

ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΟ ΔΕΛΤΙΟ 34 – ΙΟΥΝΙΟΣ 2020

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- SARS-COV-2. ΤΟ ΠΟΡΤΡΕΤΟ ΕΝΟΣ ΑΟΡΑΤΟΥ ΕΧΘΡΟΥ.
- ΠΕΜΦΙΓΑ-ΕΝΑ ΣΠΑΝΙΟ ΑΥΤΟΑΝΟΣΟ ΝΟΣΗΜΑ
- ΤΑΧΥΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΚΑΛΣΙΤΟΝΙΝΗΣ ΜΕ ΟΠΤΙΚΟ ΑΝΟΣΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΓΙΑ ΠΑΡΑΚΛΙΝΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΣΗΨΗΣ
- ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΣΗΜΕΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ (SNPS) ΣΤΑ ARMS2 ΚΑΙ CFH ΓΟΝΙΔΙΑ -ΠΟΥ ΕΝΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑΚΗ ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΤΗΣ ΩΧΡΑΣ ΚΗΛΙΔΑΣ-, ΜΕ ΤΗ ΝΟΣΟ ALZHEIMER'S
- ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ HTR2A ΚΑΙ DRD2 ΩΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗΝ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΧΙΖΟΦΡΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΑΙΣΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΨΥΧΩΣΕΩΝ ΣΕ ΚΑΥΚΑΣΙΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ



Από τις 10 του περασμένου Ιανουαρίου, όταν δημοσιεύτηκε online το πλήρες γονιδίωμα (Yong-Zhen Zhang, Shanghai Public Health Clinical Centre & School of Public Health), τα 29.811 RNA νουκλεοτίδια του SARS-CoV-2, που πήρε το επίσημο όνομά του ένα μήνα αργότερα (11 Φεβρουαρίου 2020), σήμανε συναγερμός. Ευτυχώς, πολλές από τις πρωτεΐνες του νέου κορώνα-ιού είχαν 70-80% αναλογία δομής με έναν παλιό γνώριμο, τον SARS-CoV, που προκάλεσε την επιδημία του SARS το 2003. Αρχικά σχεδιάστηκε το κυκλικό DNA, που με τις κατάλληλες ρυθμιστικές αλληλουχίες, εισήχθη στο *E. Coli*, ώστε να συντεθεί η επιθυμητή πρωτεΐνη. Και άρχισε ο αγώνας δρόμου για δεδομένα κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ ή κρυσταλλογραφίας μικροσκοπίας (cryo-EM), με σκοπό τη διευκρίνιση της στερεοδομής των πρωτεϊνών, που κωδικοποιεί ο SARS-CoV-2.

Πρώτος στόχος ήταν η M^{pro} , η κύρια πρωτεάση του ιού, που κόβει στα σωστά σημεία την πολυπρωτεϊνική αλυσίδα, που το RNA του ιού κωδικοποιεί. Η συγκεκριμένη πρωτεάση είναι από τους σημαντικότερους στόχους για τη θεραπεία της COVID-19, ώστε να «σπάσει ο κύκλος» του πολλαπλασιασμού του ιού. Σκοπός η αναστολή της δράσης της M^{pro} . Περισσότερα από 10.000 εγκεκριμένα φάρμακα και ενώσεις, που βρίσκονται ήδη σε κλινικές δοκιμές, μελετήθηκαν εικονικά, με βάση τις αρχές της Υπολογιστικής Χημείας, ως υποψήφιοι αναστολείς της M^{pro} . Ανάμεσά τους εντοπίστηκαν μερικοί πολλά υποσχόμενοι υποψήφιοι. Η επόμενη πρωτεΐνη-στόχος είναι η RNA πολυμεράση RdRp (RNA-dependent RNA polymerase), που αντιγράφει το ιϊκό γονιδίωμα, το οποίο στη συνέχεια μεταφράζεται στη γλώσσα των πρωτεϊνών από τον ξενιστή. Μελετήθηκε επίσης η δομή του πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος, που αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες, την RdRp (ή nsp12) την nsp7 (nonstructural protein 7) και την nsp8. Ο τρόπος που ένα φάρμακο συνδέεται με αυτό το σύμπλεγμα, δίνει πολύτιμες πληροφορίες για την πιθανή δράση και άλλων ενώσεων, που επίσης μελετώνται. Η όλη προσπάθεια είναι δύσκολη και μάλλον θα αποδειχθεί χρονοβόρα. Αυτός ο αγώνας δρόμου δεν είναι σπριντ, είναι μάλλον δρόμος αντοχής. Ας μην ξεχνάμε πως η στερεοδομή και ο ρόλος της μυστηριώδους βοηθητικής (accessory) πρωτεΐνης ORF8 παραμένουν προς το παρόν αδιευκρίνιστοι. Επίσης μένει να μελετηθεί η στερεοδομή της nsp3, μιας μεγαλοπρωτεΐνης που αναστέλλει την άμυνα των κυττάρων-ξενιστών.

Και βέβαια δεν ξεχνάμε το σήμα κατατεθέν, την ακιδόμορφη γλυκοπρωτεΐνη (Spike protein), στην επιφάνεια του SARS-CoV-2, μέσω της οποίας ο ιός εισβάλλει στο κύτταρο του ξενιστή. Με τη βοήθεια της cryo-EM, αποσαφηνίστηκε η κρίσιμη προ-πρόσδεσης με τον υποδοχέα ACE-2 (Angiotensin Converting Enzyme-2, Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτασίνης-2), στερεοδομή της πρωτεΐνης-S. Η πρωτεΐνη-S του SARS-CoV-2, παρουσιάζει 89% ομολογία δομής με την πρωτεΐνη-S του SARS-CoV, όμως η πρωτεΐνη-S του SARS-CoV-2 συνδέεται με πολύ ισχυρότερο δεσμό με τον υποδοχέα της ACE-2. Ας επισημάνουμε, ότι οι συνθετικοί κλώνοι της πρωτεΐνης-S, θα μπορούσαν να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό μας σύστημα έναντι του ιού. Η πρωτεΐνη-S αποτελεί πεδίο δόξης λαμπρόν για σχεδιασμό φαρμάκων ή εμβολίων.

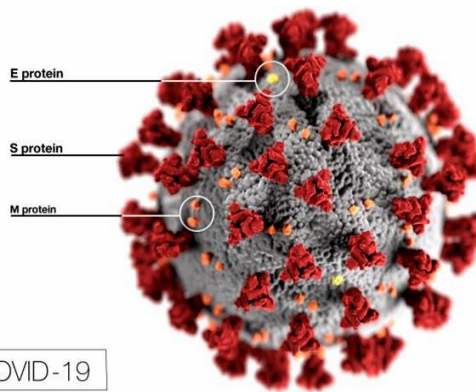
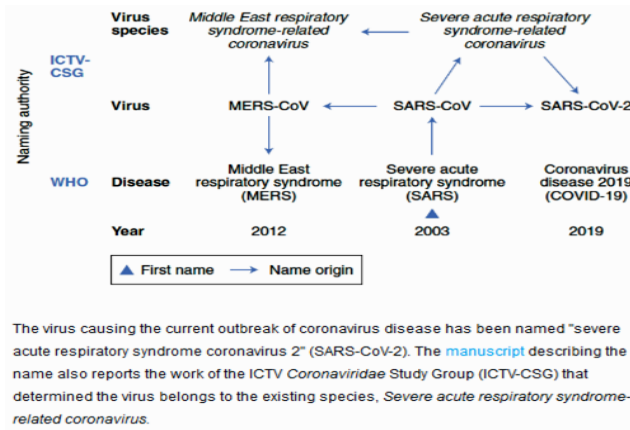
Υπενθυμίζουμε, ότι σε σχέση με άλλους RNA ιούς, οι κορώνα-ιοί διαθέτουν μηχανισμό ελέγχου της αναπαραγωγής τους (proofreading), μέσω της εξωριβονουκλεάσης, ώστε να έχουν χαμηλότερο ρυθμό μεταλλάξεων. Αυτή όμως η εξωριβονουκλεάση ελέγχου των μεταλλάξεων, παράλληλα ευνοεί τον αυξημένο ρυθμό ανασυνδυασμού τους (recombination) δηλ. ανταλλαγής του γενετικού υλικού, ώστε αυξάνει η πιθανότητα να προκύψει νέο στέλεχος, με ίσως διαφορετικές ιδιότητες. Όσο λοιπόν ο ιός ετοιμάζεται για ένα νέο γύρο, ας εφοδιάσουμε με τα κατάλληλα βέλη τη φαρέτρα μας.

Εύχομαι σε όλους, να έχετε υγεία και να περάσετε όμορφα το καλοκαίρι. Ας είμαστε όλοι μαζί, να δούμε το ουράνιο τόξο μετά το πέρασμα της καταιγίδας.

Με συναδελφικούς χαιρετισμούς,

Ανδριανή Γρηγοράτου.

SARS-COV-2. ΤΟ ΠΟΡΤΡΕΤΟ ΕΝΟΣ ΑΟΡΑΤΟΥ ΕΧΘΡΟΥ.



Naming the 2019 Coronavirus. International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV.

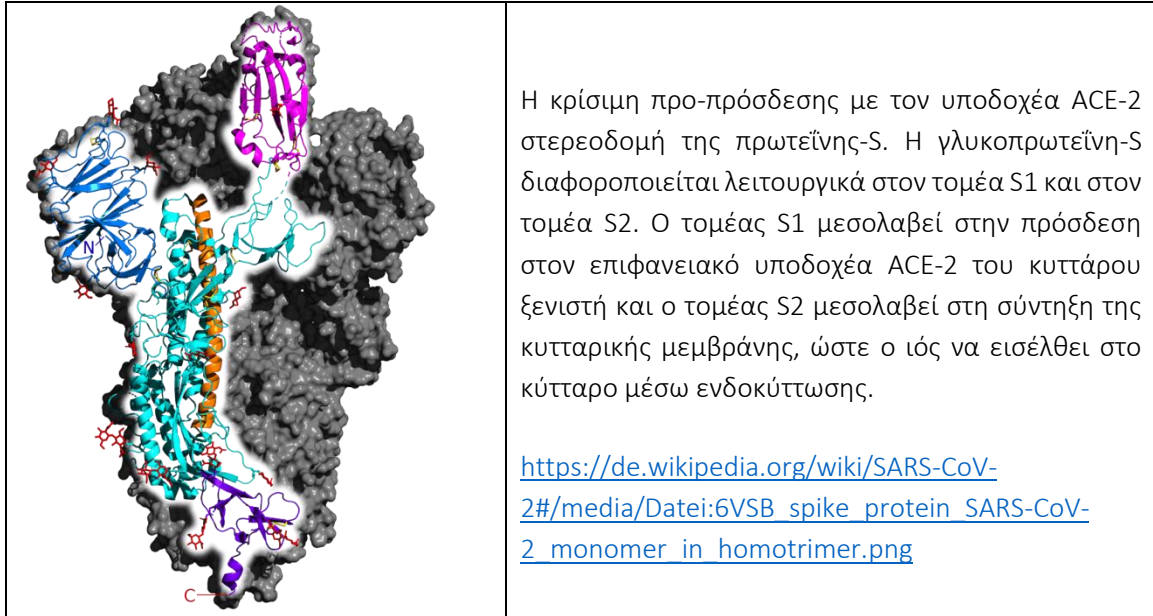
<https://talk.ictvonline.org/>

Center for Disease Control and Prevention. CDC/ Alissa Eckert, MS; Dan Higgins, MAMS, https://phil.cdc.gov/PHIL_Images/23313/23313_lores.jpg

SARS-CoV-2: Επτά γράμματα και ένας αριθμός, ο αόρατος εχθρός που άλλαξε τη ζωή μας. Ας δούμε τις τελευταίες πληροφορίες για την COVID-19.

1. WHO: Rolling updates on corona virus disease (COVID-19). Updated 01 June 2020. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen>
2. Stephen B. Thacker CDC Library. COVID-19 research articles downloadable database. <https://www.cdc.gov/library/researchguides/2019novelcoronavirus/research-articles.html>.
3. IFCC Information Guide on COVID-19 - [General Information Patient Screening Diagnostic Testing Biosafety Guidelines for the Clinical Laboratory Biochemical Monitoring of COVID-19 Patients Other Educational Materials & Webinars Big Data Tools](https://www.ifcc.org/ifcc-news/2020-03-26-ifcc-information-guide-on-covid-19/) <https://www.ifcc.org/ifcc-news/2020-03-26-ifcc-information-guide-on-covid-19/>
4. [American Association for Clinical Chemistry: COVID-19 Resources for Labs](https://www.aacc.org/resources/covid-19-resources-for-labs)
5. Gribble J, Pruijssers A.J, Agostin M.L, Anderson-Daniels J, Chappell J.D, Xiaotao Lu, Stevens L, Routh A.L, Denison M.R. The coronavirus proofreading exoribonuclease mediates extensive viral recombination. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.23.057786v1>
6. CDC. COVID View. A weekly surveillance summary of U.S. COVID-19 activity. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/covid-data/covidview/index.html>.
7. Lippi G, Plebani M. The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. Clin Chem Lab Med. 2020 Mar 19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32191623>
8. T-Y, Redwood S, Prendergast B, Chen M. Coronaviruses and the cardiovascular system: acute and long-term implications. Eur Heart J. 2020 Mar 18 <https://academic.oup.com/eurheartj/advance-article/doi/10.1093/eurheartj/ehaa231/5809453>
9. Shi Y, Wang Y, Shao C, Huang J, Gan J, Huang X, et al. COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. Cell Death Differ. 2020 Mar 23, 1–4. <http://www.nature.com/articles/s41418-020-0530-3>

10. Owen C.D, Lukacik, P, Strain-Damerell, C.M, Douangamath, A, Powell, A.J, Fearon, D, Brandao-Neto J, Crawshaw A.D, Aragao D, Williams, M, Flaig R, Hall, D.R, McAuley K.E, Mazzorana M, Stuart D.I, von Delft F, Walsh, M.A. SARS-CoV-2 main protease with unliganded active site (2019-nCoV, coronavirus disease 2019, COVID-19) <https://www.rcsb.org/structure/6YB7>
11. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. Yushun Wan, Jian Shang, Graham R, Baric R.S, Fang Li. <https://jvi.asm.org/content/94/7/e00127-20>
12. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. Michael Letko, Andrea Marzi & Vincent Munster <https://www.nature.com/articles/s41564-020-0688-y>
13. Laboratory-Acquired Severe Acute Respiratory Syndrome. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa032565>
14. Ένωση Ελλήνων Χημικών. Χημικά Χρονικά, τεύχος Ιανουαρίου-Φεβρουαρίου 2020. file:///C:/Users/User/AppData/Local/Temp/CHEM_CHRO_IAN-FEB_2020-1.pdf
15. Ένωση Ελλήνων Χημικών. Χημικά Χρονικά, τεύχος Απριλίου 2020. <https://www.eex.gr/news/anakoinwseis/2440-teuxos-apriliou-2020>
16. Διαπίστευση μοριακού τεστ για τον COVID-19. 15.04.2020. Πλαίσιο αξιολόγησης και διαπίστευσης μοριακού τεστ για τον COVID-19. Επεξηγήσεις σχετικά με την εφαρμογή των Κατευθυντηρίων Οδηγιών και των Κανονισμών Διαπίστευσης του Ε.ΣΥ.Δ http://www.esyd.gr/pweb/s/20/files/anakoinoseis/PLAISIO_DIAPISTEYSIS_MORIAKOU%20TEST_COVID19_PU_BLIC_16042020.pdf
17. EUROPEAN COMMISSION, Brussels, 15.4.2020 C(2020) 2391 final COMMUNICATION FROM THE COMMISSION. Guidelines on COVID-19 in vitro diagnostic tests and their performance https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/testing_kits_communication.pdf
18. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. https://www.escmid.org/research_projects/covid_19_resource_centre/
19. COVID-19: Abnormal liver function tests. https://www.eemh.gr/images/files/20200500_covid-19%20abnormal%20liver%20function%20tests.pdf
20. Des liens vers des informations sur l'épidémie de Covid – 19 qui peuvent vous intéresser. <https://www.sfbc-asso.fr/3162-2/>
21. Société Française de Biologie Clinique. Place des tests sérologiques dans la stratégie de prise en charge de la maladie COVID-19. https://www.sfbc-asso.fr/wp-content/uploads/2020/05/rapport_indications_tests_serologiques_covid-19-1.pdf
22. Ελληνική Εταιρεία Ανοσολογίας. <https://helsim.gr/latest-news>
23. Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας. <https://eody.gov.gr/neos-koronaivos-covid-19/>
24. Allen Institute for AI. COVID-19 Open Research Dataset (CORD-19). <https://pages.semanticscholar.org/coronavirus-research>
25. [COVID-19 Open Research Dataset \(CORD-19\)](https://www.allenai.org/covid-19/): A freely available, downloadable and updated weekly collection of publications (many as full text) on COVID-19, SARS-CoV-2, and related coronaviruses
26. Giuseppe Lippi, Khosrow Adeli, Maurizio Ferrari, Andrea R. Horvath, David Koch, Sunil Sethi and Cheng-Bin Wang. Biosafety measures for preventing infection from COVID-19 in clinical laboratories: IFCC Taskforce Recommendations. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) [Ahead of Publication](https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0633) DOI: <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0633> <https://www.degruyter.com/view/journals/cclm/ahead-of-print/article-10.1515-cclm-2020-0633/article-10.1515-cclm-2020-0633.xml?language=en>



«Αν γνωρίζεις τον εχθρό σου και τον εαυτό σου, μην φοβάσαι, θα νικήσεις ακόμα και σε εκατό μάχες.» Σουν Τζου - 孫子, δηλ. Αφέντης Σουν, Κινέζος στρατηγός (544 π.Χ. - 496 π.Χ.), Η τέχνη του πολέμου.

