



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ : ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΠΟΓΔΑΝΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΙΑΣ ΤΩΝ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ»

υπό

ΕΥΑΓΓΕΛΗΣ ΚΟΥΡΚΟΥΝΗ

ΙΑΤΡΟΥ ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΟΥ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2024

© 2024 ΕΥΑΓΓΕΛΗ ΚΟΥΡΚΟΥΝΗ

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

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (16^η/29-05-2024 ΓΣΕΣ):

1ος Εξεταστής Λάζαρος Σακκάς
(Επιβλέπων) Ομότιμος Καθηγητής Τμ. Ιατρικής ΠΘ

2ος Εξεταστής Δημήτριος Μπόγδανος
 Καθηγητής Τμ. Ιατρικής ΠΘ

3ος Εξεταστής Χριστίνα Κατσιάρη
 Αν. Καθηγήτρια Τμ. Ιατρικής ΠΘ

4ος Εξεταστής Ευθύμιος Δαρδιώτης
 Καθηγητής Τμ. Ιατρικής ΠΘ

5ος Εξεταστής Αγγελική-Βικτωρία Ρουσσάκη-Σούλτσε
 Καθηγήτρια Τμ. Ιατρικής ΠΘ

6ος Εξεταστής Νικόλαος Γιαννακούλας
 Αν. Καθηγητής Τμ. Ιατρικής ΠΘ

7^{ος} Εξεταστής Ευτέρπη Ζαφειρίου
 Αν. Καθηγήτρια Τμ. Ιατρικής ΠΘ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση και ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν στην περάτωσή της. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω και να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στον καθηγητή μου Ομότιμο Καθηγητή κ.Λάζαρο Σακκά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την παρότρυνσή του να ασχοληθώ με την έρευνα. Τον ευχαριστώ ολόψυχα για την υπομονή του, την άρτια επιστημονική καθοδήγησή του, τις συμβουλές του και την επίβλεψή του σε κάθε στάδιο της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ.Δημήτριο Μπόγδανο για την εποικοδομητική συνεργασία μας, τη στήριξή του, την πολύτιμη καθοδήγησή του και τις χρήσιμες συμβουλές του καθόλη τη διάρκεια της διατριβής.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ.Χριστίνα Κατσιάρη για την καθοδήγησή της, τις πολύτιμες επισημάνσεις και συμβουλές της για την περάτωση της διατριβής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου της Ρευματολογικής κλινικής και ιδιαίτερα τον ιατρό κ.Σωτήριο Τσιόγκα και τον βιολόγο κ.Αθανάσιο Μαυρόπουλο για τη σημαντική τους βοήθεια - συμβολή και άψογη συνεργασία στο εργαστηριακό μέρος της διατριβής. Ευχαριστώ, επίσης την ιατρό κ.Θεοδώρα Σιμοπούλου για την άψογη συνεργασία μας για τη συλλογή των δεδομένων και δειγμάτων από το Ειδικό εξωτερικό ιατρείο Σκληροδέρματος, ιδιαιτέρως τον ιατρό κ.Ιωάννη Αλεξίου για την παραχώρηση εικόνων τριχοειδοσκόπησης από το προσωπικό του αρχείο. Οφείλω ακόμη να ευχαριστήσω όλους τους ιατρούς, νοσηλευτές, τη γραμματεία της Ρευματολογικής κλινικής και κλινικής Ανοσολογίας του ΠΓΝ Λάρισας για τη συνεργασία και τη βοήθεια τους.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, τον σύζυγό μου Κώστα και τους γιους μας Γιώργο και Βασίλη για την υπομονή τους, τη συμπαράστασή τους και τη συνεχή ενθάρρυνσή τους.

ΕΥΑΓΓΕΛΗ ΚΟΥΡΚΟΥΝΗ

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Προσωπικά στοιχεία:

Όνοματεπώνυμο: **ΕΥΑΓΓΕΛΗ ΚΟΥΡΚΟΥΝΗ**

Όνομα πατέρα: Βασίλειος

Όνομα Μητέρας: Παρασκευή

Ημερομηνία Γέννησης: ***

Τόπος Γέννησης: ***

Εθνικότητα: Ελληνική

Οικογενειακή Κατάσταση: ***

Διεύθυνση Επικοινωνίας: *** Σταθ. Τηλέφωνο: ***

Κινητό Τηλέφωνο: ***

Email: **lkourkouni2@gmail.com**

Αφαίρεση προσωπικών δεδομένων
(Υπηρεσία Βιβλιοθήκης &
Πληροφόρησης Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας)

Σπουδές:

2000: Απόκτηση απολυτηρίου Ενιαίου Λυκείου Πύλης

Βαθμός 19 και 7/10

2006: Απόκτηση Πτυχίου Ιατρικής

Ιατρικής Σχολής Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Βαθμός Πτυχίου: 7,15 (Λίαν Καλώς)

2018: Απόκτηση τίτλου ιατρικής ειδικότητας (Ιατρός Ρευματολόγος)

2020: Απόκτηση Μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών « Άσκηση και Υγεία »
Τμήμα: ΤΕΦΑΑ, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Βαθμός Πτυχίου : 9,52

Γνώση Αγγλικής γλώσσας:

Τίτλος Πτυχίου First Certificate in English (Cambridge)

Επαγγελματική Εμπειρία:

5/5/2008 - 4/8/2008: Τρίμηνη εκπαίδευση στο Γενικό Νοσοκομείο Καρδίτσας (ισόχρονη τοποθέτηση σε παθολογικό και χειρουργικό τομέα)

5/8/2008 - 21/7/2009: Υποχρεωτική υπηρεσία υπαίθρου στο Π.Ι. Δρακότρυπας και εκτέλεση εφημεριών στο Κ.Υ. Μουζακίου

25/5/2010 - 2/6/2010 & 31/3/2011-22/9/2012: Ειδικευόμενη Ιατρός Παθολογίας στη Β΄ Παθολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας

07/07/2014 - 14/07/2018: Ειδικευόμενη Ρευματολογίας στην Κλινική Ρευματολογίας και κλινικής Ανοσολογίας του Π.Γ.Ν. Λάρισας

12/12/2018 έως και σήμερα Επικουρικός Ιατρός Ρευματολόγος στο ΓΝ Καρδίτσας

Διδακτική Εμπειρία:

16/02/2007-29/06/2007: Ωρομίσθια εκπαιδεύτρια στο μάθημα Φαρμακευτική Τεχνολογία στο Ι.Ε.Κ. Καρδίτσας

10/2007-02/2008: Ωρομίσθια εκπαιδεύτρια στα μαθήματα Δερματολογία, Πρώτες Βοήθειες Υγιεινή & Ασφάλεια Εργασιακού Χώρου, Υγιεινή Πρόληψη Ατυχημάτων στο Ι.Ι.Ε.Κ Τρικάλων

Ωρομίσθια εκπαιδεύτρια στο μάθημα Νοσηλευτική Τραυματολογία στο Ι.Ε.Κ Τρικάλων

Συμμετοχή σε κλινικές μελέτες:

1. Μια Διερευνητική Μελέτη Φάσης II του Mavrilimumab σε σύγκριση με τη θεραπεία έναντι του Παράγοντα Νέκρωσης των Όγκων (Anti TNF) σε ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα EarthExplorerX.

Ρόλος: Pharmasist

2. Μια Τυχαιοποιημένη, Διπλά Τυφλή, Ελεγχόμενη με Εικονικό Φάρμακο Μελέτη Φάσης 3 για την Αξιολόγηση της Αποτελεσματικότητας και της Ασφάλειας του Brodalumab σε Ασθενείς με Ψωριασική Αρθρίτιδα: AMVISION-2

Ρόλος: Blinded ESR Assessor

Ανακοινώσεις επιστημονικών εργασιών σε ιατρικά συνέδρια (poster):

1. **Ε. Κουρκούνη**, Σ. Θανέλλας, Σ. Ευαγγέλου, Κ. Κουτσιανάς, Σ. Ξηρομερίτη, Δ. Ζευγαράς, Μ. Τζαφάλια, Α. Μιχαήλ, Ο. Αλμανίδου, Α. Παπαγεωργίου, Ε. Αρχοντής. Περιστατικό ασθενούς με αυξημένα επίπεδα κρεατινικής φωσφοκινάσης (CPK) και λήψη ρανελικού στροντίου για οστεοπόρωση. 38^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο 16-19 Μαΐου 2012, Αθήνα (Βιβλίο Περιλ.: σελ.126)
2. **Ε. Κουρκούνη**, Σ. Θανέλλας, Σ. Ευαγγέλου, Κ. Κουτσιανάς, Δ. Ζευγαράς, Α. Μιχαήλ, Ο. Αλμανίδου, Ε. Αρχοντής. Παρουσίαση περιστατικού με υφηπατική εντόπιση σκωληκοειδούς αποφύσεως. 4^ο Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδας 2012, Λάρισα 29-31 Μαρτίου 2012 (Βιβλίο Περιλ.: σελ.91)
3. Α. Μιχαήλ, Ε. Αρχοντής, Ε. Εξάρχου, Ο. Αλμανίδου, Σ. Θανέλλας, Δ. Ζευγαράς, Κ. Κουτσιανάς, Σ. Ευαγγέλου, **Ε. Κουρκούνη**, Σ. Ξηρομερίτη. Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά ασθενών που νοσηλεύτηκαν λόγω ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (ΑΕΕ) στο νοσοκομείο Καρδίτσας. 4^ο Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδας 2012, Λάρισα 29-31 Μαρτίου 2012 (Βιβλίο Περιλ.: σελ.105)
4. Σ. Ευαγγέλου, Σ. Θανέλλας, **Ε. Κουρκούνη**, Κ. Κουτσιανάς, Δ. Ζευγαράς, Α. Μιχαήλ, Ο. Αλμανίδου, Ε. Αρχοντής. Περιστατικό αμφοτερόπλευρης σταφυλοκοκκικής δερματίτιδας. 4^ο Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδας 2012, Λάρισα 29-31 Μαρτίου 2012 (Βιβλίο Περιλ.: σελ.123)
5. **Ε. Kourkouni**, T. Simopoulou, G. Mitsiogiannis, C. Liaskos, Z. Daniil, K. Gourgoulialis, D.P. Bogdanos, L.I. Sakkas. Case Report: Interstitial lung diseases in the context of anti – synthetase syndrome in a woman presented with fever, arthralgias and dyspnea. 1^ο Πανελλήνιο

Πολυθεματικό Συνέδριο Αυτοάνοσων Νοσημάτων, Ρευματολογίας και κλινικής Ανοσολογίας, Κοινές Συναντήσεις Ρευματολογίας, Δερματολογίας, Νευρολογίας και Γαστρεντερολογίας. 5-7 Απριλίου 2019, Πήλιο (Βιβλίο Περιλ.: σελ.28)

6. C. Liaskos, E. Patrikiou, **E. Kourkouni**, N. Kokkali, T. Scheper, W. Meyer, T. Simopoulou, E. Dardiotis, Z. Daniil, L.I. Sakkas, D.P. Bogdanos. Profile testing of inflammatory myopathy – related autoantibodies and unconventional anti-synthetasi antibodies drastically contributes to confirm disease diagnosis. 12th International Congress on Autoimmunity 2021. 28 May-1 June 2021, Virtual Congress

Ομιλίες σε συνέδρια:

1. «Παρουσίαση Περιστατικού : Οξεία κοιλία και σπασμοί». Εαρινές Ημέρες Ρευματολογίας (23-26 Απριλίου 2015, Ρέθυμνο Κρήτης)
2. «Επίλυση Κλινικού Προβλήματος». 5^ο Συνέδριο Ρευματικών & Αυτοάνοσων Παθήσεων Κεντρικής Ελλάδας (25-27 Σεπτεμβρίου 2015, Λάρισα)
3. «Κλινικό Πρόβλημα. Νεκρωτικές Βλάβες Δέρματος» 6^ο Συνέδριο Ρευματικών & Αυτοάνοσων Παθήσεων Κεντρικής Ελλάδας (30 Σεπτεμβρίου-2 Οκτωβρίου 2016, Λάρισα)
4. «Επίλυση Κλινικού Προβλήματος». 7^ο Συνέδριο Ρευματικών & Αυτοάνοσων Παθήσεων Κεντρικής Ελλάδας (22-24 Σεπτεμβρίου 2017, Λάρισα)

5. «Επίλυση Κλινικού Προβλήματος». Φθινοπωρινή Επιστημονική Εκδήλωση 2017, Αυτοάνοσα, Ρευματικά και Μεταβολικά Νοσήματα (24-26 Νοεμβρίου 2017, Πορταριά Μαγνησίας)
6. «Συζήτηση Κλινικού Περιστατικού». Εαρινές Ημέρες Ρευματολογίας (1-3 Ιουνίου 2018, Βόλος)
7. «Επίλυση Κλινικού Προβλήματος». 8^ο Συνέδριο Ρευματικών & Αυτοάνοσων Παθήσεων Κεντρικής Ελλάδας (14-16 Σεπτεμβρίου 2018, Λάρισα)
8. «Συστηματική Σκλήρυνση - Σκληρόδερμα, Συννοσηρότητες». Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο 2018. Αυτοάνοσα, Ρευματικά, Μυοσκελετικά και Μεταβολικά Νοσήματα-Συνεργασία Ιατρικών Ειδικοτήτων, (5-7 Οκτωβρίου 2018, Ιωάννινα)
9. «Μητρότητα και Γυναίκες με Ρευματικές Παθήσεις». Ημερίδα του Συλλόγου ΕΛΕΑΝΑ με θέμα : «Ρευματικά Νοσήματα Έγκυρη και Έγκαιρη Διάγνωση-Προσέγγιση & Θεραπευτική Αντιμετώπιση» (8 Ιουνίου 2019, Καρδίτσα)
10. «Φάρμακα και Κύηση στους Ρευματολογικούς Ασθενείς». Εαρινή Επιστημονική Εκδήλωση 2019. Αυτοάνοσα, Ρευματικά, Μυοσκελετικά και Μεταβολικά Νοσήματα-Συνεργασία Ιατρικών Ειδικοτήτων (28-30 Ιουνίου 2019, Θεσσαλονίκη)
11. «Αντιφωσφολιπιδικό Σύνδρομο. Διαγνωστική Προσέγγιση και Προβληματισμοί». 2^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο 2019. Αυτοάνοσα, Ρευματικά, Μυοσκελετικά και Μεταβολικά Νοσήματα-Συνεργασία Ιατρικών Ειδικοτήτων (15-17 Νοεμβρίου 2019, Βόλος)

12. «Κλινικά Περιστατικά Ογκολογίας Ρευματολογίας». 2^ο Πανελλήνιο Πολυθεματικό Συνέδριο Αυτοάνοσων Νοσημάτων, Ρευματολογίας και κλινικής Ανοσολογίας (25-27 Σεπτεμβρίου 2020, Λίμνη Ν. Πλαστήρα, Καρδίτσα)

13. «Εμβόλια σε Ανοσοκατασταλμένους Ασθενείς». Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο 2020. Αυτοάνοσα, Ρευματικά, Μυοσκελετικά και Μεταβολικά Νοσήματα-Συνεργασία Ιατρικών Ειδικοτήτων (15-20 Δεκεμβρίου 2020, Διαδικτυακή Διεξαγωγή)

14. «Σκληρόδερμα και Συννοσηρότητες». ». Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο 2023. Αυτοάνοσα, Ρευματικά, Μυοσκελετικά και Μεταβολικά Νοσήματα-Συνεργασία Ιατρικών Ειδικοτήτων (15-17 Δεκεμβρίου 2023, Θεσσαλονίκη)

Συμμετοχή σε Φροντιστήρια / Σεμινάρια :

1. Παρακολούθηση του 3^{ου} Διαπανεπιστημιακού Προγράμματος Εκπαίδευσης στη Ρευματολογία (Σεπτέμβριος 2015-Φεβρουάριος 2018)

2. 5th International Musculoskeletal Ultrasound Course (Basic Level)
Athens, Greece (29/11/2018-01/012/2018)

3. 6th International Musculoskeletal Ultrasound Course (Intermediate Level)
Athens, Greece (28/11/2019-30/11/2019)

4. 9th International Musculoskeletal Ultrasound Course (Intermediate Level)
Athens, Greece (30/11/2023-02/12/2023)

Δημοσιεύσεις άρθρων στον διεθνή ιατρικό τύπο:

1. Efstratiadis G, Voulgaridou A, Nikiforou D, Kyventidis A, **Kourkouni E**, Vergoulas G. Rhabdomyolysis updated. Hippokratia. 2007 Jul;11(3):129-37. PMID: 19582207; PMCID: PMC2658796.
2. **Kourkouni E**, Mitsogiannis G, Simopoulou T, Liaskos C, Katsiari CG, Daniil Z, Gourgoulialis K, Bogdanos DP, Sakkas LI. Interstitial Lung Disease in Anti-Synthetase Syndrome. Mediterr J Rheumatol. 2019 Sep 30;30(3):186-189. doi: 10.31138/mjr.30.3.186. PMID: 32185363; PMCID: PMC7045864.
3. Michail A, Exarchou E, Cholevas N, **Kourkouni E**, Archontis E, Papageorgiou A. Acute pancreatitis and severe hypercalcemia due to milk-alkali syndrome. Gazzetta Medica Italiana Archivio per le Scienze Mediche 2013 October;172(10):807-10

Δημοσιεύσεις με τα δεδομένα της μελέτης της διατριβής:

1. **Kourkouni E**, Tsiogkas SG, Mavropoulos A, Simopoulou T, Katsiari CG, Bogdanos DP, Sakkas LI. CD32 (FcγRIIB) expression is low on CD21^{low} B cells from systemic sclerosis patients with digital ulcers, interstitial lung disease, and anti-topoisomerase I autoantibodies. Clin Immunol. 2024 Mar 15;262:110195. doi: 10.1016/j.clim.2024.110195. Epub ahead of print. PMID: 38494058.
2. **E. Kourkouni**, A. Mavropoulos, S.G.Tsiogkas, T.Simopoulou, C.G.Katsiari, D.B. Bogdanos, L.I. Sakkas. Low CD32 expression accounts for the association of CD21^{low} B cells with digital ulcers in Systemic sclerosis. 23rd European Congress of Rheumatology 31 May-3 June 2023, Milan / poster. Abstract book: Ann Rheum Dis, June 2023;82(Suppl 1): , DOI: 10.1136/annrheumdis-2023-eular.5100, page 1011.
3. **E. Kourkouni**, A. Mavropoulos, S.G.Tsiogkas, T.Simopoulou, C.G.Katsiari, D.B. Bogdanos, L.I. Sakkas. CD32RIIB expression is low on CD21^{low} B cells from systemic sclerosis patients with digital ulcers, interstitial lung disease, and anti - topoisomerase I autoantibodies. 8th Systemic Sclerosis World Congress 14-16 March 2024, Prague / poster Abstract book: J Scleroderma Relat Disord 2024;9 (IS)3-60):370-371.

« ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΙΑΣ ΤΩΝ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ»

ΚΟΥΡΚΟΥΝΗ ΕΥΑΓΓΕΛΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2024

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Λάζαρος Σακκάς**, Ομότιμος Καθηγητής Τμ. Ιατρικής ΠΘ (Επιβλέπων)
2. **Δημήτριος Μπόγδανος**, Καθηγητής Τμ. Ιατρικής ΠΘ
3. **Χριστίνα Κατσιάρη**, Αν. Καθηγήτρια Τμ. Ιατρικής ΠΘ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η Συστηματική Σκλήρυνση (ΣΣκ) είναι μια συστηματική νόσος του συνδετικού ιστού, που χαρακτηρίζεται από μικροαγγειοπάθεια, παραγωγή αυτοαντισωμάτων και εκτεταμένη εναπόθεση κολλαγόνου. Η παθογένεια της νόσου δεν είναι πλήρως γνωστή και οι κλινικές της εκδηλώσεις ποικίλλουν. Σημαντικό ρόλο στην παθογένειά της διαδραματίζουν τα Β λεμφοκύτταρα. Η κλινική μας βρήκε ελάττωση των ρυθμιστικών Β λεμφοκυττάρων στη ΣΣκ, που άφηνε με μειωμένη ανασταλτική επίδραση τα εκτελεστικά (effective) Β κύτταρα. Τα CD21^{low} Β κύτταρα είναι αυξημένα σε διάφορες αυτοάνοσες παθήσεις και περιέχουν αυτοαντιδραστικά κύτταρα.

Σκοπός: Σκοπός της μελέτης μας ήταν να μελετήσουμε τη σημασία των CD21^{low} Β κύτταρων στη ΣΣκ. Για το σκοπό αυτό μελετήσαμε τα CD21^{low} κύτταρα και την συσχέτισή τους με όλες τις σημαντικές εκφάνσεις της νόσου. Έπειτα μελετήσαμε τον CD32 υποδοχέα των Β κύτταρων (τα Β κύτταρα εκφράζουν σχεδόν αποκλειστικά μόνο μία από τις τρεις ισομορφές του CD32 υποδοχέα, την FcγRIIB ισομορφή, που έχει ανασταλτική δράση, και την συσχέτιση του με τις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου. Τέλος, διερευνήσαμε κατά πόσο αυτά τα Β λεμφοκύτταρα είναι αυτοαντιδραστικά έναντι της Τοποϊσομεράσης I.

Ασθενείς: Στη μελέτη συμμετείχαν είκοσι-επτά ασθενείς (21 γυναίκες, με μέση ηλικία 55,6 έτη, 7 άνδρες, με μέση ηλικία 59,5 έτη), που παρακολουθούνταν στο Εξωτερικό Ιατρείο της Ρευματολογικής κλινικής και Κλινικής Ανοσολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, καθώς και 15 υγιή άτομα (healthy controls, HCs). Οι ασθενείς πληρούσαν τα κριτήρια της ACR/EULAR του 2013 για την ΣΣκ. Από κάθε ασθενή ελήφθησαν 20 mL περιφερικού αίματος μετά από ενημερωμένη συγκατάθεση. Η μελέτη έγινε μετά από έγκριση της Τοπικής Επιτροπής Δεοντολογίας.

Μέθοδοι: Έγινε απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από το περιφερικό αίμα ύστερα από φυγοκέντρηση σε Ficoll και ανάλυση επιφανειακών δεικτών Β κυττάρων με τη χρήση

κυτταρομετρίας ροής ύστερα από χρώση με τα μονοκλωνικά αντισώματα anti-CD19, anti-CD27, anti-CD32 (που αναγνωρίζει και τις δύο ισομορφές FcγRIIA και FcγRIIB) και anti-CD21. Τέλος, αξιολογήθηκαν τα B κύτταρα που αναγνωρίζουν την Τοποϊσομεράση I (αντι-Τοπο I).

Αποτελέσματα: Από τους 27 ασθενείς οι 14 είχαν ιστορικό ή και ενεργό δακτυλικό έλκος, 10 ασθενείς είχαν διάμεση πνευμονική ίνωση, και 17 ασθενείς είχαν αντι-Τοπο I αντισώματα. Το ποσοστό CD21^{low} B κυττάρων (51,33%) ήταν αυξημένο στην ομάδα ασθενών με δακτυλικά έλκη (ΔΕ) σε σχέση με τους HCs (28,15%, $p=0,014$) και σε σχέση με τους ασθενείς που δεν είχαν ΔΕ (29,34%, $p=0,042$). Το ποσοστό των CD21^{low} B κυττάρων στην ομάδα ασθενών με Διάμεση Πνευμονική Ίνωση ήταν 53,1% στατιστικώς σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με τους υγιείς (28,1% $p=0,014$), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στην ομάδα των ασθενών χωρίς Διάμεση Πνευμονική Ίνωση ήταν 33,47% - μη στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,08$). Το ποσοστό των CD21^{low} B κυττάρων στην ομάδα των ασθενών με θετικά αντι-Τοπο I αντισώματα ήταν 48,6% και παρουσίαζε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα των ασθενών χωρίς αντι-Τοπο I αντισώματα (27,3%, $p=0,025$), όχι όμως με την ομάδα των υγιών (28,1%, $p=1,1$). Τα CD21^{low} κύτταρα δεν ήταν αυξημένο στους ασθενείς με ΣΣκ συνολικά σε σχέση με τους υγιείς (HCs) (40,7% vs 28,15% $p=0,10$).

Το ποσοστό των CD21^{low}CD32^{low} B κυττάρων ήταν σημαντικά αυξημένο σε ασθενείς με δακτυλικά έλκη (23,82%) σε σύγκριση με τους HCs (4,43%, $p=0,009$) και τους ασθενείς χωρίς εκδήλωση δακτυλικών ελκών (4,39%, $p=0,015$). Ακόμη, τα CD21^{low}CD32^{low} B κύτταρα βρέθηκαν αυξημένα στους ασθενείς με διάμεση πνευμονοπάθεια (28,43%), σε σύγκριση με τους HCs (4,43%, $p=0,001$) καθώς και σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς διάμεση πνευμονοπάθεια (6,25%, $p=0,007$). Το ποσοστό των CD21^{low}CD32^{low} B κυττάρων ήταν επίσης αυξημένο (21.54%) στους αντι-Τοπο I θετικούς ασθενείς σε σχέση με τους HCs (4,43%, $p=0,012$) και σε σχέση με τους αντι-Τοπο I-αρνητικούς ασθενείς (2,45%, $p=0,022$). Στην παρούσα κλινική μελέτη δεν βρέθηκε διαφορά στο ποσοστό των CD21^{low}CD32^{low} B

κυττάρων μεταξύ αντρών και γυναικών ασθενών (14,61% vs 14,43%, $p=0,98$). Επίσης, το ποσοστό των $CD21^{low}CD32^{low}$ B κύτταρων δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική αύξηση στο σύνολο των ασθενών με ΣΣκ σε σύγκριση με τους υγιείς (14,47%, 4,43% $p=0,08$).

Τέλος, τα $CD32^{low}$ B κύτταρα κυρίως αναγνώριζαν την Τοποϊσομεράση I σε σύγκριση με τα $CD32^{+}$ B κύτταρα (μέση διαφορά 35,18, 95% CI 26,89 έως 43,47, $p=0,0003$), ενώ η έκφραση των υποδοχέων της Τοπο I ήταν αυξημένη στα $CD32^{low}$ B κύτταρα σε σχέση με τα $CD32^{+}$ B κύτταρα.

Συμπέρασμα: Η αύξηση των $CD21^{low}CD32^{low}$ B κυττάρων σε ασθενείς με κύριες παθογενετικές εκδηλώσεις της νόσου (μικροαγγειοπάθεια, ίνωση, αντι-Τοπο I αυτοαντισώματα) περαιτέρω υποστηρίζει τον αυτοαντιδραστικό χαρακτήρα των $CD21^{low}CD32^{low}$ B κυττάρων στην ΣΣκ.

ABSTRACT

Introduction: Systemic sclerosis (SSc) is a systemic autoimmune disease characterized by microvasculopathy, autoantibodies (autoAbs), and excessive collagen deposition. The pathogenesis of this disease is incompletely understood and the clinical manifestations vary. B cells play an important role in its pathogenesis. Our clinic reported a reduction of regulatory B cells in SSc, that results in reduced inhibitory effects on B effector cells. CD21^{low} B cells are increased in many autoimmune diseases and were reported to include autoreactive cells.

Aim: The aim of our study was to study the significance of CD21^{low} B lymphocytes in SSc. Therefore, we studied CD21^{low} B cells and their relation to the main aspects of the disease. We also studied CD32 receptors of B cells (B lymphocytes express almost exclusively, one of the three isoforms of the CD32 receptor, the inhibitor FcγRIIB isoform), and B cells that recognize Topoisomerase I (Topo I).

Patients: Our study included twenty-seven patients (21 women, median age 55,6 years, 7 men, median age 59,5 years), followed up in the Outpatient Clinic of the Department of Rheumatology and clinical Immunology of the University General Hospital of Larissa, and 15 age-and sex-matched healthy controls (HCs). Patients were fulfilling the ACR / EULAR 2013 criteria for SSc. All participants gave their informed consent. The study was carried out after the approval of the ethics committee.

Methods: Mononuclear cells were isolated from 20 mL of peripheral blood after centrifugation in Ficoll and B cell surface markers were detected using multicolor flow cytometry with the monoclonal antibodies anti-CD19, anti-CD27, anti-CD32 (which recognizes both isoforms FcγRIIA and FcγRIIB) and anti-CD21. In addition, recombinant Topo I was APC-conjugated to detect B cells recognizing Topo I.

Results: Fourteen patients had a history or active digital ulcer, 10 patients had interstitial lung disease and 17 patients had anti-Topo I antibodies. The percentage of CD21^{low} B cells was

significantly increased in patients with DUs (51.33%) compared to HCs (28.15%, $p=0.014$) and to patients without DUs (29.34%, $p=0.042$) and in patients with Interstitial Lung Disease (ILD) (53.1%) compared to HCs (28.1% $p=0.014$). There was no statistically significant difference of CD21^{low} B cells between the ILD group and the non-ILD (33.47%, $p=0.08$). The percentage of CD21^{low} B cells in the anti-Topo I-positive patient group (48.6%), was significantly increased compared to anti-Topo I-negative patient group (27.3%, $p=0.025$), but not significantly so compared to HCs (28.1%, $p=1.1$). CD21^{low} B cells were not significantly increased in SSc patients compared to HCs (40.7% vs 28.15%, $p=0.10$).

