



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Θέμα: Γενετικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου της ιντεγκρίνης α4 ως
γενετικοί τροποποιητές της κλινικής πορείας της Πολλαπλής Σκλήρυνσης**

Μιχαλοπούλου Αμαλία

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Δαρδιώτης Ευθύμιος, Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας, Επιβλέπων
- Χατζηγεωργίου Γεώργιος, Καθηγητής Νευρολογίας
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Μοριακή Ιατρική και στη Νευρογενετική

Λάρισα, Οκτώβριος, 2016



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**Integrin alpha 4 genetic variants as genetic modifiers of Multiple Sclerosis
clinical course**

By
Michalopoulou Amalia

Three-member committee:

- Dardiotis Efthimios, Assistant Professor of Neurology, Supervisor
- Hadjigeorgiou Georgios, Professor of Neurology
- Germenis Anastasios, Professor of Laboratory Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Molecular Medicine and Neurogenetics

Larissa , October, 2016

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ – Η ΝΟΣΟΣ

1.1.Ιστορική αναδρομή	10
1.2.Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά	12
1.3.Αιτιολογία της νόσου	13
1.4.Ανοσοπαθογένεση	15
1.5.Παθοφυσιολογία	18
1.6.Παθολογική ανατομική.....	19
1.7.Κλινικές μορφές.....	20
1.8.Κλινική Συμπτωματολογία.....	22
1.9.Διάγνωση	25
1.9.1.Διαγνωστικές εξετάσεις.....	25
1.9.2.Διαγνωστικά κριτήρια	28
1.9.3.Διαφορική διάγνωση	29
1.10.Πρόγνωση	31
1.11.Θεραπεία	32

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΟΙ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΕΣ ΚΑΙ Η ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

2.1.Οι ιντεγκρίνες	36
2.2.Ο ρόλος της ιντεγκρίνης α4	37
2.3.Θεραπείες με στόχο την ιντεγκρίνη α4	38

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Υλικά	44
2.Μέθοδολογία	44
3.Αποτελέσματα	52
4.Συζήτηση	60

ΠΗΓΕΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63
---------------------------------	-----------

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η Πολλαπλή Σκλήρυνση (ΠΣ) είναι μια νόσος που αποτελεί πολύ συχνή αιτία νευρολογικού ελλείμματος σε νεαρές ηλικίες με τον επιπολασμό της να φτάνει τα 2,3 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως. Χαρακτηριστικά της αποτελούν η φλεγμονή, η πολυεστιακή απομυελίνωση και η νευραξονική εκφύλιση, που τελικά οδηγούν τα άτομα σε μόνιμη αναπηρία.

Φαίνεται πως πρόκειται για μια πολυπαραγοντική νόσο, όπως προκύπτει και από το πλήθος μελετών που έχουν διεξαχθεί με στόχο να αποκαλύψουν τα αίτια εκδήλωσής της. Έτσι, την προδιάθεση της νόσου επηρεάζουν γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Μια σαφής συσχέτιση υπάρχει με γονίδια του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex - MHC) και μάλιστα την πιο ισχυρή εμφανίζει το αλληλίο HLA-DRB1 15*01. Τα τελευταία χρόνια σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί και ως προς τον προσδιορισμό γονιδίων εκτός MHC που σχετίζονται με τη νόσο, με πολύ ενδιαφέρον εύρημα το γεγονός πως πολλά από αυτά γειτνιάζουν με γενετικούς τόπους που κωδικοποιούν ανοσολογικά μόρια.

Η κλινική εικόνα της ΠΣ είναι εξαιρετικά ετερογενής και παρά το γεγονός πως αδρά διαχωρίζεται σε υποτροπιάζουσα και προϊούσα, υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση των ασθενών ως προς την βαρύτητα των συμπτωμάτων και την κλινική πορεία. Επιδημιολογικά δεδομένα υποδεικνύουν επιπλέον την σύνδεση των γενετικών παραγόντων με τον κλινικό φαινότυπο και την πορεία νόσου, εκτός από την προδιάθεση. Καθένας από αυτούς πιθανόν συμβάλλει σε αρκετά μικρό ποσοστό. Ο καθορισμός ωστόσο ακόμη και παραγόντων με μικρή συμβολή μπορεί να έχει θετικές επιπτώσεις στην πρόγνωση της έκβασης αλλά στην επιλογή θεραπειών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να ερευνήσουμε την πιθανή σύνδεση των γενετικών παραλλαγών του μορίου της ιντεγκρίνης α4 με την καλοήγη πορεία νόσου. Η ιντεγκρίνη α4 είναι γνωστό πως συμβάλλει στην προσκόλληση και μετανάστευση των λεμφοκυττάρων εντός του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, παίζει επομένως καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη φλεγμονής στο ΚΝΣ, με αποτέλεσμα την απομυελίνωση και νευροεκφύλιση.

Προσπαθήσαμε να καλύψουμε το μεγαλύτερο μέρος της γενετικής ποικιλότητας του γονιδίου ITGA4 και εντοπίσαμε 36 SNPs από τα οποία γονοτυπήθηκαν τελικά 31. Κριτήριο μας ήταν η καλοήγη πορεία νόσου των ασθενών και σαν μέτρο χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα MSSS (Multiple Sclerosis Severity Scale).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς για τη συμβολή τους σε αυτή την προσπάθεια: Τον Επίκουρο Καθηγητή Νευρολογίας κ.Ευθύμιο Δαρδιώτη, Επιβλέποντα Καθηγητή μου, για την άμεση υποστήριξη που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της ερευνητικής εργασίας, υποστήριξη υλική, ηθική και επιστημονική. Τον Καθηγητή Νευρολογίας κ. Γεώργιο Χατζηγεωργίου για τη σοφή καθοδήγησή του σε κάθε δυσκολία. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους μεταπτυχιακούς συμφοιτητές, συναδέλφους μου, φίλους και συνοδοιπόρους αυτή τη χρόνια κυρία Μαρία Σωκράτους και κύριο Ζήση Τσούρη, τον συνάδελφο κύριο Βασίλειο Σιώκα, τον καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας κύριο Αναστάσιο Γερμενή και τέλος το προσωπικό του εργαστηρίου για την καθοδήγηση και βοήθεια τους στην επαφή μου με τις εργαστηριακές τεχνικές.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της μελέτης: Η Πολλαπλή Σκλήρυνση (ΠΣ) είναι μια πολυπαραγοντική νευροφλεγμονώδης και νευροεκφυλιστική νόσος που χαρακτηρίζεται από σημαντική ετερογένεια ως προς την κλινική της εικόνα και την πρόγνωση. Μέλετες έχουν υποδείξει συσχέτιση της προδιάθεσης νόσου με γενετικούς παράγοντες και υπάρχουν ακόμη στοιχεία υποδηλωτικά της συμβολής των γενετικών παραγόντων στον κλινικό φαινότυπο της νόσου. Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό να εξετάσει την πιθανή επίδραση στον κλινικό φαινότυπο της ΠΣ γενετικών παραλλαγών ενός μορίου που εμπλέκεται στην προσκόλληση και μετανάστευση μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού των λευκοκυττάρων στο ΚΝΣ, του μορίου της ιντεγκρίνης α4.

Μέθοδος: Συλλέξαμε δείγματα περιφερικού αίματος από 389 ασθενείς με ΠΣ σε τρία κέντρα σε Ελλάδα και Κύπρο. Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε αυτούς με καλοήγη πορεία (n=109) και σε αυτούς με μη καλοήγη (n=280) με βάση την κλίμακα MSSS. Έγινε γονοτύπηση σε 31 tagging SNPs που εντοπίστηκαν στο γονίδιο που κωδικοποιεί την ιντεγκρίνη α4 (ITGA4), σε μία προσπάθεια να καλυφθεί όλη η γενετική ετερογένεια της περιοχής. Οι SNPs αναλύθηκαν για συσχέτιση με την καλοήγη μορφή, υποθέτωντας το συνεπικρατικό μοντέλο κληρονόμησης. Η διόρθωση για πολλαπλές συγκρίσεις έγινε με την μέθοδο Bonferroni.

Αποτελέσματα: Για 9 SNPs υπήρξε τάση για συσχέτιση. Στατιστικά σημαντική συσχέτιση, που διατηρήθηκε με τη διόρθωση Bonferroni βρέθηκε για τον T/C γονότυπο του rs1449264 σε σχέση με τον T/T ως προς την καλοήγη πορεία νόσου. Συγκεκριμένα, οι ετεροζυγώτες με γονότυπο T/C είχαν μεγαλύτερες πιθανότητες για καλοήγη πορεία ΠΣ [OR:3,17, 95% CI (1.77-5.68), p=0.0003]

Συμπεράσματα: Η μελέτη μας δίνει στοιχεία εμπλοκής στον κλινικό φαινότυπο της ΠΣ στον ελληνικό πληθυσμό των γονιδιακών πολυμορφισμών της ιντεγκρίνης α4, η οποία σχετίζεται με τη μετακίνηση των λεμφοκυττάρων εντός του ΚΝΣ και την ενεργοποίησή τους. Το εύρημά μας αυτό μπορεί να αποτελέσει στοιχείο τόσο πρόγνωσης της νόσου, όσο και επιλογής θεραπευτικών αποφάσεων ή ακόμα πιθανών θεραπευτικών στόχων.

Λέξεις κλειδιά: Πολλαπλή Σκλήρυνση, Πορεία., Ιντεγκρίνη, Πολυμορφισμοί

ABSTRACT

Aim of the study: Multiple Sclerosis (MS) is a multifactorial neuroinflammatory and neurodegenerative disease characterized by significant heterogeneity in terms of clinical manifestations and prognosis. Several studies have suggested association of genetic variants with susceptibility to MS and there are also suggestive evidence of the contribution of genetic factors to the clinical phenotype of the disease. The present study was designed to examine the possible effect on the clinical phenotype of MS of genetic variants of a molecule involved in leucocyte adhesion and migration through the blood-brain barrier in CNS, the molecule integrin $\alpha 4$.

Method: We collected peripheral blood samples from 389 patients with MS in three centers in Greece and Cyprus. Patients were classified to those with benign course ($n = 109$) and those with non-benign ($n = 280$) according to MSSS scale. We genotyped 31 tagging SNPs identified in the gene encoding integrin alpha 4 (ITGA4) in an attempt to cover the entire genetic heterogeneity of the region. SNPs were analyzed in order to identify correlation with benign course, assuming the codominant model of inheritance. The correction for multiple comparisons was done by the Bonferroni method.

Results: There was a trend for association for 9 SNPs. A statistically significant correlation, that survived Bonferroni correction was found for T / C rs1449264 genotype with respect to the T / T in benign disease course. Specifically, heterozygotes with T / C genotype were more likely to have benign course of MS [OR:3,17, 95% CI (1.77-5.68), $p=0.0003$]

Conclusions: Our study provides evidence that genetic polymorphisms of integrin alpha 4, which is associated with lymphocyte trafficking and activation within the CNS are implicated in the clinical phenotype of MS in Greek population. Our finding can be a factor in both prognosis of the disease, selection of treatment decisions or even potential therapeutic targets.

Key words: Multiple sclerosis, Course, ITGA4, Integrin, Polymorphism

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Πολλαπλή Σκλήρυνση είναι μια χρόνια νευροφλεγμονώδης και νευροεκφυλιστική νόσος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος με κύριο χαρακτηριστικό της την πολυεστιακή απομυελίνωση. Παθολογικά, υπάρχει διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα, καταστροφή των ελύτρων μυελίνης, ενεργοποίηση μικρογλοίας και ποικίλλου βαθμού αξονική εκφύλιση ήδη από τα πρώτα στάδια της νόσου. Οι απομυελινωτικές εστίες υπάρχουν διάσπαρτες στο ΚΝΣ, τόσο στη λευκή όσο και στη φαιά ουσία και ευθύνονται για την εμφάνιση των νευρολογικών διαταραχών.

Όσον αφορά τα αίτια εμφάνισης τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά υποδεικνύουν διπλή συμμετοχή. Συμμετέχουν τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες με μια σχέση αλληλεπίδρασης.

Η νόσος αποτελεί το πιο κοινό αίτιο απομυελινωτικής νόσου σε νεαρά άτομα αν και η εικόνα της είναι εξαιρετικά ετερογενής. Αδρά έχει διαχωριστεί σε τέσσερις κλινικές μορφές, παρολαυτά τα άτομα διαφοροποιούνται μεταξύ τους αρκετά ως προς τη συμπτωματολογία και τη διαβάθμιση του νευρολογικού ελλείματος. Η πλειοψηφία των ασθενών εμφανίζει την υποτροπιάζουσα μορφή, οπότε έρχονται αντιμέτωποι με εναλλαγή εξάρσεων και υφέσεων, ενώ πολλοί από αυτούς αργότερα θα μεταπέσουν σε προϊούσα πορεία νόσου με σταθερά επιδεινούμενη νευρολογική έκπτωση. Ένα μικρό ποσοστό ασθενών εμφανίζει προϊούσα πορεία ήδη από την έναρξη.

Στις μέρες μας οι θεραπευτικές επιλογές είναι αρκετές, παρολαυτά είναι δύσκολο να προβλεφθούν οι συνέπειες αυτών μακροπρόθεσμα, ενώ δεν υπάρχουν σαφείς οδηγίες για το πότε πρέπει να γίνει η έναρξη θεραπείας ή για το πώς επιλέγεται η κατάλληλη μεταξύ των διαθέσιμων.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ – Η ΝΟΣΟΣ

1.1.ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η ιστορία της Πολλαπλής Σκλήρυνσης άρχεται ήδη από τον 14^ο αιώνα οπότε υπάρχουν και οι πρώτες καταγραφές της, αλλά ως νόσος αναγνωρίστηκε τον 19^ο. Μια από τους πρώτους καταγεγραμμένους ασθενείς ήταν η Ολλανδή μοναχή Saint Lidwina η οποία πέθανε στα 53 της έτη από μια νόσο που τα συμπτώματα και η πορεία πιθανόν ομοίζαν με αυτή της Πολλαπλής Σκλήρυνσης. Στα 16 της μετά από μια πτώση κατά την παγοδρομία, εμφάνισε έντονους πόνους, κεφαλαλγίες, διαταραχές οράσεως και βάδισης σε μια πορεία διαρκώς επιδεινούμενη αλλά με παρεμβλλόμενα διαστήματα υφέσεων που τελικά την οδήγησε σε παράλυση και θάνατο. Μια δεύτερη καταγραφή ασθενούς με ΠΣ αποτελεί ο εγγονός του βασιλιά Γεώργιου του Γ' το 1822, ο οποίος μας πληροφορεί για τα συμπτώματά του ο ίδιος μέσα από το ημερολόγιό του [1,2].

Τα χρόνια που ακολούθησαν η Πολλαπλή Σκλήρυνση αναγνωρίστηκε σαν ξεχωριστή νόσος και άρχισε να μελετάται. Ο Carswell το 1838 κατέγραψε για πρώτη φορά την παρουσία των χαρακτηριστικών πλακών της νόσου μέσα από τις αυτοψίες των ασθενών του. Ο Jean-Martin Charcot λίγες δεκαετίες αργότερα ασχολήθηκε πιο διεξοδικά και μάλιστα έδωσε μια λεπτομερή περιγραφή τόσο των κλινικών της εκδηλώσεων όσο και των αλλαγών που προκαλούσε στην εικόνα του εγκεφάλου.

Αφορμή στάθηκε μια ασθενής, η οποία εμφανίστηκε στο ιατρείο του με ένα είδος τρόμου άγνωστου σε εκείνον μέχρι τότε. Ο Charcot κατέγραψε και τα υπόλοιπα συμπτώματα της κοπέλας, όπως διαταραχές στην ομιλία και στις κινήσεις των ματιών και τα συνέκρινε και μετά το θάνατό της εξέτασε τον εγκέφαλό της και εντόπισε τις χαρακτηριστικές πλάκες της Πολλαπλής Σκλήρυνσης. Ονόμασε τη νόσο “sclérose en plaques disséminées”. Εκείνο που δεν κατάφερε όμως μέχρι και το τέλος της καριέρας του ήταν μια αποτελεσματική θεραπεία, καθώς ότι και αν είχε δοκιμάσει, μεταξύ αυτών στριχνίνη και ενέσεις από χρυσό ή ασήμι, δεν απέδιδαν [3].

Αρχικά οι γνώσεις των ειδικών βασίστηκαν μόνο στην παρατήρηση, καθώς η επιστήμη της βιολογίας και οι τεχνολογίες δεν είχαν αναπτυχθεί αρκετά. Η μυελίνη ανακαλύφθηκε και μελετήθηκε από τον Dr. Louis Ranvier το 1878 και τα κύτταρα που την παράγουν, τα ολιγοδενδροκύτταρα, το 1928. Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα διατυπώθηκαν η γενετική προδιάθεση και η λοιμώδης θεωρία όσον αφορά την αιτία νόσησης. Χάρη στους τιμημένους με Νόμπελ Ιατρικής Dr. Camillo Golgi και Dr. Santiago Ramon y Cajal βελτιώθηκε η μελέτη των νευρικών κυττάρων στο

μικροσκόπιο και έτσι ο Dr. James Dawson κατάφερε το 1916 μελετώντας εγκεφάλους να περιγράψει την προκαλούμενη φλεγμονή γύρω από τα αγγεία και την καταστροφή της μυελίνης [1,2].

Αμέσως μετά τον Α' Παγκόσμιο πόλεμο η έρευνα πάνω στην Πολλαπλή Σκλήρυνση έγινε πιο επισταμένη. Εντοπίστηκαν μεταβολές στο ΕΝΥ και άρχισαν να αναζητούνται αίτια εμφάνισης και πιθανές θεραπείες. Αρχικά ενοχοποιήθηκε μια τοξίνη, η οποία μπορούσε να εισέρχεται στον εγκέφαλο, αλλά κάτι τέτοιο δεν μπόρεσε να επαληθευθεί γιατί δεν έγινε ποτέ ανιχνεύσιμη. Άλλο αίτιο θεωρήθηκαν οι κυκλοφορικές διαταραχές γιατί παρατηρήθηκε πως η διακοπή της αιματικής ροής στον εγκέφαλο προκαλούσε παρόμοιες με τη σκλήρυνση βλάβες στη μυελίνη. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν ως φάρμακα αντιπηκτικά και αγγειοδιασταλτικά.

Το 1935 ο Dr. Thomas Rives ανακάλυψε το μοντέλο της αλλεργικής εγκεφαλομυελίτιδας (experimental allergic encephalomyelitis-EAE), μια ανακάλυψη σταθμό για την κατανόηση και μελέτη της ανοσολογίας. Ο Rivers ενίοντας μυελίνη σε πειραματόζωα διέγειρε το ανοσοποιητικό τους ώστε να επιτεθεί στη δική τους μυελίνη.

Λίγα χρόνια αργότερα, το 1946, ιδρύθηκε η Εθνική Κοινότητα Πολλαπλής Σκλήρυνσης (National Multiple Sclerosis Society).

Ακολούθησε η αποκάλυψη των ολιγοκλωνικών ζωνών στο ΕΝΥ των ασθενών και η πιο έντονη παρουσία της νόσου σε περιοχές βορειότερα του ισημερινού. Η ανάγκη για πιο αντικειμενική αξιολόγηση οδήγησε στο να σχεδιαστούν κλίμακες βαρύτητας. Θεραπευτικά, δοκιμάστηκε η αδενοκορτικοτρόπος ορμόνη ACTH για τη θεραπεία των οξέων προσβολών και το 1993 η IFN-β και η οξική γλατιραμέρη σαν τροποποιητικές θεραπείες. Παράλληλα έγιναν πιο πολλά γνωστά ως προς την παθογένεια και παθολογοανατομία.

Με την πρόοδο της τεχνολογίας εισήχθησαν η Υπολογιστική και η Μαγνητική τομογραφία (CT,MRI) και δόθηκε η δυνατότητα μέσω της απικόνισης για καλύτερη παρακολούθηση του φορτίου της νόσου, της πορείας και της ανταπόκρισης ή μη στη θεραπεία [1,2].

1.2.ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η Πολλαπλή Σκλήρυνση τυπικά εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας 15-45 ετών. Σπάνια η έναρξη μπορεί να γίνει στην παιδική ηλικία είτε ακόμα και στο 70ό έτος [4]. Η νόσος προτιμά το γυναικείο φύλο με την αναλογία γυναικών:ανδρών να είναι 2:1 και μια τάση τα τελευταία χρόνια ο αριθμός των γυναικών να γίνει τριπλάσιος. Στους άνδρες η έναρξη είναι συνήθως σε μεγαλύτερη ηλικία απ'ότι στις γυναίκες, οι πιθανότητες για πρωτοπαθή προϊούσα μορφή μεγαλύτερες και το χρονικό διάστημα επιδείνωσης της πορείας μικρότερο [5-7].

Σύμφωνα με τα επιδημιολογικά στοιχεία της Multiple Sclerosis International Federation (MSIF) για το 2013, σε παγκόσμιο επίπεδο νοσούν περίπου 2,3 εκατομμύρια άτομα. Ο επιπολασμός, αν και ποικίλλει αρκετά, φαίνεται πως σχετίζεται με το γεωγραφικό πλάτος με μια τάση να αυξάνει όσο απομακρυνόμαστε από τον ισημερινό. Είναι υψηλότερος στη Βόρεια Αμερική (στον Καναδά φτάνει τις 240/100000 πληθυσμού) και στη Βόρεια Ευρώπη (>200/100000 σε Σουηδία-Φιλανδία) και χαμηλότερος στην Ανατολική Ασία και στην Αφρική (μέσος όρος 51,52/100000) [8,9]. Στην Ελλάδα παρατηρείται αύξηση του επιπολασμού τα τελευταία χρόνια από 10,1/100.000 το 1984 σε 119,61/100.000 στην Δυτική Ελλάδα το 2006 [10,11].

Μελέτες μετακίνησης πληθυσμών, δείχνουν ότι με τη μετανάστευση αλλάζει και η συχνότητα εμφάνισης. Πιο συγκεκριμένα, άτομα που μετανάστευσαν πριν την εφηβεία από μια χώρα με υψηλή συχνότητα σε μια χώρα με χαμηλή, εμφάνισαν τη συχνότητα της χώρας προορισμού. Αντίθετα, άτομα που μετακινήθηκαν μετά την εφηβεία, εμφάνισαν τη συχνότητα της χώρας από την οποία προήλθαν. Φαίνεται, λοιπόν, πως κάποιος περιβαλλοντικός παράγοντας επιδρά στην παιδική ηλικία που επηρεάζει την εκδήλωση της νόσου [12]. Περιβαλλοντικός παράγοντας πρέπει να δρα και κατά την ενδομήτρια ή μεταγεννητική περίοδο καθώς, μεταξύ των αδερφών παρατηρείται αυξημένη συχνότητα στα διζυγωτικά δίδυμα και επιπλέον προκύπτει προτίμηση όσον αφορά το μήνα γέννησης (στις βόρειες χώρες τα παιδιά που γεννιούνται Μάιο έχουν πιο πολλές πιθανότητες σε σχέση με τα παιδιά του Νοεμβρίου) [13-15]. Τέλος, η καταγραφή των επιδημιών νόσου στα νησιά Φαρόε μετά την κατάληψή τους από το βρετανικό στρατό θέτει επίσης την υποψία εξωτερικής επίδρασης και πιο συγκεκριμένα την υποψία ιολογικής επίδρασης [16].

