

## ΝΕΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΑ ΚΑΙ ΝΕΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΑΣ ΣΥΡΡΙΚΝΩΝΟΥΝ ΤΗΝ «ΟΡΟΑΡΝΗΤΙΚΗ» ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΑ

Σωκράτης Τζάρτος\*

Τμήμα Νευροβιολογίας Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, Τμήμα Φαρμακευτικής Πανεπιστημίου Πατρών

### Περίληψη

Η μυασθένεια (Myasthenia Gravis) είναι μια αυτοάνοση νόσος που οφείλεται κυρίως σε μείωση των λειτουργικών νικοτινικών υποδοχέων ακετυλοχολίνης (AChRs) στη νευρομυϊκή σύναψη με συνέπεια τη διαταραχή της μυϊκής συστολής. Η μείωση αυτή οφείλεται συνήθως σε αυτοαντισώματα κατά του AChR ή κατά πρωτεϊνών της σύναψης απαραίτητων για τη λειτουργία του AChR. Αυτές είναι κυρίως οι MuSK και LRP4 της μετασυναπτικής μεμβράνης και η αγρίνη που εκκρίνεται από τη νευρική απόληξη. Η αγρίνη προσδένεται στην LRP4 και το σύμπλοκο LRP4-αγρίνη προσδένεται και ενεργοποιεί την MuSK. Η ενεργοποιημένη MuSK προκαλεί, μέσω άλλων πρωτεϊνών, τη συσσωμάτωση των AChRs στη μετασυναπτική μεμβράνη, απαραίτητη για την λειτουργία τους.

Ένα πολύτιμο εργαλείο στη διάγνωση της μυασθένειας είναι η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων έναντι των παραπάνω πρωτεϊνών στον ορό του ασθενούς. Στο ~80% των μυασθενών ανιχνεύονται αντι-AChR αυτοαντισώματα ενώ στο 20-40% των υπόλοιπων ανιχνεύονται αντι-MuSK αυτοαντισώματα. Τα συμπτώματα των «MuSK-ασθενών» συχνά διαφέρουν από αυτά των «AChR-ασθενών» και η συνιστώμενη θεραπεία διαφέρει σημαντικά.

Αν και αρκετοί μυασθενείς παραμένουν μέχρι σήμερα «οροαρνητικοί», πρόσφατα έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος προς τη μείωση της «οροαρνητικής» μυασθένειας. Με νέες τεχνικές (κυτταρικός ανοσοπροσδιορισμός) ανιχνεύονται σήμερα αντι-AChR και αντι-MuSK αντισώματα, μη ανιχνεύσιμα με τις κλασικές τεχνικές. Επίσης, την τελευταία διετία δείξαμε ότι ~19% των «οροαρνητικών» έχουν αντι-LRP4 αντισώματα. Η έναρξη της νόσου στους «LRP4-ασθενείς» συνήθως είναι ηπιότερη από τις άλλες δύο ομάδες, αλλά σε διπλά θετικούς τα συμπτώματα είναι πολύ βαρύτερα. Τα αντι-AChR, αντι-MuSK και αντι-LRP4 αντισώματα προκαλούν πειραματική μυασθένεια σε πειραματόζωα. Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν σε μερικού μυασθενείς αντισώματα και έναντι άλλων πρωτεϊνών της σύναψης, όπως τα αντι-αγρίνη αντισώματα. Τέλος με μία νέα τεχνική ανιχνεύουμε αντισώματα κατά της τιτίνης (πρωτεΐνη του μυϊκού κυττάρου) στο ~13% των «οροαρνητικών» ασθενών, επιπλέον από την γνωστή παρουσία τους σε «AChR-μυασθενείς».

**Λέξεις ευρητηρίου:** Μυασθένεια, αυτοαντισώματα, υποδοχέας ακετυλοχολίνης, MuSK, LRP4, νευρομυϊκή σύναψη

\* Ομότιμος Καθηγητής Ανοσοβιολογίας Πανεπιστημίου Πατρών.

## NEW AUTOANTIGENS AND NEW METHODOLOGIES FOR MYASTHENIA GRAVIS DIAGNOSIS, SHRINK SERONEGATIVE MYASTHENIA

Socrates Tzartos\*

Hellenic Pasteur Institute, Department of Pharmacy, University of Patras

### Abstract

Myasthenia gravis (MG) is an antibody-mediated autoimmune disease which is mainly due to loss of functional nicotinic acetylcholine receptors (AChRs) at the neuromuscular junction. This loss of functional AChRs, which disturbs muscle contraction, is usually due to autoantibodies against AChR or against proteins necessary for proper AChR functioning. The latter proteins include the postsynaptic membrane proteins MuSK and LRP4 and the agrin which is secreted by the nerve terminal. Agrin binds to LRP4 and then

the LRP4-agrin complex binds and activates MuSK. The activated MuSK causes, via other proteins, AChR clustering in the postsynaptic membrane, necessary for proper AChR function.

An invaluable tool in the diagnosis of MG is the detection of autoantibodies against the above proteins in patients' sera. With the use of radioimmunoassays, AChR autoantibodies are detected in ~80% of MG patients, while MuSK autoantibodies are detected in about 20-40% of the remaining patients. Symptoms in "MuSK-MG" often differ from those in "AChR-MG" and the recommended treatment differs significantly between the two groups of patients. Although several MG patients remain until today "seronegative", recently there has been considerable progress towards the reduction of "seronegative" MG. With new techniques (cell-based assays, CBA), more AChR and MuSK antibodies are now detected, undetectable by the classical techniques. Furthermore, the last two years we have shown that ~19% of "seronegative" MG patients have autoantibodies to the new autoantigen, LRP4. The onset of the disease in "LRP4-MG" is usually milder than in the other two MG groups, but in double-positive MG (anti-LRP4/anti-AChR or anti-LRP4/anti-MuSK), symptoms are considerably more severe than in any single-positive MG group. Antibodies to LRP4, like those to AChR and MuSK, can induce experimental MG in experimental animals. More recently, antibodies against additional proteins of the neuromuscular junction have been discovered in MG sera, such as antibodies to agrin. Finally, by a new technique, we can now detect antibodies against titin (a protein of the muscle cell) in ~13% of the "seronegative" MG patients, in addition to their known presence in many AChR-MG sera, further reducing the "seronegative" MG.