The percentage of CD21^{low}CD32^{low} B cells was significantly increased in patients with DUs (23.82%) compared to HCs (4.43%, $p=0.009$) and to patients without DUs (4.39%, $p=0.015$). CD21^{low}CD32^{low} B cells were also significantly increased in the ILD group (28.43%) compared to HCs (4.43%, $p=0.001$) and to non-ILD group (6.25%, $p=0.007$) and in the anti-Topo I-positive patients (21.54%) compared to HCs (4.43%, $p=0.012$) and to anti-Topo I-negative patients (2.45%, $p=0.022$). No difference was found in the percentage of CD21^{low}CD32^{low} B cells between men and women patients (14.61% vs 14.43%, $p=0.98$). Also, the percentage of CD21^{low}CD32^{low} B cells did not show a statistically significant increase in all patients with SSc compared to HCs (14.47%, 4.43% $p=0.08$).

CD32^{low} B cells predominantly recognized Topo I compared to CD32⁺ B cells (mean difference 35.18, 95%CI 26.89 to 43.47, $p=0.0003$). Also, the expression of B cell receptors for Topo I was higher on CD32^{low} B cells compared to CD32⁺ B cells.

Conclusion: The increased percentage of CD21^{low}CD32^{low} B cells in patients with main pathogenetic aspects of SSc (microangiopathy, ILD, and anti-Topo I autoantibodies) further supports the autoreactive nature of CD21^{low}CD32^{low} B cells in SSc.

Πίνακας Περιεχομένων

Πίνακας Περιεχομένων	20
1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	21
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	22
1.2 ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	25
1.3 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ	28
1.4 ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	41
1.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ	43
1.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ – ΠΡΟΓΝΩΣΗ	46
1.7 ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΟ ΣΚΛΗΡΟΔΕΡΜΑ	48
1.7.1 Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	48
1.7.2 Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	52
2 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	59
2.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	60
2.2 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	60
2.2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ	60
2.2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	64
2.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	72
2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	72
2.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	85
2.6 ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ	89
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	92

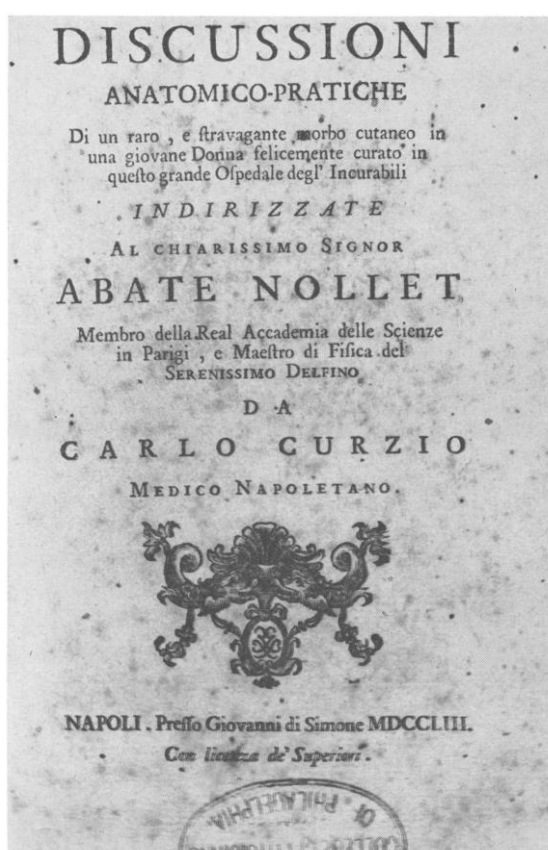
1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Συστηματική Σκλήρυνση (ΣΣκ) ή αλλιώς σκληρόδερμα είναι μια συστηματική νόσος, η αιτιοπαθογένεια της οποίας δεν έχει αποσαφηνιστεί. Στην παθογένεια της νόσου φαίνεται να συμμετέχουν τρεις βασικούς μηχανισμοί που περιλαμβάνουν την παραγωγή αυτοαντισωμάτων, την μικροαγγειοπάθεια, και την αυξημένη και εκτεταμένη εναπόθεση κολλαγόνου και άλλων συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας [1].

Οι πρώτες αναφορές για ασθενείς με δερματικές βλάβες παρόμοιες με το σκληρόδερμα βρέθηκαν σε σημειώσεις του Paulus Aegineta περίπου το 690 π.Χ. καθώς και του Ιπποκράτη και του Oribasius περί το 400 π.Χ. Ωστόσο, η πρώτη επίσημη καταγραφή έγινε το 1753 μ.Χ. από τον Ιταλό Carlo Curzio που ανακοίνωσε στον τότε ιατρικό κόσμο μια γυναίκα ασθενή 17 ετών, που παρουσίαζε περιοχές με σκληρό δέρμα. Κάθε περιοχή είχε διαφορετικής έντασης σκληρία, όπως περιγράφει χαρακτηριστικά, και στις σκληροδερματικές αυτές βλάβες η θερμοκρασία ήταν χαμηλότερη από το υπόλοιπο μη πάσχον δέρμα. Για την θεραπευτική αντιμετώπιση της ασθενούς χορηγήθηκαν τότε μικρές δόσεις υδραργύρου, ζεστό γάλα καθώς και συστηματικά ατμόλουτρα, που είχαν ως αποτέλεσμα 11 μήνες μετά να καταγράφεται το δέρμα στις πάσχουσες περιοχές μαλακό, με πλήρη αποκατάσταση των λειτουργιών του. Η πρώτη αυτή αναφορά προξένησε μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον [2]. Στην Εικόνα 1.1 παρουσιάζεται το εξώφυλλο από την πρώτη αυτή δημοσίευση. Έκτοτε, ακολούθησαν αρκετές καταγραφές με περιστατικά ασθενών με σκληροδερμία καθώς και προσπάθειες κατανόησης της νόσου. Το 1924 έγινε προσπάθεια από τον Winterbauer για κατηγοριοποίηση των κλινικών εκδηλώσεων. Έτσι, μια ομάδα ασθενών με ασβετώσεις, φαινόμενο Raynaud, σκληροδακτυλία, τηλεαγγειακτασίες ονομάστηκε από τα λατινικά αρχικά των συμπτωμάτων ως CRST (Calcinosis, Raynaud, Sclerodactyl, Telangiectasies). Αργότερα ο Velayos πρόσθεσε στην ομάδα αυτή και τη δυσκινησία οισοφάγου (Esophagus, E) και η ομάδα αυτή των συμπτωμάτων ονομάστηκε CREST, ονομασία που παραμένει μέχρι σήμερα [3].

Στις επόμενες δεκαετίες περιεγράφηκαν πολλές κλινικές εκδηλώσεις που αποδόθηκαν στη νόσο και τελικά μετά το 1980 συμφωνήθηκαν τα πρώτα διαγνωστικά της κριτήρια [3]. Ανακαλύπτεται ο ρόλος των αυτοαντισωμάτων στην παθογένεια της νόσου και ο LeRoy με την ομάδα του προτείνει τη διάκριση του σκληροδέρματος σε δύο κύριες ομάδες: το περιορισμένο δερματικό (limited cutaneous) και το διάχυτο δερματικό (diffuse cutaneous) [4]. Το πρώτο παγκόσμιο ιατρικό συνέδριο ΣΣκ πραγματοποιήθηκε μόλις το 2010 και από τότε μέχρι σήμερα αρκετές μελέτες και θεραπευτικά πρωτόκολλα έχουν συμβάλει στην κατανόηση της νόσου και την πιο αποτελεσματική θεραπευτική της αντιμετώπιση [5].



Εικόνα 1.1. Το εξώφυλλο από την πρώτη καταγραφή παρουσίασης σκληροδερμίας σε μια νεαρή ασθενή, γυναίκα 17 ετών από τον Dr. Carlo Curzio [2]

Η ΣΣκ είναι μια μη μεταδιδόμενη επίκτητη νόσος, με σποραδική παγκόσμια κατανομή. Η επίπτωση και ο επιπολασμός της, παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση στις διάφορες

πληθυσμιακές ομάδες, στοιχείο που ενισχύει ταυτόχρονα τη συμμετοχή του γενετικού υπόβαθρου, σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες [6]. Ωστόσο, η εμφάνιση της νόσου σε ποσοστό παρόμοιο σε μονοζυγωτικούς και διζυγωτικούς διδύμους (περίπου 4,7%) και η έλλειψη οικογενούς μορφής, παρά το γεγονός ότι έχουν ταυτοποιηθεί ίδιοι υπότυποι HLA και ίδιες κατηγορίες αυτοαντισωμάτων μέσα στις οικογένειες υποδηλώνει ότι οι γενετικοί παράγοντες δεν παίζουν μείζονα ρόλο στην εμφάνιση της νόσου [7,8].

Η ετήσια επίπτωσή πριν το 2004 κυμαινόταν σε 1-20 νέους ασθενείς ανά 100.000 άτομα [9]. Για την χώρα μας η ΣΣκ παρουσίαζε επιπολασμό 0,06% στην κεντρική Ελλάδα το 2010, και στην βορειοδυτική Ελλάδα, από το 1981 έως το 2002, επιπολασμό 15,4 ασθενείς ανά 100.000 κατοίκους και επίπτωση 1,1 νέων ασθενών ανά 100.000 κατοίκους [10,11]. Η παγκόσμια επίπτωση υπολογίζεται σε 8-56 νέα άτομα/10⁶/ έτος, ενώ ο επιπολασμός σε 38-341 ασθενείς/10⁶ [12].

Η νόσος εμφανίζεται πιο συχνά στις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες με αναλογία 8-9:1 [12]. Παρόλα αυτά όμως, οι πιο σοβαρές κλινικές εκδηλώσεις, εμφανίζονται πιο συχνά στους άνδρες [13]. Εξαιρέση αποτελεί η Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση, που δείχνει αύξηση της επίπτωσής της στις γυναίκες [13]. Συσχέτιση φάνηκε να καταγράφεται ανάμεσα στην έναρξη της νόσου και την ηλικία εμφάνισης [13]. Είναι μια νόσος που προσβάλλει όλες τις ηλικίες, αλλά εμφανίζεται πιο συχνά σε άτομα ηλικίας 35 έως 65 ετών. Στην παιδική ηλικία εμφανίζεται σπάνια και παρουσιάζει ήπια κλινική εικόνα και πορεία νόσου. Επίσης, ανάμεσα στους ενήλικες η πορεία της νόσου εξελίσσεται διαφορετικά.

Οι Αφροαμερικανοί άντρες προσβάλλονται κυρίως στη δεκαετία 45-54 έτη, ενώ οι λευκές γυναίκες πιο συχνά στη δεκαετία 65-74 έτη [14].

1.2 ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η αιτιοπαθογένεια της ΣΣκ είναι κατά κύριο λόγο άγνωστη. Είναι πιθανό ότι η νόσος αρχίζει από την αλληλεπίδραση ανάμεσα στο ενδοθήλιο των μικρών αγγείων και το ανοσολογικό σύστημα που οδηγεί στη βλάβη του ενδοθηλίου των αρτηριολίων και την αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου και άλλων ουσιών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. [15].

Το περιβάλλον, επίσης, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο. Το ποσοστό με το οποίο εμφανίζεται η νόσος στα άτομα της ίδιας οικογένειας είναι 1,6% (που υποδηλώνει κοινά γονίδια ή περιβάλλον), ενώ στο γενικό πληθυσμό είναι 0,026% [16]. Τα μέλη της ίδιας οικογένειας που προσβάλλονται από τη νόσο, έχουν κάποιες φορές κοινά αντιγόνα HLA και αυτοαντισώματα [17], όμως, το ποσοστό εμφάνισής της μεταξύ μονοζυγωτικών και διζυγωτικών διδύμων είναι σχεδόν ίδιο, 4,2% και 5,6% που δείχνει το σημαντικό ρόλο του περιβάλλοντος [7].

Τα αλληλία HLA φαίνεται να συσχετίζονται με αυτοαντισώματα. Σε μια μεγάλη μελέτη παρατήρησης ασθενών με ΣΣκ, Αφροαμερικανών ασθενών και Ευρωπαίων, βρέθηκε ότι στους Αφροαμερικανούς με ΣΣκ το HLA-DRB1*08:04 και HLADRB1*11:02 συσχετίστηκαν με τα αυτοαντισώματα έναντι φιμπριλλαρίνης. Στους Ευρωπαίους με ΣΣκ το HLA-DPB1*13:01 και HLA-DRB1*07:01 συσχετίστηκαν με τα αυτοαντισώματα έναντι της Τοποϊσομεράσης I (Τοπο I, ScI70) και τα αντικεντρομεριδιακά αντισώματα (ACA) [18]. Ακόμη έχουν συσχετισθεί με την παθογένεια της νόσου, ο αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης που συνεισφέρει στη δημιουργία της ίνωσης [18], διάφορα miRNAs, γονίδια που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των T-κυττάρων (STAT4, PJP22, IL12RB2, PAD14) [15], τη φυσική ανοσία (interferon type I, IRF5, IRF7, TLR2) και την ανοσολογική σηματοδότηση (Blank1, BLK, FAS, TNFAIP3, CD247) [17].

Πολύ σημαντική είναι και η συμμετοχή της ιντερφερόνης α (interferon α , IFN α) στη ΣΣκ. Η έκφρασή της είναι μεγαλύτερη στα πρώιμα στάδια της νόσου και κυρίως στην περιορισμένη μορφή σκληροδερμίας. Προάγει την έκφραση του υποδοχέα TLR3 (Toll Like Receptor 3)

στην επιφάνεια των ινοβλαστών, με αποτέλεσμα να προκαλείται παραγωγή προ-κολλαγόνου [15].

Τα μόρια που συνδέονται με TLRs διεγείρουν τα δενδριτικά κύτταρα για να παράγουν IFN- α και ιντερλευκίνη (IL)-6, που με τη σειρά τους ενεργοποιούν τα κύτταρα Th2, που παράγουν IL-4 και IL-13 και διεγείρουν τα προϋποκείμενα μακροφάγα «M2», που με τη σειρά τους παράγουν TGF- β και PDGF, που προάγουν την ίνωση [15]. Η Tenascin-C (TNC), μια γλυκοπρωτεΐνη της θεμέλιας ουσίας του συνδετικού ιστού μπορεί να συνδεθεί με τον TLR4 που οδηγεί στην έκκριση φλεγμονογόνων κυτταροκινών, όπως TNF α , IL-6, και IL-8, ενεργοποιεί ινοβλάστες, και αυξάνει την παραγωγή κολλαγόνου [19]. Όμως η παρατεταμένη διέγερση του, δίχως πλέον αντιγονικό ερέθισμα οδηγεί σε μακροχρόνια φλεγμονή. Η παρουσία της σε αυξημένα επίπεδα έχει επιβεβαιωθεί στη ΣΣκ σε βιοψίες δέρματος [20]. Αυτή η ενεργοποίηση τελικά των TLRs φαίνεται να σχετίζεται με την έναρξη της ΣΣκ [15].

Η επίδραση λοιμογόνων παραγόντων θεωρήθηκε και εδώ πως διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην αιτιοπαθογένεια. Τα βακτήρια θεωρήθηκαν αρχικά υπεύθυνα, αλλά καμία μελέτη δεν τεκμηρίωσε την παθογένεια των λοιμογόνων παραγόντων. Ωστόσο, αντισώματα για πρωτεϊνικούς επιτόπους ιδίως του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) βρέθηκαν σε ασθενείς με ΣΣκ [15]. Άλλοι λοιμογόνοι παράγοντες που ενοχοποιήθηκαν κατά καιρούς περιλαμβάνουν το *Helicobacter pylori* [21] και τον Parvovirus B-19 [22].

Μακροχρόνια έκθεση σε οργανικές και άλλες χημικές ουσίες λόγω επαγγέλματος ή συνθηκών διαβίωσης μπορεί να προκαλέσει σύνδρομα που μοιάζουν με σκληρόδερμα. Τέτοιες ουσίες είναι η σιλικόνη, το πυρίτιο, το χλωριούχο βινύλιο, η μπλεομυκίνη, το «Ισπανικό τοξικό λάδι» (που προκάλεσε το toxic oil syndrome) και η νοθευμένη L-τρυπτοφάνη (που προκάλεσε το eosinophilia-myalgia syndrome) [23,24].

Πρόσφατα μελέτες έδειξαν ότι οι επιγενετικές αλλαγές στο γονιδίωμα μπορεί να αποτελούν την εναρκτήρια δύναμη για την ανάπτυξη της νόσου.

Οι αλλαγές αυτές πραγματοποιούνται πολύ πριν εμφανιστεί κλινικά η ίνωση και περιλαμβάνουν τροποποιήσεις στη μεθυλίωση του DNA, στις ιστόνες και στην έκφραση των miRNAs. Η υπομεθυλίωση του DNA στα γονίδια των ινοβλαστών πιθανά να βρίσκεται πίσω από τη διέγερση τους. Όπως και η ακετυλίωση των ιστονών πιθανά να οδηγεί σε χαμηλή έκφραση του γονιδίου των μεταγραφικών παραγόντων KLF5 (Kruppel Like Factor 5) στους ασθενείς με ΣΣκ [25]. Η υπερέκφραση ορισμένων miRNAs, όπως το miR-29a, στους ινοβλάστες συσχετίζονται με την ελαττωμένη έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών BCL-2 και BCL-XL και τα κάνει πιο επιρρεπή στον κυτταρικό θάνατο. Επίσης η υπερέκφραση του miR-202-3p στο δέρμα των ασθενών με ΣΣκ συμβάλλει στην αδρανοποίηση της μεταλλοπρωτεΐνης 1 (Metalloproteinase 1, MMP1) [25].

Επίσης, σημαντικός είναι ο ρόλος που διαδραματίζουν τα Β και Τ λεμφοκύτταρα στην αιτιοπαθογένεια της ΣΣκ [1]. Τα Β λεμφοκύτταρα συντελούν στην δημιουργία της ίνωσης και η διαταραχή της ομοιοστασίας τους, όπως θα αναλυθεί παρακάτω, συνδέεται με την ΣΣκ [6,22].

1.3 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Όπως αναφέρθηκε, το ΣΣκ έχει τρία χαρακτηριστικά γνωρίσματα, την ίνωση (που προσβάλλει το δέρμα και τα εσωτερικά όργανα), την μικροαγγειοπάθεια, και την παραγωγή αυτοαντισώματων.

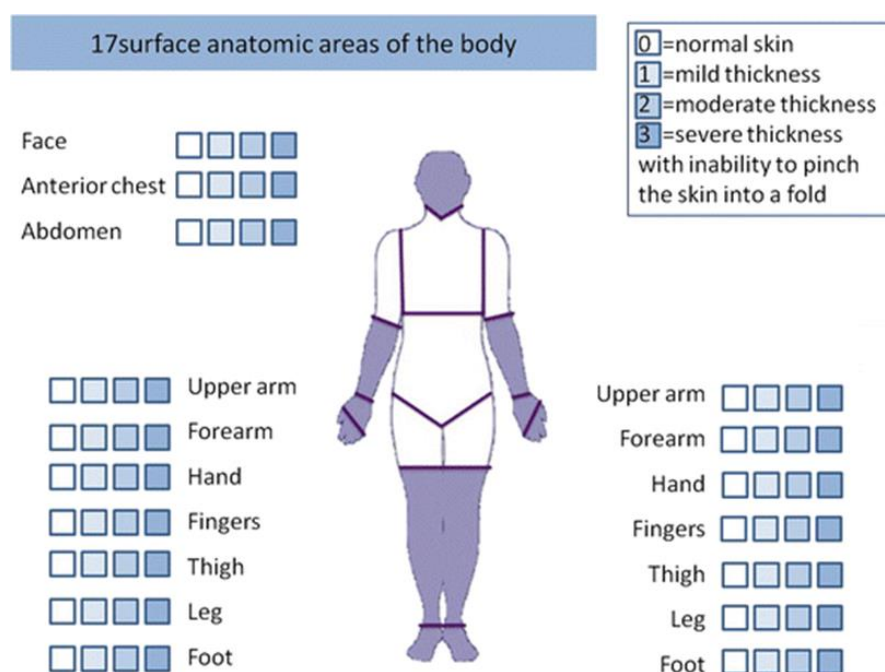
Δερματική προσβολή

Στη ΣΣκ η δερματική προσβολή είναι η πιο χαρακτηριστική προσβολή μιας και από την αφή και όψη του δέρματος μπορεί να τεθεί η υπόνοια για τη διάγνωση της νόσου. Η σκληρία δέρματος συνήθως ξεκινά από τα δάκτυλα των χεριών ή/και των ποδιών και εξελίσσεται κεντρομελικά. Όταν η προσβολή δέρματος είναι από τα δάκτυλα μέχρι τον αγκώνα στα χέρια ή μέχρι τα γόνατα στα πόδια, η νόσος χαρακτηρίζεται ως περιορισμένο δερματικό σκληρόδερμα (limited cutaneous SSc – lcSSc), ενώ όταν προσβάλλεται και το υπόλοιπο δέρμα, δηλαδή πέρα από τους αγκώνες και τα γόνατα, χαρακτηρίζεται ως διάχυτο δερματικό σκληρόδερμα (diffuse cutaneous SSc – dcSSc). Άλλες, σπάνιες υποκατηγορίες, αποτελούν το σκληρόδερμα με προσβολή των εσωτερικών οργάνων χωρίς προσβολή δέρματος (systemic sclerosis sine scleroderma), και η υποκατηγορία όπου οι ασθενείς συνδυάζουν χαρακτηριστικά και άλλων νοσημάτων συνδετικού ιστού και περιγράφεται με τον όρο σύνδρομο αλληλοεπικάλυψης, ή μικτή νόσος του συνδετικού ιστού [26].

Όταν στη ΣΣκ υπάρχει προσβολή του προσώπου δημιουργείται ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα σαν μάσκα προσωπείου, που καθιστά τον ασθενή ανέκφραστο, με τηλεαγγειεκτασίες, λεπτή μύτη που προσομοιάζει με ράμφος πτηνών, λέπτυνση και ακτινωτή αυλάκωση γύρω από τα χείλη του στόματος, που έχει μικρό εύρος ανοίγματος (μικροστομία). Άλλες δερματικές βλάβες είναι το φαινόμενο Raynaud και έλκη που θα αναφερθούν παρακάτω, και οι ασβετώσεις. Οι ασβετώσεις μπορεί να φλεγμαίνουν και να είναι εκτεταμένες επιβαρύνοντας πολύ την ποιότητα ζωής των ασθενών.

Τα εξαρτήματα του δέρματος καταστρέφονται, με αποτέλεσμα να εκκρίνεται ελαττωμένη ποσότητα σμήγματος και ιδρώτα και ο ασθενής να βιώνει το αίσθημα του κνησμού. Υπάρχουν υπό και υπέρ μελαγχρωματικές κηλίδες που δίνουν την εντύπωση αλατοπίπερου. Η επακόλουθη εναπόθεση κολλαγόνου τύπου I και II, προσδίδει τη χαρακτηριστική σκληρία στην επιφάνεια του προσβεβλημένου δέρματος. Λόγω αυτής της σκληρίας παρατηρείται αγκύλωση των αρθρώσεων των δακτύλων [27,28]. Οι δερματικές εκδηλώσεις μπορούν να επιβαρύνουν σημαντικά τη λειτουργικότητα του ασθενή και την ποιότητα ζωής του [27].

Η δερματική σκληρία βαθμολογείται με την τροποποιημένη βαθμονόμηση δερματικής σκλήρυνσης κατά Rodnan (modified Rodnan Skin Score - mRSS) [29], που φαίνεται στην Εικόνα 1.2 [30]. Κατά τη βαθμονόμηση αυτή, η συνολική επιφάνεια του σώματος χωρίζεται σε 17 επιμέρους περιοχές και ανάλογα με το βαθμό πάχυνσης της – σκληρίας, καθεμία βαθμολογείται με 0 αν το δέρμα δεν παρουσιάζει σκληρία, με 1 αν η σκληρία είναι μικρού βαθμού, με 2 αν η σκληρία είναι μετρίου βαθμού και 3 αν είναι σοβαρού βαθμού και αθροίζονται οι τιμές για να δώσουν το τελικό σκορ [31]. Η εμμένουσα αυξημένη τιμή του mRSS στα αρχικά στάδια της νόσου έχει συσχετισθεί με πιο βαριά κλινική εικόνα [32].



Εικόνα 1.2. Τροποποιημένη βαθμολόγηση δερματικής σκλήρυνσης κατά Rodnan (mRSS) [30]

Το Περιορισμένο δερματικό Σκληρόδερμα (lcSSc) τις περισσότερες φορές παρουσιάζει πιο αργή εξέλιξη και οι επιπλοκές περιλαμβάνουν: δερματική προσβολή με σκληροδερμία, δερματικά έλκη ή βοθρία, ασβεστώσεις, απορρόφηση τελικών φαλάγγων των δακτύλων, φαινόμενο Raynaud [28], την προσβολή του γαστρεντερικού συστήματος με υποκινησία του οισοφάγου και δυσαπορρόφηση από το έντερο, την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση και τη διάμεση πνευμονική ίνωση. Παρόμοια, είναι η κλινική εικόνα στο Σκληρόδερμα χωρίς σκληροδερμία (SSc sine Scleroderma), με τη δερματική προσβολή φυσικά να απουσιάζει.

Το Διάχυτο Σκληρόδερμα παρουσιάζει τις περισσότερες φορές πιο γρήγορη εξέλιξη, με πιο σοβαρές κλινικές εκδηλώσεις, όπως προσβολή οργάνων κυρίως της καρδιάς, των πνευμόνων και των νεφρών [33].

Μικροαγγειοπάθεια

Φαινόμενο Raynaud. Το φαινόμενο Raynaud οφείλεται σε παροδική αγγειοσύσπαση των δακτυλικών αρτηριών. Συμβαίνει κυρίως στα άκρα, όπως τα δάκτυλα των χεριών ή/και ποδιών, στα αυτιά και στη μύτη, στο πηγούνι και στη γλώσσα που αρχικά γίνονται άσπρα ή υποκίτρινα, στη συνέχεια κυανά και τελικά λαμβάνουν ένα ερυθρό χρώμα. Οι τρεις αυτές χρωματικές αλλαγές δεν εμφανίζονται απαραίτητα σε όλους τους ασθενείς, όμως η αναφορά από τον ασθενή για την παρουσία ωχρών δακτύλων αρκεί για τη διάγνωση. Το κάθε επεισόδιο μπορεί να διαρκέσει από μερικά λεπτά μέχρι και ώρες και να προκαλέσει πόνο ή αιμωδίες. Συμβαίνει κυρίως κατά την έκθεση στο κρύο και σε στρεσογόνα ερεθίσματα. Στη ΣΣκ, το φ. Raynaud αποτελεί πρώτη εκδήλωση στο 90% των ασθενών και αρκετές φορές προϋπάρχει της διάγνωσης του περιορισμένου σκληροδέρματος ακόμα και έτη πριν, ενώ στη διάχυτη μορφή μπορεί να εμφανιστεί ακόμη και ένα έτος μετά τη διάγνωση ή ταυτόχρονα με τις δερματικές βλάβες [28].

Δακτυλικά έλκη. Μια σημαντική κλινική εκδήλωση της νόσου είναι τα δακτυλικά έλκη. Πρόκειται για λύση της συνέχειας του δέρματος κυρίως στα δάκτυλα των άνω ή κάτω άκρων – συνήθως κοντά στις ράγες των δακτύλων, σε σημεία του σώματος με αυξημένη δερματική τάση όπως την εκτατική των μεσοφαλαγγικών αρθρώσεων, των αγκωνών ή τα σφυρά καθώς και σε ασβεστώσεις (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3. Δακτυλικό έλκος σε ασθενή με ΣΣκ

Το ενεργό έλκος μπορεί να επιμολυνθεί και να οδηγήσει σε οστεομυελίτιδα, γάγγραινα και ακρωτηριασμό δακτύλων με αντίκτυπο στην καθημερινότητα και την ποιότητα ζωής [34].

