοϊός-6 εμπλέκεται στην εξέλιξη της ΣΚΠ. Είναι ένας παράγοντας που προκαλεί roseola subitum στα παιδιά. Πάνω από το 90% των ενηλίκων φέρουν αντισώματα ενώ η λοίμωξη, κυρίως ασυμπτωματική, πιθανώς προκύπτει στην παιδική ηλικία. Μονολότι τα αποτελέσματα δεν είναι ομοιόμορφα, πολλοί ερευνητές βρήκαν αυξημένη παρουσία ιϊκής δραστηριότητας περιφερικά των πλακών της ΣΚΠ. Μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη προκειμένου να διαπιστωθεί η δυνατότητα μείωσης της συχνότητας των επεισοδίων ΣΚΠ μέσω προφυλακτικής αγωγής με αντι-ιϊκούς παράγοντες. Τελικά, είναι πιθανόν να



μην υφίσταται ένας μοναδικός ιός που να πυροδοτεί την απομυελίνωση σε όλους τους ασθενείς, αλλά να εμπλέκονται πολλοί διαφορετικοί ιοί.

## ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως περιγράφηκε, ασκούν επίδραση χωρίς όμως να αρκούν για να εξηγήσουν την αιτιοπαθογένεια της ΣΚΠ. Επομένως, οι επιδημιολογικές μελέτες, στρέφονται στη διερεύνηση της πιθανής ύπαρξης γενετικής συνιστώσας στην αιτιοπαθογένεια της νόσου. Οι δύο τύποι μελετών που αποπειρώνται να απαντήσουν σ' αυτό το ζήτημα είναι οι *μελέτες οικογενειών ασθενών* και οι *μελέτες διδύμων*.

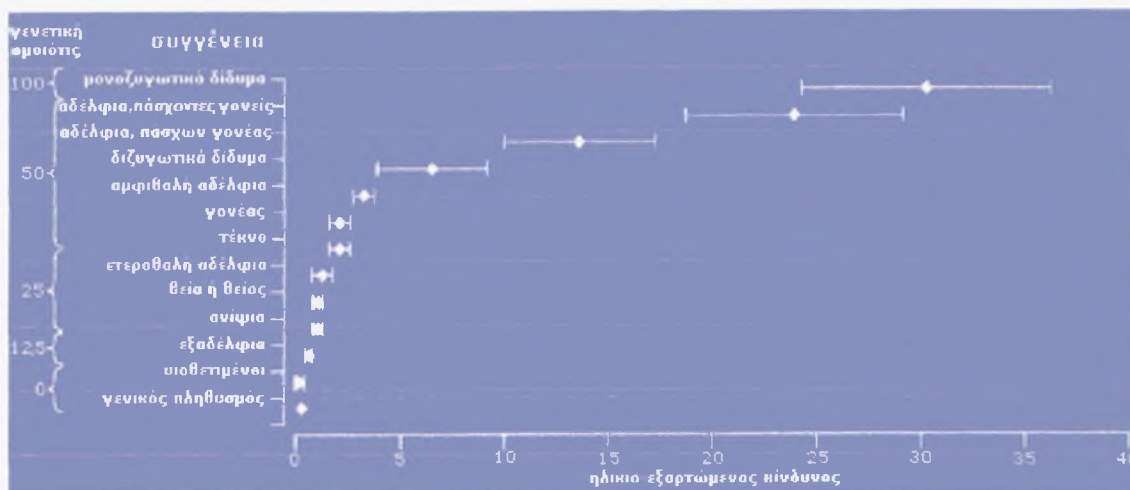
### - *Μελέτες οικογενειών ασθενών*

Κατά τη μελέτη των οικογενειών των ασθενών με ΣΚΠ σε παλαιότερες εποχές είχαν αναφερθεί στη βιβλιογραφία περιπτώσεις οικογενειών με περισσότερα του ενός προσβεβλημένα μέλη, συνήθως αδέλφια, όπου είχε προταθεί ο οικογενής χαρακτήρας της νόσου, ενώ σε κάποιες μελέτες προτεινόταν μάλιστα η μεταβίβαση της νόσου σύμφωνα με τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Εντούτοις, νεότερες συστηματικές οικογενειακές μελέτες σε ειδική κλινική του Βανκούβερ τείνουν να αποκλείσουν την μεταβίβαση της νόσου με μονογονιδιακή επικρατητική ή υπολειπόμενη κληρονομικότητα, όπως προκύπτει από τα ποσοστά με τα οποία εμφανίζεται η νόσος στους συγγενείς. Υπάρχει πάντως οικογενής επανεμφάνιση της ΣΚΠ σε ποσοστό 15%.

### - *Μελέτες σε διδύμους*

Οι μελέτες σε διδύμους αποτελούν την κλασική μέθοδο διερεύνησης της βαρύτητας της συμμετοχής του γενετικού και του περιβαλλοντικού παράγοντα στα νοσήματα. Στις μελέτες αυτές γίνεται σύγκριση της εμφάνισης της νόσου και στα δύο αδέλφια στις περιπτώσεις μονοζυγωτικών (MZ), διζυγωτικών (ΔΖ) και μη δίδυμων αδελφών. Η σύγκριση της συμφωνίας (προσβολής και των δύο διδύμων) μεταξύ MZ και ΔΖ διδύμων αποτελεί μέτρο της επίδρασης του γενετικού παράγοντα βασισμένο στο γεγονός ότι οι MZ δίδυμοι είναι γενετικά πανομοιότυποι, ενώ οι ΔΖ ομοιάζουν γενετικά όσο τα μη δίδυμα αδέλφια. Η σύγκριση μεταξύ ΔΖ και μη δίδυμων αδελφών αποτελεί τρόπο αξιολόγησης της επίδρασης μη γενετικών παραγόντων, βασισμένο στο γεγονός ότι οι ΔΖ δίδυμοι μοιράζονται ένα περιβάλλον περισσότερο όμοιο από ότι τα μη δίδυμα αδέλφια. Όπως φαίνεται στην ΕΙΚΟΝΑ 12, η συμφωνία στους MZ διδύμους είναι περίπου 35%. Ο κίνδυνος σε ετεροθαλή αδέλφια είναι μικρότερος από ότι σε κανονικά αδέλφια. Ο κίνδυνος είναι υψηλότερος σε αδέλφια (3%), γονείς (2%) και

τέκνα (2%) ασθενών από ότι σε συγγενείς δευτέρου και τρίτου βαθμού. Η εμφάνιση της νόσου είναι συχνότερη σε τέκνα δύο προσβεβλημένων γονέων (20%) από ότι σε απογόνους ενός προσβεβλημένου γονέα (2%). Ο κίνδυνος δεν αυξάνεται ούτε για άτομα υιοθετημένα από οικογένεια με προσβεβλημένο μέλος, ούτε για μη-βιολογικούς συγγενείς υιοθετημένων που αναπτύσσουν ΣΚΠ.



**Εικόνα 12**

Τα προηγούμενα, ιδιαίτερα η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης ΣΚΠ στους ΜΖ διδύμους σε σχέση με τους ΔΖ, συνδυαζόμενα με τη διαφορετική συχνότητα της νόσου στις διάφορες φυλές, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο της επιδημιολογίας, προτείνουν την ύπαρξη γενετικής συνιστώσας στην εμφάνιση της ΣΚΠ, η οποία συνιστώσα πάντως είναι μάλλον αυθεντικά πολυγονιδιακή παρά μονογονιδιακή. Λαμβανομένης υπόψιν και της περιβαλλοντικής συνιστώσας της αιτιοπαθογένειας της νόσου, προτείνεται η απόδοση στη ΣΚΠ του χαρακτηρισμού του πολυπαραγοντικού νοσήματος (complex trait).

Τα γονίδια που ευθύνονται για τα πολυπαραγοντικά νοσήματα δεν προκαλούν παθήσεις μέσω κάποιων μεταλλάξεών τους που κωδικοποιούν δομικώς τροποποιημένα γονιδιακά προϊόντα, παρά μέσω φυσιολογικών πολυμορφισμών. Δρουν είτε ανεξάρτητα ή μέσω επίστασης και κάθε πολυμορφισμός μπορεί να συμμετέχει με μικρή συμβολή σε ένα συλλογικό αποτέλεσμα πάνω σε μια, αδιευκρίνιστη ακόμη, δομική ή φυσιολογική λειτουργία. Αυτά τα γονίδια ονομάζονται γονίδια επιρρέπειας (susceptibility genes) και μπορούν να αναγνωρισθούν με μεθόδους *ανάλυσης συσχέτισμού* ή *ανάλυσης σύνδεσης*, ή και τα δύο, οι οποίες είτε στοχεύουν σε υποψήφιες περιοχές του γενώματος, είτε εφαρμόζονται συστηματικά κατά μήκος σε όλο το γένωμα. Τα γονίδια, των οποίων οι πολυμορφισμοί θα εξετασθούν ως προς την

παρουσία τους σε ασθενείς με ΣΚΠ στην παρούσα εργασία, θεωρούνται υποψήφια γονίδια επιρρέπειας γι' αυτή τη νόσο

Η συνεισφορά υποψήφιων γονιδιακών τόπων στην επιρρέπεια σε ΣΚΠ εκτιμάται με δύο συμπληρωματικές μεθόδους. Πρώτον, την προσέγγιση του *συσχετισμού*, όπου ανιχνεύονται συσχετισμοί μεταξύ συγκεκριμένων γενετικών δεικτών και ΣΚΠ σε μελέτες πληθυσμού. Συνηθέστερα, αυτό γίνεται με τη μέθοδο *περίπτωσης-μάρτυρα* (case-control). Συγκρίνεται η συχνότητα ενός αλληλόμορφου γονιδίου μεταξύ μιας ομάδας πασχόντων και μιας ομάδας φυσιολογικών ατόμων ελέγχου. Όταν υπάρχει διαφορά σημαίνει ότι υπάρχει γενετική σύνδεση ανάμεσα στην ασθένεια και το γενετικό δείκτη (αλληλόμορφο), που εμφανίζεται ως *ανισορροπία σύνδεσης* (linkage disequilibrium). Μικρές εθνολογικές και τοπικές γενετικές διαφορές μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά τα πειραματικά αποτελέσματα. Μια εναλλακτική λύση ώστε να παρακαμφθεί αυτό το πρόβλημα είναι η χρήση γονικών απλοτύπων που δεν μεταβιβάζονται στους ασθενείς ως απλοτύπους μάρτυρες. Δεύτερον, την προσέγγιση της *ανάλυσης σύνδεσης*, όπου αναγνωρίζεται σύνδεση μεταξύ κάποιου συγκεκριμένου γενετικού τόπου και ΣΚΠ. Η καθιερωμένη μέθοδος ανάλυσης σύνδεσης στη ΣΚΠ είναι η αναζήτηση απλοτύπων, μέσω ανάλυσης της μετάδοσής τους, που είναι κοινοί σε ζεύγη προσβεβλημένων αδελφών. Εντούτοις, όταν ένας γονιδιακός τόπος έχει ελάσσονα συμβολή στην επιρρέπεια στη νόσο, αυτή η τακτική μπορεί να μην ανιχνεύσει τη σύνδεση και να πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένα πιο ισχυρό τεστ ανάλυσης σύνδεσης όπως το *τεστ ανισορροπίας μετάδοσης* (Transmission Disequilibrium Test, TDT).

