



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Π. ΜΠΟΓΔΑΝΟΣ



Διδακτορική Διατριβή

**«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΜΙΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ
ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕΤΑΞΥ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ
ΚΑΙ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ
ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ»**

Υπό

ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΕΥΘΥΜΙΟΥ

Μοριακός Βιολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διδακτορικού Διπλώματος

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση
(Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη
Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης
«Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης
διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών
Υποτροφιών (ΙΚΥ)



**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Λάρισα, 2021

© 2021 ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΕΥΘΥΜΙΟΥ

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).

Στον πατέρα μου, Μαθαίο
Στη μητέρα μου, Ελένη
Στις δύο αδελφές μου, Αφροδίτη και Ελισάβετ

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (11^η/16-06-2021

ΓΣΕΣ):

1^{ος} Εξεταστής Λάζαρος Σακκάς (Επιβλέπων)

Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής Δημήτριος Μπόγδανος

Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής Ευθύμιος Δαρδιώτης

Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

4^{ος} Εξεταστής Ζωή Δανιήλ

Καθηγήτρια Πνευμονολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

5^{ος} Εξεταστής Χριστίνα Κατσιάρη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας-Ρευματολογίας Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

6^{ος} Εξεταστής Ειρήνη Ρηγοπούλου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

7^{ος} Εξεταστής Θεόδωρος Ελευθεριάδης

Αναπληρωτής Καθηγητής Νεφρολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η διδακτορική διατριβή αυτή είναι αποτέλεσμα μιας μακροχρόνιας προσπάθειας με αρκετή επιμονή και υπομονή. Δε θα μπορούσε να έχει έρθει εις πέρας χωρίς την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη της οικογένειας, των συνεργατών και των φίλων.

Τα λόγια είναι φτωχά στην προσπάθεια μου να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Μάνθο και Ελένη. Σας ευχαριστώ για την συνεχή υποστήριξη και ενθάρρυνση.

Ευχαριστώ τις δύο αδερφές μου, Αφροδίτη και Ελισάβετ, που πάντα μου ανέβαζα το ηθικό, όσο χαμηλά αυτό και αν ήταν.

Ένα θερμό ευχαριστώ στον Καθηγητή Κύριο Λάζαρο Σακκά, επιβλέποντα της διατριβής αυτής, επειδή μου έδωσε την ευκαιρία να είμαι μέλος του Εργαστηρίου της Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας. Λυπάμαι που δεν πρόλαβα να τον έχω ως δάσκαλο στην κλινική και ελπίζω μια μέρα να μαθητεύσω δίπλα του ως ειδικευόμενος ρευματολόγος.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Κύριο Ευθύμιο Δαρδιώτη, τρίτο μέλος της επιτροπής της διατριβής αυτής, επειδή ήταν εκεί κάθε φορά που τον χρειάστηκα. Είτε ως μέλος της επιτροπής, ή ως καθηγητή στο Τμήμα Ιατρικής, αποτελεί για εμένα πρότυπο συμπεριφοράς και επαγγελματικότητας.

Ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς επιτροπής της διατριβής αυτής, Καθηγήτρια Κυρία Ζωή Δανιήλ, Καθηγήτρια Κυρία Κατσιάρη, Καθηγήτρια Κυρία Ρηγοπούλου και Καθηγητή Κύριο Ελευθεριάδη για την τιμή να συμμετέχουν στην επιτροπή αξιολόγησης του έργου μου.

Ευχαριστώ το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για τη χορήγηση υποτροφίας και την οικονομική ενίσχυση της ερευνητικής μου δραστηριότητας.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη, παρόντα και παρελθόντα, του Εργαστηρίου της Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, καθώς η συνεργασία και η επαφή μαζί τους

με βοήθησαν να βελτιωθώ ως Γιώργος και ως επιστήμονας. Με αλφαβητική σειρά, τα μέλη αυτά είναι ο Γιώργος Βατίδης, ο Γιώργος Βασιλειάδης, η Ελευθερία Καλαγιά, η Φωτεινή Καλούση, η Νάνσυ Κόκκαλη, η Ελένη-Νεφέλη Κολοκοτσά, η Κατερίνα Κονδράκη, η Μαρία Κούρτη, η Δήμητρα Μήτσιου, η Μαρία Μιχαλοπούλου, η Μαριάννα-Αποστολία Μόλτσα, η Μαρία Μπαρμακούδη, η Άννα-Μαρία Νάτση, ο Σταύρος Νικητόπουλος, η Μαρία Ντόλκου, ο Θοδωρής Ντούπης, η Εύα Παπαβασιλείου, ο Δημήτρης Πάτσαλης, ο Δημήτρης Πλαγεράς, η Ματίνα Ρεντούλη, η Βέρα Ρίγγα, η Ιωάννα Σγάντζου, η Μαρία Σωκράτους, ο Ζήσης Τσούρης, η Χριστίνα Φερεντίνου, η Δέσποινα Φλώρου, ο Θοδωρής Χανής και η Ευαγγελίνα Χριστοφορίδη. Ιδιαίτερη μνεία στο Θάνο Μαυρόπουλο, την Εμμανουέλα Μάρου, την Ελένη Πατρικίου, το Θάνο Γκουτζουρέλα, το Χρήστο Λιάσκο, το Δημήτρη Σκυβαλίδα και το Σωτήρη Τσιόγκα. Αυτοί και αυτές έκαναν το εργαστήριο ένα πιο όμορφο περιβάλλον, ο καθένας και η καθεμία με τον τρόπο του/της. Ελπίζω η συνεργασία και η φιλία μας να συνεχιστεί για πολλά χρόνια ακόμα.

Ευχαριστώ τους συνεργάτες και τις συνεργάτιδες από την Κλινική της Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, ιδιαίτερα την Κυρία Θεοδώρα Σιμποπούλου και τον Κύριο Ιωάννη Αλεξίου, για τη βοήθεια τους με τη συλλογή του βιολογικού υλικού και των κλινικών πληροφοριών των ασθενών.

Ευχαριστώ επίσης το σύνολο των ασθενών που έλαβαν μέρος στο ερευνητικό έργο αυτό. Ακόμα και αν τα αποτελέσματα της διατριβής αυτής δεν έχουν άμεσο αντίκτυπο στη ζωή τους, η συμμετοχή τους βοηθάει στην κατανόηση των βασικών μηχανισμών της αυτοανοσίας, με σκοπό την ευεξία και τη βελτίωση της υγείας των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα.

Δε γίνεται να μην ευχαριστήσω τη Σοφία Χουτεσιώτη, η οποία πάντα έβρισκε χρόνο, μέσα στον πανικό, να μου κάνει τα χατίρια. Χωρίς τη Σοφία, η διατριβή αυτή θα αργούσε ακόμα να τελειώσει.

Κλείνοντας, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το κρατάω για τον Καθηγητή Κύριο Δημήτριο Μπόγδανο. Αν στους γονείς μου οφείλω το ζην, στον κύριο Μπόγδανο οφείλω το ευ ζην. Δε θα μπορούσα να έχω καλύτερο μέντορα για να με καθοδηγήσει μέσα στα μονοπάτια της επιστήμης. Ομολογώ ότι η τριβή μαζί του μου έδωσε την ώθηση να ασχοληθώ με την Ιατρική και δεν μπορώ παρά να τον ευχαριστήσω που από την πρώτη στιγμή και χωρίς αμφιβολίες στήριξε την απόφαση μου να γίνω ιατρός, κάτι για το οποίο του είμαι υπόχρεος.

Σας ευχαριστώ όλες και όλους,

Γεώργιος Ευθυμίου

Σύντομο Βιογραφικό

Εκπαίδευση

Ιαν 2018- Φοιτητής Ιατρικής

Σήμερα

Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

Εισαγωγή με κατατακτήριες εξετάσεις

Οκτ 2015- Υποψήφιος Διδάκτωρ (Ph.D.) Ιατρικής

Σήμερα

Εργαστήριο Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

Τίτλος διδακτορικής εργασίας: «Ο ρόλος της μοριακής μίμησης και της κυτταρικής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας μεταξύ παθογόνων και αυτοαντιγόνων σε ασθενείς με αυτοάνοσα ρευματολογικά και νευρολογικά νοσήματα»

Σεπ 2011- Μεταπτυχιακό στη Νευροεπιστήμη – Αναπτυξιακή Νευροβιολογία
Σεπ 2012 (M.Sc. in Neuroscience in Developmental Neurobiology),

Βαθμός: 8.29/10 (αναγνωρισμένο από το Δ.Ο.Α.Τ.Α.Π.)

King's College London, Λονδίνο

Τίτλος μεταπτυχιακής εργασίας: «Molecular mechanisms underlying neural stem cell specification and differentiation to GABAergic interneurons»

Σεπ 2006- Πτυχίο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Βαθμός: 7.41/10

Οκτ 2010

Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη

Τίτλος πτυχιακής εργασίας: «Μελέτη του πρότυπου έκφρασης του γονιδίου *Elfn1* κατά την ανάπτυξη του εμπρόσθιου εγκεφάλου του ποντικού»

Σεπ 2003- Απολυτήριο Ενιαίου Λυκείου

Ιουν 2006

Ιδιωτικό Γενικό Λύκειο «Αθηνά», Τρίκαλα

Επαγγελματική Εμπειρία

Οκτ 2015- Υποψήφιος Διδάκτωρ (Ph.D.) Ιατρικής

Σήμερα

- Ιούλ 2021** **Εκπαιδευτής Λειτουργίας του Σταθμού Α' Βοηθειών Τάγματος**
1^{ος} Λόχος, 501 Μηχανοκίνητο Τάγμα Πεζικού, Άσσηρος Θεσσαλονίκης
- Φεβ 2015-** **Ερευνητικός Συνεργάτης Μοριακής Βιολογίας**
Σεπ 2015 Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσοθεραπείας και Μοριακής Ανοσοδιαγνωστικής, Τομέας Βιοϊατρικής, Ινστιτούτο Έρευνας και Τεχνολογίας Θεσσαλίας, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης, Λάρισα
- Ιαν 2016-** **Επισκέπτης Ερευνητής Μοριακής Βιολογίας**
Απρ 2016 AG Innoprofile-Transfer, Institute of Biotechnology, Faculty of Natural Sciences, BTU Cottbus-Senftenberg, Σένφτενμπεργκ, Γερμανία
- Μάι 2013-** **Ερευνητικός Συνεργάτης Βιοχημείας**
Αυγ 2014 System Biology of Gene Regulation Group, Gene Centre, Ludwig Maximilian's University of Munich, Μόναχο
- Νοε 2011-** **Μεταπτυχιακός Ερευνητής Νευροβιολογίας**
Σεπ 2012 Molecular Neurobiology Group, Centre for Cellular Basis of Behaviour, Department of Neuroscience, Institute of Psychiatry, King's College London, Λονδίνο
- Εκπόνηση μεταπτυχιακής ερευνητικής εργασίας
- Νοε 2008-** **Προπτυχιακός Ερευνητής Μοριακής Βιολογίας**
Οκτ 2010 Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας & Μοριακής Νευροβιολογίας, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη
- Εκπόνηση μεταπτυχιακής ερευνητικής εργασίας

Υποτροφίες - Διακρίσεις

- 1^ο Βραβείο στην εργασία με τίτλο «SARS-CoV-2 and Autoimmunity: What If?», η οποία παρουσιάστηκε στο 2^ο Πανελλήνιο Πολυθεματικό Συνέδριο Αυτοάνοσων Παθήσεων, Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας κατά τις 25-27 Σεπτεμβρίου 2020 στη Λίμνη Πλαστήρα. Το βραβείο συνοδεύτηκε από χρηματικό έπαθλο
- Βραβείο «ΚΕΠΕΤΖΗ» της Ελληνικής Εταιρίας Ρευματολογίας στην εργασία με τίτλο «Ανάλυση της χυμικής απόκρισης εναντίον αντιγόνων του ιού Epstein-Barr σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση», η οποία παρουσιάστηκε στο 26^ο Πανελλήνιο

Συνέδριο Ρευματολογίας κατά τις 6-9 Δεκεμβρίου 2018 στην Αθήνα. Το βραβείο συνοδεύτηκε από χρηματικό έπαθλο

- «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας», Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών, Διάρκεια: 3 έτη (12/2016 – 12/2019)
- «Υποτροφία ΕΛΙΔΕΚ για υποψήφιους διδάκτορες», Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας, Διάρκεια: 3 έτη [λόγω αδυναμίας λήψης δύο διδακτορικών υποτροφιών ταυτόχρονα, η συγκεκριμένη υποτροφία απορρίφθηκε]

Δημοσιεύσεις

- 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*. Immunologic Research 2020 Feb;68(1):39-47
- Efthymiou G, Dardiotis E, Liaskos C, Marou E, Scheper T, Meyer W et al. *A comprehensive analysis of antigen-specific antibody responses against human cytomegalovirus in patients with systemic sclerosis*. Clinical Immunology 2019 Oct;207:87-96
- Sakkas LI, Bogdanos DP, Boumpas D, Mamouris Z, Gkoutzourelas A, Mavropoulos A, Tsouris Z et al. *The Second Greek-Israeli Symposium on Autoimmunity and Rheumatology: Success Through Synergy*. Israel Medical Association Journal 2019 Apr;21(4):292-297
- Liaskos C, Marou E, Simopoulou T, Gkoutzourelas A, Barmakoudi M, Efthymiou G, Scheper T, Meyers W, Katsiari CG, Bogdanos DP, Sakkas LI. *Multiparametric autoantibody profiling in patients with systemic sclerosis in Greece*. Mediterranean Journal of Rheumatology. 2018; 29(3):120-6
- Efthymiou G, Dardiotis E, Liaskos C, Marou E, Tsimourtou V, Rigopoulou EI, et al. *Immune responses against Helicobacter pylori-specific antigens differentiate relapsing remitting from secondary progressive multiple sclerosis*. Scientific Reports. 2017;7(1):7929
- Liaskos C, Marou E, Simopoulou T, Barmakoudi M, Efthymiou G, Scheper T, et al. *Disease-related autoantibody profile in patients with systemic sclerosis*. Autoimmunity. 2017;50(7):414-21
- Marou E, Liaskos C, Efthymiou G, Dardiotis E, Daponte A, Scheper T, et al. *Increased immunoreactivity against human cytomegalovirus UL83 in systemic sclerosis*. Clinical and Experimental Rheumatology. 2017;35 Suppl 106(4):31-4
- Marou E, Liaskos C, Simopoulou T, Efthymiou G, Dardiotis E, Katsiari C, et al. *Human cytomegalovirus (HCMV) UL44 and UL57 specific antibody responses in anti-HCMV-positive patients with systemic sclerosis*. Clinical Rheumatology. 2017;36(4):863-9
- Efthymiou G, Dardiotis E, Liaskos C, Marou E, Tsimourtou V, Scheper T, et al. *Anti-hsp60 antibody responses based on Helicobacter pylori in patients with multiple sclerosis: (ir)Relevance to disease pathogenesis*. Journal of Neuroimmunology. 2016;298:19-23

Κεφάλαια σε βιβλία

- Efthymiou G, Sakkas LI, Bogdanos DP. *Heat Shock Proteins as Target Autoantigens in Autoimmune Rheumatic Diseases*. In: Asea A, Kaur P (eds) Heat Shock Proteins in Inflammatory Diseases. Heat Shock Proteins, vol 22. Springer, Cham

- Efthymiou G, Sakkas LI, Bogdanos DP. *The danger of being a look alike: molecular mimicry involving heat shock proteins in autoimmune diseases*. In: Asea A, Kaur P (eds) *Heat Shock Proteins in Inflammatory Diseases*. Heat Shock Proteins, vol 22. Springer, Cham
- Efthymiou G, Sakkas LI, Bogdanos DP. *Anti-human Hsp60 autoantibodies in autoimmune and inflammatory rheumatic diseases*. In: Asea A, Kaur P (eds) *Heat Shock Protein 60 in Human Diseases and Disorders*. Heat Shock Proteins, vol 18. Springer, Cham
- Koutsoumpas LA, Efthymiou G, Mytilinaiou MG, Bogdanos DP. *Primary Sclerosing Cholangitis*. In: Radu-Ionita F, Pysropoulos N, Jinga N, Tintoiu IC, Sun Z, Bontas E (eds) *Liver Diseases – A Multidisciplinary Textbook*, Springer – Verlag London Ltd
- Liaskos C, Efthymiou G, Bogdanos DP. *Autoimmune Hepatitis*. In: Radu-Ionita F, Pysropoulos N, Jinga N, Tintoiu IC, Sun Z, Bontas E (eds) *Liver Diseases – A Multidisciplinary Textbook*, Springer – Verlag London Ltd

Ομιλίες σε Συνέδρια

- Ευθυμίου Γ. «Ο κυτταρομεγαλοϊός στο σκληρόδερμα». 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Επιστημονικής Εταιρίας για τη Μυοσκελετική Υγεία, 29/10-01/11/2020, Βόλος
- Ευθυμίου Γ. «SARS-CoV-2 και αυτοανοσία». 2^ο Πανελλήνιο Πολυθεματικό Συνέδριο Αυτοάνοσων Παθήσεων, Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, 25-27/09/2020, Λίμνη Πλαστήρα
- Ευθυμίου Γ. «Ερευνητικά πρωτόκολλα - Σύνταξη και ερμηνεία». 2^ο Πανελλήνιο Πολυθεματικό Συνέδριο Αυτοάνοσων Παθήσεων, Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, 25-27/09/2020, Λίμνη Πλαστήρα
- Ευθυμίου Γ. «Ανοσολογικές απαντήσεις εναντίον του ιού Epstein-Barr στη συστηματική σκλήρυνση». Πανελλήνιο Πολυθεματικό Συνέδριο Αυτοάνοσων Παθήσεων, 5-7/04/2019, Πορταριά
- Efthymiou G. «Viral triggers of systemic sclerosis». 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ρευματικών και Αυτοάνοσων Παθήσεων Κεντρικής Ελλάδας, 14-16/09/2018, Λάρισα
- Efthymiou G, Liaskos C, Bogdanos DP, Sakkas LI. «Anti-C1q antibodies in patients with multiple sclerosis and various neurological diseases». 13th Dresden Symposium on Autoantibodies, 27-30/09/2017, Δρέσδη
- Ευθυμίου Γ. «Πως το σχολείο αρνήθηκε να επιτρέψει το θάνατο της Claire και της Kaitlin». 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο στην Επείγουσα Προνοσοκομειακή Φροντίδα, 11-15/05/2016, Θεσσαλονίκη

Ατομικές δεξιότητες

- Πιστοποίηση εκπαιδευτή στη βασική υποστήριξη της ζωής και στη χρήση αυτόματου εξωτερικού απινιδωτή (BLS-AED Instructor, European Resuscitation Council)
- Πτυχίο Αγγλικών International English Language Testing System (IELTS)
- Πτυχίο Αγγλικών Cambridge Certificate of Proficiency
- Πτυχίο Αγγλικών Michigan Certificate of Proficiency
- Πτυχίο Γαλλικών DELF A2
- Πρόεδρος, Σύλλογος Εναλλακτικού Αθλητισμού Τρικάλων (Σ.ΕΝ.Α.Τ.), Τρίκαλα Θεσσαλίας

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΜΙΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ
ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕΤΑΞΥ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ
ΚΑΙ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ
ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ**

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΕΥΘΥΜΙΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Λάζαρος Σακκάς**, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (**Επιβλέπων**)
2. **Δημήτριος Μπόγδανος**, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. **Ευθύμιος Δαρδιώτης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η παρούσα διδακτορική διατριβή μελέτησε το ρόλο των ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι αντιγόνων του ιού Epstein-Barr και αντιγόνων του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* στην παθογένεση της κατά πλάκας σκλήρυνσης και της συστηματικής σκλήρυνσης, εστιάζοντας στους μηχανισμούς της μοριακής μίμησης και της ανοσολογικής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας ανάμεσα σε ιικά και μικροβιακά αντιγόνα με αυτοαντιγόνα της κατά πλάκας σκλήρυνσης και της συστηματικής σκλήρυνσης.

Για πρώτη φορά μελετήθηκαν με συστηματικό τρόπο οι χυμικές ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι αντιγόνων του ιού Epstein-Barr και του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* στην κατά πλάκας σκλήρυνση και στη συστηματική σκλήρυνση. Οι αντιγονοειδικές αποκρίσεις αναλύθηκαν ξεχωριστά στους κλινικούς φαινοτύπους των δύο αυτών νοσημάτων. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν εκτενείς αναλύσεις συσχέτισης ανάμεσα στις αντιγονοειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις και σε κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά των δύο νοσημάτων αυτών. Οι συχνότητες και τα επίπεδα των αντιγονοειδικών αντισωμάτων μελετήθηκαν με τη χρήση ανοσολογικών μεθόδων, ενώ επιλέχθηκαν στατιστικές μέθοδοι υψηλής αυστηρότητας ως προς τη στατιστική σημαντικότητα για την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Στην κατά πλάκας σκλήρυνση, οι συχνότητες και τα επίπεδα των περισσότερων αντιγονοειδικών ελικοβακτηριδιακών αντισωμάτων ήταν συγκρίσιμα ανάμεσα στους ασθενείς, ανεξαρτήτως κλινικού υποτύπου, και στους υγιείς μάρτυρες. Αξιοπρόσεκτο αποτέλεσμα ήταν η αυξημένη συχνότητα των αντισωμάτων έναντι της ελικοβακτηριδιακής τοξίνης VacA στους ασθενείς με δευτεροπαθώς προϊούσα κατά πλάκας σκλήρυνση σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Επίσης, οι συχνότητες των αντισωμάτων έναντι τεσσάρων ελικοβακτηριδιακών αντιγόνων, των p54, p50, p41 και p29-UreA, ήταν αυξημένες σε ασθενείς με δευτεροπαθώς προϊούσα κατά πλάκας

σκλήρυνση σε σύγκριση με ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα κατά πλάκας σκλήρυνση.

Στη συστηματική σκλήρυνση, οι συχνότητες και οι τίτλοι των αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* ήταν συγκρίσιμοι ανάμεσα σε ασθενείς, ανεξαρτήτως κλινικού υποτύπου, και σε υγιείς μάρτυρες.

Το πιο ενδιαφέρον αποτέλεσμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η σημαντική διαγνωστική σύνδεση και κλινική συσχέτιση των αντισωμάτων έναντι ενός μη χαρακτηρισμένου αντιγόνου του ιού Epstein-Barr, που για λόγους ευχέρειας ονομάστηκε EBV.p100, με τη συστηματική σκλήρυνση. Η ισχυρή συσχέτιση των αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου αυτού με τα αυτοαντισώματα έναντι της τοποϊσομεράσης I που εντοπίστηκε προτείνει την πιθανότητα μοριακής μίμησης ανάμεσα στο ιικό αντιγόνο και στο ενδογενές αυτοαντιγόνο. Μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης αναδείχθηκαν αρκετές ομοιότητες αλληλουχίας ανάμεσα σε ιικές πρωτεΐνες αντίστοιχου μεγέθους με το υποτιθέμενο αντιγόνο EBV.p100 και στην τοποϊσομεράση I.

Τέλος, στο πλαίσιο της διατριβής αυτής πραγματοποιήθηκε μια εκτεταμένη βιοπληροφορική ανάλυση ομοιοτήτων ανάμεσα σε αντιγόνα του SARS-CoV-2 και σε ανθρώπινες πρωτεΐνες και γνωστά αυτοαντιγόνα. Εντοπίστηκαν αρκετές ομοιότητες ανάμεσα στις αμινοξικές αλληλουχίες πιθανών αντιγονικών επιτόπων του SARS-CoV-2 και ανθρώπινων αλληλουχιών. Οι ομοιότητες αυτές θα μπορούσε να αποτελούν τη βάση της μοριακής μίμησης και της συνεπακόλουθης επαγωγής αυτοάνοσων νοσημάτων.

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες	5
Σύντομο Βιογραφικό	8
Περίληψη	13
Πίνακας Περιεχομένων	15
Λίστα Εικόνων	21
Λίστα Πινάκων	24
Συνομογραφίες	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή	30
1.1 Εισαγωγή στην αυτοανοσία και στα αυτοάνοσα νοσήματα	30
1.2 Η διάκριση εαυτού-ξένου και η ανοσολογική ανοχή	32
1.2.1 Κεντρική ανοσολογική ανοχή	33
1.2.2 Περιφερική ανοσολογική ανοχή	35
1.3 Αιτιολογικοί παράγοντες διάσπασης της ανοσολογικής ανοχής και επαγωγής της αυτοανοσίας	38
1.3.1 Γενετική προδιάθεση	41
1.3.2 Φύλο και επίδραση των ορμονών του φύλου	44
1.3.3 Άγχος	45
1.3.4 Παχυσαρκία	46
1.3.5 Μικρόβια και ιοί	47
1.3.6 Μικροβιακή χλωρίδα	50
1.3.7 Εμβόλια και ανοσοεπιταχυντικά	51
1.3.8 Ρύπανση του περιβάλλοντος και τοξικοί παράγοντες	55
1.3.9 Κάπνισμα	56
1.3.10 Δίαιτα και διατροφή	57
1.4 Μηχανισμοί διάσπασης της ανοσολογικής ανοχής και επαγωγής της αυτοανοσίας	58
1.4.1 Μηχανισμοί διάσπασης της κεντρικής ανοσολογικής ανοχής	59
1.4.2 Μηχανισμοί διάσπασης της περιφερικής ανοσολογικής ανοχής	61
1.4.2.1 Απελευθέρωση απομονωμένων αντιγόνων	62
1.4.2.2 Κρυπτικοί επίτοποι	63
1.4.2.3 Επέκταση επιτόπων	64
1.4.2.4 Νέο-αυτοαντιγόνα	67
1.4.2.5 Υπερέκφραση συνδιεγερτικών μορίων	68
1.4.2.6 Διαταραχή της απόπτωσης	69
1.4.2.7 Διαταραχές κάθαρσης αυτοαντιγόνων	69
1.4.2.8 Ανεπάρκεια των ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων	70
1.4.2.9 Πολυκλωνική λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση και υπεραντιγόνα	74
1.4.2.10 Διαταραχές έκφρασης μορίων MHC	75
1.4.2.11 Μοριακή μίμηση	76
1.4.2.12 Ενεργοποίηση παρακείμενων κυττάρων	83
1.4.2.13 Θεωρία γόνιμου πεδίου	85
1.5 Κατά πλάκας σκλήρυνση	87
1.5.1 Εισαγωγή και επιδημιολογία της κατά πλάκας σκλήρυνσης	87

1.5.2 Κλινική εικόνα της κατά πλάκας σκλήρυνσης.....	88
1.5.3 Αιτιολογικοί παράγοντες της κατά πλάκας σκλήρυνσης.....	91
1.5.4 Παθογένεση της κατά πλάκας σκλήρυνσης	94
1.5.5 Ο ρόλος των μολύνσεων και της μοριακής μίμησης στην κατά πλάκας σκλήρυνση.....	98
1.5.6 Ο ιός Epstein-Barr στην κατά πλάκας σκλήρυνση	99
1.5.7 Το <i>Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού</i> στην κατά πλάκας σκλήρυνση.....	107
1.6 Συστηματική σκλήρυνση	111
1.6.1 Εισαγωγή και επιδημιολογία της συστηματικής σκλήρυνσης.....	111
1.6.2 Κλινική εικόνα της συστηματικής σκλήρυνσης	113
1.6.3 Αιτιολογικοί παράγοντες της συστηματικής σκλήρυνσης	118
1.6.4 Παθογένεση της συστηματικής σκλήρυνσης.....	121
1.6.5 Ο ρόλος των μολύνσεων και της μοριακής μίμησης στη συστηματική σκλήρυνση.....	127
1.6.6 Ο ιός Epstein-Barr στη συστηματική σκλήρυνση	128
1.6.7 Το <i>Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού</i> στην συστηματική σκλήρυνση.....	129
1.7 Υπόθεση	130
1.8 Στόχοι.....	131
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υλικά και Μέθοδοι	132
2.1 Υλικά	132
2.1.1 Πλαστικά και αναλώσιμα.....	132
2.1.2 Μηχανήματα και εργαλεία	132
2.1.3 Εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες (kit)	133
2.1.4 Εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια, χημικά και μέσα καλλιέργειας	133
2.1.5 Αντισώματα.....	134
2.1.6 Βιολογικό Υλικό.....	134
2.2 Μέθοδοι.....	139
2.2.1 Διαχωρισμός παραγώγων αίματος σε φικόλη και κρυσταλλοποίηση μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος.....	139
2.2.1.1 Εισαγωγή.....	139
2.2.1.2 Πρωτόκολλο	142
2.2.2 Ανοσοπροσοφνητική δοκιμασία στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)	143
2.2.2.1 Εισαγωγή.....	143
2.2.2.2 Πρωτόκολλο Euroimmun	144
2.2.3 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western blotting).....	145
2.2.3.1 Εισαγωγή.....	145
2.2.3.2 Πρωτόκολλο Euroimmun	147
2.2.4 Κυτταρομετρία ροής.....	148
2.2.4.1 Εισαγωγή.....	148
2.2.4.2 Πρωτόκολλο CD3/IFN-γ.....	150
2.2.4.3 Πρωτόκολλο CD19/CD27/IL-10	153
2.2.5 Protein BLAST	156
2.2.5.1 Εισαγωγή.....	156
2.2.5.2 Παράμετροι Protein BLAST	157
2.2.6 Στατιστική ανάλυση.....	158
2.2.7 Εκτέλεση πειραματικής διαδικασίας και στατιστικής ανάλυσης	159
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αντιγονοειδικά αντισώματα έναντι του <i>Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού</i> στην κατά πλάκας σκλήρυνση.....	160

3.1 Εισαγωγή	160
3.2 Υλικά και Μέθοδοι	161
3.2.1 Υλικά	161
3.2.2 Μέθοδοι	161
3.2.2.1 Βιολογικό υλικό ασθενών και μαρτύρων	161
3.2.2.2 Ανίχνευση IgG αντι-Hp αντισωμάτων με ELISA	163
3.2.2.3 Ανίχνευση IgG αντιγονοειδικών Hp αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western	163
3.2.2.4 Ανίχνευση αντι-CagA και αντι-VacA αντισωμάτων με γραμμική ανοσοαποτύπωση	166
3.2.2.5 Κλινικές συσχετίσεις	166
3.2.2.6 Στατιστική ανάλυση	167
3.3 Αποτελέσματα	167
3.3.1 IgG αντι-Hp αντισώματα σε ασθενείς με MS	167
3.3.2 Συχνότητες IgG αντιγονοειδικών Hp αντισωμάτων σε ασθενείς με MS	171
3.3.3 Τίτλοι IgG αντιγονοειδικών Hp αντισωμάτων σε ασθενείς με MS	183
3.3.4 Συσχετίσεις των αντιγονοειδικών Hp ανοσολογικών αποκρίσεων	187
3.3.5 Ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης στις αντιγονοειδικές Hp ανοσολογικές αποκρίσεις	197
3.4 Συζήτηση	197

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Αντισώματα έναντι της Hsp60 του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* στην κατά πλάκας σκλήρυνση

4.1 Εισαγωγή	204
4.2 Υλικά και Μέθοδοι	206
4.2.1 Υλικά	206
4.2.2 Μέθοδοι	206
4.2.2.1 Βιολογικό υλικό ασθενών και μαρτύρων	206
4.2.2.2 Ανίχνευση IgG αντι-Hp αντισωμάτων με ELISA	207
4.2.2.3 Ανίχνευση IgG αντι-Hsp60 Hp αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western	207
4.2.2.4 Ανίχνευση IgG αντι-CagA και αντι-VacA αντισωμάτων με γραμμική ανοσοαποτύπωση	210
4.2.2.5 Κλινικές συσχετίσεις	210
4.2.2.6 Ανίχνευση διασταυρούμενων αντιδράσεων με τα IgG αντι-Hp Hsp60 αντισώματα	211
4.2.2.7 Στατιστική ανάλυση	211
4.3 Αποτελέσματα	211
4.4 Συζήτηση	217

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Αντιγονοειδικά αντισώματα έναντι του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* στη συστηματική σκλήρυνση

5.1 Εισαγωγή	221
5.2 Υλικά και Μέθοδοι	223
5.2.1 Υλικά	223
5.2.2 Μέθοδοι	223
5.2.2.1 Βιολογικό υλικό ασθενών και μαρτύρων	223
5.2.2.2 Ανίχνευση IgG αντι-CagA και αντι-VacA αντισωμάτων με γραμμική ανοσοαποτύπωση	225
5.2.2.3 Ανίχνευση IgG αντιγονοειδικών Hp αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western	225

5.2.2.4 Κλινικές συσχετίσεις.....	229
5.2.2.5 Στατιστική ανάλυση.....	229
5.3 Αποτελέσματα	229
5.3.1 Συχνότητες IgG αντι-Ηρ αντισωμάτων σε ασθενείς με SSc της Ομάδας 1	229
5.3.2 Συχνότητες IgG αντιγονοειδικών Ηρ αντισωμάτων σε ασθενείς με SSc της Ομάδας 1	229
5.3.3 Τίτλοι IgG αντιγονοειδικών Ηρ αντισωμάτων σε ασθενείς με SSc της Ομάδας 1.....	230
5.3.4 Αντιγονοειδικές Ηρ ανοσολογικές αποκρίσεις σε ασθενείς με SSc της Ομάδας 2.....	240
5.3.5 Πολλαπλές αντιγονοειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις	246
5.3.6 Συσχετίσεις των αντιγονοειδικών Ηρ ανοσολογικών αποκρίσεων	255
5.4 Συζήτηση.....	256

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Αντιγονοειδικά αντισώματα έναντι του ιού Epstein-Barr στη συστηματική σκλήρυνση

6.1 Εισαγωγή	262
6.2 Υλικά και Μέθοδοι	265
6.2.1 Υλικά.....	265
6.2.2 Μέθοδοι	265
6.2.2.1 Βιολογικό υλικό ασθενών και μαρτύρων	265
6.2.2.2 Ανίχνευση IgG αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	267
6.2.2.3 Ανοσοαποτύπωση με μονοκλωνικά αντισώματα αντι-ScI-70.....	270
6.2.2.4 Κλινικές συσχετίσεις.....	270
6.2.2.5 Παράμετροι Uniprot και Protein BLAST	270
6.2.2.6 Στατιστική ανάλυση.....	271
6.3 Αποτελέσματα	271
6.3.1 IgG αντι-EBV αντισώματα σε ασθενείς με SSc	271
6.3.2 Συχνότητες IgG αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων σε ασθενείς με SSc.....	275
6.3.3 Τίτλοι IgG αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων σε ασθενείς με SSc.....	285
6.3.4 Συσχετίσεις των αντιγονοειδικών EBV ανοσολογικών αποκρίσεων	291
6.3.5 Συχνότητες και τίτλοι των αντι-EBV.p100 αντισωμάτων σε ασθενείς με SSc	303
6.3.6 Συσχετίσεις της αντι-EBV.p100 ανοσολογικών απόκρισης	303
6.3.7 Αναζήτηση της ταυτότητας του αντιγόνου EBV.p100 και μελέτη διασταυρούμενης αντιδραστικότητας των αντι-EBV.p100 αντισωμάτων.....	311
6.3.8 Αναζήτηση ομοιοτήτων μεταξύ αλληλουχιών πρωτεϊνών του EBV και της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I με BLAST.....	313
6.4 Συζήτηση.....	317

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Συνδυασμένη ανοσολογική απόκριση έναντι του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού και του ιού Epstein-Barr στη συστηματική σκλήρυνση και στην κατά πλάκας σκλήρυνση

7.1 Εισαγωγή	328
7.2 Υλικά και Μέθοδοι	329
7.2.1 Υλικά.....	329
7.2.2 Μέθοδοι	329
7.2.2.1 Βιολογικό υλικό ασθενών και μαρτύρων	329
7.2.2.2 Ανίχνευση IgG αντι-Ηρ αντισωμάτων με ELISA.....	330

7.2.2.3 Ανίχνευση IgG αντι-EBV αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	330
7.2.2.5 Στατιστική ανάλυση.....	331
7.3 Αποτελέσματα.....	331
7.3.1 Συχνότητες IgG αντι-Hρ και IgG αντι-EBV αντισωμάτων στην SSc και στην MS.....	331
7.3.2 Κλινικές συσχετίσεις των συνδυασμένων ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι του Hρ και του EBV στην SSc και στην MS.....	340
7.4 Συζήτηση.....	341

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Αυτοαντισώματα σχετιζόμενα με την κατά πλάκας σκλήρυνση και αντιγονοειδικά αντισώματα έναντι του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού και του ιού Epstein-Barr σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση.....

8.1 Εισαγωγή.....	344
8.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	345
8.2.1 Υλικά.....	345
8.2.2 Μέθοδοι.....	345
8.2.2.1 Βιολογικό υλικό ασθενών.....	345
8.2.2.2 Ανίχνευση IgG αντι-Hρ αντισωμάτων με ELISA.....	346
8.2.2.3 Ανίχνευση IgG αντι-EBV αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	346
8.2.2.4 Ανίχνευση IgM και IgG αυτοαντισωμάτων σχετιζόμενων με την MS με έμμεσο ανοσοφθορισμό.....	347
8.2.2.5 Στατιστική ανάλυση.....	347
8.3 Αποτελέσματα.....	347
8.3.1 Συχνότητες αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς με MS.....	347
8.3.2 Σχέση αυτοαντισωμάτων σχετιζόμενων με την MS με αντισώματα έναντι αντιγόνων του Hρ και του EBV σε ασθενείς με MS.....	353
8.4 Συζήτηση.....	358

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Παραγωγή ιντερλευκίνης 10 από Β λεμφοκύτταρα και ιντερφερόνης γ από Τ λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση.....

9.1 Εισαγωγή.....	364
9.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	366
9.2.1 Υλικά.....	366
9.2.2 Μέθοδοι.....	366
9.2.2.1 Βιολογικό υλικό ασθενών και μαρτύρων.....	366
9.2.2.2 Κυτταρομετρία ροής.....	367
9.2.2.3 Ανίχνευση IgG αντι-Hρ αντισωμάτων με ELISA.....	367
9.2.2.4 Ανίχνευση IgG αντιγονοειδικών Hρ αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	367
9.2.2.5 Ανίχνευση IgG αντι-EBV αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	368
9.2.2.6 Στατιστική ανάλυση.....	368
9.3 Αποτελέσματα.....	368
9.3.1 IL-10+ Β λεμφοκύτταρα και IFN-γ+ Τ λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα κατά πλάκας σκλήρυνση και ασθενείς με πρωτοδιάγνωση κατά πλάκας σκλήρυνσης.....	368
9.3.2 Συσχετίσεις των IL-10 παραγωγών Β λεμφοκυττάρων και των IFN-γ παραγωγών Τ λεμφοκυττάρων με χυμικές αποκρίσεις έναντι του Hρ και του EBV σε ασθενείς με RRMS.....	374

9.4 Συζήτηση.....	376
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: SARS-CoV-2 και μοριακή μίμηση	380
10.1 Εισαγωγή	380
10.2 Υλικά και Μέθοδοι	383
10.2.1 Υλικά.....	383
10.2.2 Μέθοδοι	383
10.3 Αποτελέσματα	384
10.4 Συζήτηση.....	389
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11: Γενική Συζήτηση	396
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	402
Παράρτημα Α. Συγκατάθεση ασθενούς για συμμετοχή σε ερευνητική μελέτη	464
Παράρτημα Β. Επίτοποι πρωτεϊνών SARS-CoV-2.....	465
Παράρτημα Γ. Αλληλοεπικάλυψη επιτόπων πρωτεϊνών SARS-CoV-2.....	466
Παράρτημα Δ. Αποτελέσματα BLASTp με ανθρώπινες πρωτεΐνες	467
Παράρτημα Ε. Αποτελέσματα BLASTp με αυτοαντιγόνα	468

Λίστα Εικόνων

Εικόνα 1.1: Η γενετική προδιάθεση σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς και ενδογενείς παράγοντες επάγουν την αυτοανοσία.	40
Εικόνα 1.2: Η απελευθέρωση απομονωμένων αντιγόνων ως παθογενετικός μηχανισμός της αυτοανοσίας.....	63
Εικόνα 1.3: Η επέκταση των επιτόπων ως παθογενετικός μηχανισμός της αυτοανοσίας 66	66
Εικόνα 1.4: Η μοριακή μίμηση και η χυμική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ως παθογενετικοί μηχανισμοί της αυτοανοσίας 77	77
Εικόνα 1.5: Η ενεργοποίηση παρακείμενων κυττάρων ως παθογενετικός μηχανισμός της αυτοανοσίας. Η ενεργοποίηση αντιμικροβιακών ή αντιικών Τ βοηθητικών λεμφοκυττάρων προκαλεί φλεγμονώδη αντίδραση 85	85
Εικόνα 1.6: Συχνότητα εμφάνισης κλινικών χαρακτηριστικών σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνσης..... 90	90
Εικόνα 1.7: Η εξέλιξη (Α) και η συχνότητα εμφάνισης (Β) των κλινικών μορφών της κατά πλάκας σκλήρυνσης..... 91	91
Εικόνα 1.8: Ταξινόμηση της συστηματικής σκλήρυνσης σε περιορισμένη δερματική και σε διάχυτη δερματική μορφή. 116	116
Εικόνα 2.1: Διαχωρισμός παραγώγων αίματος σε φικόλη..... 140	140
Εικόνα 3.1: Διάγραμμα θετικών και αρνητικών δειγμάτων για αντισώματα έναντι του Ηρ με ELISA..... 168	168
Εικόνα 3.2: Διάγραμμα διασποράς που απεικονίζει τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι του Ηρ με ELISA 169	169
Εικόνα 3.3: Διάγραμμα διασποράς που απεικονίζει τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι του Ηρ με ELISA 170	170
Εικόνα 3.4: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για αντισώματα έναντι 14 πρωτεϊνών-αντιγόνων του Ηρ..... 172	172
Εικόνα 3.5: Διαγράμματα δακτυλίου που απεικονίζουν την παρουσία ενός, δύο, τριών ή τεσσάρων αντισωμάτων έναντι των p54, p50, p41 και p29-UreA..... 180	180
Εικόνα 3.6: Διαγράμματα Venh που απεικονίζουν τη συνδυαστική παρουσία των αντισωμάτων έναντι των p54, p50, p41 και p29-UreA..... 181	181
Εικόνα 3.7: Διαγράμματα διασποράς που απεικονίζουν τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι των 14 αντιγόνων του Ηρ..... 185	185
Εικόνα 4.1: Διάγραμμα διασποράς που απεικονίζει τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι του Ηρ με ELISA 212	212
Εικόνα 4.2: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για αντισώματα έναντι της Hsp60 του Ηρ..... 214	214
Εικόνα 4.3: Διάγραμμα διασποράς που απεικονίζει τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι της Hsp60 του Ηρ 215	215
Εικόνα 4.4: Διάγραμμα διασποράς που απεικονίζει τη συσχέτιση μεταξύ των τίτλων των αντι-Ηρ αντισωμάτων με ELISA με τους τίτλους των αντι-Hsp60 αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση σε 55 αντι-Ηρ+ ασθενείς με MS. 216	216

Εικόνα 5.1: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για αντισώματα έναντι 15 πρωτεϊνών-αντιγόνων του H _p	232
Εικόνα 5.2: Διάγραμμα διασποράς που απεικονίζει τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι των 15 αντιγόνων του H _p	238
Εικόνα 5.3: Διαγράμματα δακτυλίου που απεικονίζουν την παρουσία πολλαπλών αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του H _p σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc) της Ομάδας 1, συμπεριλαμβάνοντας ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), ασθενείς με SSc της Ομάδας 2, συμπεριλαμβάνοντας ασθενείς με dcSSc και με lcSSc, και σε υγιείς μάρτυρες (HC)	248
Εικόνα 6.1: Διαγράμματα Venn των προτύπων θετικότητας των αντι-VCA, των αντι-EA και των αντι-EBNA-1 αντισωμάτων	273
Εικόνα 6.2: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για αντισώματα έναντι αντιγόνων του EBV σε 35 αντιπροσωπευτικά δείγματα, 10 από ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), 10 από ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS) και 5 από υγιή δείγματα ελέγχου (HC).	276
Εικόνα 6.3: Αριθμός αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV ανά ασθενή.....	281
Εικόνα 6.4: Διαγράμματα δακτυλίου που απεικονίζουν την παρουσία πολλαπλών αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV.....	283
Εικόνα 6.5: Διαγράμματα διασποράς που απεικονίζουν τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	288
Εικόνα 6.6: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τα αντισώματα έναντι του αντιγόνου EBV.p100	305
Εικόνα 6.7: Διάγραμμα Venn που απεικονίζουν τη σχέση ανάμεσα στους 59 ασθενείς με SSc που είναι θετικοί για τα αντι-EBV.p100 αντισώματα και θετικοί για τα αντι-Scl-70 αντισώματα.....	309
Εικόνα 6.8: Διάγραμμα διασποράς που απεικονίζει τη συσχέτιση μεταξύ των τίτλων των αντι-EBV.p100 αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western με τους τίτλους των αντι-Scl-70 αυτοαντισωμάτων με γραμμική ανοσοαποτύπωση σε 21 αντι-EBV.p100+ ασθενείς με SSc.	310
Εικόνα 6.9: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας ως πρωτογενές αντίσωμα το μονοκλωνικό αντι-Scl-70 αντίσωμα σε συγκέντρωση 1:1000.	312
Εικόνα 7.1: Διαγράμματα Venn των προτύπων διπλής θετικότητας των αντι-H _p , των αντι-VCA, των αντι-EA και των αντι-EBNA-1 αντισωμάτων σε 55 ασθενείς με συστηματικής σκλήρυνση (SSc), σε 44 ασθενείς με MS και σε 17 υγιείς μάρτυρες, όπως ανιχνεύθηκαν με από ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	338
Εικόνα 7.2: Διαγράμματα Venn των προτύπων πολλαπλής θετικότητας των αντι-H _p , των αντι-VCA, των αντι-EA και των αντι-EBNA-1 αντισωμάτων σε 55 ασθενείς με συστηματικής σκλήρυνση (SSc), σε 44 ασθενείς με MS και σε 17 υγιείς μάρτυρες, όπως ανιχνεύθηκαν με από ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	339
Εικόνα 9.1: Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής	370
Εικόνα 9.2: Θηκογράμματα απεικόνισης της κατανομής των CD19+ B λεμφοκυττάρων που παράγαν IL-10 και την κατανομή των CD3+ T λεμφοκυττάρων που παράγαν IFN- γ	372