**Key words:** Myasthenia gravis, acetylcholine receptor, MuSK, LRP4, neuromuscular junction

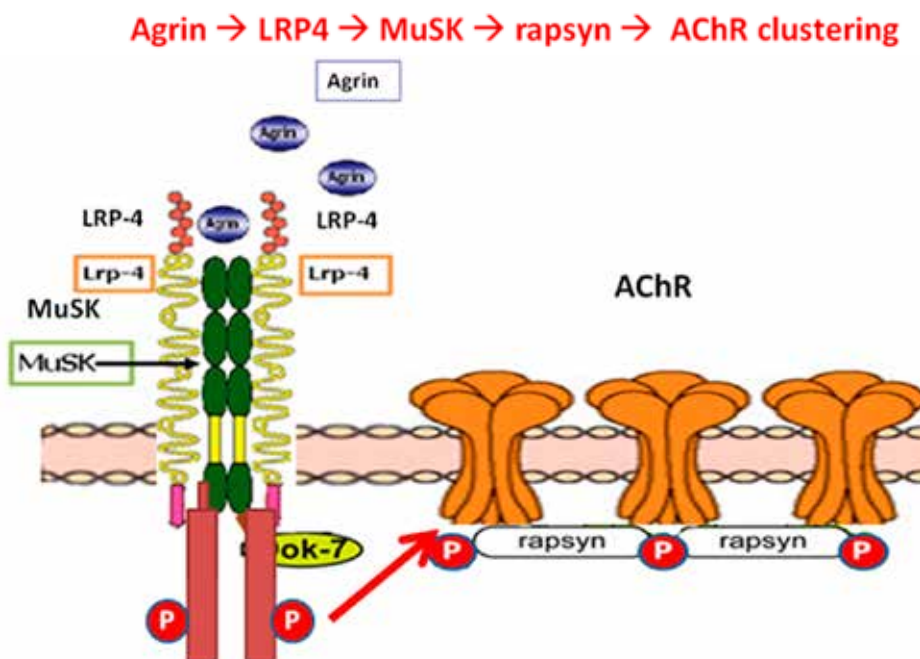
\* Professor Emeritus University of Patras.

### Εισαγωγή

Η μυασθένεια (Myasthenia Gravis, MG) είναι μια αυτοάνοση νόσος που σχετίζεται κυρίως με αυτοαντισώματα κατά των νικοτινικών υποδοχέων ακετυλοχολίνης (AChRs) της νευρομυϊκής σύναψης ή κατά πρωτεϊνών της σύναψης απαραίτητων για τη λειτουργία των AChRs.

Στο ~80% των μυασθενών η νόσος φαίνεται ότι

προκαλείται από αντι-AChR αυτοαντισώματα που προσδένονται στους AChRs της μετασυναπτικής περιοχής της νευρομυϊκής σύναψης και ελαττώνουν τους διαθέσιμους AChRs, με τελική συνέπεια τη διαταραχή της μυϊκής συστολής (Εικόνα 1). Στο 20-40% περίπου των υπόλοιπων ασθενών ανιχνεύονται αυτοαντισώματα κατά της πρωτεΐνης **MuSK** (muscle specific tyrosine



**ΕΙΚΟΝΑ 1. Η αλληλεπίδραση των αντιδράσεων που οδηγεί στην συσσωμάτωση των AChRs στη νευρομυϊκή σύναψη.** Η αγρίνη, που εκκρίνεται από τη νευρική απόληξη, προσδένεται στην LRP4, και αυτή η πρόσδεση επιτρέπει στην LRP4 να προσδεθεί στη MuSK και να την ενεργοποιήσει (φωσφορυλίωση, P). Η ενεργοποιημένη MuSK, προκαλεί ενεργοποίηση άλλων πρωτεϊνών και τελικά της rapsyn η οποία συνδέει AChRs και προκαλεί την απαραίτητη δημιουργία συσσωματωμάτων (clusters) AChRs στη μετασυναπτική μεμβράνη.

kinase) ενώ πρόσφατες μελέτες έδειξαν την παρουσία αυτοαντισωμάτων και κατά άλλων πρωτεϊνών της νευρομυϊκής σύναψης (κυρίως low density lipoprotein receptor-related protein-4, LRP4, και αγρίνη) όλες απαραίτητες για τη λειτουργία του AChR.

Η συχνότητα εμφάνισης της μυασθένειας παρουσιάζει αυξητική τάση, γεγονός που αποδίδεται κυρίως στην ανάπτυξη καλύτερων μεθόδων διάγνωσης, στην πολύ μειωμένη θνησιμότητα, λόγω νέων και αποτελεσματικότερων θεραπευτικών παρεμβάσεων, αλλά ενδεχόμενα και στις νέες συνθήκες διαβίωσης. Γενικώς, θεωρείται σήμερα ότι περίπου 1 στα 3000 άτομα πάσχουν από μυασθένεια. Είναι συνηθέστερη στις γυναίκες (αναλογία μυασθενών γυναικών/ανδρών ~1,5/1). Υπολογίζουμε ότι στην Ελλάδα έχουμε τουλάχιστον 4000 μυασθενείς.

Η εξέλιξη της νόσου ποικίλει, αλλά συνήθως διαμορφώνεται εντός δύο ετών από την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων. Στο 15% περίπου των ασθενών η νόσος περιορίζεται στους οφθαλμικούς μύες (οφθαλμική μυασθένεια), ενώ στην πλειονότητα παρατηρείται συμμετοχή και άλλων μυϊκών ομάδων (όπως του αυχένα, του κορμού, προμυϊκών και αναπνευστικών).

### Ανοσολογική διάγνωση της νόσου

Η θετική διάγνωση της μυασθένειας συνεπάγεται μια μακρόχρονη θεραπευτική αγωγή που συχνά συμπεριλαμβάνει και χειρουργική αντιμετώπιση (θυμεκτομή). Γι' αυτό το λόγο είναι σημαντικό να τεθεί σωστά η διάγνωση, να αποκλειστούν άλλες νόσοι που μπορεί να παραπλανήσουν τον κλινικό ιατρό και να διερευνηθούν καταστάσεις που πιθανόν να επηρεάζουν την εξέλιξη της νόσου.

Για τη διάγνωση της μυασθένειας αρχικά εφαρμόζονται κλινικές, φαρμακολογικές και ηλεκτροφυσιολογικές μέθοδοι που αναπτύσσονται σε άλλα κεφάλαια αυτού του τόμου. Ιδιαίτερης σημασίας είναι η ανίχνευση ειδικών αυτοαντισωμάτων έναντι αντιγόνων της νευρομυϊκής σύναψης στον ορό του ασθενούς, η ταυτοποίηση των οποίων συντελεί στην τελική διάγνωση.