Λόγω της φλεγμονώδους φύσεως του παθογενετικού μηχανισμού που φαίνεται να διαμεσολαβεί στη βλάβη του ΚΝΣ στη ΣΚΠ, οι μελέτες συσχετισμού και ανάλυσης σύνδεσης εστιάστηκαν σε υποψήφια γονίδια που κωδικεύουν ανοσο-σχετιζόμενα μόρια. Στα γονίδια που εξετάστηκαν περιλαμβάνονται τα γονίδια του *μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας* (Major Histocompatibility Complex, MHC) που κωδικεύουν τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας, γνωστά και ως *σύστημα αντιγόνων ανθρώπινων λεμφοκυττάρων* (Human Leukocyte Antigen System, HLA), τα γονίδια που ελέγχουν την α και β αλυσίδα του υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων (T-cell receptor, TCR), τα γονίδια για τις βαρείες αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών (immunoglobulins, Ig), τα γονίδια της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης (Myelin Basic Protein, MBP), δεδομένου ότι κωδικεύουν τα μόρια στόχους της αυτοάνοσης διαδικασίας στη ΣΚΠ, το γονίδιο του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (Tumor Necrosis Factor-α, TNF-α), λόγω της ανεύρεσής του στις απομυελινωτικές βλάβες και των ενδείξεων συμμετοχής του

στην παθογένεση της βλάβης, αλλά και λόγω των αυξημένων επιπέδων του στο ENY που σχετίζονται με την πρόοδο και τη σοβαρότητα της νόσου, γονίδια κυτταροκινών όπως θα μελετηθούν και στην παρούσα εργασία και για λόγους που αναπτύσσονται παρακάτω, και αρκετά άλλα γονίδια.

Από τις πρώτες case-control μελέτες του HLA είχε προταθεί συσχετισμός με τους HLA-A3 και -B7 ορολογικούς υποτύπους της τάξης I, που αργότερα θεωρήθηκαν ως δευτερεύοντες συσχετισμοί λόγω ενός ισχυρότερου συσχετισμού με το HLA-DR2 της τάξης II. Λόγω του τελευταίου συσχετισμού και του γεγονότος ότι η ΕΑΕ και άλλες αυτοάνοσες νόσοι έχουν συσχετισθεί με το τάξης II MHC, οι περισσότερες μελέτες του HLA επικεντρώθηκαν στην περιοχή της τάξης II, που διαιρείται σε τρεις κύριες υποπεριοχές, DP, DQ και DR, καθεμία από τις οποίες περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα ζεύγος εκφραζόμενων γονιδίων που κωδικεύει ένα ζεύγος λειτουργικών α και β αλύσων οι οποίες απαντώνται σε διάφορα κύτταρα εμπλεκόμενα στην ανοσιακή απάντηση. Οι ορολογικές μελέτες έδειξαν μη-συσχετισμό σε κάποιους πληθυσμούς, θεωρούνται όμως αβέβαιης σημασίας λόγω των αδυναμιών τους να αναγνωρίσουν προϊόντα όλων των αλληλίων όπως, παραδείγματος χάριν, των υποτύπων του DR2 και λόγω του σημαντικού βαθμού σφάλματος που έχουν. Οι βασιζόμενες σε ανάλυση DNA μελέτες πληθυσμού προτείνουν συσχετισμό της ΣΚΠ με τον συχνό στους Καυκάσιους DR2 απλότυπο *DRB1 1501-DQA1 0102-DQB1 0602* στους περισσότερους πληθυσμούς. Αυτό σημαίνει είτε ότι ο DR2 απλότυπος περιλαμβάνει γονίδιο επιρρέπειας στη ΣΚΠ, ή ότι το γονίδιο επιρρέπειας είναι κάποιο μη-HLA γονίδιο συνδεδεμένο στενά με τον DR2 απλότυπο, όπως για παράδειγμα τα γονίδια TAP και LMP, αν και υπάρχουν ενδείξεις πλέον που αποδυναμώνουν την πιθανότητα τα δύο τελευταία γονίδια να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο. Την επίμονη κατάδειξη συσχετισμού της ΣΚΠ με τον DR2 απλότυπο, όπως προκύπτει από τις μελέτες πληθυσμού, στηρίζει μια μελέτη σύνδεσης σε ελβετικές οικογένειες.

Μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 1995 στην Ολλανδία, κατέληξε στην ύπαρξη συσχετισμού μεταξύ πολυμορφισμού του IL-1RN και της επιρρέπειας στη ΣΚΠ. Μελέτη συσχετισμού των γονιδίων IL-1B και IL-1RN με την εμφάνιση ΣΚΠ, που πραγματοποιήθηκε το 1999 με τη μέθοδο case-control, από ομάδα όπου συμμετείχαν και οι ερευνητές της μελέτης του 1995, και αφορούσε 148 λευκούς ολλανδούς ασθενείς, κατέληξε στη μη-εύρεση σημαντικών διαφορών σε γονότυπους και συχνότητες αλληλίων μεταξύ ασθενών και υγίων, ενώ το ίδιο αποτέλεσμα είχε και η μελέτη συσχετισμού με τον τύπο της ασθένειας. Εντούτοις, ένας συγκεκριμένος συνδυασμός IL-1B/IL-1RN συσχετίστηκε με τη σοβαρότητα της νόσου. Ασθενείς με το

συνδυασμό αλληλίου 2<sup>+</sup> IL-1B/αλληλίου 2<sup>+</sup> IL-1RN παρουσίαζαν υψηλότερο ρυθμό επιδείνωσης και προόδου της αναπηρίας τους, όπως αυτή μετράται με την κλίμακα EDSS. Προτείνεται η πιθανή χρήση αυτών των πολυμορφισμών για τη διάκριση υποσυνόλων ασθενών με χειρότερη πρόγνωση. Case-control μελέτη συσχετισμού που πραγματοποιήθηκε το 1997 σε ισπανικό πληθυσμό και αφορούσε 128 λευκούς ισπανούς, κατέληξε σε συσχετισμό του αλληλίου-2 του IL-1RN με την επιρρέπεια στην R/R μορφή της ΣΚΠ, ο οποίος συσχετισμός έγινε ισχυρότερος όταν εξετάσθηκε η φορεία του αλληλίου-2 του IL-1RN σε συνδυασμό με τη φορεία του υποτύπου DRB1\*1501 του DR2 αλληλίου του HLA. Ο συσχετισμός ήταν ακόμη πιο ισχυρός όταν εξετάζονταν μόνο το γυναικείο φύλο. Φαίνεται ότι η συνδυασμένη κληρονομηση του αλληλίου-2 του IL-1RN και του DRB1\*1501 αλληλίου του HLA αυξάνει αθροιστικά την επιρρέπεια προς R/R ΣΚΠ, εντούτοις η αύξηση αυτή δεν αρκεί για να εξηγήσει τον αυξημένο κίνδυνο που προκύπτει μέσα από τις μελέτες οικογενειών.

## IL-1A ΚΑΙ IL-1B

Οι IL-1α και IL-1β ανήκουν στις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Ο όρος κυτταροκίνη είναι γενικός και αναφέρεται σε μία μεγάλη ομάδα διαλυτών μορίων που εμπλέκονται στη σηματοδότηση μεταξύ κυττάρων κατά τη διάρκεια της ανοσιακής απάντησης. Όλες οι κυτταροκίνες είναι πρωτεΐνες, σχετικά χαμηλού μοριακού βάρους (συνήθως 8-25kDa), αποτελούμενες συνήθως από μία αλυσίδα, ενώ μερικές φέρουν προσδεδεμένες υδατανθρακικές ομάδες (γλυκοπρωτεΐνες). Ρυθμίζουν πολλές σημαντικές βιολογικές διαδικασίες, όπως την κυτταρική ανάπτυξη, κυτταρική ενεργοποίηση, φλεγμονή, ανοσοποίηση, ιστική επιδιόρθωση, ίνωση και μορφογένεση. Οι διάφορες κυτταροκίνες ταξινομούνται σε κατηγορίες, μία από τις οποίες είναι οι ιντερλευκίνες. Οι IL ονομάστηκαν έτσι το 1981, θεωρούμενες ως μόρια παραγόμενα από λευκοκύτταρα και δρώντα σε λευκοκύτταρα. Μεταγενέστερες έρευνες αποκάλυψαν ότι για ορισμένες IL αυτό ισχύει και για μη-λευκοκύτταρα, η ονοματολογία όμως παρέμεινε. Οι IL είναι μια μεγάλη ομάδα μορίων (IL-1 έως IL-15) που παράγονται κυρίως από τα T-λεμφοκύτταρα, αλλά και από μονοκύτταρα φαγοκύτταρα και ιστικά κύτταρα. Έχουν ποικιλία λειτουργιών, με τις περισσότερες να εμπλέκονται στην κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση. Κάθε IL ασκεί δράση σε συγκεκριμένο, περιορισμένο σύνολο κυττάρων στα οποία εκφράζεται ο κατάλληλος υποδοχέας για αυτή την IL.

Η ιντερλευκίνη-1 (IL-1), παλαιότερα γνωστή ως ενδογενές πυρογόνο ή ενεργοποιητικός παράγων λεμφοκυττάρων ή καταβολίνη, παράγεται από μια ποικιλία κυτταρικών τύπων, περιλαμβανομένων, κυριοτέρως, των μονοκυττάρων του αίματος όπως ενεργοποιημένων μακροφάγων και διεγερμένων B-λεμφοκυττάρων, των T-λεμφοκυττάρων (λεμφοκίνες) αλλά και αστροκυττάρων, δένδριτικών κυττάρων, επιθηλιακών κυττάρων, κερατινοκυττάρων και ινοβλαστών, ως απάντηση σε κυτταρικό τραυματισμό, λοίμωξη ή παρουσία αντιγόνων. Είναι δυναμική διαμεσολαβητής της φλεγμονής και της ανοσίας, διαμεσολαβώντας τη σειρά αυτή των αμυντικών αντιδράσεων που συλλογικά αποκαλούνται αντίδραση οξείας φάσεως. Έτσι, στο ήπαρ επάγει την παραγωγή των πρωτεϊνών οξείας φάσης που απελευθερώνονται ως απάντηση σε κυτταρικό τραυματισμό.

Το 1984 απομονώθηκε cDNA ανθρώπινης IL-1 και ένα χρόνο αργότερα, από το mRNA διεγερμένων με λιποπολυσακχαρίδη (LPS) μακροφάγων, απομονώθηκαν δύο διακριτά cDNAs που κωδίκευαν πρωτεΐνες με δράση IL-1. Έτσι, έχουν βρεθεί δύο

διακριτές δομικά μορφές της IL: Η IL-1α, που είναι η όξινη μορφή με pI=5 και η IL-1β, που είναι η ουδέτερη μορφή με pI=7.

Μοριακά, και οι δύο μορφές της IL-1 είναι πρωτείνες μοριακού βάρους περίπου 17KD κωδικοκούμενες από ξεχωριστά γονίδια. Μεταξύ τους εμφανίζουν περιορισμένη ομολογία, 26% σε πρωτεϊνικό επίπεδο, 45% σε επίπεδο νουκλεϊκού οξέως, ενώ κάθε μία φαίνεται ότι συντίθεται αρχικά ως ένα μεγαλύτερο πρόδρομο μόριο μοριακού βάρους 30.606 Daltons για την IL-1α και 30.749 Daltons για την IL-1β, από το οποίο προκύπτει η μικρότερη τελική μορφή της πρωτεΐνης.