Μια πρόταση ταξινόμησης με βάση τα δακτυλικά έλκη, έγινε από τους Matucci-Cerinic M et al., μετά από παρακολούθηση 1459 ασθενών με ΣΣκ για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από δύο έτη [35]. Στην πρώτη ομάδα ήταν ασθενείς χωρίς νέα έλκη για διάστημα μεγαλύτερο των δύο ετών (33,2%). Στη δεύτερη ομάδα, ήταν ασθενείς με ένα επεισόδιο δακτυλικού έλκους χωρίς υποτροπή (9,4%). Στην τρίτη ομάδα, ήταν ασθενείς με συχνά υποτροπιάζοντα δακτυλικά έλκη χωρίς εμφάνιση νέων (46,2%) και τέλος στην τέταρτη ομάδα ήταν ασθενείς

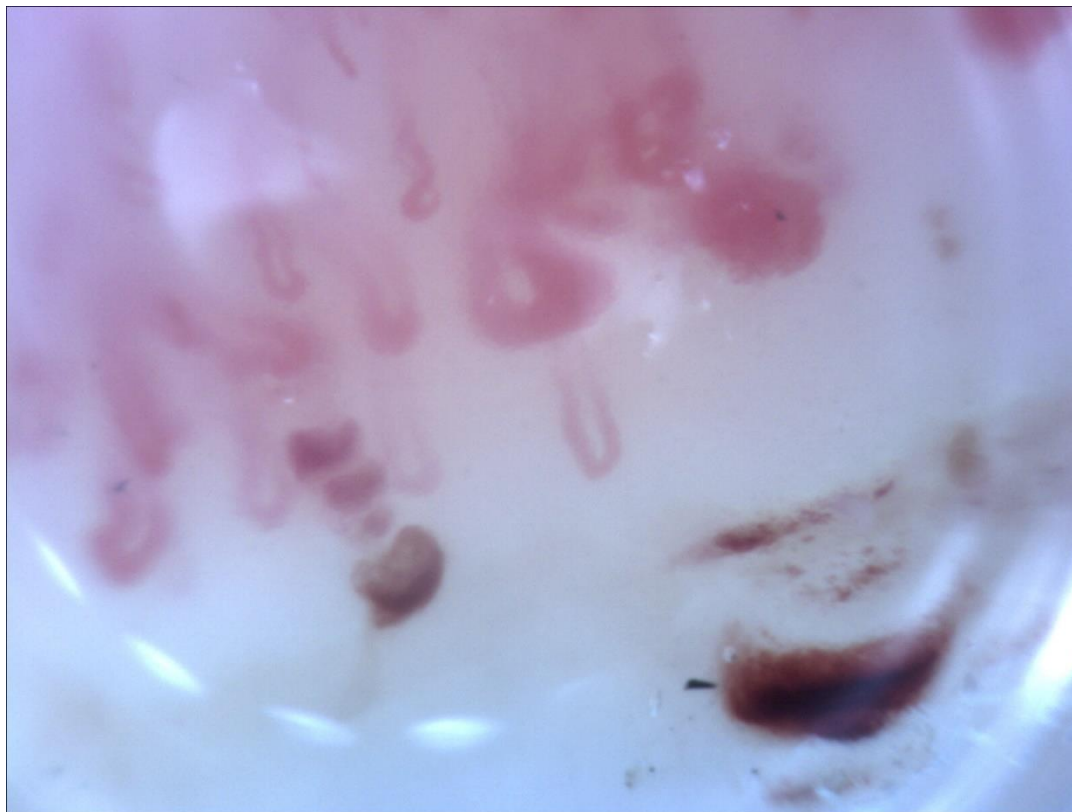
με ένα ή περισσότερα νέα δακτυλικά έλκη (11,2%) σχεδόν σε όλες τις καταγραφές. Οι ομάδες ασθενών με υποτροπιάζοντα έλκη καθώς και εμφάνιση συνεχώς νέων ελκών, συσχετιζόταν πιο συχνά με επιπλοκές [31] από το καρδιοανπνευστικό σύστημα, το γαστρεντερικό σωλήνα, ασβετώσεις, τηλεαγγειεκτασίες, και αρθρίτιδα [34] και χρειαζόταν πιο συχνή ιατρική παρακολούθηση [32]. Ακόμη, βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των ομάδων με έλκη και αντισώματα έναντι της Τοποϊσομεράσης I (18.9%, έναντι ασθενών με θετικά αντισώματα χωρίς έλκη 9.3%) και αντισώματα έναντι της RNA πολυμεράσης III (16.9% έναντι 11.8% ασθενών με αντισώματα χωρίς έλκη) [36].

Για την αξιολόγηση της μικροαγγειακής βλάβης στο σκληρόδερμα, έχουν προταθεί αρκετές μέθοδοι όπως το DUCAS score (Digital Ulcer Clinical Assessment Score). Σε κάθε επίσκεψη επισημαίνονται τα νέα ή ήδη υπάρχοντα έλκη, η παρουσία φλεγμονής, η ανάγκη για νοσηλεία εξαιτίας των ελκών, η λήψη αναλγητικών χαπιών, η ύπαρξη ή μη γάγγραινας και η ανάγκη για χειρουργική αντιμετώπιση [34].

Άλλες προτάσεις περιλαμβάνουν φωτογραφίες είτε από τον ίδιο τον ασθενή είτε από το γιατρό, τη χρήση υπερήχων, ή θερμογραφίας και laser [34].

Τα τελευταία έτη η τριχοειδοσκόπηση [nailfold capillaroscopy (NVC)], έκανε ορατή την παθολογία των μικρών αγγείων. Τα φυσιολογικά τριχοειδή παρουσιάζονται με ένα ομοιογενές μέγεθος τριχοειδών, κάθετα προσανατολισμένα στην επιφάνεια της ονυχικής πτυχής, παράλληλα μεταξύ τους, σε σχήμα φουρκέτας. Στη ΣΣκ έχουμε μεγάλα τριχοειδή (μεγατριχοειδή), μικροαιμορραγίες και απώλεια τριχοειδών με ανάδειξη ανάγγειων περιοχών (Εικόνα 1.4). Οι βλάβες αυτές ανευρίσκονται σε ποσοστό περισσότερο από το 98% των ασθενών με ΣΣκ [37].

Τα ευρήματα αυτά έχουν μεγάλη ειδικότητα και πλέον η χρήση της τριχοειδοσκόπησης των ονύχων περιλαμβάνεται στα κριτήρια ταξινόμησης της ΣΣκ του 2013 ACR/EULAR [38].

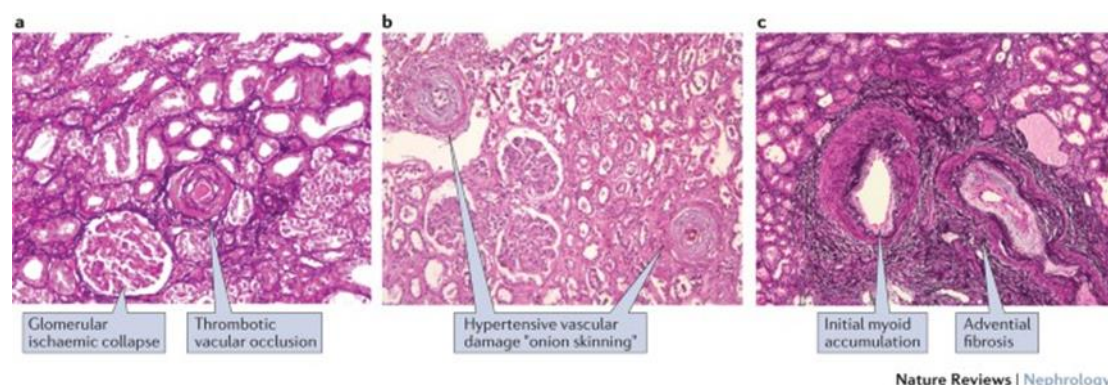


Εικόνα 1.4. Εικόνα τριχοειδοσκόπησης ασθενούς με σκληρόδερμα, όπου φαίνονται αιμορραγίες, μεγατριχοειδή και αραιώση τριχοειδών.

Νεφρική κρίση σκληροδερμίας. Η νεφρική κρίση στη ΣΣκ παρουσιάζει επιπολασμό από 1% έως 14%, με μεγαλύτερα ποσοστά να καταγράφονται στις ΗΠΑ, την Αυστραλία και το Ηνωμένο Βασίλειο. Εμφανίζεται συνήθως στα πρώτα 5 χρόνια της νόσου και χαρακτηρίζεται από κακοήγη υπέρταση με ταχεία επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας (αύξηση της κρεατινίνης, ήπια πρωτεϊνουρία) και ευρήματα μικροαγγειοπαθητικής αιμόλυσης. Αποτελεί μία επείγουσα κατάσταση με ταχεία εξέλιξη εντός ολίγων ημερών από τη διάγνωση, εάν δεν χορηγηθεί κατάλληλη θεραπεία με αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (α ΜΕΑ). Η χρήση τους, προλαμβάνει αρκετές από τις επιπλοκές και έχει περιορίσει σημαντικά τη θνησιμότητα [28].

Αρχικά στο αρτηριακό ενδοθήλιο, πολλαπλασιάζονται τα ενδοθηλιακά κύτταρα, παρατηρείται εναπόθεση ινώδους, ισχαιμία από μικροθρόμβους και στένωση του αυλού των

αγγείων καθώς και περιοχές με αιμορραγία και νέκρωση στις επιφάνειες των νεφρών. Η βλάβη γρήγορα μπορεί να οδηγήσει σε νεφρική ισχαιμία, σπειραματοσκλήρυνση και διάμεση ίνωση [39] (Εικόνα 1.5) [40].



Εικόνα 1.5. Ιστολογική εικόνα από νεφρική βιοψία ασθενή με νεφραγγειακή κρίση [40]

Προγνωστικοί δείκτες της νεφραγγειακής κρίσης σκληροδερμίας αποτελούν η διάχυτη δερματική συστηματική σκλήρυνση (10–15% σε ασθενείς με διάχυτο σκληρόδερμα, ενώ εμφανίζεται σε ασθενείς με περιορισμένο σκληρόδερμα μόλις σε ποσοστό 1-2%), η Αφροαμερικανική φυλή, η ύπαρξη περικαρδιακής συλλογής, η καρδιακή ανεπάρκεια, η αναιμία, η θρομβοπενία, η ορμονική θεραπεία υποκατάστασης, η τριβή τενόντων κατά την κλινική εξέταση, η χορήγηση πρεδνιζολόνης σε δοσολογία υψηλότερη των 15 mg/ημέρα και τέλος τα αυτοαντισώματα έναντι της RNA πολυμεράσης III [28].

Το ποσοστό θνησιμότητας της κλινικής αυτής εκδήλωσης, μετά τη χρήση των α ΜΕΑ έχει μειωθεί από 40% σε 10%. Όμως, ο κίνδυνος θανάτου σε κάθε ασθενή παραμένει σε υψηλά επίπεδα 20-35% για το πρώτο έτος και το ποσοστό ένταξης σε αιμοκάθαρση κυμαίνεται από 40-55% [39].

Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση. Η Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση (ΠΑΥ) είναι μια σοβαρή επιπλοκή της ΣΣκ [28]. Ορίζεται ως η αύξηση της τιμής της μέσης πνευμονικής αρτηριακής πίεσης (mPAP) >20-25 mmHg, με μέση πίεση ενσφήνωσης πνευμονικών

τριχοειδών ≤ 15 mmHg και πνευμονικές αγγειακές αντιστάσεις (PVR) ≥ 3 WU στον δεξιό καθετηριασμό καρδιάς απουσία σοβαρής πνευμονικής νόσου ή χρόνιας θρομβοεμβολής. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι απεικονιστικά ευρήματα εμφανίζονται ήδη όταν PVR >2 [18].

Παράγοντες κινδύνου για αυτή την επιπλοκή είναι οι εκτεταμένες τηλεαγγειεκτασίες και μεγαλύτερη διάρκεια της νόσου, τα θετικά αντικεντρομεριδιακά αντισώματα (ACA), τα αντισώματα έναντι της U1 ριβονουκλεοπρωτεΐνης (ribonucleoprotein, RNP), η απουσία αντισωμάτων έναντι της Τοποϊσομεράσης I και τα θετικά αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα. Επιπλέον αντισώματα έναντι των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης II, αντισώματα έναντι των υποδοχέων της ενδοθηλίνης 1 και αντισώματα έναντι ινοβλαστών έχουν συσχετισθεί με την παθογένεια της ΠΑΥ [41].

Η μελέτη PHAROS (Pulmonary Hypertension Assessment and Recognition of Outcomes in Scleroderma) μία από τις μεγαλύτερες για την Πνευμονική Υπέρταση στη ΣΣκ, αξιολογεί ως χρήσιμα εργαλεία για την παρακολούθησή της, την DLCO $<55\%$, το λόγο FVC/DLCO >1.6 , και την συστολική πίεση στη δεξιά κοιλία >40 mmHg που καταγράφεται με διαθωρακικό υπερηχογράφημα. Σύμφωνα με τη μελέτη, η ΠΑΥ εμφανίζεται σε ποσοστό 17% των ασθενών στην πρώτη 5ετία της νόσου. Προσβάλλονται πιο συχνά οι γυναίκες (87%) σε σχέση με τους άνδρες (67%) [41]. Η θνησιμότητα στα 3 χρόνια από τη διάγνωσή της κυμαίνεται από 21% - 48% και έχει πιο δυσμενή πρόγνωση σε σχέση με την ιδιοπαθή ΠΑΥ [28].

Η Πνευμονική Υπέρταση γενικά διακρίνεται σε Τύπου 1 (ΠΑΥ που συναντούμε σε ασθενείς με ΣΣκ) όταν η βλάβη οφείλεται στα προτριχοειδικά αρτηριόλια, σε Τύπου 2 όταν είναι αποτέλεσμα δεξιάς καρδιακής ανεπάρκειας και σε Τύπου 3 στα πλαίσια χρόνιας υποξίας εξαιτίας Διάμεσης Πνευμονοπάθειας και πάντα κατά τη διάγνωσή της πρέπει να γίνεται διαφορική διάγνωση μεταξύ τους [42].

Ο ακριβής μηχανισμός της ΠΑΥ στους ασθενείς με ΣΣκ δεν είναι πλήρως γνωστός, αλλά πιθανολογείται ότι ευθύνεται η βλάβη του ενδοθηλίου, που οδηγεί σε έκκριση ουσιών με

αγγειοσυσπαστική δράση[41]. Η ΠΑΥ συνδυάζεται με διάμεση πνευμονοπάθεια στους ασθενείς με ΣΣκ σε ποσοστό περίπου 31%. Όταν οι δύο αυτές καταστάσεις συνδυάζονται, αυξάνεται σημαντικά η θνησιμότητα. Ένας χρήσιμος αλγόριθμος αναγνώρισης ασθενών με ΠΑΥ είναι ο αλγόριθμος DETECT [41].

Διάμεση πνευμονική ίνωση

Ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών (50-65%) με ΣΣκ θα εμφανίσουν Διάμεση Πνευμονική Ίνωση, ακτινολογικά επιβεβαιωμένη σε αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας (HRCT) που είναι και η εξέταση εκλογής για τη πρόωμη διάγνωση της [26]. Το πιο κοινό ιστολογικό πρότυπο, αποτελεί η μη ειδική διάμεση πνευμονία, και περιλαμβάνει περιοχές δίκην «θαμβής υάλου» στην περιφέρεια και στις βάσεις των πνευμόνων, με δικτυοζώδεις σκιάσεις και αρκετές βρογχιεκτασίες εξ έλξεως. Ακολουθεί το πρότυπο της συνήθους διάμεσης πνευμονίας με τη χαρακτηριστική εικόνα μελισσοκηρύθρας με δικτυοζιδιακές σκιάσεις και βρογχιεκτασίες [43] (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6. Αξονική τομογραφία θώρακα σε ασθενή με σκληρόδερμα και πνευμονική ίνωση με πάχυνση των μεσολοβιδίων διαφραγματιδίων, θολή ύαλος, δικτυωτό πρότυπο, αρχόμενες αλλοιώσεις μελισσοκηρήθρας

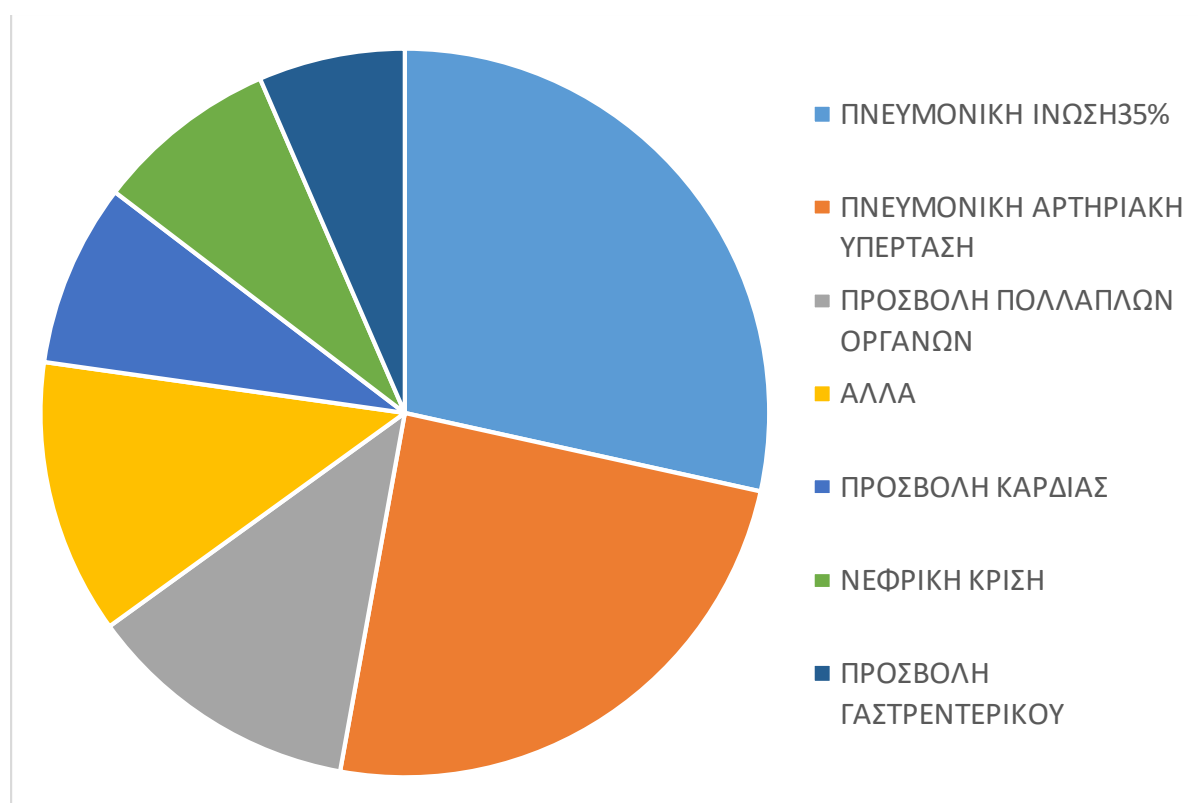
Πιο αναλυτικά στη ΣΣκ η προσβολή του πνεύμονα μπορεί να παρουσιάζει μία από τις παρακάτω μορφές, που παρατίθενται στον Πίνακα 1.1 [18].

Πίνακας 1.1. Απεικονιστικά πρότυπα προσβολής του πνεύμονα στη ΣΣκ (προσαρμογή από [18])

ΠΡΟΣΒΟΛΗ ΠΝΕΥΜΟΝΩΝ ΣΤΗ ΣΣκ
Διάμεση πνευμονική νόσος (ILD) ➤ Μη ειδική διάμεση πνευμονοπάθεια (NSIP) ➤ Συνήθης διάμεση πνευμονοπάθεια (UIP) ➤ Διάχυτη κυψελιδική βλάβη (DAD) ➤ Οργανούμενη κρυπτογενής πνευμονία (COP)
Πνευμονική Υπέρταση
Πλευριτική συλλογή
Πνευμονία από εισρόφηση
Κυψελιδική αιμορραγία
Πνευμονικές κύστες
Πνευμοθώρακας
Αδυναμία αναπνευστικών μυών
Φαρμακευτική πνευμονία

ILD: (Interstitial lung disease) Διάμεση πνευμονική νόσος, ΠΑΥ: πνευμονική αρτηριακή υπέρταση

Η προσβολή των πνευμόνων παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια τόσο ως προς την εμφάνιση, το ρυθμό επιδείνωσης, και την πρόγνωση. Η ίνωση μπορεί να είναι ασυμπτωματική και μπορεί να προχωρήσει μετά από άλλοτε άλλο διάστημα σε δύσπνοια προσπαθείας, δύσπνοια ηρεμίας και αναπνευστική ανεπάρκεια με οξυγονοθεραπεία, κακή ποιότητα ζωής και μείωση επιβίωσης. Μάλιστα, η προσβολή των πνευμόνων στη ΣΣκ θεωρείται πλέον η κύρια αιτία θανάτου [28], όπως απεικονίζεται και στο παρακάτω διάγραμμα της Εικόνας 1.7 [44].



Εικόνα 1.7. Σχηματική απεικόνιση των αιτιών θανάτου στη ΣΣκ, με την Πνευμονική Ίνωση να αποτελεί την κυριότερη αιτία θνησιμότητας (προσαρμογή εικόνας από το [44])

Επομένως, σημαντικό μέλημα του κλινικού ιατρού είναι η τακτική παρακολούθηση της πνευμονικής λειτουργίας. Ο έλεγχος πραγματοποιείται με απευθείας απεικόνιση του πνεύμονα με αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας (HRCT) και λειτουργικές δοκιμασίες ελέγχου, που είναι η εξαναγκασμένη ζωτική χωρητικότητα (FVC) και η δοκιμασία διάχυσης του

μονοξειδίου του άνθρακα (DLCO). Σοβαρή και εκτεταμένη θεωρείται η βλάβη, όταν το πάσχον παρέγχυμα που απεικονίζεται με την HRCT αντιπροσωπεύει ποσοστό >20% του πνευμονικού ιστού. Από τις δοκιμασίες ελέγχου, η εξαναγκασμένη ζωτική χωρητικότητα (FVC) θεωρείται παθολογική όταν ανευρίσκεται <70%, ενώ η δοκιμασία διάχυσης του μονοξειδίου του άνθρακα (DLCO), είναι επίσης παθολογική όταν έχει τιμή <70%. Κατά τη διάρκεια παρακολούθησης του ασθενή, αξιολογούμε κάθε αλλαγή στις τιμές των πνευμονικών δοκιμασιών και κάθε αναφερόμενο νέο σύμπτωμα ή επιδείνωση του ήδη υπάρχοντος. Αξιολογούμε ως επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας του ασθενή, την πτώση της τιμής της FVC σε ποσοστό >10% και της τιμής της DLCO >15% [45]. Έχουν δημοσιευθεί αλγόριθμοι παρακολούθησης ασθενών με διάμεση πνευμονοπάθεια της ΣΣκ [49]

Λοιπές κλινικές εκδηλώσεις

Περίπου 90% των ασθενών με ΣΣκ παρουσιάζουν προσβολή του γαστρεντερικού συστήματος. Οι εκδηλώσεις αυτές μπορούν να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή στην πορεία της νόσου και μάλιστα μπορεί να προσβάλλεται οποιοδήποτε σημείο του γαστρεντερικού σωλήνα. Η προσβολή του οισοφάγου χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση των λείων μυϊκών ινών του τοιχώματος της 2^{ης} και 3^{ης} μοίρας του, καθώς και του οισοφαγικού σφιγκτήρα από κολλαγόνο με αποτέλεσμα τη μειωμένη περισταλτική ικανότητα και δυσλειτουργία του ΚΟΣ (κατώτερος οισοφαγικός σφιγκτήρας), γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, οισοφαγίτιδα, διάταση - μείωση του περισταλτισμού του οισοφάγου [28,47]. Στη γαστροσκόπηση μπορεί να βρεθούν αγγειακές εκτασίες στο στομάχι με χαρακτηριστικό σχήμα σαν καρπούζι (watermelon stomach) [28,47].

Το κατώτερο γαστρεντερικό, προσβάλλεται σε ποσοστό έως και 50% των ασθενών. Η διαταραχή της αιμάτωσης του εντέρου λόγω μικροαγγειοπάθειας και η διαταραχή της κινητικότητας λόγω εναπόθεσης κολλαγόνου οδηγεί σε σύνδρομο υπερανάπτυξης βακτηριδίων με δυσαπορρόφηση, εναλλαγή των κενώσεων, υποτροπιάζοντα επεισόδια ψευδοαπόφραξης με κοιλιακό άλγος, ναυτία, αίσθημα μετεωρισμού και δυσκολία στη σίτιση.

Ορθοπρωκτική δυσλειτουργία εξαιτίας της προσβολής του πρωκτικού σφιγκτήρα συχνά προκαλεί απώλεια κοπράνων [28,47].

Αρθραλγίες μπορεί να έχουν αρκετοί ασθενείς που συχνά ομοιάζουν με συμμετρικό πολυαρθρικό σύνδρομο, που οφείλονται σε φλεγμονή του υμένα των αρθρώσεων ή στις συγκάψεις που προκύπτουν από την πάχυνση-ίνωση του δέρματος. Χαρακτηριστική είναι η προσβολή των τενόντων με κλινικό εύρημα τον κριγμό τους, που αποδίδεται σε τενοντοελυτρίτιδα ή σε εναπόθεση ινώδους στις δομές της άρθρωσης.

Προσβολή των μυών μπορεί να συμβεί, είτε ως μυϊκή ατροφία εξαιτίας του περιορισμού της κινητικότητας των άκρων, από την σκληροδερμία και τη σύγκαμψη των αρθρώσεων, είτε ως μυοσίτιδα φλεγμονώδους αρχής με ήπια συνήθως κεντρομελική αδυναμία [23].

Η προσβολή της καρδιάς δεν οφείλεται μόνο την ΠΑΥ, αλλά μπορεί να προσβληθούν όλες οι δομές της, όπως το περικάρδιο, το μυοκάρδιο, οι βαλβίδες, το ερεθισματογωγό σύστημα αλλά και τα μικρά αγγεία της [23].

1.4 ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα αυτοαντισώματα έχουν σημαντικό ρόλο στη ΣΣκ, έχουν συσχετιστεί με συγκεκριμένες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου και φαίνεται να συμμετέχουν στην παθογένειά της. Το 95% των ασθενών με ΣΣκ εμφανίζουν θετικά αντιπυρηνικά (anti-nuclear antibodies, ANA) αντισώματα [28]. Στο 60-80% αυτών των ασθενών εμφανίζονται παράλληλα και ένα από τα ακόλουθα αυτοαντισώματα: i) αντικεντρομεριδιακά (ACA), ii) αντι-τοποϊσομεράσης I (αντι-Τοπο I) iii) αντι-RNA πολυμεράσης III (anti-RNA pol 3) [48].

Τα ACA απαντούν κυρίως στους ασθενείς με τη περιορισμένη δερματική μορφή σκληροδερμίας (limited cutaneous, lcSSc), ενώ στη διάχυτη μορφή εμφανίζονται σε ποσοστό μόλις έως 5%. Συσχετίζονται θετικά με δακτυλικά έλκη και ΠΑΥ, και αρνητικά με τη Νεφρική κρίση σκληροδερμίας και την Διάμεση Πνευμονική Ίνωση.

Τα αντισώματα έναντι Τοποϊσομεράσης I συσχετίζονται κυρίως με τη διάχυτη μορφή της νόσου (dcSSc) και με αρκετές σοβαρές και απειλητικές για τη ζωή εκδηλώσεις όπως η νεφραγγειακή κρίση, η διάμεση πνευμονοπάθεια καθώς και η παρουσία δακτυλικών ελκών. Τα αντισώματα έναντι RNA pol III, είναι επίσης πιο συχνά στη διάχυτη μορφή και έχουν συσχετισθεί με τη νεφρική κρίση και την ανάπτυξη κακοήθειας [49].

Επιπλέον, υπάρχει και υποκατηγορία ασθενών με ΣΣκ που δεν εμφανίζει κανένα από τα παραπάνω αυτοαντισώματα, αλλά παρόλα αυτά μπορεί να εμφανίσει σοβαρή νόσο με ταχέως εξελισσόμενη κλινική εικόνα [28]. Τέλος, έχουν ταυτοποιηθεί πλέον αυτοαντισώματα που δεν είναι τόσο συχνά και σχετίζονται με διάφορες κλινικές εκδηλώσεις και μπορεί να προδιαθέτουν σε ανάπτυξη κακοήθειας όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.2 που ακολουθεί [48].

Πίνακας 1.2. Λιγότερο συχνά αυτοαντισώματα στη ΣΣκ και οι σχετιζόμενες κλινικές εκδηλώσεις (προσαρμογή πίνακα από [48])

Στόχοι αυτοαντισωμάτων στη σκληροδερμία	Κλινική συσχέτιση
PM-Scl 75 / PMscl 100	Σύνδρομα επικάλυψης σκληροδερμίας / πολυμυοσίτιδας
RNA Binding Region Containing 3(RNPC3)	Κακοήθειες, ILD, Μυοπάθεια, Δυσκινησία Γαστρεντερικού Σωλήνα
Ribonuclease P protein subunit 25(RPP25)	Αντιγονικός στόχος του anti Th/To, Ανοσιακή απάντηση
Eukaryotic initiation factor 2B(eIF2B)	Συστηματική Διάχυτη Νόσος, ILD
RuvBL1 & RuvsBL2 (RuvBL1/2)	Συστηματική Διάχυτη Νόσος, Φλεγμονώδης μυοσίτιδα, επικαλυπτόμενα σύνδρομα
Bicaudal D homolog 2 (BICD2)	Φλεγμονώδεις μυοσίτιδα, ILD
Interferon – inducible protein 16(IFI16)	Ισχαιμία άκρων
Angiotensin II type I receptor(AT1R)	Μικροαγγειοπάθεια, (Ισχαιμία άκρων, ΠΑΥ)
Endothelin -1 type A receptor(ETAR)	Μικροαγγειοπάθεια (Ισχαιμία άκρων, ΠΑΥ)
Muscarinic – 3 receptor (M3R)	Δυσκινησία Γαστρεντερικού Συστήματος
Platelet- derived growth factor receptor(PDGFR)	Ύψωση
Ku	Σύνδρομα επικάλυψης σκληροδερμίας / πολυμυοσίτιδας

1.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Έχουν δημιουργηθεί κριτήρια ταξινόμησης, ούτως ώστε να γίνεται ομαδοποίηση των ασθενών με βάση την κλινική τους εικόνα, και να δημιουργούνται συγκρίσιμες ομάδες με σκοπό την διευκόλυνση εκπόνησης ερευνητικών μελετών. Τα πρώτα κριτήρια του 1980, που συστάθηκαν από το Αμερικανικό Κολλέγιο Ρευματολογίας (ACR), παρατίθενται στον Πίνακα 1.3, δεν φάνηκε να λειτουργούν ικανοποιητικά για τη διάγνωση της πρώιμης νόσου. Παρουσίαζαν μέτρια ευαισθησία και ειδικότητα, με ποσοστά 75% και 71% αντίστοιχα [33]. Τα νέα κριτήρια της ACR/EULAR του 2013 έχουν μεγάλη ευαισθησία (91%) και ειδικότητα (92%) (Πίνακας 1.4) [50]. Τα κριτήρια ταξινόμησης δεν αποτελούν διαγνωστικά κριτήρια, αν και έχουν βρεθεί ότι βοηθούν στην κλινική πράξη στη διάγνωση των νέων ασθενών, μιας και είναι περιεκτικά και τυποποιημένα [50].