ΠΕΜΦΙΓΑ-ΕΝΑ ΣΠΑΝΙΟ ΑΥΤΟΑΝΟΣΟ ΝΟΣΗΜΑ

Μαριλένα Σταμούλη, Βιοχημικό Εργαστήριο, Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών.

Εισαγωγή

Τα αυτοάνοσα πομφολυγώδη νοσήματα είναι μια ομάδα δερματικών νοσημάτων, η οποία περιλαμβάνει την πέμφιγα, το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές, το ουλωτικό πεμφιγοειδές και την ερπητοειδή δερματίτιδα [1]. Τα νοσήματα αυτά χαρακτηρίζονται από το σχηματισμό πομφόλυγας, δηλαδή μιας επηρμένης περιγεγραμμένης δερματικής βλάβης, που περιέχει υγρό, με μέγεθος περίπου 5mm, στο δέρμα ή τους βλεννογόνους (στοματική κοιλότητα, γεννητική περιοχή, λάρυγγας, φάρυγγας, οισοφάγος, ρινική κοιλότητα, οφθαλμοί) [1,2]. Στην ομάδα της πέμφιγας οι πομφόλυγες δημιουργούνται μέσα στην επιδερμίδα, ενώ στο πομφολυγώδες πεμφιγοειδές κάτω από την επιδερμίδα. Στην πορεία της νόσου σπάνε δημιουργώντας αλλοιώσεις οι οποίες είναι επώδυνες και επεκτείνονται συνεχώς με κίνδυνο ολικής αποκόλλησης της επιδερμίδας [3]. Τα νοσήματα αυτά παρουσιάζουν χρόνια πορεία με εξάρσεις και υφέσεις. Για την αντιμετώπισή τους απαιτείται έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία, διότι μπορεί να έχουν σοβαρές επιπλοκές [2,3].

Επιδημιολογία

Ο όρος πέμφιγα προέρχεται από την αντίστοιχη ελληνική λέξη που σημαίνει «φουσκάλα, φυσαλίδα». Η πέμφιγα είναι νόσος δυνητικά απειλητική για τη ζωή. Παρουσιάζει μεγάλη νοσηρότητα, σημαντική θνησιμότητα και θνητότητα, και επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα ζωής των ασθενών. Είναι σπάνιο νόσημα με ετήσια επίπτωση που κυμαίνεται μεταξύ 0.76 (Φιλανδία) και 16.1 (Ισραήλ) περιπτώσεις ανά εκατομμύριο κατοίκων [3, 4, 5]. Είναι συχνότερη σε άτομα ηλικίας 40- 60 ετών, ωστόσο στη Βραζιλία εμφανίζεται και σε μια ενδημική μορφή, χαρακτηριστική για παιδιά και νεαρά ενήλικα άτομα. Πολλές μελέτες έχουν δείξει μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης στις γυναίκες, με αναλογία γυναίκες/άνδρες που κυμαίνεται μεταξύ 1.1 (Φινλανδία) και 5.0 (ΗΠΑ) [5,6]. Η πέμφιγα δεν μεταδίδεται από άτομο σε άτομο. Δεν έχει αποδειχθεί άμεση κληρονομικότητα, αλλά υπάρχουν γονίδια που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισής της [7]. Η πρόγνωση εξαρτάται από την έκταση της νόσου, την συνύπαρξη με άλλα νοσήματα και την ηλικία. Είναι δυσμενέστερη στους ηλικιωμένους και πολύ κακή στην παρανεοπλασματική της μορφή [7,8]. Η συχνότητα εμφάνισής της στον ελληνικό πληθυσμό είναι 8 ασθενείς ανά έτος και σε αναλογία γυναίκες/άνδρες ίση με 2.25 [9]. Διακρίνονται διάφοροι τύποι πέμφιγας. Η κατηγοριοποίηση βασίζεται σε ανατομικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των παρατηρούμενων βλαβών, στα κυκλοφορούντα αυτοαντισώματα και στα αντιγόνα - στόχους. Η κοινή πέμφιγα αντιστοιχεί στο 70% των περιπτώσεων της ασθένειας. Οι υπόλοιπες μορφές της νόσου είναι σπανιότερες (Πίνακας 1). Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά κάθε μορφής είναι τα παρακάτω [1, 7,10]:

1. Κοινή πέμφιγα (*pemphigus vulgaris*): χαρακτηρίζεται από πομφόλυγες με διαυγές ή θολερό περιεχόμενο που σπάζουν εύκολα και δημιουργούν ορορρούσες διαβρώσεις με περιφερική αποκόλληση της επιδερμίδας. Οι δερματικές αλλοιώσεις συναντώνται συχνότερα στους βλεννογόνους και στο τριχωτό κεφάλι, στο πρόσωπο, τις μασχάλες, και τις μηρογεννητικές πτυχές. Στο 50-60% των περιπτώσεων απαντώνται αλλοιώσεις μόνο στο στοματικό βλεννογόνο (υπερώα, παρειές), ενώ ακόμη σπανιότερα στο φάρυγγα, λάρυγγα, επιτεφυκότες, πρωκτό, ουρήθρα, έξω γεννητικά όργανα. Σε πλήρη εξάνθηση υπάρχουν λίγες ή καθόλου πομφόλυγες, αλλά πολλές διαβρώσεις γυμνές ή καλυπτόμενες από οροαιματηρές εφελκίδες. Ιστολογικά χαρακτηρίζεται από διαχωρισμό αμέσως πάνω από τη βασική στιβάδα, ηωσινοφιλική σπογγίωση, οίδημα ανωτέρου χορίου με μεικτή φλεγμονώδη διήθηση [1, 2, 7, 11]
2. Η φυλλώδης πέμφιγα (*pemphigus foliaceus*) εκδηλώνεται με εφελκιδοποιημένες διαβρώσεις με απολέπιση, συχνά σε ερυθματώδη βάση, χωρίς όμως εμφανή προσβολή των βλεννογόνων, ακόμα και σε εκτεταμένη νόσο. Συνήθως οι βλάβες της φυλλώδους πέμφιγας είναι σαφώς περιγεγραμμένες, με σημηματορροϊκή κατανομή (πρόσωπο,

τριχωτό, ανώτερος κορμός) [1, 7, 12]. Μερικές φορές η περιοχή της πομφόλυγας περιέχει πολυάριθμα φλεγμονώδη κύτταρα, κυρίως ουδετερόφιλα, ενώ σε πολύ πρώιμες βλάβες μπορεί να παρατηρηθεί ηωσινοφιλική σπογγίωση.

3. Η βλαστική πέμφιγα (pemphigus vegetans) χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση των χαλαρών-εύθραυστων πομφολύγων, που σπάζουν και αρχίζοντας να επουλώνονται δημιουργούν μυρμηγκιώδεις μάζες, ειδικά στις πτυχές, όπως οι μηρογεννητικές, οι μασχάλες, και κάτω από το στήθος. Στο στόμα η προσβολή αφορά τις γωνίες των χειλιών [2, 13]

4. Η παρaneoπλασματική πέμφιγα (pemphigus paraneoplastica) είναι σπάνια μορφή με συνήθη έναρξη μετά το 60ο έτος της ηλικίας. Σχετίζεται με διάφορες κακοήθειες, όπως αιματολογικές (non-hodgkin λέμφωμα, λέμφωμα β-κυττάρων, λευχαιμία), θύμωμα και τον όγκο του Castleman. Η νεοπλασία μπορεί να προηγείται, να συμπίπτει ή να έπεται της εμφάνισης της νόσου. Ιστολογικά παρατηρείται συνδυασμός ευρημάτων κοινής πέμφιγας και πολύμορφου ερυθήματος. Χαρακτηρίζεται από σοβαρές διαβρώσεις στο στόμα τα χείλη και τους επιπεφυκότες, καθώς και πολύμορφο δερματικό εξάνθημα με πομφόλυγες και διαβρώσεις [2, 14].

5. Η φαρμακευτική πέμφιγα (drug induced pemphigus) οφείλεται σε ακανθόλυση που προκαλείται από φάρμακα [2, 15]. Υπάρχουν δυο κατηγορίες φαρμάκων που επάγουν τη νόσο: α) αυτά που περιέχουν μια ομάδα θειόλης στη χημική τους δομή, όπως είναι η πενικιλλαμίνη, η οποία χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της αρθρίτιδας και σε δηλητηριάσεις από βαρέα μέταλλα, όπως από χαλκό, μόλυβδο ή υδράργυρο (χηλικός υποκαταστάτης), και τα αντιυπερτασικά καπτοπορίλη και εναλαπρίλη και β) τα φάρμακα μη-θειολικά (με θείο ή χωρίς θείο στη δομή τους), όπως είναι τα αντιμικροβιακά πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες και το αντιφυματικό ριφαμπικίνη. Αυτά συνήθως περιέχουν μια δραστική ομάδα αμιδίου $-C(=O)N=$ η οποία θεωρείται ως υπεύθυνη για την επαγωγή της νόσου. Χωριστή κατηγορία συνιστά η κρέμα ιμικουιμόδης (τροποποιητής της ανοσοποιητικής ανταπόκρισης, τοπική θεραπεία των ακτινικών κερατώσεων), η οποία δεν περιέχει θειολική ή αμιδική ομάδα ή θείο.

6. Η ενδημική πέμφιγα της νότιας Αμερικής είναι παραλλαγή της φυλλώδους [2, 16]. Αναφέρεται για πρώτη φορά ως Pemphigus brasiliensis από τον François Boissier de Sauvages στο έργο του Nosologia Methodica (1768). Η περιγραφή του είναι βασισμένη σε παρατηρήσεις ιεραποστόλων που βρίσκονταν στη Βραζιλία. Η εικόνα του δέρματος θυμίζει εγκαύματα και για αυτό το λόγο ονομάζεται *fogo selvagem*, που στην Πορτογαλική γλώσσα σημαίνει άγρια φωτιά. Έχει κλινικά, ιστοπαθολογικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά όμοια με την κοινή πέμφιγα, μεγάλη συχνότητα εμφάνισης σε παιδιά και νεαρά ενήλικα άτομα που κατοικούν σε αγροτικές περιοχές και σαφή γεωγραφική κατανομή. Η εμφάνισή της σχετίζεται με δήγματα εντόμων που απαντώνται στις περιοχές αυτές, όπως τα είδη *Simulium nigritum* και *Lutzomyia longipalpis*. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι η εκδήλωσή της σχετίζεται με τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας HLA-DRB1*0404, DRB1*1402 και DRB1*1406 [1,16].



Εικόνα δέρματος με πομφόλυγες και διαβρώσεις. Αριστερά φυλλώδης πέμφιγα και δεξιά fogo selvagem. Πηγή:

<https://www.merckmanuals.com/home/skin-disorders/blistering-diseases/pemphigus-vulgaris> και

<https://www.vakinha.com.br/vaquinha/ajuda-seu-antonio-doenca-fogo-selvagem>

7. Η ερυθηματώδης πέμφιγα είναι παραλλαγή της φυλλώδους. Παρατηρούνται ερυθηματολεπιδώδεις βλάβες σε μύτη και παρειές, σχηματισμός που μοιάζει με “πεταλούδα”. Η μορφή της μπορεί να είναι είτε εντοπισμένη, είτε γενικευμένη. Ανοσολογικά παρατηρείται συνδυασμός ευρημάτων ερυθηματώδους λύκου και πέμφιγας [1, 2, 17]

8. Η IgA πέμφιγα [1, 2,18] χαρακτηρίζεται από την παρουσία ομαδοποιημένων κυστιδίων και ερυθηματωδών πλακών με κρούστα. Είναι σπάνια μορφή της νόσου.

