



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΑΝΟΣΟΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ «ΑΝΔΡΕΑΣ ΣΥΓΓΡΟΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η αξιολόγηση της μεθοδολογίας και τεχνολογίας των εργαστηριακών παραμέτρων βιοϊατρικών μεθόδων στην διάγνωση των πομφολυγωδών νοσημάτων σε σύγχρονο κλινικό εργαστήριο

POST GRADUATE THESIS

Evaluation of the methodology and the technology of the laboratory parameters of biomedical methods in the diagnosis of bullous disorders in clinical laboratory

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Λυγερού Ευγενία / Lygerou Evgenia

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Φραγκίσκη Ανθούλη- Αναγνωστοπούλου/ Fragiski Anthouli-Anagnostopoulou

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2021



Faculty of Health and Caring Professions

Department of Biomedical Sciences

Postgraduate program: Biomedical methods and technology in
diagnosis



POST GRADUATE THESIS

Laboratory of Immunodermatology

Andreas Syggros hospital

Evaluation of the methodology and the technology of the laboratory parameters of biomedical methods in the diagnosis of bullous disorders in clinical laboratory

NAME OF STUDENT

Lygerou Evgenia (DML 18008)

Email: lygeroue@outlook.com.gr

FIRST SUPERVISOR

Fragiski Anthouli-Anagnostopoulou

SECOND SUPERVISOR

Thalassinos Nikolaos

THIRD SUPERVISOR

Kriebardis Anastasios

AIGALEO 2021

Δήλωση περί λογοκλοπής

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Ευγενία Λυγερού του Ιωάννη, με αριθμό μητρώου dml 18008 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι τις 5 Ιανουαρίου 2022 και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Η Δηλούσα

Ευγενία Λυγερού



Ευχαριστίες

Η διπλωματική αυτή η εργασία είναι το επιστέγασμα μιας δύσκολης, κουραστικής μα και συνάμα πολύ ικανοποιητικής περιόδου της ζωής μου. Το πόνημα αυτό καθώς και όλο το Μεταπτυχιακό ολοκληρώθηκαν μέσα από πολλές δυσκολίες (πανδημία, lockdown) αλλά και πρωτόγνωρες χαρές (εγκυμοσύνη, τοκετός) ίσως γι' αυτό και νιώθω ακόμα μεγαλύτερη χαρά και ικανοποίηση καθώς το ταξίδι ήταν πλούσιο από εμπειρίες και βιώματα.

Ύπρως απ' όλους θέλω να ευχαριστήσω την συνάδελφο και φίλη Αγγελική Οικονόμου που με τη δική της βοήθεια και καθοδήγηση όντας αρωγός γνώσης με πολυετή εμπειρία στον εργαστηριακό τομέα πραγματοποιήθηκε ερευνητικό κομμάτι της διπλωματικής μου εργασίας το θέμα της οποίας αποτελεί για αυτήν αντικείμενο εργασίας μέσα από την καθημερινή πράξη στο άνοσο δερματολογικό εργαστήριο του νοσοκομείου Ανδρέας Συγγρός.

Θέλω να ευχαριστήσω επίσης τον καθηγητή Δερματολογίας κύριο Ρηγόπουλο ο οποίος μου εμπιστεύτηκε το θέμα της εργασίας αυτής καθώς επίσης και την κυρία Δούβαλη Θεοδώρα ιατρό δερματολόγο, την κυρία Χρυσού Στέλλα Ευγενία ,βιοπαθολόγο ,συντονίστρια διευθύντρια εργαστηριακού τομέα στο νοσοκομείο Ανδρέας Συγγρός για την πολύτιμη βοήθεια τους και καθοδήγηση και την κυρία Βούρλάκου Χριστίνα ,παθολογοανατόμο, στο Γ.Ν.Α Ο Ευαγγελισμός.

Θερμές ευχαριστίες στην εισηγήτρια/επιβλέπουσα Δρ. Φραγκίσκη Ανθούλη Αναγνωστοπούλου, Ιατρό Παθολογοανατόμο, καθηγήτρια Ανατομικής του τμήματος Βιοϊατρικών επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής για την συνεχή της βοήθεια ,καθοδήγηση και υποστήριξη καθόλη την πορεία μου στο Μεταπτυχιακό και την βοήθεια της για την πραγματοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στον άνθρωπο της ζωής μου το σύζυγό μου Ευθύμη που χωρίς την στήριξη και την παρότρυνση του οποίου δεν θα είχα κάνει αυτό το μεταπτυχιακό. Με πίστεψε, με στήριξε και πάνω απ' όλα με άντεξε. Μου δίνει δύναμη κουράγιο, ελπίδα, χαρά, στήριξη κατανόηση, υπομονή και αγάπη όλη τη διάρκεια της κοινής μας πορείας.

Αφιερώνω την εργασία αυτή στην κόρη μου Δέσποινα που κοιμάται δίπλα μου τα βράδια και μου κρατούσε συντροφιά ενώ εκπονούσα την εργασία μου, είσαι το φως της ζωής μου...

Περίληψη

Εισαγωγή: Τα αυτοάνοσα πομφολυγώδη νοσήματα αποτελούν μια ευρεία ομάδα δερματικών νοσημάτων, στα οποία η πομφόλυγα θεωρείται η επικρατούσα στοιχειώδης βλάβη. Αποτελούν μία ομάδα νοσημάτων με μεγάλη ετερογένεια που ωστόσο έχουν πολλά αλληλοεπικαλυπτόμενα κλινικά χαρακτηριστικά, καθιστώντας συχνά τη διάγνωση βάσει της κλινικής εικόνας ανέφικτη. Για το λόγο αυτό, σήμερα η διάγνωση δε βασίζεται μόνο στην συνολική κλινική εικόνα και στα ιστοπαθολογικά δεδομένα αλλά και στα αποτελέσματα του άμεσου ανοσοφθορισμού.

Σκοπός: Η παρούσα εργασία στοχεύει στην αξιολόγηση της ευαισθησίας, της ειδικότητας, της αξιοπιστίας και της απόδοσης του άμεσου και έμμεσου ανοσοφθορισμού καθώς και της ανοσοενζυμικής μέθοδος (ELISA) στην διάγνωση των πομφολυγωδών δερματοπαθειών

Υλικό-Μέθοδοι: Για τον σκοπό αυτό θα αξιολογηθούν οι εργαστηριακές εξετάσεις ως προς την αξιοπιστία, ευαισθησία και ειδικότητά τους, που χρησιμοποιήθηκαν για την διάγνωση των πομφολυγωδών δερματοπαθειών στο Ανοσοδερματολογικό εργαστήριο του νοσοκομείου Ανδρέας Συγγρός σε 100 ασθενείς που εξετάστηκαν από 1-9-2019 έως 31-3-2020.

Αποτελέσματα: Η σύγκριση του έμμεσου ανοσοφθορισμού και της ELISA στους ασθενείς με κοινή πέμφιγα έδειξε ότι στο 82% των ασθενών υπήρχε ταύτιση ανάμεσα στα αποτελέσματα των δύο μεθοδολογιών, ενώ στην περίπτωση των ασθενών με BP η αντίστοιχη σύγκριση έδειξε ότι στο 93% των ασθενών υπήρχε ταύτιση ανάμεσα στα αποτελέσματα των δύο μεθοδολογιών. Επίσης στη BP η σύγκριση του άμεσου ανοσοφθορισμού με την ELISA 94% ταύτιση των αποτελεσμάτων, ενώ η ταύτιση μεταξύ άμεσου και έμμεσου ανοσοφθορισμού ήταν 89%

Συμπεράσματα: Συνολικά καμία τεχνική δεν αρκεί από μόνη της για την διάγνωση, ταξινόμηση και παρακολούθηση των πομφολυγωδών νοσημάτων.

Λέξεις Κλειδιά: Αυτοάνοσα πομφολυγώδη νοσήματα, Πέμφιγα, Πομφολυγώδες πεμφιγοειδές, Ανοσοφθορισμός, ELISA, Αυτό-αντισώματα

ABSTRACT

Introduction: Autoimmune blistering is an umbrella term which includes a broad group of skin diseases that are characterized by the development of blisters. Autoimmune blistering disorders are characterized by great heterogeneity, but still share several clinical features rendering thus disease diagnosis a challenging task. Thus, the current diagnostic approach includes not only the co-estimation of patient's medical state along with histopathological features but also the results of direct immunofluorescence.

Aim: The current study aimed to evaluate the analytical characteristics (i.e., sensitivity, specificity and efficiency) of direct and indirect immunofluorescence as well as of ELISA in blistering diseases' diagnosis.

Materials and Methods: For the purpose of this study, we evaluated the analytical characteristics of laboratory tests that performed for the diagnosis of autoimmune blistering diseases at 100 patients. The patients were subjected to these diagnostic tests the period from 01-09-2019 to 31-03-2020 at the Laboratory of Immunodermatology of Andreas Syngros Hospital of Venereal & Dermatological Diseases

Results: Regarding the patients suffering from pemphigus vulgaris, the comparison of indirect immunofluorescence with ELISA revealed a concordance of these methods at 82% of tested patients, while the corresponding result in BP patients was 93%. Moreover, in BP patients the comparison of direct immunofluorescence with ELISA as well as of direct and indirect immunofluorescence revealed a 94% and 89% concordance, respectively.

Conclusion: Overall no single method alone is sufficient for diagnosis, classification and monitoring of autoimmune blistering disorders.

Keywords: Autoimmune blistering, Pemphigus, Pemphigoid, Immunofluorescence, ELISA, Auto-antibodies

Περιεχόμενα

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1	ΤΟ ΔΕΡΜΑ	11
1.1.1	Ανατομία του δέρματος	12
1.1.2	Νεύρωση και Αγγείωση Δέρματος	19
1.1.3	Εξαρτήματα του δέρματος	21
1.1.4	Λειτουργικός ρόλος δέρματος.....	23
1.2	ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	26
1.2.1	Μη ειδική και ειδική ανοσία.....	28
1.2.2	Όργανα, κύτταρα και διαβιβαστές του ανοσοποιητικού συστήματος.....	32
1.2.3	Μηχανισμοί ανοσολογικής ανοχής και αυτοανοσία.....	37
1.3	ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΠΟΜΦΟΛΥΓΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ	41
1.3.1	Αιτιοπαθογένεια της πέμφιγας	43
1.3.2	Αντιδραστικότητα αυτοαντισωμάτων ενάντια στις δεσμογλεΐνες.....	43
1.3.3	Αυτοαντιδρώντα T λεμφοκύτταρα στην πέμφιγα	45
1.3.4	Κοινή πέμφιγα.....	46
1.3.5	Βλαστική Πέμφιγα.....	48
1.3.6	Φαρμακευτική πέμφιγα.....	49
1.3.7	Φυλλώδης πέμφιγα.....	49
1.3.8	Ερυθυματώδης πέμφιγα.....	50
1.3.9	Ενδημική πέμφιγα.....	50
1.3.10	Παρανεοπλασματική πέμφιγα.....	50
1.3.11	Νεογνική πέμφιγα.....	51
1.3.12	Γραμμική IgA δερματοπάθεια	51
1.3.13	Πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (Bullous pemphigoid-BP).....	52
1.3.14	Παθογένεση της BP	53
1.3.15	Κλινική εικόνα της BP	54
1.3.16	Διάγνωση Πέμφιγοειδών νοσημάτων.....	55
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	60
2.1	ΑΝΟΣΟΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ	60
2.1.1	Ανοσοφθορισμός	62
2.1.2	Δοκιμασίες ΕνζυμοΣυζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης (enzyme-linked immunosorbent assay -ELISA)	
	69	
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	78
3.1	ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	78
3.2	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΕΜΜΕΣΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ELISA ΣΤΗΝ ΚΟΙΝΗ ΠΕΜΦΙΓΑ	79
3.3	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΜΜΕΣΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ELISA ΣΤΗΝ ΚΟΙΝΗ ΠΕΜΦΙΓΑ	80
3.4	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΕΜΜΕΣΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ELISA ΣΤΟ BP.....	80
3.5	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΜΕΣΟΥ, ΕΜΜΕΣΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ELISA ΣΤΟ BP	81
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	84
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	91

Συντομογραφίες

Συντομογραφία	Αγγλική Ορολογία	Ελληνική Ορολογία
NMF	Natural Moisturizing Factor-	Φυσικοί ενυδατικοί παράγοντες
TCRs	T Cell Receptors	Υποδοχείς T λεμφοκυττάρων
TLRs	Toll like receptors	
BCRs	B Cell Receptors	Υποδοχείς B λεμφοκυττάρων
Il	Interleukin	Ιντερλευκίνη
TNF	Tumor Necrosis Factor	Παράγοντας νέκρωσης όγκου
TGF	Tumor Growth Factor	Παράγοντας ανάπτυξης όγκου
HLA	Human Leukocyte Antigen	Αντιγόνο ανθρώπινων λευκοκυττάρων
ABDs	Autoimmune Bullous Disorders	Αυτοάνοσα πομφολυγώδη νοσήματα
PDs	Pemphigus Diseases	Πεμφιγοειδή νοσήματα
BP	Bullous pemphigoid	Πομφολυγώδες πεμφιγοειδές
anti-Dsg1	anti-Desmoglein 1	αντι Δεσμογλείνη 1 αυτοαντισώματα
anti-Dsg3	anti-Desmoglein 3	αντι Δεσμογλείνη 3 αυτοαντισώματα
IFA	Indirect ImmunoFluorescence Assay	Έμμεσος ανοσοφθορισμός
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	Ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός συνδεδεμένος με ένζυμο
DFA	Direct ImmunoFluorescence Assay	Άμεσος ανοσοφθορισμός
EIAs	Enzyme immunoassays	Ενζυμικές ανοσοδοκιμασίες
AP	Alkaline phosphatase	Αλκαλική φωσφατάση

Πρόλογος

Τα πομφολυγώδη νοσήματα αυτοάνοσης αρχής έχουν χρόνια πορεία, σημαντική νοσηρότητα με απρόβλεπτη εξέλιξη. Πρόκειται για μια ετερογενή ομάδα νοσημάτων γεγονός που καθιστά την διαγνωστική προσέγγιση ιδιαίτερη. Για την ακριβή ταξινόμηση αυτών των νοσημάτων επιστρατεύονται οι ειδικές τεχνικές που η καθεμία προσφέρει και συμπληρώνει στο παζλ της διάγνωσης. Ενώ είναι γνωστό ότι η golden standard τεχνική διάγνωσης στα πομφολυγώδη είναι ο άμεσος ανοσοφθορισμός η elisa και ο έμμεσος αποδεικνύονται πολύτιμα εργαλεία στην παρακολούθηση. Συγκριτικά η elisa είναι πιο ευαίσθητη και αναλύει τον αριθμό και το είδος των αντισωμάτων. Ο έμμεσος πιστοποιεί την θετικότητα και έχει μεγάλη σημασία στην παρακολούθηση της πέμφιγας για αυτό κάνουμε αραιώσεις (τιτλοποίηση). Στο πομφολυγώδες πεμφιγοειδές μπορεί να αρνητικοποιηθεί μετά την θεραπεία.

Για πολλά χρόνια η διάγνωση και παρακολούθηση των πομφολυγωδών νοσημάτων βασιζόταν μόνο στον ανοσοφθορισμό και την ιστολογική εξέταση. Οι τεχνικές που αναφέρθηκαν (ποσοτική μέτρηση BP 180, BP 230, δεσμογλείνη 1 και 3) καθιερώθηκαν τα τελευταία χρόνια και μάλιστα σε ελάχιστα νοσοκομεία.

Είναι νοσήματα που ευτυχώς είναι σπάνια αλλά για όσους νοσούν είναι μια επίπονη και χρόνια κατάσταση και τα θεραπευτικά μέσα είναι περιορισμένα. Στο Ανοσοδερματολογικό εργαστήριο του νοσοκομείου Ανδρέας Συγγρός τα δείγματα που εξετάζονται ανήκουν σε ασθενείς που νοσηλεύονται ή που παρακολουθούνται στο ιατρείο αυτοανόσων για πολλά χρόνια μετά το εξιτήριό τους ιδιαίτερα όσοι νοσούν από πέμφιγα. Επίσης δέχεται δείγματα από πολλά νοσοκομεία της χώρας αφού τα εργαστήρια που ασχολούνται με την εργαστηριακή διερεύνηση αυτών των νοσημάτων είναι ελάχιστα.

Καμία τεχνική δεν αρκεί από μόνη της για την διάγνωση, ταξινόμηση και παρακολούθηση των πομφολυγωδών νοσημάτων.

Εισαγωγή

1.1 Το Δέρμα

Το δέρμα αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος, με έκταση στον μέσο ενήλικα περίπου 1,5 -2,0 τμ. και βάρος περίπου 4 kg (αποτελεί το 15% του συνολικού βάρους σώματος). Το 70% του δέρματος συνίσταται από νερό (στην κεράτινη στιβάδα το 13%), ενώ το φύλο, η ηλικία, η φυλή, η διατροφή, ο τρόπος διαβίωσης, η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία καθώς και η μοίρα του σώματος από την οποία προέρχεται είναι παράγοντες καθοριστικοί για το δέρμα. Το πάχος του δέρματος ποικίλει από περιοχή σε περιοχή ενώ εξαρτάται και από την ηλικία του ατόμου. Συγκεκριμένα η επιδερμίδα, με εξαίρεση την περιοχή της παλάμης, των πελμάτων και του βλεφάρου, είναι πιο λεπτή από το χόριο, ενώ εμφανίζει μεγαλύτερο πάχος στον θώρακα, στα πέλματα και στη ράχη. Επίσης αναφορικά με τη συσχέτιση του πάχους του δέρματος με την ηλικία, είναι γνωστό ότι στα πρώτα χρόνια της ζωής χαρακτηρίζεται από μικρό πάχος το οποίο αυξάνεται σταδιακά έτσι ώστε μετά το 5^ο έτος να αποκτήσει το πάχος που έχει το δέρμα του ενήλικα. Αναφορικά με το χρώμα αυτό διαφέρει από φυλή σε φυλή αλλά και από το σημεία του σώματος, καθώς στην πρόσθια επιφάνεια του σώματος το χρώμα του δέρματος είναι πιο ανοιχτόχρωμο ενώ υπάρχουν και σημεία που καλύπτονται από πιο σκουρόχρωμο δέρμα όπως η θηλαία άλως του μαστού. Σε κάθε περίπτωση καθορίζεται κυρίως από την εναπόθεση χρωστικής καθώς και από την αιμάτωση της περιοχής. Τέλος η επιφάνεια του δέρματος είναι ανώμαλη καθώς φέρει τις γραμμές του σώματος και στο μεγαλύτερο του μέρος καλύπτεται από τρίχες (εξαιρούνται οι παλάμες, τα πέλματα, το πέος και η έσω επιφάνεια των χειλέων του αιδοίου). Το δέρμα αποτελεί πρεσβευτή μιας εκ των πέντε αισθήσεων, της αφής, ενώ παράλληλα έχει προστατευτικές, ανοσολογικές και επουλωτικές ιδιότητες, είναι ρυθμιστής της θερμοκρασίας και μέρος της μη ειδικής άμυνας του οργανισμού. Το δέρμα επίσης είναι ορατό και κάθε του μεταβολή (χρώμα, υφή, βλάβη κτλ) είναι εύκολα εντοπίσιμη. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο από κλινικής άποψης καθώς κάθε δερματική εκδήλωση αποτελεί κλινικό σημείο συστηματικής νόσου και βοηθά στην σωστή διάγνωση, περιορίζοντας έτσι συχνά τη διενέργεια πολλαπλών εργαστηριακών και απεικονιστικών εξετάσεων (1)(2).

1.1.1 Ανατομία του δέρματος

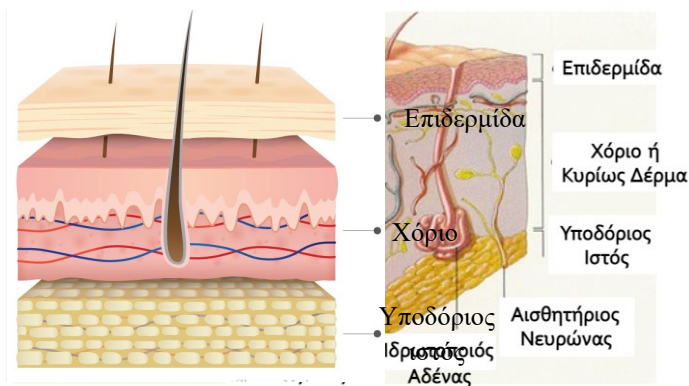
Κατά την εμβρυολογική ανάπτυξη το δέρμα σχηματίζεται από το έξω και μέσο βλαστικό δέρμα [3]. Από το πρώτο προκύπτει η επιδερμίδα, οι αδένες, τα εξαρτήματα του δέρματος και οι νευρικές απολήξεις, γεγονός που εξηγεί τη λειτουργία του δέρματος σαν αισθητήριο όργανο. Από την άλλη πλευρά το μέσο βλαστικό δέρμα δίνει γένεση στο χόριο, στο υποδόριο και στα αγγεία αιτιολογώντας την αγγειοβρίθεια του σε αντίθεση με την επιδερμίδα που στερείται αγγείων. Οι στοιβάδες του δέρματος από το εξωτερικό προς το εσωτερικό είναι:

Η επιδερμίδα (εξωτερική-επιθηλιακή στιβάδα)

Το χόριο ή κυρίως δέρμα (εσωτερική στιβάδα)

Ο υποδόριος ιστός ή υπόδερμα (περιέχει άφθονο λίπος) (3)(4).

Στο δέρμα υπάρχουν επίσης οι τρίχες, τα νύχια και οι αδένες (ιδρωτοποιοί και σμηγματογόνοι), τα οποία στο σύνολο τους είναι γνωστά σαν εξαρτήματα του δέρματος (Εικόνα 1.1).

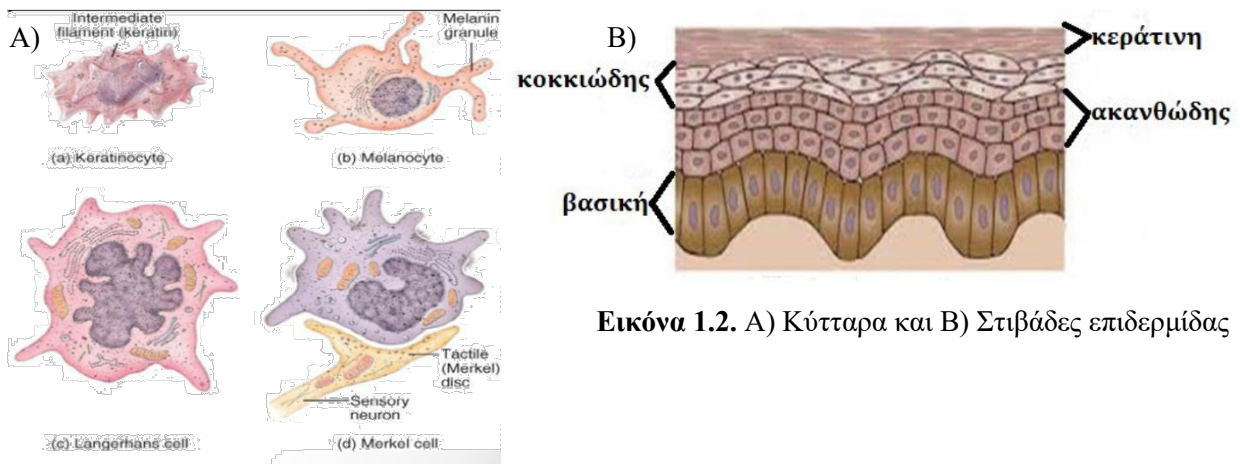


Εικόνα 1.1 Στοιβάδες του δέρματος

Επιδερμίδα

Η επιδερμίδα είναι η εξωτερική στιβάδα του δέρματος και το πάχος της ποικίλει ανάλογα με το σημείο του σώματος και τον όγκο του νερού που συγκρατεί. Είναι κερατινοποιημένο επιθήλιο, το οποίο απαρτίζεται κυρίως από τα επιθηλιακά κύτταρα (κερατινοκύτταρα), αλλά και από τα μελανοκύτταρα (μη κερατινοποιημένα κύτταρα), τα κύτταρα του Langerhans (μη κερατινοποιημένα κύτταρα) και τα κύτταρα Merkel (μη κερατινοποιημένα κύτταρα) (Εικόνα 1.2α). Τα κύτταρα αυτά συνδέονται μεταξύ τους με δεσμοσωμάτια, νημάτια ακτίνης και κονεξίνες. Η επιδερμίδα αποτελείται από τέσσερις στιβάδες οι οποίες είναι γνωστές σαν: 1. βασική στιβάδα (πάχος = 1 κύτταρο), 2. ακανθωτή ή ακανθώδης στιβάδα (πάχος = 4 -12

κύτταρα), 3. κοκκώδη στιβάδα (πάχος = 3- 5 κύτταρα), 4. κερατίνη στιβάδα (πάχος = 15- 30 κύτταρα) (2,5) (Εικόνα 1.2β).



Εικόνα 1.2. Α) Κύτταρα και Β) Στιβάδες επιδερμίδας

Η *βασική στιβάδα* είναι η βαθύτερη εκ των 5 στιβάδων της επιδερμίδας, αποτελείται από μια σειρά επιθηλιακών κυττάρων κυλινδρικού ή κυβοειδούς σχήματος ενώ το 10% των κυττάρων είναι μελανοκύτταρα. Τα κύτταρα της βασικής στιβάδας έρχονται σε άμεση επαφή και αγκιστρώνονται με τη βασική μεμβράνη, η οποία διαχωρίζει το χόριο από την επιδερμίδα. Καθώς η βασική μεμβράνη περιλαμβάνει τα αναγεννητικά κύτταρα, παρατηρείται έντονη μιτωτική δραστηριότητα αυτών των κυττάρων και μάλιστα ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους επηρεάζουν το πάχος της επιδερμίδας. Τα κερατινοκύτταρα έχουν μεγάλο βαθυχρωματικό πυρήνα, επιμήκη ή ωειδή, με κυτταρόπλασμα πλούσιο σε ριβοσώματα, λυσοσώματα και μιτοχόνδρια ενώ συχνά περιέχουν κοκκία μελανίνης τα οποία μεταφέρονται από τα γειτονικά μελανοκύτταρα. Έχει υπολογιστεί ότι ο χρόνος διαφοροποίησης ενός κερατινοκυττάρου από τη στιγμή που θα γεννηθεί στη βασική στιβάδα μέχρι να αποπέσει σαν κεράτινο πετάλιο (κερατινοποίηση) είναι περίπου 28 μέρες, ενώ σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η ψωρίαση ο χρόνος αυτός επιταχύνεται (1,6).

Τέλος, έχουν χαρακτηριστική διάταξη, η οποία προκύπτει αφενός από την μεταξύ τους στενή γεινίαση και αφετέρου από την μεταξύ τους σύνδεση αλλά και από τη σύνδεση τους με τα υπερκείμενα ακανθώδη κύτταρα μέσω των τονοϊνιδίων. Τα τελευταία είναι λεπτά κυτταροπλασματικά ινίδια τα οποία σχηματίζουν τα δεσμοσωμάτια, χαρακτηριστικό των οποίων είναι η ύπαρξη μεσοκυττάριας ουσίας στον κέντρο τους. Η συγκολλητική αυτή ουσία των δεσμοσωμάτων είναι γνωστή και σαν γλυκοκάλυκας και αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνες (4).

Όπως προαναφέρθηκε τα κύτταρα της βασικής στιβάδας αγκιστρώνονται στην βασική μεμβράνη. Η τελευταία εκτός από το ότι διαχωρίζει το χόριο από την επιδερμίδα, παράλληλα παρέχει ανθεκτικότητα, σταθερότητα και ελαστικότητα ενώ επιτρέπει και τη διέλευση διάφορων ουσιών. Ένα βασικό χαρακτηριστικό των κυττάρων της βασικής στιβάδας είναι η έντονη μιτωτική δραστηριότητα, η οποία ασφαλώς εξασφαλίζει το σημαντικό και γρήγορο πολλαπλασιασμό τους. Τα θυγατρικά κύτταρα προωθούνται σταδιακά προς τις ανώτερες στιβάδες και με αυτόν τον τρόπο τροφοδοτείται αυτή η περιοχή συνεχώς με νέα κύτταρα τα οποία τελικά σχηματίζουν την κεράτινη στιβάδα. Κατά τη διάρκεια αυτής της πορείας τα κύτταρα υφίστανται δομικές αλλαγές καθώς γίνονται επίπεδα και χάνουν τον πυρήνα τους. Έτσι μετατρέπονται σε δομές που είναι γνωστές σαν πετάλια, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους προσφέροντας έτσι στο δέρμα την πολύ σημαντική ικανότητα της αδιαπερατότητας. Η συνεχής αυτή ανανέωση των επιδερμικών κυττάρων οφείλεται στη συνδυαστική δράση της βασικής στιβάδας και της αρχικής μοίρας της επόμενης στιβάδας. Όλες οι υπόλοιπες στιβάδες του δέρματος προέρχονται από τη βασική στιβάδα και για αυτό συχνά αναφέρεται και σαν μητρική στιβάδα (6–8).

Στη βάση αλλά και μεταξύ των κυττάρων της βασικής μεμβράνης συναντάμε τα μελανοκύτταρα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της ουσίας μελανίνη. Τα μελανοκύτταρα έχουν νευρογενή προέλευση και φέρουν δενδρίτες, οι οποίοι διακλαδίζονται μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων. Οι δενδρίτες αυτοί είναι γεμάτοι μελανοσώματα δηλαδή κοκκία που περιέχουν μελανίνη προερχόμενη από τη μελανογένεση. Έχει υπολογιστεί ότι η αναλογία μελανοκύτταρα : επιθηλιακά κύτταρα είναι 1:5 ενώ είναι γνωστό ότι όλες οι φυλές έχουν ίδιο αριθμό μελανοκυττάρων. Έτσι το διαφορετικό χρώμα μεταξύ των φυλών οφείλεται στον αριθμό και το μέγεθος των μελανοσωμάτων, στην διαφορετική ικανότητα τους να παράγουν μελανίνη αλλά και στο είδος της μελανίνης που παράγεται (Ευμελανίνη / Φαιομελανίνη). Τα μελανοσώματα που εντοπίζονται στους δενδρίτες φαγοκυτταρώνονται από επιθηλιακά κύτταρα, περιβάλλουν τον πυρήνα αυτών των κυττάρων και τα προστατεύουν από την υπερϊώδη ακτινοβολία (1,3,7).

Μία άλλη κατηγορία κυττάρων που εντοπίζεται στη βασική είναι τα κύτταρα Merkel, τα οποία είναι νευροενδοκρινούς προέλευσης γεγονός που δικαιολογεί την ικανότητα παραγωγής αφενός νευροενδοκρινών ορμονών και αφετέρου νευρικών ερεθισμάτων (αίσθηση αφής/ βαθιά πίεση). Η τελευταία τους δράση οφείλεται στη σύνδεση τους με νευρικές απολήξεις. Τα

κύτταρα Merkel εντοπίζονται στη βασική μεμβράνη περιοχών του σώματος με μεγάλη ευαισθησία, όπως για παράδειγμα το πρόσωπο και τα ακροδάκτυλα) καθώς επίσης και στους βλεννογόνους και στα εξαρτήματα του δέρματος. Τέλος τα κύτταρα Merkel βρίσκονται είτε σε συσσωματώματα είτε διεσπαρμένα (2,7,9).

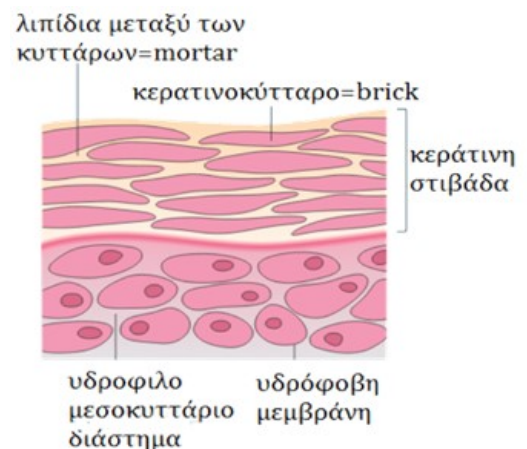
Τέλος, τα κύτταρα του Langerhans είναι δενδριτικά κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης που εντοπίζονται αποκλειστικά στην επιδερμίδα. Εκεί σχηματίζουν ένα δίκτυο κυττάρων αναμεσα στην ακανθωτή και τη βασική στιβάδα και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση. Συγκεκριμένα τα κύτταρα του Langerhans είναι αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, τα οποία αναγνωρίζουν και παρουσιάζουν τα αλλεργιογόνα στα λεμφοκύτταρα (2,7).

Η ακανθωτή ή ακανθώδης στιβάδα αποτελεί την παχύτερη στιβάδα της επιδερμίδας και βρίσκεται πάνω από τη βασική στιβάδα. Ονομάζεται έτσι λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας σε δεσμοσώματα και ινίδια κερατίνης, τα οποία της προσδίδουν μία «ακανθωτή» εμφάνιση (2,7). Βασικό χαρακτηριστικό της ακανθωτής στιβάδας είναι η ύπαρξη συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων τόσο στη ίδια τη στιβάδα όσο και με τα κύτταρα της βασικής στιβάδας. Το πάχος αυτής της στιβάδας είναι 4-12 στίχοι κυττάρων, τα οποία παρουσιάζουν διαφορετική μορφολογία μεταξύ των διαφόρων στίχων λόγω της συνεχούς εξέλιξης τους κατά τη διάρκεια της κίνησης τους προς την κοκκιώδη στιβάδα. Συγκεκριμένα τα κύτταρα της ακανθωτής στιβάδας στους κατώτερους στίχους είναι πολυεδρικά με μεγάλο πυρήνα και άφθονο κυτταρόπλασμα ενώ μετατρέπονται στους ανώτερους στίχους σε πεπλατυσμένα κύτταρα με κυτταρόπλασμα πλούσιο σε γλυκογόνο για να καταλήξουν τελικά στην κοκκώδη στιβάδα όπου πλέον περιέχουν κοκκία κερατοϋαλίνης (πρόδρομη ουσία της κερατίνης) (1,5,7). Στη ακανθωτή στιβάδα οι μεσοκυττάριοι χώροι είναι κενοί επιτρέποντας έτσι την κυκλοφορία της λέμφου. Τέλος τα κύτταρα της στιβάδας αυτής συνδέονται μεταξύ τους με μεσοκυττάρια γέφυρες, οι οποίες περιέχουν σε μεγάλο βαθμό δεσμοσώματα. Οι σχηματισμοί αυτοί είναι εφήμεροι καθώς διασπώνται και σχηματίζονται συνεχώς κατά την κίνηση των κυττάρων από τις κατώτερες προς τις ανώτερες στιβάδες.

Η κοκκώδης στιβάδα αποτελείται από 1-4 στίχους πεπλατυσμένων, ρομβοειδών κυττάρων τα οποία αποπλατώνονται και γίνονται πυκνότερα καθώς προωθούνται προς τις ανώτερες στιβάδες. Βασικό χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτής της στιβάδας είναι ότι περιέχουν στο κυτταρόπλασμά τους κοκκία κερατοϋαλίνης καθώς και τα σωματίδια Odland, τα οποία είναι

μικρά στρογγυλά κερατινοσώματα με διάμετρο 0,2-0,3 μm. Από την άλλη πλευρά τα κοκκία κερατουαλίνης αποτελούν την πρόδρομο ουσία της κερατίνης, ενώ τα κοκκία που είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος αποτελούνται από την πρωτεΐνη προφιλαγκρίνη η οποία περιέχει βασικά αμινοξέα, όπως η ιστιδίνη. Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των κοκκιωδών κυττάρων προς κερατινοκύτταρα, η προφιλαγκρίνη υφίσταται αποφωσφορυλίωση και μερική πρωτεόλυση οπότε σχηματίζεται η φιλαγκρίνη. Ασφαλώς κατά την πρωτεόλυση της προφιλαγκρίνης απελευθερώνονται αμινοξέα και παράγωγα αυτών, τα οποία συμβάλλουν στην προστασία της κεράτινης στιβάδας από την αφυδάτωση. Τα σωμάτια Odland περιέχουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων τα οποία αποβάλλονται στο μεσοκυττάριο διάστημα και συμβάλλουν στην κυτταρική συνοχή (στη λειτουργία του φραγμού της κεράτινης στιβάδας). Επίσης τα σωμάτια Odland εξασφαλίζουν τη σύνδεση μεταξύ των κερατινοκυττάρων. Συγκεκριμένα τα κοκκιώδη κύτταρα παράγουν και απελευθερώνουν ένα πολύπλοκο σύμπλεγμα το οποίο αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνες, γλυκοσφυγγολιπίδια, ελεύθερες στερόλες και υδρολυτικά ένζυμα. Το σύμπλεγμα αυτό πιστεύεται ότι δρα σαν συγκολλητική ουσία μεταξύ των κυττάρων της κεράτινης στιβάδας, ενώ ταυτόχρονα καθιστά την κεράτινη στιβάδα μη διαπερατή από το νερό (4,5,7).

Η εξωτερική στιβάδα του δέρματος είναι γνωστή σαν *κεράτινη* στιβάδα, η οποία απαρτίζεται από νεκρά αλλά λειτουργικά κύτταρα που αποτελούνται κυρίως από κερατίνη και είναι γνωστά σαν κερατινοκύτταρα. Το πάχος της συγκεκριμένης στιβάδας διαφέρει ανάλογα με το σημείο του σώματος και είναι χαρακτηριστικό ότι στα πέλματα και τις παλάμες η κεράτινη στιβάδα αντιπροσωπεύει το 50% όλου του πάχους της επιδερμίδας. Η κεράτινη στιβάδα είναι οξεόφιλη και ομοιογενής, χαρακτηριστικά που οφείλονται στην κερατίνη (2,7,10). Βασικά δομικά χαρακτηριστικά των κερατινοκυττάρων είναι ότι είναι



Εικόνα 1.3 Μοντέλο «brick and mortar»

απύρνηνα, πεπλατυσμένα, μη διαπεράτα και το κυτταρόπλασμα τους έχει ουσιαστικά αντικατασταθεί από ποικίλες πρωτεΐνες, όπως η κερατίνη, η φιλαγκρίνη και η ινβολουκρίνη. Από την άλλη πλευρά ένα βασικό λειτουργικό χαρακτηριστικό αυτών των είναι ότι περιβάλλονται από έναν φάκελο που δομείται από λιπίδια. Με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα

αυτής της στιβάδας ενώνονται σταθερά μεταξύ τους δημιουργώντας έναν φραγμό προς το περιβάλλον που έχει ως αποτέλεσμα την πολύ σημαντική ιδιότητα της μειωμένης διαπερατότητας. Μάλιστα ο φραγμός αυτός συχνά αναφέρεται σαν «brick and mortar model», όπου οι πρωτεΐνες των κερατινοκυττάρων λειτουργούν σαν τα τούβλα (bricks) και είναι βυθισμένες μέσα σε ένα λιπιδικό στρώμα το οποίο λειτουργεί σαν τσιμέντο (mortar) και το οποίο αποτελείται από σφιγγολιπίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, ελεύθερες στερόλες (κυρίως χοληστερόλη) και μη πολικά λιπίδια (Εικόνα 1.3). Έτσι η κεράτινη στιβάδα λειτουργεί σαν φραγμός, ο οποίος αφενός επιτρέπει τη διατήρηση της υγρασίας του δέρματος και αφετέρου αποτελεί το κυριότερο εμπόδιο στην είσοδο ουσιών και μικροοργανισμών από το δέρμα (4).