Εικόνα 9.3: Διαγράμματα διασποράς που απεικονίζουν τις συσχετίσεις ανάμεσα σε CD19+/IL-10+ κύτταρα και σε CD3+/IFN-γ+ κύτταρα.....	373
Εικόνα 9.4: Θηκόγραμμα απεικόνισης της κατανομής των CD19+ B λεμφοκυττάρων που παρήγαγαν IL-10 σε αντι-Hp θετικούς και αντι-Hp αρνητικούς ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα κατά πλάκας σκλήρυνση.	375
Εικόνα 10.1: Υπομονάδες και περιοχές της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2	385
Εικόνα 10.2: Στοιχίση αλληλουχιών τεσσάρων πιθανών αντιγονικών επιτόπων της πρωτεΐνης S και ενός πιθανού αντιγονικού επιτόπου της πρωτεΐνης E του SARS-CoV-2 με αλληλουχίες ανθρώπινων πρωτεϊνών.....	386
Εικόνα 10.3: Στοιχίση αλληλουχιών της πρωτεΐνης S με αυτοαντιγόνων.	388
Εικόνα 11.1: Η μοριακή μίμηση και η ανοσολογική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ανάμεσα στο αντιγόνο EBV.p100 του ιού Epstein-Barr και στην ανθρώπινη τοποϊσομεράση I ως μηχανισμοί παραγωγής του αυτοαντισώματος έναντι της τοποϊσομεράσης I.....	400

Λίστα Πινάκων

Πίνακας 1.1: Συμπτώματα και σημεία της κατά πλάκας σκλήρυνσης ανάλογα με την προσβληθείσα περιοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος.....	89
Πίνακας 2.1: Δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση	138
Πίνακας 3.1: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών και υγείων δειγμάτων ελέγχου.....	164
Πίνακας 3.2: Συχνότητες εμφάνισης αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του H _p σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.....	174
Πίνακας 3.3: Τίτλοι αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του H _p	176
Πίνακας 3.4: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των 139 ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), κατηγοριοποιημένων ανάλογα με τη θετικότητα για αντισώματα έναντι του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού (αντι-H _p) σε θετικούς (αντι-H _p +) και αρνητικούς (αντι-H _p -), όπως αυτή καθορίστηκε με ELISA.	188
Πίνακας 3.5: Κλινικές συσχετίσεις αντιγονοειδικών H _p ανοσολογικών αντιδράσεων σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση.	192
Πίνακας 3.6: Κλινικές συσχετίσεις αντιγονοειδικών H _p ανοσολογικών αντιδράσεων σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS) ταξινομημένες σε υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS) και αναλύσεις πολλαπλής παλινδρόμησης μετά από διόρθωση για την ηλικία, την ηλικία εμφάνισης της νόσου, τη διάρκεια της νόσου και το φύλλο.	194
Πίνακας 4.1: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των 129 ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), συμπεριλαμβάνοντας 102 με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και 27 με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS) και των 48 υγείων δειγμάτων ελέγχου (HC).	209
Πίνακας 5.1: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των 91 ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (SSc) της Ομάδας 1 και των 59 υγείων δειγμάτων ελέγχου (HC).	227
Πίνακας 5.2: Συχνότητες εμφάνισης αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του H _p σε ασθενείς και υγιή δείγματα ελέγχου	234
Πίνακας 5.3: Τίτλοι αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του H _p σε αντι-H _p + ασθενείς και υγιή δείγματα ελέγχου	236
Πίνακας 5.4: Συχνότητες εμφάνισης αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του H _p σε 18 αντι-H _p + ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc) της Ομάδας 2, συμπεριλαμβάνοντας 11 με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 7 με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), καθώς και σε 45 αντι-H _p + υγιή δείγματα ελέγχου (HC), όπως ανιχνεύθηκαν έπειτα από ανοσοαποτύπωση κατά Western.	242
Πίνακας 5.5: Τίτλοι αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του H _p σε αντι-H _p + ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc) της Ομάδας 2, συμπεριλαμβάνοντας αντι-H _p + ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και αντι-H _p + ασθενείς με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), καθώς και σε αντι-H _p + υγιή δείγματα ελέγχου (HC), όπως υπολογίστηκαν έπειτα από ανοσοαποτύπωση κατά Western.	244
Πίνακας 5.6: Συχνότητες παρουσίας πολλαπλών αντιγονοειδικών H _p αντισωμάτων, όπως ανιχνεύθηκαν με ανοσοαποτύπωση Western, στους 91 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc) της Ομάδας 1, συμπεριλαμβάνοντας 41 με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 50 με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), τους 35 ασθενείς με SSc της	

Ομάδας 2, συμπεριλαμβάνοντας 26 με dcSSc και 50 με lcSSc, και τους 59 υγιείς μάρτυρες (HC).....	247
Πίνακας 5.7: Συχνότητα περιπτώσεων με αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον ένα (≥ 1) αντιγόνο του Ηρ, όπως ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	249
Πίνακας 5.8: Συχνότητα περιπτώσεων με αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον τρία (≥ 3) αντιγόνα του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, όπως ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	250
Πίνακας 5.9: Συχνότητα περιπτώσεων με αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον πέντε (≥ 5) αντιγόνα του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, όπως ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	251
Πίνακας 5.10: Συχνότητα περιπτώσεων με αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον επτά (≥ 7) αντιγόνα του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, όπως ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	252
Πίνακας 5.11: Συχνότητα περιπτώσεων με αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον εννιά (≥ 9) αντιγόνα του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, όπως ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	253
Πίνακας 5.12: Συχνότητα περιπτώσεων με αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον έντεκα (≥ 11) αντιγόνα του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, όπως ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	254
Πίνακας 6.1: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών και υγιών δειγμάτων ελέγχου.....	268
Πίνακας 6.2: Κλινικά χαρακτηριστικά των 59 ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 31 ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 28 ασθενείς με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc).....	269
Πίνακας 6.3: Συχνότητες εμφάνισης των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς και υγιή δείγματα ελέγχου.....	277
Πίνακας 6.4: Αριθμός αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV ανά ασθενή.....	282
Πίνακας 6.5: Συχνότητες παρουσίας πολλαπλών αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων.....	284
Πίνακας 6.6: Τίτλοι αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV σε ασθενείς και υγιή δείγματα ελέγχου με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	287
Πίνακας 6.7: Συχνότητες περιπτώσεων με τουλάχιστον ένα (≥ 1) αντιγονοειδικό EBV αντίσωμα με τίτλο μεγαλύτερο από 100 arbitrary units (AU).....	289
Πίνακας 6.8: Συσχετίσεις ανάμεσα στους τίτλους των αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV αναμεταξύ στους 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc).....	290
Πίνακας 6.9: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση την παρουσία πνευμονικής ίνωσης.....	293
Πίνακας 6.10: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση την παρουσία πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης.....	295
Πίνακας 6.11: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση την παρουσία δακτυλικών ελκών.....	296

Πίνακας 6.12: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση την παρουσία αρθρίτιδας.	297
Πίνακας 6.13: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση την παρουσία ορογονίτιδας.	298
Πίνακας 6.14: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση την παρουσία τελαγγεικτασιών.	299
Πίνακας 6.15: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση την παρουσία ασβέστωσης.	300
Πίνακας 6.16: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση την παρουσία νεφρικής συμμετοχής.	301
Πίνακας 6.17: Συσχετίσεις ανάμεσα στους τίτλους των αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV με τους τίτλους των ειδικών για τη συστηματική σκλήρυνση αυτοαντισωμάτων στους 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση.	302
Πίνακας 6.18: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι του EBV.p100 με ανοσοαποτύπωση κατά Western.	306
Πίνακας 6.18: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου EBV.p100 σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση τα κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά τους.	307
Πίνακας 6.19: Καταχωρήσεις στη βάση δεδομένων αλληλουχιών πρωτεϊνών Uniprot όλων των πρωτεϊνών του EBV με μοριακό βάρος από 93 kiloDalton (kDa) έως 125 kDa.	314
Πίνακας 6.20: Αποτελέσματα σύγκρισης αλληλουχιών των πρωτεϊνών του EBV με μοριακό βάρος από 93 kiloDalton (kDa) έως 125 kDa με την αλληλουχία της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I (Scl-70) με BLAST.	315
Πίνακας 6.21: Ανοσοεπικρατείς επίτοποι ή αντιγονικές περιοχές της τοποϊσομεράσης I που αναγνωρίζονται από αντισώματα ή/και από T λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση.	327
Πίνακας 7.1: Συχνότητες εμφάνισης αντισωμάτων έναντι του H _p και των αντιγόνων VCA, EA και EBNA του EBV με ανοσοαποτύπωση κατά Western.	333
Πίνακας 7.2: Συχνότητες συνδυασμένης εμφάνισης αντισωμάτων έναντι του H _p και των αντιγόνων VCA του EBV με ανοσοαποτύπωση κατά Western.	334
Πίνακας 7.3: Συχνότητες συνδυασμένης εμφάνισης αντισωμάτων έναντι του H _p και των αντιγόνων EA του EBV με ανοσοαποτύπωση κατά Western.	335
Πίνακας 7.4: Συχνότητες συνδυασμένης εμφάνισης αντισωμάτων έναντι του H _p και του αντιγόνου EBNA του EBV με από ανοσοαποτύπωση κατά Western.	336
Πίνακας 7.5: Συχνότητες συνδυασμένης εμφάνισης αντισωμάτων έναντι του H _p και των αντιγόνων VCA, EA και EBNA του με από ανοσοαποτύπωση κατά Western.	337
Πίνακας 8.1: Συχνότητες αυτοαντισωμάτων έναντι αντιγόνων που σχετίζονται με την κατά πλάκας σκλήρυνση με έμμεσο ανοσοφθορισμό.	349

Πίνακας 8.2: Συχνότητες αυτοαντισωμάτων έναντι αντιγόνων που σχετίζονται με την κατά πλάκας σκλήρυνση, όπως αυτά ανιχνεύθηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό, σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση ταξινομημένους με βάση τη λήψη θεραπευτικής φαρμακευτικής αγωγής.....	351
Πίνακας 8.3: Συχνότητες αυτοαντισωμάτων έναντι αντιγόνων που σχετίζονται με την κατά πλάκας σκλήρυνση, όπως αυτά ανιχνεύθηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό, σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση ταξινομημένους με βάση τη θετικότητα για αντι-H _p , για αντι-VCA για αντι-EA για αντι-EBNA αντισώματα.....	354
Πίνακας 8.4: Συχνότητες αυτοαντισωμάτων έναντι αντιγόνων που σχετίζονται με την κατά πλάκας σκλήρυνση, όπως αυτά ανιχνεύθηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό, σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση ταξινομημένους με βάση τη θετικότητα για αντιγονοειδικά H _p και EBV αντισώματα.....	356

Συντομογραφίες

ALZ	Alzheimer's disease, νόσος Αλτσχάιμερ
AQP4	aquaporin 4, ακουαπορίνη 4
AU	arbitrary units
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
BCR	B cell receptor, υποδοχέας Β λεμφοκυττάρων
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bregs	B regulatory lymphocytes, Β ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα
CagA	cytotoxin-associated gene A
CD	cluster of differentiation, σύμπλεγμα διαφοροποίησης
CENP-A	centromeric protein A, κεντρομεριδιακή πρωτεΐνη Α
CENP-B	centromeric protein B, κεντρομεριδιακή πρωτεΐνη Β
COVID-19	Corona virus disease 2019, ασθένεια του ιού Corona 2019
CRP	C-reactive protein, C αντιδρώσα πρωτεΐνη
dcSSc	diffuse cutaneous systemic sclerosis, διάχυτη μορφή συστηματικής σκλήρυνσης
DMSO	dimethyl sulfoxide, διμεθυλοσουλφοξειδίο
EA	early antigens, πρώιμα αντιγόνα (του ιού Epstein-Barr)
EBV	Epstein-Barr virus, ιός Epstein-Barr
EBNA	Epstein-Barr virus nuclear antigen, πυρηνικό αντιγόνο του ιού Epstein-Barr
EDSS	expanded disability status scale, διευρυμένη κλίμακα κατάστασης αναπηρίας
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, ανοσοπροσροφητική δοκιμασία στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου
FBS	fetal bovine serum, εμβρυϊκός ορός βοδινού
FCS	fetal calf serum
g	γραμμάριο/γραμμάρια
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GWAS	genome wide association studies, μελέτες συσχέτισης ολόκληρου γονιδιώματος
HC	healthy control(s), υγιής μάρτυρας
HLA	human leukocyte antigens, σύστημα των ανθρώπινων λευκοκυτταρικών αντιγόνων
Hp	<i>Helicobacter Pylori</i>
Hsp	heat shock protein(s), πρωτεΐνη/πρωτεΐνες θερμικού σοκ
HTLV-1	human T-lymphotropic virus type 1, ανθρώπινος T-λεμφοτρόπος ιός τύπου 1
IFN-α	interferon-α, ιντερφερόνη άλφα
IFN-γ	interferon-γ, ιντερφερόνη γάμμα
Ig	Immunoglobulin
IgG	Immunoglobulin G
IL	interleukin, ιντερλευκίνη
JCV	John Cunningham virus, ιός John Cunningham
kDa	kilodalton
lcSSc	limited cutaneous systemic sclerosis, περιορισμένη μορφή συστηματικής σκλήρυνσης
M	molar
MAG	myelin-associated glycoprotein, γλυκοπρωτεΐνη που σχετίζεται με τη μυελίνη
MAP	<i>Mycobacterium avium paratuberculosis</i>

MBP	myelin basic protein, βασική πρωτεΐνη μυελίνης
MERS	middle east respiratory syndrome, αναπνευστικό σύνδρομο μέσης ανατολής
MHC	major histocompatibility complex, μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
ml	milliliter, χιλιοστόλιτρο
MOG	myelin oligodendrocyte protein, ολιγοδενδροκυτταρική γλυκοπρωτεΐνη της μυελίνης
MPO	myeloperoxidase, μυελοπεροξειδάση
MS	multiple sclerosis, κατά πλάκας σκλήρυνση
NAP	neutrophil activating protein
NBT	nitro-blue tetrazolium chloride
NK	natural killer cells, φυσικά φονικά κύτταρα
° C	βαθμοί Κελσίου
PBMC	peripheral blood mononuclear cells, μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος
PBS	phosphate buffer saline
PD	Parkinson's disease, νόσος Πάρκινσον
PFA	paraformaldehyde, παραφορμαλδεΐδη
PLP	proteolipid protein, πρωτεϊνολιπιδική πρωτεΐνη της μυελίνης
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PR3	proteinase 3, πρωτεϊνάση 3
RNApol	RNA polymerase, RNA πολυμεράση
rpm	rounds per minute, στροφές ανά λεπτό
RRMS	relapse-remitting multiple sclerosis, υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα κατά πλάκας σκλήρυνση
RT	room temperature, θερμοκρασία δωματίου
RU	relative unit(s), σχετική μονάδα/σχετικές μονάδες
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome Corona virus 2, ιός Corona του σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου τύπου 2
Scl70	scleroderma 70
SLE	systemic lupus erythematosus, συστηματικός ερυθηματώδης λύκος
SPMS	secondary progressive multiple sclerosis, δευτεροπαθώς προϊούσα κατά πλάκας σκλήρυνση
SSc	systemic sclerosis, συστηματική σκλήρυνση, σκληρόδερμα
TCR	T cell receptor, υποδοχέας T λεμφοκυττάρων
TGF-β	transforming growth factor beta, αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β
Th	T helper lymphocytes, T βοηθητικά λεμφοκύτταρα
Th1	T helper lymphocytes 1, T βοηθητικά λεμφοκύτταρα τύπου 1
Th17	T helper lymphocytes 17, T βοηθητικά λεμφοκύτταρα τύπου 17
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF-α	tumour necrosis factor α, παράγοντας νέκρωσης όγκων
U	unit(s)
VacA	vacuolating cytotoxin A
VCA	viral capsid antigen, αντιγόνο του καψιδίου του ιού Epstein-Barr
ΚΝΣ	κεντρικό νευρικό σύστημα
μg	microgram, μικρογραμμάριο
μl	microliter, μικρόλιτρο

1.1 Εισαγωγή στην αυτοανοσία και στα αυτοάνοσα νοσήματα

Η αυτοανοσία είναι μια πολύπλοκη διαταραχή του επίκτητου κλάδου του ανοσοποιητικού συστήματος που χαρακτηρίζεται από τη διάσπαση της ανοσολογικής ανοχής, την επαγωγή μιας μη επιτρεπτής ανοσολογικής αντίδρασης έναντι εαυτών μορίων και κυττάρων και την συνεπακόλουθη ιστική βλάβη ή λειτουργική ανεπάρκεια [1, 2]. Η διάκριση μεταξύ του εαυτού και του ξένου είναι μια θεμελιώδης ιδιότητα του ανοσοποιητικού συστήματος που επιτρέπει την άμυνα έναντι παραγόντων με δυνητική βλαπτική δράση, όπως εξωγενείς παθογόνοι μικροοργανισμοί ή ενδογενή καρκινικά κύτταρα. Εντούτοις, η διάκριση αυτή ενίοτε δεν είναι απόλυτη και το ανοσοποιητικό σύστημα στρέφεται εναντίον του οργανισμού που προστατεύει.

Η αυτοαντιδραστικότητα σε έναν οργανισμό μπορεί να κυμαίνεται σε διάφορα επίπεδα, χωρίς να οδηγεί απαραίτητα στην εμφάνιση νόσου. Χαμηλά επίπεδα αντιδραστικότητας έναντι αυτοαντιγόνων είναι ένα φυσιολογικό φαινόμενο και παίζει ρόλο την ωρίμανση των λεμφοκυττάρων, στην επιλογή του ρεπερτορίου τους, στην ανοσολογική ομοιόσταση και στην κάθαρση αυτοαντιγόνων σε νεκρωμένα ή αποπτωτικά κύτταρα, ενώ ενδιάμεσα επίπεδα αυτοαντιδραστικότητας εκφράζονται ως κυκλοφορούντα αυτοαντισώματα χαμηλής συγγένειας και μικρού μεγέθους λεμφοκυτταρικά ιστικά διηθήματα χωρίς εμφάνιση παθολογίας [3, 4]. Εντούτοις, η κλινική σημασία της χαμηλής και της ενδιάμεσης αυτοαντιδραστικότητας είναι αμφιλεγόμενη, καθώς φυσιολογικά αυτοαντισώματα ενδέχεται υπό συνθήκες ανοσολογικής απορρύθμισης, χημικής τροποποίησης του αυτοαντιγόνου-στόχου ή υπερβολικής παρουσίας του αυτοαντιγόνου-στόχου να εξελιχθούν σε παθολογικά αυτοαντισώματα, όπως έχει παρατηρηθεί σε περιπτώσεις ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα στους οποίους ανιχνεύονται αυτοαντισώματα αρκετά έτη πριν την έναρξη της κλινικής εικόνας [3, 5, 6]. Σε κάθε περίπτωση, η εμφάνιση ανοσομεσολαβούμενης

ιστικής βλάβης ή λειτουργικής ανεπάρκειας που οδηγεί σε παθολογία έχει κλινική σημασία και συνιστά παθολογική αυτοαντιδραστικότητα.

Το αποτέλεσμα της παθολογικής αυτοαντιδραστικότητας είναι η εμφάνιση των αυτοάνοσων νοσημάτων, μιας ομάδας 80 με 100 περίπου, κατά κανόνα χρόνιων νοσημάτων με μεγάλη κλινική ετερογένεια, πολυπαραγοντική αιτιολογία και πολύπλοκη παθογένεια [2]. Τα αυτοάνοσα νοσήματα αποτελούν μείζων παράγοντα νοσηρότητας λόγω της χρόνιας φύσης τους, της αναπηρίας που προκαλούν, του υψηλού κόστους διάγνωσης και θεραπείας και, κυρίως, της πολύ υψηλής επίπτωσης τους σε νεαρές ηλικίες που βρίσκονται στο ζενίθ της αναπαραγωγικής και της παραγωγικής τους ικανότητας [1]. Ο εκτιμώμενος επιπολασμός των αυτοάνοσων νοσημάτων στο γενικό πληθυσμό είναι 6.5-9.4% [7, 8], με την επίπτωση να αυξάνεται στις ανεπτυγμένες χώρες συνεχώς με την πάροδο των ετών [8-10].

Τα αυτοάνοσα νοσήματα μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες με βάση τον αριθμό των οργάνων που προσβάλλονται και τις κλινικές εκδηλώσεις, στα οργανοειδικά και στα συστηματικά. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν αυτοάνοσα νοσήματα με προσβολή ενός οργάνου ή ενός συστήματος, όπως η κατά πλάκας σκλήρυνση, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I, η θυρεοειδίτιδα Hashimoto, η νόσος του Grave, η πρωτοπαθής χολική χολαγγειίτιδα, η βαρεία μυασθένεια, η κοινή πέμφιγα, η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία και η ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα. Τα οργανοειδικά αυτοάνοσα νοσήματα χαρακτηρίζονται από την παρουσία αυτοαντιγόνων που εκφράζονται σε συγκεκριμένα όργανα και ιστούς. Στα συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα κατατάσσονται η συστηματική σκλήρυνση ή σκληρόδερμα, ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και το σύνδρομο Sjogren.

Όπως προαναφέρθηκε, τα αυτοάνοσα νοσήματα οφείλονται σε διαταραχές της επίκτητης ανοσίας οι οποίες οδηγούν σε αυτοαντιδραστικά αντισώματα και T

λεμφοκύτταρα. Αυτά αποτελούν τους μεσολαβητές της ιστικής βλάβης ή της λειτουργικής ανεπάρκειας με τη συμμετοχή της φυσικής ανοσίας. Τα αυτοάνοσα νοσήματα θα πρέπει να διαχωρίζονται από τα αυτοφλεγμονώδη νοσήματα, στα οποία η ανοσολογική διαταραχή αφορά τη φυσική ανοσία με απουσία αυτοαντισωμάτων και αυτοαντιδραστικών Τ λεμφοκυττάρων. Τα αυτοφλεγμονώδη νοσήματα, όπως ο οικογενής Μεσογειακός πυρετός και το περιοδικό σύνδρομο που σχετίζεται με τον υποδοχέα το παράγοντα νέκρωσης των όγκων, είναι σπάνιες, μονογονιδιακές διαταραχές των βασικών μηχανισμών φλεγμονής και εκδηλώνονται συνήθως με υποτροπιάζοντα πυρετό και προσβολή των αρθρώσεων, των ορογόνων υμένων, του δέρματος και των οφθαλμών [11, 12]. Τα αυτοφλεγμονώδη και τα αυτοάνοσα νοσήματα συνθέτουν το φάσμα των αυτοαντιδραστικών ανοσολογικών διαταραχών, με βάση τον κλάδο του ανοσοποιητικού συστήματος που διαταράσσεται. Ωστόσο, ο διαχωρισμός αυτός δεν είναι απόλυτος, λόγω της παρουσίας νοσημάτων με χαρακτηριστικά τόσο αυτοφλεγμονώδους, όσο και αυτοάνοσης διαταραχής, συμπεριλαμβανομένων της νόσου Αδαμαντιάδη-Behçet, της νεανικής ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της νόσου Crohn [11, 12].

1.2 Η διάκριση εαυτού-ξένου και η ανοσολογική ανοχή

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένας ομοιοστατικός μηχανισμός άμυνας του ανθρώπινου οργανισμού έναντι παραγόντων με δυνητική βλαπτική δράση, όπως εξωγενείς παθογόνοι μικροοργανισμοί ή ενδογενή καρκινικά κύτταρα. Η αναγνώριση των βλαπτικών παραγόντων από τα συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος βασίζεται στη διάκριση του εαυτού από το ξένο και στη συγκρότηση μίας φυσιολογικής κατάστασης που χαρακτηρίζεται από απουσία ανοσολογικής αντίδρασης έναντι εαυτών αντιγόνων/αυτοαντιγόνων και καλείται ανοσολογική ανοχή [13]. Ως αποτέλεσμα, το ανοσοποιητικό σύστημα επιτυγχάνει τόσο την άμυνα εναντίον

εισβολέων παθογόνων μικροοργανισμών, όσο και την προστασία του οργανισμού από δυννητικά αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα.

Η ανοσολογική ανοχή επιτυγχάνεται μέσω μηχανισμών που σκοπό έχουν την εξάλειψη, τον περιορισμό ή την απενεργοποίηση των κυττάρων της ειδικής ανοσίας που αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα, δηλαδή των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων [13, 14]. Οι μηχανισμοί της ανοσολογικής ανοχής λαμβάνουν χώρα σε διάφορα στάδια της λεμφοκυτταρικής ανάπτυξης, από τη ωρίμανση μέχρι την αλληλεπίδραση με το αντιγόνο-στόχο και την ενεργοποίηση. Η βιολογική διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα είτε στα πρωτογενή λεμφικά όργανα, δηλαδή το μυελό των οστών και το θύμο αδένα, και ονομάζεται κεντρική ανοσολογική ανοχή ή σε δευτερογενή λεμφικά όργανα και σε περιφερικούς ιστούς και ονομάζεται περιφερική ανοσολογική ανοχή [13, 14]. Ουσιαστικά, η κεντρική ανοχή προλαμβάνει την κυκλοφορία στην περιφέρεια όλων των λεμφοκυτταρικών κλώνων που αναγνωρίζουν ενδογενή αντιγόνα, ενώ η περιφερική ανοχή απενεργοποιεί τα λεμφοκύτταρα που διαφεύγουν της κεντρικής ανοχής.

1.2.1 Κεντρική ανοσολογική ανοχή

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η κεντρική ανοσολογική ανοχή λαμβάνει χώρα στο θύμο αδένα για τα T λεμφοκύτταρα και στο μυελό των οστών για τα B λεμφοκύτταρα [13, 14]. Τα ανώριμα T λεμφοκύτταρα υφίστανται στο θύμο αδένα δύο επιλεκτικές διαδικασίες με σκοπό την επιλογή όλων των T λεμφοκυτταρικών κλώνων που αναγνωρίζουν μόνο το σύμπλεγμα των ενδογενών αντιγόνων με μόρια του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC). Στο πρώτο στάδιο, γίνεται θετική επιλογή των ανώριμων T λεμφοκυττάρων που φέρουν υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων (T cell receptor, TCR) ικανό να συνδέεται με χαμηλή συγγένεια σύνδεσης με το σύμπλεγμα ενδογενές αντιγόνο-ενδογενές μόριο MHC, ενώ τα υπόλοιπα T λεμφοκύτταρα να πεθαίνουν μέσω απόπτωσης [13-16]. Στο δεύτερο στάδιο, γίνεται αρνητική επιλογή μέσω εξάλειψης όλων των ανώριμων T

λεμφοκυττάρων που φέρουν TCR με υψηλή συγγένεια για το σύμπλεγμα ενδογενές αντιγόνο-ενδογενές μόριο MHC. Μέσω της αρνητικής επιλογής, οι αυτοαντιδραστικοί κλώνοι εξαλείφονται από το λεμφοκυτταρικό ρεπερτόριο πριν προλάβουν να απελευθερωθούν στην περιφέρεια και προκαλέσουν αυτοάνοση βλάβη, εξασφαλίζοντας έτσι την ανοσολογική ανοχή [13-16]. Βεβαίως, η παρουσία των αυτοαντιγόνων στο θύμο αδένα και η αλληλεπίδραση του συμπλόκου τους με τα μόρια MHC με τους TCR με υψηλή συγγένεια αποτελούν απαραίτητες προϋποθέσεις για την κλωνική εξάλειψη. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι η αλληλεπίδραση ενός συμπλόκου αντιγόνου-MHC με ένα TCR ενός λεμφοκυττάρου εκτός του αναπτυσσόμενου θύμου αδένα δεν προκαλεί απόπτωση και εξάλειψη του κλώνου, όπως συμβαίνει στην αρνητική επιλογή, αλλά ενεργοποίηση και κλωνική επέκταση, όπως συμβαίνει κατά την ανοσολογική απόκριση έναντι ενός εξωγενούς παράγοντα. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει ότι η απάντηση του T λεμφοκυττάρου σε ένα εξωτερικό ερέθισμα είναι ανάλογη του σταδίου της ανάπτυξης του και αυτό παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη σωστή ανάπτυξη και λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

Από την άλλη πλευρά, η κεντρική ανοχή των B λεμφοκυττάρων συμβαίνει στο μυελό των οστών και περιλαμβάνει μηχανισμούς εξάλειψης, αλλά και αδρανοποίησης των αυτοαντιδραστικών B λεμφοκυτταρικών κλώνων [13, 17, 18]. Όπως και στην περίπτωση των T λεμφοκυττάρων, τα B λεμφοκύτταρα με υποδοχέα των B λεμφοκυττάρων (B cell receptor, BCR) υψηλής συγγένειας έναντι ενδογενών αντιγόνων στην επιφάνεια τους εξαλείφονται μέσω αρνητικής επιλογής πριν απομακρυνθούν από το μυελό των οστών. Τα αυτοαντιδραστικά B λεμφοκύτταρα μπορούν να μετατραπούν σε μη αυτοαντιδραστικά μέσω της επεξεργασίας των γονιδίων της ελαφριάς τους αλυσίδας και την αντικατάσταση της ελαφριάς αλυσίδας κ από τη λ, διαδικασία που έχει ως αποτέλεσμα να εκφράζουν μια διαφορετική μορφή αντισώματος που δεν αναγνωρίζει εαυτά μόρια [17]. Τέλος, αρκετά ωριμάζοντα

αυτοαντιδραστικά Β λεμφοκύτταρα αδρανοποιούνται στο μυελό των οστών μέσω αρνητικής ρύθμισης της έκφρασης του υποδοχέα του παράγοντα ενεργοποίησης των Β λεμφοκυττάρων [19]. Η απουσία του υποδοχέα αυτού μειώνει το χρόνο ημίσειας ζωής των Β λεμφοκυττάρων, τα οποία δεν προλαβαίνουν να εγκατασταθούν σε πρωτογενή βλαστικά κέντρα και να ασκήσουν την αυτοάνοση δράση τους.

1.2.2 Περιφερική ανοσολογική ανοχή

Στην περιφέρεια, αρκετοί μηχανισμοί λειτουργούν με σκοπό τον περιορισμό των αυτοάνοσων αντιδράσεων που ξεκινούν από Τ ή Β λεμφοκύτταρα που διέφυγαν της κεντρικής ανοσίας. Ο πιο απλός μηχανισμός αφορά τα αυτοαντιγόνα, κάποια από τα οποία δεν είναι ικανά να προκαλέσουν μια αυτοάνοση αντίδραση, λόγω χαμηλών επιπέδων έκφρασης, ειδικών χαρακτηριστικών όπως η τρισδιάστατη δομή και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ή ανατομικών περιορισμών [13, 20]. Ο μηχανισμός αυτός επιβεβαιώνεται από την αβλαβή παρουσία αυτοαντιγονοειδικών Τ λεμφοκυττάρων, τα οποία ούτε εξαλείφονται ούτε απενεργοποιούνται, όμως είναι λειτουργικά και ενεργοποιούνται όταν έρθουν σε επαφή με το αυτοαντιγόνο-στόχος υπό πειραματικές συνθήκες [21]. Όσον αφορά τους ανατομικούς περιορισμούς, η προεξέχουσα θεωρία επιτάσσει ότι κάποιοι ιστοί του σώματος δεν είναι προσβάσιμοι σε κύτταρα του αίματος, ούτε διαθέτουν λεμφικό σύστημα αποχέτευσης [22-24], αν και πρόσφατα δεδομένα την αμφισβητούν [25]. Τέτοιοι ιστοί θεωρούνται το κεντρικό νευρικό σύστημα, ο πρόσθιος θάλαμος του οφθαλμικού βολβού, οι όρχεις και ο πλακούντας με το έμβρυο κατά την εγκυμοσύνη [22-24]. Η απουσία του λεμφικού συστήματος είναι σημαντική για την απομόνωση από την κυτταρική ανοσία, καθώς τα Τ λεμφοκύτταρα πρώτα ενεργοποιούνται σε δευτερογενή λεμφικά όργανα και έπειτα μεταναστεύουν στα όργανα-στόχους, όπου επανενεργοποιούνται από τοπικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και επάγουν την ιστική φλεγμονή και βλάβη [26]. Υπό

φυσιολογικές συνθήκες, τα αυτοαντιγόνα που εκφράζονται στους ιστούς αυτούς είναι απομονωμένα από την κυκλοφορία και δεν επάγουν αυτοάνοσες αντιδράσεις.

Ένας δεύτερος μηχανισμός περιφερικής ανοχής επιτάσσει η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων να γίνεται μέσω δύο διεγερτικών σημάτων [13]. Το πρώτο διεγερτικό σήμα είναι αντιγονοειδικό και έρχεται από την πρόσδεση του TCR στο σύμπλοκο αντιγόνου-μόριο MHC. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται αντιγονοπαρουσίαση και πραγματοποιείται κυρίως από επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μέσω μορίων MHC τύπου II. Μεταξύ των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, τα δενδριτικά κύτταρα επιτελούν την παρουσίαση του αντιγόνου πιο αποτελεσματικά, επειδή εκφράζουν υψηλά επίπεδα μορίων MHC II σε σταθερή βάση και επειδή έχουν καλύτερη συνδιεγερτική ικανότητα. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα B λεμφοκύτταρα λειτουργούν ως επίσης ως επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά, ενώ περιορισμένες αντιγονοπαρουσιαστικές ιδιότητες έχουν όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα λόγω της έκφρασης μορίων MHC τύπου I, ιδιαίτερα τα καρκινικά κύτταρα, τα γερασμένα σωματικά κύτταρα, τα ετερόλογα κύτταρα μοσχεύματος και κύτταρα μολυσμένα με κάποιο ιό [27]. Το δεύτερο συνδιεγερτικό σήμα για τα T λεμφοκύτταρα είναι μη αντιγονοειδικό και έρχεται από την αλληλεπίδραση του CD28 στη μεμβράνη του T λεμφοκυττάρου και μελών της οικογένειας B7 στη μεμβράνη των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, ιδιαίτερα του CD80 και του CD86, και την ιντερλευκίνη (IL)-2 [13, 28]. Η έκφραση των δύο αυτών συνδιεγερτικών μορίων είναι αυξημένη μόνο σε ενεργοποιημένα επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, προσθέτοντας ένα ακόμα στάδιο ελέγχου της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων. Συνδιεγερτικά σήματα για τα B λεμφοκύτταρα προέρχονται από τα το CD28 και τον προσδέτη του CD40 στη μεμβράνη των T βοηθητικών λεμφοκυττάρων και τις κυτταροκίνες IL-4, IL-5 και IL-6. Ωστόσο, επί απουσίας του συνδιεγερτικού σήματος, η αλληλεπίδραση του TCR με το σύμπλοκο αντιγόνο-MHC ή του υποδοχέα των B

λεμφοκυττάρων με το αντιγόνο-στόχος καταλήγει σε κλωνική ανέργεια, δηλαδή μια κατάσταση μη απόκρισης και ανικανότητας πολλαπλασιασμού, μέσω αρνητικής ρύθμισης της έκφρασης των υποδοχέων τους στην επιφάνεια τους [13, 28-30].

Η περιφερική ανοχή διατηρείται και από την ανασταλτική δράση εξειδικευμένων ανοσορυθμιστικών λεμφοκυττάρων, ιδιαίτερα των CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων και των IL-10 παραγωγών B ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων [31, 32]. Τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα αποτελούν έναν διακριτό υποπληθυσμό των αβ T λεμφοκυττάρων που διαφοροποιείται στο θύμο αδένα ή στην περιφέρεια από CD4⁺ κύτταρα έπειτα από έκθεση στον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού β (transforming growth factor beta, TGF-β) και χαρακτηρίζεται από την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FOXP3 [32]. Η ενεργοποίησή τους γίνεται ταυτόχρονα με τα υπόλοιπα T λεμφοκύτταρα και εξαρτάται από τον TCR, όμως η ανοσοκατασταλτική τους δράση δεν είναι αντιγονοειδική, καθώς καταστέλλουν κάθε T λεμφοκύτταρο σε κοντινή απόσταση [32, 33]. Τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα αναστέλλουν την παρουσίαση του αντιγόνου από τα δενδριτικά κύτταρα και την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων, ανταγωνίζοντας τη δράση της IL-2 και παράγοντας τα ανοσοκατασταλτικά μόρια TGF-β, IL-10 και IL-35 [32, 34, 35]. Τα B ρυθμιστικά κύτταρα έχουν ανακαλυφθεί προσφάτως και, αν και αποτελούν έναν μικρό B λεμφοκυτταρικό πληθυσμό, ασκούν ισχυρή ανοσοκατασταλτική επίδραση σε T βοηθητικά λεμφοκύτταρα τύπου 1 (T helper lymphocytes 1, Th1) και T βοηθητικά λεμφοκύτταρα τύπου 17 (T helper lymphocytes 1, Th17), σε μακροφάγα και σε δενδριτικά κύτταρα μέσω της καταστολής του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumour necrosis factor α, TNF-α) [36, 37], καθώς επίσης επάγουν την παραγωγή T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων [38].

Εκτός από τους προαναφερθέντες κύριους μηχανισμούς κεντρικής και περιφερικής ανοσολογικής ανοχής, το ανοσοποιητικό σύστημα διαθέτει επιπλέον μηχανισμούς

απενεργοποίησης ή εξάλειψης των λεμφοκυττάρων μετά την ενεργοποίηση και την κλωνική επέκτασή τους, όπως η αυξορρύθμιση των ανασταλτικών υποδοχέων CTLA-4 και PD-1 στην επιφάνεια των Τ λεμφοκυττάρων και η έκφραση των προ-αποπτωτικών υποδοχέων Fas [39]. Τέλος, αξιοσημείωτη είναι η συμβολή της έμφυτης ανοσίας στο σχηματισμό και στη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής, μέσω της έκφρασης των υποδοχέων αναγνώρισης προτύπου που παίζουν ρόλο στη διάκριση μεταξύ εαυτού και ξένου [40], της επαγωγής ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων [41] και της αποτελεσματικής απομάκρυνσης των υπολειμμάτων αποπτωτικών και νεκρωμένων κυττάρων [42].

1.3 Αιτιολογικοί παράγοντες διάσπασης της ανοσολογικής ανοχής και επαγωγής της αυτοανοσίας

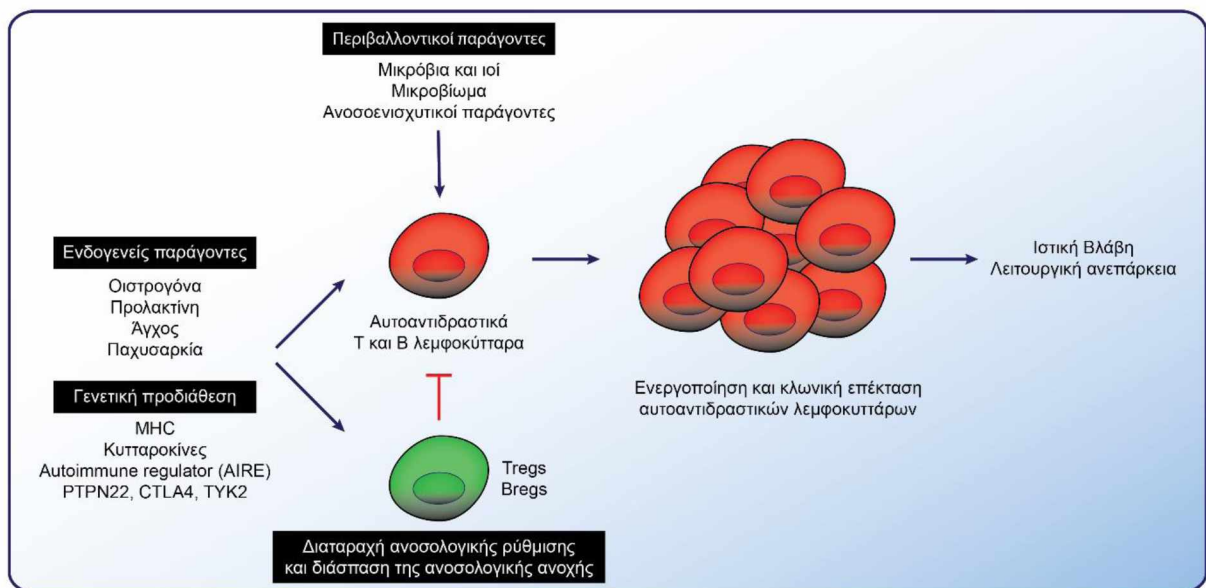
Η εύρυθμη λειτουργία των μηχανισμών της κεντρικής και της περιφερικής ανοσολογικής ανοχής προστατεύει τον οργανισμό από αυτοάνοσες αντιδράσεις. Εντούτοις, οι μηχανισμοί αυτοί δεν είναι πάντα αποτελεσματικοί και η ανεπάρκεια τους μπορεί να οδηγήσει σε μη φυσιολογικές αυτοάνοσες αντιδράσεις και σε αυτοάνοσα νοσήματα [1, 2, 43]. Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες εμφανίζεται η κατάρρευση της ανοσολογικής ανοχής αποτελούν και τα αίτια της παθογένεσης των αυτοάνοσων νοσημάτων.

Τα αυτοάνοσα νοσήματα είναι νοσήματα πολυπαραγοντικής φύσης, δηλαδή προκύπτουν από την αλληλεπίδραση μεταξύ πολλαπλών ενδογενών και εξωγενών παραγόντων (Εικόνα 1.1). Στους ενδογενείς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται το γενετικό υπόβαθρο, το φύλλο και η επίδραση των ορμονών του φύλλου, το άγχος και η παχυσαρκία, ενώ στους εξωγενείς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες συγκαταλέγονται μικροβιακοί και ιικοί παράγοντες, η μικροβιακή χλωρίδα, τα εμβόλια, ανοσοεπιταχυντικές ουσίες όπως η σιλικόνη, τοξικοί παράγοντες, η ρύπανση του περιβάλλοντος, το κάπνισμα και η δίαιτα [1, 2, 43-56].

Η αλληλεπίδραση των παραπάνω παραγόντων είναι συνεχής, με τον ένα να επηρεάζει τον άλλο, όπως για παράδειγμα η σύνθεση του μικροβιώματος επηρεάζεται από τα γονίδια, από ορμόνες, από λοιμώξεις και από τη διαίτα, ενώ η παχυσαρκία έχει άμεση σχέση με το γενετικό υπόβαθρο, τη μικροβιακή χλωρίδα και τη διαίτα. Συνεπώς, είναι αρκετά δύσκολο να ξεκαθαριστεί η επιρροή του κάθε πιθανού αιτιακού παράγοντα ξεχωριστά στην επαγωγή της αυτοανοσίας. Η επίδραση του κάθε παράγοντα μπορεί να είναι αθροιστική και να εξαρτάται από άλλους παράγοντες ή ανεξάρτητη από την επίδραση άλλων παραγόντων. Επίσης, ο ρόλος των παραγόντων αυτών στην παθογένεια των περισσότερων αυτοάνοσων νοσημάτων είναι δύσκολο να προσδιοριστεί, επειδή η εμφάνιση των συμπτωμάτων έπεται έως και αρκετά χρόνια της έναρξης της αυτοαντιδραστικότητας [57].

Μια απλή υπόθεση ορίζει ότι ένα άτομο ενδέχεται να έχει προδιάθεση για να αναπτύξει κάποια αυτοάνοση διαταραχή, η οποία δεν εκφράζεται μέχρι να πυροδοτηθεί από κάποιον παράγοντα. Η προδιάθεση αφορά το γενετικό υπόβαθρο με τη μορφή πολυμορφισμών σε γονίδια που είτε αυξάνουν ή μειώνουν την επιδεκτικότητα για εμφάνιση αυτοανοσίας, ενώ η έκθεση σε μια ποικιλία περιβαλλοντικών παραγόντων μπορεί να την πυροδοτήσει, να την επιταχύνει, να την επιδεινώσει ή να προστατεύσει από την εμφάνιση της.

