



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής Επίκ.Καθηγητής Ε.Δαρδιώτης

Διδακτορική Διατριβή

«Μελέτη γενετικών πολυμορφισμών που εμπλέκονται στην προσκόλληση και διαπίδυση μορίων εντός του ΚΝΣ σε ασθενείς με Πολλαπλή Σκλήρυνση»

υπό

ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΠΡΟΒΑΤΑ

Ιατρού

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2019

© 2019 ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΠΡΟΒΑΤΑΣ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (10^η/13-02-2019 ΓΣ):

- | | |
|---|--|
| 1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων) | Ευθύμιος Δαρδιώτης
Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ |
| 2^{ος} Εξεταστής | Αλέξανδρος Παπαδημητρίου
Ομότιμος Καθηγητής Νευρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ |
| 3^{ος} Εξεταστής | Δημήτριος Μπόγδανος
Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων νοσημάτων,
Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ |
| 4^{ος} Εξεταστής | Ευαγγελή Τσιρώνη-Μαλίζου
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας-Νευροοφθαλμολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ |
| 5^{ος} Εξεταστής | Κυριάκου Δέσποινα
Καθηγήτρια Ιατρικής των Μεταγγίσεων, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ |
| 6^{ος} Εξεταστής | Κωνσταντίνος Πατεράκης
Αναπληρωτής Καθηγητής Νευροχειρουργικής, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ |
| 7^{ος} Εξεταστής | Γεωργία Ξηρομερήσιου
Επίκουρος Καθηγήτρια Νευρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ |

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αυτή την ώρα, αναλογιζόμενος όλο το χρονικό διάστημα της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής μου, θα ήθελα να εκφράσω από καρδιάς την ευγνωμοσύνη μου προς όσους συνέβαλαν με τον τρόπο τους στην διαδικασία αυτή. Πρώτο απ' όλους οφείλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου Επίκ. Καθηγητή κ. Δαρδιώτη Ευθύμιο. Στάθηκε από την πρώτη στιγμή στο πλευρό μου, ως ένας άλλος Σίμων Κυρηναίος, παρέχοντας μου απλόχερα την βοήθεια του, τις πολύτιμες συμβουλές του, και την αγάπη του προς το πρόσωπο μου. Εκτίμησε το πρόσωπο μου στο μέγιστο βαθμό, και συνέβαλε ουσιαστικά στην επιστημονική μου κατάρτιση. Χωρίς την καθημερινή στήριξη του δεν θα είχα φθάσει εδώ. Δεν θα ήμουν όμως σε αυτή τη θέση τώρα αν δεν με εμπιστευόταν ο Καθηγητής κ. Γεώργιος Χατζηγεωργίου όταν του εξέφρασα την επιθυμία να εκπονήσω διατριβή. Οφείλω μεγάλη ευγνωμοσύνη προς το πρόσωπο του, καθώς ήταν πανεπιστημιακός δάσκαλος μου και ο πρώτος ο οποίος, πίστεψε ότι έχω την δυνατότητα να εξελιχθώ επιστημονικά. Σημαντικό ρόλο με τις συμβουλές και γνώσεις της έπαιξε και η Επίκ. Καθηγήτρια κ. Γεωργία Ξηρομερήσιου, για το οποίο την ευχαριστώ θερμά. Θερμές ευχαριστίες οφείλω και στην κ. Δαρδιώτη Μαρία, η οποία με εκπαίδευσε στις απαιτούμενες εργαστηριακές τεχνικές για την εκπόνηση της μελέτης. Επίσης ευχαριστίες οφείλω στους συναδέλφους, ειδικούς και ειδικευόμενους για την αμέριστη συμπαράσταση τους όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Τέλος οφείλω να ευχαριστήσω την κ. Μαργέτη Ελένη, φιλόλογο, για την φιλολογική επιμέλεια του κειμένου, και τον κ. Ανδρέου Άρη για την βοήθεια του στην μορφοποίηση του τελικού κειμένου.

Σημαντικό ρόλο το χρονικό διάστημα αυτό έπαιξαν και οι κ. Παρδάλης Αθανάσιος, Άγγος Παύλος, Παρίση Μαρία και Στεργίου Στέργιος για την ηθική τους υποστήριξη. Συμμερίστηκαν τις αγωνίες και τους φόβους μου και συνέβαλλαν τα μέγιστα να υπερκεραστούν. Τους ευχαριστώ θερμά από καρδιάς.

Την μεγαλύτερη, όμως, ευγνωμοσύνη την οφείλω στους γονείς μου, Βασίλη και Κωνσταντίνα, οι οποίοι με στήριξαν ηθικά και υλικά και με την αγάπη τους κατάφερα να φθάσω σήμερα σε αυτή τη θέση. Αν εκείνοι δεν με στήριζαν τίποτα δεν θα είχα καταφέρει.

Τέλος θα ήταν παράλειψη να μην εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στο πρόσωπο του μακαριστού Μητροπολίτη Λαρίσης Ιγνατίου. Από την πρώτη στιγμή που με γνώρισε στάθηκε δίπλα μου σαν πατέρας. Η αγάπη του προς το πρόσωπο μου και η πνευματική

στήριξη του ήταν αστείρευτη. Δυστυχώς δεν είναι κοντά μας πλέον για να χαρεί μαζί μας την ολοκλήρωση της διατριβής.

Αντώνιος Προβατάς

*Αφιερώνεται στον Βασίλη και την Κωνσταντίνα τους στυλοβάτες της ζωής μου, τον Θάνο,
τον Παύλο, την Μαρία και τον Στέργιο για την αγάπη τους.*

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Όνομα: Αντώνιος
Επώνυμο: Προβατάς
Πατρώνυμο: Βασίλειος
Ημερ.Γέννησης: 13/05/1985

Εκπαίδευση

1991-1997 Δημοτικό σχολείο, Ελληνογερμανική Αγωγή

1997-2000 Γυμνάσιο Α΄Τοσίτσειο-Αρσάκειο Γυμνάσιο Εκάλης

2000-2003 Λύκειο Α΄Τοσίτσειο-Αρσάκειο Λύκειο Εκάλης
Βαθμός Απολυτηρίου Άριστα 19,2

2003-2009 Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Βαθμός πτυχίου 7,44 Λίαν Καλώς

2011-2019 Υποψήφιος Διδάκτορας Νευρολογικής κλινικής, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή
Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Επαγγελματική σταδιοδρομία

Ιούνιος 2011-Σεπτέμβριος 2012 Υπηρεσία υπαίθρου ΚΥ Ελασσόνας

Οκτώβριος 2012-Ιανουάριος 2014 Ιατρός εφημερίας ΚΑΑ Απολλώνειο

Μάρτιος 2014-Δεκεμβρίου 2014 Στρατιωτική θητεία, Πολεμικό Ναυτικό, Στρατεύσιμος
Δίπλος Ιατρός, Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών

Μάρτιος 2015-Οκτώβριος 2015 Ιατρός εφημερίας ΚΑΑ Απολλώνειο

Οκτώβριος 2015-σήμερα Ειδικευόμενος Ιατρός Νευρολογίας, Νευρολογική κλινική,
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

Δημοσιεύσεις

Dardiotis E, Panayiotou E, Provatas A, Christodoulou K, Hadjisavvas A, Antoniadis A,
Lourbopoulos A, Pantzaris M, Grigoriadis N, Hadjigeorgiou GM, Kyriakides T. Gene
variants of adhesion molecules act as modifiers of disease severity in MS. *Neurol
Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2017 Apr 24;4(4):e350. doi:
10.1212/NXI.0000000000000350. eCollection 2017 Jul

«Μελέτη γενετικών πολυμορφισμών που εμπλέκονται στην προσκόλληση και διαπίδυση μορίων εντός του ΚΝΣ σε ασθενείς με Πολλαπλή Σκλήρυνση»

ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΠΡΟΒΑΤΑΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Ε.Δαρδιώτης** Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ (**Επιβλέπων**)
2. **Α.Παπαδημητρίου** Ομότιμος Καθηγητής Νευρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ
3. **Δ.Μπόγδανος** Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων νοσημάτων,
Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ

Μελέτη γενετικών πολυμορφισμών που εμπλέκονται στην προσκόλληση και διαπίδυση μορίων εντός του ΚΝΣ σε ασθενείς με Πολλαπλή Σκλήρυνση

Περίληψη

ΣΚΟΠΟΣ: Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάδειξη συσχέτισης πολυμορφισμών γονιδίων, που κωδικοποιούν μόρια που εμπλέκονται στην μετακίνηση λευκοκυττάρων εντός του ΚΝΣ, και του κλινικού φαινοτύπου της πολλαπλής σκλήρυνσης.

ΜΕΘΟΔΟΣ: Στη μελέτη περιελήφθησαν 389 ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση, ελληνικής καταγωγής, και 336 υγιείς μάρτυρες από 3 διαφορετικά κέντρα πολλαπλής σκλήρυνσης της Ελλάδας και της Κύπρου. Έγινε γονοτύπηση 147 σημειακών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών από 9 γονίδια, αυτά των P-selectin (SELP), integrins (ITGA4, ITGB1, ITGB7), των μορίων προσκόλλησης ICAM1, VCAM1, και MADCAM1, fibronectin 1 (FN1), και osteopontin (SPP1), γνωστών μορίων εμπλεκόμενων στην προσκόλληση και μετακίνηση των λεμφοκυττάρων εντός του ΚΝΣ. Οι πολυμορφισμοί αυτοί συσχετίστηκαν με την ηλικία έναρξης της νόσου και την βαρύτητα αυτής, μετρούμενη με την κλίμακα MSSS. Η στατιστική ανάλυση έγινε με δοκιμασίες μετάθεσης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Οι SNPs rs6721763 της ITGA4 και rs6532040 της SPP1 φάνηκε να επηρεάζουν στατιστικά σημαντικά την βαρύτητα της νόσου (permutation p values: 3.00e-06 και 0.009884). Από την άλλη ο SNP rs1250249 της FN1 φάνηκε να 'παρουσιάζει σημαντική στατιστική συσχέτιση με την ηλικία έναρξης της νόσου (permutation p value: 0.0002).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Η παρούσα μελέτη παρέχει στοιχεία για την δράση πολυμορφισμών των γονιδίων μορίων προσκόλλησης, εν προκειμένω για την προσκόλληση και μετακίνηση των λεμφοκυττάρων εντός του ΚΝΣ, ως τροποποιητικών παραγόντων της βαρύτητας της πολλαπλής σκλήρυνσης. Κάνοντας χρήση αυτών των γενετικών βιοδεικτών την στιγμή της διάγνωσης, θα μπορούσε να εκτιμηθεί η επιθετικότητα της νόσου και αναλόγως να ληφθούν θεραπευτικές αποφάσεις.

Gene variants of adhesion molecules act as modifiers of disease severity in MS.

Abstract

PURPOSE: To assess the potential effect of variants in genes encoding molecules that are implicated in leukocyte trafficking into the CNS on the clinical phenotype of multiple sclerosis (MS).

METHODS: 389 Greek MS cases and 336 controls were recruited in 3 MS centers from Cyprus and Greece. We genotyped 147 tagging single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 9 genes encoding for P-selectin (SELP), integrins (ITGA4, ITGB1, and ITGB7), adhesion molecules (ICAM1, VCAM1, and MADCAM1), fibronectin 1 (FN1), and osteopontin (SPP1) involved in lymphocyte adhesion and trafficking into the CNS. Clinical end points of the study were age at MS onset and MS severity as measured by the Multiple Sclerosis Severity Score. Permutation testing was applied to all analyses.

RESULTS: SNPs rs6721763 of the ITGA4 and rs6532040 of the SPP1 were found to significantly influence disease severity (permutation p values: $3.00e-06$ and 0.009884 , respectively). SNP rs1250249 of the FN1 had a dose-dependent effect on age at disease onset (permutation p value: 0.0002).

CONCLUSIONS: Our study provides evidence implicating variants encoding adhesion molecules, responsible for lymphocyte adhesion and trafficking within the CNS, as modifiers of MS disease severity. These genetic biomarkers, which can be available at the time of diagnosis, may be used to assess the biological aggressiveness of the disease and thus guide decisions on treatment.

Περιεχόμενα:

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
2.	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ	2
3.	ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ	3
4.	ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ.....	5
4.1.	Η ΜΗΤΡΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΗΝΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ.	5
4.2.	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΔΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ.....	6
4.3.	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D ΚΑΙ ΤΟ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΟ ΠΛΑΤΟΣ.	8
4.4.	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ	10
4.5.	ΦΥΣΙΚΟ ΤΡΑΥΜΑ ΚΑΙ ΨΥΧΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	10
5.	ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ	11
6.	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ... ..	14
7.	Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ ΚΑΙ ΟΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΗΣ.	16
7.1.	ΤΟ ΑΚΤΙΝΟΛΟΓΙΚΑ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ (RADIOLOGICAL ISOLATED SYNDROME-RIS).....	18
7.2.	ΤΟ ΚΛΙΝΙΚΑ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ (CLINICAL ISOLATED SYNDROME).....	18
7.3.	Η ΔΙΑΛΕΙΠΟΥΣΑ ΥΠΟΤΡΟΠΙΑΖΟΥΣΑ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ (RELAPSING REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS).....	19
7.4.	Η ΔΕΥΤΡΟΠΑΘΩΣ ΠΡΟΪΟΥΣΑ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ (SECONDARY PROGRESSIVE MULTIPLE SCLEROSIS).....	19
7.5.	Η ΠΡΩΤΟΠΑΘΩΣ ΠΡΟΪΟΥΣΑ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ (PRIMARY PROGRESSIVE MULTIPLE SCLEROSIS).....	19
7.6.	Η ΠΡΟΪΟΥΣΑ ΥΠΟΤΡΟΠΙΑΖΟΥΣΑ ΜΟΡΦΗ (PROGRESSIVE RELAPSING MULTIPLE SCLEROSIS)	20
8.	Η ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ	21
8.1.	Η ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ	21
8.2.	ΤΟ ΕΝΥ ΣΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ	22
8.3.	ΤΑ ΠΡΟΚΛΗΤΑ ΔΥΝΑΜΙΚΑ.....	23
8.4.	Η ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ	25
9.	Η ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ	31
9.1.	Η ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΟΞΕΙΑΣ ΦΑΣΗΣ	31
9.2.	Η ΠΡΟΦΥΛΑΚΤΙΚΗ Η ΝΟΣΟΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	33
9.3.	Η ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	39
10.	ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	42
10.1.	P-selectin	43
10.2.	Ιντεγκρίνη α4	44

10.3.	Ιντεγκρίνη β1	45
10.4.	Ιντεγκρίνη β7	46
10.5.	ICAM-1 (INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE-1)	47
10.6.	VCAM (VASCULAR CELLULAR ADHESION MOLECULE)	48
10.7.	MADCAM (MUCOSAL ADDRESSING CELL ADHESION MOLECULE).....	49
10.8.	FIBRONECTIN.....	50
10.9.	OSTEOPONTIN.....	50
11.	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	52
11.1.	ΣΚΟΠΟΣ	52
11.2.	ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ	53
11.3.	ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	54
11.4.	ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ	58
12.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	66
12.1.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	66
13.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	88
14.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	i

Φωτογραφίες:

Εικόνα 1. T2 εικόνα βλαβών ΠΣ	22
Εικόνα 2. Εικόνα σκιαγραφικής ενίσχυσης ενεργών βλαβών, και εικόνα μαύρης τρύπας	22

Πίνακες:

Πίνακας 1. Κριτήρια McDonald 2017	24
Πίνακας 2. Διαφορική διάγνωση της Πολλαπλής σκλήρυνσης	30
Πίνακας 3. Θεραπείες Πολλαπλής Σκλήρυνσης.....	39
Πίνακας 4. P-ELECTING	60
Πίνακας 5. INTEKPINH α4	61
Πίνακας 6. INTEΓKPINH β1	62
Πίνακας 7. INTEΓKPINH β7.....	62
Πίνακας 8. ICAM-1	62
Πίνακας 9. VCAM.....	63
Πίνακας 10. MADCAM.....	63

Πίνακας 11. FIBRONECTIN 1	65
Πίνακας 12. OSTEOPONTIN	65
Πίνακας 13. Δημογραφικά χαρακτηριστικά συμμετεχόντων.....	67
Πίνακας 14. Αναπηρία στους συμμετέχοντες βάσει EDSS	67
Πίνακας 15. Αναπηρία με βάση την κλίμακα MSSS.....	68
Πίνακας 16. Πολυμορφισμοί γονιδίων με συσχέτιση με την MSSS	68
Πίνακας 17. Αποτελέσματα για το γονίδιο της P-selectin	69
Πίνακας 18. Αποτελέσματα για το γονίδιο της Ιντεγκρίνης α4	71
Πίνακας 19. Αποτελέσματα για το γονίδιο της Ιντεγκρίνης β1.....	73
Πίνακας 20. Αποτελέσματα για το γονίδιο της Ιντεγκρίνης β7.....	76
Πίνακας 21. Αποτελέσματα για το γονίδιο του ICAM-1	76
Πίνακας 22. Αποτελέσματα για το γονίδιο του VCAM.....	77
Πίνακας 23. Αποτελέσματα για το γονίδιο του MADCAM	78
Πίνακας 24. Αποτελέσματα για το γονίδιο της fibronectin.....	78
Πίνακας 25. Αποτελέσματα για το γονίδιο της osteopontin	81
Πίνακας 26. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης νόσου για το γονίδιο της P-selectin	82
Πίνακας 27. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης της νόσου για το γονίδιο της Ιντεγκρίνης α4.....	83
Πίνακας 28. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης της νόσου για το γονίδιο της Ιντεγκρίνης β1	84
Πίνακας 29. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης της νόσου για το γονίδιο της Ιντεγκρίνης β7.....	84
Πίνακας 30. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης της νόσου για το γονίδιο του ICAM.....	85
Πίνακας 31. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης νόσου για το γονίδιο του VCAM.....	85

Πίνακας 32. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης νόσου για το γονίδιο του MADCAM	85
Πίνακας 33. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης νόσου για το γονίδιο της Fibronectin.....	86
Πίνακας 34. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης νόσου για το γονίδιο της Osteopontin.....	87

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πρώτη πιθανή περιγραφή της πολλαπλής σκλήρυνσης, σαν κλινική οντότητα, γίνεται το 1421 με την περίπτωση της St Lidwina of Schiedan, η οποία ανέπτυξε συμπτωματολογία συμβατή με πολλαπλή σκλήρυνση, όταν ήταν 16 ετών. Ακολούθησε ο Sir Augustus d'Este με την περιγραφή της αδιάγνωστης νόσου του, καθώς και οι παθολογοανατόμοι Carswell, Cruveilhier και von Frerichs οι οποίοι έδωσαν μια ικανοποιητική παθολογοανατομική περιγραφή της νόσου. Ο πρώτος όμως, ο οποίος ασχολήθηκε συστηματικά με την πολλαπλή σκλήρυνση, ήταν ο Charcot περιγράφοντας τόσο κλινικά τη νόσο, όσο και παθολογοανατομικά, πραγματοποιώντας και συσχετίσεις μεταξύ συμπτωμάτων και ανατομικών βλαβών. Παράλληλα με την παθολογοανατομική μελέτη διατύπωσε υποθέσεις για την παθογένεια της νόσου. Αποτέλεσμα αυτών ήταν η θέσπιση της τριάδας του Charcot (νυσταγμός, αταξία, δυσαρθρία) ως διαγνωστικού εργαλείου. Από τη εποχή του Charcot έως σήμερα η εξέλιξη τόσο στην μελέτη, όσο και στην θεραπεία είναι τεράστια με σημαντικούς σταθμούς, χωρίς ωστόσο να έχει επιτευχθεί αφενός πλήρης κατανόηση της παθογένεσης και αφετέρου ριζική θεραπεία της νόσου.

2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ

Η Πολλαπλή Σκλήρυνση αποτελεί την πιο συχνή φλεγμονώδη νόσο του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Χαρακτηρίζεται από επεισόδια φλεγμονής, που συνήθως διαρκούν από κάποιες ημέρες έως μήνες, προκαλώντας βλάβη στη μυελίνη που περιβάλλει τους νευράξονες, τα ολιγοδενδροκύτταρα και τελικά τους ίδιους τους νευρώνες (1). Μελέτες έχουν δείξει ότι η φλεγμονή μπορεί να είναι είτε χρόνια είτε οξεία, εστιακή ή πολυεστιακή. Εντοπίζεται περίξ των παροχτευτικών φλεβών του ΚΝΣ, δημιουργώντας τις λεγόμενες απομυελινωτικές πλάκες. Ο δε φλεγμονώδης χαρακτήρας της νόσου υποσημαίνεται επιπλέον από την αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, την παραγωγή ολιγοκλωνικών κλασμάτων IgG ανοσοσφαιρίνης στο ENY (χαρακτηριστικό της νόσου) (2, 3).

Είναι γνωστό ότι η νόσος, η οποία είναι κοινή στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη, παρουσιάζει επιπολασμό της τάξης των 100-200/100000 ατόμων του πληθυσμού ενώ η ετήσια επίπτωση της νόσου στον πληθυσμό είναι της τάξης των 5-6/100000. Η δε συχνότητα της ΠΣ είναι 2 με 3 φορές υψηλότερη στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες, ενώ η συνηθέστερη ηλικιακή περίοδος εμφάνισης αυτής είναι από τα 15 έως τα 45 έτη, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν υπάρχουν και ακραίες ηλικίες εμφάνισης της νόσου (1) (2).

Η εμφάνιση συμπτωματολογίας πάντως δεν αντιστοιχεί πάντα στην έναρξη της νόσου καθώς έχουν περιγραφεί περιπτώσεις ασθενών που υπήρξαν ασυμπτωματικοί για μεγάλο χρονικό διάστημα πριν από την διάγνωση. Επίσης έχει αναφερθεί ανεύρεση απομυελινωτικών βλαβών ως τυχαίο εύρημα σε νεκροτομικά παρασκευάσματα εγκεφάλων. Η ολοένα και αυξανόμενη χρήση του Μαγνητικού Συντονισμού ως διαγνωστικού εργαλείου, έχει συμβάλει στην πρωιμότερη διάγνωση της νόσου (2). Επιπλέον, αρκετοί εκ των ασυμπτωματικών ατόμων που εμφάνισαν απομυελινωτικές βλάβες σε μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου ανέπτυξαν στην συνέχεια πολλαπλή σκλήρυνση (1).

Η συμπτωματολογία του κάθε ασθενούς διαφέρει σημαντικά και αυτό εξαρτάται από την εντόπιση των βλαβών στο ΚΝΣ. Παρόλα αυτά κοινά συμπτώματα αποτελούν αισθητικές, κινητικές διαταραχές, διαταραχές στην όραση και γενικά συμπτώματα όπως κόπωση και καταβολή. Τα παραπάνω μπορεί να εμφανιστούν μεμονωμένα είτε σε διάφορους συνδυασμούς (2).

3. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ

Η ΠΣ είναι μία νόσος εξαιρετικά ετερογενής και δεν εμφανίζεται με την ίδια μορφή σε όλους. Έχουν γίνει αποδεκτές τέσσερις μορφές της νόσου, και έχουν περιγραφεί με σαφήνεια.

Η πρώτη, και συχνότερη (85-90% των ασθενών με ΠΣ), είναι η διαλείπουσα υποτροπιάζουσα (RRMS), η οποία χαρακτηρίζεται από αυτοπεριοριζόμενα επεισόδια νευρολογικής σημειολογίας, τα οποία διαρκούν από μερικές ημέρες μέχρι μερικές εβδομάδες. Ακολουθεί ύφεση της συμπτωματολογίας μερική ή πλήρης. Μεταξύ των επεισοδίων οι ασθενείς είναι κλινικά σταθεροί. Στη μαγνητική τομογραφία (ΜΤ) εγκεφάλου ή νωτιαίου μυελού στην διάρκεια των επεισοδίων αυτών ενδέχεται να απεικονίζονται νέες υψηλής έντασης σήματος βλάβες στις T2 ακολουθίες, οι οποίες προσλαμβάνουν γαδολίνιο (3).

Η δεύτερη μορφή είναι η δευτεροπαθώς προϊούσα μορφή (SPMS). Ξεκινά ως τυπική υποτροπιάζουσα ΠΣ και ακολουθείται από ελάττωση της συχνότητας των υποτροπών και προοδευτική επιδείνωση της κατάστασης του ασθενούς. Στις ΜΤ των ασθενών αυτών προεξάρχει κυρίως η ατροφία του εγκεφάλου παρά τα στοιχεία της οξείας φλεγμονής. Στη μορφή αυτή της νόσου μεταπίπτει η πλειοψηφία των ασθενών με υποτροπιάζουσα ΠΣ και είναι υπεύθυνη για την πλειοψηφία των νευρολογικών ελλειμμάτων και της αναπηρίας που εμφανίζεται στους πάσχοντες.

Η τρίτη μορφή της νόσου είναι η πρωτοπαθώς προϊούσα (PPMS) και αφορά το 10% των ασθενών με ΠΣ. Η μορφή αυτή χαρακτηρίζεται από έλλειψη υποτροπών και εξ αρχής υπάρχει μια προοδευτική επιδείνωση της κλινικής εικόνας του ασθενούς. Παρόμοια με την δευτεροπαθώς προϊούσα μορφή και αυτοί οι ασθενείς εμφανίζουν λιγότερα στοιχεία ενεργού φλεγμονής στην ΜΤ. Η κατανομή στα δύο φύλα εδώ είναι περισσότερο ισότιμη, εμφανίζεται σε μεγαλύτερες ηλικίες και συνήθως έχει χειρότερη πρόγνωση ως προς την αναπηρία που προκαλεί.

Η τέταρτη μορφή της νόσου είναι η προϊούσα υποτροπιάζουσα (PRMS) η οποία δεν είναι εύκολο να διακριθεί από την πρωτοπαθώς προϊούσα. Οι ασθενείς αυτοί εκτός της εξ αρχής προοδευτικής επιδείνωσης εμφανίζουν επιπρόσθετα και υποτροπές που επιβαρύνουν την εξέλιξη της νόσου.

Η θνητότητα των ασθενών με Πολλαπλή Σκλήρυνση, αν και η νόσος αναφέρεται συχνά ως μη θανατηφόρος, έχει βρεθεί ότι είναι σαφώς υψηλότερη από αυτή του γενικού πληθυσμού. Οι θάνατοι δεν οφείλονται συχνά σε αυτή καθεαυτή τη νόσο παρά σε δευτεροπαθείς επιπλοκές όπως λοιμώξεις, ατυχήματα λόγω αναπηρίας καθώς και αυτοκτονίες. Ειδικά έχει βρεθεί ότι η αναπηρία, μετρούμενη με την κλίμακα EDSS, είναι σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την θνητότητα, ιδιαίτερα σε ασθενείς με βαθμολογία 7,5 βαθμών της κλίμακας και άνω. Με την εισαγωγή των νοσοτροποποιητικών θεραπειών έχει αυξηθεί σημαντικά το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών. Επιπλέον υπάρχουν δεδομένα ότι η έγκαιρη έναρξη θεραπείας βελτιώνει το προσδόκιμο επιβίωσης (2).

4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ.

Η πολλαπλή σκλήρυνση παρουσιάζει ένα ιδιαίτερα περίπλοκο αιτιολογικό υπόβαθρο. Όπως θα αναλυθεί παρακάτω σπουδαίο ρόλο φάνηκε ότι παίζουν, τόσο γενετικοί παράγοντες, όσο και περιβαλλοντικοί, οι οποίοι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους κάτω από ορισμένες συνθήκες και οδηγούν στην εκδήλωση της νόσου.

Από μελέτες (3-8), αναδείχθηκε ότι άτομα με συγγενείς εξ αίματος που πάσχουν από πολλαπλή σκλήρυνση να έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν και αυτοί πολλαπλή σκλήρυνση. Όμως, παρόλο που φαίνεται ότι υπάρχει σημαντικό γενετικό υπόβαθρο, δεν είναι το μόνο το οποίο απαιτείται για την εκδήλωση της νόσου. Αυτό αναδείχθηκε από μελέτες διδύμων οι οποίες έδειξαν διαφορές στον επιπολασμό της νόσου ανάλογα με τον τόπο κατοικίας. Από αυτό λοιπόν γίνεται σαφές ότι υπάρχουν περιβαλλοντικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην εκδήλωση της νόσου.

4.1. Η ΜΗΤΡΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΗΝΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ.

Μελετώντας άτομα με κοινό γονέα μόνο την μητέρα, ερευνητές ανέπτυξαν την θεωρία ότι η μητέρα μεταδίδει την προδιάθεση για ανάπτυξη πολλαπλής σκλήρυνσης (5, 7). Αυτό μπορεί να είναι τόσο γενετικό, μεταφέροντας γονίδια στο παιδί καθαρά μητρικής προέλευσης, όπως τα μιτοχονδριακά (9), όσο περιβαλλοντικό με την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων κατά την ενδομήτρια ζωή και αργότερα κατά τον θηλασμό.

Τέλος ο μήνας γέννησης φάνηκε ότι παίζει ρόλο στην εμφάνιση της νόσου. Παρατηρήθηκε ότι τον μήνα Μάιο είχαν γεννηθεί περισσότεροι ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση, παρά τον μήνα Νοέμβριο (10, 11). Το φαινόμενο αυτό φαίνεται ότι αποδίδεται στον ηλιακό κύκλο και την ηλιοφάνεια της κάθε εποχής και κατ' επέκταση στα επίπεδα της βιταμίνης D, καθώς άτομα που γεννήθηκαν τον Μάιο είχαν ενδομήτριο ζωή κατά τους χειμερινούς μήνες, οπότε οι μητέρες ήταν λιγότερο εκτεθειμένες στην ηλιακή ακτινοβολία, άρα είχαν και χαμηλότερα επίπεδα βιταμίνης D, άρα και τα έμβρυα. Σε αντίθεση τα άτομα που γεννήθηκαν τον Νοέμβριο είχαν ενδομήτριο ζωή κατά τους καλοκαιρινούς μήνες με επακόλουθο οι μητέρες να είχαν υψηλότερα επίπεδα βιταμίνης D λόγω της μεγαλύτερης έκθεσης στον ήλιο (12).

4.2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΔΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ.

Η συσχέτιση λοιμωδών παραγόντων στην παθογένεια της πολλαπλής σκλήρυνσης εισήχθη από τον Poskanzer το 1963, ο οποίος υπέθεσε πιθανή συσχέτιση της λοίμωξης από πολιομυελίτιδα σε παιδική ηλικία με την αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης πολλαπλής σκλήρυνσης (13). Αυτή η πιθανή συσχέτιση ονομάστηκε υπόθεση της υγιεινής και όπως θα δούμε παρακάτω με την πάροδο των ετών περιέλαβε και άλλους λοιμώδεις παράγοντες.

4.2.1.1. Ο ιός Epstein Barr.

Ο ιός Epstein Barr είναι ένας DNA ιός, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των ερπητοϊών και ανακαλύφθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1960 από τον Burkitt. Η μετάδοση του ιού γίνεται με το σάλιο μολυσμένου ατόμου και η συνήθης κλινική εκδήλωση είναι η λοιμώδης μονοπυρήνωση, ενώ είναι δυνατόν ο ασθενής να παραμείνει ασυμπτωματικός μετά την μόλυνση από το ιό. Ο ιός παραμένει ανενεργός στα Β λεμφοκύτταρα του ατόμου και δύναται να επανενεργοποιηθεί υπό διάφορες συνθήκες, όπως η ανοσοκαταστολή.

Οι πρώτες ενδείξεις ότι υπάρχει σχέση μεταξύ του EBV και της πολλαπλής σκλήρυνσης φάνηκαν από τις ομοιότητες που παρουσιάζουν η λοιμώδης μονοπυρήνωση και η πολλαπλή σκλήρυνση ως προς την ηλικία εμφάνισης, τη γεωγραφική κατανομή, την εθνικότητα και την κοινωνικοοικονομική κατάσταση των προσβεβλημένων ατόμων (13, 14). Αυτό αντανακλά την προστασία των παιδιών και ένα περιβάλλον αυξημένης υγιεινής-καθαριότητας στο οποίο γεννιούνται και μεγαλώνουν στις αναπτυγμένες κοινωνίες, εν αντιθέσει με τις αναπτυσσόμενες κοινωνίες όπου η έκθεση των παιδιών σε λοιμογόνους παράγοντες όπως ο EBV γίνεται νωρίς στην παιδική ηλικία. Αυτή διαφορά στην ηλικία έκθεσης στον EBV είναι σημαντική, καθώς έκθεση σε μικρή ηλικία δεν θα οδηγήσει εύκολα σε λοιμώδη μονοπυρήνωση και έντονη φλεγμονώδη αντίδραση. Από την άλλη μεριά έκθεση σε μεγαλύτερη ηλικία αυξάνει κατακόρυφα το ενδεχόμενο ανάπτυξης λοιμώδους μονοπυρήνωσης, άρα και έντονης φλεγμονώδους αντίδρασης. Το παραπάνω θα μπορούσε να αντανακλά και στις ανάλογες πιθανότητες εμφάνισης πολλαπλής σκλήρυνσης, καθώς συνδέθηκε η εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων με το αποστειρωμένο περιβάλλον στο οποίο μεγαλώνουν τα παιδιά και ακολούθως την καθυστερημένη επαφή με λοιμογόνους παράγοντες, οι οποίοι θα οδηγήσουν σε έντονη φλεγμονώδη αντίδραση (15).

Από μεταanalύσεις φάνηκε ότι άτομα αρνητικά στον EBV έχουν 15 φορές χαμηλότερη πιθανότητα να αναπτύξουν πολλαπλή σκλήρυνση (13). Αυτό φάνηκε και από μελέτη (16) στην οποία μετρήθηκε ο τίτλος anti-EBV πριν και μετά την εκδήλωση πολλαπλής σκλήρυνσης από ασθενείς λαμβάνοντας δείγματα ορού από το αρχείο ορών του αμερικανικού υπουργείου άμυνας (American Department of Defense Serum Repository). Παρατηρήθηκε ότι το 100% των ασθενών που εμφάνισαν πολλαπλή σκλήρυνση και ήταν αρνητικοί στον EBV, υπέστησαν ορομετατροπή πριν την εμφάνιση της νόσου, σε αντίθεση με τους υγιείς μάρτυρες στους οποίους παρατηρήθηκε ορομετατροπή την ίδια περίοδο μόνο στο 35,7%. Παράλληλα παρατηρήθηκε μέσω της αμερικανικής βάσης παρακολούθησης των στρατιωτικών (US military cohort) ότι υψηλοί τίτλοι anti-EBNA στον ορό ατόμων συνδέθηκαν με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης πολλαπλής σκλήρυνσης (17). Παράλληλα προτάθηκαν και άλλες θεωρίες που συσχετίζουν τον EBV με την πολλαπλή σκλήρυνση όπως η αλληλεπίδραση του ιού με την βιταμίνη D καθώς και με γενετικούς τόπους των ασθενών (18)

4.2.1.2. Ο ανθρώπινος ερπητοϊός 6

Ο HHV6 είναι ένας DNA ιός της οικογένειας των ερπητοϊών, ο οποίος προσβάλλει πάνω από το 90% των παιδιών έως την ηλικία των 3 ετών προκαλώντας κυρίως τη νόσο Roseola. Η πρώτη αναφορά συσχέτισης του ιού με την πολλαπλή σκλήρυνση έγινε το 1995 (19), όπου ανιχνεύθηκαν τα γονίδια των πρωτεϊνών σύνδεσης p41 και 101k του HHV6 σε απομυελινωτικές πλάκες εγκεφάλων ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση.

Ο ιός μολύνει κυρίως τα CD4 T λεμφοκύτταρα, αλλά είναι δυνατόν να μολύνει τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα και τους ίδιους τους νευρώνες (20). Ο πιθανός παθογενετικός μηχανισμός πιθανόν να περιλαμβάνει επαγωγή του TNF-α και της IL1-β. Όμως ο ιός προάγει την απόπτωση των CD4 και CD8 T λεμφοκυττάρων, των κυττάρων φυσικών φονέων (NK), ενώ αναστέλλει την παραγωγή της IL2 και τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων και οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή της IL10 (20,70). Περαιτέρω μελέτες όμως ανέδειξαν ότι δεν υπήρχε σημαντική εμπλοκή του ιού αυτού στην παθογένεια της πολλαπλής σκλήρυνσης (20, 21).

4.2.1.3. Άλλοι ιοί.

Μια άλλη ομάδα ιών με πιθανή συσχέτιση με την πολλαπλή σκλήρυνση είναι αυτή των κοροναϊών, οι οποίοι προκαλούν λοιμώξεις αναπνευστικού. Η πρώτη αναφορά έγινε σε

τρία περιστατικά με πολλαπλή σκλήρυνση, στις απομυελινωτικές πλάκες των οποίων ανιχνεύθηκαν κοροναϊοί μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (22, 23). Ακολούθως μία μελέτη του 1982 υποστήριξε ότι 41% των ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση που μελετήθηκαν παράγγααν στο ENY αντισώματα έναντι του HcoV-OC43 και 26% αντισώματα έναντι του HcoV-229E, σε αντίθεση με του μάρτυρες όπου δεν ανιχνεύθηκε σύνθεση αντισωμάτων (24). Παράλληλα την δεκαετία του 1990 προτάθηκε και ο μηχανισμός της διασταυρούμενης αντίδρασης σε αντιγόνα του ιού και πρωτεϊνών της μυελίνης (25). Παρόλα αυτά η συμμετοχή των εν λόγω ιών στην παθογένεια της νόσου είναι αμφιλεγόμενη.

Οι ρετροϊοί είναι μία άλλη ομάδα ιών που ενοχοποιήθηκαν ότι συμμετέχουν στην παθογένεια της πολλαπλής σκλήρυνσης. Συγκεκριμένα ο ιός HERV-W, ο οποίος σχετίζεται με την ανθρώπινη συγκιτίνη, θεωρήθηκε ως πιθανός παράγοντας αλλά ακόμα υπάρχουν πολλά αναπάντητα ερωτήματα σε σχέση με την δράση του (26-28).

Τέλος οι ιοί της οικογένειας των πικορναϊών μελετήθηκαν με τη μέθοδο της PCR στο ENY, αποδίδοντας προς το παρόν πενιχρά αποτελέσματα, τα οποία χρήζουν περαιτέρω μελέτης (29), ενώ ο ιός της ανεμευλογιάς-ζωστήρα είχε προταθεί ως πιθανός παράγοντας κινδύνου, αλλά δεν ανευρέθηκαν σπουδαίες διαφορές μεταξύ ασθενών και μαρτύρων (30-32).

4.2.1.4. *Ta Chlamydia pneumoniae*

Η πιθανή συσχέτιση του βακτηρίου αυτού με την πολλαπλή σκλήρυνση πρωτοαναφέρθηκε από τους Sriram et al (33), οι οποίοι βρήκαν ότι το 97% των ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση που μελέτησαν, έναντι του 18% των μαρτύρων, ήταν θετικοί στην PCR για το γονίδιο MOMP του *Chlamydia pneumoniae* και παρουσίαζαν υψηλότερο τίτλο αντισωμάτων στο ENY τουλάχιστον κατά 3 σταθερές αποκλίσεις στο 86%. Τα αποτελέσματα αυτά αμφισβητήθηκαν αργότερα σε μια μετανάλυση το 2006 (33) όπου βρέθηκε σημαντικά αυξημένο ποσοστό παρουσίας αντισωμάτων έναντι *Chlamydia pneumoniae* στο ENY, όχι όμως και στον ορό, σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση (34).

4.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D ΚΑΙ ΤΟ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΟ ΠΛΑΤΟΣ.

Η βιταμίνη D είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη με πλειοτροπική δράση στον ανθρώπινο οργανισμό. Η κύρια πηγή της για τον άνθρωπο είναι μέσω της έκθεσης στην υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία. Στο δέρμα οι υπεριώδεις ακτίνες μετατρέπουν την 7-

δυδροχοληστερόλη σε προ-βιταμίνη D3 που ακολούθως μετατρέπεται στην ενεργό μορφή της, μετά από υδροξυλίωση πρώτα στο ήπαρ και ακολούθως στον νεφρό. Πέρα όμως από την έκθεση στον ήλιο, βιταμίνη D3 είναι δυνατόν να προσληφθεί και μέσω της διατροφής, καταναλώνοντας τροφές πλούσιες σε βιταμίνη D3, όπως τα λιπαρά ψάρια.

Η βιταμίνη D3 έχει εντοπιστεί σε περισσότερο από 30 είδη κυττάρων στον ανθρώπινο οργανισμό, συμπεριλαμβανομένων και αυτών του νευρικού ιστού (35, 36). Παράλληλα σημαντικό ρόλο παίζει και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, προάγοντας την φυσική ανοσία (37) και αναχαιτίζοντας την υπέρμετρη ανοσολογική απάντηση στα παθογόνα. Επίσης σημαντική είναι η δράση της στην κυτταρική ανοσία με την αναστολή της ωρίμανσης των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, της μείωσης της αντιγονοπαρουσίασης στο T λεμφοκύτταρα (38, 39) και την καταστολή Th1 κυττάρων σε αυτοάνοσες αντιδράσεις (40), ενώ στην χημική ανοσία αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των B λεμφοκυττάρων και προάγει την απόπτωση των ενεργοποιημένων B λεμφοκυττάρων (41).