### I. Αντι-AChR αυτοαντισώματα

Όπως ήδη αναφέραμε, η μυασθένεια προκαλείται, στη μεγάλη πλειονότητα των ασθενών, από αυτοαντισώματα είτε κατά του μυϊκού AChR είτε κατά πρωτεϊνών που συμβάλλουν στη λειτουργία του AChR. Ο μυϊκός AChR ανήκει στην «οικογένεια» των νικοτινικών AChRs. Οι υποδοχείς αυτοί είναι μεγάλες πρωτεΐνες (με μοριακό βάρος περί τις 300.000) βυθισμένες στην πλάσματική μεμβράνη των μυϊκών και νευρικών κυττάρων και εντοπισμένες κυρίως στα σημεία επαφής (συνάψεις) αυτών των κυττάρων. Το κάθε μόριο AChR περιέχει ένα δίαυλο κατιόντων ο οποίος είναι συνήθως κλειστός. Ο δίαυλος συναρμολογείται από 5 υπομονάδες που απαρτίζουν τον AChR. Η οικογένεια των νικοτινικών AChRs έχει πολλή μέλη που απαρτίζονται από συνδυασμούς διαφορετικών υπομονάδων (α1-10,

β2-4, γ, δ, και ε υπομονάδες), τα περισσότερα από τα οποία βρίσκονται στα νευρικά κύτταρα («νευρικοί» AChRs). Είναι ενδιαφέρον ότι μερικοί νευρικοί AChRs απαντούν και σε μη-διεγέρσιμα κύτταρα, όπως επιδερμικά, λευκοκύτταρα, κ.α. (1).

Στα μυϊκά κύτταρα, και συγκεκριμένα στη μετασυναπτική μεμβράνη της νευρομυϊκής σύναψης, έχουμε δύο μόνο υπότυπους AChR, τον «εμβρυϊκού τύπου» (με υπομονάδες α1, β1, γ, δ) και τον «ενήλικου τύπου» (με υπομονάδες α1, β1, ε, δ, δηλαδή η γ υπομονάδα αντικαθίσταται από την ε). Ο τελευταίος επικρατεί ήδη από τη γέννηση. Όταν η ακετυλοχολίνη, η οποία εκλύεται από την προσυναπτική πλευρά της νευρομυϊκής σύναψης, προσδεθεί στους υποδοχείς της (AChRs), ανοίγουν οι δίαυλοι και περνούν κατιόντα στο κύτταρο (1). Η λειτουργία αυτή του μυϊκού AChR είναι απαραίτητη για τη σύσπαση του μυός. Η κατανόηση της δομής του AChR έχει βοηθήσει πολύ και στην κατανόηση των μηχανισμών της μυασθένειας. Ωστόσο, η γνώση της λεπτομερούς δομής του με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ μόνο πρόσφατα αρχίζει να επιτυγχάνεται (2,3).

Είναι πλέον γνωστό ότι η πρόσδεση των αυτοαντισωμάτων στο μυϊκό AChR οδηγεί σε ελάττωση των λειτουργικά διαθέσιμων AChRs στη νευρομυϊκή σύναψη, οπότε ο μυς δε συσπάται ικανοποιητικά.

Τα αντι-AChR αντισώματα ανιχνεύονται συνήθως με ραδιοανοσοχημικό προσδιορισμό (radioimmunoassay, RIA) (4). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην κατακρήμνιση ραδιοσημασμένων AChRs από τα ειδικά αυτοαντισώματα του ορού του ασθενούς. Από την ποσότητα της ραδιενέργειας στο ίζημα υπολογίζεται η συγκέντρωση των αντι-AChR αυτοαντισωμάτων στον ορό. Έχουν αναπτυχθεί και μέθοδοι ανίχνευσης αντι-AChR αντισωμάτων με ELISA αλλά υπολείπονται σε ειδικότητα και ακρίβεια ποσοτικοποίησης. Αν και η ανίχνευση των αντι-AChR αντισωμάτων με RIA είναι πολύ ειδική για τη μυασθένεια, έχει αναφερθεί η παρουσία τους και σε άλλες ασθένειες. Όμως, οι παρατηρήσεις για «ψευδώς-θετικά» αντι-AChR αποτελέσματα σε άλλες ασθένειες είναι σπάνιες, γενικώς αφορούν πολύ χαμηλούς τίτλους και σε αρκετές περιπτώσεις δεν επιβεβαιώθηκαν από ποιο εμπειριστωμένες μελέτες (4,5). Ωστόσο είναι σαφές ότι η ύπαρξη αντι-AChR αντισωμάτων δεν συνεπάγεται απαραίτητα την ύπαρξη μυασθένειας. Π.χ. αν και τα περισσότερα νεογνά ορο-θετικών μυασθενικών μητέρων φέρουν αντι-AChR αντισώματα από την μητέρα τους, μόνο ~10-15% από αυτά νοσούν (παροδική νεογνική μυασθένεια) (6), περίπου το 1/3 των υγιών μονοωικών διδύμων με μυασθενικά αδελφία φέρουν αντι-AChR αντισώματα, μερικοί ασθενείς με οπτική νευρομυελίτιδα έχουν αντι-AChR αντισώματα με ή χωρίς ανιχνεύσιμα συμπτώματα μυασθένειας, και ορο-θετικοί μυασθενείς που βρίσκονται σε ύφεση, με πλήρη απουσία μυασθενικών συμπτωμάτων, συνήθως έχουν παραμένουσες συγκεντρώσεις αντισωμάτων, συχνά υψηλότερες από αυτές πολλών μυασθενών με συμπτώματα (4,5).

Οι θετικοί τίτλοι των αντι-AChR αντισωμάτων των μυασθενών ποικίλουν από 0,6 nM (το σύνθετο όριο θετικού) ως αρκετές χιλιάδες nM. Από 4680 αντι-AChR θετικούς ορούς που εντοπίσαμε κατά την περίοδο 2004-13 (αρκετοί από επανειλημμένες αιμοληψίες του ίδιου ασθενούς), 1,5% είχαν τίτλο 1000-7500 nM, 12% είχαν 100-999 nM, 44% είχαν 10-99 nM, και 40% είχαν 0,6-9,9 nM, με τίτλο στο μέσο της κλίμακας των ασθενών τα 15 nM.

Αυτοαντισώματα κατά του AChR ανιχνεύονται στο ~85% των ασθενών με γενικευμένη μυασθένεια καθώς και μόνο στο ~50% των ασθενών με οφθαλμική μυασθένεια (4,7). Με εξαίρεση το ότι οι οροθετικοί ασθενείς με οφθαλμική μυασθένεια (δηλαδή με αποκλειστικά οφθαλμικά συμπτώματα για  $\geq 2$  έτη) έχουν συνήθως χαμηλούς τίτλους αντισωμάτων (συνήθως  $< 10$  nM), γενικώς δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ τίτλου αντισωμάτων και βαρύτητας της ασθένειας μεταξύ διαφορετικών ασθενών. Αντίθετα όμως, παρατηρείται καλή συσχέτιση μεταξύ τίτλου αντισωμάτων και βαρύτητας για τον ίδιο ασθενή με τον χρόνο και τις θεραπείες που υφίσταται. Είναι επίσης απαραίτητο να έχουμε υπόψη ότι αρχικά οροαρνητικοί ασθενείς συχνά μετατρέπονται σε οροθετικούς μετά από λίγους μήνες (8), οπότε ο οροαρνητικός ασθενής θα πρέπει να επανελεγχθεί σε 6-12 μήνες.