Οι IL-1α και IL-1β παρουσιάζουν πλειοτροπική δράση, που περιλαμβάνει την επαγωγή της κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης των T- και B- λεμφοκυττάρων, καθώς και τη διέγερση άλλων κυτταροκινών, μορίων συγκόλλησης, ισταμίνης και θρομβοξάνης. Έτσι, στα B-λεμφοκύτταρα διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση προς πλασματοκύτταρα, ενώ στα T-λεμφοκύτταρα τον πολλαπλασιασμό, την έκφραση υποδοχέα IL-2 και την παραγωγή άλλων κυτταροκινών. Επάγουν φλεγμονώδεις απαντήσεις, όπως την παραγωγή προσταγλανδινών και την αύξηση της δραστηριότητας στα μακροφάγα, όπου διεγείρεται και η χημειοταξία, και την παραγωγή αποδομικών ενζύμων, όπως κολλαγενάση. Η επίδρασή τους στα κύτταρα Φυσικούς Φονείς (Natural Killers cells) επάγει την κυτταροτοξική δράση τους, ενώ τα πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα ενεργοποιούνται μεταβολικά και κινούνται μέσω χημειοταξίας προς τον τόπο παραγωγής της IL-1. Στον εγκέφαλο δρουν επάγοντας τον πυρετό και την απελευθέρωση κορτικοστεροειδών. Η λειτουργία τους παρουσιάζει επικάλυψη με τη λειτουργία των TNF-α και IL-6. Εμπλέκονται επίσης στη διαδικασία της απόπτωσης (κυτταρικός θάνατος). Τόσο η IL-1α όσο και η IL-1β απελευθερώνονται ύστερα από κυτταρικό τραυματισμό ασχέτως από το αίτιο που τον προκάλεσε. Ο φυσικός αναστολέας της δράσης τους, IL-1RN, αναστέλλει την εμφάνιση κλινικών εκδηλώσεων στην ΕΑΕ, το πειραματικό ζωϊκό μοντέλο της ΣΚΠ. Τα επίπεδα της IL-1β στον ορό και στο ΕΝΥ ανυψώνονται κατά τη φάση της έξαρσης της ΣΚΠ, ενώ περιορίζονται με τη χρήση κορτικοστεροειδών. Όλα τα προηγούμενα, επικουρούμενα και από το γεγονός ότι στη ΣΚΠ οι IL-1α και IL-1β ανευρίσκονται εντός και περιμετρικά των ορίων των βλαβών της νόσου, παραγόμενες από τα μακροφάγα και τα κύτταρα της μικρογλοίας, και είναι πιθανή η εμπλοκή τους στην καταστροφή της μυελίνης του ΚΝΣ, καθώς και ότι έχουν συσχετισθεί με πολλές χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις, όπως ρευματοειδή αρθρίτιδα, ελκώδη κολίτιδα, περιοδοντίτιδα και ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη, προτείνουν για τις

γλυκοπρωτεΐνες της οικογένειας της IL-1 την πιθανότητα να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην άνοσο-παθογένεση της ΣΚΠ.

Η φλεγμονώδης απάντηση έχει κεντρικό ρόλο στη παθολογία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, ενώ οι IL-1α και IL-1β είναι κυτταροκίνες με σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της φλεγμονώδους απάντησης. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν συνδυασμένες sib-TDT και TDT μέθοδοι, καθώς και παραμετρικές και μη παραμετρικές μέθοδοι σύνδεσης για να διερευνηθεί ο ρόλος των γονιδίων της IL-1α και IL-1β στην ασθένεια. Τα αποτελέσματα παρέχουν καινούργιες ενδείξεις συσχετισμού των γονιδίων με την ρευματοειδή αρθρίτιδα και πιθανού ρόλου στη σοβαρή διαβρωτική μορφή της ασθένειας.

Η παρουσία πολυμορφισμών των γονιδίων IL-1 σε ασθενείς με νόσο Alzheimer (AD), υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η φλεγμονή είναι σημαντική στην εκδήλωση αλλά και την κλινική πορεία της νόσου. Η φλεγμονή ίσως συμβάλλει στην παθοφυσιολογία της AD, και δυναμικοί νευροτοξικοί διαμεσολαβητές της φλεγμονής όπως η IL-1 εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα από τα γλοιακά κύτταρα ασθενών με AD και πιθανώς οδηγούν σε νευρωνικό τραυματισμό. Πολυμορφισμοί της IL-1 αυξάνουν πράγματι τον κίνδυνο εμφάνισης AD και ειδικότερα ο πολυμορφισμός στη θέση -889 του προμότορα. Σε άλλες εργασίες, πολυμορφισμοί της IL-1β περιλαμβάνονται σε μια ομάδα από πολυμορφισμούς και άλλων γονιδίων όπως IL-1α, IL-6, TNF, α-2-μακροσφαιρίνη, α-1-αντιχυμοθρυψίνη, το σύνολο των οποίων αποτελούν ένα προφίλ προδιάθεσης προς AD, καθώς η συνδυασμένη επίδραση πολλαπλών υψηλού κινδύνου αλληλόμορφων αντανακλάται μέσα από την αυξημένη πιθανότητα των φορέων να αναπτύξουν AD.

Τόσο η IL-1α όσο και η IL-1β διεγείρουν την δραστηριότητα των οστεοκλαστών *in vitro* και θεωρούνται έτσι δυναμικοί παράγοντες απορρόφησης οστού. Μετά από υποδόριες εγχύσεις IL-1α και IL-1β παρατηρείται αξιοσημείωτη δόσοεξαρτώμενη αύξηση του ασβεστίου πλάσματος, αυξημένος αριθμός οστεοκλαστών και επιφάνειες που φανερώνουν ιστολογικά απορρόφηση οστού. Καταδεικνύεται έτσι ο ρόλος των IL-1α και IL-1β στη ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου του εξωκυττάριου υγρού

Στην προσπάθεια για την χαρτογράφηση του γονιδίου των IL-1, αρχικά κατεδείχθει το χρωμόσωμα 2 και με *in situ* υβριδισμό το γονίδιο οριοθετήθηκε στο 2q13-q21. Σ' αυτήν την εργασία είχε χρησιμοποιηθεί ως probe, cDNA από την αρχική απομόνωση του 1984 και αντιστοιχούσε μάλλον στην IL-1β. Στη συνέχεια, με χρήση probe της IL-1α βρέθηκε να γίνεται υβριδοποίηση *in situ* στην ίδια περιοχή 2q13-q21, και στην ίδια εργασία προτάθηκε η περιοχή στο τέλος του χρωμοσώματος 18q σαν



τόπος της IL-1β. Την ίδια περίοδο όμως βρέθηκε ότι υπάρχουν και στον ποντικό τουλάχιστον 2 γονίδια IL-1 και μάλιστα αναλύοντας με Southern blot το DNA από υβριδικά κύτταρα ινδικού χοιριδίου/ ποντικού, αλλά και με *in situ* χρωμοσωμικό υβριδισμό αργότερα, κατεδείχθει ότι τα δύο γονίδια εδράζονται στο χρωμόσωμα 2 του ποντικού. Επιπλέον, με ανάλυση του τρόπου κληρονομής ορισμένων RFLPs σχετιζόμενων με το κάθε γονίδιο, βρέθηκε ότι τα δύο γονίδια στον ποντικό είναι στενά συνδεδεμένα, ενώ με pulsed field gel electrophoresis βρέθηκε να περιέχονται σε ένα γενομικό τμήμα μεγέθους περίπου 70 Kb. Όταν αργότερα, όπως αναφέρεται και παρακάτω, ένα γονίδιο στενά σχετιζόμενο με τα γονίδια των IL-1, το γονίδιο του IL-1RN, χαρτογραφήθηκε στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 2q14.2, έγινε προσπάθεια χαρτογράφησης με περιοριστικά ένζυμα όλης της περιοχής του γενώματος που ίσως περιλάμβανε τα 3 σχετιζόμενα γονίδια. Αυτή η εργασία κατέληξε ότι από ορισμένο σημείο τα τρία γονίδια διευθετούνται σε αποστάσεις που έχουν ως εξής: IL-1α μεταξύ +0 και +35Kb, IL-1β μεταξύ +70 και +110 Kb και IL-1RN μεταξύ +330 και +430 Kb. Επειδή, τέλος, η χαρτογράφηση του IL-1RN στο 2q14.2 θεωρείται η πιο αξιόπιστη, με τα σημερινά δεδομένα τα γονίδια των IL-1α και IL-1β θεωρείται ότι βρίσκονται στο χρωμόσωμα 2q14.

Η αλληλουχία του γονιδίου της IL-1β αναλύθηκε από τους Bensia et.al και βρέθηκε να αποτελείται από 7924 bp μοιρασμένα σε 6 ιντρόνια και 6 εξόνια καθώς και 2 περιοχές επαναλαμβανόμενων Alu αλληλουχιών.

## IL-1RN

Ο IL-1RN είναι συναγωνιστικός αναστολέας της δράσης της IL-1. Συναγωνίζεται τις IL-1α και IL-1β για τους ίδιους υποδοχείς, παρεμποδίζοντας έτσι την ενεργοποίηση του κυττάρου στόχου, δεδομένου ότι η πρόσδεσή του δεν προκαλεί ενεργοποίηση, οπότε μπορεί να θεωρηθεί αμιγώς ως ανταγωνιστής. Ως αποτέλεσμα, η βιολογική δράση της IL-1 δεν εμφανίζεται στη φυσιολογική και παθοφυσιολογική ανοσιακή και φλεγμονώδη απάντηση. Ο IL-1RN έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την εμφάνιση των κλινικών σημείων της ΕΑΕ, η οποία, όπως αναφέρθηκε, είναι το ζωϊκό πειραματικό μοντέλο μελέτης της ΣΚΠ. Έτσι, το βιολογικό αποτέλεσμα της IL-1β είναι εξαρτώμενο από το λόγο της IL-1β προς τον IL-1RN. Ο όρος IL-1RN αναφέρεται σε δύο διαφορετικές πρωτεΐνες, κωδικευόμενες από το ίδιο γονίδιο, οι οποίες προκύπτουν μέσω εναλλακτικού ματίσματος που δημιουργεί δύο διαφορετικά πρώτα εξόνια. Η μία

ισομορφή (17kD) εκκρίνεται, ενώ η άλλη (18kD) παραμένει στο κυτταρόπλασμα. Στο 2<sup>ο</sup> ιντρόνιο του γονιδίου του IL-1RN υπάρχει ένα πολυμορφικό σημείο ποικίλου αριθμού επαναλαμβανόμενων, 86bp μεγέθους, αλληλουχιών (Variable Number Tandem Repeats, VNTR). Απαντώνται 5 αλληλία μεγέθους 300bp, ή 385bp, ή 472bp, ή 555bp, ή 740bp αναλόγως του αριθμού των επαναλαμβανόμενων 86bp περιοχών που διαθέτει το γονίδιο (2 επαναλήψεις στο αλληλίο 2, 3 στο αλληλίο 4, 4 στο αλληλίο 1, 5 στο αλληλίο 3, και 6 στο αλληλίο 5, αντιστοίχως).

Σε εργασία που στόχευε στη διερεύνηση του ρόλου των γνωστών πολυμορφισμών των δύο γονιδίων στην εμφάνιση της οστεοπόρωσης, κατεδείχθει ότι ο VNTR πολυμορφισμός των επαναλαμβανόμενων 86 bp συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο οστεοπορωτικών καταγμάτων. Άλλοι πολυμορφισμοί και των δύο γονιδίων δεν βρέθηκαν να εμπλέκονται.