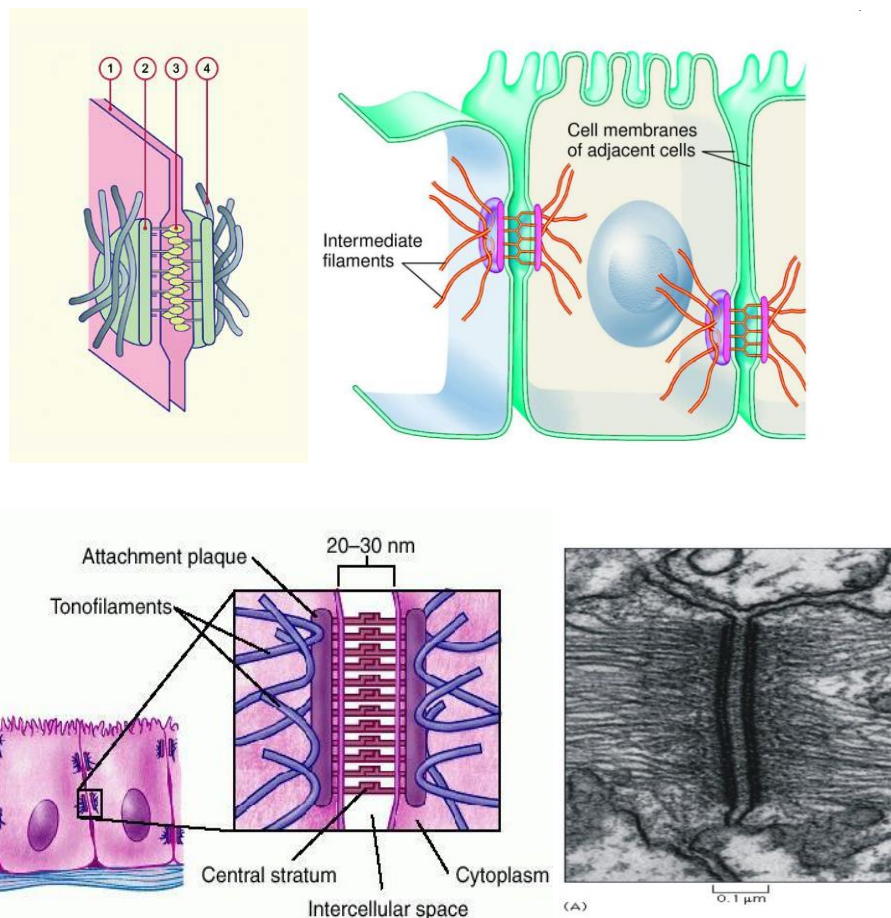
ΠΕΜΦΙΓΑ

ΤΥΠΟΣ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΑΝΤΙΓΟΝΟ ΣΤΟΧΟΣ
ΚΟΙΝΗ	Έναρξη με φυσαλίδες στο στόμα που μπορεί να είναι επώδυνες. Στη συνέχεια σπάζουν και αφήνουν έλκη.	IgG	δεσμογλεΐνη 3
ΦΥΛΛΩΔΗΣ	Λεπιδώδεις και εφελκιδιοποιημένες βλάβες επί ερυθηματώδους βάσης. Σμηγματορροϊκού τύπου κατανομή σε τριχωτό, πρόσωπο, στέρνο, ράχη. Δύσσομες, επώδυνες ορορροούσες διαβρώσεις Ασυνήθης εντόπιση στο στόμα Μπορεί να εξελιχθεί σε ερυθροδερμία	IgG	Δεσμογλεΐνη 1
ΒΛΑΣΤΙΚΗ	Βλαστικές βλάβες σε κεφαλή, πτυχές και προσβολή βλεννογόνων	IgG	δεσμογλεΐνη 1 και 3
ΠΕΜΦΙΓΑ IgA	Είναι το λιγότερο επιβλαβές είδος πέμφιγας	IgA	δεσμοκολλίνη 1 και ένα ακόμη αντιγόνο με άγνωστη μέχρι στιγμής μοριακή δομή
ΠΑΡΑΝΕΟΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	Επώδυνες πληγές στο στόμα και τα χείλη. Ραγάδες και ουλές στα μάτια και των βλέφαρα. Φλύκταινες, Σοβαρά προβλήματα στους πνεύμονες.	IgG	Δεσμοπλακίνη I/II
			Δεσμογλεΐνη 1 και 3
			Ενβοπλακίνη, περιπλακίνη, αντιγόνα MB 170 και 230 kD αντίστοιχα
ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗΣ	Ανοσολογικά: συνδυασμός ευρημάτων Ελ και πέμφιγας, δηλ. κοκκώδεις εναποθέσεις IgG και C3 στο επιδερμοχοριακό όριο και κυκλοφορούντα αντιπυρηνικά αντισώματα, μαζί με την εικόνα της πέμφιγας	IgG	Δεσμογλεΐνη 1
ΕΝΔΗΜΙΚΗ (ΒΡΑΖΙΛΙΑ, ΤΥΝΗΣΙΑ, ΚΟΛΟΜΒΙΑ)	Συσχέτιση με δήγμα μύγας <i>Simulium nigri-manum</i> • Παιδιά και νεαροί ενήλικες • Κλινικά, ιστολογικά, ανοσολογικά με φυλλώδη πέμφιγα	IgG	Δεσμογλεΐνη 1 και δεσμοκολλίνη 1 (Βραζιλία). Δεσμογλεΐνη 1 (Κολομβία). Δεσμογλεΐνη 1 και δεσμογλεΐνη 3 (Τυνησία)
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ	Αναστρέψιμη μορφή πέμφιγας	IgG	ετερογενής ομάδα αντιγόνων στόχων

Πίνακας 1. ΟΙ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΠΕΜΦΙΓΑΣ

Αιτιοπαθογένεια

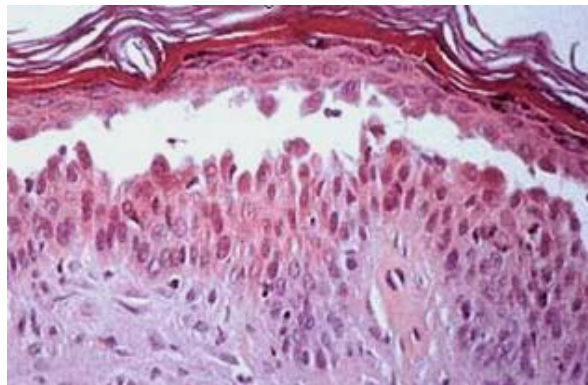
Τα αίτια της νόσου δεν είναι πλήρως γνωστά. Παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση της πέμφιγας θεωρούνται τα αυτοάνοσα νοσήματα (μυασθένεια, νόσος τους Graves, ερυθματώδης λύκος), οι νεοπλασίες (κυρίως του αιμοποιητικού συστήματος), διάφορα φάρμακα, φυσικοί παράγοντες (εγκαύματα, ιοντίζουσα ακτινοβολία), ιοί, διάφορες τροφές και το ψυχικό στρες. Επίσης υπάρχει συσχέτιση της εμφάνισης της νόσου με ορισμένα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας, όπως τα HLA-DRB1*04:02 (πληθυσμοί Εβραϊκής καταγωγής) και HLA-DQB1*05:03.10 [2, 3,19,20]. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου είναι η ακανθόλυση, δηλαδή η απώλεια της συνοχής μεταξύ των κερατινοκυττάρων, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό των ενδοεπιδερμικών φλυκταινών. Η ακανθόλυση οφείλεται σε αυτοαντισώματα κατηγορίας IgG έναντι της δεσμογλεΐνης. Η δεσμογλεΐνη(Dsg) είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία συνιστά την κύρια δομική πρωτεΐνη των δεσμοσωματίων. Απαντάται σε δύο μορφές, την Dsg3 μοριακού βάρους 130 kD και την Dsg1 μοριακού βάρους 160 kD. Στο δέρμα η δεσμογλεΐνη 1 εκφράζεται σε όλες τις στιβάδες της επιδερμίδας, αλλά περισσότερο στις επιφανειακές, ενώ η δεσμογλεΐνη 3 εκφράζεται στις κατώτερες στιβάδες της επιδερμίδας, κυρίως στη βασική. Στους βλεννογόνους και οι δύο εκφράζονται σε όλο το πάχος της ακανθωτής στιβάδας με τη δεσμογλεΐνη 1 όμως να εκφράζεται κυρίως σε κατώτερες στιβάδες από αυτές της δεσμογλεΐνης 3.



Σχηματική παράσταση δεσμοσώματος: 1=μεσοκυττάριος χώρος, 2= κυτταροπλασματική πλάκα από δεσμοπλακίνη, 3=δεσμογλεΐνη, 4=ινίδια κερατίνης. Τα δεσμοσώματα είναι ειδικοί μεσοκυττάριοι σύνδεσμοι, που συνδέουν τις συγκολλητικές πλάκες των μεμβρανών των γειτονικών κυττάρων, όπου αγκιστρώνονται τα μέσου μεγέθους ινίδια. Η τριάδα πλάκες –ινίδια–δεσμοσώματα σχηματίζουν μια τριδιάσταση σκαλωσιά πάνω στο κύτταρο που προσφέρει

στους ιστούς μηχανική δύναμη. Πηγή: Ben Lagha N, Poulesquen V, Roujeau JC, Alantar A, Maman L. Pemphigus Vulgaris: A Case-Based Update JCD 2005; 71 (9):667- 672.

Η σύνδεση των αυτοαντισωμάτων με τη δεσμογλεΐνη ενεργοποιεί το κερατινοκύτταρο και πυροδοτεί σειρά αντιδράσεων, με σημαντικότερη την απελευθέρωση του ενεργοποιητή της ουροκινάσης του πλασμινογόνου, που μετατρέπεται σε πλασμίνη, οδηγώντας τελικά στην πέψη των δεσμοσωματίων [20, 21, 22]. Οι δεσμογλεΐνες 1 και 3 είναι μέλη της οικογένειας των καδερινών (cadherines). Οι καδερίνες είναι μια ομάδα από μόρια προσκόλλησης μεταξύ των κυττάρων, που παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και την διατήρηση της ακεραιότητας των ιστών, και εξαρτώνται από την αντλία ασβεστίου. Οι καδερίνες διαιρούνται σε δύο βασικές ομάδες, τις κλασικές (E, P, N-καδερίνες, σύνδεσμοι προσκόλλησης ή/και χημικές συνάψεις), και τις δεσμοσωματικές καδερίνες (δεσμογλεΐνες και δεσμοκολλίνες). Το κυτταροπλασματικό τους κομμάτι σχετίζεται με τις πρωτεΐνες των πλακών – [α και β κατενίνες (catenins), πλακογλομπίνη (plakoglobin)], μέσω των οποίων συνδέονται με το κυτταροσκελετικό δίκτυο. Έτσι παρέχουν μια ισχυρή κυτταρική σύνδεση [23,24].



Ακανθόλυση, δηλαδή πρωτοπαθής απώλεια της συνοχής των κυττάρων της επιδερμίδας

Κλινική Εικόνα

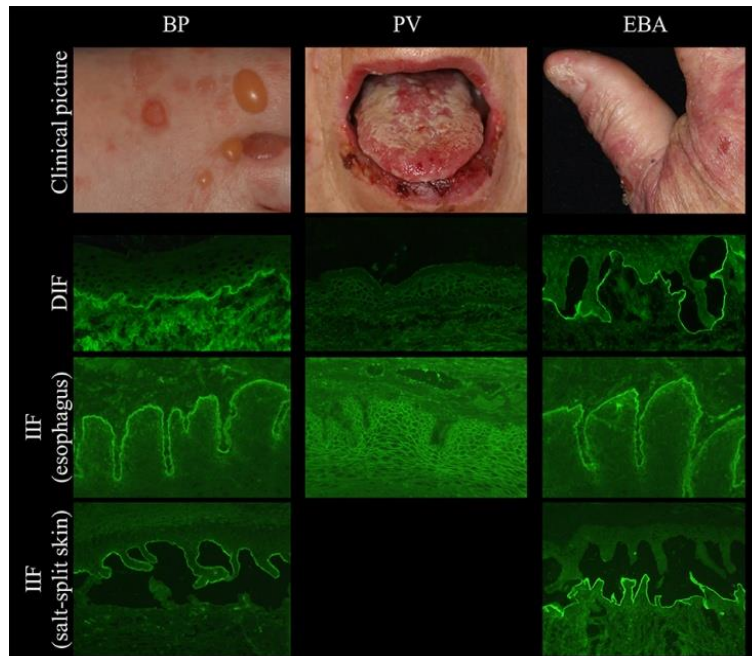
Κατά την έναρξη της νόσου παρατηρούνται βλάβες των βλεννογόνων που μετά από αρκετές εβδομάδες ή μήνες εμφανίζονται και στο δέρμα. Οι βλάβες στον βλεννογόνο του στόματος είναι επώδυνες και προκαλούν δυσφαγία, δυσκαταποσία και κατά συνέπεια απώλεια βάρους. Ο σχηματισμός πομφολύγων παρατηρείται στο δέρμα κυρίως του κρανίου, του προσώπου και του ανώτερου τμήματος του θώρακα. Όταν οι πομφόλυγες σπάνε δημιουργούν περιοχές διάβρωσης του δέρματος με έντονο πόνο. Αν οι περιοχές αυτές είναι εκτεταμένες μπορεί να προκληθούν διαταραχές στην ηλεκτρολυτική ισορροπία, απώλεια πρωτεϊνών και αναιμία. Οι βλάβες δευτερογενώς ευνοούν την ανάπτυξη λοιμώξεων [2,5, 7,10, 11].

Διάγνωση

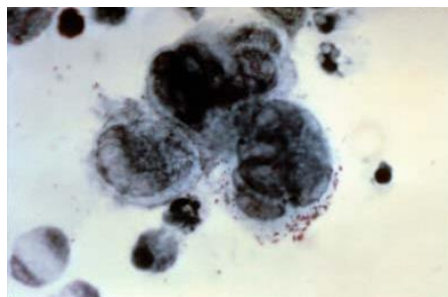
Η διάγνωση της πέμφιγας γίνεται με [7, 12, 25, 26, 27, 28]:

- πλήρες ιατρικό ιστορικό
- εκτίμηση της κλινικής εικόνας
- βιοψία του δέρματος και των αντίστοιχων ιστολογικών ευρημάτων
- άμεσο ανοσοφθορισμό: γίνεται με λήψη δέρματος όπως στην βιοψία, και ανίχνευση αυτοαντισωμάτων IgG και C3, στις περιοχές γύρω από τις διαβρώσεις του δέρματος. Δεν εφαρμόζεται ως τεχνική στην φαρμακευτική πέμφιγα.

- εξέταση αίματος για τη μέτρηση των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων (ELISA)
- δοκιμασία Tzanck: συλλέγεται υλικό δέρματος από την κορυφή ή τη βάση της πομφόλυγας, γίνεται χρώση με αιματοξυλίνη-εοσίνη ή χρώση Leishman, για την ανίχνευση ακανθοκυττάρων. Τα κύτταρα αυτά είναι συνήθως πολυπύρρνα και με αυξημένη αναλογία πυρήνα προς κυτταρόπλασμα. Η παρουσία τους επιβεβαιώνει τη διάγνωση της νόσου.
- έμμεσο ανοσοφθορισμό για την ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων έναντι της δεσμογλεΐνης σε κατάλληλο υπόστρωμα. Συνήθως χρησιμοποιούνται τμήματα οισοφάγου πιθήκου για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των ενδοεπιδερμικών αντιγόνων ή των ζωνών της βασικής μεμβράνης στον ανθρώπινο ορό. Ένα θετικό αποτέλεσμα παρέχει ένα χαρακτηριστικό "δικτυωτό εξάγωνο" μοτίβο. Η συσχέτιση του τίτλου των αντισωμάτων με την κλινική δραστηριότητα της νόσου είναι θετική, αλλά όχι απόλυτα αναλογική. Η εκτίμηση του τίτλου είναι χρήσιμη για την παρακολούθηση της πορείας της νόσου και την αξιολόγηση θεραπείας.



Διαφορική διάγνωση με έμμεσο ανοσοφθορισμό μεταξύ πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς (BP), κοινής πέμφιγας (PV) και πομφολυγώδους επιδερμόλυσης (EBA). Πηγή: Witte M, Zillikens D and Schmidt E (2018) Diagnosis of Autoimmune Blistering Diseases. *Front. Med.* 5:296. doi: 10.3389/fmed.2018.00296



Κύτταρα Tzanck μεγάλα κύτταρα τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλών πυρήνων. Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Tzanck_test

Πριν τη έναρξη της θεραπείας γίνεται μια γενική εκτίμηση της κατάστασης του ασθενούς με μέτρηση επιπέδων γλυκόζης και γλυκυωμένης αιμοσφαιρίνης HbA1c, βιταμίνης D, λιπιδίων αίματος, ιολογικό έλεγχο για ηπατίτιδα B, C

και HIV, έλεγχο αντισωμάτων έναντι της σύφιλης, γενική εξέταση ούρων, ακτινογραφία θώρακος και μέτρηση της οστικής πυκνότητας. Ο έλεγχος αυτός πρέπει να επαναλαμβάνεται κάθε χρόνο [7,8].

Θεραπεία

Η θεραπεία συνίσταται στην αντιμετώπιση της ανοσολογικής βλάβης της νόσου, στην αντιμετώπιση της φλεγμονώδους διαδικασίας που εμπλέκεται στο σχηματισμό των βλαβών και στην παροχή υποστηρικτικής φροντίδας τόσο τοπικά όσο και συστηματικά. Η θεραπεία βασίζεται σε μέτριες ως υψηλές δόσεις κορτικοστεροειδών, καθώς και στην χορήγηση ανοσοκατασταλτικών. Η έναρξη της θεραπείας πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν πιο νωρίς. Συνήθως έχει παρατεταμένη διάρκεια, ώστε να εξασφαλιστεί η αποδρομή της νόσου. Η διάρκειά της μπορεί να είναι από μερικούς μήνες ως και χρόνια. Εξαιτίας της σπανιότητας της νόσου έχουν γίνει πολύ λίγες κλινικές μελέτες [29, 30, 31]. Οι ιατρικές πρακτικές και τα φάρμακα που χορηγούνται είναι τα παρακάτω:

Κορτικοστεροειδή, λόγω της αντιφλεγμονώδους και της ανοσοκατασταλτικής τους δράσης. Χορηγήθηκαν για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1950, όπου παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση της θνησιμότητας, από 75% σε 30%. Οι ουσίες που χορηγούνται συνηθέστερα είναι πρεδνιζόνη, πρεδνιζολόνη και δεφλαζακόρτη. Επισημαίνεται εδώ ότι η χορήγησή τους πολύ συχνά προκαλεί σοβαρές παρενέργειες (υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, έλκος στομάχου, οστεοπόρωση, γλαύκωμα, καταρράκτης) [27,28].