Οι λόγοι όμως οι οποίοι οδήγησαν στην υπόθεση ότι η ανεπάρκεια της βιταμίνης D3 σχετίζεται με την πολλαπλή σκλήρυνση είναι α) η αύξηση της συχνότητας της πολλαπλής σκλήρυνσης με της αύξηση του γεωγραφικού πλάτους, άρα και μείωση της έκθεσης στον ήλιο με επακόλουθο χαμηλότερα επίπεδα βιταμίνης D3 (42-47), β) ο πολύ χαμηλός επιπολασμός της πολλαπλής σκλήρυνσης σε περιοχές με μικρό γεωγραφικό πλάτος και μεγάλη ηλιοφάνεια και επομένως αυξημένη πρόσληψη βιταμίνης D3 (48, 49), γ) η μείωση του κινδύνου εμφάνισης πολλαπλής σκλήρυνσης μετά την μετανάστευση από μεγάλο σε μικρό γεωγραφικό πλάτος (50).

Το φαινόμενο αυτό όμως τείνει να εξαλειφθεί καθώς με τις μετακινήσεις πληθυσμών σε διάφορα γεωγραφικά πλάτη παρουσιάζονται περιπτώσεις πολλαπλής σκλήρυνσης σε περιοχές με χαμηλό επιπολασμό (51, 52), ενώ ισχύει και το δεδομένο της ευκολότερης αναγνώρισης νέων περιστατικών (53, 54).

Όπως είδαμε το γεωγραφικό πλάτος και κατ' επέκταση η βιταμίνη D3 παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της πολλαπλής σκλήρυνσης. Όμως υπάρχει και το εξής παράδοξο: Στη Νορβηγία όπου ο επιπολασμός της πολλαπλής σκλήρυνσης είναι χαμηλότερος στα βόρεια τμήματα της αν και έχουν μεγαλύτερο γεωγραφικό πλάτος. Αυτό φαίνεται ότι αντανάκλα την αυξημένη πρόσληψη της βιταμίνης D3 από του βόρειους πληθυσμούς καθώς κατοικούν πιο κοντά στην θάλασσα και καταναλώνουν μεγαλύτερες ποσότητες ψαριού (55, 56).

4.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ

Από μελέτες που έγιναν προτάθηκε ότι και διατροφή παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της πολλαπλής σκλήρυνσης. Με βάση το προαναφερθέν παράδοξο της Νορβηγίας υποτέθηκε ότι η βασισμένη στο κρέας, και ιδιαίτερα το χοιρινό, διατροφή αποτελεί παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης πολλαπλής σκλήρυνσης (49). Ακολούθησαν μελέτες οι οποίες υποστήριξαν αυτή την υπόθεση και την επέκτειναν και στο συντηρημένο κρέας και τα συντηρητικά του (57-60). Σε αντίθεση με την παραπάνω, η κατανάλωση ψαριού και θαλασσινών φαίνεται ότι είναι προστατευτικός παράγοντας και συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης πολλαπλής σκλήρυνσης, καθώς και ηπιότερης μορφής νόσου (61, 62). Αυτή η σχέση του ψαριού και γενικά των θαλασσινών με την μειωμένη εμφάνιση της πολλαπλής σκλήρυνσης φαίνεται ότι αντανάκλαται στην μεγαλύτερη πρόσληψη βιταμίνης D που έχουν τα άτομα που καταναλώνουν ψάρια και θαλασσινά (56). Τέλος από μελέτη των Wender and Kazmierski (63) φάνηκε ότι το ποσοστό των ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση που καταναλώνει αυξημένες ποσότητες φρούτων και λαχανικών ήταν μικρότερο από το ποσοστό του υγιούς πληθυσμού που καταναλώνει αντίστοιχη ποσότητα αυτών των τροφών. Γεγονός το οποίο ίσως δείχνει κάποια προστατευτική δράση των φρούτων και λαχανικών. Παρόλα αυτά η συγκεκριμένη υπόθεση δεν έχει αποδειχθεί.

Όσον αφορά το κάπνισμα, είναι γνωστό από μελέτες, τόσο αναδρομικές, όσο και προοπτικές, ότι υπάρχει θετική συσχέτιση με την εμφάνιση πολλαπλής σκλήρυνσης (64, 65), αλλά και με χειρότερη πορεία της νόσου στους καπνιστές ασθενείς (66, 67).

4.5. ΦΥΣΙΚΟ ΤΡΑΥΜΑ ΚΑΙ ΨΥΧΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.

Από τον 19^ο αιώνα υπήρχε η άποψη ότι κάποια κρανιοεγκεφαλική κάκωση ή άλλος τραυματισμός στο κρανίο ή τη σπονδυλική στήλη ίσως συνέβαλε στην ανάπτυξη πολλαπλής σκλήρυνσης. Μελέτες πάνω σε αυτή την υπόθεση έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα (68, 69). Το ψυχικό στρες είναι ένα άλλο αμφιλεγόμενο θέμα και η σχέση του με την πολλαπλή σκλήρυνση είναι αμφιλεγόμενη. Η Αμερικάνικη Ακαδημία Νευρολογίας βλέπει την σχέση ψυχικού στρες και πολλαπλής σκλήρυνσης μόνο ως πιθανή (68). Επιπλέον ένας αριθμός μελετών έχουν αναδείξει την σχέση του έντονου στρες με την επιδείνωση της νόσου (70-72).

5. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ

Από χρόνια πιστεύεται ότι η πολλαπλή σκλήρυνση είναι νόσος ανοσολογικής αρχής. Η θεωρία που επικρατεί είναι ότι το άτομο με γενετική προδιάθεση, κάτω από την επίρεια περιβαλλοντικών παραγόντων μια δεδομένη χρονική στιγμή θα αναπτύξει ανοσολογική διαταραχή, που θα οδηγήσει στην εκδήλωση πολλαπλής σκλήρυνσης (73). Η έναρξη γίνεται στην περιφέρεια όπου αντιγονοπαρουσιαστικά, μακροφάγα, διεγείρομενα από αντιγόνα της μυελίνης ενεργοποιούν T λεμφοκύτταρα. Τα διεγερμένα αυτοαντιδρώντα T κύτταρα εισβάλλουν στο ΚΝΣ, μέσω ρήξης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στα μετατριχοειδικά φλεβίδια. Τα κύτταρα εισέρχονται μέσω του ενδοθηλίου των φλεβιδίων στο περιαγγειακό εγκεφαλικό παρέγχυμα. Για να εισέλθουν τα T κύτταρα στο ΚΝΣ συνδέονται με ενδοθηλιακούς προκολλητικούς παράγοντες. Η έκφραση αυτών των παραγόντων απορρυθμίζεται από τοπικές βλάβες του ΚΝΣ. Τέτοιοι παράγοντες είναι ο ICAM-1, ο VCAM-1 και η E σελεκτίνη (74). Ακολούθως πρωτεάσες, περιλαμβανομένων των μεταλοπρωτεασών, μέσω της μείωσης εξωκυττάρων μακρομορίων διευκολύνουν την περαιτέρω δίοδο των κυττάρων στο ΚΝΣ. Από εκεί αντιγόνα του εγκεφάλου και κύτταρα μεταφέρονται στους τραχηλικούς λεμφαδένες, όπου με τη σειρά τους ενεργοποιούν περαιτέρω T κύτταρα. Τα T κύτταρα αυτά μπορούν να επανέλθουν στο ΚΝΣ προκαλώντας περαιτέρω βλάβη. Πριν την εκδήλωση της κλινικής εικόνας παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα κονκαναβαλίνης, η οποία διεγείρει την παραγωγή ιντερφερόνης γ και TNF α (75), αυξημένα επίπεδα ιντερφερόνης γ στον ορό (76), είσοδος ασβεστίου στα T λεμφοκύτταρα, προαγόμενη από την ιντερφερόνη γ (77) και έκκριση προσταγλανδινών από τα μονοκύτταρα (78). Στην ΠΣ σημαντικό ρόλο παίζει η διαμεσολαβούμενη από Th1 λεμφοκύτταρα. Παρατηρείται αυξημένη έκφραση ενεργοποιημένης Z του υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων στα CD4 κύτταρα (79). Επίσης αυξάνεται η παραγωγή πρωτεϊνών ενεργοποίησης (HLA-DR και CD71), διεγερτικών μορίων των B λεμφοκυττάρων (CD80) (80) και υποδοχέων χημειοκινών των Th1 κυττάρων (81). Η αυξημένη παρουσία υποδοχέων ιντερφερόνης γ στα Th17 κύτταρα προάγει την αναστολή αυτών των κυττάρων, ενώ η παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL-1, IL-6, IL-15, και TNF- α ενισχύει την ανοσολογική αντίδραση. Η μειωμένη παραγωγή IL-10 ενισχύει την δράση των Th1 κυττάρων παράλληλα με την αυξημένη IL-15 (82). Αυτό δίνει την εντύπωση για καθυστερημένη, διαμεσολαβούμενη από Th1 κύτταρα, αντίδραση υπερευαισθησίας και αυξημένη CD8 κυτταροτοξικότητα. Εντός του ΚΝΣ η έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η ιντερφερόνη γ και ο TNF- β διεγείρει περαιτέρω κύτταρα της ανοσίας που βρίσκονται στην περιοχή. Ακολουθεί

πρόσδεση αντιγόνων σχετιζόμενα με την πολλαπλή σκλήρυνση στον TCR υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων και το MHC II των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Τέτοια αντιγόνα θεωρούνται οι πρωτεΐνες MAG, MOG αβ κρυσταλλίνη και άλλες. Αυτό οδηγεί σε ανοσολογική απόκριση ή ανεργία. Με την έκκριση ιντερλευκίνης-12 και ιντερφερόνης- γ διεγείρονται Th1 T κύτταρα, τα οποία με την σειρά παρουσιάζουν κυτταροτοξική δράση μέσω ενεργοποίησης CD8 T λεμφοκυττάρων. Παράλληλα υπάρχει και διέγερση Th2 κυττάρων μέσω έκκρισης IL1, IL4 και IL10, τα οποία παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη-κατασταλτική δράση. Όμως, δεν είναι τόσο ευκρινής ο ρόλος των Th1 και Th2 κυττάρων. Αυτό φαίνεται από το ότι οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται και από τους δύο τύπους κυττάρων αυξάνονται. Παράλληλα η εκλεκτική μείωση των Th1 κυττάρων με anti-CD52 αντίσωμα δεν επηρεάζει την εξέλιξη της προϊούσας ΠΣ. Επιπρόσθετα επιγενετικές μελέτες σε RNA από ανοσοκύτταρα ασθενών με ΠΣ που δεν λάμβαναν θεραπεία, ανέδειξαν ότι το μονοπάτι ιντερφερόνης α και β είναι επηρεασμένο σε μεγαλύτερο βαθμό από εκείνων των Th1 και Th2 κυττάρων. Παράλληλα οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται από Th2 κύτταρα μπορούν και αυτές να δράσουν βλαπτικά (83). Άλλος τύπος κυττάρων που ενέχεται στην παθοφυσιολογία της ΠΣ είναι τα Th17 κύτταρα, υπότυπος των CD4 T λεμφοκυττάρων. Τα κύτταρα αυτά ενισχύουν την διαδικασία της αυτοανοσίας στο ΚΝΣ. Ο φλεγμαίνων αιμοτοεγκεφαλικός φραγμός σε συνδυασμό με τα δενδριτικά κύτταρα, που προέρχονται από μονοκύτταρα ευοδώνουν την μετάπτωση των ανώριμων T λεμφοκυττάρων σε Th17 κύτταρα (84). Στον αντίποδα αυτών οι IL-4, IL-27, IFN- γ , και IFN- β αναστέλλουν την παραγωγή Th17 κυττάρων. Τα κυτταροτοξικά CD8 κύτταρα, σε συνδυασμό με τα μονοκύτταρα ενέχονται ισχυρά στην καταστροφή των νευρώνων και των αξόνων στις απομυελινωτικές βλάβες. Είναι ισχυρή η παρουσία τους και στο ΕΝΥ. Η ρυθμιστική/κατασταλτική λειτουργία των CD8+/CD28- κυττάρων είναι βασικής σημασίας στην ΠΣ. Τα CD8 κύτταρα κατά την διάρκεια της έξαρσης της νόσου μειώνονται και ταυτόχρονα η κατασταλτική τους δράση (85-87). Μελέτες του 1979 και 1995 έδειξαν μέσω μελετών ότι ο T κυτταρικός πληθυσμός που προκαλεί καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης στην ΠΣ είναι κυρίως CD8+/CD28- (88, 89). Επιπρόσθετα τα Tr1 CD4 κατασταλτικά κύτταρα παράγουν 6 φορές λιγότερη ποσότητα ανασταλτικής IL-10 σε ασθενείς με ΠΣ με τα κύτταρα στόχους της IL-10 να είναι ανθεκτικότερα σε αυτή (90). Τέλος τα μυελοειδή κύτταρα που αποτελούν πρόδρομους των μακροφάγων, των δενδριτικών κυττάρων και των κοκκιοκυττάρων αυξάνονται σημαντικά κατά την έξαρση της ΠΣ, γεγονός που υποδεικνύει συμμετοχή τους στην ανοσολογική διεργασία (91). Εκτός όμως της κυτταρικής ανοσίας, στην διαδικασία συμμετέχει και η χυμική ανοσία με τα B κύτταρα, τα οποία συμμετέχουν τόσο στην ανοσολογική ρύθμιση,

όσο και στην εγκεφαλική βλάβη (92). Παράγουν IL-6 η οποία ενισχύει την παραγωγή Th17 κυττάρων, ενώ από την άλλη παράγουν νευροτροφικούς αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι ενδεχομένως συμβάλλουν στην επιδιόρθωση των βλαβών. Παράλληλα εκφράζουν συνδιεγερτικά μόρια τα οποία ενισχύουν την φλεγμονή και δρουν και αυτά ως πιθανά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα καθώς παρουσιάζουν ειδικότητα έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων (80). Στο 95% των ασθενών ανιχνεύονται ολιγοκλωνικές ζώνες IgG αντισωμάτων χωρίς όμως αυτά τα αντισώματα να είναι ενεργά έναντι της μυελίνης (93). Επίσης στο 50% των απομυελινωτικών βλαβών ανιχνεύονται ανοσοσφαιρίνες και συμπλήρωμα αν και δεν συνδέονται με την απομυελίνωση (94). Τα αυτοαντισώματα είτε εισέρχονται έτοιμα από την περιφέρεια στο ΚΝΣ, είτε παράγονται εντός του ΚΝΣ από ενεργοποιημένα Β λεμφοκύτταρα.

Όλες οι παραπάνω διαδικασίες οδηγούν σε βλάβη του ελύτρου της μυελίνης και αποκάλυψη των αξόνων. Αποτέλεσμα αυτού είναι η καθυστέρηση στην μετάδοση του σήματος. Εκτός όμως από την βλάβη στο έλυτρο της μυελίνης, βλάβη προκαλείται και στον ίδιο τον άξονα, ο οποίος υφίσταται εκφύλιση και καταστροφή.

6. ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ

Το χαρακτηριστικό της ΠΣ παθολογοανατομικά είναι η παρουσία εστιακών βλαβών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από απώλεια της μυελίνης και διαφόρων βαθμών φλεγμονή (95, 96). Οι βλάβες χωρίζονται σε βλάβες τόσο του φλοιού, όσο και της λευκής ουσίας.

Οι βλάβες του φλοιού χαρακτηρίζονται από ατροφία, απώλεια νευρώνων και απομυελίνωση (97, 98). Στην πρόιμη ΠΣ οι βλάβες αυτές παρουσιάζουν στοιχεία ενεργού απομυελίνωσης με παρουσία μακροφάγων γεμάτων μυελίνη, ενώ παρούσα είναι και η φλεγμονή με περιαγγειακά διηθήματα από μακροφάγα, T και λιγότερο B λεμφοκύτταρα καθώς και πλασματοκύτταρα. Τα φλεγμονώδη κύτταρα αυτά βρίσκονται σε γεινίαση με τα νευρικά κύτταρα, γεγονός που εξηγεί την νευρωνική βλάβη (95, 99). Σε προχωρημένο στάδιο της ΠΣ οι βλάβες του φλοιού χαρακτηρίζονται από παρουσία φαγοκυττάρων, κυρίως κυττάρων της μικρογλοίας, καταστροφή των ολιγοδενδροκυττάρων, απόπτωση των νευρώνων και ατροφία (100, 101).

Οι βλάβες της λευκής ουσίας είναι δυνατόν να χωριστούν σε ενεργές και μη ενεργές. Οι ενεργές βλάβες χαρακτηρίζονται από έντονη άθροιση μακροφάγων, τα οποία περιέχουν θραύσματα μυελίνης. Περιαγγειακά και ενδοπαρεγχυματικά παρατηρούνται φλεγμονώδη διηθήματα που αποτελούνται, εκτός των μακροφάγων, από CD8 και CD4 T λεμφοκύτταρα, B λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα. Σε αυτές τις βλάβες παρατηρείται και διάσπαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, γεγονός που αναδεικνύεται στη μαγνητική τομογραφία με πρόσληψη του γαδολινίου (102-104). Έχουν διακριθεί τρία διαφορετικά πρότυπα των ενεργών βλαβών. Το πρότυπο I χαρακτηρίζεται από περιαγγειακές βλάβες με ενεργό απομυελίνωση. Οι πλάκες παρουσιάζουν τόσο απώλεια της μυελίνης, όσο έλλειψη εναπόθεσης ανοσοσφαιρινών και ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Τα υπόβαθρο είναι η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων. Το πρότυπο II χαρακτηρίζεται από ενεργό απομυελίνωση με καταστροφή της μυελίνης αλλά με συνοδό εναπόθεση ανοσοσφαιρινών και συμπληρώματος. Παρατηρείται φαγοκυττάρωση των θραυσμάτων μυελίνης από τα μακροφάγα και καταστροφή των ολιγοδενδροκυττάρων. Το πρότυπο III χαρακτηρίζεται από ενεργό απομυελίνωση με απόπτωση ολιγοδενδροκυττάρων και καταστροφή της μυελίνης. Δεν έχει παρατηρηθεί εναπόθεση ανοσοσφαιρινών και συμπληρώματος. Το κέντρο της βλάβης είναι ανενεργό και κενό από ολιγοδενδροκύτταρα (102, 105, 106). Στον αντίποδα αυτών οι χρόνιας βλάβες παρουσιάζουν έντονη

απομυελίνωση με φυγόκεντρη κατανομή των γεμάτων μυελίνη μακροφάγων και ενεργοποίηση της μικρογλοίας. Το κέντρο της βλάβης παρουσιάζει μικρό αριθμό κυττάρων, απώλεια των αξόνων και των ολιγοδενδροκυττάρων και αστρογλοίωση. Τα φλεγμονώδη διηθήματα είναι πολύ περιορισμένα (102, 105, 107).

7. Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ ΚΑΙ ΟΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΗΣ.

Η κλινική εικόνα της πολλαπλής σκλήρυνσης είναι εξαιρετικά ετερογενής και διαφέρει από ασθενή σε ασθενή. Η ετερογένεια αυτή οφείλεται στην μεγάλη ποικιλία στην εντόπιση των βλαβών που προκαλούνται από τη νόσο σε όλη την έκταση του ΚΝΣ. Η έναρξη της νόσου δεν είναι σταθερή ως προς την συμπτωματολογία της, αλλά ο ασθενής στην πορεία του χρόνου μπορεί να εμφανίσει οποιοδήποτε σύμπτωμα και την συνεπαγόμενη αναπηρία που μπορεί να αφήσει η προσβολή του ΚΝΣ. Παρόλα αυτά είναι δυνατόν τα συμπτώματα της νόσου να ομαδοποιηθούν και να χωριστούν σε συχνά ή τυπικά και σπανιότερα ή άτυπα. Μία πρώτη κατηγοριοποίηση μπορεί να γίνει με βάση τα λειτουργικά συστήματα τα οποία προσβάλλονται δηλαδή αισθητικά, κινητικά, παρεγκεφαλιδικά και ορθοκυστικά συμπτώματα καθώς και διαταραχές από τον φλοιό (108).

Παρακάτω θα γίνει μια προσπάθεια ομαδοποίησης των συμπτωμάτων και παρουσίασης της κλινικής εικόνας.

- 1) **Οπτική νευρίτιδα.** Η οπτική νευρίτιδα είναι ένα μάλλον συχνό σύμπτωμα, τόσο στην έναρξη, όσο και αργότερα στην πορεία της νόσου, με ποσοστό εμφάνισης 20% στην έναρξη και περίπου 50% αργότερα(108). Η κλινική εικόνα της οπτικής νευρίτιδας συνίσταται σε διαταραχή στην οπτική οξύτητα, η οποία μπορεί να εξελιχθεί μέχρι πλήρους αμαύρωσης, διαταραχή στην αντίληψη των χρωμάτων, ιδίως του κόκκινου και του πράσινου καθώς και άλγος που εντοπίζεται οπισθοβολβικά και εντείνεται κατά τις κινήσεις του οφθαλμού. Η εγκατάσταση της παραπάνω εικόνας εμφανίζεται συνήθως αιφνίδια, συνηθέστερα μονόπλευρα και η αποκατάσταση μπορεί να χρειαστεί από 2 έως 6 μήνες. Η αποκατάσταση συνήθως είναι πλήρης, αν και μπορεί να απομείνει υπόλειμμα.
- 2) **Εγκάρσια μυελίτιδα.** Η εγκάρσια μυελίτιδα αποτελεί συχνό φαινόμενο στην πολλαπλή σκλήρυνση, η οποία χαρακτηρίζεται συνήθως από υποξείας έναρξης κινητικές ή/και αισθητικές διαταραχές των άνω ή των κάτω άκρων ή και των τεσσάρων άκρων, αναλόγως της εντόπισης της βλάβης κατά μήκος του νωτιαίου μυελού. Χαρακτηριστική είναι εύρεση κατά την κλινική εξέταση επιπέδου υπαισθησίας το οποίο αντιστοιχεί περίπου στο ύψος του μυελοτομίου που εντοπίζεται η βλάβη. Σημαντικό είναι να ειπωθεί ότι η μυελίτιδα που εμφανίζεται στην πολλαπλή

σκλήρυνση δεν καταλαμβάνει όλο το εγκάρσιο εύρος του μυελού και κυρίως την κεντρική περιοχή του, αλλά εντοπίζεται στην λευκή ουσία αποκλειστικά (109).

- 3) **Διαταραχές από το εγκεφαλικό στέλεχος και κρανιακά νεύρα.** Η προσβολή του εγκεφαλικού στελέχους είναι αρκετά συχνή στην πολλαπλή σκλήρυνση και συνήθως εκφράζεται με διαταραχές από τα κρανιακά νεύρα. Συνήθεις διαταραχές είναι η διπλωπία, η διαπυρηνική οφθαλμοπληγία, ο νυσταγμός, η νευραλγία του τριδύμου, η πάρεση του προσωπικού νεύρου, η δυσαρθρία, η δυσκαταποσία και ο ίλιγγος. Παράλληλα διαταραχές της κινητικότητας και αισθητικότητας του κορμού και των άκρων μπορούν εμφανιστούν από προσβολή των κατιόντων και ανιόντων δεματίων αντίστοιχα. Τέλος δεν είναι ασυνήθης η εμφάνιση αταξίας από προσβολή των συνδέσεων της παρεγκεφαλίδας με το στέλεχος (108).
- 4) **Κινητικές διαταραχές.** Η εμφάνιση κινητικών διαταραχών στην πολλαπλή σκλήρυνση είναι εξαιρετικά συνήθης (110). Η προσβολή του κεντρικού κινητικού νευρώνα κατά μήκος της φλοιονωτιαίας οδού μπορεί να παρουσιαστεί σαν πάρεση ενός ή περισσότερων άκρων, δυσχέρεια στη βάδιση με συνοδό κόπωση, η οποία μπορεί να εξελιχθεί σε πληγία και μόνιμη αναπηρία του ασθενούς, καθώς και ανάδυση παθολογικών αντανακλαστικών, όπως ζωνρά τενόντια εκτατικά πέλματα και κλόνος, και εμφάνιση σπαστικότητας (108).
- 5) **Αισθητικές διαταραχές.** Αντίστοιχα προς τις κινητικές διαταραχές μπορούν να εμφανιστούν και αισθητικές διαταραχές, οι οποίες περιλαμβάνουν διαταραχές τόσο της επιπολής όσο και της εν τω βάθει αισθητικότητας και η κατανομή τους εξαρτάται από την εντόπιση της βλάβης (108).
- 6) **Διαταραχές από την παρεγκεφαλίδα και διαταραχές της ισορροπίας.** Η προσβολή της παρεγκεφαλίδας είναι επίσης συχνή στην πολλαπλή σκλήρυνση και εμφανίζεται με την μορφή της αταξίας, τόσο των άκρων όσο και του κορμού καθώς και την εμφάνιση της χαρακτηριστικής παρεγκεφαλιδικής ομιλίας. Παράλληλα διαταραχές στην ισορροπία, εκτός της προσβολής της παρεγκεφαλίδας, παρουσιάζει και η προσβολή της εν τω βάθει αισθητικότητας με την μορφή της αισθητικής αταξίας (108).
- 7) **Διαταραχές ανώτερων νοητικών λειτουργιών και του συναισθήματος.** Η εμφάνιση διαταραχών από τις ανώτερες λειτουργίες του φλοιού εμφανίζονται στην πορεία της νόσου και αφορά το 40-70% των ασθενών. Η διαταραχές αφορούν την μνήμη, την ευφράδεια, και την λεκτική και οπτική αντίληψη (111). Παράλληλα

διαταραχές εμφανίζονται και από το συναίσθημα με την μορφή τόσο της κατάθλιψης, όσο και της ευφορίας (108).

- 8) **Ορθοκυστικές και σεξουαλικές διαταραχές.** Η εμφάνιση των διαταραχών αυτών είναι ιδιαίτερα κοινή και παρουσιάζεται με την μορφή της νευρογενούς κύστης, της δυσκοιλιότητας, της στυτικής δυσλειτουργίας και της απώλειας της λίμπιντο (112-115).
- 9) **Κόπωση.** Η κόπωση είναι ένα σύμπτωμα που εμφανίζεται συχνότατα στην σκλήρυνση. Αφορά το 83% των ασθενών και μπορεί να αποτελεί και το πρώτο σύμπτωμα της νόσου, ιδίως στην προϊούσα μορφή (115). Η κόπωση παρουσιάζεται από τους ασθενείς σαν γενική έλλειψη ενεργητικότητας και συνήθως η ένταση της αυξάνει με την επιδείνωση της νόσου.

Η νόσος παρουσιάζεται με τέσσερις διακριτές μορφές, οι οποίες θα αναφερθούν συνοπτικά παρακάτω. Δύο μορφές, οι οποίες είναι αμφιλεγόμενες ως προς το αν αποτελούν ξεχωριστή μορφή της νόσου ή πρόδρομη μορφή της είναι το ακτινολογικά μεμονωμένο σύνδρομο και το κλινικά μεμονωμένο σύνδρομο.

7.1. ΤΟ ΑΚΤΙΝΟΛΟΓΙΚΑ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ (RADIOLOGICAL ISOLATED SYNDROME-RIS)

Η κλινική οντότητα αυτή εισήχθη στην καθημερινή κλινική πράξη μετά την έναρξη της ευρείας χρήσης της μαγνητικής τομογραφίας. Το ακτινολογικά μεμονωμένο σύνδρομο συνίσταται σε τυχαία ανεύρεση βλαβών συμβατών με απομυελίνωση σε μαγνητική τομογραφία, η οποία όμως διενεργήθηκε για συμπτωματολογία η οποία δεν συνδέεται με αυτές. Οι βλάβες αυτές δεν εκφράστηκαν ποτέ κλινικά με κάποια συμπτωματολογία. Είναι πλέον γνωστό ότι το 1/3 των ασθενών που παρουσιάζουν ακτινολογικά μεμονωμένο σύνδρομο θα αναπτύξουν κλινική συμπτωματολογία σε χρονικό διάστημα πέντε ετών (116, 117).

7.2. ΤΟ ΚΛΙΝΙΚΑ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ (CLINICAL ISOLATED SYNDROME)

Το κλινικά μεμονωμένο σύνδρομο είναι η πρώτη κλινική εκδήλωση των απομυελινωτικών βλαβών, η οποία μπορεί να εκδηλωθεί ως οπτική νευρίτιδα, ως μυελίτιδα ή

ως στελεχειαία συνδρομή. Η κλινική σημασία του CIS έγκειται στο ότι η πιθανότητα να αναπτύξει βεβαία πολλαπλή σκλήρυνση ο ασθενής είναι αρκετά μεγαλύτερη και διπλασιάζεται με την ανεύρεση ολιγοκλωνικών ζωνών IgG στο ENY (118).

7.3. Η ΔΙΑΛΕΙΠΟΥΣΑ ΥΠΟΤΡΟΠΙΑΖΟΥΣΑ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ (RELAPSING REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS)

Η διαλείπουσα υποτροπιάζουσα πολλαπλή σκλήρυνση αφορά το 80-90% των ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση. Χαρακτηριστικό της είναι η εμφάνιση αυτοπεριοριζόμενων επεισοδίων νευρολογικής σημειολογίας. Τα επεισόδια αυτά ακολουθούνται από περιόδους ύφεσης.

7.4. Η ΔΕΥΤΡΟΠΑΘΩΣ ΠΡΟΪΟΥΣΑ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ (SECONDARY PROGRESSIVE MULTIPLE SCLEROSIS)

Η δευτεροπαθώς προϊούσα μορφή της νόσου, ακολουθεί την διαλείπουσα υποτροπιάζουσα μορφή σε μεγάλο ποσοστό των ασθενών. Χαρακτηρίζεται αφ' ενός από ελάττωση της συχνότητας των υποτροπών, αφ' ετέρου από προοδευτική επιδείνωση της κλινικής εικόνας του ασθενούς. Ο μέσος χρόνος μετάπτωσης από την διαλείπουσα υποτροπιάζουσα μορφή στην δευτεροπαθώς προϊούσα μορφή είναι γύρω στα 10-15 χρόνια από την διάγνωση της νόσου (1, 119, 120). Η μετάπτωση αυτή δεν γίνεται απότομα αλλά σταδιακά.

7.5. Η ΠΡΩΤΟΠΑΘΩΣ ΠΡΟΪΟΥΣΑ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ (PRIMARY PROGRESSIVE MULTIPLE SCLEROSIS)

Η πρωτοπαθώς προϊούσα μορφή της νόσου αφορά το 10-20% των ασθενών. Χαρακτηρίζεται από έλλειψη υποτροπών και προοδευτική επιδείνωση της κλινικής εικόνας του ασθενούς (1, 121, 122). Η διάγνωση της μορφής αυτής στηρίζεται στα κάτωθι κριτήρια (123):

- Διασπορά των απομυελινωτικών βλαβών στο χώρο σε μαγνητική τομογραφία
- Τουλάχιστον δύο απομυελινωτικές βλάβες στο νωτιαίο μυελό
- Παρουσία ολιγοκλωνικών ζωνών IgG στο ENY.

7.6. Η ΠΡΟΪΟΥΣΑ ΥΠΟΤΡΟΠΙΑΖΟΥΣΑ ΜΟΡΦΗ (PROGRESSIVE RELAPSING MULTIPLE SCLEROSIS)

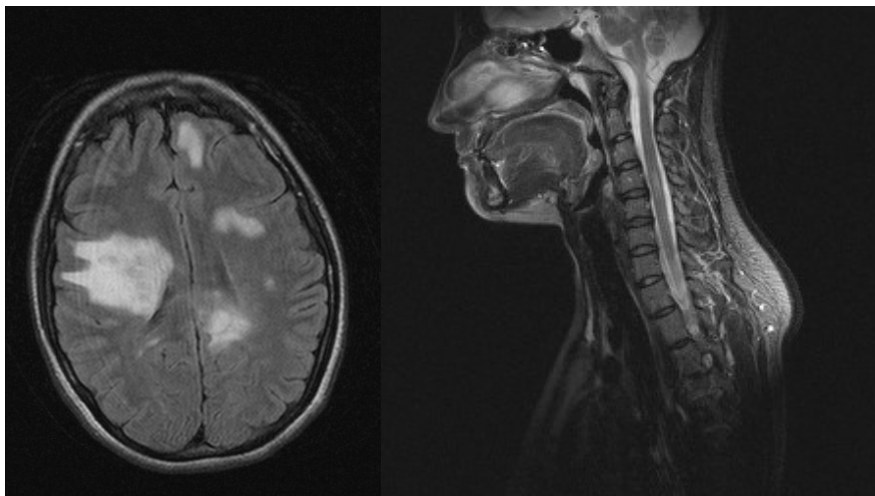
Η προϊούσα υποτροπιάζουσα μορφή της νόσου αποτελεί ένα υβρίδιο μεταξύ της διαλείπουσας υποτροπιάζουσας και της προϊούσας μορφής. Χαρακτηρίζεται από προοδευτική επιδείνωση, αλλά περιστασιακά εμφανίζονται και υποτροπές (121).

8. Η ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ

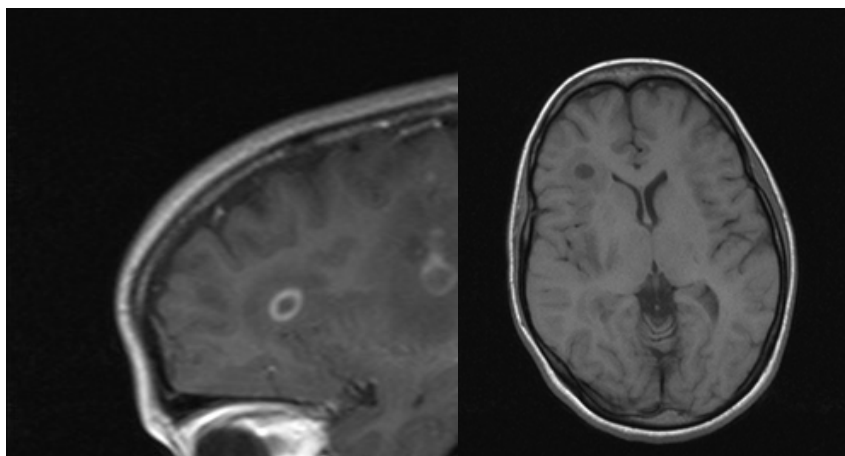
Η διάγνωση της πολλαπλής σκλήρυνσης, λόγω της ετερογένειας της νόσου, βασίζεται στο συνδυασμό κλινικής εξέτασης και εργαστηριακών εξετάσεων. Επιπλέον έχουν θεσπιστεί διαγνωστικά κριτήρια με σκοπό, την όσο είναι δυνατόν, πρωϊμότερη διάγνωση της νόσου. Αρχικά θα γίνει αναφορά στις εργαστηριακές εξετάσεις που συνεισφέρουν στη διάγνωση της πολλαπλής σκλήρυνσης (124).

8.1. Η ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ

Η μαγνητική τομογραφία αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο στην διάγνωση της πολλαπλής σκλήρυνσης. Από την εισαγωγή της στην κλινική πράξη έγινε δυνατή η πρωϊμότερη και ακριβέστερη διάγνωση της νόσου. Η μαγνητική τομογραφία αποτελεί την πιο ευαίσθητη εξέταση ανάδειξης απομυελινωτικών βλαβών. Χρησιμοποιείται τόσο στη διάγνωση της νόσου, όσο και στην παρακολούθηση της εξέλιξης της. Οι βλάβες απεικονίζονται με υψηλής έντασης σήμα σε T2 ακολουθίες, σε ακολουθίες πρωτονίων και FLAIR ακολουθίες. Αντίθετα στις T1 ακολουθίες οι βλάβες είναι μη ορατές ή μπορεί να απεικονίζονται με χαμηλό σήμα. Οι βλάβες με χαμηλό σήμα στις T1 ακολουθίες ονομάζονται μαύρες τρύπες και παριστούν βλάβες με αξονική εκφύλιση. Το μέγεθος τους είναι συνήθως 3-8χιλ, αλλά δεν αποκλείονται και μεγαλύτερες. Η θέση των βλαβών είναι υποφλοιώδης, περικολιακή, υποσκηνιδιακές, στο νωτιαίο μυελό και το στέλεχος. Ο προσανατολισμός τους είναι κάθετος προς το επένδυμα και συχνή είναι εντόπιση και στο μεσολόβιο. Οι βλάβες μπορεί να προσλαμβάνουν το γαδολίνιο ή όχι. Οι βλάβες που προσλαμβάνουν το γαδολίνιο παριστούν βλάβες με ενεργό φλεγμονή και διάσπαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (125).



Εικόνα 1. T2 εικόνα βλαβών ΠΣ



Εικόνα 2. Εικόνα σκιαγραφικής ενίσχυσης ενεργών βλαβών, και εικόνα μαύρης τρύπας

8.2. ΤΟ ΕΝΥ ΣΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ

Η ΟΝΠ είναι βασική εξέταση στην πολλαπλή σκλήρυνση, που θα δώσει κατευθύνσεις στη διαφορική διάγνωση (123). Από την γενική ανάλυση του ΕΝΥ ενδιαφέρον έχει ο αριθμός των λευκοκυττάρων. Περισσότερα από 50 κύτταρα ανά οπτικό πεδίο απομακρύνουν την διάγνωση της πολλαπλής σκλήρυνσης (126). Το σάκχαρο του ΕΝΥ είναι σε φυσιολογικά όρια, όπως και το ολικό λεύκωμα. Εκτός της γενικής ανάλυσης του ΕΝΥ σημαντική είναι η αναζήτηση των ολιγοκλωνικών ζωνών IgG. Η παρουσία των ολιγοκλωνικών ζωνών στο ΕΝΥ, με συνοδό απουσία στον ορό, υποδηλώνει παρουσία

φλεγμονής εντός του ΚΝΣ και έχει αυξημένη ειδικότητα για πολλαπλή σκλήρυνση. Αντίθετα το αυξημένο IgG index στο ENY δεν παρουσιάζει μεγάλη ειδικότητα για την πολλαπλή σκλήρυνση (126-128). Μελέτες έδειξαν ότι περισσότεροι από το 95% των ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση παρουσιάζουν ολιγοκλωνικές ζώνες IgG στο ENY.

8.3. ΤΑ ΠΡΟΚΛΗΤΑ ΔΥΝΑΜΙΚΑ

Τα προκλητά δυναμικά έχουν εφαρμογή στην πολλαπλή σκλήρυνση και μπορούν να βοηθήσουν στη διάγνωση της νόσου. Με τα προκλητά δυναμικά δύνεται η δυνατότητα αποκάλυψης βλάβης στις προσαγωγές και απαγωγές οδούς του ΚΝΣ, που κλινικά φαίνονται ανέπαφες. Τα προκλητά δυναμικά που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι τα οπτικά. Μετά από ερεθισμό των οφθαλμών με σκακιέρα τετραγώνων καταγράφεται το έπαρμα P100. Παράταση του P100 πάνω από 2,5-3 τυπικές αποκλίσεις είναι συμβατή με απομυελινωτική βλάβη της οδού.

Άλλα προκλητά δυναμικά που χρησιμοποιούνται σπανιότερα είναι τα σωματοαισθητικά, τα ακουστικά και τα κινητικά προκλητά δυναμικά. Τα προκλητά δυναμικά αυτά μετά την εισαγωγή της μαγνητικής τομογραφίας στην κλινική πράξη, έχασαν την σπουδαιότητα που είχαν παλαιότερα (108).

8.3.1. Η οπτική τομογραφία συνοχής του αμφιβληστροειδούς (OCT)

Η OCT χρησιμοποιείται στην διάγνωση της πολλαπλής σκλήρυνσης αναδεικνύοντας λέπτυνση της στιβάδας των ινών του οπτικού νεύρου, κατάσταση συνήθης στην πολλαπλή σκλήρυνση (129). Η λέπτυνση των ινών είναι παρούσα από την έναρξη της νόσου, αλλά είναι εντονότερη σε προχωρημένα στάδια της νόσου (129).