Σημαντικά χρονολογικά ορόσημα αναφορικά προς τις, έως σήμερα, γνώσεις για την κυτταροκίνη IL-1RN παρατίθενται στον ΠΙΝΑΚΑ 6.

## Πίνακας 6

Σημαντικά χρονολογικά ορόσημα αναφορικά προς την ανακάλυψη και το ρόλο του IL-1RN.

### IL-1RN (IL-1RA)

- 1990: Κλωνοποίηση, έκφραση, βιολογικός χαρακτηρισμός, mRNA 1684 bp από H. Sapiens, Carter D.B. et al.
- 1992: Χαρτογράφηση του γονιδίου IL-1RN στη χρωμοσωμική θέση 2q14-q21, περιοχή όπου βρίσκονται οι τόποι των IL-1α και IL-1β, με χρήση πολυμορφισμού ποικίλου μεγέθους που βρίσκεται στο δεύτερο ιντρόνιο, Steinkasserer et al.
- 1992: Χαρτογράφηση του γονιδίου IL-1RN στη χρωμοσωμική θέση 2q13-q14.1 με χρήση FISH, Lennard et al, και δημοσίευση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του IL-1RN από H. Sapiens DNA 12565 bp, Lennard et al, Carrier M.J.
- 1993: Προσδιορισμός της θέσης του γονιδίου IL-1RN στην τοποθεσία 2q14.2, Patterson D. et al
- 1993: Ο πολυμορφισμός στο 2<sup>ο</sup> ιντρόνιο του γονιδίου IL-1RN αφορά σε ένα VNTR με μέγεθος επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας 86 bp, υπάρχουν πέντε αλληλόμορφα του γονιδίου με 2-6 επαναλήψεις της αλληλουχίας αυτής, Tarlow J.U. et al.
- 1994: Το αλληλόμορφο 2 (με 2 επαναλήψεις) συσχετίζεται με σοβαρότερο κλινικό αποτέλεσμα σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις.  
Σε μια σειρά μελετών προκύπτουν συσχετισμοί με:
- Συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, Blakenore A.F. et al
  - Ελκώδη κολίτιδα, Mansfield J.C. et al.
  - Alopecia Areata, Zarlow et al
- 1995: Ο VNTR πολυμορφισμός συσχετίζεται για πρώτη φορά με την εμφάνιση της ΣΚΠ, Crusius et al.
- 1995-2000: Σειρά μελετών σε διάφορους πληθυσμούς αποπειράται να διερευνήσει τη συσχέτιση του VNTR πολυμορφισμού με την επιρρέπεια προς ΣΚΠ, ή με τη βαρύτητα και πορεία της νόσου. Τα αποτελέσματα συχνά διαφέρουν, πιθανώς λόγω του διαφορετικού εθνολογικού υπόβαθρου των πληθυσμών.
- 1996: Συσχετισμός του αλληλίου 2 με διαβητική νεφροπάθεια, Blakemore et al.  
Τα αλληλόμορφα 1 (4 επαναλήψεις) και 2 (2 επαναλήψεις) είναι τα πιο συχνά στον πληθυσμό, ενώ το συνολικό ποσοστό της εμφάνισης των υπολοίπων 3 αλληλίων δεν ξεπερνά το 5%, Blakemore et al.
- 1997: Η εκκρινόμενη, αλλά όχι και η κυτταροπλασματική ισομορφή της IL-1RN πρωτεΐνης παράγεται στα ηπατοκύτταρα και ρυθμίζεται από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες ως πρωτεΐνη οξείας φάσης, Gabay C. et al.
- 1999: Ασθενείς με ΣΚΠ φέροντες το αλληλίο 2 του IL-1RN και μη φέροντες το αλληλίο 2 του γονιδίου IL-1β εμφανίζουν υψηλότερο ρυθμό επιδείνωσης σε σχέση με όλους τους άλλους συνδυασμούς αλληλίων. Οι πολυμορφισμοί αυτών των γονιδίων είναι πιθανό να πληροφορούν για καλύτερη ή χειρότερη πρόγνωση, Schrijver et al.
- 2000: Ο γονότυπος IL-1RN/IL-1RN αυξάνει τόσο την πιθανότητα χρόνιας υποχλωρδρικής απάντησης σε λοίμωξη (προσβολή) από *Helicobacter pylori*, όσο και τον κίνδυνο καρκίνου του στομάχου,  
Ο πολυμορφισμός επανάληψης 86 bp στο γονίδιο IL-1RN συσχετίζεται πιθανώς με αυξημένο κίνδυνο οστεοπορωτικών καταγμάτων, Langdahl et al.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί, για πρώτη φορά σε έλληνες ασθενείς, η πιθανή συσχέτιση των γενετικών πολυμορφισμών 3953 C/T του 5ου εξονίου του γονιδίου της IL-1β και 86bp VNTR πέντα-αλληλικού του 4ου ιντρονίου του γονιδίου της IL-1α με την επιρρέπεια προς εκδήλωση ΣΚΠ και τον τρόπο έναρξης της νόσου.

## ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Μελετήθηκαν 58 ασθενείς με ΣΚΠ και 105 υγιείς μάρτυρες με ίδια περίπου κατανομή φύλου και ηλικίας. Οι ασθενείς είχαν διαγνωσθεί στην Νευρολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και η διάγνωση είχε επιβεβαιωθεί σύμφωνα με τα κριτήρια και τις οδηγίες του International Panel on the Diagnosis of MS.

## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Το πειραματικό μέρος της μελέτης αποτελείται από τα εξής επιμέρους τμήματα:

-Απομόνωση γενομικού DNA από εμπύρηννα κύτταρα ολικού αίματος.

Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με την κλασσική τεχνική της εξαλάτωσης.

-Πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων περιοχών του DNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Περιοχές των γονιδίων της IL-1RN και IL-1β πολλαπλασιάστηκαν με PCR, μια τεχνική που επιτυγχάνει την επιλεκτική κλωνοποίηση από το σύνολο του DNA, ενός επιθυμητού τμήματος μεταξύ δύο περιοχών γνωστής αλληλουχίας, με χρήση ζεύγους κατάλληλων εκκινητών.

-Πέψη των κλώνων του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου της IL-1β που παρήχθησαν με την PCR, από ειδικό περιοριστικό ένζυμο.

Το προϊόν της PCR του γονιδίου της IL-1β υποβλήθηκε σε πέψη από ενδονουλεάση περιορισμού, μέλος μιας ομάδας ενζύμων βακτηριακής προέλευσης που αναγνωρίζουν και τέμνουν ειδικές αλληλουχίες δίκλωνου DNA, με κατεύθυνση 5' → 3'.

-Αναγνώριση των προϊόντων της PCR και της πέψης και αξιολόγηση των ευρημάτων.

Η απόδοση σε προϊόν της PCR και της πέψης, καθώς και το μέγεθος των τμημάτων ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης, χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και ακολούθως φωτογράφιση υπό υπεριώδη ακτινοβολία.

## ΤΕΧΝΙΚΕΣ

### ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ (EXTRACTION) DNA ΜΕ ΕΞΑΛΑΤΩΣΗ ΑΠΟ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΑ ΟΛΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

#### 1<sup>η</sup> ημέρα

- 1) Μετά την αιμοληψία, προσθέτουμε EDTA στο αίμα, ως αντιπηκτικό, τόσο ώστε η συγκέντρωσή του στο αίμα να είναι 5 mM.
- 2) Τοποθετούμε τα 2 mL αίματος από κάθε δείγμα σε σωληνάριο των 15mL και αραιώνουμε ως 12 mL περίπου με ddH<sub>2</sub>O (δισ-απεσταγμένο) και ανακατεύουμε με σιφόνιο pasteur (τα ερυθροκύτταρα λύνονται σε υπότονο περιβάλλον).
- 3) Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3000 rpm, στους 4°C (καθιζάνουν τα εμπύρνα κύτταρα).
- 4) Αφαιρούμε το υπερκείμενο. Το ίζημα αραιώνεται σε ddH<sub>2</sub>O ως 12mL περίπου. Διαλύουμε με χρήση ταλαντωτή Vortex.
- 5) Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3000 rpm στους 4°C.
- 6) Αφαιρούμε το υπερκείμενο. Το ίζημα αραιώνεται σε ddH<sub>2</sub>O ως 12mL περίπου. Διαλύουμε σε Vortex.
- 7) Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3000 rpm στους 4°C.
- 8) Αδειάζουμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε διάλυμα λύσης λευκοκυττάρων (lysis I) (ΠΙΝΑΚΑΣ 7) μέχρι τα 12mL (το lysis I λύει την κυτταρική μεμβράνη των λευκοκυττάρων).
- 9) Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3000 rpm στους 4°C.
- 10) Επαναλαμβάνουμε τα στάδια 8, 9 με lysis I.
- 11) Αδειάζουμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε διάλυμα λύσης των πυρήνων των λευκοκυττάρων (lysis II) (ΠΙΝΑΚΑΣ 7) μέχρι τα 6 mL. Ανακινούμε καλά και επωάζουμε για 30 min (το lysis II σπάει τους πυρήνες των λευκοκυττάρων και παίρνουμε DNA).
- 12) Προσθέτουμε 750μl SDS 10% και 100μL proteinase K συγκέντρωσης 10 mg/mL (το SDS ανοίγει την πυρηνική μεμβράνη, η πρωτεϊνάση K συμβάλλει στη πεπτιδική υδρόλυση και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών).
- 13) Επώαση στους 37°C έως την επόμενη ημέρα.

## 2<sup>η</sup> ημέρα

- 14) Προσθέτουμε 2ml 6M NaCl. Αναδεύουμε ισχυρά για 15 sec (το NaCl σε μεγάλη συγκέντρωση προκαλεί κατακρήμνιση των πρωτεϊνών).
- 15) Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3500 rpm στους 4°C (με τη φυγοκέντρωση παίρνουμε το DNA στο υπερκείμενο).
- 16) Στο υπερκείμενο υπάρχει το DNA. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωλήνα (falcon των 50 mL)
- 17) Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3.500 rpm στους 4°C.
- 18) Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε άλλο σωλήνα (falcon των 50 mL)
- 19) Ακολουθεί καταβύθιση (precipitation) με 2 όγκους αιθανόλης 100%. Προσθέτουμε CH<sub>3</sub>COONa, όγκου ίσου με 1/10 του όγκου που είχαμε πριν τη καταβύθιση (το DNA κατακρημνίζεται με ανάμειξη με αιθανόλη 100%, το άλας CH<sub>3</sub>COONa οδηγεί σε συσσωμάτωση των μορίων του DNA μέσω εξουδετέρωσης των αρνητικών φορτίων τους).
- 20) Επωάζουμε στην κατάψυξη (-20 °C) έως την επόμενη ημέρα.

## 3<sup>η</sup> ημέρα

- 21) Φυγοκεντρούμε για 50min στις 3500rpm στους 4°C (ή αν πιάνει η φυγόκεντρος πολλές στροφές για 30min στις 8000rpm)
- 22) Αφαιρούμε το υπερκείμενο και το ίζημα το βάζουμε σε σωλήνα erpendorf των 2mL.
- 23) Ξεπλένουμε το ίζημα με 2mL 70% αιθανόλης και φυγοκεντρούμε για 30min στις 12000rpm στους 4°C.
- 24) Επαναλαμβάνουμε το στάδιο 23 άλλες δύο φορές, με τη διαφορά ότι η διάρκεια της φυγοκέντρωσης είναι 20min.
- 25) Αφαιρούμε το υπερκείμενο και καλύπτουμε το σωληνάκι με parafilm το οποίο τρυπάμε με καρφίτσα. Το αφήνουμε έως την επόμενη ημέρα.
- 26) Διαλύουμε το τελικό ίζημα σε ddH<sub>2</sub>O όγκου αναλόγως της συγκέντρωσης που επιθυμούμε να έχει το διάλυμα (δοθέντος ότι ποσοτικοποιήσαμε, όπως ακολουθεί παρακάτω, το DNA που απομονώσαμε και γνωρίζουμε τη μάζα του).

## ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ DNA

Στη συνέχεια προχωράμε στη ποσοτικοποίηση του DNA που διαθέτουμε. Για το σκοπό αυτό σε φωτομετρική κυψελίδα βάζουμε 1000μL, συνολικά, δ/τος ddH<sub>2</sub>O και ποσότητας τόσης από το επαναδιαλυμένο DNA του κάθε δείγματος, ώστε να βρισκόμαστε σε τιμές απορρόφησης > 0,1 A (A=Absorption). Φωτομετρούμε στα 260nm και κατόπιν στα 280nm και υπό την αίρεση ότι οι απορροφήσεις βρίσκονται για λόγους αξιοπιστίας μεταξύ 0,1 και 0,9nm, ο λόγος των δύο μετρήσεων προσδιορίζει την καθαρότητα του DNA. Αν ο λόγος βρίσκεται μεταξύ 1,8-2,0, η τιμή της απορρόφησης στα 260nm μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του δ/τος DNA που φωτομετρούμε και κατ' επέκταση της ποσότητας του DNA που διαθέτουμε (ποσοτικοποίηση). Μικρότερες τιμές υποδηλώνουν πρόσμειξη πρωτεϊνών, ενώ μεγαλύτερες πρόσμειξη RNA. Για δίκλωνο DNA ισχύει: A<sub>260</sub> = 1 ισοδυναμεί με 50 μg/mL DNA δ/τος στην κυψελίδα, και με αυτό το δεδομένο υπολογίζουμε την ποσότητα του DNA που έχουμε απομονώσει.

Τα αποτελέσματα της απομόνωσης ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση 10μL δ/τος DNA από κάθε δείγμα σε πηκτή αгарόζης 1% ,περιέχουσα βρωμιούχο αιθίδιο, υπό σταθερή τάση 100V και ακολουθεί φωτογράφιση της πηκτής σε υπεριώδη φωτισμό όπου οι "ζώνες" του DNA φθορίζουν και γίνονται ορατές. Ως μάρτυρας (marker) χρησιμοποιείται ο, που έχει καταταμηθεί με το περιοριστικό ένζυμο.

### Πίνακας 7: Παρασκευή των lysis I και lysis II.

#### Lysis I

NH<sub>4</sub>Cl: 155mM

KHCO<sub>3</sub>: 10mM

EDTA: 1mM

pH: 7,4

#### Lysis II

Tris: 10mM

NaCl: 400mM

EDTA: 2mM

pH : 8,2



## ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).

Η PCR είναι μια μέθοδος για την *in vitro* κλωνοποίηση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, εκμεταλλευόμενη ορισμένα χαρακτηριστικά του *in vivo* μηχανισμού αντιγραφής του DNA. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου, ενώ απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Το σημείο έναρξης της σύνθεσης μπορεί να καθοριστεί με τη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδικού εναρκτήριου μορίου (εκκινήτη, primer) που συνδέεται με τη μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο. Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR περιλαμβάνει πολλούς κύκλους, ο καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες, με βάση τα ακόλουθα βήματα:

1. αποδιάταξη (διαχωρισμός των δίκλωνων μορίων DNA σε μονόκλωνες αλυσίδες).
2. υβριδοποίηση (σύζευξη των εκκινήτων με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μόρια του μονόκλωνου DNA).
3. προέκταση (σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA).

Για τον πολλαπλασιασμό περιοχής του γονιδίου IL-1b με PCR χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *Taq* DNA Polymerase (5 U/μL) (Invitrogen) και οι εξής δύο εκκινήτες (primers)<sup>99</sup>:

**Primer 1 (3953F)**                    5'- GCC ACA GTG AGC AGT AAT AGA - 3'  
**Primer 2 (3953R)**                    5'- CAA CAA CAG GAA GAG AGA ACC - 3'

Η PCR αντίδραση πραγματοποιείται σε ένα πρώτο στάδιο στους 95°C για 7 λεπτά, ακολουθούμενο από 32 κύκλους σε θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf). Κάθε κύκλος περιλαμβάνει ένα στάδιο αποδιάταξης (30sec στους 95°C), ένα στάδιο σύζευξης των εκκινήτων με τη μητρική αλυσίδα (30sec στους 54°C) και ένα στάδιο επέκτασης των εκκινήτων (90sec στους 72°C). Μετά το τέλος των κύκλων ακολουθεί το στάδιο προέκτασης με στόχο τη σταθεροποίηση του προϊόντος της αντίδρασης (7 λεπτά στους 72°C), (ΠΙΝΑΚΑΣ 8).

**Πίνακας 8:** Συνθήκες της PCR IL-1b.

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	
95	7 min	
95	30sec	} 32 κύκλοι
54	30sec	
72	90sec	
72	7 min	

Για τον πολλαπλασιασμό περιοχής του γονιδίου IL-1ra με PCR χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *Taq* DNA Polymerase (5 U/μL) (Invitrogen) και οι εξής δύο εκκινητές (primers)<sup>99</sup>:

**Primer 1 (IL1ra-F)** 5'- GCC CCT CAG CAA CAC TCC TAT - 3'

**Primer 2 (IL1ra-R)** 5'- CCC TGG TCC CCA CAA AAC TA - 3'

Η PCR αντίδραση πραγματοποιείται σε ένα πρώτο στάδιο στους 95°C για 7 λεπτά, ακολουθούμενο από 32 κύκλους σε θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf). Κάθε κύκλος περιλαμβάνει ένα στάδιο αποδιάταξης (30sec στους 95°C), ένα στάδιο σύζευξης των εκκινητών με τη μητρική αλυσίδα (30sec στους 56°C) και ένα στάδιο επέκτασης των εκκινητών (90sec στους 72°C). Μετά το τέλος των κύκλων ακολουθεί το στάδιο προέκτασης με στόχο τη σταθεροποίηση του προϊόντος της αντίδρασης (7 λεπτά στους 72°C), (ΠΙΝΑΚΑΣ 9).

**Πίνακας 9:** Συνθήκες της PCR IL-1ra.

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	
95	7 min	
95	30sec	} 32 κύκλοι
56	30sec	
72	90sec	
72	7 min	

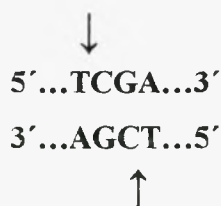
Κατά τη διάρκεια της PCR αντίδρασης, ο primer 1 τοποθετείται προς το 5' άκρο της περιοχής που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε και ο primer 2 τοποθετείται προς το 3' άκρο της. Μ' αυτό τον τρόπο πολλαπλασιάζεται περιοχή του εξονίου 5 του γονιδίου της IL-1β, μεγέθους 731bp, και περιοχή του ιντρονίου 2 του γονιδίου του IL-1RN μεγέθους 300bp, ή 385bp, ή 472bp, ή 555bp, ή 740bp αναλόγως του αριθμού των επαναλαμβανόμενων 86bp περιοχών που διαθέτει το γονίδιο (2 επαναλήψεις στο αλληλίο 2, 3 στο αλληλίο 4, 4 στο αλληλίο 1, 5 στο αλληλίο 3, και 6 στο αλληλίο 5, αντιστοίχως).

Στη συνέχεια, η απόδοση σε προϊόν της PCR, καθώς και το μέγεθος των τμημάτων ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση 10μL δ/τος έκαστου εκ των PCR προϊόντων, σε πηκτή αгарόζης 3% περιέχουσα βρωμιούχο αιθίδιο, υπό σταθερή τάση 100V και ακολούθως φωτογράφιση της πηκτής υπό υπεριώδη φωτισμό, όπου οι "ζώνες" του DNA φθορίζουν και γίνονται ορατές. Ως μάρτυρας (marker) χρησιμοποιείται ο 100bp DNA ladder (BioLabs).

### ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟ ENZYMO

Το προϊόν της PCR του γονιδίου της IL-1β υποβλήθηκε σε πέψη από την ενδονουκλεάση περιορισμού *TaqI*, μέλος μιας ομάδας ενζύμων βακτηριακής προέλευσης που αναγνωρίζουν και τέμνουν ειδικές αλληλουχίες δίκλωνου DNA, με κατεύθυνση 5' → 3'. Το ένζυμο *TaqI* αναγνωρίζει και τέμνει την αλληλουχία που παρουσιάζεται στην ΕΙΚΟΝΑ 13..

**Εικόνα 13:** Αλληλουχία που αναγνωρίζει και τέμνει (στα βέλη) το ένζυμο *TaqI*



Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη παρουσιάζονται στον ΠΙΝΑΚΑ 11. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 65° C έως την επόμενη ημέρα.

Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα της πέψης, καθώς και το μέγεθος των τμημάτων ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση 10μL δ/τος έκαστου εκ των προϊόντων της πέψης, σε πηκτική αгарόζης 3% περιέχουσα βρωμιούχο αιθίδιο, υπό σταθερή τάση 100V και ακολούθως φωτογράφιση της πηκτής υπό υπεριώδη φωτισμό, όπου οι “ζώνες” του DNA φθορίζουν και γίνονται ορατές. Ως μάρτυρας (marker) χρησιμοποιείται ο 100bp DNA ladder (BioLabs).

Με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου *TaqI* αναγνωρίζονται 2 αλληλία:

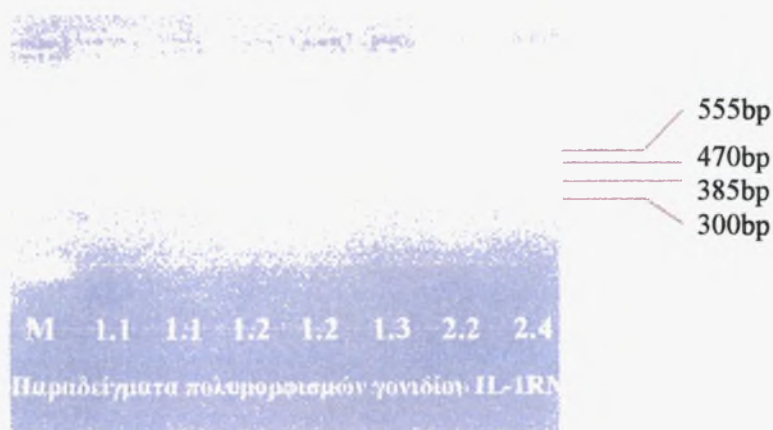
- Αλληλίο 1 ή IL-1β(+3953)\*C με νουκλεοτίδιο C στη θέση 3953 του γονιδίου
- Αλληλίο 2 ή IL-1β(+3953)\*T με νουκλεοτίδιο T στη θέση 3953 του γονιδίου

Η παρουσία του αλληλίου 1, κατόπιν της πέψεως, διαπιστώνεται από τη διάσπαση του, 731bp μεγέθους, κλωνοποιημένου κατά την PCR τμήματος DNA σε 2 μέρη, μεγέθους 234 και 497bp αντιστοίχως. Αντιθέτως, η παρουσία του αλληλίου 2 διαπιστώνεται από τη μη-διάσπαση. Έτσι, αν μετά την πέψη εμφανισθεί μόνο μία ‘ζώνη’ μεγέθους 731bp, πρόκειται για ομοζυγωτία ως προς το αλληλίο 1 (αλληλίο C), δηλαδή παρουσία 2 αλληλίων C (γονότυπος C/C). Αν εμφανισθούν δύο ‘ζώνες’, μεγέθους 234 και 497bp, πρόκειται για ομοζυγωτία ως προς το αλληλίο 2 (αλληλίο T), δηλαδή παρουσία 2 αλληλίων T (γονότυπος T/T). Τέλος, αν εμφανισθούν τρεις ‘ζώνες’, μεγέθους 234, 497 και 731bp, πρόκειται για ετεροζυγωτία, δηλαδή παρουσία ενός αλληλίου C και ενός αλληλίου T (γονότυπος C/T).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Απομονώθηκε DNA από 58 ασθενείς και 105 υγιείς μάρτυρες σύμφωνα με το πρωτόκολλο το οποίο περιγράφεται στη Μεθοδολογία. Ο λόγος των απορροφήσεων 260/280 ήταν μέσα στα αποδεκτά όρια για όλα τα δείγματα και το DNA ήταν υψηλής καθαρότητας και υψηλού μοριακού βάρους.