Αζαθειοπρίνη, αντιμεταβολίτης που χρησιμοποιείται ευρέως στις μεταμοσχεύσεις οργάνων και στην αντιμετώπιση αυτοάνοσων νοσημάτων. Είναι ιμιδαζολικό παράγωγο της μερκαπτοπουρίνης το οποίο αναστέλλει τη σύνθεση DNA, RNA, και πρωτεϊνών. Μετατρέπεται in vivo προς τον πουρινικό αντιμεταβολίτη, 6-μερκαπτοπουρίνη. Ως νουκλεοτίδιο, η 6-μερκαπτοπουρίνη ασκεί ανασταλτική δράση στην εκ νέου βιοσύνθεση πουρινών. Επίσης επιδρά στον κυτταρικό μεταβολισμό και αναστέλλει τη μίτωση. Μειώνει τον αριθμό των μονοκυττάρων με αναστρέψιμο τρόπο και αναστέλλει τη σύνθεση των γ-σφαιρινών, καθώς και τη λειτουργία των Β και Τ λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, η παρατεταμένη ανοσοκαταστολή αυξάνει τον κίνδυνο επιπλοκών από λοιμώξεις και τον κίνδυνο εμφάνισης νεοπλασιών. Άτομα με κληρονομική έλλειψη του ενζύμου μεθυλοτρανσφεράση των θειοπουρινών (thiopurine S-methyltransferase, TPMT) παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στο φάρμακο και κίνδυνο μυελοτοξικότητας [29].

Μυκοφαινολάτη μοφετίλ, ανοσοκατασταλτικό, που μετατρέπεται στον ενεργό μεταβολίτη, το μυκοφαινολικό οξύ. Αυτός με τη σειρά του αναστέλλει επιλεκτικά το ένζυμο αφυδρογονάση της μονοφωσφορικής ινοσίνης (*Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*, IMPDH) εμποδίζοντας τη σύνθεση πουρινών και μειώνοντας το ρυθμό πολλαπλασιασμού των Β και Τ λεμφοκυττάρων. Είναι αρκετά αποτελεσματικό φάρμακο. Σημαντικές επιπλοκές είναι η ουδετεροπενία, η λεμφοπενία και η μυαλγία [30, 31].

Δαψόνη, ουσία με αντιφλεγμονώδη δράση και δράση έναντι του παράγοντα TNF. Προκαλεί παρενέργειες αναστρέψιμες και εξαρτώμενες από τη δοσολογία. Οι μελέτες στη βιβλιογραφία σχετικά με το χορήγησή της παρουσιάζουν αντικρουόμενες απόψεις [31, 32].

Κυκλοσπορίνη, που είναι αναστολέας της καλσινευρίνης με ανοσοκατασταλτική δράση έναντι των Β και Τ λεμφοκυττάρων [33].

Φάρμακα έναντι του παράγοντα TNF. Ο παράγων TNF-α είναι μια από τις κυτταροκίνες που εμπλέκονται στην ακανθόλυση. Τέτοια φάρμακα είναι το infliximab και το etanercept [34]. Η ινφλιξιμάμπη (infliximab) είναι ένα χημειοκλινικό μονοκλωνικό αντίσωμα ανθρώπου-ποντικού που συνδέεται με μεγάλη χημική συγγένεια και με τους διαλυτούς και με τους διαμεμβρανικούς τύπους του TNFα. Η ετανερσέπτη (etanercept) είναι ένας ανταγωνιστικός αναστολέας της σύνδεσης του παράγοντα νέκρωσης των όγκων με τους υποδοχείς του στην επιφάνεια των κυττάρων και με αυτό τον τρόπο αναστέλλει τη βιολογική του δραστηριότητα [34].

Rituximab. Είναι χημειοκλινικό μονοκλωνικό anti-CD20 αντίσωμα, με δράση έναντι των Β λεμφοκυττάρων. Χορηγείται από το 2006 σε περιπτώσεις με σοβαρά και επίμονα συμπτώματα. Είναι καλώς ανεκτό, χωρίς σοβαρές παρενέργειες [35,36,

37]

Πλασμαφαίρεση και ανοσοπροσρόφηση. Η πλασμαφαίρεση εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1978. Με την πλασμαφαίρεση απομακρύνονται τα αυτοαντισώματα από την κυκλοφορία. Ωστόσο μπορεί να προκαλέσει rebound effect, προάγοντας μεγαλύτερη παραγωγή των αυτοαντισωμάτων μετά την απομάκρυνσή τους. Συνιστά επιλογή για σοβαρές περιπτώσεις της νόσου, όπου δεν υπάρχει ανταπόκριση σε άλλες θεραπείες. Είναι δαπανηρή θεραπεία, εφαρμόζεται σε λίγα νοσοκομεία και η βασική της επιπλοκή είναι η σηψαιμία. Η ανοσοπροσρόφηση σε σχέση με την πλασμαφαίρεση παρουσιάζει τα πλεονεκτήματα ότι δεν απαιτείται η αντικατάσταση στοιχείων του πλάσματος και έχει λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες. Εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1984. Για τη μείωση των κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων στο πλάσμα, χρησιμοποιούνται διάφορα συστήματα ανοσοπροσρόφησης, όπως τα Immunosorba και Therasorb. Τα επίπεδα των ειδικών για την πέμφιγα anti-Dsg IgG αυτοαντισωμάτων φαίνεται να μειώνονται κατά 75% ανά συνεδρία ανοσοπροσρόφησης. Μετά από 3 συνεχόμενες συνεδρίες (ένας κύκλος θεραπείας) τα επίπεδα φαίνεται να μειώνονται κατά 95% σε σχέση με τα αρχικά [38, 39, 40].

Ενδοφλέβια χορήγηση γ-σφαιρίνης. Το πλεονέκτημά της είναι η ασφαλής χορήγηση με λίγες παρενέργειες (κεφαλαλγία, δύσπνοια, ταχυκαρδία). Εφαρμόζεται σε περιπτώσεις που δεν υπάρχει ανταπόκριση σε άλλες θεραπείες ή υπάρχουν σοβαρές επιπλοκές. Μπορεί να χορηγηθεί και σε εγκύους. Είναι θεραπεία με υψηλό κόστος. Ο τρόπος δράσης στην πέμφιγα είναι πολύπλοκος και με μηχανισμούς που δρουν συνεργιστικά, όπως επιλεκτική απομάκρυνση παθογόνων αντισωμάτων, αλλαγή στην έκφραση και τη λειτουργία των υποδοχέων Fc καθώς και επίδραση στην ενεργοποίηση, τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των T και B λεμφοκυττάρων, καθώς και παρέμβαση στην ενεργοποίηση κυτταροκινών και του συμπληρώματος [41,42,43].

Τοπική Θεραπεία. Χορηγείται επικουρικά για την ανακούφιση από τον πόνο και για την πρόληψη λοιμώξεων του δέρματος. Συνήθως εφαρμόζονται σκευάσματα με κορτικοστεροειδή και αντιβιοτικά. Υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικά με τη χρήση του ανοσοκατασταλτικού tacrolimus, ειδικά στα έλκη του προσώπου. Χρησιμοποιούνται ακόμη αντισηπτικά διαλύματα σε περιπτώσεις εκτεταμένων βλαβών, όπως potassium permanganate KMnO₄ και διάλυμα χλωρεξιδίνης, γέλες κορτικοειδών (προπιονική κλομπεταζόλη) για το στοματικό βλεννογόνο και ακετονίδιο τριαμσινολόνης για εμμένοντα έλκη [44,45]

Θεραπεία με αντιβιοτικά, ενδείκνυται μόνο για περιπτώσεις με κλινική ή εργαστηριακή ένδειξη δευτερογενούς λοίμωξης, ποτέ προληπτικά. Η επιλογή τους γίνεται μετά από καλλιέργεια δέρματος και αντιβιογράμμα [46,47]

Μελλοντικές Θεραπείες. Αρκετές ουσίες βρίσκονται υπό δοκιμή σχετικά με την αποτελεσματικότητα και την ασφαλή τους χορήγηση. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται οι ουσίες veltuzumab, obinutuzumab, ofatumumab, ocaratuzumab, PRO 121921, anti-BAFF, και anti-BAFF-R [48, 49, 50,51]. Το Veltuzumab είναι ένα αντι-CD20 αντίσωμα που χορηγείται με υποδόρια ένεση. Η ομπινουτουζουμάμπη είναι ένα Τύπου II εξανθρωποποιημένο αντι-CD20 μονοκλωνικό αντίσωμα της υποομάδας IgG1, το οποίο προέρχεται από την εξανθρωποποίηση του γονικού αντισώματος μυϊκής προέλευσης B-Ly1 και παράγεται σε κυτταρική σειρά ωοθηκών κινεζικού κρικητού με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA. Η οφατουμουμάμπη (ofatumumab) είναι ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα (IgG1), που συνδέεται ειδικά με διακριτό επίτοπο που συμπεριλαμβάνει τους μικρούς και τους μεγάλους εξωκυττάρους βρόχους του μορίου CD20. Η σύνδεση της οφατουμουμάμπης στο εγγύς στη μεμβράνη επίτοπο του μορίου CD20, επάγει την ένταξη και ενεργοποίηση της συμπληρωματικής οδού στην κυτταρική επιφάνεια, γεγονός που οδηγεί σε εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα και συνακόλουθη λύση των νεοπλασματικών κυττάρων [34].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Joly P, Litrowski N. Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). *Clin Dermatol.* 2011;29(4):432-6.
2. Pollmann R, Schmidt T, Eming R, Hertl M. Pemphigus: a Comprehensive Review on Pathogenesis, Clinical Presentation and Novel Therapeutic Approaches. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018;54:1-25
3. Hammers CM, Stanley JR. Mechanisms of disease: pemphigus and bullous pemphigoid. *Annu Rev Pathol.* 2016 May 23;11:175-97
4. Kridin K, Sagi SZ, Bergman R. Mortality and cause of death in Israeli patients with pemphigus. *Acta Derm Venereol.* 2017;97:607-611.
5. Kridin K. Pemphigus group: overview, epidemiology, mortality, and comorbidities. *Immunol Res.* 2018;66:255-70.
6. Hsu DY, Brieva J, Sinha AA, Langan SM, Silverberg JI. Comorbidities and inpatient mortality for pemphigus in the USA. *Br J Dermatol.* 2016;174:1290-8
7. Hertl M, Jedlickova H, Karpati S, Marinovic B, Uzun S, Yayli S, et al. Pemphigus. S2 guideline for diagnosis and treatment—guided by the European Dermatology Forum (EDF) in cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29:405-14.
8. Cholera M, Chainani-Wu N. Management of Pemphigus Vulgaris. *Adv Ther.* 2016;33:910-58.
9. Cathy Y. Zhao, Dédée F. Murrell, Autoimmune blistering diseases in females: a review *International Journal of Women's Dermatology* 1 (2015) 4–12
10. Broussard KC, Leung TG, Moradi A, Thorne JE, Fine JD. Autoimmune bullous diseases with skin and eye involvement: Cicatricial pemphigoid, pemphigus vulgaris, and pemphigus paraneoplastica. *Clin Dermatol.* 2016;34:205-13
11. Di Zenzo G, Amber KT, Sayar BS, Müller EJ, Borradori L. Immune response in pemphigus and beyond: progresses and emerging concepts. *Semin Immunopathol.* 2016;38:57-74.
12. Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest.* 1999;103:461-8.
13. Verma Ghanshyam K, Tegta Gita R, Sharma Anuj, Kaur Mohitpreet, Sharma Sudarshan. A rare case of extensive pemphigus vegetans *Indian dermatology online Journal* 2020; 11(1): 87-90
14. Ohzono A, Sogame R, Li X, Teye K, Tsuchisaka A, et al. Clinical and immunological findings in 104 cases of paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol.* 2015 Dec;173(6):1447-52.
15. Brenner S, Bialy-Golan A, Ruocco V. Drug-induced pemphigus. *Clin Dermatol.* 1998;16:393-7.
16. Hans-Filho G, Aoki V, Bittner NRH, Bittner GC. Fogo selvagem: endemic pemphigus foliaceus. *An Bras Dermatol.* 2018;93:638-50.
17. Oktarina DA, Poot AM, Kramer D, Diercks GF, Jonkman MF, Pas HH. The IgG “Lupus-Band” deposition pattern of pemphigus erythematosus: association with the desmoglein 1 ectodomain as revealed by 3 cases. *Archives of Dermatology.* 2012;16:1–6
18. Minira Aslanova; Patrick M. Zito. IgA pemphigus
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519063/>
19. Pan M, Liu X, Zheng J. The pathogenic role of autoantibodies in pemphigus vulgaris. *Clin Exp Dermatol.* 2011;36:703-7.
20. Amber KT, Staropoli P, Shiman MI, Elgart GW, Hertl M. Autoreactive T cells in the immune pathogenesis of pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol.* 2013; 22:699–704.
21. Grando SA. Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities. *Autoimmunity.* 2012;45:7-35.
22. López-Robles E, Avalos-Díaz E, Vega-Memije E, Hojyo-Tomoka T, Villalobos R, Fraire S, et al. TNF-α and IL-6 are mediator in the blisterin process of pemphigus. *Int J Dermatol.* 2001;40:185-8.
23. Ninomiya H., David R., Damm E.W., Fagotto F., Niessen C.M., Winklbauer R. Cadherin-dependent differential cell adhesion in *Xenopus* causes cell sorting in vitro but not in the embryo. *J. Cell Sci.* 2012;125:1877–1883

24. Oroz J., Valbuena A., Vera A.M., Mendieta J., Gómez-Puertas P., Carrión-Vázquez M. Nanomechanics of the cadherin ectodomain “canalization” by Ca²⁺ binding results in a new mechanical element. *J. Biol. Chem.* 2011;286:9405–9418
25. Scott C. Bresler, Roxanne Bavarian, Scott R. Granter and Sook-Bin Woo, Direct immunofluorescence is of limited utility in patients with low clinical suspicion for an oral autoimmune bullous disorder, *Oral Diseases*, 26, 1, (81-88), (2019).
26. Monika Bowszyc-Dmochowska, Mai P. Hoang and Marian Dmochowski, Subcorneal and Intraepidermal Immunobullous Dermatoses, *Hospital-Based Dermatopathology*, 10.1007/978-3-030-35820-4_9, (349-397), (2020).
27. B. Carey, S. Joshi, A. Abdelghani, J. Mee, M. Andiappan and J. Setterfield, The optimal oral biopsy site for diagnosis of mucous membrane pemphigoid and pemphigus vulgaris, *British Journal of Dermatology*, 182, 3, (747-753), (2019).
28. Gilles F. Diercks, Hendri H. Pas and Marcel F. Jonkman, Immunofluorescence of Autoimmune Bullous Diseases, *Surgical Pathology Clinics*, 10.1016/j.path.2017.01.011, 10, 2, (505-512), (2017).
29. Martin LK, Werth VP, Villaneuva EV, Murrell DF. A systematic review of randomized controlled trials for pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Am Acad Dermatol.* 2011;64:903-8.
30. Meurer M. Immunosuppressive therapy for autoimmune bullous diseases. *Clin Dermatol.* 2012;30:78-83.
31. Tavakolpour S. Current and future treatment options for pemphigus: Is it time to move towards more effective treatments? *Int Immunopharmacol.* 2017;53:133-42.
32. Chaidemenos G, Apalla Z, Koussidou T, Papagarifallou I, Ioannides D. High dose oral prednisone vs. prednisone plus azathioprine for the treatment of oral pemphigus: a retrospective, bi-centre, comparative study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25:206-10.
33. Beissert S, Mimouni D, Kanwar AJ, Solomons N, Kalia V, Anhalt GJ. Treating pemphigus vulgaris with prednisone and mycophenolate mofetil: a multicenter, randomized, placebo controlled trial. *J Invest Dermatol.* 2010;130:2041-8
34. Maltzman JS, Koretzky GA. Azathioprine: old drug, new actions. *J Clin Invest.* 2003;111:1122-4.
35. Vyas N, Patel NS, Cohen GF. Mycophenolate mofetil as a first-line steroid sparing agent in the treatment of pemphigus vulgaris. *J Drugs Dermatol.* 2013;12:210-6.
36. Zhao CY, Murrell DF. Pemphigus Vulgaris: An Evidence-Based Treatment Update. *Drugs.* 2015;75:271-84.
37. Baum S, Debby A, Gilboa S, Trau H, Barzilai A. Efficacy of Dapsone in the treatment of pemphigus vulgaris: a single-center case study. *Dermatology.* 2016;232:578-85.
38. Barthelemy H, Frappaz A, Cambazard F et al. Treatment of nine cases of pemphigus vulgaris with cyclosporin. *J Am Acad Dermatol* 1988; 18: 1262–6.
39. Graves JE, Nunley K, Heffernan MP. Off-label uses of biologics in dermatology: rituximab, omalizumab, infliximab, etanercept, adalimumab, efalizumab, and alefacept (part 2 of 2). *J Am Acad Dermatol.* 2007;56:e55-79.
40. Ingen-Housz-Oro S, Valeyrie-Allanore L, Cosnes A, Ortonne N, Hüe S, Paul M, et al. First-line treatment of pemphigus vulgaris with a combination of rituximab and high-potency topical corticosteroids. *JAMA Dermatol.* 2015;151:200-3.
41. Tavakolpour S, Mahmoudi H, Balighi K, Abedini R, Daneshpazhooh M. Sixteen-year history of rituximab therapy for 1085 pemphigus vulgaris patients: A systematic review. *Int Immunopharmacol.* 2018;54:131-8
42. Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, Hebert V, Houivet E, Calbo S, et al., First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *Lancet.* 2017;389:2031-40
43. Eming R, Rech J, Barth S, Kalden JR, Schuler G, Harrer T, et al. Prolonged clinical remission of patients with severe pemphigus upon rapid removal of desmoglein-reactive autoantibodies by immunoadsorption. *Dermatology.* 2006;212:177-87.
44. Meyersburg D, Schmidt E, Kasperkiewicz M, Zillikens D. Immunoadsorption in dermatology. *Ther Apher Dial.* 2012;16:311-20.
45. Adriana Maria Porro¹, Günter Hans Filho², Claudia Giuli Santi³ Consensus on the treatment of autoimmune bullous dermatoses: pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus – Brazilian Society of Dermatology *An Bras Dermatol.* 2019;94(2 Suppl 1):S20-32.