Εικόνα 1.1: Η γενετική προδιάθεση σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς και ενδογενείς παράγοντες επάγουν την αυτοανοσία.



Γενετικοί πολυμορφισμοί σε γονίδια σημαντικά για τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (*major histocompatibility complex, MHC*), γονιδίων κυτταροκινών και των υποδοχέων τους και γονιδίων πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια, μπορούν να μειώσουν τον ουδό ενεργοποίησης αυτοαντιδραστικών T και B λεμφοκυττάρων. Οι ενδογενείς παράγοντες, όπως οι ορμόνες του φύλου, το άγχος και η παχυσαρκία, συμβάλλουν επίσης στη διαταραχή της ανοσολογικής ρύθμισης και στη διάσπαση της ανοσολογικής ανοχής, όπως η ελαττωματική λειτουργία των ρυθμιστικών T και B λεμφοκυττάρων. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως τα μικρόβια, οι ιοί, η μικροβιακή χλωρίδα και διάφοροι ανοσοενισχυτικοί παράγοντες, πυροδοτούν την αυτοανοσία ενεργοποιώντας τα αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα. Η μη επιθυμητή ενεργοποίηση και κλωνική επέκταση των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων θα οδηγήσει σε ιστική βλάβη ή λειτουργική ανεπάρκεια, και τελικά στην εμφάνιση των αυτοάνοσων νοσημάτων.

1.3.1 Γενετική προδιάθεση

Η συμβολή της γενετικής προδιάθεσης στην εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων θεωρείται αναγκαία και για πολλά αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα και η ψωρίαση, το οικογενειακό ιστορικό είναι σημαντικός προδιαθεσικός παράγοντας [58]. Αρκετοί εκατοντάδες γενετικοί τόποι και γενετικοί πολυμορφισμοί έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων [45, 46]. Η αλληλούχιση του ανθρωπίνου γονιδιώματος, η έλευση νέων τεχνικών αλληλούχισης του γονιδιώματος και ανάλυσης των πολυμορφισμών και μελέτες συσχέτισης ολόκληρου γονιδιώματος (genome wide association studies, GWAS) έχουν συμβάλει σημαντικά στην προσπάθεια αυτή [59, 60].

Όλα τα γονίδια που έχουν ενοχοποιηθεί παίζουν κάποιο ρόλο στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και της ανοσολογικής ανοχής. Οι πολυμορφισμοί στο σύμπλεγμα γονιδίων MHC είναι μακράν αυτοί με τη μεγαλύτερη συσχέτιση με τα αυτοάνοσα νοσήματα [43, 61]. Η κύρια λειτουργία των γονιδίων αυτών είναι η διακυτταρική αναγνώριση και παρουσίαση αντιγόνων στα T λεμφοκύτταρα με τη μορφή πεπτιδίων, μέσω μιας σύνθετης ενδοκυττάριας διαδικασίας που περιλαμβάνει την επεξεργασία των αντιγόνων και τη σύνδεση τους με τα μόρια MHC. Στον άνθρωπο, το σύμπλεγμα MHC είναι ένας γενετικός τόπος στο έκτο χρωμόσωμα μήκους 3.6 εκατομμυρίων βάσεων και αποτελεί την πιο πολυμορφική περιοχή του γονιδιώματος [62]. Αναφέρεται και ως σύστημα των ανθρώπινων λευκοκυτταρικών αντιγόνων (human leukocyte antigens, HLA) και τα γονίδια που περιέχει ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: τον τύπο I, τον τύπο II και τον τύπο III [63]. Στον τύπο I ανήκουν τα γονίδια HLA-A, HLA-B και HLA-C και, όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν εκφράζονται σε όλα τα εμπύρηννα κύτταρα και είναι υπεύθυνες για την παρουσίαση ενδογενών αντιγόνων και αντιγόνων που προέρχονται από ενδοκυττάρια μολυσματικούς παράγοντες. Στον τύπο II ανήκουν τα γονίδια HLA-DR,

HLA-DP και HLA-DQ, εκφράζονται μονάχα σε επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και κωδικοποιούν πρωτεΐνες που παρουσιάζουν στα λεμφοκύτταρα αντιγόνα εξωγενών μολυσματικών παραγόντων. Στον τύπο III ανήκουν ανοσορυθμιστικά γονίδια, όπως το γονίδιο του TNF-α, γονίδια συστατικών του συμπληρώματος και γονίδια πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins, Hsp) [63]. Για τη σωστή αναγνώριση και παρουσίαση της τεράστιας ποικιλίας των παθογόνων μικροοργανισμών, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ποικιλομορφίας στα γονίδια τύπου I και II, με τη μορφή πολλαπλών εναλλακτικών μορφών κάθε γονιδίου ή αλληλόμορφων. Κάθε αλληλόμορφο περιέχει σημειακές μεταλλάξεις που προκαλούν μικρές αλλαγές στην περιοχή αλληλεπίδρασης του μορίου MHC με το αντιγόνο, επιτρέποντας την ικανότητα αναγνώρισης και δέσμευσης πολλών διαφορετικών αντιγόνων, χωρίς να μεταβάλλεται η συνολική δομή και λειτουργία του μορίου MHC [63]. Συνολικά, υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου 10.700 αλληλόμορφα των μορίων τύπου I και περίπου 3.700 αλληλόμορφα των μορίων τύπου II [64].

Όσον αφορά τη συσχέτιση των γονιδίων αυτών με την εμφάνιση αυτοανοσίας, συγκεκριμένα αλλήλια των γονιδίων αυτών, όπως το HLA-DRB1, το HLA-DR3 και το HLA-DQ2, έχουν συσχετιστεί με πολλά αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I και ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος [61], υποστηρίζοντας έτσι το σημαντικό ρόλο που παίζει η αντιγονοπαρουσίαση στην ανοσολογική ανοχή. Το αλληλόμορφο HLA-DRB1*04:01 του γονιδίου HLA-DRB1 είναι παράγοντας κινδύνου για το διαβήτη τύπου I και για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, το αλληλόμορφο HLA-DRB1*03:01 για το συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, για το διαβήτη τύπου I και για το σύνδρομο Sjogren, και το αλληλόμορφο HLA-DRB1*04:05 για το διαβήτη τύπου I, για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και για την αυτοάνοση ηπατίτιδα [61, 65]. Αν και ο ακριβής μηχανισμός συμμετοχής των αλληλόμορφων αυτών στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων δεν έχει διαλευκανθεί, θεωρείται ότι τα T

λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν κάποιο εξωγενές αντιγόνο παρουσιάζονται από το αλληλόμορφο αλληλίο αναγνωρίζει επίσης και κάποιοι ενδογενές αντιγόνο που ομοιάζει με το εξωγενές αντιγόνο που παρουσιάζεται από το συγκεκριμένο αλληλόμορφο αλληλίο, διασπώντας έτσι την ανοσολογική ανοχή μέσω του μηχανισμού της μοριακής μίμησης [66].

Άλλα γονίδια που σχετίζονται ισχυρά με πολλά αυτοάνοσα νοσήματα αφορούν την κυτταρική σηματοδότηση σε Β και Τ λεμφοκύτταρα, όπως το PTPN22, το CTLA4, το STAT4 και το TYK2 [2, 67], αλλά και γονιδίων κυτταροκινών και των υποδοχέων τους, όπως το γονίδιο του υποδοχέα της IL-23 [68]. Η ύπαρξη γενετικών πολυμορφισμών κοινών σε αρκετά αυτοάνοσα νοσήματα υποδηλώνει κοινούς παθογενετικούς μηχανισμούς, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τους πολυμορφισμούς στο γονίδιο του υποδοχέα PTPN22 που συνδέονται με το σακχαρώδη διαβήτη τύπου Ι, το συστηματικό ερυθματώδη λύκο, τη συστηματική σκλήρυνση, τη βαρεία μυασθένεια, τη νόσο του Grave και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα [67].

Σχεδόν όλοι οι γενετικοί πολυμορφισμοί που έχουν μελετηθεί αυξάνουν ελάχιστα τον κίνδυνο εμφάνισης αυτοανοσίας, όμως η παρουσία πολλαπλών πολυμορφισμών φαίνεται ότι έχει συνεργιστική επίδραση στην αύξηση του κινδύνου [69]. Αυτό ισχύει για τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα, τα οποία θεωρούνται πως έχουν πολυγονιδιακή αιτιολογία. Έτσι, αν και υπάρχουν αρκετοί πολυμορφισμοί σε γονίδια που αυξάνουν την προδιάθεση αυτοανοσίας, ο συνδυασμός μερικών μονάχα από αυτούς θεωρείται επαρκής για την ανάπτυξη της. Ωστόσο, δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί οι συνδυασμοί των πολυμορφισμών που αυξάνουν την προδιάθεση. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχουν παραδείγματα μονογονιδιακών αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως το σύνδρομο αυτοάνοσης πολυενδοκρινοπάθειας και το σύνδρομο φυλοσύνδετης ανοσοανεπάρκειας, πολυενδοκρινοπάθειας και εντεροπάθειας, τα οποία οφείλονται σε μεταλλάξεις των γονιδίων AIRE και FOXP3, αντίστοιχα [70, 71].

1.3.2 Φύλο και επίδραση των ορμονών του φύλου

Τα αυτοάνοσα νοσήματα έχουν αξιοσημείωτη τάση να εμφανίζονται πιο συχνά στο γυναικείο φύλο [47, 72]. Ανάμεσα στα αυτοάνοσα νοσήματα, η συχνότητα εμφάνισης διαφέρει και κυμαίνεται στο 80-95% στην αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, στο συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, στο σύνδρομο Sjogren και στο αντι-φωσφολιπιδικό σύνδρομο, στο 60-75% στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, στη συστηματική σκλήρυνση, στη βαρεία μυασθένεια και στην κατά πλάκας σκλήρυνση, είναι συγκρίσιμη ανάμεσα στα δύο φύλα στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου I και στην αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα, ενώ σε ελάχιστα αυτοάνοσα νοσήματα υπάρχει σαφής επικράτηση του αρσενικού φύλου, όπως η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα και η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα [47, 72-74].

Η επίδραση της προλακτίνης και των οιστρογόνων έχει ενοχοποιηθεί για τις παρατηρούμενες διαφορές τόσο στη συχνότητα όσο και στη βαρύτητα των αυτοάνοσων νοσημάτων [75]. Οι ορμόνες αυτές λειτουργούν και ως κυτταροκίνες, ρυθμίζοντας την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων [48]. Η παρατήρηση ότι οι διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης των αυτοάνοσων νοσημάτων ανάμεσα στα δύο φύλα εμφανίζονται μετά την εφηβεία συνηγορούν υπέρ της επίδρασης των ορμονών αυτών. Η υπερπρολακτιναιμία εμφανίζεται σε αρκετούς ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, αντι-φωσφολιπιδικό σύνδρομο, ρευματοειδή αρθρίτιδα, συστηματική σκλήρυνση, κατά πλάκας σκλήρυνση και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα [48]. Η προλακτίνη φαίνεται ότι έχει έντονη προφλεγμονώδη δράση μέσω της επαγωγής της παραγωγής της IL-6, της IL-2 και της ιντερφερόνης γάμμα (interferon- γ , IFN- γ), της αύξησης της παραγωγής αντισωμάτων, της ενεργοποίησης επαγγελματικών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και της επαγωγής της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων CD80, CD86 και CD40 [76-78]. Η ικανότητα της να επιδρά στη διαδικασία ωρίμανσης των B

λεμφοκυττάρων και στην αρνητική επιλογή πιθανώς να παίζει πιο σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της αυτοανοσίας, καθώς εμποδίζει την απόπτωση, επιτρέπει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό αυτοαντιδραστικών Β λεμφοκυττάρων και μειώνει τον ουδό ενεργοποίησης τους [79, 80]. Ομοίως, τα οιστρογόνα φαίνεται ότι επηρεάζουν επίσης τους μηχανισμούς ανοσολογικής ανοχής των Β και των Τ λεμφοκυττάρων, μέσω μείωσης της έκφρασης του ανοσορρυθμιστικού γονιδίου AIRE [81].

Σημαντική είναι επίσης η αλληλεπίδραση των ορμονών αυτών με τη μικροβιακή χλωρίδα [82], το οποίο, όπως θα παρουσιαστεί σε επόμενη ενότητα, έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αυτοανοσίας. Οι διαφορές στη σύνθεση του μικροβιώματος ανάμεσα στα δύο φύλα θα μπορούσαν να εξηγήσουν εν μέρει την προδιάθεση που εμφανίζουν οι γυναίκες για να αναπτύξουν αυτοανοσία [82].

1.3.3 Άγχος

Το άγχος είναι η σωματική και η ψυχολογική αντίδραση του οργανισμού ενάντια σε κάποιον απειλητικό και επικίνδυνο, εξωτερικό ή εσωτερικό, παράγοντα [83]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, βοηθάει στην προσαρμογή και στην επιβίωση του οργανισμού. Όταν όμως εκδηλώνεται σε υπερβολικό βαθμό, μειώνει τη λειτουργικότητα και την ικανότητα προσαρμογής, οπότε και γίνεται παθολογικό άγχος. Επίσης, το άγχος θεωρείται ότι συμμετέχει στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων σε άτομα με γενετική προδιάθεση [49]. Η σωματική αντίδραση του άγχους εκδηλώνεται με την ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και την έκκριση κατεχολαμινών και γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια. Τα μόρια αυτά έχουν γνωστές ανοσορρυθμιστικές δράσεις, ελέγχοντας τόσο την έμφυτη, όσο και την επίκτητη ανοσία. Μία τέτοια δράση αφορά τη ρύθμιση των βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων, μέσω της αύξησης ή της μείωσης των κυταροκινών IL-4, IL-12 και IL-10 [84, 85]. Τα αυξημένο άγχος συνδέεται με την έναρξη και την επιδείνωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου, της πολλαπλής

σκλήρυνσης, της νόσου του Grave και των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου [49]. Στην ψωρίαση, το άγχος εικάζεται ότι καθυστερεί την επούλωση των ψωριασικών πλακών κατά τη θεραπεία [86]. Τέλος, η ψυχολογική θεραπεία και η γνωσιακή-συμπεριφορική θεραπεία με σκοπό την ελάττωση των επιπέδων του άγχους μπορεί να έχουν θετική επίδραση στη θεραπεία αρκετών αυτοάνοσων νοσημάτων [49].

1.3.4 Παχυσαρκία

Αρκετές ερευνητικές εργασίες έχουν μελετήσει το ρόλο της παχυσαρκίας στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων [50, 87]. Ως παχυσαρκία ορίζεται η νόσος με δείκτη μάζας σώματος μεγαλύτερο ή ίσο με 30 kg/m^2 , κατάσταση που οφείλεται στη συσσώρευση λιπώδους ιστού. Ο επιπολασμός της νόσου είναι τρομακτικά μεγάλος στον παγκόσμιο πληθυσμό, καθώς το 12.5% περίπου είναι παχύσαρκο, ενώ το 39% είναι υπέρβαρο με δείκτη μάζας σώματος 25-30 kg/m^2 [88]. Τα παχύσαρκα άτομα βρίσκονται σε μια χρόνια, υποκλινική φλεγμονώδη κατάσταση που οδηγεί στην εμφάνιση σοβαρών μεταβολικών συνδρόμων [89]. Η φλεγμονώδης κατάσταση αυτή διαμεσολαβείται από την απελευθέρωση ορμονών από το λιπώδη ιστό που έχουν ανοσορρυθμιστικές δράσεις, τις λιποκυτταροκίνες, ανάμεσα στις οποίες είναι η λιπονεκτίνη, η λεπτίνη, η βισφατίνη και η ρεζιστίνη [89]. Η πρώτη έχει αντιφλεγμονώδεις δράσεις και είναι ελαττωμένη σε παχύσαρκους, ενώ οι υπόλοιπες τρεις έχουν προ-φλεγμονώδεις δράσεις και είναι αυξημένες σε παχύσαρκους. Οι ανοσορρυθμιστικές τους δράσεις είναι ποικίλες, επηρεάζοντας σχεδόν κάθε πτυχή της έμφυτης και της επίκτητης ανοσίας. Μέχρι σήμερα έχει μελετηθεί η συμμετοχή τους στην παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της κατά πλάκας σκλήρυνσης, της ψωρίασης, της ψωριασικής αρθρίτιδας, του σακχαρώδη διαβήτη τύπου I, της αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας και των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου [90-96]. Επίσης, η παχυσαρκία εμφανίζεται να επιδεινώνει την κλινική πορεία των παραπάνω

αυτοάνοσων νοσημάτων, καθώς επίσης ελαττώνει τη θεραπευτική απάντηση σε κάποια από αυτά [91-94, 96].

1.3.5 Μικρόβια και ιοί

Η έκθεση σε μικροβιακούς και ιικούς παράγοντες αποτελεί τον πιο καλά μελετημένο περιβαλλοντικό παράγοντα στην αυτοανοσία και αυτόν με την πιο ισχυρή επίδραση [1, 2, 97]. Φυσιολογικά, οι μικροοργανισμοί επάγουν μια ισχυρή ανοσολογική απόκριση, σκοπός της οποίας είναι η εξουδετέρωση του παράγοντα αυτού και η αποφυγή λοίμωξης. Εντούτοις, η μόλυνση με έναν μικροοργανισμό μπορεί να πυροδοτήσει μια μη φυσιολογική αυτοάνοση αντίδραση, η οποία μπορεί να αποτελέσει την απαρχή ενός αυτοάνοσου νοσήματος.

Οι κυριότεροι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα μικρόβια και οι ιοί μπορούν να προκαλέσουν ένα αυτοάνοσο νόσημα είναι οι εξής: η μοριακή μίμηση (molecular mimicry) και η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (cross-reactivity), η ενεργοποίηση παρακείμενων κυττάρων (bystander activation) και η εξάπλωση επιτόπου/επιτόπων (epitope spreading) [2, 43, 98]. Κάθε μηχανισμός αναλύεται λεπτομερώς στην επόμενη ενότητα, μαζί με τους υπόλοιπους μηχανισμούς διάσπασης της ανοσολογικής ανοχής και επαγωγής της αυτοανοσίας.

Η αναγνώριση των μικροβίων και των ιών που εμπλέκονται στην αυτοανοσία έχει βασιστεί κυρίως σε επιδημιολογικές μελέτες και σε μελέτες με πειραματόζωα. Παρά τις ισχυρές ενδείξεις που προκύπτουν από τις μελέτες αυτές, η απόδειξη της αιτιοπαθογενετικής σχέσης των μολυσματικών παραγόντων με τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα στον άνθρωπο είναι ιδιαίτερα δυσεπίτευκτη. Ο λόγος για τη δυσκολία αυτή είναι απλός: η έκθεση στον παράγοντα, η ανοσολογική απάντηση και η εμφάνιση αυτοαντιδραστικότητας ως αυτοαντισώματα ή αυτοαντιδραστικά T λεμφοκύτταρα λαμβάνουν χώρα αρκετά χρόνια πριν από την κλινική εκδήλωση των αυτοάνοσων νοσημάτων [97]. Επίσης, πλέον έχει γίνει κατανοητό ότι για τα

περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα δεν μπορεί να εφαρμοστεί ο κανόνας «ένας παράγοντας-ένα νόσημα», όπως ορίζουν τα αναθεωρημένα κριτήρια του Koch για τα αυτοάνοσα νοσήματα, αλλά φαίνεται ότι αρκετοί μικροβιακοί και ιικοί παράγοντες συμμετέχουν στην επαγωγή και στην εξέλιξη κάθε αυτοάνοσου νοσήματος [99]. Έτσι, φαίνεται ότι κάποιοι μικροοργανισμοί συνδέονται με την ανάπτυξη περισσότερων του ενός αυτοάνοσων νοσημάτων, ενώ κάποια αυτοάνοσα νοσήματα προκαλούνται από περισσότερων του ενός μικροοργανισμών.

Ένα χαρακτηριστικό και ιδιαίτερα μελετημένο παράδειγμα αυτοάνοσου νοσήματος που επάγεται από μικρόβιο είναι ο ρευματικός πυρετός [100]. Το νόσημα αυτό είναι μια επιπλοκή της λοίμωξης από τον Gram-θετικό κόκκο *Streptococcus pyogenes* της ομάδα A και χαρακτηρίζεται από προσβολή της καρδιάς, των αρθρώσεων, των αγγείων και των υποδόριων ιστών. Στην παθογένεια του ρευματικού πυρετού εμπλέκεται η μοριακή μίμηση και η ανοσολογική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Συγκεκριμένα, αντισώματα και T λεμφοκύτταρα έναντι της μικροβιακής πρωτεΐνης M της τάξης I ή του μικροβιακού υδατανθρακικού αντιγόνου N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη αντιδρούν και με πρωτεΐνες του ανθρώπινου καρδιακού ιστού, την καρδιακή μυοσίνη, την τροπομυοσίνη και τη λαμινίνη. Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα οφείλεται σε δομικές ομοιότητες ανάμεσα στα μικροβιακά και στα ανθρώπινα αντιγόνα. Το αποτέλεσμα είναι μία μη επιθυμητή, στοχευμένη ανοσολογική αντίδραση έναντι του καρδιακού ιστού και η εκδήλωση παν-καρδίτιδας [100].

Πολλά ακόμα παραδείγματα έχουν αναφερθεί: το σύνδρομο Guillain-Barré, μία οξεία παραλυτική, απομυελινωτική νευροπάθεια αυτοάνοσης αρχής, εμφανίζεται μετά από λοιμώξεις από το *Campylobacter jejuni*, το μυκόπλασμα της πνευμονίας, τον ιό Epstein-Barr (EBV) και άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς [101]. Στη ρευματοειδή αρθρίτιδα σημαντική θεωρείται η συμμετοχή του *Porphyromonas gingivalis*, ενός Gram-αρνητικό βακτηριδίου που προκαλεί περιοδοντίτιδα, λόγω της ικανότητας του να

κιτρολινοποιεί κατάλοιπα αμινοξέων [97]. Η έκθεση στην *Escherichia coli*, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος, φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των αντι-μιτοχονδριακών αυτοαντισωμάτων στην πρωτοπαθή χολική χολαγγειίτιδα, μέσω του μηχανισμού της μοριακής μίμησης ανάμεσα σε αντιγόνα του κολοβακτηριδίου και στην πυροσταφυλική αφυδρογονάση των μιτοχονδρίων και της ανοσολογικής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας [102]. Η ανοσολογική απόκριση έναντι του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού έχει συνδεθεί με την παθογένεια της συστηματικής σκλήρυνσης, καθώς ορολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα αντισώματα έναντι αντιγόνων του κυτταρομεγαλοϊού είναι πιο συχνά και εμφανίζονται σε μεγαλύτερους τίτλους στους ασθενείς σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [103], ενώ επίσης έχει αναφερθεί ότι η χυμική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ανάμεσα στην ιική πρωτεΐνη UL-94 και στην ενδογενή πρωτεΐνη NAG-2 της επιφάνειας ενδοθηλιακών κυττάρων και ινοβλαστών προκαλεί απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και ενεργοποίηση των ινοβλαστών προς απόκτηση προ-ινωτικού φαινοτύπου [104-106]. Τέλος, αρκετοί ιοί έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη του σακχαρώδη διαβήτη τύπου I, συμπεριλαμβανομένων του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού, εντεροϊών και ροταϊών [107-110], και της κατά πλάκας σκλήρυνσης, συμπεριλαμβανομένων του EBV, του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού, του ιού του έρπητα ζωστήρα, του ανθρώπινου ερπητοϊού τύπου 6, του ιού της γρίπης και του ιού της ιλαράς [111].

Κλείνοντας, αξίζει να σημειωθεί ότι οι μολυσματικοί παράγοντες μπορεί να έχουν και προστατευτικό ρόλο έναντι των αυτοάνοσων νοσημάτων. Σύμφωνα με μία υπόθεση, την υπόθεση της υγιεινής, η μείωση της έκθεσης σε μικρόβια και ιούς σε χώρες του δυτικού κόσμου είναι η απαρχή της αυξημένης επίπτωσης αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I και η κατά πλάκας σκλήρυνση, και των αλλεργιών στις χώρες αυτές [112]. Ιδιαίτερα κατά την παιδική ηλικία, οπότε και το

ανοσοποιητικό σύστημα αναπτύσσεται, η μείωση της έκθεσης εικάζεται ότι δεν επιτρέπει τη σωστή ωρίμανση των ανοσορυθμιστικών μηχανισμών, συμπεριλαμβάνοντας τους μηχανισμούς ελέγχου της ανοσολογικής ανοχής, προδιαθέτοντας έτσι στην ανάπτυξη αυτοανοσίας [112]. Η υπόθεση αυτή βασίζεται ιδιαίτερα σε μελέτες παρατήρησης των μεταναστευτικών πληθυσμών, οι οποίες παρουσίασαν ότι οι πληθυσμοί αυτοί, όταν μετανάστευσαν από χώρες με χαμηλή επίπτωση αυτοάνοσων νοσημάτων προς χώρες με υψηλή επίπτωση αυτοάνοσων νοσημάτων, μετά από την πάροδο μίας γενεάς άρχισαν να εμφανίζουν αυτοάνοσα νοσήματα με υψηλή επίπτωση, αντίστοιχη με αυτή των χωρών που κατέληξαν [113, 114]. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από αρκετές επιδημιολογικές μελέτες και μελέτες σε πειραματόζωα, αλλά μέχρι σήμερα η έρευνα ούτε έχει αποδείξει τον προστατευτικό ρόλο των μικροοργανισμών στην αυτοανοσία, ούτε έχει αποδείξει κάποιον σχετικό αιτιολογικό μηχανισμό.

1.3.6 Μικροβιακή χλωρίδα

Η φυσιολογική ή μικροβιακή χλωρίδα του ανθρώπου είναι μια κοινωνία μικροβίων που κατοικούν πάνω και μέσα σε ένα άτομο, στην επιφάνεια του δέρματος, στην αναπνευστική οδό, στη στοματική κοιλότητα, στο έντερο, καθώς και στο ουρογεννητικό σύστημα [115]. Η σύνθεση της μικροβιακής χλωρίδας εμφανίζει σημαντική ποικιλία μεταξύ των ατόμων, αλλά και μεταξύ των σημείων του σώματος.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η συμβίωση του ξενιστή με τους μικροοργανισμούς αυτούς είναι αρμονική [52, 115]. Από τη μία πλευρά, το ανοσοποιητικό σύστημα εκτελεί χρέη επιτηρητή της ανάπτυξης της φυσιολογικής χλωρίδας, αποτρέποντας μια παθολογική υπερανάπτυξη ή την εκδήλωση λοίμωξης. Από την άλλη πλευρά, η φυσιολογική μικροχλωρίδα παίζει ρόλο στην ανάπτυξη και ομοίωση του ανοσοποιητικού συστήματος, τόσο του έμφυτου κλάδου, όσο και του επίκτητου.

Πρόσφατα, ερευνητικές μελέτες έχουν εισηγηθεί τη σημαντική συνεισφορά της μικροχλωρίδας των βλεννογόνων στην απορρύθμιση του ανοσολογικού συστήματος που παρατηρείται στην αυτοανοσία, καθώς η διατάραξη της σύνθεσης και της λειτουργίας της μικροβιακής χλωρίδας, μία κατάσταση που ονομάζεται δυσβίωση, παρατηρείται σε ασθενείς με αυτοάνοσα ή ανοσομεσολαβούμενα νοσήματα, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου Ι, η κατά πλάκας σκλήρυνση, η αυτοάνοση ηπατίτιδα και τα φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου [52]. Ωστόσο, δεν έχει εξακριβωθεί αν οι αλλαγές στο μικροβίωμα που παρατηρούνται είναι επιφανόμενο των αυτοάνοσων νοσημάτων ή της θεραπείας τους ή η αιτία εμφάνισής τους.

Πάντως, η εξέχουσα θεωρία μέχρι σήμερα υποστηρίζει ότι η ικανότητα των συμβιωτικών μικροοργανισμών να διαμορφώνουν τις ανοσοποιητικές αποκρίσεις στους βλεννογόνους έχει επίδραση και σε άλλους, απομακρυσμένους ιστούς, συνεισφέροντας έτσι στην ανάπτυξη αυτοανοσίας σε άτομα με γενετική προδιάθεση. Όπως και στην περίπτωση των εξωγενών μικροοργανισμών, η μοριακή μίμηση, η ενεργοποίηση παρακείμενων κυττάρων και η επέκταση επιτόπων θεωρούνται ως βασικοί μηχανισμοί επαγωγής και διατήρησης της αυτοανοσίας από μικρόβια της χλωρίδας [116]. Η διαλεύκανση της πολύπλοκης αλληλεπίδρασης ανάμεσα στη μικροβιακή χλωρίδα και στο ανοσοποιητικό σύστημα θα συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση της παθογένειας των αυτοάνοσων νοσημάτων και στην αντιμετώπισή τους.

1.3.7 Εμβόλια και ανοσοενισχυτικά

Ο εμβολιασμός είναι μία μέθοδος τεχνητής, ενεργητικής ανοσοποίησης με σκοπό την επαγωγή ανοσολογικής απόκρισης και ανοσολογικής μνήμης έναντι παθογόνων μικροβίων και ιών που προκαλούν λοιμώδη νοσήματα. Τα εμβόλια είναι μία ιδιαίτερα οικονομική και αποτελεσματική μέθοδος πρόληψης λοιμωδών νοσημάτων, κάποια από τα οποία αποτελούν σημαντική απειλή για την υγεία, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την εκρίζωση της ευλογιάς. Για το λόγο αυτό, αποτελούν ίσως την πιο

σπουδαία προσφορά της σύγχρονης Ιατρικής στην ανθρωπότητα [117]. Ωστόσο, ως ενισχυτές της ανοσολογικής απόκρισης, έχουν ενοχοποιηθεί ως πιθανοί επιβαρυντικοί παράγοντες αυτοανοσίας [53].

Ως γνωστόν, όλα τα εμβόλια μπορεί να έχουν ανεπιθύμητες δράσεις, οι περισσότερες των οποίων είναι οξείες, παροδικές και δεν αποτελούν σημαντική απειλή για την υγεία του εμβολιαζόμενου. Κάποιες όμως μπορεί να είναι πιο απειλητικές για τη ζωή, όπως η αντίδραση υπερευαισθησίας, και άλλες να εμφανίζονται μακροπρόθεσμα. Η επαγωγή της αυτοανοσίας εικάζεται ότι είναι μια μακροχρόνια ανεπιθύμητη ενέργεια των εμβολίων [53]. Όπως αναλύθηκε σε προηγούμενη ενότητα για τις μικροβιακές και ιικές μολύνσεις, η απόδειξη της σχέσης αιτίου-αποτελέσματος ανάμεσα στα εμβόλια και στην αυτοανοσία είναι δύσκολη, για το απλό λόγο ότι οι εμβολιασμοί προηγούνται σημαντικά της εμφάνισης των κλινικών συμπτωμάτων.

Μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις εμφάνισης αυτοάνοσων νοσημάτων που σχετίζονται με εμβόλια [118]. Το εμβόλιο έναντι του ιού της γρίπης H1N1 έχει συσχετιστεί με τη ναρκοληψία [119], μια νευρολογική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη υπνηλία, ακόμα και μετά από επαρκή ύπνο, διαταραγμένο νυχτερινό ύπνο, υπνική παράλυση, παραισθήσεις και παχυσαρκία, και το σύνδρομο Guillain-Barré [120, 121]. Το εμβόλιο έναντι του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη συστηματικού ερυθματώδους λύκου [122] και του συνδρόμου ορθοστατικής ταχυκαρδίας [123, 124], μία ετερογενής διαταραχή του αυτόνομου νευρικού συστήματος που εικάζεται ότι είναι αυτοάνοσης αρχής και χαρακτηρίζεται από επίμονη αύξηση του καρδιακού ρυθμού κατά την έγερση σε όρθια θέση με συνοδή μείωση της αιματικής ροής στον εγκέφαλο [125]. Ακόμα, το εμβόλιο έναντι του ιού Β της ηπατίτιδας έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη κατά πλάκας σκλήρυνσης [126, 127]. Σε όλες τις προαναφερθέντες περιπτώσεις, οι μηχανισμοί που θεωρούνται ότι επάγουν την αυτοανοσία λόγω των εμβολίων είναι η μοριακή μίμηση

και η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ανάμεσα σε αντιγόνα του εμβολίου και σε αυτοαντιγόνα. Στην περίπτωση του εμβολίου έναντι του ιού της ηπατίτιδας Β, ομοιότητες ανάμεσα στις αλληλουχίες αμινοξέων του επιφανειακού αντιγόνου του ιού και των ενδογενών πρωτεϊνών της μυελίνης των νευραξόνων, τη βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (myelin basic protein, MBP) και την ολιγοδενδροκυτταρική γλυκοπρωτεΐνη της μυελίνης (myelin oligodendrocyte protein, MOG), θα μπορούσαν να αποτελούν το στόχο ανοσολογικής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας [126]. Η πιθανότητα αυτή διερευνήθηκε σε μια ομάδα ατόμων πριν και μετά τον εμβολιασμό, χρησιμοποιώντας πεπτίδια-μιμητές των όμοιων αλληλουχιών τόσο του ιικού επιφανειακού αντιγόνου όσο και των δύο αυτοαντιγόνων και εξετάζοντας τους ορούς αυτών για αντισώματα που αναγνωρίζουν τα πεπτίδια αυτά. Πριν τον εμβολιασμό, κανένας συμμετέχων δεν εμφάνισε διπλή αντιδραστικότητα έναντι του επιφανειακού αντιγόνου και των αντιγόνων της μυελίνης, όμως μερικούς μήνες μετά τον εμβολιασμό το 60% των εμβολιασμένων εμφάνισε διπλή θετικότητα. Επίσης, σε μία ομάδα ελέγχου που δεν έλαβε το εμβόλιο η διπλή θετικότητα εμφανίστηκε στο 2%. Εντούτοις, κανένας συμμετέχων στη μελέτη αυτή, εμβολιασμένος ή μη, δεν εμφάνισε συμπτωματολογία απομυελινωτικής νόσου. Τα αποτελέσματα αυτά δεν απέδειξαν την ύπαρξη αντισωμάτων που αντιδρούν τόσο με το ιικό αντιγόνο όσο και με τα αυτοαντιγόνα της μυελίνης, αλλά αποτελούν ένδειξη ότι ο μηχανισμός της μοριακής μίμησης θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυτοαντιδραστικότητα και αυτοανοσία σε άτομα που έχουν λάβει το εμβόλιο έναντι του ιού της ηπατίτιδας Β.

Οι ανοσοενισχυτικοί παράγοντες (adjuvants) που χρησιμοποιούνται στα εμβόλια έχουν συνδεθεί επίσης με την πιθανότητα ανάπτυξης αντιδράσεων υπερευαισθησίας και αυτοανοσίας λόγω των εμβολίων [118]. Οι παράγοντες αυτοί είναι ανοσολογικά βοηθήματα και όταν αναμιχθούν με ένα αντιγόνο, ενισχύουν την ανοσογονικότητα του, μέσω ενίσχυσης της αντιγονοπαρουσίασης τους και των απαιτούμενων

συνδιεγερτικών σημάτων. Στα εμβόλια προστίθενται με σκοπό την ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης έναντι του ανοσογόνου παράγοντα του εμβολίου και την καλύτερη ανοσοποίηση. Ανοσοενισχυτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται ευρέως στα εμβόλια είναι άλατα αλουμινίου, λιπίδια, λιποπολυσακχαρίτες, πεπτιδογλυκάνες, τμήματα DNA ή τμήματα γνωστών ανοσοεπικρατών μικροβιακών ή ιικών αντιγόνων, όπως η αιμογλουτινίνη και η νευραμινιδάση του ιού της γρίπης [118]. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί και η σιλικόνη, ένας ανοσοενισχυτικός παράγοντας που μπορεί να μη χρησιμοποιείται στα εμβόλια, αλλά χρησιμοποιείται κατά κόρον σε διάφορα ιατρικά εμφυτεύματα. Αν και αρχικά η σιλικόνη θεωρούνταν αδρανές και ασφαλές υλικό, υπάρχουν αναφορές που τη συνδέουν με την ανάπτυξη αυτοαντιδραστικότητας και αυτοανοσίας [128, 129]. Η εμφάνιση αυτοανοσίας που σχετίζεται λόγω των ανοσοενισχυτικών παραγόντων χαρακτηρίζεται ως αυτοάνοσο/φλεγμονώδες σύνδρομο που επάγεται από ανοσοενισχυτικούς παράγοντες (autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants, ASIA) [130]. Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από αρθραλγίες και αρθρίτιδα, μυαλγίες και μυϊκή αδυναμία, κακουχία και χρόνια κόπωση, νευρολογικές εκδηλώσεις, απώλεια μνήμης και γνωστικές διαταραχές, πυρετό και ξηροστομία, ενώ η απομάκρυνση του ανοσοενισχυτικού παράγοντα συνήθως βελτιώνει την κλινική εικόνα [130].

Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι καμία μελέτη σχετικά με τη συμμετοχή των εμβολίων στην επαγωγή αυτοανοσίας, είτε μέσω της μοριακής μίμησης ή μέσω των ανοσοενισχυτικών παραγόντων ή μέσω άλλων μηχανισμών, δε θα πρέπει να επισκιάσει την αναμφισβήτητη σημασία του εμβολιασμού και των προγραμμάτων εμβολιασμού στην ανθρώπινη υγεία [53]. Η αυτοανοσία ως μακροχρόνια ανεπιθύμητη ενέργεια των εμβολίων δεν αποκλείεται, ούτε θα πρέπει να παραβλέπεται. Ωστόσο, αυτό φαίνεται ότι θα συμβεί σε μικρό ποσοστό ατόμων που είναι επιρρεπή στην ανάπτυξη αυτοανοσίας. Για αυτό το λόγο η ιατρική κοινότητα θα πρέπει να αξιολογεί

τους προδιαθεσικούς παράγοντες ανάπτυξης αυτοαντιδραστικότητας και αυτοανοσίας μετά τον εμβολιασμό, δηλαδή το γενετικό υπόβαθρο, την παρουσία αυτοαντισωμάτων, το ατομικό ιστορικό αλλεργικών αντιδράσεων, καθώς και το ατομικό και το οικογενειακό ιστορικό αυτοάνοσων νοσημάτων, και να πράττει ανάλογα.

1.3.8 Ρύπανση του περιβάλλοντος και τοξικοί παράγοντες

Η ρύπανση του περιβάλλοντος είναι η παρουσία στο περιβάλλον ουσιών-ρύπων για ικανό χρονικό διάστημα και σε συγκέντρωση τέτοια ώστε να μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στους ζωντανούς οργανισμούς ή να επηρεάσουν δυσμενώς τις συνθήκες διαβίωσης τους [131]. Η επίδραση των ρύπων στην υγεία του ανθρώπου είναι γνωστή, καθώς ευθύνονται για την εμφάνιση καρδιαγγειακών και αναπνευστικών παθήσεων, μεταβολικών, ενδοκρινικών, νευρολογικών, νευροαναπτυξιακών και αναπαραγωγικών διαταραχών, καθώς και για την εμφάνιση διάφορων μορφών νεοπλασιών [131]. Εντούτοις, τα τελευταία χρόνια γίνεται κατανοητό ότι η διαβίωση σε ένα ρυπαρό περιβάλλον αποτελεί παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης αυτοανοσίας.

Αιωρούμενα σωματίδια που προέρχονται από την καύση πετρελαίου επάγουν αυτοφαγία και κιτρουλινοποίηση αμινοξέων σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα [132]. Η επίπτωση της αυτοφαγίας στην αυτοανοσία βρίσκεται ακόμα υπό μελέτη, καθώς φαίνεται ότι σε κάποια αυτοάνοσα νοσήματα έχει προστατευτικό ρόλο, ενώ σε άλλα παθογενετικό [133]. Αντίθετα, ο ρόλος της κιτρουλινοποίησης αμινοξέων ως μετα-μεταφραστική τροποποίηση στην αυτοανοσία είναι εδραιωμένος, μιας και η τροποποίηση καταλοίπων αργινίνης σε κιτρουλίνη σε αρκετά αυτοαντιγόνα τα καθιστά στόχους των αυτοαντισωμάτων έναντι κιτρουλινοποιημένων πεπτιδίων/πρωτεϊνών, μιας κατηγορίας αυτοαντισωμάτων που είναι ειδικά για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και συμμετέχουν στην παθογένεια της [134].

Μια ακόμα τοξική ουσία που έχει αναφερθεί ως παθογενετικός παράγοντας αυτοάνοσων νοσημάτων είναι η δισφαινόλη Α [54], αν και η σύνδεση μεταξύ της ουσίας

και της αυτοανοσίας είναι ακόμα σε υποθετικό επίπεδο. Ο λόγος που έχει εμπλακεί στην εμφάνιση της αυτοανοσίας είναι η πολυεστιακή της επίδραση σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [54], επάγοντας την έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, την παραγωγή αυτοαντισωμάτων, τη διαφοροποίηση ανώριμων T λεμφοκυττάρων προς Th2 λεμφοκύτταρα εις βάρος T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων, καθώς την ενεργοποίηση υποδοχέων οιστρογόνων και την αύξηση των επιπέδων προλακτίνης που, όπως έχει ήδη αναφέρει σε προηγούμενη ενότητα, έχουν ανοσοδιεγερτικές επιδράσεις.

1.3.9 Κάπνισμα

Η υπόθεση ότι το κάπνισμα αποτελεί αιτιοπαθογενετικό παράγοντα αυτοάνοσων νοσημάτων έχει διατυπωθεί εδώ και αρκετά χρόνια [55, 135, 136]. Μέχρι σήμερα έχει συνδεθεί με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, το συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, την πρωτοπαθή χολική χολαγγειίτιδα, τη νόσο του Crohn, την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, τη νόσο Αδαμαντιάδη-Behçet, τη συστηματική σκλήρυνση, την κατά πλάκας σκλήρυνση, την αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, το σακχαρώδη διαβήτη τύπου I και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα.

Στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, το κάπνισμα αποτελεί τον πιο γνωστό παράγοντα προδιάθεσης και βαρύτητας της νόσου [134]. Παθογενετικά, η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου προκαλεί την κιτρουλινοποίηση πρωτεϊνών σε γενετικά προδιατεθειμένα πειραματόζωα, ενώ το κάπνισμα φαίνεται ότι επάγει την παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι κιτρουλινοποιημένων πεπτιδίων/πρωτεϊνών σε γενετικά προδιατεθειμένος ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα [134].

Επιδημιολογικές μελέτες και μελέτες σε πειραματικά μοντέλα έχουν συνδέσει το κάπνισμα και με το συστηματικό ερυθηματώδη λύκο. Στο νόσημα αυτό, το οξειδωτικό στρες που προκαλεί φαίνεται ότι προωθεί την παθογένεια διαταράσσοντας την έκφραση ανοσορυθμιστικών γονιδίων [137, 138]. Επιπλέον, το κάπνισμα μπορεί να

μεταβάλλει το μικροπεριβάλλον του πνεύμονα, οδηγώντας σε υπέρμετρες ανοσολογικές αντιδράσεις σε λοιμώξεις [139], αντιδράσεις που θα μπορούσαν να απορυθμίσουν το ανοσοποιητικό σύστημα και να καταλήξουν σε αυτοαντιδραστικότητα.

Κλείνοντας, αξίζει να αναφερθεί η θετική επίδραση του καπνίσματος στην ελκώδη κολίτιδα, ένα φλεγμονώδες νόσημα του εντέρου [140]. Σε ένα από τα ελάχιστα παραδείγματα στην Ιατρική όπου το κάπνισμα δεν αντενδείκνυται, στην ελκώδη κολίτιδα το κάπνισμα έχει προστατευτικό ρόλο απέναντι στην ανάπτυξη της, ενώ ακόμα και μετά την έναρξη της το κάπνισμα μειώνει τη βαρύτητα της νόσου, αποτρέπει την εμφάνιση εξάρσεων, ελαττώνει τις νοσηλείες, καθώς και την ανάγκη χορήγησης κορτικοστεροειδών ή άλλων ανοσοκατασταλτικών θεραπευτικών παραγόντων [140-142].

1.3.10 Δίαιτα και διατροφή

Οι διατροφικές συνήθειες έχουν σημαντική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία. Χωρίς αμφιβολία, «είμαστε ό τι τρώμε» και από αυτό συνεπάγεται ότι μια κακή διατροφή ή ορισμένα συστατικά της διατροφής μπορούν να οδηγήσουν σε παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβάνοντας αυτοάνοσα νοσήματα [56]. Εμμέσως, οι διατροφικές συνήθειες και οι διατροφικοί παράγοντες συμμετέχουν στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων διαμορφώνοντας τη μικροβιακή χλωρίδα ή προκαλώντας παχυσαρκία. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει κατανοητό ότι μια πληθώρα διατροφικών παραγόντων εμπλέκονται παθογενετικά στην αυτοανοσία [56].