Για όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση με στόχο τον πολλαπλασιασμό κατάλληλου τμήματος του DNA για την εύρεση του γονότυπου αναφορικά προς τον 86bp VNTR πολυμορφισμό του γονιδίου IL-1RN. Ενδεικτικά αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, σε πηκτική αγαρόζης 3%, των προϊόντων PCR 7 δειγμάτων DNA παρουσιάζονται στην ΕΙΚΟΝΑ 14.



**Εικόνα 14**

Η ζώνη μεγέθους 300 αντιστοιχεί στο αλληλίο 2  
Η ζώνη μεγέθους 385 αντιστοιχεί στο αλληλίο 4  
Η ζώνη μεγέθους 470 αντιστοιχεί στο αλληλίο 1  
Η ζώνη μεγέθους 555 αντιστοιχεί στο αλληλίο 3  
M=Marker (100bp DNA Ladder)

Για όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση με στόχο τον πολλαπλασιασμό κατάλληλου τμήματος του DNA, και κατόπιν πέψη του προϊόντος της PCR από την ενδονουκλεάση περιορισμού *TaqI*, για την εύρεση του γονότυπου αναφορικά προς τον πολυμορφισμό IL-1β(+3953)\*C/T του γονιδίου IL-1β. Ενδεικτικά αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, σε πηκτική αγαρόζης 3%, των προϊόντων PCR 7 δειγμάτων DNA παρουσιάζονται στην ΕΙΚΟΝΑ 15.



**Εικόνα 15**

Η ζώνη μεγέθους 234 και 497 αντιστοιχούν στο αλληλίο C  
 Η ζώνη μεγέθους 731 αντιστοιχεί στο αλληλίο T  
 M=Marker (100bp DNA Ladder)

Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στους ΠΙΝΑΚΕΣ 12 και 13

**Πίνακας 12**

Γονότυποι και αλληλίοι του γονιδίου του IL-1RN σε ασθενείς με ΣΚΠ και μάρτυρες

	Γονότυποι IL-1RN						Αλληλίοι (%)			
	1.1	1.2	1.3	2.2	2.3	2.4	1	2	3	4
Ασθενείς με ΣΚΠ (n=58)	28	21	3	4	1	1	69,0	26,7	3,5	0,8
Μάρτυρες (n=105)	54	39	6	6	0	0	72,9	24,3	2,8	0,0

**Πίνακας 13**

Γονότυποι και αλληλίοι του γονιδίου της IL-1β σε ασθενείς με ΣΚΠ και μάρτυρες

	Φύλο (Α/Τ)	Ηλικία (SD)	Γονότυποι IL-1β			Αλληλίοι (%)	
			C/C	C/T	T/T	C	T
Ασθενείς με ΣΚΠ (n=58)	(15/43)	33,7(11,5)	39	14	5	79,3	20,7
Μάρτυρες (n=105)	(28/77)	34,1 (9,8)	71	26	8	80,0	20,0

Από τα αποτελέσματα, στον αριθμό δειγμάτων που εξετάσαμε, δεν φαίνεται να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς το γονότυπο ή το ποσοστό αλληλίων, ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς. Εντούτοις, αυτή η εργασία είναι μέρος μιας ευρύτερης εξελισσόμενης μελέτης, σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, στην οποία κατεδείχθει η ύπαρξη συσχετισμού μεταξύ του αλληλίου 2 του γονιδίου του IL-1RN και της επιρρέπειας προς την P/P μορφή της ΣΚΠ (αδημοσίευτα δεδομένα, προσωπική επικοινωνία με κ. Χατζηγεωργίου Γ.).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε, για πρώτη φορά σε έλληνες ασθενείς, η πιθανή συσχέτιση των γενετικών πολυμορφισμών +3953 C/T του 5ου εξονίου του γονιδίου της IL-1β και 86bp VNTR πέντα-αλληλικού του 4ου ιντρονίου του γονιδίου της IL-1α, με την επιρρέπεια προς εκδήλωση ΣΚΠ και τον τρόπο έναρξης της νόσου.

Σήμερα, είναι γενικά αποδεκτό ότι τόσο άγνωστοι μέχρι τώρα περιβαλλοντικοί, όσο και γενετικοί παράγοντες ευθύνονται για την εμφάνιση της ΣΚΠ. Αρκετά γονίδια, σύνοψη των οποίων παρατίθεται στον ΠΙΝΑΚΑ 14, έχουν μελετηθεί για την πιθανή αιτιοπαθογενετική σχέση τους με τη νόσο, αλλά τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά για τα περισσότερα, αντιφατικά για πολλά και θετικά για λίγα. Πολυμορφισμοί σε γονίδια κυτταροκινών έχει βρεθεί ότι ενδεχομένως αποτελούν προδιαθεσικούς παράγοντες για την εμφάνιση της ΣΚΠ, καθώς ανιχνεύονται σε αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς, παρά στο γενικό πληθυσμό.

Οι IL-1α και IL-1β ανήκουν στις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και αποτελούν ενδιαφέροντα στόχο μελέτης, λόγω του κεντρικού τους ρόλου στη φλεγμονώδη και ανοσιακή απάντηση, δεδομένου ότι η ΣΚΠ χαρακτηρίζεται παθολογικά από πολλαπλές περιοχές φλεγμονής και ανοσολογικής ρυθμιζόμενης απομυελίνωσης. Στοιχεία που συνηγορούν υπέρ της σκοπιμότητας διερεύνησης του ρόλου τους στη νόσο, αποτελούν η ανεύρεσή τους εντός και περιμετρικά των ορίων των βλαβών της νόσου, όπου παράγονται από τα μακροφάγα και τα κύτταρα της μικρογλοίας, οι ενδείξεις ενεργής συμμετοχής τους στην εμφάνιση των απομυελινωτικών πλακών στο ΚΝΣ, η διέγερση προς πολλαπλασιασμό των Β-λεμφοκυττάρων και Τ-λεμφοκυττάρων, ο συσχετισμός τους με πολλές χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις, όπως ρευματοειδή αρθρίτιδα, ελκώδη κολίτιδα, περιοδοντίτιδα και ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη, και πολλά άλλα στοιχεία της δράσης τους. Ο φυσικός αναστολέας αυτής της δράσης, ο IL-1RN, αναστέλλει την εμφάνιση κλινικών εκδηλώσεων στην ΕΑΕ, το πειραματικό ζωϊκό μοντέλο της ΣΚΠ.



## Πίνακας 14

Σύνοψη μελετών συσχέτισμού γονιδίων με την εμφάνιση ή/και την πορεία και σοβαρότητα της ΣΚΠ.

Γονίδιο	Γενετικός δείκτης (είδος/θέση)	Μελέτη	Χώρα προέλευσης	Πληθυσμός	Ευρήματα
<i>ApoE</i>	SNP/-491 από 5'	Ferri et al., 1999	Ιταλία	RR	Μη-συσχετισμός
<i>ApoE</i>	Αλλότυπος, αλλήλια ε2, ε3, ε4	Chapman et al., 2001	Ισραήλ	RR, SP	Αλλήλιο ε4 μη- ευνοϊκό
		Dousset et al., 1998	Γαλλία	RR, SP, PP	Αλλήλιο ε4 μη- ευνοϊκό
		Evangelou et al., 1999	Μ. Βρετανία	RR, SP, PP	Αλλήλιο ε4 μη- ευνοϊκό
		Fazekas et al., 2000	Αυστρία	RR, SP	ε3/ε4, αλλήλιο ε4 μη-ευνοϊκό
		Fazekas et al., 2001	Αυστρία	RR, SP, PP	ε3/ε4, αλλήλιο ε4 μη-ευνοϊκό
		Ferri et al., 1999	Ιταλία	RR	Μη-συσχετισμός
		Haines et al., 2001	Η.Π.Α.	RR, SP	Μη-συσχετισμός
		Hamilton et al., 1999	Ιρλανδία	RR, SP, PP	Μη-συσχετισμός
		Hogh et al., 2000	Δανία	RR, SP, PP	Ομοζυγωτία ε4 μη- ευνοϊκή
		Kantarci et al., 2000	Η.Π.Α.	RR, SP, PP	Αλλήλιο ε2 ευνοϊκό
		Masterman et al., 2000	Σουηδία	ΔΑ	ε3/ε4 μη-ευνοϊκό
		Weatherby et al., 2000	Μ. Βρετανία	RR, SP, PP	Ομοζυγωτία ε3 μη- ευνοϊκή
		Weatherby et al., 2000	Μ. Βρετανία	PP	Μη-συσχετισμός
<i>B71</i>	SNP/ -56 εξ2	Weinshenker et al., 2000	Η.Π.Α.	RR, SP, PP	Μη-συσχετισμός
<i>B71</i>	SNP/ 138 εξ3	Weinshenker et al., 2000	Η.Π.Α.	RR, SP, PP	Μη-συσχετισμός
<i>B71</i>	DEL/ 424 εξ6	Weinshenker et al., 2000	Η.Π.Α.	RR, SP, PP	Μη-συσχετισμός

Πίνακας 14, συνέχεια

<i>CTLA-4</i>	MST/ 541 από 3'	Kantarci et al., 2001	Η.Π.Α.	RR, SP, PP	Μη-συσχετισμός
<i>CTLA-4</i>	SNP/ -318 εξ1	Kantarci et al., 2001	Η.Π.Α.	RR, SP, PP	Μη-συσχετισμός
<i>CTLA-4</i>	SNP/ 49 εξ1	Kantarci et al., 2001	Η.Π.Α.	RR,SP,PP	Μη-συσχετισμός
		Fukazawa et al., 1999	Ιαπωνία	RR, SP	Ομοζυγωτία CTLA-4*A μη-ευνοϊκή
<i>ESR1</i>	SNP/ -397 εξ2	Niino et al., 2000	Ιαπωνία	RR, SP	Μη-συσχετισμός
<i>GSTM1</i>	DEL γονιδίου	Mann et al., 2000	Μ. Βρετανία	RR, SP, PP	Συνδυασμός GSTM1*0 και ομοζυγωτίας GSTP1*A μη-ευνοϊκός
<i>GSTM3</i>	DEL/ 22 w6	Mann et al., 2000	Μ. Βρετανία	RR, SP, PP	Ομοζυγωτία GSTM3*A μη-ευνοϊκή
<i>GSTP1</i>	SNP/ 90 εξ5	Mann et al., 2000	Μ. Βρετανία	RR, SP, PP	Ομοζυγωτία GSTP1*A μη-ευνοϊκή
<i>GSTT1</i>	DEL γονιδίου	Mann et al., 2000	Μ. Βρετανία	RR, SP, PP	Μη-συσχετισμός
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	SNP/ 325 από 3'	Kantarci et al., 2000	Η.Π.Α.	RR, SP, PP	Μη-συσχετισμός
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	INS/ 1236 w1	Kantarci et al., 2000	Η.Π.Α.	RR, SP, PP	Μη-συσχετισμός
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	MST/ 761 w1	Kantarci et al., 2000	Η.Π.Α.	RR, SP, PP	Μη-συσχετισμός
<i>IgG</i>	αλλότυπος (Gm και Km)	Berg et al., 1989	Γαλλία	RR, SP, PP	IgG*Km1 μη-ευνοϊκό και συσχετιζόμενο με προϊούσα πορεία και μεγαλύτερη ηλικία έναρξης
		Raknes et al., 2000	Νορβηγία	RR, SP, PP	Μη-συσχετισμός