Στα σημεία του δέρματος όπου η κεράτινη στιβάδα είναι ιδιαίτερα παχιά, διακρίνεται και μία πέμπτη στιβάδα, η *διαυγής* στιβάδα, το όνομα της οποίας οφείλεται στην αδυναμία βαφής της με τις κοινές χρωστικές. Εντοπίζεται μεταξύ της κεράτινης και κοκκώδους στιβάδας και αποτελείται από 1-3 στίχους απύρηνων, πεπλατυσμένων κυττάρων τα οποία χαρακτηρίζονται από οξύφιλο κυτταρόπλασμα και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λιπίδια. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό του κυτταροπλάσματος αυτών των κυττάρων είναι ότι αποτελείται από στοιβαγμένα σφικτά μεταξύ τους νημάτια κλεισμένα μέσα σε μια πυκνή θεμέλια ουσία, και περιέχει την ουσία ελαιοειδίνη, η οποία πιθανόν είναι προϊόν αποσύνθεσης της κερατοϋαλίνης και έχει τις χρωστικές ιδιότητες των λιποειδών και λιπών (3).

Προχωρώντας από την επιδερμίδα προς το χόριο συναντάμε την *χοριοεπιδερμική ένωση*, η οποία επιτυγχάνεται με αναδύσεις του χορίου (θηλές) και καταδύσεις της επιδερμίδας. Η βασική μεμβράνη αποτελεί τη διαχωριστική επιφάνεια ανάμεσα στην επιδερμίδα και το χόριο και αποτελείται από δυο λεπτά πέταλα: 1. το διαυγές πέταλο (lamina lucida) το οποίο έρχεται σε επαφή με τη βασική μεμβράνη και 2. το πυκνό πέταλο (lamina densa) το οποίο εφάπτεται με το χόριο και είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε ινίδια κολλαγόνου. Τα τελευταία λειτουργούν σαν άγκυρες που «αγκιστρώνουν» το χόριο στην επιδερμίδα. Αυτός ο δερμοεπιδερμικός σύνδεσμος προσφέρει μηχανική υποστήριξη στην επιδερμίδα, συμβάλλει στη θρέψη της και ρυθμίζει την αμφίδρομη δίοδο ουσιών διαμέσου της επιδερμίδας καθώς λειτουργεί σαν ημιδιαπερατό φίλτρο (2,3,6).

➤ Χόριο ή κυρίως δέρμα

Το χόριο, με πάχος που κυμαίνεται από 0,3-3,0 mm, είναι ένας ελαστικός και ανθεκτικός ιστός, ο οποίος στηρίζει και τρέφει την επιδερμίδα και επιπλέον αποτελεί τον συνδετικό κρίκο ανάμεσα στον υποδόριο ιστό και την επιδερμίδα. Το χόριο αποτελείται από συνδετικό ιστό, ο οποίος είναι πλούσιος σε αγγεία και νεύρα. Τα κύτταρα του χορίου είτε παράγονται επιτόπου είτε μεταναστεύουν σε αυτό από άλλο σημείο παραγωγής και εντοπίζονται μέσα στην θεμέλιο ουσία του συνδετικού ιστού, η οποία αποτελείται από βλεννοπολυσακχαρίτες. Οι κατηγορίες των κυττάρων του χορίου είναι οι ινοβλάστες, τα ιστιοκύτταρα, τα πλασματοκύτταρα και τα μαστοειδή κύτταρα. Οι ινοβλάστες συγκεκριμένα είναι ωοειδή, επίμηκη κύτταρα με πυρήνα διαυγή και ατρακτοειδή και ωχρό κυτταρόπλασμα, και συνθέτουν τριών ειδών ίνες:

- Ίνες κολλαγόνου, οι οποίες παρέχουν δομική υποστήριξη στο δέρμα. Είναι πιο παχιές και τραχείς προς το δικτυωτό στρώμα ενώ γίνονται πιο λεπτές και χαλαρές θηλώδες στρώμα. Οι ίνες κολλαγόνου συνδυάζονται σε δεμάτια τα οποία με τη σειρά τους μπλέκονται μεταξύ τους με δικτυωτό τρόπο σχηματίζοντας έτσι ένα πολύπλοκο δίκτυο συνδέσεων το οποίο αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του συνδετικού ιστού
- Ελαστικές ίνες, οι οποίες είναι λεπτές και σχηματίζουν ένα δίκτυο σε όλο το πάχος του δέρματος καθώς αναστομώνονται μεταξύ τους. Ο ρόλος τους είναι η διασφάλιση της ελαστικότητας του δέρματος
- Δικτυωτές ίνες, οι οποίες στη θηλώδη στιβάδα είναι λεπτές και πολυάριθμες και συμμετέχουν στη δημιουργία της χοριοεπιδερμικής ένωσης

Το χόριο αποτελείται από μια επιπολής και μία εν τω βάθει στιβάδα, το *θηλώδες* και το *δικτυωτό χόριο* αντίστοιχα. Το πρώτο βρίσκεται κοντά στον δερμοεπιδερμικό σύνδεσμο ενώ το δικτυωτό στρώμα εντοπίζεται μεταξύ θηλώδους στρώματος και υποδόριου ιστού. Η θηλώδης στιβάδα χαρακτηρίζεται από την παρουσία μικρών κωνοειδών ή κυλινδροειδών προσεκβολών, οι οποίες ονομάζονται θηλές, και χρησιμεύουν στη θρέψη αυτής της στιβάδας αλλά και στην υποδοχή των τελικών αισθητικών νευρικών απολήξεων. Οι θηλές διεισδύουν στα αντίστοιχα εντυπώματα της επιδερμίδας, τα θηλαία αποτυπώματα.

Από την άλλη πλευρά η δικτυωτή στιβάδα έχει πυκνή και ελαστική σύσταση και αποτελεί τα 4/5 του πάχους του χορίου. Η σύσταση αυτή οφείλεται στην πυκνή διάταξη των ιών κολλαγόνου και την παρουσία πολλών ελαστικών ιών. Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών η δικτυωτή στιβάδα είναι η πιο ισχυρή και ελαστική στιβάδα του δέρματος. Επίσης η δικτυωτή στιβάδα αφθονεί σε αιμοφόρα αγγεία και λεμφαγγεία και σε μυϊκές ίνες, οι οποίες εντοπίζονται

περιμετρικά των θυλάκων των τριχών και των ιδρωτοποιών αδένων. Στη δικτυωτή στιβάδα εισχωρούν οι ινώδεις δεσμίδες, οι οποίες εντός του υποδέρματος δημιουργούν τους καθεκτικούς συνδέσμους του δέρματος. Τέλος, στο χόριο υπάρχουν τα εξαρτήματα του δέρματος δηλαδή, οι ιδρωτοποιοί αδένες, οι σμηγματογόνοι αδένες, τα τρίχετα νεύρα και ένα περίπλοκο δίκτυο αιμοφόρων αγγείων. Τα τελευταία προέρχονται από τα μεγαλύτερα αγγεία του υποδόριου ιστού και συντελούν στη θρέψη του δέρματος και στην ανοσολογική απόκριση (2,3,7,10).

➤ Υποδόριος ιστός

Αντιπροσωπεύει το κατώτερο στρώμα του δέρματος και απαρτίζεται από ένα αραιό δίκτυο συνδετικού ιστού το οποίο αποτελείται από κολλαγόνο και ελαστικές ίνες και το οποίο παρέχει μία χαλαρή σύνδεση του χορίου με τα υποκείμενα όργανα. Ωστόσο εκτός από μηχανική στήριξη παρέχει και θερμομονωτική προστασία του σώματος και λειτουργεί και ως διαμέρισμα αποθήκευσης θρεπτικών ουσιών. Μέσα στον υποδόριο ιστό εντοπίζονται τα λόβια, που είναι αθροίσματα λιπωδών κυττάρων, αιμοφόρα αγγεία, λεμφαγγεία, νευρικές απολήξεις, τα άκρα των θυλάκων των τριχών, τα εκκριτικά μέρη από τους ιδρωτοποιούς αδένες και οι ορογόνοι θύλακοι. Το σύνολο των λοβίων ονομάζεται *υποδόριο λίπος*, το οποίο είναι η πιο εξωτερική στιβάδα του υποδόριου ιστού. Πιο εσωτερικά ακολουθεί η *υποδέρια περιτονία* και ο *υποδόριος χαλαρός συνδετικός ιστός* (2,3). Η ποσότητα του υποδόριου λίπους διαφέρει από άτομο σε άτομο και εξαρτάται και από την περιοχή του ανθρώπινου σώματος. Για παράδειγμα πιο άφθονο είναι σε κοιλία, μαστούς, γλουτούς και σχεδόν ανύπαρκτο σε αυτιά, χείλη, βλέφαρα και μύτη (3).

1.1.2 Νεύρωση και Αγγείωση Δέρματος

Συνολικά στο δέρμα υπάρχει ένα πλούσιο και πολύπλοκο δίκτυο ελεύθερων νευρικών απολήξεων και νευρικών σχηματισμών τα οποία στο συνδυαστικά συμβάλλουν στην νεύρωση του δέρματος. Από την άλλη πλευρά ο υποδόριος ιστός και το χόριο βρίθουν από αγγεία προσφέροντας αιμάτωση στο δέρμα ενώ η επιδερμίδα τροφοδοτείται με θρεπτικά στοιχεία αποκλειστικά από τον ορό και τη λέμφο.

➤ Αγγείωση

Η αγγείωση του δέρματος διεκπεραιώνεται από αρτηρίες, φλέβες και λεμφαγγεία, με τις αρτηρίες να σχηματίζουν δύο τύπους αρτηριακών συστημάτων, τα άμεσα δερματικά και τα μυοδερματικά συστήματα. Σε γενικές γραμμές κάθε στελεχιαία αρτηρία της εκάστοτε δερματικής περιοχής, βρίσκεται κάτω από την μάζα των περιοχικών μυών και συνδέεται με το δέρμα με μυοδερματικούς κλάδους. Αυτή η σύνδεση πραγματοποιείται είτε άμεσα με το άμεσο δερματικό αρτηριακό σύστημα είτε μέσω μυϊκών κλάδων του μυοδερματικού αρτηριακού συστήματος.

Οι άμεσες δερματικές αρτηρίες αποτελούν συνέχεια των διατριαινοσών αρτηριών και εκτείνονται κατά μήκος της επιπολής μυϊκής περιτονίας παράλληλα με το δέρμα. Από την άλλη πλευρά οι μυοδερματικές αρτηρίες προκύπτουν από μυϊκούς κλάδους των διατριαινοσών αρτηριών και διαπερνούν κάθετα το υποδόριο λίπος. Στο ύψος της επιπολής περιτονίας τα δερματικά και μυοδερματικά συστήματα δημιουργούν το υποδερμάτιο αγγειακό δίκτυο από το οποίο εκφύονται ανιόντες και κατιόντες κλάδοι με τους πρώτους να σχηματίζουν το υποθηλώδες δίκτυο μεταξύ της θηλώδους και δικτυωτής στιβάδας του χορίου. Από την άλλη πλευρά οι κατιόντες κλάδοι είναι υπεύθυνοι για την αιμάτωση των βολβών των τριχών, των σπειραμάτων των ιδρωτοποιών αδένων και των λιπωδών λοβίων του υποδέρματος.

Το δίκτυο φλεβών ξεκινά από τα τριχοειδή στις θηλές της βασικής στιβάδας. Στις φλέβες που διαπερνούν το χόριο αποχετεύεται το αίμα, το οποίο πλέον κινείται παράλληλα με τις αρτηρίες αλλά με αντίθετη φορά. Μεταξύ χορίου και επιπολής περιτονίας, οι φλέβες σχηματίζουν το υποθηλοειδές και υποχοριοειδές δίκτυο μέσω των οποίων απάγεται το φλεβικό αίμα του δέρματος για να καταλήξει στις στελεχιαίες περιοχικές φλέβες. Τα λεμφαγγεία αρχίζουν από τις θηλές της θηλώδους στιβάδας του χορίου και σχηματίζουν το υποθηλώδες λεμφικό δίκτυο, που αποχετεύει λέμφο σε μεγαλύτερα αγγεία, τους προσυλλέκτες (3,12).

➤ Νεύρωση

Το δέρμα αποτελεί βασικό αισθητήριο όργανο του ανθρώπινου σώματος γεγονός που δικαιολογεί την εκτεταμένη νεύρωση του με αισθητικά και κινητικά νεύρα τα οποία ανήκουν τόσο στο αυτόνομο νευρικό σύστημα (Α.Ν.Σ.) όσο και στο εγκεφαλονωτιαίο νευρικό σύστημα. Τα πυκνά νευρωνικά δίκτυα του δέρματος επιτρέπουν τελικά την λειτουργία του δέρματος σαν αισθητήριο όργανο δηλαδή την αντίληψη της αίσθησης του πόνου, της αφής, του θερμού – ψυχρού και της εν τω βάθος αισθητικότητας. Τα νεύρα του δέρματος διεκπεραιώνουν την

αμφίδρομη μεταβίβαση μεταξύ του δέρματος και του κεντρικού νευρικού συστήματος, εξυπηρετώντας με αυτόν τον τρόπο άριστα την διατήρηση της ομοιόστασης (11,12). Όπως προαναφέρθηκε στη νεύρωση του δέρματος εμπλέκεται τόσο το Α.Ν.Σ όσο και το εγκεφαλονωτιαίο νευρικό σύστημα. Στο Α.Ν.Σ. ανήκουν οι κλάδοι οι οποίοι διανέμονται στα αγγεία, στους αδένες και στους ορθοτήρες μύες των τριχών, ενώ στο εγκεφαλονωτιαίο νευρικό σύστημα ανήκουν οι κλάδοι που προέρχονται από τα αισθητήρια νεύρα και βοηθούν την λειτουργία του δέρματος ως αισθητήριο όργανο. Αυτοί οι κλάδοι και δέχονται ερεθίσματα από υποδοχείς που απαντώνται σε όλο το πάχος του δέρματος. Αναλυτικότερα στην επιδερμίδα και συγκεκριμένα στη βασική και ακανθωτή στιβάδα υπάρχουν 1. ελεύθερες νευρικές απολήξεις που δέχονται διεγέρσεις σχετικές με τον πόνο και 2. οι απτικοί μηνίσκοι του Merkel-Ranvier, οι οποίοι σχετίζονται με την αφή. Στο χόριο και συγκεκριμένα στη θηλώδη στιβάδα ανιχνεύονται ελεύθερες νευρικές απολήξεις, υπεύθυνες για τον πόνο καθώς τα σωματίδια του Krause που είναι υπεύθυνα την αίσθηση του ψυχρού (κυρίως σε χείλη και γλώσσα). Στο χόριο επίσης των δακτύλων υπάρχουν τα σωματίδια του Ruffini, τα οποία επιτρέπουν την αίσθηση του θερμού ενώ στα γεννητικά όργανα εντοπίζονται τα γεννητικά νευροσωμάτια (παρόμοια με τα σωματίδια του Krause με μεγαλύτερο όγκο) που δέχονται διεγέρσεις που αφορούν την αίσθηση της ηδονής. Επίσης στις θηλές του άτριχου δέρματος υπάρχουν τα απτικά σωματίδια (σωμάτια Meissner) για την αίσθηση της λεπτής αφής, ενώ τέλος περιμετρικά του ινώδους θύλακα της τρίχας υπάρχουν περιτρίχιες απολήξεις, οι οποίες επιτρέπουν την αίσθηση της πίεσης. Τέλος στον υποδόριο ιστό εντοπίζονται 1. τα σωματίδια της εν τω βάθει αισθητικότητας των Vater-Paccini, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αίσθηση της ισχυρής πίεσης και της αφής και παρουσιάζουν ευαισθησία στις δονήσεις. Εξωτερικά περιβάλλονται από κάψα και φέρουν εμύελες νευρικές ίνες και εντοπίζονται κυρίως στην περιγεννητική περιοχή και στο άτριχο δέρμα. 2. τα σωματίδια Golgi-Mazzoni τα οποία εντοπίζονται στο δέρμα των δακτύλων, του περίνευου και των επιπεφυκότων και είναι υπεύθυνα για την αίσθηση των ελαφρών πιέσεων και 3. τα σωματίδια του Ruffini (12,13).

1.1.3 Εξαρτήματα του δέρματος

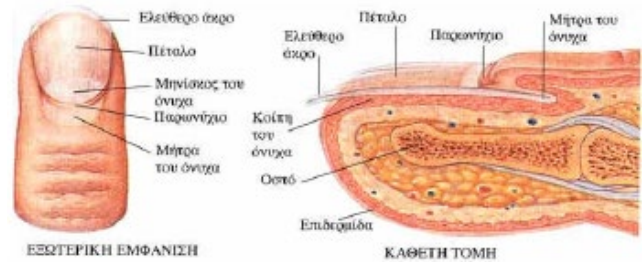
Στα εξαρτήματα του δέρματος ανήκουν τα νύχια, οι τρίχες και οι σμηγματογόνοι και ιδρωτοποιοί αδένες. Στο σύνολό τους τα εξαρτήματα του δέρματος προέρχονται από επιθηλιακές βλάστες κατά την και με εξαίρεση τα νύχια, τα υπόλοιπα εξαρτήματα του δέρματος

βρίσκονται εντός του χορίου του υποδόριου ιστού. Τα νύχια αποτελούν καλύπτουν το μέρος της τελευταίας φάλαγγας των δακτύλων των χεριών και των ποδιών και αποτελούν ημιδιαφανείς κεράτινες πλάκες (Εικόνα 1.4).

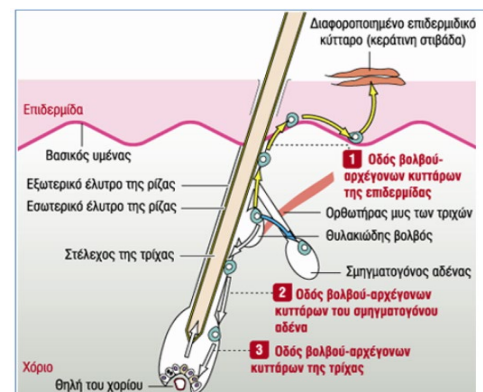
Στα νύχια διακρίνουμε τρία τμήματα, την κορυφή, το σώμα και τη ρίζα. Ο ρόλος των νυχιών είναι διττός καθώς αφενός προστατεύει τα άκρα και αφετέρου βοηθά στη συλλογή και συγκράτηση μικρών αντικειμένων (3,5).

Οι τρίχες είναι κεράτινα εξαρτήματα του δέρματος, τα οποία εκφύονται από εγκολπώσεις της επιδερμίδας που ονομάζονται τριχοσηγματικοί θύλακες ή τριχοθυλάκια. Έχουν νηματοειδές και κυλινδρικό σχήμα και καλύπτουν όλη την επιφάνεια του σώματος με εξαίρεση τις παλάμες, τις πλάγιες δακτυλικές επιφάνειες, την ονυχοφόρο φάλαγγα, τα πέλματα, τη θηλή του μαστού, την πόσθη και τους ημιβλεννογόνους. Η τρίχα χωρίζεται σε δύο μέρη, το στέλεχος και τη ρίζα, και αποτελείται από τρεις στιβάδες που είναι γνωστές σαν περιτρίχιο, φλοιός και μυελός (Εικόνα 1.5) (2,3).

Οι σημηματογόνοι αδένες έχουν κυψελοειδές σχήμα και απαρτίζονται από το αδενικό σώμα και τον εκφορητικό πόρο, ο οποίος καταλήγει στην άνω μοίρα ενός τριχοθυλακίου. Τα κύτταρα των αδένων πολλαπλασιάζονται και στη συνέχεια υφίστανται διαφοροποίηση, στα πλαίσια της οποίας οι πυρήνες συρρικνώνονται και ο διαθέσιμος χώρος γεμίζει με λίπος, το οποίο σταδιακά μετατρέπεται σε σμήγμα. Το τελευταίο είναι το έκκριμα αυτών των αδένων και απελευθερώνεται βαθμιαία προς την επιφάνεια του δέρματος καθώς διαρρηγνύονται τα κύτταρα. Το σμήγμα έχει ήπια αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική δράση ενώ ταυτόχρονα λειτουργεί και σαν λιπαντικός



Εικόνα 1.4 Ανατομία νυχιού



Εικόνα 1.5 Ανατομία τρίχας



Εικόνα 1.6 Τομή δέρματος και εξαρτήματα δέρματος

παράγοντας του δέρματος. Οι σημηματογόνοι αδένες ενεργοποιούνται κατά την εφηβεία και είναι υπό τον έλεγχο των φυλετικών ορμονών (2,3).

Ο αριθμός των ιδρωτοποιών αδένων (Εικόνα 1.6) είναι μεγάλος καθώς στο σύνολο της επιφάνειας του δέρματος υπάρχουν τέτοιου είδους αδένες, με πυκνότητα η οποία διαφέρει από περιοχή σε περιοχή. Οι ιδρωτοποιοί αδένες είναι σωληνοειδείς εσπειραμένοι αδένες οι οποίοι ανήκουν σε δύο τύπους: τους απεκκριτικούς (αποκρινείς) και τους εκκριτικούς (μεροκρινείς). Όμοια με τους σημηματογόνους αδένες αναπτύσσονται και ενεργοποιούνται στην εφηβεία, καθώς ελέγχονται και αυτοί από τις φυλετικές ορμόνες. Η δράση αυτών των αδένων οδηγεί στην εφίδρωση, η οποία βρίσκεται υπό τον έλεγχο του νευρικού συστήματος. Παράλληλα οι ιδρωτοποιοί αδένες δρουν σαν επικουρικό απεκκριτικό όργανο, το οποίο συμβάλλει στην απομάκρυνση άχρηστων ουσιών όπως η ουρία, το ουρικό οξύ κ.α (3).

1.1.4 Λειτουργικός ρόλος δέρματος

Το δέρμα αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος και ασφαλώς ο ρόλος του δεν μπορεί παρά να είναι σπουδαίος. Αρκετά συχνά το δέρμα μαρτυρά την κατάσταση των εσωτερικών οργάνων, την ύπαρξη παρενεργειών από φάρμακα (εμφάνιση εξανθημάτων) και αντικατοπτρίζει την ψυχολογική κατάσταση μέσω εφίδρωσης, ερυθρήματος ή εξανθήματος (2).

Πολλές από τις λειτουργίες του οφείλονται στις φυσικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν αυτόν τον ιστό. Συγκεκριμένα η ελαστικότητα του δέρματος είναι ένα βασικό του χαρακτηριστικό, το οποίο εξυπηρετεί τον ρόλο του σαν προστατευτικό κάλυμμα απέναντι στις μηχανικές κακώσεις. Η προστασία αυτή προέρχεται μέσω 1. της κεράτινης στιβάδας, η οποία αποτελεί έναν ισχυρό φυσικό φραγμό λόγω της στενής και ισχυρής σύνδεσης των επιθηλιακών κυττάρων και της ελαστικότητας του λόγω της παρουσίας πρωτεϊνών και λιπιδίων, 2. του χορίου και του υποδόριου λίπους, τα οποία εξυπηρετούν την απορρόφηση των κραδασμών και 3. της υπερπλασίας ιστών, που συμβαίνει σε επαναλαμβανόμενο μηχανικό τραύμα (βιοχημικός μηχανισμός προστασίας). Επίσης, προστατεύει από έντονες θερμικές επιδράσεις (ψύχος ή θερμότητα) και την ηλιακή ακτινοβολία. Τέλος, το δέρμα αποτελεί έναν ημιδιαπερατό φραγμό, ο οποίος επιτρέπει την έξοδο χρήσιμων χημικών ουσιών και ηλεκτρικών φορτίων από τον σώμα εμποδίζοντας ταυτόχρονα την είσοδο αυτών των ουσιών αλλά και ποικίλων μικροοργανισμών και παρασιτικών οργανισμών. Συγκεκριμένα για τους μικροοργανισμούς το δέρμα αποτελεί ένα φυσικό και χημικό ταυτόχρονα εμπόδιο για την είσοδο τους στον ανθρώπινο οργανισμό.

Αναφορικά με τη χημική δράση του δέρματος, έχει βρεθεί ότι η επιδερμίδα παράγει ένα προστατευτικό χημικό φιλμ αποτελούμενο από διάφορες χημικές ουσίες, γνωστές σαν Natural Moisturizing Factor-NMF (φυσικοί ενυδατικοί παράγοντες). Οι παράγοντες αυτοί είναι κυρίως ηλεκτρολύτες, αμινοξέα, ουρία και γαλακτικό οξύ και είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση της απαραίτητης υγρασίας στην κεράτινη στιβάδα. Επιπλέον τα τριγλυκερίδια, που παράγονται από τα επιδερμικά κύτταρα, μεταβολίζονται από τη φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα του δέρματος σε λιπαρά οξέα. Η παραγωγή των λιπαρών οξέων βοηθά 1. στην διατήρηση του όξινου pH του δέρματος, το οποίο δημιουργεί δυσμενείς συνθήκες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και 2. εμποδίζει την απώλεια του νερού (2,3,7).

Το δέρμα είναι επίσης βασικό αισθητήριο όργανο, αποτελώντας το σημείο επαφής του οργανισμού με το περιβάλλον και αντιδρά άμεσα σε ζέστη, κρύο, πίεση και πόνο. Η αίσθηση της αφής, βασίζεται στα σωμάτια των Wagner- Meissner ενώ η εν τω βάθει αίσθηση της πίεσης στα σωμάτια των Vater- Pacini. Η αίσθηση της πίεσης και της θερμότητας δεν είναι ομοιόμορφα κατανεμημένη σε όλη την επιφάνεια του σώματος, με τη δεύτερη να προέρχεται από τα σωμάτια Ruffini και Krause. Επιπλέον η αίσθηση της δόνησης οφείλεται στα σωμάτια Pacini ενώ το ήπιο άγγιγμα στα κύτταρα Merkel (9,12,14).

Το δέρμα παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη θερμορρύθμιση μέσω κυρίως δύο μηχανισμών: την παραγωγή/εξάτμιση ιδρώτα και τη διαστολή/συστολή των αγγείων. Σε περίπτωση αυξημένης εξωτερικής θερμοκρασίας προκαλείται παραγωγή ιδρώτα μετά από αντανακλαστική ενεργοποίηση των εκκριτικών νευρικών απολήξεων αλλά και διέγερση των αγγειοκινητικών απολήξεων η οποία οδηγεί σε αγγειοδιαστολή. Λόγω της αγγειοδιαστολής η θερμότητα μεταφέρεται μέσω του αίματος προς το δέρμα, από όπου τελικά αποβάλλεται. Σε περίπτωση μειωμένης εξωτερικής θερμοκρασίας ενεργοποιείται ο ίδιος άξονας «υποθάλαμος-δερματικές νευρικές απολήξεις», οδηγώντας σε αγγειοσυστολή η οποία προκαλεί μείωση της ποσότητας του αίματος που φτάνει στην επιφάνεια του δέρματος με αποτέλεσμα να περιορίζεται και η απώλεια της θερμότητας (12–14).

Το δέρμα έχει επίσης απεκκριτική και απορροφητική λειτουργία καθώς αποτελεί σημαντικό όργανο αμφίδρομης ανταλλαγής ουσιών μεταξύ του εσωτερικού του οργανισμού και του περιβάλλοντος. Μεταξύ των ουσιών που αποβάλλονται από το δέρμα είναι ο ιδρώτας και το σμήγμα. Ο ιδρώτας είναι ένα όξινο (pH 4-6) υδατικό διάλυμα αποτελούμενο από ανόργανα άλατα και οργανικές ουσίες, το οποίο επίσης ενισχύει το δυσμενές για τους

παθογόνους μικροοργανισμούς όξινο περιβάλλον. Η φυσιολογική ημερήσια παραγωγή είναι της τάξης των 500 με 700 gr και ασφαλώς η ποσότητα αυτή αυξάνεται όταν το άτομο βρίσκεται σε εμπύρετη κατάσταση ή όταν καταβάλει σωματική ή ψυχική προσπάθεια. Από την άλλη πλευρά το σμήγμα, το οποίο παράγεται από τους σμηγματογόνους αδένες, είναι ένα παχύρρευστο υγρό ιδιαίτερα πλούσιο σε ουδέτερα λίπη, ελεύθερα λιπαρά οξέα, λιποειδή (π.χ. χοληστερίνη), προβιταμίνη D, βιταμίνη A και καροτίνη. Το σμήγμα εμπλέκεται στο σχηματισμό του λιπαρού υμένα της επιδερμίδας, συμμετέχοντας έτσι την προστασία του δέρματος από τους διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς. Στον προστατευτικό ρόλο του σμήγματος συμβάλλει επίσης το χαμηλό του pH εξαιτίας της παρουσίας των λιπαρών οξέων και του γαλακτικού οξέος. Εξίσου σημαντική με την απεκκριτική λειτουργία του δέρματος είναι και η απορροφητική του δράση. Για παράδειγμα η είσοδος ξеноβιοτικών ουσιών γίνεται μέσω της επιδερμίδας και των τριχοσμηγματογόνων θυλάκων. Το νερό, το οξυγόνο και οι υδατοδιαλυτές ουσίες διαπερνούν ελάχιστα το δέρμα σε αντίθεση με τις λιποδιαλυτές που απορροφούνται ευκολότερα (2,14).

Μία ακόμα σημαντική λειτουργία του δέρματος είναι η κερατινοποίηση, δηλαδή η φυσιολογική ωρίμανση των κυττάρων της επιδερμίδας, στα πλαίσια της οποίας οι σφαιρικές πρωτεΐνες μετατρέπονται σε ινώδες, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται αποσύνθεση του κυτταροπλάσματος και απώλεια του πυρήνα. Ο ρόλος του δέρματος σαν φραγμός οφείλεται κυρίως στην παρουσία της κεράτινης στιβάδας. Κατά τη διαφοροποίηση που υφίστανται τα κύτταρα της επιδερμίδας καθώς μετακινούνται από την βασική προς την κεράτινη στιβάδα, παράγονται μεγάλες ποσότητες λίπους και κερατίνης, με αποτέλεσμα η κεράτινη στιβάδα να είναι ελαστική και στέρεα, δύο χαρακτηριστικά που την καθιστούν κατάλληλη για το ρόλο της σαν φραγμό. Πράγματι, η κεράτινη στιβάδα είναι ο κύριος φραγμός του δέρματος και χρησιμεύει ως αποθηκευτικός χώρος εξωγενών ουσιών, τοξικών και μη (2,10,14).

Η μελανογένεση είναι επίσης μία σημαντική λειτουργία που επιτελείται στο δέρμα. Για το χρώμα του δέρματος ευθύνεται η ποσότητα και το είδος της χρωστικής μελανίνης, το πάχος της κεράτινης στιβάδας, η κοκκώδης στιβάδα και η αιμάτωση του δέρματος. Υπεύθυνα κύτταρα για την παραγωγή της μελανίνης, είναι τα μελανοκύτταρα, όπου είτε παραμένει εκεί είτε μεταναστεύει μέσω των δενδριτών στην ακανθωτή στιβάδα ή το χόριο. Τα επίπεδα παραγωγής της μελανίνης αυξάνονται σημαντικά μετά από έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, με αποτέλεσμα το δέρμα να αποκτά το χαρακτηριστικό χρώμα του μαυρίσματος. Η μελανίνη έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της επικίνδυνης υπεριώδους ακτινοβολίας του ηλίου (14,15).

Τέλος το δέρμα αποτελεί τμήμα του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς αφενός ανήκει στους μηχανισμούς της μη ειδικής άμυνας και αφετέρου αντιδρά άμεσα σε ερεθίσματα που οδηγεί στην ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσίας. Αναφορικά με το ρόλο του στην μη ειδική άμυνα είναι γνωστό ότι το υγιές άθικτο δέρμα προβάλλει μεγάλη αντίσταση στην είσοδο των παθογόνων μικροοργανισμών στον οργανισμό. Από την άλλη πλευρά στο δέρμα υπάρχουν κύτταρα τα οποία εμπλέκονται στην επίκτητη ανοσία: τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Langerhans-επιδερμίδα και πλασματοειδή/μυελοειδή δενδριτικά-χόριο), τα ιστιοκύτταρα, τα μαστοκύτταρα, τα T λεμφοκύτταρα, τα πλασματοκύτταρα (B λεμφοκύτταρα), τα μακροφάγα, και φυσικά φονικά κύτταρα. Τα πλασματοκύτταρα του δέρματος συμμετέχουν στην παραγωγή αντισωμάτων και έχει παρατηρηθεί αύξηση του αριθμού των λεμφοκυττάρων του δέρματος σε συνθήκες αυξημένου άγχους, με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται εντονότερες δερματικές ανοσολογικές αντιδράσεις (14).

1.2 Ανοσοποιητικό σύστημα

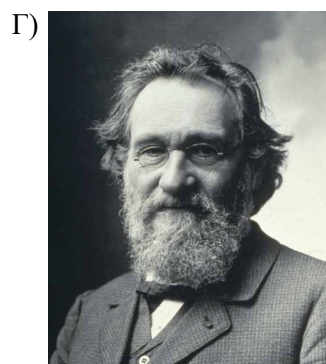
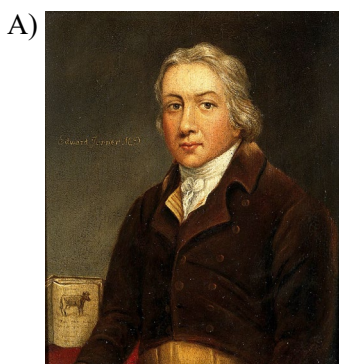
Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα πολύπλοκο σύνολο οργάνων, κυττάρων και μορίων τα οποία δημιουργούν ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων με σκοπό την προστασία του οργανισμού έναντι κάθε βλαβερού ερεθίσματος του περιβάλλοντος. Το ερέθισμα αυτό αναγνωρίζεται από τον οργανισμό ως κάτι ξένο και μπορεί να είναι εξωγενές όπως ένας μικροοργανισμός ή ενδογενές όπως τα νεοπλασματικά κύτταρα. Η σημαντική αυτή λειτουργία είναι γνωστή με τον όρο «ανοσία», ο οποίος προέρχεται από τον λατινικό όρο “*immunis*” που σημαίνει απαλλάσσω. Ο όρος αυτός καθιερώθηκε το 1910 για να δηλώσει την προστασία του οργανισμού από λοιμώδεις ασθένειες αν και οι πρώτες αναφορές επί της ανοσολογίας χρονολογούνται το 430 π.Χ όταν ο Θουκυδίδης, αναφέρει ότι «μόνο αυτοί που ανάρρωναν από την πανούκλα μπορούν να περιθάλψουν τους αρρώστους καθώς δε θα προσβληθούν από την ασθένεια δεύτερη φορά».

Εκ τότε ακολούθησαν πολλές ενδιαφέρουσες μελέτες και παρατηρήσεις από σπουδαίους επιστήμονες, οι οποίες οδήγησαν όχι μόνο σε μία πιο ολοκληρωμένη εικόνα της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και στην αξιοποίηση σημαντικών αμυντικών μηχανισμών για την προστασία των οργανισμών από ποικίλους παθογόνους μικροοργανισμούς. Έτσι ήδη τον 18^ο αιώνα, οι μικροβιολόγοι υποστήριζαν σθεναρά τον εμβολιασμό των υγιών ατόμων προκειμένου να προστατεύονται από τις ασθένειες και είναι

ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι επέμεναν σε αυτή την τακτική χωρίς ακόμα να είναι γνωστό ότι πολλές ασθένειες προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς καθώς και ότι τα κύτταρα της ανοσίας μπορούν να σκοτώσουν αυτούς τους μικροοργανισμούς. Το πρώτο εμβόλιο αποδίδεται στον Edward Jenner (Εικόνα 1.7Α), ο οποίος το 1798 σύνθεσε ένα ακατέργαστο εμβόλιο από το πύον των βλαβών της δαμαλίας της το οποίο παρείχε επιτυχώς ανοσία στην ευλογιά (16). Η ανακάλυψη αυτή προήλθε μετά από την παρατήρηση του Edward Jenner ότι κάποιες εργαζόμενες που άρμεγαν ζώα παρουσίασαν ανοσία στην ευλογιά αφού προηγουμένως είχαν προσβληθεί από δαμαλίαση και χρονολογείται 100 πριν την καθιέρωση των αξιωμάτων του Koch, τα οποία επισφράγισαν τους παθογόνους μικροοργανισμούς σαν γενεσιουργό αιτία πολλών ασθενειών. Το επόμενο μεγάλο βήμα στην ανοσολογία ήρθε το 1881 με τα συμπεράσματα του Louis Pasteur (Εικόνα 1.7Β) για την ανοσία στη χολέρα και με τη πειραματική επιβεβαίωση της δυνατότητας χρήσης ενός εξασθενημένου παθογόνου σαν εμβόλιο. Έναν χρόνο αργότερα ο Eli Metchnikoff (Εικόνα 1.7Γ) αναγνώρισε την ικανότητα των λευκών αιμοσφαιρίων να καταστρέφουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς μέσω της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης. Τα σπουδαία συμπεράσματα του Eli Metchnikoff τον καθιέρωσαν σαν έναν από τους πιο σπουδαίους επιστήμονες στον τομέα της ανοσολογίας δικαιολογώντας τον τίτλο «Πατέρας της φυσικής ανοσίας» (17). Την ίδια περίπου περίοδο (1889) οι Emil Von Behring και Shibasaburo Kitasato με τα πειράματα τους αναγνώρισαν τον σπουδαίο ρόλο των αντισωμάτων στην αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών και ασφαλώς η συνεισφορά τους είναι θεμελιώδης στην εξέλιξη της ανοσολογίας (18,19). Σημαντική είναι επίσης και οι συμβολή των Almroth Wright και Steward Douglas, οι οποίοι το 1903 απέδειξαν ότι η κυτταρική και χυμική ανοσία είναι εξίσου σημαντικοί μηχανισμοί στην άμυνα του οργανισμού και μάλιστα βρίσκονται σε άμεση συνεργασία. Συγκεκριμένα διαπίστωσαν ότι τα αντισώματα και το συμπλήρωμα αυξάνουν την φαγοκυττάρωση των βακτηρίων μέσω της διαδικασίας της οψωνοποίησης.(20).