Πίνακας 1.3. Κριτήρια ταξινόμησης ασθενών με ΣΣκ ACR 1980 [33]

ΜΕΙΖΟΝΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ
1. Εγγύς σκληρόδερμα: συμμετρική πάχυνση, τάση και σκλήρυνση του δέρματος των δακτύλων των άκρων χειρών και του δέρματος κεντρικά ως προς τις μετακαρπιοφαλαγγικές ή μεταταρσιοφαλαγγικές αρθρώσεις. Η προσβολή μπορεί να αφορά στον κορμό, τα άκρα, το πρόσωπο και τον τράχηλο.
ΕΛΑΣΣΟΝΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ
1. Σκληροδακτυλία: Οι παραπάνω αλλοιώσεις στις φάλαγγες
2. Δακτυλικές ουλές με εντύπωμα ή απώλεια υποδόριου ιστού στις ράγες των δακτύλων, παρουσία βοθρίων ως αποτέλεσμα ισχαιμίας
3. Αμφοτερόπλευρη ίνωση των πνευμονικών βάσεων που δεν οφείλεται σε πρωτοπαθή πνευμονική νόσο

Πίνακας 1.4. Κριτήρια ταξινόμησης ασθενών με ΣΣκ ACR/EULAR 2013 [50]

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΟ	ΥΠΟΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΒΑΘΜΟΣ
Πάχυνση του δέρματος δακτύλων άμφω, μέχρι τις μετακαρποφαλαγγικές αρθρώσεις (επαρκές κριτήριο)	-	9
Πάχυνση δέρματος των δακτύλων (δεχόμαστε την υψηλότερη βαθμολογία)	Πάχυνση	2
	Σκληροδακτυλία (άπω των MCP αρθρώσεων, κοντά στις PIP)	4
Βλάβες στην άκρη των δακτύλων (κρατάμε την υψηλότερη βαθμολογία)	Έλκη στις ράγες δακτύλων	2
	Ουλές – βοθρία στις ράγες των δακτύλων	3
Τηλεαγγειεκτασίες	-	2
Παθολογική τριχοειδοσκόπηση	-	2
Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση με ή χωρίς Διάμεση πνευμονική νόσος (μέγιστη βαθμολογία 2)	Πνευμονική υπέρταση	2
	Διάμεση πνευμονική ίνωση	2
Raynaud's φαινόμενο	-	3
Αυτοαντισώματα	Anticentromere Anti – topoisomerase I Anti – RNA polymerase III	3

Επιβεβαιωμένο σκληρόδερμα όταν το άθροισμα ≥ 9 [50].

Η ΣΣκ θα πρέπει να διαφοροδιαγνωσθεί από άλλες καταστάσεις, όπως το σκληρομυξοίδημα, το σκληροίδημα, την ηωσινοφιλική περιτονίτιδα, την αντίδραση μοσχεύματος έναντι ξενιστή (Graft versus Host Disease GvHD), το σύνδρομο καρκινοειδούς, τις παραπρωτεΐναιμίες, την όψιμο δερματική πορφυρία, το σύνδρομο Werner, το σύνδρομο POEMS (πλασματοκυτταρική δυσκρασία, πολυνευροπάθεια, οργανομεγαλία, ενδοκρινοπάθεια, μονοκλωνική γαμμαπάθεια και σκληροδερματικού τύπου αλλοιώσεις δέρματος), την φαινυλκετονουρία και τις τοπικές λιποδυστροφίες [23].

1.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ – ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Θεραπεία. Η θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με ΣΣκ αποτελεί όπως ήδη αναφέρθηκε πρόκληση για τον θεράποντα ιατρό και πρέπει να αρχίσει πριν την ίνωση για να είναι αποτελεσματική [51]. Υπάρχουν συστάσεις της EULAR για κάθε μία κλινική εκδήλωση της ΣΣκ [52] αλλά και επικαιροποιημένες συστάσεις του 2023 που έχουν ανακοινωθεί αλλά δεν έχουν ακόμα δημοσιευθεί. Τονίζεται η έγκαιρη διάγνωση και η ταξινόμηση των ασθενών ανάλογα με τη βαρύτητα και τις κλινικές εκδηλώσεις, έτσι ώστε να προγραμματίζεται πιο στενή παρακολούθηση αυτών των ασθενών με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης σοβαρών επιπλοκών [52]. Έτσι, για την αντιμετώπιση του φαινομένου Raynaud συστήνονται ανταγωνιστές ασβεστίου, και για πιο ανθεκτικές περιπτώσεις αναστολείς φωσφοδιεστεράσης – 5 (PDE-5 inhibitors), η ενδοφλέβια χορήγηση με προστανοειδές (iloprost), καθώς και αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης. Οι αναστολείς φωσφοδιεστεράσης – 5 και η ενδοφλέβια χορήγηση με προστανοειδές (iloprost) συστήνονται για τη θεραπεία των δακτυλικών ελκών. Χρήσιμη είναι και η χρήση ανταγωνιστών υποδοχέων ενδοθηλίνης (dual endothelin receptor antagonist – ERA).

Για την ΠΑΥ συστήνεται η χρήση ανταγωνιστών υποδοχέων ενδοθηλίνης (ERA), αναστολέων φωσφοδιεστεράσης-5, ή διεγέρτες της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης (riociguat) και χρήση ενδοφλέβιων ανάλογων προστακυκλίνης (iloprost, treprostinil).

Ως γενική θεραπευτική αρχή συστήνεται η χρήση της μεθοτρεξάτης ως αποτελεσματική επιλογή στην αντιμετώπιση της δερματικής προσβολής. Η μεταμόσχευση αυτόλογων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων συστήνεται σε ταχέως εξελισσόμενη νόσο μη ανταποκρινόμενη στη φαρμακευτική αγωγή με mycophenolate, ή rituximab.

Για την αντιμετώπιση της πνευμονικής προσβολής, ως κύρια θεραπευτική επιλογή συστήνεται η κυκλοφωσφαμίδα, το mycophenolate mofetil και το rituximab και Nintedanib και η μεταμόσχευση αυτόλογων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε ταχεία επιδείνωση διάμεσης πνευμονοπάθειας.

Για την νεφρική κρίση ΣΣκ συστήνονται αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης I (α ΜΕΑ), που μείωσε σημαντικά τη θνητότητα. Επισημαίνεται ότι η χρήση υψηλών δόσεων κορτικοστεροειδών πρέπει να αποφεύγεται στους ασθενείς με ΣΣκ. Η προληπτική τακτική παρακολούθηση της αρτηριακής πίεσης και της νεφρικής λειτουργίας είναι απαραίτητα.

Για την προσβολή του γαστρεντερικού συστήματος συστήνεται η χρήση αναστολέων αντλίας πρωτονίων (PPIs), προκινητικών σκευασμάτων για την αντιμετώπιση της δυσφαγίας, της αχαλασίας του οισοφάγου και της ψευδοαπόφραξης του εντέρου, μαζί με την περιοδική χρήση αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση της βακτηριδιακής υπερανάπτυξης [52].

Πρόγνωση. Η πρόγνωση της νόσου γενικά παραμένει φτωχή. Υπάρχουν αρκετοί ασθενείς που παρουσιάζουν πολύ μικρή διάρκεια νόσου με σοβαρές επιπλοκές [23].

Στη βάση δεδομένων της EUSTAR (EULAR, European League Against Rheumatism) η αυξημένη θνησιμότητα συσχετίστηκε με προσβολή των πνευμόνων, τη διάχυτη δερματική σκληροδερμία, το φαινόμενο Raynaud, την πρωτεϊνουρία, την ΠΑΥ και τη μεγάλη ηλικία εμφάνισης. Επιμέρους μελέτες, δίνουν έμφαση κάθε φορά και σε διαφορετική κλινική εκδήλωση ως δυσμενέστερο προγνωστικό δείκτη για την πορεία της νόσου, [44,53,54,55]. Παράλληλα τονίζεται ο ρόλος των αυτοαντισωμάτων στην πρόγνωση, με τα αντικεντρομεριδικά να συσχετίζονται θετικά, ενώ τα anti-Topo I αντισώματα και τα αντί-RNA πολυμεράσης III αντισώματα να αποτελούν αρνητικό προγνωστικό δείκτη [56,57].

Συσχέτιση επίσης φαίνεται να υπάρχει και με την οικονομική κατάσταση [13].

1.7 ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΟ ΣΚΛΗΡΟΔΕΡΜΑ

1.7.1 Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα Τ λεμφοκύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επίκτητη ανοσία. Φέρουν στην επιφάνεια τους υποδοχέα αντιγόνων αποτελούμενο από α και β άλυσσο (T Cell Receptors - TCR) με τους οποίους αναγνωρίζουν αντιγονικά πεπτίδια σε συνδυασμό με αλληλία HLA [58].

Υποπληθυσμοί Τ λεμφοκυττάρων.

Τα "βοηθητικά" CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν πεπτίδια από εξωκυττάρια αντιγόνα που είναι συνδεδεμένα με HLA τάξης II. Παρέχουν βοήθεια στα Β λεμφοκύτταρα και εκκρίνουν κυτταροκίνες, ασκώντας επίδραση και σε άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς. Ανάλογα με τις κυτταροκίνες που εκκρίνουν διακρίνονται σε διάφορους υποτύπους (Th1, Th2, Th17, Th9, Tfh), όπως φαίνονται πιο αναλυτικά στον Πίνακα 1.5 [59].

Πίνακας 1.5. Υποκατηγορίες βοηθητικών CD4⁺ Τ λεμφοκυττάρων [59]

ΥΠΟΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΗ	ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ	ΡΟΛΟΣ
Th1	INF γ	Tbet	Φλεγμονώδης απόκριση σε βακτήρια, και καρκινικά κύτταρα
Th2	IL-4, IL-13	GATA-3	Διαφοροποίηση Β λεμφοκυττάρων και παραγωγή αντισωμάτων
Th17	IL-17	ROR γ t	Άμυνα σε φραγμούς του βλεννογόνου και μύκητες
Th9	IL-9	IRF4, PU.1	Άμυνα σε έλμινθες
Tfh	IL-21, IL-4	Bcl-6	Βοήθεια στην παραγωγή αντισωμάτων από τα Β κύτταρα στα βλαστικά κέντρα

Tfh: T follicular helper cells

Τα "κυτταροτοξικά" CD8⁺ T λεμφοκύτταρα, αναγνωρίζουν ως αντιγόνα ενδοκυττάρια πεπτίδια, που φέρονται στην επιφάνεια του κυττάρου συνδεδεμένα με HLA τάξης I. Τα κύτταρα αυτά σκοτώνουν καρκινικά κύτταρα, κύτταρα μολυσμένα με ιό, και συμμετέχουν στην απόρριψη μολυσμένου από τον ξενιστή. Εκκρίνουν ουσίες, τις κυτταροκίνες (IL-2, INFγ), μέσω των οποίων ενεργοποιούν άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [60].

Μια άλλη κατηγορία είναι τα T κύτταρα μνήμης, που έχουν μεγάλο χρόνο ζωής και ενεργοποιούνται τη δεύτερη φορά που θα έρθουν σε επαφή με το ίδιο αντιγόνο και ενδέχεται λειτουργούν είτε σαν βοηθητικά είτε σαν κυτταροτοξικά κύτταρα [61]. Διακρίνονται σε:

- T κύτταρα κεντρικής μνήμης (κύτταρα TCM), που έχουν υποδοχείς CD45RO, CD44, υποδοχείς χημειοκίνης C-C τύπου 7 (CCR7) και L-σελεκτίνης (CD62L). Κυρίως, τα συναντούμε στους λεμφαδένες και στο περιφερικό αίμα.
- Δραστικά T κύτταρα μνήμης (Effector memory T cells) που έχουν τους CD45RO και CD44 υποδοχείς. Τα συναντούμε στο περιφερικό αίμα και τους ιστούς [62].
- T κύτταρα μόνιμης μνήμης ιστών (TRM), εντοπίζονται σε διάφορους ιστούς, δεν μετακινούνται και φέρουν τους CD103 υποδοχείς [63].
- T κύτταρα παροδικής μνήμης εντοπίζονται στο αίμα και η δράση τους μπορεί να είναι είτε ως κυτταροτοξικό είτε ως βοηθητικό κύτταρο [64].

Άλλη κατηγορία αποτελούν τα ρυθμιστικά T κύτταρα (Tregs) που καταστέλλουν τη δράση των εκτελεστικών (effector) T λεμφοκυττάρων, τερματίζουν την T κυτταρική απάντηση καταστέλλοντας και τα αυτοαντιδραστικά T κύτταρα. Εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα FOXP3 και ο αριθμός αλλά κυρίως η λειτουργία τους είναι μειωμένη σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα [65].

Διακρίνουμε επίσης τα εμφυτοειδή T-κύτταρα (Innate-like T cells), που προκαλούν γρήγορη ανοσιακή κυτταρική απάντηση ανεξάρτητα από τα αλληλόμορφα HLA. Ταξινομούνται σε κύτταρα NKT (T - Natural killers, T κυτταρα-φυσικοί φονείς), κύτταρα

MAIT (Mucosal associated invariant T cells), αμετάβλητα T κύτταρα, που δραστηριοποιούνται στο βλεννογόνο), και γδ T κύτταρα, που εμπλέκονται σε κακοήθειες και σε λοιμώξεις [66].

Τα φυσικά φονικά T κύτταρα (Natural killer T cells -NKT) διαφέρουν από τα φονικά κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Αναγνωρίζουν τα γλυκολιπίδια που παρουσιάζονται από το CD1d, ως αντιγόνα και μόλις ενεργοποιηθούν, ενεργούν με λειτουργίες τόσο βοηθητικών όσο και κυτταροτοξικών T κυττάρων. Συμμετέχουν στην παραγωγή κυτταροκινών, αναγνωρίζουν και καταστρέφουν νεοπλασματικά κύτταρα και όσα κύτταρα είναι μολυσμένα από τον ιό του απλού έρπητα [67].

Τα σχετιζόμενα με το βλεννογόνο μη μεταβλητά T κύτταρα (Mucosal associated invariant T cells) εντοπίζονται στους πνεύμονες, στο ήπαρ, στους βλεννογόνους, στο περιφερικό αίμα. Το έναυσμα για την ενεργοποίησή τους αποτελεί η πρωτεΐνη MR1. Εκκρίνουν κυτταροκίνες με φλεγμονώδη δράση και προκαλούν λύση του κυτταρικού τοιχώματος [68].

Τέλος τα γδ T κύτταρα είναι ένα μικρό υποσύνολο T κυττάρων που διαθέτουν TCR (υποδοχέας T-κυττάρου) με γ και δ άλυσο. Εντοπίζονται κυρίως στον εντερικό βλεννογόνο και αναγνωρίζουν ολόκληρες πρωτεΐνες χωρίς να απαιτείται αντιγόνο-παρουσίαση από το HLA [69].

T λεμφοκύτταρα και ΣΣκ

Τα T λεμφοκύτταρα φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ΣΣκ. Σε βιοψίες δέρματος ασθενών με ΣΣκ βρέθηκε ολιγοκλωνικός πολλαπλασιασμός των T λεμφοκυττάρων [70, 71,72] και T λεμφοκύτταρα με έκφραση δείκτη πρώιμης ενεργοποίησης του T κυττάρου, CD69 [22]. Στους νέους ασθενείς, που δεν έχει γίνει ακόμη έναρξη φαρμακευτικής αγωγής, στις βιοψίες δέρματος ανευρίσκονται αυξημένα ποσοστά κυτταροτοξικών CD4⁺ (CD57^{high}CD4⁺) κύτταρων (CD4⁺CTLs) και CD8⁺ T κύτταρα. Είναι ενεργοποιημένα, έχουν δράση κυτταροτοξική και προάγουν την ίνωση [73]. Στις ίδιες βιοψίες

δέρματος ανευρίσκονται αρκετά αποπτωτικά ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και ενδοθηλιακά κύτταρα που φέρουν μόρια HLA τύπου II, και αποτελούν στόχους απόπτωσης από τα γειτονικά CD4⁺CTLs [73]. Αυτό το εύρημα της βιοψίας δείχνει ότι τα T λεμφοκύτταρα συνεισφέρουν στην ίνωση και στην παθογένεια των αγγειακών βλαβών της νόσου αλληλεπιδρώντας με τα αντιγόνα των ενδοθηλιακών κυττάρων [74].

Επίσης τα Th2 κύτταρα έχουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην ΣΣκ, μέσω της IL-4 και της IL-13 που επιδρούν στους ινοβλάστες και επάγουν την ίνωση, αλλά και μέσω της διέγερσης του TGF-β σε ινοβλάστες και μακροφάγα. Ακόμη, επιδρούν στα CD30⁺ B κύτταρα, αυξάνουν τον παράγοντα διέγερσης μακροφάγων και κοκκιοκυττάρων των μυο-ινοβλαστών (GM-CSF) που συσχετίζεται με διάμεση πνευμονοπάθεια στην ΣΣκ [75]. Η αύξηση της παραγωγής της IL-31 που σχετίζεται με την ίνωση, οφείλεται επίσης στην ενεργοποίησή τους [76].

Τα Tfh κύτταρα (CD4⁺CXCR5⁺PD1⁺) συμβάλλουν στην παραγωγή αντισωμάτων από πλασματοκύτταρα των βλαστικών κέντρων. Τα Tfh κύτταρα συσχετίστηκαν με ασθενείς με θετικά ευρήματα στην τριχοειδοσκόπηση και προσβολή εσωτερικών οργάνων [77].

Τέλος, τα T λεμφοκύτταρα που παράγουν ανασταλτικές κυτταροκίνες (π.χ TGFβ1 και IL-10) και καταστέλλουν την ινωτική δράση άλλων κυττάρων, βρέθηκαν να είναι ανενεργά στους ασθενείς με ΣΣκ [78].

1.7.2 B ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα B λεμφοκύτταρα τα συναντούμε για πρώτη φορά στο εμβρυϊκό ήπαρ, ενώ μετά τη γέννηση η ωρίμανσή τους συνεχίζεται στο μυελό των οστών. Το 1974 αρχικά διατυπώθηκε η υπόθεση ότι ένας υποπληθυσμός τους μπορεί να έχει και κατασταλτική δράση στην ανοσιακή απάντηση [79]. Κύριες λειτουργίες τους είναι η παραγωγή των αντισωμάτων - αυτοαντισωμάτων, η έκκριση κυτταροκινών και η αντιγονο-παρουσίαση στα T λεμφοκύτταρα.

Κατά την ωρίμανσή τους τα B κύτταρα ακολουθούν ένα σταθερό κύκλο με πολλά σημεία ελέγχου. Στον κύκλο της ζωής τους, που αρχίζει από το μυελό των οστών πραγματοποιείται αναδιάταξη των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας Ig, μα και επιμέρους αλλαγές της ελαφριάς αλυσίδας που οδηγούν σε ένα BCR (B Cell Antigen Receptor) υποδοχέα ανά B κύτταρο με απόλυτη εξειδίκευση για το αντιγόνο. Τα ανώριμα CD10⁺ B κύτταρα, τα οποία εκφράζουν IgM/IgD στην επιφάνειά τους, μεταναστεύουν στο περιφερικό αίμα, όπου μετατρέπονται σε ώριμα πρωτογενή B λεμφοκύτταρα που με τη σειρά τους έρχονται σε επαφή με αντιγόνα και μέσω αντιδράσεων που πραγματοποιούνται στα βλαστικά κέντρα, η Ig βαριά αλυσίδα αλλάζει τάξη και προκύπτει το ώριμο B κύτταρο μνήμης ή το πλασματοκύτταρο που εκκρίνει ειδικές για το αντιγόνο - στόχο ανοσοσφαιρίνες [80].

Υποπληθυσμοί B λεμφοκυττάρων

Τα B λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες. Εκτελεστικά (effector) B κύτταρα που εκκρίνουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως IL-6, και ρυθμιστικά B λεμφοκύτταρα (regulatory B cells, Breg cells) που εκκρίνουν τις αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, IL-10, IL-35, καταστέλλουν τα effector T κύτταρα και προάγουν τα Tregs [81].

Τα B λεμφοκύτταρα ανάλογα με τη λειτουργία τους, διακρίνονται στις εξής υποκατηγορίες:

- Πλασμαβλάστες, με μικρό χρόνο ζωής και προκύπτουν από τη διαφοροποίηση των Β κυττάρων μετά την πρώτη επαφή με το αντιγόνο. Εκκρίνουν αντισώματα χαμηλής συγγένειας με το αντιγόνο [82].
- Πλασματοκύτταρα, που δημιουργούνται με την ενεργοποίηση των Β κυττάρων μέσω της Τ εξαρτώμενης αλληλεπίδρασης και τα αντισώματα τους έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με το αντιγόνο [82].
- Λεμφοπλασματοκυτταροειδή κύτταρα, που αποτελούν συνδυασμό Β λεμφοκυττάρων και πλασματοκυττάρων. Ανευρίσκονται συνήθως σε προ -κακοήθεις καταστάσεις και δυσκρασίες και εκκρίνουν μονοκλωνικά IgM αντισώματα [83].
- Κύτταρα μνήμης, που αναπτύσσονται στα βλαστικά κέντρα δευτερογενών λεμφικών οργάνων, μετά από ενεργητική ή παθητική ενεργοποίηση (επαφή με αντιγόνο ή εμβολιασμός) και κυκλοφορούν στην περιφέρεια ανενεργά, για πολλά έτη. Ενεργοποιούνται στη δεύτερη επαφή με το ίδιο αντιγόνο και εκκρίνουν ταχύτατα τα απόλυτα εξειδικευμένα για το αντιγόνο αντισώματα. Τα Β κύτταρα μνήμης έχουν στην επιφάνειά τους υποδοχείς, κυρίως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (BCR), που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του κυττάρου μνήμης και την αναγνώριση του ίδιου αντιγόνου σε δεύτερο χρόνο στην περιφέρεια [84]. Τα Β κύτταρα μνήμης συνήθως χαρακτηρίζονται από τον υποδοχέα CD27, που όμως δεν εκφράζεται πάντα, όπως σε ορισμένες αυτοάνοσες παθήσεις ή όταν πρόκειται για εξαντλημένα Β κύτταρα.
- Κύτταρα B-2 που διακρίνονται σε θυλακοειδή Β κύτταρα (follicular B cells) και κύτταρα οριακής ζώνης (Marginal zone B cells). Τα πρώτα βρίσκονται κυρίως στα δευτερογενή λεμφοειδή όργανα και είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία αντισωμάτων υψηλής συγγένειας κατά τη διάρκεια μιας μόλυνσης. Τα Β κύτταρα οριακής ζώνης, τα οποία απαντούν κυρίως στο σπλήνα και αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των παθογόνων που μεταφέρονται εκεί με το αίμα. Η ενεργοποίησή τους μπορεί να γίνει και μέσω των Τ κυττάρων [82].

- B-1 κύτταρα που απαντούν σε ποντίκια, ανευρίσκονται στην περιτοναϊκή και την υπεζωκοτική τους κοιλότητα, παράγουν αντισώματα κυρίως έναντι των παθογόνων στους βλεννογόνους και η ενεργοποίησή τους δεν είναι εξαρτώμενη από T κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά δεν έχουν ανευρεθεί σε ανθρώπους [82].

B λεμφοκύτταρα και ΣΣκ

Τα B κύτταρα είναι ήδη γνωστό, από βιοψίες ασθενών, ότι ανευρίσκονται στις δερματικές βλάβες της ΣΣκ και συσχετίζονται με την παθογένεια της νόσου [85] και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων [86]. Στη ΣΣκ τα αυτοαντισώματα που εκκρίνονται πιο συχνά από τα B λεμφοκύτταρα είναι ειδικά της νόσου και χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη, είναι τα αντισώματα κατά της τοποϊσομεράσης I (Topo I), τα αντι-κεντρομεριδιακά αντισώματα (ACA) και τα αντισώματα έναντι της RNA πολυμεράσης III (anti RNA pol 3). Μέσω της δράσης των αντισωμάτων φαίνεται ότι τα B κύτταρα συμβάλλουν στην αιτιοπαθογένεια της νόσου.

Τα αντικεντρομεριδιακά (ACA) αντισώματα έχουν ως στόχο πρωτεΐνες του πυρήνα και συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση [86]. Τα αντισώματα έναντι της τοποϊσομεράσης I συνδέονται με την τοποϊσομεράση I, ένα ένζυμο που συμμετέχει στη σύνδεση του DNA. Τα αντισώματα αυτά μπορεί να συνδεθούν στην επιφάνεια των ινοβλαστών σε ασθενείς με ΣΣκ, χωρίς να είναι πλήρως γνωστό αν η σύνδεση αυτή είναι αρκετή να τους ενεργοποιήσει [86].

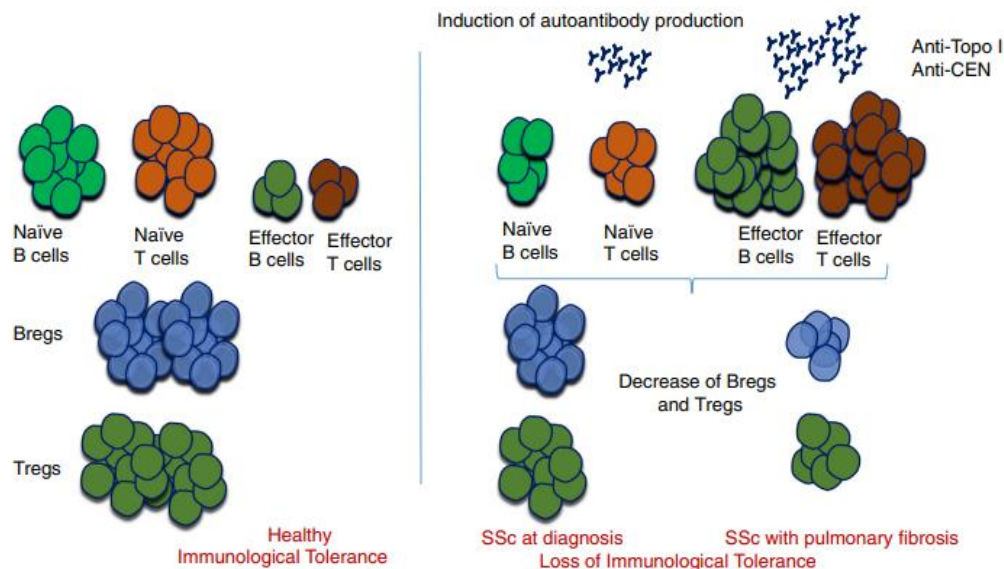
Ακόμα υπάρχουν υποθέσεις ότι τα κύτταρα του ενδοθηλίου που αποπίπτουν κάνουν ορατά στο ανοσιακό σύστημα τοποϊσομεράση I και CENP-B, που συνδέεται χαλαρά με τα λεία μυϊκά κύτταρα της πνευμονικής αρτηρίας μέσω του CCR3. Στο σύμπλεγμα που θα δημιουργηθεί συνδέονται τα αντικεντρομεριδιακά αντίσωμα προκαλώντας αγγειακή βλάβη. Αντι-Τοπο I αντισώματα μέσω του CCR7 μορίου μπορούν να προσδεθούν στους ινοβλάστες και να αυξηθεί η παραγωγή κολλαγόνου [86].

Τα αντισώματα έναντι της RNA πολυμεράσης III, φαίνεται να συσχετίζονται με την εμφάνιση κακοήθειας. Μεταλλάξεις του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της υπομονάδας RPC1 της RNA πολυμεράσης III έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ΣΣκ και κακοήθεια. Τα αντισώματα στρέφονται τόσο κατά του παθολογικού γονιδίου, όσο και του φυσιολογικού και πιθανά συμβάλουν στην παθογένεια της νόσου [86].

Διάφορα άλλα αντισώματα χωρίς να είναι ειδικά της ΣΣκ φαίνεται να συμβάλλουν στην παθογένεια της νόσου. Αντισώματα έναντι της μεταλοπρωτεΐνης 1 και 3, που αδρανοποιούν τη δράση των στόχων τους, που είναι η διάσπαση του κολλαγόνου, συμβάλλοντας έτσι στην ίνωση [86]. Αντισώματα έναντι των ενδοθηλιακών κυττάρων, αντισώματα έναντι του υποδοχέα 1 της αγγειοτενσίνης II, και αντισώματα έναντι του μουσκαρινικού υποδοχέα 3, φαίνεται επίσης να έχουν λειτουργική σημασία στη ΣΣκ, με τα τελευταία να εμπλέκονται στη δυσλειτουργία της κινητικότητας του γαστρεντερικού σωλήνα [86,87, 88, 89].

Τα Β κύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες που ευνοούν την ίνωση, όπως IL-6, IL-23 και TGFβ1. Από την άλλη μεριά τα ρυθμιστικά Β κύτταρα, που εκκρίνουν αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-10 και IL-35, είναι ελαττωμένα σε αριθμό στη νόσο [85,86,88] Όπως φαίνεται στην εικόνα 1.8 [87].

Μία ακόμη δράση των Β κύτταρων που ενέχεται στην παθογένεια της ΣΣκ, είναι η ικανότητα που έχουν να αλληλοεπιδρούν άμεσα τόσο με τους ινοβλάστες, όσο και με τα δένδριτικά κύτταρα [85] που προάγουν διαφοροποίηση των Τ λεμφοκυττάρων προς Th2 και παραγωγή IL-4, IL-5, IL-13 [86, 90].