46. Svecova D. IVIG therapy in pemphigus vulgaris has corticosteroid-sparing and immunomodulatory effects. *Australas J Dermatol.* 2016;57:141-4.
47. Chaigne B, Mouthon L. Mechanisms of action of intravenous immunoglobulin. *Transfus Apher Sci.* 2017;56:45-9.
48. Lin L, Zeng X, Chen Q. Pemphigus and pregnancy. *Saudi Med J.* 2015;36:1033-8.
49. Gach JE, Ilchyshyn A. Beneficial effects of topical tacrolimus on recalcitrant erosions of pemphigus vulgaris. *Clin Exp Dermatol.* 2004;29:271-2.
50. mber KT, Maglie R, Solimani F, Eming R, Hertl M. Targeted therapies for autoimmune bullous diseases: current status. *Drugs.* (2018) 78:1527–48. doi: 10.1007/s40265-018-0976-5
51. Huang A, Madan RK, Levitt J. Future therapies for pemphigus vulgaris: Rituximab and beyond. *J Am Acad Dermatol.* 2016;74:746-53.

ΤΑΧΥΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΚΑΛΣΙΤΟΝΙΝΗΣ ΜΕ ΟΠΤΙΚΟ ΑΝΟΣΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΓΙΑ ΠΑΡΑΚΛΙΝΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΣΗΨΗΣ

Δ. Τσουνίδη¹, Γ. Κουκουβίνος¹, Δ. Γουστουρίδης², Ι. Ράπτης², Β. Τσαούσης³,

Χ. Μητρόπουλος³, Σ. Κακαμπάκος¹, Π. Πέτρου¹

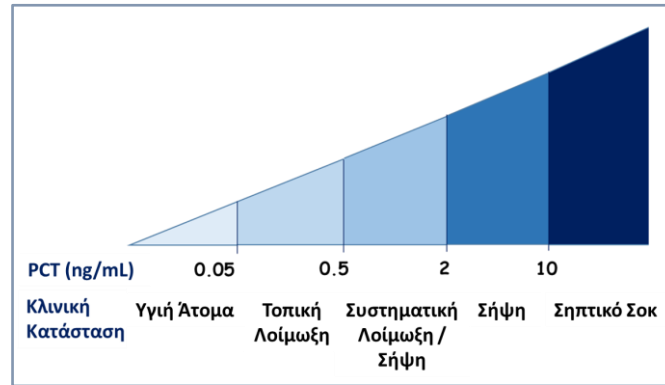
1. Εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων/Ανοσοαισθητήρων, Ινστιτούτο Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος», Νεαπόλεως 27 & Πατριάρχου Γρηγορίου, 15341 Αγία Παρασκευή
2. Thetametrisis A.E., Χρήστου Λαδά 40, 12132 Περιστέρι
3. Medicon Hellas A.E., Μελίτωνα 5-7, 15344 Γέρακας

Εισαγωγή

Η σήψη είναι μια απειλητική για τη ζωή κλινική κατάσταση που προκύπτει ως αποτέλεσμα γενικευμένης φλεγμονώδους αντίδρασης του οργανισμού σε μια μικροβιακή λοίμωξη.¹ Εφόσον δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα, οδηγεί σε ανεπάρκεια ζωτικών οργάνων και σηπτικό σοκ, το οποίο πιθανόν να καταλήξει στο θάνατο. Η σήψη αποτελεί παγκοσμίως την συχνότερη αιτία νοσηλείας στις μονάδες εντατικής θεραπείας και μία από τις συχνότερες αιτίες θανάτου σε νοσηλευόμενους ασθενείς. Συγκεκριμένα, υπολογίζεται ότι τα περιστατικά σήψης παγκοσμίως ξεπερνούν κάθε χρόνο τα 30 εκατομμύρια, με το ποσοστό θνησιμότητας να φτάνει περίπου το 40%.^{2,3} Για το λόγο αυτό, κρίνεται επιτακτική η έγκαιρη διάγνωση ώστε να εφαρμοστεί στοχευμένη θεραπεία και να αυξηθούν τα ποσοστά επιβίωσης. Σήμερα, η διάγνωση της σήψης βασίζεται κυρίως στην αξιολόγηση της κλινικής εικόνας του ασθενούς και σε καλλιέργειες αίματος για την ανίχνευση των βακτηρίων που προκάλεσαν τη σήψη. Χαρακτηριστικά συμπτώματα για τη διάγνωση της σήψης είναι η αύξηση του ρυθμού αναπνοής, η χαμηλή πίεση του αίματος, προβλήματα στο κεντρικό νευρικό σύστημα και τη διανοητική κατάσταση του ασθενούς, ο πυρετός και η δυσουρία.⁴ Ωστόσο, τα συμπτώματα αυτά δεν είναι ειδικά για τη σήψη, καθώς μπορεί να παρουσιαστούν και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις, δυσκολεύοντας την διάγνωση. Από την άλλη πλευρά, οι καλλιέργειες αίματος που πραγματοποιούνται με στόχο την ταυτοποίηση του παθογόνου μικροοργανισμού που προκάλεσε τη λοίμωξη, χαρακτηρίζονται από μεγάλο χρόνο ανάλυσης (2-7 ημέρες), με αποτέλεσμα να καθυστερεί η διάγνωση.³ Μια λύση για έγκαιρη και ακριβή διάγνωση της σήψης είναι ο προσδιορισμός των επιπέδων διαφόρων βιοδεικτών στον ορό του αίματος, μεταξύ των οποίων η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, η προκαλσιτονίνη, η ιντερλευκίνη-6 και το γαλακτικό οξύ.⁵ Οι τιμές των βιοδεικτών αυτών μπορούν να βοηθήσουν τόσο στη διάγνωση της σήψης, όσο και στην παρακολούθηση της εξέλιξης της κατάστασης του ασθενούς και της αποτελεσματικότητας της φαρμακευτικής αγωγής.^{6,7} Ένας από τους ειδικότερους και πιο αξιόπιστους βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της σήψης είναι η προκαλσιτονίνη (Procalcitonin, PCT).

Η PCT είναι μια πρωτεΐνη 116 αμινοξέων η οποία παράγεται και εκκρίνεται από το θυρεοειδή αδένος και τα επίπεδά της στο αίμα των υγιών ατόμων είναι πολύ χαμηλά (<0.05 ng/mL).^{7,8} Εντούτοις, τα επίπεδα της PCT αυξάνονται στο αίμα 2-3 ώρες μετά από μια μικροβιακή λοίμωξη, λαμβάνοντας μέγιστες τιμές 8-24 ώρες μετά την έναρξη της λοίμωξης,

μπορούν δε να συσχετιστούν με τη σοβαρότητα της σήψης και την έκβαση της κλινικής κατάστασης του ασθενούς, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 1. Έτσι μέσω επαναλαμβανόμενων μετρήσεων επιτρέπεται η αξιολόγηση της εξέλιξης της νόσου, χορηγείται η κατάλληλη αντιβιοτική θεραπεία και παρακολουθείται η ανταπόκριση του ασθενούς.

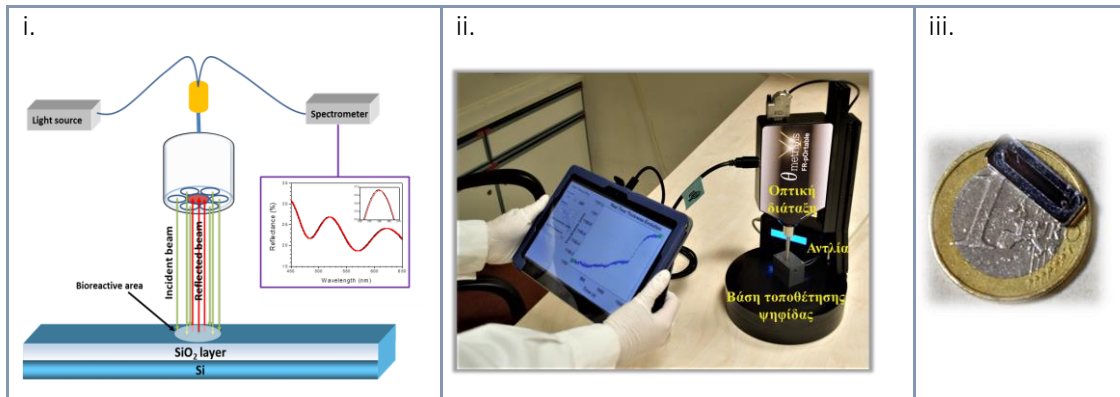


Εικόνα 1: Επίπεδα της PCT στον ορό του αίματος κατά την εξέλιξη της λοίμωξης από τοπική σε σηπτικό σοκ.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η ανάπτυξη μεθόδου για τον ταχύ προσδιορισμό της PCT σε ορό αίματος με χρήση οπτικού βιοαισθητήρα που βασίζεται στην φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός (White Light Reflectance Spectroscopy, WLRS) στοχεύοντας σε εφαρμογή στο σημείο φροντίδας του ασθενούς μέσω της ενσωμάτωσης του αισθητήρα σε μικρού μεγέθους συσκευή.

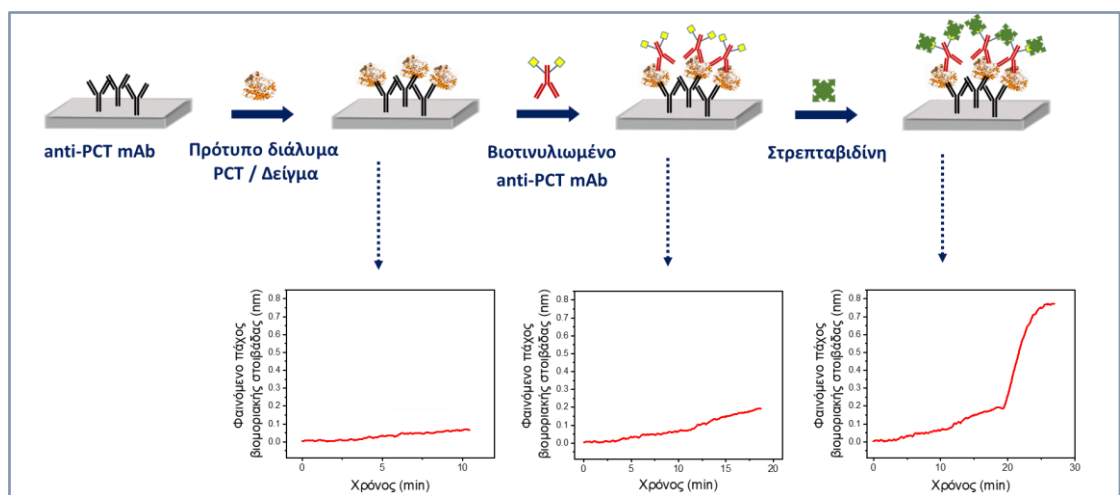
Μεθοδολογία

Ο οπτικός βιοαισθητήρας WLRS βασίζεται στη φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός από κατάλληλα διαμορφωμένες ψηφίδες πυριτίου και επιτρέπει την παρακολούθηση βιομοριακών αντιδράσεων χωρίς τη χρήση ιχνηθέτη σε πραγματικό χρόνο. Η ανίχνευση των βιοαντιδράσεων γίνεται μέσω της παρακολούθησης της ολίσθησης του φάσματος συμβολής που δημιουργείται κατά την ανάκλαση λευκού φωτός από την αισθητήρια επιφάνεια, η οποία αποτελείται από ψηφίδα πυριτίου (Si) που φέρει υμένιο διοξειδίου του πυριτίου (SiO₂), και στην οποία εφαρμόζεται μικρορευστομηχανική κυψελίδα για τη συνεχή διαβίβαση των αντιδραστηρίων.^{9,10} Η αρχή λειτουργίας του WLRS παρουσιάζεται στην εικόνα 2i. Στην αισθητήρια ψηφίδα προσπίπτει κάθετα φως από δέσμη 6 περιφερειακών οπτικών ινών συνδεδεμένων με πηγή λευκού φωτός ενώ το ανακλώμενο φως συλλέγεται από μία κεντρική ίνα, οδηγείται στο φασματοφωτόμετρο και καταγράφεται το φάσμα ανάκλασης. Όταν στην ψηφίδα ακινητοποιηθούν βιομόρια (π.χ., αντισώματα) και πραγματοποιηθεί βιοαντίδραση, το φάσμα συμβολής μετατοπίζεται λόγω αύξησης του πάχους της βιομοριακής στοιβάδας που σχηματίζεται. Η μετατόπιση καταγράφεται από κατάλληλο λογισμικό, επιτρέποντας την παρακολούθηση της βιοαντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Στην εικόνα 2ii παρουσιάζεται η φορητή συσκευή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την ανίχνευση της PCT, ενώ στην εικόνα 2iii παρουσιάζεται η αισθητήρια ψηφίδα με την μικρορευστομηχανική κυψελίδα.



Εικόνα 2: i) Αρχή λειτουργίας οπτικού αισθητήρα WLR. ii) Φωτογραφία της φορητής συσκευής WLR iii) Φωτογραφία αισθητήριας ψηφίδας στην οποία έχει τοποθετηθεί μικρορευστομηχανική κυψελίδα για τη διαβίβαση των αντιδραστηρίων.

Για τον προσδιορισμό της PCT στον αισθητήρα WLR αναπτύχθηκε ανοσοχημική μέθοδος μη ανταγωνιστικού τύπου δύο σταδίων, όπως παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 3. Συγκεκριμένα, σε αισθητήρια ψηφίδα όπου έχει ακινητοποιηθεί ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της PCT, διαβιβάζεται αρχικά πρότυπο διάλυμα PCT ή δείγμα ορού επί 7 min. Ακολουθεί διαβίβαση βιοτινυλιωμένου μονοκλωνικού αντισώματος που συνδέεται με διαφορετικό επίτοπο της PCT επί 7 min, και στη συνέχεια τα ανοσοσυμπλέγματα που έχουν δημιουργηθεί στην ψηφίδα αντιδρούν επί 4 min με διάλυμα στρεπταβιδίνης για την ενίσχυση του σήματος. Όλα τα διαλύματα διαβιβάζονται με ταχύτητα ροής 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. Η καταγραφή του σήματος κατά τη διάρκεια του ανοσοπροσδιορισμού πραγματοποιείται σε πραγματικό χρόνο.