8.3.2. Τα διαγνωστικά κριτήρια της πολλαπλής σκλήρυνσης

Η ανάγκη θέσπισης κριτηρίων ήταν μεγάλη, λόγω της ετερογένειας της νόσου και της ανάγκης πρώιμης διάγνωσης, που είναι καθοριστική για την μετέπειτα εξέλιξη της νόσου. Η χρήση διαγνωστικών κριτηρίων στη διάγνωση της πολλαπλής σκλήρυνσης ξεκίνησε το 1965 από τον Schumacher, ο οποίος όρισε την διασπορά στον χρόνο και τον χώρο και την έννοια της υποτροπής. Ακολούθησε ο Poser το 1983, ο οποίος στα κριτήρια του περιέλαβε εκτός των κλινικών απαιτήσεων και εργαστηριακές παραμέτρους. Η εξέλιξη όμως των διαγνωστικών και θεραπευτικών χειρισμών στην πολλαπλή σκλήρυνση απαίτησε κριτήρια τα οποία θα μπορούσαν να δώσουν προωμότερη διάγνωση, να είναι εύχρηστα από τον ιατρό και

να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κοινή γλώσσα από τους ιατρούς. Το 2001 παρουσιάστηκαν τα κριτήρια McDonald τα οποία κατέστησαν δυνατή την πρόιμη διάγνωση της πολλαπλής σκλήρυνσης με 83% ειδικότητα και 83% ευαισθησία (124, 130). Τα κριτήρια αυτά αναθεωρήθηκαν το 2005 για πρώτη φορά και ακολούθως το 2010 και το 2017. Η τελευταία αναθεώρηση του 2017 είναι σε χρήση τώρα.

Πριν την παράθεση των κριτηρίων σημαντικός είναι ο ορισμός της της διασποράς στον χρόνο και στον χώρο. Διασπορά στον χρόνο εννοείται η παρουσία ταυτόχρονα βλαβών που προσλαμβάνουν γαδολίνιο και βλαβών που δεν προσλαμβάνουν ή η εμφάνιση νέων βλαβών σε διαδοχικές μαγνητικές τομογραφίες. Αντίστοιχα διασπορά στο χώρο είναι η παρουσία δύο τουλάχιστον βλαβών με υψηλό σήμα σε T2 ακολουθίες σε μία από τις ακόλουθες θέσεις: περικοιλιακά, υποφλοιωδώς, υποσκληνίδια και νωτιαίος μυελός.

Κλινικά επεισόδια	Αριθμός απομυελινωτικών βλαβών	Πρόσθετα στοιχεία για την διάγνωση ΠΣ
2 ή περισσότερα κλινικά επεισόδια	2 ή περισσότερες βλάβες	Κανένα
2 ή περισσότερα κλινικά επεισόδια	1 (με σαφώς αποδεδειγμένο από το ιστορικό επεισόδιο που σχετιζόταν με συγκεκριμένη βλάβη τοπογραφικά)	Κανένα
2 ή περισσότερα κλινικά επεισόδια	1	Διασπορά στο χώρο υποδεικνυόμενη ή από επιπρόσθετο κλινικό επεισόδιο εμπλέκοντας διαφορετική περιοχή του ΚΝΣ ή από την MRI
1 κλινικό επεισόδιο	2 ή περισσότερες βλάβες	Διασπορά στον χρόνο υποδεικνυόμενη από επιπρόσθετο κλινικό επεισόδιο ή από την MRI ή ανάδειξη ολιγοκλωνικών ζωνών IgG στο ENY
1 κλινικό επεισόδιο	1	Διασπορά στο χώρο υποδεικνυόμενη ή από επιπρόσθετο κλινικό επεισόδιο εμπλέκοντας διαφορετική περιοχή του ΚΝΣ ή από την MRI και διασπορά στον χρόνο υποδεικνυόμενη από επιπρόσθετο κλινικό επεισόδιο ή από την MRI ή ανάδειξη ολιγοκλωνικών ζωνών IgG στο ENY

Πίνακας 1. Κριτήρια McDonald 2017

8.4. Η ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ

Για να τεθεί με βεβαιότητα η διάγνωση της πολλαπλής σκλήρυνσης είναι σημαντικό να αποκλειστούν άλλες νόσοι που μιμούνται την πολλαπλή σκλήρυνση περισσότερο ακτινολογικά παρά κλινικά (131). Στη διαφορική διάγνωση θα συμβάλει το ιστορικό και εργαστηριακές εξετάσεις καθώς και τυχόν συνοσηρότητα με άλλες νόσους. Η διαφορική διάγνωση κινείται μεταξύ των κάτωθι νόσων.

8.4.1. Οξεία διάσπαρτη εγκεφαλομυελίτιδα (ADEM) και μεταλοιμώδεις εγκεφαλομυελίτιδες

Η ADEM είναι μία φλεγμονώδης απομυελινωτική νόσος του ΚΝΣ. Είναι συχνότερη στα παιδιά και χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και συμπτωματολογία από διάφορα λειτουργικά συστήματα (132). Συνήθως είναι μονοφασική και ακολουθεί μετά από λοίμωξη ή εμπύρετη λοίμωξη στο 50-75% των περιπτώσεων (132). Χαρακτηρίζεται από εγκεφαλοπάθεια και πυρετό και σχετίζεται με πολυεστιακές βλάβες της λευκής ουσίας του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Στις περιοχές των βλαβών περιλαμβάνονται και τα βασικά γάγγλια και ο θάλαμος (133, 134). Χαρακτηριστικό της νόσου είναι η εικόνα του ENY με πλειοκυττάρωση (>50κύτταρα).

8.4.2. Οπτική νευρομυελίτιδα ή νόσος Devic

Η οπτική νευρομυελίτιδα παλαιότερα θεωρούνταν μία πιο επιθετική μορφή της πολλαπλής σκλήρυνσης. Πλέον είναι γνωστό ότι αποτελεί διακριτή νόσο με ιδιαίτερη παθοφυσιολογία (135, 136). Χαρακτηριστικό της νόσου είναι τα αντισώματα έναντι της ακουαπορίνης 4, τα οποία έχουν 99% ειδικότητα για την διάγνωση της νόσου (135, 137, 138). Κλινικά η νόσος χαρακτηρίζεται από απομυελινωτικές βλάβες του νωτιαίου μυελού και του στελέχους και από οπτικές νευρίτιδες (139, 140). Απομυελινωτικές βλάβες μπορούν να υπάρχουν και στον εγκέφαλο, όμως δεν πληρούν τα κριτήρια υπέρ πολλαπλής σκλήρυνσης (141). Επιπλέον τα αντισώματα έναντι της ακουαπορίνης μπορούν να απουσιάζουν από τον ορό των ασθενών. Για την διάγνωση της οπτικής νευρομυελίτιδας πρέπει να πληρούνται τα εξής: συνδυασμός οπτικής νευρίτιδας και μυελίτιδας και 2 από τα κάτωθι

1. θετικά αντισώματα έναντι ακουαπορίνης 4

2. μυελίτιδα που καταλαμβάνει 3 ή περισσότερα μυελοτόμια όλο το πλάτος του μυελού
3. βλάβες στον εγκέφαλο μη ειδικές για πολλαπλή σκλήρυνση (142).

Στην οπτική νευρομυελίτιδα απουσιάζει η προοδευτική επιδείνωση και η αναπηρία λόγω της νόσου προκαλείται από τις υποτροπές (143, 144).

8.4.3. Μικροϊσχαιμική λευκοεγκεφαλοπάθεια και αγγειακά επεισόδια

Η μικροϊσχαιμική λευκοεγκεφαλοπάθεια είναι πολύ συχνή κατάσταση στον γηραιότερο πληθυσμό και συχνά τίθεται το διαγνωστικό δίλλημα μεταξύ αυτής και της πολλαπλής σκλήρυνσης. Η χαρακτηριστική διαφορά των ισχαιμικών βλαβών είναι ότι εντοπίζονται υποφλοιωδώς και περικοιλιακά μόνο. Το μέγεθος τους είναι μικρότερο έχουν σχετική συμμετρία και διασταυρώνονται σε αντίθεση με τις τυπικές βλάβες της πολλαπλής σκλήρυνσης (108).

8.4.4. Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο

Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο είναι αυτοάνοση διαταραχή που προκαλεί θρομβώσεις αρτηριών και φλεβών. Χαρακτηριστικό του συνδρόμου είναι τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα (145). Η κλινική εικόνα του συνδρόμου σχετίζεται με παροδικά ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια τα οποία μπορεί να εξελιχθούν σε μόνιμα ισχαιμικά επεισόδια. Οι βλάβες που προκαλεί το σύνδρομο μοιάζουν πολύ με αυτές τις μικροϊσχαιμικής λευκοεγκεφαλοπάθειας (146). Στην διάγνωση θα βοηθήσει η απουσία ολιγοκλωνικών ζωνών IgG στο ENY και η παρουσία στον ορό αντισωμάτων έναντι καρδιολιπίνης και β_2 gpi καθώς και αντιπηκτικού του λύκου. Επιπλέον το ιστορικό θα βοηθήσει ιδιαίτερα στις γυναίκες αποκαλύπτοντας αυτόματες εκτρώσεις στο πρώτο τρίμηνο της κύησης.

8.4.5. Συστηματικός ερυθματώδης λύκος

Ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος είναι μία αυτοάνοση πολυσυστηματική νόσος (147). Εκτός των άλλων συστημάτων, συχνά επηρεάζει και το ΚΝΣ, προκαλώντας μία πλειάδα συμπτωμάτων. Η εκδήλωση του ΣΕΛ που μπορεί να οδηγήσει σε διαγνωστικό πρόβλημα και εμπλέκεται στην διαφορική διάγνωση της πολλαπλής σκλήρυνσης είναι το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο. Το σύνδρομο αυτό προκαλεί εικόνα στην μαγνητική παρόμοια με την σκλήρυνση και συχνά οδηγεί σε σύγχυση και λάθος διάγνωση της

πολλαπλής σκλήρυνσης σε ασθενείς με ΣΕΛ. είναι αποδεδειγμένο ότι μυελίτιδες σε ασθενείς με ΣΕΛ οφείλονται συχνότερα σε συνύπαρξη αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου ή οπτικής νευρομυελίτιδας (148).

8.4.6. Σύνδρομο Sjogren

Το σύνδρομο Sjogren είναι φλεγμονώδης νόσος που χαρακτηρίζεται από λεμφοκυτταρική διήθηση των σιαλογόνων και δακρυϊκών αδένων, ξηροφθαλμία και ξηροστομία. Χαρακτηριστικά της νόσου είναι τα αντισώματα έναντι SSA και SSB (149). Τα αντισώματα έναντι SSA είναι παρόντα στο 15% των ασθενών με εκτεταμένη μυελίτιδα, που πιθανόν πάσχουν από οπτική νευρομυελίτιδα (150).

8.4.7. Νόσος Αδαμαντιάδη-Bechet

Η νόσος αυτή είναι αυτοάνοση διαταραχή με κλινικές εκδηλώσεις τα έλκη στα γεννητικά όργανα και το στόμα, αγγειίτιδα του αμφιβληστροειδούς, δερματικές εκδηλώσεις, αρθρίτιδα και προσβολή του ΚΝΣ (151). Η διάγνωση στηρίζεται σε διαγνωστικά κριτήρια και σημαντική συσχέτιση με την νόσο έχει το HLA B51 (152). Οι εκδηλώσεις από το ΚΝΣ μπορούν να μοιάζουν με αυτές της πολλαπλής σκλήρυνσης, αλλά δεν πληρούν τα κριτήρια της.

8.4.8. Σαρκοείδωση

Η σαρκοείδωση είναι κοκκιωματώδης νόσος άγνωστης αιτιολογίας. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία μη νεκρωτικών κοκκιωμάτων, διόγκωση των λεμφαδένων, συχνή προσβολή των πνευμόνων και εκδηλώσεις από όλα τα συστήματα. Συνήθως στα 2/3 των ασθενών με νευροσαρκοείδωση συνυπάρχει και εκδήλωση της νόσου εκτός του ΚΝΣ. Μόνο στο 1/3 των ασθενών με νευροσαρκοείδωση η νόσος περιορίζεται μόνο στο νευρικό σύστημα (153, 154). Το πρόβλημα με την σαρκοείδωση είναι ότι μπορεί να προκαλέσει οποιαδήποτε κλινική εικόνα από το ΚΝΣ και να θέσει μεγάλο διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα (155, 156). Στην περίπτωση που η σαρκοείδωση έχει υψηλές πιθανότητες διάγνωσης βοηθητική είναι η αξονική τομογραφία θώρακος, για ανάδειξη διογκωμένων λεμφαδένων ή/και πνευμονικής προσβολής και η μέτρηση του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγιοτενσίνης στον ορό, ενώ η τελική διάγνωση τίθεται με βιοψία προσβεβλημένου ιστού (157, 158).

8.4.9. Λέμφωμα του ΚΝΣ

Το λέμφωμα του ΚΝΣ είναι δυνατόν να μιμηθεί απεικονιστικά την πολλαπλή σκλήρυνση αλλά έχει τελείως διαφορετικούς χαρακτήρες και εξέλιξη. Αποτελεί γενικότερα σπάνια κατάσταση και η διάγνωση τίθεται με κυτταρολογική εξέταση του ENY, PET/CT scan και βιοψία (159).

8.4.10. Σύνδρομο Susac

Αποτελεί σπάνιο σύνδρομο το οποίο χαρακτηρίζεται από διαταραχή του ενδοθηλίου των μικρών αγγείων. Κλινικά παρουσιάζεται με κεφαλαλγία, εγκεφαλοπάθεια, διαταραχές όρασης και ακοής (160). Απεικονιστικά χαρακτηρίζεται από υψηλής έντασης σε T2 ακολουθίες βλάβες, οι οποίες εντοπίζονται και στο μεσολόβιο. Βοηθητική στην διάγνωση είναι και η φλουροαγγειογραφία (161).

8.4.11. Αγγειίτιδα του ΚΝΣ

Η αγγειίτιδα του ΚΝΣ μπορεί να αποτελεί εκδήλωση συστηματικού νοσήματος ή να είναι πρωτοπαθής. Μιμείται απεικονιστικά την πολλαπλή σκλήρυνση αλλά αφορά συχνότερα άνδρες και κλινικά η εικόνα περιλαμβάνει κεφαλαλγία, γνωσιακές διαταραχές και σπασμούς. Επιπλέον είναι δυνατόν και η ανεύρεση αιμορραγικών βλαβών στην νευροαπεικόνιση. Η διάγνωση τίθεται με βιοψία μήνιγγας ή εγκεφάλου (162).

8.4.12. CADASIL

Το σύνδρομο αυτό είναι γενετικό και κληρονομείται με τον αυτοσωματικό επικρατικό τύπο κληρονομικότητας. Χαρακτηρίζεται από ημικρανίες και ισχαιμικές/αιμορραγικές βλάβες του εγκεφάλου, ιδίως των κροταφικών λοβών, ενώ συνοδεύεται και από ψυχιατρικά συμπτώματα (163-165).

8.4.13. Νόσος Lyme

Πρόκειται για λοίμωξη από την *Borrelia burgdorferi* και μεταδίδεται με το τσίμπημα κρότωνα (166). Η νόσος αρχίζει με χαρακτηριστικό δερματικό εξάνθημα. Η προσβολή του ΝΣ αποτελεί εκδήλωση του δεύτερου σταδίου της νόσου και μπορεί να περιλαμβάνει εικόνα λευκοεγκεφαλοπάθεια και προσβολή νεύρων και ριζών (167). Η διάγνωση τίθεται με

αναζήτηση αντισωμάτων έναντι της *Borrelia* τόσο στον ορό όσο και στο ENY, καθώς και με μοριακές μεθόδους (168).

8.4.14. Νευροσύφιλη

Πρόκειται για λοίμωξη από το *Treponema pallidum* και είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενη. Αποτελεί εκδήλωση της τριτογενούς σύφιλης και είναι σπάνια στην σύγχρονη εποχή λόγω της ανάπτυξης των αντιβιοτικών και καλύτερων διαγνωστικών εργαλείων (169). Εκδηλώνεται με μηνιγγίτιδα, προσβολή νεύρων και εικόνα ισχαιμικών εμφράκτων λόγω προσβολής των αγγείων. Στη διάγνωση απαραίτητη είναι η δοκιμασία VDRL.

8.4.15. Λοίμωξη από HTLV

Πρόκειται για ρετροϊκή λοίμωξη, σε ενδημικές περιοχές, που προκαλεί σπαστική παραπάρεση και την T λευχαιμία/λέμφωμα (170). Η κλινική εικόνα εμφανίζεται ύπουλα και με αργό ρυθμό. Χαρακτηρίζεται από αυξημένου T2 σήματος βλάβες του μυελού αλλά και ατροφία του (171).

8.4.16. Ανεπάρκεια B12

Εμφανίζεται με την εικόνα της υποξείας πλαγίας σκλήρυνσης και χαρακτηρίζεται διαταραχές της εν τω βάθει αισθητικότητας, δυσχέρεια βάδισης και αισθητική αταξία. Η κλινική εικόνα είναι προοδευτικά επιδεινούμενη και παρούσα συχνά είναι και μεγαλοβλαστική αναιμία (108).

8.4.17. Μυελίτιδα από ανεπάρκεια χαλκού

Η ανεπάρκεια χαλκού, συνήθως μετά από βαριατρικά χειρουργεία και αυξημένη πρόσληψη ψευδραργύρου, είναι σπάνια κατάσταση πρόκλησης μυελίτιδας, αλλά και οπτικής νευρίτιδας (172).

8.4.18. Απομυελίνωση του ΚΝΣ σε έδαφος χορήγησης αναστολέων του TNFα.

Οι anti-TNFα βιολογικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη για την θεραπεία ποικίλων αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η νόσος του Crohn. Στο παρελθόν μελετήθηκαν σαν πιθανή θεραπεία της πολλαπλής σκλήρυνσης. Το αποτέλεσμα της μελέτης ήταν απογοητευτικό γιατί βρέθηκε ότι επιδεινώνουν την νόσο (173). Μελέτες έχουν δείξει ότι ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με anti-TNFα βιολογικούς

παράγοντες παρουσιάζουν εστίες απομυελίνωσης στο ΚΝΣ με αντίστοιχη συμπτωματολογία της εντόπισης της βλάβης χωρίς ωστόσο να έχει αποδειχθεί ο μηχανισμός πρόκλησης τους (174).

8.4.19. Παρανεοπλασματική εκδήλωση

Συνήθως οι παρανεοπλασματικές εκδηλώσεις από το ΚΝΣ δεν ομοιάζουν με την πολλαπλή σκλήρυνση. Εξαιρέση αποτελεί η παρανεοπλασματική μυελίτιδα. Η ακτινολογική εικόνα αυτής της μυελίτιδας είναι συνήθως χαρακτηριστική με μεγάλη έκταση, εντοπιζόμενη συνήθως στον θωρακικό μυελό. Σημαντικό στη διαφορική διάγνωση είναι η αναζήτηση ειδικών παρανεοπλασματικών αντισωμάτων (175).

Πίνακας 2. Διαφορική διάγνωση της Πολλαπλής σκλήρυνσης

<u>Απομυελινοτικές νόσοι</u>
<i>Οξεία διάσπαρτη εγκεφαλομυελίτιδα</i>
<i>Οπτική νευρομυελίτιδα</i>
<u>Αγγειακές βλάβες</u>
<i>Μικροϊσχαιμική αγγειοπάθεια</i>
<i>Αγγειακό εγκεφαλικό έμφρακτο</i>
<u>Ανοσολογικής αρχής νοσήματα</u>
<i>Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο</i>
<i>Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος</i>
<i>Σύνδρομο Sjögren</i>
<i>Νόσος Αδαμαντιάδη-Behçet</i>
<i>Σαρκοείδωση</i>
<i>Σύνδρομο Susac</i>
<i>Αγγειίτιδα ΚΝΣ</i>
<u>Λοιμώδη νοσήματα</u>
<i>Νόσος Lyme</i>
<i>Λοίμωξη από HTLV</i>
<i>Νευροσύφιλη</i>
<u>Μεταβολικά αίτια</u>
<i>Ανεπάρκεια Β12</i>
<i>Ανεπάρκεια χαλκού</i>
<u>Άλλα αίτια</u>
<i>CADASIL</i>
<i>Λέμφωμα ΚΝΣ</i>
<i>Χορήγηση anti-TNFα</i>
<i>Παρανεοπλασματική εκδήλωση</i>

9. Η ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ

Η θεραπεία της πολλαπλής σκλήρυνσης χωρίζεται σε τρεις επιμέρους κατηγορίες

- Την θεραπεία της οξείας φάσης
- Την προφυλακτική ή νοσοτροποποιητική θεραπεία
- Την συμπτωματική θεραπεία

9.1. Η ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΟΞΕΙΑΣ ΦΑΣΗΣ

Οξεία φάση στην πολλαπλή σκλήρυνση εννοείται η υποτροπή, είτε αυτή είναι κλινικά εκδηλωμένη, είτε ακτινολογικά με εμφάνιση νέων βλαβών. Η οξεία φάση καλείται και υποτροπή, έξαρση ή ώση. Αποτελεί αντικείμενο άγχους για τους ασθενείς με ΠΣ και προκαλεί τους περισσότερους φόβους των ασθενών σχετικά με την έκβαση της νόσου.

Η υποτροπή ορίζεται ως η εγκατάσταση νέας νευρολογικής σημειολογίας, η οποία διαρκεί τουλάχιστον 24 ώρες. Στο παραπάνω απαιτείται απουσία λοίμωξης ή πυρετού. Κλινικά η υποτροπή μπορεί να εμφανιστεί με οποιαδήποτε συμπτωματολογία, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Συνήθως η συμπτωματολογία της υποτροπής διαρκεί ορισμένο χρονικό διάστημα και παρέρχεται πλήρως ή καταλείπει υπόλειμμα (176).

Η παλαιότερη μέθοδος αντιμετώπισης της υποτροπής ήταν η ανάπαυση, η οποία κυριάρχησε ως τρόπος αντιμετώπισης έως την έναρξη της φαρμακοθεραπείας (177).

9.1.1. Τα στεροειδή και η φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη ACTH

Τα στεροειδή διαθέτουν αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτική δράση. Η θέση τους είναι σημαντική στην οξεία φάση της πολλαπλής σκλήρυνσης, καθώς μειώνουν την φλεγμονή εντός του ΚΝΣ, και το οίδημα, αποκαθιστούν τον ραγέντα αιματοεγκεφαλικό φραγμό και μειώνουν ή και εξαφανίζουν τα συμπτώματα των ασθενών. Χαρακτηριστικό της δράσης τους είναι η μείωση της ενδοθηλικής παραγωγής ανοσοσφαιρινών και του αριθμού των Th1 λεμφοκυττάρων. Στο ίδιο μήκος κύματος βρίσκεται και η ACTH, καθώς αποτελεί εκλυτικό παράγοντα των ενδογενών στεροειδών.

Η πρώτη, τεκμηριωμένη από μελέτη, απόδειξη της της επίδρασης της ACTH στην υποτροπή της ΠΣ ανάγεται στο 1961 (178). Στην συγκεκριμένη μελέτη ορίζεται σαφώς η έννοια της υποτροπής και οι ασθενείς χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες. Η μία έλαβε ACTH

και η άλλη φυσιολογικό ορό. Το αποτέλεσμα της μελέτης αναφέρει σημαντική επίδραση της ACTH στην κλινική συμπτωματολογία. Το 1970 νέα μελέτη απέδειξε εκ νέου την ωφέλεια της ACTH στην υποτροπή της ΠΣ, γεγονός που οδήγησε στην υιοθέτηση της ACTH ως θεραπείας ευρύτερα (179).

Στις αρχές της δεκαετίας του 1980, μελέτες υποστήριξαν ότι η χορήγηση στεροειδών υπερτερεί, έναντι της ACTH στην υποτροπή (180-182). Αρχικά μελετήθηκαν δόσεις από 40mg έως 500mg την ημέρα, αλλά φάνηκε ότι μόνο οι υψηλές δόσεις είναι αποτελεσματικές στην υποτροπή (183, 182).

Αν και μειώνουν τον χρόνο της υποτροπής, τα στεροειδή φαίνεται ότι δεν επηρεάζουν την χρονική εξέλιξη της νόσου. Φάνηκε από μελέτες (184), ότι οι υψηλές δόσεις στεροειδών μειώνουν την πιθανότητα επανεμφάνισης οπτικής νευρίτιδας, καθώς και την εξέλιξη μιας οπτικής νευρίτιδας σε πολλαπλή σκλήρυνση.

Το όφελος από τα στεροειδή ίσως είναι μεγαλύτερο σε ασθενείς που λαμβάνουν ιντερφερόνη, αλλά η διακοπτόμενη χορήγηση υψηλών δόσεων οδηγεί σε μείωση της δράσης της ιντερφερόνης (185). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο συνδυασμός στεροειδών και ιντερφερόνης προάγει την απόπτωση των ενεργοποιημένων Τα κυττάρων, αν και έχουν βρεθεί πληθυσμοί κυττάρων ανθεκτικοί.

Είναι σημαντικό η θεραπεία να ξεκινά άμεσα μετά την έναρξη της υποτροπής. Η χορήγηση τους γίνεται ενδοφλεβίως και σε υψηλή δόση. Το συχνότερα χρησιμοποιούμενο στεροειδές είναι η μεθυλοπρεδνιζολόνη σε δόση ενός γραμμαρίου ανά ημέρα για 3 ή 5 ημέρες, ανάλογα την ανταπόκριση του ασθενή (186). Εναλλακτικά, εκτός της μεθυλοπρεδνιζολόνης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί δεξαμεθαζόνη σε δόση 96mg δύο φορές τη μέρα για τρεις ημέρα (183).

9.1.2. Η πλασμαφαίρεση

Η πλασμαφαίρεση έχει θέση στην οξεία φάση της πολλαπλής σκλήρυνσης. Αφορά κυρίως ασθενείς με αιφνίδια και σημαντικά κινητικά ελλείμματα, οι οποίοι δεν ανταποκρίθηκαν ικανοποιητικά στη θεραπεία με στεροειδή (187, 188).

9.2. Η ΠΡΟΦΥΛΑΚΤΙΚΗ Η ΝΟΣΟΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Τα τελευταία 25 χρόνια αναπτύχθηκαν μια σειρά από φάρμακα για την τροποποίηση της πορείας της νόσου. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, αλλά με την πάροδο του χρόνου σχεδιάστηκαν και ανακαλύφθηκαν φάρμακα πιο ειδικά για την πολλαπλή σκλήρυνση. Παρόλα αυτά όμως όλα τα φάρμακα εστιάζουν στην καταστολή της φλεγμονής και επομένως στην πρόληψη νέων υποτροπών και όχι στην νευροεκφύλιση. Αυτός είναι και ο λόγος, που οι θεραπείες μέχρι στιγμής απευθύνονται σε ασθενείς με διαλείπουσα υποτροπιάζουσα μορφή. Η πρόοδος αυτή συνεισέφερε στην βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών, αλλά βοήθησε και την επιστημονική κοινότητα να κατανοήσει περισσότερο την νόσο.

9.2.1. Ιντερφερόνη βήτα

Η αρχική ιδέα για την χορήγηση της ιντερφερόνης, ελήφθη με σκοπό να αντιμετωπιστεί ο ιός της σκλήρυνσης. Είναι γνωστό ότι η ιντερφερόνη διαθέτει αντιϊική δράση (189) μέσω προφλεγμονώδους δράσης, η οποία ωφελεί ασθενείς με ιογενείς λοιμώξεις και καρκίνο (190). Το όφελος της ιντερφερόνης 1β στην πολλαπλή σκλήρυνση έχει να κάνει με την πλειότροπη δράση της. Προκαλεί λεμφοπενία μέσω περιορισμού των κυττάρων στους λεμφαδένες, αυξάνει τα κατασταλτικά κύτταρα φυσικούς φονείς(191), προάγει την διαφοροποίηση ρυθμιστικών T κυττάρων (191) και αλλάζει τη σχέση Th1 προς Th2 κύτταρα (192). Επιπλέον καταστέλλει τα Th17 κύτταρα και την παραγωγή IL17 μέσω της επαγωγής της IL27 και IL10 (193). Παράλληλα μειώνει τα επίπεδα πολλών χημειοκινών και αυξάνει τους υποδοχείς της ιντερφερόνης-γ στα λεμφοκύτταρα (194), και μειώνει την έκκριση IL2, IL17, οστεοποντίνης TNF-α και ιντερφερόνης-γ. Όσον αφορά τα B κύτταρα καταστέλλει την έκφραση CD80 και CD40 (80). Στα δενδριτικά κύτταρα η δράση της ιντερφερόνης είναι επίσης σπουδαία. Αναστρέφει την διαδικασία μετατροπής τους σε πλασματοκυτταροειδή κύτταρα, μειώνει την παραγωγή IL23 από αυτά και τα μακροφάγα και ενισχύει την αναστολή των Th1 κυττάρων από τα δενδριτικά κύτταρα. Παράλληλα προάγει την απόπτωση των μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων, αναστέλλοντας τη φλεγμονώδη δράση τους. Τέλος αναστέλλει την δίοδο των T κυττάρων στο ΚΝΣ διά του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, αναστέλλοντας τα Th1 και επιτρέποντας όμως στα Th2 να εισέλθουν (195).

Η ιντερφερόνη 1β προκαλεί αύξηση της IL10 στο ENY (196), η οποία παράγεται από τα Τ κύτταρα και τα αστροκύτταρα (197). Η αύξηση αυτή γίνεται λόγω μείωσης της παραγωγής της IL10 από τα μονοκύτταρα.

Εκτός από αντιφλεγμονώδη δράση, η ιντερφερόνη έχει και νευροπροστατευτική δράση, ενισχύοντας την έκκριση νευροτροφικών παραγόντων (198, 199). Τέτοιοι παράγοντες είναι η ACTH, ο NGF (200), ο LIF (201), ο IGF-1 (202) και ο BDNF (203).

Η πρώτη μελέτη αναφορικά με τη δράση της ιντερφερόνης 1β στην ΠΣ έγινε το 1986 (204), με χορήγηση ιντερφερόνης ενδοθηκικά. Ακολούθησε άλλη μελέτη το 1987 με την παρατήρηση ότι η ιντερφερόνη γ, δεν χρησιμοποιείται στην θεραπεία, χορηγούμενη στην περιφέρεια μειώνει δραματικά την ενεργότητα της νόσου τροποποιώντας το ανοσολογικό σύστημα στην περιφέρεια (205).

Η ιντερφερόνη 1β φαίνεται ότι είναι ιδιαίτερα αποδοτική στην διαλείπουσα υποτροπιάζουσα πολλαπλή σκλήρυνση, ιδίως κατά την έναρξη της νόσου και στην υποτροπιάζουσα προϊούσα. Βρέθηκε ότι ασθενείς με κλινικά μεμονωμένο σύνδρομο, που έλαβαν ιντερφερόνη είχαν τις μισές πιθανότητες να αναπτύξουν βεβαία πολλαπλή σκλήρυνση από αυτούς που δεν έλαβαν (206). Από την άλλη φάνηκε ότι η ιντερφερόνη είναι αποτελεσματική στην μείωση τόσο του αριθμού, όσο και του όγκου των απομυελινωτικών βλαβών στην μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου (207, 208).

Στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται τέσσερα διαφορετικά σκευάσματα. Ένα σκεύασμα για χορήγηση 3 φορές εβδομαδιαίως, ένα σκεύασμα για χορήγηση παρά μέρα, ένα σκεύασμα για χρήση άπαξ εβδομαδιαίως. Πρόσφατα στην κλινική πράξη εισήλθε και τέταρτο σκεύασμα ιντερφερόνης, η πεγκυλιωμένη. Η τελευταία μορφή έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής και καθιστά δυνατή την χορήγηση ανά μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, μειώνοντας έτσι την δυσανεξία των ασθενών στις ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου.

Συνήθεις ανεπιθύμητες ενέργειες της ιντερφερόνης είναι ο πυρετός, το γριπώδες σύνδρομο, η μείωση των έμμορφων συστατικών του αίματος και διαταραχές από το ήπαρ και τον θυρεοειδή.

9.2.2. Οξική γλατιραμέρη

Η οξική γλατιραμέρη είναι τετραπεπτίδιο το οποίο συνδέεται με τα μόρια του τάξης II HLA των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Δρα πιθανώς ως μετατρεπτικό πεπτίδιο

σύνδεσης ή ανταγωνιστής των αυτοαντιγόνων καταστέλλοντας έτσι την ανοσολογική αντίδραση έναντι του ΚΝΣ. Η γλατιραμέρη αναστέλλει την έκφραση μορίων ενεργοποίησης στα μονοκύτταρα και τα μετατρέπει σε μονοκύτταρα II. Τα μονοκύτταρα II εκκρίνουν λιγότερες φλεγμονώδεις ουσίες. Εκκρίνουν όμως και αυξημένα επίπεδα IL10, προάγοντας έτσι τη δραστικότητα των Th2 κυττάρων.

Σημαντικός στόχος της γλατιραμέρης είναι τα CD8 κύτταρα, αφού προάγει την διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των CD8 κυττάρων (209). Τα κύτταρα αυτά παράγουν ιντερφερόνη- γ , TNF- α και TGF- β και καταστέλλουν τα ενεργοποιημένα Th1 κύτταρα (210). Επιπλέον η γλατιραμέρη αυξάνει τον αριθμό των ρυθμιστικών CD4 T κυττάρων (211, 212) και προάγει τον πολλαπλασιασμό των ρυθμιστικών B κυττάρων (80). Με την χορήγηση γλατιραμέρης αυξάνεται η παραγωγή νευροπροστατευτικών παραγόντων.

Η πρώτη μεγάλη μελέτη για την οξική γλατιραμέρη διενεργήθηκε το 1995 και έδειξε 29% μείωση των υποτροπών με τριετή καθημερινή χορήγηση 20mg του φαρμάκου (213). Η ανωτέρω μελέτη δεν παρείχε στοιχεία για την μαγνητική τομογραφία. Οι μελέτες που ακολούθησαν απέδειξαν σημαντική δραστικότητα του φαρμάκου και την εικόνα της μαγνητικής τομογραφίας. Μείωση του αριθμού και του όγκου των ενεργών απομυελινωτικών εστιών παρατηρήθηκε, αλλά με καθυστέρηση έξι μηνών σε σχέση με την ιντερφερόνη (214).

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν δερματικές εκδηλώσεις, ερυθρότητα, κνησμός, νέκρωση και συστηματικές εκδηλώσεις όπως δύσπνοια, αίσθημα θερμότητας και ερυθρότητας προσώπου, θωρακικό άλγος.

Η χορήγηση της οξικής γλατιραμέρης είναι καθημερινή 20mg με υποδόρια ένεση. Πρόσφατα κυκλοφόρησε στην αγορά και σκεύασμα 40mg με παρ' ημέρα χορήγηση.

9.2.3. Τεριφλουνομίδη

Το φάρμακο αυτό είναι ανοσοκατασταλτικός παράγοντας, ενεργός μεταβολίτης της λεφλουνομιδης. Δρα αναστέλλοντας την αφυδρογονάση του διυδροοροτικού οξέος, μιτοχονδριακό ένζυμο που εμπλέκεται στην de novo σύνθεση των πυριμιδινών. Ο κύριος στόχος του είναι τα T λεμφοκύτταρα και προκαλεί πτώση του αριθμού των λεμφοκυττάρων και των ουδετερόφιλων. Επιπλέον, προάγει την αύξηση του αριθμού των Th2 κυττάρων έναντι των Th1. Το φάρμακο χορηγείται από του στόματος άπαξ ημερησίως.

Η αποτελεσματικότητα της τεριφλουνομίδης αποδείχθηκε με την μελέτη TEMSO, διπλή τυφλή μελέτη στην οποία χορηγήθηκαν 7mg και 14 mg τεριφλουνομίδης ημερησίως για διάστημα πάνω από 108 εβδομάδες. Οι ασθενείς είχαν τουλάχιστον μία υποτροπή το παρελθόν έτος ή δύο τα δύο προηγούμενα. Το αποτέλεσμα μετρήθηκε με τον ετήσιο ρυθμό υποτροπών όπου βρέθηκε σημαντικά μικρότερος στους ασθενείς που έλαβαν το φάρμακο έναντι αυτών που έλαβαν εικονικό. Ομοίως παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας στην μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου καθώς και του ρυθμού εξέλιξης της αναπηρίας (215).

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες αφορούν κυρίως την διαταραχή της ALT, αλωπεκία, διάρροια, ναυτία.

9.2.4. Φουμαρικός διμεθυλεστέρας

Ο φουμαρικός διμεθυλεστέρας μειώνει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, τον αριθμό των λεμφοκυττάρων και προάγει τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2. Ο μεταγραφικός παράγοντας αυτός έχει πιθανή νευροπροστατευτική δράση και ενεργοποιείται στους νευρώνες, τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα, παράγοντας την ομώνυμη αντιοξειδωτική πρωτεΐνη. Μία από τις δράσεις του φαρμάκου είναι η μείωση των Th1 και η αύξηση των Th2 κυττάρων.

Η αποτελεσματικότητα φάνηκε στις μελέτες DEFINE και CONFIRM. Και οι δύο μελέτες ήταν διπλές τυφλές. Φάνηκε σημαντική μείωση του ετήσιου ρυθμού υποτροπών, των ενεργών T1, των T2 βλαβών και του ρυθμού εξέλιξης της αναπηρίας.

Η ερυθρίαση και οι γαστρεντερικές διαταραχές είναι οι συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες. Η χορήγηση γίνεται από του στόματος δύο φορές ημερησίως με δόση έναρξης τα 120mg δύο φορές την μέρα, και ακολούθως διπλασιάζεται (216).

9.2.5. Φιγκολιμόδη

Η φιγκολιμόδη αποτέλεσε την πρώτη από του στόματος θεραπεία για την πολλαπλή σκλήρυνση. Είναι αγωνιστής του υποδοχέα S1P. Μέσω της δράσης της αναστέλλει την έξοδο των λεμφοκυττάρων από τους λεμφαδένες στην περιφέρεια. Αποτέλεσμα έχει την συσσώρευση των λεμφοκυττάρων στους λεμφαδένες και την πτώση του αριθμού τους στην περιφέρεια. Τα λεμφοκύτταρα γίνονται πιο ανεκτικά και καταστέλλονται. Ο πληθυσμός που παγιδεύεται εντός των λεμφαδένων είναι σε μεγαλύτερο βαθμό T CD4 κύτταρα και Τα βοηθητικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό έχει προκαλέσει σύγχυση και ακόμα υπάρχει

διχογνωμία για το αν πρόκειται για νοσοτροποποιητικό φάρμακο ή ανοσοκατασταλτικό (217). Παράλληλα η φιγκολιμόδη αναστέλλει την δίοδο των λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ (218). Αποτέλεσμα αυτού είναι η πτώση του αριθμού των κυττάρων του ENY, του IgG index και η ελάττωση των ολιγοκλωνικών ζωνών IgG (218). Παράλληλα μελέτες έδειξαν μείωση του ρυθμού απώλειας εγκεφαλικού όγκου των ασθενών που λάμβαναν φιγκολιμόδη και βελτιωμένες ανώτερες γνωσιακές λειτουργίες (219, 220). Ως προς την νευροπροστατευτική δράση, η φιγκολιμόδη σε βάθος χρόνου ενεργοποιεί τους ανάπτυξη των νευρώνων και των ολιγοδενδροκυττάρων και διατηρεί την υποστήριξη των αστροκυττάρων προς τους νευρώνες (221-223). Η δραστηριότητα της φιγκολιμόδης αποδείχθηκε από δύο μεγάλες μελέτες την TRANSFORMS και την FREEDOMS. Και οι δύο μελέτες ήταν διπλές τυφλές τυχαιοποιημένες και τα αποτελέσματα τους συμφωνούσαν μεταξύ τους. Χαρακτηριστικά, υπήρξε σημαντική μείωση του αριθμού των υποτροπών, με ταυτόχρονη μείωση των ενεργών T1 βλαβών. Παράλληλα παρατηρήθηκε και μείωση του ρυθμού της εγκεφαλικής ατροφίας καθώς και της εξέλιξης της αναπηρίας (220).

Σημαντικά σημεία για την ασφάλεια της φιγκολιμόδης αποτελούν οι επιδράσεις της στο καρδιαγγειακό σύστημα, τον οφθαλμό και το ανοσοποιητικό.

Η βραδυαρρυθμία και ο κολποκοιλιακός αποκλεισμός αποτελούν σημαντική αιτία νοσηρότητας και αντένδειξης χορήγησης της φιγκολιμόδης και έχει να κάνει με την δράση της στους S1P1 υποδοχείς στην καρδιά. Συστήνεται ο έλεγχος με καταγραφή του ρυθμού προ της πρώτης χορήγησης. Η πρώτη χορήγηση επίσης συστήνεται να γίνεται υπό παρακολούθηση του καρδιακού ρυθμού.

Το οίδημα της ωχράς κηλίδας είναι επίσης σημαντικό σημείο. Απαιτείται οφθαλμολογικός έλεγχος προ της έναρξης της θεραπείας και τρεις μήνες μετά για διαπίστωση οιδήματος ωχράς κηλίδας.

Τέλος οι λοιμώξεις, κυρίως από ιούς, αποτελούν σημαντική αιτία νοσηρότητας. Συστήνεται ο εμβολιασμός για ανεμευλογιά ζωστήρα καθώς παρατηρήθηκαν βαρείες λοιμώξεις από τον ιό αυτό σε ασθενείς υπό φιγκολιμόδη (224).