Εικόνα 1.8 Ενδεικτική παρουσίαση των Β κυττάρων και των Τ κυττάρων σε υγιείς και σε ασθενείς με ΣΣκ (διαταραχή της ανοσιακής απάντησης). Τα δραστικά (Effector) Β και Τ κύτταρα αυξάνονται στη ΣΣκ ενώ τα Bregs και Tregs μειώνονται, ιδίως με την πάροδο του χρόνου και τη συσχέτιση εκδηλώσεων όπως η πνευμονική ίνωση. Ακόμη ο μειωμένος αριθμός των Bregs συσχετίζεται με υψηλό τίτλο αυτοαντισωμάτων για τη νόσο [87]

Στη ΣΣκ τα Β λεμφοκύτταρα υπερεκφράζουν τον διεγερτικό υποδοχέα CD19 σε ποσοστό 30-50% [85], ενώ παράλληλα ο ανασταλτικός υποδοχέας CD22 φαίνεται πως υπολειτουργεί σε ασθενείς με διάχυτου τύπου σκληροδερμία και κυρίαρχη κλινική εκδήλωση την πνευμονική ίνωση. Υπάρχουν αυτοαντισώματα έναντι του CD22 με αποτέλεσμα η ανασταλτική δράση του CD22 να περιορίζεται [86], δηλαδή, υπάρχει υπερέκφραση του διεγερτικού CD19 και απουσία του ανασταλτικού CD22 [86].

Ένας ακόμα υποδοχέας των Β λεμφοκυττάρων είναι ο CD32 ή αλλιώς FcγRII, που είναι μια οικογένεια υποδοχέων με τρεις ισομορφές, την FcγRIIA, την FcγRIIB και την FcγRIIC. Οι υποδοχείς FcγR συνδέονται με το σταθερό τμήμα Fc των ανοσοσφαιρινών. Βρίσκονται στα λευκοκύτταρα, στα κύτταρα Langerhans, στα αιμοπετάλια και στα λεμφοκύτταρα (Τ, Β και ΝΚ). Στα Β λεμφοκύτταρα εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά ο ανασταλτικός υποδοχέας FcγRIIB. Σε αυτούς τους τρεις υποτύπους η εξωκυττάρια περιοχή είναι σχεδόν η ίδια, αλλά

το ενδοκυττάριο μέρος διαφέρει με αποτέλεσμα να έχουν διαφορετικές λειτουργίες. Ο υποδοχέας FcγRIIB έχει μια ενδοκυττάρια περιοχή που δρα ανασταλτικά ενώ ο υποδοχέας FcγRIIA λειτουργεί σαν ενεργοποιητής και τέλος ο υποδοχέας FcγRIIC είναι ένα μείγμα μεταξύ A και B και λειτουργεί σαν ενεργοποιητής [91,92]. Η αναλογία των FcγRIIB υποδοχέων στη μεμβράνη των B κυττάρων επηρεάζεται θετικά από φαρμακευτικές ουσίες όπως η δεξαμεθαζόνη και οι κυτταροκίνες IL-6 και IL-10, ενώ επηρεάζεται αρνητικά από ουσίες όπως ο anti-TNFα, το C5 και η IFNγ [91].

Η σύνδεση του υποδοχέα FcγRIIB με το τμήμα Fc ενός αντιγόνου στην επιφάνεια των B κυττάρων ενεργοποιεί τη διαδικασία της απόπτωσης [93], αυξάνει την ουδό ενεργοποίησης του BCR [86] και μειώνει την παραγωγή των αυτοαντισωμάτων [94]. Στα δενδριτικά κύτταρα, στα μακροφάγα, στα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, στα μαστοκύτταρα και στα βασεόφιλα αναστέλλει τις λειτουργίες ενεργοποίησης, όπως είναι η φαγοκυττάρωση και η απελευθέρωση φλεγμονογόνων κυτταροκινών. Ο ρόλος τους είναι επομένως απαραίτητος, τόσο στην άμυνα έναντι παθογόνων όσο και σε αυτοάνοσες καταστάσεις. B λεμφοκύτταρα με μειωμένη έκφραση του ανασταλτικού υποδοχέα FcγRIIB ανευρέθηκαν στα B κύτταρα μνήμης σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, με ΣΕΛ και μάλιστα παραλλαγή του υποδοχέα FcγRIIB συσχετίστηκε με αυξημένη ακτινολογική βλάβη στις αρθρώσεις των ασθενών [94].

Ένας άλλος υποπληθυσμός των B λεμφοκυττάρων με υποδοχέα το CD21 έχει ήδη συσχετισθεί με αρκετές αυτοάνοσες παθήσεις. Τα CD21^{low} B λεμφοκύτταρα στον υγιή πληθυσμό, είναι εξαντλημένα αποπτωτικά κύτταρα, που βρίσκονται στο περιφερικό αίμα, στις αμυγδαλές και στον θύμο αδένα σε ποσότητα μικρότερη από το 5% των συνολικών B λεμφοκυττάρων. Ο πληθυσμός των B κυττάρων με μειωμένη έκφραση ή έλλειψη έκφρασης του CD21 υποδοχέα, τα λεγόμενα CD21^{low} B κύτταρα, έχουν συσχετιστεί με αρκετές αυτοάνοσες και χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις και χαρακτηρίζονται ως κύτταρα μνήμης (IgD-CD 27⁺) υπερδιεγερμένα, και περιέχουν αυτοαντιδραστικά κύτταρα που εκφράζουν υψηλά επίπεδα δεικτών ενεργοποίησης [84]. Η παρουσία τους ταυτοποιήθηκε σε λοιμώξεις

από παράσιτα, HIV λοίμωξη και ηπατίτιδα C. Εμπλέκονται στην αιτιοπαθογένεια του σ. Sjogren, της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας και του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου [95,96,97,98,99,100].

Μάλιστα, σε ασθενείς με σκληρόδερμα, βρέθηκε ότι τα CD21^{low} B λεμφοκύτταρα υπάρχουν σε ποσοστό περίπου >10% του συνολικού αριθμού των CD19⁺ B κυττάρων, χωρίς να υπάρχει συσχέτιση με την ταξινόμηση των ασθενών, δηλαδή περιορισμένο (lcSSc) ή διάχυτο (dcSSc) σκληρόδερμα [83]. Το αυξημένο ποσοστό τους, έχει επιβεβαιωθεί στους ασθενείς με ΣΣκ, ο βαθμός συμμετοχής τους όμως στην παθογένεια και ο ρόλος τους δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός [96,101].

2 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της μελέτης είναι να διερευνήσουμε τη σημασία των CD21^{low} B κυττάρων στη ΣΣκ. Για τον σκοπό αυτό αναλύσαμε τα CD21^{low} B κύτταρα σε συσχέτιση με όλες τις κύριες εκφάνσεις της νόσου (μικροαγγειοπάθεια - δακτυλικά έλκη, πνευμονική ίνωση, παραγωγή αντι-Τοπο I αυτοαντισωμάτων) και έπειτα μελετήσαμε και την έκφραση του ανασταλτικού CD32 υποδοχέα (FcγRIIB ισομορφής) στα CD21^{low} B κύτταρα στις ίδιες βασικές εκδηλώσεις της νόσου. Ακόμη, προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε κατά πόσο τα παραπάνω B κύτταρα είναι αυτοαντιδραστικά αναγνωρίζοντας την Τοποϊσομεράση I.

2.2 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Στη μελέτη πήραν μέρος 27 ασθενείς, με Συστηματική Σκλήρυνση, σύμφωνα με τα αναθεωρημένα κριτήρια ταξινόμησης της ACR/EULAR του 2013 [50] καθώς και 15 υγιή άτομα (healthy controls, HCs). Όλοι οι ασθενείς, παρακολουθούνταν στο Εξωτερικό Ιατρείο της Ρευματολογικής κλινικής και Κλινικής Ανοσολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Λήφθηκε γραπτή ενημερωμένη συγκατάθεση από όλους τους συμμετέχοντες σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι και το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Τοπική Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Από τους ασθενείς 21 άτομα (77,7 %) ήταν γυναίκες με μέση ηλικία τα 55,66 έτη (ηλικιακό εύρος 32-81 έτη) και 6 άτομα (22,2 %) ήταν άνδρες με μέση ηλικία τα 59,5 έτη (ηλικιακό εύρος 52-79 έτη). Δώδεκα ασθενείς (44,44 %) είχαν διάχυτη δερματική μορφή ΣΣκ και οι υπόλοιποι 15 ασθενείς (55,55 %) είχαν περιορισμένη δερματική μορφή. Επίσης, 14 από τους ασθενείς αυτούς (51,85 %), παρουσίασαν κατά τη διάρκεια της νόσου τους τουλάχιστον μία καταγραφή παρουσίας δακτυλικού έλκους, ενώ για τους υπόλοιπους 13 ασθενείς (48,14 %)

δεν υπήρχε αντίστοιχη καταγραφή ή αναφορά. Ακόμη, οι 10 ασθενείς (27,03%) είχαν Πνευμονική Ίνωση τεκμηριωμένη με απεικόνιση του θώρακα με αξονική τομογραφία, ενώ οι υπόλοιποι 17 ασθενείς (62,96%) δεν παρουσίαζαν διάμεση πνευμονική ίνωση. Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον Πίνακα 2.1. Στον Πίνακα 2.2 φαίνεται η φαρμακευτική αγωγή που ελάμβαναν οι ασθενείς, στον Πίνακα 2.4 φαίνεται η βαθμολογία σκλήρυνσης του δέρματος των ασθενών, όπως εκτιμήθηκε με τον τροποποιημένο δείκτη mRSS και στον Πίνακα 2.5 τα αυτοαντισώματα των ασθενών.

Πίνακας 2.1. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (ΣΣκ) που συμμετείχαν στη μελέτη

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ (%)
Γυναίκες	21 (77,7 %)
Ηλικία (μέση τιμή, εύρος, έτη)	55,66 (32-81)
Άνδρες	6 (22,2 %)
Ηλικία (μέση τιμή, εύρος, έτη)	59,5(52-79)
Δείκτης Μάζας Σώματος (Kg/m ²) (μέσος όρος, εύρος)	24,9 (17,8-31,2)
Διάχυτη (dcSSc) / Περιορισμένη δερματική (lcSSc) ΣΣκ	12 (44,44 %) / 15 (55,55 %)
Δακτυλικά έλκη (NAI/OXI)	14 (51,85 %) / 13 (48,14 %)
Πνευμονική ίνωση (NAI/OXI)	10 (27,03 %) / 17 (62,96 %)
Διάρκεια νόσου (μέσος όρος, εύρος σε έτη)	10,5 (1-23)
ΤΚΕ (mm) (μέση τιμή, εύρος)	22,6 (2-57)
Αυξημένη CRP (αριθμός ασθενών)	0
Αντι – τοποϊσομεράσης I (+) αντισώματα (αριθμός ασθενών)	17
Αντικεντρομεριδιακά αντισώματα (+) (αριθμός ασθενών)	7
Πνευμονική αρτηριακή πίεση (μετρημένη με διαθωρακικό υπέρηχο καρδιάς) >40 mmHg (αριθμός ασθενών)	2
Λήψη ανοσοκαταστολής (αριθμός ασθενών, %)	16 (59,2%)

Πίνακας 2.2. Φαρμακευτική αγωγή που ελάμβαναν οι ασθενείς

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ
IV Iloprost	1
Bosentan	12
Macitentan	1
Sildenafil	1
Plaquenil	6
Prednisolone	10
Methotrexate	3
Mycophenolate mofetil	8
Azathioprine	2
Rituximab	5

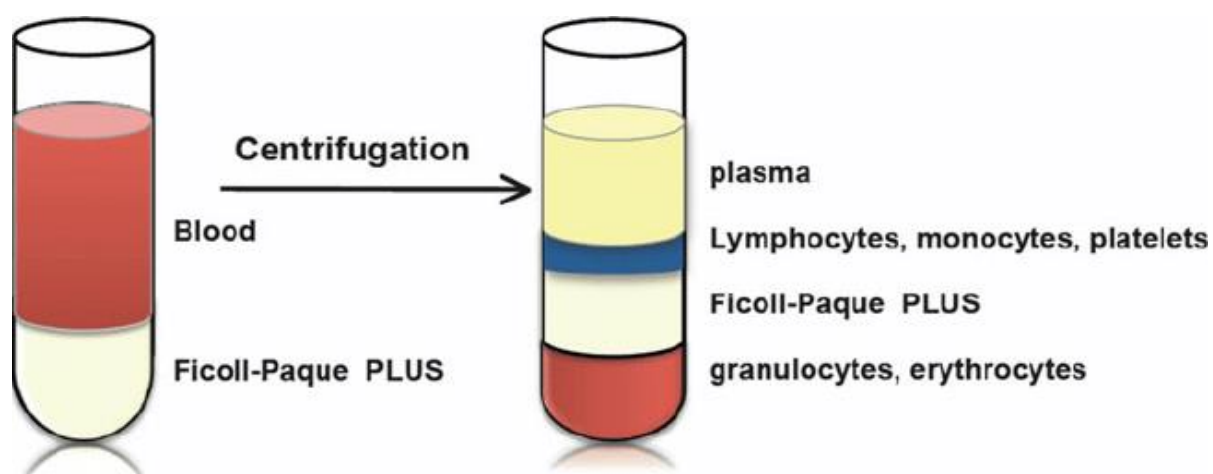
Από τους 5 ασθενείς που ελάμβαναν Rituximab στον ένα ασθενή η αιμοληψία έγινε 1 έτος μετά την έγχυση του φαρμάκου και στους υπόλοιπους τέσσερις 6 μήνες μετά.

2.2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

I) Απομόνωση μονοπύρηνων λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells / PBMCs)

Υλικά και αντιδραστήρια: Ηπαρινισμένη σύριγγα συλλογής αίματος (20ml) / δοκιμαστικοί σωλήνες 50ml και 15ml / Μέσο RPMI (Roswell Park Memorial Institute) – 1640, διάλυμα αλατιού / Στείρες πιπέτες Pasteur / Διάλυμα Lymphoprep (μέσο βαθμίδωσης πυκνότητας για την απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων) / Ορός εμβρύου μόσχου (Foetal Bovine Serum, FBS) / Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide, DMSO) / κρυοφιαλίδια, Cryovials / Υγρό άζωτο.

Μέθοδος: Η αιμοληψία έγινε στα Εξωτερικά Ιατρεία και από τον κάθε ασθενή πραγματοποιήθηκε αιμοληψία (20ml αίματος) από περιφερική φλέβα σε ηπαρινισμένη σύριγγα. Αμέσως μετά γινόταν η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων με φυγοκέντρηση των 20ml αίματος σε 10ml διάλυμα διαβάθμισης Lymphoprep σε κωνικό σωλήνα φυγοκέντρησης (falcon tube) 50ml (2500 rpm για 20 λεπτά). Στην Εικόνα 2.1 φαίνεται η διαστρωμάτωση του περιφερικού αίματος πριν και μετά την φυγοκέντρηση [102].



Εικόνα 2.1. Διαστρωμάτωση περιφερικού αίματος πριν και μετά την φυγοκέντρηση [102]

Στη συνέχεια γινόταν έκπλυση των μονοπύρηνων μετά από 2 φυγοκεντρήσεις με το μέσο RPMI-1640 (1800 rpm για 5 λεπτά) και προσθήκη στο ίζημα των μονοπύρηνων 3ml διαλύματος κρυοσυντήρησης (FBS 60%, RPMI-1640 30%, DMSO 10%). Τα κύτταρα κατανέμονταν σε 3 cryovials και αποθηκεύονταν σε κατάψυξη στους -80 °C για τουλάχιστον 24 ώρες. Τα δείγματα που δεν θα χρησιμοποιούνταν άμεσα καταψύχονταν σε υγρό άζωτο σε ειδικά cryoboxes.

II. Μέτρηση κυττάρων με χρώση Trypan Blue

Υλικά και αντιδραστήρια: Οπτικό μικροσκόπιο / 0.4% χρώση Trypan Blue / Πλάκα Neubauer ή αιμοκυτταρόμετρο

Μέθοδος: Σε 100μl κυττάρων σε σωλήνες πολυπροπυλενίου μίας χρήσης (Eppendorf) γινόταν προσθήκη 400μL 0.4% Trypan Blue (συγκέντρωση 0.32%), και καλή ανάδευση. Στη συνέχεια γινόταν λήψη 100μl από το κυτταρικό εναιώρημα που προέκυπτε μετά την προσθήκη Trypan Blue και εφαρμογή σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Γέμιζαν δύο θάλαμοι κάτω από την καλυπτρίδα, επιτρέποντας έτσι την κίνηση του κυττάρου μέσω τριχοειδούς δράσης. Σε μικροσκόπιο (μεγέθυνση 10X) γινόταν μέτρηση των ζωντανών (μη χρωματισμένων κυττάρων) και ο αριθμός πολλαπλασιάζονταν $\times 10^4$ επειδή η πλευρά του κάθε τετραγώνου είναι 1mm και η απόσταση μεταξύ της πλάκας για προβολή (slide) και της καλυπτρίδας είναι 0.1mm άρα 0.1mm^3 και το αποτέλεσμα πολλαπλασιάζονταν $\times 5$ (λόγω της αραιώσης 1:5 που έγινε από την προσθήκη Trypan Blue) για να δώσει τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων / ml του αρχικού κυτταρικού εναιωρήματος.

III. Χρώση B λεμφοκυττάρων με μονοκλωνικά αντισώματα

Υλικά και αντιδραστήρια: Διάλυμα χρώσης αλατούχο με φωσφορικά (Phosphate Buffered Saline, PBS) με 2% FBS (fetal bovine serum)(ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης, staining buffer) / Μονιμοποιητικό μέσο παραφορμαλδεΐδη (paraformaldehyde, PFA) 2% / Μονοκλωνικά αντισώματα σημασμένα με φθοριοχρώματα / Πιπέττες διαφόρων μεγεθών (0.5-2μl, 2-20μl,

20-200μl, 100-1000μl) / Ορός εμβρύου μόσχου (FBS) / Διάλυμα PBS / Πλαστικά σωληνάρια προπυλενίου τύπου Eppendorf .

Μέθοδος: Γινόταν μεταφορά των κυττάρων σε σωληνάρια τύπου Eppendorf και φυγοκέντρωση στις 4000 στροφές / λεπτό για 2 λεπτά. Μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού, γινόταν πλύση των κυττάρων με 800μl ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης (staining buffer), και μετά τη φυγοκέντρωση τα κύτταρα αραιώνονται σε 100μl ρυθμιστικού διαλύματος χρώσης (staining buffer). Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη μονοκλωνικού αντισώματος, επώαση στους 4°C για 30 λεπτά, και μετά πλύση με 800μl Staining Buffer και φυγοκέντρωση (4000 στροφές/λεπτό για 2 λεπτά). Στα κύτταρα γινόταν προσθήκη 200μl 2% PFA και επώαση στους 4°C για 10 λεπτά, πλύση με 800μl ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης (staining buffer), φυγοκέντρωση (4000rpm για 2 λεπτά), επαναιώρηση των κυττάρων σε 200μl ρυθμιστικού διαλύματος χρώσης, και φύλαξη στους 4 °C για μερικές ώρες. Μετά γινόταν με πλύση των κυττάρων με 800μl διαλύματος PBS, φυγοκέντρωση (4000 στροφές/λεπτό για 2 λεπτά) και επαναδιάλυση των κυττάρων σε PBS ώστε ο τελικός όγκος να είναι περίπου 250-300μl [103,104].

Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα anti-CD19, anti-CD27, anti-CD32 (που αναγνωρίζει και τις δύο ισομορφές FcγRIIA και FcγRIIB) και anti-CD21. Στον Πίνακα 2.3 που ακολουθεί φαίνονται τα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την φαινοτύπηση των B λεμφοκυττάρων των ασθενών της μελέτης. Όλα τα συζευγμένα με φθοριοχρώματα μονοκλωνικά αντισώματα για την ανάλυση κυτταρομετρίας ροής προμηθεύτηκαν από την BioLegend [(San Diego, CA)]. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης DNA Topoisomerase I (Topo I), (M0301S, New England Biolabs) και εργαλειοθήκη επισήμανσης (labeling kit) με αλλοφυκοκυανίνη (ANASPEC AnaTag APC Labeling kit Cat No AS-7211).

Πίνακας 2.3. Μονοκλωνικά αντισώματα με φθοριοχρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη φαινοτύπηση των κυττάρων των ασθενών με ΣΣκ.

ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΚΛΩΝΟΣ
APC/Cyanine7 anti-human CD19	SJ25C1
PE anti-human CD32	FUN-2
APC anti-human CD21	Bu32
FITC anti-human CD27	M-T271

IV) Χρώση Τοποϊσομεράσης I

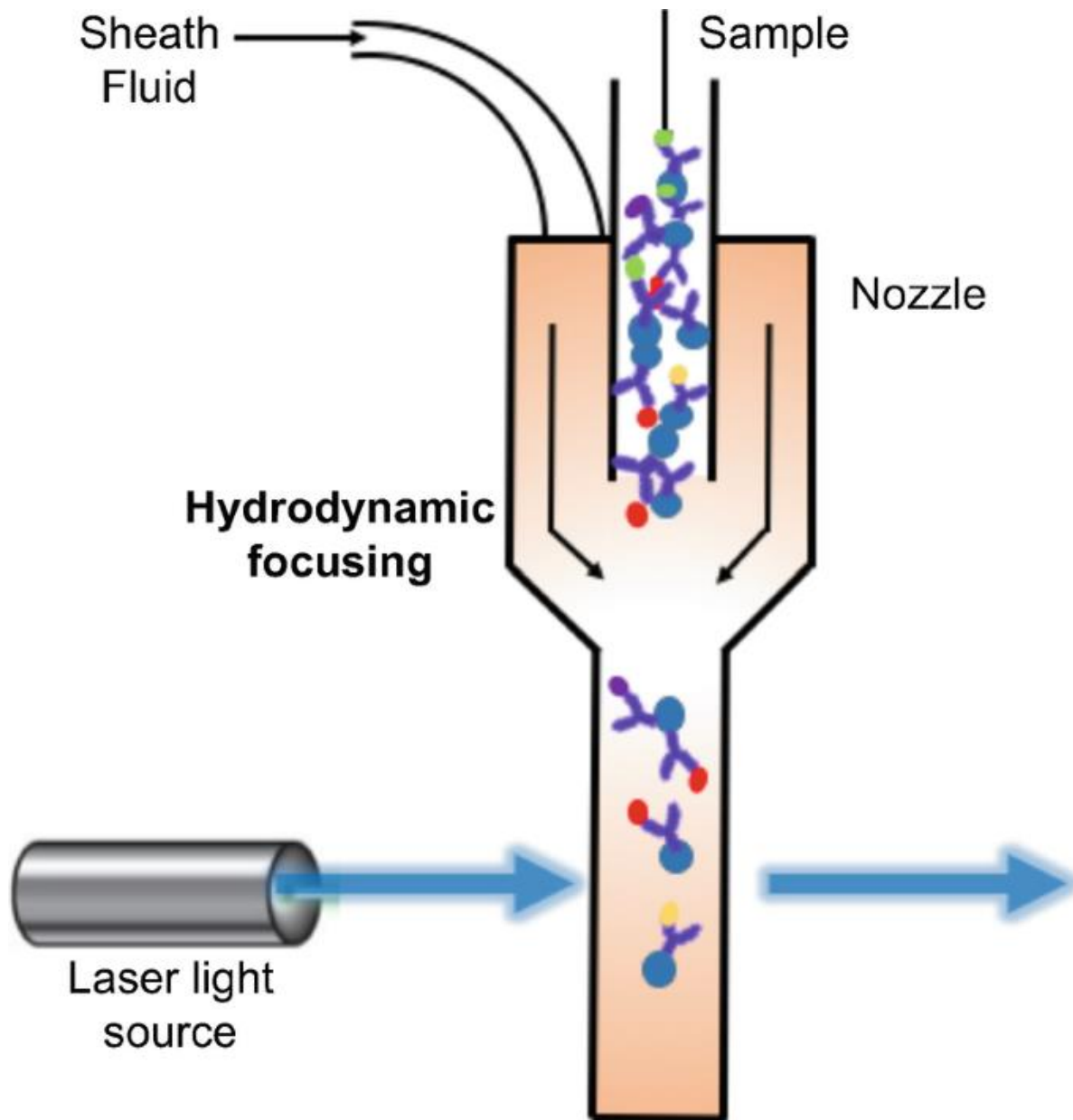
Προετοιμασία της DNA Τοποϊσομεράσης I. Αφού, έγινε προσαρμογή της συγκέντρωσης του ενζύμου στα 2-10 mg/mL και προστέθηκαν 20 μ L διαλύματος DL-Dithiothreitol (DTT) ή διθειοθρεϊτόλη ανά mL διαλύματος ενζύμου. Γινόταν ανάδευση των αντιδραστηρίων απαλά και η επώση της αντίδρασης πραγματοποιούνταν σε ένα καλυμμένο σωλήνα σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά χωρίς ανάδευση και στη συνέχεια με μια στήλη περιστροφής γινόταν αφαλάτωση του ενζύμου. Τέλος υπολογίστηκε η συγκέντρωση της εκλυόμενης πρωτεΐνης με βάση την απορρόφηση στα 280 nm.

Σύζευξη Τοποϊσομεράσης I. Γινόταν προσθήκη 0,693 mg ενεργοποιημένου με 4-(N-μηλεϊμιδομεθυλ) κυκλοεξανο-1-καρβοξυλικό ηλεκτριμιδυλεστέρα SuccinimidyI-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), αλλοφυκοκυανίνη - APC, ανά mg ενζύμου. Το διάλυμα επωζόταν για 1 (μία) ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση και προστασία από το φως. Αποκλείστηκαν οι περίσσειες των ελεύθερων θειολών με προσθήκη 10 μ L διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl Sulfoxide, DMSO) σε ένα φιαλίδιο N-αιθυλομαλεϊμίδιο (NEM, N-ethylmaleimide) και μετά με την προσθήκη 1 μ L διαλύματος NEM ανά 100 μ L μείγματος σύζευξης από την προηγούμενη αντίδραση και γινόταν

ανάδευση. Επωαζόταν ξανά το διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά μακριά από το φως. Το τελικό προϊόν περιείχε ως επί το πλείστον τη συζευγμένη με APC Τοποϊσομεράση I (APC-Τοποϊσομεράσης I), με μικρές ποσότητες ελεύθερου APC και Τοποϊσομεράσης I.

V) Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική με την οποία μετράμε και χαρακτηρίζουμε τους κυτταρικούς πληθυσμούς που βρίσκονται ελεύθερα μέσα σε ρευστό υγρό, μέσω της ανάλυσης της σκέδασης του φωτός από τα κύτταρα αυτά και του φθορισμού που εκπέμπουν. Τα κύτταρα περνάνε μπροστά από μία δέσμη laser. Η κυτταρομετρία ροής μας δίνει πληροφορίες για δεκάδες χιλιάδες κύτταρα το δευτερόλεπτο, που αφορούν το μέγεθος και το είδος τους, μιας και η δέσμη του laser εστιάζει σε κάθε κύτταρο καθώς αυτό διέρχεται από μπροστά του. Η σκέδαση ανιχνεύεται κάθετα ή παράλληλα και στα γραφήματα συμβολίζουμε με FSC (Forward Scattering) τη σκέδαση που είναι παράλληλη με τη δέσμη laser και με SSC (Side Scattering) την σκέδαση που είναι κάθετη με τη δέσμη laser. Ο φθορισμός (ενδογενής ή από εξωγενείς ουσίες που μαρκάρουν τα κύτταρα) ανιχνεύεται κάθετα (Εικόνα 2.2) [105].



Εικόνα 2.2. Σχηματική διάταξη της κυτταρομετρίας ροής σε σχέση με τη δέσμη laser [105]

Μπορούμε ταυτόχρονα να μετρήσουμε διάφορα κύτταρα και πολλές παραμέτρους των κυττάρων που ρέουν στη συσκευή ανίχνευσης. Τα κύτταρα που θέλουμε να ανιχνεύσουμε και τα μαρκάρουμε προσθέτοντας στην επιφάνειά τους τα ειδικά φθοριοαντισώματα.