Τέλος τις δεκαετίες του '60 και '70 ξεκίνησε η μελέτη της γενετικής βάσης της ανοσίας προκύπτοντας ιδιαίτερα ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα το 1965 οι Dreyer και Bennet στο άρθρο τους προτείνουν ότι ο ανασυνδυασμός του DNA των ανοσογονιδίων μπορεί να δώσει ανοσοποικιλομορφία (21), ενώ μερικά χρόνια αργότερα τα αποτελέσματα πολλών μελετών οδήγησαν στην αναγνώριση του V(D)J ανασυνδυασμού, ο οποίος είναι ένας μηχανισμός ανασυνδυασμού που συμβαίνει στα πρώτα στάδια ωρίμανσης των B και T

λεμφοκυττάρων και οδηγεί σε μία μεγάλη δεξαμενή διαφορετικών αντισωμάτων (τα οποία παράγονται από τα Β λεμφοκύτταρα) και υποδοχέων στην επιφάνεια των Τ λεμφοκυττάρων (T Cell Receptors -TCRs) (22). Σήμερα βέβαια έχουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τη λειτουργία και τον ρόλο του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία οφείλεται στην γνώση της ανατομίας του ανοσοποιητικού συστήματος, στην αναγνώριση των υπεύθυνων κυττάρων και στην κατανόηση του τρόπου λειτουργίας τους, στην διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών και μονοπατιών που εμπλέκονται στην ανοσολογική αντίδραση αλλά της γενετικής βάσης αυτών των μηχανισμών. Επίσης σήμερα έχει καταστεί σαφές ότι οι μηχανισμοί του ανοσοποιητικού συστήματος αφορούν όχι μόνο τους λοιμογόνους παράγοντες, αλλά και τους μη λοιμογόνους μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι διάφοροι τύποι καρκίνου, οι μεταμοσχευμένοι ιστοί (απόρριψη μοσχεύματος), τα αλλεργιογόνα (αλλεργία) αλλά και οι ιστοί του ίδιου του οργανισμού (αυτοανοσία).



Εικόνα 1.7
A) Edward Jenner, B) Louis Pasteur, Γ) Eli Metchnikoff

1.2.1 Μη ειδική και ειδική ανοσία

Η ανοσία διακρίνεται σε μη ειδική ή φυσική ή έμφυτη (innate immunity) και σε ειδική ή επίκτητη (adaptive immunity). Η μη ειδική ανοσία υπάρχει από την γέννηση και δεν παρουσιάζει μεταβολές και εξέλιξη με την πάροδο των χρόνων. Από εξελικτικής άποψης η μη ειδική ανοσία προϋπάρχει της ειδικής και απαντάται τόσο στα ασπόνδυλα όσο και στα σπονδυλώτα. Η μη ειδική άμυνα είναι η πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών και ενεργοποιείται άμεσα όταν έρθει σε επαφή με αυτούς. Στην μη ειδική ανοσία περιλαμβάνονται αφενός οι φυσιολογικοί φραγμοί του δέρματος και των βλεννογόνων, που αποτελούν ένα σημαντικό εμπόδιο στην είσοδο των παθογόνων μικροοργανισμών στα εσωτερικά και πιο ευπαθή όργανα του σώματος, και αφετέρου αμυντικοί μηχανισμοί, οι οποίοι ενεργοποιούνται μετά την επίδραση του βλαπτικού ερεθίσματος. Το

βασικό χαρακτηριστικό αυτών των μηχανισμών είναι ότι δεν παρουσιάζουν καμία ειδικότητα, που σημαίνει ότι ενεργοποιούνται ανεξάρτητα από το είδος και τα χαρακτηριστικά του εκάστοτε παθογόνου μικροοργανισμού. Το έναυσμα για την ενεργοποίηση των μηχανισμών της μη ειδικής άμυνας είναι οι διαφορές που δημιουργούνται από την παρουσία του εκάστοτε παθογόνου στο εσωτερικό του οργανισμού. Εκτός από το δέρμα και τους βλεννογόνους, στη μη ειδική άμυνα συμμετέχουν επίσης οι αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται στο δέρμα και τους βλεννογόνους, τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας [κοκκιοκύτταρα (ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, ουδετερόφιλα), τα δενδριτικά κύτταρα, τα σιτευτικά κύτταρα και τα φυσικά φονικά κύτταρα], οι κυτταροκίνες, οι οποίες ρυθμίζουν και οργανώνουν τη δράση των κυττάρων της ειδικής και της μη ειδικής ανοσίας, οι κυκλοφορούσες πρωτεΐνες οι οποίες πυροδοτούν το μονοπάτι της φλεγμονής (πρωτεΐνες του συμπληρώματος, αντιμικροβιακά πεπτίδια, πρωτεΐνες οξείας φάσης), μεμβρανικοί και ενδοκυτταρικοί υποδοχείς (TLRs και NOD-like receptors) και κυκλοφορούντα φυσικά αντισώματα. Οι μηχανισμοί της μη ειδικής ανοσίας προστατεύουν τον οργανισμό από τα ξένα στοιχεία έως ότου να ενεργοποιηθούν οι μηχανισμοί της ειδικής άμυνας (16,23).

Εκτός από τον ρόλο της μη ειδικής ανοσίας στην άμεση και γρήγορη αντιμετώπιση του εκάστοτε παθογόνου μικροοργανισμού, συμβάλει επίσης, σε συνδυασμό με την αναγνώριση ειδικών για κάθε οργανισμό μορίων, στην ενεργοποίηση των μηχανισμών της ειδικής ανοσίας. Η τελευταία αποτελεί έναν πιο εξελιγμένο μηχανισμό άμυνας που βασίζεται στην ενεργοποίηση πολυάριθμων μηχανισμών όπου συμμετέχει ποικιλία μορίων και στη συνεργασία διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Ενεργοποιείται όψιμα και εξελίσσεται μετά από κάποιο χρονικό διάστημα (μέρες ή εβδομάδες) μετά την επαφή με τον βλαπτικό παράγοντα. Τα βασικά κύτταρα που συμμετέχουν στην ειδική ανοσία είναι τα T και B λεμφοκύτταρα, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των λευκών αιμοσφαιρίων. Μάλιστα αυτοί οι κυτταρικοί τύποι αποτελούν τη βάση της διάκρισης της ειδικής ανοσίας σε κυτταρική (ενεργοποίηση T κυττάρων) και χυμική ανοσία (ενεργοποίηση B κυττάρων και παραγωγή αντισωμάτων). Ασφαλώς η κατηγοριοποίηση αυτή γίνεται για την καλύτερη μελέτη και κατανόηση αυτών των τύπων ανοσίας καθώς στην πραγματικότητα η κυτταρική και χυμική ανοσία βρίσκονται σε στενή συνεργασία και αποτελούν μία λειτουργική συνέχεια. Χαρακτηριστικό αυτής της συνέχειας είναι το γεγονός ότι τα T λεμφοκύτταρα συμμετέχουν στην επαγωγή της χυμικής ανοσίας και ταυτόχρονα τα αντισώματα λαμβάνουν μέρος στις κυτταροεξαρθρώμενες αντιδράσεις.

Τα βασικά χαρακτηριστικά της ειδικής ανοσίας είναι η:

- i. Ειδικότητα, που σημαίνει ότι οι αντίστοιχοι μηχανισμοί ενεργοποιούνται από συγκεκριμένο αντιγόνο και εξουδετερώνουν μόνο το αντιγόνο που προκάλεσε την ενεργοποίησή τους
- ii. Μνήμη, που σημαίνει ότι οι αντίστοιχοι μηχανισμοί «θυμούνται» τα παθογόνα που έχουν αντιμετωπίσει στο παρελθόν με αποτέλεσμα να αντιδρούν γρηγορότερα σε επόμενη επαφή (16).

Τα χαρακτηριστικά αυτά αποτελούν και τις ειδοποιούς διαφορές ανάμεσα στην ειδική και τη μη ειδική ανοσία. Επιπλέον κάθε ανοσολογική απόκριση χαρακτηρίζεται από τρεις φάσεις. Πιο αναλυτικά η έναρξη της ενεργοποίησης της ανοσολογικής απάντησης σηματοδοτείται από την είσοδο του αντιγόνου στον οργανισμό. Αυτό σημαίνει πως το αντιγόνο έχει ξεπεράσει τους μηχανισμούς της μη ειδικής ανοσίας, οι οποίοι δεν έχουν καταπολεμήσει το αντιγόνο με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μηχανισμών της ειδικής ανοσίας. Στην πρώτη φάση, η οποία ονομάζεται και φάση αναγνώρισης, το αντιγόνο συνδέεται σε ειδικούς λεμφοκυτταρικούς υποδοχείς. Ακολουθεί η φάση της ενεργοποίησης κατά τη διάρκεια της οποίας ο λεμφοκυτταρικός κλώνος που είναι ειδικός για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται στον αντίστοιχο κλώνο λεμφοκυττάρων τα οποία είναι ικανά να αναγνωρίζουν και να εξουδετερώνουν ειδικό το αντιγόνο που προκάλεσε την παραγωγή τους. Στη φάση ενεργοποίησης, τα Β λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε κύτταρα που παράγουν αντισώματα (πλασματοκύτταρα), δηλαδή πρωτεϊνικά μόρια τα οποία συνδέονται με τα αντίστοιχα διαλυτά αντιγόνα και με αυτόν τον τρόπο πυροδοτούνται οι μηχανισμοί εξουδετέρωσης των αντιγόνων. Επίσης παρατηρείται διαφοροποίηση και των Τ λεμφοκυττάρων, αφενός σε κύτταρα που ενεργοποιούν τα φαγοκύτταρα για την καταστροφή των μικροοργανισμών και αφετέρου σε Τ κύτταρα που προκαλούν τη λύση των κυττάρων που παράγουν/εμφανίζουν στην επιφάνεια τους ξένα αντιγόνα (π.χ. ιϊκές πρωτεΐνες). Τέλος, η τρίτη δραστική φάση περιλαμβάνει την εξουδετέρωση του αντιγόνου από τα αντίστοιχα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα. Στη διάρκεια της δραστικής φάσης γίνεται επίσης παραγωγή Τ και Β κυττάρων μνήμης με σκοπό την γρήγορη παραγωγή αντισωμάτων και κατάλληλων κυττάρων της κυτταρικής ανοσίας σε περίπτωση επόμενης επαφής με το ίδιο αντιγόνο. Μετά την εξουδετέρωση του αντιγόνου ο πληθυσμός των Τ κατασταλτικών κυττάρων, που είναι υπεύθυνος για την επαναφορά της ισορροπίας του ανοσοποιητικού, αυξάνεται (16).

Όπως προαναφέρθηκε διακρίνονται δύο τύποι ειδικής ανοσίας ανάλογα με το είδος των λεμφοκυττάρων που εμπλέκονται στους εκάστοτε μηχανισμούς: η *κυτταρική* (T λεμφοκύτταρα) και η *χυμική* (B λεμφοκύτταρα-αντισώματα) ανοσία. Η χυμική ανοσία χαρακτηρίζεται από την παραγωγή αντισωμάτων (ανοσοσφαιρίνες) και είναι ο κύριος προστατευτικός μηχανισμός έναντι εξωκυττάρων μικροοργανισμών αλλά και των τοξινών που παράγονται από αυτούς. Μεσολαβείται από τα B λεμφοκύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται (παρουσία κατάλληλων ερεθισμάτων) σε πλασματοκύτταρα και εκκρίνουν αντισώματα. Η εμφάνιση των αντισωμάτων στην κυκλοφορία δεν γίνεται αμέσως μετά την επαφή με το ανοσογόνο αλλά μεσολαβεί μια περίοδος λίγων ημερών, η οποία είναι γνωστή σαν λανθάνουσα ή επαγωγική περίοδος. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου γίνεται η αναγνώριση του αντιγόνου, η κατεργασία και μεταφορά του στα κατάλληλα κύτταρα προκειμένου να γίνει η σύνθεση των αντίστοιχων αντισωμάτων. Η διάρκεια της λανθάνουσας περιόδου ποικίλλει και εξαρτάται από παράγοντες που αφορούν α) το αντιγόνο, β) τον τρόπο χορήγησης και γ) τον ξενιστή. Με το πέρας της περιόδου αυτής ξεκινά η βιοσύνθεση του αντισώματος, η οποία διαιρείται σε τρεις φάσεις:

- Πρώτη φάση (λογαριθμική), όπου παρατηρείται λογαριθμική αύξηση του αντισώματος (4-10 ημέρες) ανάλογα με τη φύση του ανοσογόνου και τις συνθήκες ανοσοποίησης.
- Δεύτερη φάση (δυναμική ισορροπία- steady state/plateau) κατά τη διάρκεια της οποίας η συγκέντρωση του αντισώματος παραμένει σταθερή.
- Τρίτη φάση (πτωτική), όπου ο ρυθμός καταβολισμού είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό σύνθεσης του αντισώματος. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης των αντισωμάτων καταλήγοντας στην πλήρη εξαφάνιση του (πρωτογενής απάντηση-primary response) (16,22).

Σε περίπτωση δεύτερης επαφής με το ίδιο ανοσογόνο ακόμα και μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα παρατηρείται λαμβάνει χώρα η δευτερογενής απόκριση, στην οποία παράγονται τα ίδια με την πρωτογενή απόκριση, αντισώματα. Οι διαφορές ανάμεσα στην πρωτογενή και τη δευτερογενή απόκριση είναι ότι η τελευταία χαρακτηρίζεται από βραχύτερη λανθάνουσα περίοδο, ταχύτερη παραγωγή και υψηλότερο τίτλο αντισώματος που διατηρείται για περισσότερο χρόνο. Στη δευτερογενή απόκριση ενεργοποιείται άμεσα ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων μνήμης με αποτέλεσμα να η λανθάνουσα περίοδος να είναι πιο σύντομη και ταχύτερος ο ρυθμός σύνθεσης των αντισωμάτων. Τα αντισώματα που εμφανίζονται στην αρχή της πρωτογενούς απάντησης είναι τα IgM και αργότερα εμφανίζονται τα IgG τα οποία

ανιχνεύονται εφόσον υπάρχουν ακόμα τα IgM. Ενώ τα IgM αντισώματα ανιχνεύονται δύσκολα μετά από 1-2 εβδομάδες, ο τίτλος των IgG αυξάνεται για περισσότερο χρόνο και στη συνέχεια πέφτει. Στη δευτερογενή απάντηση τα αντισώματα είναι IgG, ενώ τα IgM αποτελούν μικρό ποσοστό. Ο τίτλος των IgG φθάνει γρήγορα σε υψηλό σημείο και μετά μειώνεται με βραδύ ρυθμό (16,22).

Από την άλλη πλευρά η κυτταρική ανοσία μεσολαβείται από τα T λεμφοκύτταρα, τα οποία σε συνεργασία με τα φαγοκύτταρα (μόρια της φυσικής ανοσίας) καταστρέφουν μικρόβια όπως μύκητες, βακτήρια και κύτταρα μολυσμένα από ιούς προάγοντας τελικά την λύση των μολυσμένων κυττάρων ή την καταστροφή τους (16,22).

1.2.2 Όργανα, κύτταρα και διαβιβαστές του ανοσοποιητικού συστήματος

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ιδιαίτερα πολύπλοκο και εκτενές, γεγονός που συνεπάγεται ότι στα συστατικά αυτού του συστήματος περιλαμβάνονται πολλά και διαφορετικά όργανα, αρκετοί κυτταρικοί τύποι και ασφαλώς ειδικά μόρια διαβιβαστές, τα οποία εξασφαλίζουν την επικοινωνία μεταξύ αυτών των συστατικών.

➤ Όργανα

Τα όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος κατατάσσονται στα πρωτογενή και δευτερογενή. Ο θύμος αδένας και ο μυελός των οστών είναι τα πρωτογενή λεμφικά όργανα, στα οποία παράγονται και ωριμάζουν τα λεμφοκύτταρα. Μετά την ωρίμανση τους τα λεμφοκύτταρα εγκαταλείπουν τα πρωτογενή λεμφικά όργανα και μεταφέρονται στην κυκλοφορία του αίματος, χωρίς ωστόσο να έχουν έρθει ακόμα σε επαφή με οποιονδήποτε ξένο παράγοντα. Λόγω αυτής της ιδιότητας τα λεμφοκύτταρα ονομάζονται σε αυτή τη φάση «αθώα λεμφοκύτταρα» (naïve lymphocytes). Η επαφή ανάμεσα στον ξένο παράγοντα και τα λεμφοκύτταρα καθώς και η ενεργοποίηση αυτών λαμβάνει χώρα στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, τα οποία είναι οι ιστοί που σχετίζονται με τους βλεννογόνους, οι αμυγδαλές, οι πλάκες του Peyer στο έντερο και κυρίως ο σπλήνας και οι λεμφαδένες. Τα όργανα αυτά λειτουργούν σαν φίλτρα, τα οποία φιλτράρουν τη λέμφο, μέσω της οποίας φτάνουν σε αυτά τόσο τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όσο και τα αντιγόνα που κυκλοφορούν στον οργανισμό. Μέσω αυτού του φιλτραρίσματος, οι λεμφαδένες και ο σπλήνας κατακρατούν τα αντιγόνα και τελικά τα εκθέτουν στα λεμφοκύτταρα, ευαισθητοποιώντας με αυτόν τον τρόπο αυτά τα κύτταρα στα διάφορα αντιγόνα. Στη συνέχεια τα ευαισθητοποιημένα πλέον λεμφοκύτταρα επιστρέφουν

στην κυκλοφορία του αίματος, όπου αν συναντήσουν ξανά κάποιο από τα αντιγόνα θα το αναγνωρίσουν και θα το εξουδετερώσουν (16).

➤ **Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος**

Η ειδική προς το αντιγόνο ανοσολογική απόκριση βασίζεται στη δράση δύο τύπων κυττάρων: των T και B λεμφοκυττάρων (Εικόνα 1.8). Είναι τα κύτταρα που αναγνωρίζουν και αντιδρούν ειδικά με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Προέρχονται, όπως και τα άλλα έμμορφα στοιχεία του αίματος, από βλαστικά κύτταρα του εμβρυϊκού ασκού, το χαρακτηριστικό των οποίων είναι ότι είναι πολυδύναμα, δηλαδή μπορούν να δώσουν γένεση σε όλα τα κύτταρα του αίματος (κύτταρα της ερυθράς, λεμφικής, κοκκώδους και μεγακαρυοκυτταρικής σειράς). Στα κύτταρα της λεμφικής σειράς ανήκουν τα ώριμα B (Bursa ή Bone marrow derived) και τα T (Thymus derived) λεμφοκύτταρα. Τα T λεμφοκύτταρα παράγονται στον μυελό των οστών και κατά την εμβρυϊκή και νεογνική ζωή μεταναστεύουν στον θύμο αδέν. Εκεί τα T λεμφοκύτταρα ωριμάζουν και διαφοροποιούνται στα ώριμα T λεμφοκύτταρα, τα οποία πλέον εντοπίζονται στη λέμφο αλλά και στην κυκλοφορία του αίματος, όπου αποτελούν το 80-90% των λεμφοκυττάρων του αίματος. Είναι ενδιαφέρον ότι τα T λεμφοκύτταρα, ελέγχουν όχι μόνο τη δική τους λειτουργία αλλά και άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται τα B λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα. Η ρύθμιση αυτή επιτυγχάνεται μέσω της παραγωγής και έκκρισης ειδικών μορίων που ονομάζονται κυτταροκίνες (16,22,24). Διακρίνονται σε:

- *Βοηθητικά* T-λεμφοκύτταρα, τα οποία ενεργοποιούνται από το εκτεθειμένο στην επιφάνεια των μακροφάγων τμήμα του αντιγόνου και στη συνέχεια ενεργοποιούν τα B-λεμφοκύτταρα ή άλλα είδη T-λεμφοκυττάρων μέσω ουσιών που εκκρίνουν. Χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτών των κυττάρων είναι παρουσία στην επιφάνειά τους του μορίου CD4. Η επαφή αυτών των κυττάρων με κάποιο αντιγονικό παράγοντα οδηγεί στην ενεργοποίησή τους, στα πλαίσια της οποίας παράγουν και εκκρίνουν κυτταροκίνες. Τα τελευταία μόρια προάγουν τον πολλαπλασιασμό άλλων CD4(+) κυττάρων των B και άλλων T λεμφοκυττάρων καθώς και των μακροφάγων.
- *Κυτταροτοξικά* T-λεμφοκύτταρα, τα οποία ενεργοποιούνται από τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα και καταστρέφουν καρκινικά κύτταρα ή κύτταρα που έχουν προσβληθεί από

κάποιον ιό. Τα συγκεκριμένα κύτταρα έχουν στην επιφάνειά τους το μόριο CD8 και ενεργοποιούνται από τα CD4 κύτταρα

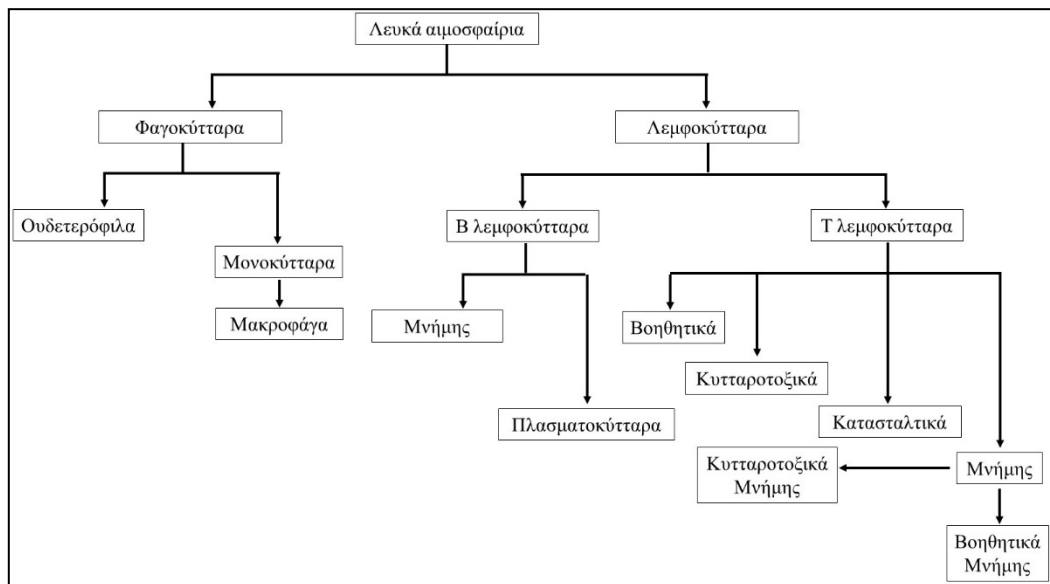
- *T-λεμφοκύτταρα μνήμης*, τα οποία παράγονται μετά την έκθεση του οργανισμού σε ένα αντιγόνο και έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούνται αμέσως μετά από επόμενη έκθεση του οργανισμού σε αυτό.
- *Κατασταλτικά T-λεμφοκύτταρα*, έχουν κατασταλτική δράση κι έτσι τερματίζουν την ανοσοβιολογική απόκριση μετά την επιτυχή αντιμετώπιση του αντιγόνου (22–24).

Η δεύτερη κατηγορία κυττάρων της ειδικής ανοσίας είναι τα B λεμφοκύτταρα, τα οποία αποτελούν το 10-15% των λεμφοκυττάρων του αίματος. Τα B λεμφοκύτταρα παράγονται στον μυελό των οστών και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των αντισωμάτων. Στην κυτταρική μεμβράνη των B λεμφοκυττάρων αναγνωρίζονται μόρια ανοσοσφαιρινών τα οποία αποτελούν τους αντιγονικούς υποδοχείς αυτών των κυττάρων (BCRs - B Cell Receptors). Ο BCR αποτελείται από την επιφανειακή IgM η οποία συνδέεται με δυο ετεροδιμερή μόρια τα Iga και Igβ. Η αλληλεπίδραση των αντιγόνων με τους BCR υποδοχείς οδηγεί στην ενεργοποίηση των πρώιμων B λεμφοκυττάρων τα οποία τελικά ωριμάζουν και διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα. Τα τελευταία είναι τα υπεύθυνα για την παραγωγή και απελευθέρωση των αντισωμάτων που είναι ειδικά για το αντιγόνο που προκάλεσε την παραγωγή τους. Τα αντισώματα αυτά συνδέονται με τα αντίστοιχα διαλυτά αντιγόνα και κινητοποιούν τους μηχανισμούς εξουδετέρωσής τους. Η ανάπτυξη και διαφοροποίηση της B λεμφοκυτταρικής σειράς πραγματοποιείται σε δύο στάδια: 1. αρχικό μη αντιγονοειδικό στάδιο (προ-B λεμφοκύτταρο μέχρι ώριμο B λεμφοκύτταρο) και 2. αντιγονοειδικό στάδιο (B λεμφοκύτταρο μέχρι πλασματοκύτταρο) (16,22–24).

Διαθέτοντας το ανοσοποιητικό σύστημα αυτές τις δύο κατηγορίες κυττάρων, στην πράξη έχει τη δυνατότητα να διακρίνει με μεγάλη ακρίβεια δυο διαφορετικά ερεθίσματα. Η δυνατότητα αυτή οφείλεται στην ύπαρξη στην επιφάνεια των T και B λεμφοκυττάρων των εξαιρετικά εξειδικευμένων υποδοχέων, οι οποίοι μπορούν να αναγνωρίζουν και να αλληλεπιδρούν με πολλά και διαφορετικά αντιγόνα. Οι υποδοχείς αυτοί είναι ο κυτταρικός υποδοχέας των T λεμφοκυττάρων και οι ανοσοσφαιρίνες των B λεμφοκυττάρων. Το κοινό χαρακτηριστικό αυτών των υποδοχέων, που ανήκουν στην ίδια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, είναι ότι διαθέτουν μεγάλη ποικιλομορφία. Πράγματι έχει υπολογιστεί ότι οι περιοχές που αναγνωρίζουν το αντιγόνο μπορεί να είναι της τάξης των 10^7 ανασυνδυασμών. Συνεπώς το

ανοσοποιητικό σύστημα διαθέτει ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών υποδοχέων, μέσω των οποίων έχει τη δυνατότητα να αναγνωρίζει μία μεγάλη ποικιλία αντιγόνων. Το ανοσοποιητικό σύστημα παράγει κύτταρα μνήμης, τα οποία αφορούν τα Τ και Β λεμφοκύτταρα. Πρόκειται για μακρόβια κύτταρα τα οποία μπορούν να αναγνωρίζουν το ίδιο αντιγόνο καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής τους (16,23).

Μία άλλη κατηγορία κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος είναι τα φαγοκύτταρα στα οποία ανήκουν τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Αυτά κυκλοφορούν στο αίμα και «επιτηρούν» για πιθανές εισβολές παθογόνων μικροοργανισμών στον οργανισμό. Σε περίπτωση τέτοιας εισβολής, τα φαγοκύτταρα καταστρέφουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς μέσω της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης, στα πλαίσια της οποίας παράγονται και απελευθερώνονται τοξικές ουσίες, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και ένζυμα. Τα φαγοκύτταρα μέσω αυτής της διαδικασίας εμπλέκονται στην μη ειδική ανοσία, ωστόσο παίζουν σημαντικό ρόλο και στην μη ειδική ανοσία. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης ο παθογόνος μικροοργανισμός κατακερματίζεται και μέρος των παραγόμενων θραυσμάτων παρουσιάζονται τελικά στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων. Τα θραύσματα αυτά στη συνέχεια αποτελούν το αντιγονικό ερέθισμα το οποίο πυροδοτεί την επακόλουθη ειδική ανοσολογική απόκριση. Λόγω αυτής της λειτουργίας τα κύτταρα αυτά είναι επίσης γνωστά και σαν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (18,23).



Εικόνα 1.8 Κύτταρα ανοσοποιητικού συστήματος

➤ Διαβιβαστές: Κυτταροκίνες και Χημειοκίνες

Ένα βασικό χαρακτηριστικό του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η ύπαρξη ενός πολύπλοκου δικτύου αλληλεπιδράσεων, το οποίο επιτρέπει την επικοινωνία, τον συντονισμό και την μετακίνηση των επιμέρους συστατικών έτσι ώστε τελικά να επιτευχθεί η ολοκληρωμένη και πλήρως λειτουργική ανοσολογική απόκριση. Η επικοινωνία μεταξύ των διαφορετικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος επιτυγχάνεται μέσω μικρών πρωτεϊνικών μορίων, τα οποία ονομάζονται *κυτταροκίνες* και παράγονται από διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Οι κυτταροκίνες μπορούν να δράσουν σε τρία επίπεδα:

- Ενδοκρινικά, δρουν δηλαδή σε μακρινό κύτταρο-στόχος
- Παρακρινικά, δρουν δηλαδή σε παρακείμενο κύτταρο-στόχος
- Αυτοκρινικά, δρουν δηλαδή στο ίδιο κύτταρο που τις παράγει.

Επίσης, οι κυτταροκίνες κατατάσσονται με βάση τις λειτουργικές τους ιδιότητες σε τέσσερις κατηγορίες:

- *Αναπτυξιακοί παράγοντες*, οι οποίοι προάγουν την ανάπτυξη και ωρίμανση κάποιων κυττάρων
- *Ανοσορυθμιστικές κυτταροκίνες*, οι οποίες ρυθμίζουν την ωρίμανση και ανάπτυξη υποομάδων των T λεμφοκυττάρων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της κατηγορίας είναι η ιντερλευκίνη-2 (IL-2), ιντερλευκίνη-4 (IL-4) και η ιντερφερόνη -γ (IFN-γ)
- Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, οι οποίες είναι απαραίτητες για την έναρξη και εξέλιξη της φλεγμονής. Παραδείγματα αυτών των κυτταροκινών είναι ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor-TNF), η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και ιντερλευκίνη-6 (IL-6)
- Αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, οι οποίες έχουν κατασταλτικό ρόλο αναφορικά με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (Tumor Growth Factor-TGF) και ιντερλευκίνη-10 (IL-10) (16,18).

Στα μόρια-διαβιβαστές του ανοσοποιητικού συστήματος ανήκουν επίσης μόρια, τα οποία ονομάζονται *χημειοκίνες* και ο ρόλος τους είναι η προσέλκυση των κατάλληλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στο σημείο του οργανισμού που έχει υποστεί βλάβη. Συγκεκριμένα οι χημειοκίνες είναι μικρά μόρια τα οποία παράγονται κατά την διάρκεια της

φλεγμονώδους αντίδρασης, με αποτέλεσμα τελικά τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος να φθάνουν στην περιοχή που εκδηλώνεται η φλεγμονή συνεισφέροντας έτσι στην συνολική προσπάθεια του ανοσοποιητικού συστήματος για την εξουδετέρωση του αντιγόνου (24).

1.2.3 Μηχανισμοί ανοσολογικής ανοχής και αυτοανοσία

➤ Ανοσολογική ανοχή

Η εύρυθμη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην ικανότητα να ξεχωρίζει τα δικά του συστατικά από τα ξένα και να δρα ειδικά ενάντια στα «ξένα» παθογόνα. Η ικανότητα αυτή του ανοσοποιητικού συστήματος να παραμένει ανενεργό όταν έρχεται σε επαφή με τα αντιγόνα του ίδιου του οργανισμού, ονομάζεται «*ανοχή*» (tolerance) ή «*αυτοανοχή*» (self tolerance). Αποτελεί μια εκ των θεμελιωδών ιδιοτήτων του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την προστασία του οργανισμού από την αναίτια ενεργοποίηση ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι του ίδιου. Η αυτοανοχή είναι μια διαρκής και ενεργός διαδικασία, η οποία, ανάλογα με το που επιτελείται, διακρίνεται σε *κεντρική* και *περιφερική*.

Οι μηχανισμοί της κεντρικής ανοχής ενεργοποιούνται στο θύμο αδένα για τα T λεμφοκύτταρα και στο μυελό των οστών για τα B λεμφοκύτταρα. Σε αυτούς τους μηχανισμούς περιλαμβάνεται 1. η εξάλειψη, κυρίως μέσω απόπτωσης, των «αυτοδραστικών» T ή B κυττάρων, δηλαδή των κυττάρων που αναγνωρίζουν με ισχυρή συγγένεια τα «συστατικά» του οργανισμού και 2. η μετάπτωση των κυττάρων που δεν αναγνωρίζουν κάποιο από τα ξένα αντιγόνα που παρουσιάζονται στο μικροπεριβάλλον σε κατάσταση μη λειτουργικής απόκρισης (ανέργεια). Αν και ένα μεγάλο ποσοστό αυτοδραστικών T και B κυττάρων απαλείφονται κεντρικά, παραμένει ένα μεγάλος αριθμός T και B αυτοδραστικών κυττάρων, τα οποία ξεφεύγουν από την κεντρική ανοχή και απελευθερώνονται στην περιφέρεια (25). Σε αυτή την περίπτωση, αυτοδραστικά κύτταρα καταστέλλονται και τίθενται υπό τον έλεγχο των μηχανισμών της περιφερικής ανοχής, η οποία είναι μία συνεχής διαδικασία καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής. Αυτή επιτελείται μέσω:

α) Της απόπτωσης των αυτοδραστικών κυττάρων ή μέσω της μετάβασης τους στην κατάσταση ανέργειας. Η κατάληξη αυτών των κυττάρων είτε στην απόπτωση είτε στην ανέργεια οφείλεται στην μη αποτελεσματική ενεργοποίησή τους, η οποία μπορεί να προκύψει με ποικίλους τρόπους. Συγκεκριμένα, η απουσία συνδιεγερτικών μηνυμάτων για την ενεργοποίηση των T

κυττάρων ή ειδικών βοηθητικών T κυττάρων για την ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων ή του κατάλληλου ισοζυγίου κυτταροκινών, δεν μπορεί να υποστηρίξει την αποτελεσματική ενεργοποίησή τους. Το αποτέλεσμα είναι τα λεμφοκύτταρα τελικά να μην προωθούνται προς την έκπτυξη ή τη διαφοροποίηση, αλλά σε απόπτωση ή ανέργια. β) Ρυθμιστικών μηχανισμών που αφορούν στη δράση ρυθμιστικών πληθυσμών T ή B λεμφοκυττάρων (ρυθμιστικά T ή B κύτταρα), και τη συνεπακόλουθη επικράτηση ρυθμιστικών κυτταροκινών, όπως TGF-β και IL-10, στο μικροπεριβάλλον (26).

➤ Αυτοανοσία

Η αυτοανοσία μπορεί να προκύψει λόγω αποτυχίας ή κατάρρευσης των μηχανισμών της αυτοανοχής. Οι λόγοι αυτής της δυσλειτουργίας είναι πολλαπλοί και σε αυτούς περιλαμβάνεται: α) η ελαττωματική εξάλειψη των αυτοδραστικών T ή B κυττάρων στα πρωτογενή λεμφικά όργανα, β) η μη αποτελεσματική αναστολή της λειτουργίας των αυτοδραστικών T ή B κυττάρων στους περιφερικούς ιστούς, γ) η συνεχής ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η τελευταία αιτία οφείλεται στη δυσλειτουργία των ρυθμιστικών μηχανισμών στους οποίους ανήκουν οι ρυθμιστικοί υποπληθυσμοί ανοσοκυττάρων, οι κυτταροκίνες και οι υποδοχείς της φυσικής και επίκτητης ανοσίας και οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την ισορροπημένη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Ωστόσο αξίζει να αναφερθεί ότι η εκδήλωση αυτοάνοσων αποκρίσεων δεν συνδέεται υποχρεωτικά με την εκδήλωση κάποιου αυτοάνοσου νοσήματος (autoimmune disease). Η εκδήλωση μίας τέτοιας ασθένειας φαίνεται να περιλαμβάνει πιο πολύπλοκες διαδικασίες, όπου οι αυτοδραστικές αποκρίσεις προκαλούν σοβαρή ιστική βλάβη η οποία με τη σειρά της θα επάγει κάποια σημαντική λειτουργική βλάβη του επηρεαζόμενου ιστού. Οι παθογενετικοί μηχανισμοί που οδηγούν στην απώλεια της ανοσολογικής ανοχής και στην ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Είναι όμως αποδεκτό ότι η παθογένεση αυτών των ασθενειών είναι αποτέλεσμα της συνδυασμένης επίδρασης γενετικών, περιβαλλοντικών, ορμονικών και νευροψυχολογικών παραγόντων (16,18,24).

Πράγματι, μέχρι σήμερα έχουν συσχετισθεί αρκετά γονίδια με την εκδήλωση αυτοάνοσων νοσημάτων, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται τα γονίδια του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MΣΙ), κυρίως της τάξης I, του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου (Human Leukocyte Antigen-HLA), της Il-2, του Fas και του FasL (27). Επιπρόσθετα έχουν

αναγνωριστεί πολυμορφισμοί αλλά και εναλλακτικά μετάγραφα γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια-ρυθμιστές των ανοσολογικών αποκρίσεων. Η διαφορετική έκφραση πολυμορφισμών ή των εναλλακτικών μεταγράφων γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροκίνες, χημειοκίνες ή συνδιεγερτικά μόρια, έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων (28). Η συμμετοχή των γενετικών παραγόντων στην εμφάνιση αυτοανοσίας επιβεβαιώνεται επίσης από μελέτες σε επίπεδο πληθυσμού, οικογενειών, και μονοζυγωτικών διδύμων αλλά και από μελέτες σε γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ζώων.

Ορμονικοί παράγοντες επίσης φαίνεται να συμμετέχουν στην ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων. Πράγματι πλήθος επιδημιολογικών μελετών δείχνουν υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης τέτοιων νοσημάτων στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες, σε μία αναλογία η οποία είναι της τάξης 9:1. Η συμμετοχή των ορμονών στην αυτοανοσία υποστηρίζεται επίσης από μελέτες σε ζωικά μοντέλα, όπου έχει παρατηρηθεί η ωοθηκεκτομή συνδέεται με ύφεση ή ακόμα και με μη εμφάνιση της ασθένειας (29,30). Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ο μηχανισμός δράσης των ορμονών στην ανάπτυξη και εκδήλωση των αυτοάνοσων νοσημάτων.

Μία ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι στην πλειονότητα των ασθενών που εμφανίζουν για πρώτη φορά ένα αυτοάνοσο νόσημα ή παρουσιάζει έξαρση κάποιου προϋπάρχοντος αναφέρουν ότι έχει προηγηθεί κάποιο ισχυρό ψυχοτραυματικό γεγονός, όπως η απώλεια αγαπημένου προσώπου ή εργασίας κ.α. Η παρατήρηση αυτή ασφαλώς συνδέει την ανάπτυξη και εκδήλωση των αυτοάνοσων νοσημάτων με την νευροψυχολογική κατάσταση των ασθενών και σήμερα γνωρίζουμε ότι υπάρχει ισχυρή βιολογική σχέση ανάμεσα στο στρες και το ανοσοποιητικό σύστημα, η οποία δικαιολογεί την συμμετοχή των νευροψυχολογικών παραγόντων στην παθογένεση των αυτοάνοσων νοσημάτων (29).