Ωστόσο δεν αποκλείεται να συνυπάρχει και γενετική προδιάθεση και η εμφάνιση της νόσου να οφείλεται σε μια αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο. 15% των νοσούντων έχουν ένα συγγενή πάσχοντα και αυτοί κατά πλειοψηφία είναι αδέρφια. Η αυξημένη συχνότητα στα ομοθαλή αδέρφια σε σχέση με τα ετεροθαλή (σχεδόν τριπλάσια) είναι ακόμα ένα ισχυρό στοιχείο γενετικής βάσης της νόσου. [4,17].

1.3.ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η σαφής αιτιολογία της Πολλαπλής Σκλήρυνσης παραμένει μέχρι και σήμερα άγνωστη. Ωστόσο οι πιο επικρατούσες θεωρίες εμπλέκουν περισσότερους τους ενός παράγοντες. Έτσι θεωρείται μια επίκτητη ανοσομεσολαβούμενη νόσος που η αιτιοπαθογένειά της αποδίδεται σε αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Γενετική προδιάθεση:

Όπως είδαμε και παραπάνω, οι επιδημιολογικές μελέτες αποκαλύπτουν μια πιο αυξημένη παρουσία της νόσου στις οικογένειες ατόμων που πάσχουν σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό. Μάλιστα το ποσοστό αυξάνει ανάλογα με το βαθμό συγγένειας και επομένως είναι μεγαλύτερη η πιθανότητα νόσησης στους συγγενείς α' βαθμού. Επιπλέον αυξημένο κίνδυνο φαίνεται να έχουν και οι μονοζυγωτικοί δίδυμοι σε σχέση με τους διζυγωτικούς, τα ομοθαλή σε σχέση με τα ετεροθαλή αδέρφια, ενώ αντίθετα στις περιπτώσεις υιοθεσίας ο κίνδυνος παραμένει ίδιος με του γενικού πληθυσμού. Συμπερασματικά, τίθεται το ερώτημα για το εάν πρόκειται ή όχι για κάποιο τύπο μη μενδέλειας πολυγονιδιακής κληρονομικότητας [5,15,17-19]. Εδώ και αρκετά χρόνια έχει γίνει γνωστή η συσχέτιση της ΠΣ με γονίδια HLA, τα οποία ξέρουμε πως εμπλέκονται στην ανοσιακή ρύθμιση. Η πρώτη συσχέτιση έγινε το 1972 και ακολούθησε πλήθος μελετών που αποκάλυψε την παρουσία τους σχεδόν σε όλους τους μελετηθέντες πληθυσμούς ασθενών τόσο στην μορφή εξάρσεων-υφέσεων όσο και στην πρωτοπαθώς προϊούσα. Από αυτά τη μεγαλύτερη συσχέτιση εμφανίζει το HLA-DR2 στο χρωμόσωμα 6p21 με το αλληλίο DRB1*1501 να δείχνει τη μεγαλύτερη προδιάθεση για νόσο [20-22]. Σίγουρο είναι πως η ΠΣ χαρακτηρίζεται από μεγάλη γενετική ετερογένεια και υπάρχει πλήθος γονιδίων που σχετίζονται με τον κίνδυνο. Η συμβολή του καθενός ως προς την εμφάνιση της νόσου μπορεί να είναι αρκετά μικρή, το σύνολό τους όμως είναι δυνατόν να αυξήσει σημαντικά τον κίνδυνο. Εκτός από τα γονίδια HLA, έχουν βρεθεί και άλλα μη-HLA, τα περισσότερα

από τα οποία σχετίζονται με την απορρύθμιση του ανοσοποιητικού, αποκαλύπτοντας έτσι την μεγάλη σημασία που παίζει αυτή στην εκδήλωση της Πολλαπλής Σκλήρυνσης [23-26]. Μερικά από αυτά αφορούν ιντερλευκίνες, συνδιεγερτικά μόρια ή μόρια που μετέχουν στη σηματοδότηση για ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων.

Περιβαλλοντικοί παράγοντες:

Η περιβαλλοντική επίδραση βασίζεται κυρίως στα δεδομένα των επιδημιολογικών μελετών που αποκαλύπτουν γεωγραφική κατανομή, συσχέτιση με τη μετανάστευση μεταξύ χωρών χαμηλού και υψηλού κινδύνου, υπερίσχυση των γυναικών μεταξύ των νοσούντων, φυλετικές συσχετίσεις. Φαίνεται πως οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επιδρούν και στα τρία ηλικιακά στάδια: στην περιγεννητική περίοδο, στην εφηβεία και στην ενήλικη ζωή [4]. Κατά καιρούς έχουν μελετηθεί διάφοροι και έχουν διαχωριστεί σε δύο βασικές ομάδες, τους λοιμογόνους και μη λοιμογόνους. Στους δεύτερους ανήκουν παράγοντες όπως είναι η βιταμίνη D, η διαίτα, το κάπνισμα, η έκθεση σε τοξικά, τα εμβόλια, η συνύπαρξη με κατοικίδια ζώα. Μεταξύ των λοιμογόνων μελετήθηκαν οι Epstein Barr Virus (EBV), Human Herpes Virus-6 (HHV-6) και Varicella Zoster Virus (VZV). Οι ισχυρότερες ενδείξεις αφορούν τον EBV, καθώς μεταξύ των ασθενών παρατηρήθηκε πως πολλοί είχαν νοσήσει στη νεαρή ενήλικη ζωή από λοιμώδη μονοπυρήνωση ή βρέθηκαν με υψηλούς τίτλους αντισωμάτων του EBV στον ορό κατά την έναρξη της νόσου [27-29]. Ο EBV μάλιστα έχει συνδεθεί και με άλλες αυτοάνοσες νόσους κατά καιρούς, όπως είναι το σύνδρομο Sjögren, ο ΣΕΛ, η ρευματοειδής αρθρίτιδα αλλά και με κακοήθειες. Ο μηχανισμός δράσης του στο ανοσιακό σύστημα ωστόσο δεν είναι ακόμα γνωστός. Άλλοι λοιμογόνοι παράγοντες που αναφέρονται είναι τα *Chlamydia pneumoniae* και ο HHV-6 [30-32]. Όσον αφορά τους μη λοιμογόνους παράγοντες, την ισχυρότερη συσχέτιση παρουσιάζει η βιταμίνη D. Η σχέση της με τη νόσο υποδηλώνεται από το γεγονός πως ο κίνδυνος είναι υψηλότερος για τις περιοχές μακριά από τον ισημερινό και ακόμα πως φυλές όπως οι Εσκιμώοι που καταναλώνουν τροφές πλούσιες σε βιταμίνη D3 έχουν μειωμένο κίνδυνο προσβολής [33,34]. Η ηλιακή έκθεση πιθανόν παρέχει κάποια προστασία, καθώς η UVB ακτινοβολία συμμετέχει στη σύνθεση της βιταμίνης. Πράγματι, φάνηκε πως μάλλον η υψηλή συγκέντρωση του μεταβολίτη 25(OH)D στον ορό αντιστοιχεί με μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης νόσου [27,35]. Μάλιστα, η αλλαγή στις γεωγραφικές κατανομές τα τελευταία χρόνια με αύξηση της εμφάνισης ακόμα και σε περιοχές κοντά στον ισημερινό μπορεί να αποδοθεί κατά ένα μέρος στην αυξημένη χρήση αντηλιακών σκευασμάτων που μπλοκάρουν την UVB

ακτινοβολία και επομένως μειώνουν την παραγόμενη βιταμίνη D. Είναι γνωστό πως αυτή συμμετέχει με κάποιο τρόπο στην ανοσορρύθμιση, αλλά άγνωστο σε ποια περίοδο της ζωής η έλλειψή της παίζει σημαντικότερο ρόλο [4,36]. Τα τελευταία χρόνια σημαντική αποδεικνύεται και η συμβολή του καπνίσματος που φαίνεται επίσης να αυξάνει τον κίνδυνο τόσο για έναρξη όσο και για γρηγορότερη επιδείνωση της πορείας [37,38].

1.4.ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ

Όπως προκύπτει και από τα παραπάνω, ένας συνδυασμός γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία των απομυελινωτικών πλακών που είναι και το χαρακτηριστικό παθολογικό στοιχείο της νόσου. Η απομυελίνωση είναι το αποτέλεσμα μιας έντονης ανοσολογικής δραστηριότητας που στόχο έχει την καταστροφή της μυελίνης.

Το παθοφυσιολογικό μοντέλο της περιλαμβάνει δύο θεωρίες. Σύμφωνα με το περιφερικό μοντέλο, αυτοδραστικά T-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται περιφερικά πιθανόν μέσω του φαινομένου της μοριακής μίμησης, διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και εισέρχονται στο ΚΝΣ συνοδευόμενα επιπλέον από B-κύτταρα και μονοκύτταρα. Ένα μοντέλο που έχει χρησιμοποιηθεί ιδιαίτερα για την κατανόηση αυτού του μηχανισμού είναι της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis). Σε αυτό, η έγχυση στην περιφέρεια των πειραματόζωων συστατικών της μυελίνης (βασική πρωτεΐνη μυελίνης, γλυκοπρωτεΐνη μυελίνης ολιγοδενδροκυττάρων, πρωτεολιπιδική πρωτεΐνη) ή ακόμη και η μεταφορά ειδικών ενεργοποιημένων T-κυττάρων από ζώα που πάσχουν προκαλεί απομυελίνωση των νευρώνων [39].

Αντίθετα στο κεντρικό μοντέλο η παθολογική δραστηριότητα και εκφύλιση ξεκινά εντός του ΚΝΣ οδηγώντας σε ανάπτυξη νόσου και διήθηση από φλεγμονοκύτταρα. Ως αίτιο εδώ ενοχοποιείται κάποια ιογενής λοίμωξη του ΚΝΣ ή πρωτοπαθής νευροεκφύλιση όμοια με αυτή που συμβαίνει σε νόσους όπως Parkinson ή Alzheimer [40,41].

Βασικός μηχανισμός της όλης παθολογικής δραστηριότητας είναι η αποτυχία καταστολής των αυτοδραστικών T-λεμφοκυττάρων, η οποία γίνεται μέσω ενός μορίου επιφανείας, του CD-95 (Fas). Σε άτομα που πάσχουν παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα της διαλυτής μορφής αυτού του μορίου που αναστέλλει την απόπτωση.

Όπως είναι γνωστό, το επίκτητο ανοσιακό σύστημα (που περιλαμβάνει τα T και B λεμφοκύτταρα) αναγνωρίζει συγκεκριμένους αντιγονικούς στόχους και επιτίθεται σε αυτούς και επιπλέον δύναται να ξεχωρίζει τα ξένα αντιγόνα από αυτά του οργανισμού έτσι ώστε να επιτίθεται μόνο στα δεύτερα. Υπάρχει όμως μια ομάδα λεμφοκυττάρων που μπορεί να αναγνωρίζει αυτοαντιγόνα και να αντιδρά δυνητικά σε αυτά. Χάρη στην ανοσιακή ανοχή τα κύτταρα αυτά δε γίνονται επιβλαβή. Σε περίπτωση απορρύθμισης της ανοχής (π.χ. σε γενετικά προδιαθετημένα άτομα που εκτέθηκαν σε περιβαλλοντικό παράγοντα), τότε έχουμε την εμφάνιση της αυτοανοσίας. Σε όλη αυτή τη διαδικασία να σημειώσουμε πως συμμετέχει και η φυσική ανοσία.

Όπως προαναφέρθηκε πιθανόν η ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων να οφείλεται σε μοριακή μίμηση. Σε αυτήν, λόγω της ομοιότητας που εμφανίζουν τα αντιγόνα ορισμένων μικροοργανισμών (Epstein Barr, απλού έρπη, ιού της γρίπης) με στοιχεία του οργανισμού, το ανοσιακό σύστημα διεγείρεται και αναπτύσσει απάντηση εναντίον του ίδιου του οργανισμού [42,43].

Αφού ενεργοποιηθούν, τα ανοσοκύτταρα προάγουν την έκκριση μορίων που υποβοηθούν την μετακίνησή τους στο ενδοθήλιο των αγγείων και την είσοδο στο ΚΝΣ. Οι εκκρινόμενες ιντεγκρίνες αλληλεπιδρούν με συνδέσμους του ενδοθηλίου με αποτέλεσμα τη σύλληψή τους από αυτά. Οι χημειοκίνες προάγουν την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών και συντελούν στη σύλληψη. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες είναι λυτικά ένζυμα που βοηθούν στη λύση του αιματεγκεφαλικού φραγμού και στην είσοδο των ανοσιακών κυττάρων στο ΚΝΣ. Πιο συγκεκριμένα:

1. Τα μόρια προσκόλλησης του αγγειακού ενδοθηλίου (σελεκτίνες, ICAM-1, VCAM-1) προσδένονται στους συνδέτες τους στα λευκοκύτταρα (LFA-1, VLA-4) με αποτέλεσμα τη σύλληψη των λευκοκυττάρων. (Elonaga et al., 2000)

2. Οι χημειοκίνες αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς τους εξυπηρετώντας φυσιολογικά την ανοσοεπιτήρηση αλλά και τη φλεγμονή του ΚΝΣ στην περίπτωση της ΠΣ. Αναφορικά, στα όρια των ενεργών πλακών συναντούμε την χημειοκίνη CCL5 με τον υποδοχέα της CCR5, η CCL2 εκφράζεται από τα αστροκύτταρα, ενώ στο ΕΝΥ ασθενών ανευρίσκονται αυξημένα επίπεδα CXCL10 και CCL5.

3. Η οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνών περιλαμβάνει τα λυτικά ένζυμα MMPs, ADAM TIMPs. Αυτές μετέχουν στην παθολογική διαδικασία α)διαρηγνύοντας τον ΑΕΦ και διευκολύνοντας έτσι την είσοδο στο ΚΝΣ των ανοσοκυττάρων, β)ενεργοποιώντας προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, γ)καταστρέφοντας οι ίδιες δομές του ΚΝΣ (εκφράζονται και σε αστροκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα). Αναφέρονται

υψηλά επίπεδα MMPs και συγκεκριμένα MMP-9 στο ΕΝΥ πασχόντων σε υποτροπή, ενώ η χρήση κορτικοθεραπείας παράλληλα με τη μείωση της πρόσληψης γαδολινίου (που αντικατοπτρίζει διάνοιξη ΑΕΦ), μειώνει και τα επίπεδα των μεταλλοπρωτεϊνών [44,45].

Για την ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων εντός του ΚΝΣ απαιτείται η σύνδεση των αντιγόνων με μόρια ΜΗC και η παρουσίαση τους στον υποδοχέα των Τ-κυττάρων (TCR) από ειδικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (μικρογλοιακά, δενδριτικά, μακροφάγα ή και Β-κύτταρα). Η σύνδεση αυτή παράγει σήμα ενεργοποίησης ενισχυμένο από δεύτερο σήμα, αυτό των συνδιεγερτικών μορίων. Έτσι τα Τ-λεμφοκύτταρα είναι σε θέση να πολλαπλασιαστούν, να εκκρίνουν κυτοκίνες και να διαφοροποιηθούν. Η παρουσία των συνδιεγερτικών μορίων είναι ιδιαίτερα σημαντική, γιατί είναι αυτά που είτε θα προάγουν την ενεργοποίηση με τη σύνδεσή τους στο μόριο CTLA-4 του υποδοχέα των Τ είτε θα στείλουν ανασταλτικό σήμα (κάτι που θα αποτελούσε ενδιαφέροντα θεραπευτικό στόχο).

Παράλληλα τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα εκκρίνουν κυτοκίνες, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να καθορίζουν τον υπότυπο του Τ-κυττάρου και επομένως τη δράση του. Έτσι, κυτοκίνες όπως οι ιντερλευκίνες IL-12 και IL-23 προάγουν τη δημιουργία των δραστικών Th1 που εκκρίνουν IFN- γ και δρουν κυρίως κατά των ιών. Αντίθετα, η IL-4 προάγει τα Th2 και τη δράση κατά παρασίτων. Άλλες κατηγορίες περιλαμβάνουν αυτές των Th3 και Th17, με δική της ξεχωριστή δράση. Η Πολλαπλή Σκλήρυνση σχετίζεται με την διαταραγμένη ρύθμιση αυτών των υποομάδων και λέγεται πως τα Th1 και Th17 είναι προφλεγμονώδη και προκαλούν βλάβες, ενώ τα Th2 και Th3 έχουν προστατευτική δράση. Αρκετές θεραπείες, όπως η ιντερφερόνη- β και η οξική γλατιραμέρη βασίζονται σε αυτό, καθώς στοχεύουν στη βελτίωση των ρυθμιστικών ηχανισμών ή ακόμα στην μεταβολή των Th1 σε Th2, με κίνδυνο όμως αυτές οι τροποποιήσεις να επιδρούν στην αντική και αντικαρκινική δράση των ανοσιακών κυττάρων.

Όσον αφορά τον ειδικό στόχο των Τ, αυτός δεν είναι συγκεκριμένος και πιθανότατα διαφοροποιείται από άτομο σε άτομο και αλλάζει κατά την πορεία της νόσου. Απάντηση έχει εντοπιστεί κατά της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης, της γλυκοπρωτεΐνης της μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων (MOG), τη γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένης με μυελίνη (MAG), της πρωτεολιπιδικής πρωτεΐνης κ.ά.

Αν και η νόσος θεωρείται Τ-μεσολαβούμενη, η συμβολή των Β-κυττάρων θεωρείται εξίσου σημαντική τόσο γιατί παρουσιάζουν τα αντιγόνα όσο και γιατί με

την παραγωγή αντισωμάτων ενεργοποιούν μηχανισμούς εξόντωσης. Χαρακτηριστικό της νόσου αποτελούν οι ολιγοκλωνικές αλυσίδες στο ENY, ενώ ήδη από τα πρώτα στάδια υπάρχει ενδορραχιαία παραγωγή IgG και αντισώματα κατά συστατικών της μυελίνης στις περιοχές απομυελίνωσης.

Τέλος, η παρατηρούμενη ελάττωση του αριθμού των ολιγοδενδροκυττάρων στις βλάβες είναι αποτέλεσμα είτε καταστροφής τους από τα T-κυτταροτοξικά κύτταρα είτε παραγωγής κυτοκινών με τοξική δράση (ιντερφερόνης- γ , TNF, νιτρικού οξέως).

Τελικά, η ανοσιακή απάντηση θα οδηγήσει σε βλάβη της μυελίνης, των ολιγοδενδροκυττάρων, και των νευρώνων, με τελικό στάδιο τη νευροεκφύλιση [40,41,46].

1.5. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Για να γίνει κατανοητή η σημασία της μυελίνης στην αγωγή του σήματος παραθέτονται κάποια στοιχεία φυσιολογίας:

Η μυελίνη είναι το έλυτρο που τυλίγει τους νευράξονες με πολλαπλές αναδιπλώσεις και εξασφαλίζει μόνωση στις μεταδιδόμενες ηλεκτρικές ώσεις κατά μήκος τους. Βασικός της ρόλος είναι να αυξάνει την ταχύτητα μετάδοσης των ηλεκτρικών δυναμικών. Το έλυτρο της μυελίνης δεν είναι συνεχές, αλλά διακόπτεται ανά τακτά διαστήματα. Τα σημεία εκείνα που στερούνται μυελίνης καλούνται κόμβοι του Ranvier. Λόγω της μόνωσης που παρέχει στον νευράξονα από το εξωκυττάριο υγρό, τα ηλεκτρικά δυναμικά δεν μπορούν να διαδοθούν στα εμμύελα κομμάτια κι έτσι πηδούν από τον ένα κόμβο του Ranvier στον άλλο (μετάδοση κατ'άλματα). Αποτέλεσμα όλων αυτών είναι να επιτυγχάνονται μεγαλύτερες ταχύτητες απ'ό,τι στην περίπτωση της συνεχόμενης μετάδοσης (όπως στις αμύελες ίνες).

Η ηλεκτρική ώση δημιουργείται με τη διάνοιξη των διαύλων Na^+ που υπάρχουν στους κόμβους του Ranvier και την παραγωγή ρεύματος εισροής ιόντων κατευθυνόμενο προς τον επόμενο κόμβο. Το τέλος επέρχεται με τη διάνοιξη των διαύλων K^+ , οπότε προκαλείται επαναπόλωση.

Όταν καταστρέφεται η μυελίνη, οι διάυλοι K^+ έρχονται στην επιφάνεια (φυσιολογικά κρύβονται κάτω από το έλυτρο) με αποτέλεσμα υπερπόλωση της αξονικής μεμβράνης και αποκλεισμό της ώσης. Αυτή η διακοπή του σήματος είναι υπεύθυνη και για τα συμπτώματα και σημεία της νόσου. Στοιχεία που μπορεί να εγείρουν αυτή τη διακοπή του σήματος είναι η αύξηση της θερμοκρασίας και άλλες

μεταβολικές αλλαγές κατά την άσκηση ή τον πυρετό. Οι πλάκες είναι ευαίσθητες ακόμα και σε μεταβολή της θερμοκρασίας κατά 0,5°C. Σε αυτές τις περιπτώσεις υπάρχει επιδείνωση των ήδη υπαρχόντων συμπτωμάτων (φαινόμενο Uhthoff) ή ακόμα και συμπτώματα από κλινικά σιωπηλές πλάκες. Αυτή η επιδείνωση μπορεί μερικές φορές λανθασμένα να θεωρηθεί σαν νέα υποτροπή. Είναι δυνατόν οι διάλυτοι Na⁺ αργότερα να ανακατανεμηθούν κατά μήκος του νευράξονα, γεγονός που επιτρέπει και πάλι την αγωγή του σήματος, αλλά με συνεχή τρόπο κι επομένως πιο βραδύ.

Με τη λύση της φλεγμονής και την αποκατάσταση του αιματεγκεφαλικού φραγμού παρατηρείται και βελτίωση της κλινικής εικόνας. Συχνά οι νευρικές ίνες υφίστανται επαναμυελίνωση, μια διαδικασία που συμβαίνει σε βάθος χρόνου και οδηγεί τελικά σε πιο αργή μετάδοση του σήματος. Εάν επέλθει κλινική βελτίωση μέσα σε λίγες μέρες από την εμφάνιση της ώσης, η διακοπή του σήματος δεν αποδίδεται στην επαναμυελίνωση, αλλά στο οίδημα και τη φλεγμονώδη διήθηση.

Παράλληλα με την καταστροφή της μυελίνης παρατηρείται και ποικίλλου βαθμού βλάβη των νευραξόνων. Η καταστροφή αυτών προκύπτει είτε λόγω της απομυελίνωσης είτε λόγω των τοξικών παραγόντων της φλεγμονής (ρίζες οξυγόνου, νιτρικό οξείδιο) και έχει συνδεθεί με πιο μόνιμες και μη αναστρέψιμες βλάβες. Οι απογυμνωμένοι νευράξονες αρχικά προσαρμόζονται στις αλλαγές αλλά καθώς η νόσος προχωρά υφίστανται και αυτοί εκφύλιση [47,48].