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η κοιλιόκακη, ένα αυτοάνοσο νόσημα δυσαπορρόφησης που προσβάλλει το έντερο και οφείλεται σε δυσανεξία στη γλουτένη σε άτομα με γενετική προδιάθεση [143]. Η κοιλιόκακη αποτελεί ένα από τα ελάχιστα αυτοάνοσα νοσήματα για το οποίο γνωρίζουμε ακριβώς τα γονίδια που προσδίδουν τη γενετική προδιάθεση, το αυτοαντιγόνο και τον εξωγενή παράγοντα που το

πυροδοτεί. Τα εμπλεκόμενα γονίδια είναι το HLA-DQ2 και το HLA-DQ8, το αυτοαντιγόνο είναι η ιστική τρανσγλουταμινάση και ο παράγοντας που πυροδοτεί τη νόσο είναι η γλουτένη. Η νόσος αυτή προσφέρει ένα καλό παράδειγμα αλληλεπίδρασης προδιαθεσικών παραγόντων αυτοανοσίας, καθώς εκτός από τη δίαιτα, η μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου παίζει εξίσου σημαίνοντα ρόλο. Συγκεκριμένα, η απουσία βακτηρίων ικανών να πέψουν τη γλουτένη από τη μικροβιακή χλωρίδα ατόμων με γενετική προδιάθεση μπορεί να επάγει τη νόσο επί λήψης τροφών που περιέχουν γλουτένη [143, 144].

Μια άλλη διαιτητική συνήθεια που πιθανόν να εμπλέκεται στην ανάπτυξη αυτοανοσίας είναι η δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι. Το αλάτι επηρεάζει τη διαφοροποίηση των CD4+ T λεμφοκυττάρων, ευνοώντας τον Th17 φαινότυπο [145, 146], ο οποίος είναι ένας κυτταρικός πληθυσμός με καθοριστικό ρόλο σε αρκετά αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, η κατά πλάκας σκλήρυνση και η ψωρίαση [147]. Το αλάτι επίσης τροποποιεί τη φυσιολογία των CD4+ CD25+ FOXP3+ T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων, επάγοντας την παραγωγή της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IFN- γ από τα κύτταρα αυτά και αναστέλλοντας την ανοσοκατασταλτική τους λειτουργία [148]. Η απώλεια της ανοσοκατασταλτικής δράσης των ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων αποτελεί βασικό μηχανισμό διάσπασης της ανοσολογικής ανοχής. Τέλος, πειράματα στο πειραματικό μοντέλο της κατά πλάκας σκλήρυνσης, την πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα, έδειξαν ότι η δίαιτα πλούσια σε αλάτι επιδεινώνει τη βαρύτητα της νόσου [145, 146].

1.4 Μηχανισμοί διάσπασης της ανοσολογικής ανοχής και επαγωγής της αυτοανοσίας

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, υπό φυσιολογικές συνθήκες τα B και τα T λεμφοκύτταρα δεν αντιδρούν με αυτοαντιγόνα, λόγω της δράσης των μηχανισμών της ανοσολογικής ανοχής που αναλύθηκαν στην Ενότητα 1.2. Οι μηχανισμοί αυτοί όμως δεν είναι

απόλυτοι και όταν αποτυγχάνουν προκαλείται αυτοαντιδραστικότητα και αυτοάνοσα νοσήματα. Τόσο οι κεντρικοί, όσο και οι περιφερικοί μηχανισμοί αυτοανοσίας δύνανται να αποτύχουν με αρκετούς τρόπους, οδηγώντας στην κυκλοφορία και στην ενεργοποίηση αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων.

1.4.1 Μηχανισμοί διάσπασης της κεντρικής ανοσολογικής ανοχής

Αν και η αρνητική επιλογή των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων θεωρείται μια διαδικασία υψηλής πιστότητας, στην πραγματικότητα εμφανίζει διαρροές [149]. Ένας λόγος αποτυχίας της εξάλειψης των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων είναι η μειωμένη ή απύουσα έκφραση και παρουσίαση των αυτοαντιγόνων στα πρωτογενή λεμφικά όργανα [13, 20]. Όπως αναλύθηκε στην Ενότητα 1.2.1, η κλωνική εξάλειψη των T λεμφοκυττάρων μέσω της αρνητικής επιλογής απαιτεί την παρουσία των αυτοαντιγόνων στο θύμο αδένα και την αλληλεπίδραση του συμπλόκου τους με τα μόρια MHC με τους TCR με υψηλή συγγένεια. Συνεπώς, η ικανότητα της αρνητικής επιλογής να προσαρμόζει το ρεπερτόριο των λεμφοκυττάρων είναι ανάλογη του βαθμού της έκφρασης και παρουσίασης των αυτοαντιγόνων κατά την ωρίμανση των λεμφοκυττάρων.

Η παραπάνω θεωρία επιβεβαιώνεται από μελέτες σε πειραματικά μοντέλα αυτοάνοσων νοσημάτων, καθώς αυτά δεν εμφανίζονται όταν χορηγούνται αυτοαντιγόνα ή μεταμοσχευτούν κομμάτια των ιστών-στόχων στο θύμο αδένα του ζώου. Σε πειραματικά μοντέλα του σακχαρώδη διαβήτη τύπου I, η μεταμόσχευση παγκρεατικών νησιδίων ή η χορήγηση της γλουταμικής αποκαρβοξυλάσης, ένα από τα αυτοαντιγόνα της νόσου, μέσα στο θύμο αδένα μπόρεσαν να προλάβουν ή να αναστείλουν το νόσημα [150, 151]. Το ίδιο αποτέλεσμα εμφανίστηκε και στην πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα, το πειραματικό μοντέλο της κατά πλάκας σκλήρυνσης, όταν χορηγήθηκε ένα από τα αυτοαντιγόνα της νόσου, η MBP, ή ο κύριος ανοσογονικός επίτοπος αυτού [152]. Αντίστοιχα, σε ποντίκια με προδιάθεση

ανάπτυξης του συστηματικού ερυθματώδους λύκου, η παραγωγή αντι-DNA αντισωμάτων επιβραδύνθηκε έπειτα από εισαγωγή νουκλεοσωμάτων στο θύμο αδένα [153].

Ένα ακόμα παράδειγμα αποτυχίας της κεντρικής ανοσοανοχής λόγω μειωμένης έκφρασης και ανεπαρκούς παρουσίας περιφερικών αυτοαντιγόνων στο θύμο αδένα αποτελεί το σύνδρομο αυτοάνοσης πολυενδοκρινοπάθειας APECED. Το σύνδρομο αυτό σχετίζεται με την αυτοάνοση καταστροφή πολλαπλών ενδοκρινών αδένων από T λεμφοκύτταρα [70]. Όπως έχει προαναφερθεί, το σύνδρομο APECED αποτελεί ένα από τα ελάχιστα αυτοάνοσα νοσήματα μονογονιδιακής φύσης, προκαλούμενο από μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί για το μεταγραφικό παράγοντα AIRE [70]. Ο μεταγραφικός παράγοντας δρα στο θύμο αδένα, επάγοντας την έκφραση γονιδίων που φυσιολογικά εκφράζονται σε περιφερειακούς ιστούς. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών αποτελούν στόχους των θυμικών T λεμφοκυττάρων, τα οποία όμως εξαλείφονται στα πλαίσια της αρνητικής επιλογής, εξασφαλίζοντας έτσι την ανοσολογική ανοχή. Στο σύνδρομο APECED, η μειωμένη παραγωγή των περιφερειακών αντιγόνων στο θύμο αδένα οδηγεί σε αδυναμία εξουδετέρωσης των αυτοαντιδραστικών T λεμφοκυττάρων [70].

Στην περίπτωση των B λεμφοκυττάρων, οι μηχανισμοί που διαταράσσουν την κεντρική ανοσολογική ανοχής και οδηγούν σε αυτοανοσία είναι πιο δύσκολο να εξακριβωθούν. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα ανώριμα B λεμφοκύτταρα συνεχίζουν να υπόκεινται σε μηχανισμούς αρνητικής επιλογής ακόμα και μετά από την έξοδο τους από το θύμο αδένα, κάτι που τους επιτρέπει να έρχονται σε άμεση επαφή με αυτοαντιγόνα της περιφέρειας [1]. Παρ' όλα αυτά, η ανεπάρκεια της κεντρικής ανοσοανοχής των B λεμφοκυττάρων φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στην αυτοανοσία, όπως υποστηρίζεται από την ύπαρξη άωρων αυτοαντιδραστικών B λεμφοκυττάρων που μπορούν να παράγουν αυτοαντισώματα πριν ακόμα έρθουν σε επαφή με

ενδογενή αντιγόνα σε ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο και ρευματοειδή αρθρίτιδα [154, 155].

1.4.2 Μηχανισμοί διάσπασης της περιφερικής ανοσολογικής ανοχής

Παρά την ύπαρξη λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια που αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα, υπό φυσιολογικές περιστάσεις οι περιφερειακοί μηχανισμοί ανοσολογικής ανοχής είναι δύσκολο να καμφθούν. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι στην πλειοψηφία του πληθυσμού δεν αναπτύσσονται αυτοάνοσα νοσήματα, ακόμα και όταν ανιχνεύονται αυτοαντισώματα στην κυκλοφορία ή αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα σε ιστούς [3, 4]. Ακόμα και στα πειραματικά μοντέλα αυτοάνοσων νοσημάτων, για να διασπαστεί η ανοσοανοχή χρειάζονται μεγάλες ποσότητες αυτοαντιγόνων και ισχυροί ανοσοενισχυτικοί παράγοντες σε έδαφος κατάλληλου γενετικού υπόβαθρου με τη μορφή αλληλόμορφων MHC [1, 156].

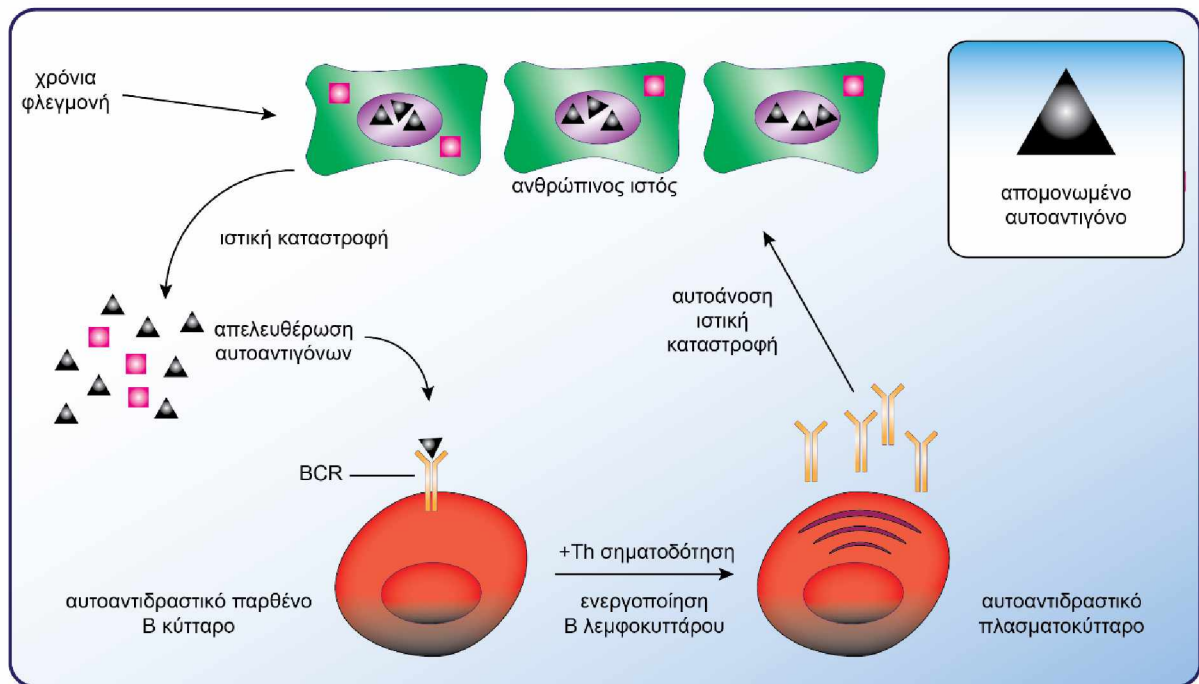
Για τη διάσπαση της περιφερικής ανοσολογικής ανοχής των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων που έχουν διαφύγει της κεντρικής ανοσοανοχής απαιτείται η ενεργοποίηση τους από κάποιο αυτοαντιγόνο, κατά κανόνα σε περιβάλλον φλεγμονής, μέσω της παρουσίασης τους από επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Η ενεργοποίηση των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων εξαρτάται από τη φύση του αυτοαντιγόνου, την ανοσογονικότητα των επιτόπων του, το βαθμό έκθεσης στο αυτοαντιγόνο, την ικανότητα των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων να επεξεργαστούν το αυτοαντιγόνο, τη συγγένεια πρόσδεσης του αυτοαντιγόνου στα μόρια MHC, τη συγγένεια πρόσδεσης του συμπλόκου αυτοαντιγόνου-MHC στον TCR ή του αυτοαντιγόνου στον BCR, το ρεπερτόριο και τον αριθμό των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων, τον τύπο και τα επίπεδα των συνδιεγερτικών σημάτων, τις κυτταροκίνες και την ύπαρξη φλεγμονής στο περιβάλλον [13, 157, 158]. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ενεργοποιούνται τα αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα στην περιφέρεια είναι αρκετοί, δύσκολα εξακριβώνονται, αλλά παρέχουν ένα πλαίσιο

κατανόησης της αυτοανοσίας και μπορεί να συμβάλλουν στο σχεδιασμό καλύτερων προληπτικών και θεραπευτικών παρεμβάσεων.

1.4.2.1 Απελευθέρωση απομονωμένων αντιγόνων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, όλα τα ενδογενή αντιγόνα που δεν παρουσιάζονται σε ωριμάζοντα T και B λεμφοκύτταρα στα πρωτογενή λεμφικά όργανα δεν επάγουν αυτοανοχή [13, 20]. Τα αντιγόνα αυτά συνήθως εκφράζονται σε περιοχές απομονωμένες από την κυκλοφορία, όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα [22-24], ή εκφράζονται σε ενδοκυτταρικά οργανίδια χωρίς πρόσβαση στα λεμφοκύτταρα, όπως ο πυρήνας [159]. Όμως, σε περιπτώσεις κυτταρικής και ιστικής βλάβης, όπως συμβαίνει σε έναν τραυματισμό, σε μία λοίμωξη ή σε ισχαιμία, η απελευθέρωση στην κυκλοφορία των απομονωμένων αυτοαντιγόνων μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση ανεργικών λεμφοκυττάρων [160]. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να αποτελέσει το εναρκτήριο γεγονός ενός αυτοάνοσου νοσήματος και στην περίπτωση αυτή τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα θα αντιδράσουν έναντι ανοσοεπικρατών επιτόπων των αυτοαντιγόνων (Εικόνα 1.2).

Εικόνα 1.2: Η απελευθέρωση απομονωμένων αντιγόνων ως παθογενετικός μηχανισμός της αυτοανοσίας.



Σε έδαφος χρόνιας φλεγμονής που μπορεί να οφείλεται σε ενεργό αυτοάνοσο νόσημα ή σε εμμένουσα μικροβιακή ή ιική λοίμωξη, η ιστική καταστροφή που προκαλείται οδηγεί στην απελευθέρωση απομονωμένων από την κυκλοφορία αυτοαντιγόνων. Τα αυτοαντιγόνα γίνονται στόχος λεμφοκυττάρων, η ενεργοποίηση των οποίων στρέφει το ανοσοποιητικό σύστημα έναντι εαυτών κυττάρων και ιστών, προκαλώντας ανοσομεσολαβούμενη ιστική καταστροφή ή λειτουργική ανεπάρκεια. Συντομεύσεις: BCR, υποδοχέας του B λεμφοκυττάρου· Th, T βοηθητικό λεμφοκύτταρο.

1.4.2.2 Κρυπτικοί επίτοποι

Η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια, αυτοαντιδραστικών ή μη, εξαρτάται και από την ανοσογονικότητα των αυτοαντιγόνων, και πιο συγκεκριμένα την ανοσογονικότητα των επιμέρους επιτόπων τους. Οι επίτοποι δεν έχουν την ίδια ικανότητα επαγωγής ανοσολογικής απόκρισης· ορισμένοι είναι ανοσογονικοί, ενώ άλλοι δεν είναι [161]. Οι τοπογραφικές ιδιότητες του κάθε επιτόπου καθορίζουν την ανοσογονικότητα του. Κατά κανόνα, οι B λεμφοκυτταρικοί επίτοποι είναι επιφανειακοί

ώστε να είναι προσβάσιμοι στα αντισώματα [162], ενώ οι Τ λεμφοκυτταρικοί επίτοποι μπορεί να είναι και εσωτερικοί [163]. Επίσης, η ανοσογονικότητα του κάθε επιτόπου καθορίζεται από τις φυσικοχημικές του ιδιότητες, καθώς αυτές επηρεάζουν το βαθμό επεξεργασίας από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και την πρόσδεση τους σε μόρια MHC [161]. Επιπλέον, η παρουσία φλεγμονής και η παρουσία συνδिएεργετικών σημάτων αυξάνουν την ανοσογονικότητα [157]. Με βάση τα παραπάνω, οι επίτοποι διαβαθμίζονται από ανοσοεπικρατείς όταν επάγουν έντονες ανοσοαποκρίσεις έως μη ανοσογονικοί. Ωστόσο, υπάρχει μία κατηγορία αντιγονικών καθοριστών οι οποίοι υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι μη ανοσογονικοί, όμως σε φλεγμονώδεις συνθήκες γίνονται ανοσοεπικρατείς. Αυτοί οι επίτοποι ονομάζονται κρυπτικοί [164-166], επειδή συνήθως είναι κρυμμένοι στο εσωτερικό των αντιγόνων, και επεξεργάζονται και παρουσιάζονται πιο αποτελεσματικά σε φλεγμονώδεις συνθήκες.

Η ταξινόμηση των επιτόπων σε ανοσοεπικρατείς και κρυπτικούς φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη, στη διατήρηση και στην εξέλιξη της αυτοανοσίας [164-166]. Κατά την αρνητική επιλογή των λεμφοκυττάρων, όσα λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν ανοσοεπικρατείς επιτόπους εξαλείφονται. Αντιθέτως, όσα λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν λιγότερο ανοσογονικούς και κρυπτικούς επιτόπους διαφεύγουν της κεντρικής ανοσοανοχής. Τα λεμφοκύτταρα αυτά μεταναστεύουν στην περιφέρεια, όπου μπορεί να ενεργοποιηθούν από τους κρυπτικούς επιτόπους σε συνθήκες φλεγμονής και να μεσολαβήσουν αντιδράσεις αυτοανοσίας [164-166].

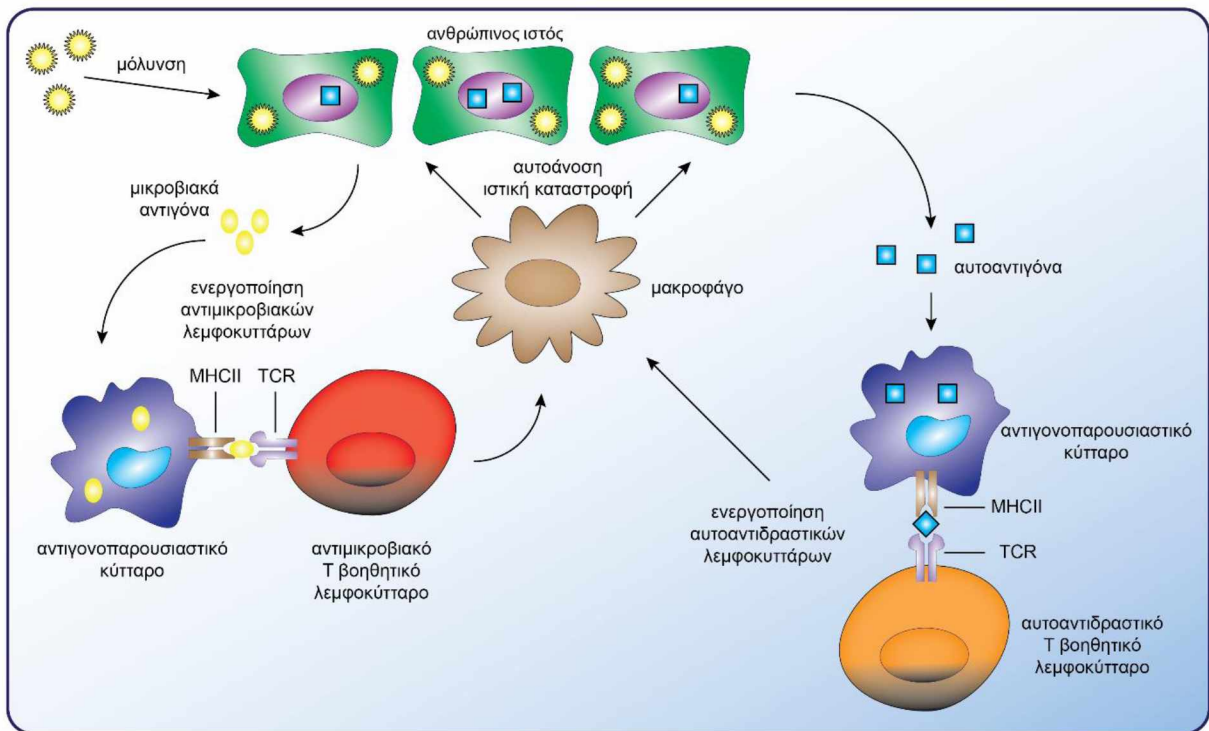
1.4.2.3 Επέκταση επιτόπων

Στα αυτοάνοσα νοσήματα, η παρατεταμένη ιστική βλάβη λόγω της χρόνιας φλεγμονής και η συνεχής απελευθέρωση αυτοαντιγόνων κάτω από ευνοϊκές συνθήκες, με έντονη αντιγονοπαρουσίαση και με παρουσία συνδिएεργετικών μορίων, δύναται να επεκτείνει το ρεπερτόριο των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων με κλώνους που αντιδρούν με αντιγονικούς επιτόπους μιας πρωτεΐνης διαφορετικούς από τον αρχικό [167]. Ο

μηχανισμός αυτός ονομάζεται επέκταση επιτόπων (epitope spreading, Εικόνα 1.3), επειδή η φλεγμονή «επεκτείνεται», συμπεριλαμβάνοντας αντιγονικούς στόχους μιας πρωτεΐνης που δεν αναγνωρίζονταν από λεμφοκύτταρα στα αρχικά στάδια της αυτοανοσίας [167]. Η χρόνια φλεγμονή που οδηγεί στην ιστική βλάβη και στην απελευθέρωση νέων αυτοαντιγόνων ενδέχεται να προκαλείται και από χρόνιες, εμμένουσες ή λανθάνουσες λοιμώξεις [168], αποκαλύπτοντας έναν μηχανισμό συμμετοχής των μικροοργανισμών στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων.

Οι νέοι αντιγονικοί στόχοι που προκύπτουν με την επέκταση επιτόπων εικάζεται ότι είναι λιγότερο επικρατείς ή κρυπτικοί [166]. Εντούτοις, συμμετέχουν στη διαίωσιση της αυτοάνοσης αντίδρασης και της φλεγμονής και για αυτό το λόγο ο μηχανισμός της επέκτασης επιτόπων θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση και την εξέλιξη των αυτοάνοσων νοσημάτων.

Εικόνα 1.3: Η επέκταση των επιτόπων ως παθογενετικός μηχανισμός της αυτοανοσίας



Ο μηχανισμός αυτός προϋποθέτει χρόνια φλεγμονή, με τη μορφή μιας εμμένουσας λοίμωξης από μικρόβιο ή από ιό ή με τη μορφή ενεργού αυτοάνοσου νοσήματος. Σε περίπτωση λοίμωξης, τα εξωγενή αντιγόνα αποτελούν τον πρωταρχικό αντιγονικό στόχο, ενώ σε περίπτωση ενεργού αυτοάνοσου νοσήματος, ο στόχος είναι κάποιο αυτοαντιγόνο. Οι πρωταρχικοί αντιγονικοί στόχοι ενεργοποιούν την επίκτητη ανοσία και επάγουν ιστική καταστροφή. Η παρατεταμένη ιστική βλάβη οδηγεί σε συνεχή απελευθέρωση νέων αυτοαντιγόνων, τα οποία προκαλούν την εξάπλωση της ανοσολογικής απόκρισης των T λεμφοκυττάρων σε περισσότερους επιτόπους, διαφορετικούς από τους πρωταρχικούς. Συντομεύσεις: MHCII, μόριο μείζονος ιστοσυμβατότητας τύπου II· TCR, υποδοχέας του T λεμφοκυττάρου.

Η επέκταση των επιτόπων μπορεί να είναι ενδομοριακή και να αφορά συνήθως κρυπτικούς επιτόπους στο ίδιο αυτοαντιγόνο, ή διαμοριακή και να αφορά νέους επιτόπους σε ένα διαφορετικό αυτοαντιγόνο [167]. Τόσο η ενδομοριακή, όσο και η

διαμοριακή επέκταση έχουν αναφερθεί σε αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος και η συστηματική σκλήρυνση [169, 170]. Μάλιστα, σε ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον κλινικό περιστατικό που δημοσιεύθηκε από τους Mahler και συνεργάτες περιγράφεται η συνύπαρξη των δύο τύπων επέκτασης επιτόπων σε μία ασθενή με συστηματική σκλήρυνση [169]. Στο περιστατικό αυτό, κατά τα πρώτα επτά χρόνια του νοσήματος ανιχνεύονταν αντι-ιστονικά αυτοαντισώματα έναντι συγκεκριμένων επιτόπων. Το όγδοο έτος ξεκίνησαν να ανιχνεύονται αυτοαντισώματα έναντι της κεντρομεριδιακής πρωτεΐνης A (centromeric protein A, CENPA), τα οποία αναγνώριζαν έναν επίτοπο κοινού μοτίβου αλληλουχίας με τον αντιγονικό επίτοπο της ιστόνης H3 [171]. Το γεγονός αυτό θεωρήθηκε ως διαμοριακή επέκταση επιτόπων. Στη συνέχεια, ανιχνεύθηκε μια ενδομοριακή επέκταση των επιτόπων προς το αμινοτελικό άκρο της κεντρομεριδιακής πρωτεΐνης A, το οποίο περιέχει δύο αλληλουχίες κοινού μοτίβου με τον αρχικό επίτοπο και τον επίτοπο της ιστόνης H3. Τέλος, σε ένα δεύτερο φαινόμενο διαμοριακής επέκτασης επιτόπων, δώδεκα χρόνια μετά την έναρξη της νόσου, ξεκίνησαν να ανιχνεύονται αντισώματα έναντι της κεντρομεριδιακής πρωτεΐνης B, τα οποία αναγνώριζαν έναν επίτοπο με το ίδιο μοτίβο αλληλουχίας. Η εξέλιξη αυτή της ανοσολογικής απόκρισης περιγράφει με αξιόλογη λεπτομέρεια τη δημιουργία των αντι-κεντρομεριδιακών αντισωμάτων, μιας κατηγορίας αυτοαντισωμάτων ειδικών για τη συστηματική σκλήρυνση και την περιορισμένη δερματική μορφή της [172]. Με τον ίδιο τρόπο θα μπορούσαν να δημιουργούνται αυτοαντιδραστικά αντισώματα και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα.

1.4.2.4 Νέο-αυτοαντιγόνα

Ένας ακόμα μηχανισμός ενεργοποίησης αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια είναι η παραγωγή νέων αυτοαντιγόνων ή νέο-αυτοαντιγόνων μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και χημικών τροποποιήσεων [173]. Οι τροποποιήσεις αυτές αφορούν συνήθως πρωτεΐνες και μπορούν να δημιουργήσουν ένα νέο

αυτοαντιγόνο άμεσα μέσω του σχηματισμού μίας καινούργιας δομής στην πρωτεΐνη που αναγνωρίζεται από λεμφοκύτταρα ή έμμεσα μέσω αλλαγών που αλλάζουν την ικανότητα πρόσδεσης στα μόρια MHC ή την ικανότητα επεξεργασίας του αντιγόνου από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα [173].

Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα μετα-μεταφραστικής τροποποίησης πρωτεϊνών που συνδέεται με την αυτοανοσία είναι η κιτρολινοποίηση αμινοξέων αργινίνης στην ρευματοειδή αρθρίτιδα [134]. Στη νόσο αυτή εντοπίζονται αυτοαντισώματα έναντι κιτρολινοποιημένων πρωτεϊνών, όπως το ινωδογόνο, η φιμπρονεκτίνη, η α-ενολάση, το κολλαγόνο και οι ιστόνες [134]. Άλλα παραδείγματα τροποποιήσεων σε κατάλοιπα αμινοξέων που επάγουν αυτοάνοσες αντιδράσεις έχουν χαρακτηριστεί σε πειραματικά μοντέλα, συμπεριλαμβάνοντας τη μετατροπή καταλοίπων ασπαρτικού οξέος σε ισοασπαρτικό οξύ που επάγει την ανάπτυξη λύκου σε ποντίκια [174] και την ακετυλίωση σε πεπτιδία της MBP που επάγει πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα [175].

Νέο-αυτοαντιγόνα μπορούν να δημιουργηθούν επίσης μέσω αλλαγών στη τρισδιάστατη μορφή μίας πρωτεΐνης. Ο σχηματισμός IgG ανοσοσυμπλεγμάτων από μη ανοσογονικά, διαλυτά μόρια IgG μπορεί να επάγει την παραγωγή ρευματοειδούς παράγοντα, δηλαδή IgM αντισωμάτων έναντι του τμήματος Fc αντισωμάτων IgG [176]. Επιπλέον, μια αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης του μορίου του κολλαγόνου τύπου IV μέσω σουλφυδριλικών δεσμών δημιουργεί έναν νέο στόχο για παθογονικά αυτοαντισώματα στο σύνδρομο Goodpasture [177].

1.4.2.5 Υπερέκφραση συνδιεγερτικών μορίων

Η υπερέκφραση σηματοδοτικών μορίων φαίνεται ότι αποτελεί έναν μηχανισμό διάσπασης της ανοσολογικής ανοχής [178, 179]. Ο μηχανισμός είναι υπεύθυνος για την ανάπτυξη λύκου στο πειραματικό μοντέλο της νόσου αυτής που ονομάζεται *sarngome* [178]. Στα ποντίκια αυτά, μία σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο *Rc3h1*, το

οποίο κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη του συστήματος της ουβικουΐνης, έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη αποικοδόμηση του mRNA του συνδεδεμένου μορίου ICOS [179]. Η αυξημένη έκφραση του ICOS προάγει την κλωνική επέκταση θυλακιακών Τ λεμφοκυττάρων, την ανάπτυξη βλαστικών κέντρων και την παραγωγή της IL-21, επάγοντας έτσι αυτοανοσία [178].

1.4.2.6 Διαταραχή της απόπτωσης

Διαταραχές στο μηχανισμό της απόπτωσης μπορούν διασπάσουν την ανοσοανοχή, εμποδίζοντας την απομάκρυνση μη επιθυμητών, αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων. Ο μηχανισμός αυτός έχει αποδειχθεί ότι οφείλεται για την ανάπτυξη του αυτοάνοσου λεμφοϋπερπλαστικού συνδρόμου, αλλά και στο αντίστοιχο νόσημα στα ποντίκια, την λεμφοϋπερπλαστική νόσο [180]. Το παραπάνω σύνδρομο οφείλεται σε μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη Fas, έναν προαποπτωτικό, επιφανειακό υποδοχέα που έχει κεντρικό ρόλο στην ανοσολογική ομοίωση και ανοχή [181]. Η δυσλειτουργία τους Fas οδηγεί σε συσσώρευση Β και Τ λεμφοκυττάρων, με τελικό αποτέλεσμα την εμφάνιση αυτοάνοσης κυτταροπενίας σε τουλάχιστον δύο κυτταρικές σειρές του αίματος, αλλά και τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λεμφώματος [180]. Παρόμοια παθολογία εμφανίζεται και σε μεταλλάξεις του προσδέτη του υποδοχέα Fas [180].

1.4.2.7 Διαταραχές κάθαρσης αυτοαντιγόνων

Η σημασία της κάθαρσης των αυτοαντιγόνων για τη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής είναι εμφανής σε περιπτώσεις διαταραχής της διαδικασίας αυτής [42]. Τέτοια περίπτωση αποτελεί η συσσώρευση μορίων DNA λόγω αδυναμίας απομάκρυνσης τους, τα οποία αποτελούν στόχο αυτοαντισωμάτων [182]. Ενδοκυτταρική συσσώρευση μορίων DNA παρατηρείται σε ανεπάρκεια της εξονουκλεάσης TREX1, ένζυμο με λειτουργία αποικοδόμησης μορίων DNA [183]. Μεταλλάξεις της TREX1 έχουν συνδεθεί με το σύνδρομο Aicardi-Goutières, μία σπάνια προϊούσα εγκεφαλοπάθεια που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα ιντερφερόνης άλφα

(interferon α , IFN- α) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, καθώς και με κλινικές μορφές του συστηματικού ερυθματώδους λύκου [183, 184]. Η σημασία της κάθαρσης του DNA στο συστηματικό ερυθματώδη λύκο υποστηρίζεται και από τη σύνδεση της ανεπάρκειας της DNase I, ενός ενζύμου με ενεργότητα ενδονουκλεάσης και εξέχοντα ρόλο στη διαχείριση νουκλεϊκών αποβλήτων, με την ανάπτυξη του νοσήματος αυτού σε ανθρώπους και σε ποντίκια [185, 186].

1.4.2.8 Ανεπάρκεια των ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων

Η δράση των ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής [31, 32]. Για το λόγο αυτό, η ανεπάρκεια τους συνδέεται άμεσα με την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I, η κατά πλάκας σκλήρυνση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος και η ψωρίαση. Ο ρόλος των B ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στην αυτοανοσία δεν είναι πλήρως κατανοητός [31]. Αντιθέτως, η σημασία της διαταραχής των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων είναι ευρέως αποδεκτή και αρκετοί σχετικοί μηχανισμοί έχουν περιγραφεί [32, 187].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η κυριότερη κατηγορία T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων είναι τα CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ λεμφοκύτταρα. Η απουσία τους ή η εξάλειψη τους σε ποντίκια οδηγεί αυτόματα στην εμφάνιση αυτοάνοσης γαστρίτιδας, αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας, σακχαρώδους διαβήτη τύπου I ή φλεγμονώδους νόσου του εντέρου [32, 187]. Η σημασία των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στον άνθρωπο αναδεικνύεται στο σύνδρομο φυλοσύνδετης ανοσοανεπάρκειας, πολυενδοκρिनοπάθειας και εντεροπάθειας IPEX, ένα από τα λίγο παραδείγματα μονογονιδιακού αυτοάνοσου νοσήματος [71]. Η αιτία του συνδρόμου IPEX είναι μεταλλάξεις στο γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα FOXP3, οι οποίες οδηγούν στην απουσία των CD4⁺ CD25⁺ T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων. Οι ασθενείς εμφανίζουν ένα μεγάλο φάσμα αυτοαντισωμάτων με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I, αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα,

δερματίτιδα, αιμολυτική αναιμία, και φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, ενώ αν δεν υποβληθούν σε μεταμόσχευση μυελού των οστών, το προσδόκιμο ζωής τους είναι χαμηλό [71].

Οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην αποτυχία της ανοσορυθμιστικής δράσης των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων αφορούν διαταραχές στον αριθμό τους, διαταραχές στη λειτουργία τους και διαταραχές που επιτρέπουν στα αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα να αντιστέκονται στην κατασταλτική τους δράση [187]. Οι μηχανισμοί αυτοί έχουν μελετηθεί περισσότερο σε πειραματικά μοντέλα και λιγότερο σε ανθρώπινα αυτοάνοσα νοσήματα, όμως φαίνεται ότι ενδογενείς διαταραχές σε T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα, αυτοαντιδραστικά T λεμφοκύτταρα, αλλά και επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, σε συνδυασμό με μεταβολές της σύνθεσης του φλεγμονώδους περιβάλλοντος, έχουν ως αποτέλεσμα την κατάρρευση της ανοσολογικής ανοχής.

Μια διαταραχή του αριθμού των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων έχει ήδη αναφερθεί και είναι το σύνδρομο IPEX, όπου η παντελής έλλειψη των κυττάρων αυτών οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου *FOXP3* [71]. Εντούτοις, στα υπόλοιπα αυτοάνοσα νοσήματα σπάνια παρατηρείται καθολική απουσία των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων, όμως υπάρχει μείωση στον αριθμό τους. Βέβαια, ακόμα και σε περίπτωση που ο αριθμός τους είναι φυσιολογικός στο περιφερικό αίμα, ενδέχεται να υπάρχουν ανεπαρκείς ποσότητες στα σημεία της αυτοάνοσης φλεγμονής και να μην είναι αρκετά ώστε να καταστείλουν στην αυτοάνοση αντίδραση. Σε τέτοιες καταστάσεις, είναι δύσκολο να καθοριστεί αν για την ανεπάρκεια αυτή ευθύνεται κάποιος συστηματικός παράγοντας ή κάποιος τοπικός παράγοντας στο σημείο της φλεγμονής. Η πρόκληση αυτή περιπλέκεται περισσότερο από το γεγονός ότι το CD25 και ο FOXP3 δεν είναι απόλυτα ειδικοί δείκτες των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων, αλλά εκφράζονται και σε δραστικά T λεμφοκύτταρα [187]. Ωστόσο, η ανακάλυψη νέων βιοδεικτών, όπως το CD127, και η χρήση της κυτταρομετρίας ροής με σκοπό τη χρώση ενδοκυττάρων κυτταροκινών

βοηθούν στο διαχωρισμό των ρυθμιστικών από τα δραστικά T λεμφοκύτταρα και στην καταμέτρηση τους [188, 189].

Ο αριθμός των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων επηρεάζεται από την παραγωγή τους στο μυελό των οστών, την ωρίμανση τους στο θύμο αδένα, την επιβίωση τους στην περιφέρεια και την επέκταση τους στις περιοχές με φλεγμονή [190-192]. Οποιοσδήποτε παράγοντας ρυθμίζει την έκφραση του FOXP3 μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη και την επιβίωση του πληθυσμού αυτού. Στους παράγοντες αυτούς περιλαμβάνονται το συνδιεγερτικό σήμα CD28, ο αυξητικός παράγοντας TGF- β , οι κυτταροκίνες IL-2, IL-4, IL-7 και IL-15, καθώς και η παρουσία δενδριτικών κυττάρων [190-192]. Ελάττωση των παραγόντων αυτών μπορεί να ελαττώσει τον αριθμό των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων.

Ο δεύτερος μηχανισμός που εμπλέκεται στην ανεπάρκεια των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων είναι οι διαταραχές της λειτουργίας τους [187]. Η πειραματική επιβεβαίωση της λειτουργικής ανεπάρκειας των κυττάρων αυτών είναι ιδιαίτερα απαιτητική. Αυτή απαιτεί τη χρήση *in vitro* δοκιμασιών, οι οποίες πραγματοποιούνται με λίγα κύτταρα, λόγω του ούτως ή άλλως περιορισμένου αριθμού των ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα. Ως συνέπεια, περιορίζεται και ο τύπος, αλλά και η ποιότητα των δοκιμασιών που μπορούν να διεξαχθούν [187]. Για τη μελέτη της λειτουργίας των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων και των διαταραχών τους χρησιμοποιούνται κυρίως οι παρακάτω δύο τεχνικές: η κυτταρομετρία ροής για να καθοριστεί η ενδοκυττάρια παραγωγή κυτταροκινών και η κυτταροκαλλιέργεια T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων με T δραστικά λεμφοκύτταρα και αντιγονοπαρουσιαστικά λεμφοκύτταρα για να καθοριστεί η ικανότητα καταστολής του πολλαπλασιασμού και της παραγωγής κυτταροκινών των δραστικών κυττάρων.

Η δυσλειτουργία των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στην αυτοανοσία μπορεί να οφείλεται σε διαταραχή σε οποιονδήποτε από τους μηχανισμούς φυσιολογικής

λειτουργίας των Τ λεμφοκυττάρων [193]. Μία τέτοια διαταραχή είναι η ανεπαρκής έκφραση των επιφανειακών μορίων που μεσολαβούν την καταστολή μέσω επαφής, όπως είναι το CTLA-4, το CD39, το LAG-3, το ένζυμο granzyme A και ο υποδοχέας Fas [189, 194, 195]. Η ανεπαρκής παραγωγή των αντι-αποπτωτικών κυτταροκινών IL-10, IL-35 και TGF-β μπορεί να συμβάλει επίσης στη δυσλειτουργία των Τ ρυθμιστικών κυττάρων. Επιπλέον, η παρουσία προφλεγμονοδών κυτταροκινών, όπως ο TNF-α, IL-4, IL-6 και IL-15, στο ιστικό μικροπεριβάλλον μπορεί να καταστείλει τοπικά τη λειτουργία των Τ ρυθμιστικών κυττάρων [196-198].

Ο τρίτος και τελευταίος μηχανισμός ανεπάρκειας των Τ ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων είναι η αντίσταση των δραστικών και αυτοαντιδραστικών Τ λεμφοκυττάρων στην κατασταλτική δράση των ρυθμιστικών κυττάρων [187]. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί σε πειραματικά μοντέλα του σακχαρώδη διαβήτη τύπου Ι, του συστηματικού ερυθματώδους λύκου και της κατά πλάκας σκλήρυνσης [198-200], καθώς επίσης έχει αναφερθεί και σε αυτοάνοσα νοσήματα του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένων του σακχαρώδους διαβήτη τύπου Ι, της κατά πλάκας σκλήρυνσης, του συστηματικού ερυθματώδους λύκου και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας [201-204].

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων αναπτύσσεται η αντίσταση είναι ενδογενείς διαταραχές των δραστικών Τ λεμφοκυττάρων που δεν επιτρέπουν την απόκριση στα κατασταλτικά σήματα, αύξηση της έντασης των διεγερτικών σημάτων ή έκθεση σε αυξητικούς παράγοντες των Τ λεμφοκυττάρων [205]. Οι ενδογενείς μηχανισμοί αντίστασης στην καταστολή εμφανίζονται σε CD4+ κύτταρα μνήμης και σε Τ βοηθητικά κύτταρα 17 [206]. Οι κυτταροκίνες IL-2, IL-4, IL-7 και IL-15 ευνοούν τον πολλαπλασιασμό δραστικών Τ λεμφοκυττάρων, ακόμα και σε παρουσία Τ ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων [192]. Τέλος, η ενεργοποίηση μελών της οικογένειας

υποδοχέων του TNF μπορεί να ακυρώσει την κατασταλτική δράση των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων [207, 208].

1.4.2.9 Πολυκλωνική λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση και υπεραντιγόνα

Κάποια αυτοάνοσα νοσήματα χαρακτηρίζονται από πολυκλωνική ενεργοποίηση λεμφοκυττάρων. Το πιο κλασσικό παράδειγμα είναι ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, όπου παρατηρείται χρόνια, πολυκλωνική B λεμφοκυτταρική υπερενεργοποίηση [209], όμως ο μηχανισμός αυτός έχει συνδεθεί επίσης με την πέμφιγα, την ψωρίαση, την ατοπική δερματίτιδα και τη νόσο Kawasaki [210-212]. Η αιτία που βρίσκεται πίσω από αυτό το φαινόμενο δεν είναι πλήρως κατανοητή, όμως φαίνεται ότι προκαλείται από μικροοργανισμούς μέσω της δράσης υπεραντιγόνων (superantigens) [213].

Τα υπεραντιγόνα είναι μικροβιακά ή ιικά αντιγόνα, τα οποία συνδέονται σε ένα μόριο MHC τύπου II, αλλά όχι στη θέση αναγνώρισης του συμβατικού πεπτιδίου, ενώ επίσης αναγνωρίζονται από πολλούς TCR και όχι μονάχα από έναν TCR [214]. Η αντίδραση αυτή παράγει ένα συνδιεγερτικό σήμα που ενεργοποιεί και επάγει τον πολλαπλασιασμό πολλών λεμφοκυττάρων με διαφορετικούς TCR και, έτσι, τη δημιουργία πολλαπλών λεμφοκυτταρικών κλώνων [213, 214]. Επίσης, κάποιοι ιοί, όπως ο EBV, έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν πολλαπλά B λεμφοκύτταρα χωρίς τη δράση υπεραντιγόνων, με μη αντιγονοειδικό τρόπο μέσω του μηχανισμού της ενεργοποίησης παρακείμενων κυττάρων [215].