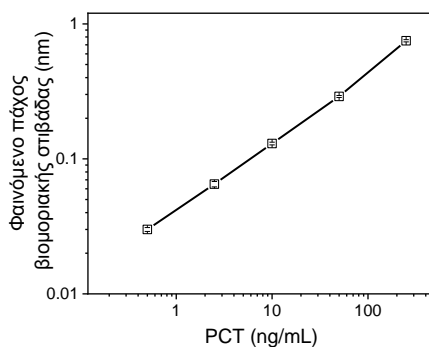
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων του ανοσοχημικού προσδιορισμού της PCT στον αισθητήρα WLR. Η απόκριση του σήματος καταγράφεται σε πραγματικό χρόνο σε όλα τα στάδια του προσδιορισμού.

Αποτελέσματα

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου ανοσοπροσδιορισμού της PCT με τον αισθητήρα WLRS βελτιστοποιήθηκαν διάφορες παράμετροι με κριτήρια την ευαισθησία ανίχνευσης και τον χρόνο ανάλυσης. Αρχικά, δοκιμάστηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί αντισωμάτων και αφού επιλέχθηκε κατάλληλο ζεύγος αντισωμάτων δέσμευσης και ανίχνευσης ακολούθως βελτιστοποιήθηκε η συγκέντρωση τόσο του αντισώματος δέσμευσης όσο και του αντισώματος ανίχνευσης. Μία άλλη παράμετρος που βελτιστοποιήθηκε είναι η χρονική διάρκεια των σταδίων του ανοσοπροσδιορισμού, όπου δοκιμάστηκαν διάφοροι συνδυασμοί για τα δύο στάδια της ανοσοαντίδρασης. Έχοντας ως στόχο τον ταχύ προσδιορισμό της PCT για επιτόπια (point-of-care) εφαρμογή, επιλέχθηκε ο χρόνος των 7 min τόσο για το στάδιο της διαβίβασης του δείγματος, όσο και για το στάδιο διαβίβασης του βιοτινυλιωμένου αντισώματος, καθώς παρείχε επαρκές αναλυτικό σήμα και ικανοποιητική ευαισθησία ανίχνευσης. Μία ακόμα σημαντική παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η επίδραση της μήτρας του ορού στον ανοσοπροσδιορισμό. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα αραιώσης ορού και επίσης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα PCT σε ανθρώπινο ορό. Κατά την ανάλυση των αραιωμένων δειγμάτων ορού δεν παρατηρήθηκαν φαινόμενα επίδρασης μήτρας και διαπιστώθηκε ότι δεν απαιτείται η αραιώση του ορού για την ανίχνευση της PCT. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν για την βιοενεργοποίηση των ψηφίδων καθώς και για την ανάλυση παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Τυπική πρότυπη καμπύλη που λαμβάνεται ακολουθώντας αυτό το πρωτόκολλο παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.

Πίνακας 1: Πρωτόκολλο ανοσοχημικού προσδιορισμού PCT.

Επικάλυψη επιφάνειας	200 µg/mL anti-PCT mAb, phosphate buffer 50 mM, pH 7.4, ολονύχτια επώαση
Αποκλεισμός επιφάνειας	1% (w/v) BSA, NaHCO ₃ 0.1 M, pH 8.5, επώαση 2 h
Έκπλυση	Tris-HCl 10 mM, pH 8.5, απεσταγμένο H ₂ O, ξήρανση με N ₂
Ανάλυση	Πρότυπο διάλυμα PCT / δείγμα ορού, Tris-HCl 50 mM, pH 7.8, 0.9% (w/v) NaCl, 0.5% (w/v) BSA, 0.05% (w/v) b-IgG, 30 µL/min, 7 min
	10 µg/mL βιοτινυλιωμένο anti-PCT mAb, Tris-HCl 50 mM, pH 7.8, 0.9% (w/v) NaCl, 0.5% (w/v) BSA, 0.05% (w/v) b-IgG, 30 µL/min, 7 min
	50 µg/mL στρεπταβιδίνη, Tris-HCl 50 mM, pH 7.8, 0.9% (w/v) NaCl, 0.5% (w/v) BSA, 0.05% (w/v) b-IgG, 30 µL/min, 4 min



Εικόνα 4: Τυπική πρότυπη καμπύλη PCT. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 4 μετρήσεων ± SD.

Το όριο ανίχνευσης της PCT, υπολογιζόμενο ως η τιμή που αντιστοιχεί σε σήμα ίσο με 5SD 20 επαναληπτικών μετρήσεων του μηδενικού προτύπου προσδιορίστηκε στα 0.2 ng/mL, ενώ η δυναμική περιοχή εκτείνεται από 0.5 – 250 ng/mL. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από υψηλή επαναληψιμότητα καθώς οι συντελεστές διακύμανσης εντός του ίδιου και μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών κυμαίνονταν από 2.3-6.5 και 3.8-8.6%, αντίστοιχα. Η ακρίβεια της μεθόδου αξιολογήθηκε με πειράματα γραμμικότητας αραίωσης καθώς και ανάκτησης προσθέτοντας γνωστή ποσότητα PCT σε δείγματα ορού που περιείχαν μη ανιχνεύσιμες με τη μέθοδο συγκεντρώσεις. Οι τιμές ανάκτησης κυμαίνονταν από 82 έως 108%, καταδεικνύοντας την ακρίβεια των προσδιορισμών. Επίσης οι τιμές που προσδιορίστηκαν με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα σε μικρό αριθμό δειγμάτων ασθενών ήταν σε καλή συμφωνία με τις τιμές που προσδιορίστηκαν για τα ίδια δείγματα με τον κλινικό αναλυτή KRYPTOR (Thermo Scientific BRAHMS).

Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι

Στην παρούσα εργασία, αναπτύχθηκε ανοσοχημική μέθοδος για τον ταχύ προσδιορισμό της PCT με οπτικό βιοαισθητήρα WLRS. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από σύντομο χρόνο ανάλυσης (20 min) και ικανοποιητική ευαισθησία ανίχνευσης (LOD 0.2 ng/mL PCT), που επιτρέπει την ανάλυση δειγμάτων κλινικού ενδιαφέροντος. Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου, σε συνδυασμό με το χαμηλό κόστος της οργανολογίας του αισθητήρα και των αναλωσίμων, καθιστούν τη μέθοδο κατάλληλη για εφαρμογή στο σημείο φροντίδας του ασθενούς. Μελλοντικά, ο προσδιορισμός της PCT θα συνδυαστεί με τον προσδιορισμό δύο ακόμα βιοδεικτών για τη σήψη, της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) και της ιντερλευκίνης-6 (IL-6), ώστε να αναπτυχθεί ένα ολοκληρωμένο μικροσύστημα βασισμένο στο WLRS για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των τριών αυτών αναλυτών με στόχο την ταχεία διάγνωση της σήψης στο σημείο φροντίδας του ασθενούς.

Βιβλιογραφία

1. Singer M., et al, JAMA, 315 (2016), 801-810
2. Fleischmann C. et al, Am J Respir Crit Care Med, 193 (3) , (2016), 259-272
3. Minasyan H., Journal of Critical Care, 40 (2017), 229–242
4. Napolitano L.M., Surgical Infections, 19 (2) (2018), 117-125
5. Kumar R., Chaudhari D., Kumar R., Apollo medicine, 12 (2015), 239-242
6. Chun K. et al, Journal of Laboratory Automation, 20 (5) (2015), 539–561
7. Riedel S., Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 73 (2012), 221–227
8. Vijayan A. et al, Journal of Intensive Care, 5:51 (2017)
9. Koukouvinos G. et al, Talanta 175 (2017) 443–450
10. Tsonidi D. et al, Sensors & Actuators: B. Chemical 282 (2019) 104–111

Ευχαριστίες

Η Δ. Τσουνίδη χρηματοδοτείται από το Πρόγραμμα Βιομηχανικών Υποτροφιών Υποψηφίων Διδακτόρων του Ιδρύματος Σταύρος Νιάρχος και του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής μέρος της οποίας αποτελεί η παρούσα εργασία. Η παρούσα εργασία χρηματοδοτείται από τη Δράση «ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ» με συγχρηματοδότηση από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και τους εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑΝΕΚ) (Κωδικός έργου: Τ1ΕΔΚ-00101 «ΜΙΚΡΟΔΙΑΓΝΩΣΗ»). Θερμές ευχαριστίες στον Δρ. Ι. Παπασωτηρίου, Διευθυντή του Βιοχημικού τμήματος του Γενικού Νοσοκομείου Παιδών «Η Αγία Σοφία» για την παροχή ανώνυμων δειγμάτων ορού.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΣΗΜΕΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ (SNPS) ΣΤΑ *ARMS2* ΚΑΙ *CFH* ΓΟΝΙΔΙΑ -ΠΟΥ ΕΝΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑΚΗ ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΤΗΣ ΩΧΡΑΣ ΚΗΛΙΔΑΣ-, ΜΕ ΤΗ ΝΟΣΟ ALZHEIMER'S

Σιμούδης Αμίλιος¹, Παπαστεφανοπούλου Βίκυ^{1,2}, Χαρωνίτη Ειρήνη¹, Παπαδοπούλου Μίρκα¹, Στανίτσα Ευαγγελία², Παπατριανταφύλλου Ιωάννης², Παπαγεωργίου Σωκράτης², Κρούπης Χρήστος¹,

¹Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας, Αττικόν Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

²Μονάδα Νοητικών Διαταραχών/Ανοιας, Β' Νευρολογική Πανεπιστημιακή Κλινική, Αττικόν Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εισαγωγή: Η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας (HEΩΚ) αποτελεί εκφυλιστική νόσο του οφθαλμού, που εκδηλώνεται μετά την ηλικία των 65 ετών και μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική απώλεια της κεντρικής όρασης. Η κατάσταση είναι κυρίως αμφοτερόπλευρη και αποτελεί την πρώτη σε συχνότητα αιτία μη-αναστρέψιμης τύφλωσης σε πολλές αναπτυγμένες χώρες και την τρίτη αιτία τύφλωσης συνολικά παγκοσμίως [1]. Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου είναι η ηλικία, το χαμηλό μορφωτικό επίπεδο, το φύλο -με τον γυναικείο πληθυσμό να υπερτερεί στη συχνότητα εμφάνισης της νόσου- καθώς και η φυλή. Τέλος, μελέτες κατέδειξαν το κάπνισμα ως παράμετρο αυξημένου κινδύνου κατά 2-3 φορές [2-5].

Πλέον έχει αποδειχθεί ότι σημαντικό ρόλο στην HEΩΚ παίζουν τα γονίδια. Ισχυρή συσχέτιση με τη νόσο έχει διαπιστωθεί στους Καυκάσιους για το σημειακό πολυμορφισμό (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) A69S (rs10490924) του γονιδίου *ARMS2* καθώς ο πολυμορφισμός αυτός ενέχεται στην εξαρτώμενη από το οξειδωτικό stress βλάβη των φωτοϋποδοχέων του αμφιβληστροειδούς [6]. Η αντικατάσταση μιας γουανίνης σε θυμίνη οδηγεί στην αλλαγή μιας αλανίνης σε σερίνη στη θέση 69 της πρωτεΐνης. Μια μετα-ανάλυση κατέδειξε 7,5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εκδήλωσης της HEΩΚ στους ομοζυγώτες του αλληλίου κινδύνου και 2,4 φορές στους ετεροζυγώτες [7]. Επίσης, ισχυρή συσχέτιση με τη νόσο έχει διαπιστωθεί για το SNP Y402H (rs1061170) στο γονίδιο του παράγοντα H του συμπληρώματος (*CFH*, *Complement Factor H*) που συμμετέχει στη φυσική ανοσία. Πρόκειται για μια αντικατάσταση μιας κυτοσίνης σε θυμίνη που έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή μιας τυροσίνης σε μια ιστιδίνη. Σύμφωνα με μια μετα-ανάλυση ο κίνδυνος εκδήλωσης του κινδύνου φθάνει στο 2,5 για τους ετεροζυγώτες και 6,3 για τους ομοζυγώτες μεταλλαγμένους [8]. Τα δύο αυτά SNPs εξηγούν το 25% περίπου των περιπτώσεων HEΩΚ [9,10].

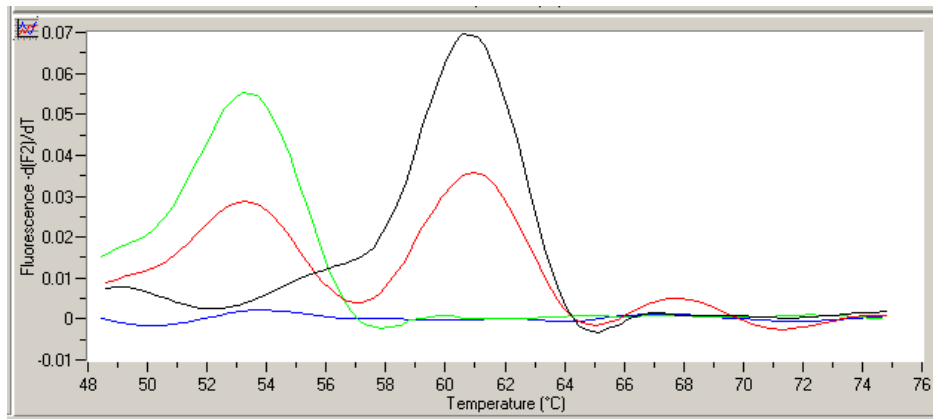
Τελευταία στη βιβλιογραφία αναφέρεται επισταμένα σχέση μεταξύ της HEΩΚ και της νόσου Alzheimer καθώς υπάρχουν πολλοί κοινοί μηχανισμοί που ενέχονται και στα δύο αυτά νευροεκφυλιστικά νοσήματα του εγκεφάλου. Και οι δύο νόσοι εμφανίζουν οξειδωτικό στρες και χαρακτηρίζονται από ανώμαλη εναπόθεση εξωκυττάρων ουσιών: drusen στην HEΩΚ και πλάκες αμυλοειδούς-β (Aβ) στη νόσο Alzheimer. Στις εναποθέσεις drusen της HEΩΚ ανιχνεύεται υψηλό ποσοστό Aβ μαζί με πρωτεΐνες του συμπληρώματος και απολιποπρωτεΐνη E, συστατικά παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται στις πλάκες αμυλοειδούς στη νόσο Alzheimer. Μάλιστα, πιθανολογείται η δυνατότητα πρόωμης πρόβλεψης ή διάγνωσης της γνωσιακής εκφύλισης του εγκεφάλου και της νόσου Alzheimer μέσω χρήσης μιας αναίμακτης απεικονιστικής μεθόδου, της οπτικής τομογραφίας συνοχής (OCT) στον αμφιβληστροειδή [11-16].

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης μεταξύ της HEΩΚ και της νόσου Alzheimer μέσα από την ανάλυση των δύο προαναφερθέντων SNPs [1,10].