Η παθογονικότητα των αντι-AChR αντισωμάτων έχει επανειλημμένως δείχθει με την πρόκληση πειραματικής μυασθένειας σε πειραματόζωα τόσο μετά από ανοσοποίηση με AChR, όσο και μετά από ένεση αντι-AChR μονοκλωνικών αντισωμάτων, ορών μυασθενών ή και απομονωμένων αντι-AChR αντισωμάτων των μυσθενών (9,10). Αντίθετα, οροί που τους έχουν εκλεκτικά αφαιρεθεί τα αντι-AChR αντισώματα χάνουν την παθογόνο δράση τους (11). Αυτό συνιστά ότι τα αντι-AChR αντισώματα είναι ο κύριος παθογόνος παράγοντας στους AChR-θετικούς ασθενείς. Τα περισσότερα αντι-AChR αντισώματα, και μάλιστα τα περισσότερα παθογόνα αντι-AChR αντισώματα, προσδένονται στην α υπομονάδα του AChR, συνήθως στην κύρια ανοσογόνο περιοχή της (main immunogenic region, MIR) (12).

## II. Αντι-MuSK αυτοαντισώματα

Το 2001 δείχτηκε ότι αρκετοί αντι-AChR οροαρνητικοί μυασθενείς εμφανίζουν αυτοαντισώματα κατά της πρωτεΐνης MuSK (13). Η MuSK είναι μια κινάση της τυροσίνης, η οποία προκαλεί τη συσσώρευση των AChRs στη μετασυναπτική μεμβράνη, σε συνεργασία με την LRP4 (μια ακόμη μεμβρανική πρωτεΐνη) και την αγρίνη (Εικόνα 1). Συγκεκριμένα, η αγρίνη (μια πρωτεΐνη που εκκρίνεται από τη νευρική απόληξη στη νευρομυϊκή σύναψη) προσδένεται στην LRP4, στη συνέχεια το σύμπλοκο LRP4-αγρίνη προσδένεται στη MuSK και προκαλεί την ενεργοποίησή της μέσω φωσφορυλίωσης (14). Η ενεργοποιημένη MuSK θα προκαλέσει, μέσω άλλων πρωτεϊνών, την απαραίτητη συσσωμάτωση των

AChRs (AChR clusters) στη μετασυναπτική μεμβράνη. Μερικά χαρακτηριστικά της MuSK μυασθένειας είναι: αδυναμία προμυϊκών μυών, συχνά μυϊκή ατροφία (πρόσωπο, γλώσσα), αδυναμία αναπνευστικού συστήματος, ελαττωμένη απόκριση σε αναστολές ακετυλοχολινεστεράσης, σε ανοσοκατασταλτικά και σε θυμεκτομή, απουσία υπερηλιασίας θύμου αδένου και θυμώματος, σταθερή πορεία της νόσου (13).

Τα αντι-MuSK αυτοαντισώματα συνήθως ανιχνεύονται, όπως και τα αντι-AChR αντισώματα, με RIA με ραδιοσημασμένη MuSK. Οι τίτλοι των αντι-MuSK αντισωμάτων είναι χαμηλότεροι από αυτούς των αντι-AChR αντισωμάτων, αλλά και η τεχνική είναι πολύ πιο ευαίσθητη (όριο θετικού τίτλου 0,03 nM, δηλαδή 20 φορές χαμηλότερο από αυτό για τα αντι-AChR αντισώματα). Έχουμε αναπτύξει και μια πιο ευαίσθητη RIA για αντι-MuSK αντισώματα (RIA δύο σταδίων), η οποία μειώνει περαιτέρω το όριο του θετικού τίτλου (15). Δεν έχουμε παρατηρήσει αντι-MuSK τίτλο άνω των 75 nM, αλλά η μεγάλη πλειονότητα των θετικών ορών έχουν τίτλο άνω της μονάδος ενώ ο τίτλος στο μέσο της κλίμακας των 310 αντι-MuSK ασθενών ήταν 10,3 nM, δηλαδή όχι πολύ μικρότερος αυτού των αντι-AChR αντισωμάτων. Αντισώματα κατά της MuSK ανιχνεύονται στο ~20-40 των αντι-AChR οροαρνητικών μυασθενών (13). Η ανίχνευση αντι-MuSK αυτοαντισωμάτων θεωρείται σαφής ένδειξη μυασθένειας. Τα αντι-MuSK αντισώματα έχουν την ιδιορρυθμία να ανήκουν στην IgG4 υποτάξη ανοσοσφαιρινών, η οποία δεν ενεργοποιεί το συμπλήρωμα (16). Τα αντι-MuSK αντισώματα σπάνια απαντούν σε οφθαλμική μυασθένεια (17) και σπάνια συνυπάρχουν με αντι-AChR αντισώματα, με λίγες μόνο εξαιρέσεις (18,19). Τα αντι-MuSK αντισώματα είναι ικανά να προκαλούν πειραματική μυασθένεια σε πειραματόζωα, αποδεικνύοντας έτσι τον παθογόνο ρόλο τους (16).

## III. «Νέα» αντισώματα κατά παιδιών αντιγόνων (AChR και MuSK)

Το 2008 η ομάδα της Vincent ανέπτυξε νέες τεχνικές ανίχνευσης των αντι-AChR και αντι-MuSK αντισωμάτων με κυτταρικό ανοσοφθορισμό (cell based assay, CBA) (20). Στη CBA διαμοιλούμε μια κυτταρική σειρά με το μεμβρανικό αντιγόνο μας το οποίο θα εκφραστεί στην επιφάνεια των κυττάρων. Κατόπιν επωάζουμε τον υπό εξέταση ορό τόσο με τα διαμοιλυσμένα όσο και με τα μη διαμοιλυσμένα κύτταρα. Αν υπάρχουν στον ορό αντισώματα έναντι του αντιγόνου, αυτά θα προσδεθούν στα διαμοιλυσμένα κύτταρα αλλά όχι στα μη διαμοιλυσμένα. Κατόπιν προσθέτουμε φθορίζον αντι-αντίσωμα με το οποίο θα σημανθούν μόνο τα διαμοιλυσμένα κύτταρα, ένδειξη παρουσίας των ειδικών αντισωμάτων στον ορό.