Τέλος, πλήθος μελετών υποστηρίζουν τη συμμετοχή ποικίλων περιβαλλοντικών παραγόντων, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται και οι λοιμώξεις από διάφορους μικροοργανισμούς, στην παθογένεση των αυτοάνοσων νοσημάτων. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η εμφάνιση κάποιων αυτοάνοσων νοσημάτων συνδέεται με ιούς [π.χ. ο EBV (31,32), ο ιός της ερυθράς (33), ο HCV (34), τα στελέχη B3 και B4 του ιού coxsackie (35,36), ο MTLV (37), ροταϊοί (38), ο HHV-6 (39,40), και ο HPV B19 (41)], με βακτήρια [π.χ. το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*) (42), στελέχη του γένους *Streptococcus* (43) και τα είδη *Novospingobium aromaticivorans* (44) και *Borrelia burgdorferi* (45)] και με διάφορα παράσιτα

[π.χ. στελέχη των γενών *Schistosomas* (46) και *Toxoplasma* (47), το είδος *Trypanosoma cruzi* (48), ο μύκητας *Aspergillus fumigatus* (49)]. Η χρήση κάποιων φαρμάκων καθώς και η έκθεση σε τοξίνες και υπεριώδη ακτινοβολία ανήκουν σε επιπλέον περιβαλλοντικούς παράγοντες που έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση αυτοανοσίας (50).

Αναφορικά με τους μηχανισμούς που ενεργοποιούνται στα αυτοάνοσα νοσήματα τα δεδομένα δείχνουν ότι ανήκουν τόσο μηχανισμούς τόσο των κυτταρικών όσο και χυμικών αποκρίσεων. Σήμερα γνωρίζουμε ότι οι αυτοάνοσες αποκρίσεις είναι αντιγόνο-οδηγούμενες και βασίζονται σε μηχανισμούς που είναι όμοιοι με αυτούς που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των φυσιολογικών ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι των «ξένων» αντιγόνων. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από παρατηρήσεις όπως: α) συγκεκριμένα αυτοάνοσα νοσήματα σχετίζονται με συγκεκριμένα αυτοαντισώματα, β) το μεγαλύτερο ποσοστό αυτοαντισωμάτων ανήκει στην IgG τάξη, υποδηλώνοντας την ύπαρξη αντιγόνο-εξαρτώμενης T-κυτταρικής βοήθειας (1), γ) οι αυτοάνοσες αποκρίσεις χαρακτηρίζονται από πολυκλωνικότητα, το οποίο σημαίνει ότι αναγνωρίζουν και στοχεύουν πολλαπλούς επίτοπους του ίδιου αυτοαντιγόνου (1) και δ) ενισχύονται και διαιώνονται με τη δράση των μηχανισμών της ενδο- και διαμοριακής επέκτασης επιτόπων (51).

Συγκεκριμένα για τις αυτοάνοσες χυμικές αποκρίσεις έχει βρεθεί ότι μπορεί να έχουν γενικευμένη δράση, οπότε χαρακτηρίζονται από την αυξημένη παραγωγή ανοσοσφαιρινών, ή μπορεί να έχουν εξειδικευμένη δράση οπότε παράγονται και εκκρίνονται αυτοαντισώματα το οποία είναι ειδικά και αναγνωρίζουν συγκεκριμένα στοιχεία του οργανισμού. Τα στοιχεία αυτά είναι κυρίως αντιγονικά σύμπλοκα αποτελούμενα από νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα το ματίσωμα (spliceosome) και το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο Ro/La (52).

Λόγω της αυξημένης παραγωγής αντισωμάτων συχνά παρατηρείται η δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων, η καθίζηση των οποίων σχετίζεται με ιστική βλάβη ή/και δυσλειτουργία. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα αυτοαντισώματα συνήθως χαρακτηρίζουν συγκεκριμένες αυτοάνοσες νόσους. Ωστόσο δεν έχει αποσαφηνιστεί αν η παραγωγή των αυτοαντισωμάτων είναι αποτέλεσμα της ιστικής βλάβης και της επακόλουθης παρουσίασης αυτοαντιγόνων, ή αν έχουν παθογενετικό ρόλο. Παρ' όλα αυτά η ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων σε εργαστηριακό επίπεδο έχει υψηλή διαγνωστική και προγνωστική αξία, ενώ συχνά περιλαμβάνονται στα διαγνωστικά κριτήρια αυτοάνοσων νοσημάτων (53).

1.3 Αυτοάνοσα πομφολυγώδη νοσήματα

Ο όρος «πέμφιγα» προέρχεται από την ελληνική λέξη «πέμφιξ» που σημαίνει φουσκάλα ή πομφόλυγα. Πρόκειται για μία ομάδα αυτοάνοσων νοσημάτων του δέρματος και των βλεννογόνων που χαρακτηρίζονται ιστοπαθολογικά από ενδοεπιδερμικές πομφόλυγες και ακανθόλυση, ενώ σε ανοσολογικό επίπεδο χαρακτηρίζονται από κυκλοφορούντα και καθηλωμένα αντισώματα εναντίον της επιφάνειας των επιδερμικών κυττάρων (54). Τα αυτοάνοσα πομφολυγώδη νοσήματα (Autoimmune Bullous Disorders-ABDs) αποτελούν μία ομάδα ετερογενών καταστάσεων που διακρίνονται στις επιφανειακές και στις εν τω βάθει και συνδέονται με την απώλεια της ανοχής των δομικών πρωτεϊνών του δέρματος. Το αποτέλεσμα αυτής της απώλειας είναι η παραγωγή αυτοαντισωμάτων τα οποία στοχεύουν επιδερμικές ή υπο-επιδερμικές πρωτεΐνες προσκόλλησης. Η επακόλουθη απώλεια της προσκόλλησης μεταξύ των κερατινοκυττάρων ή ανάμεσα στα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας με την υποκείμενη επιδερμική βασική μεμβράνη οδηγεί σε μειωμένη ανθεκτικότητα της επιδερμίδας με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενδοεπιθηλιακών ή υποεπιθηλιακών πομφολύγων στο δέρμα και στους βλεννογόνους. Οι ABD αποτελούν μία σημαντική αιτία σοβαρής νοσηρότητας αλλά και θνησιμότητας (55).

Η ταξινόμηση των ABD εξαρτάται από το πόσο έντονη είναι η εμφάνιση των πομφολύγων και περιλαμβάνει βασικές ομάδες που είναι γνωστές σαν «πεμφιγοειδή νοσήματα» (pemphigus diseases-PDs) και «πεμφιγοειδούς τύπου ABD». Τα PDs χαρακτηρίζονται από την παραγωγή παθογόνων αυτοαντισωμάτων τα οποία στοχεύουν διαφορετικές πρωτεΐνες των δεσμοσωματίων, οδηγώντας ιστολογικά στην εμφάνιση διεπιδερμικής πομφόλυγας. Υπάρχουν διάφοροι τύποι πεμφιγοειδών νοσημάτων, με τους πιο κοινούς τύπους να είναι η κοινή πέμφιγα (*Pemphigus vulgaris*), φυλλώδης πέμφιγα και παρανεοπλασματική πέμφιγα (Πίνακας 1). Οι διάφοροι κλινικοί τύποι πέμφιγας ταξινομούνται με βάση το επίπεδο του ενδοεπιδερμικού διαχωρισμού. Στην κοινή πέμφιγα, η οποία ανήκει στις εν τω βάθει πέμφιγες, οι πομφόλυγες εντοπίζονται ακριβώς πάνω από τη βασική στιβάδα της επιδερμίδας ενώ στην αντίστοιχη φυλλώδη, η οποία ανήκει στις επιφανειακές, οι πομφόλυγες σχηματίζονται στις ανώτερες στιβάδες της (56). Στις εν τω βάθει πομφολυγώδεις δερματοπάθειες ανήκει επίσης η βλαστική ενώ στις επιφανειακές συγκαταλέγεται επίσης η ερυθρηματώδης και η ενδημική. Τέλος, η φαρμακευτική, η νεογνική, η παρανεοπλασματική και η IgA πέμφιγα αποτελούν ιδιαίτερες μορφές της νόσου (54).

Πίνακας 1. Ταξινόμηση της Πέμφιγας (57)

Κοινή Πέμφιγα
Βλαστική πέμφιγα: Εντοπισμένη
Φαρμακευτική
Φυλλώδης πέμφιγα
Ερυθυματώδης πέμφιγα: Εντοπισμένη
Ενδημική
Φαρμακευτική
Παρανεοπλασματική

Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η γεωγραφική κατανομή και η εθνικότητα επηρεάζουν τη συχνότητα εμφάνισης της κοινής πέμφιγας. Για παράδειγμα η ασθένεια αυτή είναι ιδιαίτερα συχνή στους Εβραίους Ashkenazi, στους λαούς της Μεσογείου και στην Ινδία. Μάλιστα στις δύο τελευταίες περιπτώσεις η κοινή πέμφιγα εμφανίζει υψηλότερα ποσοστά σε σχέση με τη φυλλώδη. Για παράδειγμα η σύγκριση της συχνότητας εμφάνισης της κοινής πέμφιγας σε σχέση με τη φυλλώδη στο Ιράν και στη Φιλανδία αποκάλυψε ότι οι αντίστοιχες αναλογίες στο Ιράν και στη Φιλανδία είναι 12:1 και 0.5:1 αντίστοιχα. Παρόμοιες είναι και οι παρατηρήσεις σε σχέση με τη γεωγραφική κατανομή αυτών των διαταραχών καθώς έχει βρεθεί ότι στο Ιράν παρουσιάζονται ετησίως περίπου 10 περιστατικά κοινής πέμφιγας/100.000 πληθυσμού, ενώ αντίστοιχα στην Φιλανδία η αναλογία είναι 0.76/1.000.000 πληθυσμού. Ωστόσο, οι επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η συχνότητα εμφάνισης της κοινής πέμφιγας είναι ίδια μεταξύ των δύο φύλων, ενώ συνήθως η ηλικία έναρξης είναι 36-60 έτη. Τέλος παρόλο που, όπως προαναφέρθηκε, η φυλλώδης πέμφιγα είναι πιο σπάνια από την κοινή αντιπροσωπεύει το 10-20% των περιπτώσεων (54).

Από την άλλη πλευρά τα πεμφιγοειδούς τύπου ABD αποτελούν μία μεγάλη ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από την παραγωγή κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων τα οποία στοχεύουν πολλές δομικές πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης οδηγώντας ιστολογικά στην εμφάνιση υποεπιδερμικής πομφόλυγας. Οι βασικοί τύποι των πεμφιγοειδών τύπου ABD είναι το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές [bullous pemphigoid (BP)] και τα pemphigoid gestationis, mucous membrane pemphigoid, epidermolysis bullosa acquisita, και anti-p200 pemphigoid (57).

1.3.1 Αιτιοπαθογένεια της πέμφιγας

Σε μοριακό επίπεδο, ο σχηματισμός ενδοεπιδερμικής πομφόλυγας εκφράζει τη λύση μεταξύ των συνδέσεων των κυττάρων της επιδερμίδας, η οποία καθορίζεται ιστολογικά ως ακανθόλυση και οφείλεται στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων είτε ενάντια στη διακυτταρική ουσία των επιδερμικών κυττάρων είτε ενάντια σε πρωτεΐνες-στοιχεία των δεσμοσωματίων (καντχερίνες). Η παραγωγή αυτοαντισωμάτων στην κοινή και φυλλώδη πέμφιγα είναι πολυκλωνική ενώ τα περισσότερα αυτοαντισώματα στην κοινή πέμφιγα είναι κυρίως της υποομάδας IgG4, ιδιαίτερα στους ασθενείς με ενεργό μορφή (58,59). Ασθενείς με ύφεση της νόσου έχουν κυρίως αυτοαντισώματα της IgG1 υποομάδας, ενώ υγιείς συγγενείς των ασθενών με κοινή πέμφιγα και υγιείς φορείς των επικρατούντων για την κοινή πέμφιγα HLA τύπου II αλληλομόρφων γονιδίων, εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα των IgG1 αυτοαντισωμάτων (60,61). Απόδειξη για την παθογονικότητα αυτών των κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων αποτελεί η παρατήρηση ότι:

- Η κλινική δραστηριότητα της νόσου σχετίζεται με τα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων
- Νεογέννητα μητέρων με ενεργό νόσο προσωρινή εμφανίζουν πομφόλυγες εξαιτίας της μεταφοράς διαμέσου του πλακούντα μητρικών αυτοαντισωμάτων
- Βλάβες που μοιάζουν με πέμφιγα προκαλούνται σε νεογνά ποντικών μετά από μεταφορά IgG από ασθενείς με κοινή πέμφιγα (62).

1.3.2 Αντιδραστικότητα αυτοαντισωμάτων ενάντια στις δεσμογλεΐνες

Η κοινή πέμφιγα αποδίδεται σε αυτοαντισώματα, τα οποία στρέφονται έναντι του εξωκυττάριου τμήματος της δεσμογλεΐνης 3, η οποία αποτελεί ένα δεσμοσωματικό πρωτεϊνικό προσκολλητικό μόριο των επιδερμικών κυττάρων. Η φυλλώδης πέμφιγα οφείλεται σε αυτοαντισώματα έναντι της δεσμογλεΐνης 1, μίας διαφορετικής αλλά ομόλογης με την δεσμογλεΐνη 3 δεσμοσωματικής προσκολλητικής πρωτεΐνης. Ωστόσο αξίζει να αναφερθεί ότι σε ασθενείς που πάσχουν από κοινή πέμφιγα έχουν ανιχνευτεί αυτοαντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν τόσο τη δεσμογλεΐνη 1 όσο και άλλα διαμεμβρανικά συστατικά των δεσμοσωματίων (63). Οι Amagai et al. συμπέραναν ότι η προαπορρόφηση της IgG στην κοινή πέμφιγα και η επανασύνδεση της με την δεσμογλεΐνη 3 οδηγεί στο σχηματισμό των πομφόλυγων της ασθένειας. Η ειδικότητα σύνδεσης της IgG με την δεσμογλεΐνη 3 έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει βρεθεί ότι η IgG του ορού της κοινής πέμφιγας συνδέεται στενά με

το εξωκυττάριο τμήμα 1-2 (EC1-2) της δεσμογλεΐνης 3. Η σύνδεση μάλιστα αυτή είναι υπεύθυνη για την πρόκληση της ακανθόλυσης πάνω από τη βασική επιδερμική μεμβράνη, η οποία είναι το τυπικό ιστολογικό εύρημα της κοινής πέμφιγας. Αντίθετα η IgG, η οποία συνδέεται με μία πρωτεΐνη που εντοπίζεται πάνω στο εξωκυττάριο τμήμα 3-5 (EC3-5) της δεσμογλεΐνης 3 δεν οδηγεί σε ακανθόλυση (64). Έχει επίσης βρεθεί ότι οι IgG1 και IgG4 από ασθενείς με ενεργό κοινή πέμφιγα αναγνωρίζουν επιτόπους στα EC1 και EC2 τμήματα, ενώ παράλληλα *in vitro* δεδομένα δείχνουν ότι η IgG4 που αναγνωρίζει το EC2 τμήμα προκαλεί ακανθόλυση (58). Σε γενικές γραμμές δηλαδή φαίνεται ότι η IgG4 εναντίον του EC2 τμήματος της δεσμογλεΐνης 3 αποτελεί το κύριο ακανθολυτικό αντίσωμα, ενώ η IgG4 εναντίον του EC1 τμήματος αποτελεί μάλλον έναν παράγοντα που διευκολύνει αυτή τη διαδικασία.

Πλήθος μελετών υποστηρίζει ότι η δέσμευση IgG στα επιδερμικά κύτταρα ασθενών με πέμφιγα προκαλεί την άμεση και σταδιακή αύξηση των ιόντων Ca^{++} , η οποία μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την τροποποίηση της μεταβίβασης μηνυμάτων μέσω αντισωμάτων, οδηγώντας έτσι σε απώλεια της κυτταρικής συνοχής (65). Ακανθόλυση μπορεί να προκληθεί επίσης από διάφορες πρωτεάσες, όπως ο ενζυμικός καταλύτης του πλασμινογόνου, με τη δέσμευση των αυτοαντισωμάτων στα επιδερμικά κύτταρα (66).

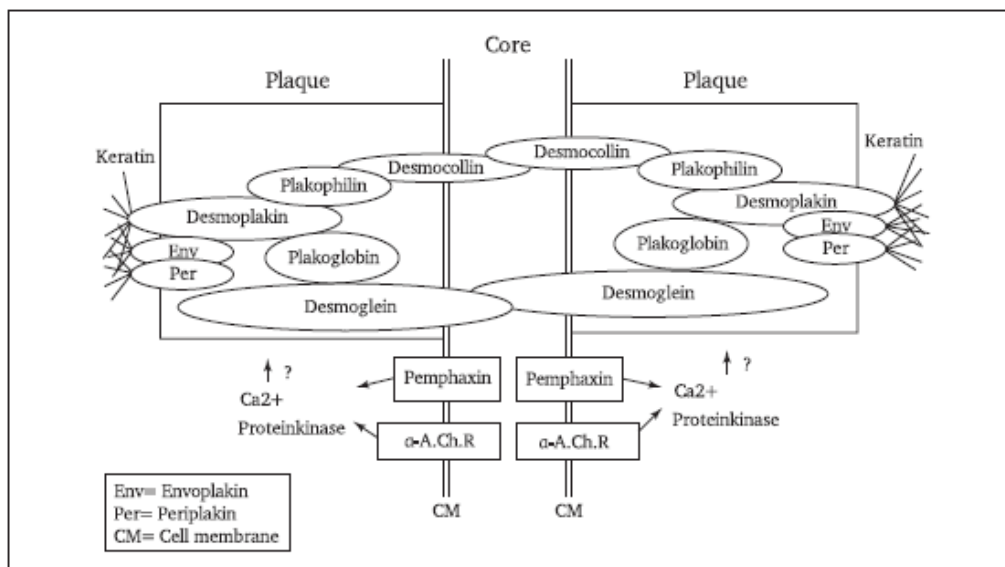
Η τυπική κοινή πέμφιγα παρουσιάζεται βασικά με βλάβες του βλεννογόνου και σχετίζεται με την IgG εναντίον της δεσμογλεΐνης 3. Ωστόσο έχει βρεθεί ότι στον ορό ασθενών με κοινή πέμφιγα με βλεννοδερματικές βλάβες τα επίπεδα της IgG4 είναι υψηλότερα από αυτά της IgG1 εναντίον της δεσμογλεΐνης 3 και 1 του αυτοαντιγόνου της φυλλώδους πέμφιγας. Οι επίτοποι της δεσμογλεΐνης 1 που αναγνωρίζονται από τον ορό ασθενών με κοινή πέμφιγα εντοπίζονται στον αμινοτελικό άκρο και είναι ευαίσθητοι από άποψη διαμόρφωσης (63). Η εξήγηση για τη σύνδεση του χαρακτηριστικού τύπου αντιγόνων με τα διαφορετικά κλινικά είδη κοινής πέμφιγας, δίνεται από τη διαφορετική έκφραση της μορφής της δεσμογλεΐνης 1 και της δεσμογλεΐνης 3 στα κερατινοποιημένα και μη κερατινοποιημένα στρώματα του επιθηλίου. Στο δέρμα η δεσμογλεΐνη 1 εκφράζεται στις ανώτερες στιβάδες της επιδερμίδας ενώ αντίστοιχα έκφραση της δεσμογλεΐνης 3 εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά πάνω στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας (67). Στα μη κερατινοποιημένα στρώματα του επιθηλίου (π.χ βλεννογόννος στοματικής κοιλότητας), η δεσμογλεΐνη 3 εκφράζεται περίπου σε όλη την έκταση της επιδερμίδας ενώ η δεσμογλεΐνη 1 παρουσιάζει πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης. Έτσι η δεσμογλεΐνη 3 αποτελεί το σημαντικό αντιγονικό στόχο για την ανάπτυξη των στοματικών και

σε μικρότερο βαθμό των δερματικών βλαβών στην κοινή πέμφιγα. Αντίθετα αυτοαντισώματα τα οποία στρέφονται ενάντια στη δεσμογλεΐνη 1 σε ασθενείς με φυλλώδη πέμφιγα δεν προκαλούν πομφόλυγες στο βλεννογόνο. Ασφαλώς ο συνδυασμός και των δύο αυτοαντισωμάτων οδηγεί στην εμφάνιση ποφολυγών τόσο στο δέρμα όσο και στους βλεννογόνους (54).

1.3.3 Αυτοαντιδρώντα T λεμφοκύτταρα στην πέμφιγα

Είναι πλέον αποδεκτό ότι αυτοαντιδρώντα T λεμφοκύτταρα παίζουν αποφασιστικό ρόλο στην έναρξη, εξέλιξη και διάρκεια των αυτοάνοσων νοσημάτων, στην παθογένεια των οποίων εμπλέκεται είτε η χυμική είτε η κυτταρική ανοσία. Πιστεύεται ότι αυτοαντιδρώντα T λεμφοκύτταρα ίσως αποτελούν σημαντική βοήθεια για τα B κύτταρα, στη συνεχή παραγωγή παθογενετικών αυτοαντισωμάτων στην πέμφιγα. Η συμμετοχή των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων στην παθογένεση της κοινής πέμφιγας έχει περαιτέρω υποστηριχθεί από την ισχυρή συσχέτιση αυτής της νόσου με τους απλότυπους HLA-DRβ1*0402 και HLA-DQβ1*0503 (68–70). Είναι ενδιαφέρον ότι η πλειονότητα των περιφερικών T κυτταρικών σειρών και κλώνων που δημιουργήθηκαν από ασθενείς με κοινή πέμφιγα εξέφραζαν CD4⁺ φαινότυπο μνήμης, ενώ σε πολύ λίγες κυτταρικές σειρές και κλώνους παρατηρήθηκε έκφραση του CD8⁺ υποδοχέα (71). Επιπλέον σε ασθενείς με κοινή πέμφιγα αναγνωρίστηκαν TH1 και TH2 λεμφοκύτταρα ειδικά για τη δεσμογλεΐνη 3. Οι δύο αυτοί τύποι αυτοαντιδρώντων T λεμφοκυττάρων πιστεύεται ότι εμπλέκονται στην ρύθμιση της παραγωγής των παθογενετικών αυτοαντισωμάτων από B λεμφοκύτταρα στην κοινή πέμφιγα.

Αυτοαντιδρώντα T λεμφοκύτταρα έχουν επίσης ανιχνευτεί στην ενδιμική πέμφιγα, η οποία εμφανίζεται σε ασθενείς που ζουν σε συγκεκριμένες περιοχές της Νότιας Αμερικής. Σε αυτή την κατηγορία ασθενών έχουν βρεθεί περιφερικά CD4⁺ T λεμφοκύτταρα τα οποία αντιδρούν με το εξωκυττάριο τμήμα της δεσμογλεΐνης 1 και παράγουν κυτταροκίνες τύπου TH2 (72).



Εικόνα 1.9 Σχηματική αναπαράσταση ενός δεσμοσώματος με τα κυριότερα αντιγόνα της πέμφιγας (73)

1.3.4 Κοινή πέμφιγα

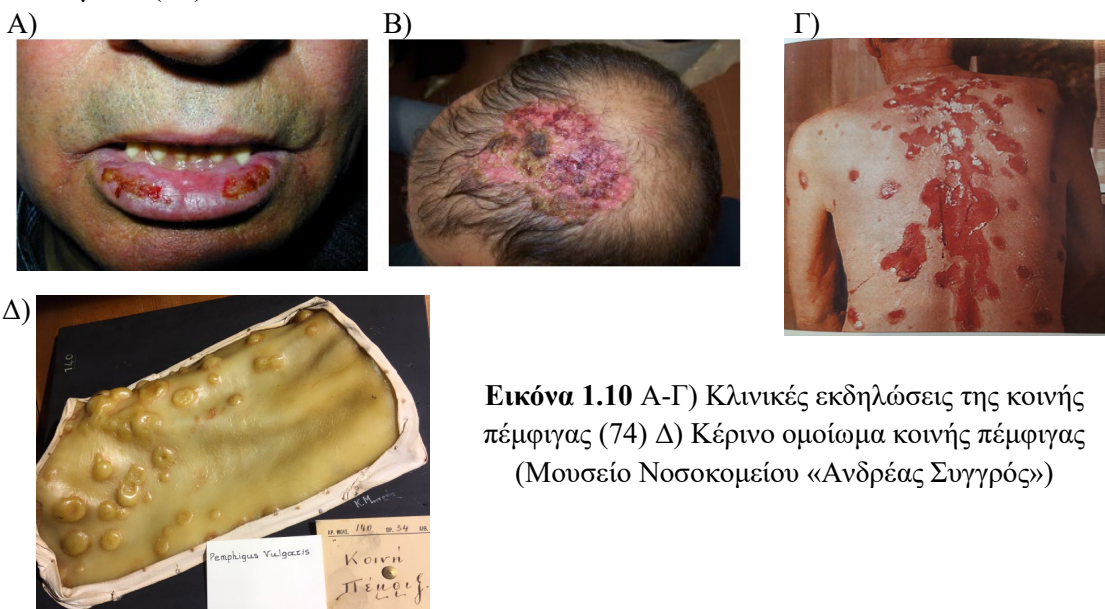
Η κοινή πέμφιγα, είναι μία σοβαρή οξεία ή χρόνια πομφολυγώδης αυτοάνοση νόσος που επηρεάζει τόσο το δέρμα όσο και τους βλεννογόνους και αποτελεί την πρότυπη νόσο της οικογένειας της πέμφιγας. Είναι η πιο συχνή και σοβαρή μορφή πέμφιγας, καθώς αν δεν αντιμετωπιστεί με ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες είναι θανατηφόρος. Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι μεταξύ 40 και 60 ετών και η συχνότητα εμφάνισης είναι ίδια μεταξύ ανδρών και γυναικών (54).

Η κοινή πέμφιγα οφείλεται σε απώλεια της φυσιολογικής προσκόλλησης των κυττάρων της επιδερμίδας, γεγονός που οφείλεται, όπως προαναφέρθηκε, στην παρουσία κυκλοφορούντων IgG αυτοαντισωμάτων, τα οποία αναγνωρίζουν και καταστρέφουν γλυκοπρωτεΐνες της επιφάνειας των επιδερμικών κυττάρων. Συγκεκριμένα αναγνωρίζουν τη δεσμογλείνη 3, η οποία ανήκει στην υπεροικογένεια των καντχερινών, οδηγώντας τελικά σε ακανθόλυση η οποία πιθανολογείται ότι οφείλεται στην ενεργοποίηση των πρωτεασών σερίνης (74).

Συνήθως η ασθένεια ξεκινά στο βλεννογόνο της στοματικής κοιλότητας με την εμφάνιση επιφανειακών πλαδαρών πομφολύγων, οι οποίες γρήγορα καταστρέφονται αφήνοντας υγρές πληγές που προκαλούν πόνο και επουλώνονται αργά. Το αποτέλεσμα είναι η

εμφάνιση έντονου πόνου κατά την στοματική πρόσληψη τροφής ή υγρού, ενώ συχνή είναι και η αυξημένη σιελόρροια καθώς και η εμφάνιση αίματος στο σίελο. Οι βλάβες στον στοματικό βλεννογόνο μπορεί να παραμείνουν εντοπισμένες για 6-12 μήνες και ακολούθως εμφανίζονται γενικευμένες πομφόλυγες. Συγκεκριμένα εμφανίζονται αντίστοιχες αλλοιώσεις σε άλλες περιοχές του δέρματος, ενώ είναι πιθανό να επηρεαστούν η περιοχή του φάρυγγα, οι φωνητικές χορδές καθώς και το δέρμα του κρανίου (Εικόνα 1.10). Οι δερματικές βλάβες συνήθως συνοδεύονται από πόνο αλλά όχι κνησμό και μπορούν να εμφανιστούν επί υγιούς δέρματος ή επί ερυθματώδους βάσεως ή απότομα με εκτεταμένο εξάνθημα. Το χαρακτηριστικό των πομφολύγων είναι ότι περιέχουν διαυγές, άσηπτο υγρό, το οποίο με την εξέλιξη της νόσου γίνεται θολερό, καθώς επίσης και ότι ρήγνυνται εύκολα προκαλώντας εκτεταμένες δερματικές διαβρώσεις. Οι διαβρώσεις αυτές έχουν την τάση περιφερικής επέκτασης και για αυτό χαρακτηριστικά σημεία της νόσου θεωρούνται τα σημεία Nikolsky I και II. Λόγω της εντόπισης των βλαβών οι ασθενείς εμφανίζουν δυσκολία στη λήψη τροφής (δυσφαγία), επίσταξη και βράγχο φωνής (54,74)

Οι κλινικοί τύποι της κοινής πέμφιγας περιλαμβάνουν 1. την ασθένεια που επηρεάζει μόνο τους βλεννογόνους, που σχετίζεται με αύξηση των κυκλοφορούντων αντι Δεσμογλεΐνη 3 (anti-Desmoglein 3/anti-Dsg3) αυτοαντισωμάτων, 2. τη δερματική μόνο ασθένεια, όπου επικρατούν τα αντι Δεσμογλεΐνη 1 (anti-Desmoglein 1/anti-Dsg1) anti-Dsg1 αντισώματα και την 3. βλεννοδερματική ασθένεια, όπου ανιχνεύονται τόσο anti-Dsg1 όσο και anti-Dsg3 αντισώματα (74).



Εικόνα 1.10 Α-Γ) Κλινικές εκδηλώσεις της κοινής πέμφιγας (74) Δ) Κέρνιο ομοίωμα κοινής πέμφιγας (Μουσείο Νοσοκομείου «Ανδρέας Συγγρός»)

1.3.5 Βλαστική Πέμφιγα

Η βλαστική πέμφιγα (Εικόνα 1.11) θεωρείται παραλλαγή της κοινής και χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση κοκκιωματώδων διαβρώσεων στις πτυχές, την περιστοματική χώρα, τον τράχηλο και το τριχωτό της κεφαλής. Συγκεκριμένα οι ασθενείς εμφανίζουν κοκκιωματώδεις βλαστικές ρυπαρές πλάκες που επεκτείνονται φυγόκεντρα καθώς και ακανθόλυση πάνω από τη βασική στιβάδα με ενδοεπιδερμικά αποστήματα που περιέχουν κυρίως ηωσινόφιλα. Παρατηρείται επίσης ψευδοεπιθηλιωματώδης υπερπλασία της επιδερμίδας, υπεράφθονος κοκκιώδης ιστός με σχηματισμό αποστήματος ενώ ανιχνεύονται και IgG αυτοαντισώματα όπως και στην κοινή πέμφιγα. Η κοινή πέμφιγα μπορεί να εξελιχθεί σε βλαστική αλλά ισχύει και το αντίστροφο. Η βλαστική πέμφιγα χωρίζεται σε δύο υποκατηγορίες:

- Τύπος Newmann: Χαρακτηρίζεται από φυσαλίδες και πομφόλυγες, οι οποίες ρήγνυνται, σχηματίζοντας τις χαρακτηριστικές κοκκιωματώδεις διαβρώσεις που αιμορραγούν εύκολα. Οι διαβρώσεις αυτές εξελίσσονται σε πυορροούσες και ορορροούσες βλαστικές μάζες οι οποίες φέρουν μικρά περιφερικά φλυκτανίδια. Οι διαβρώσεις παρουσιάζουν τάσεις περιφερικής επέκτασης και τελικά γίνονται ξηρές, υπερκερατωσικές και ρωγμώδεις.
- Τύπος Hallopeau: Οι αρχικές βλάβες είναι φλυκτανίδια, τα οποία εξελίσσονται σε βλαστικές πλάκες διάστικες από φλύκταινες. Η πορεία αυτού του τύπου είναι πιο καλοήθης σε σχέση με την τύπου Newmann, καθώς είναι πιθανή η αυτόματη ύφεσή της και είναι λιγότερο μακροχρόνια (54).



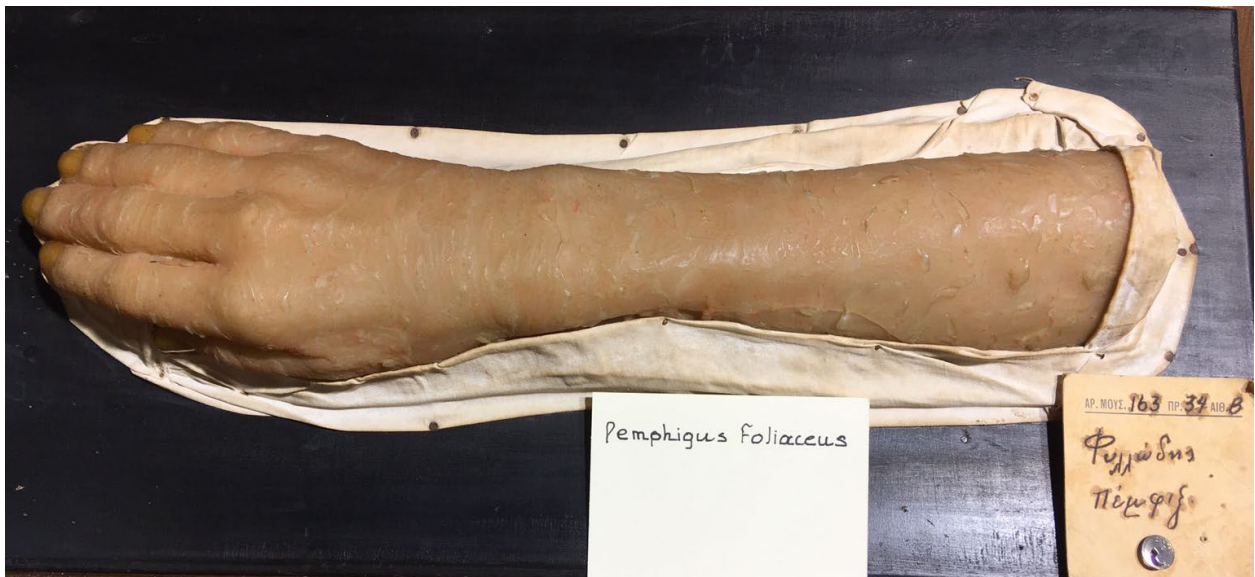
Εικόνα 1.11 Κέρνα ομοιώματα βλαστικής πέμφιγας (Μουσείο Νοσοκομείου «Ανδρέας Συγγρός»

1.3.6 Φαρμακευτική πέμφιγα

Η φαρμακευτική πέμφιγα θεωρείται σπάνια και μπορεί να εξελιχθεί από ένα σύνδρομο τύπου κοινής ή φυλλώδους ή ενδημικής πέμφιγας. Συνδέεται κυρίως με την χορήγηση D-πενικιλαμίνης και λιγότερο συχνά από την καπτροπρίλη και άλλα φάρμακα. Κλινικά παρουσιάζει ομοιότητες συνήθως με τη φυλλώδη πέμφιγα, ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις το εξάνθημα υποχωρεί με τη διακοπή της θεραπείας με το υπεύθυνο φάρμακο (54).

1.3.7 Φυλλώδης πέμφιγα

Η φυλλώδης πέμφιγα (Εικόνα 1.12) θεωρείται ηπιότερη από την κοινή πέμφιγα και χαρακτηρίζεται από την ήπια έναρξη με εμφάνιση διάσπαρτων λεπιωδών βλαβών με «σημηματοροϊκού τύπου» κατανομή. Εμφανίζεται συχνότερα στο πρόσωπο, το τριχωτό της κεφαλής, τον ανώτερο θώρακα, την κοιλία και την άνω ράχη. Ωστόσο μπορεί να αφορά το σύνολο του δέρματος και εκδηλωθεί σαν απολεπιστική ερυθροδερμία. Καθώς η ασθένεια επεκτείνεται παρατηρούνται διαβρώσεις οι οποίες περιβάλλονται από ερύθημα και φυσαλίδες. Οι διαβρώσεις είναι δύσσομες και επώδυνες, ενώ συχνά καλύπτονται από λέπια και εφελκίδες (54).



Εικόνα 1.12 Κέρνα ομοιώματα φυλλώδους πέμφιγας (Μουσείο Νοσοκομείου «Ανδρέας

1.3.8 Ερυθματώδης πέμφιγα

Αυτός ο τύπος πέμφιγας είναι γνωστή και σαν σύνδρομο Senear-Usher και αποτελεί μία εντοπισμένη μορφή της φυλλώδους πέμφιγας που περιορίζεται στις σμηγματοροϊκές περιοχές. Χαρακτηρίζεται από ερυθματώδεις, εφελκιδωποιημένες και διαβρωτικές βλάβες στην περιοχή του ερυθήματος δίκην «πεταλούδας» του προσώπου, στο μέτωπο, στην προστερνική και μεσοπλάτιο χώρα. Παρά τις κλινικές, ιστοπαθολογικές, και ανοσοϊστοπαθολογικές ομοιότητες με την φυλλώδη πέμφιγα, η ερυθματώδης πέμφιγα είναι μοναδική ως προς το ότι οι ασθενείς παρουσιάζουν εναποθέσεις ανοσοσφαιρινών και συμπληρώματος στη χοριο-επιδερμική σύνδεση, επιπλέον του διακυτταρικού αντισώματος πέμφιγας στην επιδερμίδα καθώς και αντιτυρηνικά αντισώματα όπως στην περίπτωση του ερυθματώδους λύκου (54).

1.3.9 Ενδημική πέμφιγα

Αποτελεί μία ιδιαίτερη μορφή της φυλλώδους πέμφιγας και είναι επίσης γνωστή σαν Βραζιλιανή ή Fogo Selvagem (Φωτιά που καίει). Η ονομασία «ενδημική» οφείλεται στο γεγονός ότι αυτή η μορφή πέμφιγας είναι ενδημική σε ορισμένες περιοχές της Νότιας Αμερικής και πιο συγκεκριμένα στις αγροτικές παραποτάμιες περιοχές της Βραζιλίας. Ιστολογικά και ανοσολογικά είναι πανομοιότυπη με τις άλλες μορφές πέμφιγας, όμως διαχωρίζεται από αυτές λόγω των ιδιαίτερων και μοναδικών επιδημιολογικών χαρακτηριστικών της. Η ενδημική πέμφιγα συναντάται με μεγαλύτερη συχνότητα σε συγκεκριμένες περιοχές, εποχές αλλά και οικογένειες (συνδέεται με συγκεκριμένου HLA απλότυπους) και είναι πιο συχνή σε νεαρά άτομα. Πιθανός αιτιολογικός παράγοντας είναι η χρόνια έκθεση στα τσιμπήματα της μαύρης μύγας, η οποία ζει στις συγκεκριμένες περιοχές με αποτέλεσμα τη δημιουργία αυτοαντισωμάτων που εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση με τα τη δεσμογλεινή. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι ασθενείς παρουσιάζουν σημαντική βελτίωση όταν μετακομίσουν σε αστικές περιοχές ενώ υποτροπιάζουν όταν επιστρέφουν στις ενδημικές περιοχές. Τέλος οι βλάβες μοιάζουν με αυτές τις φυλλώδους πέμφιγας αλλά μπορεί να μοιάζουν με εγκαύματα και συνοδεύονται από αίσθημα καύσου, εξηγώντας και την ονομασία Fogo Selvagem (Φωτιά που καίει) (54).