Η χορήγηση όπως αναφέρθηκε γίνεται από του στόματος άπαξ ημερησίως.

9.2.6. Ναταλιζουμάμπη

Η ναταλιζουμάμπη είναι εξανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της α4β1 ιντεγκρίνης. Η ιντεγκρίνη αυτή βρίσκεται στην επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων και αλληλεπιδρά με τον VCAM-1 των ενδοθηλιακών κυττάρων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, επιτρέποντας την διόδο των κυττάρων στο ΚΝΣ. Η δραστηριότητα της ναταλιζουμάμπης αποδείχθηκε με δύο μεγάλες μελέτες η AFFIRM και η SENTINEL. Οι μελέτες ήταν διπλές τυφλές, τυχαιοποιημένες. Περιέλαβαν περισσότερους από 2000 ασθενείς με μία υποτροπή τουλάχιστον το προηγούμενο έτος, EDSS μεταξύ 0 και 5 και μαγνητική τομογραφία στην αρχή της μελέτης και ένα χρόνο μετά για ανάλυση του αριθμού των T1 βλαβών που προσλάμβαναν παραμαγνητική ουσία και T2 βλαβών (225, 226). Το αποτέλεσμα ήταν 68% και 54% αντίστοιχα μείωση του αριθμού των υποτροπών.

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες της ναταλιζουμάμπης περιλαμβάνουν αντιδράσεις υπερευαισθησίας, υπόταση, πυρετό, κεφαλαλγία και κατάθλιψη.

Το 2005 περιγράφηκαν δύο περιπτώσεις ασθενών υπό ναταλιζουμάμπη, οι οποίοι εμφάνισαν προϊούσα πολυεστιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια (PML) (227). Η PML αποτελεί ευκαιριακή λοίμωξη του ΚΝΣ από τον JCV. Στο παρελθόν παρατηρήθηκε σε ασθενείς με έντονη ανοσοκαταστολή. Αν και η ανασκόπηση των ασθενών που έλαβαν ναταλιζουμάμπη έως τότε δεν ανέδειξε άλλη περίπτωση PML, καθιερώθηκαν τρία κριτήρια για τον καθορισμό του κινδύνου ανάπτυξης PML σε ασθενείς υπό ναταλιζουμάμπη. Η έκθεση στον ιό, η προηγούμενη λήψη ανοσοκαταστολής και η διάρκεια θεραπείας με ναταλιζουμάμπη πάνω από 2 έτη (228).

Η χορήγηση του φαρμάκου γίνεται κάθε 28 ημέρες ενδοφλεβίως.

9.2.7. Αλεμτουζουμάμπη

Πρόκειται για μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του CD52 που εκφράζεται στην επιφάνεια τόσο των B όσο και των T λεμφοκυττάρων, αλλά και στα NK κύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα ηωσινόφιλα. Προκαλεί σημαντική λεμφοπενία χωρίς να επηρεάζει τα πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών. Η δράση του φαρμάκου αυτού σχετίζεται με την μακρά ανοσοκαταστολή που προκαλεί και στην ουσία την ανασύσταση του ανοσοποιητικού συστήματος. Μελέτες έδειξαν αρκετά καλή αποτελεσματικότητα.

Σημαντικά αρνητικό στοιχείο του φαρμάκου αυτού αποτελεί ο κίνδυνος ανάπτυξης ευκαιριακών λοιμώξεων καθώς και δευτεροπαθών αυτοάνοσων διαταραχών (229-232).

9.2.8. Ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη

Η ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη ως νοσοτροποποιητικός παράγοντας φαίνεται ότι έχει θέση τόσο στην υποτροπιάζουσα μορφή, όσο και στην προϊούσα. Έχει φανεί ότι στην προϊούσα μορφή υπήρξε καθυστέρηση της εξέλιξης της νόσου (233).

Εκτός των παραπάνω φαρμάκων στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται και ανοσοκατασταλικά φάρμακα. Αυτά είναι η μιτοξανδρόνη, η κυκλοφωσφαμίδη και η αζαθειοπρίνη. Από αυτά το πλέον χρησιμοποιούμενο είναι η μιτοξανδρόνη, καθώς είναι το μόνο με επίσημη ένδειξη για την πολλαπλή σκλήρυνση. Πρόκειται για φάρμακο της κατηγορίας των ανθρακυκλινών, το οποίο αναστέλλει την σύνθεση του DNA μέσω της αναστολής της τοποϊσομεράσης.

Πίνακας 3. Θεραπείες Πολλαπλής Σκλήρυνσης

ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ 1ΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ	ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ 2ΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ	ΆΛΛΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ
<i>INTEΦEPONH 1B</i>	<i>Φιγκολιμόδη</i>	<i>Αζαθειοπρίνη</i>
<i>ΟΞΕΙΚΗ ΓΛΑΤΙΡΑΜΕΡΗ</i>	<i>Ναταλιζουμάμπη</i>	<i>Μιτοξανδρόνη</i>
<i>ΦΟΥΜΑΡΙΚΟΣ</i>	<i>Αλεμτουζουμάμπη</i>	<i>Πλασμαφαίρεση</i>
<i>ΔΙΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ</i>		<i>Ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη</i>
<i>ΤΕΡΙΦΛΟΥΝΟΜΙΔΗ</i>		

9.3. Η ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η πολλαπλή σκλήρυνση στην πορεία της γίνεται η αιτία για μία σειρά συμπτωμάτων, τα οποία δεν σχετίζονται άμεσα με την δραστηριότητα της νόσου, δεν βελτιώνονται από την νοσοτροποποιητική θεραπεία και επηρεάζουν την καθημερινότητα και την ποιότητα ζωής των ασθενών. Οι περισσότερες μελέτες εστιάζουν στην αντιμετώπιση της σπαστικότητας και του νευροπαθητικού πόνου που εμφανίζουν οι ασθενείς. Παρόλα αυτά παρακάτω θα εκτεθούν και άλλα συμπτώματα, τα οποία χρήζουν αντιμετώπισης από τον Νευρολόγο.

Η κόπωση αποτελεί το συχνότερο και πιο ενοχλητικό σύμπτωμα των ασθενών με ΠΣ. Το 75-90% των ασθενών με ΠΣ αιτιώνται χρόνια κόπωση η οποία επηρεάζει την παραγωγικότητα των ατόμων αυτών (234, 235). Είναι σημαντικό η κόπωση να μην συγχέεται

με την κόπωση που οφείλεται σε διαταραχές του ύπνου. Σχετική μελέτη συσχέτισε την κόπωση με τον διαταραγμένο ύπνο (236), ωστόσο άλλη μελέτη που περιλάμβανε μελέτη ύπνου έδειξε ότι ασθενείς με ΠΣ που εμφάνιζαν κόπωση δεν είχαν διαταραχές στον ύπνο (237). Ένας ιδιαίτερος τύπος κόπωσης στην ΠΣ είναι η ιδιοπαθής εξάντληση. Αποτελεί συχνό φαινόμενο αλλά όχι σαφώς κατανοητό ως προς την αιτιολογία του. Η μειωμένη νευρωνική ακεραιότητα φαίνεται να ευθύνεται σύμφωνα με μελέτες σε μεγάλο ποσοστό για το είδος της κόπωσης αυτό (238-240), ενώ από την άλλη η φλεγμονή φαίνεται να παίζει και αυτή σημαντικό ρόλο. Στην διαχείριση της κόπωσης έχουν χρησιμοποιηθεί η αμανταδίνη (241) και η μοδαφινίλη (242). Αυτά τα φάρμακα είναι δυνατόν να επιδεινώσουν προϋπάρχοντα ψυχιατρικά προβλήματα όπως κατάθλιψη, παρανοϊκό ιδεασμό, ανησυχία. Επίσης η βουπροπιόνη έχει χρησιμοποιηθεί με καλά αποτελέσματα καταπολεμώντας κυρίως την κατάθλιψη των ασθενών αυτών (243). Τέλος μελέτες έδειξαν ότι η σωματική φυσική άσκηση μπορεί να βελτιώσει το αίσθημα κόπωσης των ασθενών (244).

Η σπαστικότητα αποτελεί κοινό σύμπτωμα της βλάβης του ανώτερου κινητικού νευρώνα, οπότε δεν θα μπορούσε να απουσιάζει από την ΠΣ. Η προσβολή του νωτιαίου μυελού συνδέεται με μεγαλύτερου βαθμού σπαστικότητα. Από την άλλη η σπαστικότητα συνδυάζεται συχνά με λοιμώξεις του ουροποιητικού. Κλινικά η σπαστικότητα εμφανίζεται ως αυξημένος μυϊκός τόνος στην ηρεμία που αυξάνεται στην γρήγορη κίνηση. Συνοδεύεται από ζωνρές τενόντιες αντανάκλασεις και κλόνο. Για την διαχείριση της σπαστικότητας χρήσιμη είναι η άσκηση και η φυσικοθεραπεία (245). Φαρμακευτικά μπορεί να αντιμετωπιστεί με μπακλοφαίνη και τιζανιδίνη (246). Η μπακλοφαίνη σε περιπτώσεις εξεζητημένης σπαστικότητας των κάτω άκρων μπορεί να χορηγηθεί ενδοραχιαία με αντλία (247).

Σημαντικό σύμπτωμα στην ΠΣ αποτελεί η νευρογενής κύστη. Οι ασθενείς εμφανίζουν όλο το φάσμα της νευρογενούς κύστης, από επιτακτική ούρηση και ατελή κένωση της κύστης έως πλήρη ακράτεια. Η νευρογενής κύστη αποτελεί σημαντικό αίτιο θνητότητας των ασθενών με ΠΣ, λόγω της αυξημένης συχνότητας λοιμώξεων του ουροποιητικού, οι οποίες μπορεί να φθάσουν σε σήψη και καταπληξία (248). Η θεραπεία προσαρμόζεται σε κάθε ασθενή ανάλογα με τη μορφή της. Αντιχολινεργικά φάρμακα όπως η οξυβουτινίνη χορηγούνται σύμφωνα με αλγόριθμους (249) στην περίπτωση της υπερλειειτουργικής κύστης. Νεώτερη σχετικά επιλογή και η έγχυση αλλαντικής τοξίνης στον εξωστήρα μυ της κύστης (250). Στην περίπτωση της άτονης κύστης ευρεία χρήση έχουν οι διουρηθρικοί καθετηριασμοί και ο μόνιμος υπερηβικός καθετήρας (251).

Η δυσκοιλιότητα είναι επίσης σημαντική στους ασθενείς με ΠΣ. Εκτός από την νευρογενή βλάβη, στην εμφάνιση της συμβάλουν τόσο οι διάφορες φαρμακευτικές αγωγές που λαμβάνουν οι ασθενείς, όσο και η μειωμένη κινητικότητα και η αφυδάτωση (252). Ωσμωτικοί παράγοντες, διεγερτικά της κινητικότητας του εντέρου και κατανάλωση φυτικών ινών αποτελούν συνήθεις θεραπευτικές επιλογές (American College of Gastroenterology Chronic Constipation Task Force 2005).

Σημαντικό και συχνό σύμπτωμα στους ασθενείς με ΠΣ είναι ο νευροπαθητικός πόνος, οξύς ή χρόνιος (253). Μπορεί να εμφανιστεί είτε παροξυσμικά με την εικόνα νευραλγίας, όπως του τριδύμου ή του γλωσσοφαρυγγικού νεύρου (254), είτε με τη μορφή χρόνιου άλγους όπως η υπεραλγησία και οι δυσαισθησίες (255). Θεραπευτικά, χορηγούνται αντιεπιληπτικά όπως η καρβαμαζεπίνη, η γκαμπαπεντίνη και η πρεγκαμπαλίνη, τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά (αμιτριπτυλίνη), εκλεκτικοί αναστολείς της επαναπρόσληψης σεροτονίνης και νοραδρεναλίνης όπως η δουλοξετίνη (254, 255).

Διαταραχές από τις ανώτερες νοητικές λειτουργίες είναι επίσης συχνές στην ΠΣ. Βάση μελετών η χορήγηση αντιανοϊκών φαρμάκων όπως η δονεπεξίλη και μεμαντίνη δεν έδειξε ιδιαίτερο όφελος (256) σε αντίθεση με την αρμοδαφινίλη η οποία έδωσε θετικά στοιχεία για τη βελτίωση της μνήμης (257). Από την άλλη η χορήγηση μεθυλφαινιδάτης βελτίωσε την προσοχή των ασθενών (258).

Τέλος η διαταραχή της βάδισης, σύμπτωμα συχνό και ιδιαίτερα δύσκολο για τους ασθενείς με ΠΣ μπορεί να βελτιωθεί με χορήγηση φαμπριδίνης. Μελέτη φάσης 3 έδειξε βελτίωση της βάδισης σε 35% των ασθενών με ΠΣ που έλαβαν φαμπριδίνη (259).

10. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Από νωρίς υποτέθηκε ότι η πολλαπλή σκλήρυνση ίσως έχει και κάποιο γενετικό υπόβαθρο. Σήμερα είναι αποδεκτό ότι η πολλαπλή σκλήρυνση έχει μία περίπλοκη αιτιοπαθογένεια στην οποία εμπλέκονται και γενετικοί παράγοντες. Σε αυτό συνέβαλε και η παρατήρηση ότι η πολλαπλή σκλήρυνση είναι συχνότερη σε συγγενείς ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση (4). Παράλληλα με μελέτες διδύμων βρέθηκε ότι υπάρχει 25-30% αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης πολλαπλής σκλήρυνσης στους μονοζυγωτικούς διδύμους αν ο ένας αναπτύξει σκλήρυνση, να αναπτύξει και ο άλλος (3). Επίσης ο κίνδυνος ανάπτυξης ΠΣ αυξάνεται όταν πάσχουν και οι δύο γονείς από ΠΣ. Πρόσφατη μετανάλυση περισσότερων από 500 μελετών έδειξε ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης ΠΣ στους μονοζυγωτικούς διδύμους είναι 18,2% και στα αδέρφια 2,7% (260). Ο μόνος όμως γενετικός τύπος, ο οποίος έχει ισχυρά συσχετιστεί με την πολλαπλή σκλήρυνση, αλλά χωρίς όμως να υπάρχει και σχέση αιτίου-αποτελέσματος, είναι η περιοχή DRB1, ειδικότερα ο DRB1*1501, του συστήματος μείζονος ιστοσυμβατότητας, η οποία εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 (261-263). Επιπλέον μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS) έδειξαν μικρότερη επίδραση των γονιδίων IL2RA και IL7RA. Ακολούθως μετanalύσεις ανέδειξαν συσχέτιση με την ΠΣ και των γονιδίων CD58, TYK2, STAT3 και TNFRSF1A (264). Είναι όμως σίγουρο ότι υπάρχουν και άλλα ύποπτα γονίδια και πολυμορφισμοί αυτών οι οποίοι ενέχονται στην παθογένεια της νόσου (12). Μετanalύσεις έδειξαν ότι η ΠΣ συσχετίζεται με πλειάδα πολυμορφισμών σε πολλαπλά γονίδια, περισσότερα από 200 (265). Το σύνολο αυτών των πολυμορφισμών καλείται γενετικό φορτίο της ΠΣ και είναι δυνατόν να υπολογιστεί σε κάθε ασθενή χωριστά (265, 266). Ομοίως μελέτες στην περιοχή του HLA έδειξαν ότι αρκετοί πολυμορφισμοί συσχετίζονται με δημογραφικά και απεικονιστικά χαρακτηριστικά της ΠΣ (267).

Στην παρούσα μελέτη βάσει αυτών των παρατηρήσεων για τους γενετικούς πολυμορφισμούς και την παρατήρηση ότι η χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του μορίου προσκόλλησης $\alpha 4$ integrin, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση κατά 90% των νέων βλαβών στο ΚΝΣ ασθενών, αποφασίστηκε η μελέτη γενετικών πολυμορφισμών γονιδίων μορίων προσκόλλησης και διαπίδυσης (P- selectin, integrins $\alpha 4$, $\beta 1$ and $\beta 7$, ICAM1, VCAM1 and MADCAM-1) και της osteopontin και fibronectin. Ακολούθως θα γίνει αναφορά σε κάθε γονίδιο.

10.1. P-selectin

Η P-selectin αποτελεί μόριο προσκόλλησης μοριακού βάρους 140 kD το οποίο εκφράζεται στην επιφάνεια ενεργοποιημένων κυττάρων και μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση των ενδοθηλιακών κυττάρων ή των αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα. Άλλες ονομασίες του μορίου είναι GMP-140 και CD62. Το γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 1q24.2, έχει μήκος άνω των 50kb και περιέχει 17 εξόνια (268). Η πρώτη ανακάλυψη της αλληλουχίας του γονιδίου έγινε το 1988 (269), ενώ το 1989 (270) ανακαλύφθηκε η κατανομή του μορίου στα διάφορα κύτταρα. Αποδείχθηκε ότι εκφράζεται στα μεγακαρυοκύτταρα, τα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Συγκεκριμένα στα ενδοθηλιακά κύτταρα η P-selectin εκφράζεται στις μεμβράνες των σωματίων Weibel-Palade και ενδοκυτταρικά στα κοκκία που περιέχουν τον παράγοντα von Willebrand.

Η P-selectin μαζί με τον lymph node homing receptor (LAM1) και τον endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM1) φαίνεται ότι αποτελούν μία οικογένεια πρωτεϊνών προσκόλλησης γνωστή ως selectins που προέκυψε από διαδικασίες διπλασιασμού πολλών γονιδίων πριν την εξελικτική απόκλιση ποντικών και ανθρώπων (271). Η θέση αυτών των γονιδίων στον ποντικό και των άνθρωπο είναι στο χρωμόσωμα 1 και συνεχεται με στενή εξελικτική σχέση με γονίδια σχετιζόμενα με τον υποδοχέα του συμπληρώματος, τα οποία βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα και στα δύο είδη και με τα οποία μοιράζονται μία περιοχή ομόλογης ακολουθίας. Το 1990 παρατηρήθηκε ότι αυτή η περιοχή 1q χρωμοσώματος φαίνεται σημαντική για την διακυτταρική επικοινωνία στο ανοσοποιητικό σύστημα (271).

Το 1998 ανακαλύφθηκε ότι τα επίπεδα της P-selectin είναι αρκετά αυξημένα σε ασθενείς με ασταθή στηθάγχη (272). Αποδείχθηκε ότι το γονίδιο αυτό παρουσιάζει πολλούς πολυμορφισμούς και μόνο ο πολυμορφισμός pro715 συσχετίζεται με το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Περαιτέρω μελέτη έδειξε ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει προστατευτικό χαρακτήρα (273). Οι περισσότερες μελέτες συσχέτισης αφορούν κυρίως τη συσχέτιση της P-selectin με την στεφανιαία νόσο.

Από μελέτη σε ποντίκια, στα οποία αντικαταστάθηκε το φυσιολογικό γονίδιο P-selectin από μεταλλαγμένο που παράγει μεγάλη ποσότητα P-selectin, παρατηρήθηκε αυξημένη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης ισχαιμικών εμφράκτων. Επίσης η εμφάνιση αθηροσκληρωτικών βλαβών πλούσιων σε μακροφάγα ήταν αυξημένη (274).

Ένα χαρακτηριστικό της P-selectin είναι η συμμετοχή της στη διαδικασία της φλεγμονής από κοινού με τον ICAM1, συνεργαζόμενες στην προσκόλληση των μονοκυττάρων στο φλεγμαίνον ενδοθήλιο κατά τη διάρκεια της στρατολόγησης τους προς τον νοσούντα ιστό. Η P-selectin παίζει ρόλο στην έναρξη και την συγκράτηση της ασταθούς προς τα εμπρός διαδικασίας της μετάφρασης των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων μέσω της κυλιόμενης προσκόλλησης σε αντίθεση με την διαμεσολαβούμενη από ιντεγκρίνη προσκόλληση η οποία διευκολύνει την σύλληψη του κυττάρου πριν την μετανάστευση διαμέσου του ενδοθηλίου.

10.2. Ιντεγκρίνη α4

Η οικογένεια των ιντεγκρινών περιλαμβάνει τόσο μεμβρανικούς υποδοχείς εξωκυττάρων ουσιών όσο και υποδοχείς προσκόλλησης λευκοκυττάρων. Αποτελούνται από α και β ετεροδιμερείς διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες είναι μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες. Έχουν ταυτοποιηθεί τρεις υποομάδες ιντεγκρινών οι οποίες αποτελούνται από μία κοινή β υπομονάδα που συνδέονται με διαφορετικές α υπομονάδες. Δύο ομάδες ιντεγκρινών εκφράζονται σε λεμφοειδή και αιμοποιητικά κύτταρα. Η πρώτη περιλαμβάνει τις LFA1, Mac1 και p150,95. Τα μόρια αυτά εκφράζονται αυστηρά στα λευκοκύτταρα. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τα VLA μόρια που εκφράζονται σε πολλούς τύπους κυττάρων εκτός των κοκκιοκυττάρων και των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα μόρια αυτά αποτελούνται από τουλάχιστον 6 διαφορετικές αλυσίδες οι οποίες συνδέονται με την ίδια β υπομονάδα. Η λειτουργία των μορίων αυτών έχει να κάνει κυρίως με την προσκόλληση ουσιών από τη θεμέλια ουσία. Εξάιρεση αποτελεί η VLA4 ή ιντεγκρίνη α4 η οποία σχετίζεται με την προσκόλληση μεταξύ κυττάρων.

Το γονίδιο της ιντεγκρίνης α4β1 εδράζεται στο 2q31.3 και χαρτογραφήθηκε πρώτη φορά το 1991.

Έχει δειχθεί από μελέτες (275) ότι η ιντεγκρίνη α4 εκφράζεται σε μεγάλα επίπεδα στα Β λεμφοκύτταρα της οριακής ζώνης του λεμφαδένα, ενώ εκλεκτική αναστολή της ιντεγκρίνης α4β1 οδηγεί σε αυξημένη απελευθέρωση Β λεμφοκυττάρων από την οριακή ζώνη. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι ιντεγκρίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμερισματοποίηση του περιφερικού λεμφικού ιστού. Εκτός όμως από τα Β λεμφοκύτταρα η ιντεγκρίνη α4β1 εκφράζεται και στην επιφάνεια των Τα λεμφοκυττάρων, των μακροφάγων και των ηωσινοφίλων (276). Η ιντεγκρίνη α4β1 συνδέεται ακολούθως με τους συνδέτες της στο ενδοθήλιο το ICAM-1, το VCAM-1 και το MADCAM και οδηγεί σε μετανάστευση των

λεμφοκυττάρων εξωαγγειακά. Η σύνδεση με το VCAM-1 αποτελεί σημαντικό στοιχείο για την παθογένεση της ΠΣ ενώ με το MADCAM σημαντικό στοιχείο για τη νόσο Crohn (276).

Η ιντεγκρίνη $\alpha 4\beta 1$ παίζει σπουδαίο ρόλο στην παθογένεση της ΠΣ. Αυτό είχε αρχίσει να γίνεται γνωστό και από τις μελέτες σε πειραματόζωα με πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE). Η χορήγηση ουδετεροποιημένων αντισωμάτων έναντι της ιντεγκρίνης $\alpha 4\beta 1$ στα ποντίκια έδειξε αδυναμία μετανάστευσης λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ και ανάπτυξη EAE (277). Αυτό οδήγησε στην δημιουργία του εξανθρωποποιημένου natalizumab, το οποίο έδειξε σημαντική αποτελεσματικότητα στην EAE (278, 279). Μετά από μελέτες σε ασθενείς με ΠΣ φάνηκε ότι υπήρχε σημαντική αποτελεσματικότητα του natalizumab στην μείωση των υποτροπών της ΠΣ και στην εξέλιξη της αναπηρίας (225). Παράλληλα λόγω της καίριας σημασίας της ιντεγκρίνης $\alpha 4\beta 1$ στην ΠΣ έγιναν και μελέτες πολυμορφισμών της ιντεγκρίνης $\alpha 4\beta 1$ και ανιχνεύθηκε η πιθανή σχέση τους με την εκδήλωση ΠΣ. Μελέτη 12 πολυμορφισμών στον υποκινητή και τα ιντρόνια του γονιδίου και βρέθηκε μόνο η περιοχή rs1449263 στο ιντρόνιο 2 να έχει σημαντική διαφορά στους ασθενείς με ΠΣ που εξετάστηκαν (280). Άλλες μελέτες δεν ανέδειξαν κάποια σημαντική συσχέτιση (281).

Ο μηχανισμός δράσης της ιντεγκρίνης $\alpha 4\beta 1$ οδήγησε σε πλειάδα μελετών μέσω των οποίων ορίστηκαν νέοι θεραπευτικοί στόχοι και θεραπείες. Εκτός της ήδη αναφερθείσας ΠΣ, η αναστολή της ιντεγκρίνης $\alpha 1$ από το natalizumab έδειξε σαφή βελτίωση της νόσου του Crohn μέσω της μειωμένης μετανάστευσης φλεγμονωδών κυττάρων στο εντερικό τοίχωμα (282). Παράλληλα σημαντική δράση φαίνεται να υπάρχει και στη οξεία μυελοβλαστική λευχαιμία. Η σύνδεση της ιντεγκρίνης $\alpha 4\beta 1$ με την fibronectin στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών οδηγεί σε αντοχή στη χημειοθεραπεία και υποτροπή της νόσου μετά την θεραπεία (283). Τέλος πιθανολογήθηκε η σημαντική συμμετοχή της ιντεγκρίνης $\alpha 4\beta 1$ από κοινού με τον VCAM-1 στην αγγειογένεση (284).

10.3. Ιντεγκρίνη $\beta 1$

Η ιντεγκρίνη $\beta 1$ ή γλυκοπρωτεΐνη IIa αποτελεί υποδοχέα της fibronectin. Το γονίδιο της εδράζεται στο 10p11.2 συγκεκριμένα στην περικεντρομεριδιακή περιοχή (285, 286). Μελέτη με cDNA του γονιδίου φάνηκε ότι υπήρχε πρόσδεση εκτός από το γονίδιο στο χρωμόσωμα 10 και στο χρωμόσωμα 19p (287). Αυτό θεωρήθηκε ότι οφείλεται παρεμβολή στο χρωμόσωμα 19 τμήματος του γονιδίου της ιντεγκρίνης $\beta 1$. Περαιτέρω μελέτη έδειξε ότι δεν

υφίσταται σε όλους τους ανθρώπους η περιοχή αυτή στο χρωμόσωμα 19 και ότι πρόκειται περί ψευδογονιδίου.

Η δράση της ιντεγκρίνης β1 στα Β λεμφοκύτταρα στην οριακή ζώνη είναι παρόμοια με αυτής της α4. Ομοίως και στην διαδικασία της αγγειογένεσης. Σημαντική φαίνεται να είναι η δράση της στην θρομβασθένεια Glanzmann. Ενώ παρατηρήθηκαν φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης και λειτουργικότητας του μορίου, δεν ήταν δυνατόν αυτά να ενεργοποιηθούν μέσω μονοπατιών inside-out.

Η ιντεγκρίνη α1β1 μεσολαβεί στην πρόκληση παραγωγής κυτταροκινών από την σεμαφορίνη 7^A (288). Το γεγονός αυτό είναι μείζονος σημασίας στην φλεγμονώδη διεργασία. Σημαντική φαίνεται να είναι η σημασία της ιντεγκρίνης β1 στην λοίμωξη από *H.Pylori*, καθώς συνδέεται με την πρωτεΐνη προσκόλλησης CagL και ενεργοποιούνται FAK και SRC κινάσες τυροσίνης, γεγονός το οποίο πιθανόν θα οδηγήσει σε καλύτερη ερμηνεία της σημασίας του *H.Pylori* στον γαστρικό καρκίνο και το πεπτικό έλκος (289). Άλλη σπουδαία δράση της ιντεγκρίνης β1 ανιχνεύεται στην παθογένεια της ψωρίασης. Συγκεκριμένα η αναστολή της αλληλεπίδρασης της ιντεγκρίνης β1 με το κολλαγόνο προλαμβάνει την συσσώρευση των επιδερμικών Τ λεμφοκυττάρων και την γενικότερη ανοσοπαθογένεση της ψωρίασης. Η ιντεγκρίνη β1 είναι σημαντικός υποδοχέας του κολλαγόνου που εκφράζεται εκλεκτικά στα Τα λεμφοκύτταρα της επιδερμίδας, όχι όμως και του χορίου. Τα κύτταρα αυτά έχουν χαρακτηριστικά κυττάρων μνήμης και εκφράζουν υψηλά επίπεδα ιντερφερόνης γ. Η αναστολή της ιντεγκρίνης β1 οδηγεί σε πλήρη αναστολή της ανάπτυξης ψωρίασης, αποτέλεσμα παρόμοιο με αυτό του TNFα (290).

Όσον αφορά το πειραματικό της μοντέλο την ΕΑΕ από μελέτη φάνηκε ότι η εξάλειψη του γονιδίου στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα δεν επιφέρει καμία αλλαγή στην εκδήλωση και πορεία της νόσου, ούτε αποτρέπει την είσοδο αυτών των κυττάρων στο ΚΝΣ. Αντίθετα τα Τ λεμφοκύτταρα που είχαν αυτή την έλλειψη δεν ήταν δυνατόν να εισέλθουν στο ΚΝΣ και υπήρχε καθυστερημένη έναρξη της ΕΑΕ, αλλά όχι απουσία αυτής (291).

10.4. Ιντεγκρίνη β7

Η ιντεγκρίνη β7 αποτελεί μόριο προσκόλλησης και είναι επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη. Ανακαλύφθηκε το 1991 μέσω της μελέτης των λευκοκυττάρων (292). Το cDNA περιλάμβανε ένα μεγάλο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιούσε μία πρόδρομο πρωτεΐνη. Όπως οι υπόλοιπες β ιντεγκρίνες έχει μεγάλο εξωκυττάριο τμήμα, διαμεμβρανικό

τμήμα και κυτταροπλασματική ουρά. Το γονίδιο της ιντεγκρίνης β7 εδράζεται στο χρωμόσωμα 12q13.13.

Η ιντεγκρίνη β7 παίζει σπουδαίο ρόλο στην μετανάστευση T λεμφοκυττάρων στο έντερο. Υπάρχει τροπισμός των κυττάρων που εκφράζουν την ιντεγκρίνη β7 και διεγείρονται από αντιγόνα του εντέρου, ο οποίος μεσολαβεί από τα δενδρικά κύτταρα των πλακών Peyer (293).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η ιντεγκρίνη β7 συνδεόμενη με τον MADCAM παίζει σπουδαίο ρόλο στην παθογένεση της νόσου Crohn (282). Από την άλλη μελέτες για την ιντεγκρίνη β7 στην ΠΣ και συγκεκριμένα στην ΕΑΕ έδειξαν ότι εκλεκτική αναστολή της ιντεγκρίνη β7 δεν κατάφερε να αλλάξει την παθογένεση της ΕΑΕ (294). Παρόλα αυτά, δεν είναι δυνατόν να αποκλειστεί ο ρόλος της ιντεγκρίνης β7 στη χρόνια φάση της ΕΑΕ, καθώς το συνδετικό μόριο της MADCAM εκφράζεται σημαντικά στις χρόνιες βλάβες. Φάνηκε από μελέτη ότι η ιντεγκρίνη β7 παίζει συνεργικό ρόλο με την ιντεγκρίνη α4 στην ΕΑΕ. Αυτό φάνηκε από τη αναστολή με αντισώματα της ιντεγκρίνης β7 και της α4. Τα μεν πρώτα ανέστειλαν την α4β7 και αΕβ7, τα δεύτερα δε την α4β1 και α4β7. Η ιντεγκρίνη α4β7 εκφράζεται ετερογενώς στα λεμφοκύτταρα (295). Φάνηκε ότι η συγχορήγηση anti-α4 και anti-β7 αντισωμάτων μείωσε δραστικά το χρόνο προς την ύφεση της ΕΑΕ (296).

10.5. ICAM-1 (INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE-1)

Ο ICAM-1 είναι μια επαγωγίμη γλυκοπρωτεΐνη 76-11kD της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Παρουσιάζει 5 διακριτές περιοχές που ομοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μία κυταροπλασματική ουρά. Αποτελεί μόριο προσκόλλησης και υφίσταται εκτεταμένες διαφορετικές τροποποιήσεις, από τις οποίες προκύπτουν οι διάφορες ισομορφές του. Οι ισομορφές αυτές παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση και δυναμική σύνδεσης αναλόγως τα κύτταρα (297).

Το γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 19p13.3-13.2 και χαρτογραφήθηκε το 1991 (298, 299). Νωρίτερα είχε φανεί ότι το γονίδιο του ICAM-1 παρουσίαζε ομολογία με αυτό του NCAM (neural cell adhesion molecule) (300).

Το γονίδιο του ICAM-1 περιέχει επτά εξόνια και έξι ιντρόνια.

Ο ICAM-1 έχει βρεθεί ότι αποτελεί σημαντικό υποδοχέα διαφόρων ρινοϊών (301). Παράλληλα, αναδείχθηκε ότι δυσλειτουργία του στην έκφραση του ICAM-1 σε συνδυασμό με το HLA-DR παρατηρήθηκε στο σύνδρομο Sjogren (302).

Σημαντική επίσης είναι η δράση του στα Β λεμφοκύτταρα της οριακής ζώνης του λεμφαδένα. Τα αυξημένα επίπεδα ιντεγκρίνης α4β1 που εκφράζονται από τα Β λεμφοκύτταρα στην οριακή ζώνη συνδέονται με τον ICAM-1 και τον VCAM-1. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω αναστολή της σύνδεσης αυτής οδηγεί στην απελευθέρωση Β λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια.

Στην HIV λοίμωξη ο ICAM-1 φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο καθώς προάγοντας την έκφραση του CD80 από Β κύτταρα διευκολύνει την μόλυνση των Τ κυττάρων από τον HIV (303). Το 2002 δημοσιεύθηκε ο ρόλος του ICAM-1 στην χρόνια οικογενή βλεννογονοδερματική καντιντίαση. Πιθανόν αυτοσωματική επικρατής μειωμένη έκφραση του ICAM-1 συμβάλλει σε αυτό (304).

Στην ογκογένεση φαίνεται να έχει ρόλο ICAM-1. Μείωση των επιφανειακών μορίων του ICAM-1 αναστέλλει την επαγρύπνηση των κυτταροτοξικών Τα λεμφοκυττάρων έναντι νεοπλασματικών κυττάρων (305).

Ο ICAM-1 σε συνέργεια με την P-selectin όπως αναφέρθηκε παίζει σημαντικό ρόλο στην φλεγμονή προάγοντας την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο. Μελέτες σε ζωικά μοντέλα έδειξαν ότι ο ICAM-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση, ρύθμιση και καταστολή των Τ λεμφοκυττάρων (297).

10.6. VCAM (VASCULAR CELLULAR ADHESION MOLECULE)

Ο αγγειακός παράγοντας προσκόλλησης (Vascular adhesion molecule-1, VCAM), αποτελεί επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται από το ενδοθήλιο των αγγείων κατόπιν διέγερσης από κυτταροκίνες. Μεσολαβεί στην προσκόλληση των μονοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων στο ενδοθήλιο (306).

Το γονίδιο του VCAM-1 εδράζεται στο χρωμόσωμα 1 στη θέση 1p34-p21. Αποτελείται από 9 εξόνια και είναι σε ένα αντίγραφο στο γονιδίωμα (306). Το 2002 περιγράφηκαν 33 σημειακοί πολυμορφισμοί του γονιδίου (307), και φαίνεται ότι το γονίδιο ενεργοποιείται σε διάφορα όργανα και ιστούς από πλήθος μεταγραφικών παραγόντων (308). Παράλληλα αναγνωρίστηκαν 8 απλότυποι υποκινητή για το γονίδιο αυτό.

Λειτουργικά ο VCAM-1 συνδέεται με τις ιντεγκρίνες LFA1 και α4 στην οριακή ζώνη των Β λεμφοκυττάρων στα λεμφοξίδια αναστέλλοντας την απελευθέρωση των λεμφοκυττάρων (275). Επιπρόσθετα, από μελέτες φάνηκε ότι έκφραση του VCAM-1 και της ιντεγκρίνης α4β4 γίνεται από τα διαφοροποιούμενα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την διαδικασία της νεοαγγείωσης (284). Παράλληλα, μεταγραφικές αναλύσεις ανέδειξαν ότι ο VCAM-1 ενδεχομένως εμπλέκεται στην εμφάνιση πνευμονικών μεταστάσεων σε ασθενείς με καρκίνο μαστού (309).

Σχετικά με την πολλαπλή σκλήρυνση φάνηκε από μελέτες ότι ο VCAM-1 εκφράζεται σε αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση. Χαρακτηριστικά αυξημένη είναι η έκφραση στο ενδοθήλιο των αγγείων και των γύρω από αυτά ιστό, τις μήνιγγες και σε λευκοκύτταρα εντός της φαιάς και λευκής ουσίας του εγκεφάλου σε υγιείς περιοχές του εγκεφάλου (310). Παράλληλα, ο VCAM-1 φάνηκε ότι εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε περιπτώσεις υποτροπής οξείας έναρξης σε αντίθεση με τις χρονιότερες και ανενεργές μορφές. Ωστόσο, η έκφραση του VCAM-1 στο ενδοθήλιο των αγγείων εντός των απομυελινωτικών πλακών είναι λιγότερη σε σχέση με τα αγγεία σε υγιείς περιοχές, ή τουλάχιστον η ίδια. Εκτός αυτών που αναφέρθηκαν δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση του VCAM-1 με την ηλικία, το φύλο και την βαρύτητα της νόσου (310).

10.7. MADCAM (MUCOSAL ADDRESSING CELL ADHESION MOLECULE)

Ο βλεννογονικός αγγειακός παράγοντας προσκόλλησης (MADCAM Mucosal addressing cell adhesion molecule) είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που αποτελεί μόριο προσκόλλησης των λεμφοκυττάρων στα υψηλού ενδοθηλίου φλεβίδια του λεμφικού ιστού των βλεννογόνων. Εδράζεται στο 19p13.3 κοντά στο γονίδιο του ICAM-1 και το γονίδιο του ICAM-3 (311).

Μελέτες με ανοσοϊστοχημία σε εγκεφάλους ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση αλλά και ατόμων υγιών δεν ανέδειξε ιδιαίτερη διαφορά στην έκφραση του MADCAM-1 παραμένοντας αρνητική και στις δύο περιπτώσεις (310). Στο πειραματικό μοντέλο της αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας φαίνεται ότι ο MADCAM-1 προάγει την αλληλεπίδραση των ιντεγκρινών α4β7 και α4β1 με το ενδοθήλιο των αγγείων. Παρόλα αυτά δεν τεκμηριώθηκε συσχέτιση στην παθογένεση της αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας, ούτε και αλλαγή της θέσης της περιαγγειακής φλεγμονής (294).

10.8. FIBRONECTIN

Η Fibronectin αποτελεί γλυκοπρωτεΐνη υψηλού μοριακού βάρους, που ανευρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη, το εξωκυττάριο υγρό, τη βασική μεμβράνη και τον συνδετικό ιστό. Ανιχνεύονται δύο είδη της πρωτεΐνης, η διαλυτή στο πλάσμα και η ενδοκυττάρια. Ο μηχανισμός δράσης της σχετίζεται με την προσκόλληση των κυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται με την αλληλεπίδραση της fibronectin με άλλα μόρια όπως οι ιντεγκρίνες και το κολλαγόνο (312).

Το γονίδιο της fibronectin εδράζεται στο χρωμόσωμα 2q23.2-qter, ενώ έχουν ανιχνευθεί και δύο ψευδογονίδια (313). Η κύρια δράση της fibronectin είναι η συνέργεια της στην διαδικασία της προσκόλλησης των κυττάρων. Συνδέεται με το C1q και προάγει την ενδοκυττάρωση, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι βοηθάει στην κάθαρση από ανοσοσυμπλέγματα και θραύσματα κυττάρων (314). Η fibronectin σύμφωνα με μελέτες έχει φανεί ότι είναι απαραίτητη για την δημιουργία μεταστάσεων από το μελάνωμα (315). Παράλληλα φάνηκε ότι η σύνδεση της fibronectin με την ιντεγκρίνη α4 σε λευχαιμικά κύτταρα οδηγεί σε δυσμενή απάντηση στη θεραπεία και ανθεκτικότητα της οξείας μυελοβλαστικής λευχαιμίας (283). Σημαντικότερη όμως συμμετοχή της fibronectin στην παθογένεια νόσων αφορά δύο γενετικά νοσήματα, την σπειραματοπάθεια με εναποθέσεις fibronectin 2 και την σπονδυλομεταφυσιακή δυσπλασία του τύπου του γωνιώδους κατάγματος. Η πρώτη αφορά 6 οικογένειες και έχουν ανακαλυφθεί 3 ετερόζυγες μεταλλάξεις του γονιδίου της fibronectin (316). Η δεύτερη αφορά 7 οικογένειες και σχετίζεται με ετερόζυγες μεταλλάξεις του γονιδίου της fibronectin (317).