Σε περίπτωση που κυκλοφορούν στην περιφέρεια αυτοαντιδραστικά T ή B λεμφοκύτταρα, ο μηχανισμός της πολυκλωνικής ενεργοποίησης μπορεί να τα ενεργοποιήσει, συμβάλλοντας έτσι στην έναρξη, στη διατήρηση και στην εξέλιξη της αυτοανοσίας και των αυτοάνοσων νοσημάτων [210, 215].

1.4.2.10 Διαταραχές έκφρασης μορίων MHC

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα μόρια MHC παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία και ομοίωση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της παρουσίασης αντιγόνων στα Τ λεμφοκύτταρα [13, 27]. Η έκφραση των μορίων MHC ρυθμίζεται με ακρίβεια και περιορίζεται σε συγκεκριμένα κύτταρα και για το λόγο αυτό οι διαταραχές της συνδέονται με τη διάσπαση της ανοσολογικής αυτοανοχής.

Πολλά κύτταρα που φυσιολογικά δεν εκφράζουν μόρια HLA τύπου II, όταν ενεργοποιηθούν παράγουν τέτοια μόρια. Η έκτοπη έκφραση μορίων MHC τύπου II έχει περιγραφεί σε ηπατοκύτταρα και σε κυβικά επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων αγγείων από ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και με πρωτοπαθή χολική χολαγγειίτιδα [216, 217]. Τα κύτταρα αυτά φυσιολογικά δεν εκφράζουν μόρια MHC τύπου II, φαίνεται όμως ότι το κάνουν σε φλεγμονώδεις καταστάσεις [218]. Επίσης, ηπατικά κύτταρα ποντικών που υπερεκφράζουν μόρια MHC τύπου II έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν CD4+ Τ λεμφοκύτταρα *in vitro*, όμως η υπερέκφραση των MHC τύπου II σε ηπατοκύτταρα σε ποντίκια δεν οδηγεί σε αυτοανοσία [218]. Παρομοίως, η υπερέκφραση μορίων MHC τύπου II σε θυλακικά επιθηλιακά κύτταρα σε ποντίκια αδυνατεί να επάγει αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, όμως επιδεινώνει την κλινική εικόνα της νόσου μετά την έναρξη της [219]. Ωστόσο, η έκτοπη υπερέκφραση μορίων MHC II σε αρθρώσεις ποντικίστων πειραματικών μοντέλων της ρευματοειδούς αρθρίτιδας μπορεί να επάγει φλεγμονώδη πολυαρθρίτιδα [220]. Τα δεδομένα αυτά προτείνουν έναν νοσοειδικό ρόλο του μηχανισμού της έκτοπης και της αυξημένης έκφρασης των μορίων MHC τύπου II στην επαγωγή της αυτοανοσίας, ένας ρόλος που χρήζει περισσότερης μελέτης.

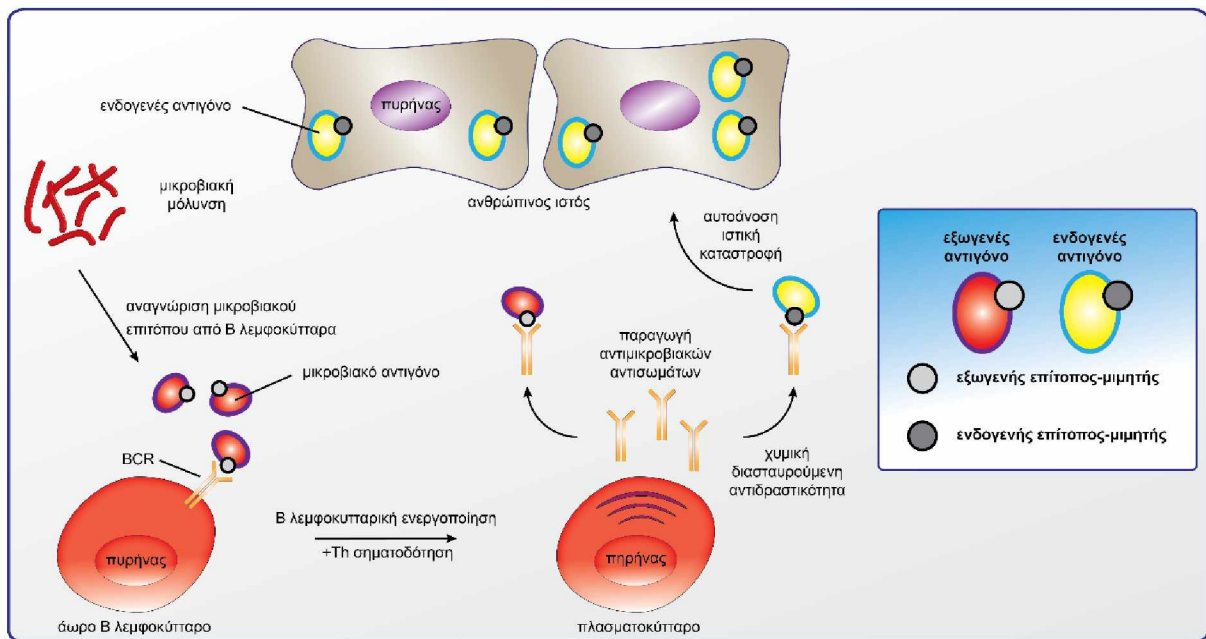
Τα μόρια MHC τύπου I φαίνεται ότι θα μπορούσαν να συμβάλλουν επίσης στη διάσπαση της ανοσολογικής ανοχής. Β παγκρεατικά κύτταρα από ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I υπερεκφράζουν μόρια MHC τύπου I, τα οποία είναι

ιδιαίτερα σταθερά και αυτό ενδέχεται να ενισχύει την αντιγονοπαρουσίαση [221]. Τέλος, η υπερέκφραση μορίων MHC I σε μυϊκά κύτταρα επιδεινώνει τη βαρύτητα της μυοσίτιδας σε πειραματικά μοντέλα [222].

1.4.2.11 Μοριακή μίμηση

Ως μοριακή μίμηση (molecular mimicry) αναφέρεται η ύπαρξη δομικής ομοιότητας ή η ομοιότητα αλληλουχίας ανάμεσα σε έναν εξωγενή και έναν ενδογενή επίτοπο που μπορεί να είναι επαρκής για να επάγει T (κυτταρική) ή B (χυμική) διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ανάμεσα στους δύο αυτούς επιτόπους [57, 223] (Εικόνα 1.4). Είναι ένας από τους κύριους μηχανισμούς αυτοανοσίας που προκαλείται από μικροβιακούς και ιικούς παράγοντες, καθώς η παρουσία μικροβιακών ή ιικών αντιγόνων μπορεί να ενεργοποιήσει αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα τα οποία δεν μπορούν να διακρίνουν το εαυτό από το ξένο και προκαλούν αυτοάνοση ιστική βλάβη ή οργανική ανεπάρκεια σε άτομα με γενετική προδιάθεση.

Εικόνα 1.4: Η μοριακή μίμηση και η χυμική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ως παθογενετικοί μηχανισμοί της αυτοανοσίας



Μια μικροβιακή μόλυνση διεγείρει την παραγωγή αντισωμάτων ειδικών έναντι αντιγόνων του μικροβίου. Σε περίπτωση δομικής ομοιότητας ή ομοιότητας αλληλουχίας ανάμεσα σε κάποιον επίτοπο ενός μικροβιακού αντιγόνου και σε κάποιον επίτοπο ενός ενδογενούς αντιγόνου, εμφανίζεται χυμική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα, δηλαδή τα αντι-μικροβιακά αντισώματα αναγνωρίζουν και αντιδρούν τόσο με το εξωγενές αντιγόνο, όσο και με το ενδογενές. Τα αυτοαντιδραστικά αντισώματα επάγουν αυτοάνοση ιστική καταστροφή ή λειτουργική ανεπάρκεια. Η μοριακή μίμηση μπορεί να προκαλείται και με ιικές λοιμώξεις. Με αντίστοιχο τρόπο, η ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων από εξωγενείς επιτόπους μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Συνομημύσεις: BCR, υποδοχέας B λεμφοκυττάρου, Th, T βοηθητικό λεμφοκύτταρο.

Η πρώτη αναφορά ανοσολογικής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας έγινε το 1962 από τους Kaplan και Meyeserian, οι οποίοι περιέγραψαν τη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ανάμεσα σε κάποιο αντιγόνο του *Streptococcus pyogenes* της ομάδα

Α και σε κάποιο συστατικό της ανθρώπινης καρδιάς σε πτωματικό παρασκεύασμα ασθενούς με ρευματικό πυρετό [224]. Βεβαίως, εκείνη την περίοδο δεν ήταν γνωστή ούτε η ταυτότητα των εμπλεκόμενων αντιγόνων, αλλά ούτε και ο βαθμός της ομολογίας ανάμεσα τους. Ο όρος μοριακή μίμηση εισήχθη στην επιστημονική βιβλιογραφία δύο χρόνια αργότερα από τον Damian για να περιγραφεί η ύπαρξη αντιγονικών καθοριστών από παράσιτα που ομοιάζουν αντιγονικούς καθοριστές των ξενιστών σε τέτοιο βαθμό, ώστε να μην επάγεται η παραγωγή αντι-παρασιτικών αντισωμάτων και έτσι τα παράσιτα να διαφεύγουν του ανοσοποιητικού συστήματος [225]. Ο Damian αναγνώρισε ότι η ύπαρξη εξωγενών αντιγόνων θα μπορούσε να προκαλέσει αυτοανοσία, όμως θεώρησε ότι ένα τέτοιο συμβάν δεν ευνοείται από τη φυσική επιλογή και την εξέλιξη των ειδών [225]. Για τις επόμενες δύο δεκαετίες, αρκετές επιδημιολογικές και πειραματικές μελέτες προσπάθησαν να διαλευκάνουν το ρόλο των μικροβίων και των ιών στην αυτοανοσία μέσω της μοριακής μίμησης και της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας. Η πρώτη απτή απόδειξη δημοσιεύθηκε το 1983 από τους Fujinami και συνεργάτες, οι οποίοι έδειξαν ότι μονοκλωνικά αντισώματα έναντι αντιγόνων του ιού της ιλαράς και του ερπητοϊού τύπου 1 αντιδρούσαν επίσης με μία πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων ανθρώπινων κυττάρων [226]. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν το όρο μοριακή μίμηση για να περιγράψουν τους κοινούς ανοσογονικούς επιτόπους ανάμεσα στα ιικά και στα ανθρώπινα αντιγόνα στο πλαίσιο αυτοανοσίας. Λίγο αργότερα, οι ίδιοι ερευνητές ανακάλυψαν ομολογία ανάμεσα σε αμινοξικές αλληλουχίες της MBP, η οποία από τότε θεωρούνταν αυτοαντιγόνο της πολλαπλής σκλήρυνσης και ήταν γνωστό ότι μπορεί να επάγει αυτοάνοση πειραματική εγκεφαλίτιδα, και της πολυμεράσης του ιού της ηπατίτιδας Β [227]. Χρησιμοποιώντας πεπτίδια-μιμητές των ομόλογων αλληλουχιών, τόσο από την MBP, όσο και την πολυμεράση του ιού της ηπατίτιδας Β, μπόρεσαν να προκαλέσουν αυτοάνοση πειραματική εγκεφαλίτιδα σε κονίκλους, αποδεικνύοντας για πρώτη φορά την

ικανότητα ενός ιού να προκαλεί ένα αυτοάνοσο νόσημα σε πειραματόζωο [227]. Έτσι, οι Fujinami και συνεργάτες επέκτειναν τη σημασία του όρου της μοριακής μίμησης, ώστε να περιλαμβάνει και τις παθογενετικές επιπτώσεις της ανοσολογικής διασταυρούμενη αντιδραστικότητας ανάμεσα σε εξωγενή αντιγόνα και σε αυτοαντιγόνα λόγω ομοιότητας στη δομή ή στην αλληλουχία.

Τα κριτήρια της μοριακής μίμησης είναι τέσσερα [57]. Το πρώτο είναι η ομοιότητα ανάμεσα σε έναν επίτοπο του ξενιστή και σε έναν επίτοπο μικροβίου, ιού ή άλλου περιβαλλοντικού παράγοντα. Το δεύτερο είναι η ανίχνευση αντισωμάτων ή Τ λεμφοκυττάρων που αντιδρούν και με τους δύο επιτόπους σε ασθενείς με κάποιο αυτοάνοσο νόσημα. Το τρίτο είναι η επιδημιολογική σύνδεση ανάμεσα στην έκθεση στο και στην ανάπτυξη του αυτοάνοσου νοσήματος. Το τελευταίο είναι η αναπαραγωγή της αυτοανοσίας στο αντίστοιχο πειραματικό μοντέλο μετά από ευαισθητοποίηση με τον υπεύθυνο επίτοπο, με τη μορφή μόλυνσης με το μικροβιακό ή ιικό παράγοντα, χορήγησης του μικροβιακού ή ιικού αντιγόνου ή χορήγησης πεπτιδίων του επιτόπου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα περιπτώσεων που πληρούν και τα τέσσερα αυτά κριτήρια είναι η ανάπτυξη του συνδρόμου Guillain-Barré έπειτα από μόλυνση με το *Campylobacter jejuni* και η σχέση ανάμεσα στην κατά πλάκας σκλήρυνση και την πρωτεΐνη του αγελαδινού γάλακτος βουτυροφιλίνη [101, 228]. Και τα δύο παραδείγματα περιγράφονται με περισσότερη λεπτομέρεια παρακάτω. Εντούτοις, τα κριτήρια αυτά είναι ιδιαίτερα δύσκολο να αποδειχθούν στις περισσότερες περιπτώσεις, καθώς η έκθεση στον υπεύθυνο μολυσματικό παράγοντα μπορεί να έχει λάβει χώρα αρκετά χρόνια πριν την έναρξη της κλινικής εικόνας [57]. Επίσης, μολονότι όλοι οι άνθρωποι μολύνονται από πολλαπλούς μικροβιακούς και ιικούς παράγοντες κατά τη διάρκεια της ζωής τους, οι παράγοντες αυτοί δε θα προκαλέσουν κάποιο αυτοάνοσο νόσημα σε όλους [57].

Η μοριακή μίμηση εμφανίζεται ως μία από τις παρακάτω τέσσερις μορφές. Η πρώτη μορφή αντιστοιχεί σε πλήρη ομοιότητα σε πρωτεϊνικό επίπεδο ανάμεσα στο μολυσματικό παράγοντα και στον ξενιστή και αφορά πρωτεΐνες που δεν εκφράζονται από το μολυσματικό παράγοντα, αλλά από τον ξενιστή, όπως συμβαίνει σε περιπτώσεις ενσωμάτωσης ανθρώπινων πρωτεϊνών στο φάκελο ιών [229]. Για παράδειγμα, ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός έχει την ικανότητα να ενσωματώνει την ανθρώπινη πρωτεΐνη αμινοπεπτιδάση N, γνωστή και ως CD13, στο φάκελο του κατά τη συναρμολόγηση του. Η πρωτεΐνη αυτή, αν και ενδογενής, αναγνωρίζεται ως εξωγενές αντιγόνο από το ανοσοποιητικό σύστημα και επάγει την παραγωγή αντιγονοειδικών αντισωμάτων, τα οποία στρέφονται επίσης εναντίον εαυτών κυττάρων που εκφράζουν το CD13. Τα αντισώματα αυτά φαίνεται ότι έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή που εμφανίζεται μετά από μεταμοσχεύσεις [229].

Η δεύτερη μορφή μοριακής μίμησης αφορά πρωτεΐνες που εκφράζονται από έναν μικρόβιο ή έναν ιό και είναι ομόλογες με πρωτεΐνες του ξενιστή [230]. Τέτοια περίπτωση αποτελεί η καρβονική ανυδράση του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* και η ομόλογη της ανθρώπινη καρβονική ανυδράση II [230]. Αυτοαντισώματα έναντι της καρβονικής ανυδράσης II ανιχνεύονται στην αυτοάνοση παγκρεατίτιδα [231]. Το νόσημα αυτό έχει συσχετιστεί με τη μόλυνση από το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* [232]. Οι ομόλογες αλληλουχίες ανάμεσα στις δύο καρβονικές ανυδράσεις περιέχουν το μοτίβο πρόσδεσης του μορίου HLA-DRB1*04:05 [230], το οποίο έχει προταθεί ως παράγοντας κινδύνου της αυτοάνοσης παγκρεατίτιδας [233]. Έτσι, η έκφραση από ένα μικροοργανισμό μιας πρωτεΐνης που εμφανίζει ομολογία με μια πρωτεΐνη του ξενιστή φαίνεται ότι μπορεί να προκαλέσει αυτοάνοση αντίδραση στον ξενιστή.

Η τρίτη μορφή μοριακής μίμησης χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη κοινών ή όμοιων αλληλουχιών αμινοξέων ανάμεσα σε μικροβιακές ή ιικές πρωτεΐνες και σε πρωτεΐνες

του ξενιστή [228]. Η μορφή αυτή φαίνεται ότι είναι η πιο συχνή που συναντάται σε αυτοάνοσα νοσήματα, ή τουλάχιστον αυτή που έχει αναφερθεί περισσότερο. Ένα παράδειγμα αυτής της μορφής μοριακής μίμησης έχει αναφερθεί ανάμεσα στη βουτυροφιλίνη του αγελαδινού γάλακτος και στην MOG στην κατά πλάκας σκλήρυνση [228]. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες ανήκουν στην ίδια πρωτεϊνική οικογένεια και μοιράζονται κοινές αμινοξικές αλληλουχίες και δομικές ομοιότητες [234]. Η MOG είναι γνωστό υποψήφιο αυτοαντιγόνο της κατά πλάκας σκλήρυνσης, καθώς αντι-MOG αυτοαντισώματα και T λεμφοκύτταρα ανιχνεύονται σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση, ενώ επίσης η χορήγηση MOG σε τρωκτικά και κονίκλους προκαλεί πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα, δηλαδή το πειραματικό μοντέλο της κατά πλάκας σκλήρυνσης [235-237]. Ομοίως, η χορήγηση βουτυροφιλίνης σε πειραματόζωα μπορεί να προκαλέσει μια υποκλινική μορφή εγκεφαλίτιδας με παρουσία ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων έναντι της MOG, ενώ σχετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύνδεση που έχει αναφερθεί ανάμεσα στην κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων και στην κατά πλάκας σκλήρυνση [238, 239]. Η ανίχνευση αντισωμάτων που αντιδρούν τόσο με τη MOG, όσο και με τη βουτυροφιλίνη εντός του κεντρικού νευρικού συστήματος ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση αποτελεί σαφή ένδειξη της συμμετοχής των αντισωμάτων αυτών στην παθογένεια της νόσου μέσω του μηχανισμού της μοριακής μίμησης [228].

Η τρίτη μορφή της μοριακής μίμησης δεν εμφανίζεται μονάχα με ομοιότητες σε επίπεδο αμινοξέων και πρωτεϊνών, αλλά εμφανίζεται και με ομοιότητες σε άλλα βιολογικά μακρομόρια, όπως στους πολυσακχαρίτες. Ομοιότητες ανάμεσα σε κατάλοιπα σακχάρων που οδηγούν σε ανοσολογική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα εμφανίζονται στο σύνδρομο Guillain-Barré, ανάμεσα σε έναν λιποπολυσακχαρίτη του βακτηρίου *Campylobacter jejuni* και στο γαγγλιοσίδιο GM1, ένα γλυκοσφιγγολιπίδιο που εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη νευραξόνων των περιφερικών νεύρων

[240]. Τα δύο πολυσακχαρδικά μόρια φέρουν όμοιους επιτόπους που περιέχουν κοινή γραμμική αλληλουχία σακχάρων και αναγνωρίζονται από διασταυρούμενα αντισώματα. Επιδημιολογικές μελέτες, ορολογικές μελέτες και μελέτες σε πειραματόζωα έχουν επιβεβαιώσει ότι η μοριακή μίμηση στην περίπτωση αυτή είναι ο μηχανισμός που βρίσκεται πίσω από την ανάπτυξη του συνδρόμου Guillain-Barré έπειτα από έκθεση στο *Campylobacter jejuni* [240, 241].

Η τελευταία μορφή μοριακής μίμησης έχει αναφερθεί σε δομικές ομοιότητες ανάμεσα σε μικροβιακά ή ιικά αντιγόνα και σε αντιγόνα του ξενιστή [242, 243]. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η κυτταρική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα σε ασθενή με κατά πλάκας σκλήρυνση ανάμεσα στο πεπτίδιο 85-99 της MBP προσδεμένο στο μόριο HLA-DRB1*15:01 και στο πεπτίδιο 627-641 της DNA πολυμεράσης του EBV προσδεμένο στο μόριο HLA-DRB5*01:01 [242]. Ο κρυσταλλογραφικός καθορισμός της τριτοταγούς δομής των συμπλόκων HLA-DRB1*15:01-MBP και HLA-DRB5*01:01-EBV DNA πολυμεράση αποκάλυψε σημαντική δομική ομοιότητα στην επιφάνεια επαφής τους με τον TCR και τέσσερα όμοια σημεία επαφής ανάμεσα στον TCR και στο κάθε πεπτίδιο, αποδεικνύοντας έτσι τη δομική βάση της μοριακής μίμησης και της κυτταρικής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας [242]. Με αντίστοιχο τρόπο έχει αποδειχθεί η μοριακή μίμηση και η χυμική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ανάμεσα σε μία ανοσοεπικρατή πρωτεΐνη του ανθρώπινου Τ-λεμφοτρόπου ιού τύπου 1 (human T-lymphotropic virus type 1, HTLV-1) και στην ανθρώπινη πυρηνική ριβονουκλεοτιδική πρωτεΐνη hnRNP-A1 [243]. Ο HTLV-1 προκαλεί την τροπική σπαστική παραπάρεση, μία προϊούσα αυτοάνοση μυελοπάθεια, που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα αντι-hnRNP-A1 αντισωμάτων στον ορό, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στο εγκεφαλικό παρέγχυμα [243]. Παρά την απουσία ομοιότητας ανάμεσα στις αλληλουχίες της πρωτεΐνης του HTLV-1 και της ανθρώπινης hnRNP-A1, αντισώματα έναντι της hnRNP-A1 που απομονώθηκαν από ασθενείς αντιδρούσαν και με την ιική πρωτεΐνη, ενώ τα

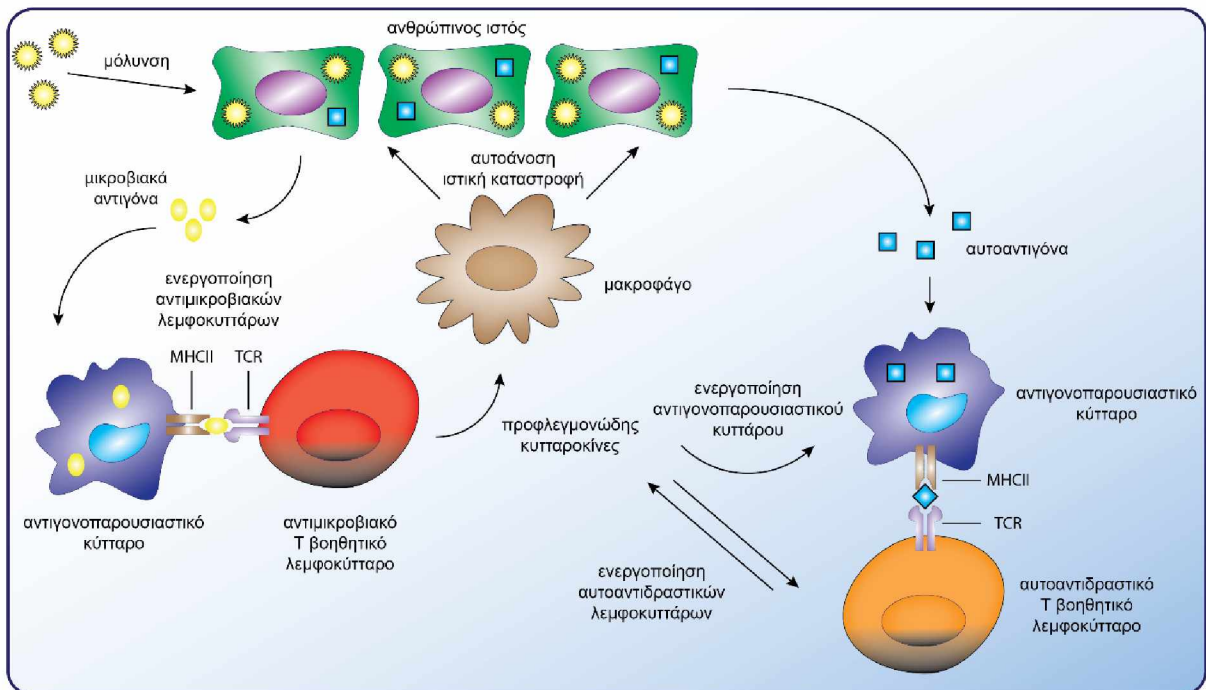
αντισώματα αυτά είχαν την ικανότητα αναστολής της ηλεκτρικής νευρωνικής δραστηριότητας όταν προστέθηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες νευρικών κυττάρων [243]. Κλείνοντας την ενότητα αυτή, αξίζει να αναφερθεί η διαφορά ανάμεσα στη χυμική και στην κυτταρική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Οι αντιγονικοί επίτοποι που συμμετέχουν στη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα δεν αναγνωρίζονται πάντα και από T και από B λεμφοκύτταρα [244, 245]. Αυτό οφείλεται στη φύση των επιτόπων, όπως έχει παρουσιαστεί στην Ενότητα 1.4.1.2, αλλά και στη φύση της αλληλεπίδρασης των BCR και TCR με τον επίτοπο [246-248]. Στην πρώτη περίπτωση η αλληλεπίδραση αφορά αποκλειστικά τον BCR και ολόκληρο αντιγόνο και είναι υψηλής ειδικότητας σύνδεσης «δίκην κλειδιού-κλειδαριάς» [246], ενώ στη δεύτερη περίπτωση η αλληλεπίδραση αφορά τον TCR, το αντιγόνο σε μορφή πεπτιδίων, αλλά και μόρια MHC που παρουσιάζουν τα πεπτίδια στον TCR και εμφανίζει εκφύλιση ως προς τη σύνδεση [247, 248]. Δηλαδή, οι επίτοποι που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα πρέπει να είναι δομικά όμοιοι, ενώ αντίθετα μικρές αλλαγές στη θέση αναγνώρισης του TCR είναι ανεκτές.

1.4.2.12 Ενεργοποίηση παρακείμενων κυττάρων

Η ενεργοποίηση παρακείμενων κυττάρων είναι ακόμα ένας μηχανισμός αυτοανοσίας που έχει προταθεί και εμπλέκει τη συμμετοχή μικροβίων και ιών [249]. Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, ένας μολυσματικός παράγοντας μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση ανεργικών παρακείμενων λεμφοκυττάρων, τα οποία δεν είναι ειδικά για τον παράγοντα, μέσω της ενεργοποίησης της έμφυτης ανοσίας, της ενεργοποίησης αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και της απελευθέρωσης προφλεγμονωδών κυτταροκινών [249]. Σε περίπτωση που κάποια από τα παρακείμενα λεμφοκύτταρα είναι αυτοαντιδραστικά, η ενεργοποίησή τους οδηγεί σε αυτοάνοση ιστική βλάβη ή λειτουργική ανεπάρκεια (Εικόνα 1.5).

Η ενεργοποίηση των παρακείμενων λεμφοκυττάρων μπορεί να γίνεται μέσω του TCR ή ανεξάρτητα. Η πρώτη περίπτωση μεσολαβείται από την ενεργοποίηση αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, ιδιαίτερα δενδριτικών κυττάρων. Μικρόβια και ιοί έχουν την ικανότητα να προκαλούν σημαντική ενεργοποίηση δενδριτικών κυττάρων με αυξορρύθμιση των μορίων MHC και των συνδिएεργητικών μορίων [249]. Αυτού του είδους ενεργοποίηση παρακείμενων κυττάρων φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές αυτοάνοσες αντιδράσεις. Αντίθετα, η ενεργοποίηση παρακείμενων κυττάρων που δεν εξαρτάται από τον TCR επιτυγχάνεται μέσω της δράσης κυτταροκινών και χημειοκινών, όπως ιντερφερόνες, η IL-12, η IL-7, η IL-15, η χημειοκίνη CCL5 και η φλεγμονώδης πρωτεΐνη 10 [98, 249, 250]. Ωστόσο, φαίνεται ότι οι κυτταροκίνες και οι χημειοκίνες δεν έχουν την ικανότητα να ενεργοποιήσουν πλήρως τα αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα επί απουσίας αυτοαντιγόνου [251, 252], αν και υπάρχουν αναφορές για αμιγώς TCR-ανεξάρτητη ενεργοποίηση παρακείμενων αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων [253, 254].

Εικόνα 1.5: Η ενεργοποίηση παρακείμενων κυττάρων ως παθογενετικός μηχανισμός της αυτοανοσίας. Η ενεργοποίηση αντιμικροβιακών ή αντιικών Τ βοηθητικών λεμφοκυττάρων προκαλεί φλεγμονώδη αντίδραση



Η ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας, η ενεργοποίηση αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και η απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών μπορούν να ενεργοποιήσουν παρακείμενα αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα που δεν είναι ειδικά για το μικρόβιο ή για τον ιό. Τα αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα επάγουν την αυτοάνοση ιστική βλάβη ή την αυτοάνοση λειτουργική ανεπάρκεια.

1.4.2.13 Θεωρία γόνιμου πεδίου

Η θεωρία του γόνιμου πεδίου δεν αποτελεί πειραματικά αποδεδειγμένο μηχανισμό αυτοανοσίας, αλλά ένα μοντέλο που έχει σχηματιστεί για να εξηγήσει πως τα μικρόβια και οι ιοί προκαλούν την εμφάνιση και την εξέλιξη των αυτοάνοσων νοσημάτων [98]. Η θεωρία βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στη μοριακή μίμηση και στην ενεργοποίηση παρακείμενων κυττάρων.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο κάθε ανθρώπινος οργανισμός εκτίθεται επανειλημμένως σε πλήθος πιθανών αντιγόνων, ανάμεσα τους αυτοαντιγόνα, χωρίς να επάγεται καμία ανοσολογική αντίδραση. Ωστόσο, κάτω από ορισμένες συνθήκες κατά τη στιγμή της έκθεσης στο αντιγόνο, η ανοσολογική αντίδραση μπορεί να είναι τελείως διαφορετική. Σύμφωνα με τη θεωρία, μία μικροβιακή ή ιική μόλυνση την κατάλληλη στιγμή μπορεί να δημιουργήσει τέτοιες συνθήκες, συνθέτοντας ένα γόνιμο ανοσολογικό πεδίο που επιτρέπει την εκδήλωση ανοσολογικής αντίδρασης κατά του αντιγόνου αυτού. Αν το αντιγόνο είναι ενδογενές, τότε εκδηλώνεται αυτοάνοση αντίδραση. Το γόνιμο πεδίο που δημιουργείται είναι παροδικό, τοπικό και ευμετάβλητο, ανάλογα με τις φλεγμονώδεις συνθήκες στην περιοχή. Η παρουσία ανοσογονικών καθοριστών στο πεδίο αυτό εξαρτάται από την ανατομική περιοχή του πεδίου, το είδος των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στη δημιουργία του, αλλά και από τις φλεγμονώδεις συνθήκες στην περιοχή, οι οποίες καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την αντιγονοπαρουσίαση.

Σε περίπτωση που ο εξωγενής μολυσματικός παράγοντας που δημιουργεί το γόνιμο πεδίο φέρει αντιγόνα με δομική ομοιότητα ή ομοιότητα στην αλληλουχία με κάποιο αυτοαντιγόνο, τότε η μοριακή μίμηση ευθύνεται για τη δημιουργία των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων. Στην περίπτωση αυτή, τα αυτοαντιδραστικά κύτταρα θα αντιδρούν και με εξωγενή αντιγόνα. Στην αντίθετη περίπτωση, τα αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα δε θα αντιδρούν με κάποιο εξωγενές αντιγόνο και για την ενεργοποίησή τους ευθύνεται ο μηχανισμός της ενεργοποίησης της παρακείμενης φλεγμονής, είτε μέσω του TCR επί παρουσίας του αυτοαντιγόνου-στόχου ή ανεξάρτητα από τον TCR. Ωστόσο, οι δύο αυτοί μηχανισμοί είναι πιθανό να δρουν ταυτόχρονα: η μοριακή μίμηση επάγει τα αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα, όμως απαιτείται η παρακείμενη φλεγμονή για την πλήρη ενεργοποίησή τους.

Η θεωρία του γόνιμου πεδίου προσπαθεί επίσης να εξηγήσει πως η εμφάνιση ενός αυτοάνοσου νοσήματος πολλές φορές έπεται σημαντικά της εμφάνισης της αυτοαντιδραστικότητας. Αρχικά, η δημιουργία ενός γόνιμου πεδίου οδηγεί στην εμφάνιση των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων, μέσω μοριακής μίμησης ή ενεργοποίησης παρακείμενων κυττάρων, χωρίς όμως την εμφάνιση αυτοαντιδραστικότητας. Η μετάβαση στην αυτοαντιδραστικότητα γίνεται σε δεύτερο στάδιο, λόγω μιας μόλυνσης από τον ίδιο ή διαφορετικό μολυσματικό παράγοντα που μπορεί να συμβεί αρκετά χρόνια μετά. Είναι επίσης πιθανό να απαιτούνται περισσότεροι του ενός μολυσματικοί παράγοντες ώστε να ενεργοποιηθούν τα αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα. Αυτό σημαίνει ότι για την εμφάνιση των αυτοάνοσων νοσημάτων δεν ευθύνεται ένας αποκλειστικά μολυσματικός παράγοντας, αλλά αρκετοί και διαφορετικοί μολυσματικοί παράγοντες μπορούν να συμβάλλουν στην παθογένεια. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να εξηγήσει γιατί ακόμα και σήμερα είναι σχεδόν αδύνατο να προσδιοριστεί ένας και μόνο μικροβιακός ή ιικός παθογενετικός παράγοντας για τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα.

1.5 Κατά πλάκας σκλήρυνση

1.5.1 Εισαγωγή και επιδημιολογία της κατά πλάκας σκλήρυνσης

Η κατά πλάκας σκλήρυνση αποτελεί ένα χρόνιο αυτοάνοσο νόσημα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) [255, 256]. Είναι γνωστή και ως πολλαπλή σκλήρυνση και περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Robert Carswell το 1838 [257].

Η κατά πλάκας σκλήρυνση είναι μια από τις πιο κοινές νευρολογικές παθολογικές καταστάσεις και αποτελεί την κυρίαρχη αιτία μη τραυματικής νευρολογικής αναπηρίας σε ενήλικες νεαρής ηλικίας [258]. Σύμφωνα με επιδημιολογικά στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, το 2013 υπήρχαν 2.3 εκατομμύρια ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση στον κόσμο, με τον επιπολασμό να κυμαίνεται μεταξύ 2.1-140 ανά 100.000 κατοίκους ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή και την επίπτωση 4.8 νέες

περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους ανά έτος [256, 258]. Στην Ελλάδα υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου 8.000 ασθενείς, με τον επιπολασμό να είναι 70 ασθενείς ανά 100.000 κατοίκους και την επίπτωση 7 νέα περιστατικά ανά 100.000 κατοίκους ανά έτος [256, 259, 260]. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, υπάρχει μια επικράτηση του νοσήματος σε ασθενείς του γυναικείου φύλου έναντι του αντρικού, με το λόγο γυναίκες προς άντρες σε παγκόσμιο επίπεδο να είναι 2.3 και σε πανελλαδικό επίπεδο 1.4 [256]. Τέλος, Η μέση ηλικία εμφάνισης της πολλαπλής σκλήρυνσης το 2013 σε παγκόσμιο επίπεδο ήταν τα 30 έτη και σε πανελλαδικό επίπεδο τα 27 έτη [256]. Αυτό σημαίνει ότι η κατά πλάκας σκλήρυνση είναι ένα νόσημα των νεαρών ηλικιών, αν και η κλινική έναρξη μπορεί να συμβεί και σε μικρότερες ή μεγαλύτερες ηλικίες. Οι ασθενείς ζουν με μια μη-ιάσιμη, προοδευτικά επιδεινούμενη παθολογική κατάσταση για πολλά έτη. Δυστυχώς, οι περισσότεροι ασθενείς κατά την έναρξη της νόσου βρίσκονται στην πλέον παραγωγική και αναπαραγωγική ηλικία της ζωής τους και η νόσος επηρεάζει σημαντικά την κοινωνική, οικονομική και οικογενειακή κατάσταση τους.

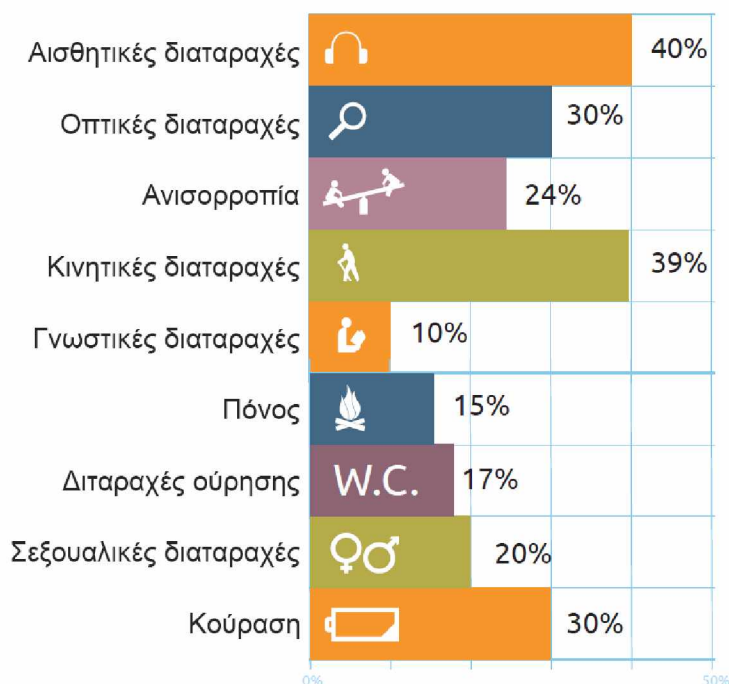
1.5.2 Κλινική εικόνα της κατά πλάκας σκλήρυνσης

Τα συμπτώματα και τα σημεία της κατά πλάκας σκλήρυνσης είναι διάφορα και εξαρτώνται από τις περιοχές και τις νευρικές οδούς του ΚΝΣ που προσβάλλονται (Πίνακας 1.1) [255, 261]. Πιο συχνά εμφανίζονται οι αισθητικές διαταραχές (40%) και οι κινητικές διαταραχές (39%), ακολουθούν οι διαταραχές της όρασης (30%), η κούραση (30%) και η ανισοροπία (24%), ενώ λιγότερο συχνές είναι οι σεξουαλικές διαταραχές (20%), οι διαταραχές της ούρησης (17%), ο πόνος (15%) και οι γνωστικές διαταραχές (10%) (Εικόνα 1.6).

Πίνακας 1.1: Συμπτώματα και σημεία της κατά πλάκας σκλήρυνσης ανάλογα με την προσβληθείσα περιοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Περιοχή	Συμπτώματα	Σημεία
Πρόσθιος εγκέφαλος	Γνωστικές διαταραχές Αισθητικές διαταραχές Κινητικές διαταραχές Διαταραχές διάθεσης, κατάθλιψη Επιληψία	Έλλειμα προσοχής και λογικής Διαταραχή εκτελεστικών λειτουργιών Άνοια
Οπτικό νεύρο	Απώλεια όρασης	Σκότωμα όρασης Ελαττωμένη οπτική οξύτητα Ελαττωμένη έγχρωμη όραση Ελαττωμένο ανακλαστικό κόρης
Παρεγκεφαλίδα	Τρόμος Ασάθεια Ανισορροπία	Τρόμος κατά τη στάση ή/και την κίνηση Δυσαρθρία Έλλειψη συγχρονισμού άκρων Αταξία βαδίσματος
Εγκεφαλικό στέλεχος	Διπλωπία Ίλιγγος Διαταραχή ή αδυναμία κατάποσης Διαταραχές ομιλίας Συναισθηματική ασάθεια	Νυσταγμός Οφθαλμοπληγία Δυσαρθρία
Σπονδυλική στήλη	Αδυναμία Ακαμψία Επώδυνοι σπασμοί Δυσλειτουργία ουροδόχου κύστης Στυτική δυσλειτουργία Ακράτεια κοπράνων	Σημεία βλάβης ανώτερου κινητικού νευρώνα Σπαστικότητα
Λοιπά	Πόνος Κούραση Ευαισθησία σε αλλαγές θερμοκρασίας	

Εικόνα 1.6: Συχνότητα εμφάνισης κλινικών χαρακτηριστικών σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνσης.



Η κατά πλάκας σκλήρυνση ταξινομείται φαινοτυπικά σε κλινικές μορφές με βάση την κλινική εικόνα του ασθενούς και την κλινική ενεργότητα της νόσου (Εικόνα 1.7) [255]. Η πιο συχνή κλινική μορφή της νόσου στην πρώτη διάγνωση είναι η υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα πολλαπλή σκλήρυνση (relapse-remitting multiple sclerosis, RRMS), κατά την οποία η νόσος περνάει από στάδια εξάρσεων με ενδιάμεσες περιόδους κλινικής ύφεσης. Η συχνότητα και η διάρκεια των εξάρσεων διαφέρει σε κάθε ασθενή, ενώ συνήθως η κλινική βαρύτητα των εξάρσεων επιδεινώνεται με την πάροδο του χρόνου. Από τους ασθενείς αυτούς, το 80% θα μεταβεί στη δευτεροπαθώς προϊούσα κλινική μορφή (secondary progressive multiple sclerosis, SPMS), κατά την οποία η εξέλιξη του νοσήματος επιδεινώνεται σταδιακά χωρίς κλινικές υφέσεις. Η μετάβαση στον υπότυπο αυτό δεν μπορεί να προβλεφθεί, αλλά με την κατάλληλη θεραπευτική αγωγή αυτή μπορεί παραταθεί σημαντικά. Η τρίτη συχνότερη κλινική μορφή του νοσήματος προσβάλλει το 10% των ασθενών στην πρώτη διάγνωση, είναι η πιο καταστροφική

κλινική μορφή και ονομάζεται πρωτοπαθώς προϊούσα πολλαπλή σκλήρυνση (primary progressive multiple sclerosis, PPMS). Ασθενείς με τον υπότυπο αυτό εμφανίζουν προοδευτική επιδείνωση της αναπηρίας από την έναρξη της νόσου χωρίς παρουσία υποτροπών. Τέλος, η λιγότερο συχνή μορφή της νόσου ονομάζεται προϊούσα υποτροπιάζουσα πολλαπλή σκλήρυνση και χαρακτηρίζεται από σταθερή εξέλιξη της αναπηρίας, αλλά με σαφείς κύκλους εξάρσεων και υφέσεων. Οι συχνότητες εμφάνισης της κάθε κλινικής μορφής είναι ίδιες σε όλο τον κόσμο και δεν επηρεάζονται από το φύλλο.

Εικόνα 1.7: Η εξέλιξη (A) και η συχνότητα εμφάνισης (B) των κλινικών μορφών της κατά πλάκας σκλήρυνσης.



1.5.3 Αιτιολογικοί παράγοντες της κατά πλάκας σκλήρυνσης

Παρά τις σημαντικές εξελίξεις που έχουν σημειωθεί τις τελευταίες δεκαετίες στο πεδίο έρευνας της κατά πλάκας σκλήρυνσης, οι παράγοντες που την προκαλούν δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Ωστόσο, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για αρκετούς ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη του νοσήματος. Η παθογένεση της κατά πλάκας σκλήρυνσης, όπως συμβαίνει και με τα υπόλοιπα αυτοάνοσα νοσήματα, περιλαμβάνει τη σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων που οδηγεί σε διαταραγμένους

ανοσορρυθμιστικούς μηχανισμούς και στην κατάργηση της ανοσολογικής ανοχής εναντίον εαυτών μορίων και κυττάρων.

Ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου εμφάνισης της νόσου είναι η γενετική προδιάθεση [255, 261]. Η αυξημένη κληρονομικότητα της νόσου που παρατηρείται ενδοοικογενειακά και η σταδιακή μείωση του ρίσκου καθώς αυξάνεται ο βαθμός συγγένειας αποτελούν τη βάση της θεωρίας ότι οι ασθενείς είναι γενετικά προδιατεθειμένοι. Η πιθανότητα ένας ασθενής να έχει θετικό οικογενειακό ιστορικό για τη νόσο αυτή ανέρχεται στο 20% και η νόσος εμφανίζεται στο 9% των παιδιών από μητέρα και πατέρα με πολλαπλή σκλήρυνση, ενώ στο γενικό πληθυσμό η πιθανότητα εμφάνισης είναι 1/750 [255, 261]. Επίσης, μελέτες διδύμων αποκάλυψαν ότι ο κίνδυνος ανέρχεται στο 30% για μονοζυγωτικά δίδυμα και στο 5% για διζυγωτικά δίδυμα [261].