1.3.10 Παρανεοπλασματική πέμφιγα

Η παρανεοπλασματική πέμφιγα θεωρείται σπανιότερη από την κοινή και τη φυλλώδη και τα ιστολογικά ευρήματα των δερματικών βλαβών παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ποικιλομορφία, η

οποία ασφαλώς αντικατοπτρίζει την κλινική ετερογένεια. Όπως υποδηλώνει και η ονομασία της, η συγκεκριμένη διαταραχή σχετίζεται με υποκείμενες νεοπλασματικές νόσους, τόσο καλοήθεις όσο και κακοήθεις. Οι πιο συχνά σχετιζόμενες νεοπλασίες είναι τα non-Hodgkin's λεμφώματα (42%), η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (29%), καλοήθη και κακοήθη θυμώματα (6%) κ.α. Τα non-Hodgkin's λεμφώματα και η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία ευθύνονται για περίπου τα δύο τρίτα των ασθενών που εμφανίζουν παρανεοπλασματική πέμφιγα (54).

1.3.11 Νεογνική πέμφιγα

Βρέφη που γεννιούνται από μητέρες με κοινή πέμφιγα συχνά παρουσιάζουν κλινικά, ιστολογικά και ανοσολογικά συμπτώματα της νόσου. Σε αυτές τις περιπτώσεις παρατηρείται ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων, τα οποία κυμαίνονται από πολύ ήπια κλινική εικόνα της πέμφιγας έως και θνησιγένεια. Με το πέρασμα του χρόνου τα αυτοαντισώματα που μεταβιβάζονται από τη μητέρα καταβολίζονται και η νόσος υποστρέφει αυτόματα. Βρέφη που γεννιούνται από μητέρες με φυλλώδη πέμφιγα σπανίως παρουσιάζουν κλινική συμπτωματολογία (54).



Εικόνα 1.13 Κλινικές εκδηλώσεις της νεογνικής πέμφιγας (54)

1.3.12 Γραμμική IgA δερματοπάθεια

Η γραμμική IgA δερματοπάθεια είναι μία σπάνια ανοσολογική υποεπιδερμική πομφολυγώδης δερματοπάθεια που ορίζεται από την παρουσία ομογενών γραμμοειδών εναποθέσεων IgA στη βασική μεμβράνη του δέρματος. Διαφέρει σαφώς από την ερπητοειδή δερματίτιδα βάσει των ανοσοϊστολογικών και ανοσογενετικών ευρημάτων και της έλλειψης συσχέτισης με εντεροπάθεια ευαίσθητη στη γλουτένη. Πιθανότητα ταυτίζεται με τη χρόνια πομφολυγώδη νόσο της παιδικής ηλικίας, ένα σπάνιο πομφολυγώδες νόσημα που παρατηρείται κυρίως σε παιδιά κάτω των 5 ετών και εμφανίζει ομογενείς γραμμοειδείς εναποθέσεις IgA στη βασική μεμβράνη, όμοιες με εκείνες της γραμμοειδούς IgA δερματοπάθειας. Η γραμμική IgA

δερματοπάθεια εκδηλώνεται συνήθως μετά την εφηβεία και οι κλινικές εκδηλώσεις της μοιάζουν με αυτές της ερπητοειδούς δερματίτιδας με τη διαφορά ότι οι πομφολύγες είναι περισσότερες. Οι ασθενείς εμφανίζουν συνδυασμό δακτυλιοειδών ή ομαδοποιημένων βλατίδων, φυσαλίδων και πομφολύγων που κατανέμονται συμμετρικά στις εκτατικές επιφάνειες, όπως οι αγκώνες, τα γόνατα και οι γλουτοί. Οι βλάβες είναι ιδιαίτερα κνησμώδεις όμως λιγότερο σοβαρές από αυτές τις ερπητοειδούς δερματίτιδας. Η προσβολή των βλεννογόνων είναι σημαντική και κυμαίνεται από μεγάλες, ασυμπτωματικές στοματικές διαβρώσεις και εξελκώσεις μέχρι σοβαρή στοματική νόσο μόνο ή σοβαρή γενικευμένη δερματική προσβολή και στοματική νόσο ανάλογη με εκείνη του ουλωτικού πεμφιγοειδούς. Επίσης έχουν βρεθεί κυκλοφορούντα αυτοαντισώματα έναντι της βασικής μεμβράνης της επιδερμίδας (54).

1.3.13 Πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (Bullous pemphigoid-BP)

Το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές είναι ο πιο κοινός τύπος των πεμφιγοειδών τύπου ABD, η οποία επηρεάζει κυρίως ηλικιωμένα άτομα που διανύουν την 8^η δεκαετία της ζωής τους, χωρίς προδιάθεση φύλλου, με τις περιπτώσεις πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς σε παιδιά και ενήλικες να αποτελούν σπάνια case reports. Τις τελευταίες δεκαετίες η συχνότητα εμφάνισης της BP εμφανίζει αυξητική τάση, η οποία οφείλεται κυρίως στη γήρανση του πληθυσμού η οποία συνοδεύεται από πολλαπλές συννοσηρότητες αλλά και έκθεση σε φάρμακα που ενδέχεται να προκαλέσουν την ασθένεια. Ο τυπικός ορισμός του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς ορίζει ότι πρόκειται για μία χρόνια επίκτητη πομφολυγώδης δερματοπάθεια που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη υποεπιδρμικών πομφολύγων. Πρόκειται για μία αυτοάνοση ασθένεια το ειδικό όργανο-στόχο της οποίας είναι το δέρμα. Η αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος και η σταθεροποίηση του συμπληρώματος καταλήγουν σε μία τυπική και επαναλαμβανόμενη σειρά γεγονότων με αποτέλεσμα τη δημιουργία πομφολύγων (75).

Επιδημιολογικές μελέτες αναφέρουν ότι τα ποσοστά εμφάνισης της συγκεκριμένης ασθένειας στην Ευρώπη κυμαίνονται μεταξύ 2.5 και 42.8 περιπτώσεις/εκατομμύριο/έτος ενώ στην Ασία τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 2.6 έως 7.5 περιπτώσεις/εκατομμύριο/έτος. Η συχνότητα εμφάνισης ασφαλώς αυξάνεται σε ασθενείς άνω των 80 ετών με τις αντίστοιχες τιμές να κυμαίνονται μεταξύ 150-330 νέα περιστατικά/εκατομμύριο/έτος (76).

1.3.14 Παθογένεση της BP

Η BP χαρακτηρίζεται από την παρουσία αυτοαντισωμάτων τα οποία αναγνωρίζουν αυτό-αντιγόνα που εντοπίζονται στην βασική μεμβράνη. Η αλληλεπίδραση των αυτοαντισωμάτων με τα αντιγόνα λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων της βασικής στιβάδας και ακολουθείται από ενεργοποίηση του συμπληρώματος και προσέλκυση των ουδετερόφιλων και ηωσινόφιλων. Οι πομφολυγώδεις βλάβες προκύπτουν ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης πολλαπλών βιοδραστικών μορίων που απελευθερώνονται από τα μαστοκύτταρα και τα ηωσινόφιλα.

Τα συγκεκριμένα αυτό-αντιγόνα είναι γνωστά σαν BP180 (180 kDa) ή BPAG2, και BP230 (230kDa) ή BPAG1. Τα αντίστοιχα αντιγόνα είναι συστατικά των ημιδεσμοσωματίων με ρόλο-κλειδί καθώς είναι υπεύθυνα για την προσκόλληση μεταξύ της επιδερμίδας και της δερμίδας. Συγκεκριμένα το BP230 είναι ένα διακυτταρικό συστατικό των ημιδεσμοσωματίων ενώ τα IgG αυτοαντισώματα αντιδρούν ενάντια στις καρβοξυτελικές περιοχές της BP230. Από την άλλη πλευρά το BP180 είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη αποτελούμενη από περίπου 1500 αμινοξέα στην οποία αναγνωρίζεται μια εξωκυτταρική περιοχή, γνωστή σαν NC16A, που είναι ο βασικός αντιγονικός επίτοπος στην BP. Στους ασθενείς με BP αναγνωρίζονται αυτό-αντισώματα όχι μόνο ενάντια στην NC16A περιοχή αλλά και σε άλλους καρβοξυτελικούς και διακυτταρικούς επίτοπους (76).

Η σύνδεση των anti-NC16A αυτοαντισωμάτων με το BP180 οδηγεί στην ενεργοποίηση πολλών μονοπατιών, στα οποία περιλαμβάνονται η ενεργοποίηση του συμπληρώματος, η χημειοταξία των ουδετερόφιλων με ταυτόχρονη απελευθέρωση πρωτεασών και ελαστασών που προάγουν τη διάρρηξη της βασικής μεμβράνης και συνεπώς την εμφάνιση πομφολυγών (77–79). Τα IgG1 και IgG3 είναι τα πιο συχνά κυκλοφορούντα anti-NC16A αυτοαντισώματα ακολουθούμενα από τα IgG4, με τα πρώτα να είναι ικανά να συνδέονται στην βασική μεμβράνη και να οδηγούν στη συναρμολόγηση του συμπληρώματος (80).

1.3.15 Κλινική εικόνα της BP

Το BP είναι μία ιδιαίτερα ετερογενής νόσος αναφορικά με την κλινική εικόνα η οποία περιλαμβάνει δύο φάσεις: τη μη πομφολυγώδη και την πομφολυγώδη. Κατά τη διάρκεια της πρώτης μη πομφολυγώδους φάσης συχνά αναφέρεται κνησμός χωρίς δερματικό εξάνθημα ή παρατηρείται εξάνθημα με χαρακτηριστικά εκζέματος ή κνίδωσης. Σε κάθε περίπτωση τα συμπτώματα είναι μη ειδικά δυσχεραίνοντας ασφαλώς την αξιόπιστη διάγνωση. Ο κνησμός που προηγείται της εμφάνισης των πομφολύγων παρουσιάζει διαβαθμίσεις ως προς την ένταση ενώ είναι πιθανό να επιμένει για αρκετό χρονικό διάστημα πριν την έκθυσή τους ή να αποτελεί και το



Εικόνα 1.14 Μη πομφολυγώδους φάση της BP (74) κνιδωτικού εξανθήματος προηγείται 1-3 εβδομάδες της εμφάνισης των πολυφλύγων, ενώ όταν οι αλλοιώσεις μοιάζουν με έκζεμα η πρόδρομη φάση της ασθένειας μπορεί να έχει διάρκεια αρκετών μηνών. Ωστόσο, καθώς η νόσος εξελίσσεται και γίνεται η μετάβαση στην πομφολυγώδη φάση, οι αλλοιώσεις μπορούν να γενικευθούν άμεσα σε διάστημα μόλις μίας ή μερικών εβδομάδων (82) (Εικόνα 1.14). Το εξάνθημα μπορεί να είναι εντοπισμένο ή γενικευμένο συνήθως διάσπαρτο ή μπορεί να σχηματίζει τοξοειδείς ή οφιοειδείς σχηματισμούς. Επίσης στο BP οι πομφόλυγες σπάζουν δυσκολότερα από εκείνες της πέμφιγας. Σε κάποιες περιπτώσεις αναπτύσσονται μεγάλες, έντονα ερυθρές ορορρούσες και αιμορραγούσες διαβρώσεις που συνιστούν μείζων πρόβλημα. Συνήθως όμως οι αρχικές τεταμένες πομφόλυγες συρρικνώνονται και μεταμορφώνονται σε εφελκίδες. Οι αλλοιώσεις αυτές εντοπίζονται κυρίως στις μασχάλες, την έσω επιφάνεια των μηρών, τη βουβωνική χώρα, την κοιλιά, τις καμπτικές επιφάνειες των αντιβραχίων και τις κνήμες.

Η πομφολυγώδης φάση χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση πομφολύγων που εντοπίζονται σε ερυθρηματώδη βάση ή ακόμα και σε φυσιολογικό δέρμα μαζί με κνιδωτικές πλάκες που έχουν διάφορα σχήματα. Οι πομφόλυγες είναι διαμέτρου 1-4 εκ. και συνήθως περιέχουν ορώδες ή ακόμα και αιμορραγικό υγρό. Οι αλλοιώσεις αυτές διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα ενώ όταν διαρρηγνύονται καλύπτουν δερματικές αλλοιώσεις που καλύπτονται από εφελκίδες. Τα εξανθήματα εντοπίζονται κυρίως στις καμπτικές περιοχές των

άνω και κάτω άκρων, στην κοιλία και στο κατώτερο τμήμα του κορμού (Εικόνα 1.15). Τέλος η οξεία φάση της ασθένειας συχνά συνοδεύεται από λευκοκυττάρωση και εωσινοφιλία ενώ σε αρκετές περιπτώσεις αναφέρεται και πυρετός. Ωστόσο ακόμα κι όταν οι δερματικές αλλοιώσεις είναι εκτεταμένες η γενική κατάσταση των ασθενών παραμένει καλή (83).



Εικόνα 1.15 Πομφολυγώδης φάση της BP (74)

1.3.16 Διάγνωση Πέμφιγοειδών νοσημάτων

Τα ABDs συχνά έχουν κοινά κλινικά χαρακτηριστικά με αποτέλεσμα η διαφοροδιάγνωση βασιζόμενη αποκλειστικά στα κλινικά χαρακτηριστικά να καθίσταται πολλές φορές δύσκολη. Έτσι, η διάγνωση αυτών των νοσημάτων βασίζεται σε 3 κριτήρια: 1) συνολική κλινική εικόνα του ασθενούς, 2) ιστοπαθολογικά ευρήματα και 3) θετικά ευρήματα άμεσου ή έμμεσου ανοσοφθορισμού, μία τεχνική που εφαρμόζεται συνήθως σε δείγματα περιβλαβικού δέρματος ή ορού, οπότε ανιχνεύονται αυτοαντισώματα τα οποία στοχεύουν τα υπεύθυνα επιθηλιακά αντιγόνα. Οι ανοσοδιαγνωστικές μέθοδοι είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για τη διαφοροδιάγνωση των διάφορων ABDs (84).

Η ιστοπαθολογική διάγνωση των βλεννογονοδερματικών βλαβών μπορεί να αποκαλύψει ενδοεπιδερμικό διαχωρισμό εξαιτίας της απώλειας της αλληλοσυνοχής των επιδερμικών κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό σαν «ακανθόλυση» και είναι το βασικό ιστολογικό εύρημα της πέμφιγας. Η απουσία κυτταρικής συνοχής έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ελεύθερων ακανθολυτικών επιδερμικών κυττάρων μέσα στην κοιλότητα που δημιουργείται (Θετική δοκιμασία Tzanck). Είναι ωστόσο ενδιαφέρον ότι οι βλάβες αυτές δεν παρουσιάζουν φλεγμονώδεις κυτταρικές διηθήσεις. Η κοινή και παρανεοπλασματική πέμφιγα χαρακτηρίζονται συνήθως από υπερβασικό επιδερμικό διαχωρισμό, αφήνοντας μία μονήρη στιβάδα βασικών επιδερμικών κυττάρων προσκολλημένα στη βασική μεμβράνη. Από την άλλη πλευρά η φυλλώδης πέμφιγα χαρακτηρίζεται από πιο επιφανειακό διαχωρισμό, ο οποίος

εντοπίζεται κάτω από την κεράτινη στιβάδα. Από την άλλη πλευρά στην περίπτωση του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς, η ιστοπαθολογική αξιολόγηση αποκαλύπτει την ύπαρξη υποδερμικών αλλοιώσεων στις οποίες εντοπίζεται ένα πυκνό δίκτυο ινών το οποίο περιλαμβάνει ηωσινόφιλα και/ή ουδετερόφιλα, τα επίπεδα των οποίων διαφέρουν μεταξύ των περιπτώσεων. Επίσης στο BP σε αυτές τις αλλοιώσεις παρατηρείται δερματικές φλεγμονώδεις κυτταρικές διηθήσεις, οι οποίες αποτελούνται από ηωσινόφιλα και ουδετερόφιλα. Στη μη πομφολυγώδη φάση, τα ιστοπαθολογικά ευρήματα δεν είναι ειδικά, καθώς παρατηρούνται μόνο υποδερμικές σχισμές και ηωσινοφιλική σπογγίωση (85,86).

Ο άμεσος ανοσοφθορισμός είναι μία τεχνική που πραγματοποιείται σε δείγμα περιβλαβικού δέρματος ή βλεννογόνου, αν και συχνά πραγματοποιείται σε μη προσβεβλημένες περιοχές. Με την εφαρμογή του άμεσου ανοσοφθορισμού διαπιστώνεται καθήλωση ανοσοσφαιρίνης IgG ή IgA (στην IgA πέμφιγα) με μία τυπική δικτυωτή διακυτταρική κατανομή στην επιδερμίδα. Οι ανοσοσφαιρινικές εναποθέσεις συνήθως συνοδεύονται από καθήλωση και του C3. Με εξαίρεση την παρανεοπλασματική και την ερυθματώδη πέμφιγα, αυτές οι εναποθέσεις δεν εντοπίζονται κατά μήκος του δερμοεπιδερμικού ορίου. Στο πομφολυγώδες πεμφιγοειδές το διαγνωστικό εύρημα είναι η εμφάνιση μίας γραμμικής συνεχούς εναπόθεσης IgG και/ή C3 κατά μήκος του δερμοεπιδερμικού ορίου. Σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρείται το ίδιο πρότυπο εναπόθεσης IgA και IgE (85,87).

Η εξέταση του ορού των ασθενών μέσω του έμμεσου ανοσοφθορισμού αποτελεί μία θεμελιώδη διαγνωστική δοκιμασία για αυτές τις ασθένειες, καθώς το χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι η παρουσία κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων έναντι των δεσμοσωματικών αντιγόνων. Στις περισσότερες περιπτώσεις σαν υπόστρωμα που χρησιμοποιείται είναι οισοφάγος πιθήκου και η χρήση ορού ασθενών με πέμφιγα προκαλεί το χαρακτηριστικό δικτυωτό διακυτταρικό τύπο ανοσοφθορισμού των επιθηλιακών κυττάρων του υποστρώματος. Ο ορός ασθενούς που πάσχει από παρανεοπλασματική πέμφιγα δίνει μία έντονη αντίδραση όχι μόνο όταν χρησιμοποιείται οισοφάγος πίθηκου αλλά και όταν χρησιμοποιούνται κι άλλα υποστρώματα τα οποία είναι το ίδιο πλούσια σε δεσμοσωμάτια (π.χ. οισοφάγος ινδικού χοιριδίου και επιθήλιο ουροδόχου κύστεως τρωκτικού). Το γεγονός αυτό συχνά είναι ιδιαίτερης αξίας και χρησιμότητας για την επιβεβαίωση της διάγνωσης της παρανεοπλασματικής πέμφιγας (88).

Η διαθεσιμότητα ανασυνδυασμένων τύπων αυτοαντιγόνων στις διάφορες μορφές πέμφιας αποτέλεσε τη βάση για την ανάπτυξη νεότερων ορολογικών διαγνωστικών δοκιμασιών. Οι δοκιμασίες αυτές επιτρέπουν την επιβεβαίωση της ήδη τεθείσας με τις κλινικές τεχνικές διάγνωσης με απόλυτη ειδικότητα και βασίζονται στις μεθόδους του έμμεσου ανοσοφθορισμού (Indirect ImmunoFluorescence Assay (IFA) και του ανοσοπροσοροφητικού προσδιορισμού συνδεδεμένου με ένζυμο (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay-ELISA). Μάλιστα τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί νέες διαγνωστικές πολυπαραγοντικές μέθοδοι οι οποίες αποτελούν ένα πρακτικό εργαλείο ελέγχου (screening) των ασθενών με υποψία ABD ασθένειας. Ο σκοπός της εφαρμογής αυτών των μεθόδων είναι η ταυτόχρονη ανίχνευση των πιο κοινών αυτοαντισωμάτων που είναι υπεύθυνα για αυτά τα νοσήματα (89,90).

Στην περίπτωση της κοινής πέμφιας ο IFA επιτρέπει την ανίχνευση των κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων κατά πρωτεϊνών ή επιθηλιακών κερατινοκυττάρων μέσω επώασης του ορού των ασθενών με κατάλληλα εμπορικά διαθέσιμα υποστρώματα τα οποία περιέχουν το αντιγόνο-στόχο. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η δοκιμασία διεξάγεται σε οισοφάγο πιθήκου ή σε άλλα επιθηλιακά υποστρώματα, οπότε ο ορός από ασθενείς με κοινή πέμφια δίνει ένα χαρακτηριστικό λείο και δικτυωτό μοτίβο στα περισσότερα επιθηλιακά στρώματα, που αναφέρονται ως μοτίβο «δίχτυ ψαρέματος» ή "κηρήθρα" (87,91).

Η κλωνοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί τα κύρια αντιγόνα της πέμφιας, τα Dsg1 και Dsg3, επέτρεψαν την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των IgG αυτοαντισωμάτων με εφαρμογή της μεθόδου ELISA (92). Το προφίλ των αυτοαντισωμάτων Dsg3/Dsg1 καθορίζει το κλινικό αποτέλεσμα, αφού η κοινή πέμφια με αποκλειστική συμμετοχή των βλεννογόνων σχετίζεται με τη σύνθεση IgG αυτοαντισωμάτων τα οποία αναγνωρίζουν την Dsg3, ενώ η μορφή της κοινής πέμφιας στην οποία επηρεάζονται οι βλεννογόνοι σχετίζεται με την σύνθεση αντι-Dsg1 και anti-Dsg3 IgG αυτοαντισωμάτων. Η ανίχνευση των IgG αυτοαντισωμάτων μέσω ELISA δίνει θετικά ευρήματα σε περισσότερο από το 90% των περιπτώσεων (91).

Τα επίπεδα στον ορό των IgG αυτοαντισωμάτων έναντι των Dsg1 και Dsg3 συσχετίζονται γενικά με την έκταση και την επιθετικότητα της νόσου ενώ η ανίχνευση μέσω ELISA υψηλών επιπέδων αντι-Dsg1 αυτοαντισωμάτων έχουν θετική προγνωστική αξία για υποτροπές του δέρματος (91). Ως εκ τούτου, η ELISA μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν καλό ορολογικό προγνωστικό δείκτη της ασθένειας, αν και δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία από

μεγάλες προοπτικές μελέτες για την προβλεπτική αξία αυτής της δοκιμασίας (91). Ωστόσο αξίζει να αναφερθεί ότι αυτοαντισώματα κατά του Dsg έχουν ανιχνευτεί και σε ορό φυσιολογικών ατόμων αλλά και ασθενών με άλλες πεμφιγοειδείς ασθένειες (92).

Στην περίπτωση του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς ο IFA μπορεί να ανιχνεύσει κυκλοφορούντα IgG αντισώματα που συνδέονται με τη βασική μεμβράνη. Η ELISA μπορεί να ανιχνεύσει IgG αντι-BP180 και αντι-BP230 αντισώματα, όπου τα επίπεδα των αντι-BP180 αντισωμάτων στον ορό είναι δυνατόν να ελέγχονται και να προσδιορίζονται κατά τη διάρκεια της νόσου. Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα των αντι-BP180 NC16A IgG μετά τη διακοπή της θεραπείας θεωρούνται ένας αξιόπιστος δείκτης πρόβλεψης του κινδύνου υποτροπής. Ωστόσο και σε αυτή την περίπτωση θετικό αποτέλεσμα έχει αναφερθεί σε υγιή άτομα αλλά και σε ασθενείς που πάσχουν από άλλες φλεγμονώδεις δερματικές διαταραχές (87).

Σκοπός

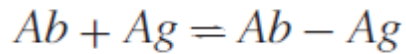
Το φάσμα των πολυφολυγωδών νόσων είναι ιδιαίτερα μεγάλο και συχνά η κλινική εικόνα δεν συνάδει με τα ευρήματα της ιστολογικής εξέτασης και του ανοσοφθορισμού, γεγονός που εμποδίζει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων και την στοιχειοθέτηση μίας ακριβούς διάγνωσης. Έτσι πλέον είναι σαφές ότι υπάρχει ανάγκη χρήσης νέων μεθόδων για τη διαφορική διάγνωση, τη θεραπεία και την πρόγνωση αυτών των νοσημάτων. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η αξιολόγηση της ευαισθησίας, της ειδικότητας, της αξιοπιστίας και της απόδοσης του άμεσου και έμμεσου ανοσοφθορισμού καθώς και της ανοσοενζυμικής μέθοδος (ELISA) στην διάγνωση των πομφολυγωδών δερματοπαθειών. Για τον σκοπό αυτό θα αξιολογηθούν οι εργαστηριακές εξετάσεις ως προς την αξιοπιστία, ευαισθησία και ειδικότητά τους, που χρησιμοποιήθηκαν για την διάγνωση των πομφολυγωδών δερματοπαθειών στο Ανοσοδερματολογικό εργαστήριο του νοσοκομείου Ανδρέας Συγγρός σε 100 ασθενείς που εξετάστηκαν από 1-9- 2019 έως 31-3-2020. Τα ευρήματα θα αναλυθούν στατιστικά για την εξαγωγή συμπερασμάτων ικανών να συμβάλλουν στην αξιολόγηση των εργαστηριακών μεθόδων.

Υλικά και μέθοδοι

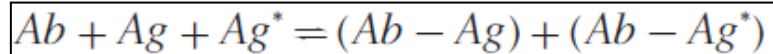
2.1 Ανοσοδοκιμασίες

Οι ανοσοδοκιμασίες (immunoassays) βασίζονται στην επιλεκτική και ειδική σύνδεση αντίσωμα (Ab)-αντιγόνο (Ag). Οι δύο κύριοι τύποι αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται στις ανοσοδοκιμασίες είναι πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα με τα πρώτα να έχουν ένα ευρύ φάσμα ισχυρών δεσμεύσεων και παράγονται από πολλές διαφορετικές κυτταρικές σειρές μέσα στο σώμα. Αντίθετα τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι πανομοιότυπα ως προς την αλληλουχία τους γεγονός που τους επιτρέπει να συνδέονται επιλεκτικά μόνο με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Η ιδιότητα αυτή έχει σαν αποτέλεσμα η χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων να αυξάνει την ακρίβεια της ανοσοδοκιμασίας.

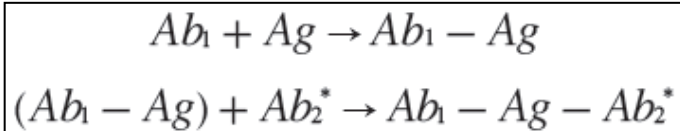
Μία τυπική ανοσοδοκιμασία βασίζεται στην παρακάτω αντίδραση και διακρίνεται σε δύο τύπους: συναγωνιστική και μη συναγωνιστική.



Σε μία συναγωνιστική ανοσοδοκιμασία (Εικόνα 2.1), μία γνωστή ποσότητα ενός σημασμένου αντιγόνου (Ag^*) συναγωνίζεται για σύνδεση με έναν περιορισμένο αριθμό θέσεων πρόσδεσης, όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση. Συνεπώς η ποσότητα του προσδεμένου σημασμένου αντιγόνου είναι αντιστρόφως ανάλογη με την ποσότητα του αντιγόνου που υπάρχει στο δείγμα

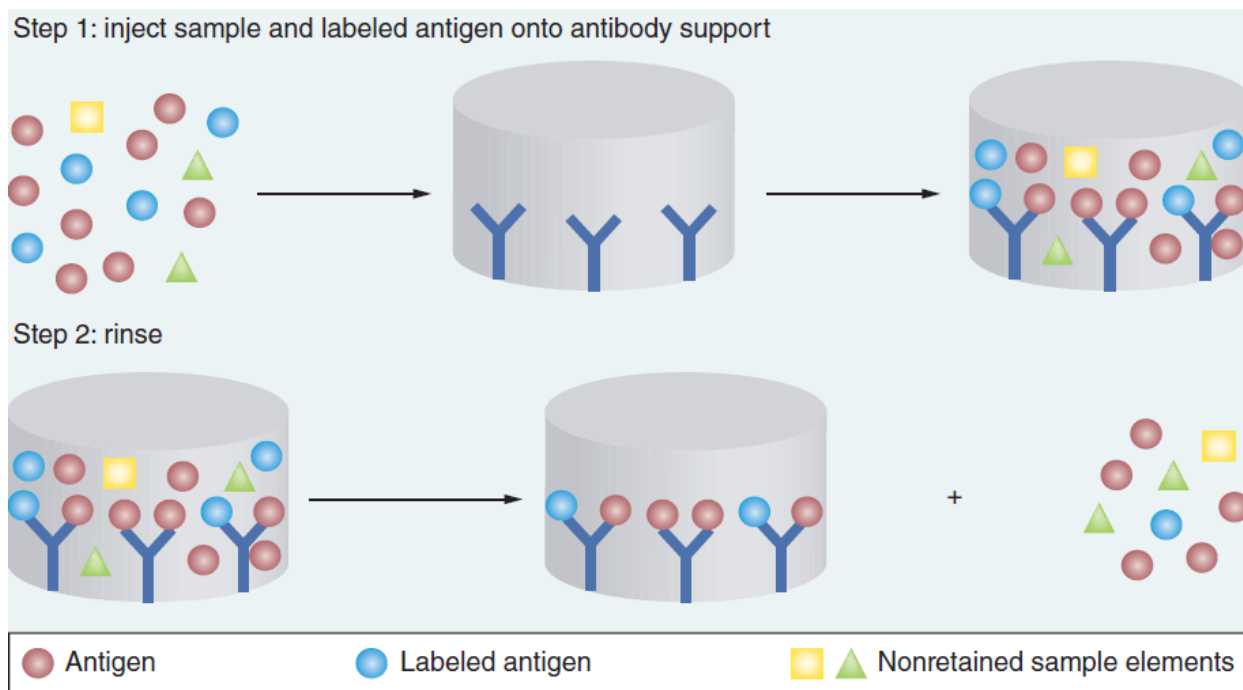


Επίσης υπάρχουν και οι μη συναγωνιστικές ανοσοδοκιμασίες όπως για παράδειγμα οι ανοσοδοκιμασίες τύπου «sandwich» (Εικόνα 2.2), όπου δύο διαφορετικά αντισώματα σχηματίζουν ένα «sandwich» γύρω από το αντιγόνο όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση



Το δεύτερο αντίσωμα (Ab_2^*) είναι κατάλληλα σημασμένο έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση του αντιγόνου. Σε αυτόν τον τύπο ανοσοδοκιμασίας η ποσότητα του συνδεδεμένου σημασμένου αντισώματος είναι ευθέως ανάλογη με την ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα. Γενικά είτε το ένα είτε και δύο αντισώματα που χρησιμοποιούνται σε αυτήν την περίπτωση

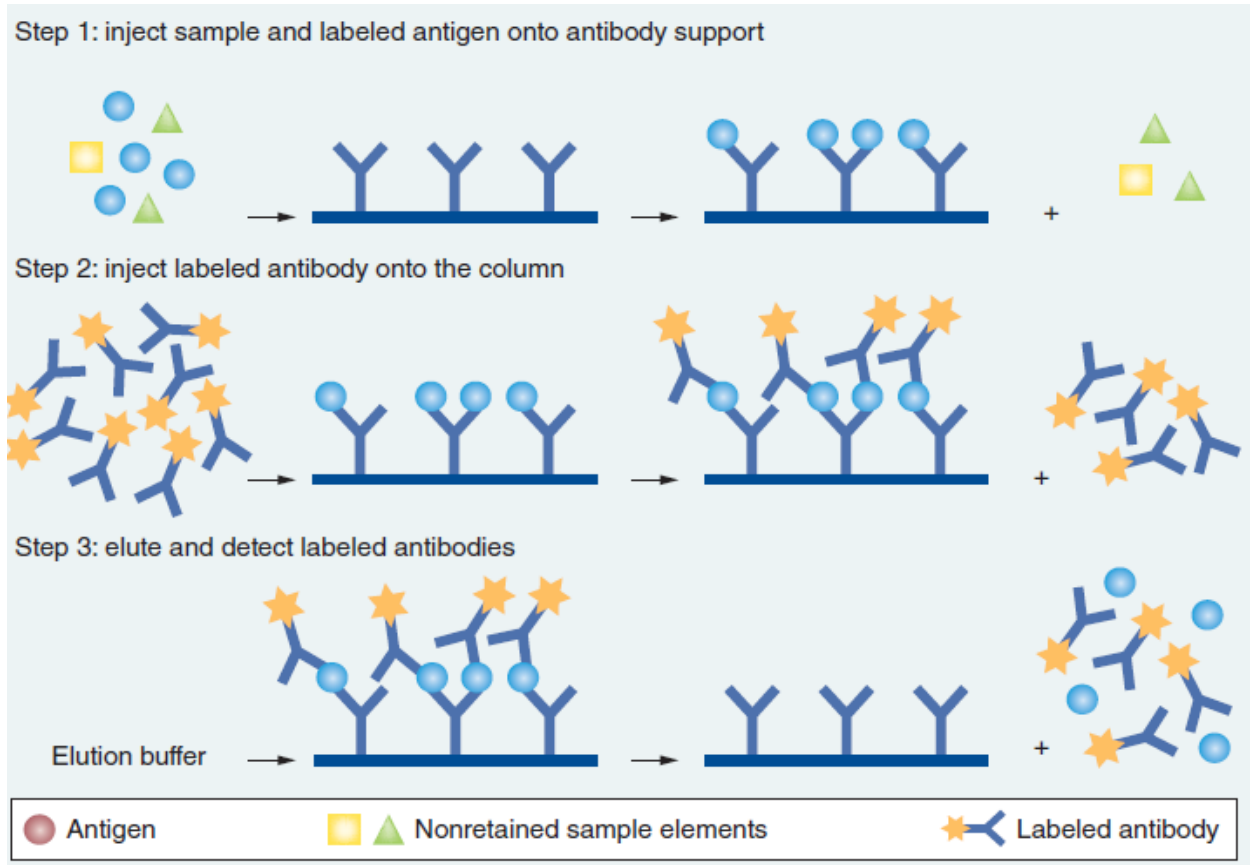
είναι μονοκλωνικά αντισώματα καθώς είναι απαραίτητη η ύπαρξη δύο διαφορετικών θέσεων πρόσδεσης του αντιγόνου. Βασικό πλεονέκτημα των μη συναγωνιστικών ανοσοδοκιμασιών είναι η μεγαλύτερη ειδικότητα ενώ των συναγωνιστικών δοκιμασιών η ευκολία σχεδιασμού της μεθοδολογίας (93).



Εικόνα 2.1 Σχηματική αναπαράσταση μιας συναγωνιστικής ανοσοδοκιμασίας (93)

Το είδος της σήμανσης των αντισωμάτων και το σχήμα ανίχνευσης καθορίζουν τον απαιτούμενο εξοπλισμό, αποτελώντας έτσι έναν σημαντικό παράγοντα που καθορίζει το στήσιμο της μεθοδολογίας. Τα μόρια που χρησιμοποιούνται για τη σήμανση στις ανοσοδοκιμασίες είναι ραδιοϊσότοπα, ένζυμα, φθοριοχρώματα, φθορίζοντα χηλικά άλατα και tags χημειοφωταύγειας. Ανάλογα με τον τύπο σήμανσης διακρίνονται διάφοροι τύποι ανοσοδοκιμασιών, όπως για παράδειγμα οι ραδιοανοσοδοκιμασίες (radioimmunoassay -RIA), όπου χρησιμοποιείται κάποιο ραδιοϊσότοπο για τη σήμανση κυρίως τα ^{125}I , ^3H , ^{32}P , ^{57}Co και ^{131}I . Γενικά αυτές οι δοκιμασίες είναι συναγωνιστικού τύπου και το αντιγόνο-στόχος σημαίνεται με κάποιο ραδιοϊσότοπο. Στην περίπτωση όπου χρησιμοποιούνται ένζυμα για την ανίχνευση του συμπλόκου αντίσωμα-αντιγόνο οι μέθοδοι ονομάζονται ενζυμικές ανοσοδοκιμασίες (Enzyme immunoassays -EIAs) και Δοκιμασίες ΕνζυμοΣυζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης (enzyme-linked immunosorbent assays -ELISAs) και το προϊόν αυτών

των ενζυμικών αντιδράσεων είναι φθοριοχρώματα ή ουσίες που είναι ορατές στην υπεριώδη ακτινοβολία. Τέλος στον ανοσοφθορισμό χρησιμοποιούνται τα φθοριοχρώματα για τη σήμανση είτε του αντισώματος είτε του αντιγόνου (93).



Εικόνα 2.2 Σχηματική αναπαράσταση μιας ανοσοδοκιμασίας τύπου «sandwich» (93)

2.1.1 Ανοσοφθορισμός

➤ Αρχή μεθόδου

Ο ανοσοφθορισμός αποτελεί μία μέθοδο όπου χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα τα οποία επιτρέπουν την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα. Η κύρια εφαρμογή αυτής της μεθόδου είναι η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων στα ανοσολογικά εργαστήρια. Όπως δηλώνει και η ονομασία της μεθόδου βασίζεται στο φαινόμενο του φθορισμού, κατά το οποίο μία ουσία η οποία ακτινοβολείται από φως συγκεκριμένου μήκους κύματος εκπέμπει φως μεγαλύτερου μήκους κύματος. Πιο αναλυτικά χρησιμοποιείται υπεριώδες ακτινοβολία (UV) η οποία προσπίπτει στα ηλεκτρόνια των ατόμων

του φθοριοχρώματος, προκαλώντας έτσι τη διέγερσή τους και την απελευθέρωση της ενέργειας που προσέλαβαν με τη μορφή φωτονίων. Μέρος της αρχικής διεγείρουσας ενέργειας καταναλώνεται με αποτέλεσμα τελικά να εκπέμπεται φως μικρότερης ενέργειας (μεγαλύτερου μήκους κύματος) από τη διεγείρουσα ακτινοβολία. Η λειτουργία των μικροσκοπίων φθορισμού βασίζεται στην παραπάνω ιδιότητα την εκμεταλλευόμεστε στα μικροσκόπια φθορισμού.