1.6.ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ

Κύριο χαρακτηριστικό της Πολλαπλής Σκλήρυνσης αποτελεί ο σχηματισμός των απομυελινωτικών πλακών που απλώνονται διάσπαρτα σε όλο το ΚΝΣ τόσο στη λευκή όσο και στη φαιά ουσία. Στις διατομές του εγκεφάλου εμφανίζονται σαν περιοχές ιστού ελαφρά πιο συμπιεσμένες από την υπόλοιπη επιφάνεια. Οι συνηθεστερες εντοπίσεις είναι στην περικοιλιακή και υποφλοιώδη λευκή ουσία, το μεσολόβιο, τα οπτικά νεύρα, το εγκεφαλικό στέλεχος, την λευκή ουσία της παρεγκεφαλίδας και τον νωτιαίο μυελό. Κατά τη μακροσκοπική εξέτασή τους, εμφανίζονται ωειδείς ή στρόγγυλες, με τις ενεργές να είναι μαλακής σύστασης και ροδόχροες (λόγω απώλειας μυελίνης), ενώ οι χρόνιες γκριζωπές και σκληρές. Επιπλέον παρατηρείται διαφόρου βαθμού εγκεφαλική ατροφία, ατροφία του νωτιαίου μυελού και των οπτικών νεύρων, καθώς και διεύρυνση των κοιλιών. Μικροσκοπικά,

στις ενεργές πλάκες παρατηρείται ποικίλλου βαθμού φλεγμονώδης διήθηση ανάλογα με τη χρονιότητα που περιλαμβάνει κύτταρα T, B, μακροφάγα και μικρογλοιακά κύτταρα. Υπάρχει απώλεια μυελίνης με χαρακτηριστική παρουσία μακροφάγων που περιέχουν θραύσματα μυελίνης στα λυσοσώματά τους, απώλεια ολιγοδενδροκυττάρων, οίδημα του παρεγχύματος, αξονική καταστροφή, αντιδραστική γλοίωση (αύξηση της μικρογλοίας και σχηματισμός ουλώδους ιστού) και επαναμυελίνωση. Στις χρόνια ενεργές η επαναμυελίνωση ξεκινά από την περιφέρεια αλλά μπορεί να επεκταθεί και σε ολόκληρη την πλάκα (οι ονομαζόμενες «σκιώδεις πλάκες»), το κέντρο χαρακτηρίζεται από ανενεργότητα, ενώ παρατηρούνται ακόμα παρουσία συμπληρώματος και αντισωμάτων. Οι ανενεργές πλάκες χαρακτηρίζονται από σημαντικά μειωμένη παρουσία φλεγμονής, πλήρη απώλεια ολιγοδενδροκυττάρων και σπάνια επαναμυελίνωση [49-53].

Σύμφωνα με τη μελέτη της ομάδας Lucchinetti υπάρχουν διάφοροι τύποι απομυελινωτικών πλακών, οι οποίοι διαφέρουν ανά άτομο και στάδιο νόσου. Οι τύπου I και II έχουν παρόμοια μορφή με ασαφή όχθο, αυξημένη παρουσία ολιγοδενδροκυττάρων και εντόπιση γύρω από φλέβες και φλεβίδια. Ιδιαίτερα στις τύπου II υπάρχει κυρίως εναπόθεση ανοσοσφαιρινών και συμπληρώματος. Οι τύπου III έχουν επίσης ασαφή όρια, αλλά μειωμένο αριθμό ολιγοδενδροκυττάρων λόγω απόπτωσής τους. Στις πλάκες αυτές υπάρχει κυρίως απώλεια της γλυκοπρωτεΐνης σχετιζόμενης με μυελίνη (Myelin-Associated Glucoprotein – MAG) και ελλείπουν ανοσοσφαιρίνες, συμπλήρωμα ή επαναμυελίνωση. Οι τύπου IV σε αντίθεση με τις υπόλοιπες έχουν σαφή όρια και μείωση των ολιγοδενδροκυττάρων επίσης. Οι πρώτοι δύο τύποι ανευρίσκονται σε όλες τις μορφές νόσου, οι III στα πολύ αρχικά στάδια της νόσου (διάρκεια μικρότερη από 2 μήνες) και οι IV κυρίως στην προϊούσα μορφή [54].

1.7.ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ

Υπάρχουν 4 κλινικές μορφές:

1) **Υποτροπιάζουσα μορφή** (Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis/RRMS): Αυτή αφορά την πλειοψηφία των ασθενών (περίπου 85%) και χαρακτηρίζεται από επεισόδια αιφνίδιας εμφάνισης οξείων συμπτωμάτων που ονομάζονται υποτροπές. Οι υποτροπές διαρκούν από ένα 24ωρο έως μερικές μέρες και μετά το πέρας τους είτε υπάρχει πλήρης αποκατάσταση είτε παραμένει κάποιο υπόλειμμα. Ενδιάμεσα

παρεμβάλλονται περίοδοι υφέσεων στις οποίες οι ασθενείς παραμένουν νευρολογικά σταθεροί. Οι υποτροπές συμβαίνουν ακανόνιστα κατά τη διάρκεια της νόσου με μέση συχνότητα εμφάνισης μια υποτροπή το χρόνο.

2) Πρωτοπαθώς προϊούσα μορφή (Primary Progressive Multiple Sclerosis/PPMS):

Σε αυτή τη μορφή υπάρχει μια διαρκώς επιδεινούμενη κατάσταση από την έναρξη της νόσου και μετά χωρίς να υπάρχουν περίοδοι υφέσεων ή οξείας προσβολής και η αναπηρία επέρχεται πιο γρήγορα. Εμφανίζεται λίγο αργότερα (περί τα 40 έτη), δεν υπάρχει προτίμηση στο φύλο και αφορά το 10-15%.

3) Δευτεροπαθώς προϊούσα μορφή (Secondary Progressive Multiple

Sclerosis/SPMS): Η υποτροπιάζουσα μορφή συνήθως καταλήγει σε εξελισσόμενη νόσο που εγκαταλείπει μόνιμες βλάβες και νευρολογικά ελείμματα. Στη μορφή αυτή μπορεί να συνεχίζουν να υπάρχουν ώσεις αν και εμφανίζονται με μικρότερη συχνότητα. Πάνω από το 50% των ασθενών με RRMS θα εξελιχθούν σε SPMS μετά την πρώτη δεκαετία με το ποσοστό να αυξάνεται όσο προχωρούν τα χρόνια.

4) Προϊούσα μορφή με υποτροπές (Progressive Relapsing Multiple

Sclerosis/PRMS): Υπάρχει σταδιακή επιδείνωση της νόσου ήδη από τα πρώτα στάδια με ενίοτε παρουσία υποτροπών σε μικρή συχνότητα και ήπιας μορφής. Στα διαστήματα μεταξύ των εξάρσεων δεν υπάρχει στασιμότητα αλλά επιδείνωση της νόσου. Απαντάται σε πολύ μικρό ποσοστό και από πολλούς δεν αποτελεί ξεχωριστή μορφή και δεν διαχωρίζεται από την πρωτοπαθώς προϊούσα.

Η παρακολούθηση της εξέλιξης βασίζεται τόσο σε κλινικά όσο και απεικονιστικά μέσα. Η πιο ευρέως χρησιμοποιημένη κλίμακα είναι η Expanded Disability Status Scale (EDSS) του Kurtzke (Kurtzke, 1983). Στην κλίμακα αυτή, που αποτελείται από 10 βαθμίδες, το 0 αντιστοιχεί σε φυσιολογική νευρολογική λειτουργία και το 10 στο θάνατο λόγω νόσου. Παρολαυτά, η EDSS εστιάζει κυρίως στα κινητικά ελλείμματα, με αποτέλεσμα η βαθμονόμηση των ασθενών να αφορά κυρίως τις κατώτερες και ανώτερες βαθμίδες, και οι ενδιάμεσες να εμφανίζουν μέτρια ευαισθησία [55]. Τα τελευταία χρόνια έχει εισαχθεί μια ακόμη κλίμακα, η MSSS (Multiple Sclerosis Severity Scale) η οποία δίνει τη δυνατότητα ελέγχου της εξέλιξης της νόσου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα μέτρο σύγκρισης της αναπηρίας μεταξύ των ασθενών [56].

Καλοήθης μορφή: Αφορά ένα ποσοστό περίπου 20% των προσβεβλημένων και πρόκειται για μια πορεία εξάρσεων-υφέσεων που αφήνουν ελάχιστο ή καθόλου υπόλειμμα. Όσο η διάρκεια της νόσου μεγαλώνει ο κίνδυνος ανικανότητας αυξάνει.

Σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμα και μετά από πολλά χρόνια μιας καλοήθους πορείας μπορεί τελικά να εγκατασταθεί σοβαρού βαθμού αναπηρία [57,58].

Επιθετική μορφή: Χαρακτηρίζει την ταχέως εξελισσόμενη νόσο ή την πορεία με συχνές και σοβαρές υποτροπές που μετά την αποδρομή τους υπάρχει ελάχιστη βελτίωση.

Κακοήθης μορφή (τύπος Marburg): Είναι μια αρκετά σπάνια μορφή συνήθως μονοφασική με κεραυνοβόλο έναρξη με ταχεία εξέλιξη. Πρόκειται για συνδυασμό εκδηλώσεων από τον εγκεφαλικό φλοιό, το στέλεχος, τον νωτιαίο μυελό. Μέσα σε μερικές εβδομάδες εγκαθίστανται λήθαργος, κώμα, απεγκεφαλισμός και σύντομα επέρχεται θάνατος. Παθολογοανατομικά παρατηρούνται μεγάλες υπερκυτταρικές και οίδηματώδεις πλάκες.

Νόσος Schilder: Παραλλαγή της Πολλαπλής Σκλήρυνσης. Εμφανίζεται σε παιδιά ή νεαρούς ενήλικες και ακολουθεί μια σταθερά επιδεινούμενη πορεία ή πολλαπλά επεισόδια ταχείας επιδείνωσης. Η συνήθης κλινική εικόνα περιλαμβάνει ψυχοδιανοητική έκπτωση, ομώνυμη ημιανοψία, κώφωση, τύφλωση, ποικίλου βαθμού ημιπληγία-τετραπληγία και ψευδοπρομηκική παράλυση. Ο θάνατος επέρχεται σε λίγους μήνες και στο ENY ανευρίσκονται υψηλοί τίτλοι της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης. Κύριο χαρακτηριστικό της είναι η ύπαρξη μεγάλων ασύμμετρων πλακών με απότομα όρια που απλώνονται σε ολόκληρο το λοβό ή το ημισφαίριο κι επεκτείνονται στο μεσολόβιο και σε τμήμα του αντίθετου ημισφαιρίου.

Νόσος Balo ή συγκεντρική σκλήρυνση: Αποτελεί μάλλον μορφή της νόσου Schilder με μόνη διαφορά ότι παρατηρούνται δακτύλιοι με εναλλασσόμενες ζώνες κατεστραμμένης και ακέραιας μυελίνης [59-63].

1.8.ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Η Πολλαπλή Σκλήρυνση καλύπτει μεγάλο εύρος συμπτωμάτων, κανένα από αυτά όμως δεν είναι χαρακτηριστικό της νόσου. Ανάλογα με την προσβληθείσα περιοχή του ΚΝΣ, συμπτώματα μπορεί να υπάρχουν από το εγκεφαλικό στέλεχος, τα οπτικά νεύρα ή τον νωτιαίο μυελό. Αναφορικά, οι κλινικές εκδηλώσεις μπορεί να περιλαμβάνουν αδυναμία, σπαστικότητα, υπαισθησίες, παραισθησίες, άλγη, αιμωδίες,

οπτικές διαταραχές, αταξία, ίλιγγο, δυσλειτουργία κυστική-εντερική-σεξουαλική, γνωστικές και ψυχιατρικές διαταραχές. Δεν είναι σπάνια η πολυσυμπτωματική νόσος, ενώ συχνά οι εκδηλώσεις σχετίζονται με την μορφή της ΠΣ. Η εμφάνιση των συμπτωμάτων μπορεί να είναι είτε πολύ δραματική είτε αυτά να λανθάνουν της προσοχής έτσι που το άτομο να μην αναζητά ιατρική βοήθεια.

Βλάβες οπτικού νεύρου: Η οπτική (οπισθοβολβική) νευρίτιδα που οφείλεται σε φλεγμονή του οπτικού νεύρου είναι μια πολύ συχνή πρώτη εκδήλωση. Εμφανίζεται ως σταδιακή μείωση της όρασης για 1-2 εβδομάδες, ενώ μπορεί να συνυπάρχει άλγος περικογχικά επιδεινούμενο με τις οφθαλμικές κινήσεις. Ακολουθεί αυτόματη βελτίωση. Εάν αυτό επιμένει για μεγαλύτερο διάστημα ή υπάρχει απώλεια της αντίληψης του φωτός ή ραγοειδίτιδα, καλό είναι η διάγνωση να στρέφεται αλλού. Συνήθως η συμπτωματολογία αφορά τον ένα μόνο οφθαλμό, δεν αποκλείεται όμως να είναι και αμφοτερόπλευρη. Η βυθοσκόπηση μπορεί να είναι φυσιολογική ή να αποκαλύπτει οίδημα οπτικής θηλής. Επιπλέον υπάρχει μειωμένη οπτική οξύτητα, επίκτητη δυσχρωματοψία και σκότωμα συνήθως κεντρικό. Άλλα συμπτώματα είναι η θόλωση της όρασης, ακόμα και μονόπλευρη τύφλωση και το φαινόμενο Uhthoff (θόλωση της όρασης μετά από άσκηση ή ζεστό μπάνιο).

Διαταραχές οφθαλμοκίνησης: Η διπλωπία μπορεί επίσης να αποτελεί πρώτη εκδήλωση της νόσου. Οφείλεται είτε σε πάρεση του απαγωγού νεύρου (σπανιότερα του κοινού κινητικού ή του τροχλιακού) είτε σε διαπυρηνική οφθαλμοπληγία. Η διαπυρηνική οφθαλμοπληγία εμφανίζεται με αδυναμία προσαγωγής του σύστοιχου με την πλευρά της βλάβης οφθαλμού κατά τις οριζόντιες κινήσεις και με νυσταγμό στην απαγωγή του αντίστοιχου οφθαλμού. Άλλες διαταραχές πιο σπάνιες είναι η παράλυση της βλεμματικής κίνησης και η βλάβη του αντανακλαστικού της κόρης.

Κινητικές διαταραχές: Στην Πολλαπλή Σκλήρυνση διαταράσσεται η λειτουργικότητα της κινητικής οδού προκαλώντας σπαστικότητα, αυξημένα τενόντια, κλόνο και σημείο Babinski. Η σπαστικότητα αφορά αύξηση του μυϊκού τόνου, η οποία γίνεται όλο και πιο έντονη όσο πιο γρήγορη είναι η κίνηση, με αποτέλεσμα ασυνέργεια των μυών, αγωνιστών και ανταγωνιστών, και διαταραχή της κίνησης. Σχετίζεται με προσβολή του ανώτερου κινητικού νευρώνα. Είναι πιο συχνή στα κάτω άκρα και μπορεί να εμφανίζεται σαν απώλεια δυνάμεων, ταχύτητας ή δεξιότητας, σαν κόπωση ή διαταραχές βάδισης. Όσο η νόσος εξελίσσεται οι κινητικές διαταραχές γίνονται όλο και πιο έντονες. Χαρακτηριστικό της ΠΣ είναι η επίταση της αδυναμίας

μετά την άσκηση. Σπάνια προσβάλλεται ο κατώτερος κινητικός νευρώνας, οπότε στην κλινική εξέταση βλέπουμε να μην παράγεται κάποιο τενόντιο αντανακλαστικό.

Αισθητικές διαταραχές: Αυτές ποικίλλουν και περιλαμβάνουν παραισθησίες, υπαισθησίες, δυσαισθησίες, αιμωδίες, αλλά η πλήρης απώλεια της αισθητικότητας είναι εξαιρετικά σπάνια. Ένδειξη ότι έχει προσβληθεί ο νωτιαίος μυελός είναι η μειωμένη αισθητικότητα από ένα επίπεδο του κορμού και κάτω μέχρι και τα άκρα (αισθητικό επίπεδο). Συχνή είναι επίσης η δυσανεξία στη θερμότητα, καθώς η αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει τη νευρική αγωγιμότητα και μπορεί να επιδεινώσει άλλα συμπτώματα.

Παρεγκεφαλιδικά συμπτώματα: εμφανίζονται καθώς η νόσος εξελίσσεται και περιλαμβάνουν αταξία, νυσταγμό, δυσαρθρία, τρόμο τελικού σκοπού.

Η κόπωση: Είναι πολύ συχνό ενόχλημα. Σχετίζεται με την απομυελίνωση και την μειωμένη μετάδοση ώσεων, αλλά και το κινητικό έλλειμμα και ενισχύεται από τις διαταραχές ύπνου, τα φάρμακα και τη διαταραγμένη ψυχική υγεία. Μπορεί να υπάρχει σε καθημερινή βάση και να εμποδίζει τις δραστηριότητες ή να εμφανιστεί ξαφνικά. Επιδεινώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας.

Διαταραχές από το αυτόνομο: Υπάρχει δυσλειτουργία της ουροδόχου κύστης και της εντερικής λειτουργίας εκδηλούμενα με συχνοουρία, επίσχεση, επιτακτική ακράτεια, ακράτεια από υπερπλήρωση και δυσκοιλιότητα, ακράτεια κοπράνων αντίστοιχα. Συχνή είναι και η σεξουαλική δυσλειτουργία.

Γνωστική λειτουργία: Μικρή έκπτωση μπορεί να εμφανιστεί ήδη από τα πρώτα στάδια της νόσου. Συνήθως όμως νοητικές διαταραχές εμφανίζονται σε άτομα που νοσούν επί χρόνια και επηρεάζουν τη μνήμη, τη σκέψη, τη συγκέντρωση, υπάρχει δυσκολία στις εκτελεστικές λειτουργίες και στην επίλυση προβλημάτων, καθώς και ψυχοκινητική επιβράδυνση.

Ψυχιατρικές εκδηλώσεις: Η κατάθλιψη είναι η πιο συχνή και αφορά σχεδόν το 50%. Μπορεί να είναι αντιδραστική ή απότοκος της νόσου. Σπάνια μπορεί πρώτο επεισόδιο να είναι ένα ψυχωτικό επεισόδιο, αν και η ψύχωση δεν είναι σε γενικές γραμμές συχνή εκδήλωση.

Ο πόνος: Είναι συχνό σύμπτωμα και εμφανίζεται σε πάνω από το 50% των ατόμων. Προέρχεται σαν συνέπεια της σπαστικότητας και των μυικών σπασμών ή από την ίδια τη νόσο με δυσαισθησίες σαν αίσθημα καψίματος ή τσιμπήματος, ενώ υπάρχουν και παροξυσμικές μορφές όπως η νευραλγία τριδύμου, το σημείο Lhermitte ή οι επώδυνες τονικές κρίσεις.

Κρανιακά νεύρα: Η νευραλγία τριδύμου αν και δεν αποτελεί τυπικό σύμπτωμα της νόσου, ωστόσο η εμφάνισή της σε νεαρότερες ηλικίες ή αμφοτερόπλευρα πρέπει να θέτει την υποψία. Σαν εκδηλώσεις έχουν καταγραφεί επίσης άλλες νευραλγίες και η παράλυση του Bell.

Παροξυσμικά συμπτώματα: Είναι τυπική η παρουσία τους στη νόσο. Έχουν οξεία έναρξη, διάρκεια έως 2 λεπτά και επαναλαμβάνονται πολλές φορές τη μέρα, ενώ αυτοπεριορίζονται μέσα σε μερικές εβδομάδες ή μήνες. Σχετίζονται πιθανόν με ηλεκτρικές εκφορτίσεις.

Άλλα συμπτώματα: Το σημείο Lhermitte (η κάμψη του αυχένα προκαλεί ένα στιγμιαίο αίσθημα ηλεκτρικής εκκένωσης που απλώνεται από τη ράχη έως τα πόδια), οι επιληπτικές κρίσεις που είναι 2-3 φορές πιο συχνές σε σχέση με το γενικό πληθυσμό [59,62-64].

1.9.ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Δεν υπάρχει κάποια ειδική εξέταση με την οποία να μπορεί να τεθεί η διάγνωση της νόσου. Αυτή είναι κυρίως κλινική και βασίζεται σε κάποια γενικά χαρακτηριστικά (ηλικία έναρξης, εναλλαγή εξάρσεων-υφέσεων), στη διασπορά των συμπτωμάτων σε χώρο και χρόνο και στον παρακλινικό έλεγχο. Αρχικά θα πρέπει να αποκλεισθούν άλλες αιτίες που προκαλούν παρόμοια κλινική εικόνα και ευρήματα, όπως ανοσολογικές παθήσεις, λοιμώξεις ή εξεργασίες.

Είναι πολύ πιθανό να τεθεί η υποψία της νόσου όταν ένας ασθενής νεαρής ηλικίας προσέλθει με εικόνα οπτικής νευρίτιδας, αμφοτερόπλευρη στελεχιαία συμπτωματολογία και εγκάρσια μυελίτιδα. Με τη βοήθεια του παρακλινικού ελέγχου, ει δυνατόν κατά την οξεία φάση, η διάγνωση θα επιβεβαιωθεί πιο εύκολα.

1.9.1.ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

Οι βασικές διαγνωστικές εξετάσεις που πραγματοποιούνται σε υποψία Πολλαπλής Σκλήρυνσης είναι οι εξής:

ENY: Κατά την ενεργό φάση της νόσου, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ανευρίσκεται ελαφριά έως μετρίου βαθμού μονοπυρηνική πλειοκυττάρωση με έως 50 κύτταρα/mm³. Η διάγνωση πρέπει να αποκτά άλλη κατεύθυνση σε περίπτωση που βρεθούν κύτταρα >75 ή πολυμορφοπυρηνικός τύπος. Η σχέση γ-σφαιρίνης και

λευκωματίνης είναι αυξημένη και κατά την ηλεκτροφόρηση των λευκωμάτων του ENY είναι χαρακτηριστική η διάσπαση της γ-σφαιρίνης σε ανώμαλους διακριτούς πληθυσμούς που καλούνται «ολιγοκλωνικές ζώνες» (ποσοστό 90% των ασθενών). Αυτό είναι ίσως το πιο χρήσιμο εύρημα όσον αφορά την επιβεβαίωση της διάγνωσης, αν και η εντόπιση μιας μόνο ζώνης θεωρείται αρνητικό τεστ. Η ύπαρξή τους ήδη από την έναρξη της νόσου προδιαθέτει για τη μορφή των εξάρσεων-υφέσεων. Ωστόσο, απαιτείται και δείγμα αίματος που θα αποκλείει την παρουσία τους εκεί και θα πιστοποιεί τον σχηματισμό τους εντός του ΚΝΣ και όχι την παθητική μεταφορά τους από τον ορό, γιατί διαφορετικά χάνεται η διαγνωστική αξία της εξέτασης. Η νόσος Devic και η νεκρωτική μυελοπάθεια στερούνται αυτών των ζωνών, ενώ είναι συχνή η εμφάνισή τους σε άλλες παθήσεις όπως η σύφιλη, η νόσος Lyme, οι αγγειίτιδες, οι κολλαγονώσεις, οι παρανεοπλασματικές εκδηλώσεις και η υποξεία σκληρυντική εγκεφαλίτιδα.

Άλλο στοιχείο που ελέγχεται είναι το ολικό λεύκωμα που βρίσκεται αυξημένο στο 40% και ο δείκτης IgG (δηλαδή η σχέση IgG/αλβουμίνης σε ENY και ορό) που αυξάνει στο 90% της βέβαιης μορφής νόσου. Έχει φανεί επίσης με ανοσοδοκιμές πως κατά τις υποτροπές της νόσου το ENY περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης (MBP).