Για τα αντι-AChR αντισώματα, οι ερευνητές είδαν ότι το CBA τεστ έγινε πολύ περισσότερο ευαίσθητο όταν προκάλεσαν τη συσσωμάτωση των AChRs (AChR clusters) στην επιφάνεια των κυττάρων, μιμούμενοι τη

συσσωμάτωσή τους στη νευρομυϊκή σύναψη. Η συσσωμάτωση αυτή φαίνεται ότι βοηθά στην ανίχνευση τόσο των αντισωμάτων με χαμηλή συγγένεια για τον AChR όσο και αντισωμάτων χαμηλής συγκέντρωσης. Με αυτές τις τεχνικές, η ομάδα της Vincent έδειξε ότι αρκετοί «διπλά οροαρνητικοί» μασθενείς (αρνητικοί για αντι-AChR και αντι-MuSK αντισώματα όπως μετριοούνται με RIA) στην πραγματικότητα έχουν αντισώματα κατά του AChR ή κατά της MuSK (20). Στην αρχική μελέτη θεωρήθηκε ότι τα 2/3 των «οροαρνητικών» ασθενών έχουν αντισώματα κατά των "AChR clusters", αργότερα όμως δείχθηκε ότι η συχνότητά τους είναι πολύ μικρότερη (~5-20% των οροαρνητικών). Δεν υπάρχουν εκτενείς μελέτες για την ειδικότητα των αντισωμάτων κατά συσσωματωμάτων AChR, αλλά πάντως δεν έχουν αναφερθεί θετικοί οροί από υγιή άτομα.

Εφαρμόσαμε την CBA τεχνική για τα αντι-MuSK αντισώματα και ολοκληρώσαμε πρόσφατα μια μεγάλη πανευρωπαϊκή μελέτη με τη χρήση ορών από ~700 «οροαρνητικούς» ασθενείς από εξειδικευμένες κλινικές 12 κρατών. Δείξαμε ότι ~13% των «οροαρνητικών» ασθενών έχουν αντι-MuSK αντισώματα ανιχνεύσιμα μόνο με την CBA (A. Tsonis, P. Zisimopoulou and col., δημοσίευτα αποτελέσματα). Φαίνεται ότι τα αντι-MuSK αντισώματα που ανιχνεύονται μόνο με CBA είναι κυρίως IgM, αντίθετα από τα IgG4 αντισώματα που ανιχνεύονται με RIA. Πρέπει όμως να τονιστεί ότι τέτοια αντι-MuSK αντισώματα ανιχνεύθηκαν και στο ~2% των υγείων μαρτύρων. Επομένως η ύπαρξη τέτοιων αντισωμάτων πρέπει να συνεκτιμηθεί με την κλινική εικόνα και με άλλες εξετάσεις.

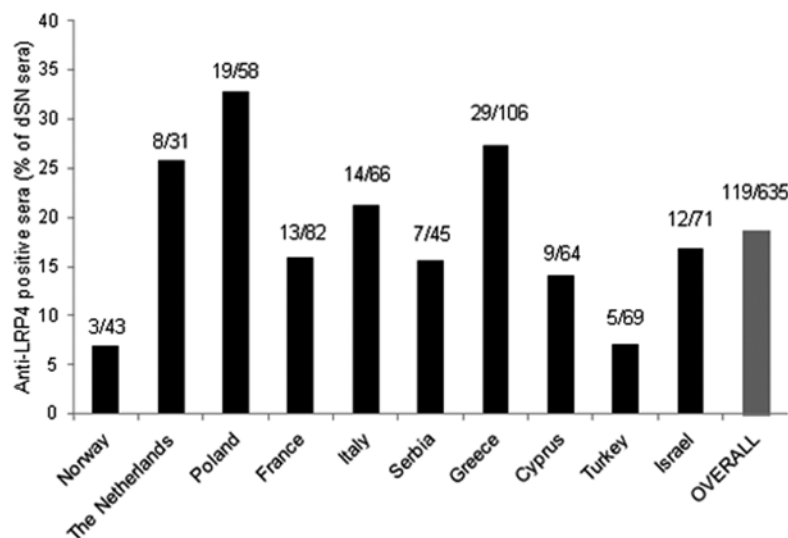
Για τεχνικούς λόγους αυτές οι νέες μεθοδολογίες για αντι-AChR και αντι-MuSK αντισώματα καθυστέρησαν διεθνώς να εφαρμοστούν στη διάγνωση. Από το 2013

ξεπεράσαμε τα εμπόδια και εφαρμόζουμε πλέον και αυτές τις τεχνικές στη διάγνωση ρουτίνας.