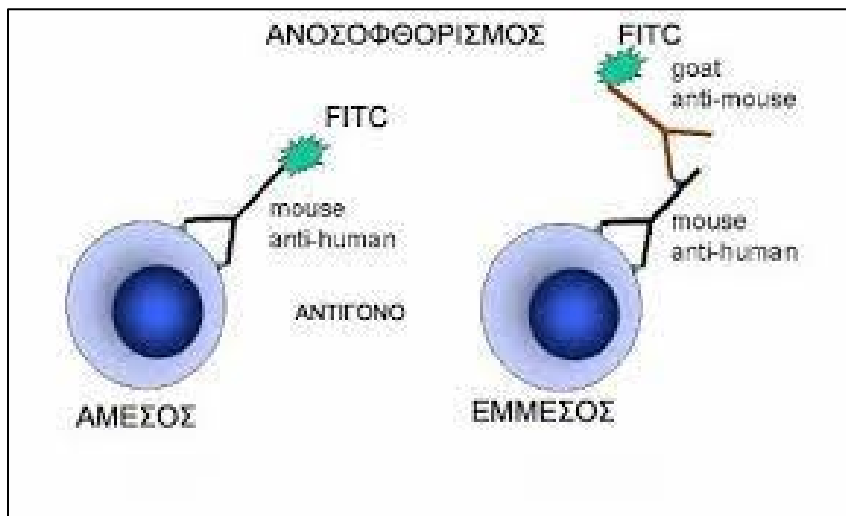
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω στον ανοσοφθορισμό χρησιμοποιούνται για τη σήμανση των αντισωμάτων ειδικές χημικές ουσίες που έχουν την ιδιότητα να φθορίζουν και ονομάζονται φθοριοχρώματα. Κάθε φθοριόχρωμα απελευθερώνει φθορίζον φως συγκεκριμένου μήκους κύματος το οποίο εξαρτάται από το ποσό της ενέργειας που καταναλώνεται κατά την διέγερση των ηλεκτρονίων του. Τα πιο κοινά φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται στον ανοσοφθορισμό είναι τα:

1. Φυκοερυθρίνη (RE), η οποία εκπέμπει πορτοκαλί χρώμα.
2. Ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), η οποία εκπέμπει πράσινο χρώμα.
3. Ισοθειοκυανική τετραμεθυλοραδαμίνη (TMRITC), η οποία εκπέμπει κόκκινο χρώμα.

Στον ανοσοφθορισμό τα αντισώματα που μελετώνται αντιδρούν με αντιγόνα που βρίσκονται πάνω σε κύτταρα ή ιστούς, τα οποία αυτά με τη σειρά τους είναι προσκολλημένα πάνω σε ειδικά διαμορφωμένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Έτσι το υλικό στο οποίο μπορεί να εφαρμοσθεί ο ανοσοφθορισμός είναι:

1. Τομές ιστών, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων και τη μελέτη βιοπτικού υλικού.
2. Μονοστιβάδες κυτταρικών καλλιιεργειών, οι οποίες χρησιμοποιούνται κυρίως για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων.
3. Ενωρήματα ζωντανών κυττάρων, τα οποία χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση επιφανειακών αντιγόνων μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος ή μυελού των οστών και διαφόρων νεοπλασματικών κυττάρων ή αντισωμάτων έναντι αυτών.
4. Επιχρίσματα κυττάρων ή μικροοργανισμών, τα οποία είναι κατάλληλα για την ανίχνευση διαφόρων αντισωμάτων.

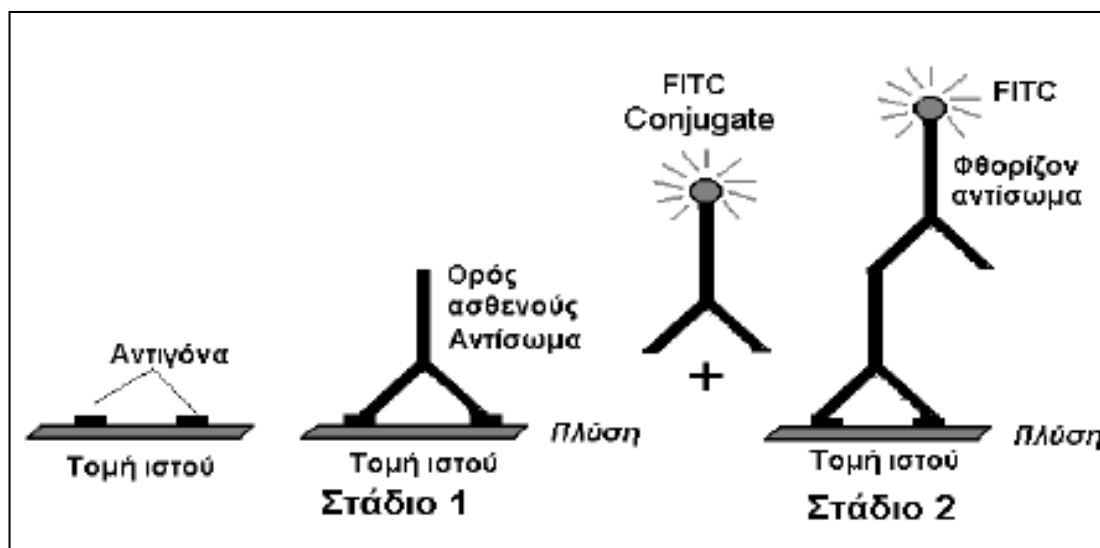
Ανάλογα με τον αριθμό των αντισωμάτων και το υλικό που χρησιμοποιείται ο ανοσοφθορισμός διακρίνεται σε έμμεσο (Indirect immunoFluorescence Assay-IFA) και άμεσο (Direct immunoFluorescence Assay-DFA) ανοσοφθορισμό (Εικόνα 2.3) (93).



Εικόνα 2.3 Σχηματική αναπαράσταση άμεσου και έμμεσου ανοσοφθορισμού (93)

Τα στάδια του IFA (Εικόνα 2.4) είναι τα εξής:

- Στάδιο 1. Ο υπό εξέταση ορός ο οποίος περιέχει τα εξεταζόμενα αντισώματα τοποθετείται πάνω σε τομή ιστού που περιέχει το αντιγόνο.
- Στάδιο 2. Έκπλυση με φωσφορούχο διάλυμα για την απομάκρυνση του ασύνδετου αντισώματος.
- Στάδιο 3. Προσθήκη φθορίζοντος αντισώματος.
- Στάδιο 4. Πλύση για την απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου φθορίζοντος αντισώματος.
- Στάδιο 5. Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού (93).



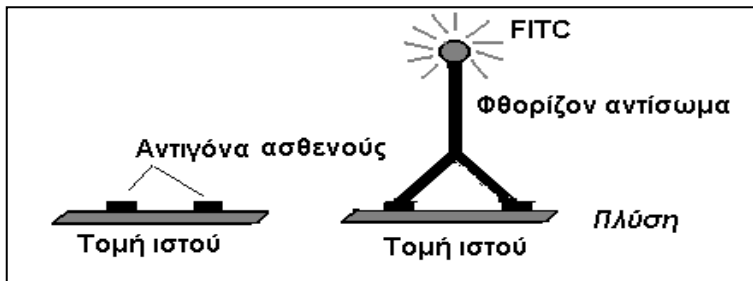
Εικόνα 2.4 Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων του έμμεσου ανοσοφθορισμού (93)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω στην περίπτωση της κοινής πέμφιγας ο IFA επιτρέπει την ανίχνευση των κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων κατά πρωτεϊνών ή επιθηλιακών κερατινοκυττάρων μέσω επώασης του ορού των ασθενών με κατάλληλα εμπορικά διαθέσιμα υποστρώματα τα οποία περιέχουν το αντιγόνο-στόχο. Η δοκιμασία διεξάγεται σε οισοφάγο πιθήκου ή σε άλλα επιθηλιακά υποστρώματα, οπότε ο ορός από ασθενείς με κοινή πέμφιγα δίνει ένα χαρακτηριστικό λείο και δικτυωτό μοτίβο στα περισσότερα επιθηλιακά στρώματα, που αναφέρονται ως μοτίβο «δίχτυ ψαρέματος» ή "κηρήθρα" (87,91). Στο BP με τον IFA ανιχνεύονται IgG κυκλοφορούντα αυτοαντισώματα κατά συστατικών της βασικής μεμβράνης, σε ποσοστό μικρότερο του 70%. Σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται γραμμικός φθορισμός της βασικής μεμβράνης κυρίως με IgG και C3 και σπάνια με IgA και IgE (87). Στην περίπτωση του IFA για το BP το εξεταζόμενο υλικό είναι συνήθως ορός αίματος αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και υγρό πομφόλυγας και πιο σπάνια ούρα. Ωστόσο αξίζει να αναφερθεί ότι η εφαρμογή του IFA δεν αποτελεί μία ευαίσθητη πρακτική για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της νόσου (94). Αυτό πιθανά μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι με τον IFA ανιχνεύουμε την παρουσία αντισωμάτων τα οποία αναγνωρίζουν και τα δύο αντιγόνα BP180 και BP230. Πιθανά ο φθορισμός των αυτοαντισωμάτων σε αυτή την τεχνική να αντανακλά περισσότερο την ικανότητα αντίδρασης κατά του BP230 και σε μικρότερο βαθμό κατά του BP180. Μάλιστα είναι γνωστό ότι τα BP230 εντοπίζονται κυρίως στην ενδοκυττάρια ημιδεσμοσωματική πλάκα και για τον λόγο αυτό τα αυτοαντισώματα που στρέφονται εναντίον του θεωρείται ότι δεν εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της νόσου (95).

Τα στάδια του DFA (Εικόνα 2.5) είναι τα εξής:

- Στάδιο 1. Προσθήκη φθορίζοντος αντισώματος πάνω σε τομή ιστού που περιέχει τα εξεταζόμενα αντιγόνα.
- Στάδιο 2. Πλύση με φωσφορούχο διάλυμα και απομάκρυνση του πλεονάζοντος αντισώματος.
- Στάδιο 3. Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Όπως φαίνεται από την περιγραφή των δύο μεθόδων ο έμμεσος ανοσοφθορισμός χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό των ασθενών ενώ ο άμεσος ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση αντιγόνων του ασθενή πάνω σε υλικό βιοψίας (93).

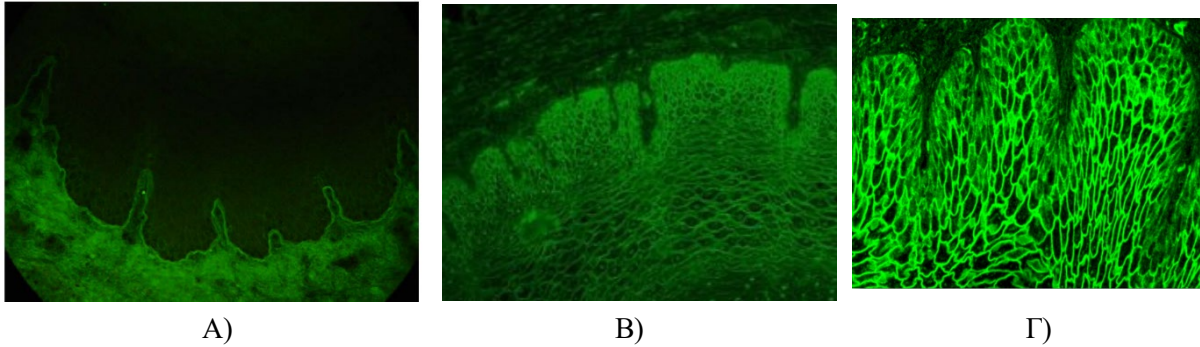


Εικόνα 2.5 Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων του άμεσου ανοσοφθορισμού (93)

Ο άμεσος ανοσοφθορισμός πραγματοποιείται σε δείγμα περιβλαβικού δέρματος ή βλεννογόνου, αν και συχνά πραγματοποιείται σε μη προσβεβλημένες περιοχές. Με την εφαρμογή του άμεσου ανοσοφθορισμού διαπιστώνεται καθήλωση ανοσοσφαιρίνης IgG ή IgA (στην IgA πέμφιγα) με μία τυπική δικτυωτή διακυτταρική κατανομή στην επιδερμίδα. Οι ανοσοσφαιρινικές εναποθέσεις συνήθως συνοδεύονται από καθήλωση και του C3. Με εξαίρεση την παρανεοπλασματική και την ερυθηματώδη πάμφιγα, αυτές οι εναποθέσεις δεν εντοπίζονται κατά μήκος του δερμοεπιδερμικού ορίου. Στο πομφολυγώδες πεμφιγοειδές το διαγνωστικό εύρημα είναι η εμφάνιση μίας γραμμικής συνεχούς εναπόθεσης IgG και/ή C3 κατά μήκος του δερμοεπιδερμικού ορίου. Σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρείται το ίδιο πρότυπο εναπόθεσης IgA και IgE (85,87).

➤ **Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε υπόστρωμα από οισοφάγο πιθήκου**

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός είναι μία ορολογική τεχνική και βασίζεται στη χρήση υποστρώματος φυσιολογικού ιστού, ο οποίος συνήθως είναι οισοφάγος πιθήκου. Στην περίπτωση που το εξεταζόμενο υγρό περιέχει αντισώματα (IgG) τα οποία αναγνωρίζουν επιτόπους του υποστρώματος, πραγματοποιείται η ανοσολογική σύνδεση τους, η οποία τελικά γίνεται ορατή μέσω προσθήκης ειδικού ανθρώπινου αντι-IgG, το οποίο είναι σημασμένο με τη χρωστική FITCH και συνδέεται με τα IgG αντισώματα που υπάρχουν στο εξεταζόμενο δείγμα. Οι θέσεις σύνδεσης και το πρότυπο φθορισμού εξαρτώνται από τη νόσο και συγκεκριμένα στην περίπτωση του BP ο έμμεσος ανοσοφθορισμός δίνει γραμμικό φθορισμό στη βασική μεμβράνη, κυρίως με IgG και C3 και σπανιότερα με IgA ή IgE (Εικόνα 2.6). Όπως προαναφέρθηκε στην περίπτωση του IFA για το BP το εξεταζόμενο υλικό είναι συνήθως ορός αίματος αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και υγρό πομφόλυγας και πιο σπάνια ούρα (85).



Εικόνα 2.6 Α) BP- Γραμμικός φθορισμός της βασικής μεμβράνης σε υπόστρωμα οισοφάγου πιθήκου. Εικόνα έμμεσου ανοσοφθορισμού Β) BP Γ) IFA -Πέμφιγα

Στη συγκεκριμένη μελέτη ο έμμεσος ανοσοφθορισμός πραγματοποιήθηκε με χρήση του εμπορικά διαθέσιμου kit Nova Lite Monkey Oesophagus IFA (Inova Diagnostics Inc., San Diego CA USA), στο οποίο χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα οισοφάγος πιθήκου. Σε γενικές γραμμές η διαδικασία περιλαμβάνει την επώαση του εξεταζόμενου δείγματος και των δειγμάτων ελέγχου με τις τομές στις οποίες είναι μονιμοποιημένο το υπόστρωμα. Στα παθολογικά δείγματα περιέχονται αντισώματα, τα οποία αντιδρούν με τους αντίστοιχους επιτόπους που βρίσκονται στο υπόστρωμα, οπότε μετά την επώαση τους ακολουθεί η ανοσολογική αντίδραση. Στη συνέχεια απομακρύνεται η περίσσεια των αντισωμάτων με διαδοχικές πλύσεις και ακολουθεί η προσθήκη του ειδικού αντι-IgG, το οποίο είναι σημασμένο με τη χρωστική FITCH. Μετά την απομάκρυνση της περίσσειας του αντι-IgG ακολουθεί παρατήρηση των πλακιδίων σε μικροσκόπιο φθορισμού, όπου τα θετικά δείγματα εμφανίζουν σημεία πράσινου χρώματος, τα οποία αντιστοιχούν στα σημεία όπου έχει πραγματοποιηθεί σύνδεση των αυτοαντισωμάτων των εξεταζόμενων δειγμάτων με τα αντιγόνα του υποστρώματος.

Η πειραματική διαδικασία ξεκινά με την τοποθέτηση των πλακιδίων (αφού πρώτα έχουν έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος), στα οποία είναι μονιμοποιημένο το υπόστρωμα σε ειδικό θάλαμο υγρασίας, και την προσθήκη μίας σταγόνας από τα δείγματα θετικού και αρνητικού ελέγχου στις κατάλληλες θέσεις του πλακιδίου. Στη συνέχεια προστίθενται στις εναπομένουσες θέσεις 50μl αραιωμένου δείγματος από κάθε ασθενή. Τα δείγματα αραιώνονται κατά 1/10 και η αραιώση γίνεται με PBS Buffer, το οποίο περιέχεται στο kit. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε σε αυτό το διάστημα πραγματοποιείται η σύζευξη μεταξύ των αυτοαντισωμάτων των δειγμάτων και των αντιγόνων του υποστρώματος.

Ακολουθεί πλύση των πλακιδίων με PBS Buffer για την απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων αυτοαντισωμάτων του εξεταζόμενου δείγματος και στη συνέχεια αφού αφαιρεθεί το διάλυμα πλύσης προστίθεται μικρή ποσότητα του κατάλληλου ανθρώπινου σημασμένου με τη χρωστική FITCH αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει και συνδέεται με τα αυτοαντισώματα που περιέχονται στα εξεταζόμενα δείγματα. Συγκεκριμένα για την αναγνώριση δερματικών αυτοαντισωμάτων χρησιμοποιούνται ανθρώπινα αντι-IgG AFF FITCH, ενώ για την αναγνώριση των endomysial αυτοαντισωμάτων χρησιμοποιούνται τα αντι-IgA AFF FITCH. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια πλύση με PBS Buffer για την απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων αντι-IgG AFF FITCH ή αντι-IgA AFF FITCH.

Ακολουθεί παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού και ανάλυση των αποτελεσμάτων, η οποία αρχικά περιλαμβάνει την αξιολόγηση της εικόνας του θετικού και αρνητικού μάρτυρα. Αναλυτικότερα ο θετικός μάρτυρας στην περίπτωση της πέμφιγας πρέπει να δίνει ένα πρότυπο σε πράσινου φθορισμού που μοιάζει με συρματοπλέγμα (chicken-wire pattern) στην διακυτταρική περιοχή του επιθηλίου, ενώ στην περίπτωση ενδομυϊκού θετικού δείγματος η εικόνα θα πρέπει να περιλαμβάνει στον συνδετικό ιστό περιμετρικά των λείων μυών ίνες που μοιάζουν στην ρετικουλίνη. Αντίθετα το αρνητικό δείγμα ελέγχου δε θα πρέπει να δίνει καθόλου φθορισμό. Αν δεν ισχύουν οι παραπάνω προϋποθέσεις η δοκιμασία θεωρείται μη έγκυρη και θα πρέπει να επαναληφθεί. Αναφορικά με την αξιολόγηση των δειγμάτων των ασθενών, όπως αναφέρθηκε το πρότυπο φθορισμού εξαρτάται από την νόσο και συγκεκριμένα στην περίπτωση της πέμφιγας η χρώση παρατηρείται στην διακυτταρική περιοχή του στρωματοποιημένου επιθηλίου ενώ στην περίπτωση του BP ο φθορισμός παρατηρείται στη βασική μεμβράνη κατά μήκος της δερμο-επιδερμικής σύνδεσης.



Εικόνα 2.7 Inova Diagnostics
QUANTA-Lyser® 2

2.1.2 Δοκιμασίες ΕνζυμοΣυζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης (enzyme-linked immunosorbent assay -ELISA)

➤ Αρχή μεθόδου

Η ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA (ή Δοκιμασία ΕνζυμοΣυζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης) περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τους Engvall και Perlman το 1971 και αποτελεί μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση αντιγόνων ή αντισωμάτων σε βιολογικά υγρά, τόσο για ερευνητικούς όσο και για διαγνωστικούς σκοπούς. Η ELISA, η οποία σήμερα εφαρμόζεται τόσο σε ερευνητικό όσο και σε κλινικό επίπεδο, είναι μια μέθοδος με αυξημένη ευαισθησία που μας επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων, αντιγόνων, κυτταροκινών, χημικών ουσιών και ορμονών με τη χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων και χρωμογόνου υποστρώματος. Τα βασικά πλεονεκτήματά της έναντι των άλλων ανοσοδοκιμασιών είναι η: 1. αυξημένη ευαισθησία και επαναληψιμότητα και 2. αποφυγή χρήσης ραδιενέργειας.

Η ELISA, όπως όλες οι ανοσοδοκιμασίες, βασίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Ωστόσο η ELISA αποτελεί μία ιδιαίτερα «ευέλικτη» τεχνική καθώς ανάλογα με την εφαρμογή, τα αντιδραστήρια και την ευαισθησία που επιδιώκεται, η μέθοδος έχει πολλές παραλλαγές, όπως η έμμεση ELISA, η ELISA τύπου Sandwich, η ανταγωνιστική ELISA, η άμεση και η έμμεση κυτταρική ELISA. Ανεξάρτητα από την παραλλαγή ELISA που εφαρμόζεται, η εργαστηριακή διαδικασία περιλαμβάνει 4 στάδια:

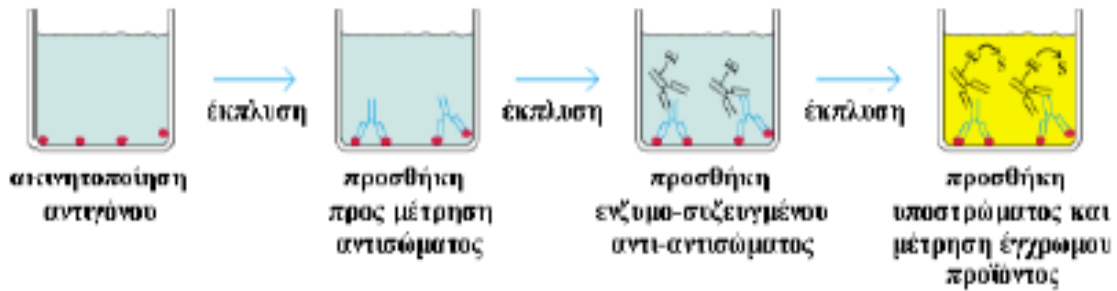
1. Πρόσδεση και ακινητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεή επιφάνεια (Ανοσοπροσρόφηση, ImmunoSorbent). Το εξεταζόμενο αντιγόνο ή αντίσωμα αρχικά ακινητοποιείται σε στερεά επιφάνεια, είτε μέσω χημικού δεσμού (προσκόλληση σε σφαιρίδια κυτταρίνης, αγαρόζης, πολυακρυλαμιδίου) είτε μέσω φυσικής προσρόφησης με υδρόφοβο δεσμό (προσρόφηση σε πλαστική επιφάνεια). Η πρακτική απλότητα χειρισμού των πλαστικών σκευών και η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιώντας πλάκες μικροτιτλοποίησης καθιστά τον δεύτερο τρόπο προσρόφησης ευρύτερα χρησιμοποιούμενο στις ανοσοδοκιμασίες ELISA.
2. Χρήση ενζυμο-συζευγμένου (Enzyme-Linked) αντισώματος. Αυτό το στάδιο αποτελεί ένα βασικό χαρακτηριστικό της μεθόδου ELISA και η σύζευξη μεταξύ ενζύμου και αντισώματος γίνεται μέσω ενός σταθερού ομοιοπολικού δεσμού, ο οποίος δεν

επιηρεάζει αφενός την ικανότητα του αντισώματος να αναγνωρίζει το αντιγόνο και αφετέρου την καταλυτική δραστικότητα του ενζύμου. Σήμερα είναι αρκετά τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται επιτυχώς στη μέθοδο ELISA, μεταξύ των οποίων είναι η υπεροξειδάση χρενου(HRP), η αλκαλική φωσφατάση (AP), η β-γαλακτοσιδάση (β-Gal). Η επιλογή του ενζύμου εξαρτάται από την εφαρμογή της μεθόδου.

3. Χρήση χρωμογόνων υποστρώματων, τα οποία μετά από την αντίδραση με το ένζυμο παράγουν διαλυτό έγχρωμο προϊόν (χρώμα ή φθορισμό), επιτρέποντας έτσι την ανίχνευση του εξεταζόμενου αντιγόνου ή αντισώματος. Η επιλογή του ζεύγους ενζύμου-υποστρώματος της χρωμογόνου αντίδρασης καθορίζει την ευαισθησία της δοκιμασίας και τα κριτήρια για την επιλογή του κατάλληλου ενζύμου-υποστρώματος είναι: (α) η ταχύτατη αντίδραση μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος έτσι ώστε να παράγεται έγχρωμο προϊόν σε μεγάλη ποσότητα, (β) το έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης να ανιχνεύεται με μεγάλη ευαισθησία και (γ) η ενζυμική δραστικότητα να μην επηρεάζεται από παράγοντες του εξεταζόμενου δείγματος.
4. Ανάλυση αποτελεσμάτων και ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου - αντισώματος. Το τελικό αυτό στάδιο εξαρτάται από την επιλογή του ενζύμου και του υποστρώματος καθώς αυτές οι παράμετροι καθορίζουν τη μέθοδο ανίχνευσης και μέτρησης του προϊόντος της ανοσοδοκιμασίας. Σε κάθε περίπτωση το τελικό προϊόν της ανοσοδοκιμασίας είναι διαλυτό, γεγονός που αποτελεί ιδιαίτερο και το σημαντικότερο χαρακτηριστικό της μεθόδου. Η μέτρηση του τελικού προϊόντος μπορεί να γίνει με φωταύγεια, φθορισμομετρία ή χρωματομετρία (93).

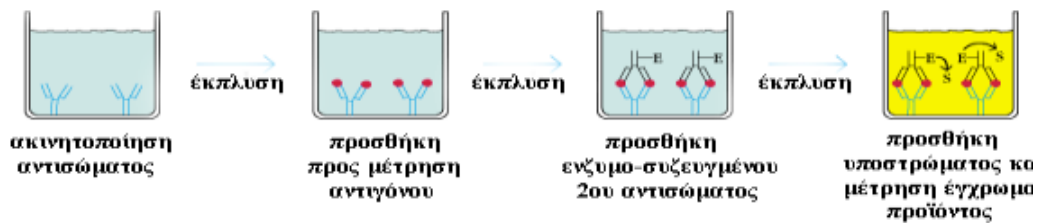
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της ELISA, μια εκ των οποίων είναι η έμμεση ELISA η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένου αντιγόνου σε βιολογικά υγρά. Στην έμμεση ELISA (Εικόνα 2.8), αρχικά το αντιγόνο ακινητοποιείται στη στερεά επιφάνεια και στη συνέχεια ακολουθεί η επώαση με το εξεταζόμενο βιολογικό υγρό. Η ύπαρξη αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων στο υπό εξέταση δείγμα διαπιστώνεται με τη χρήση ενός αντι-αντισώματος το οποίο είναι συζευγμένο με ένζυμο. Η ποσότητα του ενζύμου που θα προσδεθεί στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο «αντιγόνο - αντίσωμα - ενζυμοσυζευγμένο αντι-αντίσωμα» είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του εξεταζόμενου αντισώματος στο βιολογικό υγρό και τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν τίτλος αντισώματος. Η παραλλαγή αυτή εφαρμόζεται για: (α) ανίχνευση αντισωμάτων έναντι λοιμογόνων

παραγόντων, όπως ο ιός HIV, (β) προσδιορισμό τίτλου αντισωμάτων μετά από εμβολιασμό ή ανοσοποίηση ζώων, (γ) ανίχνευση αυτό-αντισωμάτων, (δ) ανίχνευση αντισωμάτων έναντι αλλεργιογόνων και (ε) ανίχνευση αντισωμάτων έναντι αντιγόνων, όπως στην περίπτωση της λειψμανίας (93,96).



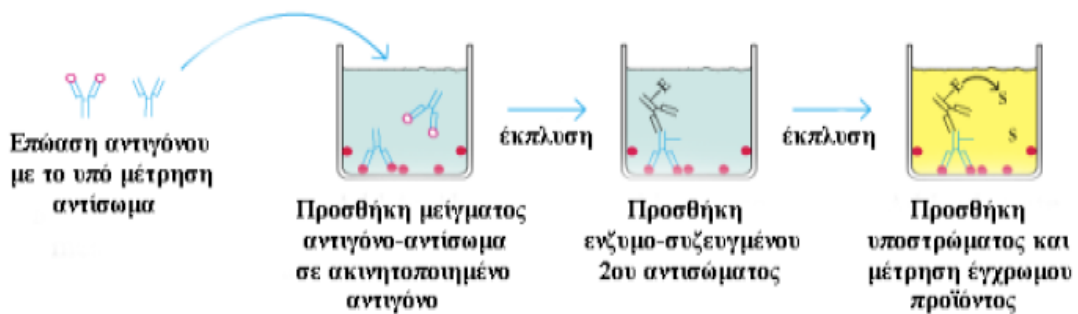
Εικόνα 2.8 Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της έμμεσης ELISA (96)

Μία άλλη παραλλαγή της ELISA είναι η τύπου «sandwich» (Εικόνα 2.9), η οποία χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου αντιγόνου σε βιολογικά υγρά. Η παραλλαγή αυτή βασίζεται στη χρήση δύο διαφορετικών αντισωμάτων τα οποία όμως αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους του αντιγόνου. Το πρώτο αντίσωμα ακινητοποιείται στην στερεά επιφάνεια, και ακολούθως προστίθεται το εξεταζόμενο δείγμα που περιέχει το υπό εξέταση αντιγόνο σε άγνωστη συγκέντρωση. Το πρώτο αντίσωμα αναγνωρίζει και έτσι ενώνεται με το εξεταζόμενο αντιγόνο και αφού ολοκληρωθεί αυτό το στάδιο ακολουθεί η προσθήκη του ενζυμο-συζευγμένου δευτέρου αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει έναν διαφορετικό επίτοπο του εξεταζόμενου αντιγόνου. Η ποσότητα του δευτέρου αντισώματος που θα προσδεθεί, άρα και ενζύμου, είναι ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου που έχει προσδεθεί στο πρώτο αντίσωμα. Ακολούθως, προστίθεται το κατάλληλο υπόστρωμα και μέσω ενζυμικής αντίδρασης ανιχνεύεται η ποσότητα του προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης, η οποία είναι ανάλογη με την ποσότητα του αντιγόνου που έχει συνδεθεί με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Για την ποσοτικοποίηση των εξεταζόμενων δειγμάτων χρησιμοποιείται καμπύλη αναφοράς που γίνεται με διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αναφοράς του αντιγόνου και τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν σε διεθνή μονάδα συγκέντρωσης (g/l ή υποδιαιρέσεις, π.χ. ng/ml, pg/ml). Η ELISA τύπου «Sandwich» εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό ορμονών, κυτταροκινών, ανοσοσφαιρινών και άλλων πρωτεϊνών σε βιολογικά υγρά και σε υπερκείμενα καλλιιεργειών (93,96).



Εικόνα 2.9 Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της ELISA τύπου «sandwich» (96)

Στην περίπτωση που απαιτείται η ποσοτικοποίηση του αντιγόνου αλλά είτε υπάρχει ένα μόνο αντίσωμα είτε το αντιγόνο διαθέτει μόνο έναν επίτοπο τότε εφαρμόζεται μία άλλη παραλλαγή της ELISA η οποία είναι γνωστή σαν ανταγωνιστικού τύπου ELISA (Εικόνα 2.10). Σε αυτή την περίπτωση υπάρχει ανταγωνισμός για πρόσδεση στο αντίσωμα μεταξύ του διαλυτού και του ακινητοποιημένου σε στερεά επιφάνεια αντιγόνου. Το αντιγόνο σε διαλυτή μορφή αναμειγνύεται με περίσσεια ενζυμο-συζευγμένου αντισώματος και αυτό το μείγμα συνεπιάζεται με το ακινητοποιημένο σε στερεά επιφάνεια αντιγόνο, σε συνθήκες που επιτρέπουν να αναπτυχθεί ο επιθυμητός ανταγωνισμός. Η ενζυμική αντίδραση είναι μέγιστη απουσία του διαλυτού αντιγόνου και μειώνεται αυξανόμενης της συγκέντρωσής του (93,96).



Εικόνα 2.10 Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της ανταγωνιστικού τύπου ELISA (96)

Η κλωνοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί τα κύρια αντιγόνα της πέμφιγας, τα Dsg1 και Dsg3, επέτρεψαν την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των IgG αυτοαντισωμάτων με εφαρμογή της μεθόδου ELISA (92). Η ανίχνευση των IgG αυτοαντισωμάτων μέσω ELISA δίνει θετικά ευρήματα σε περισσότερο από το 90% των περιπτώσεων (85). Τα επίπεδα στον ορό των IgG αυτοαντισωμάτων έναντι των Dsg1 και Dsg3 συσχετίζονται γενικά με την έκταση και την επιθετικότητα της νόσου ενώ η ανίχνευση μέσω ELISA υψηλών επιπέδων αντι-Dsg1 αυτοαντισωμάτων έχουν θετική

προγνωστική αξία για υποτροπές του δέρματος (85). Ως εκ τούτου, η ELISA μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν καλό ορολογικό προγνωστικό δείκτη της ασθένειας, αν και δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία από μεγάλες προοπτικές μελέτες για την προβλεπτική αξία αυτής της δοκιμασίας (85).

Στην περίπτωση του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς η ELISA μπορεί να ανιχνεύσει IgG αντι-BP180 και αντι-BP230 αντισώματα, όπου τα επίπεδα των αντι-BP180 αντισωμάτων στον ορό είναι δυνατόν να ελέγχονται και να προσδιορίζονται κατά τη διάρκεια της νόσου. Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα των αντι-BP180 NC16A IgG μετά τη διακοπή της θεραπείας θεωρούνται ένας αξιόπιστος δείκτης πρόβλεψης του κινδύνου υποτροπής. Ωστόσο και σε αυτή την περίπτωση θετικό αποτέλεσμα έχει αναφερθεί σε υγιή άτομα αλλά και σε ασθενείς που πάσχουν από άλλες φλεγμονώδεις δερματικές διαταραχές (87).

➤ **Ανίχνευση και Ποσοτικοποίηση των αντι-Desmoglein 1 και αντι-Desmoglein 3 IgG αντισωμάτων**

Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των αντι-Desmoglein 1 και 3 IgG αντισωμάτων μέσω ELISA με χρήση των kit Anti-Desmoglein 1 ELISA (IgG) και Anti-Desmoglein 3 ELISA (IgG) (Euroimmun). Τα συγκεκριμένα αντισώματα αποτελούν χρήσιμους δείκτες για τα πεμφιγοειδή νοσήματα. Η συσχέτιση των αντι-Desmoglein 1 και αντι-Desmoglein 3 αυτοαντισωμάτων με την παθογένεια αυτών των ασθενειών είναι καλά επιβεβαιωμένη αν και παραμένει ακόμα άγνωστη η συμμετοχή τους στον μηχανισμό σχηματισμού των πεμφίγων (97,98). Αν και η κλινική διάγνωση βασίζεται στην παρουσία τυπικών δερματολογικών συμπτωμάτων, σήμερα θεωρείται gold standard στη διάγνωση των πεμφιγοειδών αυτοάνοσων νοσημάτων ο προσδιορισμός των αυτοαντισωμάτων και/ή του C3 που είναι συνδεδεμένα στο δέρμα ή στους βλεννογόνους των ασθενών.

Βάσει των παραπάνω, η ανάπτυξη του ανοσοφθορισμού και της ELISA έχουν συμβάλλει σημαντικά στη διάγνωση αυτών των ασθενειών καθώς ο προσδιορισμός τόσο των κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων μέσω ανοσοφθορισμού όσο και των αντι-Desmoglein 1 και αντι-Desmoglein 3 αυτοαντισωμάτων μέσω ELISA αποτελούν σήμερα καθιερωμένες, σε κλινικό επίπεδο, διαγνωστικές πρακτικές, οι οποίες χαρακτηρίζονται μάλιστα και από την ίδια ευαισθησία και ειδικότητα (99,100)(101). Συγκεκριμένα η ευαισθησία και ειδικότητα της αντι-Desmoglein 1 ELISA είναι 100% και 94.7% αντίστοιχα ενώ για την αντι-Desmoglein 1 ELISA

τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 85% και 99.1% (101). Στις περισσότερες περιπτώσεις η εφαρμογή της ELISA για την ανίχνευση των αντι-Desmoglein 1 και αντι-Desmoglein 3 αυτοαντισωμάτων επαρκεί για τη διάγνωση αυτών των νοσημάτων (102), και μόνο επί αρνητικού αποτελέσματος της ELISA κρίνεται απαραίτητη η διάγνωση της πέμφιγας μέσω του IFA. Η αντι-Desmoglein 3 ELISA είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη διαφοροδιάγνωση της κοινής πέμφιγας από την Lichen ruber mucosa, benign aphtha, Behcet's disease Steven-Johnson σύνδρομο, στην περίπτωση όπου οι ασθενείς εμφανίζουν βλάβες στο βλεννογόνο της στοματικής κοιλότητας. Σε ασθενείς οι οποίοι δεν έχουν λάβει θεραπεία ένα θετικό αποτέλεσμα στην αντι-Desmoglein 3 ELISA είναι ενδεικτικό της ύπαρξης κοινής πέμφιγας μόνο στους βλεννογόνους, ενώ θετικό αποτέλεσμα και στην αντι-Desmoglein 1 ELISA υποδηλώνει την ύπαρξη κοινής πέμφιγας τόσο στους βλεννογόνους όσο και στο δέρμα. Από την άλλη πλευρά θετικό αποτέλεσμα στην αντι-Desmoglein 1 ELISA είναι ενδεικτικό της ύπαρξης φυλλώδους πέμφιγας. Σε αυτή την κατηγορία νοσημάτων ανήκει και η IgA πέμφιγα, η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία IgA αντισωμάτων τα οποία αναγνωρίζουν και εξουδετερώνουν κυρίως την desmocollin 1 και δευτερευόντως τις Desmoglein 1 ή 3. Τέλος τα επίπεδα των αντι-Desmoglein 1 και 3 αυτοαντισωμάτων παρουσιάζουν ισχυρή συσχέτιση όχι μόνο την επιθετικότητα της νόσου αλλά και την ανταπόκριση στη θεραπεία (100).

Τα ELISA test kits που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης επιτρέπουν τον ημιποσοτικό ή ποσοτικό προσδιορισμό των αντι-Desmoglein 1 και 3 IgG αυτοαντισωμάτων και περιλαμβάνουν ειδικά διαμορφωμένα πιάτα μικροτίτλων στα οποία έχει μονιμοποιηθεί είτε η Desmoglein 1 είτε η Desmoglein 3. Περιλαμβάνουν επίσης ειδικά αντισώματα συνδεδεμένα με το ένζυμο υπεροξειδάση τα οποία αναγνωρίζουν και συνδέονται με ανθρώπινα IgG αντισώματα (peroxidase-labeled anti-human IgG), καθώς επίσης και το υπόστρωμα που αναγνωρίζεται από το συγκεκριμένο ένζυμο.