Υλικά και μέθοδοι: Συλλέχθηκε περιφερικό αίμα από διαδοχικά προσερχόμενους ασθενείς της νόσου Alzheimer στη Μονάδα Νοητικών Διαταραχών/Ανοιας της Β' Νευρολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «Αττικόν», καθώς και τους υγιείς συνοδούς τους ύστερα από ενημέρωση και ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους. Στους ασθενείς έγινε πλήρης νευρολογικός και νευροψυχολογικός έλεγχος. Συμμετείχαν 38 υγιή άτομα (ηλικίας 57,39±4,59)

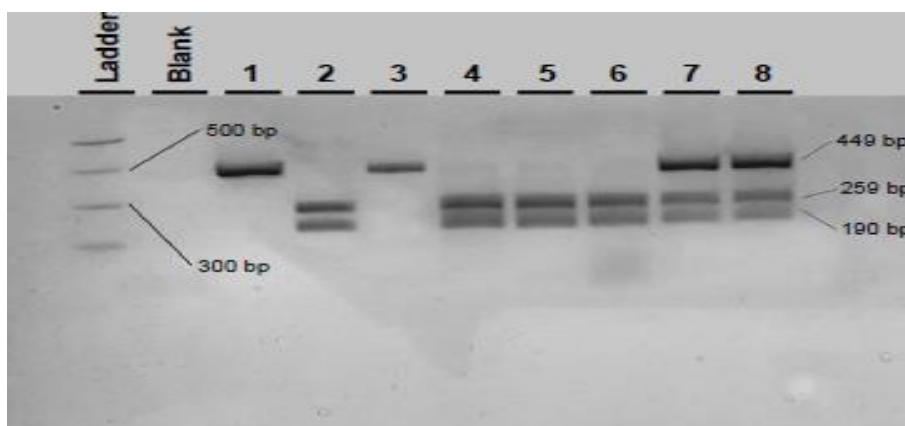
και 120 ασθενείς νόσου Alzheimer ($72,90 \pm 7,77$). Η απομόνωση του DNA έγινε με High Pure PCR Template Kit (Roche) στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του Νοσοκομείου.

Η CFH γονοτύπηση εκτελέστηκε με real-time qPCR-melting curve analysis που έχει αναπτυχθεί από την ερευνητική μας ομάδα στη πλατφόρμα LightCycler (Roche) [1]. Για την μέθοδο αυτή, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές CFH-F1 (5'ACATGCTAGGATTCAGAGTAGT 3', πρόσθιος εκκινητής) και CFH-A (5'TTATTTATTTATCATTGTTATGGTCC3', ανάστροφος εκκινητής), οι φθορίζοντες ανιχνευτές (probes) CFH-FL (5'ACATGCTAGGATTCAGAGTAGT 3') και CFH-LC (640-CAGGGTAAATCTATAGACGTTGCCTGCCp), καθώς και πολυμεράση LightCycler® FastStart DNA Master (Roche).



Εικόνα 2. Αποτελέσματα γονοτύπησης του CFH η οποία εκτελέστηκε με real time qPCR-melting curve analysis στην πλατφόρμα LightCycler (Roche). Η πράσινη καμπύλη τήξεως απεικονίζει φυσιολογικό δείγμα (TT), η κόκκινη δείχνει ετεροζυγώτη (TC) και η μαύρη μεταλλαγμένο ομοζυγώτη (CC) [6].

Η ARMS2 γονοτύπηση έγινε με PCR-RFLP μέθοδο [6]. Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές LOCF (5'-CAATGGTAGCCAGGACCCAT-3', πρόσθιος εκκινητής) και LOCR (5'-ATCCGTTAAGTCGGAAGGAG-3', ανάστροφος εκκινητής), καθώς και η πολυμεράση GoTaq® G2 Green Master Mix, 2X (Promega). Για την ενζυμική πέψη των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο PvuII (Fermentas) και το buffer του, Buffer G (Thermo Scientific).



Εικόνα 1. Αποτελέσματα γονοτύπησης του ARMS2 A69S PCR-RFLP μετά από ενζυμική πέψη και ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης. Στις δύο πρώτες θέσεις, απεικονίζονται δείκτης M.B. (NEB PCR marker) και το τυφλό δείγμα (blank). Στις θέσεις 2 και 4-6 απεικονίζονται φυσιολογικά δείγματα (GG γονότυπος). Στις θέσεις 7 και 8 φαίνονται ετερόζυγα δείγματα (GT). Στις θέσεις 1 και 3 φαίνονται τα ομόζυγα μεταλλαγμένα δείγματα (TT). Συντομεύσεις: PCR, polymerase chain reaction; RFLP, restriction fragment length polymorphism; M.B, μοριακό βάρος (προσαρμοσμένο από [1]).

Αποτελέσματα: Τα αποτελέσματα των γονοτυπίσεων εισήχθησαν στο στατιστικό πρόγραμμα SNPstats όπου αφού

ελέγχθηκε η ισορροπία Hardy-Weinberg ($p > 0,05$), καταγράφηκαν οι γονότυποι και οι συχνότητες τους και στα δύο γονίδια (Πίνακες 1 και 2, οι υγιείς αποτελούν την ομάδα 0-control και οι ασθενείς την ομάδα 1-case). Δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στις κατανομές των γονοτύπων μεταξύ των υγιών και ασθενών και δεν ανιχνεύθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε κανένα προτεινόμενο μοντέλο κληρονομησης ούτε με το CFH γονίδιο [Odds Ratio=0,90 για το αθροιστικό log-additive μοντέλο (95%C.I.=1,54-1,49), $p=0,68$] ούτε με το ARMS2 γονίδιο [OR=1,29 (0,60-2,77), $p=0,5$].

Πίνακας 1. SNPStats ανάλυση για τη συσχέτιση του ARMS2 πολυμορφισμού με τη νόσο Alzheimer.

X..RMS2 association with response Diagnosis (n=158, crude analysis)							
Model	Genotype	Diagnosis=0-control	Diagnosis=1-case	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	G/G	28 (73.7%)	84 (70%)	1.00	0.42	178.6	187.8
	G/T	10 (26.3%)	33 (27.5%)	1.10 (0.48-2.51)			
	T/T	0 (0%)	3 (2.5%)	NA (0.00-NA)			
Dominant	G/G	28 (73.7%)	84 (70%)	1.00	0.66	178.1	184.3
	G/T-T/T	10 (26.3%)	36 (30%)	1.20 (0.53-2.73)			
Recessive	G/G-G/T	38 (100%)	117 (97.5%)	1.00	0.2	176.7	182.8
	T/T	0 (0%)	3 (2.5%)	NA (0.00-NA)			
Overdominant	G/G-T/T	28 (73.7%)	87 (72.5%)	1.00	0.89	178.3	184.4
	G/T	10 (26.3%)	33 (27.5%)	1.06 (0.47-2.43)			
Log-additive	---	---	---	1.29 (0.60-2.77)	0.5	177.9	184

Πίνακας 2. SNPStats ανάλυση για τη συσχέτιση του CFH πολυμορφισμού με τη νόσο Alzheimer.

CFH association with response Diagnosis (n=158, crude analysis)							
Model	Genotype	Diagnosis=0-control	Diagnosis=1-case	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	T/T	17 (44.7%)	51 (42.5%)	1.00	0.41	178.5	187.7
	T/C	13 (34.2%)	53 (44.2%)	1.36 (0.60-3.08)			
	C/C	8 (21.1%)	16 (13.3%)	0.67 (0.24-1.83)			
Dominant	T/T	17 (44.7%)	51 (42.5%)	1.00	0.81	178.3	184.4
	T/C-C/C	21 (55.3%)	69 (57.5%)	1.10 (0.53-2.28)			
Recessive	T/T-T/C	30 (79%)	104 (86.7%)	1.00	0.26	177.1	183.2
	C/C	8 (21.1%)	16 (13.3%)	0.58 (0.23-1.48)			
Overdominant	T/T-C/C	25 (65.8%)	67 (55.8%)	1.00	0.27	177.1	183.3
	T/C	13 (34.2%)	53 (44.2%)	1.52 (0.71-3.26)			
Log-additive	---	---	---	0.90 (0.54-1.49)	0.68	178.2	184.3

Συμπεράσματα:

Στη πιλοτική μελέτη μας δεν διαφάνηκε δυνατότητα χρήσης των δύο κύριων πολυμορφισμών της HEΩK (CFH και ARMS2) για τη μελέτη της νόσου Alzheimer. Ίσως αυτή η υπόθεση εργασίας να πρέπει να διευρυνθεί στο μέλλον σε υποομάδες της νόσου καθώς και σε άλλους γενετικούς βιοδείκτες (μεταλλάξεις ή πολυμορφισμούς) σε γονίδια που ενέχονται σε κοινούς μηχανισμούς παθογένειας και στα δύο νοσήματα.

Η πρώιμη διάγνωση τόσο της ηλιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας όσο και της νόσου Alzheimer αποτελούν επιτακτική ανάγκη καθώς και τα δύο νοσήματα συνιστούν ένα διογκούμενο πρόβλημα υγείας με τεράστιο οικονομικό και κοινωνικό βάρος στις αναπτυσσόμενες χώρες οι οποίες διαθέτουν υψηλό βιοτικό επίπεδο και προσδόκιμο χρόνο ζωής.

Βιβλιογραφία:

1. Velissari, A., Skalidakis, I., Oliveira, S. C., Koutsandrea, C., Kitsos, G., Petersen, M. B., & Kroupis, C. (2015). Novel association of FCGR2A polymorphism with age-related macular degeneration (AMD) and development of a novel CFH real-time genotyping method. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 53, 1521-1529.
2. Resnikoff, S., Pascolini, D., Etya'Ale, D., Kocur, I., Pararajasegaram, R., Pokharel, G. P., & Mariotti, S. P. (2004). Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the world health organization*, 82, 844-851.

3. Van Leeuwen, R., Klaver, C. C., Vingerling, J. R., Hofman, A., & de Jong, P. T. (2003). Epidemiology of age-related maculopathy: a review. *European journal of epidemiology*, 18(9), 845-854.
4. Thornton, J., Edwards, R., Mitchell, P., Harrison, R. A., Buchan, I., & Kelly, S. P. (2005). Smoking and age-related macular degeneration: a review of association. *Eye*, 19(9), 935-944.
5. Bressler, S. B., Munoz, B., Solomon, S. D., & West, S. K. (2008). Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Salisbury Eye Evaluation (SEE) Project. *Archives of ophthalmology*, 126(2), 241-245.
6. Sarli, A., Skalidakis, I., Velissari, A., Koutsandrea, C., Stefaniotou, M., Petersen, M. B., Kroupis, C., Kitsos, G. & Moschos, M. M. (2017). Investigation of associations of ARMS2, CD14, and TLR4 gene polymorphisms with wet age-related macular degeneration in a Greek population. *Clinical ophthalmology*, 11, 1347-1358.
7. Tong, Y., Liao, J., Zhang, Y., Zhou, J., Zhang, H., & Mao, M. (2010). LOC387715/HTRA1 gene polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis. *Molecular vision*, 16, 1958.
8. Donoso, L. A., Vrabec, T., & Kuivaniemi, H. (2010). The role of complement Factor H in age-related macular degeneration: a review. *Survey of ophthalmology*, 55(3), 227-246.
9. Fritsche, L. G., Fariss, R. N., Stambolian, D., *et al* (2014). Age-related macular degeneration: genetics and biology coming together. *Annual review of genomics and human genetics*, 15, 151-171.
10. C. Kroupis, G. Kitsos, M.M. Moschos and M.B. Petersen. "Biomarkers in age-related macular degeneration" *Clinical Laboratory International*, **42**, 13-17
11. Lukiw, W. J., & Alexandrov, P. N. (2012). Regulation of complement factor H (CFH) by multiple miRNAs in Alzheimer's disease (AD) brain. *Molecular neurobiology*, 46, 11-19.
12. Zhang, D. F., Li, J., Wu, H., *et al* (2016). CFH variants affect structural and functional brain changes and genetic risk of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology*, 41, 1034-1045.
13. Logue, M. W., Schu, M., Vardarajan, B. N., *et al* (2014). A search for age-related macular degeneration risk variants in Alzheimer disease genes and pathways. *Neurobiology of aging*, 35, 1510-e7.
14. Proitsi, P., Lupton, M. K., Dudbridge, F., *et al* (2012). Alzheimer's disease and age-related macular degeneration have different genetic models for complement gene variation. *Neurobiology of aging*, 3, 1843-e9.
15. Zetterberg, M., Landgren, S., Andersson, M. E., *et al* (2008). Association of complement factor H Y402H gene polymorphism with Alzheimer's disease. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 147, 720-726.
16. Le Fur, I., Laumet, G., Richard, F., *et al* (2010). Association study of the CFH Y402H polymorphism with Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 31, 165-166.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *HTR2A* ΚΑΙ *DRD2* ΩΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗΝ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΧΙΖΟΦΡΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΑΙΣΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΨΥΧΩΣΕΩΝ ΣΕ ΚΑΥΚΑΣΙΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ

Ζωή Κορδού¹, Γεώργιος Π. Πατρινός^{1,2,3}, Ευαγγελία-Ειρήνη Τσερμπίνι¹

¹Εργαστήριο Φαρμακογονιδιωματικής και Εξατομικευμένης Θεραπείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πάτρα

²Department of Pathology, College of Medicine and Health Sciences, United Arab Emirates University, Al-Ain, UAE

³Zayed Center of Health Science, United Arab Emirates University, Al-Ain, UAE

Η σχιζοφρένεια δεν εμφανίζεται σε συγκεκριμένες ομάδες πληθυσμών, αλλά έχει παρατηρηθεί σε όλες τις φυλές και τους πληθυσμούς [1] και έχει πιθανότητα εμφάνισης 1% στο γενικό πληθυσμό [2]. Η σχιζοφρένεια (SZ) αποτελεί μία σοβαρή ψυχιατρική διαταραχή, μακράς διάρκειας, που μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολές στην αντίληψη ενός ατόμου για την πραγματικότητα, καθώς επίσης σε μειωμένη λειτουργικότητα και γνωσιακή έκπτωση. Η σχιζοφρένεια εμφανίζεται κυρίως κατά την εφηβική ηλικία ή την πρώιμη ενήλικη ζωή [3],[4] με συμπτώματα τα οποία μπορεί να κατηγοριοποιηθούν σε: ψυχωσικά, θετικά, αρνητικά και αποδιοργανωτικά. Για την διάγνωση της σχιζοφρένειας λαμβάνεται υπόψιν και η λειτουργικότητα του ατόμου στην καθημερινότητα [2]. Τα θετικά συμπτώματα συμπεριλαμβάνουν τις διαταραχές σκέψης με κύριο το παραλήρημα, το οποίο επηρεάζει την επαφή με την πραγματικότητα, καθώς και τις αντιληπτικές διαταραχές με κύριο σύμπτωμα τις ψευδαισθήσεις. Τα αρνητικά συμπτώματα περιλαμβάνουν μειωμένη συναισθηματική έκφραση, ανηδονία, απάθεια και αλογία [5]. Τα γνωσιακά συμπτώματα περιλαμβάνουν προβλήματα στη συγκέντρωση, την προσοχή, τον προσανατολισμό, τη μάθηση και τη μνήμη, και πιο συγκεκριμένα, απροσεξία, διάσπαση, εύκολη εξάντληση, κ.ά. [2]. Τέλος, υπάρχουν τα αποδιοργανωτικά συμπτώματα, που εμφανίζονται πολύ νωρίτερα από τα συμπτώματα της ψύχωσης και αφορούν την μειωμένη ικανότητα συμμετοχής στον χώρο εργασίας, στο σχολείο ή σε οποιαδήποτε άλλη ομάδα, δυσκολία στις οικογενειακές ή φιλικές σχέσεις, στην φροντίδα του εαυτού, στην ποιοτική χρήση του ελεύθερου χρόνου, κ.ά. [2].

Σύμφωνα με ερευνητικές μελέτες, η ανάπτυξη της σχιζοφρένειας προϋποθέτει την ύπαρξη τόσο περιβαλλοντικών, όσο και γενετικών παραγόντων [6], [3]. Η θεραπεία της SZ επικεντρώνεται στην ανακούφιση των συμπτωμάτων και περιλαμβάνει την χορήγηση αντιψυχωτικών φαρμάκων, όπως για παράδειγμα η κλοζαπίνη και η ρισπεριδόνη. Η κλοζαπίνη χορηγείται ουσιαστικά σε δυο κατηγορίες ασθενών, στους ανθεκτικούς ασθενείς και στους ασθενείς με σχιζοσυναισθηματική διαταραχή, όπου δηλαδή η διαταραχή είναι επίμονη παρά την χρόνια χορήγηση άλλων αντιψυχωσικών φαρμάκων και στην περίπτωση που οι ασθενείς έχουν υψηλό ρίσκο απόπειρας αυτοκτονίας. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η κλοζαπίνη φαίνεται να έχει την ίδια αποτελεσματικότητα με την ρισπεριδόνη [7] ενώ είναι και τα δυο αποτελεσματικά σε ασθενείς με ανθεκτική σχιζοφρένεια [8], Ωστόσο, κάτι που είναι ιδιαίτερα σημαντικό, είναι το γεγονός ότι η ρισπεριδόνη, σε αντίθεση με την κλοζαπίνη, δεν εμφανίζει ακοκκιοκυτταραιμία, που είναι μια πολύ σοβαρή και συχνή ανεπιθύμητη ενέργεια [7]. Ωστόσο, μόνο το 70% των ασθενών σημειώνει ικανοποιητική βελτίωση των συμπτωμάτων.