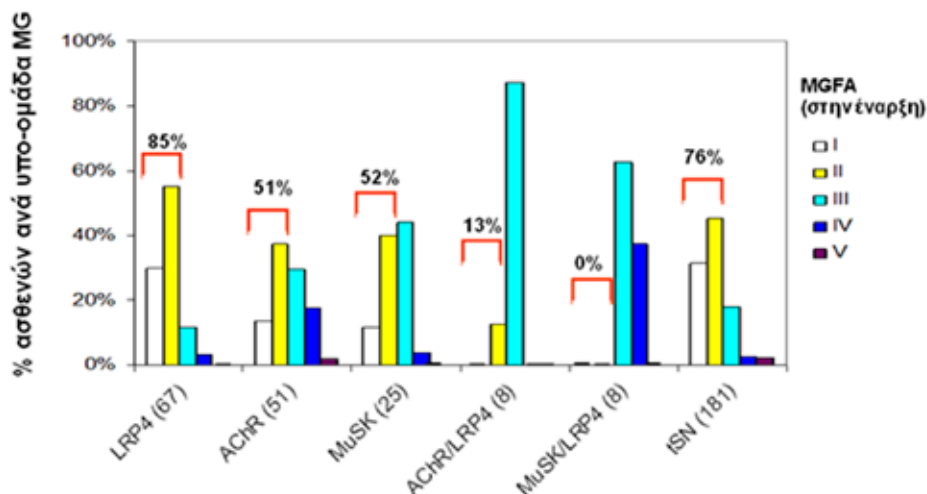
#### IV. Αντι-LRP4 αυτοαντισώματα

Το 2011/2012 τρεις δημοσιεύσεις (21-23) (στη μία από τις οποίες συμμετείχαμε και εμείς) παρουσίασαν την ανακάλυψη αυτοαντισωμάτων κατά της LRP4 σε ορούς μασθενών (κυρίως σε διπλά οροαρνητικούς). Όπως αναφέρθηκε, η δράση της LRP4 είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της νευρομυϊκής σύναψης (Εικόνα 1). Οι 3 δημοσιεύσεις διέφεραν πολύ στη συχνότητα των αντι-LRP4 μασθενών (από 2-50% των διπλά οροαρνητικών μασθενών). Αυτές οι δραματικές διαφορές μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στη μέθοδο διάγνωσης και σε γεωγραφικές/εθνικές διαφορές (Ιαπωνία, Ελλάδα, Γερμανία, USA). Στη συνέχεια αναπτύξαμε στο εργαστήριό μας μια ιδιαίτερα αξιόπιστη διαγνωστική τεχνική για τα LRP4 αυτοαντισώματα (με CBA) και συντονίσαμε μια μεγάλη μελέτη με τη συνεργασία εξειδικευμένων στη μασθένεια κλινικών από 10 Ευρωπαϊκά κράτη στην οποία ελέγξαμε 635 ορούς από διπλά οροαρνητικούς μασθενείς (24). Συνολικά, 19% των «διπλά οροαρνητικών» βρέθηκαν αντι-LRP4 θετικοί (από 7% μέχρι 33% για τα διάφορα κράτη, Εικόνα 2) ενώ βρέθηκαν αντι-LRP4 θετικοί και μεταξύ των αντι-AChR-θετικών (10%) και των αντι-MuSK-θετικών (15%). Κανείς από τους 90 ορούς υγίων ατόμων που ελέγχθηκαν δεν είχε αντι-LRP4 αντισώματα.

Οι ασθενείς με LRP4 αντισώματα παρουσιάζουν συνήθως ηπιότερα συμπτώματα στην έναρξη της νόσου απ'ότι οι ασθενείς με τα άλλα αυτοαντισώματα (85% έναντι 51% ασθενείς με ήπια συμπτώματα, αντίστοιχα), ενώ αντίθετα οι διπλο-θετικοί (AChR+/LRP4+ ή MuSK+)



**ΕΙΚΟΝΑ 2. Συχνότητα της LRP4 μασθένειας μεταξύ των 635 διπλά-οροαρνητικών μασθενών από 10 κράτη.** Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τα ποσοστά των LRP4-μασθενών στο σύνολο των διπλά-οροαρνητικών μασθενών για κάθε κράτος, ενώ επάνω από τις στήλες φαίνονται οι συγκεκριμένοι αριθμοί των LRP4-μασθενών προς τους διπλά-οροαρνητικούς (από δημοσίευση αρ. 24).



**Εικόνα 3. Κατανομή κλινικής κατάστασης της μυασθένειας (MGFA grade), κατά την πρώτη εξέταση, ανά υπο-ομάδα μυασθενών.** Φαίνεται ότι στην LRP4-μυασθένεια επικρατούν τα ήπια συμπτώματα κατά την πρώτη εξέταση (άθροισμα βαθμίδων I και II = 85%), σε αντίθεση με την AChR- και MuSK-μυασθένεια (51 και 52% αντίστοιχα), και κυρίως με τους διπλά-θετικούς (LRP4 με AChR ή LRP4 με MuSK) όπου τα ήπια συμπτώματα είναι ασυνήθη (13 και 0%) (από δημοσίευση αρ. 24).

LRP4+) ασθενείς είχαν συνήθως σοβαρότερα συμπτώματα από τους μονο-θετικούς (Εικόνα 3). Δεν ανιχνεύθηκαν LRP4-ασθενείς με θύμωμα αλληλά το 1/3 από αυτούς είχαν θυμική υπερπλασία. Ήταν ενδιαφέρον ότι ενώ η οφθαλμική μυασθένεια είναι πολύ σπάνια στους ασθενείς με αντι-MuSK αντισώματα, ήταν πολύ συχνή μεταξύ των αντι-LRP4 θετικών ασθενών. Η ανταπόκριση των LRP4-θετικών ασθενών στις κλασικές θεραπείες για τη μυασθένεια ήταν συνήθως πολύ ικανοποιητική με μόνο το 10% των ασθενών να μην ανταποκρίνεται στις θεραπευτικές αγωγές (24). Πιο πρόσφατες δημοσιεύσεις παρουσίασαν λεπτομερέστερα τα κλινικά χαρακτηριστικά μερικών LRP4-θετικών μυασθενών (25,26).

Πρόσφατα δείχθηκε ότι LRP4 αντισώματα μπορούν να προκαλέσουν πειραματική μυασθένεια σε πειραματόζωα, υποστηρίζοντας τον παθογόνο ρόλο των αντι-LRP4 αντισωμάτων (27). Επίσης, δικά μας προκαταρκτικά πειράματα συνιστούν ότι οι οροί ασθενών με αντι-LRP4 αντισώματα έχουν παθογόνο δράση σε πειραματόζωα.

Είναι ενδιαφέρον ότι ανιχνεύσαμε αντι-LRP4 αυτοαντισώματα και σε ασθενείς με τη νόσο του κινητικού νευρώνα (ALS), σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές των LRP4 αντισωμάτων των μυασθενών. Συγκεκριμένα, ανιχνεύσαμε αντι-LRP4 αντισώματα στο 23% (24/104) ALS ασθενών της Ελλάδος και Ιταλίας (28). Η LRP4 επιπλέον της παρουσίας της στη μετασυναπτική μεμβράνη της νευρομυϊκής σύναψης με κρίσιμο ρόλο στη λειτουργία του AChR, βρίσκεται και στους κινητικούς νευρώνες συμμετέχοντας στην ανάπτυξη και λειτουργία τους. Είναι επομένως πιθανό, αυτά τα LRP4 αντισώματα να παίζουν παθογόνο ρόλο στην ALS, με ελκυστικές θεραπευτικές προοπτικές. Είναι ακόμη προς διερεύνηση οι πιθανές διαφορές μεταξύ

των αντι-LRP4 αντισωμάτων των μυασθενών και αυτών των ALS ασθενών, και η ερμηνεία της διαφορετικής παθογένειάς τους. Το εύρημα αυτό ωστόσο, προτρέπει σε λεπτομερέστερη αξιολόγηση της θετικής σε LRP4 αντισώματα μυασθένειας.

Η διάγνωση των αντι-LRP4 αντισωμάτων γίνεται πλέον σε εξειδικευμένα διαγνωστικά εργαστήρια.

### V. Αντι-αγρίνη αυτοαντισώματα

Όπως ειπώθηκε, η αγρίνη είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της LRP4, δηλαδή την ενεργοποίηση της MuSK και τέλος τη συσσωμάτωση των AChRs (Εικόνα 1). Τρεις πρόσφατες δημοσιεύσεις έδειξαν την παρουσία αντι-αγρίνη αντισωμάτων σε ορούς μερικών μυασθενών («οροαρνητικών» ή οροθετικών) (29-31). Η συχνότητά τους δεν είναι σαφής από τις πρώτες μελέτες και χρήζει διερεύνησης. Είμαστε στη διαδικασία ανάπτυξης ενός νέου διαγνωστικού για αντι-αγρίνη αντισώματα το οποίο στη συνέχεια θα χρησιμοποιήσουμε σε μια πολυκεντρική επιδημιολογική μελέτη των ασθενών με αυτά τα αντισώματα, καθώς και για τη διάγνωση ρουτίνας για την περαιτέρω μείωση των οροαρνητικών μυασθενών.