Όσο αφορά την πολλαπλή σκλήρυνση, μελέτες έχουν δείξει ότι η fibronectin αθροίζεται σε στις φλεγμαινύουσες απομυελινωτικές πλάκες λόγω της αυξημένης παραγωγής της στις περιοχές αυτές. Η διεργασία αυτή επάγεται σε καλλιέργειες αστροκυττάρων από φλεγμονώδες μεσολαβητικό λιποπολυσακχαρίδιο και αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα της επαναμυελίνωσης (318).

10.9. OSTEOPONTIN

Η osteopontin αποτελεί μέλος της ομάδας των φωσφοπρωτεϊνών. Το γονίδιο εδράζεται στο 4q21-q25 και αποτελείται από 7 εξόνια, εκ των οποίων τα 6 περιέχουν κωδικοποιούσες περιοχές (319, 320). Αποτελεί την κύρια φωσφορυλιωμένη γλυκοπρωτεΐνη των οστών, αλλά εκφράζεται και σε άλλους ιστούς σε μικρότερη ποσότητα. Η έκφραση της γίνεται κατόπιν

διέγερσης από την βιταμίνη D στους οστεοβλάστες και συνδέεται με τον υδρόξυαπατίτη. Παράλληλα αποτελεί συστατικό στοιχείο των φυσιολογικών ελαστικών ινών του δέρματος και της αορτής (321). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η osteopontin αποτελεί κυτταροκίνη με ογκοκατασταλτική δράση μέσω της δράσης της στο γονίδιο p53 (322, 323). Τέλος φάνηκε ότι η osteopontin αποτελεί μόριο σύνδεσης των T λεμφοκυττάρων (324).

Όσον αφορά την πολλαπλή σκλήρυνση πολλές μελέτες προσπάθησαν να συσχετίσουν πολυμορφισμούς του γονιδίου αυτού με την εκδήλωση και τη βαρύτητα της νόσου. Τέσσερις πολυμορφισμοί του γονιδίου δημιουργούν τρεις απλοτύπους A,B,C. Οι ομοζυγώτες για AA παρουσιάζουν 1,5 λιγότερο κίνδυνο ανάπτυξης πολλαπλής σκλήρυνσης και οι πάσχοντες παρουσιάζουν καθυστερημένη μετάπτωση σε δευτεροπαθώς προϊούσα πολλαπλή σκλήρυνση. Από την άλλη τα επίπεδα της osteopontin στους ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση είναι αυξημένα γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα της εμπλοκής της osteopontin στην ανοσολογική αντίδραση (325). Παράλληλα μελέτες σε πολυμορφισμούς έδειξαν σημαντική συσχέτιση ορισμένων με την πρόοδο της νόσου, όπως αυτή εκφράζεται με τις υποτροπές ή την άθροιση αναπηρίας (326).

11. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

11.1. ΣΚΟΠΟΣ

Η πολλαπλή σκλήρυνση είναι η συχνότερη φλεγμονώδης απομυελινωτική νόσος του ΚΝΣ. Θεωρείται ότι η εκδήλωση της νόσου συμβαίνει όταν σε ένα γενετικά προδιατεθειμένο άτομο επιδράσουν ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες (327-329), με αποτέλεσμα την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι στοιχείων της μυελίνης. Η γενετική βάση της πολλαπλής σκλήρυνσης προβληματίσε και συνεχίζει να προβληματίζει την επιστημονική κοινότητα. Μελέτες κατά το παρελθόν με στόχο την εξεύρεση γενετικών τόπων σχετιζόμενων με την νόσο απέδωσαν περισσότερους από 110 γενετικούς παράγοντες κινδύνου για εκδήλωση πολλαπλής σκλήρυνσης (330). Από την άλλη είναι αποδεδειγμένο ότι γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν την κλινική έκφραση της νόσου, όπως την ηλικία έναρξης, την βαρύτητα της νόσου καθώς και την φυσική ιστορία της (11, 331). Μελέτες του συνόλου του γονιδιώματος (GWAS), συγκεκριμένα τρεις τον αριθμό, που ασχολήθηκαν με τον συσχετισμό της σοβαρότητας της νόσου δεν κατάφεραν να αναδείξουν συγκεκριμένο γενετικό τόπο (264, 332, 333). Στο ίδιο μήκος κύματος κινήθηκε και πρόσφατη μετανάλυση 10 μελετών κοορτής. Η μετανάλυση αυτή συμπεριέλαβε 7125 ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση αλλά δεν στάθηκε δυνατόν να αποκαλύψει κάποιο αξιοσημείωτο αποτέλεσμα (334).

Η νόσος λόγω της πολυπαραγοντικής φύσης της είναι εξαιρετικά ετερογενής στους ασθενείς. Αν και έχει αποδειχθεί συσχέτιση γενετικών τόπων και της κλινικής έκφρασης της νόσου, η ετερογένεια της νόσου υποδεικνύει ότι από μόνος του ένας γενετικός τόπος δεν είναι αρκετός. Μάλλον ο συνδυασμός διαφόρων γενετικών τόπων ισχυροποιεί την γενετική προδιάθεση του ασθενούς.

Η διεργασία της φλεγμονής στην πολλαπλή σκλήρυνση είναι υπεύθυνη για την αναπηρία που προκαλεί η νόσος. Περιλαμβάνει τόσο την έμφυτη, όσο και την επίκτητη ανοσία. Για να μπορέσει να δημιουργηθεί θα πρέπει τα ανοσιακά κύτταρα και ειδικά τα λεμφοκύτταρα να περάσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να εισέλθουν στο ΚΝΣ. Η διαδικασία αυτή γίνεται με την συνέργεια μορίων προσκόλλησης στο ενδοθήλιο των αγγείων, αλλά και μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του ιστού-οργάνου στόχου (225, 335).

Η δράση της ναταλιζουμάμπης στη πολλαπλή σκλήρυνση, αναστέλλοντας την αλληλεπίδραση της ιντεγκρίνης $\alpha 4\beta 4$ με τις εξωκυττάριας πρωτεΐνες και εμποδίζοντας

επομένως τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα να εισέλθουν στο ΚΝΣ, οδήγησε σε εξαιρετικό έλεγχο της δραστηριότητας της νόσου. Παράλληλα υπέδειξε ότι τα μόρια προσκόλλησης παίζουν καίριο ρόλο στην δραστηριότητα και παθογένεια της νόσου (225, 335).

Θεωρήθηκε επομένως πιθανό ότι γενετικές παραλλαγές σε μόρια προσκόλλησης καθώς και πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας που ενέχονται στην μετανάστευση των ανοσιακών κυττάρων εντός του ΚΝΣ θα μπορούσαν να εμφανίζουν συσχέτιση με την κλινική έκφραση και πορεία της νόσου.

Βάσει της υπόθεσης αυτής σχεδιάστηκε η παρούσα μελέτη που αφορά σε μία προσπάθεια συσχέτισης γενετικών πολυμορφισμών μορίων που εμπλέκονται στην μετανάστευση ανοσιακών κυττάρων από τα αγγεία στο ΚΝΣ, με την βαρύτητα της νόσου, όπως αυτή καταγράφηκε με την κλίμακα αξιολόγησης MSSS (Multiple Sclerosis Severity Score).

Αποφασίστηκε να μελετηθούν λειτουργικοί πολυμορφισμοί εννέα γονιδίων μορίων που ενέχονται στην μετανάστευση των ανοσιακών κυττάρων στο ΚΝΣ. Τα μόρια επιλέχθηκαν διότι έχει αποδειχθεί ότι έχουν παθογενετικό ρόλο στην πολλαπλή σκλήρυνση. Έτσι αποφασίστηκε η μελέτη των γονιδίων P-selectin, integrins α4, β1 και β7, και των μορίων προσκόλλησης ICAM1, VCAM1 και MADCAM-1 καθώς επίσης και Fibronectin και Osteopontin.

Η μελέτη των ασθενών έγινε βάσει ομαδοποίησης τους σε δύο κατηγορίες βάσει της βαρύτητας της νόσου τους όπως αυτή αξιολογήθηκε με την κλίμακα MSSS. Οι ομάδες ήταν αυτή με καλοήγη ΠΣ (MSSS 1-2), και μη καλοήγη μορφή (MSSS 3-10).

Η μελέτη περιέλαβε συνολικά 389 ασθενείς με τεκμηριωμένη πολλαπλή σκλήρυνση. Οι ασθενείς προέρχονταν από την περιοχή της Λάρισας, της Θεσσαλονίκης και της Κύπρου.

11.2. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ

11.2.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΣΘΕΝΩΝ

Επιλέχθηκαν ασθενείς από τρία νευρολογικά κέντρα, το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, το Νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ της Θεσσαλονίκης και το Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής της Κύπρου. Συνολικά το δείγμα της μελέτης αποτελούνταν από 389 ασθενείς, εκ των οποίων 206 προέρχονταν από τη Λάρισα, 79 από την Θεσσαλονίκη και 104 από την Κύπρο.

Οι ασθενείς ήταν όλοι άνω των 18 ετών, είχαν διαγνωστεί με διαλείπουσα υποτροπιάζουσα πολλαπλή σκλήρυνση βάσει των αναθεωρημένων κριτηρίων McDonald 2010 και η διάρκεια της νόσου τους ήταν τουλάχιστον 5 χρόνια. Ασθενείς με προϊούσα μορφή ΠΣ αποκλείστηκαν από την μελέτη.

Από τους ασθενείς ελήφθη γραπτώς συγκατάθεση για την συμμετοχή τους στη μελέτη, ενώ προηγήθηκε η έγκριση της διεξαγωγής της μελέτης βάσει της σχετικής νομοθεσίας.

Καταγράφηκαν τα εξής δημογραφικά στοιχεία των ασθενών:

-το φύλο

-ηλικία έναρξης της νόσου.

-ηλικία κατά την περίοδο διεξαγωγής της μελέτης.

-χρονικό διάστημα από την διάγνωση.

-νοσοτροποποιητική θεραπεία (οι ασθενείς λάμβαναν ως θεραπεία ιντερφερόνη-β, οξική γλατιραμέρη ή ναταλιζουμάμπη).

-αναπηρία του ασθενούς βάσει των κλιμάκων EDSS και MSSS.

Από τους ασθενείς έγινε λήψη περιφερικού αίματος για απομόνωση DNA για τους σκοπούς της μελέτης.

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν και 336 υγιείς μάρτυρες εθελοντικά από την ίδια γεωγραφική περιοχή με τους ασθενείς. Η ένταξη των μαρτύρων έγινε κατά περίπτωση με βάση το φύλο και την ηλικία.

11.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ

11.3.1.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της εξαλάτωσης. Η απομόνωση του DNA γίνεται από εμπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος και είναι σημαντικό να μην έχει προσμίξεις πρωτεϊνών και να μην είναι τεμαχισμένο σε μικρά κομμάτια.

Απαιτούνται 10 ml περιφερικού αίματος σε EDTA.

Στη διαδικασία χρησιμοποιούνται τα εξής:

A) Διάλυμα διάσπασης των πυρήνων Lysis I [NH_4Cl (155mM), KHCO_3 (10mM), EDTA(1mM), pH 7,4]

Διάλυμα διάσπασης των πυρήνων Lysis II [Tris(10mM), NaCl(400mM), di-Na EDTA(2mM), pH 8,2]

Τα διαλύματα Lysis I, II συντελούν στην διάσπαση των πυρηνικών μεμβρανών για την απελευθέρωση του DNA. Παράλληλα δεσμεύουν τα δισθενή κατιόντα (Ca^{2-} , Mg^{2+}) που είναι απαραίτητα για την δράση των νουκλεασών. Σκοπός είναι η αδρανοποίηση των ενζύμων αυτών για αποφυγή του τεμαχισμού του DNA σε μικρά κομμάτια.

Διάλυμα πρωτεΐνάσης K (10mg/ml)

Η πρωτεΐνάση K συντελεί στην πέψη των ιστονών και άλλων πρωτεϊνών με τις οποίες είναι συνδεδεμένο το DNA.

Δ) Διάλυμα 10%w/v SDS (sodium dodecyl sulfate)

Το SDS είναι ανιονικό αποδιατακτικό και συντελεί στη δέσμευση των λιπιδίων και επομένως στη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης, ενώ παίζει ρόλο στην αποδιάταξη της χρωματίνης και των συνδεδεμένων με το DNA πρωτεϊνών.

E) Κορεσμένο διάλυμα NaCl 6M

Z) Απόλυτη αιθανόλη

H) CH_3COONa 3M

Θ) Πηκτή αγαρόζης

Η διαδικασία της απομόνωσης έχει τρία στάδια και γίνεται σε τρεις ημέρες

1^η μέρα

-τοποθετείται το αίμα σε φιαλίδιο πολυπροπυλενίου των 15ml και αραιώνεται με δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) έως 12 ml. ακολουθεί ανάδευση για λύση των ερυθροκυττάρων.

Φυγοκέντρηση για 15 min στις 3500rpm στους 40 βαθμούς, για απομόνωση των εμπύρηνων κυττάρων.

Απόρριψη του υπερκειμένου. Αραίωση του ιζήματος με ddH₂O έως 12ml και καλή ανάδευση.

Φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες με την πρώτη για 15 min.

Απόρριψη του υπερκειμένου και αραίωση του ιζήματος με το διάλυμα Lysis I ως τα 12 ml.

Φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες για 15 min.

Εκ νέου απόρριψη του υπερκειμένου και επανάληψη του σταδίου με το Lysis I. Ομοίως νέα φυγοκέντρηση.

Απόρριψη του υπερκειμένου και αραίωση του ιζήματος με το διάλυμα Lysis II έως 6ml. Καλή ανάδευση και επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου.

Προσθήκη 750μl SDS 10%w/v και 100μl πρωτεϊνάση K 10mg/ml

Επώαση σε υδατόλουτρο στους 37 βαθμούς για 16 με 18 ώρες.

2^η μέρα

Προσθήκη 2ml 6M NaCl. Ανάδευση ισχυρή για 15 δευτερόλεπτα.

Φυγοκέντρηση στις 3500rpm στους 40 βαθμούς για 15 min

Μετάγγιση του υπερκειμένου σε καθαρό σωληνάριο των 50ml και απόρριψη του ιζήματος. Στο υπερκείμενο βρίσκεται το DNA.

Προσθήκη απόλυτης αιθανόλης στο σωληνάριο σε ποσότητα διπλάσια από αυτή του διαλύματος και CH₃COONa σε ποσότητα ίση με το 10% του διαλύματος. Το DNA καθιζάνει στο φιαλίδιο.

Επώαση για μία νύχτα στους 20 βαθμούς.

3^η μέρα

Φυγοκέντρηση για 50 min στις 3500rpm στους 40 βαθμούς.

Απόρριψη του υπερκειμένου. Ξέπλυμα του DNA με αιθανόλη 70% και εισαγωγή σε σωληνάριο Eppendorf.

Φυγοκέντρηση για 30min στις 12000rpm στους 40 βαθμούς.

Απόρριψη του υπερκειμένου και επανάληψη του προηγούμενου βήματος δύο φορές αλλά για 20 min η κάθε φυγοκέντρηση.

Ακολουθως απόρριψη του υπερκειμένου και κάλυψη με παραφίλμ του σωληναρίου του οποίο έχει τρυπηθεί. Τοποθέτηση στους 4 βαθμούς.

Το DNA συντηρείται στους -20 βαθμούς.

Η ποιότητα του DNA που απομονώθηκε ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης με προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου. Το DNA γίνεται ορατό με λυχνία υπεριώδους ακτινοβολίας.

Μετά το πέρας της διαδικασίας που αναφέρθηκε ανωτέρω υπολογίζεται η συγκέντρωση του DNA. Η απλούστερη διαδικασία είναι η φωτομέτρηση.

Είναι γνωστό ότι το DNA απορροφά ακτινοβολία στα 260nm. Επομένως μετράται η οπτική πυκνότητα αραιωμένου διαλύματος 1:100 σε μήκος κύματος 260nm και 280nm σε ειδική κυψελίδα από χαλαζία. Η απορρόφηση στα 260nm αντιστοιχεί στο DNA ενώ στα 280nm σε πρωτεΐνες και άλλα συστατικά. Ο λόγος της οπτικής πυκνότητας 260/280 δίνει την καθαρότητα του DNA. Τιμές μεταξύ 1,7 και 1,9 αντιστοιχούν σε ικανοποιητικά καθαρό DNA.

Η συγκέντρωση υπολογίζεται με βάση το γεγονός ότι οπτική πυκνότητα ίση με 1 στα 260nm αντιστοιχεί σε πυκνότητα DNA 50μg/ml.

Επομένως η συγκέντρωση υπολογίζεται από τον τύπο: αραίωση x 50 x (οπτική πυκνότητα στα 260nm)

11.3.1.2. ΑΛΥΣΙΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR Polymerase Chain Reaction)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία διαδικασία με την οποία γίνεται πολλαπλασιασμός μίας συγκεκριμένη αλληλουχίας DNA από πολύ μικρή αρχική ποσότητα. Αυτό δίνει την δυνατότητα της μελέτης της αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει.

Η διαδικασία βασίζεται στην αντιγραφή του DNA όπως αυτή είναι γνωστή από την βιολογία. Το DNA αποτελούμενο από δύο αλυσίδες, αποδιατάσσεται και με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης αντιγράφεται, χρησιμοποιώντας σαν εκμαγείο την μονή έλικα.

Η διαδικασία αυτή in vitro απαιτεί Taq DNA πολυμεράση και συγκεκριμένο εκκινητή που υβριδίζεται σε συγκεκριμένη αλληλουχία στο DNA και από το σημείο αυτό άρχεται η αντιγραφή. Χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα δύο εκκινητές (primer) συμπληρωματικοί των

δύο ελίκων που καθορίζουν το τμήμα που θα αντιγραφεί. Η διαδικασία αυτή γίνεται πολλές συνεχόμενες φορές αποδίδοντας μεγάλη ποσότητα του επιθυμητού τμήματος DNA.

In vitro η διαδικασία γίνεται σε ειδικό μηχάνημα που λέγεται θερμοκυκλοποιητής και έχει τα ακόλουθα στάδια:

1. Θερμική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation)
2. Σύνδεση των εκκινητών και υβριδισμός τους στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες (primer annealing)
3. Σύνθεση του DNA με την παρουσία Taq πολυμεράσης και dNTPS. Η σύνθεση του DNA ακολουθεί πάντα πορεία από το 5' άκρο προς το 3' (extension)

Η διαδικασία περιλαμβάνει εναλλαγές της θερμοκρασίας με αρχική υψηλή θερμοκρασία για αποδιάταξη της διπλής έλικας, ακολούθως χαμηλή θερμοκρασία για την σύνδεση των εκκινητών και τέλος μία ενδιάμεση θερμοκρασία για το στάδιο της επιμήκυνσης του DNA.

11.3.1.3. ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ Taqman

Για την εύρεση πολυμορφισμών σε συγκεκριμένη αλληλουχία DNA, γίνεται χρήση της μεθόδου γονοτύπησης Taqman. Η διαδικασία αυτή επί της ουσίας είναι Real time PCR. Χρησιμοποιείται ένας Taqman ιχνηθέτης, ο οποίος είναι συμπληρωματικός προς τον πολυμορφισμό που μας ενδιαφέρει, και περιέχει δύο χρωστικές. Σκοπός των δύο χρωστικών είναι η ανάδειξη του πολυμορφισμού. Αυτό επιτυγχάνεται με μία φθορίζουσα χρωστική σε συνδυασμό με μία που εξουδετερώνει το σήμα της φθορίζουσας όταν είναι κοντά. Ο ιχνηθέτης συνδέεται με την συμπληρωματική προς αυτόν ακολουθία. Ακολουθεί υδρόλυση του ιχνηθέτη από την Taq πολυμεράση και αποκοπή του άκρου του. Επομένως απομακρύνεται από την χρωστική που απορροφά το σήμα και επομένως φθορίζει. Αυτό συμβαίνει σε περίπτωση ύπαρξης του πολυμορφισμού. Σε αντίθετη περίπτωση ο ιχνηθέτης δεν υδρολύεται και επομένως δεν υπάρχει φθορισμός. Η ύπαρξη και η ένταση του φθορισμού αποκαλύπτει τον εκάστοτε γονότυπο. Στην περίπτωση της μελέτης αυτής η γονοτύπηση έγινε με ABI PRISM 7900 Sequence Detection System, ενώ η ανάλυση με το λογισμικό SDS (Applied Biosystems, Foster City, USA).

11.4. ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ

Η επιλογή των πολυμορφισμών των γονιδίων γονιδίων P- selectin, integrins α4, β1 και β7, και των μορίων προσκόλλησης ICAM1, VCAM1 και MADCAM-1, Fibronectin και

Osteopontin έγινε με προσπάθεια να καλυφθεί όσο το δυνατόν περισσότερο η γενετική ποικιλομορφία των γονιδίων. Η εντόπιση έγινε με την χρήση του αλγόριθμου σήμανσης διαταραχής ανισοροπίας σύνδεσης του HarMap project. Η εντόπιση έγινε σε πληθυσμούς CEU (καυκάσιοι) και Tuscan in Italy (ως πλησιέστεροι στον ελληνικό πληθυσμό) και βασίστηκε στο Har Map Release 27 Phase I+II February 09 on NCBI B36 assembly, dbSNP b126. Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή των πολυμορφισμών ήταν ο δείκτης r^2 να είναι μεγαλύτερος ή ίσος του 0,8 και η συχνότητα του ελάσσονος αλληλομόρφου να είναι μεγαλύτερη από 0,05.

Βάσει των παραπάνω επιλέχθηκαν 32 SNP για το γονίδιο της P-selectin, 36 SNP για το γονίδιο της ιντεγκρίνης $\alpha 4$, 16 SNP για το γονίδιο της ιντεγκρίνης $\beta 1$, 3 SNP για το γονίδιο της ιντεγκρίνης $\beta 7$, 5 SNP για το γονίδιο του ICAM, 15 SNP για το γονίδιο του VCAM, 38 SNP για το γονίδιο της fibronectin και 8 SNP για το γονίδιο της osteopontin.

Οι πολυμορφισμοί καθώς και το χρωμόσωμα και η θέση εντός αυτού που εδράζονται, η συχνότητα τους σε CEU και TSI πληθυσμούς και η συχνότητα του ελάσσονος αλληλομόρφου στο δείγμα της μελέτης του κάθε πολυμορφισμού φαίνονται στους κατωτέρω πίνακες αναλυτικά.

P-SELECTIN

Αριθμός rs	Χρωμόσωμα	Θέση στο χρωμόσωμα	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε CEU πληθυσμό	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε TSI πληθυσμό	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου στο δείγμα της μελέτης
rs732314	chr1	167865878	0.460	0.494	0.470
rs3917862	chr1	167859737	0.075	0.045	0.071
rs3917683	chr1	167857997	0.407	0.455	0.436
rs3917686	chr1	167857788	0.097	0.131	0.078
rs2244529	chr1	167853656	0.314	0.330	0.293
rs2244526	chr1	167853570	0.084	0.098	0.065
rs3917709	chr1	167851169	0.080	0.102	0.067
rs2236868	chr1	167850620	0.500	0.409	0.498
rs3917714	chr1	167850053	0.062	0.040	0.044
rs6125	chr1	167848941	0.068	0.046	0.042
rs3917727	chr1	167847882	0.354	0.261	0.439
rs6131	chr1	167847509	0.221	0.193	0.203
rs3917731	chr1	167847341	0.288	0.222	0.306

rs3917739	chr1	167846002	0.358	0.375	0.339
rs3917740	chr1	167845890	0.252	0.193	0.197
rs2076074	chr1	167845210	0.236	0.270	0.160
rs3917744	chr1	167844614	0.372	0.324	0.436
rs2142760	chr1	167843957	0.425	0.483	0.390
rs3917768	chr1	167839571	0.403	0.489	0.389
rs2205895	chr1	167839269	0.354	0.386	0.338
rs3917779	chr1	167837472	0.112	0.114	0.038
rs2420378	chr1	167836542	0.354	0.369	0.327
rs3917786	chr1	167836069	0.469	0.398	0.466
rs3917788	chr1	167835343	0.066	0.102	0.040
rs3917792	chr1	167834456	0.186	0.238	0.217
rs6127	chr1	167832937	0.482	0.409	
rs3917824	chr1	167831206	0.115	0.119	
rs1569471	chr1	167830754	0.181	0.222	0.217
rs6128	chr1	167829528	0.156	0.170	0.183
rs3917843	chr1	167826881	0.064	0.045	0.049
rs3917853	chr1	167825950	0.053	0.102	0.053
rs3917854	chr1	167825659	0.301	0.278	0.232

Πίνακας 4. P-ELECTING

INTEΓΚΡΙΝΗ α4

Αριθμός rs	Χρωμόσωμα	Θέση στο χρωμόσωμα	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε CEU πληθυσμό	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε TSI πληθυσμό	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου στο δείγμα της μελέτης
rs12988934	chr2	182031910	0.071	0.085	0.049
rs3770138	chr2	182034152	0.252	0.261	0.249
rs10930969	chr2	182036202	0.248	0.256	0.257
rs2124440	chr2	182036459	0.465	0.449	0.430
rs3770136	chr2	182037705	0.252	0.256	0.254
rs155149	chr2	182037892	0.195	0.159	0.360
rs3770132	chr2	182041206	0.097	0.102	0.168
rs1449260	chr2	182041692	0.218	0.182	
rs711801	chr2	182043118	0.124	0.080	0.490
rs1449264	chr2	182044719	0.345	0.352	0.329
rs1449265	chr2	182045050	0.478	0.455	0.445
rs3770126	chr2	182045129	0.354	0.284	0.332

rs11694175	chr2	182046272	0.456	0.494	0.445
rs17224277	chr2	182048689	0.111	0.040	0.106
rs155087	chr2	182049919	0.198	0.230	0.198
rs2305588	chr2	182055317	0.235	0.244	0.264
rs155099	chr2	182057111	0.190	0.227	0.228
rs3755021	chr2	182057654	0.241	0.256	0.268
rs155103	chr2	182058988	0.199	0.229	0.248
rs155106	chr2	182059597	0.425	0.472	0.471
rs3770120	chr2	182060714	0.320	0.341	0.283
rs155110	chr2	182061036	0.400	NA	
rs17225354	chr2	182061849	0.412	0.385	0.456
rs2305586	chr2	182068427	0.104	0.199	0.167
rs4667310	chr2	182071088	0.128	0.068	0.052
rs7607758	chr2	182075156	0.442	0.415	0.461
rs11689738	chr2	182077191	0.381	0.369	0.345
rs10204136	chr2	182084156	0.367	0.347	
rs12469449	chr2	182087968	0.372	0.364	0.317
rs16867437	chr2	182093888	0.138	0.062	
rs6721763	chr2	182094233	0.496	0.420	0.437
rs6728886	chr2	182101354	0.369	0.364	0.311
rs6707704	chr2	182103199	0.500	0.420	0.369
rs1449259	chr2	182106574	0.133	0.062	0.054
rs7562325	chr2	182107342	0.496	0.420	
rs1047307	chr2	182109997	0.301	0.341	0.407

Πίνακας 5. INTEKPINH α4

INTEKPINH β1

Αριθμός rs	Χρωμόσωμα	Θέση στο χρωμόσωμα	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε CEU πληθυσμό	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε TSI πληθυσμό	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου στο δείγμα της μελέτης
rs11009157	chr10	33282407	0.257	0.256	0.282
rs1187070	chr10	33281144	0.159	0.222	0.150
rs1009002	chr10	33276907	0.469	0.398	0.375
rs2488336	chr10	33276311	0.401	0.477	0.500
rs10827164	chr10	33272634	0.323	0.335	0.408
rs16933819	chr10	33267483	0.147	0.210	0.166
rs9417094	chr10	33267386	0.122	NA	0.136
rs2504001	chr10	33264893	0.388	0.460	0.379

<i>rs2488331</i>	<i>chr10</i>	33263770	0.286	0.420	0.375
<i>rs10763902</i>	<i>chr10</i>	33258082	0.257	0.312	0.245
<i>rs3780873</i>	<i>chr10</i>	33253686	0.093	0.040	0.070
<i>rs4587680</i>	<i>chr10</i>	33240788	0.111	0.102	0.120
<i>rs2488320</i>	<i>chr10</i>	33238917	0.412	0.483	0.487
<i>rs1316757</i>	<i>chr10</i>	33237203	0.119	0.170	0.192
<i>rs2488318</i>	<i>chr10</i>	33235175	0.138	0.209	0.186
<i>rs2153875</i>	<i>chr10</i>	33230573	0.257	0.273	0.362

Πίνακας 6. INTEΓΚΡΙΝΗ β1

INTEΓΚΡΙΝΗ β7

Αριθμός rs	Χρωμόσωμα	Θέση στο χρωμόσωμα	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε CEU πληθυσμό	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε TSI πληθυσμό	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου στο δείγμα της μελέτης
<i>rs3825084</i>	<i>chr12</i>	51880198	0.186	0.170	0.282
<i>rs2272300</i>	<i>chr12</i>	51873735	0.062	0.062	0.060
<i>rs11170465</i>	<i>chr12</i>	51872092	0.058	0.045	0.091

Πίνακας 7. INTEΓΚΡΙΝΗ β7

ICAM-1

Αριθμός rs	Χρωμόσωμα	Θέση στο χρωμόσωμα	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε CEU πληθυσμό	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε TSI πληθυσμό	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου στο δείγμα της μελέτης
<i>rs5030390</i>	<i>chr19</i>	10243537	0.115	0.091	0.100
<i>rs1799969</i>	<i>chr19</i>	10255792	0.098	0.080	0.106
<i>rs5498</i>	<i>chr19</i>	10256683	0.398	0.483	0.460
<i>rs3093032</i>	<i>chr19</i>	10257336	0.155	0.102	0.180
<i>rs281437</i>	<i>chr19</i>	10258238	0.310	0.273	0.500

Πίνακας 8. ICAM-1

VCAM

Αριθμός rs	Χρωμόσωμα	Θέση στο χρωμόσωμα	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε CEU πληθυσμό	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε TSI πληθυσμό	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου στο δείγμα της μελέτης
rs3176860	chr1	100959807	0.336	0.420	0.459
rs3176861	chr1	100959909	0.241	NA	0.240
rs3917009	chr1	100961998	0.111	NA	0.093
rs3917010	chr1	100963454	0.217	NA	0.248
rs3765685	chr1	100965581	0.076	NA	0.193
rs3176867	chr1	100966793	0.216	0.218	0.206
rs3917012	chr1	100968247	0.270	0.278	0.354
rs3176869	chr1	100969021	0.136	NA	0.279
rs3181088	chr1	100971296	0.196	0.140	0.118
rs2209627	chr1	100971735	0.108	NA	0.212
rs3176876	chr1	100973196	0.267	NA	0.468
rs3917016	chr1	100973735	0.125	NA	0.142
rs3917018	chr1	100974810	0.305	0.364	0.458
rs3917019	chr1	100974942	0.250	NA	0.236
rs3176878	chr1	100976286	0.155	0.176	0.148

Πίνακας 9. VCAM

MADCAM

Αριθμός rs	Χρωμόσωμα	Θέση στο χρωμόσωμα	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε CEU πληθυσμό	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε TSI πληθυσμό	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου στο δείγμα της μελέτης
rs12982646	chr19	450978	0.261	0.193	0.151
rs6510810	chr19	451359	0.058	0.028	0.207
rs3745925	chr19	452900	0.171	0.261	0.250

Πίνακας 10. MADCAM

FIBRONECTIN 1

Αριθμός rs	Χρωμόσωμα	Θέση στο χρωμόσωμα	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε CEU πληθυσμό	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε TSI πληθυσμό	Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου στο δείγμα της μελέτης
rs1250258	chr2	216008430	0.214	0.250	0.406
rs2577290	chr2	216007795	0.261	0.330	0.283
rs1250246	chr2	216007526	0.473	0.477	0.366
rs1898536	chr2	216005476	0.274	0.193	0.157
rs1250250	chr2	215997588	0.266	0.345	0.298
rs11693652	chr2	215997040	0.270	0.193	0.154
rs16854041	chr2	215995742	0.270	0.222	0.280
rs1250249	chr2	215995521	0.252	0.347	0.269
rs1250248	chr2	215995338	0.205	0.239	0.261
rs17517509	chr2	215993019	0.259	0.347	0.301
rs1437799	chr2	215991238	0.314	0.267	0.226
rs12105173	chr2	215990926	0.319	0.261	
rs724617	chr2	215990726	0.414	0.364	0.434
rs13021679	chr2	215984620	0.268	NA	0.288
rs2372545	chr2	215981870	0.354	0.369	0.436
rs7575234	chr2	215977147	0.288	0.335	0.298
rs7572169	chr2	215976689	0.274	0.335	0.297
rs10172425	chr2	215976600	0.350	0.364	0.361
rs34255697	chr2	215974470	0.344	0.364	0.436
rs1525351	chr2	215971611	0.385	0.398	0.477
rs2692228	chr2	215968123	0.398	0.402	0.477
rs1968510	chr2	215966496	0.087	0.085	
rs11883812	chr2	215965226	0.084	0.062	0.172
rs10804242	chr2	215964952	0.372	0.381	0.422
rs6709607	chr2	215964860	0.372	0.379	0.419
rs7588661	chr2	215961699	0.389	0.420	0.437
rs13652	chr2	215957832	0.115	0.097	0.120
rs13432972	chr2	215956705	0.281	0.205	0.314
rs1250203	chr2	215956550	0.084	0.097	0.131
rs7608342	chr2	215954325	0.353	0.375	0.432
rs6707530	chr2	215948829	0.274	0.324	0.292
rs1250211	chr2	215941943	0.447	0.330	0.311
rs2289200	chr2	215941223	0.301	0.307	0.280
rs7568287	chr2	215940801	0.372	0.273	0.221
rs33996776	chr2	215940353	0.239	0.352	0.321

<i>rs10498037</i>	<i>chr2</i>	<i>215938461</i>	<i>0.076</i>	<i>0.051</i>	<i>0.085</i>
<i>rs7579867</i>	<i>chr2</i>	<i>215938095</i>	<i>0.335</i>	<i>0.273</i>	<i>0.195</i>
<i>rs11651</i>	<i>chr2</i>	<i>215937937</i>	<i>0.279</i>	<i>0.358</i>	<i>0.265</i>

Πίνακας 11. FIBRONECTIN 1

OSTEOPONTIN

<i>Αριθμός rs</i>	<i>Χρωμόσωμα</i>	<i>Θέση στο χρωμόσωμα</i>	<i>Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε CEU πληθυσμό</i>	<i>Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε TSI πληθυσμό</i>	<i>Συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου στο δείγμα της μελέτης</i>
<i>rs2853749</i>	<i>chr4</i>	<i>89116838</i>	<i>0.350</i>	<i>NA</i>	<i>0.378</i>
<i>rs11728697</i>	<i>chr4</i>	<i>89117965</i>	<i>0.460</i>	<i>0.426</i>	<i>0.472</i>
<i>rs6840362</i>	<i>chr4</i>	<i>89118944</i>	<i>0.270</i>	<i>0.261</i>	<i>0.276</i>
<i>rs6532040</i>	<i>chr4</i>	<i>89121226</i>	<i>0.333</i>	<i>NA</i>	<i>0.354</i>
<i>rs6811536</i>	<i>chr4</i>	<i>89121429</i>	<i>0.284</i>	<i>0.256</i>	<i>0.252</i>
<i>rs4754</i>	<i>chr4</i>	<i>89121716</i>	<i>0.226</i>	<i>0.374</i>	<i>0.247</i>
<i>rs1126772</i>	<i>chr4</i>	<i>89123210</i>	<i>0.195</i>	<i>0.250</i>	<i>0.148</i>
<i>rs9138</i>	<i>chr4</i>	<i>89123366</i>	<i>0.158</i>	<i>NA</i>	<i>0.214</i>

Πίνακας 12. OSTEOPONTIN

Η ανωτέρω γονοτύπηση έγινε με Taqman 5' νουκλεάση και ήταν επιτυχής σε ποσοστό μεγαλύτερο του 96%. Παρόλα αυτά 9 SNP δεν κατέστη δυνατόν να γονοτυπηθούν και ως εκ τούτου εξαιρέθηκαν από την μελέτη. Οι SNP αυτοί είναι οι εξής: από το γονίδιο της P-selectin οι rs6127, rs3917824, από το γονίδιο της ιντεγκρίνης α4 οι rs1449260, rs155110, rs10204136, rs16867437, rs7562325, και από το γονίδιο της fibronectin οι rs12105173 και rs1968510.

12. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Ο έλεγχος ποιότητας πραγματοποιήθηκε αξιολογώντας τις γονοτυπικές κατανομές με την ισορροπία Hardy-Weinber όλων των SNPs στα δείγματα ελέγχου, διενεργήθηκε test επανατυχαιοποίησης χρησιμοποιώντας με όριο στατιστικής σημαντικότητας το $P \leq 0.05$ (αρθρ 17). Η μέση συχνότητα κάθε αλληλομόρφου εκτιμήθηκε και χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ποιότητας (όριο κατωφλιού $<0.05\%$). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης για την ηλικία κατά την έναρξη της ασθένειας και την MSSS, για έλεγχο της συσχέτισης. Το όριο σημαντικότητας τέθηκε εξ αρχής σε μια προερχόμενη από μεταλλαγή P value 0.01. Οι αναλύσεις για την ηλικία κατά την έναρξη της νόσου προσαρμόστηκαν κατά φύλο και τόπο. Οι αναλύσεις με την MSSS, ως εξαρτημένη μεταβλητή, προσαρμόστηκαν επιπροσθέτως ως προς την ηλικία κατά την έναρξη της νόσου και την θεραπεία. Για την θεραπεία ειδικότερα, η διάρκεια θεραπείας με ΔΜΤ σε μήνες χρησιμοποιήθηκε ως συγχυτικός παράγοντας, ώστε οποιαδήποτε επίδραση να μην οφείλεται στη διάρκεια της θεραπείας.

Δοκιμασίες επανατυχαιοποίησης εφαρμόστηκαν 10^6 φορές. Ο σκοπός ήταν η προσαρμογή πολλαπλών δοκιμασιών για γνωστούς και άγνωστους παράγοντες, οι οποίοι θα επηρέαζαν την ισορροπία της κατανομής των στοιχείων προς μελέτη.

Η εκτίμηση της σημαντικότητας των SNP κάθε συμμετέχοντα έγινε με πολλαπλές μεταθέσεις με 2 βαθμούς ελευθερίας. Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SNPStats.

Ακολούθησε διόρθωση κατά Bonferroni λόγω της διενέργειας πολλαπλών συσχετίσεων. Στατιστικά σημαντικό θεωρήθηκε το $p < 0,005$.

12.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συνολικά μελετήθηκαν 389 ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση. Από αυτούς 206 προέρχονταν από το κέντρο ΠΣ της Λάρισας, 79 από το κέντρο ΠΣ της Θεσσαλονίκης και 104 από το κέντρο ΠΣ της Κύπρου. Η αναλογία γυναικών προς άνδρες ήταν 2:1 περίπου. Το 70% των ασθενών λάμβανε κάποια νοσοτροποποιητική θεραπεία με το μέσο όρο διάρκειας νόσου να είναι τα 12,9 έτη. Η μέση τιμή της βαθμολογίας στην EDSS κλίμακα ήταν 3,4, αν και οι μισοί περίπου από τους ασθενείς παρουσίαζαν βαθμολογία μικρότερη του 3. Σχετικά με την βαρύτητα της νόσου μετρημένη με την κλίμακα MSSS, μόνο το 20% των ασθενών εντάχθηκε στην κατηγορία της μη καλοήθους πολλαπλής σκλήρυνσης, οπότε και παρουσίαζε

βαθμολογία στην MSSS κλίμακα 3-10. Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι οι ασθενείς που προέρχονταν από την Κύπρο παρουσίαζαν σημαντικά καλύτερη εικόνα ως προς την αναπηρία και την πρόοδο αυτής μετρημένη με τις κλίμακες MSSS και EDSS ($p < 0,05$). Στους παρακάτω τρεις πίνακες παρίστανται αναλυτικά τα ανωτέρω αποτελέσματα.