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα 4 στάδια της ELISA και συγκεκριμένα στο πρώτο στάδιο μεταφέρονται στις προκαθορισμένες θέσεις (wells) του πιάτου μικροτίτλων 100μl θετικού ή αρνητικού δείγματος ελέγχου ή 100μl βαθμονομητή (calibrator) ή 100μl εξεταζόμενου δείγματος το οποίο έχει υποστεί αραίωση 1:101 με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (sample buffer). Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά η οποία επιτρέπει τη σύνδεση των IgG (αλλά και IgM και IgA) αυτοαντισωμάτων με την Desmoglein 1 ή την Desmoglein 3. Στη συνέχεια πραγματοποιείται πλύση για την απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων

αυτοαντισωμάτων. Για τον σκοπό αυτό απομακρύνεται το αρχικό μείγμα αντίδρασης και στη συνέχεια προστίθενται σε κάθε θέση του πιάτου μικροτίτλων διαδοχικά και εις τριπλούν 300μl από το ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (wash buffer). Σε κάθε κύκλο πλύσης το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης αφήνεται για 30-60 sec και στη συνέχεια ακολουθεί προσεκτική αφαίρεσή του από το πιάτο μικροτίτλων.

Στο δεύτερο στάδιο της διαδικασίας πραγματοποιείται η προσθήκη του δεύτερου αντισώματος το οποίο είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση. Συγκεκριμένα προστίθενται 100μl αντισώματος σε κάθε θέση του πιάτου μικροτίτλων και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Υπό αυτές τις συνθήκες επιτρέπεται η πρόσδεση του δεύτερου αντισώματος με το ήδη σχηματισμένο (1^ο στάδιο) σύμπλοκο αντι-Desmoglein 1-Desmoglein 1 ή αντι-Desmoglein 3-Desmoglein 3. Έπειτα πραγματοποιείται πλύση με τον ίδιο που τρόπο που περιγράφηκε στο 1^ο στάδιο για την απομάκρυνση του πλεονάζοντος μη συνδεδεμένου 2^{ου} αντισώματος.

Το τρίτο στάδιο περιλαμβάνει την προσθήκη σε κάθε θέση του πιάτου μικροτίτλων 100μl του ειδικού υποστρώματος και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος. Η επώαση αυτή επιτρέπει την πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης και συνεπώς την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος ενώ η προστασία από το φως εξασφαλίζει ότι δε θα επηρεαστεί η ποιότητα του προϊόντος της αντίδρασης. Το στάδιο αυτό ολοκληρώνεται με την προσθήκη σε κάθε θέση του πιάτου μικροτίτλων 100μl κατάλληλου διαλύματος για τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης.

Τέλος στο τέταρτο στάδιο λαμβάνει χώρα ο ποσοτικός ή ποιοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου έγχρωμου προϊόντος μέσω φωτομέτρησής του στα 450nm και στα 620-650nm. Η μέτρηση αυτή γίνεται μετά την πάροδο 30 λεπτών από την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης και μετά από προσεκτική και ήπια ανάδευση του μίγματος αντίδρασης για την εξασφάλιση της ομοιόμορφης κατανομής του έγχρωμου προϊόντος σε κάθε θέση του πιάτου μικροτίτλων.

Οι τιμές της φωτομέτρησης στη συνέχεια αναλύονται και υπολογίζεται η αναλογία του σήματος που προκύπτει για κάθε εξεταζόμενο δείγμα σε συνάρτηση με το σήμα του βαθμονομητή. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Extinction of the control or patient sample}}{\text{Extinction of the calibrator}}$$

Σύμφωνα με τις οδηγίες του kit αρνητικό αποτέλεσμα θεωρείται όταν η παραπάνω αναλογία έχει τιμές <1 ενώ μία τιμή ≥ 1 είναι ενδεικτική θετικού αποτελέσματος.

➤ Δημιουργία δερματολογικού προφίλ μέσω ELISA

Η δημιουργία του δερματολογικού προφίλ βασίζεται στην ανίχνευση μέσω της ELISA των IgG αυτοαντισωμάτων που στοχεύουν τις 6 πιο βασικές δομικές πρωτεΐνες του δέρματος στα αυτοάνοσα πομφολυγώδη νοσήματα, δηλαδή τις BP180, BP230, Desmoglein 1, Desmoglein 3, Envoplakin και κολλαγόνο τύπου VII. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη το kit Dermatology Profile ELISA (IgG) (Euroimmune), το οποίο επιτρέπει τον προσδιορισμό πολλαπλών δεικτών μέσω μίας μόνο δοκιμασίας, η οποία επιτρέπει τη διαφοροδιάγνωση των τεσσάρων βασικών τύπων που περιλαμβάνονται στον όρο «αυτοάνοσα πομφολυγώδη νοσήματα»:

1. πεμφιγοειδή νοσήματα
2. πέμφιγα, όπου περιλαμβάνεται και η παρανεοπλασματική πέμφιγα
3. Epidermolysis Bullosa Acquisita (EBA)
4. Dermatitis herpetiformis (DH)

Τα πεμφιγοειδή νοσήματα χαρακτηρίζονται από τον υποεπιδερμικό σχηματισμό πομφολύγων κοντά στη βασική μεμβράνη και βασικός εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας είναι το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (BP). Αν και συνήθως το BP αναγνωρίζεται κλινικά από το χαρακτηριστικό πρότυπο πομφολύγων που αναπτύσσεται, υπάρχουν περιπτώσεις όπου η ανάπτυξη της νόσου δεν συνοδεύεται από αυτή την κλινική εκδήλωση τις πρώτες εβδομάδες ή ακόμα και μήνες. Έτσι οι ηλικιωμένοι άνθρωποι με εμμένουσες δερματικές διαταραχές θα πρέπει να εξετάζονται για BP. Τα αυτοαντισώματα που παράγονται σε αυτή τη νόσο στοχεύουν τις πρωτεΐνες BP180 (κυρίως την NC16A περιοχή) και BP230. Στην περίπτωση της EBA παράγονται αυτοαντισώματα τα οποία στοχεύουν το κολλαγόνο τύπου VII, ενώ στην DH τα αυτοαντισώματα στοχεύουν την επιδερμική τρανσγλουταμινάση ή την ιστική τρανσγλουταμινάση και την γλιαδίνη. Τέλος η παρανεοπλασματική πέμφιγα σχετίζεται με την εμφάνιση αυτοαντισωμάτων τα οποία στοχεύουν διάφορες δεσμοσωμικές και ημιδεσμοσωμικές πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η desmoplakin 1 και 2, envoplakin, periplakin, plectin, BP230, Desmoglein 1 και Desmoglein 3.

Είναι πλέον σαφές ότι τα αυτοάνοσα πομφολυγώδη νοσήματα αποτελούν μία ομάδα νοσημάτων τα οποία συχνά μοιράζονται κοινά κλινικά χαρακτηριστικά αλλά οφείλονται σε διαφορετικά ανοσολογικά μονοπάτια τα οποία ασφαλώς επηρεάζουν τη λειτουργία διαφορετικών μορίων που εμπλέκονται στη λειτουργία του δέρματος. Έτσι πολλές φορές καθίσταται επιτακτική η ανάγκη διαφοροδιάγνωσης των συγκεκριμένων ασθενειών, η οποία βασίζεται στη δημιουργία του ανοσολογικού προφίλ του κάθε ασθενή. Η χρήση του συγκεκριμένου Kit εξυπηρετεί αυτόν τον σκοπό καθώς επιτρέπει, όπως προαναφέρθηκε την ανίχνευση των IgG αυτοαντισωμάτων που στοχεύουν τις 6 πιο βασικές δομικές πρωτεΐνες του δέρματος που εμπλέκονται στους διαφορετικούς τύπους των αυτοάνοσων πομφολυγωδών νοσημάτων. Το συγκεκριμένο kit περιλαμβάνει ένα πιάτο μικροτίτλων 96 θέσεων (8 σειρές x 12 θέσεις), όπου σε κάθε οκτάδα έχει ακινητοποιηθεί ένα από τα 6 εξεταζόμενα αντιγόνα, καθώς επίσης και ένα δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση, το κατάλληλο υπόστρωμα, και τα διαλύματα πλύσης και τερματισμού της ενζυμικής αντίδρασης.

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα ίδια στάδια που αναφέρθηκαν παραπάνω για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των αντι-Desmoglein 1 και αντι-Desmoglein 3 IgG αντισωμάτων ενώ ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων βασίζεται στον παρακάτω τύπο, ενώ η διαφοροδιάγνωση γίνεται με βάση τις τιμές του Πίνακα 2.1:

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Extinction of the control or patient sample}}{\text{Antigen specific factor x extinction of the calibrator}}$$

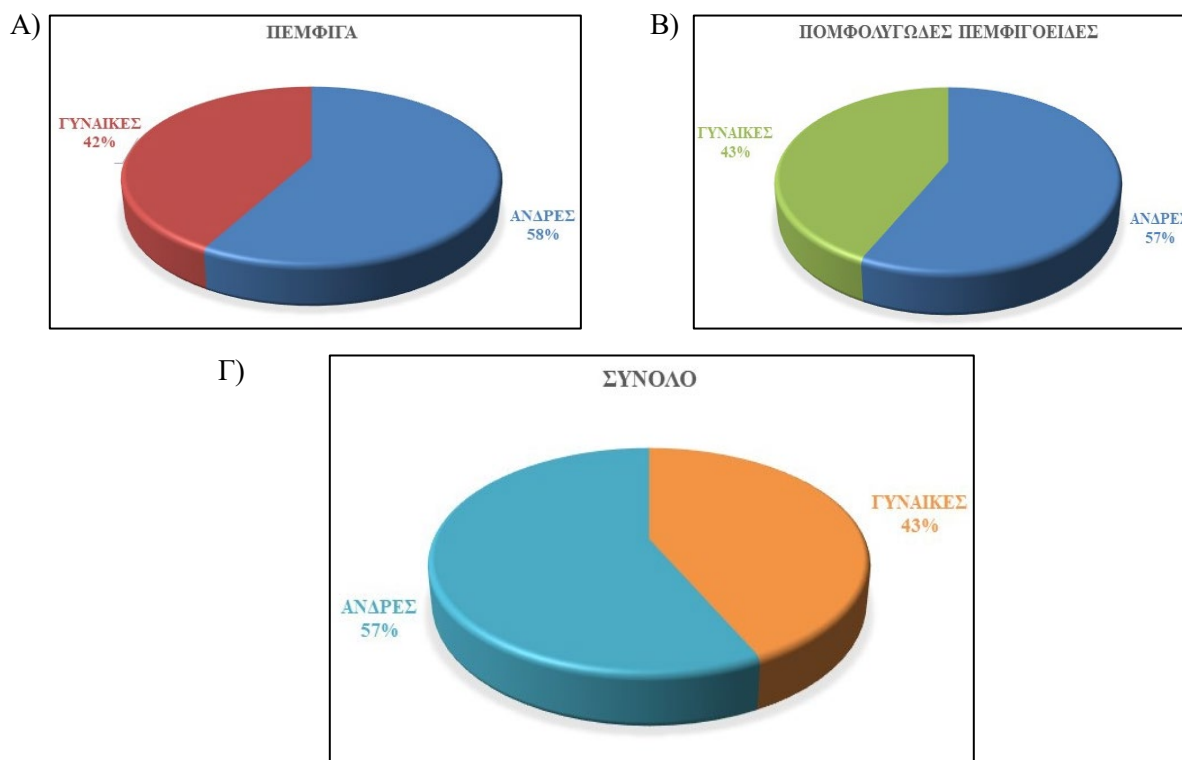
Πίνακας 2.1 Επιπολασμός στον ορό (seroprevalence) των αυτοαντισωμάτων που εμπλέκονται στα αυτοάνοσα πομφολυγώδη νοσήματα

Νόσος	Αυτοαντιγόνο-Επιπολασμός αντισωμάτων
BP	BP180 και BP230 - >90%
EBA	Κολλαγόνου τύπου VII – περίπου 50%
DH	Ιστική τρανσγλουταμινάση – περίπου 80%
Φυλλώδης πέμφιγα	Dsg1- >90%
Κοινή πέμφιγα	Dsg1 και Dsg3- >90%
IgA πέμφιγα	Dsg1 ή Dsg3 και desmokolini 1- περίπου 50%
Παρανεοπλασματική πέμφιγα	envoplakin, periplakin, desmoplakin 1 και 2-περίπου 80%, BP230, plectin, Dsg1 και Dsg3- περίπου 80%

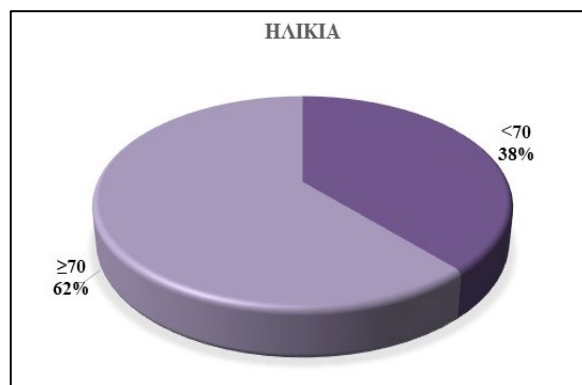
Αποτελέσματα

3.1 Κλινικά δείγματα

Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας αναλύθηκαν με εφαρμογή των μεθοδολογιών του άμεσου και έμμεσου ανοσοφθορισμού καθώς και της ELISA δείγματα ορού και ιστού από 38 ασθενείς με κοινή πέμφιγα καθώς και από 58 ασθενείς με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές. Το 42.7% (n= 41) αυτών ήταν γυναίκες ενώ το υπόλοιπο 57.3% (n= 55) ήταν άνδρες (Εικόνα 3.1Γ). Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 69.7 έτη (τυπική απόκλιση =16.6), το εύρος ήταν 17-99 έτη ενώ η διάμεσος είναι τα 74.5 έτη.



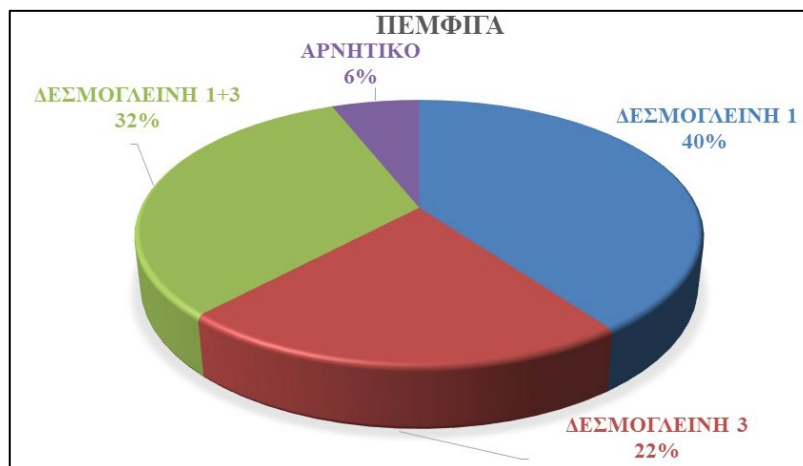
Εικόνα 3.1 Ποσοστά ανδρών-γυναικών στους ασθενείς Α) με κοινή πέμφιγα, Β) με πομφολυγώδες πεμφιγοειδές και Γ) συνολικά



Εικόνα 3.2 Ποσοστά ασθενών με βάση την κατανομή της ηλικίας (Ο διαχωρισμός στις δύο ομάδες έγινε βάσει της διαμέσου (~ 70 έτη)

3.2 Εφαρμογή του έμμεσου ανοσοφθορισμού και της ELISA στην κοινή πέμφιγα

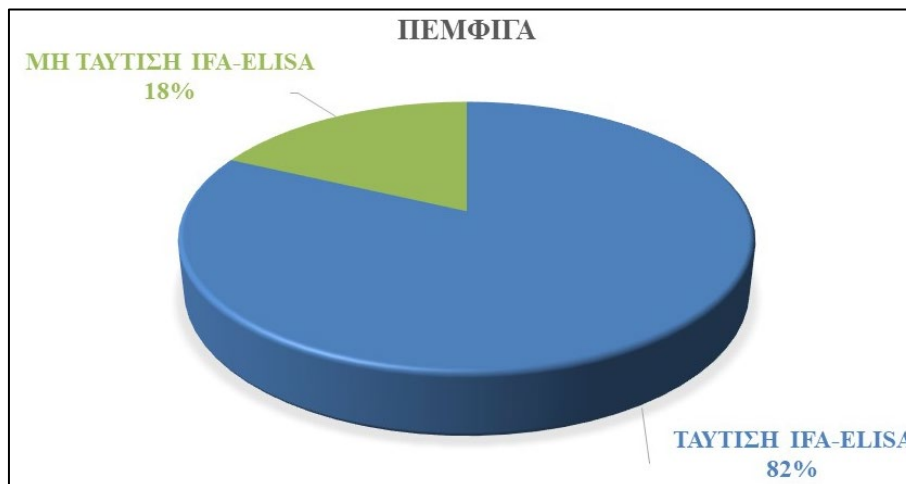
Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός και ELISA για την ανίχνευση των αντι-Desmoglein 1 και 3 IgG αντισωμάτων σε δείγματα 38 ασθενών οι οποίοι πάσχουν από κοινή πέμφιγα. Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός έδωσε θετικό αποτέλεσμα για το σύνολο των ασθενών. Από την άλλη πλευρά σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ELISA το 6% των ασθενών χαρακτηρίζονται αρνητικοί ως προς της παρουσία των παραπάνω αντισωμάτων στον ορό του αίματος, ενώ το 40% και 22% των ασθενών βρέθηκαν θετικοί ως προς την παρουσία των αντι-Desmoglein 1 IgG και αντι-Desmoglein 3 IgG αυτοαντισωμάτων, αντίστοιχα. Τέλος 32% των ασθενών βρέθηκαν θετικοί ως προς τα δύο αυτά αυτοαντισώματα (Εικόνα 3.3). Όπως προαναφέρθηκε η εφαρμογή της ELISA διευκολύνει στο διαχωρισμό των κλινικών τύπων της κοινής πέμφιγας καθώς αυξημένα επίπεδα 1. των κυκλοφορούντων αντι-Desmoglein 3 αυτοαντισωμάτων σχετίζονται με ασθένεια που επηρεάζει μόνο τους βλενογόνους, 2. των των κυκλοφορούντων αντι-Desmoglein 1 αυτοαντισωμάτων είναι ενδεικτικά της ύπαρξης φυλλώδους πέμφιγας και σχετίζονται με τη δερματική μόνο ασθένεια και 3. των κυκλοφορούντων αντι-Desmoglein 1 και 3 αυτοαντισωμάτων είναι ενδεικτικά της βλεννοδερματικής ασθένειας. Τέλος τα επίπεδα των αντι-Desmoglein 1 και 3 αυτό-αντισωμάτων παρουσιάζουν ισχυρή συσχέτιση όχι μόνο την επιθετικότητα της νόσου αλλά και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι για 8 από τους εξεταζόμενους ασθενείς υπήρχαν δεδομένα από τον άμεσο ανοσοφθορισμό, σύμφωνα με τον οποίο οι 7 ασθενείς χαρακτηρίστηκαν θετικοί, συμφωνώντας με τα αποτελέσματα του έμμεσου ανοσοφθορισμού και της ELISA.



Εικόνα 3.3 Αποτελέσματα της αντι-Desmoglein 1 και 3 ELISA στους ασθενείς με κοινή πέμφιγα

3.3 Σύγκριση έμμεσου ανοσοφθορισμού και ELISA στην κοινή πέμφιγα

Η σύγκριση του έμμεσου ανοσοφθορισμού και της ELISA έδειξε ότι για τους περισσότερους ασθενείς τα αποτελέσματα των δύο μεθοδολογιών ταυτίζονται. Πιο αναλυτικά στο 18% των ασθενών ο έμμεσος ανοσοφθορισμός έδωσε θετικό αποτέλεσμα σε αντίθεση με την ELISA, η οποία έδωσε αρνητικό αποτέλεσμα, ενώ στο 82% των ασθενών υπήρχε ταύτιση ανάμεσα στα αποτελέσματα των δύο μεθοδολογιών (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4 Σύγκριση έμμεσου ανοσοφθορισμού (IFA) και ELISA σε ασθενείς με κοινή πέμφιγα

3.4 Εφαρμογή του έμμεσου ανοσοφθορισμού και της ELISA στο BP

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός και ELISA για την ανίχνευση των BP180 και BP239 αντισωμάτων σε δείγματα 58 ασθενών οι οποίοι πάσχουν από BP. Όμοια με την κοινή πέμφιγα ο έμμεσος ανοσοφθορισμός έδωσε θετικό αποτέλεσμα για το σύνολο των ασθενών. Από την άλλη πλευρά σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ELISA το 6% των ασθενών χαρακτηρίζονται αρνητικοί ως προς της παρουσία των παραπάνω αντισωμάτων στον ορό του αίματος, ενώ το 69% και 3% των ασθενών βρέθηκαν θετικοί ως προς την παρουσία των BP180 και BP230 αυτοαντισωμάτων, αντίστοιχα. Τέλος 22% των ασθενών βρέθηκαν θετικοί ως προς τα δύο αυτά αυτοαντισώματα (Εικόνα 3.5). Όπως έχει αναφερθεί τα αυτοάνοσα πομφολυγώδη νοσήματα αποτελούν μία ομάδα νοσημάτων τα οποία συχνά μοιράζονται κοινά κλινικά χαρακτηριστικά αλλά οφείλονται σε διαφορετικά ανοσολογικά μονοπάτια τα οποία ασφαλώς επηρεάζουν τη λειτουργία διαφορετικών μορίων που εμπλέκονται στη λειτουργία του δέρματος. Έτσι πολλές φορές καθίσταται επιτακτική η ανάγκη διαφοροδιάγνωσης των συγκεκριμένων ασθενειών, η οποία βασίζεται στη δημιουργία

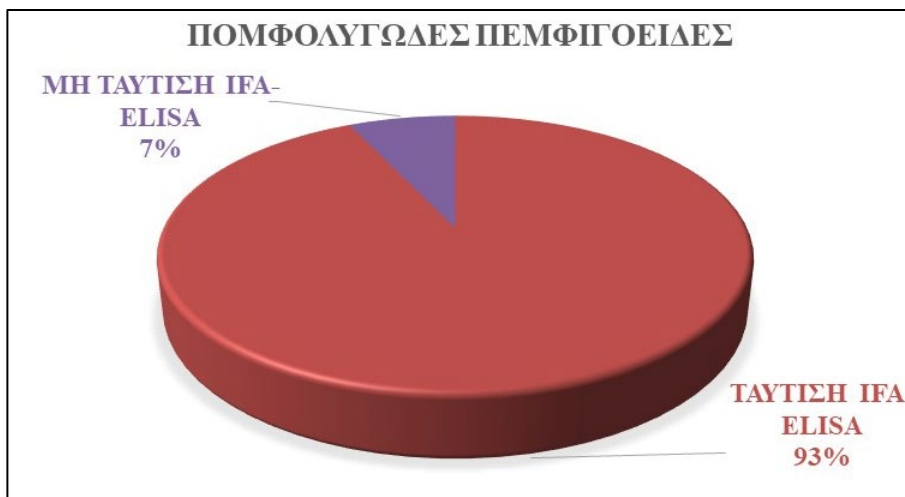
του ανοσολογικού προφίλ του κάθε ασθενή. Η δημιουργία του δερματολογικού προφίλ εξυπηρετεί αυτόν τον σκοπό καθώς επιτρέπει, όπως προαναφέρθηκε την ανίχνευση των IgG αυτοαντισωμάτων που στοχεύουν τις 6 πιο βασικές δομικές πρωτεΐνες του δέρματος που εμπλέκονται στους διαφορετικούς τύπους των αυτοάνοσων πομφολυγδών νοσημάτων (Πίνακας 2.1).



Εικόνα 3.5 Αποτελέσματα της BP180, BP230 ELISA στους ασθενείς με BP

3.5 Σύγκριση άμεσου, έμμεσου ανοσοφθορισμού και ELISA στο BP

Η σύγκριση του έμμεσου ανοσοφθορισμού και της ELISA έδειξε ότι για τους περισσότερους ασθενείς τα αποτελέσματα των δύο μεθοδολογιών ταυτίζονται. Συγκεκριμένα στο 7% των ασθενών ο έμμεσος ανοσοφθορισμός έδωσε θετικό αποτέλεσμα σε αντίθεση με την ELISA, η οποία έδωσε αρνητικό αποτέλεσμα, ενώ στο 93% των ασθενών υπήρχε ταύτιση ανάμεσα στα αποτελέσματα των δύο μεθοδολογιών (Εικόνα 3.6).



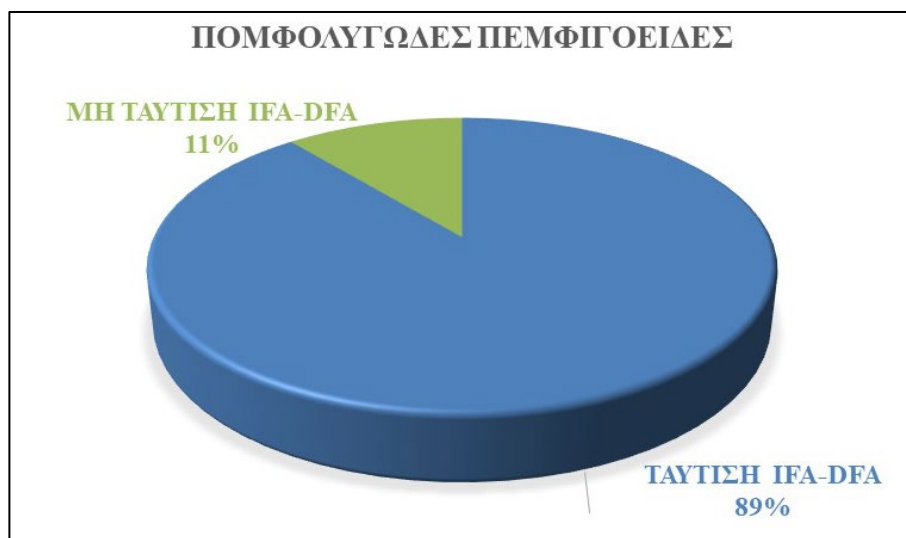
Εικόνα 3.6 Σύγκριση έμμεσου ανοσοφθορισμού (IFA) και ELISA στους ασθενείς με BP

Η αντίστοιχη σύγκριση του άμεσου ανοσοφθορισμού (DFA) με την ELISA οδήγησε σε παρόμοια αποτελέσματα. Αναλυτικότερα, από τους 32 ασθενείς, για τους οποίους υπήρχαν δεδομένα από τον άμεσο ανοσοφθορισμό, στο 94% αυτών τα αποτελέσματα των δύο μεθοδολογιών συμφωνούσαν. Αντίθετα, οι δύο μεθοδολογίες έδωσαν διαφορετικό αποτέλεσμα στο 6% των ασθενών (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7 Σύγκριση άμεσου ανοσοφθορισμού (DFA) και ELISA στους ασθενείς με BP

Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση ανάμεσα στον άμεσο και έμμεσο ανοσοφθορισμό, όπου παρατηρήθηκαν παρόμοια ποσοστά συμφωνίας. Πιο συγκεκριμένα στο 89% των ασθενών τα αποτελέσματα των δύο εκδοχών ανοσοφθορισμού συμπίπτουν, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό μη ταύτισης των αποτελεσμάτων των δύο μεθοδολογιών ήταν 11% (Εικόνα 3.8).



Εικόνα 3.8 Σύγκριση άμεσου (DFA) και έμμεσου ανοσοφθορισμού (IFA) στους ασθενείς με BP

Συζήτηση

Τα πομφολυγώδη νοσήματα αυτοάνοσης αρχής αποτελούν μία ομάδα νοσημάτων του δέρματος και των βλεννογόνων που χαρακτηρίζονται ιστοπαθολογικά από ενδοεπιδερμικές πομφόλυγες και ακανθόλυση, ενώ σε ανοσολογικό επίπεδο χαρακτηρίζονται από κυκλοφορούντα και καθηλωμένα αντισώματα τα οποία στοχεύουν την επιφάνεια των επιδερμικών κυττάρων (54). Τα συγκεκριμένα νοσήματα χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια αλλά σε γενικές γραμμές διακρίνονται σε επιφανειακά και στα εν τω βάθει και συνδέονται με την απώλεια της ανοχής των δομικών πρωτεϊνών του δέρματος. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή αυτοαντισωμάτων τα οποία στοχεύουν επιδερμικές ή υποεπιδερμικές πρωτεΐνες προσκόλλησης. Η καταστροφή αυτών των πρωτεϊνών οδηγεί με τη σειρά της σε απώλεια της προσκόλλησης μεταξύ των κερατινοκυττάρων ή ανάμεσα στα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας με την υποκείμενη επιδερμική βασική μεμβράνη γεγονός που οδηγεί τελικά στην εμφάνιση ενδοεπιθηλιακών ή υποεπιθηλιακών πομφολύγων στο δέρμα και στους βλεννογόνους. Τα αυτοάνοσα πομφολυγώδη νοσήματα εκτός του ότι έχουν χρόνια πορεία και απρόβλεπτη εξέλιξη αποτελούν επίσης μία σημαντική αιτία σοβαρής νοσηρότητας αλλά και θνησιμότητας (55).

Λόγω της μεγάλης ετερογένειας που εμφανίζουν αυτά τα νοσήματα, για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή κρίνεται απαραίτητη η ταξινόμηση τους, η οποία βασίζεται στο πόσο έντονη είναι η εμφάνιση των πομφολύγων. Βάσει αυτού του κριτηρίου σήμερα αναγνωρίζονται δύο μεγάλες ομάδες των αυτοάνοσων πομφολυγώδων νοσημάτων οι οποίες είναι γνωστές σαν «πεμφιγοειδή νοσήματα» (pemphigus diseases-PDs) και «πεμφιγοειδούς τύπου ABD». Τα πρώτα χαρακτηρίζονται από την παραγωγή παθογόνων αυτοαντισωμάτων τα οποία στοχεύουν διαφορετικές πρωτεΐνες των δεσμοσωματίων, οδηγώντας ιστολογικά στην εμφάνιση διεπιδερμικής πομφόλυγας (54), ενώ τα πεμφιγοειδούς τύπου ABD χαρακτηρίζονται από την παραγωγή κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων τα οποία στοχεύουν πολλές δομικές πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης οδηγώντας ιστολογικά στην εμφάνιση υποεπιδερμικής πομφόλυγας (57). Ασφαλώς οι δύο αυτές μεγάλες ομάδες υποδιαιρούνται σε επιπλέον κλινικές οντότητες και σήμερα αναγνωρίζουμε αρκετούς τύπους τόσο των πεμφιγοειδών νοσημάτων, με τους πιο κοινούς τύπους να είναι η κοινή πέμφιγα (*Pemphigus vulgaris*), φυλλώδης πέμφιγα και παρανεοπλασματική πέμφιγα (54), όσο και των πεμφιγοειδών τύπου ABD με βασικό εκπρόσωπο το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (57).

Αναφορικά με την επιδημιολογία αυτών των νοσημάτων, μελέτες δείχνουν για την κοινή πέμφιγα ότι η γεωγραφική κατανομή και η εθνικότητα επηρεάζουν τη συχνότητα εμφάνισης της. Για παράδειγμα η ασθένεια αυτή είναι ιδιαίτερα συχνή στους Εβραίους Ashkenazi, στους λαούς της Μεσογείου και στην Ινδία. Μάλιστα στις δύο τελευταίες περιπτώσεις η κοινή πέμφιγα εμφανίζει υψηλότερα ποσοστά σε σχέση με τη φυλλώδη. Για παράδειγμα η σύγκριση της συχνότητας εμφάνισης της κοινής πέμφιγας σε σχέση με τη φυλλώδη στο Ιράν και στη Φιλανδία αποκάλυψε ότι οι αντίστοιχες αναλογίες στο Ιράν και στη Φιλανδία είναι 12:1 και 0.5:1 αντίστοιχα. Παρόμοιες είναι και οι παρατηρήσεις σε σχέση με τη γεωγραφική κατανομή αυτών των διαταραχών καθώς έχει βρεθεί ότι στο Ιράν παρουσιάζονται ετησίως περίπου 10 περιστατικά κοινής πέμφιγας/100.000 πληθυσμού, ενώ αντίστοιχα στην Φιλανδία η αναλογία είναι 0.76/1.000.000 πληθυσμού. Οι επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η συχνότητα εμφάνισης της κοινής πέμφιγας είναι ίδια μεταξύ των δύο φύλων, ενώ συνήθως η ηλικία έναρξης είναι 36-60 έτη (54). Σε σχέση με το BP αντίστοιχες μελέτες αναφέρουν ότι η συχνότητα εμφάνισης ασφαλώς αυξάνεται σε ασθενείς άνω των 80 ετών ενώ παρατηρούνται επίσης διαφορές στη γεωγραφική κατανομή. Πιο αναλυτικά στην Ευρώπη τα ποσοστά εμφάνισης της BP κυμαίνονται μεταξύ 2.5 και 42.8 περιπτώσεις/εκατομμύριο/έτος ενώ στην Ασία είναι 2.6 έως 7.5 περιπτώσεις/εκατομμύριο/έτος (76).

Πέρα από τις επιδημιολογικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και μελέτες για τη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην εμφάνιση αυτών των αυτοάνοσων δερματικών παθήσεων με απώτερο σκοπό την πιο αξιόπιστη διάγνωση αλλά και την αποτελεσματικότερη θεραπεία τους. Έτσι σήμερα γνωρίζουμε ότι στην κοινή πέμφιγα παράγονται σε IgG αυτοαντισώματα, τα οποία στρέφονται έναντι του εξωκυττάριου τμήματος της δεσμογλεΐνης 3 (anti-Dsg 3), ενώ η φυλλώδης πέμφιγα αποδίδεται σε IgG αυτοαντισώματα έναντι της δεσμογλεΐνης 1 (anti-Dsg 1). Είναι αξιοσημείωτο ωστόσο το γεγονός ασθενείς που πάσχουν από κοινή πέμφιγα παράγουν αυτοαντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν τόσο τη δεσμογλεΐνη 1 όσο και άλλα διαμεμβρανικά συστατικά των δεσμοσωματίων. Βάσει αυτών των παρατηρήσεων αναγνωρίζονται τρεις κλινικοί τύποι της κοινής πέμφιγας στους οποίους περιλαμβάνονται 1. η ασθένεια που επηρεάζει μόνο τους βλενογόνους και σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα των κυκλοφορούντων anti-Dsg3 αυτοαντισωμάτων, 2. η δερματική μόνο ασθένεια, στην οποία επικρατούν τα anti-Dsg1 αντισώματα και η 3. βλεννοδερματική ασθένεια, όπου ανιχνεύονται τόσο anti-Dsg1 όσο και anti-Dsg3 αντισώματα (74). Σε ότι αφορά το BP,

έχει αναφερθεί η παραγωγή IgG αυτοαντισωμάτων τα οποία στοχεύουν αυτό-αντιγόνα που εντοπίζονται στην βασική μεμβράνη. Τα αυτό-αντιγόνα αυτά ονομάζονται BP180 (180 kDa) ή BPAG2, και BP230 (230kDa) ή BPAG1 και είναι συστατικά των ημιδεσμοσωματίων με ρόλο-κλειδί καθώς είναι υπεύθυνα για την προσκόλληση μεταξύ της επιδερμίδας και της δερμίδας. Η αλληλεπίδραση των αυτοαντισωμάτων με τα συγκεκριμένα αντιγόνα πραγματοποιείται στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων της βασικής στιβάδας και ακολουθείται από ενεργοποίηση του συμπληρώματος και προσέλκυση των ουδετερόφιλων και ηωσινόφιλων. Οι πομφολυγώδεις βλάβες προκύπτουν ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης πολλαπλών βιοδραστικών μορίων που απελευθερώνονται από τα μαστοκύτταρα και τα ηωσινόφιλα (76).

Τα δεδομένα αυτά ασφαλώς συνέβαλλαν στην πιο αξιόπιστη διαφοροδιάγνωση αυτών των ετερογενών νοσημάτων καθώς επέτρεψε την ανάπτυξη εργαστηριακών μεθόδων ανίχνευσης των μορίων που συμβάλλουν στην παθογένεια των αυτοάνοσων πομφολυφωδών νοσημάτων. Συγκεκριμένα για την ακριβή ταξινόμηση αυτών των νοσημάτων επιστρατεύονται οι ειδικές τεχνικές που η καθεμία προσφέρει και συμπληρώνει στο παζλ της διάγνωσης. Ενώ είναι γνωστό ότι η golden standard τεχνική διάγνωσης στα πομφολυγώδη είναι ο άμεσος ανοσοφθορισμός η ELISA και ο έμμεσος αποδεικνύονται πολύτιμα εργαλεία στην παρακολούθηση. Συγκριτικά η ELISA είναι πιο ευαίσθητη και αναλύει τον αριθμό και το είδος των αντισωμάτων. Ο έμμεσος πιστοποιεί την θετικότητα και έχει μεγάλη σημασία στην παρακολούθηση της πέμφιγας για αυτό κάνουμε αραιώσεις (τιτλοποίηση). Στο πομφολυγώδες πεμφιγοειδές μπορεί να αρνητικοποιηθεί μετά την θεραπεία. Ο άμεσος ανοσοφθορισμός είναι μία τεχνική που πραγματοποιείται σε δείγμα περιβλαβικού δέρματος ή βλεννογόνου, αν και συχνά πραγματοποιείται σε μη προσβεβλημένες περιοχές. Με την εφαρμογή του άμεσου ανοσοφθορισμού διαπιστώνεται καθήλωση ανοσοσφαιρίνης IgG ή IgA (στην IgA πέμφιγα) με μία τυπική δικτυωτή διακυτταρική κατανομή στην επιδερμίδα (85).