Μαγνητική Τομογραφία: Η εικόνα που καταγράφεται αφορά πολλαπλές απομυελινωτικές πλάκες που εντοπίζονται κυρίως στην περικοιλιακή λευκή ουσία, στην παραφλοιώδη λευκή ουσία, στο μεσολόβιο, στο στέλεχος και στον νωτιαίο μυελό. Οι εστίες είναι σχήματος ωοειδούς ή στρόγγυλου με διάμετρο περί τα 3-10mm. Κύρια ακολουθία που χρησιμοποιείται είναι η T2 όπου οι εστίες εμφανίζονται υπέρπυκνες, ενώ στις FLAIR(πιο ευαίσθητες ακολουθίες) είναι με μαύρο χρώμα. Στις T1 ακολουθίες απεικονίζονται οι χρόνιες εστίες σαν υπόπυκνες περιοχές (black holes), δείκτης μη αναστρέψιμης απομυελινωτικής βλάβης και αξνικής απώλειας. Η ενδοφλέβια χορήγηση παραμαγνητικών ουσιών, όπως το γαδολίνιο, στις ενεργές φάσεις της νόσου εμφανίζει τις εστίες με ενίσχυση λόγω της αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας και της οξείας φλεγμονής, αλλά και της ρήξης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Έτσι οι εστίες με πρόσληψη υποδηλώνουν ενεργή νόσο. Η διάρκειά τους είναι 3-4 εβδομάδες και σε περίπτωση χορήγησης κορτιζόνης αυτές εξαφανίζονται.

Κάποιες χαρακτηριστικές και ιδιαίτερα διαγνωστικές εικόνες είναι τα Dawson fingers όπου οι απομυελινωτικές πλάκες φαίνονται κάθετες στο μεσολόβιο σαν

ακτίνες του. Σπάνια μια εστία μπορεί να θυμίζει γλοιοβλάστωμα ή έμφρακτο οπότε καλείται tumefactive.

Δεν φαίνεται να υπάρχει μεγάλη συσχέτιση ανάμεσα στην κλινική εικόνα και τα ευρήματα της μαγνητικής τομογραφίας. Εκεί τα ευρήματα είναι συνήθως πολύ περισσότερα σε σχέση με την συμπτωματολογία και καθώς η νόσος προχωρά ο αριθμός των εστιών αυξάνει. Πολύ σπάνια είναι δυνατόν ασθενείς με κλινικά βέβαιη πολλαπλή σκλήρυνση να έχουν φυσιολογική απεικόνιση.

Η μαγνητική τομογραφία μας πληροφορεί για το φορτίο της νόσου και την ύπαρξη εγκεφαλικής ατροφίας. Αποδεικνύεται ιδιαίτερα χρήσιμη στις περιπτώσεις κλινικά μεμονωμένων περιστατικών (Clinically Isolated Syndrome-CIS), όπου η παρουσία κλινικά σιωπηλών εστιών αυξάνει τον κίνδυνο εξέλιξης σε βέβαιη νόσο. Επιπλέον, η παρακολούθηση διαδοχικών τομογραφιών καθώς η νόσος προχωρά είναι ένας χρήσιμος δείκτης ώστε να ελέγξουμε την αποτελεσματικότητα της φαρμακευτικής αγωγής και να την τροποποιήσουμε αν χρειάζεται.

Δυστυχώς η εξέταση αυτή στερείται ειδικότητας, καθώς πολλές είναι οι παθήσεις που μπορούν να εμφανίσουν παρόμοια εικόνα. Στον πίνακα 1 παρακάτω φαίνονται μερικές.

Προκλητά δυναμικά:

Τα προκλητά δυναμικά (οπτικά, ακουστικά, σωματοαισθητικά) είναι ηλεκτρικά δυναμικά που παράγονται μετά από επαναλαμβανόμενο ερεθισμό επιλεγμένων περιφερικών νεύρων. Η παράταση που καταγράφεται υποδηλώνει απομυελίνωση. Ανωμαλίες ανευρίσκονται περίπου στο 70% των περιπτώσεων. Η χρησιμότητά τους έγκειται στο γεγονός πως μπορούν να αποκαλύψουν κλινικά ασυμπτωματικές εστίες. Μεγαλύτερης διαγνωστικής αξίας είναι τα οπτικά [59,62-64].

Πίνακας 1: Παθήσεις που μιμούνται απεικονιστικά την Πολλαπλή Σκλήρυνση

ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ	ΑΓΓΕΙΑΚΕΣ
<ul style="list-style-type: none">• Οξεία διάσπαρτη εγκεφαλομυελίτιδα• Οπτική νευρομυελίτιδα• Αγγειίτιδες• Σαρκοείδωση• Νόσος Behcet• Πρωτοπαθής αγγειίτιδα του ΚΝΣ	<ul style="list-style-type: none">• Μικροαγγειοπάθεια• Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο• CADASIL <p>ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ</p> <ul style="list-style-type: none">• Γεφυρική μυελινόλυση• Φαινυλκετονουρία• Έλλειψη Β12• Υπερομοκυστεϊναιμία

ΛΟΙΜΩΔΕΙΣ	
<ul style="list-style-type: none"> • Προοδευτική πολυεστιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια • HIV εγκεφαλίτιδα • Ιογενής εγκεφαλίτιδα • Νόσος Lyme και Whipple • Σύφιλη • Υποξεία σκληρυντική πανεγκεφαλίτιδα • Φυματίωση, μυκητιάσεις 	<ul style="list-style-type: none"> • Εγκεφαλοτενόντια ξανθωμάτωση
	ΆΛΛΕΣ
	<ul style="list-style-type: none"> • Λευκοδυστροφίες • Όγκοι • Μιτοχονδριάσεις • Σύνδρομο Susac

1.9.2.ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Η πρώτη προσπάθεια καταγραφής των χαρακτηριστικών συμπτωμάτων της ΠΣ έγινε από τον Charcot, ο οποίος θεώρησε τον νυσταγμό, τον τρόπο τελικού σκοπού και την διαταραγμένη ομιλία σαν τυπικά συμπτώματα της νόσου (τριάδα Charcot). Αργότερα η τριάδα αυτή απορρίφθηκε καθώς αφορά προχωρημένα στάδια και προσβολή κυρίως της παρεγκεφαλίδας. Το 1954 οι Allison και Milliar παρατήρησαν τη χαρακτηριστική διασπορά των συμπτωμάτων σε χρόνο και χώρο και ακολούθησε η καταγραφή κριτηρίων από τους Schumacher(1965), McAlpine(1972), Poser(1983) και McDonald(2001). Η ομάδα του McDonald μάλιστα τροποποίησε και τον ορισμό των υποτροπών. Έτσι μια υποτροπή θα πρέπει να έχει διάρκεια τουλάχιστον 24ωρών και να μην σχετίζεται με εικόνα λοίμωξης, ενώ οι υποτροπές για να θεωρηθούν ξεχωριστές πρέπει να απέχουν τουλάχιστον 30 ημέρες μεταξύ τους. Σήμερα αυτά που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι αυτά του McDonald (με την αναθεώρηση του 2010) που παρατίθενται στον πίνακα παρακάτω [59,62,63,65,66].

Πίνακας 2:Τα κριτήρια McDonald σύμφωνα με την αναθεώρηση του 2010 [66]

Κλινική εικόνα	Δεδομένα που απαιτούνται για διάγνωση
≥2 ώσεις: αντικειμενικά κλινικά ευρήματα ≥2 προσβεβλημένων εστιών ή αντικειμενικά κλινικά ευρήματα για 1 εστία και ύπαρξη ιστορικού προηγούμενης ώσης	Δεν απαιτούνται άλλα δεδομένα

<p>≥2 ώσεις: αντικειμενικά κλινικά ευρήματα για 1 προσβεβλημένη εστία</p>	<p>Διασπορά στο χώρο: ≥1 T2 εστίες σε τουλάχιστον 2 περιοχές (περικολιακά, παραφλοιωδώς, υποσκληνίδια, στον νωτιαίο μυελό) ή Αναμονή για νέα ώση που θα υποδεικνύει διαφορετική περιοχή του ΚΝΣ</p>
<p>1 ώση: αντικειμενικά κλινικά ευρήματα για ≥2 εστίες</p>	<p>Διασπορά στο χρόνο: Ταυτόχρονη παρουσία εστιών που προσλαμβάνουν γαδολίνιο και άλλων που δεν προσλαμβάνουν ή νέα εστία στην T2 και/ή εστία που προσλαμβάνει γαδολίνιο σε επόμενη MRI χωρίς να λαμβάνεται υπόψιν ο χρόνος ή αναμονή για νέα κλινική ώση</p>
<p>1 ώση: Αντικειμενικά κλινικά ευρήματα για 1 εστία (CIS syndrome)</p>	<p>Διασπορά σε χώρο και χρόνο όπως περιγράφονται παραπάνω</p>
<p>Πρωτοπαθώς προϊούσα μορφή MS (PPMS)</p>	<p>1 χρόνος προϊούσας νόσος με 2 από τα 3 παρακάτω: -στοιχεία για διασπορά στο χώρο στον εγκέφαλο με ≥1 T2 εστίες στις χαρακτηριστικές περιοχές εντόπισης -στοιχεία διασποράς στο χώρο στον νωτιαίο μυελό με ≥2 T2 εστίες -θετική εξέταση ENY (παρουσία ολιγοκλωνικών ζωνών και/ή αυξημένος δείκτης IgG</p>

1.9.3.ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Υπάρχει πλήθος άλλων καταστάσεων που μπορεί να μιμηθούν την εικόνα της πολλαπλής σκλήρυνσης. Ιδιαίτερα, η διάγνωση της πολλαπλής σκλήρυνσης θα πρέπει να απομακρύνεται και να γίνεται πιο εκτεταμένος έλεγχος όταν:

- τα κριτήρια είναι ελλιπή για τη βέβαιη διάγνωση,
- η ηλικία έναρξης δεν είναι η συνήθως παρατηρούμενη (<15 ή >60 έτη),
- η νόσος εμφανίζει προϊούσα πορεία ήδη από την έναρξη,

- το άτομο δεν εμφάνισε ποτέ στην πορεία της νόσου συμπτώματα οφθαλμικά-αισθητικά-κυστικά
- η εντόπιση των απομυελινωτικών πλακών είναι σε ασυνήθιστες περιοχές του εγκεφάλου ή του νωτιαίου μυελού,
- ο παρακλινικός έλεγχος δεν είναι ο χαρακτηριστικός
- υπάρχουν μη τυπικά συμπτώματα όπως: αφασία, χορεία, παρκινσονισμός, πυρετός, κεφαλαλγίες, επιληπτικές κρίσεις, κόμα

Στον πίνακα 3 καταγράφεται μια σειρά καταστάσεων που η εικόνα τους ομοιάζει με αυτή της Πολλαπλής Σκλήρυνσης [59,62,63,67]:

Πίνακας 3: Παθήσεις που ομοιάζουν με την Πολλαπλή Σκλήρυνση

Διαφορική διάγνωση Πολλαπλής Σκλήρυνσης
Οξεία διάσπαρτη εγκεφαλομυελίτιδα (ADEM)
Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο
Νόσος Αδαμαντιάδη-Behçet
CADASIL
Γνωστικές Λευκοδυστροφίες
Λοίμωξη από HIV
Ισχαιμική οπτική νευροπάθεια
Νόσος Lyme
Βρουκέλλωση
Λοίμωξη από Borellia
Μιτοχονδριακή εγκεφαλοπάθεια με γαλακτική οξέωση και εγκεφαλικό
Νεοπλάσματα (λέμφωμα, γλοίωμα, μηνιγγίωμα)
Σαρκοείδωση
Σύνδρομο Sjögren's
Ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια
Σύφιλη
Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος και άλλες κολλαγονώσεις
Τροπική σπαστική παραπάρεση (λοίμωξη από HTLV I/II)
Αγγειοδυσπλασίες
Αγγειίτιδες
Έλλειψη B12
Πλάγια αμνατροφική σκλήρυνση
Σχιστοσωμίαση
Αταξία Friedreich
Δηλητηρίαση με νιτρικό οξείδιο

1.10.ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό της Πολλαπλής Σκλήρυνσης είναι ο διαλείπων χαρακτήρας της, με τις περιόδους των ώσεων να ακολουθούνται από περιόδους υφέσεων. Η ύφεση συνήθως είναι πλήρης, ενώ σπάνια μπορεί να είναι τόσο σοβαρής μορφής ώστε να καταλήξει σε τετραπληγία του ασθενούς. Κατά πολλούς η μορφή της MS καθορίζει και την πρόγνωση θεωρώντας πως η RRMS έχει την καλύτερη. Παρολαυτά από τη στιγμή που θα εγκατασταθεί αναπηρία, η αρχική εικόνα δεν παίζει μεγάλο ρόλο. Ένα 20% των ασθενών παραμένει με πολύ ήπια ή και χωρίς αναπηρία (EDSS≤3) ακόμη και δεκαετίες μετά την έναρξη της νόσου. Πρόκειται για την καλοήγη μορφή. Στην πλειοψηφία όμως, καθώς η νόσος προχωρά αυξάνει και ο κίνδυνος για μετάπτωση στη δευτεροπαθώς προϊούσα μορφή με σταθερή επιδείνωση και ανάγκη υποβοηθούμενης βάδισης. Μάλιστα στα 25 χρόνια της νόσου το 80% θα μεταπέσει σε SPMS. Ένα 10% διαγιγνώσκεται εξ αρχής με την πρωτοπαθώς προϊούσα μορφή με μικρή απάντηση στις θεραπείες και κακή πρόγνωση.

Υπάρχει ένας αριθμός κριτηρίων-χαρακτηριστικών στην έναρξη της νόσου που καταγράφηκαν με τα χρόνια και φαίνεται να δίνουν κάποια εικόνα για τη μετέπειτα εξέλιξή της. Αυτά που συνδέονται με χειρότερη πρόγνωση είναι: 1)μικρό μεσοδιάστημα μεταξύ έναρξης και πρώτης υποτροπής, 2)ο μεγάλος αριθμός υποτροπών, 3)η σύντομη απόκτηση μέτριου βαθμού αναπηρίας μέσα στα πρώτα 5 έτη, 3)η πρώιμη εμφάνιση πυραμιδικών ή παρεγκεφαλιδικών συμπτωμάτων, 4)η προοδευτική πορεία με επιδείνωση. Αντίθετα καλύτερη εξέλιξη φαίνεται να έχουν ασθενείς με αισθητικά ή οφθαλμικά συμπτώματα στην έναρξη, η παρουσία λιγότερων από 2 ώσεων τον πρώτο χρόνο και γενικώς οι αραιές και ήπιες υποτροπές.

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης υπάρχει κλινική σταθερότητα και μάλιστα ο αριθμός των υποτροπών μειώνεται όσο αυτή προχωρά. Στο πρώτο τρίμηνο της λοχείας όμως διπλασιάζεται ο κίνδυνος υποτροπής.

Η πρόγνωση του μεμονωμένου συνδρόμου CIS βασίζεται στην παρακολούθηση των μαγνητικών τομογραφιών. Εάν υπάρχουν έως 3 εστίες ο κίνδυνος για Πολλαπλή Σκλήρυνση είναι 80% μέσα στα επόμενα 20 χρόνια. Μάλιστα εάν υπάρχει και πρόσληψη γαδολινίου οι πιθανότητες αυξάνουν σημαντικά. Σε περίπτωση που η απεικόνιση είναι φυσιολογική ο κίνδυνος μειώνεται στο 20%.

Η ηλικία έναρξης καθορίζει επίσης με έναν τρόπο την πρόγνωση κυρίως γιατί η RRMS ξεκινά σε νεότερες ηλικίες, ενώ η PPMS μετά τα 40 έτη. Η εμφάνιση στην παιδική ηλικία έχει επίσης καλύτερη πορεία γιατί η ανικανότητα καθυστερεί

περισσότερο να εμφανιστεί. Παλαιότερα θεωρούνταν πως το ανδρικό φύλο συνδεόταν με βαρύτερη εικόνα, αλλά τα τελευταία χρόνια αυτό αμφισβητείται.

Η θνητότητα είναι μόνο κατά λίγα χρόνια μικρότερη από τον γενικό πληθυσμό κυρίως λόγω των επιπλοκών και του αυξημένου ποσοστού αυτοκτονιών (διπλάσιο σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό) [59,62,63].

1.11.ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Τρεις είναι οι κατηγορίες στις οποίες χωρίζεται η θεραπευτική αντιμετώπιση. Αυτές τις αποτελούν:

- 1)η θεραπεία της οξείας φάσης
- 2)η νοσοτροποποιητική θεραπεία που θεωρείται προφυλακτική
- 3)η συμπτωματική θεραπεία

1.Θεραπεία της οξείας φάσης

Αυτή αντιμετωπίζεται κατά βάση με χρήση γλυκοκορτικοειδών. Αρχικό βήμα όμως εδώ είναι να ξεδιαλύνουμε αν πρόκειται για πραγματική υποτροπή της νόσου ή για κάποια παρόξυνση συμπτωμάτων λόγω π.χ. αύξησης θερμοκρασίας ή κάποιας λοίμωξης. Στην περίπτωση αυτή δεν είναι κατάλληλη η κορτικοθεραπεία.

Γλυκοκορτικοειδή: χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των υποτροπών η στην πρώτη προσβολή της νόσου καθώς επιτυγχάνουν γρηγορότερη ανάρρωση και ελαττώνουν τη σοβαρότητα. Είναι άγνωστο αν επιδρούν θετικά και μακροπρόθεσμα στη νόσο. Η λειτουργία τους δεν είναι σαφής αλλά πιθανόν δρουν ελαττώνοντας το οίδημα, σταθεροποιούν τον ΑΕΦ, ελαττώνουν τον αριθμό των προφλεγμονωδών κυτοκινών και αυξάνουν την απόπτωση των T κυττάρων. Χορηγείται ενδοφλέβια μεθυλπρεδνιζολόνη 500-1000mg την ημέρα για 3-5 μέρες και είτε ο ασθενής συνεχίζει με πρεδνιζολόνη από του στόματος 60-80Mg είτε όχι. Εάν πρόκειται για ήπιας μορφής ώση αποτελεσματικές είναι και η φυσικοθεραπεία,εργοθεραπεία οπότε δεν χρειάζεται φαρμακευτική παρέμβαση. Συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η κατακράτηση υγρών, η ελάττωση των επιπέδων K^+ , η αύξηση βάρους, γαστρεντερολογικές διαταραχές, ακμή και συναισθηματική αστάθεια. Έτσι προτείνεται για εκείνο το διάστημα δίαιτα περιορισμένη σε αλάτι και γλυκά, πλούσια σε κάλιο και αν χρειάζεται καλιοσυντηρητικά διουρητικά. Μπορεί ακόμη να

χορηγηθεί λίθιο και εάν υπάρχει ιστορικό πεπτικού έλκους ρανιτιδίνη, σιμετιδίνη και αναστολείς αντλίας πρωτονίων.

Πλασμαφαίρεση: Χρησιμοποιείται σπάνια σε κεραυνοβόλες καταστροφικές ώσεις που δεν ανταποκρίνονται στην θεραπεία με κορτικοειδή. Γίνονται συνολικά 5-7 πλασμαφαιρέσεις 40-60mL/Kg ανά δύο μέρες για διάστημα 14 ημερών. Αποφεύγεται λόγω υψηλού κόστους και αμφίβολης αποτελεσματικότητας.

2. Τροποποιητικές θεραπείες

Για τις μορφές που εμφανίζουν υποτροπές (RRMS, SPMS με εξάρσεις) χρησιμοποιούνται κατεξοχήν οι ιντερφερόνες σαν πρώτης γραμμής φάρμακα και ακολουθεί η οξική γλατιραμέρη. Σε περίπτωση μη ανταπόκρισης οι επιλογές περιλαμβάνουν θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα, φιγγολιμώδη, μιτοξανδρόνη, και τεριφλουνομίδη.

Ιντερφερόνη-β: Στο εμπόριο κυκλοφορούν η IFNβ-1α (Avonex, Rebif) και η IFNβ-1β (Betaseron). Φυσιολογικά αποτελεί κυτταροκίνη της φυσικής ανοσίας που παράγεται από τους ινοβλάστες. Έχει ικανότητες αντικές, αντινεοπλασματικές και ανοσορρυθμιστικές καθώς η λειτουργία της έγκειται στο να ελαττώνει τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων, να μειώνει την έκφραση των μορίων MHC και να περιορίζει την κυκλοφορία των φλεγμονωδών κυττάρων στο ΚΝΣ. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε σαν θεραπεία της Πολλαπλής Σκλήρυνσης λόγω της υποψίας πως κάποιος ιός εμπλέκεται στην παθογένεση αν και αυτό δεν έχει επιβεβαιωθεί μέχρι και σήμερα. Η χρήση της ελαττώνει τον ρυθμό των υποτροπών, βελτιώνει το φορτίο της νόσου όπως φαίνεται στις μαγνητικές τομογραφίες και βελτιώνει επίσης τον βαθμό αναπηρίας στην EDSS κλίμακα. Παρολαυτά δεν είναι αποτελεσματική σαν θεραπεία στην δευτεροπαθώς προϊούσα μορφή χωρίς εξάρσεις. Το Avonex χορηγείται ενδομυϊκώς 30μg μια φορά την εβδομάδα, το Rebif υποδορίως 44μg 3 φορές την εβδομάδα και το Betaseron υποδορίως 250μg ανά 2 ημέρες.

Στις ανεπιθύμητες ενέργειες αναφέρονται γριπώδης συνδρομή, τοπική αντίδραση λόγω της ενέσιμης μορφής, και μικρή αύξηση των ηπατικών ενζύμων ή λεμφοπενία. Ακόμα έχουν καταγραφεί κατάθλιψη (που σε περίπτωση σοβαρού επεισοδίου πρέπει να διακόπτεται), αύξηση στην σπαστικότητα και γνωστικές διαταραχές αλλά αυτά δεν είναι βέβαιο αν οφείλονται στην θεραπεία ή την ίδια τη νόσο. Μια σημαντική παρατήρηση ωστόσο είναι η ανάπτυξη εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι της ιντερφερόνης-β με αποτέλεσμα να μειώνεται η βιοδιαθεσιμότητά της και κατ'

επέκταση η αποτελεσματικότητα. Σπάνιες ανεπιθύμητες ενέργειες αποτελούν η αυτοάνοση ηπατίτιδα, η θυρεοειδική νόσος και το νεφρωσικό σύνδρομο.

Οξική γλατιραμέρη (Copaxone): Είναι ένα πολυπεπτίδιο που αποτελείται από 4 αμινοξέα και δρα προάγοντας τη δράση των κατασταλτικών T κυττάρων, εμποδίζοντας τη σύνδεση της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης στα μόρια MHC καθώς καταλαμβάνει τη θέση και αυξάνοντας τον αριθμό των ρυθμιστικών κυτοκινών. Η χρήση της έχει σαν αποτέλεσμα την ελάττωση του ρυθμού των υποτροπών και φαίνεται να έχει παρόμοια αποτελεσματικότητα με τις υψηλές δόσεις ιντερφερόνης-β. Χορηγείται υποδορίως 20μg καθημερινά. Στις ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνονται η τοπική αντίδραση λόγω ενέσιμης θεραπείας, και μια σειρά από συμπτώματα όπως flush, δύσπνοια, αρρυθμίες, άγχος τα οποία εμφανίζονται 1-2 φορές μόνο σε όλη τη διάρκεια της θεραπείας. Ακόμη είναι δυνατόν να εμφανιστεί λιποατροφία στο σημείο των ενέσεων.