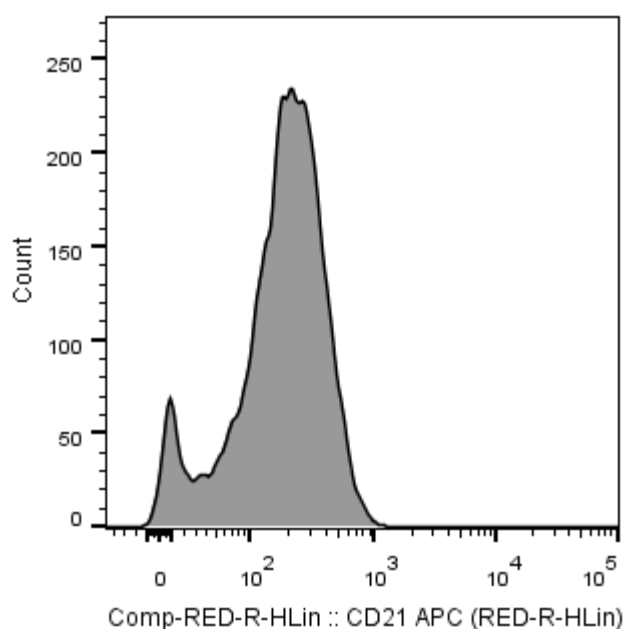
Το κυτταρόμετρο έχει τρία κύρια μέρη:

- το σύστημα ροής υγρών, που μεταφέρει το δείγμα από το δοκιμαστικό σωλήνα στον θάλαμο ροής

- το οπτικό σύστημα, που περιλαμβάνει την πηγή φωτός, φίλτρα και διάφορους ανιχνευτές φωτός
- το υπολογιστικό σύστημα, που ενισχύει το σήμα και το μετατρέπει σε ψηφιακή μορφή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αναλύσεις

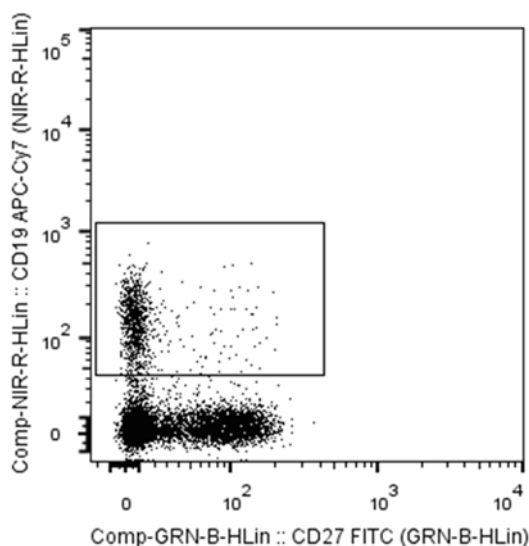
Η καταγραφή των αποτελεσμάτων από την κυτταρομετρία ροής γίνεται με :

- γραφική παράσταση με μορφή ιστογράμματος (Εικόνα 2.3)



Εικόνα 2.3 Παράδειγμα γραφικής παράστασης ιστογράμματος από κυτταρομετρία ροής

- γράφημα με κουκίδες (dot plot) με αρκετές παραλλαγές (Εικόνα 2.4)



Εικόνα 2.4 Παράδειγμα γραφήματος με κουκίδες (dot plot) από κυτταρομετρία ροής

Από τις εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής, οι πιο συχνές περιλαμβάνουν το διαχωρισμό των κυττάρων και την ταξινόμησή τους με βάση τις φυσικές τους παραμέτρους που αναγνωρίζονται από το κυτταρόμετρο, την ανίχνευση μικροοργανισμών, την εύρεση νέων βιοδεικτών, την διάγνωση ασθενειών όπως καρκίνος, λευχαιμία κ.α. [106,107]

Στη συγκεκριμένη μελέτη, για την ανάλυση των δειγμάτων εφαρμόστηκε ο τετραπλός άμεσος ανοσοφθορισμός και χρησιμοποιήθηκε ο κυτταρομετρητής ροής Guava easyCyte™ της Millipore-Merck και η μετέπειτα ανάλυση των δεδομένων έγινε με το λογισμικό Flow Jo.

2.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την ανάλυση των δεδομένων, δηλαδή για κάθε ασθενή το ποσοστό των κυττάρων που φέρουν συγκεκριμένους επιφανειακούς δείκτες καθώς και τιμές MFI, παρουσιάστηκαν ως μέσος όρος $\pm$ SD ή διάμεσος και διατεταρτημοριακό εύρος (IQR) όποτε ήταν απαραίτητο. Ως περιγραφική στατιστική χρησιμοποιήθηκαν η μέση και τυπική απόκλιση.

Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων των ασθενών υπολογίστηκαν μέσω t test δύο όψεων για μη ζευγαρωμένες μεταβλητές (Unpaired t test) και αναλύθηκαν με το λογισμικό GraphPad Prism (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Στατιστικά σημαντικές τιμές θεωρήθηκαν οι τιμές μικρότερες από 0,05.

2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως αναγράφεται στον Πίνακα 2.1, 14 ασθενείς είχαν δερματικό έλκος ή ιστορικό δερματικού έλκους, 10 ασθενείς είχαν πνευμονική ίνωση. Η βαθμολογία σκλήρυνσης του δέρματος των ασθενών, όπως εκτιμήθηκε με τον mRSS φαίνεται στον Πίνακα 2.4 ενώ στον Πίνακα 2.5 φαίνονται τα αυτοαντισώματα των ασθενών. Δεκαεπτά ασθενείς είχαν αυτοαντισώματα έναντι Τοποϊσομεράσης I, 7 ασθενείς είχαν αντικεντρομεριδικά αυτοαντισώματα και 3 ασθενείς ήταν αρνητικοί για τα δύο προηγούμενα αυτοαντισώματα.

Πίνακας 2.4. Βαθμολογία σκληρίας δέρματος (mRSS) των ασθενών με ΣΣκ

mRSS	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ
0-5	8
6-10	6
11-15	5
16-20	2
21-25	2
26-30	1

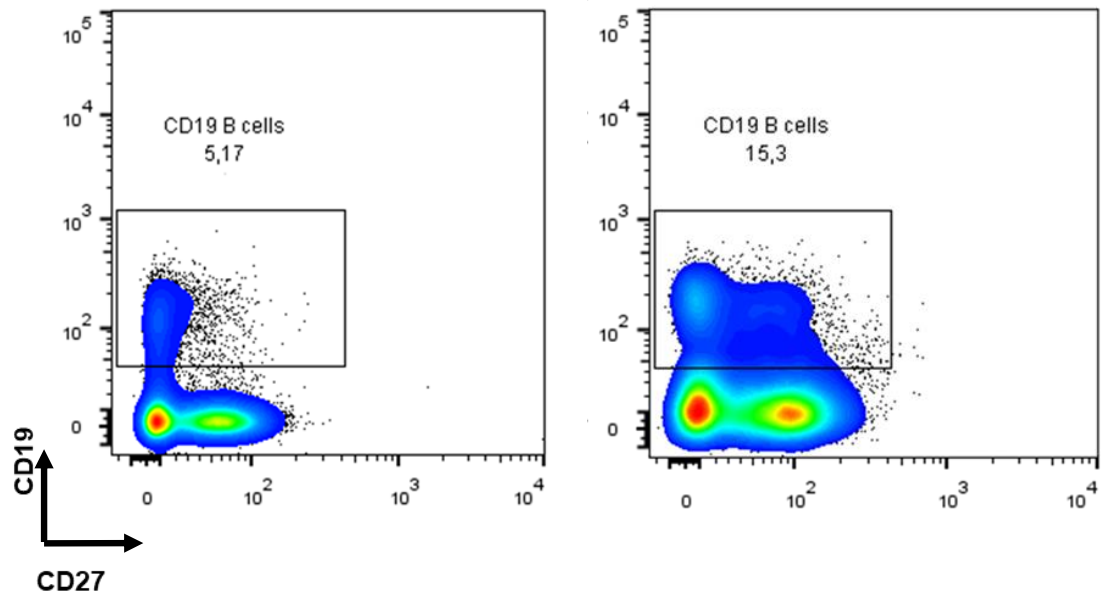
Πίνακας 2.5. Αντισώματα των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ
ANA	26
ΑΝΤΙ-ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΗΣ I	17
ΑΝΤΙΚΕΝΤΟΜΕΡΙΔΙΑΚΑ	7

Το ποσοστό CD19⁺CD21^{low} Β κυττάρων ήταν αυξημένο (51,33%) στην ομάδα ασθενών με δακτυλικά έλκη (ΔΕ) σε σχέση με τους HCs (28,15%, $p=0,014$) και σε σχέση με τους ασθενείς που δεν είχαν ΔΕ (29,34%, $p = 0,042$ difference between means: $21,99 \pm 10,25$, 95% CI 43,10 έως 0,88). (Εικόνα 2.5)

A

CD19⁺

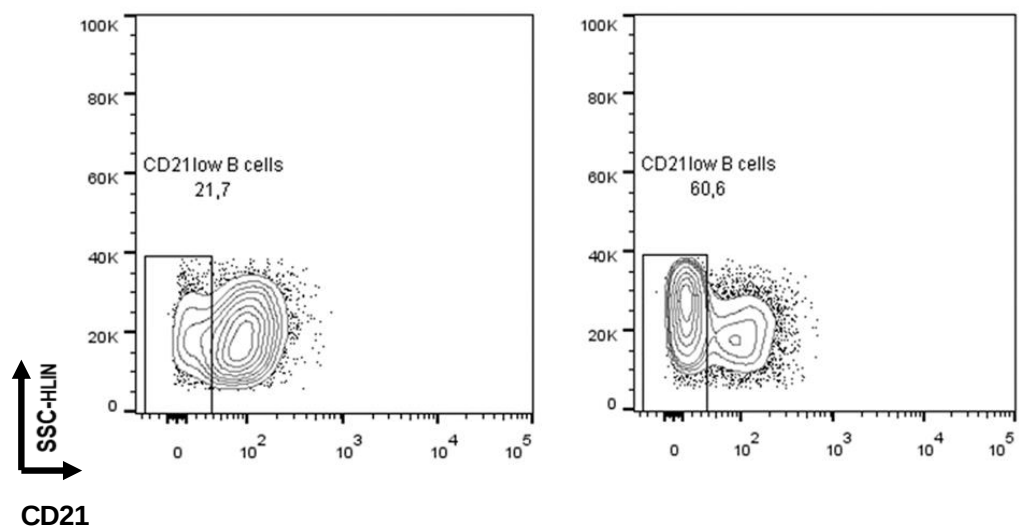


• ΑΣΘΕΝΗΣ ΧΩΡΙΣ ΔΕ

• ΑΣΘΕΝΗΣ ΜΕ ΔΕ

B

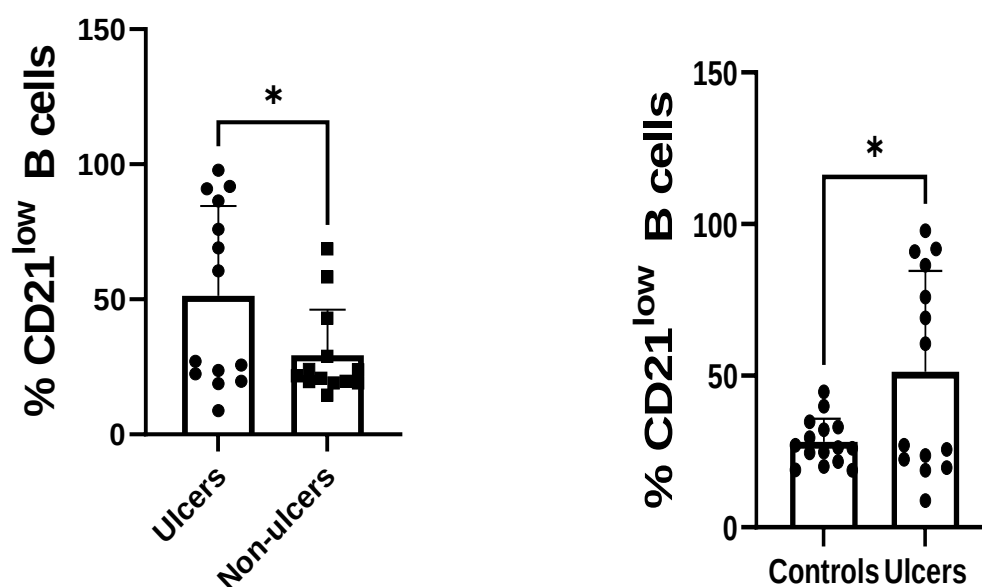
GATED CD19⁺



• ΑΣΘΕΝΗΣ ΧΩΡΙΣ ΈΛΚΟΣ

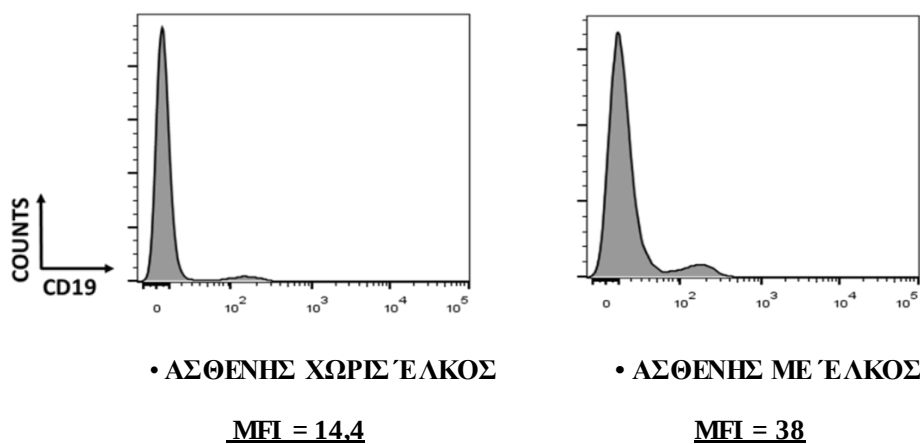
• ΑΣΘΕΝΗΣ ΜΕ ΈΛΚΟΣ

Γ

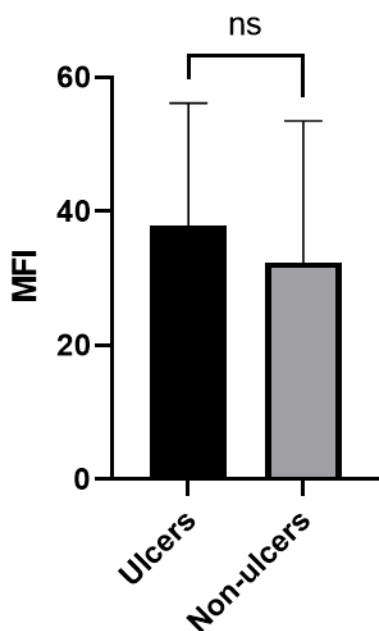


Εικόνα 2.5. **A.** Η έκφραση των CD19 υποδοχέων στα B κύτταρα σε αντιπροσωπευτικό ασθενή με δακτυλικά έλκη (ΔΕ) και σε ασθενή χωρίς ΔΕ. **B.** Διάγραμμα με κυτταρομετρία ροής (dot plot), όπου φαίνεται η έκφραση των CD21^{low} υποδοχέων στα B κύτταρα σε ασθενή με ΔΕ και σε ασθενή χωρίς ΔΕ. **Γ.** Αριστερά: Ιστόγραμμα με το ποσοστό CD21^{low} B κυττάρων στην ομάδα ασθενών με ΔΕ και την ομάδα ασθενών χωρίς ΔΕ. Δεξιά: Ιστόγραμμα με το ποσοστό CD21^{low} B κυττάρων στην ομάδα ασθενών με ΔΕ και την ομάδα των HCs

Η έκφραση του CD19, όπως ανιχνεύθηκε από το MFI, ήταν αυξημένη σε μερικούς ασθενείς με δακτυλικά έλκη (ΔΕ) (Εικόνα 2.6), αλλά στο σύνολο της ομάδας ασθενών με ΔΕ (37,8%) δεν ήταν στατιστικώς σημαντική η αύξηση σε σχέση με την ομάδα ασθενών χωρίς ΔΕ (32,2%, $p=0,6$) (Εικόνα 2.7).



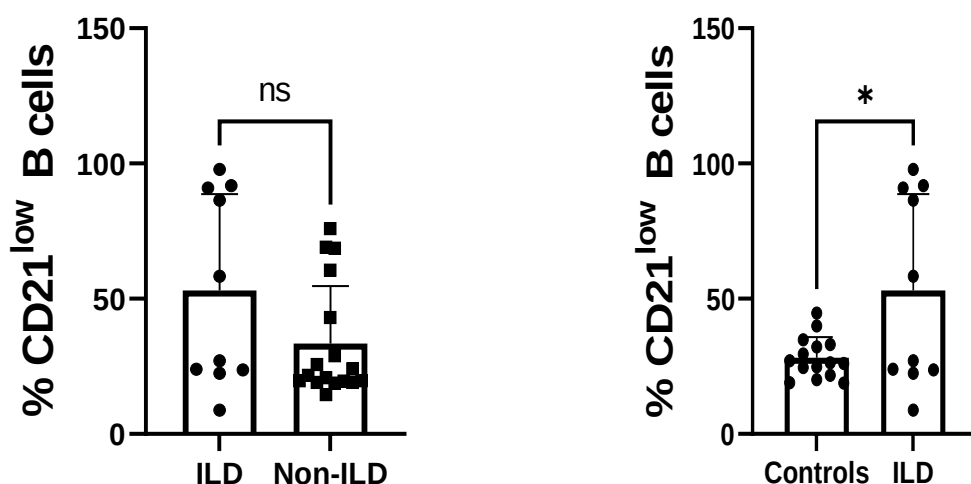
Εικόνα 2.6. Πυκνότητα του CD19 στα B λεμφοκύτταρα σε ένα ασθενή με ΔΕ και ένα ασθενή χωρίς ΔΕ ($MFI_{ΔΕ} > MFI_{ΧΔΕ}$)



Εικόνα 2.7. Ιστόγραμμα που δείχνει μικρή αύξηση, όχι στατιστικά σημαντική, του MFI του CD19 στους ασθενείς με ΔΕ και τους ασθενείς χωρίς ΔΕ.

Αναλύθηκαν τα CD21^{low} B λεμφοκύτταρα σε σχέση με άλλη σημαντική παθογενετική εκδήλωση της ΣΣκ, την Διάμεση Πνευμονική Ίνωση. Το ποσοστό των CD21^{low} B κυττάρων στην ομάδα των 10 ασθενών με την Διάμεση Πνευμονική Ίνωση ήταν 53,1% στατιστικά

σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους υγιείς (28,1% $p=0,014$), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στην ομάδα των ασθενών χωρίς Διάμεση Πνευμονική Ύψωση ήταν 33,47% - μη στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,08$, διαφορά μέσων όρων $19,63 \pm 10,85$, 95%CI 41,98-2,72), Εικόνα 2.8.



Εικόνα 2.8. Αριστερά: Ιστόγραμμα που δείχνει ότι το ποσοστό των CD21^{low} B κυττάρων είναι αυξημένο, αλλά όχι στατιστικώς σημαντικά, σε ασθενείς με Διάμεση Πνευμονική Ύψωση σε σχέση με ασθενείς χωρίς Διάμεση Πνευμονική Ύψωση. Δεξιά: Ιστόγραμμα που δείχνει ότι το ποσοστό των CD21^{low} B κυττάρων είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένο σε ασθενείς με Διάμεση Πνευμονική Ύψωση σε σχέση με την ομάδα των υγιών

Αναλύθηκε η συσχέτιση των CD21^{low} B λεμφοκυττάρων με τα αυτοαντισώματα έναντι της Τοποϊσομεράσης Ι. Το ποσοστό των CD21^{low} B κυττάρων στην ομάδα των ασθενών με θετικά αντι-Τοπο Ι αντισώματα ήταν 48,6% και παρουσίαζε στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα των ασθενών με αρνητικά αντι-Τοπο Ι αντισώματα (27,3%, $p=0,025$), αλλά όχι στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τους υγιείς (28,1%, $p=1,1$)

Τέλος το ποσοστό του υποπληθυσμού αυτού δεν ήταν αυξημένο στην ομάδα των ασθενών με ΣΣκ σε σχέση με τους υγιείς (40,7%, 28,15% $p=0,10$).

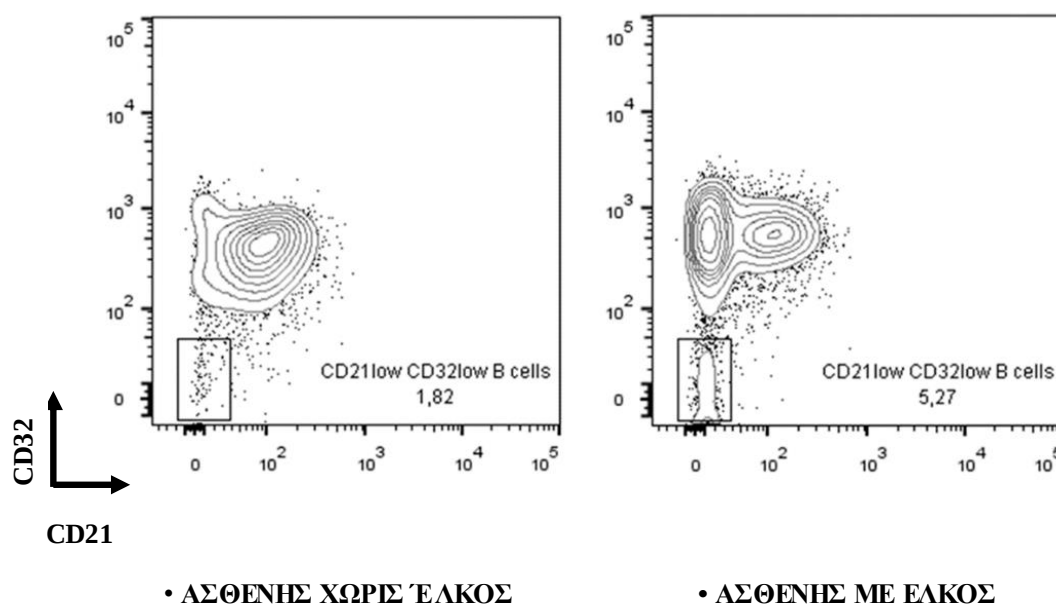
Η έκφραση του CD32 στα CD21^{low} B λεμφοκύτταρα

Στη συνέχεια αναλύθηκε η έκφραση του CD32 στα CD21^{low} B λεμφοκύτταρα και η συσχέτισή του με ΔΕ, πνευμονική ίνωση και αντι-Τοπο Ι αυτοαντισώματα.

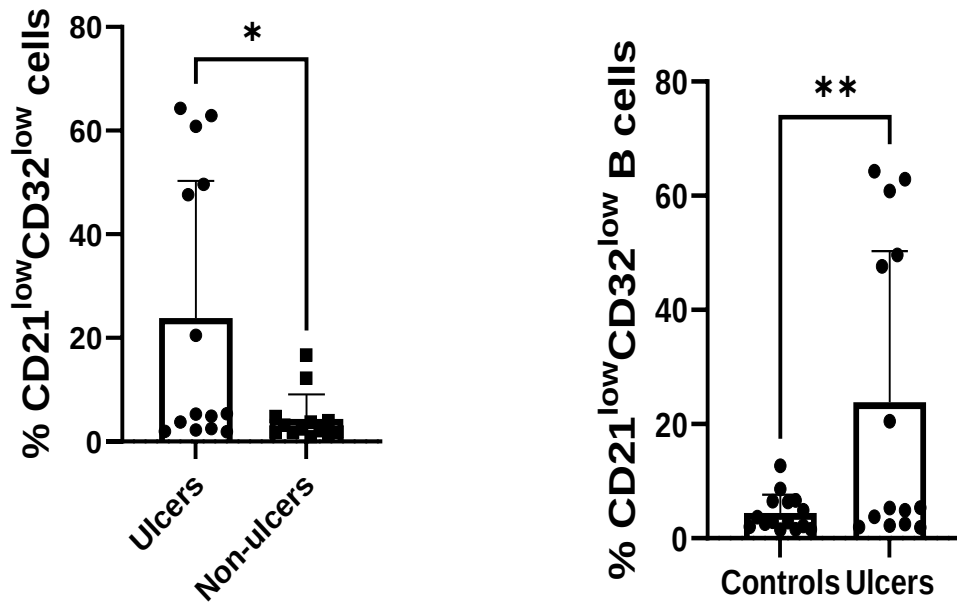
Το ποσοστό των CD21^{low} B κυττάρων που είχαν χαμηλή/καθόλου έκφραση του CD32 (CD21^{low}CD32^{low} B κύτταρα) βρέθηκε αυξημένο στους ασθενείς με δακτυλικά έλκη (23,82%) σε σύγκριση με την ομάδα των HCs (4,43%, $p=0,009$) και με την ομάδα των ασθενών χωρίς έλκη (4,39%), διαφορά η οποία είναι στατιστικά σημαντική, $p=0,015$ (difference between means: $19,43 \pm 7,45$, 95% CI 34,78 έως 4,08) (Εικόνα 2.9).

A

GATED CD19⁺CD21^{low}



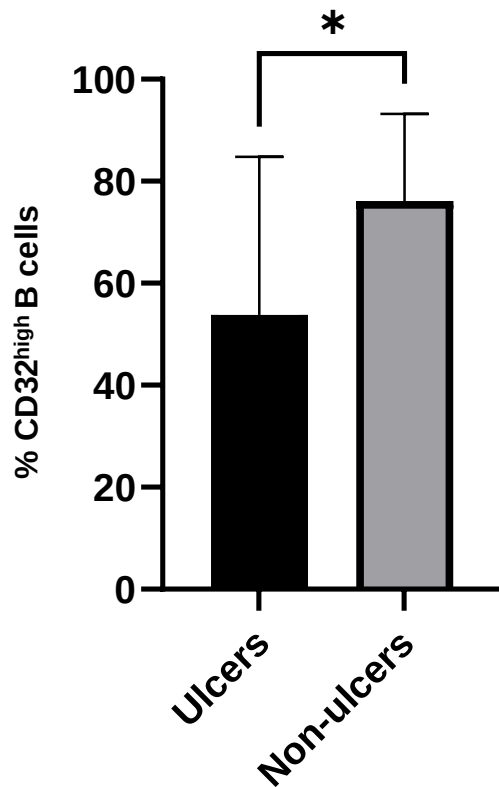
B



Εικόνα 2.9. Α. Διάγραμμα με κουκίδες από κυτταρομετρία ροής που δείχνει το ποσοστό των CD21^{low} CD32^{low} B κυττάρων από έναν αντιπροσωπευτικό ασθενή χωρίς ΔΕ και έναν αντιπροσωπευτικό ασθενή με ΔΕ

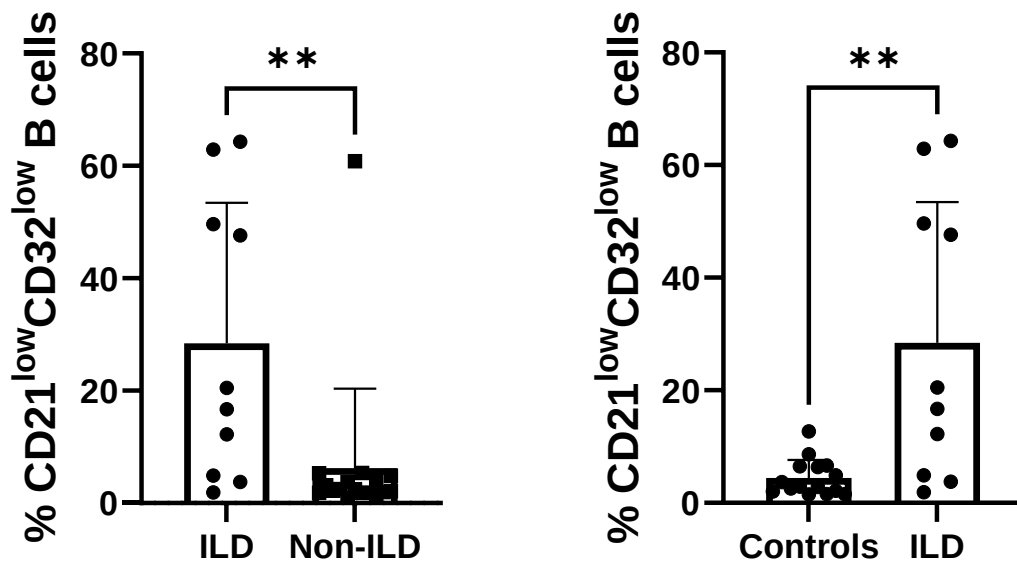
Β. Αριστερά: Ιστόγραμμα με το ποσοστό των CD21^{low} CD32^{low} B κυττάρων στην ομάδα των ασθενών με ΔΕ και στην ομάδα χωρίς ΔΕ. Δεξιά: Ιστόγραμμα με το ποσοστό των CD21^{low} CD32^{low} B κυττάρων στην ομάδα των ασθενών με ΔΕ και στην ομάδα των HCs. Το ποσοστό των CD21^{low} CD32^{low} B κυττάρων ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένο στην ομάδα των ΔΕ σε σύγκριση και με τις δύο ομάδες.

Όπως ήταν αναμενόμενο, το ποσοστό των CD21^{low} B κυττάρων με αυξημένο ποσοστό CD32 υποδοχέων (CD32^{high}) ήταν ελαττωμένο με στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,031$) στην ομάδα των ασθενών με δακτυλικά έλκη (53,81%) σε σχέση με αυτή των ασθενών χωρίς έλκη (76,09%) (διαφορά μέσων όρων $22,22 \pm 9,737$, 95% CI 2,22 έως 42,34). (Εικόνα 2.10).



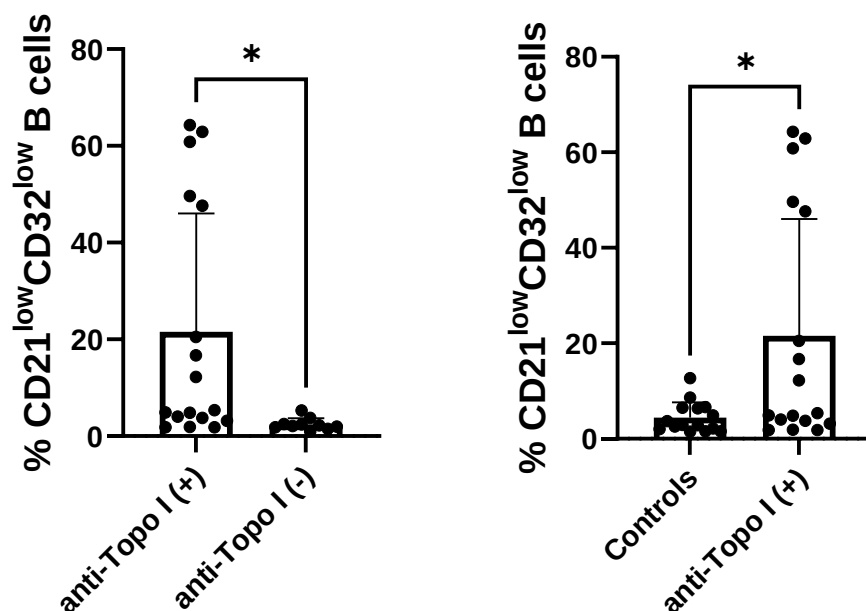
Εικόνα 2.10. Ιστόγραμμα στην ομάδα ασθενών με ΔΕ και στην ομάδα ασθενών χωρίς ΔΕ, που δείχνει ότι το ποσοστό των CD21^{low} CD32^{high} B κυττάρων που είναι αυξημένο στην ομάδα χωρίς ΔΕ.