Έτσι λοιπόν διαμορφώθηκε ο στόχος της παρούσας μελέτης και πραγματοποιήθηκε μία μετα-ανάλυση με σκοπό τον εντοπισμό γενετικών αλλαγών που σχετίζονται με την ανταπόκριση των ασθενών με σχιζοφρένεια που βρίσκονταν υπό την χορήγηση κλοζαπίνης ή ρισπεριδόνης οι οποίες γενετικές αλλαγές ενδεχομένως να οφείλονται στη μειωμένη ανταπόκριση στα φάρμακα. Η μετά ανάλυση συμπεριλάμβανε 49 μελέτες που αφορούσαν συνολικά 6.786 υγιή άτομα και 5.705 ασθενείς με σχιζοφρένεια. Τα άτομα αυτά ανήκαν στην Καυκάσια, την Ασιατική και την Αφρο-αμερικάνικη

φυλή και πιο συγκεκριμένα, ήταν Τούρκοι, Σουηδοί, Γερμανοί, Άγγλοι, Γάλλοι, Κροάτες, Ισπανοί, Σλοβένοι, Πακιστανοί, Ισραηλινοί, Ιάπωνες, Κορεάτες και Κινέζοι.

Τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης ανέδειξαν δύο γενετικές αλλαγές, μία στο γονίδιο του υποδοχέα της σεροτονίνης 2A (*HTR2A*), τον πολυμορφισμό rs6313, και μία στο γονίδιο του υποδοχέα της ντοπαμίνης D2 (*DRD2*), τον πολυμορφισμό rs9978, ως πιθανούς φαρμακογονιδιωματικούς βιοδείκτες για την θεραπεία της SZ με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά φάρμακα. Ο πολυμορφισμός rs6313, είναι σημειακή μετάλλαξη και βρίσκεται στον 1ο εσώνιο του γονιδίου *HTR2A*, στο χρωμόσωμα 13 και κωδικοποιεί τον υποδοχέα σεροτονίνης 5-HT_{2A}. Ο πολυμορφισμός rs9978 είναι επίσης σημειακή μετάλλαξη, που βρίσκεται στον 3ο εξώνιο του γονιδίου *DRD2* που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 και κωδικοποιεί τον υποδοχέα της ντοπαμίνης D2.

Όσον αφορά τον υποδοχέα 5-HT_{2A}, υπάρχουν 14 υπότυποι του οι οποίοι εντοπίζονται σε νευροανατομικές δομές του ΚΝΣ και θεωρείται πως σχετίζονται με την παθογένεια της σχιζοφρένειας. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό σχετίζονται με την εμφάνιση σχιζοφρένειας, κατάθλιψης και ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής (OCD) [9]. Για τον πολυμορφισμό rs6313, επίσης γνωστός ως T102C, υπάρχουν δύο αλληλόμορφα όπου στην ίδια θέση το ένα θα έχει βάση θυμίνης ενώ το άλλο κυτοσίνης. Το φυσιολογικό αλληλόμορφο έχει στη θέση 102 κυτοσίνη (C) ενώ το μεταλλαγμένο θυμίνη (T). Η συχνότητα εμφάνισης του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου είναι περίπου 40% τόσο στους Ευρωπαίους όσο και στον παγκόσμιο πληθυσμό ([NCBI](#)). Πρόκειται βέβαια για μία συνώνυμη μετάλλαξη, καθώς δεν αλλάζει η αμινοξική αλληλουχία[10].

Εν συνέχεια, ελέγχθηκαν οι συχνότητες των πολυμορφισμών αυτών σε τέσσερις διαφορετικούς Καυκάσιους πληθυσμούς οι οποίοι δεν έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν 513 ασθενείς με σχιζοφρένεια και 440 υγιή άτομα ελληνικής, σλοβενικής, ιταλικής και κροατικής προέλευσης. Για την γονοτύπηση χρησιμοποιήθηκε PCR-RFLP με το ένζυμο BspEI για τον rs6313 και Sanger-sequencing και SimpleProbe Analysis για τον rs9978.

Από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν αξιοσημείωτα είναι εκείνα που αφορούν στον Ελληνικό πληθυσμό όπου γονοτυπήθηκαν 101 ασθενείς με σχιζοφρένεια, εκ των οποίων οι 48 είχαν ανθεκτική μορφή σχιζοφρένειας και οι 53 ανταποκρίνονταν σε αγωγή με αντιψυχωσικά φάρμακα, καθώς και 141 υγιή άτομα. Επιπλέον γονοτυπική σύγκριση πραγματοποιήθηκε και ανάμεσα στους ασθενείς που δεν ανταποκρίνονταν στην αγωγή με αντιψυχωσικά φάρμακα (σύνολο 48 ασθενείς) και εκείνους που ανταποκρίνονταν (σύνολο 53 ασθενείς).

Έπειτα για να ελεγχθεί πιθανή σχέση μεταξύ του rs6313 και της ανταπόκρισης ή μη στην φαρμακευτική αγωγή με αντιψυχωσικά φάρμακα, εφαρμόστηκε το κριτήριο χ^2 . Η τιμή p_{value} που λήφθηκε από την σύγκριση των γονοτύπων μεταξύ των ασθενών με ανθεκτική σχιζοφρένεια και της ομάδας αναφοράς, ήταν 0,554327, τιμή που δεν υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά και άρα ο πολυμορφισμός δεν σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στα αντιψυχωσικά φάρμακα. Ωστόσο, στην περίπτωση της σύγκρισης μεταξύ των ανταποκρινόμενων ασθενών και της ομάδας αναφοράς το p_{value} βρέθηκε ίσο με 0,001756, γεγονός που υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά. Τέλος, στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε από την σύγκριση των γονοτύπων μεταξύ των ασθενών με ανθεκτική σχιζοφρένεια και των ανταποκρινόμενων ασθενών, καθώς η τιμή του p_{value} ήταν ίση με 0,000747.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, παρά το μικρό δείγμα ασθενών (50 ασθενείς), φαίνεται να αναδεικνύεται ο πολυμορφισμός rs6313 ως υποψήφιος φαρμακογονιδιωματικός βιοδείκτης για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία της σχιζοφρένειας με την ρισπεριδόνη στον ελληνικό πληθυσμό, γεγονός που θα παρέχει αποτελεσματικότερη και ασφαλέστερη θεραπεία, καθώς και καλύτερη ποιότητα ζωής στους ασθενείς.

Βιβλιογραφία

1. Szkulcka-Dębek M, Walczak J, Augustyńska J, *et al.* Epidemiology and Treatment Guidelines of Negative Symptoms in Schizo-phrenia in Central and Eastern Europe: A Literature Review. *Clin. Pract. Epidemiol. Ment. Heal.* [Internet]. 11(1), 158–165 (2015). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26535049>.
2. Mueser KT, McGurk SR. Schizophrenia. *Lancet* [Internet]. 363(9426), 2063–2072 (2004). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15207959>.
3. Sullivan PF. The genetics of schizophrenia. *PLoS Med.* [Internet]. 2(7), e212 (2005). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16033310>.
4. Gejman P V., Sanders AR, Duan J. The Role of Genetics in the Etiology of Schizophrenia. *Psychiatr. Clin. North Am.* [Internet]. 33(1), 35–66 (2010). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20159339>.
5. Schultz SK, Andreasen NC. Schizophrenia. *Lancet (London, England)* [Internet]. 353(9162), 1425–30 (1999). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10227239>.
6. Tiwari AK, Zai CC, Müller DJ, Kennedy JL. Genetics in schizophrenia: where are we and what next? *Dialogues Clin. Neurosci.* [Internet]. 12(3), 289–303 (2010). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20954426>.
7. KLIESER E, LEHMANN E, KINZLER E, WURTHMANN C, HEINRICH K. Randomized, Double-Blind, Controlled Trial of Risperidone Versus Clozapine in Patients With Chronic Schizophrenia. *J. Clin. Psychopharmacol.* [Internet]. 15(1 Suppl 1), 45S-51S (1995). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7537287>.
8. Bondolfi G, Dufour H, Patris M, *et al.* Risperidone Versus Clozapine in Treatment-Resistant Chronic Schizophrenia: A Randomized Double-Blind Study [Internet]. . Available from: <https://ajp.psychiatryonline.org/doi/pdf/10.1176/ajp.155.4.499>.
9. O’Donovan M. Novel genetic advances in schizophrenia: an interview with Michael O’Donovan. *BMC Med.* [Internet]. 13(1), 181 (2015). Available from: <https://bmcmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-015-0417-1>.
10. Cieślińska A, Fiedorowicz E, Jarmołowska B, *et al.* Polymorphisms rs6313 and rs6314 in Serotonin Receptor Gene (HTR2A) and Serotonin Concentration in Autistic Children. *Neuropsychiatry (London)*. [Internet]. (1), 2021–2028 (2019). Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/8dc6/2adcc1d12812e4d19a0dc881810e97023dce.pdf>.

BCLF / BSCL 2020 MEETING

Cancelled/ Postponed for the next year



Dear BCLF Members, Dear BSCL Members, Congress Attendees, Speakers, and Industry Partners,

On behalf of the Local Organizing Committee for the **BCLF/BSCL 2020 Meeting**, we regret to inform you that the Meeting has been cancelled due to the COVID pandemic. Our primary concern for the health of all congress participants was paramount in this decision. We apologize for any inconvenience caused by the cancellation.

Plans are being considered at this time for the Meeting to be rescheduled for Q1-Q2, 2021, again in Sofia, Bulgaria. We envision that mid-April would be the most appropriate time period, having in mind the other international congress activities. Herewith, we ask for the agreement of the BCLF President, BCLF Board, National representatives and Presidents of all Member Societies, to proceed further with the organization.

The Organizing Committee will be contacting everyone, as soon as we receive the agreement and fix the dates for the Meeting in 2021.

The Abstracts already submitted, should be considered released, to allow you to submit them to another conference in the future. Alternatively, submitted abstracts that are not withdrawn could be saved for participation in the Meeting next year, after confirmation by authors.

We sincerely hope all of you stay healthy and safe and look forward to meeting you again in Sofia, in the not so distant future.

On behalf of the Local Organizing Committee, with best personal regards,

Professor Dr. Dobrin A. Svinarov, MD, Ph.D., Dr. Med. Sc.

Head, Clinical Laboratory & Clinical Pharmacology Chairman,

Department of Clinical Laboratory

President, Bulgarian Society of Clinical Laboratory

Alexander University Hospital, Faculty of Medicine

Medical University of Sofia, St. G. Sofiiski 1 Blvd., 1431 Sofia, Bulgaria

E-mail: dsvinarov@yahoo.com



United Nations

5 Ιουνίου
Παγκόσμια Ημέρα Περιβάλλοντος
Η Γη, το κοινό μας σπίτι



Time for nature

The foods we eat, the air we breathe, the water we drink and the climate that makes our planet habitable all come from nature. For instance, each year, marine plants produce more than a half of our atmosphere's oxygen, and a mature tree cleans our air, absorbing 22 kilos of carbon dioxide, releasing oxygen in exchange. Despite all the benefits that our nature give us, we still mistreat it. That is why we need to work on that. That is why we need this Observance.

World Environment Day, hosted by Colombia this 2020, is the most renowned day for environmental action. Since 1974, it has been celebrated every year on 5 June: engaging governments, businesses, celebrities and citizens to focus their efforts on a pressing environmental issue.

This year, the **theme is biodiversity** – a concern that is both urgent and existential. Recent events, from bushfires in Brazil, the United States, and Australia to locust infestations across East Africa – and now, a global disease pandemic – demonstrate the interdependence of humans and the webs of life, in which they exist.

But, do we really know its importance? Maybe our biodiversity trivial will help.



Πως να ζωγραφίσετε ένα πουλί

(Pour faire le portrait d'un oiseau, "Paroles", 1945).

Jacques Prévert (1900 - 1977)

Ζωγραφίστε πρώτα ένα κλουβί	Peindre d'abord une cage
με μια πόρτα ανοιχτή, ζωγραφίστε μετά	avec une porte ouverte, peindre
κάτι όμορφο, κάτι απλό	ensuite
κάτι ωραίο, κάτι χρήσιμο για το πουλί	quelque chose de joli
Βάλτε έπειτα το μουσαμά επάνω σ' ένα	quelque chose de simple
δέντρο	quelque chose de beau
σ' ένα κήπο, σ' ένα άλσος	quelque chose d'utile pour l'oiseau
ή σ' ένα δάσος	Placer ensuite la toile contre un arbre
Κρυφτείτε πίσω από το δέντρο	dans un jardin, dans un bois
αμίλητοι, ακίνητοι...	ou dans une forêt
Μερικές φορές το πουλί έρχεται γρήγορα	Se cacher derrière l'arbre
αλλά μπορεί και να αργήσει πολύ	sans rien dire, sans bouger...
πριν το αποφασίσει	Parfois l'oiseau arrive vite
Μην απογοητευτείτε, περιμένετε,	mais il peut aussi bien mettre
περιμένετε αν χρειαστεί, χρόνια	de longues années avant de se décider
ολόκληρα	Ne pas se décourager, attendre,
Αν το πουλί έρθει γρήγορα ή πιο μετά	attendre s'il le faut pendant des
δεν έχει καμιά σχέση με την επιτυχία του	années la vitesse ou la lenteur de
πίνακα	l'arrivée de l'oiseau n'ayant aucun
Όταν έρθει το πουλί	rapport avec la réussite du tableau
αν έρθει	Quand l'oiseau arrive
μείνετε τελείως σιωπηλός	s'il arrive
περιμένετε να μπει το πουλί στο κλουβί	observer le plus profond silence
κι όταν μπει,	attendre que l'oiseau entre dans la
κλείστε απαλά την πόρτα με το πινέλο	cage et quand il est entré
μετά σβήστε ένα-ένα όλα τα κάγκελα	fermer doucement

προσέχοντας να μην αγγίξετε καθόλου τα φτερά του πουλιού
Ζωγραφίστε κατόπιν το δέντρο διαλέγοντας το πιο ωραίο κλαδί για το πουλί
ζωγραφίστε ακόμη το πράσινο φύλλωμα και τη δροσιά του ανέμου τη σκόνη που φαίνεται στον ήλιο τον ήχο των ζώων πάνω στο χορτάρι μέσα στην κάψα του καλοκαιριού και μετά περιμένετε το πουλί να αποφασίσει να κελαηδήσει
Αν το πουλί δεν τραγουδά είναι κακό σημάδι σημαίνει, πως ο πίνακας είναι κακός, αλλά αν τραγουδά είναι καλό σημάδι σημαίνει, πως μπορείτε να υπογράψετε
Λοιπόν τραβάτε πολύ απαλά ένα φτερό απ' το πουλί και γράφετε τ' όνομά σας σε μια γωνιά του πίνακα.



la porte avec le pinceau, puis effacer un à un les barreaux en ayant soin de ne toucher aucune des plumes de l'oiseau
Faire ensuite le portrait de l'arbre en choisissant la plus belle de ses branches pour l'oiseau
peindre aussi le vert feuillage et la fraîcheur du vent la poussière du soleil et le bruit des bêtes de l'herbe dans la chaleur de l'été et puis attendre que l'oiseau se décide à chanter
Si l'oiseau ne chante pas c'est mauvais signe, signe que le tableau est mauvais, mais s'il chante c'est bon signe, signe que vous pouvez signer
Alors vous arrachez tout doucement une des plumes de l'oiseau et vous écrivez votre nom dans un coin du tableau.