Natalizumab (Tysabri): Αποτελεί ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον της ιντεγκρίνης α4 και αποτρέπει την προσκρόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο των αγγείων, επομένως εμποδίζει την διόδό τους μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Είναι ένα φάρμακο καλά ανεκτό που σε ένα πολύ μικρό ποσοστό μπορεί να προκαλέσει υπερευαισθησία ή να αναπτυχθούν αντισώματα. Σημαντική επιπλοκή εδώ είναι η εμφάνιση προοδευτικής πολυεστιακής λευκοεγκεφαλοπάθειας, γ'αυτο η χρήση του καθιστά απαιρήτο τον έλεγχο για αντισώματα έναντι του ιού JC.

Φιγγολιμώδη (Gilenya): Είναι ένας αναστολέας της σφιγγοσινο-1-φωσφατάσης που προλαμβάνει την έξοδο των λευκών από τα δευτερογενή λεμφικά όργανα, τα παγιδεύει στην περιφέρεια και δεν επιτρέπει την είσοδο τους στο εγκέφαλο. Εμφανίζει και κεντρική δράση καθώς δύναται να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Επιτυγχάνει μείωση του ρυθμού των υποτροπών και βελτιώνει τους δείκτες βαρύτητας της νόσου. Χορηγείται από το στόμα σε δοσολογία 0,5mg την ημέρα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν θεραπεία πρώτης γραμμής και είναι αρκετά ασφαλές αν και η μακρόχρονη δράση του δεν έχει επιβεβαιωθεί. Προκαλεί ήπια διαταραχή των ηπατικών ενζύμων και λεμφοπενία, και λόγω περιστατικών βραδυκαρδίας και 1^{ου} βαθμού αποκλεισμού η 1^η δόση πρέπει να ακολουθείται από βωρη παρακολούθηση με monitoring.

Τεριφλουνομίδη (Aubagio): Χορηγείται και αυτό από το στόμα 7-14mg την ημέρα και προκαλεί μια μέτρια ελάττωση του ρυθμού υποτροπών και σημαντική

βελτίωση της αναπηρίας στις υψηλότερες δόσεις. Ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η ηπατοτοξικότητα, ναυτία και έχει τερατογόνο δράση.

Μιτοξανδρόνη (Novantrone): Είναι το μοναδικό αντινεοπλασματικό φάρμακο που έχει εγκριθεί για τη θεραπεία της ΠΣ. Ενδείκνυται μόνο στις περιπτώσεις RRMS με επιδείνωση χωρίς βελτίωση στα μεσοδιαστήματα, SPMS, PRMS που δεν ανταποκρίνονται στις άλλες θεραπείες. Η χρήση του δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 2-3 χρόνια καθώς είναι αρκετά καρδιοτοξικό φάρμακο. Άλλες επιπλοκές είναι η αμνηρόρροια, η λευκοπενία και η οξεία λευχαιμία.

Στις περιπτώσεις εκείνες όπου η εμφάνιση των υποτροπών συνεχίσει να εμφανίζει μεγάλη συχνότητα ή υπάρχει επιδείνωση της αναπηρίας θα πρέπει να επανεξετάζεται η χρησιμοποιούμενη θεραπεία και να τροποποιείται. Είναι σημαντικό η θεραπεία να ξεκινά όσο πιο νωρίς στην RRMS καθώς έτσι μειώνεται η παρουσία φλεγμονής στο ΚΝΣ όπως μπορεί κανείς να παρατηρήσει στις MRI, παρατείνεται το χρονικό διάστημα για εγκατάσταση αναπηρίας και εξέλιξης σε δευτεροπαθώς προϊούσα μορφή και ελαττώνεται η εμφάνιση των όσεων. Βεβαίως στην περίπτωση του μεμονωμένου επεισοδίου διαπιστώνεται φυσιολογική νευρολογική εξέταση και χαμηλό φορτίο νόσου η φαρμακευτική αντιμετώπιση μπορεί να καθυστερήσει.

Όσον αφορά τις προϊούσες μορφές χωρίς περιόδους εξάρσεων (SPMS, PPMS) καμία θεραπεία δεν μπορεί να τροποποιήσει την πορεία τους. Πιθανόν μόνο η χρήση rituximab να ελαττώνει την εξέλιξη της αναπηρίας στη μορφή της πρωτοπαθώς προϊούσας νόσου.

Άλλες θεραπείες που έχουν χρησιμοποιηθεί περιλαμβάνουν:

Την **αζαθειοπρίνη**: χρησιμοποιείται στην SPMS και μειώνει τον ρυθμό υποτροπών αλλά δεν βελτιώνει την αναπηρία

Την **μεθοτρεξάτη**: επιβραδύνει την εξελικτική πορεία της SPMS και βελτιώνει την δυσλειτουργικότητα των άνω άκρων

Την **κυκλοφωσφαμίδη**: προτιμάται από την μιτοξανδρόνη γιατί μπορεί να χρησιμοποιηθεί περισσότερο από 3 χρόνια αλλά μόνο σε ασθενείς κατα τ'άλλα υγιείς, κ'τω των 40 ετών και καθηλωμένους.

Την **ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη**: περιορισμένη η χρήση της και για όχι περισσότερο από δύο χρόνια [4,59,63,68].

3.Συμπτωματική θεραπεία

Περιλαμβάνει την άσκηση (ιδιαίτερα κολύμβηση), την λήψη συμπληρωμάτων βιταμίνης D, ω3 και ακόρεστων λιπαρών οξέων ενώ συγκεκριμένα για κάθε σύμπτωμα αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1) [59,63,69,70].

Πίνακας 4: Αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της Πολλαπλής Σκλήρυνσης

ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ
Αταξία-τρόμος Σπαστικότητα, σπασμοί	Κλοναζεπάμη, προπανολόλη Φυσιοθεραπεία, υδροθεραπεία, άσκηση, αποφυγή λοιμώξεων, μπακλοφένη, διαζεπάμη, τιζανιδίνη, γκαμπαπεντίνη
Αδυναμία Πόνοι	Αmpyra κυρίως αν προκαλεί δυσχέρεια βάρδισης Αντιεπιληπτικά, αντικαταθλιπτικά, αντιαρρυθμικά
Διαταραχές ούρησης	Ουροδυναμικός έλεγχος, αποκλεισμός ουρολοιμώξεων-ΚΥΠ-φαρμακολογικής αιτιολογίας, περιορισμός βραδινής πρόσληψης υγρών, φαρμακευτική αντιμετώπιση, πρόληψη ουρολοιμώξεων με χορήγηση βιταμίνης C ή χυμών κρανμπερι, προφυλακτική θεραπεία με αντιβιοτικά, διαλείποντες καθετηριασμοί
Ασυνέργεια σφιγκτήρων	Phenoxybenzamine, terazocin
Δυσκοιλιότητα	Δίαιτα πλούσια σε φυτικές ίνες και υγρά
Κατάθλιψη	SSRIs, τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά
Κόπωση	Αντιμετώπιση της σπαστικότητας, βοήθεια στο στίτι, Modiodal, Symmetrel
Γνωστικές διαταραχές	Αναστολείς χολινεστεράσης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΟΙ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΕΣ ΚΑΙ Η ΠΣ

2.1.ΟΙ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΕΣ

Οι ιντεγκρίνες αποτελούν μια ομάδα διαμεμβρανικών υποδοχέων της βασικής μεμβράνης, οι οποίοι συγκροτούνται από αλυσίδες α και β, σχηματίζοντας έτσι ετεροδιμερή. Αφού σχηματιστούν οι πρωτεΐνες α και β, μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου συνδέονται μεταξύ τους κι έπειτα το ετεροδιμερές μετακινείται στην κυτταρική μεμβράνη. Οι ιντεγκρίνες αποτελούν τα μόρια προσκόλλησης με τη μεγαλύτερη ποικιλία καθώς είναι γνωστές 24 διαφορετικές οικογένειες αυτών. Η λειτουργία τους έγκειται στο να μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων μεταξύ τους (cell-cell interaction) αλλά και του κυττάρου με την εξωκυττάρια ουσία (cell-extracellular matrix). Παίζουν επομένως

έναν πολύ σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό ισχυρών και ανθεκτικών δεσμών και στις αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν κατά την μετακίνηση των κυττάρων [71-73].

Μια πολύ σημαντική λειτουργία των ιντεγκρινών είναι η δυνατότητα που παρέχουν στο κύτταρο για αμφίδρομη σηματοδότηση, παίζοντας έτσι βασικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις του κυττάρου με την εξωκυττάρια ουσία. Η σημασία επομένως της παρουσίας τους στις ανοσολογικές απαντήσεις είναι μεγάλη. Μόλις ενεργοποιηθούν οι υποδοχείς χημειοκινών ή άλλοι υποδοχείς των T-λεμφοκυττάρων, το κυτταροπλασματικό τμήμα των ιντεγκρινών συνδέεται με ειδικές διακυτταρικές πρωτεΐνες (ταλίνες, κιντλίνες) με αποτέλεσμα μια ολική αναδιαμόρφωσή τους σε υψηλής συγγένειας ώστε να είναι εύκολη η πρόσδεση συνδετών στο εξωκυττάριο κομμάτι τους (σηματοδότηση από μέσα προς τα έξω). Το αντίστροφο συμβαίνει όταν προσδένονται συνδέτες στο εξωκυττάριο τμήμα, με αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση εσωτερικά και την έναρξη ενδοκυττάρων σημάτων (σηματοδότηση από έξω προς τα μέσα) [72,74,75].

2.2.Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ Α4 (ITGA4)

Η ιντεγκρίνη α4 παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση και προσκόλληση των λευκών στα ενδοθηλιακά κύτταρα στα σημεία φλεγμονής. Τα ζεύγη που σχηματίζει με τις ιντεγκρίνες β1 και β7 αποτελούν τους υποδοχείς VLA-4 (α4β1) και LPAM-1 (α4β7) οι οποίοι κατ'αντιστοιχία συνδέονται στους συνδέτες VCAM-1, φιμπρονεκτίνη και MadCAM [76]. Ο πρώτος αποτελεί ενδοθηλιακό συνδέτη, η φιμπρονεκτίνη είναι συνδέτης της εξωκυττάριας ουσίας που εντοπίζεται σε φλεγμονές, ενώ ο MadCAM συναντάται αποκλειστικά στο έντερο. Φαίνεται πως οι α4 ιντεγκρίνες παρουσιάζουν σημαντική οργανοειδικότητα, καθώς είναι υπεύθυνες για τη μετακίνηση των λευκοκυττάρων στον εγκέφαλο (α4β1) και το έντερο (α4β7). Συναντώνται επίσης σε αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα όπου φροντίζουν για την μετακίνηση και συγκράτησή τους στο μυελό των οστών. Παρότι στους ενήλικες θα λέγαμε πως αποτελούν αποκλειστικό στοιχείο των κυττάρων του αίματος, στα έμβρυα εντοπίζονται σε μεγάλη συγκέντρωση στην καρδιά και συγκεκριμένα στο περικάρδιο κατά την πρόιμη ανάπτυξή τους.

Στις αυτοάνοσες παθήσεις υπάρχει χρόνια φλεγμονή που ισοδυναμεί με συσσώρευση λευκοκυττάρων. Η εξαγγείωση των λευκών απαιτεί την δίοδο τους μέσα

από το αγγειακό ενδοθήλιο, μια διαδικασία που ρυθμίζεται από τη σηματοδότηση με μόρια προσκόλλησης και χημειοκίνες [73,77].

Με τη βοήθεια των σελεκτινών, τα κυκλοφορούντα λευκά προσδένονται και περιτυλίγονται στο ενδοθήλιο, γεγονός που τα φέρνει κοντά στους φλεγμαίνοντες ιστούς κ διευκολύνει τη σάρωση για χημειοκίνες. Μόλις συναντήσουν χημειοκίνες, τα λευκά ενεργοποιούνται με τη βοήθεια των υποδοχέων τους και μέσω ενός καταρράκτη σηματοδότησης ενεργοποιείται το κυτταροπλασματικό τμήμα των ιντεγκρινών. Ακολουθεί η αλλαγή στη διαμόρφωση σε υψηλής συγγένειας έτσι ώστε να επιτευχθεί ισχυρή σύνδεση των λευκοκυττάρων με το ενδοθήλιο της φλεγμαίνουσας περιοχής.

Υπάρχουν δύο τρόποι με τους οποίους τα λευκοκύτταρα εξέρχονται των αγγειακών ενδοθηλίων, παρακυτταρικά και διακυτταρικά [78]. Στο παρακυτταρικό μονοπάτι, οι ισχυροί δεσμοί με τους οποίους συνδέονται τα παρακείμενα ενδοθηλιακά κύτταρα αποσυναρμολογούνται με αποτέλεσμα το σχηματισμό κενού ανάμεσά τους έτσι ώστε να διέλθουν τα λευκά. Στο διακυτταρικό, το λευκοκύτταρο μεταναστεύει μέσω ενός μόνο ενδοθηλιακού κυττάρου, στο οποίο σχηματίζεται ένας πόρος. Τα κριτήρια με τα οποία τα λευκοκύτταρα τελικά διαλέγουν το ένα μονοπάτι ή το άλλο δεν είναι γνωστά, αλλά γνωρίζουμε πως για να μπορέσουν να πλησιάσουν τις ενδοθηλιακές επιφάνειες χρησιμοποιούν ποδοσώματα, δομές πλούσιες σε ακτίνη που ομοιάζουν με τα ενδοσώματα.

Αυτή η οργανοειδικότητα των ιντεγκρινών που αναφέρθηκε παραπάνω έχει σαν αποτέλεσμα και την οργανοειδικότητα των λευκοκυττάρων. Τα λεμφοκύτταρα αρχικά κυκλοφορούν περιπολώντας για μικροοργανισμούς και μεταλλαγμένα κύτταρα. Για να καταφέρουν να εισέλθουν στους λεμφικούς ιστούς απαιτούνται 1) περιτύλιξη μέσω L-σελεκτίνης, 2) ενεργοποίηση μέσω του χημειοκινικού υποδοχέα CCR7 και 3) σύλληψη μέσω της ιντεγκρίνης LFA-1 στο επιθήλιο των λεμφαδένων. Στη συνέχεια αυτά απορρίπτουν την L-σελεκτίνη, χάνουν τη δυνατότητα επανακυκλοφορίας στο αίμα και ανάλογα με το πώς και πού ενεργοποιούνται αυξάνουν και την έκφραση συγκεκριμένων ιντεγκρινών. Αποτέλεσμα όλων αυτών είναι να αποκτούν διαφορετικό οργανοειδικό τροπισμό [79-81].

2.3.ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗ Α4

Η σκέψη για την ανάπτυξη μιας αντι-ιντεγκρινικής θεραπείας βασίστηκε στην παρατηρηθείσα οργανοειδικότητα που παρουσιάζουν τα T-λεμφοκύτταρα.

Πειράματα *in vivo* απέδειξαν ότι η παραγωγή ενός αντισώματος ενάντια στην α4β1 ιντεγκρίνη, θα εμπόδιζε και τη συσσώρευση των λεμφοκυττάρων στον εγκέφαλο και κατά συνέπεια την ανάπτυξη ΕΑΕ [82]. Έτσι, κάποιες φαρμακευτικές εταιρείες ανέπτυξαν το ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα natalizumab έναντι στην ιντεγκρίνη α4. Η πρώτη μελέτη που διεξήχθη (τυχαιοποιημένη διπλή τυφλή) περιελάμβανε 72 ασθενείς με ενεργό RRMS και SPMS, οι οποίοι έλαβαν μόνο δύο εγχύσεις του μονοκλωνικού αντισώματος ανά μήνα. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν μείωση στην εμφάνιση των ενεργών πλακών στις MRI, αλλά η θεραπεία δεν φάνηκε να έχει κανένα αποτέλεσμα στην αντιμετώπιση της οξείας μορφής της νόσου. Ακολούθησε δεύτερη τυχαιοποιημένη μελέτη με 213 ασθενείς, όπου μελετήθηκαν τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα της θεραπείας της RRMS και αναδείχθηκε μείωση της εμφάνισης νέων πλακών, αλλά και κλινική βελτίωση με μείωση του αριθμού των υποτροπών. Επόμενες ήταν οι μελέτες AFFIRM και SENTINEL [83,84]. Η πρώτη, με 942 ασθενείς και διάρκεια μεγαλύτερη των 2 ετών, αξιολόγησε την πορεία της αναπηρίας και τον αριθμό των υποτροπών, με παρατηρούμενη και εδώ ελάττωση του ρυθμού υποτροπών και αύξηση των περιόδων ύφεσης. Η δεύτερη μελέτησε το ενδεχόμενο προσθήκης της θεραπείας με το μονοκλωνικό αντίσωμα στην θεραπεία με ιντερφερόνη β1α. Συμμετείχαν 1171 ασθενείς για πάνω από 2 έτη και το αποτέλεσμα ανέδειξε μείωση του κινδύνου για αύξηση της αναπηρίας και του ρυθμού υποτροπών.

Έτσι το 2004 η natalizumab έγινε δεκτή από τον FDA και κυκλοφόρησε για πρώτη φορά. Λίγους μήνες αργότερα όμως χρειάστηκε να αποσυρθεί λόγω 3 περιπτώσεων ασθενών που ανέπτυξαν *προοδευτική πολυεστιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια* (PML) με τους 2 από αυτούς να καταλήγουν [85,86]. Πρόκειται για μια θανατηφόρο λοίμωξη από τον ιό JC που προκαλεί σοβαρή βλάβη του εγκεφαλικού ιστού. Ο ιός που βρίσκεται σε λανθάνουσα μορφή επανενεργοποιείται λόγω της ανοσοκαταστολής. Φαίνεται πως η ιντεγκρίνη α4 είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη διατήρηση της ανοσίας έναντι του ιού, καθώς ρυθμίζει τα ειδικά δραστικά T-λεμφοκύτταρα και κύτταρα μνήμης με αποτέλεσμα ο αποκλεισμός αυτής να αποβαίνει μοιραίος.

Το φάρμακο επανήλθε στην αγορά το 2006 αφού επανεκτιμήθηκαν τα οφέλη σε σχέση με τη ζημία και καθορίστηκαν 3 καταστάσεις αυξημένου κινδύνου για εμφάνιση προοδευτικής πολυεστιακής λευκοεγκεφαλοπάθειας: 1)θετικός έλεγχος για

παρουσία αντισωμάτων JC 2) προηγηθείσα ή παρούσα κατασταλτική θεραπεία
3)διάρκεια θεραπείας με natalizumab πάνω από 2 έτη [87].

Έτσι, το μονοκλωνικό αντίσωμα natalizumab θεωρείται σήμερα η πιο ισχυρή
θεραπεία για την μορφή RRMS, αν και ο κίνδυνος για PML περιορίζει τις ενδείξεις
χρησιμοποίησης του. Στις ΗΠΑ προτείνεται μόνο σε ασθενείς που παρουσιάζουν
μειωμένη απόκριση ή δεν κάνουν ανεκτές τις βασικές θεραπείες με ιντερφερόνη-β ή
γλατιραμέρη ή σε αυτούς με κακή πρόγνωση [88-90].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Η Πολλαπλή Σκλήρυνση είναι μια χρόνια νευροφλεγμονώδης νόσος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Η διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος εναντίον στοιχείων της μυελίνης του ίδιου οργανισμού φαίνεται πως συμβαίνει σε γενετικά προδιαθετημένα άτομα υπό την πρόσθετη επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων. Η γενετική βάση της νόσου απασχόλησε αρκετά την επιστημονική κοινότητα και πλήθος μελετών έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα με στόχο να συγκεντρωθούν όσο το δυνατόν περισσότεροι γενετικοί τόποι σχετιζόμενοι με ευαισθησία απέναντι στη νόσο. Οι προσπάθειες αυτές αποκάλυψαν συσχέτιση με την παρουσία συγκεκριμένων HLA γονιδίων, καθώς και πολλών ακόμα μη-HLA, ωστόσο παρά τα αξιόλογα αποτελέσματα δεν κατορθώνουν να εξηγήσουν πλήρως τον κίνδυνο εμφάνισης [91-93]. Φαίνεται πως η συμμετοχή καθενός ξεχωριστά συμβάλλει σε πολύ μικρό ποσοστό και μόνο η συνύπαρξή τους ισχυροποιεί τον κίνδυνο.

Λόγω της πολυπαραγοντικότητας της νόσου, η κλινική εικόνα μεταξύ των ασθενών διαφέρει σημαντικά, με το εύρος της να κυμαίνεται από την πολύ ήπια καλοήγη μορφή με ελάχιστες κλινικές υποτροπές έως τις εκρηκτικές ταχέως εξελισσόμενες περιπτώσεις που επιφέρουν γρήγορα το θάνατο. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση πως η βαρύτητα πιθανόν να καθορίζεται και αυτή έως ένα βαθμό γενετικά.

Η αναπηρία της ΠΣ, είτε υπολειμματική από υποτροπές ή με προοδευτική πορεία, είναι αποτέλεσμα της επίθεσης του ανοσοποιητικού [94]. Γνωρίζουμε πως για να ξεκινήσει η φλεγμονή εντός του ΚΝΣ πρέπει τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα της περιφέρειας καθώς και άλλα φλεγμονώδη λευκά κύτταρα (μακροφάγα) να διασχίσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Για την προσκόλληση των λευκοκυττάρων και τη δίοδό τους μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, καθώς και τη μετανάστευση τους μέσω της εξωκυττάριας ουσίας στον ιστό στόχο υπεύθυνος είναι ένας αριθμός μορίων. [95]. Σε αυτή τη διαδικασία σημαντικό ρόλο παίζει η παρουσία των μορίων προσκόλλησης και πιο συγκεκριμένα των ιντεγκρινών, με τη βοήθεια των οποίων τα λευκά κατορθώνουν να προσδεθούν ισχυρά στο ενδοθήλιο των αγγείων για να μπορέσουν έπειτα να περάσουν μέσα από αυτό στο ΚΝΣ. Πιο ειδικά, η ιντεγκρίνη α4 (ITGA4) είναι μεταξύ της οικογενείας της αυτή που εμφανίζει οργανοειδικότητα για τον εγκέφαλο.

Η συμμετοχή επομένως της ITGA4 στην παθογένεση της Πολλαπλής Σκλήρυνσης καθιστά τις γενετικές παραλλαγές - πολυμορφισμούς της υποψήφιους τροποποιητικούς παράγοντες της πορείας της νόσου. Η χρήση του natalizumab, ενός

μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της α4 ιντεγκρίνης, βρέθηκε να μειώνει σημαντικά τις υποτροπές, το σχηματισμό νέων απομυελινωτικών εστιών και την εξέλιξη της αναπηρίας [83], καθώς εμποδίζει την προσκόλληση των λεμφοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο και αναστέλλει την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες εξωκυττάριας ουσίας [84].

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε για να εξεταστούν μόρια που εμπλέκονται στην διακίνηση λευκοκυττάρων μέσα από το τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων στο ΚΝΣ σε σχέση με την πορεία της ΠΣ όπως μετρήθηκε με το MSSS score. Υποθέσαμε ότι τα γενετικά ευαίσθητα άτομα μπορεί να είναι πιο επιρρεπή στην αυξημένη φλεγμονώδη διηθήση του εγκεφαλικού ιστού και, κατά συνέπεια στην βλάβη της μυελίνης και του άξονα. Μελετήσαμε τα tagging SNPs του γονιδίου ITGA4 στους εξής φαινότυπους της Πολλαπλής Σκλήρυνσης: Καλοήθης ΠΣ (MSSS=1-2) σε σχέση με την Μη Καλοήθη ΠΣ (MSSS=3-10) [95].