Το ποσοστό των CD21^{low}CD32^{low} B κυττάρων ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένο στους ασθενείς με Διάμεση Πνευμονική Ίνωση (28,43%) σε σχέση με τους υγιείς (HCs 4,43%, $p=0,001$) και σε σχέση με την ομάδα χωρίς διάμεση πνευμονική ίνωση (6,25%, $p 0,007$) (Εικόνα 2.11).



Εικόνα 2.11. Αριστερά: Ιστόγραμμα που δείχνει αυξημένο ποσοστό των CD21^{low}CD32^{low} B κυττάρων σε ασθενείς με Διάμεση Πνευμονική Ίνωση σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς πνευμονική Ίνωση. Η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική. Δεξιά: Ιστόγραμμα που δείχνει στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό των CD21^{low}CD32^{low} B κυττάρων σε ασθενείς με Διάμεση Πνευμονική Ίνωση σε σχέση με τους υγιείς.

Το ποσοστό των CD21^{low}CD32^{low} B κυττάρων ήταν αυξημένο (21,54%) στους ασθενείς με θετικά αντι-τοποϊσομεράσης I αυτοαντισώματα σε σχέση με τους υγιείς (4,43%, $p=0,012$) καθώς και σε σχέση με ασθενείς αρνητικούς για αντι-τοποϊσομεράση I αυτοαντισώματα (2,45%, $p=0,022$), Εικόνα 2.12.



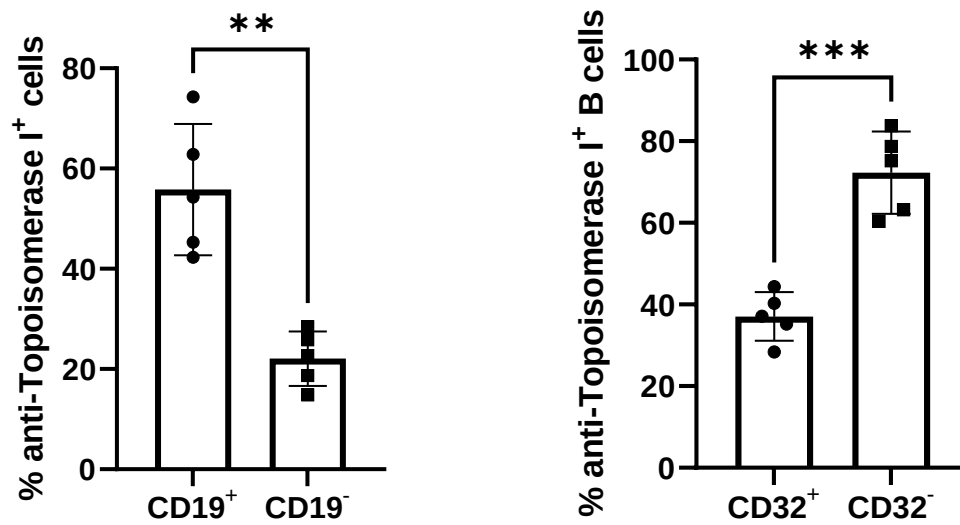
Εικόνα 2.12. Αριστερά: Ιστόγραμμα που δείχνει αυξημένο ποσοστό των CD21^{low}CD32^{low} B κυττάρων σε ασθενείς με θετικά αντι- τοποϊσομεράσης I αντισώματα σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς. Η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική. Δεξιά: Ιστόγραμμα που δείχνει στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό των CD21^{low}CD32^{low} B κυττάρων σε ασθενείς με θετικά αντι- τοποϊσομεράσης I αντισώματα σε σχέση με τους υγιείς.

Στην παρούσα κλινική μελέτη δεν βρέθηκε διαφορά στο ποσοστό των CD21^{low}CD32^{low} B κυττάρων μεταξύ αντρών και γυναικών (14,61%, 14,43%, $p=0,98$). Επίσης, το ποσοστό των CD21^{low}CD32^{low} B κύτταρων δεν παρουσίαζε στατιστικά σημαντική αύξηση στο σύνολο των ασθενών με ΣΣκ σε σύγκριση με τους υγιείς (14,47%, 4,43% $p=0,08$)

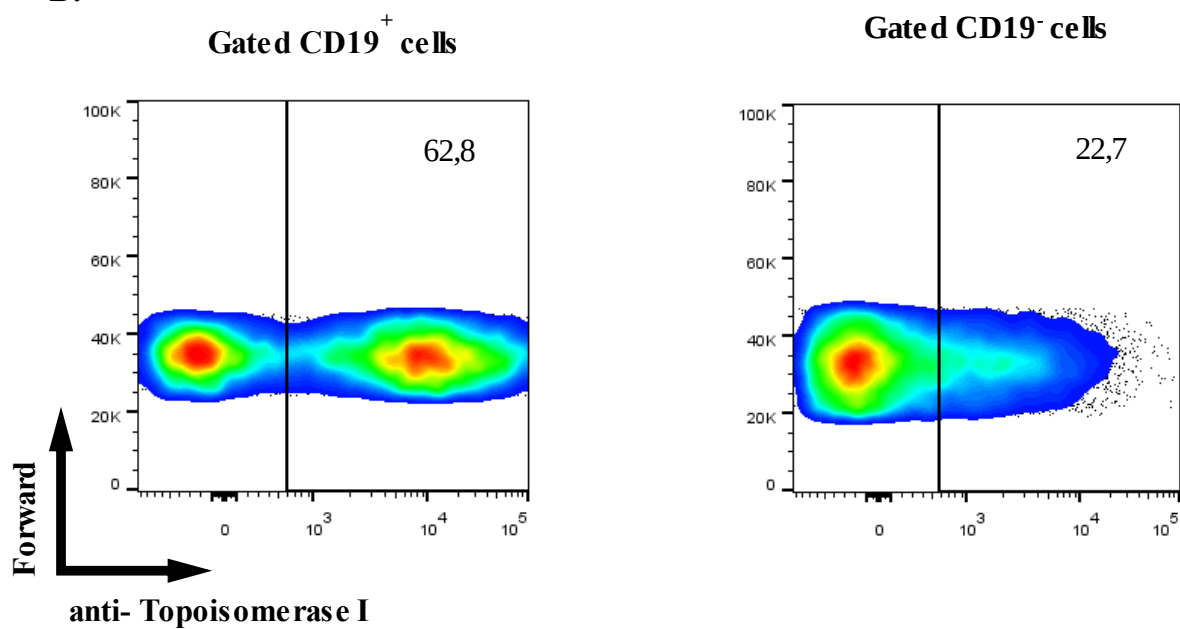
Τέλος, τα B κύτταρα που αναγνωρίζουν την Τοποϊσομεράση I αξιολογήθηκαν με συζευγμένη με APC Τοποϊσομεράση I. Η έκφραση της Τοποϊσομεράσης I είναι στατιστικά σημαντικώς αυξημένη στα B κύτταρα CD19⁺ σε σχέση με τα CD19⁻ ($p=0,0019$) (μέση διαφορά: 33,72, 95%CI 20,79 – 46,65, $p=0,0019$). Τα CD32^{low} B κύτταρα αναγνώρισαν κυρίως την Τοποϊσομεράση I σε σύγκριση με τα CD32⁺ B κύτταρα (μέση διαφορά 35,18, 95% CI 20,79 - 43,47, $p=0,0003$). Επιπλέον, η έκφραση των υποδοχέων των B κυττάρων για την

Τοποϊσομεράση I ήταν υψηλότερη στα CD32^{low} B κύτταρα (μέση ένταση φθορισμού [MFI] 600 υψηλότερη) σε σύγκριση με τα CD32⁺ B κύτταρα, Εικόνα 2.13.

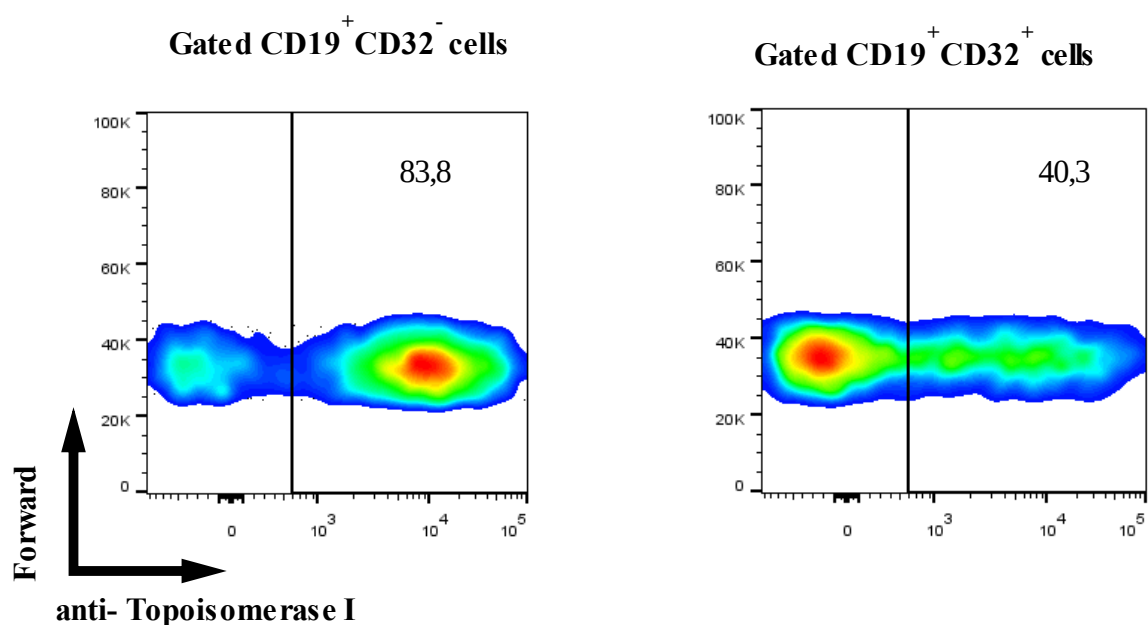
A.



B.



Γ.



Εικόνα 2.13 Έκφραση της αντι-Τοποϊσομεράσης I στα Β κύτταρα σε ασθενείς με ΣΣκ

Α. Η έκφραση της Τοποϊσομεράσης I είναι στατιστικά σημαντικώς αυξημένη στα Β κύτταρα CD19⁺ ($p=0,0019$) καθώς και στα CD32^{low} Β κύτταρα σε σύγκριση με τα CD32⁺ Β ($p=0,0003$) **Β.** CD19⁺ και CD19⁻ ευρήματα κυτταρομετρίας από αντιπροσωπευτικό ασθενή **Γ.** CD19⁺CD32⁻ και CD19⁺CD32⁺ ευρήματα κυτταρομετρίας από έναν αντιπροσωπευτικό ασθενή

2.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη μελέτη μας βρήκαμε ότι τα CD21^{low} B λεμφοκύτταρα συσχετίζονται με ενεργά δακτυλικά έλκη ή ιστορικό δακτυλικών ελκών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με μια άλλη μελέτη που βρήκε ότι CD21^{low} B λεμφοκύτταρα ήταν αυξημένα σε ασθενείς με σκληροδερμία και εμφάνιση Δακτυλικών Ελκών, Πνευμονικής Αρτηριακής Υπέρτασης, Νεφραγγειακής κρίσης [101]. Βρέθηκε μάλιστα ότι ποσοστό των CD21^{low} $\geq 10\%$ σε ασθενείς με ΣΣκ συσχετίστηκε με την εμφάνιση νέων Δακτυλικών Ελκών [93].

Τα Δακτυλικά Έλκη, όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι από τις πιο συχνές εκδηλώσεις της νόσου. Σε μια μεγάλη μελέτη παρατήρησης και καταγραφής ασθενών με ΣΣκ και Δακτυλικά Έλκη, ασθενείς με Διάχυτη Συστηματική Σκλήρυνση (dcSSc) παρουσίαζαν επεισόδιο με έλκος σε ποσοστό 27,5% ενώ ασθενείς με Περιορισμένο Συστηματικό Σκληρόδερμα παρουσίαζαν επεισόδιο έλκους σε ποσοστό 13% [108]. Τα δακτυλικά έλκη αντικατοπτρίζουν μία από τις κυριότερες παθογενετικές βλάβες της νόσου, τη μικροαγγειοπάθεια. Είναι επώδυνες βλάβες, που περιορίζουν τις δραστηριότητες, τη λειτουργικότητα, την εργασία, την ποιότητα ζωής και μπορεί να οδηγήσουν σε λοίμωξη δέρματος, οστεομυελίτιδα και ακρωτηριασμό δακτύλων [109].

Στη μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε αντισώματα για την ανίχνευση του CD32 κυτταρικού υποδοχέα που αναγνωρίζουν δύο από τις τρεις ισομορφές του. Την FcγRIIA ισομορφή καθώς και την FcγRIIB ισομορφή. Τα B λεμφοκύτταρα στην επιφάνεια τους εκφράζουν σχεδόν αποκλειστικά την ισομορφή FcγRIIB, που αποτελεί όπως έχει ήδη αναφερθεί ανασταλτικό υποδοχέα [91].

Τα CD21^{low}CD32^{low} B λεμφοκύτταρα ήταν αυξημένα σε ασθενείς με δακτυλικά έλκη, δηλαδή, τα CD21^{low} B λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με δακτυλικά έλκη έχουν μειωμένη/απούσα την έκφραση του ανασταλτικού υποδοχέα FcγRIIB, σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς ΔΕ. Αντίθετα, όπως αναμένονταν τα CD21^{low} B κύτταρα με αυξημένη έκφραση του CD32 υποδοχέα (CD21^{low}CD32^{high}) ήταν σε χαμηλό ποσοστό στους ασθενείς με δακτυλικά έλκη σε

σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς ΔΕ. Αξίζει να σημειωθεί, πως μία ακόμη από τις δράσεις του ανασταλτικού υποδοχέα FcγRIIB είναι η ικανότητά του να προκαλεί απόπτωση των Β λεμφοκυττάρων [91]. Τα ευρήματα αυτά είναι σύμφωνα με την άποψη ότι τα CD21^{low}CD32^{low} Β λεμφοκύτταρα στη ΣΣκ είναι πιθανώς είναι ενεργά effector κύτταρα. Τα CD21^{low} Β λεμφοκύτταρα σε αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα, όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος έχει βρεθεί ότι περιέχουν σε μεγάλο ποσοστό αυτοαντιδραστικά Β λεμφοκύτταρα [95,96]. Σε μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι τα ανθρώπινα CD21^{low} Β λεμφοκυττάρων, περιέχουν 13 υποπληθυσμούς κυττάρων, από τους οποίους κάποιοι αποτελούνταν από υγιή κύτταρα και κάποιοι από αυτοαντιδραστικούς πληθυσμούς που σχετίζονται με την παθογένεια διάφορων φλεγμονωδών παθήσεων [110].

Για το λόγο αυτό στη μελέτη μας ελέγξαμε την έκφραση του CD32 στα CD21^{low} Β λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με ένα άλλο χαρακτηριστικό της ΣΣκ, τη διάμεση πνευμονική ίνωση. Και στους ασθενείς με διάμεση πνευμονική ίνωση, βρέθηκε ότι τα CD21^{low}CD32^{low} Β κύτταρα ήταν αυξημένα, σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς πνευμονική ίνωση, δηλαδή τα CD21^{low} Β λεμφοκύτταρα στους ασθενείς με διάμεση πνευμονική ίνωση δεν εκφράζουν ή έχουν χαμηλή έκφραση του ανασταλτικού υποδοχέα CD32.

Ο υποπληθυσμός των CD21^{low} Β λεμφοκυττάρων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες αυτοάνοσες και χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως ήδη αναφέρθηκε (π.χ. λοιμώξεις από παράσιτα, HIV λοίμωξη και ηπατίτιδα C, σ. Sjogren, Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος και Ρευματοειδής Αρθρίτιδα [95,96,97,98,99,100]. Ακόμη, είναι ήδη γνωστή η συσχέτιση ανάμεσα στα CD21^{low} Β λεμφοκύτταρα και την εμφάνιση αυτοάνοσων παρενεργειών σε ασθενείς με κακοήθεια που λαμβάνουν ανοσοθεραπεία [111]. Επιπλέον, η χαμηλή έκφραση του CD32 υποδοχέα έχει παρατηρηθεί και σε άλλες αυτοάνοσες παθήσεις όπως ο SLE [112] και η θυρεοειδίτιδα Hashimoto [113]. Όλα αυτά ενισχύουν επιπλέον την υπόθεση ότι τα CD21^{low} Β λεμφοκύτταρα, όπως και στις άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις,

έτσι και στη ΣΣκ είναι κύτταρα ενεργά / αυτοαντιδραστικά που πιθανό να σχετίζονται με την παθογένεια της μικροαγγειοπάθειας και της πνευμονικής ίνωσης.

Τα αυτοαντιδραστικά Β κύτταρα είναι γενικά σημαντικά και κρίσιμα κύτταρα που συμβάλλουν στην παθογένεια της νόσου, με το να παρουσιάζουν αυτοαντιγόνα στα Τ κύτταρα και παράλληλα να παράγουν αυτοαντισώματα, μερικά από τα οποία μπορεί να είναι παθογόνα. Η αναγνώριση αυτοαντιδραστικών Β κυττάρων και η απενεργοποίησή τους, θα είχε σημαντικά οφέλη όχι μόνο στη θεραπεία αρκετών παθήσεων, αλλά και στη διάγνωση και στην πρόγνωση τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί μια μελέτη σε μοντέλο ποντικών με ΣΣκ, όπου Β λεμφοκύτταρα που αναγνώριζαν μέσω επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης την Τοποϊσομεράση Ι με αυξημένη δύναμή σύνδεσης προήγαγαν την παραγωγή φλεγμονογόνων κυτταροκινών IL-6 και IL-23 από τα Τ λεμφοκύτταρα ενώ Β λεμφοκύτταρα που αναγνώριζαν Τοποϊσομεράση Ι με χαμηλή δύναμη σύνδεσης επήγαγαν ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα με παραγωγή της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10. Επιπλέον, τα Β λεμφοκύτταρα που αναγνώριζαν την Τοποϊσομεράση Ι με μεγάλη δύναμη σύνδεσης προήγαγαν την ίνωση στο ποντικίσιο μοντέλο του ΣΣκ. Παράλληλα βρέθηκε ότι τα Β λεμφοκύτταρα που αναγνώριζαν την Τοποϊσομεράση Ι με μεγάλη δύναμη σύνδεσης συσχετίζονταν με τη βαρύτητα της νόσου και σε ανθρώπους με ΣΣκ [114].

Λόγω του ότι τα αντισώματα έναντι τοποϊσομεράσης Ι συσχετίζονται με διάχυτη ίνωση δέρματος και ινωτική προσβολή εσωτερικών οργάνων αναλύσαμε τα CD21^{low} και τα CD21^{low}CD32^{low} Β λεμφοκύτταρα στους ασθενείς με αντισώματα αντι-Τοποϊσομεράσης Ι. Τα ποσοστά των CD21^{low} και των CD21^{low}CD32^{low} Β λεμφοκυττάρων στη μελέτη μας βρέθηκαν αυξημένα στους ασθενείς με αυτοαντισώματα έναντι Τοποϊσομεράσης Ι σε σχέση με τους ασθενείς αρνητικούς για αντισώματα έναντι τοποϊσομεράσης Ι. Επίσης, το εύρημά μας σχετικά ότι η Τοποϊσομεράση Ι αναγνωρίζεται κυρίως από τα CD32^{low} Β κύτταρα καθώς και την αυξημένη έκφραση υποδοχέων (BCRs) για την Τοποϊσομεράση Ι στα CD32^{low} Β κύτταρα υποδηλώνουν ότι τα αυτοαντιδραστικά έναντι της Τοποϊσομεράσης Ι Β κύτταρα είναι κυρίως

στην ομάδα των CD32^{low} B κύτταρων. Συνεπώς, τα CD21^{low}CD32^{low} B κύτταρα είναι αυτοαντιδραστικά και πιθανώς παθογόνα κύτταρα συμμετέχοντας και στα τρία βασικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα της νόσου, την ίνωση, την μικροαγγειοπάθεια και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι της Τοπο Ι.

Το αδύνατο σημείο της μελέτης μας είναι ο σχετικά μικρός αριθμός των ασθενών που συμμετείχαν. Εάν τα ευρήματά μας επιβεβαιωθούν σε άλλη εργασία με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, θα είναι ένα σημαντικό βήμα για τη ΣΣκ. Τα CD21^{low}CD32^{low} B λεμφοκύτταρα ως αυτοαντιδραστικά αλλά και πιθανότητα, ως παθογόνα κύτταρα, θα πρέπει να αποτελέσουν το θεραπευτικό στόχο στη ΣΣκ, μια νόσο που η θεραπεία της μέχρι σήμερα είναι εν πολλοίς ανεπαρκής.

2.6 ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ

ml (mili litre)	χιλιοστόλιτρο ή ένα χιλιοστό του λίτρου
μl (microliter)	μικρόλιτρο ή ένα εκατομμυριοστό του λίτρου
kg (kilogramme)	κιλό
mg (milligram)	χιλιοστόγραμμα
mm (milimetre)	χιλιοστόμετρο
m² (square meter)	τετραγωνικό μέτρο
mm³ (cubic millimeters)	κυβικό χιλιοστόμετρο
rpm (revolutions per minute)	Στροφές ανά λεπτό
nm (nanometer)	Νανόμετρο
DNA (Deoxyribonucleic acid)	Δεσοξυριβοζονουκλεϊνικό Οξύ
TNF (Tumor Necrosis Factor)	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκου
TGF- B (Transforming Growth Factor – B)	Μεταμορφωτικός Αυξητικός Παράγοντας – β
PDGF (Platelet Derived Growth Factor)	Αυξητικός Παράγοντας Αιμοπεταλίων
HLA (Human Leukocyte Antigens)	Ανθρώπινα Λευκοκυτταρικά Αντιγόνα
mRNA (messenger Ribonucleic Acid)	αγγελιοφόρο – Ριβονουκλεϊκό οξύ
IL (interleukine)	Ιντερλευκίνη
Th (T helper)	T βοηθητικά
Tfh (T follicular)	T θυλακιώδη
HRCT (High Resolution Computed Tomography)	Αξονική Τομογραφία Υψηλής Ευκρίνειας
DLCO (Carbon Monoxide Diffusing Lung Capacity)	Διαχυτική ικανότητα των πνευμόνων για το μονοξείδιο του άνθρακα
FVC (Forced Vital Capacity)	Γρήγορα Εκπνεόμενη Ζωτική Χωρητικότητα
PVR (Pulmonary Vascular Resistance)	Πνευμονική Αγγειακή Αντίσταση

WU (Wood Units)	Μονάδα μέτρησης Πνευμονικής Αγγειακής Αντίστασης
PAH (Pulmonary Arterial Hypertension)	Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση
m PAP (mean Pulmonary Artery Pressure)	Μέση Πίεση Πνευμονικής Αρτηρίας
Hg (Hydrargyros)	Υδράργυρος
EULAR (European League Against Rheumatism)	Ευρωπαϊκή Εταιρεία Αντιρευματικού Αγώνα
BCL (B Cell Lymphoma)	Λέμφωμα Β κυτταρικής αρχής
TCM (Central Memory T cells)	T κύτταρα κεντρικής μνήμης
TRM (Tissue-resident memory T cells)	T κύτταρα μνήμης που βρίσκονται σε ιστούς
MCH (Major Histocompatibility Complex)	Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας (ΜΣΙ)
MR1 (MCH Related gene protein 1)	Σχετιζόμενο με το ΜΣΙ γονίδιο έκφρασης πρωτεΐνης 1
TCR (T cell receptor)	Υποδοχέας T λεμφοκυττάρων
GM – CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)	Παράγοντας διέγερσης κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων
BCR (B cell receptor)	Υποδοχέας B λεμφοκυττάρων
CENP – B (Centromere protein B)	Κεντρομεριδιακή πρωτεΐνη B
CCR3 (C-C Motif Chemokine Receptor 3)	Υποδοχέας χημειοκίνης τύπου C-C 3
RPC1 (Subunit forms part of the active site region of RNA polymerase III)	Υπομονάδα της ενεργού θέσης της RNA πολυμεράσης III
RNA (Ribonucleic acid)	Ριβονουκλεϊκό οξύ
CD (cluster of differentiation)	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης
UIP (Usual Interstitial Pneumonia)	Συνήθης διάμεση πνευμονοπάθεια
NSIP (Nonspecific Interstitial Pneumonia)	Μη ειδική διάμεση πνευμονοπάθεια

DAD (Diffuse Alveolar Damage)

Διάχυτη κυψελιδική βλάβη

COP (Cryptogenic organizing pneumonia)

Οργανούμενη κρυπτογενής πνευμονία

PDE-5 (PhosphoDiesterase-5)

Φωσφοδιεστεράσης-5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] **Sakkas LI, Chikanza IC, Platsoucas CD.** Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006;2(12):679-85. doi: 10.1038/ncprheum0346. PMID: 17133253.
- [2] **RODNAN GP, BENEDEK TG.** An historical account of the study of progressive systemic sclerosis (diffuse scleroderma). *Ann Intern Med.* 1962;57:305-19. doi: 10.7326/0003-4819-57-2-305. PMID: 14493141.
- [3] **Masi AT.** Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 1980;23(5):581-590. doi:10.1002/art.1780230510.
- [4] **LeRoy EC, Medsger J.** Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2001;28(7):1573-1576.
- [5] **Scleroderma: From pathogenesis to comprehensive management. / Varga, John; Denton, Christopher P.; Wigley, Fredrick M. et al.** Springer International Publishing, 2016. 743 p.
- [6] **Sakkas LI, Bogdanos DP.** Systemic sclerosis: New evidence re-enforces the role of B cells. *Autoimmun Rev.* 2016;15(2):155-61. doi: 10.1016/j.autrev.2015.10.005.
- [7] **Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Wright TM.** Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* 2003;48(7):1956-1963. doi:10.1002/art.11173.
- [8] **Hudson M, Rojas-Villarraga A, Coral-Alvarado P, et al.** Polyautoimmunity and familial autoimmunity in systemic sclerosis. *J Autoimmun.* 2008;31(2):156-159. doi:10.1016/j.jaut.2008.05.002
- [9] **Allcock RJ, Forrest I, Corris PA, Crook PR, Griffiths ID.** A study of the prevalence of systemic sclerosis in northeast England. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43(5):596-602. doi: 10.1093/rheumatology/keh124.

- [10] **Anagnostopoulos I, Zinzaras E, Alexiou I, Papathanasiou AA, Davas E, Koutroumpas A, Barouta G, Sakkas LI.** The prevalence of rheumatic diseases in central Greece: a population survey. *BMC Musculoskelet Disord.* 2010;11:98. doi: 10.1186/1471-2474-11-98. PMID: 20504294; PMCID: PMC2890601.
- [11] **Alamanos Y, Tsifetaki N, Voulgari P V, et al.** Epidemiology of systemic sclerosis in northwest Greece 1981 to 2002. *Semin Arthritis Rheum.* 2005;34(5):714-720. doi:10.1016/j.semarthrit.2004.09.001.
- [12] **Ingegnoli F, Ughi N, Mihai C.** Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of systemic sclerosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2018;32(2):223-240. doi: 10.1016/j.berh.2018.08.005.
- [13] **Calderon LM, Pope JE.** Scleroderma epidemiology update. *Curr Opin Rheumatol.* 2021;33(2):122-127. doi: 10.1097/BOR.0000000000000785.
- [14] **Mayes MD, Lacey J V., Beebe-Dimmer J, et al.** Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum.* 2003;48(8):2246-2255. doi:10.1002/art.11073
- [15] **Gupta L, Ahmed S, Zanwar Ab.** The Pathogenesis of Scleroderma. *Indian Journal of Rheumatology* 2017;12(Suppl 2):p S142-S148. | DOI: 10.4103/0973-3698.219083
- [16] **Angiolilli C, Marut W, van der Kroef M, Chouri E, Reedquist KA, Radstake TRDJ.** New insights into the genetics and epigenetics of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2018 Nov;14(11):657-673. doi: 10.1038/s41584-018-0099-0. PMID: 30305700
- [17] **Sheldon WB, Lurie DP, Maricq HR, Kahaleh MB, DeLustro FA, Gibofsky A, et al.** Three siblings with scleroderma (systemic sclerosis) and two with Raynaud's phenomenon from a single kindred. *Arthritis Rheum.* 1981;24(5):668–76.
- [18] **Hant FN, Herpel LB, Silver RM.** Pulmonary manifestations of scleroderma and mixed connective tissue disease. *Clin Chest Med.* 2010;31(3):433-49. doi: 10.1016/j.ccm.2010.05.004.