Πίνακας 14, συνέχεια

		Salier et al., 1986	Γαλλία	RR, SP, PP	Συνδυασμός IgG*Gm1 και φορείας HLA B7 μη-ευνοϊκός
<i>IgG</i>	SNP/ 134 εξ4	Myhr et al., 1999	Νορβηγία	RR, SP, PP	FcRIIA*H αλληλίο ευνοϊκό
<i>FcγRIIA</i>					
<i>IgG</i>	αλλότυπος	Myhr et al., 1999	Νορβηγία	RR, SP, PP	FcRIIIB*NA1 αλληλίο ευνοϊκό
<i>FcγRIIIB</i>					
<i>IL-10</i>	SNP/ -519 από 5'	Pickard et al., 1999	Μ. Βρετανία	RR, SP	Μη-συσχετισμός
<i>IL-10</i>	SNP/ -819 από 5'	Pickard et al., 1999	Μ. Βρετανία	RR, SP	Μη-συσχετισμός
<i>IL-1RN</i>	VNTR/ 864 ιν2 (5 αλληλίο με 2-6 επαναλήψεις 86bp)	de la Concha et al., 1997	Ισπανία	RR, SP, PP	IL-1RN*2 αλληλίο ευνοϊκό
		Feakes et al., 2000	Μ. Βρετανία	RR, SP, PP	IL-1RN*2 αλληλίο ευνοϊκό
		Kantarci et al., 2000	Η.Π.Α.	RR, SP, PP	IL-1RN*3 αλληλίο ευνοϊκό
		Mann et al., 1998	Μ. Βρετανία	ΔΑ	IL-1RN*2 αλληλίο ευνοϊκό
		Schrijver et al., 1999	Ολλανδία	RR, SP, PP	Συνδυασμός IL-1RN*2 αλληλίου και μη-φορείας IL-1β 14 εξ5*2 αλληλίου μη-ευνοϊκός
		Sciacca et al., 1999	Ιταλία	RR, SP	IL-1RN*2 αλληλίο ευνοϊκό
<i>IL-1β</i>	SNP/ -511 από 5'	Feakes et al., 2000	Μ. Βρετανία	RR, SP, PP	αλληλίο 2 ευνοϊκό
		Mann et al., 1998	Μ. Βρετανία	ΔΑ	αλληλίο 2 μη-ευνοϊκό
<i>IL-1β</i>	SNP/ 14 εξ5 ή αλλιώς IL-1β(+3953)	Kantarci et al., 2000	Η.Π.Α.	RR, SP, PP	αλληλίο 2 ευνοϊκό

Πίνακας 14, συνέχεια

		Schrijver et al., 1999	Ολλανδία	RR, SP, PP	Αλληλίο 2 ευνοϊκό
<i>IL-4</i>	VNTR/ 691 iv3	Vandenbroeck et al., 1997	Σαρδήνιοι και Καυκάσιοι (γενικά)	RR, SP, PP	Μη-συσχετισμός, αλληλίο Β1 συσχετίζεται με ηλικία έναρξης
<i>MPO</i>	SNP/ -463 από 5'	Kantarci et al., 2000	Η.Π.Α.	RR, SP, PP	Μη-συσχετισμός
<i>PECAM1</i>	MST/ 186 iv3	Sciacca et al., 2000	Ιταλία	RR	Μη-συσχετισμός
<i>TGFβ1</i>	SNP/ -800 από 5'	Green et al., 2001	Η.Π.Α.	RR, SP	Μη-συσχετισμός
<i>TGFβ1</i>	SNP/ -509 από 5'	Green et al., 2001	Η.Π.Α.	RR, SP	Αλληλίο C ευνοϊκό
<i>TGFβ1</i>	SNP/ κωδ. 10	Green et al., 2001	Η.Π.Α.	RR, SP	Αλληλίο T ευνοϊκό
<i>TGFβ1</i>	SNP/ κωδ. 25	Green et al., 2001	Η.Π.Α.	RR, SP	Μη-συσχετισμός
<i>TGFβ1</i>	SNP/ κωδ. 263	Green et al., 2001	Η.Π.Α.	RR, SP	Μη-συσχετισμός
<i>TNFα</i>	SNP/ -308 από 5'	Mann et al., 1998	Μ. Βρετανία	ΔΑ	Μη-συσχετισμός
		Maurer et al., 2000	Γερμανία	RR, SP, PP	Μη-συσχετισμός
		Weinshenker et al., 1997	Η.Π.Α.	RR, SP, PP	Μη-συσχετισμός

Υπό το φως των ενδείξεων ύπαρξης γενετικής συνιστώσας στην αιτιοπαθογένεια της ΣΚΠ, όπως προκύπτει μέσω των μελετών σε οικογένειες και διδύμους, τα αντιφατικά αποτελέσματα για πολλά υποψήφια γονίδια του ανοσοποιητικού συστήματος που έχουν μελετηθεί, καθώς και τα μη-αποκαλυπτικά αποτελέσματα των μελετών ανάλυσης σύνδεσης σε όλο το γένωμα, εγείρουν τρία θεμελιώδη ζητήματα που αφορούν τη γενετική της ΣΚΠ.

Πρώτον, τη μαθηματική προσέγγιση που χρησιμοποιείται και τον τρόπο που αυτή εφαρμόζεται. Πρέπει να συγκριθούν οι μέθοδοι ευρείας προσέγγισης της ανακάλυψης γονιδίων επιρρέπειας, όπως οι μέθοδοι μελέτης ανάλυσης σύνδεσης και οι μέθοδοι μελέτης συσχετισμού. Δεδομένης της ασθενούς γενετικής συμβολής του κάθε

γενετικού τόπου στα πολυπαραγοντικά νοσήματα, ένας πολύ υψηλός αριθμός δεικτών σε κοντινές αποστάσεις μεταξύ τους απαιτούνται ώστε να επιτευχθεί μέγιστη αναλυτική δύναμη, αριθμός ο οποίος μάλλον είναι πέραν των πρακτικών ορίων. Απαιτείται, επίσης, υπερβολικά μεγάλος όγκος δεδομένων ώστε να ανιχνευθεί σύνδεση με τόπους με μικρότερη επίρεια από αυτή του HLA, για παράδειγμα, ώστε οι μέθοδοι σύνδεσης φαίνεται να είναι καταλληλότερες για εφαρμογή σε σχετικά λίγες, αλλά μεγάλες σειρές συγγενών, πολλών γενεών και με πολλά προσβεβλημένα μέλη, τόσο για τις παραμετρικές αναλύσεις της μεθόδου, όσο και για τις μη-παραμετρικές. Στις μελέτες συσχετισμού, η συλλογή μεγάλου αριθμού δειγμάτων είναι ευκολότερη, καθώς δεν απαιτούνται σπάνιες οικογενείς περιπτώσεις. Αυτές οι μελέτες φαίνονται πιο ευέλικτες για χρήση στη διερεύνηση των πολυπαραγοντικών νοσημάτων. Εφαρμόζονται όμως, κυρίως, για υποψήφια γονίδια παρά για έλεγχο ολόκληρου του γενώματος για εύρεση υποψήφιων τόπων. Επίσης, μείζονος σημασίας είναι η εθνική ομοιογένεια των ατόμων που περιλαμβάνονται σε αυτές τις μελέτες, και αποτελεί το μεγαλύτερο περιορισμό τους. Εύκολα μπορεί να προκύψουν ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα συσχετισμού όταν δεν δοθεί επαρκής σημασία στο εθνικό υπόβαθρο του πληθυσμού. Οποιαδήποτε στατιστική διαδικασία κι αν χρησιμοποιηθεί, πρέπει να υπολογισθεί σωστά ο απαιτούμενος αριθμός δειγμάτων ώστε αυτή να είναι αποδοτική.

Δεύτερον, τη μεθοδολογία που εφαρμόζεται αναφορικά προς την ταξινόμηση των ασθενών που συμμετέχουν στις μελέτες. Δεν υφίσταται πάντα ακολουθία στον τρόπο ταξινόμησης των ασθενών στους τύπους της νόσου, ενώ και η ταξινόμησή τους αναφορικά προς την πορεία της νόσου και τη σοβαρότητά της περιέχουν κάποιου βαθμού ανακολουθία μεταξύ των μελετών. Είναι δυνατόν, στην πορεία της νόσου μέσα στο χρόνο, όπως μετάπτωση από R/R μορφή σε SP, να διαφεύγει της παρατήρησης. Έτσι, είναι δυνατόν, η μαθηματική προσέγγιση να είναι ορθή, εντούτοις, να προκύπτουν εσφαλμένα αποτελέσματα λόγω σφάλματος στη μεθοδολογία επιλογής και ταξινόμησης των ασθενών. Ένας συσχετισμός που αφορά σε μία μορφή της νόσου και όχι στο σύνολό της θα μπορούσε να διαφεύγει, όπως επίσης θα μπορούσε και να προκύπτει εσφαλμένα, λόγω αδυναμιών ταξινόμησης.