Στη μελέτη συμμετείχε ένα σύνολο από 389 ασθενείς με Πολλαπλή Σκλήρυνση (64,5% γυναίκες) σε δύο πόλεις της Ελλάδας (Λάρισα, Θεσσαλονίκη) και στην Κύπρο και συλλέχθηκαν δεδομένα συμπεριλαμβανομένων:

- της ηλικίας έναρξης της νόσου
- της ηλικίας λήψης του δείγματος
- της διάρκειας της νόσου
- του φύλου
- της λήψης ανοσοτροποποιητικής θεραπείας
- της αξιολόγησης με βάση την κλίμακα MSSS

Επιπλέον εντοπίστηκαν 36 SNPs του γονιδίου ITGA4 με βάση τα δεδομένα HarMap από τους CEU (Utah residents with ancestry from northern and western Europe population) και TSI (Tuscan in Italy) πληθυσμό (Release 27, Phase II+III, Feb09, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126):

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς

Ασθενείς με ΠΣ επιλέχθηκαν προοπτικά μετά από διαδοχικές εισαγωγές στο τμήμα Νευρολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, Θεσσαλονίκης και Κύπρου. Συνολικά 389 ασθενείς με βέβαιη Πολλαπλή Σκλήρυνση συμμετείχαν στη μελέτη (πίνακας 5). Το πρωτόκολλο της μελέτης εξετάστηκε και εγκρίθηκε από τα Institutional Review Board των ανωτέρω νοσοκομείων και λήφθηκε λεπτομερής έγγραφη συγκατάθεση από κάθε συμμετέχοντα.

Όσον αφορά την καταγραφή των ασθενών, για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε τα εξής:

1. Η διάγνωση της νόσησης από Πολλαπλή Σκλήρυνση βασίστηκε στα αναθεωρημένα διαγνωστικά κριτήρια McDonald του 2010 [66]

2. Η τρέχουσα φάση της νόσου καθορίστηκε με βάση στοιχεία που προέκυψαν από το ιστορικό και την νευρολογική εξέταση

3. Η αξιολόγηση της έκτασης και της βαρύτητας νόσου έγινε με την κλίμακα MSSS (Multiple Sclerosis Severity Scale) [56]

4. Με βάση τη βαθμονόμησή τους στην MSSS προέκυψαν δύο ομάδες:

α) Καλοήθης Πολλαπλή Σκλήρυνση με MSSS: 1-2

β) Μη καλοήθης Πολλαπλή Σκλήρυνση με MSSS: 7-10

5. Από τους συμμετέχοντες λήφθηκε δείγμα περιφερικού φλεβικού αίματος υπό άσηπτες συνθήκες και συλλέχθηκε σε φιαλίδια.

Πίνακας 5: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΠΣ

<i>Μεταβλητές</i>	<i>Σύνολο Ασθενών</i>	<i>Λάρισα Ασθενείς</i>	<i>Κύπρος Ασθενείς</i>	<i>Θεσσαλονίκη Ασθενείς</i>
<i>Αριθμός (%)</i>	389 (53.7)	206 (49.9)	104 (45.0)	79
<i>Αριθμός γυναικών(%)</i>	251 (64.5)	126 (31.8)	74 (28.8)	51 (64.6)
<i>Αριθμός ανδρών (%)</i>	138 (35.5)	80 (61.2)	30 (71.2)	28 (35.4)
<i>Λόγος Γυναίκες:Άντρες</i>	1.8:1	1.6:1	2.5:1	1.8:1
<i>Ηλικία έναρξης, μέση τιμή</i>	30.42 (8-63)	29.0 (8-63)	35.3 (15-58)	27.95 (13-50)
<i>Ηλικία λήψης δείγματος, μέση τιμή</i>	43.33 (20-74)	43 (21-74)	43.83 (25-66)	41.92 (20.63)
<i>Διάρκεια νόσου (έτη), μέση τιμή</i>	12.9	12.77	12.44	13.90

Διάμεσος τιμή	11 (2-52)	10 (5-52)	11 (5-35)	12 (2.38)
Αριθμός ασθενών που έλαβαν τροποποιητική θεραπεία (%)	271 (69.7)	131 (63.6)	71 (68.3)	69 (87.3)
Βαθμονόμηση σύμφωνα με MSSS, αριθμός	1065	930	331	344
Διάμεσος τιμή	4.00	5.00	3.00	5.00
Μέση τιμή (διακύμανση)	4.39 (2.61)	4.92 (2.89)	3.18 (1.98)	4.71 (2.00)
Καλοήθης MS [(MSSS=(1-2))], αριθμός (%)	109 (28.0)	51 (24.8)	49 (47.1)	9 (11.4)

Επιλογή πολυμορφισμών

Σε μια προσπάθεια να καλύψουμε το μεγαλύτερο μέρος της γενετικής ποικιλότητας όλου του γονιδίου ITGA4 (περιοχή chr2: 2q31-q32), τα προς μελέτη SNPs εντοπίστηκαν στο project HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) με το πρόγραμμα (<http://www.broadinstitute.org/mpg/tagger>). Η επιλογή των SNPs βασίστηκε στους πληθυσμούς CEU (Utah residents with ancestry from northern and western Europe population) Tuscan in Italy, HapMap-TSI (Release 27, Phase II+III, Feb09, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126) χρησιμοποιώντας τα παρακάτω κριτήρια: r^2 μεγαλύτερο ή ίσο με 0.8 και συχνότητα του ελάσσονος αλληλομόρφου μεγαλύτερη από 0.05. Συνολικά 36 SNPs επιλέχθηκαν, τα οποία καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος της μεταβλητότητας του γονιδίου ITGA4 στην βάση δεδομένων HapMap. Τα SNPs που επιλέχθηκαν είναι: rs12988934, rs3770138, rs10930969, rs2124440, rs3770136, rs155149, rs3770132, rs1449260a, rs711801, rs1449264, rs1449265, rs3770126, rs11694175, rs17224277, rs155087, rs2305588, rs155099, rs3755021, rs155103, rs155106, rs3770120, rs155110a, rs17225354, rs2305586, rs4667310, rs7607758, rs11689738, rs10204136a, rs12469449, rs16867437a, rs6721763, rs6728886, rs6707704, rs1449259, rs7562325a, rs1047307. Λεπτομέρειες για αυτά φαίνονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά των ITGA4 SNPs στους ασθενείς με ΠΣ

Αριθμός rs	Χρωμόσωμα	Χρωμοσωμική Θέση ¹	Minor Αλληλόμορφο (Συχνότητα) CEU πληθυσμός ²	Minor Αλληλόμορφο (Συχνότητα) TSI πληθυσμός ³
rs12988934	chr2	182031910	0.071	0.085
rs3770138	chr2	182034152	0.252	0.261
rs10930969	chr2	182036202	0.248	0.256
rs2124440	chr2	182036459	0.465	0.449
rs3770136	chr2	182037705	0.252	0.256
rs155149	chr2	182037892	0.195	0.159
rs3770132	chr2	182041206	0.097	0.102
rs1449260 ^a	chr2	182041692	0.218	0.182
rs711801	chr2	182043118	0.124	0.080
rs1449264	chr2	182044719	0.345	0.352
rs1449265	chr2	182045050	0.478	0.455
rs3770126	chr2	182045129	0.354	0.284
rs11694175	chr2	182046272	0.456	0.494
rs17224277	chr2	182048689	0.111	0.040
rs155087	chr2	182049919	0.198	0.230
rs2305588	chr2	182055317	0.235	0.244
rs155099	chr2	182057111	0.190	0.227
rs3755021	chr2	182057654	0.241	0.256
rs155103	chr2	182058988	0.199	0.229
rs155106	chr2	182059597	0.425	0.472
rs3770120	chr2	182060714	0.320	0.341
rs155110 ^a	chr2	182061036	0.400	NA
rs17225354	chr2	182061849	0.412	0.385
rs2305586	chr2	182068427	0.104	0.199
rs4667310	chr2	182071088	0.128	0.068
rs7607758	chr2	182075156	0.442	0.415
rs11689738	chr2	182077191	0.381	0.369
rs10204136 ^a	chr2	182084156	0.367	0.347
rs12469449	chr2	182087968	0.372	0.364
rs16867437 ^a	chr2	182093888	0.138	0.062
rs6721763	chr2	182094233	0.496	0.420
rs6728886	chr2	182101354	0.369	0.364
rs6707704	chr2	182103199	0.500	0.420
rs1449259	chr2	182106574	0.133	0.062
rs7562325 ^a	chr2	182107342	0.496	0.420
rs1047307	chr2	182109997	0.301	0.341

¹ Χρωμοσωμική θέση κάθε SNP and
² minor αλληλίο (συχνότητες) σε Καυκάσιο and ³Ιταλικό (Tuscan in Italy) πληθυσμό on HapMap Data Rel 27, Phase II+III, Feb09, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126
^a SNPs που εντοπίστηκαν με το tagger software αλλά απέτυχαν να γονοτυπηθούν

Εργαστηριακές τεχνικές

1. Απομόνωση DNA
2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction)
3. Γονοτύπηση με τη μέθοδο κατά Taqman

1.Απομόνωση DNA

Στο συγκεκριμένο πείραμα εφαρμόστηκε η μέθοδος της εξαλάτωσης. Είναι σημαντικό το DNA να είναι ελεύθερο προσμίξεων και να μην είναι διασπασμένο σε πολύ μικρά κομμάτια που δεν μπορούν να ενισχυθούν και να αναλυθούν. Η απομόνωση γενωμικού DNA γίνεται από εμπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (πυρήνες λευκοκυττάρων). Για τη διαδικασία αυτή λαμβάνονται 10ml αίματος που τοποθετούνται σε σωληνάριο, παρουσία αντιπηκτικού Na₂EDTA. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του γενωμικού DNA είναι:

- 1) Διάλυμα διάσπασης των πυρήνων [Lysis I: NH₄Cl (155mM), KHCO₃ (10mM), EDTA (1mM), pH=7.4 και Lysis II : Tris (10mM), NaCl (400mM), di-Na EDTA (2mM), pH=8.2],
- 2) διάλυμα πρωτεϊνάσης K (10mg/ml),
- 3) Διάλυμα 10% w/v SDS (sodium dodecyl sulfate: δωδεκακυλοθειικό νάτριο),
- 4) κορεσμένο διάλυμα NaCl (6M),
- 5) απόλυτη αιθανόλη,
- 6) CH₃COONa (3M),
- 7) πηκτή αγαρόζης 1%

Για την απομόνωση του DNA με τη μέθοδο της εξαλάτωσης ακολουθούμε τα παρακάτω στάδια παρουσιάζονται παρακάτω:

1η μέρα

1. Τοποθετούμε το αίμα σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 15ml και αραιώνουμε ως 12ml με ddH₂O (δισ αποσταγμένο νερό). Ακολουθεί καλή ανάδευση (με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων).
2. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3500rpm, στους 40C (απομόνωση των εμπύρηνων κυττάρων).
3. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απορρίπτεται και η διαδικασία συνεχίζεται με το ίζημα. Τα κύτταρα αραιώνονται σε ddH₂O έως 12ml και ανακινούμε σε vortex.
4. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3500rpm, στους 40C.

5. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και συνεχίζουμε με το ίζημα. Προσθέτουμε το διάλυμα lysis I μέχρι τα 12ml.
6. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3500rpm, στους 40C.
7. Επαναλαμβάνουμε τα στάδια 5 και 6 με lysis I.
8. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και συνεχίζουμε με το ίζημα. Προσθέτουμε το διάλυμα lysis II μέχρι τα 6ml (τα λυτικά διαλύματα lysis I και lysis II διευκολύνουν τη διάσπαση των πυρηνικών μεμβρανών για την απελευθέρωση του DNA. Επίσης, όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, περιέχουν EDTA που δεσμεύει τα δισθενή κατιόντα (Ca^{2+} , Mg^{2+}) που θεωρούνται απαραίτητα για τη δράση των νουκλεασών. Έτσι, τα ένζυμα αυτά απενεργοποιούνται, γεγονός που εξυπηρετεί στην αποφυγή της διάσπασης του DNA). Ανακινούμε ισχυρά και επωάζουμε για 15-30min, σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Προσθέτουμε 750μl SDS (10% w/v) και 100μl πρωτεΐνάσης K (10mg/ml) (το SDS είναι ένα ανιονικό αποδιατακτικό που δεσμεύει τα λιπίδια και καταστρέφει τη δομή της μεμβράνης του πυρήνα, ενώ συμμετέχει στην αποδιάταξη της χρωματίνης και των πρωτεϊνών. Επίσης, με την πρωτεΐνάση K επιτυγχάνεται η διάσπαση και η πέψη των πρωτεϊνών, με τις οποίες είναι συνδεδεμένο το DNA).
10. Επώαση στους 370C για 16-18hrs (overnight-O/N).

2η μέρα

Προσθέτουμε 2ml 6M κεκορεσμένου διαλύματος NaCl. Αναδεύουμε ισχυρά για 15sec (με τη διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα η κατακρήμνιση των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών).

1. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3500rpm, στους 40C.
2. Στο υπερκείμενο υπάρχει το DNA. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάριο και απορρίπτουμε το ίζημα. Αναδεύουμε ισχυρά.
3. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3500rpm, στους 40C.
4. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάριο των 50ml και απορρίπτουμε το ίζημα.
5. Ακολουθεί καταβύθιση του νουκλεϊκού οξέος, που βρίσκεται στο υπερκείμενο διάλυμα, με 2 όγκους απόλυτης αιθανόλης (2πλάσιο όγκο σε σχέση με το αρχικό διάλυμα) και CH_3COONa σε ποσότητα ίση με το 1/10 του όγκου του αρχικού διαλύματος. Σε περίπτωση που η αρχική ποσότητα του δείγματος του αίματος είναι αρκετή, δεν χρειάζεται να προσθέσουμε CH_3COONa
6. Επώαση στους 200C O/N.

3η μέρα

1. Φυγοκεντρούμε για 50min στις 3500rpm, στους 40C.
2. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Το DNA που συλλέγεται «ξεπλένεται» με διάλυμα αιθανόλης 70% και εισάγεται σε σωληνάριο τύπου erppendorf (το συγκεκριμένο βήμα καθαρισμού χρειάζεται για την απομάκρυνση του άλατος που έχει παραμείνει στο διάλυμα).
3. Φυγοκεντρούμε για 30min στις 12000rpm, στους 40C.
4. Επαναλαμβάνουμε το στάδιο 2 άλλες δύο φορές, με τη διαφορά ότι η διάρκεια της φυγοκέντρωσης είναι 20min.
5. Αφαιρούμε όλο το υπερκείμενο (αιθανόλη) προσεκτικά, (αφήνουμε μόνο το ίζημα-DNA) και καλύπτουμε το σωληνάριο με παραφίλμ, το οποίο τρυπάμε με μικροσκοπική καρφίτσα (με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η εξάτμιση της αιθανόλης που έχει παραμείνει στο σωληνάριο).
6. Επώαση σε θερμοκρασία ψυγείου.
7. Το DNA φυλάσσεται στους 40C (για συχνή χρήση) ή στους -200C (για μεγάλο χρονικό διάστημα).

Προσδιορισμός ποιότητας και συγκέντρωσης του DNA

A. Έλεγχος σε πηκτή αγαρόζης

Με μικρή ποσότητα DNA πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και το DNA γίνεται ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία σε συσκευή UV. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ο έλεγχος της ποιότητας του DNA.

B. Μέτρηση συγκέντρωσης

Μετά το πέρας της διαδικασίας απομόνωσης του DNA ακολουθεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής του. Το DNA ανιχνεύεται και προσδιορίζεται ποσοτικά με πολλούς τρόπους. Η απλούστερη μέθοδος περιλαμβάνει τον υπολογισμό της συγκέντρωσής του με φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να απορροφά εκλεκτικά ακτινοβολία μήκους κύματος 260nm.

Συγκεκριμένα, μετράται η οπτική πυκνότητα (OD) υδατικού διαλύματος DNA (αραιωμένο διάλυμα DNA 1:100) σε μήκος κύματος 260nm και 280 nm σε κυψελίδα χαλαζία με διαδρομή φωτός 1cm. Η απορρόφηση στα 260nm αντιστοιχεί στο

νουκλεϊκό οξύ που περιέχεται στο διάλυμα, ενώ η απορρόφηση στα 280 nm αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις που έχουν παραμείνει στο διάλυμα.

Η καθαρότητα του DNA εκτιμάται με βάση το λόγο OD₂₆₀/OD₂₈₀. Τιμές του λόγου μεταξύ 1,7 και 1,9 υποδηλώνουν παρουσία επαρκώς καθαρού DNA, τιμές μικρότερες του 1,7 φανερώνουν ότι το διάλυμα του DNA περιέχει πρωτεΐνες, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 1,9 υποδηλώνουν πρόσμιξη με RNA.

Έχει αποδειχθεί ότι σε μήκος κύματος 260nm τιμή OD ίση με 1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50μg/ml δίκλωνου DNA. Βάσει αυτού του δεδομένου μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση του DNA μετά τη φωτομέτρηση ως εξής:

$$\text{Συγκέντρωση DNA (}\mu\text{g/ml)} = \text{αραιώση} \times 50 \times \text{τιμήOD}_{260}$$

Η μέθοδος αυτή είναι αρκετά ευαίσθητη και μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητες DNA μέχρι και 0,2μg DNA/ml διαλύματος.

2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction)

Ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός (in vitro) επιλεγμένων αλληλουχιών DNA (DNA-στόχου), από ελάχιστη αρχική ποσότητα δείγματος γίνεται με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction), η οποία ουσιαστικά, εκμεταλλεύεται δύο χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA:

1. ότι μονόκλωνο DNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο από την Taq DNA πολυμεράση για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου και για το λόγο αυτό καθίσταται απαραίτητη η αποδιάταξη του DNA και

2. ότι για να τη σύνθεση η Taq DNA πολυμεράση χρειάζεται ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA, πράγμα που σημαίνει ότι αν μετά το διαχωρισμό των δύο αλυσίδων ενός μορίου DNA χρησιμοποιηθεί ένας εκκινητής που υβριδίζεται σε ένα σημείο της μιας αλυσίδας, τότε θα αρχίσει η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας από το σημείο που υβριδίστηκε ο εκκινητής (primer).

Με επιλογή λοιπόν δύο εκκινητών που υβριδίζονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας-στόχου (όπου ο κάθε εκκινητής είναι συμπληρωματικός προς κάθε μια από τις δύο αλυσίδες DNA και οι δύο μαζί καθορίζουν τα άκρα του επιθυμητού προϊόντος) μπορούμε να ενισχύσουμε οποιοδήποτε τμήμα δίκλωνου DNA. Η τεχνική της PCR αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους, όπου ο κάθε κύκλος περιλαμβάνει

τρία στάδια. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται εξολοκλήρου *in vitro*, σε ένα σωληνάριο τύπου *ependorf* με τη χρήση θερμικού κυκλοποιητή.

Στάδια των κύκλων της PCR

Στάδιο 1: θερμική αποδιάταξη του DNA-εκμαγείου, όπου το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο (denaturation)

Στάδιο 2: σύνδεση εκκινητών, όπου οι δύο εκκινητές υβριδίζονται με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-στόχου (primer annealing)

Στάδιο 3: σύνθεση DNA, όπου παρουσία Taq DNA πολυμεράσης και dNTPs, οι συμπληρωματικές βάσεις προστίθενται στα 3' άκρα των εκκινητών με βάση την αλυσίδα DNA-εκμαγείο και οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες επεκτείνονται (extension). Η σύνθεση DNA γίνεται πάντοτε προς την κατεύθυνση 5' → 3'.

Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει μία επαναλαμβανόμενη εναλλαγή θερμοκρασιών (υψηλή, σχετικά χαμηλή και ενδιάμεση). Αναλυτικότερα, υψηλή θερμοκρασία για το διαχωρισμό των αλυσίδων του DNA, μια σχετικά χαμηλή θερμοκρασία για τον υβριδισμό των εκκινητών με συμπληρωματικές περιοχές του DNA-στόχου και μια ενδιάμεση θερμοκρασία για την επέκταση των εκκινητών.

3.Γονοτύπηση με τη μέθοδο κατά Taqman

Για τον προσδιορισμό πολυμορφισμών σε συγκεκριμένο τμήμα του DNA, χρησιμοποιείται η γονοτύπηση με τη μέθοδο κατά Taqman, η οποία στη ουσία είναι μια Real-Time PCR. Ένας Taqman ιχνηθέτης (ο οποίος είναι συμπληρωματικός με τον υπό έλεγχο πολυμορφισμό) περιέχει δύο χρωστικές. Η μία χρωστική είναι φθορίζουσα και η δεύτερη χρωστική απορροφά και εξουδετερώνει το σήμα που προέρχεται από την πρώτη όταν είναι σε εγγύτητα. Αν τώρα, ο υπό εξέταση πολυμορφισμός υπάρχει, ο ιχνηθέτης θα υβριδισθεί στο αντίστοιχο τμήμα του DNA αλλά κατά τη διάρκεια της επέκτασης (extension) του PCR προϊόντος ο ιχνηθέτης θα υδρολυθεί από την Taq πολυμεράση. Συνέπεια αυτού είναι η αποκοπή του άκρου του, και κατ' επέκταση η διακοπή της αλληλεξουδετέρωσης του σήματος, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Αν ο υπό εξέταση πολυμορφισμός δεν υπάρχει, ο ιχνηθέτης θα παραμείνει ανέπαφος και έτσι δεν θα παρατηρηθεί φθορισμός. Με αυτό τον τρόπο και ανάλογα με την ένταση φθορισμού καθίσταται φανερός ο γονότυπος στο συγκεκριμένο σημείο. Η γονοτύπωση με τη μέθοδο κατά Taqman πραγματοποιήθηκε σε ABI PRISM® 7900 Sequence Detection System και η ανάλυση έγινε με το SDS λογισμικό (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Στατιστική ανάλυση

Για να μπορέσουμε να ελέγξουμε την υπόθεση συσχέτισης των πολυμορφισμών και κλινικού φαινότυπου της ΠΣ μετρήθηκαν οι συχνότητες των αλληλίων και των γονοτύπων για κάθε άτομο ξεχωριστά. Μεταξύ των ασθενών με Καλοήγη μορφή (MSSS=1-2) και Μη καλοήγη (MSSS=3-10) έγινε σταθεροποίηση για τις παρακάτω μεταβλητές-παράγοντες: φύλο, ηλικία έναρξης, χρονικό διάστημα από την 1η υποτροπή μέχρι τη 2η, αριθμός υποτροπών, καθώς και πόσες φορές έλαβαν θεραπεία. Οι τιμές D' και r^2 της ανισορροπίας σύνδεσης μεταξύ των SNPs υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>) [96]. Οι τιμές αυτές φαίνονται στις εικόνες 1 και 2. Οι λόγοι αναλογιών [Odds Ratios (ORs)] και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης [Confidence Intervals (CIs)] για τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς υπολογίστηκαν υποθέτοντας το συνεπικρατικό (γονοτυπικό) μοντέλο κληρονόμησης ([AA] vs [Ab] vs [bb]) με δύο βαθμούς ελευθερίας, το οποίο καλύπτει τα υπόλοιπα μοντέλα, χωρίς τη ανάγκη για περαιτέρω διόρθωση για πολλαπλές συγκρίσεις υποθέτοντας πολλαπλά μοντέλα κληρονόμησης [97]. Η ανωτέρω λογιστική παλινδρόμηση πραγματοποιήθηκε με το SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats/>) [98].