- [19] **Bhattacharyya S, Wang W, Morales-Nebreda L, Feng G, Wu M, Zhou X, Lafyatis R, Lee J, Hinchcliff M, Feghali-Bostwick C, Lakota K, Budinger GR, Raparia K, Tamaki Z, Varga J.** Tenascin-C drives persistence of organ fibrosis. *Nat Commun.* 2016;7:11703. doi: 10.1038/ncomms11703.
- [20] **Janowsky EC, Kupper LL, Hulka BS.** Meta-Analyses of the Relation between Silicone Breast Implants and the Risk of Connective-Tissue Diseases. *N Engl J Med.* 2000;342(11):781–90
- [21] **Efthymiou G, Liaskos C, Simopoulou T, Marou E, Patrikiou E, Scheper T, Meyer W, Daoussis D, Sakkas LI, Bogdanos DP.** Antigen-specific humoral responses against *Helicobacter pylori* in patients with systemic sclerosis. *Immunol Res.* 2020;68(1):39-47. doi: 10.1007/s12026-020-09124-w.
- [22] **Brown M, O'Reilly S.** The immunopathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 2019;195(3):310-321. doi: 10.1111/cei.13238.
- [23] **TEXTBOOK: Primer on the Rheumatic Diseases, John H. Klipel,** Ελληνική Έκδοση, Κεφάλαιο 18, Συστηματική Σκλήρυνση και συναφή σύνδρομα (σελ 471-488) Edition 12th , Library of congress catalog card No; 2001090001
- [24] **Kettaneh A, Al Moufti O, Tiev KP, Chayet C, Tolédano C, Fabre B, Fardet L, Cabane J.** Occupational exposure to solvents and gender-related risk of systemic sclerosis: a metaanalysis of case-control studies. *J Rheumatol.* 2007;34(1):97-103.
- [25] **Angiolilli C, Marut W, van der Kroef M, Chouri E, Reedquist KA, Radstake TRDJ.** New insights into the genetics and epigenetics of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2018;14(11):657-673. doi: 10.1038/s41584-018-0099-0.
- [26] **Poormoghim H, Lucas M, Fertig N, Medsger TA Jr.** Systemic sclerosis sine scleroderma: demographic, clinical, and serologic features and survival in forty-eight patients. *Arthritis Rheum.* 2000;43(2):444-51. doi: 10.1002/1529-0131(200002)43:2<444::AID-ANR27>3.0.CO;2-G.

- [27] **Krieg T, Takehara K.** Skin disease: a cardinal feature of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48 Suppl 3:iii14-8. doi: 10.1093/rheumatology/kep108.
- [28] **Volkman ER, Andréasson K, Smith V.** Systemic sclerosis. *Lancet*. 2023; 401(10373):304-318. doi: 10.1016/S0140-6736(22)01692-0.
- [29] **Ferrel C, Gasparini G, Parodi A, Cozzani E, Rongioletti F, Atzori L.** Cutaneous Manifestations of Scleroderma and Scleroderma-Like Disorders: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;53(3):306-336. doi: 10.1007/s12016-017-8625-4.
- [30] **Ferrel C, Gasparini G, Parodi A, Cozzani E, Rongioletti F, Atzori L.** Cutaneous Manifestations of Scleroderma and Scleroderma-Like Disorders: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017 Dec;53(3):306-336. doi: 10.1007/s12016-017-8625-4. PMID: 28712039.
- [31] **Furst DE, Clements PJ, Steen VD, et al.** The modified Rodnan skin score is an accurate reflection of skin biopsy thickness in systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1998;25(1):84-88.
- [32] **Steen VD, Medsger TA.** Improvement in skin thickening in systemic sclerosis associated with improved survival. *Arthritis Rheum*. 2001;44(12):2828-2835.
- [33] **Masi, A. T., & Subcommittee For Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. (1980).** Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis & Rheumatism*, 23(5), 581-590. & Subcommittee For Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. (1980). Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheumatism* 1980; 23(5): 581-590.
- [34] **Hughes M, Bruni C, Ruaro B, Confalonieri M, Matucci-Cerinic M, Bellando-Randone S.** Digital Ulcers in Systemic Sclerosis. *Presse Med*. 2021 Apr;50(1):104064. doi: 10.1016/j.lpm.2021.104064. Epub 2021 Feb 3. PMID: 33548375.

- [35] **Matucci-Cerinic M, Krieg T, Guillevin L, Schwierin B, Rosenberg D, Cornelisse P, et al.** Elucidating the burden of recurrent and chronic digital ulcers in systemic sclerosis: long-term results from the DUO Registry. *Ann Rheum Dis.* 2016 Oct;75(10):1770–6.
- [36] **Morrisroe K, Stevens W, Sahhar J, Ngian GS, Ferdowsi N, Hill CL, Roddy J, Walker J, Proudman S, Nikpour M.** Digital ulcers in systemic sclerosis: their epidemiology, clinical characteristics, and associated clinical and economic burden. *Arthritis Res Ther.* 2019 Dec 23;21(1):299. doi: 10.1186/s13075-019-2080-y. PMID: 31870459; PMCID: PMC6929369.
- [37] **Soulaidopoulos S, Triantafyllidou E, Garyfallos A, Kitas GD, Dimitroulas T.** The role of nailfold capillaroscopy in the assessment of internal organ involvement in systemic sclerosis: A critical review. *Autoimmun Rev.* 2017;16(8):787-795. doi: 10.1016/j.autrev.2017.05.019.
- [38] **Smith V, Herrick AL, Ingegnoli F, Damjanov N, De Angelis R, Denton CP, Distler O, Espejo K, Foeldvari I, Frech T, Garro B, Gutierrez M, Gyger G, Hachulla E, Hesselstrand R, Iagnocco A, Kayser C, Melsens K, Müller-Ladner U, Paolino S, Pizzorni C, Radic M, Ricciieri V, Snow M, Stevens W, Sulli A, van Laar JM, Vonk MC, Vanhaecke A, Cutolo M.** EULAR Study Group on Microcirculation in Rheumatic Diseases and the Scleroderma Clinical Trials Consortium Group on Capillaroscopy. Standardisation of nailfold capillaroscopy for the assessment of patients with Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2020;19(3):102458. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102458.
- [39] **Ghossein C, Varga J, Fenves AZ.** Recent Developments in the Classification, Evaluation, Pathophysiology, and Management of Scleroderma Renal Crisis. *Curr Rheumatol Rep.* 2016;18(1):5. doi: 10.1007/s11926-015-0551-y.
- [40] **Woodworth TG, Suliman YA, Li W, Furst DE, Clements P.** Scleroderma renal crisis and renal involvement in systemic sclerosis. *Nat Rev Nephrol.* 2016 Nov;12(11):678-691. doi: 10.1038/nrneph.2016.124. Epub 2016 Sep 19. Erratum in: *Nat Rev Nephrol.* 2018 Jan 02;; PMID: 27641135.

- [41] **Naranjo M, Hassoun PM.** Systemic Sclerosis-Associated Pulmonary Hypertension: Spectrum and Impact. *Diagnostics* (Basel). 2021;11(5):911. doi: 10.3390/diagnostics11050911.
- [42] **Badesch DB, Champion HC, Gomez Sanchez MA, Hoeper MM, Loyd JE, Manes A, McGoon M, Naeije R, Olschewski H, Oudiz RJ, Torbicki A.** Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Jun 30;54(1 Suppl):S55-S66. doi: 10.1016/j.jacc.2009.04.011. PMID: 19555859.
- [43] **Suliman S, Al Harash A, Roberts WN, Perez RL, Roman J.** Scleroderma-related interstitial lung disease. *Respir Med Case Rep.* 2017 Jul 15;22:109-112. doi: 10.1016/j.rmcr.2017.07.007. PMID: 28761806; PMCID: PMC5524221
- [44] **Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, Airò P, Cozzi F, Carreira PE, Bancel DF, Allanore Y, Müller-Ladner U, Distler O, Iannone F, Pellerito R, Pileckyte M, Miniati I, Ananieva L, Gurman AB, Damjanov N, Mueller A, Valentini G, Riemekasten G, Tikly M, Hummers L, Henriques MJ, Caramaschi P, Scheja A, Rozman B, Ton E, Kumánovics G, Coleiro B, Feierl E, Szucs G, Von Mühlen CA, Riccieri V, Novak S, Chizzolini C, Kotulska A, Denton C, Coelho PC, Kötter I, Simsek I, de la Pena Lefebvre PG, Hachulla E, Seibold JR, Rednic S, Stork J, Morovic-Vergles J, Walker UA.** Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis.* 2010 Oct;69(10):1809-15. doi: 10.1136/ard.2009.114264. Epub 2010 Jun 15. PMID: 20551155.
- [45] **Suliman YA, Dobrota R, Huscher D, Nguyen-Kim TD, Maurer B, Jordan S, Speich R, Frauenfelder T, Distler O.** Brief Report: Pulmonary Function Tests: High Rate of False-Negative Results in the Early Detection and Screening of Scleroderma-Related Interstitial Lung Disease. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(12):3256-61. doi: 10.1002/art.39405.
- [46] **Cottin V, Hirani NA, Hotchkiss DL, Nambiar AM, Ogura T, Otaola M, Skowasch D, Park JS, Poonyagariyagorn HK, Wuyts W, Wells AU.** Presentation, diagnosis and clinical

course of the spectrum of progressive-fibrosing interstitial lung diseases. *Eur Respir Rev.* 2018 Dec 21;27(150):180076. doi: 10.1183/16000617.0076-2018. PMID: 30578335; PMCID: PMC9489068.

[47] **Sakkas LI, Simopoulou T, Daoussis D, Liossis SN, Potamianos S.** Intestinal Involvement in Systemic Sclerosis: A Clinical Review. *Dig Dis Sci.* 2018;63(4):834-844. doi: 10.1007/s10620-018-4977-8.

[48] **Mecoli CA, Casciola-Rosen L.** An update on autoantibodies in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol.* 2018;30(6):548-553. doi: 10.1097/BOR.0000000000000550.

[49] **Nihtyanova SI, Denton CP.** Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2010 Feb 1;6(2):112–6.

[50] **van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, Matucci-Cerinic M, Naden RP, Medsger TA Jr, Carreira PE, Riemekasten G, Clements PJ, Denton CP, Distler O, Allanore Y, Furst DE, Gabrielli A, Mayes MD, van Laar JM, Seibold JR, Czirjak L, Steen VD, Inanc M, Kowal-Bielecka O, Müller-Ladner U, Valentini G, Veale DJ, Vonk MC, Walker UA, Chung L, Collier DH, Csuka ME, Fessler BJ, Guiducci S, Herrick A, Hsu VM, Jimenez S, Kahaleh B, Merkel PA, Sierakowski S, Silver RM, Simms RW, Varga J, Pope JE.** 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2013;65(11):2737-47. doi: 10.1002/art.38098.

[51] **Sakkas LI, Simopoulou T, Katsiari C, Bogdanos D, Chikanza IC.** Early systemic sclerosis-opportunities for treatment. *Clin Rheumatol.* 2015 Aug;34(8):1327-31. doi: 10.1007/s10067-015-2902-5. Epub 2015 Feb 26. PMID: 25711876.

[52] **Kowal-Bielecka O, Fransen J, Avouac J, Becker M, Kulak A, Allanore Y, Distler O, Clements P, Cutolo M, Czirjak L, Damjanov N, Del Galdo F, Denton CP, Distler JHW, Foeldvari I, Figelstone K, Frerix M, Furst DE, Guiducci S, Hunzelmann N, Khanna D, Matucci-Cerinic M, Herrick AL, van den Hoogen F, van Laar JM, Riemekasten G, Silver**

R, Smith V, Sulli A, Tarner I, Tyndall A, Welling J, Wigley F, Valentini G, Walker UA, Zulian F, Müller-Ladner U; EUSTAR Coauthors. Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(8):1327-1339. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-209909.

[53] **Foocharoen C, Mahakkanukrauh A, Suwannaroj S, Nanagara R.** Clinical characteristics and mortality in systemic sclerosis: A comparison between early- and late-referred diseases. *J Med Assoc Thail.* 2014;97(1):28-35

[54] **Domsic RT, Rodriguez-Reyna T, Lucas M, Fertig N, Medsger T a.** Skin thickness progression rate: a predictor of mortality and early internal organ involvement in diffuse scleroderma. *Ann Rheum Dis.* 2010;70(1):104-109. doi:10.1136/ard.2009.127621.

[55] **Hashimoto A, Tejima S, Tono T, Suzuki M, Tanaka S, Matsui T, Tohma S, Endo H, Hirohata S.** Predictors of survival and causes of death in Japanese patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2011 Sep;38(9):1931-9. doi: 10.3899/jrheum.100298. Epub 2011 Jul 15. PMID: 21765111

[56] **Sharif R, Fritzler MJ, Mayes MD, et al.** Anti-fibrillar antibody in African American patients with systemic sclerosis: immunogenetics, clinical features, and survival analysis. *J Rheumatol.* 2011;38(8):1622-1630. doi:10.3899/jrheum.110071\jrheum.110071

[57] **Hesselstrand R, Scheja a, Wuttge D.** Scleroderma renal crisis in a Swedish systemic sclerosis cohort: survival, renal outcome, and RNA polymerase III antibodies as a risk factor. *Scand J Rheumatol.* 2012;41(1):39-43. doi:10.3109/03009742.2011.610032.

[58] **Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al.** *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Lymphocytes and the Cellular Basis of Adaptive Immunity. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26921>

[59] **Gutcher I, Becher B.** APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest.* 2007 May;117(5):1119-27. doi: 10.1172/JCI31720. PMID: 17476341; PMCID: PMC1857272.

- [60] **Al-Shura, Anika Niambi** (2020). Lymphocytes. *Advanced Hematology in Integrated Cardiovascular Chinese Medicine*. Elsevier. pp. 41–46. doi:10.1016/b978-0-12-817572-9.00007-0. ISBN 978-0-12-817572-9. S2CID 241913878
- [61] **Akbar AN, Terry L, Timms A, Beverley PC, Janossy G (April 1988)**. "Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells". *J. Immunol.* 140 (7): 2171–8. doi:10.4049/jimmunol.140.7.2171.
- [62] **Koch S, Larbi A, Derhovanessian E, Özcelik D, Naumova E, Pawelec G**. "Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people". *Immunity & Ageing*. 2008;5 (6): 6. doi:10.1186/1742-4933-5-6.
- [63] **Shin H, Iwasaki A**. "Tissue-resident memory T cells". *Immunological Reviews*. 2013; 255 (1): 165–81. doi:10.1111/imr.12087.
- [64] **Lee YJ, Jameson SC, Hogquist KA**. "Alternative memory in the CD8 T cell lineage". *Trends in Immunology*. 2011;32 (2): 50–56. doi:10.1016/j.it.2010.12.004.
- [65] **Singh B, Schwartz JA, Sandroff C, Bellemore SM, Nikoopour E**. "Modulation of autoimmune diseases by interleukin (IL)-17 producing regulatory T helper (Th17) cells". *Indian J. Med. Res.* 2013;138 (5): 591–4. PMC 3928692.
- [66] **Godfrey DI, Uldrich AP, McCluskey J, Rossjohn J, Moody DB**. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat Immunol.* 2015 Nov;16(11):1114-23. doi: 10.1038/ni.3298. Erratum in: *Nat Immunol.* 2016 Feb;17(2):214. Erratum in: *Nat Immunol.* 2016 Apr;17(4):469. PMID: 26482978.
- [67] **Mallewaey T, Fontaine J, Breuilh L, Paget C, Castro-Keller A, Vendeville C, Capron M, Leite-de-Moraes M, Trottein F, Faveeuw C**. Invariant and noninvariant natural killer T cells exert opposite regulatory functions on the immune response during murine schistosomiasis. *Infect Immun.* 2007 May;75(5):2171-80. doi: 10.1128/IAI.01178-06. Epub 2007 Mar 12. PMID: 17353286; PMCID: PMC1865739.

- [68] **Howson LJ, Salio M, Cerundolo V.** MR1-Restricted Mucosal-Associated Invariant T Cells and Their Activation during Infectious Diseases. *Front Immunol.* 2015 Jun 16;6:303. doi: 10.3389/fimmu.2015.00303. PMID: 26136743; PMCID: PMC4468870.
- [69] **Holtmeier W, Kabelitz (2005).** "T δ T Cells Link Innate and Adaptive Immune Responses". *Mechanisms of Epithelial Defense. Chemical Immunology and Allergy.* 2005;86: 151–183. doi:10.1159/000086659. ISBN 3-8055-7862-8. PMID 15976493.
- [70] **Sakkas LI, Xu B, Artlett CM, Lu S, Jimenez SA, Platsoucas CD.** Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Immunol.* 2002 Apr 1;168(7):3649-59. doi: 10.4049/jimmunol.168.7.3649. PMID: 11907131.
- [71] **Sakkas LI, Platsoucas CD.** Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheum.* 2004 Jun;50(6):1721-33. doi: 10.1002/art.20315. PMID: 15188347.
- [72] **Sakkas LI.** New developments in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmunity.* 2005 Mar;38(2):113-6. doi: 10.1080/16066350500095415. PMID: 16040330.
- [73] **Maehara T, Kaneko N, Perugino CA, Mattoo H, Kers J, Allard-Chamard H, Mahajan VS, Liu H, Murphy SJ, Ghebremichael M, Fox D, Payne AS, Lafyatis R, Stone JH, Khanna D, Pillai S.** Cytotoxic CD4⁺ T lymphocytes may induce endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis. *J Clin Invest.* 2020;130(5):2451-2464. doi: 10.1172/JCI131700.
- [74] **Casciola-Rosen, L., Andrade, F., Ulanet, D., Wong, W. B., & Rosen, A.** Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J Exp Med* 1999;190(6), 815-826.
- [75] **K Higashioka, Y Kikushige, M Ayano, Y Kimoto, H Mitoma, M Kikukawa, M Akahoshi, Y Arinobu, T Horiuchi, K Akashi, H Niïro,** Generation of a novel CD30⁺ B cell subset producing GM-CSF and its possible link to the pathogenesis of systemic sclerosis, *Clinical and Experimental Immunology*, 2020;201(3):233–243

- [76] **He R, Yin H, Yuan B, Liu T, Luo L, Huang P, Dai L, Zeng K.** IL-33 improves wound healing through enhanced M2 macrophage polarization in diabetic mice. *Mol Immunol.* 2017;90:42-49. doi: 10.1016/j.molimm.2017.06.249.
- [77] **Sakkas LI, Bogdanos DP.** The Role of T Cells in Systemic Sclerosis: An Update. *Immunology* 2022; 2(3):534-547. <https://doi.org/10.3390/immuno2030034>
- [78] **Frantz C, Auffray C, Avouac J, Allanore Y.** Regulatory T Cells in Systemic Sclerosis. *Front Immunol.* 2018;9:2356. doi: 10.3389/fimmu.2018.02356.
- [79] **Baba Y, Saito Y, Kotetsu Y.** Heterogeneous subsets of B-lineage regulatory cells (Breg cells). *Int Immunol.* 2020;32(3):155-162. doi: 10.1093/intimm/dxz068.
- [80] **Dörner T, Jacobi AM, Lipsky PE.** B cells in autoimmunity. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(5):247. doi: 10.1186/ar2780.
- [81] **Rosser EC, Mauri C.** Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity.* 2015 Apr 21;42(4):607-12. doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.005. PMID: 25902480.
- [82] **Nutt, Stephen L.; Hodgkin, Philip D.; Tarlinton, David M.; Corcoran, Lynn M.** The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 2015;15 (3): 160–71. doi:10.1038/nri3795.
- [83] **Wutke K, Várbiro M, Rüdiger KD, Kelényi G.** Cytological and histological classification of multiple myeloma. *Haematologia (Budap).* 1981;14(3):315-29. PMID: 7327443.
- [84] **Kurosaki T, Kometani K, Ise W.** Memory B cells. *Nat Rev Immunol.* 2015 Mar;15(3):149-59. doi: 10.1038/nri3802. Epub 2015 Feb 13. PMID: 25677494. .
- [85] **Sakkas LI, Bogdanos DP.** The Role of B Cells in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Isr Med Assoc J.* 2016;18(9):516-519.
- [86] **Melissaropoulos K, Iliopoulos G, Sakkas LI, Daoussis D.** Pathogenetic Aspects of Systemic Sclerosis: A View Through the Prism of B Cells. *Front Immunol.* 2022;13:925741. doi: 10.3389/fimmu.2022.925741. PMID: 35812378; PMCID: PMC9259786

- [87] **Sakkas LI, Bogdanos DP.** Systemic sclerosis: New evidence re-enforces the role of B cells. *Autoimmun Rev.* 2016 Feb;15(2):155-61. doi: 10.1016/j.autrev.2015.10.005. Epub 2015 Oct 21. PMID: 26497107.
- [88] **Sakkas LI, Daoussis D, Mavropoulos A, Liossis SN, Bogdanos DP.** Regulatory B cells: New players in inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 2019 Jun;48(6):1133-1141. doi: 10.1016/j.semarthrit.2018.10.007. Epub 2018 Oct 15. PMID: 30409417.
- [89] **Sakkas LI, Katsiari CG, Daoussis D, Bogdanos DP.** The role of B cells in the pathogenesis of systemic sclerosis: an update. *Rheumatology (Oxford).* 2023 May 2;62(5):1780-1786. doi: 10.1093/rheumatology/keac578. PMID: 36218415.
- [90] **Melissaropoulos K, Iliopoulos G, Sakkas LI, Daoussis D.** Pathogenetic Aspects of Systemic Sclerosis: A View Through the Prism of B Cells. *Front Immunol.* 2022 Jun 23;13:925741. doi: 10.3389/fimmu.2022.925741. PMID: 35812378; PMCID: PMC9259786.
- [91] **Anania JC, Chenoweth AM, Wines BD, Hogarth PM.** The Human FcγRII (CD32) Family of Leukocyte FcR in Health and Disease. *Front Immunol.* 2019;10:464. doi: 10.3389/fimmu.2019.00464.
- [92] **Jessup CF, Ridings J, Ho A, Nobbs S, Robertson DM, Macardle P, Zola H.** The Fc receptor for IgG (Fc gamma RII; CD32) on human neonatal B lymphocytes. *Hum Immunol.* 2001;62(7):679-85. doi: 10.1016/s0198-8859(01)00257-9.
- [93] **Visentini M, Pellicano C, Leodori G, Marrapodi R, Colantuono S, Gigante A, Casato M, Rosato E.** CD21^{low} B cells are predictive markers of new digital ulcers in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 2021;205(2):128-134. doi: 10.1111/cei.13604.
- [94] **Yagi-Numata N, Matsushita T, Takehara K, Hamaguchi Y.** Increased expression levels of FcγRIIB on naïve and double-negative memory B cells in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2019;37 Suppl 119(4):23-31.

- [95] **Ricard L, Malard F, Riviere S, Laurent C, Fain O, Mohty M, Gaugler B, Mekinian A.** Regulatory B cell imbalance correlates with Tfh expansion in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2021 Jul-Aug;39 Suppl 131(4):20-24. doi: 10.55563/clinexprheumatol/fq8tm9. Epub 2021 Jul 28. PMID: 34323682.
- [96] **Thorarinsdottir K, Camponeschi A, Cavallini N, Grimsholm O, Jacobsson L, Gjertsson I, Mårtensson IL.** CD21(-/low) B cells in human blood are memory cells. *Clin Exp Immunol.* 2016;185(2):252-62. doi: 10.1111/cei.12795.
- [97] **Isnardi I, Ng YS, Menard L, Meyers G, Saadoun D, Srdanovic I, Samuels J, Berman J, Buckner JH, Cunningham-Rundles C, Meffre E.** Complement receptor 2/CD21- human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. *Blood.* 2010 Jun 17;115(24):5026-36. doi: 10.1182/blood-2009-09-243071. Epub 2010 Mar 15. PMID: 20231422; PMCID: PMC3373152.
- [98] **Saadoun D, Terrier B, Bannock J, Vazquez T, Massad C, Kang I, Joly F, Rosenzweig M, Sene D, Benech P, Musset L, Klatzmann D, Meffre E, Cacoub P.** Expansion of autoreactive unresponsive CD21-/low B cells in Sjögren's syndrome-associated lymphoproliferation. *Arthritis Rheum.* 2013 Apr;65(4):1085-96. doi: 10.1002/art.37828. PMID: 23279883; PMCID: PMC4479193.
- [99] **Charles ED, Brunetti C, Marukian S, Ritola KD, Talal AH, Marks K, Jacobson IM, Rice CM, Dustin LB.** Clonal B cells in patients with hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia contain an expanded anergic CD21low B-cell subset. *Blood.* 2011;117(20):5425-37. doi: 10.1182/blood-2010-10-312942.
- [100] **Wehr C, Eibel H, Masilamani M, Illges H, Schlesier M, Peter HH, Warnatz K.** A new CD21low B cell population in the peripheral blood of patients with SLE. *Clin Immunol.* 2004;113(2):161-71. doi: 10.1016/j.clim.2004.05.010. PMID: 15451473.

- [101] **Marrapodi R, Pellicano C, Radicchio G, Leodori G, Colantuono S, Iacolare A, Gigante A, Visentini M, Rosato E.** CD21^{low} B cells in systemic sclerosis: A possible marker of vascular complications. *Clin Immunol.* 2020;213:108364. doi: 10.1016/j.clim.2020.108364.
- [102] **Bharadwaj M, Mifsud NA, McCluskey J.** Detection and characterisation of alloreactive T cells. *Methods Mol Biol.* 2012;882:309-37. doi: 10.1007/978-1-61779-842-9_18. PMID: 22665242.
- [103] **A.Mavropoulos, T.Simopoulou, A.Varna, C.Liaskos, C.G.Katsiari, D.P.Bogdanos, L.I.Sakkas.** Breg Cells Are Numerically Decreased and Functionally Impaired in Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 68 (2016) 494-504. doi: 10.1002/art.39437.
- [104] **Tsiogkas SG, Mavropoulos A, Dardiotis E, Zafiriou E, Bogdanos DP.** A sharp decrease of Th17, CXCR3⁺-Th17, and Th17.1 in peripheral blood is associated with an early anti-IL-17-mediated clinical remission in psoriasis. *Clin Exp Immunol.* 2022 Oct 21;210(1):79-89. doi: 10.1093/cei/uxac069. PMID: 35925616; PMCID: PMC9585551.
- [105] **Schmit T, Klomp M, Khan MN.** An Overview of Flow Cytometry: Its Principles and Applications in Allergic Disease Research. *Methods Mol Biol.* 2021;2223:169-182. doi: 10.1007/978-1-0716-1001-5_13. PMID: 33226595.
- [106] **Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A.** Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2017 Mar;37(2):163-176. doi: 10.3109/07388551.2015.1128876. Epub 2016 Jan 14. PMID: 26767547.
- [107] **McCoy, J.P., Jr.,** Basic principles of flow cytometry. *Hematol Oncol Clin North Am,* 2002.16(2): p. 229-43.
- [108] **M. Hughes, Y. Allanore, L. Chung, J.D. Pauling, C.P. Denton, M. Matucci-Cerinic.** Raynaud phenomenon and digital ulcers in systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2020;16 :208-221. doi: 10.1038/s41584-020-0386-4. Erratum in: *Nat Rev Rheumatol.* 17 (2021) 246. PMID: 32099191

- [109] **S.I. Nihtyanova, G.M. Brough, C.M. Black, C.P. Denton.** Clinical burden of digital vasculopathy in limited and diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Ann.Rheum.Dis.* 2008;67:120-3. doi: 10.1136/ard.2007.072686
- [110] **Wilfong EM, Vowell KN, Crofford LJ, Kendall PL.** Multiparameter analysis of human B lymphocytes identifies heterogeneous CD19⁺ CD21^{lo} subsets. *Cytometry A.* 2023 Apr;103(4):283-294. doi: 10.1002/cyto.a.24699. Epub 2022 Nov 6. PMID: 36281747; PMCID: PMC10085822
- [111] **Das R, Bar N, Ferreira M, Newman AM, Zhang L, Bailur JK, Bacchiocchi A, Kluger H, Wei W, Halaban R, Sznol M, Dhodapkar MV, Dhodapkar KM.** Early B cell changes predict autoimmunity following combination immune checkpoint blockade. *J Clin Invest.* 2018 Feb 1;128(2):715-720. doi: 10.1172/JCI96798. Epub 2018 Jan 8. PMID: 29309048; PMCID: PMC5785243.
- [112] **K. Su, H. Yang, X. Li, X.Li, A.W. Gibson, J.M. Cafardi, T. Zhou, J.C. Edberg, and R.P. Kimberly.** Expression Profile of FcγRIIb on Leukocytes and Its Dysregulation in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.*2007; 178:3272–3280. doi: 10.4049/jimmunol.178.5.3272.
- [113] **Y. Liu, Y. Gong, C.Qu, Y. Zhang, R.You, N.Yu, G. Lu, Y. Huang, H. Zhang, Y. Gao, Y. Gao, X. Guo.** CD32b expression is down-regulated on double-negative memory B cells in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;440:1-7. doi: 10.1016/j.mce.2016.11.004
- [114] **T.Fukasawa, A.Yoshizaki, S.Ebata, A.Yoshizaki-Ogawa, Y.Asano, A. Enomoto, K.Miyagawa, Y.Kazoe, K.Mawatari, T.Kitamori, S.Sato.** Single-cell-level protein analysis revealing the roles of autoantigen-reactive B lymphocytes in autoimmune disease and the murine model. *eLife* 2021;10: e67209. doi: 10.7554/eLife.67209