Η εξέταση του ορού των ασθενών μέσω του έμμεσου ανοσοφθορισμού αποτελεί μία θεμελιώδη διαγνωστική δοκιμασία για αυτές τις ασθένειες, καθώς το χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι η παρουσία κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων έναντι των δεσμοσωματικών αντιγόνων και βασίζεται στη χρήση υποστρώματος φυσιολογικού ιστού, ο οποίος συνήθως είναι οισοφάγος πιθήκου. Στην περίπτωση που το εξεταζόμενο υγρό περιέχει αντισώματα (IgG) τα οποία αναγνωρίζουν επιτόπους του υποστρώματος, πραγματοποιείται η ανοσολογική σύνδεση τους, η οποία τελικά γίνεται ορατή μέσω προσθήκης ειδικού ανθρώπινου αντι-IgG, το

οποίο είναι σημασμένο με τη χρωστική FITCH και συνδέεται με τα IgG αντισώματα που υπάρχουν στο εξεταζόμενο δείγμα. Οι θέσεις σύνδεσης και το πρότυπο φθορισμού εξαρτώνται από τη νόσο και συγκεκριμένα στην περίπτωση του BP ο έμμεσος ανοσοφθορισμός δίνει γραμμικό φθορισμό στη βασική μεμβράνη, κυρίως με IgG και C3 και σπανιότερα με IgA ή IgE. Όπως προαναφέρθηκε στην περίπτωση του IFA για το BP το εξεταζόμενο υλικό είναι συνήθως ορός αίματος αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και υγρό πομφόλυγας και πιο σπάνια ούρα (86).

Τέλος η κλωνοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί τα κύρια αντιγόνα της πέμφιγας, τα Dsg1 και Dsg3, επέτρεψαν την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των IgG αυτοαντισωμάτων με εφαρμογή της μεθόδου ELISA (92). Το προφίλ των αυτοαντισωμάτων Dsg3/Dsg1 καθορίζει το κλινικό αποτέλεσμα, αφού η κοινή πέμφιγα με αποκλειστική συμμετοχή των βλεννογόνων σχετίζεται με τη σύνθεση IgG αυτοαντισωμάτων τα οποία αναγνωρίζουν την Dsg3, ενώ η μορφή της κοινής πέμφιγας στην οποία επηρεάζονται οι βλεννογόνοι σχετίζεται με την σύνθεση αντι-Dsg1 και anti-Dsg3 IgG αυτοαντισωμάτων. Η ανίχνευση των IgG αυτοαντισωμάτων μέσω ELISA δίνει θετικά ευρήματα σε περισσότερο από το 90% των περιπτώσεων (91). Στην περίπτωση του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς η ELISA μπορεί να ανιχνεύσει IgG αντι-BP180 και αντι-BP230 αντισώματα, όπου τα επίπεδα των αντι-BP180 αντισωμάτων στον ορό είναι δυνατόν να ελέγχονται και να προσδιορίζονται κατά τη διάρκεια της νόσου (87). Βάσει των παραπάνω, η ανάπτυξη του ανοσοφθορισμού και της ELISA έχουν συμβάλει σημαντικά στη διάγνωση αυτών των ασθενειών καθώς ο προσδιορισμός τόσο των κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων μέσω ανοσοφθορισμού όσο και των αντι-Desmoglein 1 και αντι-Desmoglein 3 αυτοαντισωμάτων μέσω ELISA αποτελούν σήμερα καθιερωμένες, σε κλινικό επίπεδο, διαγνωστικές πρακτικές, οι οποίες χαρακτηρίζονται μάλιστα και από την ίδια ευαισθησία και ειδικότητα (99-101).

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι το φάσμα των πολυφολυγωδών νόσων είναι ιδιαίτερα μεγάλο και συχνά η κλινική εικόνα δεν συνάδει με τα ευρήματα της ιστολογικής εξέτασης και του ανοσοφθορισμού, γεγονός που εμποδίζει την εξαγωγή ασφαλώς συμπερασμάτων και την στοιχειοθέτηση μίας ακριβούς διάγνωσης. Έτσι πλέον είναι σαφές ότι υπάρχει ανάγκη χρήσης νέων μεθόδων για τη διαφορική διάγνωση, τη θεραπεία και την πρόγνωση αυτών των νοσημάτων. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η αξιολόγηση της ευαισθησίας, της ειδικότητας, της αξιοπιστίας και της απόδοσης του άμεσου και έμμεσου ανοσοφθορισμού

καθώς και της ανοσοενζυμικής μέθοδος (ELISA) στην διάγνωση των πομφολυγωδών δερματοπαθειών. Για τον σκοπό αυτό αξιολογήθηκαν οι εργαστηριακές εξετάσεις ως προς την αξιοπιστία, ευαισθησία και ειδικότητά τους, που χρησιμοποιήθηκαν για την διάγνωση των πομφολυγωδών δερματοπαθειών στο Ανοσοδερματολογικό εργαστήριο του νοσοκομείου Ανδρέας Συγγρός σε 100 ασθενείς που εξετάστηκαν από 1-9- 2019 έως 31-3-2020. Τα ευρήματα αναλύθηκαν στατιστικά για την εξαγωγή συμπερασμάτων ικανών να συμβάλλουν στην αξιολόγηση των εργαστηριακών μεθόδων.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός και ELISA για την ανίχνευση των αντι-Desmoglein 1 και 3 IgG αντισωμάτων σε δείγματα 38 ασθενών με κοινή πέμφιγα. Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός έδωσε θετικό αποτέλεσμα για το σύνολο των ασθενών. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της ELISA αποκάλυψε ότι το 40% και 22% των ασθενών βρέθηκαν θετικοί ως προς την παρουσία των αντι-Desmoglein 1 IgG και αντι-Desmoglein 3 IgG αυτοαντισωμάτων, αντίστοιχα, ενώ το 32% των ασθενών βρέθηκαν θετικοί ως προς τα δύο αυτά αυτοαντισώματα. Το 6% των ασθενών χαρακτηρίζονται αρνητικοί ως προς της παρουσία των παραπάνω αντισωμάτων στον ορό του αίματος. Η ELISA αποτελεί μία αξιόπιστη, εύκολη και οικονομική τεχνική, η οποία στην περίπτωση της πέμφιγας συμβάλλει στη διαφοροδιάγνωση των κλινικών τύπων πεμφιγοειδών αυτοάνοσων νοσημάτων.

Αν και η κλινική διάγνωση βασίζεται στην παρουσία τυπικών δερματολογικών συμπτωμάτων, σήμερα θεωρείται gold standard στη διάγνωση των πεμφιγοειδών αυτοάνοσων νοσημάτων ο προσδιορισμός των αυτοαντισωμάτων και/ή του C3 που είναι συνδεδεμένα στο δέρμα ή στους βλεννογόνους των ασθενών. Βάσει των παραπάνω, η ανάπτυξη του ανοσοφθορισμού και της ELISA έχουν συμβάλλει σημαντικά στη διάγνωση αυτών των ασθενειών καθώς ο προσδιορισμός τόσο των κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων μέσω ανοσοφθορισμού όσο και των αντι-Desmoglein 1 και αντι-Desmoglein 3 αυτοαντισωμάτων μέσω ELISA αποτελούν σήμερα καθιερωμένες, σε κλινικό επίπεδο, διαγνωστικές πρακτικές, οι οποίες χαρακτηρίζονται μάλιστα και από την ίδια ευαισθησία και ειδικότητα (99-101). Συγκεκριμένα η ευαισθησία και ειδικότητα της αντι-Desmoglein 1 ELISA είναι 100% και 94.7% αντίστοιχα ενώ για την αντι-Desmoglein 3 ELISA τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 85% και 99.1% (101). Στις περισσότερες περιπτώσεις η εφαρμογή της ELISA για την ανίχνευση των αντι-Desmoglein 1 και αντι-Desmoglein 3 αυτοαντισωμάτων επαρκεί για τη διάγνωση αυτών των νοσημάτων (102), και μόνο επί αρνητικού αποτελέσματος της ELISA κρίνεται απαραίτητη

η διάγνωση της πέμφιγας μέσω του IFA. Ο προσδιορισμός των αντι-Dsg 1 και 3 μέσω ELISA βοηθά στην κλινική πράξη στη διάκριση των διαφορετικών κλινικών τύπων της κοινής πέμφιγας καθώς αυξημένα επίπεδα 1. των κυκλοφορούντων αντι-Dsg 3 αυτοαντισωμάτων σχετίζονται με ασθένεια που επηρεάζει μόνο τους βλενογόνους, 2. των κυκλοφορούντων αντι-Dsg 1 αυτοαντισωμάτων είναι ενδεικτικά της ύπαρξης φυλλώδους πέμφιγας και σχετίζονται με τη δερματική μόνο ασθένεια και 3. των κυκλοφορούντων αντι-Dsg 1 και 3 αυτοαντισωμάτων είναι ενδεικτικά της βλεννοδερματικής ασθένειας. Τέλος τα επίπεδα των αντι-Dsg 1 και 3 αυτοαντισωμάτων παρουσιάζουν ισχυρή συσχέτιση όχι μόνο την επιθετικότητα της νόσου αλλά και την ανταπόκριση στη θεραπεία (100).

Στη συνέχεια κρίθηκε απαραίτητη η σύγκριση των αποτελεσμάτων του έμμεσου ανοσοφθορισμού (IFA) και την ELISA, οπότε προέκυψε μία σημαντική ταύτιση των αποτελεσμάτων αυτών των δύο μεθοδολογιών. Αναλυτικότερα στο 82% των ασθενών υπήρχε ταύτιση ανάμεσα στα αποτελέσματα των δύο μεθοδολογιών, υποστηρίζοντας αυτό που έχει ήδη αναφερθεί ότι δηλαδή αυτές οι διαγνωστικές πρακτικές χαρακτηρίζονται από την ίδια ευαισθησία και ειδικότητα (99-101).

Στα δείγματα των ασθενών με BP έμμεσος ανοσοφθορισμός αλλά και ELISA για την ανίχνευση των BP180 και BP239 αντισωμάτων. Η ELISA πραγματοποιήθηκε με ένα εμπορικά διαθέσιμο kit το οποίο επιτρέπει τη δημιουργία του δερματολογικού προφίλ του κάθε ασθενή καθώς βοηθά στην ανίχνευση των IgG αυτοαντισωμάτων που στοχεύουν τις 6 πιο βασικές δομικές πρωτεΐνες του δέρματος που εμπλέκονται στους διαφορετικούς τύπους των αυτοάνοσων πομφολυγωδών νοσημάτων. Ασφαλώς η δημιουργία του δερματολογικού προφίλ εξυπηρετεί σε σημαντικό βαθμό τη διαφοροδιάγνωση αυτών των ασθενειών, η οποία συχνά είναι δύσκολη καθώς όπως έχει αναφερθεί αν και τα αυτοάνοσα πομφολυγώδη νοσήματα συχνά μοιράζονται κοινά κλινικά χαρακτηριστικά οφείλονται σε διαφορετικά ανοσολογικά μονοπάτια γεγονός που συνεπάγεται ασφαλώς τη διαταραχή της λειτουργίας διαφορετικών μορίων που εμπλέκονται στη λειτουργία του δέρματος. Όμοια με την κοινή πέμφιγα ο έμμεσος ανοσοφθορισμός έδωσε θετικό αποτέλεσμα για το σύνολο των ασθενών. Από την άλλη πλευρά σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ELISA το 6% των ασθενών χαρακτηρίζονται αρνητικοί ως προς της παρουσία των παραπάνω αντισωμάτων στον ορό του αίματος, ενώ το 69% και 3% των ασθενών βρέθηκαν θετικοί ως προς την παρουσία των BP180 και BP230 αυτοαντισωμάτων, αντίστοιχα. Τέλος 22% των ασθενών βρέθηκαν θετικοί ως προς τα δύο αυτά

αυτοαντισώματα Η μετέπειτα σύγκριση αυτών των δυο μεθοδολογιών αποκάλυψε μια αξιοσημείωτη ταύτιση των αποτελεσμάτων η οποία παρατηρείται στο 93% των εξεταζόμενων δειγμάτων.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι για 32 ασθενείς ήταν διαθέσιμα δεδομένα άμεσου ανοσοφθορισμού, κι έτσι θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η σύγκριση τόσο των αποτελεσμάτων του άμεσου και του έμμεσου ανοσοφθορισμού όσο και των αποτελεσμάτων του άμεσου με αυτών της ELISA. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια καθώς στην πλειονότητα των ασθενών παρατηρήθηκε ταύτιση των εκάστοτε δύο συγκρινόμενων μεθοδολογιών. Πιο συγκεκριμένα στο 93% των ασθενών ο έμμεσος ανοσοφθορισμός και η ELISA κατέληγαν στο ίδιο συμπέρασμα, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στην περίπτωση άμεσος ανοσοφθορισμός/ELISA ήταν 94%. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν ότι ο ανοσοφθορισμός (έμμεσος και άμεσος) και η ELISA αποτελούν αξιόπιστες μεθοδολογίες οι οποίες αξίζει να χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη για τη διάκριση των διαφορετικών κλινικών τύπων αυτής της ιδιαίτερα ετερογενούς ομάδας νοσημάτων.

Συνολικά στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη του άμεσου, έμμεσου ανοσοφθορισμού και της ELISA σε ένα σημαντικό δείγμα ασθενών που πάσχουν από αυτοάνοσα πομφολυγώδη νοσήματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η συνεκτίμηση και συναξιολόγηση των δεδομένων που προκύπτουν από αυτές τις μεθοδολογίες μας επιτρέπει να έχουμε μια πιο σαφή και ολοκληρωμένη εικόνα της διάγνωσης αυτών των νοσημάτων καθώς η καθεμία προσφέρει και συμπληρώνει στο παζλ της διάγνωσης. Συνολικά καμία τεχνική δεν αρκεί από μόνη της για την διάγνωση, ταξινόμηση και παρακολούθηση των πομφολυγωδών νοσημάτων. Ασφαλώς θα ήταν χρήσιμη η επιβεβαίωση αυτών των αποτελεσμάτων σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με απώτερο σκοπό την ενσωμάτωση του έμμεσου ανοσοφθορισμού και της ELISA στην κλινική ρουτίνα για τη διάγνωση, ταξινόμηση αλλά και παρακολούθηση αυτών των νοσημάτων.

Βιβλιογραφία

1. Elias PM. The skin barrier as an innate immune element [Internet]. Vol. 29, Seminars in Immunopathology. Semin Immunopathol; 2007 [cited 2021 May 19]. p. 3–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17621950/>
2. Jensen JM, Proksch E. The skin's barrier [Internet]. Vol. 144, Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia. Edizioni Minerva Medica; 2009 [cited 2021 May 19]. p. 689–700. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19907407/>
3. Kaniakakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. Eur J Dermatology [Internet]. 2002 [cited 2021 May 19];12(4):390–401. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12095893/>
4. Bosko CA. Skin Barrier Insights: From Bricks and Mortar to Molecules and Microbes [Internet]. Vol. 18, Journal of drugs in dermatology : JDD. NLM (Medline); 2019 [cited 2021 May 19]. p. s63–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30681811/>
5. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: An indispensable barrier. Exp Dermatol [Internet]. 2008 [cited 2021 May 19];17(12):1063–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19043850/>
6. Chan FL, Inoue S. Lamina lucida of basement membrane: An artefact. Microsc Res Tech [Internet]. 1994 [cited 2021 May 19];28(1):48–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8061357/>
7. Chambers ES, Vukmanovic-Stejic M. Skin barrier immunity and ageing [Internet]. Vol. 160, Immunology. Blackwell Publishing Ltd; 2020 [cited 2021 May 19]. p. 116–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31709535/>
8. Adachi E, Hopkinson I, Hayashi T. Basement-membrane stromal relationships: Interactions between collagen fibrils and the lamina densa [Internet]. Vol. 173, International Review of Cytology. Academic Press Inc.; 1997 [cited 2021 May 19]. p. 73–156. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9127952/>
9. Woo SH, Lumpkin EA, Patapoutian A. Merkel cells and neurons keep in touch [Internet]. Vol. 25, Trends in Cell Biology. Elsevier Ltd; 2015 [cited 2021 Jun 1]. p. 74–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25480024/>
10. Elias PM. The skin barrier as an innate immune element [Internet]. Vol. 29, Seminars in Immunopathology. Semin Immunopathol; 2007 [cited 2021 Jun 1]. p. 3–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17621950/>
11. Feito J, García-Suárez O, García-Piqueras J, García-Mesa Y, Pérez-Sánchez A, Suazo I, et al.

- The development of human digital Meissner's and Pacinian corpuscles. *Ann Anat* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2021 May 19];219:8–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29842990/>
12. Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal control of skin function: The skin as a neuroimmunoendocrine organ [Internet]. Vol. 86, *Physiological Reviews*. *Physiol Rev*; 2006 [cited 2021 May 19]. p. 1309–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17015491/>
 13. Lopez-Ojeda W, Oakley AM. Anatomy, Skin (Integument) [Internet]. *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2018 [cited 2021 Jun 1]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28723009>
 14. Wysocki AB. Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. Vol. 34, *The Nursing clinics of North America*. 1999.
 15. D'Mello SAN, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling pathways in melanogenesis [Internet]. Vol. 17, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2016 [cited 2021 Jun 1]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27428965/>
 16. McComb S, Thiriout A, Akache B, Krishnan L, Stark F. Introduction to the Immune System. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2019. p. 1–24.
 17. Cavaillon J-M. The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2011 Sep [cited 2021 Jun 1];90(3):413–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21628329/>
 18. Tomar N, De RK. A brief outline of the immune system. *Methods Mol Biol*. 2014;1184:3–12.
 19. Kantha SS. A Centennial Review; the 1890 Tetanus Antitoxin Paper of von Behring and Kitasato and the Related Developments. *Keio J Med* [Internet]. 1991 [cited 2021 Jun 1];40(1):35–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2046211/>
 20. Turk JL. Almroth Wright--phagocytosis and opsonization. [Internet]. Vol. 87, *Journal of the Royal Society of Medicine*. *J R Soc Med*; 1994 [cited 2021 Jun 1]. p. 576–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7966100/>
 21. Dreyer WJ, Bennett JC. The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1965 [cited 2021 Jun 1];54(3):864–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4160200/>
 22. McComb S, Thiriout A, Krishnan L, Stark F. Introduction to the immune system [Internet]. Vol. 1061, *Methods in Molecular Biology*. *Methods Mol Biol*; 2013 [cited 2021 Jun 1]. p. 1–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23963928/>
 23. Litman GW, Cannon JP, Dishaw LJ. Reconstructing immune phylogeny: New perspectives

- [Internet]. Vol. 5, *Nature Reviews Immunology*. *Nat Rev Immunol*; 2005 [cited 2021 Jun 1]. p. 866–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16261174/>
24. Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem* [Internet]. 2016 Oct 31 [cited 2021 Jun 1];60(3):275–301. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27784777/>
 25. Kyewski B, Klein L. A central role for central tolerance [Internet]. Vol. 24, *Annual Review of Immunology*. *Annu Rev Immunol*; 2006 [cited 2021 Jun 1]. p. 571–606. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16551260/>
 26. Cornaby C, Gibbons L, Mayhew V, Sloan CS, Welling A, Poole BD. B cell epitope spreading: Mechanisms and contribution to autoimmune diseases [Internet]. Vol. 163, *Immunology Letters*. Elsevier B.V.; 2015 [cited 2021 Jun 1]. p. 56–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25445494/>
 27. Gregersen PK, Olsson LM. Recent advances in the genetics of autoimmune disease [Internet]. Vol. 27, *Annual Review of Immunology*. *Annu Rev Immunol*; 2009 [cited 2021 Jun 1]. p. 363–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19302045/>
 28. Sjöstrand M, Ambrosi A, Brauner S, Sullivan J, Malin S, Kuchroo VK, et al. Expression of the Immune Regulator Tripartite-Motif 21 Is Controlled by IFN Regulatory Factors. *J Immunol* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2021 Jun 1];191(7):3753–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23975864/>
 29. Quintero OL, Amador-Patarroyo MJ, Montoya-Ortiz G, Rojas-Villarraga A, Anaya JM. Autoimmune disease and gender: Plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity. *J Autoimmun* [Internet]. 2012 May [cited 2021 Jun 1];38(2–3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22079680/>
 30. Sammaritano LR. Menopause in patients with autoimmune diseases [Internet]. Vol. 11, *Autoimmunity Reviews*. *Autoimmun Rev*; 2012 [cited 2021 Jun 1]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22120060/>
 31. Evans AS, Rothfield NF, Niederman JC. RAISED ANTIBODY TITRES TO E.B. VIRUS IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS. *Lancet* [Internet]. 1971 Jan 23 [cited 2021 Jun 3];297(7691):167–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4102189/>
 32. Pender MP. Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases. *Trends Immunol* [Internet]. 2003 [cited 2021 Jun 3];24(11):584–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14596882/>
 33. Ginsberg-Fellner F, Witt ME, Fedun B, Taub F, Dobersen MJ, McEvoy RC, et al. Diabetes mellitus and autoimmunity in patients with the congenital rubella syndrome. *Rev Infect Dis* [Internet]. 1985 [cited 2021 Jun 3];7 Suppl 1. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3890104/>
34. Dammacco F, Lauletta G, Russi S, Leone P, Tucci M, Manno C, et al. Clinical practice: hepatitis C virus infection, cryoglobulinemia and cryoglobulinemic vasculitis. Vol. 19, *Clinical and Experimental Medicine*. Springer-Verlag Italia s.r.l.; 2019.
 35. Triantafyllopoulou A, Tapinos N, Moutsopoulos HM. Evidence for coxsackievirus infection in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2004 Sep [cited 2021 Jun 3];50(9):2897–902. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15457458/>
 36. LIAKOS D, TRIANTAFYLLOPOULOU A, KAPSOGEOGOU E, MOUTSOPOULOS H. Autoimmune diseases: role of coxsackieviruses in their pathogenesis. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2004 Sep 11 [cited 2021 Jun 3];3 Suppl 1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15309808/>
 37. Virus and autoimmunity: induction of autoimmune disease in mice by mouse T lymphotropic virus (MTLV) destroying CD4+ T cells - PubMed [Internet]. [cited 2021 Jun 3]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10228006/>
 38. Blomqvist M, Juhela S, Erkkilä S, Korhonen S, Simell T, Kupila A, et al. Rotavirus infections and development of diabetes-associated autoantibodies during the first 2 years of life. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2002 [cited 2021 Jun 3];128(3):511–5. Available from: </pmc/articles/PMC1906266/>
 39. Cermelli C, Berti R, Soldan SS, Mayne M, D'Ambrosia JM, Ludwin SK, et al. High frequency of human herpesvirus 6 DNA in multiple sclerosis plaques isolated by laser microdissection. *J Infect Dis* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2021 Jun 3];187(9):1377–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12717618/>
 40. Tejada-Simon M V., Zang YCQ, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ. Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2021 Jun 3];53(2):189–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12557285/>
 41. Severin MC, Levy Y, Shoenfeld Y. Systemic lupus erythematosus and parvovirus B-19: Casual coincidence or causative culprit? [Internet]. Vol. 25, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. Humana Press; 2003 [cited 2021 Jun 3]. p. 41–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12794260/>
 42. Tamer GS, Tengiz I, Ercan E, Duman C, Alioglu E, Turk UO. Helicobacter pylori seropositivity in patients with acute coronary syndromes. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2009 Jun [cited 2021 Jun 3];54(6):1253–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18770033/>
 43. Kirvan CA, Swedo SE, Heuser JS, Cunningham MW. Mimicry and autoantibody-mediated neuronal cell signaling in Sydenham chorea. *Nat Med* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2021 Jun

- 3];9(7):914–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12819778/>
44. Selmi C, Gershwin ME. Bacteria and human autoimmunity: The case of primary biliary cirrhosis [Internet]. Vol. 16, *Current Opinion in Rheumatology*. Curr Opin Rheumatol; 2004 [cited 2021 Jun 3]. p. 406–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15201604/>
 45. Singh SK, Girschick HJ. Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* [Internet]. Vol. 4, *Lancet Infectious Diseases*. Lancet Publishing Group; 2004 [cited 2021 Jun 3]. p. 575–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15336225/>
 46. Van der Kleij D, Latz E, Brouwers JFHM, Kruize YCM, Schmitz M, Kurt-Jones EA, et al. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Dec 13 [cited 2021 Jun 3];277(50):48122–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12359728/>
 47. Lidar M, Lipschitz N, Langevitz P, Barzilai O, Ram M, Porat-Katz BS, et al. Infectious serologies and autoantibodies in Wegener's granulomatosis and other vasculitides: Novel associations disclosed using the rad BioPlex 2200. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* [Internet]. Blackwell Publishing Inc.; 2009 [cited 2021 Jun 3]. p. 649–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19758211/>
 48. Gironès N, Cuervo H, Fresno M. Trypanosoma cruzi-induced molecular mimicry and Chagas' disease [Internet]. Vol. 296, *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Verlag; 2005 [cited 2021 Jun 3]. p. 89–123. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16323421/>
 49. Arora S, Huffnagle GB. Immune regulation during allergic bronchopulmonary mycosis: Lessons taught by two fungi [Internet]. Vol. 33, *Immunologic Research*. Humana Press; 2005 [cited 2021 Jun 3]. p. 53–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16120972/>
 50. Kretz-Rommel A, Duncan SR, Rubin RL. Autoimmunity caused by disruption of central T cell tolerance. A murine model of drug-induced lupus. *J Clin Invest* [Internet]. 1997 Apr 15 [cited 2021 Jun 3];99(8):1888–96. Available from: [/pmc/articles/PMC508013/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/100000000/)
 51. Yiannaki E, Vlachoyiannopoulos PG, Manoussakis MN, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Moutsopoulos HM, et al. Study of antibody and T cell responses in rabbits immunized with synthetic human B cell epitope analogues of La (SSB) autoantigen. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2000 [cited 2021 Jun 3];121(3):551–6. Available from: [/pmc/articles/PMC1905730/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/100000000/)
 52. Lindop R, Arentz G, Thurgood LA, Reed JH, Jackson MW, Gordon TP. Pathogenicity and proteomic signatures of autoantibodies to Ro and La. In: *Immunology and Cell Biology* [Internet]. Immunol Cell Biol; 2012 [cited 2021 Jun 3]. p. 304–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22249199/>

53. Shiboski SC, Shiboski CH, Criswell LA, Baer AN, Challacombe S, Lanfranchi H, et al. American College of rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: A data-driven, expert consensus approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthritis Care Res* [Internet]. 2012 Apr [cited 2021 Jun 3];64(4):475–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22563590/>
54. *Dermatology: 2-Volume Set - 9780702062759* [Internet]. [cited 2021 Jun 3]. Available from: <https://www.us.elsevierhealth.com/dermatology-2-volume-set-9780702062759.html>
55. Kridin K. Pemphigus group: overview, epidemiology, mortality, and comorbidities [Internet]. Vol. 66, *Immunologic Research*. Humana Press Inc.; 2018 [cited 2021 Jun 3]. p. 255–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29479654/>
56. Kiuttu J, Hartikainen-Sorri A-L, Mäkitalo R. Occurrence of Antinuclear Antibodies in an Unselected Pregnancy Population. *Gynecol Obstet Invest* [Internet]. 1992 [cited 2021 Jun 3];33(1):21–5. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/294841>
57. Daniel BS, Murrell DF. Review of autoimmune blistering diseases: the Pemphigoid diseases [Internet]. Vol. 33, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. Blackwell Publishing Ltd; 2019 [cited 2021 Jun 3]. p. 1685–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31087464/>
58. Bhol K, Natarajan K, Nagarwalla N, Mohimen A, Aoki V, Ahmed AR. Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris: A model for autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1995 [cited 2021 Jun 3];92(11):5239–43. Available from: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/141884/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/141884/)
59. Spaeth S, Riechers R, Borradori L, Zillikens D, Büdinger L, Hertl M. IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of desmoglein 3 in active pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* [Internet]. 2001 [cited 2021 Jun 3];144(6):1183–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11422039/>
60. Kricheli D, David M, Frusic-Zlotkin M, Goldsmith D, Rabinov M, Sulkes J, et al. The distribution of pemphigus vulgaris-IgG subclasses and their reactivity with desmoglein 3 and 1 in pemphigus patients and their first-degree relatives. *Br J Dermatol* [Internet]. 2000 [cited 2021 Jun 3];143(2):337–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10951142/>
61. Brandsen R, Frusic-Zlotkin M, Lyubimov H, Yunes F, Michel B, Tamir A, et al. Circulating pemphigus IgG in families of patients with pemphigus: Comparison of indirect immunofluorescence, direct immunofluorescence, and immunoblotting. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 1997 [cited 2021 Jun 3];36(1):44–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8996260/>

62. Bédane C, Prost C, Thomine E, Intrator L, Joly P, Caux F, et al. Binding of autoantibodies is not restricted to desmosomes in pemphigus vulgaris: Comparison of 14 cases of pemphigus vulgaris and 10 cases of pemphigus foliaceus studied by Western immunoblot and immunoelectron microscopy. *Arch Dermatol Res* [Internet]. 1996 [cited 2021 Jun 3];288(7):343–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8818180/>
63. Emery DJ, Diaz LA, Fairley JA, Lopez A, Taylor AF, Giudice GJ. Pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris autoantibodies react with the extracellular domain of desmoglein-1. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1995 [cited 2021 Jun 3];104(3):323–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7860995/>
64. Amagai M, Karpati S, Prussick R, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest* [Internet]. 1992 [cited 2021 Jun 3];90(3):919–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1522242/>
65. Seishima M, Esaki C, Osada K, Mori S, Hashimoto T, Kitajima Y. Pemphigus IgG, but not bullous pemphigoid IgG, causes a transient increase in intracellular calcium and inositol 1,4,5-trisphosphate in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1995 [cited 2021 Jun 3];104(1):33–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7798638/>
66. Hashimoto K, Shafran KM, Webber PS, Lazarus GS, Singer KH. Anti-cell surface pemphigus autoantibody stimulates plasminogen activator activity of human epidermal cells: A mechanism for the loss of epidermal cohesion and blister formation. *J Exp Med* [Internet]. 1983 Jan 1 [cited 2021 Jun 3];157(1):259–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6681540/>
67. Amagai M, Koch PJ, Nishikawa T, Stanley JR. Pemphigus vulgaris antigen (Desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1996 [cited 2021 Jun 3];106(2):351–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8601740/>
68. Sinha AA, Brautbar C, Szafer F, Friedmann A, Tzfon E, Todd JA, et al. A newly characterized HLA DQ β allele associated with pemphigus vulgaris. *Science* (80-) [Internet]. 1988 [cited 2021 Jun 5];239(4843):1026–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2894075/>
69. Ahmed AR, Wagner R, Khatri K, Notani G, Awdeh Z, Alper CA, et al. Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1991 Jun 1 [cited 2021 Jun 5];88(11):5056–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1675792/>
70. Hertl M, Riechers R. Analysis of the T cells that are potentially involved in autoantibody

- production in pemphigus vulgaris. *J Dermatol* [Internet]. 1999 [cited 2021 Jun 5];26(11):748–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10635617/>
71. Hertl M, Amagai M, Sundaram H, Stanley J, Ishii K, Katz SI. Recognition of desmoglein 3 by autoreactive T cells in pemphigus vulgaris patients and normals. In: *Journal of Investigative Dermatology* [Internet]. Nature Publishing Group; 1998 [cited 2021 Jun 5]. p. 62–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9424089/>
 72. Lin MS, Fu CL, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Moraes JR, et al. Desmoglein-1-specific T lymphocytes from patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Clin Invest* [Internet]. 2000 [cited 2021 Jun 5];105(2):207–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10642599/>
 73. Röcken M, Biedermann T. Pathogenesis of Autoimmune Diseases. In: *Autoimmune Diseases of the Skin* [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 2011 [cited 2021 Jun 5]. p. 1–22. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-211-99225-8_1
 74. Di Lernia V, Casanova DM, Goldust M, Ricci C. Pemphigus Vulgaris and Bullous Pemphigoid: Update on Diagnosis and Treatment. *Dermatol Pract Concept* [Internet]. 2020 Jul [cited 2021 Jun 5];10(3):e2020050. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32642305>
 75. Kershenovich R, Hodak E, Mimouni D. Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid [Internet]. Vol. 13, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier; 2014 [cited 2021 Jun 5]. p. 477–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24424192/>
 76. Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid diseases [Internet]. Vol. 381, *The Lancet*. Elsevier B.V.; 2013 [cited 2021 Jun 5]. p. 320–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23237497/>
 77. Genovese G, Zeno G Di, Cozzani E, Berti E, Cugno M, Marzano AV. New insights into the pathogenesis of bullous pemphigoid: 2019 update. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [cited 2021 Jun 5];10(JUL). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31312206/>
 78. Miyamoto D, Santi CG, Aoki V, Maruta CW. Bullous pemphigoid [Internet]. Vol. 94, *Anais brasileiros de dermatologia*. NLM (Medline); 2019 [cited 2021 Jun 5]. p. 133–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31090818/>
 79. Bernard P, Antonicelli F. Bullous Pemphigoid: A Review of its Diagnosis, Associations and Treatment [Internet]. Vol. 18, *American Journal of Clinical Dermatology*. Springer International Publishing; 2017 [cited 2021 Feb 16]. p. 513–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28247089/>
 80. Zuo Y, Evangelista F, Culton D, Guilbert A, Lin L, Li N, et al. IgG4 autoantibodies are

- inhibitory in the autoimmune disease bullous pemphigoid. *J Autoimmun* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2021 Jun 5];73:111–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27377454/>
81. Cozzani E, Gasparini G, Burlando M, Drago F, Parodi A. Atypical presentations of bullous pemphigoid: Clinical and immunopathological aspects [Internet]. Vol. 14, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2015 [cited 2021 Jun 5]. p. 438–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25617817/>
 82. Wong SN, Chua SH. Spectrum of subepidermal immunobullous disorders seen at the National Skin Centre, Singapore: A 2-year review. *Br J Dermatol* [Internet]. 2002 [cited 2021 Jun 5];147(3):476–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12207586/>
 83. Lin L, Hwang BJ, Culton DA, Li N, Burette S, Koller BH, et al. Eosinophils Mediate Tissue Injury in the Autoimmune Skin Disease Bullous Pemphigoid. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2021 Jun 5];138(5):1032–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29246800/>
 84. Pollmann R, Schmidt T, Eming R, Hertl M. Pemphigus: a Comprehensive Review on Pathogenesis, Clinical Presentation and Novel Therapeutic Approaches [Internet]. Vol. 54, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. Humana Press Inc.; 2018 [cited 2021 Jun 5]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29313220/>
 85. Cozzani E, Marzano A V., Caproni M, Feliciani C, Calzavara-Pinton P, Alaibac M, et al. Bullous pemphigoid: Italian guidelines adapted from the EDF/EADV guidelines [Internet]. Vol. 153, *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia*. Edizioni Minerva Medica; 2018 [cited 2021 Jun 5]. p. 305–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29600832/>
 86. Machado-Pinto J, McCalmont TH, Golitz LE. Eosinophilic and neutrophilic spongiosis: Clues to the diagnosis of immunobullous diseases and other inflammatory disorders [Internet]. Vol. 15, *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. Frontline Medical Communications; 1996 [cited 2021 Jun 5]. p. 308–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9069598/>
 87. Feliciani C, Joly P, Jonkman MF, Zambruno G, Zillikens D, Ioannides D, et al. Management of bullous pemphigoid: The European Dermatology Forum consensus in collaboration with the European Academy of Dermatology and Venereology. *Br J Dermatol* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2021 Jun 5];172(4):867–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25827742/>
 88. Jiao D, Bystryjn JC. Sensitivity of indirect immunofluorescence, substrate specificity, and immunoblotting in the diagnosis of pemphigus. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 1997 [cited 2021 Jun 5];37(2 I):211–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9270506/>
 89. van Beek N, Dährnich C, Johannsen N, Lemcke S, Goletz S, Hübner F, et al. Prospective studies on the routine uses of a novel multivariant enzyme-linked immunosorbent assay for the

- diagnosis of autoimmune bullous diseases. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2021 Jun 5];76(5):889-894.e5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28038887/>
90. Yang A, Xuan R, Melbourne W, Tran K, Murrell DF. Validation of the BIOCHIP test for the diagnosis of bullous pemphigoid, pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Eur Acad Dermatology Venereol* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2021 Jun 5];34(1):153–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31260565/>
 91. Feliciani C, Cozzani E, Marzano A V., Caproni M, Di Zenzo G, Calzavara-Pinton P. Italian guidelines in pemphigus - adapted from the European Dermatology Forum (EDF) and European Academy of Dermatology and Venerology (EADV) [Internet]. Vol. 153, *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia*. Edizioni Minerva Medica; 2018 [cited 2021 Jun 5]. p. 599–608. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29860771/>
 92. Amagai M, Komai A, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Yamada T, et al. Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* [Internet]. 1999 [cited 2021 Jun 5];140(2):351–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10233237/>
 93. Moser AC, Carlson TL. General principles of immunoassays. In: *Novel Approaches in Immunoassays*. Future Medicine Ltd.; 2014. p. 7–19.
 94. Venning VA, Wojnarowska F. Lack of predictive factors for the clinical course of bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 1992 [cited 2021 Jun 7];26(4):585–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1597545/>
 95. Shimbo T, Tanemura A, Yamazaki T, Tamai K, Katayama I, Kaneda Y. Serum anti-BPAG1 auto-antibody is a novel marker for human melanoma. *PLoS One* [Internet]. 2010 [cited 2021 Feb 16];5(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20479946/>
 96. *Kuby Immunology 7th edition (9781429219198) - Textbooks.com* [Internet]. [cited 2021 Jun 7]. Available from: <https://www.textbooks.com/Kuby-Immunology-7th-Edition/9781429219198/Judy-Owen.php>
 97. Okazaki A, Miyagawa S, Yamashina Y, Kitamura W, Shirai T. Polymorphisms of HLA-DR and -DQ genes in Japanese patients with bullous pemphigoid. *J Dermatol* [Internet]. 2000 [cited 2021 Jun 7];27(3):149–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10774139/>
 98. Gao XH, Winsey S, Li G, Barnardo M, Zhu XJ, Chen HD, et al. HLA-DR and DQ polymorphisms in bullous pemphigoid from northern China. *Clin Exp Dermatol* [Internet]. 2002 [cited 2021 Jun 7];27(4):319–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12139680/>
 99. Cotell S, Robinson ND, Chan LS. Autoimmune blistering skin diseases [Internet]. Vol. 18,

- American Journal of Emergency Medicine. W.B. Saunders; 2000 [cited 2021 Jun 7]. p. 288–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10830686/>
100. Lai FJ, Sheu HM, Lee JYY, Cheng CL, Chen WC. Vesicular pemphigoid with circulating autoantibodies against 230-kDa and 180-kDa proteins, and additional autoantibodies against 97-kDa and 45-kDa proteins. *Int J Dermatol* [Internet]. 2007 Feb [cited 2021 Jun 7];46(2):206–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17269979/>
 101. Hong WJ, Kim SC. Vesicular bullous pemphigoid in a 23-year-old male [Internet]. Vol. 29, *Annals of Dermatology*. Korean Dermatological Association; 2017 [cited 2021 Jun 7]. p. 659–61. Available from: </pmc/articles/PMC5597673/>
 102. Vornicescu C, Şenilă SC, Cosgarea R, Candrea E, Pop AD, Ungureanu L. Pemphigoid nodularis - rare presentation of bullous pemphigoid: A case report and literature review. *Exp Ther Med* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2021 Jun 7];17(2):1132–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30679985>