Στατιστικά σημαντικό θεωρήθηκε το $P < 0.05$. Εφαρμόστηκε η διόρθωση κατά Bonferroni λόγω της διενέργειας πολλαπλών συσχετίσεων με δείκτη σημαντικότητας $P < 0.05/31 < 0.0016$ λόγω του ότι μελετήσαμε 31 SNPs. Έτσι, στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν μόνο οι τιμές p που ήταν μικρότερες από 0.0016. Τέλος, η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συνολικά συμμετείχαν 389 ασθενείς, εκ των οποίων 251 (64.5%) ήταν γυναίκες και 138 (35.5%) ήταν άνδρες, όπως φαίνεται και στον πίνακα 5. Ο λόγος γυναικών:ανδρών βρέθηκε 1.8:1. Μέση ηλικία έναρξης της νόσου ήταν τα 30.42 έτη, ενώ η μέση τιμή για τη διάρκεια νόσου έως και τη στιγμή της δειγματοληψίας ήταν τα 12.9 έτη. Από τους ασθενείς τροποποιητική θεραπεία έλαβαν οι 271 (69.7) και αυτή περιελάμβανε ιντερφερόνη-β, οξική γλατιραμέρη και ναταλιζουμάμπη. Την καλοήγη μορφή της νόσου, όπως αυτή κατατάχθηκε μέσω MSSS=(1-2), εμφάνιζαν οι

109 (28.0%). Στον πίνακα 7 φαίνονται οι συχνότητες των αλληλίων και των γονοτύπων.

Πίνακας 7: Συχνότητες αλληλίων και γονοτύπων των tag-SNPs της ITGA4

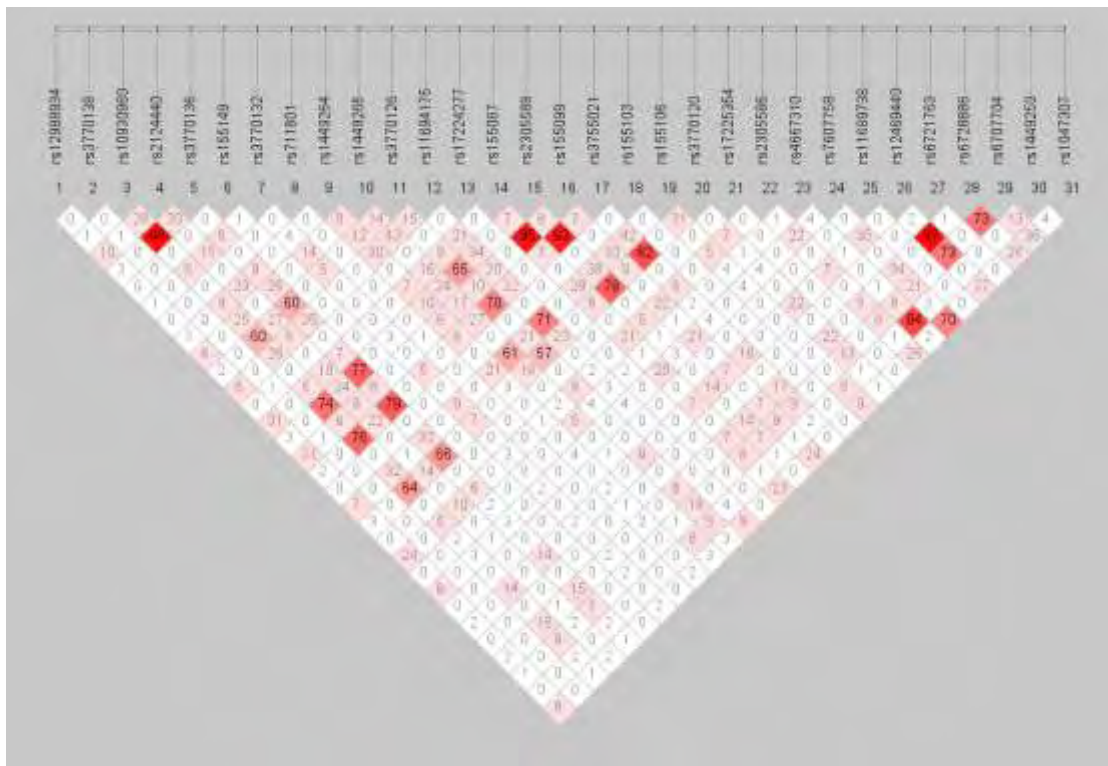
SNPs	Γονότυποι / Αλληλία	Σύνολο	Καλοήθης ΠΣ	Μη καλοήθης
		περιπτώσεων ΠΣ	(MSSS=1-2)	ΠΣ (MSSS=3-10)
		Αριθμός (%)	Αριθμός (%)	Αριθμός(%)
rs12988934				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	3 (0.01)	2 (0.01)	1 (0.01)
	G/A	56 (0.15)	29 (0.12)	22 (0.2)
	G/G	320 (0.84)	217 (0.88)	85 (0.79)
<i>Αλληλία</i>	G	696 (0.92)	463 (0.93)	192 (0.89)
	A	62 (0.08)	33 (0.94)	24 (0.11)
rs3770138				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	14 (0.04)	11(0.04)	3 (0.03)
	G/A	146 (0.39)	97 (0.39)	41 (0.38)
	G/G	216 (0.57)	139 (0.56)	63 (0.59)
<i>Αλληλία</i>	G	578 (0.77)	375 (0.76)	167 (0.78)
	A	174 (0.23)	119 (0.24)	47 (0.22)
rs10930969				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	22 (0.06)	20 (0.08)	2 (0.02)
	G/A	150 (0.39)	103 (0.41)	42 (0.39)
	G/G	208 (0.55)	126 (0.51)	64 (0.59)
<i>Αλληλία</i>	G	566 (0.74)	355 (0.71)	170 (0.79)
	A	194 (0.26)	143 (0.29)	46 (0.21)
rs2124440				
<i>Γονότυπος</i>	C/C	105 (0.28)	79 (0.32)	20 (0.19)
	C/T	188 (0.5)	122 (0.5)	56 (0.52)
	T/T	81 (0.22)	43 (0.18)	31 (0.29)
<i>Αλληλία</i>	C	398 (0.53)	280 (0.57)	96 (0.45)
	T	350 (0.47)	208 (0.43)	118 (0.55)
rs3770136				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	20 (0.05)	18 (0.07)	2 (0.02)
	G/A	148 (0.39)	103 (0.42)	40 (0.37)
	G/G	211 (0.56)	127 (0.51)	66 (0.61)
<i>Αλληλία</i>	G	570 (0.75)	357 (0.72)	172 (0.8)
	A	188 (0.25)	139 (0.28)	44 (0.2)
rs155149				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	17 (0.04)	13 (0.05)	2 (0.02)
	C/A	232 (0.61)	142 (0.57)	73 (0.7)
	C/C	129 (0.34)	95 (0.38)	30 (0.29)
<i>Αλληλία</i>	C	490 (0.65)	332 (0.66)	133 (0.63)
	A	266 (0.35)	168 (0.34)	77 (0.37)
rs3770132				
<i>Γονότυπος</i>	C/C	10 (0.03)	7 (0.03)	1 (0.01)
	T/C	99 (0.26)	70 (0.28)	24 (0.22)
	T/T	270 (0.71)	171 (0.69)	83 (0.77)
<i>Αλληλία</i>	T	639 (0.84)	412 (0.83)	190 (0.88)
	C	119 (0.16)	84 (0.17)	26 (0.12)
rs711801				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	134 (0.36)	90 (0.37)	33 (0.31)
	A/G	115 (0.31)	69 (0.28)	42 (0.39)
	G/G	126 (0.34)	86 (0.35)	33 (0.31)
<i>Αλληλία</i>	A	383 (0.51)	249 (0.51)	108 (0.5)
	G	367 (0.49)	241 (0.49)	108 (0.5)
rs1449264				
<i>Γονότυπος</i>	C/C	39 (0.11)	26 (0.11)	11 (0.11)
	T/C	167 (0.48)	91 (0.4)	65 (0.64)
	T/T	145 (0.41)	111 (0.49)	26 (0.25)
<i>Αλληλία</i>	T	457 (0.65)	313 (0.69)	117 (0.57)
	C	245 (0.35)	143 (0.31)	87 (0.43)
rs1449265				

<i>Γονότυπος</i>	G/G	106 (0.28)	75 (0.3)	29 (0.27)
	G/T	185 (0.49)	116 (0.47)	56 (0.52)
	T/T	87 (0.23)	56 (0.23)	23 (0.21)
<i>Αλληλίο</i>	G	397 (0.53)	266 (0.54)	114 (0.53)
	T	359 (0.47)	228 (0.46)	102 (0.47)
rs3770126				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	178 (0.47)	107 (0.43)	55 (0.51)
	A/G	176 (0.47)	119 (0.48)	50 (0.46)
	G/G	23 (0.06)	20 (0.08)	3 (0.03)
<i>Αλληλίο</i>	A	532 (0.71)	333 (0.68)	160 (0.74)
	G	222 (0.29)	159 (0.32)	56 (0.26)
rs11694175				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	82 (0.22)	58 (0.23)	21 (0.19)
	G/A	203 (0.54)	127 (0.51)	64 (0.59)
	G/G	94 (0.25)	64 (0.59)	23 (0.21)
<i>Αλληλίο</i>	G	391 (0.52)	253 (0.51)	110 (0.51)
	A	367 (0.48)	243 (0.49)	106 (0.49)
rs17224277				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	1 (0)	1 (0)	0 (0)
	G/A	44 (0.12)	29 (0.12)	10 (0.1)
	G/G	333 (0.88)	222 (0.88)	95 (0.9)
<i>Αλληλίο</i>	G	710 (0.94)	473 (0.94)	200 (0.95)
	A	46 (0.06)	31 (0.06)	10 (0.05)
rs155087				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	9 (0.02)	4 (0.02)	4 (0.04)
	G/A	126 (0.33)	75 (0.3)	42 (0.39)
	G/G	245 (0.64)	170 (0.68)	62 (0.57)
<i>Αλληλίο</i>	G	616 (0.81)	415 (0.83)	166 (0.77)
	A	144 (0.19)	83 (0.17)	50 (0.23)
rs2305588				
<i>Γονότυπος</i>	C/C	21 (0.06)	18 (0.07)	3 (0.03)
	T/C	145 (0.38)	99 (0.4)	42 (0.39)
	T/T	213 (0.56)	131 (0.53)	63 (0.58)
<i>Αλληλίο</i>	T	571 (0.75)	361 (0.73)	168 (0.78)
	C	187 (0.25)	135 (0.27)	48 (0.22)
rs155099				
<i>Γονότυπος</i>	C/C	238 (0.64)	165 (0.68)	60 (0.57)
	C/G	123 (0.33)	74 (0.3)	41 (0.39)
	G/G	11 (0.03)	5 (0.02)	5 (0.05)
<i>Αλληλίο</i>	C	599 (0.81)	404 (0.83)	161 (0.76)
	G	145 (0.19)	84 (0.17)	51 (0.24)
rs3755021				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	17 (0.04)	15 (0.06)	2 (0.02)
	G/A	142 (0.37)	99 (0.4)	41 (0.38)
	G/G	220 (0.58)	134 (0.54)	65 (0.6)
<i>Αλληλίο</i>	G	582 (0.77)	367 (0.74)	171 (0.79)
	A	176 (0.23)	129 (0.26)	45 (0.21)
rs155103				
<i>Γονότυπος</i>	C/C	245 (0.66)	162 (0.67)	71 (0.68)
	C/T	109 (0.3)	74 (0.3)	26 (0.25)
	T/T	15 (0.04)	7 (0.03)	7 (0.07)
<i>Αλληλίο</i>	C	599 (0.81)	398 (0.82)	168 (0.81)
	T	139 (0.19)	88 (0.18)	40 (0.19)
rs155106				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	119 (0.32)	78 (0.32)	30 (0.28)
	A/C	195 (0.52)	123 (0.5)	61 (0.56)
	C/C	63 (0.17)	45 (0.18)	17 (0.16)
<i>Αλληλίο</i>	A	433 (0.57)	279 (0.57)	121 (0.56)
	C	321 (0.43)	213 (0.43)	95 (0.44)
rs3770120				
<i>Γονότυπος</i>	C/C	21 (0.06)	17 (0.07)	4 (0.04)
	T/C	153 (0.42)	103 (0.43)	45 (0.45)
	T/T	187 (0.52)	118 (0.5)	52 (0.51)
<i>Αλληλίο</i>	T	527 (0.73)	339 (0.71)	149 (0.74)
	C	195 (0.27)	137 (0.29)	53 (0.26)
rs17225354				
<i>Γονότυπος</i>	C/C	38 (0.1)	22 (0.09)	13 (0.12)
	T/C	209 (0.56)	139 (0.57)	57 (0.53)

<i>Αλλήλιο</i>	T/T	127 (0.34)	82 (0.34)	38 (0.35)
	T	463 (0.62)	303 (0.62)	133 (0.62)
	C	285 (0.38)	183 (0.38)	83 (0.38)
rs2305586				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	259 (0.68)	179 (0.72)	68 (0.63)
	A/G	113 (0.3)	66 (0.27)	36 (0.33)
	G/G	8 (0.02)	4 (0.02)	4 (0.04)
<i>Αλλήλιο</i>	A	631 (0.83)	424 (0.85)	172 (0.8)
	G	129 (0.17)	74 (0.15)	44 (0.2)
rs4667310				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	2 (0.01)	2 (0.01)	0 (0)
	T/A	43 (0.12)	29 (0.12)	11 (0.1)
	T/T	319 (0.88)	206 (0.87)	95 (0.9)
<i>Αλλήλιο</i>	A	681 (0.94)	441 (0.93)	201 (0.95)
	T	47 (0.06)	33 (0.07)	11 (0.05)
rs7607758				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	75 (0.2)	41 (0.17)	27 (0.25)
	C/A	197 (0.52)	127 (0.51)	58 (0.54)
	C/C	106 (0.28)	79 (0.32)	23 (0.21)
<i>Αλλήλιο</i>	A	409 (0.54)	285 (0.58)	104 (0.48)
	C	347 (0.46)	209 (0.42)	112 (0.52)
rs11689738				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	74 (0.2)	46 (0.19)	23 (0.22)
	G/A	166 (0.44)	110 (0.45)	44 (0.42)
	G/G	136 (0.36)	91 (0.37)	39 (0.37)
<i>Αλλήλιο</i>	A	438 (0.58)	292 (0.59)	122 (0.58)
	G	314 (0.42)	202 (0.41)	90 (0.42)
rs12469449				
<i>Γονότυπος</i>	C/C	38 (0.1)	30 (0.12)	7 (0.06)
	T/C	147 (0.39)	94 (0.38)	47 (0.44)
	T/T	195 (0.51)	125 (0.5)	54 (0.5)
<i>Αλλήλιο</i>	C	537 (0.71)	344 (0.69)	155 (0.72)
	T	223 (0.29)	154 (0.31)	61 (0.28)
rs6721763				
<i>Γονότυπος</i>	C/C	121 (0.33)	73 (0.3)	41 (0.39)
	C/T	191 (0.51)	126 (0.52)	54 (0.51)
	T/T	59 (0.16)	43 (0.18)	11 (0.1)
<i>Αλλήλιο</i>	C	433 (0.58)	272 (0.56)	136 (0.64)
	T	309 (0.42)	212 (0.44)	76 (0.36)
rs6728886				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	193 (0.51)	123 (0.5)	54 (0.5)
	A/G	147 (0.39)	95 (0.38)	46 (0.43)
	G/G	39 (0.1)	30 (0.12)	8 (0.07)
<i>Αλλήλιο</i>	A	533 (0.7)	341 (0.69)	154 (0.71)
	G	225 (0.3)	155 (0.31)	62 (0.29)
rs6707704				
<i>Γονότυπος</i>	C/C	156 (0.41)	100 (0.41)	44 (0.41)
	C/T	169 (0.45)	105 (0.43)	54 (0.5)
	T/T	51 (0.14)	40 (0.16)	10 (0.09)
<i>Αλλήλιο</i>	C	481 (0.64)	305 (0.62)	142 (0.66)
	T	271 (0.36)	185 (0.38)	74 (0.34)
rs1449259				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	326(0.86)	213 (0.86)	94 (0.88)
	A/G	49 (0.13)	32 (0.13)	13 (0.12)
	G/G	2 (0.01)	2 (0.01)	0 (0)
<i>Αλλήλιο</i>	A	701 (0.93)	458 (0.93)	201 (0.94)
	G	53 (0.07)	36 (0.07)	13 (0.06)
rs1047307				
<i>Γονότυπος</i>	A/A	55 (0.14)	34 (0.14)	19 (0.18)
	G/A	187 (0.49)	112 (0.45)	58 (0.54)
	G/G	138 (0.36)	103 (0.41)	31 (0.29)
<i>Αλλήλιο</i>	G	463 (0.61)	318 (0.64)	120 (0.56)
	A	297 (0.39)	180 (0.36)	96 (0.44)



Εικόνα 1. Απεικόνιση της κατανομής της ανισορροπίας σύνδεσης D' στο δείγμα μας για τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς του γονιδίου ITGA4.



Εικόνα 2. Απεικόνιση της κατανομής της ανισορροπίας σύνδεσης r^2 στο δείγμα μας για τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς του γονιδίου ITGA4.

Συνολικά 9 πολυμορφισμοί βρέθηκαν να έχουν μια τάση για συσχέτιση με την καλοήγη κλινική πορεία και αυτοί είναι οι: rs10930969, rs2124440, rs3770136, rs1449264, rs3770126, rs155087, rs155099, rs7607758, rs1047307. Μεταξύ αυτών στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα προκύπτουν μόνο για τον rs1449264. Συγκεκριμένα η ετεροζυγωτία των αλληλίων του (T/C) παρουσιάζει αυξημένες πιθανότητες για καλοήγη νόσο με $P=0.0003$. Παρατηρώντας τον πίνακα 7, βλέπουμε πως τόσο το T όσο και το C αλληλίο παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης στην καλοήγη μορφή σε σχέση με την μη καλοήγη. Παρολαυτά το αλληλίο T είναι σε πολύ μεγαλύτερη συχνότητα από το C (69% και 31% αντίστοιχα).

Όσον αφορά τους SNPs με τάση για συσχέτιση προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα: Αυξημένες πιθανότητες για καλοήγη νόσο παρουσιάζουν οι γονότυποι G/A στον rs155087 [OR:1.73, 95% CI (1.02-2.95) $P=0.069$], C/G στον rs155099 [OR:1.75, 95% CI (1.02-3.00) $P=0.074$], A/A στον rs7607758 [OR:2.33, 95% CI (1.12-4.87) $P=0.051$] και G/A στον rs1047307 [OR:1.86, 95% CI (1.04-3.15) $P=0.076$]. Μειωμένες πιθανότητες για καλοήγη νόσο προέκυψαν για τους εξής γονότυπος: A/A στον rs10930969 [OR:0.17, 95% CI (0.04-0.79) $P=0.018$], T/T στον rs2124440 [OR:3.37, 95% CI (1.61-7.09) $P=0.0048$], A/A στον rs3770136 [OR:0.19, 95% CI (0.04-0.89) $P=0.022$] και G/G στον rs3770126 [OR:0.27, 95% CI (0.07-0.97) $P=0.053$]. Τα ORs με τα αντίστοιχα 95% C.I.s και τα p-values για κάθε πολυμορφισμό απεικονίζονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8: Ανάλυση συσχέτιση ανάλυσης για τους SNPs της ιντεγκρίνης α4 σε σχέση με την μορφή της πολλαπλής σκλήρυνσης (Καλοήθης έναντι μη καλοήθους), για το γονοτυπικό μοντέλο.

SNPs	Γονότυποι	Καλοήθης MS (MSSS=1-2) vs Μη καλοήθης MS (MSSS=3-10)	
		OR (95%CI)	P
rs12988934	G/G	1.00	0.43
	G/A	1.55 (0.78-3.08)	
	A/A	1.68 (0.13-22.30)	
rs3770138	G/G	1.00	0.69
	A/G	0.82 (0.49-1.37)	
	A/A	0.70 (0.18-2.76)	
rs10930969	G/G	1.00	0.018
	G/A	0.70 (0.42-1.17)	

rs2124440	A/A	0.17 (0.04-0.79)	
	C/C	1.00	0.0048
	C/T	1.79 (0.95-3.36)	
	T/T	3.37 (1.61-7.09)	
rs3770136	G/G	1.00	0.022
	G/A	0.65 (0.39-1.09)	
	A/A	0.19 (0.04-0.89)	
rs155149	C/C	1.00	0.071
	A/C	1.74 (1.00-3.04)	
	A/A	0.60 (0.12-3.07)	
rs3770132	T/T	1.00	0.45
	T/C	0.81 (0.45-1.44)	
	C/C	0.31 (0.03-3.13)	
rs711801	A/A	1.00	0.33
	A/G	1.44 (0.78-2.67)	
	G/G	0.93 (0.50-1.74)	
rs1449264	T/T	1.00	0.0003
	T/C	3.17 (1.77-5.68)	
	C/C	1.88 (0.77-4.58)	
rs1449265	T/T	1.00	0.62
	G/T	1.33 (0.74-2.37)	
	T/T	1.11 (0.55-2.26)	
rs3770126	A/A	1.00	0.053
	A/G	0.68 (0.41-1.14)	
	G/G	0.27 (0.07-0.97)	
rs11694175	G/G	1.00	0.52
	A/G	1.35 (0.73-2.48)	
	A/A	1.02 (0.49-2.14)	
rs17224277	G/G	1.00	0.65
	A/G	0.72 (0.32-1.65)	
	A/A	0.00 (0.00-NA)	
rs155087	G/G	1.00	0.069
	G/A	1.73 (1.02-2.95)	
	A/A	2.89 (0.63-13.19)	
rs2305588	T/T	1.00	0.21
	T/C	0.81 (0.49-1.37)	
	C/C	0.35 (0.10-1.29)	
rs155099	C/C	1.00	0.074
	C/G	1.75 (1.02-3.00)	
	G/G	2.50 (0.64-9.81)	
rs3755021	G/G	1.00	0.15
	G/A	0.79 (0.47-1.32)	
	A/A	0.27 (0.06-1.28)	

rs155103	C/C	1.00	0.57
	C/T	0.79 (0.45-1.39)	
	T/T	1.43 (0.41-5.03)	
rs155106	A/A	1.00	0.35
	A/C	1.41 (0.80-2.49)	
	C/C	0.94 (0.44-2.00)	
rs3770120	T/T	1.00	0.51
	T/C	0.97 (0.58-1.65)	
	C/C	0.51 (0.16-1.68)	
rs17225354	T/T	1.00	0.25
	C/T	0.70 (0.41-1.20)	
	C/C	1.22 (0.52-2.85)	
rs2305586	A/A	1.00	0.24
	A/G	1.36 (0.79-2.33)	
	G/G	3.36 (0.63-17.95)	
rs4667310	T/T	1.00	0.37
	T/A	0.73 (0.33-1.61)	
	A/A	0.00 (0.00-NA)	
rs7607758	C/C	1.00	0.051
	C/A	1.81 (0.99-3.30)	
	A/A	2.33 (1.12-4.87)	
rs11689738	G/G	1.00	0.86
	A/G	1.08 (0.62-1.89)	
	A/A	1.21 (0.61-2.40)	
rs12469449	T/T	1.00	0.12
	T/C	1.09 (0.65-1.84)	
	C/C	0.43 (0.17-1.09)	
rs6721763	C/C	1.00	0.26
	T/C	0.89 (0.51-1.53)	
	T/T	0.51 (0.22-1.18)	
rs6728886	A/A	1.00	0.25
	A/G	1.04 (0.62-1.75)	
	G/G	0.50 (0.20-1.24)	
rs6707704	C/C	1.00	0.086
	C/T	1.07 (0.63-1.83)	
	T/T	0.45 (0.20-1.04)	
rs1449259	A/A	1.00	0.51
	A/G	0.95 (0.45-2.03)	
	G/G	0.00 (0.00-NA)	
rs1047307	G/G	1.00	0.076
	G/A	1.81 (1.04-3.15)	
	A/A	1.86 (0.87-3.96)	

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Λαμβάνοντας δείγματα αίματος από 389 ασθενείς συνολικά μεταξύ των οποίων 109 εμφάνιζαν την καλοήγη μορφή της νόσου, αναζητήσαμε την πιθανή συσχέτιση της καλοήθους πορείας με την παρουσία γενετικών παραλλαγών του γονιδίου της ιντεγκρίνης ITGA4. Μελετήθηκαν 36 πολυμορφισμοί συνολικά (rs12988934, rs3770138, rs10930969, rs2124440, rs3770136, rs155149, rs3770132, rs1449260a, rs711801, rs1449264, rs1449265, rs3770126, rs11694175, rs17224277, rs155087, rs2305588, rs155099, rs3755021, rs155103, rs155106, rs3770120, rs155110a, rs17225354, rs2305586, rs4667310, rs7607758, rs11689738, rs10204136a, rs12469449, rs16867437a, rs6721763, rs6728886, rs6707704, rs1449259, rs7562325a, rs1047307), εκ των οποίων 5 δεν κατάφεραν να γονουπηθούν. Από τους εναπομείναντες 31 μόνο ένας αποκάλυψε στατιστικά σημαντική σχέση και 8 μια τάση για συσχέτιση.