	Συνολικοί ασθενείς	Συνολικοί μάρτυρες	Ασθενείς Λάρισας	Μάρτυρες Λάρισας	Ασθενείς Θεσ/κης	Ασθενείς Κύπρου	Μάρτυρες Κύπρου
Αριθμός ασθενών	389	336	206	209	79	104	127
Γυναίκες	251/64,5%	234/69,6%	126/61,2%	146/69,9%	51/64,6%	74/71,2%	88/69,3%
Άνδρες	138/35,5%	102/30,4%	80/38,8%	63/30,1%	28/35,4%	30/28,8%	39/30,7%
Λόγος Γ/Α	1,8:1	2,3:1	1,6:1	2,3:1	1,8:1	2,5:1	2,3:1
Ηλικία έναρξης νόσου/μέση τιμή	30,4 (18-63)		29,0 (18-63)		27,9 (18-50)	35,3 (18-58)	
Ηλικία κατά τη μελέτη/μέση τιμή	43,3 (23-74)	36,3 (23-78)	43,0 (23-74)	29,6 (23-58)	41,9 (23-63)	43,8 (25-66)	47,4 (20-78)
Διάρκεια νόσου/μέση τιμή	12,9		12,77		13,90	12,44	
Διάμεσος διάρκεια νόσου	11 (5-52)		10 (5-52)		12 (5-38)	11 (5-35)	
Λήψη θεραπείας	271/69,7%		131/63,6%		69/87,3%	71/68,3%	
Μέση τιμή χρόνου θεραπείας σε μήνες	72,1/44,2		70,4/43,3		73,9/40,2	73,6/49,6	

Πίνακας 13. Δημογραφικά χαρακτηριστικά συμμετεχόντων

EDSS	Συνολικοί ασθενείς	Ασθενείς Λάρισας	Ασθενείς Θεσ/κης	Ασθενείς Κύπρου
<3	188/47,8%	84/40,0%	33/41,8%	69/66,3%
3 έως <6	114/29,3%	54/26,2%	33/41,8%	27/26,0%
6 έως 6,5	40/10,3%	25/21,1%	9/1,4%	6/5,8%
>=7	35/9,0%	31/15,0%	2/2,5%	2/1,9%
Μέση τιμή	3,40	3,83	3,51	2,44
Δείκτης εξέλιξης αναπηρίας	0,31	0,34	0,35	0,22

Πίνακας 14. Αναπηρία στους συμμετέχοντες βάσει EDSS

MSSS	Συνολικοί ασθενείς	Ασθενείς Λάρισας	Ασθενείς Θεσ/κης	Ασθενείς Κύπρου
Διάμεσος	4,0	5	5,00	3,00
Μέση τιμή	4,39	4,92	4,71	3,18
Καλοήθης μορφή¹	109/28%	51/24,8%	9/11,4%	49/47,1%
Μη καλοήθης μορφή²	86/22%	61/29,6%	16/20,3%	9/8,7%

1^ο: Καλοήθης μορφή MSSS 1-2, 2^ο: Μη καλοήθης μορφή MSSS 3-10

Πίνακας 15. Αναπηρία με βάση την κλίμακα MSSS

Από την γενόμενη στατιστική ανάλυση προέκυψαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα ως προς την κατανομή των πολυμορφισμών των ελεγχθέντων γονιδίων σχετικά με την αναπηρία εκφρασμένη με την κλίμακα MSSS. Από τον έλεγχο με γραμμική παλινδρόμηση προέκυψε ότι 4 πολυμορφισμοί του γονιδίου της Ιντεγκρίνης α4 είχαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την αναπηρία. Επίσης ένας πολυμορφισμός της ιντεγκρίνης β1 επίσης έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Τέλος δύο πολυμορφισμοί της fibronectin και ένας της osteopontin εμφάνισαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Η στάθμη σημαντικότητας ήταν $p < 0,05$.

Οι πολυμορφισμοί αυτοί φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Ιντεγκρίνη α4	Ιντεγκρίνη β1	Fibronectin	Osteopontin
rs10930969	rs3780873	rs1250258	rs9138
rs2124440		rs13432972	
rs3770136			
rs6721763			
p<0,05			

Πίνακας 16. Πολυμορφισμοί γονιδίων με συσχέτιση με την MSSS

Στους επόμενους πίνακες θα παρασταθούν η κατανομή των πολυμορφισμών στον πληθυσμό της μελέτης σε συνδυασμό με την βαθμολογία στην MSSS κλίμακα και τα αποτελέσματα στην ανάλυση με την γραμμική παλινδρόμηση.

Πίνακας 17. Αποτελέσματα για το γονίδιο της P-selectin

Πολυμορφισμός	Γονότυπος	Αριθμός	Ποσοστό	MSSS Μέση τιμή	MSSS Τυπική απόκλιση	Βήτα συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης	p-value
rs732314	AA	141	0.3801	3.831	2.498	-0.04715	0.7762
	Ab	117	0.3154	4.239	2.759		
	Bb	113	0.3046	3.704	2.637		
rs3917862	AA	317	0.8544	3.978	2.652	-0.1431	0.6423
	Ab	44	0.1186	3.331	2.402		
	Bb	10	0.02695	4.696	2.584		
rs3917683	AA	85	0.2291	4.056	2.813	0.00325	0.9872
	Ab	202	0.5445	3.81	2.647		
	Bb	84	0.2264	4.051	2.392		
rs3917686	AA	311	0.8383	3.876	2.614	0.3489	0.237
	Ab	49	0.1321	3.93	2.661		
	Bb	11	0.02965	5.161	2.797		
rs2244529	AA	173	0.4663	4.082	2.729	-0.09963	0.5952
	Ab	139	0.3747	3.662	2.451		
	Bb	59	0.159	4.06	2.716		
rs2244526	AA	315	0.8491	3.911	2.634	0.1617	0.5966
	Ab	46	0.124	3.797	2.59		
	Bb	10	0.02695	4.806	2.674		
rs3917709	AA	278	0.7493	3.93	2.575	-0.00385	0.988
	Ab	78	0.2102	3.86	2.807		
	Bb	15	0.04043	4.065	2.784		
rs2236868	AA	136	0.3666	3.95	2.564	0.07837	0.6729
	Ab	160	0.4313	3.773	2.626		
	Bb	75	0.2022	4.184	2.753		
rs3917714	AA	328	0.8841	3.9	2.645	0.1284	0.6648
	Ab	28	0.07547	4.049	2.249		
	Bb	15	0.04043	4.139	3.012		
rs6125	AA	328	0.8841	3.9	2.645	0.1284	0.6648
	Ab	28	0.07547	4.049	2.249		
	Bb	15	0.04043	4.139	3.012		
rs3917727	AA	125	0.3369	3.748	2.469	0.2931	0.1683
	Ab	201	0.5418	3.913	2.668		
	Bb	45	0.1213	4.436	2.855		
rs6131	AA	214	0.5768	4.071	2.722	-0.202	0.3079
	Ab	115	0.31	3.671	2.38		
	Bb	42	0.1132	3.839	2.783		
rs3917731	AA	173	0.4663	3.942	2.69	0.1732	0.3901
	Ab	155	0.4178	3.682	2.526		

	Bb	43	0.1159	4.694	2.634		
rs3917739	AA	148	0.3989	4.007	2.666	0.07788	0.6833
	Ab	161	0.434	3.671	2.489		
	bb	62	0.1671	4.365	2.845		
rs3917740	AA	262	0.7062	3.937	2.665	-0.08079	0.7447
	Ab	94	0.2534	3.929	2.572		
	bb	15	0.04043	3.591	2.432		
rs2076074	AA	201	0.5418	3.921	2.635	0.09155	0.6288
	Ab	118	0.3181	3.771	2.609		
	bb	52	0.1402	4.261	2.657		
rs3917744	AA	136	0.3666	3.743	2.478	0.1564	0.414
	Ab	169	0.4555	4.032	2.69		
	bb	66	0.1779	4.002	2.778		
rs2142760	AA	106	0.2857	3.793	2.831	0.06305	0.7337
	Ab	169	0.4555	4.006	2.5		
	bb	96	0.2588	3.912	2.634		
rs3917768	AA	106	0.2857	3.671	2.729	0.02401	0.8988
	Ab	176	0.4744	4.195	2.576		
	bb	89	0.2399	3.676	2.578		
rs2205895	AA	147	0.3962	3.882	2.674	-0.1001	0.6105
	Ab	169	0.4555	4.094	2.609		
	bb	55	0.1482	3.491	2.548		
rs3917779	AA	292	0.7871	3.938	2.745	0.01238	0.9589
	Ab	56	0.1509	3.717	2.042		
	bb	23	0.06199	4.202	2.405		
rs2420378	AA	153	0.4124	3.822	2.649	-0.05035	0.8014
	Ab	169	0.4555	4.152	2.605		
	bb	49	0.1321	3.433	2.601		
rs3917786	AA	120	0.3235	3.73	2.564	0.1232	0.5193
	Ab	176	0.4744	4.049	2.641		
	bb	75	0.2022	3.927	2.709		
rs3917788	AA	324	0.8733	3.877	2.666	0.1422	0.637
	Ab	34	0.09164	4.442	2.255		
	bb	13	0.03504	3.656	2.573		
rs3917792	AA	200	0.5391	3.94	2.689	0.09388	0.6682
	Ab	145	0.3908	3.774	2.575		
	bb	26	0.07008	4.591	2.402		
rs1569471	AA	200	0.5391	3.96	2.694	0.05696	0.7935
	Ab	144	0.3881	3.755	2.574		
	bb	27	0.07278	4.517	2.386		
rs6128	AA	253	0.6819	4.092	2.557	-0.3431	0.1491
	Ab	100	0.2695	3.475	2.809		
	bb	18	0.04852	3.995	2.398		
rs3917843	AA	320	0.8625	4.036	2.617	-0.3511	0.2435

	Ab	39	0.1051	2.712	2.366		
	bb	12	0.03235	4.768	2.808		
rs3917853	AA	347	0.9353	3.865	2.598	0.4312	0.12
	Ab	0	0	NA	NA		
	bb	24	0.06469	4.728	2.96		
rs3917854	AA	206	0.5553	3.688	2.588	0.2408	0.2644
	Ab	137	0.3693	4.361	2.653		
	bb	28	0.07547	3.482	2.583		

Πίνακας 18. Αποτελέσματα για το γονίδιο της Ιντεγκρίνης α4

Πολυμορφισμός	Γονότυπος	Αριθμός	Ποσοστό	MSSS Μέση τιμή	MSSS Τυπική απόκλιση	Βήτα συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης	p-value
rs12988934	AA	307	0.8275	4.013	2.622	-0.2561	0.3639
	Ab	51	0.1375	3.25	2.565		
	bb	13	0.03504	4.38	2.78		
rs3770138	AA	204	0.5499	3.887	2.652	0.1528	0.482
	Ab	140	0.3774	3.861	2.583		
	bb	27	0.07278	4.491	2.7		
rs10930969	AA	193	0.5202	3.712	2.625	0.4946	0.01955
	Ab	147	0.3962	3.954	2.568		
	bb	31	0.08356	5.064	2.698		
rs2124440	AA	100	0.2695	4.377	2.548	-0.4757	0.01243
	Ab	181	0.4879	3.916	2.691		
	bb	90	0.2426	3.424	2.518		
rs3770136	AA	196	0.5283	3.687	2.616	0.4867	0.02227
	Ab	145	0.3908	4.045	2.609		
	bb	30	0.08086	4.852	2.627		
rs155149	AA	218	0.5876	3.818	2.703	0.14	0.5223
	Ab	127	0.3423	4.115	2.577		
	bb	26	0.07008	3.835	2.226		
rs3770132	AA	257	0.6927	3.797	2.635	0.3202	0.1803
	Ab	96	0.2588	4.179	2.635		
	bb	18	0.04852	4.308	2.471		
rs711801	AA	134	0.3612	4.058	2.714	0.1042	0.5233
	Ab	111	0.2992	3.347	2.33		
	bb	126	0.3396	4.281	2.714		
rs1449264	AA	139	0.3747	4.449	2.592	-0.3203	0.08341
	Ab	158	0.4259	3.4	2.596		
	bb	74	0.1995	4.04	2.58		
rs1449265	AA	105	0.283	3.936	2.6	0.02416	0.8979

	Ab	175	0.4717	3.876	2.674		
	bb	91	0.2453	3.99	2.593		
rs3770126	AA	166	0.4474	3.714	2.599	0.3622	0.08632
	Ab	170	0.4582	3.994	2.653		
	bb	35	0.09434	4.543	2.589		
rs11694175	AA	99	0.2668	3.955	2.556	0.02992	0.8795
	Ab	192	0.5175	3.858	2.681		
	bb	80	0.2156	4.029	2.61		
rs17224277	AA	321	0.8652	3.881	2.609	0.176	0.5751
	Ab	40	0.1078	4.245	2.68		
	bb	10	0.02695	3.891	3.163		
rs155087	AA	236	0.6361	4.132	2.638	-0.393	0.09328
	Ab	117	0.3154	3.492	2.568		
	bb	18	0.04852	3.941	2.663		
rs2305588	AA	198	0.5337	3.775	2.629	0.3248	0.1253
	Ab	142	0.3827	3.976	2.579		
	bb	31	0.08356	4.6	2.794		
rs155099	AA	229	0.6173	4.135	2.638	-0.3185	0.1432
	Ab	115	0.31	3.472	2.558		
	bb	27	0.07278	4.016	2.677		
rs3755021	AA	203	0.5472	3.761	2.623	0.3462	0.1108
	Ab	141	0.3801	4.022	2.607		
	bb	27	0.07278	4.596	2.723		
rs155103	AA	235	0.6334	3.815	2.578	0.08005	0.7022
	Ab	103	0.2776	4.282	2.663		
	bb	33	0.08895	3.548	2.819		
rs155106	AA	111	0.2992	4.023	2.647	0.0509	0.7939
	Ab	185	0.4987	3.749	2.542		
	bb	75	0.2022	4.195	2.804		
rs3770120	AA	173	0.4663	3.791	2.564	0.2826	0.1485
	Ab	149	0.4016	3.88	2.616		
	bb	49	0.1321	4.503	2.849		
rs17225354	AA	122	0.3288	3.976	2.715	-0.178	0.3929
	Ab	198	0.5337	3.997	2.692		
	bb	51	0.1375	3.495	2.112		
rs2305586	AA	250	0.6739	4.087	2.64	-0.3493	0.1443
	Ab	104	0.2803	3.527	2.537		
	bb	17	0.04582	3.885	2.879		
rs4667310	AA	306	0.8248	3.833	2.615	0.3796	0.1164
	Ab	40	0.1078	4.15	2.809		
	bb	25	0.06739	4.634	2.441		
rs7607758	AA	103	0.2776	4.164	2.59	-0.2616	0.18
	Ab	188	0.5067	3.907	2.608		
	bb	80	0.2156	3.64	2.722		

rs11689738	AA	132	0.3558	3.862	2.576	-0.04114	0.8214
	Ab	156	0.4205	4.075	2.673		
	bb	83	0.2237	3.725	2.636		
rs12469449	AA	182	0.4906	3.879	2.554	0.0724	0.7122
	Ab	142	0.3827	3.936	2.773		
	bb	47	0.1267	4.036	2.498		
rs6721763	AA	114	0.3073	3.191	2.198	-0.8924	3,37E-03
	Ab	184	0.496	3.94	2.64		
	bb	73	0.1968	5.012	2.847		
rs6728886	AA	180	0.4852	3.845	2.548	0.1088	0.5763
	Ab	142	0.3827	3.973	2.77		
	bb	49	0.1321	4.048	2.531		
rs6707704	AA	147	0.3962	3.817	2.494	0.139	0.4638
	Ab	160	0.4313	3.945	2.82		
	bb	64	0.1725	4.1	2.445		
rs1449259	AA	312	0.841	3.861	2.59	0.2932	0.2995
	Ab	45	0.1213	4.19	2.923		
	bb	14	0.03774	4.395	2.529		
rs1047307	AA	135	0.3639	4.228	2.674	-0.2261	0.2436
	Ab	173	0.4663	3.682	2.514		
	bb	63	0.1698	3.918	2.799		

Πίνακας 19. Αποτελέσματα για το γονίδιο της Ιντεγκρίνης β1

Πολυμορφισμός	Γονότυπος	Αριθμός	Ποσοστό	MSSS Μέση τιμή	MSSS Τυπική απόκλιση	Βήτα συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης	p-value
rs12988934	AA	307	0.8275	4.013	2.622	-0.2561	0.3639
	Ab	51	0.1375	3.25	2.565		
	bb	13	0.03504	4.38	2.78		
rs3770138	AA	204	0.5499	3.887	2.652	0.1528	0.482
	Ab	140	0.3774	3.861	2.583		
	bb	27	0.07278	4.491	2.7		
rs10930969	AA	193	0.5202	3.712	2.625	0.4946	0.01955
	Ab	147	0.3962	3.954	2.568		
	bb	31	0.08356	5.064	2.698		
rs2124440	AA	100	0.2695	4.377	2.548	-0.4757	0.01243
	Ab	181	0.4879	3.916	2.691		
	bb	90	0.2426	3.424	2.518		
rs3770136	AA	196	0.5283	3.687	2.616	0.4867	0.02227

	Ab	145	0.3908	4.045	2.609		
	bb	30	0.08086	4.852	2.627		
rs155149	AA	218	0.5876	3.818	2.703	0.14	0.5223
	Ab	127	0.3423	4.115	2.577		
	bb	26	0.07008	3.835	2.226		
rs3770132	AA	257	0.6927	3.797	2.635	0.3202	0.1803
	Ab	96	0.2588	4.179	2.635		
	bb	18	0.04852	4.308	2.471		
rs711801	AA	134	0.3612	4.058	2.714	0.1042	0.5233
	Ab	111	0.2992	3.347	2.33		
	bb	126	0.3396	4.281	2.714		
rs1449264	AA	139	0.3747	4.449	2.592	-0.3203	0.08341
	Ab	158	0.4259	3.4	2.596		
	bb	74	0.1995	4.04	2.58		
rs1449265	AA	105	0.283	3.936	2.6	0.02416	0.8979
	Ab	175	0.4717	3.876	2.674		
	bb	91	0.2453	3.99	2.593		
rs3770126	AA	166	0.4474	3.714	2.599	0.3622	0.08632
	Ab	170	0.4582	3.994	2.653		
	bb	35	0.09434	4.543	2.589		
rs11694175	AA	99	0.2668	3.955	2.556	0.02992	0.8795
	Ab	192	0.5175	3.858	2.681		
	bb	80	0.2156	4.029	2.61		
rs17224277	AA	321	0.8652	3.881	2.609	0.176	0.5751
	Ab	40	0.1078	4.245	2.68		
	bb	10	0.02695	3.891	3.163		
rs155087	AA	236	0.6361	4.132	2.638	-0.393	0.09328
	Ab	117	0.3154	3.492	2.568		
	bb	18	0.04852	3.941	2.663		
rs2305588	AA	198	0.5337	3.775	2.629	0.3248	0.1253
	Ab	142	0.3827	3.976	2.579		
	bb	31	0.08356	4.6	2.794		
rs155099	AA	229	0.6173	4.135	2.638	-0.3185	0.1432
	Ab	115	0.31	3.472	2.558		
	bb	27	0.07278	4.016	2.677		
rs3755021	AA	203	0.5472	3.761	2.623	0.3462	0.1108
	Ab	141	0.3801	4.022	2.607		
	bb	27	0.07278	4.596	2.723		
rs155103	AA	235	0.6334	3.815	2.578	0.08005	0.7022
	Ab	103	0.2776	4.282	2.663		
	bb	33	0.08895	3.548	2.819		
rs155106	AA	111	0.2992	4.023	2.647	0.0509	0.7939
	Ab	185	0.4987	3.749	2.542		
	bb	75	0.2022	4.195	2.804		

rs3770120	AA	173	0.4663	3.791	2.564	0.2826	0.1485
	Ab	149	0.4016	3.88	2.616		
	bb	49	0.1321	4.503	2.849		
rs17225354	AA	122	0.3288	3.976	2.715	-0.178	0.3929
	Ab	198	0.5337	3.997	2.692		
	bb	51	0.1375	3.495	2.112		
rs2305586	AA	250	0.6739	4.087	2.64	-0.3493	0.1443
	Ab	104	0.2803	3.527	2.537		
	bb	17	0.04582	3.885	2.879		
rs4667310	AA	306	0.8248	3.833	2.615	0.3796	0.1164
	Ab	40	0.1078	4.15	2.809		
	bb	25	0.06739	4.634	2.441		
rs7607758	AA	103	0.2776	4.164	2.59	-0.2616	0.18
	Ab	188	0.5067	3.907	2.608		
	bb	80	0.2156	3.64	2.722		
rs11689738	AA	132	0.3558	3.862	2.576	-0.04114	0.8214
	Ab	156	0.4205	4.075	2.673		
	bb	83	0.2237	3.725	2.636		
rs12469449	AA	182	0.4906	3.879	2.554	0.0724	0.7122
	Ab	142	0.3827	3.936	2.773		
	bb	47	0.1267	4.036	2.498		
rs6721763	AA	114	0.3073	3.191	2.198	-0.8924	3,37E-03
	Ab	184	0.496	3.94	2.64		
	bb	73	0.1968	5.012	2.847		
rs6728886	AA	180	0.4852	3.845	2.548	0.1088	0.5763
	Ab	142	0.3827	3.973	2.77		
	bb	49	0.1321	4.048	2.531		
rs6707704	AA	147	0.3962	3.817	2.494	0.139	0.4638
	Ab	160	0.4313	3.945	2.82		
	bb	64	0.1725	4.1	2.445		
rs1449259	AA	312	0.841	3.861	2.59	0.2932	0.2995
	Ab	45	0.1213	4.19	2.923		
	bb	14	0.03774	4.395	2.529		
rs1047307	AA	135	0.3639	4.228	2.674	-0.2261	0.2436
	Ab	173	0.4663	3.682	2.514		
	bb	63	0.1698	3.918	2.799		

Πίνακας 20. Αποτελέσματα για το γονίδιο της Ιντεγκρίνης β7

<i>Πολυμορφισμός</i>	<i>Γονότυπος</i>	<i>Αριθμός</i>	<i>Ποσοστό</i>	<i>MSSS Μέση τιμή</i>	<i>MSSS Τοπική απόκλιση</i>	<i>Βήτα συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης</i>	<i>p-value</i>
<i>rs3825084</i>	AA	229	0.6173	3.886	2.59	0.009854	0.9639
	Ab	115	0.31	4.046	2.694		
	bb	27	0.07278	3.681	2.722		
<i>rs2272300</i>	AA	313	0.8437	3.913	2.623	0.1103	0.6614
	Ab	35	0.09434	3.718	2.888		
	bb	23	0.06199	4.337	2.311		
<i>rs11170465</i>	AA	310	0.8356	3.962	2.638	-0.1638	0.4932
	Ab	34	0.09164	3.75	2.679		
	bb	27	0.07278	3.661	2.499		

Πίνακας 21. Αποτελέσματα για το γονίδιο του ICAM-1

<i>Πολυμορφισμός</i>	<i>Γονότυπος</i>	<i>Αριθμός</i>	<i>Ποσοστό</i>	<i>MSSS Μέση τιμή</i>	<i>MSSS Τοπική απόκλιση</i>	<i>Βήτα συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης</i>	<i>p-value</i>
<i>rs5030390</i>	AA	287	0.7736	3.969	2.638	0.007335	0.9789
	Ab	74	0.1995	3.538	2.421		
	bb	10	0.02695	5.372	3.387		
<i>rs1799969</i>	AA	291	0.7844	3.892	2.657	0.0922	0.7319
	Ab	67	0.1806	4.044	2.517		
	bb	13	0.03504	3.944	2.69		
<i>rs5498</i>	AA	116	0.3127	3.752	2.474	0.1603	0.3866
	Ab	167	0.4501	3.961	2.611		
	bb	88	0.2372	4.066	2.861		
<i>rs3093032</i>	AA	246	0.6631	3.788	2.607	0.2386	0.2662
	Ab	95	0.2561	4.231	2.647		
	bb	30	0.08086	4.026	2.723		
<i>rs281437</i>	AA	148	0.3989	4.006	2.669	-0.2988	0.0718
	Ab	116	0.3127	4.349	2.73		
	bb	107	0.2884	3.339	2.361		

Πίνακας 22. Αποτελέσματα για το γονίδιο του VCAM

Πολυμορφισμός	Γονότυπος	Αριθμός	Ποσοστό	MSSS Μέση τιμή	MSSS Τοπική απόκλιση	Βήτα συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης	p- value
<i>rs3176860</i>	AA	127	0.3423	4.135	2.748	-0.1579	0.392
	Ab	162	0.4367	3.783	2.538		
	bb	82	0.221	3.861	2.619		
<i>rs3176861</i>	AA	210	0.566	3.875	2.596	0.1609	0.4412
	Ab	128	0.345	3.871	2.661		
	bb	33	0.08895	4.405	2.72		
<i>rs3917009</i>	AA	278	0.7493	3.897	2.631	0.02174	0.9262
	Ab	70	0.1887	4.069	2.698		
	bb	23	0.06199	3.755	2.447		
<i>rs3917010</i>	AA	213	0.5741	3.863	2.598	0.1787	0.3923
	Ab	125	0.3369	3.892	2.66		
	bb	33	0.08895	4.405	2.72		
<i>rs3765685</i>	AA	229	0.6173	4.108	2.774	-0.3158	0.1186
	Ab	104	0.2803	3.608	2.416		
	bb	38	0.1024	3.647	2.182		
<i>rs3176867</i>	AA	199	0.5364	4.095	2.699	-0.1341	0.4711
	Ab	116	0.3127	3.555	2.54		
	bb	56	0.1509	4.06	2.511		
<i>rs3917012</i>	AA	150	0.4043	4.177	2.79	-0.2571	0.1798
	Ab	161	0.434	3.744	2.549		
	bb	60	0.1617	3.755	2.39		
<i>rs3176869</i>	AA	261	0.7035	3.841	2.553	0.2139	0.4081
	Ab	99	0.2668	4.117	2.779		
	bb	11	0.02965	4.043	3.112		
<i>rs3181088</i>	AA	284	0.7655	4.061	2.725	-0.3649	0.162
	Ab	73	0.1968	3.336	2.171		
	bb	14	0.03774	4.124	2.495		
<i>rs2209627</i>	AA	255	0.6873	4.05	2.707	-0.203	0.27
	Ab	60	0.1617	3.518	2.389		
	bb	56	0.1509	3.766	2.486		
<i>rs3176876</i>	AA	111	0.2992	3.616	2.504	0.1315	0.485
	Ab	174	0.469	4.162	2.648		
	bb	86	0.2318	3.826	2.721		
<i>rs3917016</i>	AA	252	0.6792	3.991	2.583	-0.1055	0.5958
	Ab	77	0.2075	3.699	2.754		
	bb	42	0.1132	3.904	2.694		
<i>rs3917018</i>	AA	107	0.2884	3.604	2.49	0.1805	0.3379
	Ab	175	0.4717	4.107	2.598		

	bb	89	0.2399	3.935	2.83		
rs3917019	AA	194	0.5229	4.05	2.601	-0.2249	0.2281
	Ab	121	0.3261	3.876	2.722		
	bb	56	0.1509	3.571	2.518		
rs3176878	AA	228	0.6146	3.951	2.549	-0.1517	0.4261
	Ab	94	0.2534	4.081	2.895		
	bb	49	0.1321	3.472	2.445		

Πίνακας 23. Αποτελέσματα για το γονίδιο του MADCAM

Πολυμορφισμός	Γονότυπος	Αριθμός	Ποσοστό	MSSS Μέση τιμή	MSSS Τοπική απόκλιση	Βήτα συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης	p-value
rs12982646	AA	206	0.5553	3.971	2.746	-0.08311	0.6661
	Ab	117	0.3154	3.876	2.551		
	bb	48	0.1294	3.814	2.311		
rs6510810	AA	252	0.6792	3.951	2.715	-0.1879	0.3146
	Ab	66	0.1779	4.257	2.494		
	bb	53	0.1429	3.36	2.298		
rs3745925	AA	224	0.6038	4.081	2.777	-0.3311	0.1329
	Ab	122	0.3288	3.72	2.477		
	bb	25	0.06739	3.47	1.769		

Πίνακας 24. Αποτελέσματα για το γονίδιο της fibronectin

Πολυμορφισμός	Γονότυπος	Αριθμός	Ποσοστό	MSSS Μέση τιμή	MSSS Τοπική απόκλιση	Βήτα συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης	p-value
rs1250258	AA	185	0.4987	4.202	2.726	-0.373	0.0486
	Ab	132	0.3558	3.676	2.598		
	bb	54	0.1456	3.554	2.267		
rs2577290	AA	179	0.4825	3.875	2.671	-0.03453	0.8654
	Ab	152	0.4097	4.067	2.677		
	bb	40	0.1078	3.572	2.221		
rs1250246	AA	137	0.3693	3.851	2.742	0.1888	0.325
	Ab	169	0.4555	3.823	2.566		
	bb	65	0.1752	4.321	2.537		
rs1898536	AA	258	0.6954	3.917	2.584	0.05374	0.8293
	Ab	99	0.2668	3.882	2.753		
	bb	14	0.03774	4.271	2.677		
rs1250250	AA	174	0.469	3.879	2.71	0.07255	0.7256
	Ab	159	0.4286	3.938	2.571		

	bb	38	0.1024	4.04	2.533		
<i>rs11693652</i>	AA	253	0.6819	3.931	2.589	0.08304	0.7066
	Ab	91	0.2453	3.735	2.737		
	bb	27	0.07278	4.453	2.626		
<i>rs16854041</i>	AA	180	0.4852	4.029	2.712	-0.06105	0.7667
	Ab	153	0.4124	3.731	2.477		
	bb	38	0.1024	4.172	2.818		
<i>rs1250249</i>	AA	205	0.5526	3.962	2.671	-0.1621	0.4301
	Ab	130	0.3504	3.996	2.641		
	bb	36	0.09704	3.416	2.319		
<i>rs1250248</i>	AA	191	0.5148	3.816	2.554	0.1963	0.3619
	Ab	151	0.407	3.993	2.714		
	bb	29	0.07817	4.239	2.695		
<i>rs17517509</i>	AA	175	0.4717	3.885	2.703	0.03679	0.8602
	Ab	160	0.4313	3.964	2.59		
	bb	36	0.09704	3.907	2.478		
<i>rs1437799</i>	AA	196	0.5283	3.911	2.579	0.05439	0.8054
	Ab	150	0.4043	3.894	2.668		
	bb	25	0.06739	4.156	2.845		
<i>rs724617</i>	AA	121	0.3261	3.893	2.672	-0.112	0.551
	Ab	170	0.4582	4.09	2.68		
	bb	80	0.2156	3.604	2.439		
<i>rs13021679</i>	AA	175	0.4717	3.871	2.69	0.1411	0.4944
	Ab	158	0.4259	3.887	2.574		
	bb	38	0.1024	4.293	2.589		
<i>rs2372545</i>	AA	117	0.3154	3.948	2.607	0.1022	0.6174
	Ab	196	0.5283	3.802	2.597		
	bb	58	0.1563	4.268	2.778		
<i>rs7575234</i>	AA	169	0.4555	3.909	2.694	0.1154	0.5843
	Ab	167	0.4501	3.837	2.56		
	bb	35	0.09434	4.377	2.641		
<i>rs7572169</i>	AA	169	0.4555	3.909	2.694	0.1154	0.5843
	Ab	167	0.4501	3.837	2.56		
	bb	35	0.09434	4.377	2.641		
<i>rs10172425</i>	AA	154	0.4151	3.915	2.818	-0.1122	0.5728
	Ab	167	0.4501	4.048	2.566		
	bb	50	0.1348	3.512	2.187		
<i>rs34255697</i>	AA	116	0.3127	3.906	2.616	0.07098	0.7333
	Ab	201	0.5418	3.882	2.627		
	bb	54	0.1456	4.098	2.692		
<i>rs1525351</i>	AA	100	0.2695	4.098	2.664	-0.04987	0.8082
	Ab	204	0.5499	3.788	2.596		
	bb	67	0.1806	4.062	2.683		

rs2692228	AA	100	0.2695	4.128	2.661	-0.07749	0.7071
	Ab	205	0.5526	3.781	2.591		
	bb	66	0.1779	4.043	2.699		
rs11883812	AA	252	0.6792	4.011	2.675	-0.1664	0.3998
	Ab	76	0.2049	3.709	2.59		
	bb	43	0.1159	3.765	2.431		
rs10804242	AA	120	0.3235	4.028	2.749	-0.0375	0.8548
	Ab	195	0.5256	3.821	2.595		
	bb	56	0.1509	4.039	2.5		
rs6709607	AA	121	0.3261	4.039	2.74	-0.04648	0.821
	Ab	195	0.5256	3.814	2.599		
	bb	55	0.1482	4.041	2.5		
rs7588661	AA	96	0.2588	3.776	2.516	0.1381	0.4913
	Ab	198	0.5337	3.941	2.721		
	bb	77	0.2075	4.049	2.54		
rs13652	AA	246	0.6631	3.928	2.706	0.05752	0.7569
	Ab	71	0.1914	3.709	2.484		
	bb	54	0.1456	4.167	2.461		
rs13432972	AA	183	0.4933	4.147	2.714	-0.3768	0.0476
	Ab	135	0.3639	3.838	2.666		
	bb	53	0.1429	3.349	2.114		
rs1250203	AA	270	0.7278	3.948	2.669	-0.04458	0.8577
	Ab	85	0.2291	3.805	2.475		
	bb	16	0.04313	4.071	2.839		
rs7608342	AA	117	0.3154	3.934	2.742	0.03303	0.8707
	Ab	194	0.5229	3.877	2.615		
	bb	60	0.1617	4.038	2.473		
rs6707530	AA	158	0.4259	3.736	2.509	0.2363	0.2167
	Ab	155	0.4178	4.009	2.662		
	bb	58	0.1563	4.188	2.849		
rs1250211	AA	162	0.4367	3.791	2.652	-0.05351	0.7815
	Ab	154	0.4151	4.259	2.585		
	bb	55	0.1482	3.357	2.582		
rs2289200	AA	180	0.4852	3.903	2.661	-0.06237	0.7432
	Ab	137	0.3693	4.055	2.689		
	bb	54	0.1456	3.64	2.364		
rs7568287	AA	191	0.5148	3.917	2.662	-0.08588	0.6434
	Ab	122	0.3288	4.075	2.653		
	bb	58	0.1563	3.609	2.465		
rs33996776	AA	163	0.4394	3.899	2.677	-0.001821	0.9925
	Ab	153	0.4124	3.97	2.646		
	bb	55	0.1482	3.85	2.464		
rs10498037	AA	302	0.814	3.909	2.656	0.1169	0.6827

	Ab	58	0.1563	3.875	2.466		
	bb	11	0.02965	4.491	2.811		
rs7579867	AA	219	0.5903	3.912	2.599	-0.002135	0.9922
	Ab	126	0.3396	3.953	2.686		
	bb	26	0.07008	3.836	2.671		
rs11651	AA	176	0.4744	3.917	2.642	-0.06162	0.7378
	Ab	132	0.3558	4.028	2.704		
	bb	63	0.1698	3.709	2.441		

Πίνακας 25. Αποτελέσματα για το γονίδιο της osteopontin

Πολυμορφισμός	Γονότυπος	Αριθμός	Ποσοστό	MSSS Μέση τιμή	MSSS Τυπική απόκλιση	Βήτα συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης	p-value
rs2853749	AA	124	0.3342	4.042	2.67	-0.1308	0.5398
	Ab	202	0.5445	3.871	2.595		
	bb	45	0.1213	3.812	2.695		
rs11728697	AA	95	0.2561	3.908	2.435	-0.1996	0.3225
	Ab	200	0.5391	4.102	2.734		
	bb	76	0.2049	3.459	2.545		
rs6840362	AA	175	0.4717	4.003	2.675	-0.2273	0.1742
	Ab	105	0.283	4.182	2.725		
	bb	91	0.2453	3.461	2.377		
rs6532040	AA	110	0.2965	3.538	2.496	0.3279	0.0792
	Ab	172	0.4636	4.034	2.638		
	bb	89	0.2399	4.176	2.738		
rs6811536	AA	199	0.5364	3.845	2.555	0.1135	0.542
	Ab	116	0.3127	3.986	2.716		
	bb	56	0.1509	4.056	2.729		
rs4754	AA	215	0.5795	3.978	2.665	-0.07516	0.6912
	Ab	105	0.283	3.824	2.592		
	bb	51	0.1375	3.878	2.58		
rs1126772	AA	244	0.6577	3.803	2.653	0.2071	0.3978
	Ab	113	0.3046	4.218	2.629		
	bb	14	0.03774	3.576	2.052		
rs9138	AA	229	0.6173	4.121	2.753	-0.5236	0.0086
	Ab	102	0.2749	3.909	2.471		
	bb	40	0.1078	2.806	1.962		

Στους ανωτέρω πίνακες θα πρέπει να αναφερθεί ότι στον γονότυπο παρουσιάζεται και η συχνότητα ομοζυγωτίας ή ετεροζυγωτίας του μείζονος και ελάσσονος αλληλόμορφου. Όπου Α είναι το μείζον αλληλόμορφο και αντίστοιχα όπου b το έλασσον αλληλόμορφο.

Ακολούθησε ανάλυση μετάθεσης (permutation analysis) για προσαρμογή στις πολλαπλές δοκιμασίες. Ελέγχθηκαν τόσο η συσχέτιση των πολυμορφισμών με την αναπηρία, εκτιμώμενη με την κλίμακα MSSS, όσο και με την ηλικία έναρξης της νόσου.

Στην ανάλυση προέκυψε ότι ο πολυμορφισμός rs6721763 του γονιδίου της ιντεγκρίνης α4 παρουσίαζε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την αναπηρία με permutation p value 3.00e-06. Αντίστοιχα ο πολυμορφισμός rs6532040 του γονιδίου της osteopontin παρουσίαζε επίσης στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την αναπηρία με permutation p value 0.009884. Αποτελεί αξιοσημείωτο γεγονός ότι η ομοζυγωτία για το έλασσον αλληλόμορφο σε αυτούς τους πολυμορφισμούς και των δύο γονιδίων εμφάνιζε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την αναπηρία. Οι ομοζυγώτες για το έλασσον αλληλόμορφο του πολυμορφισμού rs6721763 της ιντεγκρίνης α4 παρουσίαζαν μέση τιμή αναπηρίας στην MSSS κλίμακα 5,012, έναντι των ετεροζυγωτών με 3,94 και των ομοζυγωτών για το μείζον με 3,191. Αντίστοιχα και με τον πολυμορφισμό rs6532040 της osteopontin, οι αντίστοιχες τιμές ήταν 4,176, 4,034 και 3,538. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το έλασσον αλληλόμορφο παρουσιάζει μία «δοσοεξαρτώμενη» επίδραση στην αναπηρία για τους πολυμορφισμούς και των δύο γονιδίων.

Όσο αφορά την συσχέτιση της ηλικίας έναρξης με τους πολυμορφισμούς των μελετηθέντων γονιδίων, η ανάλυση μεταστοιχείωσης ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με p value <0,0002 (όριο κατωφλιού p<0,01) του πολυμορφισμού rs1250249 του γονιδίου της fibronectin. Και εδώ φαίνεται ότι η ομοζυγωτία στο έλασσον αλληλόμορφο μειώνει την ηλικία έναρξης της νόσου στα 26,3 έτη, έναντι 28,1 των ετεροζυγωτών και 32,3 των ομοζυγωτών για το μείζον αλληλόμορφο. Φαίνεται ότι και εδώ ισχύει η «δοσοεξαρτώμενη» επίδραση όπως και στους πολυμορφισμούς που επηρεάζουν την αναπηρία.

Στους πίνακες που ακολουθούν παρίστανται αναλυτικά τα αποτελέσματα της μελέτης συσχέτισης αναπηρίας και ηλικίας έναρξης ανά γονίδιο.