### VI. Αυτοαντισώματα έναντι γραμμωτών μυϊκών ινών σε αντι-AChR-θετικούς ασθενείς

Περίπου τα 2/3 των μυασθενών έχουν θυμική υπερπλασία και ~10% έχουν θύμωμα (7). Σε πολλούς μυασθενείς με ή χωρίς θύμωμα αφαιρείται ο θύμος αδένας (όπως αναλύεται σε άλλο κεφάλαιο) με συχνή ύφεση ή βελτίωση της κλινικής κατάστασής τους. Επιπλέον της μαγνητικής τομογραφίας, η ανίχνευση

αντισωμάτων κατά ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών των γραμμωτών μυϊκών ινών αποτελεί σοβαρή ένδειξη για την παρουσία θυμώματος. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι η τιτίνη, ο υποδοχέας ρυανοδίνης (διάλυτος ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο) και ο τασεοεξαρτώμενος διάλυτος καλίου Kv1.4 (32,33). Αν και είναι αμφίβολο ότι τα αντισώματα κατά αυτών των εσωτερικών πρωτεϊνών έχουν παθογόνο ρόλο, η χρησιμότητά τους για την ανίχνευση θυμώματος είναι πολύ σημαντική. Πολύ λίγα είναι γνωστά για τα αντισώματα κατά των διαύλων καλίου Kv1.4 και απ όσο γνωρίζουμε δε διατίθεται διάγνωση ρουτίνας γι αυτά. Τα αντισώματα κατά τιτίνης (συνήθως ανιχνευόμενα με ELISA) εμφανίζονται κυρίως σε AChR-θετικούς μυσθενείς, και η ύπαρξή τους σε νέους ασθενείς κάτω των 40-45 ετών (early onset MG) αποτελούν ισχυρή ένδειξη παρουσίας θυμώματος. Η συνύπαρξη αντισωμάτων κατά τιτίνης και υποδοχέα ρυανοδίνης περαιτέρω ενισχύει την πιθανότητα παρουσίας θυμώματος.

### VII. Αντι-τιτίνη αυτοαντισώματα ως νέος βιοδείκτης για την «οροαρνητική» μυσθενεία

Με τις χρησιμοποιούμενες τεχνικές για αντι-τιτίνη αντισώματα (συνήθως ELISA), τέτοια αντισώματα ανιχνεύονται σχεδόν μόνο σε αντι-AChR οροθετικούς ασθενείς, με χρησιμότητα κυρίως για τη διάγνωση θυμώματος. Πρόσφατα αναπτύξαμε μια πολύ ευαίσθητη RIA για αντι-τιτίνη αντισώματα και με αυτήν ελέγξαμε 300 ορούς από τριπλά οροαρνητικούς μυσθενείς από Ευρωπαϊκές κλινικές, 114 ορούς από υγιείς μάρτυρες και 30 ορούς από ασθενείς με περιφερικές νευροπάθειες (με αντισώματα κατά γαγγλιοσιδίων ή MAG). Παρατηρήσαμε ότι ~13% των οροαρνητικών μυσθενών (αλλά κανείς από τους 144 μάρτυρες) έχουν αντι-τιτίνη αντισώματα (Ch. Stergiou, V. Zouvelou, J. Tzartos et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Ελπίζουμε ότι αυτή η RIA θα αποτελέσει ένα νέο δυναμικό διαγνωστικό για τους μέχρι χθες οροαρνητικούς μυσθενείς.

### Συμπερασματικά

Ένα σημαντικό πρόβλημα στη διάγνωση της μυσθενείας και στη διαφορική διάγνωση ασθενειών με παρόμοια συμπτώματα, είναι ότι σε αρκετούς μυσθενείς δεν ανιχνεύονται ειδικά αυτοαντισώματα. Η πρόσφατη ανάπτυξη νέων διαγνωστικών, η ανακάλυψη νέων αυτοαντιγόνων (LRP4 και αγρίνη) και η εφαρμογή τους στη διάγνωση «ρουτίνας» έχουν μειώσει δραστικά την «ορο-αρνητική» μυσθενεία. Η ανακάλυψη των νέων αυτοαντιγόνων ελπίζεται ότι θα συμβάλει και στον αγώνα για την ανάπτυξη ειδικών θεραπευτικών αγωγών για τη μυσθενεία.

### Βιβλιογραφία

1. Hurst R, Rollema H, Bertrand D. Nicotinic

acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2013 Jan;137(1):22-54. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.08.012.

2. Li SX, Huang S, Bren N, Noridomi K, Dellisanti CD, Sine SM, Chen L. Ligand-binding domain of an  $\alpha 7$ -nicotinic receptor chimera and its complex with agonist. *Nat Neurosci.* 2011 Sep 11;14(10):1253-9. doi: 10.1038/nn.2908.
3. Zouridakis M, Giastas P, Zarkadas E, Chroni-Tzartou D, Bregestovski P and Tzartos SJ. Crystal structures of the free and antagonist-bound states of the extracellular domain of human  $\alpha 9$  nicotinic receptor. 2014. *Nat. Struct & Mol. Biol.* doi:10.1038/nsmb.2900.
4. Vincent A, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for myasthenia gravis: results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1985 Dec;48(12):1246-52.
5. Somnier FE. Clinical implementation of anti-acetylcholine receptor antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1993 May;56(5):496-504.
6. Lefvert AK, Osterman PO. Newborn infants to myasthenic mothers: a clinical study and an investigation of acetylcholine receptor antibodies in 17 children. *Neurology.* 1983 Feb;33(2):133-8.
7. Drachman D. Myasthenia gravis. In: Rose N, Mackay I, eds. *The Autoimmune Diseases*, Third Edition, Academic Press, 1998; 31: 637-62.
8. Chan KH, Lachance DH, Harper CM, Lennon VA. Frequency of seronegativity in adult-acquired generalized myasthenia gravis. *Muscle Nerve.* 2007 Nov;36(5):651-8
9. Tzartos, S. J., Hochschwender, S., Vasquez, P., and Lindstrom, J.. Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis by monoclonal antibodies to the main immunogenic region of the acetylcholine receptor. *J. Neuroimmunol.* 1987. 15, 185-194.
10. Fuchs S, Aricha R, Reuveni D, Souroujon MC. Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis: From immunochemical characterization to therapeutic approaches. *J Autoimmun.* 2014 Jun 23. pii: S0896-8411(14)00100-0. doi: 10.1016/j.jaut.2014.06.003. [Epub ahead of print]
11. Kordas G, Lagoumintzis G, Sideris S, Poulas K and Tzartos SJ. Direct proof of the in vivo pathogenic role of the AChR autoantibodies from myasthenia gravis patients. *PLOS-1.* 2014. Sep 26;9(9):e108327. doi: 10.1371/journal.pone.0108327.
12. Tzartos, S.J., Barkas, T., Cung, M. T., Mamalaki, A., Marraud, M., Orlewski et al. Anatomy of the antigenic structure of a large membrane autoantigen, the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor. *Immunol. Rev.* 1998. 163, 89-120.
13. Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis

- J, Melms A, Vincent A. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med*. 2001 Mar;7(3):365-8.
14. Kim N, Stiegler AL, Cameron TO, Hallock PT, Gomez AM, Huang JH et al. Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell*. 2008 Oct 17;135(2):334-42. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.002
  15. Trakas, N., Zisimopoulou, P., and Tzartos, S.J. Development of a highly sensitive diagnostic assay for muscle-specific tyrosine kinase (MuSK) autoantibodies in myasthenia gravis. *J. Neuroimmunol*. 2011. 240-1: 79-86.
  16. Huijbers MG, Zhang W, Klooster R, Niks EH, Friese MB, Straasheijm KR et al. MuSK IgG4 autoantibodies cause myasthenia gravis by inhibiting binding between MuSK and Lrp4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 17;110(51):20783-8. doi: 10.1073/pnas.1313944110.
  17. Zouvelou V, Papathanasiou A, Koros C, Rentzos M, Zambelis T, Stamboulis E. Pure ocular anti-musk myasthenia under no immunosuppressive treatment. *Muscle Nerve*. 2013 Sep;48(3):464. doi: 10.1002/mus.23847.
  18. Poulas K, Koutsouraki E, Kordas G, Kokla A, Tzartos SJ. Anti-MuSK- and anti-AChR-positive myasthenia gravis induced by d-penicillamine. *J Neuroimmunol*. 2012 Sep 15;250(1-2):94-8. doi: 10.1016/j.jneuroim.2012.05.011. Epub 2012 Jun 9. PubMed PMID: 22683336.
  19. Zouvelou V, Kyriazi S, Rentzos M, Belimezi M, Micheli MA, Tzartos SJ, Stamboulis E. Double-seropositive myasthenia gravis. *Muscle Nerve*. 2013, 47(3):465-6.
  20. Leite MI, Jacob S, Viegas S, Cossins J, Clover L, Morgan BP, et al. IgG1 antibodies. to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis. *Brain*. 2008;131:1940e52.
  21. Higuchi O, Hamuro J, Motomura M, Yamanashi Y. Autoantibodies to low density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2011;69:418-22.
  22. Zhang B, Tzartos JS, Belimezi M, Ragheb S, Bealmear B, Lewis RA, et al. Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double seronegative myasthenia gravis. *Arch Neurol* 2012;69:445-51.
  23. Pevzner A, Schoser B, Peters K, Cosma NC, Karakatsani A, Schalke B, et al. Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibody-negative myasthenia gravis. *J Neurol* 2012;259:427-35.
  24. Zisimopoulou P, Evangelakou P, Tzartos J, Lazaridis K, Zouvelou V, Mantegazza R et al. A comprehensive analysis of the epidemiology and clinical characteristics of anti-LRP4 in myasthenia gravis. *J. Autoimmunity*. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2013.12.004>
  25. Zouvelou V, Zisimopoulou P, Rentzos M, Karandreas N, Evangelakou P, Stamboulis E, Tzartos SJ. Double seronegative myasthenia gravis with anti-LRP4 antibodies. *Neuromuscul Disord*. 2013 Jul;23(7):568-70.
  26. Tsigvoulis G, Dervenoulas G, Kokotis P, Zompola C, Tzartos J, Tzartos SJ, Voumvourakis KI. Double seronegative myasthenia gravis with low density lipoprotein-4 (LRP4) antibodies presenting with isolated ocular symptoms. 2014. *J. Neurol. Sci*. doi: 10.1016/j.jns.2014.09.013.
  27. Shen C, Lu Y, Zhang B, Figueiredo D, Bean J, Jung J, Wu H, et al. Antibodies against low-density lipoprotein receptor-related protein 4 induce myasthenia gravis. *J Clin Invest*. 2013 Dec 2;123(12):5190-202. doi: 10.1172/JCI66039.
  28. Tzartos JS, Zisimopoulou P, Rentzos M, Karandreas N, Zouvelou V, Evangelakou P, et al. LRP4 antibodies in serum and CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann. Clin Transl Neurol*. Dec. 2013. doi: 10.1002/acn3.26.
  29. Cossins J, Belaya K, Zoltowska K, Konecny I, Maxwell S, Jacobson L. The search for new antigenic targets in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Dec;1275:123-8. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06833.x.
  30. Zhang B, Shen C, Bealmear B, Ragheb S, Xiong WC, Lewis RA et al. Autoantibodies to agrin in myasthenia gravis patients. *PLoS One*. 2014; 9(3):e91816. doi: 10.1371
  31. Gasperi C, Melms A, Schoser B, Zhang Y, Meltoranta J, Risson V et al. Anti-agrin autoantibodies in myasthenia gravis. *Neurology*. 2014; 82(22):1976-83.
  32. Romi F, Skeie GO, Aarli JA, Gilhus NE. The severity of myasthenia gravis correlates with the serum concentration of titin and ryanodine receptor antibodies. *Arch Neurol*. 2000 Nov;57(11):1596-600.
  33. Suzuki S, Utsugisawa K, Nagane Y, Satoh T, Terayama Y, Suzuki N, Kuwana M. Classification of myasthenia gravis based on autoantibody status. *Arch Neurol*. 2007 Aug;64(8):1121-4.
- Ευχαριστίες:** Ευχαριστώ θερμά τους πολλούς συνεργάτες στα τρία εργαστήριά μας (στο Ε.Ι. Παστέρ, στο Πανεπιστήμιο Πατρών και στη Τζάρτος ΝευροΔιαγνωστική), στις συνεργαζόμενες Ελληνικές νευρολογικές κλινικές (Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Αττικό Νοσοκομείο, Νοσοκομείο ΕΕΣ κ.α) και στις άνω των 10 κλινικών του εξωτερικού για την αποφασιστική συμβολή τους στις πρωτότυπες εργασίες που αναφέρονται σε αυτήν την ανασκόπηση (δημοσιευμένες ή μη). Οι πρωτότυπες εργασίες υποστηρίχθηκαν από προγράμματα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, του MDA, του AFM, και της ΓΓΕΤ.