Συγκεκριμένα ο γονότυπος T/C για τον rs1449264 που βρίσκεται στο ιντρόνιο 2-3 στη θέση 182044719, εμφάνισε κατά 3.17 φορές (95% CI 1.77-5.68 P=0.0003) αυξημένες πιθανότητες για συσχέτιση με μια καλοήγη πορεία σε σχέση με τον T/T γονότυπο. Εστιάζοντας στη συγκεκριμένη παραλλαγή, παρατηρήσαμε ακόμα αυξημένη φορεία του αλληλίου T σε βαθμό που να υπερβαίνει τη διπλάσια σχέση ως προς το C στους ασθενείς με καλοήγη νόσο. Πιο συγκεκριμένα αυτό εντοπίστηκε σε 313(0.69) ασθενείς, ενώ το C σε 143(0.31). Οι πολυμορφισμοί που ανέδειξαν τάση για συσχέτιση ήταν:

- 1)rs10930969:0,17 φορές λιγότερες πιθανότητες (95% CI 0.04-0.79 P=0.018)
- 2)rs2124440: 3.37 φορές περισσότερες πιθανότητες (95% CI 1.61-7.09 P=0.0048)
- 3)rs3770136: 0.19 φορές λιγότερες πιθανότητες (95% CI 0.04-0.89 P=0.022)
- 4)rs3770126: 0.27 φορές λιγότερες πιθανότητες (95% CI 0.07-0.97 P=0.053)
- 5)rs155087: 1.73 φορές περισσότερες πιθανότητες (95% CI 1.02-2.95 P=0.069)
- 6)rs155099: 1.75 φορές περισσότερες πιθανότητες (95% CI 1.02-3.00 P=0.074)
- 7)rs7607758: 2.33 φορές περισσότερες πιθανότητες (95% CI 1.12-4.87 P=0.051)
- 8)rs1047307:1.86 φορές περισσότερες πιθανότητες (95% CI 1.04-3.15 P=0.076)

Η πολυπαραγοντικότητα της Πολλαπλής Σκλήρυνσης καθιστά εξαρχής εξαιρετικά δύσκολο τον καθορισμό γενετικών παραλλαγών που θα επηρεάζουν την πορεία της εμφάνισής της. Παρά τη σημαντική πρόοδο στον εντοπισμό των γενετικών παραλλαγών που ενοχοποιούνται για ΠΣ [99] υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία σε γενετικούς παράγοντες που μπορεί να συμβάλλουν στην σοβαρότητα της ασθένειας.

Γενετικές μελέτες συσχέτισης έχουν επικεντρωθεί σε υποψήφια γονίδια όπως είναι τα APOE, γονίδια που σχετίζονται με τη λειτουργία του ανοσοποιητικού, αυτοανοσία, νευροβιολογία, δομή μυελίνης και το αντιγόνο ανθρώπινων λευκοκυττάρων (HLA), αλλά τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα [100,101]. Επιπλέον, τρεις GWASs σχετικά με τη σοβαρότητα της ΠΣ απέτυχαν γενικά να αναδείξουν κάποια γενετική περιοχή με ισχυρή στατιστικά σημαντικότητα [23,102,103]. Το μόνο σχετικά σταθερό εύρημα μεταξύ των μελετών ήταν η επίδραση του HLA επί έναρξης της νόσου [104,105]. Φορείς του DRB1 * 15: 01 αλληλόμορφου έχουν πρωιμότερη έναρξη ΠΣ, με κάθε αντίγραφο να αντιστοιχεί σε μείωση της ηλικίας έναρξης της νόσου κατά περίπου 10.6 μήνες [106].

Η παρούσα μελέτη ανίχνευσε μία ισχυρά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του rs1449264 ITGA4 γονιδίου και της καλοήθους μορφή ασθένειας, όπως μετράται με την κλίμακα MSSS. Το ITGA4 γονίδιο κωδικοποιεί την α4 υπομονάδα της ιντεγκρίνης α4β1, η οποία εμπλέκεται στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων και τη μετανάστευση μέσω του αίματο-εγκεφαλικού φραγμού [95]. Το μονοκλωνικό αντίσωμα natalizumab, η οποία έχει εγκριθεί για τη θεραπεία της υποτροπιάζουσας διαλείπουσας πολλαπλής σκλήρυνσης, ασκεί ευνοϊκές επιδράσεις στις υποτροπές και την εξέλιξη της αναπηρίας, στοχεύοντας την α4 ιντεγκρίνη [84]. Οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο ITGA4 έχουν συνδεθεί με την ΠΣ [107-109]. Ειδικότερα, ο rs1143676, ένας μη συνώνυμος πολυμορφισμός (R878Q) που βρίσκεται στο εξόνιο 24 του γονιδίου ITGA4 βρέθηκε να σχετίζεται με την ευαισθησία της νόσου σε Σλοβάκους [108], αλλά όχι σε άλλους πληθυσμούς [26, 27]. Ένας δεύτερος πολυμορφισμός ITGA4 που συνδέεται μέχρι τώρα με την ΠΣ σε μια βασική ομάδα είναι ο ιντρονικός rs1449263 [109].

Η δυσκολία στον προσδιορισμό της γενετικών τροποποιητών της ΠΣ και της μορφής της μπορεί να οφείλεται είτε την πολυπλοκότητα ή την ποικιλομορφία των φλεγμονωδών και νευροεκφυλιστικών μηχανισμών που συμβάλλουν στην κλινική έκφραση ή ορισμένες εγγενείς αδυναμίες στη μέτρηση σχετικών κλινικών παραμέτρων. Επιπλέον, η έλευση του ανοσοδιαμορφωτικών θεραπειών έχει αποδειχθεί πως αλλάζει την πορεία της νόσου [110]. Πρόωρη έναρξη και έγκαιρη κλιμάκωση των φαρμάκων τροποποίησης της νόσου είναι γνωστό πως πρόλαμβάνει της συσσώρευσης της αναπηρίας.

Η μελέτη μας περιελάμβανε μια κλινικά καλά χαρακτηρισμένη και εθνικά ομοιογενή ομάδα. Η μορφή της νόσου σε κάθε άτομο εκτιμήθηκε με τη βοήθεια της

κλίμακας MSSS, ενός επικυρωμένου μέτρου. Επιπλέον, οι ασθενείς συμπεριλήφθηκαν μόνο με την προϋπόθεση να έχουν διάρκεια νόσου τουλάχιστον 5 έτη, καθώς είναι γνωστό ότι τα πρώτα 5 έτη της νόσου αντιπροσωπεύουν σημαντικό ορόσημο της ΠΣ [111]. Επίσης, μια σειρά από σημαντικά κλινικά προγνωστικούς παράγοντες που ενδέχεται να έχουν επιπτώσεις στη μακροπρόθεσμη πορεία συλλέχθηκαν και συμπεριλήφθηκαν ως συμπαράγοντες στην ανάλυση. Επιπλέον, η γενετική ποικιλότητα του δοκιμαζόμενου γονιδίου καλυπτόταν από ένα μεγάλο αριθμό SNPs καλύπτοντας όλο το γονίδιο της ITGA4.

Συμπερασματικά, η μελέτη μας παρέχει στοιχεία που εμπλέκουν τους πολυμορφισμούς του γονιδίου της ITGA4, υπεύθυνου για την προσκόλληση των λευκοκυττάρων και τη μετανάστευση μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού εντός του ΚΝΣ, της προαγωγής της φλεγμονής και κατ'επέκταση της σοβαρότητας της ΠΣ. Ένας τέτοιος βιοδείκτης, αν αναπαραχθεί και επικυρωθεί, μπορεί, στο μέλλον, να γίνει πολύτιμο προγνωστικό εργαλείο. Επιπλέον, οι θεραπείες που στοχεύουν την ITGA4 μπορεί να αξίζει να διερευνηθούν στο μέλλον.

ΠΗΓΕΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gately K. The historical maze of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 4(12):804.
2. Murray TJ. The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *Journal of the neurological sciences*. 2009;277 Suppl 1:S3-8.
3. Hafler DA. Multiple sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(6):788-94.
4. Goodin DS. The epidemiology of multiple sclerosis: insights to disease pathogenesis. *Handbook of clinical neurology*. 2014;122:231-66.
5. Bergamaschi R. Prognostic factors in multiple sclerosis. *International review of neurobiology*. 2007;79:423-47.
6. Leray E, Moreau T, Fromont A, Edan G. Epidemiology of multiple sclerosis. *Revue neurologique*. 2016;172(1):3-13.
7. Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, et al. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *The Lancet Neurology*. 2006;5(11):932-6.
8. Evans C, Beland SG, Kulaga S, Wolfson C, Kingwell E, Marriott J, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the Americas: a systematic review. *Neuroepidemiology*. 2013;40(3):195-210.
9. Kingwell E, Marriott JJ, Jette N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC neurology*. 2013;13:128.
10. Papathanasopoulos P, Gourzoulidou E, Messinis L, Georgiou V, Leotsinidis M. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in western Greece: a 23-year survey. *Neuroepidemiology*. 2008;30(3):167-73.
11. Vassilopoulos D. Epidemiological Data for Multiple Sclerosis in Greece. *Neuroepidemiology*. 1984;3(1):52-6.
12. Dean G. Annual incidence, prevalence, and mortality of multiple sclerosis in white South-African-born and in white immigrants to South Africa. *British Medical Journal*. 1967;2(5554):724-30.
13. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*. 2002;359(9313):1221-31.
14. Rodríguez Cruz P, Matthews L, Boggild M, et al. Time- and region-specific season of birth effects in multiple sclerosis in the united kingdom. *JAMA Neurology*. 2016;73(8):954-60.
15. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC, The Canadian Collaborative Study Group Wellcome Trust Centre for Human Genetics UoORDOOXBNUK, et al. 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.
16. Kurtzke JF. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 1993;6(4):382-427.
17. 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.
18. 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.

19. Sadovnick AD, Baird PA. The familial nature of multiple sclerosis: age-corrected empiric recurrence risks for children and siblings of patients. *Neurology*. 1988;38(6):990-1.
20. Dyment 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.
21. Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *Journal of autoimmunity*. 2015;64:13-25.
22. Lincoln MR, Montpetit A, Cader MZ, Saarela J, Dyment DA, Tiislar M, et al. A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nature genetics*. 2005;37(10):1108-12.
23. 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.
24. 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.
25. Lundmark F, Duvefelt K, Iacobaeus E, Kockum I, Wallstrom E, Khademi M, et al. Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nature genetics*. 2007;39(9):1108-13.
26. Nischwitz S, Muller-Myhsok B, Weber F. Risk conferring genes in multiple sclerosis. *FEBS letters*. 2011;585(23):3789-97.
27. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Annals of neurology*. 2007;61(4):288-99.
28. Farrell PJ. Role for HLA in susceptibility to infectious mononucleosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(10):2756-8.
29. Nielsen T, Rostgaard K, Nielsen N, et al. Multiple sclerosis after infectious mononucleosis. *Archives of Neurology*. 2007;64(1):72-5.
30. Kaufman M, Gaydos CA, Sriram S, Boman J, Tondella ML, Norton HJ. Is *Chlamydia pneumoniae* found in spinal fluid samples from multiple sclerosis patients? Conflicting results. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2002;8(4):289-94.
31. Krone B, Pohl D, Rostasy K, Kahler E, Brunner E, Oeffner F, et al. Common infectious agents in multiple sclerosis: a case-control study in children. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2008;14(1):136-9.
32. Moses H, Jr., Sriram S. An infectious basis for multiple sclerosis: perspectives on the role of *Chlamydia pneumoniae* and other agents. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2001;15(3):199-206.
33. Kimlin MG. Geographic location and vitamin D synthesis. *Molecular aspects of medicine*. 2008;29(6):453-61.
34. Koch-Henriksen N. Multiple sclerosis in Scandinavia and Finland. *Acta neurologica Scandinavica Supplementum*. 1995;161:55-9.
35. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin d levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 2006;296(23):2832-8.
36. Cantorna MT, Mahon BD. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)*. 2004;229(11):1136-42.
37. Wingerchuk DM. Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. 2012;5(1):13-22.

38. Zhang P, Wang R, Li Z, Wang Y, Gao C, Lv X, et al. The risk of smoking on multiple sclerosis: a meta-analysis based on 20,626 cases from case-control and cohort studies. *PeerJ*. 2016;4:e1797.
39. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British journal of pharmacology*. 2011;164(4):1079-106.
40. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(9):545-58.
41. Grigoriadis N, van Pesch V. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *European journal of neurology*. 2015;22 Suppl 2:3-13.
42. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical and experimental immunology*. 2010;162(1):1-11.
43. Severson C, Hafler DA. T-cells in multiple sclerosis. Results and problems in cell differentiation. 2010;51:75-98.
44. Avolio C, Ruggieri M, Giuliani F, Liuzzi GM, Leante R, Riccio P, et al. Serum MMP-2 and MMP-9 are elevated in different multiple sclerosis subtypes. *Journal of neuroimmunology*. 2003;136(1-2):46-53.
45. Kouwenhoven M, Ozenci V, Gomes A, Yarilin D, Giedraitis V, Press R, et al. Multiple sclerosis: elevated expression of matrix metalloproteinases in blood monocytes. *Journal of autoimmunity*. 2001;16(4):463-70.
46. Hartung HP, Aktas O, Menge T, Kieseier BC. Immune regulation of multiple sclerosis. *Handbook of clinical neurology*. 2014;122:3-14.
47. Houtchens MK, Richert JR, Sami A, Rose JW. Open label gabapentin treatment for pain in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 1997;3(4):250-3.
48. Lubetzki C, Stankoff B. Demyelination in multiple sclerosis. *Handbook of clinical neurology*. 2014;122:89-99.
49. Kutzelnigg A, Lassmann H. Pathology of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. *Handbook of clinical neurology*. 2014;122:15-58.
50. Lassmann H. Review: the architecture of inflammatory demyelinating lesions: implications for studies on pathogenesis. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2011;37(7):698-710.
51. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2007;17(2):210-8.
52. Wu GF, Alvarez E. The immuno-pathophysiology of multiple sclerosis. *Neurologic clinics*. 2011;29(2):257-78.
53. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain : a journal of neurology*. 1997;120 (Pt 3):393-9.
54. 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.
55. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-52.
56. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, et al. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology*. 2005;64(7):1144-51.
57. Pittock SJ, Rodriguez M. Benign multiple sclerosis: a distinct clinical entity with therapeutic implications. *Current topics in microbiology and immunology*. 2008;318:1-17.

58. Ramsaransing GS, De Keyser J. Benign course in multiple sclerosis: a review. *Acta neurologica Scandinavica*. 2006;113(6):359-69.
59. Lanska DJ. ADams and victor's principles of neurology. *JAMA*. 2010;303(13):1311-2.
60. Karussis D. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a critical review. *Journal of autoimmunity*. 2014;48-49:134-42.
61. Simon JH, Kleinschmidt-DeMasters BK. Variants of multiple sclerosis. *Neuroimaging clinics of North America*. 2008;18(4):703-16, xi.
62. Gelfand JM. Chapter 12 - Multiple sclerosis: diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. In: Douglas SG, editor. *Handbook of clinical neurology*. Volume 122: Elsevier; 2014. p. 269-90.
63. Leary S, Giovannoni G, Howard R, Miller D, Thompson A. *Multiple Sclerosis and Demyelinating Diseases*. *Neurology: Wiley-Blackwell*; 2009. p. 411-47.
64. Deangelis TM, Miller A. Chapter 14 - Diagnosis of multiple sclerosis. In: Douglas SG, editor. *Handbook of clinical neurology*. Volume 122: Elsevier; 2014. p. 317-42.
65. 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.
66. 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.
67. Aliaga ES, Barkhof F. Chapter 13 - MRI mimics of multiple sclerosis. In: Douglas SG, editor. *Handbook of clinical neurology*. Volume 122: Elsevier; 2014. p. 291-316.
68. O'Connor PW, Oh J. Chapter 22 - Disease-modifying agents in multiple sclerosis. In: Douglas SG, editor. *Handbook of clinical neurology*. Volume 122: Elsevier; 2014. p. 465-501.
69. de Sa JCC, Airas L, Bartholome E, Grigoriadis N, Mattle H, Oreja-Guevara C, et al. Symptomatic therapy in multiple sclerosis: a review for a multimodal approach in clinical practice. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. 2011;4(3):139-68.
70. Toosy A, Ciccarelli O, Thompson A. Chapter 24 - Symptomatic treatment and management of multiple sclerosis. In: Douglas SG, editor. *Handbook of clinical neurology*. Volume 122: Elsevier; 2014. p. 513-62.
71. Askari JA, Buckley PA, Mould AP, Humphries MJ. Linking integrin conformation to function. *Journal of cell science*. 2009;122(Pt 2):165-70.
72. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002;110(6):673-87.
73. Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual review of immunology*. 2007;25:619-47.
74. Uzman A. *Molecular biology of the cell* (4th ed.): Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2003;31(4):212-4.
75. Hood JD, Cheresh DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(2):91-100.
76. Rose DM, Han J, Ginsberg MH. $\alpha 4$ integrins and the immune response. *Immunological Reviews*. 2002;186(1):118-24.

77. Petri B, Phillipson M, Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2008;180(10):6439-46.
78. Carman CV. Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'. *Journal of cell science*. 2009;122(Pt 17):3025-35.
79. Lobb RR, Hemler ME. The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *Journal of Clinical Investigation*. 1994;94(5):1722-8.
80. Evans R, Patzak I, Svensson L, De Filippo K, Jones K, McDowall A, et al. Integrins in immunity. *Journal of cell science*. 2009;122(Pt 2):215-25.
81. Mitroulis I, Alexaki VI, Kourtzelis I, Ziogas A, Hajishengallis G, Chavakis T. Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacology & therapeutics*. 2015;147:123-35.
82. Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GPA, Libonati MA, et al. A Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(1):15-23.
83. 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. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(9):899-910.
84. Rudick RA, Sandrock A. Natalizumab: alpha 4-integrin antagonist selective adhesion molecule inhibitors for MS. *Expert Rev Neurother*. 2004;4(4):571-80.
85. Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, Subramanyam M, Goelz S, Natarajan A, et al. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *The New England journal of medicine*. 2012;366(20):1870-80.
86. Huggett B. How Tysabri survived. *Nature biotechnology*. 2009;27(11):986.
87. Foley J. Recommendations for the selection, treatment, and management of patients utilizing natalizumab therapy for multiple sclerosis. *The American journal of managed care*. 2010;16(6 Suppl):S178-83.
88. Kawamoto E, Nakahashi S, Okamoto T, Imai H, Shimaoka M. Anti-Integrin Therapy for Multiple Sclerosis. *Autoimmune Diseases*. 2012;2012:357101.
89. Rice GP, Hartung HP, Calabresi PA. Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. *Neurology*. 2005;64(8):1336-42.
90. Schwab N, Schneider-Hohendorf T, Wiendl H. Therapeutic uses of anti-alpha4-integrin (anti-VLA-4) antibodies in multiple sclerosis. *International immunology*. 2015;27(1):47-53.
91. Handunnetthi L, Ramagopalan SV, Ebers GC, Knight JC. Regulation of major histocompatibility complex class II gene expression, genetic variation and disease. *Genes and immunity*. 2010;11(2):99-112.
92. Patsopoulos NA, Barcellos LF, Hintzen RQ, Schaefer C, van Duijn CM, Noble JA, et al. Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS genetics*. 2013;9(11):e1003926.
93. Ramagopalan SV, Knight JC, Ebers GC. Multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. *Current opinion in neurology*. 2009;22(3):219-25.
94. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2015;14(4):406-19.
95. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(9):678-89.

96. Shi YY, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell research*. 2005;15(2):97-8.
97. Lettre G, Lange C, Hirschhorn JN. Genetic model testing and statistical power in population-based association studies of quantitative traits. *Genetic epidemiology*. 2007;31(4):358-62.
98. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2006;22(15):1928-9.
99. Sawcer S, Franklin RJ, Ban M. Multiple sclerosis genetics. *The Lancet Neurology*. 2014;13(7):700-9.
100. Ramagopalan SV, DeLuca GC, Degenhardt A, Ebers GC. The genetics of clinical outcome in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2011;201:183-99.
101. Ramagopalan SV, DeLuca GC, Morrison KM, Herrera BM, Dymment 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.
102. 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.
103. Genome-wide association study of severity in multiple sclerosis. *Genes and immunity*. 2011;12(8):615-25.
104. Hensiek AE, Sawcer SJ, Feakes R, Deans J, Mander A, Akesson E, et al. HLA-DR 15 is associated with female sex and younger age at diagnosis in multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2002;72(2):184-7.
105. Masterman T, Ligers A, Olsson T, Andersson M, Olerup O, Hillert J. HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2000;48(2):211-9.
106. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011;476(7359):214-9.
107. 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.
108. 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.
109. O'Doherty C, Roos IM, Antiguada A, Aransay AM, Hillert J, Vandenberg K. ITGA4 polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2007;189(1-2):151-7.
110. 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.
111. Kurtzke JF, Beebe GW, Nagler B, Kurland LT, Auth TL. Studies on the natural history of multiple sclerosis--8. Early prognostic features of the later course of the illness. *Journal of chronic diseases*. 1977;30(12):819-30.