Πίνακας 26. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης νόσου για το γονίδιο της P-selectin

	<i>Πολυμορφισμοί</i>	<i>P value για αναπηρία (MSSS)</i>	<i>P value για ηλικία έναρξης νόσου</i>
1.	rs732314	0.9147	0.7488
2.	rs3917862	0.6987	0.5482
3.	rs3917683	0.9941	0.8725

4.	<i>rs3917686</i>	<i>0.5239</i>	<i>0.0494</i>
5.	<i>rs2244529</i>	<i>0.4432</i>	<i>0.1733</i>
6.	<i>rs2244526</i>	<i>0.9039</i>	<i>0.1413</i>
7.	<i>rs3917709</i>	<i>0.6725</i>	<i>0.6279</i>
8.	<i>rs2236868</i>	<i>0.6458</i>	<i>0.9807</i>
9.	<i>rs3917714</i>	<i>0.7683</i>	<i>0.4794</i>
10.	<i>rs6125</i>	<i>0.7683</i>	<i>0.4794</i>
11.	<i>rs3917727</i>	<i>0.2448</i>	<i>0.4176</i>
12.	<i>rs6131</i>	<i>0.3165</i>	<i>0.8577</i>
13.	<i>rs3917731</i>	<i>0.4606</i>	<i>0.8253</i>
14.	<i>rs3917739</i>	<i>0.8051</i>	<i>0.0675</i>
15.	<i>rs3917740</i>	<i>0.8371</i>	<i>0.2621</i>
16.	<i>rs2076074</i>	<i>0.9684</i>	<i>0.0917</i>
17.	<i>rs3917744</i>	<i>0.6447</i>	<i>0.6515</i>
18.	<i>rs2142760</i>	<i>0.4416</i>	<i>0.2571</i>
19.	<i>rs3917768</i>	<i>0.6865</i>	<i>0.4627</i>
20.	<i>rs2205895</i>	<i>0.6823</i>	<i>0.7577</i>
21.	<i>rs3917779</i>	<i>0.9829</i>	<i>0.5705</i>
22.	<i>rs2420378</i>	<i>0.9013</i>	<i>0.7253</i>
23.	<i>rs3917786</i>	<i>0.7186</i>	<i>0.877</i>
24.	<i>rs3917788</i>	<i>0.5852</i>	<i>0.9736</i>
25.	<i>rs3917792</i>	<i>0.6765</i>	<i>0.5383</i>
26.	<i>rs1569471</i>	<i>0.743</i>	<i>0.6807</i>
27.	<i>rs6128</i>	<i>0.1919</i>	<i>0.4336</i>
28.	<i>rs3917843</i>	<i>0.3343</i>	<i>0.129</i>
29.	<i>rs3917853</i>	<i>0.1037</i>	<i>0.9978</i>
30.	<i>rs3917854</i>	<i>0.1719</i>	<i>0.9475</i>

Πίνακας 27. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης της νόσου για το γονίδιο της Ιντεγκρίνης α4

	<i>Πολυμορφισμός</i>	<i>P value για αναπηρία (MSSS)</i>	<i>P value για ηλικία έναρξης νόσου</i>
1.	<i>rs12988934</i>	0.3794	0.2472
2.	<i>rs3770138</i>	0.7438	0.9833
3.	<i>rs10930969</i>	0.01169	0.5195
4.	<i>rs2124440</i>	0.01847	0.3632
5.	<i>rs3770136</i>	0.01521	0.5833
6.	<i>rs155149</i>	0.3515	0.2422
7.	<i>rs3770132</i>	0.3451	0.2448
8.	<i>rs711801</i>	0.8058	0.2659
9.	<i>rs1449264</i>	0.2445	0.3907
10.	<i>rs1449265</i>	0.8729	0.7364
11.	<i>rs3770126</i>	0.06531	0.633

12.	rs11694175	0.9604	0.8132
13.	rs17224277	0.3591	0.3649
14.	rs155087	0.04326	0.4102
15.	rs2305588	0.1206	0.9404
16.	rs155099	0.07616	0.4087
17.	rs3755021	0.1005	0.9403
18.	rs155103	0.3347	0.3747
19.	rs155106	0.9674	0.6263
20.	rs3770120	0.1899	0.9935
21.	rs17225354	0.6191	0.7798
22.	rs2305586	0.1351	0.2151
23.	rs4667310	0.1279	0.9014
24.	rs7607758	0.1746	0.2496
25.	rs11689738	0.6311	0.1771
26.	rs12469449	0.5248	0.8221
27.	rs6721763	3.00e-06	0.4594
28.	rs6728886	0.4004	0.8401
29.	rs6707704	0.2942	0.7818
30.	rs1449259	0.3535	0.6257
31.	rs1047307	0.2376	0.4576

Πίνακας 28. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης της νόσου για το γονίδιο της Ιντεγκρίνης β1

	Πολυμορφισμός	P value για αναπηρία (MSSS)	P value για ηλικία έναρξης νόσου
1.	rs11009157	0.2657	0.2646
2.	rs1187070	0.5029	0.458
3.	rs1009002	0.696	0.6432
4.	rs2488336	0.3562	0.5961
5.	rs10827164	0.7011	0.2184
6.	rs16933819	0.2905	0.8029
7.	rs9417094	0.2937	0.597
8.	rs2504001	0.6565	0.6404
9.	rs2488331	0.4218	0.7543
10.	rs10763902	0.7189	0.0942
11.	rs3780873	0.1267	0.2694
12.	rs4587680	0.3719	0.3861
13.	rs2488320	0.8601	0.8165
14.	rs1316757	0.853	0.5107
15.	rs2488318	0.8561	0.3442
16.	rs2153875	0.8525	0.2032

Πίνακας 29. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης της νόσου για το γονίδιο της Ιντεγκρίνης β7

	Πολυμορφισμός	P value για αναπηρία (MSSS)	P value για ηλικία έναρξης νόσου
1.	rs3825084	0.6863	0.4465
2.	rs2272300	0.2438	0.0346
3.	rs11170465	0.5258	0.6733

Πίνακας 30. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης της νόσου για το γονίδιο του ICAM

	<i>Πολυμορφισμός</i>	<i>P value για αναπηρία (MSSS)</i>	<i>P value για ηλικία έναρξης νόσου</i>
1.	<i>rs5030390</i>	0.6959	0.1254
2.	<i>rs1799969</i>	0.6981	0.9175
3.	<i>rs5498</i>	0.5103	0.594
4.	<i>rs3093032</i>	0.2641	0.5659
5.	<i>rs281437</i>	0.1168	0.7896

Πίνακας 31. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης νόσου για το γονίδιο του VCAM

	<i>Πολυμορφισμός</i>	<i>P value για αναπηρία (MSSS)</i>	<i>P value για ηλικία έναρξης νόσου</i>
1.	<i>rs3176860</i>	0.3093	0.3679
2.	<i>rs3176861</i>	0.3179	0.8429
3.	<i>rs3917009</i>	0.7551	0.2508
4.	<i>rs3917010</i>	0.2939	0.9048
5.	<i>rs3765685</i>	0.2097	0.1184
6.	<i>rs3176867</i>	0.2108	0.5629
7.	<i>rs3917012</i>	0.1209	0.6042
8.	<i>rs3176869</i>	0.539	0.1075
9.	<i>rs3181088</i>	0.1947	0.3477
10.	<i>rs2209627</i>	0.288	0.3043
11.	<i>rs3176876</i>	0.5796	0.5188
12.	<i>rs3917016</i>	0.533	0.3639
13.	<i>rs3917018</i>	0.3098	0.5867
14.	<i>rs3917019</i>	0.4335	0.284
15.	<i>rs3176878</i>	0.857	0.0178

Πίνακας 32. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης νόσου για το γονίδιο του MADCAM

	<i>Πολυμορφισμός</i>	<i>P value για αναπηρία (MSSS)</i>	<i>P value για ηλικία έναρξης νόσου</i>
1.	<i>rs12982646</i>	0.5785	0.5068
2.	<i>rs6510810</i>	0.2457	0.6292
3.	<i>rs3745925</i>	0.2051	0.5431

Πίνακας 33. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης νόσου για το γονίδιο της Fibronectin

	<i>Πολυμορφισμός</i>	<i>P value για αναπηρία (MSSS)</i>	<i>P value για ηλικία έναρξης νόσου</i>
1.	<i>rs1250258</i>	0.0634	0.7134
2.	<i>rs2577290</i>	0.7659	0.4776
3.	<i>rs1250246</i>	0.209	0.951
4.	<i>rs1898536</i>	0.9657	0.3883
5.	<i>rs1250250</i>	0.885	0.3562
6.	<i>rs11693652</i>	0.9635	0.1941
7.	<i>rs16854041</i>	0.5775	0.7381
8.	<i>rs1250249</i>	0.5565	0.0002
9.	<i>rs1250248</i>	0.1671	0.2665
10.	<i>rs17517509</i>	0.9489	0.4849
11.	<i>rs1437799</i>	0.9584	0.9373
12.	<i>rs724617</i>	0.9754	0.0665
13.	<i>rs13021679</i>	0.6185	0.3871
14.	<i>rs2372545</i>	0.4479	0.337
15.	<i>rs7575234</i>	0.6593	0.4119
16.	<i>rs7572169</i>	0.6593	0.4119
17.	<i>rs10172425</i>	0.6431	0.8334
18.	<i>rs34255697</i>	0.5046	0.4112
19.	<i>rs1525351</i>	0.7776	0.1505
20.	<i>rs2692228</i>	0.917	0.1994
21.	<i>rs11883812</i>	0.5302	0.5154
22.	<i>rs10804242</i>	0.9766	0.761
23.	<i>rs6709607</i>	0.9355	0.9371
24.	<i>rs7588661</i>	0.7678	0.7585
25.	<i>rs13652</i>	0.6824	0.3687
26.	<i>rs13432972</i>	0.06204	0.1038
27.	<i>rs1250203</i>	0.7171	0.5777
28.	<i>rs7608342</i>	0.6461	0.6432
29.	<i>rs6707530</i>	0.348	0.4292
30.	<i>rs1250211</i>	0.9535	0.2133
31.	<i>rs2289200</i>	0.8463	0.2213
32.	<i>rs7568287</i>	0.6808	0.4625
33.	<i>rs33996776</i>	0.7985	0.121
34.	<i>rs10498037</i>	0.7494	0.2363
35.	<i>rs7579867</i>	0.8239	0.7653
36.	<i>rs11651</i>	0.8754	0.6583

Πίνακας 34. Αποτελέσματα πολλαπλών δοκιμασιών για αναπηρία και ηλικία έναρξης νόσου για το γονίδιο της Osteopontin

	<i>Πολυμορφισμός</i>	<i>P value για αναπηρία (MSSS)</i>	<i>P value για ηλικία έναρξης νόσου</i>
1.	<i>rs2853749</i>	0.7142	0.0756
2.	<i>rs11728697</i>	0.1396	0.871
3.	<i>rs6840362</i>	0.4792	0.0251
4.	rs6532040	0.009884	0.2716
5.	<i>rs6811536</i>	0.4773	0.4023
6.	<i>rs4754</i>	0.6128	0.8603
7.	<i>rs1126772</i>	0.6849	0.5407
8.	<i>rs9138</i>	0.03449	0.0584

13. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι μέχρι σήμερα μελέτες που ασχολήθηκαν με την ανάδειξη πιθανής γενετικής συσχέτισης με την πολλαπλή σκλήρυνση είχαν αμφιλεγόμενα και πολλές φορές αντικρουόμενα αποτελέσματα. Εστίασαν κυρίως σε θέματα λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος (γονίδια APOE), θέματα αυτοανοσίας, νευροβιολογίας και γενετικής μελέτης της δομής της μυελίνης. Επιπρόσθετα σημαντικό αντικείμενο μελέτης αποτέλεσαν τα γονίδια του συστήματος μείζονος ιστοσυμβατότητας (HLA) (336, 337). Συγκεκριμένα το HLA φάνηκε ότι έχει επίδραση στην εκδήλωση της νόσου (αρ 20-21), με σημαντικότερο το HLA DRB1*15:01 οι φορείς του οποίου εμφανίζουν πρώιμα τη νόσο. Η ομοζυγωτία στο συγκεκριμένο αλληλόμορφο φαίνεται ότι μειώνει κατά 10,6 έτη την εμφάνιση της νόσου (αρ22). Από την άλλη είναι μεγάλης σημασίας είναι, όπως προαναφέρθηκε, ότι τρεις μελέτες του συνόλου του γονιδιώματος (GWAS) δεν κατάφεραν να αναδείξουν συσχέτιση μεταξύ της βαρύτητας της πολλαπλής σκλήρυνσης και κάποιου γενετικού τύπου (264, 332, 333). Η εστίαση σε πολυμορφισμούς γονιδίων, που σχετίζονται με τη γλυκοζυλίωση και τη σηματοδότηση μέσω ασβεστίου και γλουταμάτης, έδειξε παρόμοια αποτελέσματα με τις εκτεταμένες μελέτες GWAS.

Η μελέτη μας ανέδειξε ενδιαφέροντα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση των διαφόρων πολυμορφισμών των μελετηθέντων γονιδίων στην βαρύτητα, αλλά και την ηλικία έναρξης της νόσου. Τα κωδικοποιούμενα μόρια αποτελούν μόρια προσκόλλησης των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο των αγγείων ή μόρια που σχετίζονται με αυτή με σκοπό την είσοδο των κυττάρων αυτών στο ΚΝΣ.

Ο πολυμορφισμός rs6721763 του γονιδίου της ιντεγκρίνης α4 φάνηκε ότι έχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την βαρύτητα της νόσου. Η επίδραση δε αυτή είναι «δοσοεξαρτώμενη», και εξαρτάται με το αν ο ασθενής είναι ομόζυγος, ή ετερόζυγος στο αλληλόμορφο. Είναι άξιο λόγου ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός βρίσκεται κοντά στο σημείο ματίσματος του 18ου εξονίου του γονιδίου. Το γονίδιο της ιντεγκρίνης α4 κωδικοποιεί την α υπομονάδα του μορίου της ιντεγκρίνης α4β1. Το μόριο αυτό εμπλέκεται άμεσα στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο των αγγείων και την μετέπειτα μετανάστευση τους εντός του ΚΝΣ (αρ23). Πολυμορφισμοί στο γονίδιο αυτό έχουν συσχετιστεί γενικότερα με την πολλαπλή σκλήρυνση (280, 281, 338). Ο μη συνώνυμος πολυμορφισμός rs1143676, που εδράζεται στο 24ο εξόνιο του γονιδίου της ιντεγκρίνης έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση πολλαπλής σκλήρυνσης σε σλοβακικούς πληθυσμούς, αλλά

όχι σε άλλους (280, 281, 338). Άλλος πολυμορφισμός του ίδιου γονιδίου συσχετισμένος με την εκδήλωση πολλαπλής σκλήρυνσης, αλλά μόνο σε πληθυσμό Βάσκων, αποτελεί ο rs1449263, ο οποίο εδράζεται σε ιντρόνιο του γονιδίου (280).

Ο πολυμορφισμός rs6532040 του γονιδίου της osteopontin είναι ο δεύτερος από τους μελετηθέντες που αναδείχθηκε να έχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την βαρύτητα της νόσου. Και εδώ υπάρχει «δοσοεξαρτώμενη» επίδραση καθώς ο ομοζυγώτης για το έλασσον αλληλόμορφο φαίνεται να εμφανίζει βαρύτερη κλινική εικόνα από τον ετεροζυγώτη ή τον ομοζυγώτη για το μείζον. Η δράση της osteopontin είναι πλειότροπη. Εμπλέκεται, ως προφλεγμονώδης παράγοντας, στην ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων καθώς και την μετανάστευση τους. Παράλληλα συνδέεται και με τις ιντεγκρίνες γνωστά μόρια προσκόλλησης. Ενδοκυτταρίως η osteopontin ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια (339). Η osteopontin στο πειραματικό μοντέλο της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας στα ποντίκια ενέχεται στη βαρύτητα και την ενεργότητα της νόσου (340). Επίσης τα επίπεδα της osteopontin στις απομυελινωτικές πλάκες, αλλά και στην φαινομενικά ακέραιη λευκή ουσία των ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση είναι διαταραγμένα, ενώ έχει φανεί από μελέτες ότι πολυμορφισμοί του γονιδίου μεταβάλλουν τα επίπεδα της osteopontin (325). Ο πολυμορφισμός rs6532040, που στην δική μας μελέτη φαίνεται να σχετίζεται με την βαρύτητα της νόσου εδράζεται στο ιντρόνιο 5-6 αλλά πολύ κοντά στην αρχή του 7ου εξονίου. Ο πολυμορφισμός rs9138, εδραζόμενος στο 7ο εξόνιο, έδειξε μέτρια τάση για συσχέτιση. Ο φορέας του μη μεταλλαγμένου γονιδίου φαίνεται να έχει περισσότερες πιθανότητες για δυσμενή κλινική πορεία και αυξημένη πιθανότητα μετάπτωσης σε δευτεροπαθώς προϊούσα πολλαπλή σκλήρυνση (341). Παράλληλα μελέτη απλοτύπων 4 πολυμορφισμών (rs4754, rs1126616, rs1126772, rs9138) ανέδειξε ότι οι ομοζυγώτες των μη μεταλλαγμένων μορφών των αλληλομόρφων και των 4 πολυμορφισμών έχουν μάλλον καλύτερη κλινική πορεία, με αργότερη συσσώρευση αναπηρίας και καθυστερημένη μετάπτωση σε δευτεροπαθώς προϊούσα μορφή πολλαπλής σκλήρυνσης (325). Το ίδιο αποτέλεσμα φαίνεται ότι είχε και η μελέτη του rs7687316 στον υποκινητή του γονιδίου (326). Από την άλλη η μελέτη 8 πολυμορφισμών στα εξόνια 6 και 7 δεν ανέδειξε κάποια σημαντική συσχέτιση (342).

Ο πολυμορφισμός rs1250249 του γονιδίου της fibronectin φάνηκε στη μελέτη μας να συσχετίζεται με την ηλικία έναρξης της νόσου. Και αυτός εμφανίζει το φαινόμενο της «δοσοεξαρτώμενης» επίδρασης. Η fibronectin αποτελεί εξωκυττάρια γλυκοπρωτεΐνη εμπλεκόμενη στην προσκόλληση και μετανάστευση κυττάρων, την οργάνωση του

κυτταροσκελετού. Η πλειότροπη δράση αυτή μεσολαβείται από την αλληλεπίδραση με τις ιντεγκρίνες (316).

Οι πολύπλοκοι μηχανισμοί της φλεγμονής και της νευροεκφύλισης της πολλαπλής σκλήρυνσης που ευθύνονται για την κλινική έκφραση της νόσου φαίνεται ότι καθιστούν δύσκολη και την ταυτοποίηση γενετικών τόπων που επηρεάζουν την νόσο. Επιπρόσθετος παράγοντας είναι οι διάφορες θεραπευτικές παρεμβάσεις που αλλάζουν την κλινική πορεία της νόσου (343, 344). Είναι αποδεδειγμένο ότι πρόωμη έναρξη θεραπείας και η κλιμάκωση αυτής όταν χρειάζεται επιδρά καταλυτικά στην συσσώρευση αναπηρίας. Για τους ανωτέρω λόγους θα ήταν εξαιρετικά σημαντικό σε μέλλουσες μελέτες να συμπεριληφθούν ασθενείς με που δεν έλαβαν θεραπεία ή τουλάχιστον δεν έλαβαν τη κατάλληλη θεραπεία. Αυτό θα δράσει σαν ένας σημαντικός συγχυτικός παράγοντας και ενδεχομένως θα οδηγήσει σε ανακάλυψη σημαντικών γενετικών επιδράσεων.

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε πάνω σε έναν εθνικά ομοιογενή πληθυσμό και καλά ταξινομημένο από κλινικής πλευράς. Χρησιμοποιήθηκε ακριβής και αξιόπιστη κλίμακα αξιολόγησης της αναπηρίας, MSSS, και οι ασθενείς που συμμετείχαν είχαν τουλάχιστον 5 έτη διάρκειας νόσου. Παράλληλα καταγράφηκαν και αξιολογήθηκαν γνωστοί δυσμενείς προγνωστικοί παράγοντες για την νόσο. Η γενετική ποικιλομορφία των μελετηθέντων γονιδίων καλύφθηκε όσο το δυνατόν περισσότερο με την μελέτη μεγάλου αριθμού πολυμορφισμών, ενώ η μελέτη με πολλαπλές δοκιμασίες, που αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο στατιστικής ανάλυσης εφαρμόστηκε για την προσαρμογή πολλαπλών δοκιμασιών για γνωστούς και ταυτοχρόνως άγνωστους παράγοντες.

Κλείνοντας θα ήταν σημαντικό να τονιστεί ότι η παρούσα μελέτη παρείχε επαρκή στοιχεία για την συσχέτιση των μορίων προσκόλλησης με την πολλαπλή σκλήρυνση και ειδικά σχετικά με την βαρύτητα της νόσου. Μελλοντικά θα μπορούσε, αν αυτά τα αποτελέσματα επεκταθούν και σε άλλους πληθυσμούς μέσω αντίστοιχων μελετών, να δημιουργηθούν προγνωστικοί δείκτες για τη νόσο τη στιγμή της διάγνωσης καθορίζοντας ενδεχομένως και την πιθανή θεραπευτική επιλογή. Παράλληλα ένα άλλο σημαντικό σημείο θα ήταν η εστίαση στα μόρια προσκόλλησης ως πιθανούς στόχους μελλοντικών θεραπειών.

14. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain : a journal of neurology*. 1989;112 (Pt 1):133-46.
2. Goodin DS. The epidemiology of multiple sclerosis: insights to disease pathogenesis. *Handbook of clinical neurology*. 2014;122:231-66.
3. Compston A. Making progress on the natural history of multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2006;129(Pt 3):561-3.
4. Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature*. 1995;377(6545):150-1.
5. Sadovnick AD, Ebers GC, Dyment DA, Risch NJ. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet (London, England)*. 1996;347(9017):1728-30.
6. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*. 2002;359(9313):1221-31.
7. Ebers GC, Sadovnick AD, Dyment DA, Yee IM, Willer CJ, Risch N. Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations in half-siblings. *Lancet (London, England)*. 2004;363(9423):1773-4.
8. Nielsen NM, Westergaard T, Rostgaard K, Frisch M, Hjalgrim H, Wohlfahrt J, et al. Familial risk of multiple sclerosis: a nationwide cohort study. *American journal of epidemiology*. 2005;162(8):774-8.
9. Bartolomei MS, Tilghman SM. Genomic imprinting in mammals. *Annual review of genetics*. 1997;31:493-525.
10. Templer DI, Trent NH, Spencer DA, Trent A, Corgiat MD, Mortensen PB, et al. Season of birth in multiple sclerosis. *Acta neurologica Scandinavica*. 1992;85(2):107-9.
11. DeLuca GC, Ramagopalan SV, Herrera BM, Dyment DA, Lincoln MR, Montpetit A, et al. An extremes of outcome strategy provides evidence that multiple sclerosis severity is determined by alleles at the HLA-DRB1 locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(52):20896-901.
12. Goodin DS. The causal cascade to multiple sclerosis: a model for MS pathogenesis. *PloS one*. 2009;4(2):e4565.
13. Ascherio A, Munger K. Epidemiology of multiple sclerosis: from risk factors to prevention. *Seminars in neurology*. 2008;28(1):17-28.
14. Warner HB, Carp RI. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. *Lancet (London, England)*. 1981;2(8258):1290.
15. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England journal of medicine*. 2002;347(12):911-20.
16. Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2010;67(6):824-30.
17. Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D, et al. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. *Jama*. 2003;289(12):1533-6.
18. Pakpoor J, Giovannoni G, Ramagopalan SV. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: association or causation? *Expert review of neurotherapeutics*. 2013;13(3):287-97.
19. Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, Rose TM, et al. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(16):7440-4.
20. Enbom M. Human herpesvirus 6 in the pathogenesis of multiple sclerosis. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2001;109(6):401-11.
21. Clark D. Human herpesvirus type 6 and multiple sclerosis. *Herpes : the journal of the IHMF*. 2004;11 Suppl 2:112a-9a.
22. Tanaka R, Iwasaki Y, Koprowski H. Intracisternal virus-like particles in brain of a multiple sclerosis patient. *Journal of the neurological sciences*. 1976;28(1):121-6.

23. Burks JS, DeVald BL, Jankovsky LD, Gerdes JC. Two coronaviruses isolated from central nervous system tissue of two multiple sclerosis patients. *Science (New York, NY)*. 1980;209(4459):933-4.
24. Salmi A, Ziola B, Reunanen M, Julkunen I, Wager O. Immune complexes in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients and patients with other neurological diseases. *Acta neurologica Scandinavica*. 1982;66(1):1-15.
25. Talbot PJ, Paquette JS, Ciurli C, Antel JP, Ouellet F. Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 1996;39(2):233-40.
26. Dolei A, Perron H. The multiple sclerosis-associated retrovirus and its HERV-W endogenous family: a biological interface between virology, genetics, and immunology in human physiology and disease. *Journal of neurovirology*. 2009;15(1):4-13.
27. Christensen T, Jensen AW, Munch M, Haahr S, Sorensen PD, Riemann H, et al. Characterization of retroviruses from patients with multiple sclerosis. *Acta neurologica Scandinavica Supplementum*. 1997;169:49-58.
28. Christensen T. Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Reviews in medical virology*. 2005;15(3):179-211.
29. Blinkova O, Kapoor A, Victoria J, Jones M, Wolfe N, Naeem A, et al. Cardioviruses are genetically diverse and cause common enteric infections in South Asian children. *Journal of virology*. 2009;83(9):4631-41.
30. Compston DA, Vakarelis BN, Paul E, McDonald WI, Batchelor JR, Mims CA. Viral infection in patients with multiple sclerosis and HLA-DR matched controls. *Brain : a journal of neurology*. 1986;109 (Pt 2):325-44.
31. Sullivan CB, Visscher BR, Detels R. Multiple sclerosis and age at exposure to childhood diseases and animals: cases and their friends. *Neurology*. 1984;34(9):1144-8.
32. Rodriguez-Violante M, Ordonez G, Bermudez JR, Sotelo J, Corona T. Association of a history of varicella virus infection with multiple sclerosis. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2009;111(1):54-6.
33. Bagos PG, Nikolopoulos G, Ioannidis A. Chlamydia pneumoniae infection and the risk of multiple sclerosis: a meta-analysis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2006;12(4):397-411.
34. Lauer K. Environmental risk factors in multiple sclerosis. *Expert review of neurotherapeutics*. 2010;10(3):421-40.
35. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2010;9(6):599-612.
36. Holick MF. Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *The American journal of clinical nutrition*. 1995;61(3 Suppl):638s-45s.
37. Lemire JM, Archer DC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of clinical investigation*. 1991;87(3):1103-7.
38. Hayes CE, Nashold FE, Spach KM, Pedersen LB. The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. 2003;49(2):277-300.
39. Becklund BR, Hansen DW, Jr., Deluca HF. Enhancement of 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by calcitonin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(13):5276-81.
40. Hauser SL, Weiner HL, Che M, Shapiro ME, Gilles F, Letvin NL. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in the SJL/J mouse by whole body ultraviolet irradiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1984;132(3):1276-81.
41. Royal W, 3rd, Mia Y, Li H, Naunton K. Peripheral blood regulatory T cell measurements correlate with serum vitamin D levels in patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2009;213(1-2):135-41.
42. Kurtzke JF, Beebe GW, Norman JE, Jr. Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans: 1. Race, sex, and geographic distribution. *Neurology*. 1979;29(9 Pt 1):1228-35.

43. Acheson ED, Bachrach CA. The distribution of multiple sclerosis in U. S. veterans by birthplace. *American journal of hygiene*. 1960;72:88-99.
44. Hammond SR, McLeod JG, Millingen KS, Stewart-Wynne EG, English D, Holland JT, et al. The epidemiology of multiple sclerosis in three Australian cities: Perth, Newcastle and Hobart. *Brain : a journal of neurology*. 1988;111 (Pt 1):1-25.
45. Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 1997;7(5):439-43.
46. Vukusic S, Van Bockstael V, Gosselin S, Confavreux C. Regional variations in the prevalence of multiple sclerosis in French farmers. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2007;78(7):707-9.
47. van der Mei IA, Ponsonby AL, Engelsen O, Pasco JA, McGrath JJ, Eyles DW, et al. The high prevalence of vitamin D insufficiency across Australian populations is only partly explained by season and latitude. *Environmental health perspectives*. 2007;115(8):1132-9.
48. Goldberg P, Fleming MC, Picard EH. Multiple sclerosis: decreased relapse rate through dietary supplementation with calcium, magnesium and vitamin D. *Medical hypotheses*. 1986;21(2):193-200.
49. Swank RL, Lerstad O, Strom A, Backer J. Multiple sclerosis in rural Norway its geographic and occupational incidence in relation to nutrition. *The New England journal of medicine*. 1952;246(19):722-8.
50. Gale CR, Martyn CN. Migrant studies in multiple sclerosis. *Progress in neurobiology*. 1995;47(4-5):425-48.
51. Hernan MA, Olek MJ, Ascherio A. Geographic variation of MS incidence in two prospective studies of US women. *Neurology*. 1999;53(8):1711-8.
52. Wallin MT, Page WF, Kurtzke JF. Multiple sclerosis in US veterans of the Vietnam era and later military service: race, sex, and geography. *Annals of neurology*. 2004;55(1):65-71.
53. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vecsei L, et al. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *European journal of neurology*. 2006;13(7):700-22.
54. Alonso A, Hernan MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology*. 2008;71(2):129-35.
55. Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2008;7(3):268-77.
56. Kampman MT, Brustad M. Vitamin D: a candidate for the environmental effect in multiple sclerosis - observations from Norway. *Neuroepidemiology*. 2008;30(3):140-6.
57. Gusev E, Boiko A, Lauer K, Riise T, Deomina T. Environmental risk factors in MS: a case-control study in Moscow. *Acta neurologica Scandinavica*. 1996;94(6):386-94.
58. Zorzon M, Zivadinov R, Nasuelli D, Dolfini P, Bosco A, Bratina A, et al. Risk factors of multiple sclerosis: a case-control study. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2003;24(4):242-7.
59. Lauer K. A possible paradox in the immunology of multiple sclerosis: its apparent lack of 'specificity' might provide clues to the etiology. *Medical hypotheses*. 1993;40(6):368-74.
60. Knowles ME, Gilbert J, MacWeeny DJ. Phenols in smoked, cured meats: nitrosation of phenols in liquid smokes and in smoked bacon. *Journal of the science of food and agriculture*. 1975;26(3):267-76.
61. Kampman MT, Wilsgaard T, Mellgren SI. Outdoor activities and diet in childhood and adolescence relate to MS risk above the Arctic Circle. *Journal of neurology*. 2007;254(4):471-7.
62. Bates D, Cartledge NE, French JM, Jackson MJ, Nightingale S, Shaw DA, et al. A double-blind controlled trial of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1989;52(1):18-22.
63. Kazmierski R, Wender M, Guzik P, Zielonka D. Association of influenza incidence with multiple sclerosis onset. *Folia neuropathologica*. 2004;42(1):19-23.
64. Villard-Mackintosh L, Vessey MP. Oral contraceptives and reproductive factors in multiple sclerosis incidence. *Contraception*. 1993;47(2):161-8.

65. Thorogood M, Hannaford PC. The influence of oral contraceptives on the risk of multiple sclerosis. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1998;105(12):1296-9.
66. Courville CB, Maschmeyer JE, Delay CP. EFFECTS OF SMOKING ON THE ACUTE EXACERBATIONS OF MULTIPLE SCLEROSIS. *Bulletin of the Los Angeles Neurological Society*. 1964;29:1-6.
67. Emre M, de Decker C. Effects of cigarette smoking on motor functions in patients with multiple sclerosis. *Archives of neurology*. 1992;49(12):1243-7.
68. Goodin DS, Ebers GC, Johnson KP, Rodriguez M, Sibley WA, Wolinsky JS. The relationship of MS to physical trauma and psychological stress: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 1999;52(9):1737-45.
69. Goldacre MJ, Abisgold JD, Yeates DG, Seagroatt V. Risk of multiple sclerosis after head injury: record linkage study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2006;77(3):351-3.
70. Mohr DC, Epstein L, Luks TL, Goodkin D, Cox D, Goldberg A, et al. Brain lesion volume and neuropsychological function predict efficacy of treatment for depression in multiple sclerosis. *Journal of consulting and clinical psychology*. 2003;71(6):1017-24.
71. Buljevac D, Hop WC, Reedecker W, Janssens AC, van der Meche FG, van Doorn PA, et al. Self reported stressful life events and exacerbations in multiple sclerosis: prospective study. *BMJ (Clinical research ed)*. 2003;327(7416):646.
72. Ackerman KD, Stover A, Heyman R, Anderson BP, Houck PR, Frank E, et al. 2002 Robert Ader New Investigator award. Relationship of cardiovascular reactivity, stressful life events, and multiple sclerosis disease activity. *Brain, behavior, and immunity*. 2003;17(3):141-51.
73. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2000;343(13):938-52.
74. Prat A, Pelletier D, Duquette P, Arnold DL, Antel JP. Heterogeneity of T-lymphocyte function in primary progressive multiple sclerosis: relation to magnetic resonance imaging lesion volume. *Annals of neurology*. 2000;47(2):234-7.
75. Beck J, Rondot P, Catinot L, Falcoff E, Kirchner H, Wietzerbin J. Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations? *Acta neurologica Scandinavica*. 1988;78(4):318-23.
76. Dettke M, Scheidt P, Prange H, Kirchner H. Correlation between interferon production and clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *Journal of clinical immunology*. 1997;17(4):293-300.
77. Martino G, Moiola L, Brambilla E, Clementi E, Comi G, Grimaldi LM. Interferon-gamma induces T lymphocyte proliferation in multiple sclerosis via a Ca(2+)-dependent mechanism. *Journal of neuroimmunology*. 1995;62(2):169-76.
78. Dore-Duffy P, Donaldson JO, Thompson HG, Leuze M. Lymphocyte adherence to myelinated tissue in multiple sclerosis: correlation with disease activity. *Neurology*. 1986;36(11):1500-3.
79. Reder AT, Velichko S, Yamaguchi KD, Hamamcioglu K, Ku K, Beekman J, et al. IFN-beta1b induces transient and variable gene expression in relapsing-remitting multiple sclerosis patients independent of neutralizing antibodies or changes in IFN receptor RNA expression. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2008;28(5):317-31.
80. Genc K, Dona DL, Reder AT. Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(11):2664-71.
81. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(12):6873-8.
82. Soldan SS, Alvarez Retuerto AI, Sicotte NL, Voskuhl RR. Dysregulation of IL-10 and IL-12p40 in secondary progressive multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2004;146(1-2):209-15.
83. Yamaguchi KD, Ruderman DL, Croze E, Wagner TC, Velichko S, Reder AT, et al. IFN-beta-regulated genes show abnormal expression in therapy-naive relapsing-remitting MS mononuclear

- cells: gene expression analysis employing all reported protein-protein interactions. *Journal of neuroimmunology*. 2008;195(1-2):116-20.
84. Ifergan I, Kebir H, Bernard M, Wosik K, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, et al. The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain : a journal of neurology*. 2008;131(Pt 3):785-99.
 85. Antel J, Bania M, Noronha A, Neely S. Defective suppressor cell function mediated by T8+ cell lines from patients with progressive multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1986;137(11):3436-9.
 86. Karaszewski JW, Reder AT, Anlar B, Kim WC, Arnason BG. Increased lymphocyte beta-adrenergic receptor density in progressive multiple sclerosis is specific for the CD8+, CD28-suppressor cell. *Annals of neurology*. 1991;30(1):42-7.
 87. Correale J, Villa A. Isolation and characterization of CD8+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2008;195(1-2):121-34.
 88. Antel JP, Arnason BG, Medof ME. Suppressor cell function in multiple sclerosis: correlation with clinical disease activity. *Annals of neurology*. 1979;5(4):338-42.
 89. Crucian B, Dunne P, Friedman H, Ragsdale R, Pross S, Widen R. Alterations in levels of CD28-/CD8+ suppressor cell precursor and CD45RO+/CD4+ memory T lymphocytes in the peripheral blood of multiple sclerosis patients. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1995;2(2):249-52.
 90. Martinez-Forero I, Garcia-Munoz R, Martinez-Pasamar S, Inoges S, Lopez-Diaz de Cerio A, Palacios R, et al. IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis. *European journal of immunology*. 2008;38(2):576-86.
 91. Ioannou M, Alissafi T, Lazaridis I, Deraos G, Matsoukas J, Gravanis A, et al. Crucial role of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in the regulation of central nervous system autoimmune disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;188(3):1136-46.
 92. Meinel E, Krumbholz M, Hohlfeld R. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Annals of neurology*. 2006;59(6):880-92.
 93. Bennett JL, Haubold K, Ritchie AM, Edwards SJ, Burgoon M, Shearer AJ, et al. CSF IgG heavy-chain bias in patients at the time of a clinically isolated syndrome. *Journal of neuroimmunology*. 2008;199(1-2):126-32.
 94. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain : a journal of neurology*. 1999;122 (Pt 12):2279-95.
 95. Popescu BF, Lucchinetti CF. Meningeal and cortical grey matter pathology in multiple sclerosis. *BMC neurology*. 2012;12:11.
 96. Calabrese M, Filippi M, Gallo P. Cortical lesions in multiple sclerosis. *Nature reviews Neurology*. 2010;6(8):438-44.
 97. Cifelli A, Arridge M, Jezzard P, Esiri MM, Palace J, Matthews PM. Thalamic neurodegeneration in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2002;52(5):650-3.
 98. Kolasinski J, Stagg CJ, Chance SA, Deluca GC, Esiri MM, Chang EH, et al. A combined post-mortem magnetic resonance imaging and quantitative histological study of multiple sclerosis pathology. *Brain : a journal of neurology*. 2012;135(Pt 10):2938-51.
 99. Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, et al. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2011;365(23):2188-97.
 100. Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp BD. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology*. 2001;50(3):389-400.
 101. Wegner C, Esiri MM, Chance SA, Palace J, Matthews PM. Neocortical neuronal, synaptic, and glial loss in multiple sclerosis. *Neurology*. 2006;67(6):960-7.
 102. Popescu BF, Pirko I, Lucchinetti CF. Pathology of multiple sclerosis: where do we stand? *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2013;19(4 Multiple Sclerosis):901-21.
 103. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain : a journal of neurology*. 2009;132(Pt 5):1175-89.

104. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Bruck W, Rauschka H, Bergmann M, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2005;128(Pt 11):2705-12.
105. Filippi M, Rocca MA, Barkhof F, Bruck W, Chen JT, Comi G, et al. Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2012;11(4):349-60.
106. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of neurology*. 2000;47(6):707-17.
107. Prineas JW, Kwon EE, Cho ES, Sharer LR, Barnett MH, Oleszak EL, et al. Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2001;50(5):646-57.
108. Gelfand JM. Multiple sclerosis: diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. *Handbook of clinical neurology*. 2014;122:269-90.
109. Cordonnier C, de Seze J, Breteau G, Ferriby D, Michelin E, Stojkovic T, et al. Prospective study of patients presenting with acute partial transverse myelopathy. *Journal of neurology*. 2003;250(12):1447-52.
110. Swingler RJ, Compston DA. The morbidity of multiple sclerosis. *The Quarterly journal of medicine*. 1992;83(300):325-37.
111. Chiaravalloti ND, DeLuca J. Cognitive impairment in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2008;7(12):1139-51.
112. de Seze J. [Multiple sclerosis: clinical aspects, acute disseminated encephalomyelitis, neuromyelitis optica and other inflammatory variants]. *Revue neurologique*. 2007;163(6-7):647-50.
113. Fowler CJ, Panicker JN, Drake M, Harris C, Harrison SC, Kirby M, et al. A UK consensus on the management of the bladder in multiple sclerosis. *Postgraduate medical journal*. 2009;85(1008):552-9.
114. De Ridder D, Van Der Aa F, Debruyne J, D'Hooghe M B, Dubois B, Guillaume D, et al. Consensus guidelines on the neurologist's role in the management of neurogenic lower urinary tract dysfunction in multiple sclerosis. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2013;115(10):2033-40.
115. Minden SL, Frankel D, Hadden L, Perloff J, Srinath KP, Hoaglin DC. The Sonya Slifka Longitudinal Multiple Sclerosis Study: methods and sample characteristics. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2006;12(1):24-38.
116. Lebrun C. The radiologically isolated syndrome. *Revue neurologique*. 2015;171(10):698-706.
117. Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, Waubant E, Baranzini SE, Goodin DS, et al. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome. *Neurology*. 2009;72(9):800-5.
118. Tintore M, Rovira A, Rio J, Tur C, Pelayo R, Nos C, et al. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology*. 2008;70(13 Pt 2):1079-83.
119. Runmarker B, Andersen O. Prognostic factors in a multiple sclerosis incidence cohort with twenty-five years of follow-up. *Brain : a journal of neurology*. 1993;116 (Pt 1):117-34.
120. Rovaris M, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M. Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. *The Lancet Neurology*. 2006;5(4):343-54.
121. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain : a journal of neurology*. 2006;129(Pt 3):606-16.
122. Tremlett H, Zhao Y, Devonshire V. Natural history comparisons of primary and secondary progressive multiple sclerosis reveals differences and similarities. *Journal of neurology*. 2009;256(3):374-81.
123. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology*. 2011;69(2):292-302.
124. Milo R, Miller A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmunity reviews*. 2014;13(4-5):518-24.
125. Ceccarelli A, Bakshi R, Neema M. MRI in multiple sclerosis: a review of the current literature. *Current opinion in neurology*. 2012;25(4):402-9.

126. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Archives of neurology*. 2005;62(6):865-70.
127. Lefvert AK, Link H. IgG production within the central nervous system: a critical review of proposed formulae. *Annals of neurology*. 1985;17(1):13-20.
128. Ohman S, Ernerudh J, Forsberg P, Henriksson A, von Schenck H, Vrethem M. Comparison of seven formulae and isoelectrofocusing for determination of intrathecally produced IgG in neurological diseases. *Annals of clinical biochemistry*. 1992;29 (Pt 4):405-10.
129. Gelfand JM, Goodin DS, Boscardin WJ, Nolan R, Cuneo A, Green AJ. Retinal axonal loss begins early in the course of multiple sclerosis and is similar between progressive phenotypes. *PLoS one*. 2012;7(5):e36847.
130. Dalton CM, Brex PA, Miszkief KA, Hickman SJ, MacManus DG, Plant GT, et al. Application of the new McDonald criteria to patients with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2002;52(1):47-53.
131. Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen JA, Freedman MS, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2008;14(9):1157-74.
132. Menge T, Hemmer B, Nessler S, Wiendl H, Neuhaus O, Hartung HP, et al. Acute disseminated encephalomyelitis: an update. *Archives of neurology*. 2005;62(11):1673-80.
133. Hynson JL, Kornberg AJ, Coleman LT, Shield L, Harvey AS, Kean MJ. Clinical and neuroradiologic features of acute disseminated encephalomyelitis in children. *Neurology*. 2001;56(10):1308-12.
134. Tenenbaum S, Chamoles N, Fejerman N. Acute disseminated encephalomyelitis: a long-term follow-up study of 84 pediatric patients. *Neurology*. 2002;59(8):1224-31.
135. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*. 2004;364(9451):2106-12.
136. Roemer SF, Parisi JE, Lennon VA, Benarroch EE, Lassmann H, Bruck W, et al. Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2007;130(Pt 5):1194-205.
137. Magana SM, Matiello M, Pittock SJ, McKeon A, Lennon VA, Rabinstein AA, et al. Posterior reversible encephalopathy syndrome in neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology*. 2009;72(8):712-7.
138. McKeon A, Fryer JP, Apiwattanakul M, Lennon VA, Hinson SR, Kryzer TJ, et al. Diagnosis of neuromyelitis spectrum disorders: comparative sensitivities and specificities of immunohistochemical and immunoprecipitation assays. *Archives of neurology*. 2009;66(9):1134-8.
139. Jacob A, Matiello M, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG. Neuromyelitis optica: changing concepts. *Journal of neuroimmunology*. 2007;187(1-2):126-38.
140. Cree B. Neuromyelitis optica: diagnosis, pathogenesis, and treatment. *Current neurology and neuroscience reports*. 2008;8(5):427-33.
141. Wingerchuk DM. Neuromyelitis optica. *Advances in neurology*. 2006;98:319-33.
142. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology*. 2006;66(10):1485-9.
143. Wingerchuk DM. Neuromyelitis optica: new findings on pathogenesis. *International review of neurobiology*. 2007;79:665-88.
144. Sellner J, Cepok S, Kalluri SR, Nestler A, Kleiter I, Kumpfel T, et al. Aquaporin 4 antibody positive central nervous system autoimmunity and multiple sclerosis are characterized by a distinct profile of antibodies to herpes viruses. *Neurochemistry international*. 2010;57(6):662-7.
145. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *The New England journal of medicine*. 2002;346(10):752-63.
146. Cuadrado MJ, Khamashta MA. The anti-phospholipid antibody syndrome (Hughes syndrome): therapeutic aspects. *Bailliere's best practice & research Clinical rheumatology*. 2000;14(1):151-63.
147. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet (London, England)*. 2007;369(9561):587-96.

148. Birnbaum J, Petri M, Thompson R, Izbudak I, Kerr D. Distinct subtypes of myelitis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(11):3378-87.
149. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Annals of the rheumatic diseases*. 2002;61(6):554-8.
150. Pittock SJ, Lennon VA, de Seze J, Vermersch P, Homburger HA, Wingerchuk DM, et al. Neuromyelitis optica and non organ-specific autoimmunity. *Archives of neurology*. 2008;65(1):78-83.
151. Goodin DS. A questionnaire to assess neurological impairment in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 1998;4(5):444-51.
152. Maldini C, Lavalley MP, Cheminant M, de Menthon M, Mahr A. Relationships of HLA-B51 or B5 genotype with Behcet's disease clinical characteristics: systematic review and meta-analyses of observational studies. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2012;51(5):887-900.
153. Joseph FG, Scolding NJ. Neurosarcoidosis: a study of 30 new cases. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2009;80(3):297-304.
154. Pawate S, Moses H, Sriram S. Presentations and outcomes of neurosarcoidosis: a study of 54 cases. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2009;102(7):449-60.
155. Douglas AC, Maloney AF. Sarcoidosis of the central nervous system. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1973;36(6):1024-33.
156. James DG, Turiat J, Hosoda Y, Williams WJ, Israel HL, Douglas AC, et al. Description of sarcoidosis: Report of the Subcommittee on Classification and Definition. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1976;278:742.
157. Bolat S, Berding G, Dengler R, Stangel M, Trebst C. Fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) is useful in the diagnosis of neurosarcoidosis. *Journal of the neurological sciences*. 2009;287(1-2):257-9.
158. Bunting PS, Szalai JP, Katic M. Diagnostic aspects of angiotensin converting enzyme in pulmonary sarcoidosis. *Clinical biochemistry*. 1987;20(3):213-9.
159. Scott BJ, Douglas VC, Tihan T, Rubenstein JL, Josephson SA. A systematic approach to the diagnosis of suspected central nervous system lymphoma. *JAMA neurology*. 2013;70(3):311-9.
160. Pawate S, Agarwal A, Moses H, Sriram S. The spectrum of Susac's syndrome. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2009;30(1):59-64.
161. Susac JO, Hardman JM, Selhorst JB. Microangiopathy of the brain and retina. *Neurology*. 1979;29(3):313-6.
162. Kadkhodayan Y, Alreshaid A, Moran CJ, Cross DT, 3rd, Powers WJ, Derdeyn CP. Primary angiitis of the central nervous system at conventional angiography. *Radiology*. 2004;233(3):878-82.
163. Markus HS, Martin RJ, Simpson MA, Dong YB, Ali N, Crosby AH, et al. Diagnostic strategies in CADASIL. *Neurology*. 2002;59(8):1134-8.
164. Liem MK, Lesnik Oberstein SA, Haan J, Boom R, Ferrari MD, Buchem MA, et al. Cerebrovascular reactivity is a main determinant of white matter hyperintensity progression in CADASIL. *AJNR American journal of neuroradiology*. 2009;30(6):1244-7.
165. Liem MK, Lesnik Oberstein SA, Haan J, van der Neut IL, Ferrari MD, van Buchem MA, et al. MRI correlates of cognitive decline in CADASIL: a 7-year follow-up study. *Neurology*. 2009;72(2):143-8.
166. Garcia-Monco JC, Benach JL. Lyme neuroborreliosis. *Annals of neurology*. 1995;37(6):691-702.
167. Halperin JJ. Nervous system Lyme disease. *Infectious disease clinics of North America*. 2008;22(2):261-74, vi.
168. Nocton JJ, Bloom BJ, Rutledge BJ, Persing DH, Logigian EL, Schmid CH, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis. *The Journal of infectious diseases*. 1996;174(3):623-7.
169. Lukehart SA, Hook EW, 3rd, Baker-Zander SA, Collier AC, Critchlow CW, Handsfield HH. Invasion of the central nervous system by *Treponema pallidum*: implications for diagnosis and treatment. *Annals of internal medicine*. 1988;109(11):855-62.

170. Cooper S, van der Loeff MS, McConkey S, Cooper M, Sarge-Njie R, Kaye S, et al. Neurological morbidity among human T-lymphotropic-virus-type-1-infected individuals in a rural West African population. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2009;80(1):66-8.
171. Umehara F, Hagiwara T, Yoshimura M, Higashi K, Arimura K. Enlarged, multifocal upper limb neuropathy with HTLV-I associated myelopathy in a patient with chronic adult T-cell leukemia. *Journal of the neurological sciences*. 2008;266(1-2):167-70.
172. Kumar N, Crum B, Petersen RC, Vernino SA, Ahlskog JE. Copper deficiency myelopathy. *Archives of neurology*. 2004;61(5):762-6.
173. van Oosten BW, Barkhof F, Truyen L, Boringa JB, Bertelsmann FW, von Blomberg BM, et al. Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology*. 1996;47(6):1531-4.
174. Solomon AJ, Spain RI, Kruer MC, Bourdette D. Inflammatory neurological disease in patients treated with tumor necrosis factor alpha inhibitors. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2011;17(12):1472-87.
175. Flanagan EP, McKeon A, Lennon VA, Kearns J, Weinshenker BG, Krecke KN, et al. Paraneoplastic isolated myelopathy: clinical course and neuroimaging clues. *Neurology*. 2011;76(24):2089-95.
176. Lublin FD, Baier M, Cutter G. Effect of relapses on development of residual deficit in multiple sclerosis. *Neurology*. 2003;61(11):1528-32.
177. Berkovich R. Treatment of acute relapses in multiple sclerosis. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2013;10(1):97-105.
178. Miller H, Newell DJ, Ridley A. Multiple sclerosis. Treatment of acute exacerbations with corticotrophin (A.C.T.H.). *Lancet (London, England)*. 1961;2(7212):1120-2.
179. Rose AS, Kuzma JW, Kurtzke JF, Namerow NS, Sibley WA, Tourtellotte WW. Cooperative study in the evaluation of therapy in multiple sclerosis. ACTH vs. placebo--final report. *Neurology*. 1970;20(5):1-59.
180. Abbruzzese G, Gandolfo C, Loeb C. "Bolus" methylprednisolone versus ACTH in the treatment of multiple sclerosis. *Italian journal of neurological sciences*. 1983;4(2):169-72.
181. Barnes MP, Bateman DE, Cleland PG, Dick DJ, Walls TJ, Newman PK, et al. Intravenous methylprednisolone for multiple sclerosis in relapse. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1985;48(2):157-9.
182. Milanese C, La Mantia L, Salmaggi A, Campi A, Eoli M, Scaioli V, et al. Double-blind randomized trial of ACTH versus dexamethasone versus methylprednisolone in multiple sclerosis bouts. Clinical, cerebrospinal fluid and neurophysiological results. *European neurology*. 1989;29(1):10-4.
183. Reder AT, Lowy MT, Meltzer HY, Antel JP. Dexamethasone suppression test abnormalities in multiple sclerosis: relation to ACTH therapy. *Neurology*. 1987;37(5):849-53.
184. Beck RW, Cleary PA, Trobe JD, Kaufman DI, Kupersmith MJ, Paty DW, et al. The effect of corticosteroids for acute optic neuritis on the subsequent development of multiple sclerosis. The Optic Neuritis Study Group. *The New England journal of medicine*. 1993;329(24):1764-9.
185. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007;179(3):1634-47.
186. Lattanzi S, Cagnetti C, Danni M, Provinciali L, Silvestrini M. Oral and intravenous steroids for multiple sclerosis relapse: a systematic review and meta-analysis. *Journal of neurology*. 2017;264(8):1697-704.
187. Weinshenker BG. The natural history of multiple sclerosis: update 1998. *Seminars in neurology*. 1998;18(3):301-7.
188. Keegan BM, Noseworthy JH. Multiple sclerosis. *Annual review of medicine*. 2002;53:285-302.
189. Panitch HS. Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 1994;36 Suppl:S25-8.
190. Duschet P, Schwarz T, Soyer P, Henk A, Hausmaninger H, Gschnait F. Treatment of herpes zoster. Recombinant alpha interferon versus acyclovir. *International journal of dermatology*. 1988;27(3):193-7.

191. Korporal M, Haas J, Balint B, Fritzsching B, Schwarz A, Moeller S, et al. Interferon beta-induced restoration of regulatory T-cell function in multiple sclerosis is prompted by an increase in newly generated naive regulatory T cells. *Archives of neurology*. 2008;65(11):1434-9.
192. Ochi H, Feng-Jun M, Osoegawa M, Minohara M, Murai H, Taniwaki T, et al. Time-dependent cytokine deviation toward the Th2 side in Japanese multiple sclerosis patients with interferon beta-1b. *Journal of the neurological sciences*. 2004;222(1-2):65-73.
193. Durelli L, Conti L, Clerico M, Boselli D, Contessa G, Ripellino P, et al. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Annals of neurology*. 2009;65(5):499-509.
194. Ahn J, Feng X, Patel N, Dhawan N, Reder AT. Abnormal levels of interferon-gamma receptors in active multiple sclerosis are normalized by IFN-beta therapy: implications for control of apoptosis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2004;9:1547-55.
195. Prat A, Biernacki K, Antel JP. Th1 and Th2 lymphocyte migration across the human BBB is specifically regulated by interferon beta and copolymer-1. *Journal of autoimmunity*. 2005;24(2):119-24.
196. Rudick RA, Ransohoff RM, Lee JC, Pepler R, Yu M, Mathisen PM, et al. In vivo effects of interferon beta-1a on immunosuppressive cytokines in multiple sclerosis. *Neurology*. 1998;50(5):1294-300.
197. Hulshof S, Montagne L, De Groot CJ, Van Der Valk P. Cellular localization and expression patterns of interleukin-10, interleukin-4, and their receptors in multiple sclerosis lesions. *Glia*. 2002;38(1):24-35.
198. Reder AT, Lowy MT. Interferon-beta treatment does not elevate cortisol in multiple sclerosis. *Journal of interferon research*. 1992;12(3):195-8.
199. Gironi M, Martinelli V, Brambilla E, Furlan R, Panerai AE, Comi G, et al. Beta-endorphin concentrations in peripheral blood mononuclear cells of patients with multiple sclerosis: effects of treatment with interferon beta. *Archives of neurology*. 2000;57(8):1178-81.
200. Biernacki K, Antel JP, Blain M, Narayanan S, Arnold DL, Prat A. Interferon beta promotes nerve growth factor secretion early in the course of multiple sclerosis. *Archives of neurology*. 2005;62(4):563-8.
201. Byskosh PV, Reder AT. Interferon beta-1b effects on cytokine mRNA in peripheral mononuclear cells in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 1996;1(5):262-9.
202. Hosback S, Hardiman O, Nolan CM, Doyle MA, Gorman G, Lynch C, et al. Circulating insulin-like growth factors and related binding proteins are selectively altered in amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. 2007;17(6):472-9.
203. Hamamcioglu K, Reder AT. Interferon-beta regulates cytokines and BDNF: greater effect in relapsing than in progressive multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2007;13(4):459-70.
204. Jacobs L, Salazar AM, Herndon R, Reese PA, Freeman A, Josefowicz R, et al. Multicentre double-blind study of effect of intrathecally administered natural human fibroblast interferon on exacerbations of multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*. 1986;2(8521-22):1411-3.
205. Panitch HS, Hirsch RL, Schindler J, Johnson KP. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology*. 1987;37(7):1097-102.
206. Kappos L, Edan G, Freedman MS, Montalban X, Hartung HP, Hemmer B, et al. The 11-year long-term follow-up study from the randomized BENEFIT CIS trial. *Neurology*. 2016;87(10):978-87.
207. Simon JH, Lull J, Jacobs LD, Rudick RA, Cookfair DL, Herndon RM, et al. A longitudinal study of T1 hypointense lesions in relapsing MS: MSCRG trial of interferon beta-1a. *Multiple Sclerosis Collaborative Research Group*. *Neurology*. 2000;55(2):185-92.
208. Jacobs L, Brownschidle CM. Appropriate use of interferon beta-1a in multiple sclerosis. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 1999;11(3):155-63.
209. Karandikar NJ, Crawford MP, Yan X, Ratts RB, Brenchley JM, Ambrozak DR, et al. Glatiramer acetate (Copaxone) therapy induces CD8(+) T cell responses in patients with multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(5):641-9.

210. Biegler BW, Yan SX, Ortega SB, Tennakoon DK, Racke MK, Karandikar NJ. Glatiramer acetate (GA) therapy induces a focused, oligoclonal CD8⁺ T-cell repertoire in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2006;180(1-2):159-71.
211. Venken K, Hellings N, Thewissen M, Somers V, Hensen K, Rummens JL, et al. Compromised CD4⁺ CD25^(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology*. 2008;123(1):79-89.
212. Venken K, Hellings N, Broekmans T, Hensen K, Rummens JL, Stinissen P. Natural naive CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;180(9):6411-20.
213. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*. 1995;45(7):1268-76.
214. Li DK, Paty DW. Magnetic resonance imaging results of the PRISMS trial: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of interferon-beta1a in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Prevention of Relapses and Disability by Interferon-beta 1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis*. *Annals of neurology*. 1999;46(2):197-206.
215. O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, Comi G, Kappos L, Olsson TP, et al. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2011;365(14):1293-303.
216. Biotti D, Ciron J. First-line therapy in relapsing remitting multiple sclerosis. *Revue neurologique*. 2018;174(6):419-28.
217. Bourdette D, Gilden D. Fingolimod and multiple sclerosis: four cautionary tales. *Neurology*. 2012;79(19):1942-3.
218. Kowarik MC, Pellkofer HL, Cepok S, Korn T, Kumpfel T, Buck D, et al. Differential effects of fingolimod (FTY720) on immune cells in the CSF and blood of patients with MS. *Neurology*. 2011;76(14):1214-21.
219. Conway D, Cohen JA. Emerging oral therapies in multiple sclerosis. *Current neurology and neuroscience reports*. 2010;10(5):381-8.
220. Doggrell SA. Oral fingolimod for relapsing-remitting multiple sclerosis Evaluation of: Kappos L, Radue E-M, O'Connor P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010;362:387-401; and Cohen JA, Barkhof F, Comi G, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010;362:402-15. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2010;11(10):1777-81.
221. Eskan MA, Rose BG, Benakanakere MR, Lee MJ, Kinane DF. Sphingosine 1-phosphate 1 and TLR4 mediate IFN-beta expression in human gingival epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;180(3):1818-25.
222. Miron VE, Schubart A, Antel JP. Central nervous system-directed effects of FTY720 (fingolimod). *Journal of the neurological sciences*. 2008;274(1-2):13-7.
223. Miron VE, Hall JA, Kennedy TE, Soliven B, Antel JP. Cyclical and dose-dependent responses of adult human mature oligodendrocytes to fingolimod. *The American journal of pathology*. 2008;173(4):1143-52.
224. Ratchford JN, Costello K, Reich DS, Calabresi PA. Varicella-zoster virus encephalitis and vasculopathy in a patient treated with fingolimod. *Neurology*. 2012;79(19):2002-4.
225. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2006;354(9):899-910.
226. Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA, Confavreux C, Galetta SL, Radue EW, et al. Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2006;354(9):911-23.
227. Kleinschmidt-DeMasters BK, Tyler KL. Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2005;353(4):369-74.

228. Lee P, Plavina T, Castro A, Berman M, Jaiswal D, Rivas S, et al. A second-generation ELISA (STRATIFY JCV DxSelect) for detection of JC virus antibodies in human serum and plasma to support progressive multifocal leukoencephalopathy risk stratification. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2013;57(2):141-6.
229. Gerardi C, Bertele V, Rossi S, Garattini S, Banzi R. Preapproval and postapproval evidence on drugs for multiple sclerosis. *Neurology*. 2018;90(21):964-73.
230. Ruck T, Bittner S, Wiendl H, Meuth SG. Alemtuzumab in Multiple Sclerosis: Mechanism of Action and Beyond. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(7):16414-39.
231. Li Z, Richards S, Surks HK, Jacobs A, Panzara MA. Clinical Pharmacology of Alemtuzumab, an Anti-CD52 Immunomodulator, in Multiple Sclerosis. *Clinical and experimental immunology*. 2018.
232. Buc M. New biological agents in the treatment of multiple sclerosis. *Bratislavske lekarske listy*. 2018;119(4):191-7.
233. Pohlau D, Przuntek H, Sailer M, Bethke F, Koehler J, Konig N, et al. Intravenous immunoglobulin in primary and secondary chronic progressive multiple sclerosis: a randomized placebo controlled multicentre study. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2007;13(9):1107-17.
234. Mills RJ, Young CA. A medical definition of fatigue in multiple sclerosis. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2008;101(1):49-60.
235. Greim B, Benecke R, Zettl UK. Qualitative and quantitative assessment of fatigue in multiple sclerosis (MS). *Journal of neurology*. 2007;254 Suppl 2:i58-64.
236. Attarian HP, Brown KM, Duntley SP, Carter JD, Cross AH. The relationship of sleep disturbances and fatigue in multiple sclerosis. *Archives of neurology*. 2004;61(4):525-8.
237. Vetrugno R, Stecchi S, Scandellari C, Pierangeli G, Sabattini L, D'Angelo R, et al. Sleep-wake and body core temperature rhythms in multiple sclerosis with fatigue. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*. 2007;118(1):228-34.
238. Roelcke U, Kappos L, Lechner-Scott J, Brunnschweiler H, Huber S, Ammann W, et al. Reduced glucose metabolism in the frontal cortex and basal ganglia of multiple sclerosis patients with fatigue: a 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography study. *Neurology*. 1997;48(6):1566-71.
239. Tartaglia MC, Narayanan S, Francis SJ, Santos AC, De Stefano N, Lapierre Y, et al. The relationship between diffuse axonal damage and fatigue in multiple sclerosis. *Archives of neurology*. 2004;61(2):201-7.
240. Marrie RA, Cutter G, Tyry T, Hadjimichael O, Campagnolo D, Vollmer T. Validation of the NARCOMS registry: fatigue assessment. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2005;11(5):583-4.
241. Taus C, Giuliani G, Pucci E, D'Amico R, Solari A. Amantadine for fatigue in multiple sclerosis. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2003(2):Cd002818.
242. Rammohan KW, Rosenberg JH, Lynn DJ, Blumenfeld AM, Pollak CP, Nagaraja HN. Efficacy and safety of modafinil (Provigil) for the treatment of fatigue in multiple sclerosis: a two centre phase 2 study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2002;72(2):179-83.
243. Duffy JD, Campbell J. Bupropion for the treatment of fatigue associated with multiple sclerosis. *Psychosomatics*. 1994;35(2):170-1.
244. Stroud NM, Minahan CL. The impact of regular physical activity on fatigue, depression and quality of life in persons with multiple sclerosis. *Health and quality of life outcomes*. 2009;7:68.
245. Petajan JH, Gappmaier E, White AT, Spencer MK, Mino L, Hicks RW. Impact of aerobic training on fitness and quality of life in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 1996;39(4):432-41.
246. Paisley S, Beard S, Hunn A, Wight J. Clinical effectiveness of oral treatments for spasticity in multiple sclerosis: a systematic review. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2002;8(4):319-29.
247. Dalton CM, Keenan E, Jarrett L, Buckley L, Stevenson VL. The safety of baclofen in pregnancy: intrathecal therapy in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2008;14(4):571-2.
248. Andrews KL, Husmann DA. Bladder dysfunction and management in multiple sclerosis. *Mayo Clinic proceedings*. 1997;72(12):1176-83.

249. Ford HL. The effect of consent guidelines on a multiple sclerosis register. *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England). 2006;12(1):104-7.
250. Schurch B. Botulinum toxin for the management of bladder dysfunction. *Drugs*. 2006;66(10):1301-18.
251. Branagan GW, Moran BJ. Published evidence favors the use of suprapubic catheters in pelvic colorectal surgery. *Diseases of the colon and rectum*. 2002;45(8):1104-8.
252. Romero Y, Evans JM, Fleming KC, Phillips SF. Constipation and fecal incontinence in the elderly population. *Mayo Clinic proceedings*. 1996;71(1):81-92.
253. Moulin DE, Foley KM, Ebers GC. Pain syndromes in multiple sclerosis. *Neurology*. 1988;38(12):1830-4.
254. Clark WC, Kuhl JP, Keohan ML, Knotkova H, Winer RT, Griswold GA. Factor analysis validates the cluster structure of the dendrogram underlying the Multidimensional Affect and Pain Survey (MAPS) and challenges the a priori classification of the descriptors in the McGill Pain Questionnaire (MPQ). *Pain*. 2003;106(3):357-63.
255. Svendsen KB, Jensen TS, Hansen HJ, Bach FW. Sensory function and quality of life in patients with multiple sclerosis and pain. *Pain*. 2005;114(3):473-81.
256. Krupp LB, Christodoulou C, Melville P, Scherl WF, Pai LY, Muenz LR, et al. Multicenter randomized clinical trial of donepezil for memory impairment in multiple sclerosis. *Neurology*. 2011;76(17):1500-7.
257. Bruce J, Hancock L, Roberg B, Brown A, Henkelman E, Lynch S. Impact of armodafinil on cognition in multiple sclerosis: a randomized, double-blind crossover pilot study. *Cognitive and behavioral neurology : official journal of the Society for Behavioral and Cognitive Neurology*. 2012;25(3):107-14.
258. Harel Y, Appleboim N, Lavie M, Achiron A. Single dose of methylphenidate improves cognitive performance in multiple sclerosis patients with impaired attention process. *Journal of the neurological sciences*. 2009;276(1-2):38-40.
259. Lecat M, Decavel P, Magnin E, Lucas B, Gremeaux V, Sagawa Y. Multiple Sclerosis and Clinical Gait Analysis before and after Fampridine: A Systematic Review. *European neurology*. 2017;78(5-6):272-86.
260. O'Gorman C, Lin R, Stankovich J, Broadley SA. Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. *Neuroepidemiology*. 2013;40(1):1-12.
261. Willer CJ, Dymant DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(22):12877-82.
262. Dymant DA, Herrera BM, Cader MZ, Willer CJ, Lincoln MR, Sadovnick AD, et al. Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance. *Human molecular genetics*. 2005;14(14):2019-26.
263. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *The New England journal of medicine*. 2007;357(9):851-62.
264. Baranzini SE, Wang J, Gibson RA, Galwey N, Naegelin Y, Barkhof F, et al. Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Human molecular genetics*. 2009;18(4):767-78.
265. Patsopoulos NA. Genetics of Multiple Sclerosis: An Overview and New Directions. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2018;8(7).
266. Baranzini SE, Oksenberg JR. The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years. *Trends in genetics : TIG*. 2017;33(12):960-70.
267. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, et al. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nature genetics*. 2015;47(10):1107-13.
268. Johnston GI, Bliss GA, Newman PJ, McEver RP. Structure of the human gene encoding granule membrane protein-140, a member of the selectin family of adhesion receptors for leukocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(34):21381-5.
269. Rosa JP, Bray PF, Gayet O, Johnston GI, Cook RG, Jackson KW, et al. Cloning of glycoprotein IIIa cDNA from human erythroleukemia cells and localization of the gene to chromosome 17. *Blood*. 1988;72(2):593-600.

270. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *The Journal of clinical investigation*. 1989;84(1):92-9.
271. Watson ML, Kingsmore SF, Johnston GI, Siegelman MH, Le Beau MM, Lemons RS, et al. Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1. *The Journal of experimental medicine*. 1990;172(1):263-72.
272. Herrmann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Evans A, Ruidavets JB, et al. The P-selectin gene is highly polymorphic: reduced frequency of the Pro715 allele carriers in patients with myocardial infarction. *Human molecular genetics*. 1998;7(8):1277-84.
273. Tregouet DA, Barbaux S, Escolano S, Tahri N, Golmard JL, Tiret L, et al. Specific haplotypes of the P-selectin gene are associated with myocardial infarction. *Human molecular genetics*. 2002;11(17):2015-23.
274. Kisucka J, Chauhan AK, Zhao BQ, Patten IS, Yesilaltay A, Krieger M, et al. Elevated levels of soluble P-selectin in mice alter blood-brain barrier function, exacerbate stroke, and promote atherosclerosis. *Blood*. 2009;113(23):6015-22.
275. Lu TT, Cyster JG. Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science (New York, NY)*. 2002;297(5580):409-12.
276. Davenport RJ, Munday JR. Alpha4-integrin antagonism--an effective approach for the treatment of inflammatory diseases? *Drug discovery today*. 2007;12(13-14):569-76.
277. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*. 1992;356(6364):63-6.
278. Leger OJ, Yednock TA, Tanner L, Horner HC, Hines DK, Keen S, et al. Humanization of a mouse antibody against human alpha-4 integrin: a potential therapeutic for the treatment of multiple sclerosis. *Human antibodies*. 1997;8(1):3-16.
279. Steinman L. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nature reviews Drug discovery*. 2005;4(6):510-8.
280. O'Doherty C, Roos IM, Antiguada A, Aransay AM, Hillert J, Vandenbroeck K. ITGA4 polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2007;189(1-2):151-7.
281. Durmanova V, Shawkatova I, Javor J, Parnicka Z, Copikova-Cundrakova D, Turcani P, et al. VLA4 Gene Polymorphism and Susceptibility to Multiple Sclerosis in Slovaks. *Folia biologica*. 2015;61(1):8-13.
282. Engelhardt B, Briskin MJ. Therapeutic targeting of alpha 4-integrins in chronic inflammatory diseases: tipping the scales of risk towards benefit? *European journal of immunology*. 2005;35(8):2268-73.
283. Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, Takimoto R, Tanaka I, Fujimi A, et al. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nature medicine*. 2003;9(9):1158-65.
284. Garmy-Susini B, Jin H, Zhu Y, Sung RJ, Hwang R, Varner J. Integrin alpha4beta1-VCAM-1-mediated adhesion between endothelial and mural cells is required for blood vessel maturation. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(6):1542-51.
285. Shulman LM, Barker PE, Hart JT, Messer Peters PG, Ruddle FH. Assignment of low-molecular-weight human (2', 5')A synthetase to chromosome 11. *Somatic cell and molecular genetics*. 1984;10(3):247-57.
286. Wu JS, Giuffra LA, Goodfellow PJ, Myers S, Carson NL, Anderson L, et al. The beta subunit locus of the human fibronectin receptor: DNA restriction fragment length polymorphism and linkage mapping studies. *Human genetics*. 1989;83(4):383-90.
287. Giuffra LA, Lichter P, Wu JS, Kennedy JL, Pakstis AJ, Rogers J, et al. Genetic and physical mapping and population studies of a fibronectin receptor beta-subunit-like sequence on human chromosome 19. *Genomics*. 1990;8(2):340-6.
288. Suzuki K, Okuno T, Yamamoto M, Pasterkamp RJ, Takegahara N, Takamatsu H, et al. Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through alpha1beta1 integrin. *Nature*. 2007;446(7136):680-4.

289. Kwok T, Zabler D, Urman S, Rohde M, Hartig R, Wessler S, et al. Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*. 2007;449(7164):862-6.
290. Conrad C, Boyman O, Tonel G, Tun-Kyi A, Laggner U, de Fougères A, et al. Alpha1beta1 integrin is crucial for accumulation of epidermal T cells and the development of psoriasis. *Nature medicine*. 2007;13(7):836-42.
291. Bauer M, Brakebusch C, Coisne C, Sixt M, Wekerle H, Engelhardt B, et al. Beta1 integrins differentially control extravasation of inflammatory cell subsets into the CNS during autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(6):1920-5.
292. Erle DJ, Sheppard D, Breuss J, Ruegg C, Pytela R. Novel integrin alpha and beta subunit cDNAs identified in airway epithelial cells and lung leukocytes using the polymerase chain reaction. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1991;5(2):170-7.
293. Mora JR, Bono MR, Manjunath N, Weninger W, Cavanagh LL, Roseblatt M, et al. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature*. 2003;424(6944):88-93.
294. Doring A, Pfeiffer F, Meier M, Dehouck B, Tauber S, Deutsch U, et al. TET inducible expression of the alpha4beta7-integrin ligand MAdCAM-1 on the blood-brain barrier does not influence the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *European journal of immunology*. 2011;41(3):813-21.
295. Andrew DP, Rott LS, Kilshaw PJ, Butcher EC. Distribution of alpha 4 beta 7 and alpha E beta 7 integrins on thymocytes, intestinal epithelial lymphocytes and peripheral lymphocytes. *European journal of immunology*. 1996;26(4):897-905.
296. Kanwar JR, Kanwar RK, Wang D, Krissansen GW. Prevention of a chronic progressive form of experimental autoimmune encephalomyelitis by an antibody against mucosal addressin cell adhesion molecule-1, given early in the course of disease progression. *Immunology and cell biology*. 2000;78(6):641-5.
297. Gottrand G, Courau T, Thomas-Vaslin V, Prevel N, Vazquez T, Ruocco MG, et al. Regulatory T-cell development and function are impaired in mice lacking membrane expression of full length intercellular adhesion molecule-1. *Immunology*. 2015;146(4):657-70.
298. Greve JM, Davis G, Meyer AM, Forte CP, Yost SC, Marlor CW, et al. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell*. 1989;56(5):839-47.
299. Trask B, Fertitta A, Christensen M, Youngblom J, Bergmann A, Copeland A, et al. Fluorescence in situ hybridization mapping of human chromosome 19: cytogenetic band location of 540 cosmids and 70 genes or DNA markers. *Genomics*. 1993;15(1):133-45.
300. Simmons D, Makgoba MW, Seed B. ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature*. 1988;331(6157):624-7.
301. Bella J, Kolatkar PR, Marlor CW, Greve JM, Rossmann MG. The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(8):4140-5.
302. Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren's syndrome. *The British journal of ophthalmology*. 1999;83(4):390-5.
303. Swingler S, Brichacek B, Jacque JM, Ulich C, Zhou J, Stevenson M. HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection. *Nature*. 2003;424(6945):213-9.
304. Zuccarello D, Salpietro DC, Gangemi S, Toscano V, Merlino MV, Briuglia S, et al. Familial chronic nail candidiasis with ICAM-1 deficiency: a new form of chronic mucocutaneous candidiasis. *Journal of medical genetics*. 2002;39(9):671-5.
305. Ueda R, Kohanbash G, Sasaki K, Fujita M, Zhu X, Kastenhuber ER, et al. Dicer-regulated microRNAs 222 and 339 promote resistance of cancer cells to cytotoxic T-lymphocytes by down-regulation of ICAM-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(26):10746-51.
306. Cybulsky MI, Fries JW, Williams AJ, Sultan P, Eddy R, Byers M, et al. Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1991;88(17):7859-63.
307. Taylor JGt, Tang DC, Savage SA, Leitman SF, Heller SI, Serjeant GR, et al. Variants in the VCAM1 gene and risk for symptomatic stroke in sickle cell disease. *Blood*. 2002;100(13):4303-9.
 308. Idelman G, Taylor JG, Tongbai R, Chen RA, Haggerty CM, Bilke S, et al. Functional profiling of uncommon VCAM1 promoter polymorphisms prevalent in African American populations. *Human mutation*. 2007;28(8):824-9.
 309. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005;436(7050):518-24.
 310. Allavena R, Noy S, Andrews M, Pullen N. CNS elevation of vascular and not mucosal addressin cell adhesion molecules in patients with multiple sclerosis. *The American journal of pathology*. 2010;176(2):556-62.
 311. Leung E, Berg RW, Langley R, Greene J, Raymond LA, Augustus M, et al. Genomic organization, chromosomal mapping, and analysis of the 5' promoter region of the human MAdCAM-1 gene. *Immunogenetics*. 1997;46(2):111-9.
 312. Muro AF, Chauhan AK, Gajovic S, Iaconcig A, Porro F, Stanta G, et al. Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. *The Journal of cell biology*. 2003;162(1):149-60.
 313. Jhanwar SC, Jensen JT, Kaelbling M, Chaganti RS, Klinger HP. In situ localization of human fibronectin (FN) genes to chromosome regions 2p14----p16, 2q34----q36, and 11q12.1----q13.5 in germ line cells, but to chromosome 2 sites only in somatic cells. *Cytogenetics and cell genetics*. 1986;41(1):47-53.
 314. Bing DH, Almeda S, Isliker H, Lahav J, Hynes RO. Fibronectin binds to the C1q component of complement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79(13):4198-201.
 315. Ridley A. Molecular switches in metastasis. *Nature*. 2000;406(6795):466-7.
 316. Goossens K, Van Soom A, Van Zeveren A, Favoreel H, Peelman LJ. Quantification of fibronectin 1 (FN1) splice variants, including two novel ones, and analysis of integrins as candidate FN1 receptors in bovine preimplantation embryos. *BMC developmental biology*. 2009;9:1.
 317. Lee CS, Fu H, Baratang N, Rousseau J, Kumra H, Sutton VR, et al. Mutations in Fibronectin Cause a Subtype of Spondylometaphyseal Dysplasia with "Corner Fractures". *American journal of human genetics*. 2017;101(5):815-23.
 318. Stoffels JM, de Jonge JC, Stancic M, Nomden A, van Strien ME, Ma D, et al. Fibronectin aggregation in multiple sclerosis lesions impairs remyelination. *Brain : a journal of neurology*. 2013;136(Pt 1):116-31.
 319. Young MF, Kerr JM, Termine JD, Wewer UM, Wang MG, McBride OW, et al. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics*. 1990;7(4):491-502.
 320. Crosby AH, Edwards SJ, Murray JC, Dixon MJ. Genomic organization of the human osteopontin gene: exclusion of the locus from a causative role in the pathogenesis of dentinogenesis imperfecta type II. *Genomics*. 1995;27(1):155-60.
 321. Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegard D. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(12):4473-5.
 322. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science (New York, NY)*. 2000;287(5454):860-4.
 323. Morimoto I, Sasaki Y, Ishida S, Imai K, Tokino T. Identification of the osteopontin gene as a direct target of TP53. *Genes, chromosomes & cancer*. 2002;33(3):270-8.
 324. Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science (New York, NY)*. 1996;271(5248):509-12.
 325. Chiocchetti A, Comi C, Indelicato M, Castelli L, Mesturini R, Bensi T, et al. Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *Journal of neuroimmunology*. 2005;163(1-2):172-8.

326. Comi C, Cappellano G, Chiocchetti A, Orilieri E, Buttini S, Ghezzi L, et al. The impact of osteopontin gene variations on multiple sclerosis development and progression. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:212893.
327. Compston A, Sadovnick AD. Epidemiology and genetics of multiple sclerosis. *Current opinion in neurology and neurosurgery*. 1992;5(2):175-81.
328. Sokratous M, Dardiotis E, Tsouris Z, Bellou E, Michalopoulou A, Siokas V, et al. Deciphering the role of DNA methylation in multiple sclerosis: emerging issues. *Auto-immunity highlights*. 2016;7(1):12.
329. Efthymiou G, Dardiotis E, Liaskos C, Marou E, Tsimourtou V, Scheper T, et al. Anti-hsp60 antibody responses based on *Helicobacter pylori* in patients with multiple sclerosis: (ir)Relevance to disease pathogenesis. *Journal of neuroimmunology*. 2016;298:19-23.
330. Sawcer S, Franklin RJ, Ban M. Multiple sclerosis genetics. *The Lancet Neurology*. 2014;13(7):700-9.
331. Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka KV, Maurer M, et al. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2005;58(1):50-7.
332. Brynedal B, Wojcik J, Esposito F, Debailleul V, Yaouanq J, Martinelli-Boneschi F, et al. MGAT5 alters the severity of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2010;220(1-2):120-4.
333. Genome-wide association study of severity in multiple sclerosis. *Genes and immunity*. 2011;12(8):615-25.
334. George MF, Briggs FB, Shao X, Gianfrancesco MA, Kockum I, Harbo HF, et al. Multiple sclerosis risk loci and disease severity in 7,125 individuals from 10 studies. *Neurology Genetics*. 2016;2(4):e87.
335. Tsivgoulis G, Katsanos AH, Mavridis D, Grigoriadis N, Dardiotis E, Heliopoulos I, et al. The Efficacy of Natalizumab versus Fingolimod for Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A Systematic Review, Indirect Evidence from Randomized Placebo-Controlled Trials and Meta-Analysis of Observational Head-to-Head Trials. *PloS one*. 2016;11(9):e0163296.
336. Ramagopalan SV, Deluca GC, Morrison KM, Herrera BM, Dyment DA, Lincoln MR, et al. Analysis of 45 candidate genes for disease modifying activity in multiple sclerosis. *Journal of neurology*. 2008;255(8):1215-9.
337. Ramagopalan SV, Deluca GC, Degenhardt A, Ebers GC. The genetics of clinical outcome in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2008;201-202:183-99.
338. Andreoli V, Cittadella R, Valentino P, Condino F, La Russa A, Liguori M, et al. The role of VLA4 polymorphisms in multiple sclerosis: an association study. *Journal of neuroimmunology*. 2007;189(1-2):125-8.
339. Rittling SR, Singh R. Osteopontin in Immune-mediated Diseases. *Journal of dental research*. 2015;94(12):1638-45.
340. Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, et al. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science (New York, NY)*. 2001;294(5547):1731-5.
341. Caillier S, Barcellos LF, Baranzini SE, Swerdlin A, Lincoln RR, Steinman L, et al. Osteopontin polymorphisms and disease course in multiple sclerosis. *Genes and immunity*. 2003;4(4):312-5.
342. Hensiek AE, Roxburgh R, Meranian M, Seaman S, Yeo T, Compston DA, et al. Osteopontin gene and clinical severity of multiple sclerosis. *Journal of neurology*. 2003;250(8):943-7.
343. Tsivgoulis G, Katsanos AH, Grigoriadis N, Hadjigeorgiou GM, Heliopoulos I, Papathanasopoulos P, et al. The Effect of Disease Modifying Therapies on Disease Progression in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one*. 2015;10(12):e0144538.
344. Tsivgoulis G, Katsanos AH, Grigoriadis N, Hadjigeorgiou GM, Heliopoulos I, Papathanasopoulos P, et al. The effect of disease-modifying therapies on brain atrophy in patients with clinically isolated syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2015;8(5):193-202.