Τρίτον, την ετερογένεια της νόσου. Η τεράστια κλινική ετερογένεια της ΣΚΠ είναι οικεία στους νευρολόγους, ενώ η αίσθηση της ύπαρξης γενετικής ετερογένειας στην πολυπαραγοντική αυτή νόσο γίνεται διαρκώς εντονότερη. Ακόμη και μεταξύ ομοιογενούς πληθυσμού, είναι δυνατόν διάφοροι περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες να οδηγούν σε φαινότυπο διαγιγνωσκόμενο ως ΣΚΠ. Ο σακχαρώδης

διαβήτης είναι έξοχο παράδειγμα μιας ετερογενούς ομάδας καταστάσεων στις οποίες για την ανίχνευση γονιδίων της νόσου απαιτήθηκε πολύ προσεκτική κλινική διάγνωση αλλά και ταξινόμηση των ασθενών σε υποσύνολα, με βάση μεταβολικές παραμέτρους ή εύρεση του τύπου HLA. Παρομοίως, μία μελλοντική πρόκληση για την έρευνα στη ΣΚΠ, φαίνεται να είναι η αποσαφήνιση της ύπαρξης ειδικών υποσυνόλων της.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, συμπερασματικά, με τεχνικές μοριακής γενετικής, κατορθώσαμε να ανιχνεύσουμε για πρώτη φορά σε έλληνες ασθενείς με ΣΚΠ, αλλά και υγιείς μάρτυρες, τους πολυμορφισμούς 86bp VNTR του γονιδίου του IL-1RN και +3953 C/T του γονιδίου της IL-1β. Η εργασία είναι μέρος μίας ευρύτερης μελέτης σε εξέλιξη, της οποίας τα αποτελέσματα αναμένονται με ενδιαφέρον, καθώς φαίνεται να υπάρχει συσχετισμός μεταξύ του αλληλίου 2 του IL-1RN και της P/P μορφής της νόσου στον ελληνικό πληθυσμό.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Andersen, D.H. (1936) *Am. J. Dis. Child.* 56: 344-399.
2. Boat, T.F., Welsh, M.J., and Beaudet, A.L. (1989) *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th edn, pp 2649-2680.
3. Edwards, J.H (1997) *Arch. Dis. Child.* 52: 343-344.
4. Hanson, G.C. (1998) (Letter) *Nature* 333: 711
5. Hollander, D.H. (1982) *Med.Hypothesis* 8: 191-197.
6. Pier, G.B., Grout, M., Zaidi, T., Meluleni, G., et al (1998) *Nature* 393: 79-82.
7. Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Tsui, L-C., et al (1989) *Science* 245: 1073-1080.
8. Nielsen O.H.(1988) *Acta Paediatr Scand* 77: 836-841.
9. Balassopoulou, A., Loukopoulos, D., Kollia, P., et al (1990) *Human Genetics* 85: 393-394.
10. Μεταξωτού Μ., Καναβάκης Ε., Τσεγκή Χ. (2002) "Ινοκυστική νόσος", *Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης*.
11. Morral, N., Bertranpetit, J., Estivill, X., et al (1994) *Nat.Genet.* 7: 169-175.
12. Rommens, J.M., Jannuzzi, M.C., Kerem, B., et al (1989) *Science* 245: 1059-1065.
13. Riordan, J.R, Rommens, J.M., Kerem, B., et al (1989) *Science* 245: 1066-1073.
14. Wainwright, B.J., et al (1985) *Nature* 318 : 384-385.
15. White, R., Woodward, S., Leppert, M., et al (1985) *Nature* 318: 322-384.
16. Estivill, X., et al (1987) *Nature* 326 : 840-845.
17. Estivill, X., et al (1988) *Genomics* 1 : 257-263.
18. Canessa, C.M., et al (1994) *Nature* 367 : 463-467.
19. Lingueglia, E., et al (1993) *FEBS Lett* 318 : 95-99.
20. Smith, J.J., et al (1996) *Cell* 85, 229-236.
21. Ko, Y.H., et al (1997) *FEBS Lett.* 405: 200-208.
22. Bianchet, M.A et al (1997) *J Bioenerg. Biomembr.* 29: 503-524.
23. Doidge, C.A, et al (1993) *Annu. Rev. Microbiol.*47: 291-319
24. Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J. et.al. (1982) *EMBO J.* 1: 945-951.
25. Cheng, S.H, Rich, D.P., Marshal, J., et al (1991) *Cell* 66: 1027-1036.
26. Hwang, T-C., Nagel, G., Nairn, A.C., et al (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4698-4702.
27. Winter M.C. and Welsh M.J (1997) *Nature* 389: 296-297.
28. Mattheus, C.J., et al (1998) *J. Physiol.* 508: 365-377.
29. Daniel, J., Hennager, et al (2000) *PNAS* 98: 3594-3599.
30. Ramjeesingh, M., et al (1999) *Biochemistry* 38: 1463-1468.
31. Ikuma, M., Welsh, M.J., (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8675-8680.
32. Zeltwanger, S, et al (1999) *J. Gen. Physiol.* 113: 541-554.
33. Li. C., et al (1996) *J. Biol. Chem.* 271 : 28463-28468.

35. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (1994) *Hum. Mutat.* 4:167-177.
36. Hamosh, A., Trapnell, B.C., Zeitlin, P.L., et al (1991) *J. Clin. Invest.* 88: 1880-1885
37. Cheng, S.H., Gregory, R.J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D.W., et al. (1990) *Cell* 63: 827-834.
38. Anderson, P.S. & Welsh, M.J (1992) *Science* 257: 1701-1704.
39. Sheppard, D.N., Rich, D.P., Ostegaard, L.S., et al (1993) *Nature* 362: 160-164.
40. Thomas P.J. et al (1992) *J. Biol. Chem* 267: 5727-5730.
41. Bianchet, M.A., Ko, Y.H., Amzel, L.M., and Pedersen, P.L. (1997) *J. Bioenerg. Biomembr.* 29: 503-524.
42. Massiah, M.A., Ko, Y.H., Pedersen, P.L., and Mildvan, A.S. (1999) *Biochemistry* 38: 7453-7461.
43. Nichols, W.C., Ginsburg, D. (1999) *Am. J. Hum. Genet.* 64:1493-1498
44. Johnston, J.A., Ward, C.L., Kopito, R.R. (1998) *J. Cell Biol.* 143: 1883-1898.
45. Cheng, S.H., Gregory, R.J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D.W., et al. (1990) *Cell* 63: 827-834.
46. Gregory, R.J., Rich, D.P., Cheng, S.H., Souza, D.W., Welsh, M.J. (1991) *Mol. Cell Biol.* 11:3886-3893.
47. Denning, G.M., Ostedgaard, L.S., and Welsh, M.J. (1992) *J. Cell Biol.* 118: 551-559.
48. Denning, G.M., Anderson, M.P., Amara, J., Marshall, J., Smith, A.E., and Welsh, M.J. (1992) *Nature* 358: 761-764.
49. Dalemans, W., Barbry, P., Champigny, G., Jallat, S., et al (1991) *Nature* 354 : 526-528.
50. Drumm, M.L., Wilkinson, D.J., Smit, L.S., Worrel, R.T., et al (1991) *Science* 254: 1797-1799.
51. Brown, C.R., Hong-Brown, L.Q., Biwersi, J., Verkman, A.S., Welsh, W.J. (1996) *Cell Stress Chaperons* 1: 117-125.
52. Haws, C.M., Nepomuceno, I.B., Krouse, M.E., Wakelee, H., Law, T., Wine, J.J. (1996) *Am. J. Physiol.* 270: C1544-C1555.
53. Jiang, C., Fang, S.L., Xiao, Y.F., O'Connor, S.P., Nadler, S.G., Lee, D.W., Jefferson, D.M., et al (1998) *Am. J. Physiol.* 275: C171-C178.
54. Di Sant' Agnese, P.A & Davis, P.B (1976) *N. Engl. J. Med.* 295: 481-485.
55. Khan T.Z., Wagener J.J., Bost T., Martinez J., Accurso F.J., Riches D.W. (1995) *Am J Respir. Crit Care Med* 151: 1075-82.
56. Burke W., Aitken M.L., Chen S.H., Scott C.R. (1992) *Chest* 102: 506-509.
57. Fitz Simmons S.C. (1993) *J. Pediatr.* 122: 1-9.
58. Konstan M.W., Hillard K.A., Norvell T.M., Berger M. (1994) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: 448-54.
59. Chase H.P., Long M.A., Lavin M.H. (1979) *J. Pediatr.* 95: 337-346.
60. Kerem E., Corey M., Kerem, B.J., Rommens, J., Markiewicz D, Levison H., Tsui L-C & Durie P. (1990) *N. Engl. J. Med.* 323: 1517-1522.
61. Santis G., Osborne L., Knight R.A & Hodson M. (1990) *Lancet* 336: 1081-1084.
62. Gray M.A., Harris A., Coleman L., Greenwell J.R., Argent B.E. (1989) *Am. J. Physiol.* 257: C 240-C251.
63. Gray M.A., Plant J., Argent B.E. (1993) *Am. J. Physiol.* 264: C591-C602.
64. Kopelman H., Durie P., Gaskin K., Weizman Z., Forstner. G. (1985) *N. Engl. J. Med.* 312: 329.



67. Lanng S. (1996) *Eur. J. Gastroenterol Hepatol* 8: 744-747.
68. Hardin D.S., Le Blanc A., Lukenbough J., Seilheimer D.K. (1997) *J. Pediatr.* 130: 948-56.
69. Stern R.C., Stevens D.P., Boat T.F., et al. (1976) *Gastroenterology* 70: 645-649.
70. Taylor C. J., Baxter P.S., Hardcastle J., Hardcastle P.T. (1988) *Gut* 29: 957-962.
71. Allan J.R., Robbie M., Phelan P.D. & Danks D.M. (1981) *Eur. J. Pediatr.* 135 : 291-292.
72. Talamo R.C., Rosenstein B.J. & Berninger R.W. (1983) *The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5<sup>th</sup> edn.* p.p. 1889-1917.
73. Welsh M.J., Tsui L-C, Boat TF, Beaudet AL (1996) *In The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases: 3799-3876.*
74. Honig S.C., Lamont J., Oates R.D (1991) *J Urol. Suppl.* 145: 326a
75. Stutts M.J., Boucher R.C. (1999) *In Cystic Fibrosis in Adults: 3-25*
76. Sato F. (1984) *J. Clin. Invest.* 73: 1763-1771.
77. Le Grys VA (1996) *J. Pediatr.* 129 : 892-897.
78. Chinet T. (1994) *Eur. Resp. J.* 7 : 1917-1920.
79. Rosenstein B.J., Cutting G.R.(1998) *J. Pediatr.* 132: 589-595.
80. Zeitlin P. (2001) *J. Pediatr.* 139: 345.
81. Wilmot R. (1998) *J. Pediatr.* 132: 563-564.
82. Rosenstein, B.J. & Zeitlin, P.L. (1991) *Curr. Sci.* 3: 392-398
83. Sokol R.J., Accurso F.J., Abman S.H., Hammondk (1989) *Pediatr Pulmonol.* [suppl.] 4: 63-65.
84. Rich D.P. Anderson M.P., Gregory R.J., Cheng S.H., Welsh M.J., et.al. (1990) *Nature* 347: 358-363.
85. Zabner J, Couture R.A., Gregory R.J., Graham S.M., Smith A.E., Welsh M.J. (1993) *Cell* 75: 207-216.
86. Crystal R.G., McElvaney N.G., Rsenfeld M.A., Chu C.S., et. al. (1994) *Nat. Genet.* 8: 42-51.
87. Caplen N.J., Alton E.W., Middleton P.G., Dorin J.R., Gaox, et. al. (1995) *Nat. Med.* 1: 39-46.
88. J.M. Claverie (2001) *Science* 291: 1255-1257.
89. Saiki R.K., Bugawan T.L., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1986) *Nature* 324 : 163-166.
90. Kazazian H.H. (1989) *In Erlich HA(ed) "PCR Technology": 153.*
91. Newton C.R., Graham A., Powell S.J., Smith J.C., et.al. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17: 2503-2516.
92. Rommens J., Kerem B-S., Greer, W. Chang P., Tsui L-C & Ray P. (1990) *Am. J. Hum. Genet.* 46: 395-396.
93. Maxam A.M., Gilbert W. (1980) *Methods Enzymol. C.J.*: 499-559.
94. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
95. Myers R.M., Sheffield V.C., Cox D.R. (1989) *In Erlich H.A. (ed) "PCR Technology": 71.*
96. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 2766-2770.
97. Cotton R.G.H. (1989) *Biochem. J.* 263: 1-10.
98. Miller S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.
99. R.K. Saiki et. al. (1985) *Science* 230 : 1350.
100. Farrel P.M., Kosorok M.R., Rock M.J., Laxova A., Zeng L., Lai H-CL et. al. (2001) *Pediatrics* 107 : 1-13.