Ο γενετικός τύπος HLA του χρωμοσώματος 6 που περιέχει τα γονίδια MHC έχει συσχετισθεί σημαντικά με την πολλαπλή σκλήρυνση και πιστεύεται ότι ευθύνεται για το 20-30% της γενετικής προδιάθεσης στο νόσημα [262]. Οι φορείς του αλληλόμορφου HLA-DRB1*15:01 εμφανίζουν το μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης της κατά πλάκας σκλήρυνσης, όμως θετική σύνδεση με τη νόσο εμφανίζουν επίσης οι απλότυποι HLA-DR15, HLA-DR16 και HLA-DQ6, καθώς και τα αλληλόμορφα HLA-DQA1*01:02 και HLA-DQB2*06:02 [261, 263, 264]. Μελέτες GWAS έχουν αναγνωρίσει μια πλειάδα γονιδίων που συμμετέχουν στην παθογένεση της κατά πλάκας σκλήρυνσης, όπως τα *IL12RA* και *IL7RA* (υποδοχείς των IL-12 και IL-7, αντίστοιχα), το *CD58* (πρωτεΐνη κυτταρικής προσκόλλησης σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα), το *TYK2* (κινάση τυροσίνης), το *STAT3* και το *TNFRSF1A* (υποδοχέας του TNFα) [265, 266]. Αρκετά από τα γονίδια αυτά εμφανίζονται και σε Έλληνες ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση, σύμφωνα με τους Χατζηγεωργίου και συνεργάτες, οι οποίοι εντόπισαν επίσης μεταλλάξεις στα γονίδια *RGS1*, *IRF8*, *TAGAP*, *METTL1/CYP27B1* και *DLEU1*

στους Έλληνες ασθενείς [267]. Όλα τα παραπάνω γονίδια κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη ρύθμιση και στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

Ένας ακόμα ενδογενής παράγοντας που έχει συνδεθεί με την κατά πλάκας σκλήρυνση είναι η παχυσαρκία, ιδιαίτερα όταν εμφανίζεται σε νεαρή ηλικία [95, 268]. Τόσο παχύσαρκα, όσο και υπέρβαρα ασυμπτωματικά άτομα κατά την παιδική και την εφηβική ηλικία διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου αργότερα στη ζωή τους σε σχέση με άτομα της ίδιας ηλικίας με φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος.

Όσον αφορά τους περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου της κατά πλάκας σκλήρυνσης, αυτοί είναι το κάπνισμα, τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D, ο EBV και τα αντισώματα έναντι του EBV και άλλοι λοιμογόνοι παράγοντες [268, 269]. Ο ρόλος του EBV και άλλων λοιμογόνων μικροβίων και ιών, όπως το Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού, θα αναλυθούν με λεπτομέρειες σε επόμενες ενότητες.

Ο κίνδυνος που σχετίζεται με το κάπνισμα αυξάνεται αναλογικά με τη διάρκεια και την ένταση του καπνίσματος, ενώ η διακοπή του καπνίσματος από ασθενείς οδηγεί σε καλύτερη πρόγνωση και εξέλιξη της νόσου [270, 271].

Η έλλειψη της βιταμίνης D σχετίζεται με ελαττωμένη έκθεση στον ήλιο, με μειωμένη φυσιολογική παραγωγή σε άτομα με σκούρο δέρμα, με μειωμένη πρόσληψη με τη δίαιτα ή με μεταλλάξεις σε γονίδια του μεταβολισμού της. Καθώς υπάρχει η υπόθεση ότι η κατανομή της κατά πλάκας σκλήρυνσης ακολουθεί το πλάτος της Γης και δεδομένο ότι αυτό καθορίζει την έκθεση στον ήλιο, έχει προταθεί ότι η γεωγραφική κατανομή του νοσήματος σχετίζεται με την έλλειψη της βιταμίνης D σε περιοχές με χαμηλή ηλιοφάνεια [255, 272]. Επιπρόσθετα, σε περιοχές με χαμηλή ηλιοφάνεια, η προσθήκη της βιταμίνης D στη δίαιτα μειώνει τη συχνότητα εμφάνισης [273]. Σε κάθε περίπτωση, τα χαμηλά επίπεδα της βιταμίνης D φαίνεται ότι προδιαθέτουν για κατά πλάκας σκλήρυνση και τα υψηλά επίπεδα προστατεύουν [269, 274].

Οι παραπάνω παράγοντες είναι ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου της κατά πλάκας σκλήρυνσης, όμως η αλληλεπίδραση κάποιων από αυτούς είναι αθροιστική και αυξάνει σημαντικά το συνολικό κίνδυνο ανάπτυξης του νοσήματος. Τέτοια παραδείγματα αύξησης του κινδύνου έχουν αναφερθεί επί παρουσίας υψηλών τίτλων IgG αντι-EBV αντισωμάτων σε ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο HLA-DRB1*15:01 [275-277] και επί παρουσίας υψηλών τίτλων IgG αντι-EBV αντισωμάτων σε ασθενείς καπνιστές [278].

1.5.4 Παθογένεση της κατά πλάκας σκλήρυνσης

Η παθογένεση της κατά πλάκας σκλήρυνσης χαρακτηρίζεται από έναν καταρράκτη παθολογικών διεργασιών που οδηγούν στην απομυελινοποίηση των νευρικών αξόνων στο ΚΝΣ και στη νευρική εκφύλιση [57, 279, 280]. Οι διεργασίες αυτές περιλαμβάνουν αρχικά την επαγωγή αυτοαντιδραστικών Τ λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια, τη μετακίνηση των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων και άλλων λευκοκυττάρων μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, την ενεργοποίησή τους και την έναρξη φλεγμονώδους αντίδρασης με στόχο το έλυτρο της μυελίνης των νευρικών αξόνων. Με την πρόοδο του νοσήματος παρατηρείται τόσο στις εστίες της φλεγμονής, όσο και στο υπόλοιπο εγκεφαλικό παρέγχυμα, η ενεργοποίηση μικρογλοιακών κυττάρων, η διαταραχή της μιτοχονδριακής δραστηριότητας στους νευρώνες, η αύξηση της συγκέντρωσης του νατρίου και ασβεστίου στον ενδοκυττάριο χώρο και του γλουταμικού στον εξωκυττάριο χώρο, καθώς και η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός αστροκυττάρων με αποτέλεσμα τη σκληρυντική γλοΐωση.

Τα CD4+ Τ λεμφοκύτταρα θεωρείται ότι παίζουν κομβικό ρόλο στην κατά πλάκας σκλήρυνση [57]. Η επαγωγή αυτοαντιδραστικών CD4+ Τ λεμφοκυττάρων συμβαίνει στην περιφέρεια και αρκετοί μηχανισμοί έχουν προταθεί ότι συμμετέχουν σε αυτήν, ανάμεσα τους η μοριακή μίμηση, όπως θα παρουσιαστεί στην επόμενη ενότητα. Τα

λεμφοκύτταρα αυτά είναι ειδικά έναντι αντιγόνων του ελύτρου της μυελίνης των νευρικών αξόνων στον εγκέφαλο και στο νωτιαίο μυελό, όπως είναι η MBP, η MOG, η γλυκοπρωτεΐνη που σχετίζεται με τη μυελίνη (myelin-associated glycoprotein, MAG) και η πρωτεϊνολιπιδική πρωτεΐνη της μυελίνης (proteolipid protein, PLP) [281], ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχουν αναφερθεί αρκετοί στόχοι ανοσολογικών αποκρίσεων στην κατά πλάκας σκλήρυνση που δεν αποτελούν συστατικά της μυελίνης και ενδέχεται να αποτελούν νέα αυτοαντιγόνα, όπως είναι οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ριβονουκλεοπρωτεΐνη L και σεπτίνη-9, το κυτταροπλασματικό ένζυμο συνθάση της γουανοσινικής διφωσφορικής-L-φουκόζης και ο μεταγραφικός παράγοντας IRF5 [282-285]. Η μετακίνηση των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων εντός του ΚΝΣ μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, χωρίς να υπάρχει διάσπαση αυτού, διευκολύνεται από την έκφραση μορίων κυτταρικής προσκόλλησης και από τη δράση χημειοκινών. Με την είσοδο τους στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, τα αυτοαντιδραστικά T λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα στην περιοχή και ξεκινούν την αυτοάνοση φλεγμονώδη αντίδραση. Ιδιαίτερα, τα Th1 και τα Th17 λεμφοκύτταρα συμβάλλουν στην έναρξη της φλεγμονής μέσω της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών, οι οποίες προσελκύουν και ενεργοποιούν μονοκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα στην περιοχή, ενώ επίσης ενεργοποιούν CD8+ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα που συμμετέχουν ενεργά στην καταστροφή του ελύτρου της μυελίνης [281, 286]. Το αποτέλεσμα είναι να εμφανίζονται εστίες φλεγμονής και απομυελίνωσης στη λευκή ουσία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού που προκαλούν τις κλινικές εκδηλώσεις και τα επεισόδια της κατά πλάκας σκλήρυνσης.

Τα τελευταία χρόνια γίνεται εμφανής ο σημαντικός ρόλος των B λεμφοκυττάρων στην παθογένεση της νόσου μέσω της παραγωγής αυτοαντισωμάτων, της έκκρισης

προφλεγμονοδών κυτταροκινών και της αντιγονοπαρουσίασης [264, 287, 288]. Η σημασία τους μέχρι πρόσφατα παρέμενε αινιγματική, παρά το γεγονός ότι Β λεμφοκυτταρική κλωνική επέκταση παρατηρείται στο ΚΝΣ και στην περιφέρεια ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση, ενώ η παρουσία ολιγοκλωνικών αντισωμάτων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό αποτελεί μέρος των κριτηρίων διάγνωσης της υποτροπιάζουσας-διαλείπουσας κατά πλάκας σκλήρυνσης [264]. Τα Β λεμφοκύτταρα φαίνεται ότι παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στη δευτεροπαθώς προϊούσα κατά πλάκας σκλήρυνση, καθώς στους ασθενείς αυτούς εντοπίζονται φλεγμονώδεις κυτταρικές συναθροίσεις πλούσιες σε Β λεμφοκύτταρα στις μήνιγγες, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως έκτοπα βλαστικά κέντρα [289]. Ο τοπικός πολλαπλασιασμός Β λεμφοκυττάρων στις μήνιγγες πιθανώς να διατηρεί τη φλεγμονή στις μήνιγγες, ιδιαίτερα σε προχωρημένα στάδια του νοσήματος, και να συμβάλλει στο σχηματισμό εστιών φλεγμονής στη φαιά ουσία του φλοιού, στην απομυελίνωση νευραξόνων του φλοιού και στην επίταση της κλινικής εικόνας [290, 291]. Η παρουσία των έκτοπων βλαστικών κέντρων έχει μεγάλη κλινική σημασία, επειδή οι ασθενείς αυτοί έχουν μικρότερη ηλικία έναρξης του νοσήματος και πιο ταχεία επιδείνωση της βαρύτητας [290, 291]. Τέλος, η επιτυχία των θεραπευτικών φαρμακευτικών παραγόντων που στοχεύουν Β λεμφοκύτταρα, όπως μονοκλωνικά αντι-CD20 αντισώματα, στην πρόληψη και στη μείωση της βαρύτητας των υποτροπών της κατά πλάκας σκλήρυνσης υποστηρίζει τη συνεισφορά των Β λεμφοκυττάρων στην παθογένεση του νοσήματος [292].

Κατά την οξεία φάση των υποτροπών της κατά πλάκας σκλήρυνσης, οι αυτοάνοσες φλεγμονώδεις αντιδράσεις αποτελούν το σημαντικότερο παράγοντα που προκαλεί τις κλινικές εκδηλώσεις. Με την πρόοδο του νοσήματος, σε απάντηση της φλεγμονής και της ιστικής βλάβης που παρατηρείται στην οξεία φάση, ενεργοποιούνται μικρογλοιακά κύτταρα στις εστίες της φλεγμονής, αλλά και έξω από αυτές, τα οποία συμμετέχουν

επίσης στην ιστική βλάβη και στη νευρική εκφύλιση [293]. Τα ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα, όπως επίσης και ενεργοποιημένα μακροφάγα που διεισδύουν στο ΚΝΣ από την περιφέρεια, παράγουν και εκκρίνουν δραστικές ρίζες του οξυγόνου, οι οποίες έχουν τοξική δράση και επιταχύνουν τον εκφυλισμό των νευραξόνων [294]. Επίσης, οι δραστικές ρίζες του οξυγόνου διαταράσσουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων των νευρώνων, η οποία εντείνει το οξειδωτικό στρες και μειώνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP [295, 296]. Η ελάττωση των ενεργειακών αποθεμάτων των νευρώνων απενεργοποιεί την αντλία νατρίου-καλίου με αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης νατρίου. Η επακόλουθη αύξηση του ενδοκυττάριας ασβεστίου ενεργοποιεί ένα φαύλο κύκλο ενεργοποίησης διαμεμβρανικών διαύλων νατρίου, η οποία αυξάνει την εισροή νατρίου στους νευρώνες, και απελευθέρωσης ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα από ενδοκυττάρια αποθήκες [297]. Το τελικό αποτέλεσμα είναι μια διάχυτη και ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση ενδοκυττάριας πρωτεασών και λιπασών που προκαλούν τη νέκρωση των νευρώνων [297]. Τα ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα και μακροφάγα έχουν επίσης την ικανότητα να παράγουν το νευροδιαβιβαστή γλουταμικό οξύ στις εστίες φλεγμονής ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση [298]. Η υπερβολική ποσότητα γλουταμικού είναι ιδιαίτερα τοξική για τα νευρικά κύτταρα, αναφέρεται ως διεγερτική τοξικότητα και θεωρείται ότι οφείλεται στην αυξημένη εισροή ασβεστίου μέσω διαύλων NMDA στους νευρώνες και στην επακόλουθη ενεργοποίηση πρωτεασών και λιπασών [298].

Τέλος, η βλάβη των κυττάρων του νευρικού παρεγχύματος επάγει τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση αστρογλοιακών κυττάρων στην περιφέρεια των εστιών φλεγμονής και απομυελινοποίησης, καθώς επίσης και περιοχές της λευκής ουσίας χωρίς διαφαινόμενη φλεγμονή και βλάβη [299]. Η γλοιωτική απόκριση αυτή αντικαθιστά τα κατεστραμμένα νευρικά κύτταρα, δημιουργώντας ουλοτικό ιστό, και

εμποδίζει τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς της μυελίνης και έχει αρνητική επίδραση στην επιβίωση των νευρικών αξόνων [299, 300]. Η αθροιστική ουλοποίηση ή σκληρυντική γλοίωση που επέρχεται οδηγεί σε προοδευτική ατροφία του εγκεφάλου και προσβολή της φαιάς ουσίας. Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω μηχανισμών οδηγεί σε εκτεταμένες νευροεκφυλιστικές αλλοιώσεις, οι οποίες συσσωρεύονται σε βάθος χρόνου και οδηγούν σε ανικανότητα, αναπηρία και θάνατο [264].

1.5.5 Ο ρόλος των μολύνσεων και της μοριακής μίμησης στην κατά πλάκας σκλήρυνση

Όπως παρουσιάστηκε στην προηγούμενη ενότητα, η επαγωγή αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός της παθογένεσης της κατά πλάκας σκλήρυνσης. Η επαγωγή τους μπορεί να συμβαίνει έπειτα από παρουσίαση ενδογενών αυτοαντιγόνων που έχουν διαρρεύσει από το ΚΝΣ, είτε μέσω λεμφικής αποχέτευσης, ή μέσω ενεργής μεταφοράς εκτός του ΚΝΣ από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα [264]. Το μηχανισμό αυτό υποστηρίζουν νεότερα δεδομένα που δείχνουν ότι το ΚΝΣ δεν είναι τόσο ανοσολογικά και ανατομικά απομονωμένο όσο αρχικά πιστεύονταν [25]. Ωστόσο, αρκετές ερευνητικές μελέτες προτείνουν ότι η επαγωγή των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων στην κατά πλάκας σκλήρυνση οφείλεται στη δράση ιικών και μικροβιακών παραγόντων [57, 301].

Αρκετοί μολυσματικοί παράγοντες έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη της κατά πλάκας σκλήρυνσης, συμπεριλαμβάνοντας τον EBV, ο ερπητοϊός τύπου 6, ο ιός του έρπητα ζωστήρα, ο ιός John-Cunningham (John-Cunningham virus, JCV), ενδογενείς ρετροϊοί, αλλά και μικρόβια, όπως το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού*, το μικρόπλασμα της πνευμονίας και τα χλαμύδια της πνευμονίας [57, 250, 301]. Οι ρόλοι του EBV και του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* στην κατά πλάκας σκλήρυνση θα παρουσιαστούν στις

επόμενες ενότητες αναλυτικά, καθώς αποτελούν το θέμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Οι μολυσματικοί παράγοντες θα μπορούσαν να επάγουν και να διατηρούν την αυτοανοσία στην κατά πλάκας σκλήρυνση μετά από την είσοδο τους στο ΚΝΣ. Αυτό υποστηρίζεται από τον απομόνωση πολλών μικροβίων και ιών στο εγκεφαλικό παρέγχυμα ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση, όπως επίσης και από το γεγονός ότι οι υπότροπές του νοσήματος πολλές φορές έπονται μιας μικροβιακής ή ιικής λοίμωξης [249]. Επίσης, η αναστολή της εισόδου των μολυσματικών παραγόντων στο ΚΝΣ εικάζεται ότι έχει θεραπευτική επίδραση, όπως υποδεικνύεται από τη χρήση αντι-CD20 μονοκλωνικών αντισωμάτων [302]. Στην περίπτωση αυτή, τα Β λεμφοκύτταρα θεωρούνται ως οχήματα μεταφοράς των ιών EBV και JCV εντός του εγκεφαλικού παρεγχύματος μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων που στοχεύουν τα Β λεμφοκύτταρα εμποδίζουν την ιική παράδοση εντός αυτού, προστατεύοντας έτσι από την παθογενετική τους δράση.

Ωστόσο, η είσοδος των μολυσματικών παραγόντων καθ'αυτών στο εγκεφαλικό παρέγχυμα φαίνεται ότι δεν είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της νόσου. Αντιθέτως, η αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι των μολυσματικών παραγόντων φαίνεται ότι μπορεί να προκαλέσει αυτοάνοση βλάβη μέσω του μηχανισμού της μοριακής μίμησης [250]. Στην περίπτωση αυτή, τα λεμφοκύτταρα και τα αντισώματα που παράγονται στην περιφέρεια έναντι μικροβιακών και ιικών αντιγόνων αντιδρούν και με ενδογενή αυτοαντιγόνα του ΚΝΣ, και συγκεκριμένα με αντιγόνα της μυελίνης, αφού διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

1.5.6 Ο ιός Epstein-Barr στην κατά πλάκας σκλήρυνση

Ο EBV ή ανθρώπινος ερπητοϊός 4 είναι ένας DNA ιός, διπλής έλικας, με περίβλημα που ανήκει στην οικογένεια των ανθρώπινων ερπητοϊών, και συγκεκριμένα στην υπο-

οικογένεια των γάμμα ερπητοϊών [303]. Αν και μολύνει σχεδόν καθολικά τον ανθρώπινο πληθυσμό από μικρή ηλικία σε όλο τον κόσμο, συνήθως δεν προκαλεί λοίμωξη. Ο EBV προκαλεί λοιμώδη μονοπυρήνωση και έχει συσχετιστεί αιτιολογικά με το λέμφωμα Burkitt, το λέμφωμα Hodgkin και το ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα, ενώ επίσης έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη Β λεμφωμάτων σε ασθενείς με επίκτητη ή συγγενή ανοσοανεπάρκεια [303, 304].

Ο EBV μεταδίδεται συνήθως μέσω του σιέλου και για αυτό η λοιμώδης μονοπυρήνωση αναφέρεται και ως «νόσος του φιλιού» [304]. Ενδέχεται όμως να μεταδοθεί και μέσω μετάγγισης αίματος, μετάγγισης αιμοποιητικών κυττάρων και μετάγγισης συμπαγών οργάνων από μολυσμένο δότη σε μη μολυσμένο δέκτη [304]. Έχει περιορισμένο εύρος ξενιστών και συγκεκριμένο ιστικό τροπισμό για επιθηλιακά κύτταρα του φάρυγγα και για αδρανή, αδιαφοροποίητη Β λεμφοκύτταρα, όμως έχει την ικανότητα να παραμένει σε χρόνια, λανθάνουσα κατάσταση μονάχα στα Β λεμφοκύτταρα [305]. Ο τροπισμός του καθορίζεται από την περιορισμένη έκφραση του υποδοχέα του στα συγκεκριμένα κύτταρα, δηλαδή του μορίου CD21, που είναι ο υποδοχέας του C3d συστατικού του συμπληρώματος, μπορεί όμως να προσδένεται και σε μόρια MHC τύπου II [306]. Ο EBV προσαρμόζεται στα Β λεμφοκύτταρα και χειρίζεται τις διάφορες φάσεις ανάπτυξης τους για να εγκαταστήσει μια δια βίου, λανθάνουσα λοίμωξη [307]. Κατά τη λανθάνουσα λοίμωξη, ο EBV χρησιμοποιεί ανοσοτροποποιητικούς και άλλους μηχανισμούς για να διαφεύγει του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως είναι η σύνθεση ενός ομολόγου της αντι-φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 που ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των Β λεμφοκυττάρων και αναστέλλει τα Th1 λεμφοκύτταρα που διευκολύνει τον πολλαπλασιασμό του ιού και η έκφραση μικρού αριθμού πρωτεϊνών ώστε να μην υπάρχουν πολλά διαθέσιμα ιικά αντιγόνα-στόχοι για το ανοσοποιητικό σύστημα [307, 308].

Η σχεδόν καθολική παρουσία του EBV στον ανθρώπινο πληθυσμό, η ικανότητα του να προκαλεί χρόνια λοίμωξη με δυνατότητα συνεχούς επανενεργοποίησης και οι ανοσοτροποποιητικές του ιδιότητες τον καθιστούν σημαντικό υποψήφιο παράγοντα επαγωγής αυτοανοσίας [309]. Στην κατά πλάκας σκλήρυνση, ο EBV αποτελεί εδραιωμένο παράγοντα κινδύνου, με το ρόλο του στην παθογένεση του νοσήματος αυτού να αποτελεί ένα από τα πιο μελετημένα παραδείγματα σύνδεσης μολυσματικού παράγοντα με αυτοάνοσο νόσημα. Ο ρόλος αυτός υποστηρίζεται από επιδημιολογικές και ορολογικές μελέτες, ενώ αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει πως ο EBV και οι ανοσολογικές αποκρίσεις εναντίον του συμμετέχουν στην παθογένεση της κατά πλάκας σκλήρυνσης.

Διαχρονικές μελέτες σε μεγάλους πληθυσμούς που ανέλυσαν δείγματα ορού ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση δεκαετίες πριν από την κλινική εμφάνιση του νοσήματος αποκάλυψαν ότι η παρουσία αντισωμάτων έναντι του EBV σε ασυμπτωματικά άτομα συνδέεται με την ανάπτυξη του νοσήματος, ενώ ο κίνδυνος αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση των τίτλων των αντι-EBV αντισωμάτων, ιδιαίτερα των αντισωμάτων έναντι του ιικού πυρηνικού αντιγόνου 1 (Epstein-Barr nuclear antigen 1, EBNA-1) [310-315]. Τα αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε ασυμπτωματικά άτομα μέχρι και είκοσι χρόνια πριν από την έναρξη των συμπτωμάτων [311]. Όλα τα άτομα που ανέπτυξαν κατά πλάκας σκλήρυνση ήταν θετικά για αντι-EBV αντισώματα, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις η θετικότητα εμφανίστηκε λίγο πριν την κλινική εμφάνιση της νόσου [312]. Μετα-αναλύσεις έχουν επιβεβαιώσει ότι οι ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση έχουν υψηλότερη συχνότητα και υψηλότερους τίτλους αντι-EBV, ιδιαιτέρως αντι-EBNA-1, αντισωμάτων σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [316, 317], ενώ ο κίνδυνος ανάπτυξης κατά πλάκας σκλήρυνσης αυξάνεται σημαντικά μετά από λοιμώδη μονοπυρήνωση [277, 318, 319]. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι τα επίπεδα των αντι-EBNA-1 αντισωμάτων

στο αίμα ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση είναι ευθέως ανάλογα με την απεικονιστική βαρύτητα του νοσήματος [320], ενώ ακόμα μια αυξημένη ανοσολογική απόκριση έναντι του EBV με τη μορφή παραγωγής IFN- γ από μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος παρατηρήθηκε σε ασθενείς έως και οχτώ εβδομάδες πριν από την απεικονιστική εμφάνιση του νοσήματος [321].

Ωστόσο, τα παραπάνω επιδημιολογικά και ορολογικά δεδομένα δεν αποτελούν αναμφίβολες αποδείξεις ότι ο EBV ή η ανοσολογική απόκριση έναντι στον EBV είναι η αιτία ανάπτυξης της κατά πλάκας σκλήρυνσης και θα μπορούσαν να είναι απλά δευτερογενείς εκδηλώσεις που οφείλονται σε διαταραγμένες ανοσολογικές αποκρίσεις στην κατά πλάκας σκλήρυνση [322]. Σχετικά με το τελευταίο, μέχρι σήμερα οι αναφορές σχετικά με τις T λεμφοκυτταρικές αποκρίσεις έναντι του EBV σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση είναι αντικρουόμενες [323-330]. Όλες οι μελέτες έχουν εξετάσει *in vitro* τις CD8+ T λεμφοκυτταρικές αποκρίσεις απέναντι σε πεπτιδία που προήρθαν από συγκεκριμένα ιικά αντιγόνα ή απέναντι σε B λεμφοκύτταρα που είχαν μολυνθεί με τον EBV. Η πρώτη προσέγγιση επιτρέπει τον προσδιορισμό του σταδίου της ιικής λοίμωξης που στοχεύεται περισσότερο από το ανοσοποιητικό σύστημα στους ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση, ενώ, η δεύτερη προσέγγιση είναι πιο κοντά στην πραγματική *in vivo* ανοσολογική απόκριση, καθώς δεν παραβλέπει τη διαδικασία επεξεργασίας και της παρουσίασης των αντιγόνων. Κάποιες από τις μελέτες ανέφεραν υψηλότερη T λεμφοκυτταρική αντιδραστικότητα έναντι του EBV σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [323, 326, 327], κάποιες χαμηλότερη [324, 329] και κάποιες δε βρήκαν διαφορά [325, 328, 330]. Οι διαφορές αυτές φαίνεται ότι οφείλονται στις διαφορετικές ανοσολογικές αποκρίσεις ανάλογα με το στάδιο της ιικής λοίμωξης, καθώς σε κάθε στάδιο εκφράζονται διαφορετικά ιικά αντιγόνα [326, 331]. Έτσι, οι ανοσολογικές αποκρίσεις σε ασθενείς με κατά πλάκας

σκλήρυνση είναι πιο έντονες έναντι αντιγόνων του EBV που εκφράζονται κατά τη λανθάνουσα και κατά τη λυτική φάση, όπως είναι το EBNA-1, το sCP2 και το BRRF2, και αυτές σχετίζονταν με την ενεργότητα της νόσου [326, 331].

Αντικρουόμενα είναι και τα δεδομένα σχετικά με την παρουσία του EBV εντός του ΚΝΣ, είτε στο παρέγχυμα ή στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό [332-339]. Μελέτες σε πτωματικά παρασκευάσματα εγκεφάλου από ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση ανίχνευσαν Β λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα μολυσμένα με τον EBV και γενετικό υλικό εντός του εγκεφαλικού παρεγχύματος, ακόμα και εντός ενεργών εστιών φλεγμονής [334, 335, 337]. Η παρουσία του ιού στο ΚΝΣ υποστηρίζει την άμεση συμμετοχή του στην επαγωγή της κατά πλάκας σκλήρυνσης, με την ενεργοποίηση παρακείμενων κυττάρων να είναι ένας πιθανός μηχανισμός [250]. Όμως, άλλες μελέτες δεν μπόρεσαν να αναπαράγουν τα αποτελέσματα αυτά, καθώς δεν ανίχνευσαν τον ιό εντός του εγκεφαλικού παρεγχύματος [332, 333, 336], ενώ εντόπισαν το γενετικό υλικό του ιού εντός του εγκεφαλονωτιαίου υγρού σε λίγους ασθενείς ή κανένα [338, 339]. Η απουσία του ιού από το ΚΝΣ δεν αποκλείει τη συμμετοχή του στην κατά πλάκας σκλήρυνση. Αυτό μπορεί να γίνεται με τον EBV εκτός του ΚΝΣ μέσω του μηχανισμού της μοριακής μίμησης και να μεσολαβείται από Τ λεμφοκύτταρα και αντισώματα που έχουν δημιουργηθεί για ως μέρος της ανοσολογικής απόκρισης έναντι του EBV, όμως εισέρχονται στο ΚΝΣ να αντιδρούν και με αντιγόνα της μυελίνης. Αυτό υποστηρίζεται από την ανίχνευση Τ λεμφοκυττάρων και αντισωμάτων έναντι του EBV στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση, αλλά όχι σε υγιείς μάρτυρες [340-342].

Η μοριακή μίμηση ανάμεσα σε αντιγόνα του EBV και σε αυτοαντιγόνα της μυελίνης έχει μελετηθεί εκτενώς. Οι Wucherpfennig και Strominger πρώτοι ανέφεραν ότι CD8+ κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα που είχαν απομονωθεί από ασθενείς με κατά πλάκας

σκλήρυνση μπορούσαν να αντιδρούν τόσο με το πεπτίδιο 85-99 της MBP, όσο και με το πεπτίδιο-μιμητή 627-641 από την DNA πολυμεράση του EBV [343]. Μερικά χρόνια μετά τεκμηριώθηκε η δομική βάση της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας ανάμεσα στα δύο πεπτίδια [242]. Το πεπτίδιο 85-99 της MBP αναγνωρίζονταν από το HLA-DRB1*15:01, ενώ το πεπτίδιο 627-641 της EBV DNA πολυμεράσης από το HLA-DRB5*01:01. Με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ αποκαλύφθηκε ότι οι επιφάνειες πρόσδεσης του TCR στα παραπάνω σύμπλοκα ήταν δομικά πανομοιότυπες και αυτό εξηγούσε τη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα [242]. Η κλινική σημασία της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας ανάμεσα στο ιικό αντιγόνο και στο αντιγόνο της μυελίνης στην κατά πλάκας σκλήρυνση επισημάνθηκε με την ανίχνευση CD4+ βοηθητικών T λεμφοκυττάρων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών που αντιδρούσαν και με τα δύο παραπάνω πεπτίδια [344]. Αυτό απέδειξε ότι T λεμφοκύτταρα ειδικά για τον EBV μπορούν να εισέλθουν στο ΚΝΣ και ενδέχεται να στρέφονται εναντίον του ελύτρου της μυελίνης των νευρικών αξόνων *in vivo*, επάγοντας έτσι αυτοάνοση ανοσολογική αντίδραση.

Το EBNA-1 έχει αναφερθεί ότι αναγνωρίζεται και από T λεμφοκύτταρα ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση που αντιδρούν διασταυρούμενα με συστατικά της μυελίνης [330]. Συγκεκριμένα, CD4+ βοηθητικά T λεμφοκύτταρα από ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση αντιδρούσαν με πεπτίδια του καρβοξυτελικού τμήματος του EBNA-1, που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 400-641, και με ανοσοεπικρατή πεπτίδια από τέσσερα αυτοαντιγόνα της μυελίνης, των MBP, PLP, MOG και 2,3-κυκλικο-νουκλεοτιδο-3-φωσφοδιεστεράση [330]. Τα λεμφοκύτταρα αυτά είχαν επίσης την ικανότητα παραγωγής των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών IFN-γ και IL-2. Αν και η συχνότητα των αντιδραστικών T λεμφοκυττάρων ήταν συγκρίσιμη ανάμεσα σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση και σε υγιείς μάρτυρες, ο συνολικός αριθμός τους ήταν σημαντικά

αυξημένος στους ασθενείς [330]. Οι συγγραφείς δε διευκρίνισαν ποιες περιοχές του καρβοξυτελικού τμήματος αναγνωρίζονταν από τα T λεμφοκύτταρα, όμως σε προηγούμενη δημοσίευση τους είχαν αναφέρει ότι η περιοχή αναγνώρισης σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση καλύπτει ουσιαστικά όλο το καρβοξυτελικό τμήμα, ενώ σε υγιείς μάρτυρες η περιοχή αναγνώρισης από τα T λεμφοκύτταρα περιορίζεται στην περιοχή 473-508 [345].

Ο ανοσογονικός επίτοπος 85-99 της MBP έχει αποδειχτεί ότι αναγνωρίζεται πολύ ισχυρά και από αντι-MBP αυτοαντισώματα που απομονώθηκαν από εγκεφαλικό παρέγχυμα πτωματικού υλικού ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση, αλλά τα αυτοαντισώματα αυτά δεν αντιδρούσαν με πεπτιδία-μιμητές της DNA πολυμεράσης του EBV, σε αντίθεση με τα T λεμφοκύτταρα που αναφέρθηκε πιο πάνω [245]. Όμως, ο ανοσογονικός επίτοπος αυτός αναγνωριζόταν από αυτοαντισώματα στον ορό ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση τα οποία αντιδρούσαν επίσης με το πεπτιδίο 400-413 του EBNA-1 [346]. Μάλιστα, η συχνότητα των αντισωμάτων αυτών ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [346], ενώ επιπλέον μπορούσαν να απομονωθούν από άτομα με ιστορικό λοιμώδους μονοπυρήνωσης χωρίς κλινική εικόνα κατά πλάκας σκλήρυνσης, συνδέοντας τη λείμωξη από EBV με την ανάπτυξη αυτοαντιδραστικότητας μέσω του μηχανισμού της μοριακής μίμησης και της χυμικής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας [347].

Το EBNA-1 έχει αναφερθεί σε ακόμα δύο περιπτώσεις μοριακής μίμησης σε ασθενείς κατά πλάκας σκλήρυνσης. Η πρώτη περίπτωση αφορά την πρωτεΐνη ανοκταμίνη 2, έναν δίαυλο ιόντων που εκφράζεται στο ΚΝΣ και έχει προταθεί ως πιθανό αυτοαντιγόνο της κατά πλάκας σκλήρυνσης [348]. Στο ορό ασθενών ανιχνεύθηκαν IgG αντισώματα που αντιδρούσαν τόσο με την περιοχή 431-440 του EBNA-1, όσο και με την περιοχή 140-149 της ανοκταμίνης 2 [348]. Μάλιστα, ο συνδυασμός της θετικότητας

για αντι-ανοκταμίνη 2 αντισώματα με δύο γνωστούς παράγοντες κινδύνου, την παρουσία του αλληλόμορφου HLA-DRB1*15:01 και την παρουσία υψηλών IgG αντι-EBNA-1 αντισωμάτων, εκτόξευσε τον κίνδυνο κατά πλάκας σκλήρυνσης, προτείνοντας τη συμμετοχή των αντισωμάτων έναντι της ανοκταμίνης 2 στην αιτιοπαθογένεια του νοσήματος μέσω του μηχανισμού της μοριακής μίμησης [348]. Η δεύτερη περίπτωση αφορά την ριβονουκλεοπρωτεΐνη L [285], ένα αυτοαντιγόνο που δεν είναι ειδικό για το ΚΝΣ και έχει συνδεθεί με τη συστηματική σκλήρυνση παρά την κατά πλάκας σκλήρυνση [349]. Οι συγγραφείς μπόρεσαν να επιβεβαιώσουν με τρεις διαφορετικές πειραματικές μεθόδους, ανοσοκατακρήμιση, ανοσοαποτύπωση κατά Western και ανοσοδοκιμασία ELISA, ότι IgG αντι-EBNA-1 αντισώματα από ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση αντιδρούν και με την ριβονουκλεοπρωτεΐνη L [285]. Ο ρόλος των αντισωμάτων αυτών στην κατά πλάκας σκλήρυνση παραμένει αινιγματικός.

Τέλος, δύο ακόμα περιστατικά μοριακής μίμησης και χυμικής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας έχουν αναφερθεί ανάμεσα σε αντιγόνα του EBV και σε αυτοαντιγόνα σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση [283, 284]. Αντισώματα έναντι του πεπτιδίου 305-320 του αντιγόνου BOLF1 του περιβλήματος του EBV στον ορό ασθενών με το νόσημα αυτό αντιδρούσαν και με το πεπτίδιο 424-434 της ανθρώπινης πρωτεΐνης IRF5 [283]. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένα μεταγραφικός παράγοντας που εκφράζεται και στο ΚΝΣ, αλλά σε μικρογλοιακά κύτταρα και άρα δεν αποτελεί συστατικό του ελύτρου της μυελίνης [350]. Πάντως, πολυμορφισμοί του γονιδίου *IRF5* έχουν συνδεθεί με επιδεκτικότητα για κατά πλάκας σκλήρυνση [351]. Τα παραπάνω πεπτίδια είχαν επίσης την ικανότητα επαγωγής της παραγωγής των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IFN- γ και TNF- α από CD4+ βοηθητικά και CD8+ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα [283]. Ακόμα, αντισώματα έναντι του αντιγόνου του ιικού καψιδίου BFRF3 από ορό ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση αντιδρούσαν και με την

ανθρώπινη κυτταροπλασματική πρωτεΐνη σεπτίνη-9 και αντισώματα έναντι του αντιγόνου του ιικού καψιδίου BFRF2 από ορό ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση αντιδρούσαν και με μιτοχονδριακές πρωτεΐνες [284].

1.5.7 Το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* στην κατά πλάκας σκλήρυνση

Το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* είναι ένα Gram αρνητικό, μικροαερόφιλο βακτήριο, σπειροειδούς σχήματος, με ικανότητα δια βίου αποικισμού του ανθρώπινου στομάχου [352]. Μεταδίδεται μέσω της κοπρανο-στοματικής, της στοματο-στοματικής και της γαστρο-στοματικής οδού και είναι αιτιολογικός παράγοντας γαστρίτιδας και πεπτικών ελκών, ενώ αποτελεί μείζονα παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης αδενοκαρκινώματος του στομάχου και λεμφωμάτων από λεμφικό ιστό του γαστρικού βλεννογόνου [353]. Η μόλυνση από το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* αφορά ένα πολύ μεγάλο μέρος του ανθρώπινου πληθυσμού σε παγκόσμιο επίπεδο, καθώς προσβάλλεται ως και το 90% του πληθυσμού, τόσο σε αναπτυσσόμενες χώρες, όσο και σε ανεπτυγμένες χώρες [354, 355]. Ωστόσο, στις αναπτυσσόμενες χώρες το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού έχει μολυνθεί ήδη από την παιδική ηλικία, ενώ στις ανεπτυγμένες χώρες ο επιπολασμός αυξάνεται βαθμιαία με την ηλικία [354, 355]. Περίπου το 10-15% των ατόμων που θα μολυνθούν από το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* θα εμφανίσουν παθολογία που οφείλεται στη δράση του [353].

Η ανακάλυψη του έγινε το 1984 από τους Marshall και Warren [356], οι οποίοι τιμήθηκαν το 2005 με το βραβείο Νόμπελ Ιατρικής για αυτήν. Η διαπίστωση ότι το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* ευθύνεται για τα πεπτικά έλκη ήταν μια ριζοσπαστική εξέλιξη της Βιοϊατρικής Επιστήμης και αρχικά αντιμετωπίστηκε με μεγάλη δυσπιστία από την επιστημονική κοινότητα. Ο λόγος είναι ότι βελτίωσε σημαντικά τη θεραπευτική αντιμετώπιση των πεπτικών ελκών μέσω της χρήσης αντιβιοτικών, αντικαθιστώντας τις επεμβάσεις γαστρεκτομής που εφαρμόζονταν μέχρι τότε και οι οποίες είχαν πολλές

μετεγχειρητικές επιπλοκές και συννοσηρότητες. Μάλιστα, για να καταφέρει να πείσει την επιστημονική κοινότητα, ο Marshall κατάπνε καλλιέργεια του βακτηρίου και στη συνέχεια ανέπτυξε γαστρίτιδα, όπως αποκάλυψε η γαστροσκόπηση και η βιοψία του άντρου του στομάχου, αποδεικνύοντας έτσι το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* είναι πραγματικά παθογόνο και ανταποκρίνεται στα κριτήρια του Koch [357].

Η ικανότητα του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* να αποικίζει το στομάχο είναι άξια προσοχής και επιτυγχάνεται μέσω της στρατολόγησης αρκετών μηχανισμών. Πρώτον, το βακτήριο εκφράζει πρωτεΐνες που αναστέλλουν την παραγωγή γαστρικού οξέος από οξεοπαραγωγά τοιχωματικά κύτταρα του στομάχου [358]. Δεύτερον, παράγει μεγάλες ποσότητες ουρεάσης, έναν ένζυμο που εξουδετερώνει το γαστρικό οξύ και αυξάνει το pH γύρω από τη μικροβιακή αποικία [358]. Τρίτον, φέρει μαστίγια που του επιτρέπουν να κινείται ταχέως δια μέσου του στρώματος της γαστρικής βλέννης [358]. Τέταρτον, διαθέτει πολλαπλές επιφανειακές πρωτεΐνες που διευκολύνουν την προσκόλληση του στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα [352]. Τέλος, μπορεί και διαφεύγει της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή μέσω αρκετών μηχανισμών, όπως είναι η πρόσδεση ενδογενών πρωτεϊνών στην επιφάνεια ως κάλυψη ώστε να μην αναγνωρίζεται ως εξωγενής παράγοντας από το ανοσοποιητικό σύστημα και η σύνθεση λιποπολυσακχαριτών με χαμηλή ανοσογονικότητα στο βακτηριακό τοίχωμα ώστε να αποφεύγει το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα [359, 360].

Ως λοιμογόνος παράγοντας που μολύνει μεγάλο μέρος του ανθρώπινου πληθυσμού, το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* έχει συνδεθεί με την παθογένεση αρκετών αυτοάνοσων νοσημάτων [361]. Ερευνητικές μελέτες έχουν εστιάσει στη συμμετοχή του μικροβίου αυτού σε αυτοάνοσα νοσήματα του πεπτικού συστήματος, όπως είναι η αυτοάνοση γαστρίτιδα και η αυτοάνοση παγκρεατίτιδα [230, 232, 362]. Όμως, έχει συσχετιστεί και με την παθογένεση συστηματικών αυτοάνοσων νοσημάτων και

οργανοειδικών αυτοάνοσων νοσημάτων άλλων συστημάτων εκτός του πεπτικού, όπως είναι η κατά πλάκας σκλήρυνση [361]. Μέχρι σήμερα, αρκετές οροεπιδημιολογικές μελέτες έχουν ερευνήσει τον επιπολασμό της μόλυνσης από το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση. Τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα, αλλά άκρως ενδιαφέροντα.

Μία πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση μελετών του επιπολασμού της μόλυνσης από το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* από τους Jagunovgvanich και συνεργάτες ανέφερε σημαντικά χαμηλότερο επιπολασμό σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας και φύλλου [363]. Η παραπάνω μελέτη συμπεριέλαβε έξι ερευνητικές εργασίες στη μετα-ανάλυση· όλες χρησιμοποίησαν δοκιμασία ELISA για ανίχνευση αντι-ελικοβακτηριδιακών αντισωμάτων για τη διάγνωση της μόλυνσης [364-368], εκτός από μία που εξέτασε Έλληνες ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση και εξέτασε ιστολογικό παρασκεύασμα γαστρικής βιοψίας [369]. Από τις μελέτες αυτές, οι τέσσερις ανέφεραν χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης IgG αντι-ελικοβακτηριδιακών αντισωμάτων στον ορό ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες [364-366, 368], μία μελέτη δεν εντόπισε διαφορά στη συχνότητα των αντισωμάτων ανάμεσα στις δύο ομάδες [367] και η τελευταία μελέτη ανέφερε υψηλότερη συχνότητα ανίχνευσης του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* στη γαστρική βιοψία ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση [369].

Το αποτέλεσμα της παραπάνω μετα-ανάλυσης επιβεβαιώθηκε από μια δεύτερη μετα-ανάλυση στο ίδιο έτος [370] που χρησιμοποίησε στην ανάλυση και δεδομένα από ερευνητικές παρουσιάσεις σε επιστημονικά συνέδρια, οι οποίες ανέφεραν είτε χαμηλότερη ή συγκρίσιμη συχνότητα IgG αντι-ελικοβακτηριδιακών αντισωμάτων στον ορό ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Επίσης, και

άλλες ερευνητικές μελέτες που έχουν δημοσιευθεί ανέφεραν χαμηλότερη συχνότητα IgG αντι-ελικοβακτηριδιακών αντισωμάτων στον ορό ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση [371-374]. Εκτός από τη χαμηλότερη συχνότητα μόλυνσης που παρατηρήθηκε στους ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση, οι θετικοί για το *Ελικοβακτηρίδιο* ασθενείς εμφάνισαν χαμηλότερη κλινική και απεικονιστική βαρύτητα του νοσήματος [365, 371, 374]. Η μόλυνση με *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* μπορεί επίσης να μειώσει τη βαρύτητα της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλίτιδας, πιθανώς μέσω αναστολής των Th1 και των Th17 ανοσολογικών αποκρίσεων [372].

Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ότι το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* έχει προστατευτικό παρά αιτιοπαθογενετικό ρόλο στην κατά πλάκας σκλήρυνση. Η σχέση αυτή θα μπορούσε να εξηγηθεί από την υπόθεση της υγιεινής, όπως αυτή παρουσιάστηκε στην Ενότητα 1.3.5 [112]. Επιπλέον, το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* θα μπορούσε να ασκεί την προστατευτική του δράση μέσω της επαγωγής T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων, καθώς έχει αναφερθεί ότι ασθενείς θετικοί για το *Ελικοβακτηρίδιο* έχουν αυξημένα επίπεδα των κυττάρων αυτών στο περιφερικό αίμα [375]. Ωστόσο, δεν ανιχνεύθηκε αύξηση των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων σε ποντίκια με αυτοάνοση πειραματική εγκεφαλίτιδα μολυσμένα με *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* σε σύγκριση με μη μολυσμένα [372]. Επίσης, το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* ενδέχεται να ασκεί την προστατευτική του δράση μέσω της ρύθμισης της έκφρασης μορίων κυτταρικής προσκόλλησης και υποδοχέων κυτταροκινών σε λεμφοκύτταρα, εμποδίζοντας έτσι την είσοδο τους στο ΚΝΣ και ελέγχοντας την παθογενετική τους δράση [376].

Από την άλλη πλευρά, η ερευνητική ομάδα του Κουντουρά και των συνεργατών του έχει υποστηρίξει έναν παθογενετικό ρόλο του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* στην κατά πλάκας σκλήρυνση [377]. Η ομάδα αυτή έχει επανειλημμένα αναφέρει αυξημένη

συχνότητα ελικοβακτηριδιακής μόλυνσης σε ασθενείς με το νόσημα αυτό μέσω ιστολογικής εξέτασης βιοψίας στομάχου [369, 377-382]. Υποστηρίζει ότι η μέθοδος αυτή υπερτερεί των ορολογικών μεθόδων στην διάκριση ενεργών και παλαιών λοιμώξεων από το *Ελικοβακτηρίδιο*. Αυτό είναι πολύ σημαντικό, επειδή μονάχα οι ενεργές λοιμώξεις από το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* έχουν την ικανότητα να επάγουν χυμικές και κυτταρικές ανοσολογικές αποκρίσεις και έτσι είναι πιο πιθανό να συμβάλλουν στην αυτοανοσία [377]. Επίσης, η παρουσία του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* σε ασθενείς με κλινικά μεμονωμένο σύνδρομο, την αρχική μορφή της υποτροπιάζουσας-διαλείπουσας κατά πλάκας σκλήρυνσης, σχετίζονταν με αυξημένους δείκτες εξέλιξης του συνδρόμου σε κατά πλάκας σκλήρυνση και με αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών [383]. Μετά από την εκρίζωση του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* μέσω τριπλής αντιβιοτικής θεραπείας, οι ασθενείς αυτοί εμφάνισαν χαμηλότερη συχνότητα εξέλιξης του συνδρόμου σε κατά πλάκας σκλήρυνση σε σύγκριση με ασθενείς που το *Ελικοβακτηρίδιο* δεν αντιμετωπίστηκε αποτελεσματικά, ενώ σε περίπτωση υποτροπής του νοσήματος, η βαρύτητα της ήταν χαμηλότερη [383].

1.6 Συστηματική σκλήρυνση

1.6.1 Εισαγωγή και επιδημιολογία της συστηματικής σκλήρυνσης

Η συστηματική σκλήρυνση ή σκληρόδερμα είναι ένα σπάνιο, χρόνιο, συστηματικό, αυτοάνοσο νόσημα του συνδετικού ιστού που μπορεί να προσβάλει πολλά συστήματα και όργανα, άγνωστης αιτιολογίας και περίπλοκης παθογένεσης [384, 385]. Τα τρία ξεχωριστά χαρακτηριστικά της συστηματικής σκλήρυνσης είναι η χυμική και κυτταρική ανοσολογική απορρύθμιση που οδηγεί σε αυτοανοσία, η μικροαγγειακή βλάβη και η γενικευμένη ίνωση μέσω παθολογικής εναπόθεσης εξωκυττάριας, θεμέλιας ουσίας. Αναφορές περιστατικών δερματικών νοσημάτων με κλινική εικόνα συμβατή με

συστηματική σκλήρυνση είχαν γίνει από τον Ιπποκράτη και το Γαληνό, όμως η πρώτη συστηματική περιγραφή του νοσήματος έγινε το 1753 από τον Cario Curzio στη Νάπολη σε ένα 17χρονο κορίτσι με διάχυτη σκληρία του δέρματος, ενώ ο όρος «σκληροδερμία» για να περιγράψει την κλινική κατάσταση αυτή εισήχθη το 1847 από τον Gintrac [386].

Η συστηματική σκλήρυνση είναι ένα σπάνιο νόσημα· στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής ο επιπολασμός υπολογίζεται στους 276 ασθενείς ανά εκατομμύριο πληθυσμού και η επίπτωση στους 19.3 νέους ασθενείς ανά εκατομμύριο πληθυσμού ανά έτος [387]. Σε παγκόσμιο επίπεδο, ο επιπολασμός υπολογίζεται στους 100-300 ασθενείς ανά εκατομμύριο πληθυσμού και η επίπτωση στους 18-20 νέους ασθενείς ανά εκατομμύριο πληθυσμού ανά έτος [388-390], ενώ αυξημένος επιπολασμός και αυξημένη επίπτωση εμφανίζεται σε πληθυσμούς ιθαγενών Αμερικανών και σε Αφροαμερικανών [391, 392]. Η μέση ηλικία εμφάνισης του νοσήματος είναι ανάμεσα στα 35-50 έτη, αν και έχουν περιγραφεί περιστατικά εμφάνισης σε ηλικιωμένα άτομα, ενώ το νόσημα σπάνια εμφανίζεται σε άτομα νεότερα των 25 ετών.

Η θνητότητα του νοσήματος είναι υψηλή και αυξημένη κατά 1.46-7.1 φορές σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό, η μέση διάρκεια του από τη στιγμή της εμφάνισης μέχρι το θάνατο είναι 7 έως 15 χρόνια, ανάλογα με τη μορφή του νοσήματος, ενώ η δεκαετής επιβίωση τη δεκαετία του 1990 υπολογίστηκε στο 66%, αν και σήμερα αναμένεται να έχει βελτιωθεί σημαντικά, λόγω της καλύτερης διάγνωσης και θεραπευτικής αντιμετώπισης [390, 393]. Η θνητότητα συνδέεται άμεσα με τις κλινικές εκδηλώσεις του νοσήματος. Παράγοντες δυσμενούς πρόγνωσης είναι η διάχυτη δερματική μορφή του νοσήματος, η προσβολή των πνευμόνων, ιδιαίτερα επί παρουσίας πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης, η προσβολή των νεφρών, η προσβολή της καρδιάς, η σοβαρή προσβολή του γαστρεντερικού συστήματος, η

παρουσία αναιμίας, η πολυσυστηματική νόσος, η μεγάλη ηλικία εμφάνισης του νοσήματος, το αντρικό φύλλο και η αφροαμερικανική φυλή [393, 394]. Οι ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση εμφανίζουν επίσης μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου και επιπλοκών αυτής σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό [395].

1.6.2 Κλινική εικόνα της συστηματικής σκλήρυνσης

Η κλινική εικόνα της συστηματικής σκλήρυνσης εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια από ασθενή σε ασθενή [396, 397]. Τα χαρακτηριστικά κλινικά γνωρίσματα είναι η σκληρία του δέρματος και το φαινόμενο Raynaud.

Η προσβολή του δέρματος αρχίζει συνήθως από τα δάχτυλα ως σκληροδακτυλία, επεκτείνεται κεντρομελικά και ενδέχεται να καλύψει ολόκληρο το σώμα. Η έκταση της προσβολής του δέρματος χρησιμοποιείται στην ταξινόμηση της συστηματικής σκλήρυνσης σε περιορισμένη δερματική και σε διάχυτη δερματική μορφή [396, 398], όπως θα παρουσιαστεί παρακάτω. Τα εξαρτήματα του δέρματος εξαφανίζονται, ενώ εμφανίζονται χαρακτηριστικές τηλεαγγεικτασίες. Επίσης, εμφανίζονται ατροφικές ουλές ή έλκη και ασβετώσεις, ιδιαίτερα στις ράγες των δαχτύλων. Η προσβολή του δέρματος του προσώπου οδηγεί στην εμφάνιση του χαρακτηριστικού σκληροδερματικού προσωπείου, με δέρμα λείο, στιλπνό, τεταμένο και ατροφικό που περιγράφεται ως περγαμηνοειδές, με λεπτά χείλη, μικρό άνοιγμα στόματος και ανέκφραστη όψη (σα μάσκα).

Στο φαινόμενο Raynaud παρατηρείται επεισοδιακή σύσπασση των δακτυλικών αρτηριών και αγγείων, συνήθως μετά από έκθεση των άκρων χειρών και ποδών στο κρύο. Κατά την έναρξη κάθε επεισοδίου τα δάχτυλα παρουσιάζουν άλγος και γίνονται λευκά, στη συνέχεια ακολουθεί κυάνωση και με την αποκατάσταση της κυκλοφορίας παρατηρείται ερυθρότητα με αίσθημα αιμωδίας. Το φαινόμενο Raynaud μπορεί να

οδηγήσει σε ισχαιμικά έλκη ή σε απορρόφηση της ονυχοφόρου φάλαγγας. Επίσης, φαίνεται ότι συμβαίνει και σε εσωτερικά όργανα και όχι μονάχα στο δέρμα.

Άλλα συστήματα και όργανα που μπορεί να προσβληθούν είναι το μυοσκελετικό, το γαστρεντερικό, οι πνεύμονες, η καρδιά και οι νεφροί. Συγκεκριμένα, οι αρθραλγίες στα δάχτυλα, στους καρπούς και στις ποδοκνημικές αρθρώσεις είναι συχνές και εμφανίζονται πρώιμα, ενώ σπάνια εμφανίζεται αρθρίτιδα. Οι λείοι μύες του οισοφάγου προσβάλλονται πολύ συχνά, προκαλώντας δυσκινησία οισοφάγου και ατελή σύγκλειση του κάτω οισοφαγικού σφιγκτήρα, με κλινικές εκδηλώσεις όπως είναι η δυσφαγία και η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση.

Η προσβολή των λείων μυικών ινών του στομάχου μπορεί να προκαλέσει δυσπεψία και γαστροπάρεση και η προσβολή των λείων μυικών ινών του εντέρου προκαλεί υποκινητικότητα που οδηγεί σε υπερανάπτυξη μικροβίων και δυσαπορρόφηση, ενώ μπορεί επίσης να οδηγήσει σε ψευδο-απόφραξη με δυσκοιλιότητα. Οι ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση μπορεί να εμφανίσουν εκκολπώματα του παχέος εντέρου και πιο σπάνια συλλογή αέρα στο εντερικό τοίχωμα (εντερική πνευμάτωση).

Η προσβολή των πνευμόνων είναι η κύρια αιτία νοσηρότητας και θνητότητας των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση. Πιο συχνά εμφανίζεται ως διάχυτη πνευμονική ίνωση, η οποία εκδηλώνεται με δύσπνοια προσπάθειας και ξηρό βήχα. Εμφανίζεται τόσο στη διάχυτη δερματική, όσο και στην περιορισμένη δερματική συστηματική σκλήρυνση, με σημαντική ετερογένεια ως προς τη βαρύτητα και την έκβαση. Η διάχυτη πνευμονική ίνωση μπορεί να προκαλέσει πνευμονική υπέρταση, όμως αυτή μπορεί να παρουσιαστεί επί απουσίας ίνωσης των πνευμόνων ως πνευμονική αρτηριακή υπέρταση. Ακόμα, η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών έχουν πλευρίτιδα ή συλλογή πλευριτικού υγρού.

Η συμμετοχή της καρδιάς είναι επίσης συχνή και συχνά δεν προκαλεί σοβαρές κλινικές εκδηλώσεις, όμως μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή καρδιακή ανεπάρκεια. Το μυοκάρδιο μπορεί να προσβληθεί με τη μορφή μικρών εστιών ίνωσης και νέκρωσης που οδηγούν σε στηθάγχη, καρδιακή ανεπάρκεια και υπερκοιλιακές ή κοιλιακές αρρυθμίες. Αρκετοί ασθενείς έχουν μικρή συλλογή περικαρδιακού υγρού που συνήθως δεν οδηγεί σε καρδιακό επιπωματισμό.

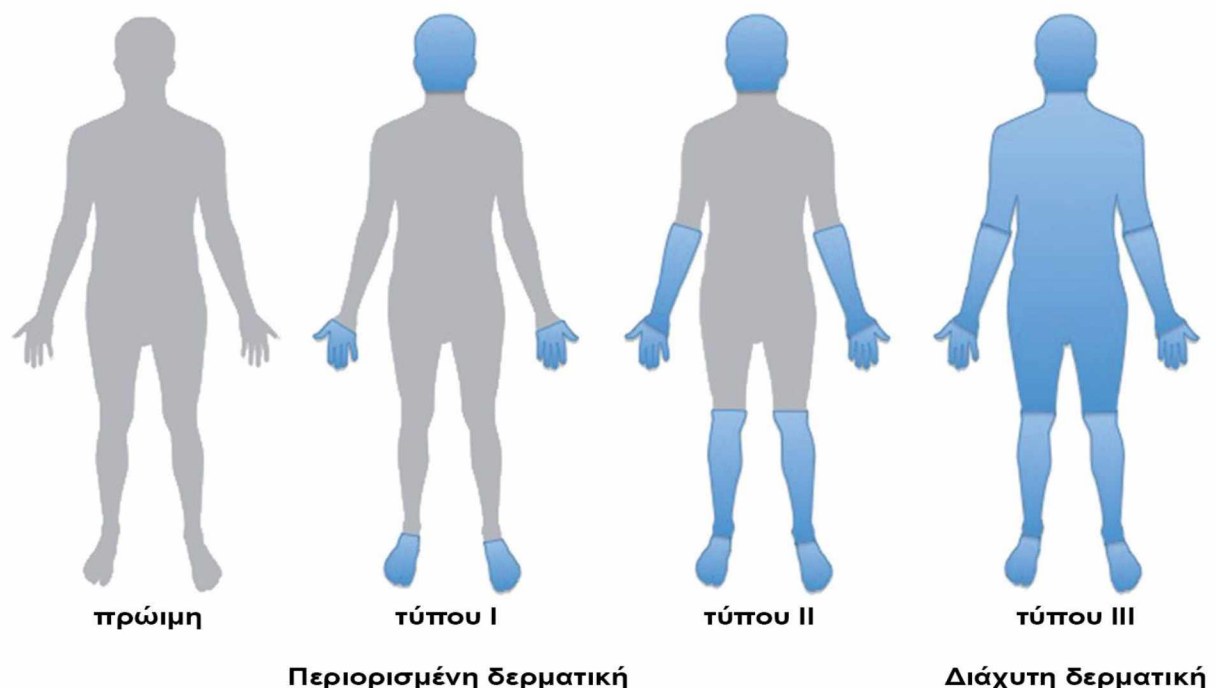
Η προσβολή των νεφρών εμφανίζεται ως νεφρική κρίση σκληροδερμίας με ταχέως εξελισσόμενη υπέρταση, νεφρική ανεπάρκεια και μικροαγγειοπαθητική αναιμία. Η νεφρική κρίση της σκληροδερμίας είναι μια απειλητική για την ζωή κατάσταση.

Πολλοί ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση εμφανίζουν κλινικά χαρακτηριστικά άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων, ρευματολογικών και μη, όπως είναι η πολυαρθρίτιδα, η μυοσίτιδα, το σύνδρομο ξηρότητας sicca και ο υποθυρεοειδισμός. Τέτοιες περιπτώσεις χαρακτηρίζονται ως σύνδρομο επικάλυψης. Λιγότερο συχνά, οι ασθενείς εμφανίζουν σύνδρομο επικάλυψης με την πρωτοπαθή χολική χολαγγειίτιδα, την αυτοάνοση ηπατίτιδα, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και διάφορες αγγειίτιδες. Επίσης, σπάνια ασθενείς εμφανίζουν τη μικτή νόσο του συνδετικού ιστού, η οποία είναι ένα σύνδρομο επικάλυψης με χαρακτηριστικά συστηματικής σκλήρυνσης, συστηματικού ερυθρηματώδους λύκου, πολυμυοσίτιδας και ρευματοειδούς αρθρίτιδας.

Όπως προαναφέρθηκε, η κλινική εικόνα της συστηματικής σκλήρυνσης είναι ιδιαίτερα ετερογενής, καθώς υπάρχουν αρκετοί ξεχωριστοί κλινικοί φαινότυποι με σημαντική ανομοιομορφία της βαρύτητας και της έκβασης. Η ταξινόμηση της συστηματικής σκλήρυνσης με βάση της έκταση της προσβολής του δέρματος έχει αποδειχτεί χρήσιμη στην καθημερινή κλινική πρακτική [396-398]. Έτσι, εντοπίζονται δύο κύριες κλινικές μορφές του νοσήματος, η περιορισμένη δερματική και η διάχυτη δερματική (Εικόνα 1.8). Στην περιορισμένη δερματική συστηματική σκλήρυνση η σκληροδερμία

εντοπίζεται περιφερικά των αγκώνων και των γονάτων και σίγουρα όχι στον κορμό. Κάποιοι ασθενείς ενδέχεται να μην εμφανίζουν καθόλου ή ελάχιστη σκληροδερμία, ιδιαίτερα κατά την έναρξη του νοσήματος, άλλοι εμφανίζουν σκληρία μονάχα στις άκρες χείρες και πόδες και άλλοι μέχρι τους αγκώνες και τα γόνατα. Στην περιορισμένη δερματική συστηματική σκλήρυνση κατατάσσεται και το σύνδρομο CREST, το οποίο χαρακτηρίζεται από ασβέστωση, φαινόμενο Raynaud, οισοφαγική δυσκινησία, σκληροδακτυλία και τηλαγγειεκτασίες. Στη διάχυτη δερματική συστηματική σκλήρυνση η σκληροδερμία επεκτείνεται και εγγύτερα των αγκώνων και των γονάτων στον κορμό. Η προσβολή του δέρματος του προσώπου μπορεί να παρουσιαστεί και στις δύο κλινικές μορφές.

Εικόνα 1.8: Ταξινόμηση της συστηματικής σκλήρυνσης σε περιορισμένη δερματική και σε διάχυτη δερματική μορφή.



Οι ασθενείς με περιορισμένη δερματική μορφή μπορεί να μην εμφανίζουν σκληροδερμία στην πρώιμη μορφή, μπορεί να εμφανίζουν σκληροδερμία των άκρων χειρών και ποδών και δακτύλων στον τύπο I ή να εμφανίζουν σκληροδερμία περιφερικά

των αγκώνων και των γονάτων. Οι ασθενείς με διάχυτη δερματική μορφή εμφανίζουν σκληροδερμία εγγύτερα των αγκώνων και των γονάτων ή στον κορμό.

Η εξέλιξη του νοσήματος διαφέρει σημαντικά από ασθενή σε ασθενή και εξαρτάται από την κλινική μορφή [397]. Η συστηματική σκλήρυνση είναι ένα χρόνια, μονοφασικό νόσημα, δηλαδή δε χαρακτηρίζεται από επεισόδια εξάρσεων με ενδιάμεσα διαστήματα κλινικών υφέσεων, όπως παρατηρείται στα περισσότερα άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. Η έκταση της προσβολής των εσωτερικών οργάνων ποικίλει, αλλά συνήθως είναι ανάλογη της έκτασης της προσβολής του δέρματος. Σε γενικές γραμμές, οι ασθενείς με διάχυτη δερματική μορφή εμφανίζουν πιο σοβαρή προσβολή των εσωτερικών οργάνων συγκριτικά με τους ασθενείς με περιορισμένη δερματική μορφή. Οι ασθενείς που εμφανίζουν μονάχα σκληροδακτυλία συνήθως δεν εμφανίζουν σοβαρές κλινικές εκδηλώσεις του νοσήματος.

Το φαινόμενο Raynaud είναι η πρώτη κλινική εκδήλωση της συστηματικής σκλήρυνσης σε πολλούς ασθενείς. Σε αυτούς, μπορεί να περάσουν χρόνια από την εκδήλωση του φαινομένου Raynaud πριν από την εκδήλωση διαταραχών σε εσωτερικά όργανα. Ωστόσο, ασθενείς με διάχυτη σκληροδερμία μπορεί να εμφανίσουν ταχέως εξελισσόμενη πολυσυστηματική νόσο εντός λίγων μηνών.

Όπως έχει προαναφερθεί, η βαρύτητα της συστηματικής σκλήρυνσης σχετίζεται με την ηλικία, το φύλλο και τη φυλή [387, 394]. Έτσι, ασθενείς που εμφανίζουν το νόσημα σε μεγάλη ηλικία, ασθενείς του αντρικού φύλλου και Αφροαμερικανοί και Ιθαγενείς Αμερικανοί ασθενείς εμφανίζουν πιο επιθετική συστηματική σκλήρυνση, με πολυσυστηματική προσβολή και χειρότερη πρόγνωση.

1.6.3 Αιτιολογικοί παράγοντες της συστηματικής σκλήρυνσης

Όπως και στην κατά πλάκας σκλήρυνση, οι παράγοντες που προκαλούν τη συστηματική σκλήρυνση δεν είναι γνωστοί, αλλά υπάρχουν ερευνητικές ενδείξεις ότι το γενετικό υπόβαθρο, επιγενετικοί μηχανισμοί, λοιμογόνοι παράγοντες, περιβαλλοντικοί ρυπαντές, τοξικές ουσίες και φάρμακα πιθανώς να συμβάλλουν στην παθογένεια του νοσήματος.

Το οικογενειακό ιστορικό συστηματικής σκλήρυνσης είναι ισχυρός παράγοντας κινδύνου του νοσήματος και μπορεί να θεωρηθεί ως ένδειξη της σημασίας της γενετικής προδιάθεσης στην παθογένεια [399]. Ο κίνδυνος εμφάνισης του νοσήματος σε συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με συστηματική σκλήρυνση είναι μέχρι και δεκατρείς φορές μεγαλύτερος σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό [392], ενώ το 36% των συγγενών αυτών εμφανίζουν κάποια αυτοάνοση διαταραχή, ιδιαίτερα υποθυρεοειδισμό, νόσο του Graves, ρευματοειδή αρθρίτιδα και συστηματικό ερυθματώδη λύκο [400]. Ανάμεσα σε δίδυμα αδέρφια η συνύπαρξη της συστηματικής σκλήρυνσης είναι χαμηλή, περίπου 5%, που υποδηλώνει μικρή συμμετοχή των γονιδίων στο νόσημα, όμως η συνύπαρξη αντιπυρηνικών αντισωμάτων σε μονοζυγωτικά δίδυμα είναι 90% και σε διζυγωτικά δίδυμα είναι 40% [401].

Γενετικές μελέτες και μελέτες GWAS έχουν αναγνωρίσει αρκετά γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεια της συστηματικής σκλήρυνσης. Ο γενετικός τόπος HLA έχει και στο νόσημα αυτό δεσπόζουσα σημασία, με τα αλληλόμορφα HLA-DRB1*11:04, HLA-DQA1*05:01 και HLA-DQB1*03:01 να εμφανίζονται συχνά σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, αλλά φαίνεται να συσχετίζονται με τα ειδικά αυτοαντισώματα της σκληροδερμίας παρά με το ίδιο το νόσημα [402]. Άλλα σημαντικά γονίδια που έχουν συνδεθεί με τη συστηματική σκλήρυνση είναι το *PTPN22*, το οποίο κωδικοποιεί για μια πρωτεϊνική φωσφατάση με σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση

των T και B λεμφοκυττάρων, το γονίδιο της κυτταροκίνης IL-1β, το *NLRP1*, το οποίο κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη του φλεγμονοσώματος, το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα IRF5, ο οποίος συνδέεται με την έκφραση των ιντερφερονών τύπου I, το *STAT4*, το οποίο κωδικοποιεί για το μεταγραφικό παράγοντα των IL-12 και IL-23, και το *CD247*, το οποίο συνδέεται με την T λεμφοκυτταρική σηματοδότηση [403-405]. Όλα τα παραπάνω γονίδια εμπλέκονται στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, τόσο του έμφυτου κλάδου, όσο και του επίκτητου. Μια σημαντική λεπτομέρεια είναι ότι τα προδιαθεσικά γονίδια αυτά δεν είναι ειδικά για τη συστηματική σκλήρυνση, αλλά εμφανίζονται και στο συστηματικό ερυθματώδη λύκο και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. Αυτό υποδηλώνει τους κοινούς μηχανισμούς ανάμεσα στα διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα, όμως δημιουργεί απορίες σχετικά με την επίδραση των κοινών γονιδίων σε κάθε νόσημα.

Διάφοροι επιγενετικοί μηχανισμοί έχουν μελετηθεί στη συστηματική σκλήρυνση με σκοπό την κατανόηση της ετερογενούς κλινικής εικόνας ανάμεσα στα αυτοάνοσα νοσήματα, παρά την ύπαρξη κοινών γενετικών μηχανισμών, καθώς μπορούν να ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση. Μια ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA σε ινοβλάστες ασθενών με συστηματική σκλήρυνση και σε ινοβλάστες υγείων μαρτύρων αποκάλυψε διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης σε νησίδια CpG που συνδέονται με γονίδια πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και μορίων κυτταρικής προσκόλλησης στη συστηματική σκλήρυνση, υποδηλώνοντας διαφορετική ρύθμιση της έκφρασης τους [406]. Μια άλλη μελέτη ανέφερε την αύξηση της μεθυλίωσης σε υποκινητές αντι-ινωτικών γονιδίων με αποτέλεσμα την αποσιώπηση τους σε ινοβλάστες ασθενών με συστηματική σκλήρυνση [407]. Παράλληλα, επιγενετικές τροποποιήσεις στη συστηματική σκλήρυνση φαίνεται ότι ευνοούν την έκφραση προ-ινωτικών γονιδίων, καθώς η ακετυλίωση της ιστόνης 3 στη λυσίνη 27 στον ενισχυτή

του γονιδίου του TGF-β οδηγεί σε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης του προ-ινωτικού παράγοντα αυτού σε ινοβλάστες ασθενών με συστηματική σκλήρυνση [408]. Ο TGF-β με τη σειρά του επάγει την έκφραση του κολλαγόνου τύπου 1, αλλά και την έκφραση πρωτεϊνών που επιτρέπουν την ωρίμανση και την εναπόθεση του στον εξωκυττάριο χώρο, και έτσι οι ινοβλάστες βρίσκονται σε μια συνεχή ινωτική κατάσταση [408]. Οι παραπάνω μελέτες, μαζί με πολλές άλλες, καταδεικνύουν τη σημαντική συμβολή των επιγενετικών τροποποιήσεων στην ανάπτυξη της συστηματικής σκλήρυνσης.

Αρκετοί μολυσματικοί παράγοντες, μικρόβια και ιοί, έχουν προταθεί ως πυροδότες της συστηματικής σκλήρυνσης [51, 409]. Ο πιθανός ρόλος τους, ιδιαίτερα αυτός του EBV και του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού*, θα παρουσιαστούν αναλυτικά σε επόμενες ενότητες.

Περιβαλλοντικοί ρυπαντές, τοξικές ουσίες και φάρμακα έχουν προταθεί ως αιτιολογικοί παράγοντες της συστηματικής σκλήρυνσης. Δύο πιθανές ουσίες είναι το λάδι ελαιοκράμβης και η L-τρουπτοφάνη. Η χρήση μαγειρικού λαδιού με πρόσμιξη λαδιού ελαιοκράμβης έχει συνδεθεί με το σύνδρομο του τοξικού ελαίου, ενώ διαιτητικά συμπληρώματα που περιέχουν L-τρουπτοφάνη ενοχοποιήθηκαν για την επιδημιολογική έξαρση του συνδρόμου εωσινοφιλίας-μυαλγίας το 1989 στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής [410, 411]. Τα δύο παραπάνω σύνδρομα είναι τοξικοεπιδερμικά και χαρακτηρίζονται από ίνωση του δέρματος και εσωτερικών οργάνων, όπως στη συστηματική σκλήρυνση, όμως διαφοροποιούνται από αυτήν, επειδή δεν έχουν άλλα κλινικά, ιστοπαθολογικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά της. Η επαγγελματική έκθεση εργατών σε σκόνη σιλικόνης έχει αναφερθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης συστηματικής σκλήρυνσης [412]. Άλλες ουσίες που έχουν περιστασιακά συνδεθεί με το νόσημα είναι το πολυβινυλοχλωρίδιο των πλαστικών, το τολουόλιο, το ξυλένιο, το τριχλωροαιθυλένιο, διάφοροι οργανικοί διαλύτες, φυτοφάρμακα και βαφές μαλλιών

[413]. Τέλος, τα αντινεοπλασματικά φάρμακα μπλεομυκίνη, πακλιταξέλη και δοσεταξέλη, το οπιοειδές αναλγητικό πενταζοκίνη και η κοκαΐνη έχουν επίσης ενοχοποιηθεί περιστασιακά ότι συμμετέχουν στην παθογένεια της συστηματικής σκλήρυνσης [413].

1.6.4 Παθογένεση της συστηματικής σκλήρυνσης

Η παθογένεση της συστηματικής σκλήρυνσης είναι πολύπλοκη και περιλαμβάνει μηχανισμούς απορρύθμισης και ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, φλεγμονής, αγγειακής βλάβης, ενεργοποίησης ινοβλαστών και διάχυτης ιστικής ίνωσης [414]. Οι μηχανισμοί αυτοί αντανακλούν ουσιαστικά τα τρία παθολογικά χαρακτηριστικά της συστηματικής σκλήρυνσης που παρουσιάστηκαν στην Ενότητα 1.6.1. Η συνεισφορά του κάθε μηχανισμού στην παθογένεση του νοσήματος ενδέχεται να διαφέρει από ασθενή σε ασθενή, όμως η αλληλεπίδραση ανάμεσα στους είναι σύνθετη και δυναμική και οδηγεί στην έναρξη, στη διατήρηση και στην εξέλιξη της συστηματικής σκλήρυνσης.

Όπως παρουσιάστηκε στην προηγούμενη ενότητα, οι ακριβείς αιτιοπαθογενετικοί παράγοντες της συστηματικής σκλήρυνσης δεν είναι πλήρως εξακριβωμένοι. Η επικρατέστερη θεωρία ορίζει ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες μαζί με επιγενετικούς μηχανισμούς σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα πυροδοτούν τους μηχανισμούς της απορρύθμισης και ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, που οδηγεί σε αυτοανοσία, και της αγγειακής βλάβης [413, 414]. Οι αυτοάνοσες ανοσολογικές αντιδράσεις και η διαταραχή της λειτουργίας μικρών αρτηριών και αρτηριδίων προκαλούν τις κλινικές εκδηλώσεις της συστηματικής σκλήρυνσης κατά την έναρξη της. Παράλληλα, η ενεργοποίηση ινοβλαστών καταλήγει σε παθολογική εναπόθεση μεγάλων ποσοτήτων εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας στους ιστούς και προοδευτική ιστική βλάβη. Με την πάροδο του χρόνου, η χρόνια αγγειακή ανεπάρκεια και η διάχυτη

ίνωση προξενούν εκτεταμένη βλάβη και σοβαρή ανεπάρκεια εσωτερικών οργάνων, όπως οι πνεύμονες, η καρδιά, οι νεφρούς και ο γαστρεντερικός σωλήνας, και επιφέρουν τη σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα της συστηματικής σκλήρυνσης [413, 414].

Η απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος θεωρείται θεμελιώδες γεγονός στη συστηματική σκλήρυνση [415]. Από την έναρξη του νοσήματος παρατηρούνται στο προσβεβλημένο δέρμα και στους πνεύμονες περιαγγειακή διήθηση Τ λεμφοκυττάρων, ιστοκυττάρων, εωσινόφιλων, μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων, ενώ ανιχνεύονται ενεργοποιημένα Τ και Β λεμφοκύτταρα στην κυκλοφορία [172, 413, 416]. Η αυτοανοσία εκδηλώνεται από την παρουσία αυτοαντισωμάτων υψηλής ειδικότητας ουσιαστικά σε όλους τους ασθενείς καθ' όλη τη διάρκεια του νοσήματος [172, 417, 418].

Η ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων είναι πρόδηλη στους προσβεβλημένους ιστούς και στο περιφερικό αίμα ασθενών με συστηματική σκλήρυνση και φαίνεται ότι έχει άμεσο ρόλο στην επαγωγή της ίνωσης [416]. Στα πρώιμα στάδια της συστηματικής σκλήρυνσης ενεργοποιημένα CD4⁺ και CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα εντοπίζονται στον περιαγγειακό χώρο στο δέρμα, στους πνεύμονες και σε άλλα όργανα που έχουν προσβληθεί πριν από την εμφάνιση της ίνωσης [419, 420]. Η έκταση της λεμφοκυτταρικής διήθησης είναι ευθέως ανάλογη της κλινικής βαρύτητας και της εξέλιξης του νοσήματος. Επίσης, ενεργοποιημένα, ολιγοκλωνικά CD4⁺ Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα διηθούν τους προσβεβλημένους ιστούς [421]. Ο Th2 λεμφοκυτταρικός φαινότυπος επικρατεί έναντι του Th1 και αυτή η ανισορροπία ευνοεί την ίνωση [422]. Τα Th2 λεμφοκύτταρα παράγουν και εκκρίνουν άφθονες ποσότητες IL-4, IL-5 και IL-13, οι οποίες επάγουν τη σύνθεση κολλαγόνου, την ενεργοποίηση ινοβλαστών με απόκτηση ενός προ-ινωτικού φαινοτύπου, καθώς και την ενεργοποίηση του TGF-β, ο

ο οποίος έχει εξέχουσα θέση στην παραγωγή, συσσώρευση και εναπόθεση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας που παρατηρείται στη συστηματική σκλήρυνση [414, 423]. Τα επίπεδα της αντι-ινωτικής IFN- γ είναι μειωμένα ως αποτέλεσμα της μείωσης των Th1 κυττάρων, ευνοώντας ακόμα περισσότερο ένα ινωτικό περιβάλλον.

Τα νοσοειδικά αυτοαντισώματα μπορεί να εμφανίζονται αρκετά χρόνια πριν από την κλινική εκδήλωση της συστηματικής σκλήρυνσης [172]. Τα πιο συχνά είναι τα αυτοαντισώματα έναντι της τοποϊσομεράσης I ή Scl70, έναντι της RNA πολυμεράσης III και έναντι των κεντρομεριδιακών πρωτεϊνών A και B. Η παρουσία ενός αυτοαντισώματος συνήθως αποκλείει την παρουσία ενός άλλου. Επίσης, η παρουσία των αυτοαντισωμάτων αυτών χρησιμοποιείται στη διάγνωση και στην κατάταξη της συστηματικής σκλήρυνσης. Τα αυτοαντισώματα έναντι της τοποϊσομεράσης I και έναντι της RNA πολυμεράσης III ανιχνεύονται πιο συχνά σε ασθενείς με διάχυτη δερματική συστηματική σκλήρυνση, ενώ τα αντι-κεντρομεριδιακά αυτοαντισώματα στην περιορισμένη δερματική συστηματική σκλήρυνση [417, 418]. Ακόμα, κάθε αυτοαντίσωμα συνδέεται με συγκεκριμένο κλινικό φαινότυπο· για παράδειγμα, τα αντι-τοποϊσομεράση I αυτοαντισώματα σχετίζονται με την εκδήλωση πνευμονικής ίνωσης και προσβολής της καρδιάς και τα αντι-κεντρομεριδιακά αυτοαντισώματα με την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση [415]. Ο ρόλος των αυτοαντισωμάτων στην παθογένεση της συστηματικής σκλήρυνσης δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Ωστόσο, αρκετά από αυτά συμμετέχουν στη δημιουργία ίνωσης επάγοντας την παραγωγή κολλαγόνου και του TGF- β και ευνοώντας την παθολογική εναπόθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας [424-426]. Επίσης, κάποια αυτοαντισώματα συμμετέχουν στην αγγειακή βλάβη, μέσω της επαγωγής απόπτωσης και αύξησης του οξειδωτικού στρες [427, 428], ενώ επίσης υπάρχουν αυτοαντισώματα που προκαλούν αγγειοσυστολή [429].

Σημαντικό ρόλο στη συστηματική σκλήρυνση διαδραματίζουν και τα Β λεμφοκύτταρα [172]. Ενεργοποιημένα Β λεμφοκύτταρα ανιχνεύονται σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση [430] και εκτός από την παραγωγή των αυτοαντισωμάτων, συμμετέχουν στην παθογένεση και με άλλους μηχανισμούς. Αρχικά, τα ενεργοποιημένα Β λεμφοκύτταρα μπορούν να παράγουν τις IL-6 και TGF-β, οι οποίες έχουν έντονες προ-ινωτικές δράσεις στη συστηματική σκλήρυνση [172]. Επίσης, έχουν σημαντική αντιγονοπαρουσιαστική δραστηριότητα προς τα Τ λεμφοκύτταρα και αλληλοεπιδρούν με δενδριτικά κύτταρα προς επαγωγή του Th2 φαινότυπου στα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα [431]. Τέλος, τα Β ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα είναι λειτουργικά και αριθμητικά διαταραγμένα σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, διευκολύνοντας έτσι τη διάσπαση της ανοσολογικής ανοχής και την εμφάνιση αυτοανοσίας [430].

Το δεύτερο εξέχον παθολογικό χαρακτηριστικό της συστηματικής σκλήρυνσης είναι η αγγειακή βλάβη μικρών αρτηριών και αρτηριδίων [432]. Η παθολογική εξεργασία αυτή συμβαίνει νωρίς στην πορεία του νοσήματος και συχνά προηγείται την κλινικής εκδήλωσης. Η αρχική προσβολή των αγγείων στη συστηματική σκλήρυνση μπορεί να προκαλείται από τη δράση Τ λεμφοκυττάρων, αυτοαντισωμάτων, ιών, προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών ή ενεργών ριζών του οξυγόνου. Η αρχική αγγειακή βλάβη αυτή σε προδιατεθειμένα άτομα προκαλεί έναν καταρράκτη παθολογικών εξεργασιών που οδηγούν σε μικροαγγειοπάθεια, αραίωση και απώλεια των μικρών αγγείων και τριχοειδών και τελικά την ιστική υποξία.

Ο καταρράκτης ξεκινάει με την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων των προσβεβλημένων αγγείων, ακολουθούμενη από την ενεργοποίηση αιμοπεταλίων και του μηχανισμού της πήξης [432]. Η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων μεσολαβείται και από αντι-ενδοθηλιακά αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται στον ορό ασθενών με συστηματική σκλήρυνση [427]. Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα

διαφοροποιούνται προς μεσεγγυματικά κύτταρα και ινοβλάστες, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται ενδοθηλιο-μεσεγγυματική μετάβαση και επάγεται από τη δράση του TGF- β [433]. Επίσης, τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες της ενδοθηλίνης 1, ενός ισχυρού αγγειοσυσπαστικού παράγοντα. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σχετίζεται με την απελευθέρωση της θρομβοξάνης A₂, του αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια PDGF και του TGF- β , καθώς και με την ενεργοποίηση της θρομβίνης, με αποτέλεσμα την πήξη, την αγγειοσύσπαση και την ενεργοποίηση ινοβλαστών. Παράλληλα, περικύτταρα των αγγειακών τοιχωμάτων ενεργοποιούνται και πολλαπλασιάζονται, προκαλώντας την πάχυνση των αγγειακών τοιχωμάτων, η οποία επιδεινώνεται από την παθολογική εναπόθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας από τους ενεργοποιημένους ινοβλάστες. Η πάχυνση των αγγειακών τοιχωμάτων σε συνδυασμό με την αγγειοσυσπαστική δράση της ενδοθηλίνης 1 μειώνουν τη διάμετρο του αγγειακού αυλού, επηρεάζοντας έτσι τη ροή του αίματος [413].

Εκτός από δομικές αλλαγές, τα προσβεβλημένα αγγεία στους ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση εμφανίζουν και λειτουργικές διαταραχές, οι οποίες επιβαρύνουν την αγγειακή βλάβη [432]. Τόσο η παραγωγή αγγειοδιασταλτικών μορίων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως το μονοξειδίο του αζώτου, όσο και απόκριση των λείων μυικών κυττάρων είναι ελαττωμένες. Επίσης, εμφανίζεται απορρύθμιση της νευρικής αγγειακής ρύθμισης, μέσω ελάττωσης των αγγειοδιασταλτικών νευροπεπτιδίων και αύξησης των α_2 αδρενεργικών υποδοχέων στα λεία μυικά κύτταρα των αγγείων. Επιπλέον, αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση έχουν την ικανότητα αγγειοσύσπασης [429]. Η ανισορροπία ανάμεσα σε αγγειοσυσπαστικά και αγγειοδιασταλτικά σήματα που δημιουργείται επηρεάζει ακόμα περισσότερο την αιματική ροή και προκαλεί επεισόδια ισχαιμίας και επαναιμάτωσης.

Η διαταραχή της αιματικής παροχής επάγει οξειδωτικό στρες, το οποίο με τη σειρά του επιδεινώνει την αγγειακή βλάβη [413]. Τα κατεστραμένα αγγεία εμφανίζουν αυξημένη διαπερατότητα, αυξάνοντας έτσι τη διήθηση των ιστών από λεμφοκύτταρα, ενώ οι υπο-ενδοθηλιακές δομές εκτίθενται στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, διευκολύνοντας τη συσσωμάτωση τους και το σχηματισμό θρόμβων. Η υπερπηκτική διάθεση αυξάνεται από την αυξημένη παραγωγή και απελευθέρωση του παράγοντα von Willebrand από τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα [413].

Ο συνδυασμός της πάχυνσης του αγγειακού τοιχώματος, της αγγειοσύσπασης και του σχηματισμού θρόμβων προκαλούν την απόφραξη και την εξάλειψη του αγγείου. Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης των αγγείων, όπως είναι η αγγειογένεση που επάγεται από τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα VEGF, στη συστηματική σκλήρυνση είναι επίσης απορυθμισμένοι, με συνέπεια την προοδευτική αραίωση αρχικά και απώλεια των αγγείων στη συνέχεια με συνεπακόλουθη ιστική ισχαιμία στο προσβεβλημένο όργανο [434].

Το τελευταίο παθολογικό χαρακτηριστικό της συστηματικής σκλήρυνσης είναι η διάχυτη ίνωση του δέρματος και εσωτερικών οργάνων [413, 414]. Όπως έχει ήδη παρουσιαστεί, στη συστηματική σκλήρυνση εμφανίζεται μια έντονα προ-ινωτική διάθεση, με εκτεταμένη ενεργοποίηση ινοβλαστών, ετεροδιαφοροποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων και λιποκυττάρων προς ενεργοποιημένους ινοβλάστες και μυοβλάστες, απευαισθητοποίηση από την αντι-ινωτική επίδραση της IFN- γ , παραγωγή, εναπόθεση και συσσώρευση συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Σημαντικό ρόλο στην ίνωση παίζει ο TGF- β [423]. Η εκτεταμένη ίνωση μαζί με την αγγειακή ανεπάρκεια και την ιστική ισχαιμία οδηγούν σε οργανική ανεπάρκεια των προσβεβλημένων οργάνων και στο τέλος επιφέρουν το θάνατο.

1.6.5 Ο ρόλος των μολύνσεων και της μοριακής μίμησης στη συστηματική σκλήρυνση

Όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 1.6.3, μικρόβια και ιοί έχουν συσχετιστεί με τη συστηματική σκλήρυνση, εμπλεκόμενοι στην ανάπτυξη και διατήρηση του νοσήματος [51]. Μέχρι σήμερα έχει αναφερθεί η πιθανή συμμετοχή στη συστηματική σκλήρυνση του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού*, τα χλαμύδια, ο παρβοϊός B19, ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός, ο EBV και ενδογενείς ρετροϊοί, ενώ ένας από τους παθογενετικούς μηχανισμούς μέσω του οποίου συμμετέχουν στην παθογένεση είναι μοριακή μίμηση. Οι πιθανοί ρόλοι του EBV και του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* στη συστηματική σκλήρυνση θα παρουσιαστούν στις δύο επόμενες ενότητες, αντίστοιχα. Ωστόσο, αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στον πιθανό ρόλο του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού στη συστηματική σκλήρυνση.

Ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός έχει την ικανότητα να μολύνει τα βασικά κύτταρα που συμμετέχουν στους παθογενετικούς μηχανισμούς της συστηματικής σκλήρυνσης, δηλαδή τους ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα [435]. Γενετικό υλικό του ιού έχει ανιχνευθεί σε ενδοθηλιακά κύτταρα δέρματος μίας ασθενούς με συστηματική σκλήρυνση, η διάγνωση της οποίας έγινε δύο μήνες μετά από την εμφάνιση οξείας λοίμωξης από τον κυτταρομεγαλοϊό [436]. Ο ιός αυτός έχει την ικανότητα να αυξάνει σημαντικά την έκφραση αρκετών προ-ινωτικών παραγόντων σε ανθρώπινους ινοβλάστες *in vitro* [437]. Επίσης, τόσο η συχνότητα, όσο και οι τίτλοι των αντισωμάτων έναντι του κυτταρομεγαλοϊού είναι υψηλότεροι σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, συμπεριλαμβανομένων αντιγονοειδικών αντισωμάτων έναντι των ιικών αντιγόνων UL94, UL83 και UL99 [103, 106, 438, 439].

Ο κυτταρομεγαλοϊός θα μπορούσε να συμμετέχει στην επαγωγή της αυτοανοσίας στη συστηματική σκλήρυνση μέσω του μηχανισμού της μοριακής μίμησης. Ένας επίτοπος

του ιικού αντιγόνου UL94 εμφανίζει ομολογία με την ενδογενή πρωτεΐνη NAG-2, η οποία εκφράζεται στην επιφάνεια ενδοθηλιακών κυττάρων και ινοβλαστών [104, 106]. Αντισώματα έναντι του UL94 μπορούν να προσδένονται στην επιφάνεια ενδοθηλιακών κυττάρων προκαλώντας την απόπτωση τους [104], αλλά και στην επιφάνεια ινοβλαστών, προκαλώντας την ενεργοποίησή τους και την απόκτηση ενός προ-ινωτικού φαινοτύπου [106]. Επίσης, μοριακή μίμηση έχει αναφερθεί ανάμεσα στο ιικό αντιγόνο UL70 και σε έναν επίτοπο της τοποϊσομεράσης I που αναγνωρίζεται από αυτοαντισώματα απομονωμένα από ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, χωρίς ωστόσο να αναφέρεται διασταυρούμενη αντιδραστικότητα [440].

1.6.6 Ο ιός Epstein-Barr στη συστηματική σκλήρυνση

Ο ρόλος του ιού EBV στην αιτιοπαθογένεια της συστηματικής σκλήρυνσης έχει αποτελέσει αντικείμενο αρκετών μελετών μέχρι σήμερα. Ο EBV έχει την ικανότητα να μολύνει ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα στο δέρμα ασθενών με συστηματική σκλήρυνση, αλλά και μονοκύτταρα στο περιφερικό αίμα [441, 442], ενώ γενετικό υλικό του ιού έχει ανιχνευθεί και στο πνευμονικό παρέγχυμα ασθενών με συστηματική σκλήρυνση [443]. Η μόλυνση των ινοβλαστών και των ενδοθηλιακών κυττάρων στους ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση είναι χρόνια, όπως αποδεικνύεται από την ανίχνευση mRNA και πρωτεϊνών της λανθάνουσας και της λυτικής φάσης [442]. *In vitro*, ο ιός έχει την ικανότητα ενεργοποίησης ανθρώπινων ινοβλαστών μέσω των υποδοχέων TLR7 και TLR9, επάγοντας έναν προ-ινωτικό φαινότυπο με αυξημένη έκφραση του TGF- β , της ενδοθηλίνης 1 και γονιδίων που επάγονται από το TGF- β και έχουν ινωτική δράση [442]. Επίσης, ο EBV έχει την ικανότητα απορρύθμισης της έμφυτης ανοσίας στη συστηματική σκλήρυνση, καθώς μπορεί να ενεργοποιεί μονοκύτταρα από ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση μέσω του υποδοχέα TLR8 [441].

Ο ρόλος της ανοσολογικής απόκρισης έναντι του EBV φαίνεται ότι είναι σημαντικός στην παθογένεια της συστηματικής σκλήρυνσης. Οι χυμικές αποκρίσεις ένα του EBV και έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του είναι αυξημένες σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [444, 445]. Οι Mahler και συνεργάτες έχουν υποστηρίξει ότι η μοριακή μίμηση ανάμεσα στο ιικό πυρηνικό αντιγόνο EBNA-1 και στην ενδογενή κεντρομεριδιακή πρωτεΐνη A και η ανοσολογική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα πιθανώς να παίζει ρόλο στην εξέλιξη της συστηματικής σκλήρυνσης, καθώς αντισώματα έναντι της EBNA-1 αντιδρούν με την κεντρομεριδιακή πρωτεΐνη A μέσω κοινών κρυπτικών επιτόπων-μιμητών [171].

1.6.7 Το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* στην συστηματική σκλήρυνση

Το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* έχει μελετηθεί ως πιθανός πυροδότης της συστηματικής σκλήρυνσης. Ορολογικές και επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν το ρόλο αυτό, ερευνώντας τις συχνότητες της μόλυνσης από το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση με χρήση δοκιμασίας ELISA για ανίχνευση IgG αντι-ελικοβακτηριδιακών αντισωμάτων ή δοκιμασία ουρίας αναπνοής ή δοκιμασία ουρίας σε γαστρική βιοψία [446-455]. Ανάμεσα σε αυτές, μια μετα-ανάλυση που ανέλυσε δεδομένα από οχτώ επιμέρους μελέτες ανέφερε ότι η μόλυνση από *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* είναι δύο φορές πιο συχνή στη συστηματική σκλήρυνση σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό [454]. Οι πέντε από αυτές τις μελέτες ανίχνευσαν IgG αντισώματα έναντι του βακτηρίου με δοκιμασία ELISA και όλες ανέφεραν υψηλότερη συχνότητα αυτών σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [446, 449, 450, 452, 453]. Η μετα-ανάλυση χρησιμοποιώντας δεδομένα μονάχα από τις πέντε ορολογικές μελέτες αυτές έδειξε ότι η παρουσία αντι-ελικοβακτηριδιακών αντισωμάτων είναι δυόμισι φορές πιο συχνή σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [454]. Στις υπόλοιπες τρεις

μελέτες, η παρουσία του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* διερευνήθηκε με δοκιμασίες ουρίας και ήταν συγκρίσιμη ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες [447, 448, 451]. Επίσης, οι τίτλοι των αντι-ελικοβακτηριδιακών αντισωμάτων έχουν βρεθεί να είναι υψηλότεροι σε μια μικρή ομάδα ασθενών με συστηματική σκλήρυνση [455].

Η εκκρίωση του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* με τριπλή θεραπευτικό σχήμα εξαφάνισε ή μείωσε σημαντικά επεισόδια του φαινομένου Raynaud σε ασθενείς με πρωτοπαθή νόσο Raynaud [456, 457]. Η αποτυχία εκκρίωσης του *Ελικοβακτηριδίου* σχετίστηκε με αυξημένη συχνότητα και βαρύτητα των επεισοδίων της νόσου. Το *Ελικοβακτηρίδιο* ενδέχεται να συμμετέχει στο φαινόμενο Raynaud μέσω της παραγωγής αγγειοδραστικών ουσιών, η ελάττωση των οποίων μετά την εκκρίωση οδηγεί σε ύφεση του φαινομένου [456]. Μέσω αυτού του μηχανισμού θα μπορούσε να συμμετέχει και στις παθογενετικές εξεργασίες της συστηματικής σκλήρυνσης. Ωστόσο, η υπόθεση αυτή δεν υποστηρίζεται από μελέτες οι οποίες δε βρήκαν συσχέτιση ανάμεσα στο *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* και στο φαινόμενο Raynaud ή στη συστηματική σκλήρυνση [448, 458, 459].

1.7 Υπόθεση

Η υπόθεση της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι ότι οι ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι αντιγόνων του ιού Epstein-Barr και σε αντιγόνα του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* συμμετέχουν στην παθογένεση της κατά πλάκας σκλήρυνσης και της συστηματικής σκλήρυνσης, μέσω των μηχανισμών της μοριακής μίμησης και της ανοσολογικής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας ανάμεσα σε ιικά και μικροβιακά αντιγόνα με αυτοαντιγόνα της κατά πλάκας σκλήρυνσης και της συστηματικής σκλήρυνσης.

1.8 Στόχοι

- 1) Να μελετηθούν οι χυμικές ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι του ιού Epstein-Barr και του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση και σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση.
- 2) Να μελετηθούν πιθανές συσχετίσεις των ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι του ιού Epstein-Barr και του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* με κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά της κατά πλάκας σκλήρυνσης και της συστηματικής σκλήρυνσης.
- 3) Να αναζητηθούν *in silico* πιθανοί στόχοι μοριακής μίμησης ανάμεσα σε αντιγόνα του ιού Epstein-Barr και του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* με αυτοαντιγόνα της κατά πλάκας σκλήρυνσης και της συστηματικής σκλήρυνσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Πλαστικά και αναλώσιμα

Υλικό	Εταιρία
Ακρορύγχια πιπτετών	Gilson Inc., Γουινσκόνσιν, ΗΠΑ
Απορροφητικό χαρτί τύπου Whatman	Bio-Rad Laboratories Inc., Καλιφόρνια, ΗΠΑ
Πιπέτες τύπου Pasteur 3 ml	Greiner Bio-One GmbH, Γερμανία
Πλακίδια 24 φρεατίων (24-well plate)	Corning Inc., Νέα Υόρκη, ΗΠΑ
Φορέας επώασης ταινιών δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης 30 καναλιών	Euroimmun AG, Γερμανία
Σύριγγα 20 ml με βελόνα 21 gauge	Webest Medical Product Co., Ltd., Κίνα
Σωληνάρια κρυοαποθήκευσης (cryovials) 1.5 ml	Corning Inc., Νέα Υόρκη, ΗΠΑ
Σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 ml	FL medical, Ιταλία
Σωληνάρια τύπου Falcon 15 ml	Corning Inc., Νέα Υόρκη, ΗΠΑ
Σωληνάρια τύπου Falcon 50 ml	Corning Inc., Νέα Υόρκη, ΗΠΑ
Ταινία εργαστηρίου «Parafilm»	Pechiney Plastic Packaging, Ιλινόι, ΗΠΑ

2.1.2 Μηχανήματα και εργαλεία

Μηχάνημα/εργαλείο	Εταιρία
Αναδευτήρας τύπου Rocker	Heidolph Instruments, Γερμανία
Αναδευτήρας τύπου Vortex	Velp Scientifica, Ιταλία
Αυτόκαυστο αποστείρωσης	Daihan Labtech Co. Ltd, Νότια Κορέα
Δοχείο κατάψυξης κυττάρων «Mr. Frosty»	Nalge Nunc, Νέα Υόρκη, ΗΠΑ
Επιτραπέζια φυγόκεντρος Z400 (με ρότορες για σωληνάρια τύπου Falcon 15 ml και 50 ml)	HERMLE Labortechnik GmbH, Γερμανία
Εργαστηριακός απαγωγός αερίων	Daihan Labtech Co. Ltd, Νότια Κορέα
Ηλεκτρονικό χρονόμετρο	QIAGEN, Γερμανία
Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας	Velp Scientifica, Ιταλία
Καταψύκτης -20° C	Whirlpool, Μίσιγκαν, ΗΠΑ
Καταψύκτης -74° C	Daihan Labtech Co. Ltd, Νότια Κορέα
Κλίβανος επώασης κυττάρων με CO ₂	ThermoFisher Scientific Inc., Μασαχουσέτη, ΗΠΑ

Κυτταρόμετρο Guava easyCyte 5	Merck Millipore Inc. Μασαχουσέτη, ΗΠΑ
Πιπέτες Finnpiettes	ThermoFisher Scientific Inc., Μασαχουσέτη, ΗΠΑ
Σύστημα καθαρισμού νερού Direst Q3	Merck Millipore Inc. Μασαχουσέτη, ΗΠΑ
Φωτόμετρο Multimode Plate Reader EnSpire	PerkinElmer Inc., Μασαχουσέτη, ΗΠΑ
Ψυγείο 4° C	Whirlpool, Μίσιγκαν, ΗΠΑ

2.1.3 Εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες (kit)

Δοκιμασία	Εταιρία
Anti-Helicobacter pylori ELISA (IgG)	Euroimmun AG, Γερμανία
Antibodies against Helicobacter pylori (IgG) EUROLINE-WB	Euroimmun AG, Γερμανία
Anti-EBV WESTERNBLOT (IgG)	Euroimmun AG, Γερμανία
ELISA Kit for C Reactive Protein	Cloud Clone Corporation, Κίνα

2.1.4 Εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια, χημικά και μέσα καλλιέργειας

Αντιδραστήριο	Εταιρία
Fetal Bovine Serum (FBS), εμβρυικός ορός βοδινού	Gibco, ThermoFisher Scientific Inc. Μασαχουσέτη, ΗΠΑ
ODN2006, CpG ODN	Invivogen, Καλιφόρνια, ΗΠΑ
PBS (1X) pH 7.4	Gibco, ThermoFisher Scientific Inc. Μασαχουσέτη, ΗΠΑ
PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate	Cayman Chemical, Μίσιγκαν, ΗΠΑ
Trypan blue stain 0.4%	Gibco, ThermoFisher Scientific Inc. Μασαχουσέτη, ΗΠΑ
Διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO)	Sigma Aldrich, Μιζούρι, ΗΠΑ
Ηπαρίνη (5000 IU/ml)	LEO Pharma A/S, Δανία
Θρεπτικό μέσο RPMI-1640 (1X) με L- Glutamine	Gibco, ThermoFisher Scientific Inc. Μασαχουσέτη, ΗΠΑ
Ιονομυκίνη	Cayman Chemical, Μίσιγκαν, ΗΠΑ
Μπρεφελνίνη, Brefeldin A, GolgiPlug	BD Biosciences, Νιου Τζέρσεϊ, ΗΠΑ
Σαπονίνη από Quillaja	Sigma Aldrich, Μιζούρι, ΗΠΑ
Παραφορμαλδεΐδη, paraformaldehyde, PFA	Sigma Aldrich, Μιζούρι, ΗΠΑ
Πενικιλίνη (10000 Units/ml)/Στρεπτομυκίνη (10000 µg/ml)	Gibco, ThermoFisher Scientific Inc. Μασαχουσέτη, ΗΠΑ

Φικόλη Lymphosep Lymphocyte Separation Media	Biosera, Γαλλία
--	-----------------

2.1.5 Αντισώματα

Αντίσωμα	Εταιρία
IgG rabbit αντι-Escherichia coli GroEL	Enzo Life Sciences, Νέα Υόρκη, ΗΠΑ
IgG rabbit αντι-Hp VacA	Abcam, Ηνωμένο Βασίλειο
IgG1,λ rabbit anti-human Scl-70	Euroimmun AG, Γερμανία
IgG mouse Alexa Fluor 647-anti-human IFN-γ	BD Biosciences, Νιου Τζέρσεϊ, ΗΠΑ
IgG mouse allophycocyanin (APC)-anti-human IL-10	BD Biosciences, Νιου Τζέρσεϊ, ΗΠΑ
IgG mouse fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-human CD3	BD Biosciences, Νιου Τζέρσεϊ, ΗΠΑ
IgG mouse phycoerythrin (PE)-anti-human CD19	BD Biosciences, Νιου Τζέρσεϊ, ΗΠΑ
IgG mouse FITC-anti-human CD27	BD Biosciences, Νιου Τζέρσεϊ, ΗΠΑ

2.1.6 Βιολογικό Υλικό

Συνολικά, συλλέχθηκαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος από 139 (98 γυναίκες, 70.5%· διάμεση ηλικία 42 έτη, εύρος ηλικίας 20-69 έτη) ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (multiple sclerosis, MS), εκ των οποίων τα 102 (73.4% των ασθενών με MS· 70 γυναίκες, 68.6%· διάμεση ηλικία 38 έτη, εύρος ηλικίας 20-66 έτη) από ασθενείς με υποτροπιάζουσα κατά πλάκας σκλήρυνση (relapse-remitting multiple sclerosis, RRMS) και τα 37 (26.6% των ασθενών με MS· διάμεση ηλικία 58 έτη, εύρος ηλικίας 30-69 έτη) από ασθενείς με δευτεροπαθή προϊούσα κατά πλάκας σκλήρυνση (secondary progressive multiple sclerosis, SPMS). Ο Πίνακας 2.1 παρουσιάζει τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με MS. Η διάγνωση της RRMS βασίστηκε στα ανανεωμένα Κριτήρια McDonald του 2011 [460], ενώ η μετάβαση στην SPMS βασίστηκε στα κριτήρια που θεσπίστηκαν το 2016 από τους Lorscheider και συνεργάτες [461]. Κατά την αιμοληψία 38 (27.3%) ασθενείς δε λάμβαναν κάποια

θεραπευτική αγωγή. Ανάμεσα στους υπόλοιπους ασθενείς, 33 (23.7%) λάμβαναν ιντερφερόνη β (συμπεριλαμβανομένου 19 σε ιντερφερόνη β-1α και 14 σε ιντερφερόνη β-1β), 23 (16.5%) λάμβαναν ναταλιζουμάμπη/Tysabri, 20 (14.4%) λάμβαναν φινγκολιμόδη/Gilenya, 18 (12.9%) λάμβαναν οξική γλατιραμέρη/Coraxone, 5 (3.6%) λάμβαναν τεριφλουνομίδη/Aubagio και 2 (1.4%) λάμβαναν μιτοξαντρόνη. Όλοι οι ασθενείς παρακολουθούνταν σε τακτική βάση στην Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική (Διευθυντές Καθηγητής Γεώργιος Χατζηγεωργίου και Αναπληρωτής Καθηγητής Ευθύμιος Δαρδιώτης) στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

Επίσης, συλλέχθηκαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος από 110 (90 γυναίκες, 81.8%· διάμεση ηλικία 55 έτη, εύρος ηλικίας 25-87 έτη) ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (systemic sclerosis, SSc), από τους οποίους οι 59 (53.6% των ασθενών με SSc· 51 γυναίκες, 86.4%· διάμεση ηλικία 60 έτη, εύρος ηλικίας 34-87 έτη) είχαν την περιορισμένη μορφή (limited cutaneous systemic sclerosis, lcSSc) και οι 51 (46.4% των ασθενών με SSc· 39 γυναίκες, 76.5%· διάμεση ηλικία 50 έτη, εύρος ηλικίας 25-79 έτη) είχαν τη διάχυτη μορφή (diffuse cutaneous systemic sclerosis, dcSSc). Ο Πίνακας 2.1 παρουσιάζει δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με SSc. Η διάγνωση βασίστηκε στα Κριτήρια για τη Συστηματική Σκλήρυνση του 2013 από το American College of Rheumatology και τη European League Against Rheumatism [396]. Κατά την αιμοληψία όλοι οι ασθενείς λάμβαναν τυπική θεραπευτική φαρμακευτική αγωγή με κορτικοστεροειδή σε χαμηλές δόσεις (<7.5 mg/ημέρα) και αζαθειοπρίνη ή μεθοτρεξάτη και ήταν θετικοί για αντιπυρηνικά αντισώματα, όπως αυτά ανιχνεύθηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Οι ασθενείς παρακολουθούνταν σε τακτική βάση στην Πανεπιστημιακή Κλινική Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας (Διευθυντές Καθηγητής Λάζαρος Σακκάς και Καθηγητής Δημήτριος Μπόγδανος) στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

Για την επαλήθευση αποτελεσμάτων της μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν οροί από μια ανεξάρτητη ομάδα 35 ασθενών με SSc. Οι ασθενείς αυτοί παρακολουθούνταν σε τακτική βάση στο Ρευματολογικό Τμήμα της Πανεπιστημιακή Κλινικής Παθολογίας (Διευθυντής Καθηγητής Σταμάτιος Λιόσης) στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πάτρας. Οι ασθενείς είχαν δημογραφικά χαρακτηριστικά αντίστοιχα με τους ασθενείς με που περιεγράφηκαν παραπάνω (30 γυναίκες, 85.7%· διάμεση ηλικία, 56 έτη· εύρος ηλικίας, 20-84 έτη) και αποτελούνταν από 26 ασθενείς με dcSSc (22 γυναίκες, 84.6%· διάμεση ηλικία, 59 έτη· εύρος ηλικίας, 27-78 έτη) και 9 ασθενείς με lcSSc (8 γυναίκες, 88.9%· διάμεση ηλικία, 56 έτη· εύρος ηλικίας, 43-84 έτη).

Ως παθολογικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ολικό περιφερικό αίμα από 39 (20 γυναίκες, 51.3%· διάμεση ηλικία 70 έτη, εύρος ηλικίας 38-84 έτη) ασθενείς με νόσο Πάρκινσον (Parkinson's disease, PD) και 21 (13 γυναίκες, 61.9%· διάμεση ηλικία 77 έτη, εύρος ηλικίας 63-86 έτη) ασθενείς με νόσο Αλτςχάιμερ (Alzheimer's disease, ALZ). Ο Πίνακας 2.1 παρουσιάζει τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με PD και ALZ.

Ως υγιή δείγματα ελέγχου (healthy controls, HCs) χρησιμοποιήθηκε ολικό περιφερικό αίμα από 68 υγιείς μάρτυρες (40 γυναίκες, 58.8%· διάμεση ηλικία 53 έτη, εύρος ηλικίας 16-73). Ο Πίνακας 2.1 παρουσιάζει τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των υγιών μαρτύρων. Οι υγιείς μάρτυρες ήταν μέλη του προσωπικού του Εργαστηρίου και της Κλινικής Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, καθώς και συνοδοί ασθενών. Κανένας υγιής μάρτυρας δεν είχε οικογενειακό ιστορικό αυτοάνοσης νόσου, ούτε άλλη συννοσηρότητα ή χρόνια νόσο, όπως καρκίνο, αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη ή χρόνια καρδιαγγειακή νόσο.

Όλοι οι ασθενείς και οι μάρτυρες ήταν Λευκοί Καυκάσιοι. Όλα τα δείγματα ολικού περιφερικού αίματος διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση σε φικόλη και τα παράγωγα του

αίματος αποθηκεύτηκαν κατάλληλα, είτε στους -20°C ή σε υγρό άζωτο. Τα δείγματα ορών των ασθενών από την Πάτρα απεστάλησαν στη Λάρισα με συσκευασία ξηρού πάγου και αποθηκεύτηκαν κατάλληλα στους -20°C . Το ερευνητικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (Αριθμός Έγκρισης 1329/11-1-2016). Όλοι οι ασθενείς και οι μάρτυρες από τους οποίους συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε υλικό έδωσαν τη γραπτή συγκατάθεση για τη συμμετοχή τους στη μελέτη (Παράρτημα Α).

Πίνακας 2.1: Δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση

	MS (n=139)	RRMS (n=102)	SPMS (n=39)	SSc (n=110)	lcSSc (n=59)	dcSSc (n=51)	PD (n=39)	ALZ (n=21)	HC (n=68)
Φύλο									
Γυναίκες	98 (70.5%)	70 (68.6%)	28 (75.7%)	90 (81.8%)	51 (86.4%)	39 (76.5%)	20(51.3%)	13 (61.9%)	40 (58.8%)
Άντρες	41 (29.5%)	32 (31.4%)	28 (41.2%)	20 (18.2%)	8 (13.6%)	12 (23.5%)	19 (48.7%)	8 (38.1%)	28 (41.2%)
Ηλικία	43.2 ± 12	39.2 ± 9.8	54.5 ± 10	56.1 ± 13.8	59 ± 13.8	52.7 ± 13	68.7 ± 9.4	77.7 ± 7.5	47.4 ± 16.9

Δημογραφικά χαρακτηριστικά των 139 ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση (ΚΠΣ), συμπεριλαμβανομένου 102 με υποτροπιάζουσα ΚΠΣ (Υ-ΚΠΣ) και 37 με δευτερογενή προϊούσα ΚΠΣ (ΔΠ-ΚΠΣ), των 68 υγείων δειγμάτων ελέγχου (ΥΔΕ), των 39 παθολογικών δειγμάτων ελέγχου με Πάρκινσον (ΑΠ) και των 21 παθολογικών δειγμάτων με Αλτςχάιμερ (ΑΑ). Εξαιτίας του μικρού τους αριθμού, τα 4 δείγματα των ασθενών με πρωτογενή προϊούσα ΚΠΣ δε λήφθηκαν υπόψιν. Τα δεδομένα του φύλλου αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των γυναικών και των αντρών ασθενών ή μαρτύρων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Τα δεδομένα της ηλικίας αναπαριστούν τη μέση τιμή της ηλικίας και την τυπική απόκλιση (mean ± standard deviation).

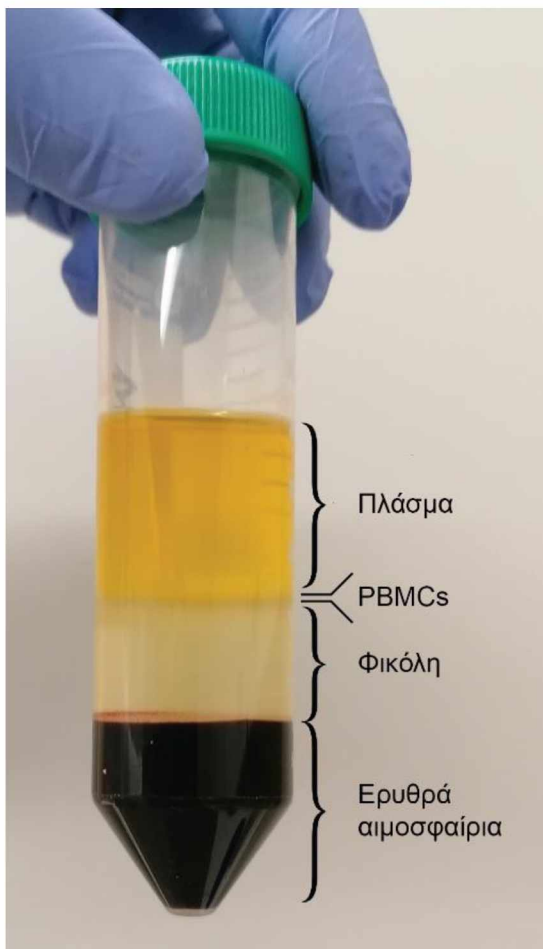
2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Διαχωρισμός παραγώγων αίματος σε φικόλη και κρυοαποθήκευση μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος

2.2.1.1 Εισαγωγή

Το ολικό περιφερικό αίμα μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις στιβάδες (πλάσμα, λεμφοκύτταρα και ερυθροκύτταρα) με φυγοκέντρηση σε φικόλη (Ficoll) και μετριμιζίδη (Hyraque) (Εικόνα 2.1). Ο διαχωρισμός βασίζεται στο ότι το πλάσμα και τα λεμφοκύτταρα έχουν μικρότερη πυκνότητα τόσο από τα ερυθροκύτταρα όσο και από τη φικόλη, οπότε και δεν την διαπερνούν (πυκνότητα $\rho_{\text{πλάσματος}} < \rho_{\text{λεμφοκυττάρων}} < \rho_{\text{φικόλης}} < \rho_{\text{ερυθροκυττάρων}}$). Μετά τη φυγοκέντρηση, τα ερυθροκύτταρα και τα πολυμορφοπύρηνά ουδετερόφιλα διέρχονται διαμέσου της φικόλης, σχηματίζοντας ίζημα στον πυθμένα. Ο ορός παραμένει πάνω από το στρώμα της φικόλης, ενώ τα λεμφοκύτταρα παραμένουν στη μεσοστιβάδα ανάμεσα του ορού και της φικόλης. Τα κύτταρα αυτά της μεσοστιβάδας αποτελούν τα μονοπύρηνά κύτταρα του περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs).

Εικόνα 2.1: Διαχωρισμός παραγώγων αίματος σε φικόλη.



Οι τρεις στιβάδες του αίματος είναι ορατές έπειτα από φυγοκέντρηση με τη χρήση φικόλης. Η πάνω στιβάδα είναι ο ορός του αίματος, η κάτω στιβάδα περιέχει ερυθρά αιμοσφαίρια και τα κοκκιοκύτταρα, ενώ η μεσαία στιβάδα περιέχει τα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος (*peripheral blood mononuclear cells, PBMCs*), ανάμεσα στα οποία είναι τα λεμφοκύτταρα. Η μεσαία στιβάδα έχει εικόνα «δίκην σύννεφου» ανάμεσα από τη στιβάδα του ορού και τη φικόλη.

Τα απομονωμένα PBMCs μπορούν να αποθηκευτούν μακροπρόθεσμα για μελλοντική χρήση σε βαθιά κατάψυξη. Η κατάψυξη λευκοκυττάρων σε θερμοκρασίες κάτω των -100 βαθμών Κελσίου ($^{\circ}\text{C}$) αποσκοπεί στη μακροπρόθεσμη αποθήκευση τους χωρίς να χρειάζεται η καθημερινή καλλιέργεια τους. Επιπλέον, τα βιολογικά αποτελέσματα της *in vitro* κυτταρικής γήρανσης, τα οποία εμφανίζονται σε κύτταρα καλλιιεργειών, παύουν να υφίστανται όταν τα κύτταρα διατηρούνται σε θερμοκρασίες υπό των -130°C . Ενώ τα κύτταρα αρχίζουν να ψύχονται από τη θερμοκρασία δωματίου ($+18^{\circ}\text{C}$ έως $+25^{\circ}\text{C}$, room temperature, RT) ως τους 0°C , ο κυτταρικός μεταβολισμός επιβραδύνεται και η ενδοκυτταρική μεταφορά και διαμεμβρανική ανταλλαγή ιόντων

διακόπτονται. Καθώς η θερμοκρασία συνεχίζει να πέφτει από τους 0° C ως τους -20° C, κρύσταλλοι πάγου σχηματίζονται στον εξωκυττάριο χώρο, αυξάνοντας έτσι τη συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών. Αυτό δημιουργεί ωσμωτική πίεση, οδηγώντας νερό έξω από τα κύτταρα. Όταν η θερμοκρασία πέφτει πολύ αργά, η ωσμωτική πίεση που δημιουργείται είναι τόσο μεγάλη ώστε όλο το νερό από το εσωτερικό του κυττάρου βγαίνει εκτός, καταλήγοντας σε ολική αφυδάτωση, υπερβολική συρρίκνωση του κυττάρου και κυτταρικό θάνατο κατά την απόψυξη. Αυτό γίνεται διότι το φυσικό στρες που προκαλεί η υπερβολική συρρίκνωση οδηγεί σε ζημιές στην κυτταρική μεμβράνη, τον κυτταροσκελετό και τα κυτταρικά οργανίδια. Η κυτταρική αποδιοργάνωση είναι τόσο εκτεταμένη, ώστε το κύτταρο δεν επιβιώνει τη διαδικασία της απόψυξης. Επιπρόσθετα, κυτταρική καταστροφή προκαλείται και από την πολύ υψηλή συγκέντρωση διαλυμένων ουσιών στο εξωκυττάριο διάλυμα, προκαλώντας μεταβολές του pH και γενικευμένη αποδιάταξη πρωτεϊνών. Αντιθέτως, όταν η θερμοκρασία πέφτει πολύ γρήγορα, κρύσταλλοι πάγου σχηματίζονται μέσα στο κύτταρο πριν ολοκληρωθεί η αφυδάτωση. Οι κρύσταλλοι πάγου καταστρέφουν τα κυτταρικά οργανίδια και τις μεμβράνες τους, με αποτέλεσμα να κύτταρα να πεθαίνουν όταν αποψυχθούν. Όμως, όταν ο ρυθμός ψύξης είναι αρκετά αργός ώστε να μη δημιουργηθούν κρύσταλλοι πάγου ενδοκυτταρικά, αλλά και αρκετά γρήγορος ώστε να αποφευχθεί η υπερβολική κυτταρική αφυδάτωση, τότε τα κύτταρα επιβιώνουν την ψύξη και τη μετέπειτα απόψυξη τους. Ειδικά για τα ευκαρυωτικά κύτταρα, η προσθήκη ενός κρυοπροστατευτικού παράγοντα, όπως η γλυκερόλη ή το διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide, DMSO), είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί η σωστή ψύξη των κυττάρων. Ουσιαστικά, οι κρυοπροστατευτικοί παράγοντες δεν προστατεύουν τα κύτταρα από την καταστροφή που προκαλείται από τη γρήγορη ψύξη (σχηματισμός κρυστάλλων πάγου ενδοκυτταρικά) αλλά από τις επιπτώσεις της αργής ψύξης (αφυδάτωση και

συρρίκνωση). Αυτό επιτυγχάνεται με την μεταβολή των φυσικών ιδιοτήτων του πάγου και του εξωκυττάριου διαλύματος. Επίσης, η χρήση του ειδικού δοχείο κατάψυξης κυττάρων «Mr. Frosty» που περιέχει ισοπροπυλική αλκοόλη βοηθάει στο να καταψυχθούν τα κύτταρα αργά και ομοιόμορφα. Ιδανικά, τα ευκαρυωτικά κύτταρα πρέπει να παγώνουν με ρυθμό -1°C ως -3°C το λεπτό.

2.2.1.2 Πρωτόκολλο

20 χιλιοστόλιτρα (ml) περιφερικού αίματος λήφθηκαν με αιμοληψία από κάθε ασθενή ή μάρτυρα χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη και ηπαρινισμένη (τελική συγκέντρωση ηπαρίνης=10 U/ml) σύριγγα. Όλα τα επόμενα στάδια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν σε απαγωγό αερίων στο δωμάτιο της κυτταροκαλλιέργειας. Το δείγμα αίματος επιστηβάχθηκε επάνω σε 10 ml LymphoPrep (Ficoll-Hydraque, τελική συγκέντρωση LymphoPrep=1.077 g/ml) μέσα σε σωληνάριο Falcon 50 ml και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε χωρίς φρένο στις 2000 στροφές ανά λεπτό (rounds per minute, rpm) για 20 λεπτά σε RT. Η στιβάδα του ορού, η μεσοστιβάδα και η στιβάδα των ερυθροκυττάρων απομακρύνθηκαν προσεκτικά με πλαστική πιπέτα τύπου Pasteur και τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστά σωληνάρια Falcon 15 ml, ενώ το LymphoPrep απορρίφθηκε. Ο ορός και τα ερυθροκύτταρα αποθηκεύτηκαν στους -20°C . Το δείγμα των PBMCs πλύθηκε δύο φορές χρησιμοποιώντας θρεπτικό υλικό RPMI-1640, το οποίο ήταν σε RT. Αρχικά, προστέθηκε 1X RPMI-1640 μέχρι τελικό όγκο 15 ml, ακολούθησε ήπια ανάδευση αναποδογυρίζοντας το σωληνάριο 5-6 φορές και φυγοκέντρωση με φρένο στις 2000 rpm για 5 λεπτά σε RT. Έπειτα, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσέχοντας να μη διαταραχτεί η πελέτα των PBMCs. Ακολούθησε μια ακόμα πλύση με 5 ml RPMI-1640. Μετά τη δεύτερη πλύση, η πελέτα των PBMCs επαναδιαλύθηκε σε τόσο όγκο κρυοπροστατευτικού διαλύματος όσο χρειαζόταν για τελική συγκέντρωση κυττάρων $\sim 10^6$ κύτταρα/ml. Η σύσταση του κρυοπροστατευτικού

διαλύματος ήταν 70% εμβρυικού ορού βοδινού (fetal bovine serum, FBS), 20% θρεπτικό υλικό RPMI-1640 και 10% DMSO. Η βιωσιμότητα των κυττάρων ξεπερνούσε το 95%, όπως υπολογίστηκε μέσω ελέγχου της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη χρήση Trypan blue. Τα κύτταρα μοιράστηκαν σε τμήματα (aliquots) μέσα σε σωληνάρια κρυοαποθήκευσης (cryovials) 1.5 ml με τελικό όγκο 1 ml. Τα cryovials τοποθετήθηκαν σε δοχείο κατάψυξης κυττάρων «Mr. Frosty» και αποθηκεύτηκαν για τουλάχιστον 48 ώρες στους -74° C. Τέλος, τα cryovials μεταφέρθηκαν σε δεξαμενή υγρού αζώτου. Ο ορός και τα PBMCs χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για το πειραματικό κομμάτι της διδακτορικής διατριβής.

2.2.2 Ανοσοπροσροφητική δοκιμασία στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)

2.2.2.1 Εισαγωγή

Η τεχνική της ELISA είναι μια ενζυμική ανοσοδοκιμασία στερεάς φάσεως η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης μια πρωτεΐνης σε βιολογικά υγρά, όπως είναι τα ανθρώπινα αντισώματα εναντίων διάφορων αντιγόνων στον ορό ασθενών. Τα βασικά πλεονεκτήματα της τεχνικής ELISA έναντι άλλων ανοσοδοκιμασιών είναι: (α) η υψηλή ευαισθησία (β) η επαναληψιμότητα και (γ) η μη χρησιμοποίηση ραδιενέργειας, όπως στη μέθοδο της ραδιοανοσοδοκιμασίας RIA. Η αρχή της τεχνικής βασίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Η ELISA αποτελεί μια ιδιαίτερα προσαρμόσιμη δοκιμασία, δεδομένου ότι ανάλογα με την εφαρμογή, τα αντιδραστήρια και την ευαισθησία που επιδιώκεται, η μέθοδος παρουσιάζει πολλαπλές παραλλαγές, όπως η έμμεση ELISA, η ELISA τύπου sandwich, η ανταγωνιστική ELISA, η άμεση και η έμμεση κυτταρική ELISA. Σε όλες τις παραλλαγές τις μεθόδου, τα χαρακτηριστικά στοιχεία είναι: (1) η πρόσδεση και η ακινητοποίηση του αντιγόνου ή του αντισώματος σε στερεή επιφάνεια,

(2) η χρήση ενός ενζυμο-συζευγμένου αντισώματος και (3) η χρήση ενός χρωμογόνου υποστρώματος, το οποίο μετά από αντίδραση με το ένζυμο παράγουν διαλυτό έγχρωμο προϊόν (χρώμα ή φθορισμό), επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος. Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε ELISA για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων εναντίον του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση.

2.2.2.2 Πρωτόκολλο Euroimmun

Η τεχνική της ELISA έγινε χρησιμοποιώντας δοκιμασία της εταιρίας Euroimmun και σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας. Αναλυτικά: χρησιμοποιήθηκε «τυφλό» δείγμα (blank) από ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος «Sample Buffer» για τον προσδιορισμό του θορύβου. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα προς εξέταση, χρησιμοποιήθηκαν τρία διαλύματα βαθμονομητές γνωστής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης 2, 20 και 200 σχετικών μονάδων (calibrator 1=2 σχετικές μονάδες (relative units, RU)/ml, calibrator 2= 20 RU/ml, calibrator 3=200 RU/ml). Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα θετικού και αρνητικού ελέγχου (controls) για την επιβεβαίωση της σωστής πειραματικής εκτέλεσης. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν και τα πλακίδια 96 φρεατίων επώασης που περιείχαν το αντιγόνο (ή τα αντιγόνα) προς εξέταση ήταν σε RT. Επίσης, όλα τα διαλύματα καθώς και τα δείγματα ορού που χρησιμοποιούνται αναδεύτηκαν καλά πριν τη χρήση. Ακόμα, όλα τα δείγματα ορού εξετάστηκαν εις τριπλούν. Αρχικά, τα δείγματα ορού αραιώθηκαν 1:101 σε «Sample Buffer». 100 μικρόλιτρα (microliter, μ l) αραιωμένου ορού, 100 μ l από τα calibrators 1-3 και 100 μ l controls μεταφέρθηκαν το καθένα σε ξεχωριστό φρεάτιο του πλακιδίου της ELISA. Τα δείγματα επώαστηκαν υπό ανάδευση για 30 λεπτά σε RT και έπειτα το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Τα

δείγματα ξεπλύθηκαν τρεις φορές με 300 µl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης «Wash Buffer» υπό ανάδευση για 1 λεπτό σε RT και έπειτα το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. 100 µl διαλύματος ενζυμικού συμπλόκου «Enzyme conjugate» (peroxidase-labelled anti-human IgG) προστέθηκαν σε κάθε φρεάτιο του πλακιδίου της ELISA. Τα δείγματα επωάστηκαν υπό ανάδευση για 30 λεπτά σε RT και έπειτα το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Τα φρεάτια ξεπλύθηκαν τρεις φορές με 300 µl «Wash Buffer» υπό ανάδευση για 1 λεπτό σε RT και έπειτα το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. 100 µl διαλύματος χρωμογόνου/υποστρώματος «Chromogen/Substrate Solution» (διάλυμα 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)/H₂O₂) προστέθηκε σε κάθε φρεάτιο του πλακιδίου της ELISA. Τα δείγματα επωάστηκαν υπό ανάδευση και στο σκοτάδι για 15 λεπτά σε RT. Η αντίδραση χρώσης σταμάτησε με την προσθήκη 100 µl διαλύματος τερματισμού «Stop Solution» (0.5 M θειικό οξύ). Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της έντασης του χρωμογόνου αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων σε μήκος κύματος 450 nm χρησιμοποιώντας φωτόμετρο Multimode Plate Reader EnSpire ειδικό για πλακίδια 96 φρεατίων. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς που υπολογίστηκε με βάση τις απορροφήσεις των calibrators 1-3. Το όριο της θετικότητας ορίστηκε στο ≥ 21 RU/ml, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας.

2.2.3 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western blotting)

2.2.3.1 Εισαγωγή

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western είναι μια αναλυτική μέθοδος ανίχνευσης και ταυτοποίησης πρωτεϊνών. Περιλαμβάνει τη μεταφορά πρωτεϊνών, ανασυνδυασμένων ή σε εκχύλισμα, που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με βάση το μοριακό τους βάρος ή και το ισοηλεκτρικό τους

σημείο, σε ένα μεμβρανώδες υλικό στήριξης, όπως η νιτροκυτταρίνη, και την επακόλουθη ανίχνευση τους χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα. Η διαδικασία μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη γίνεται με ηλεκτροφόρηση, εξασφαλίζοντας έτσι την ταχύτητα και την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι οι πρωτεΐνες είναι περισσότερο προσβάσιμες στα αντισώματα όταν βρίσκονται στην επιφάνεια της μεμβράνης παρά στο πήκτωμα. Η ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων εναντίον συγκεκριμένων αντιγόνων στα βιολογικά υγρά ενός ασθενή, όπως το αίμα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η ανίχνευση ενός προσδεμένου αντισώματος στη μεμβράνη επιτυγχάνεται με τη χρήση δευτερογενούς αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει τη σταθερή περιοχή Fc του πρωτογενούς ανθρώπινου αντισώματος. Συνήθως, το δευτερογενές αντίσωμα είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με κάποιο ένζυμο, όπως η αλκαλική φωσφατάση ή η υπεροξειδάση του χρένου, το οποίο μετατρέπει το άχρωμο διαλυτό υπόστρωμα του ενζύμου σε έγχρωμο ίζημα μέσω μιας αντίδρασης χρώσης. Η ποσοτικοποίηση των τίτλων των αντισωμάτων στο διάλυμα προς εξέταση επιτυγχάνεται με πυκνομέτρηση των επιμέρους ζωνών της μεμβράνης με λογισμικό πυκνομετρικής σάρωσης και επεξεργασίας εικόνας. Αφού σαρωθεί η μεμβράνη που φέρει το σήμα της ανοσοεντόπισης, επεξεργάζεται με τη βοήθεια του λογισμικού πυκνομέτρησης, το οποίο αναγνωρίζει τις περιοχές αντίδρασης στη μεμβράνη ως ζώνες συλλέγοντας πληροφορίες, όπως η απόσταση των ζωνών από την αρχή της μεμβράνης και το εμβαδόν τους. Στη συνέχεια αξιολογεί, κανονικοποιεί με βάση το σήμα υποβάθρου (background signal) και ποσοτικοποιεί το άθροισμα της έντασης των εικονοστοιχείων (pixels) που περιλαμβάνονται στις ζώνες. Για την ποσοτικοποίηση είναι απαραίτητη η επεξεργασία εσωτερικών μαρτύρων του

πειράματος, δηλαδή μια πρωτεΐνη γνωστής συγκέντρωσης και ανιχνεύεται με τον ίδιο τρόπο όπως η πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος. Ένας θετικός ορός ελέγχου ανθρώπινης IgG ανοσοσφαιρίνης χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της επιτυχίας του πειράματος. Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον *in vitro* ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό ανθρώπινων αντισωμάτων εναντίον αντιγόνων του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού και του ιού Epstein-Barr σε ασθενείς με κατά πλάκας και συστηματική σκλήρυνση.

2.2.3.2 Πρωτόκολλο Euroimmun

Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western έγινε χρησιμοποιώντας δοκιμασία της εταιρίας Euroimmun και σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας. Η δοκιμασία Western blotting της Euroimmun προμηθεύει με μεμβρανώδεις ταινίες δοκιμασιών (strips) στις οποίες έχει μεταφερθεί ηλεκτροφορητικά το επιθυμητό αντιγόνο (ή τα αντιγόνα) με σκοπό την εξέταση πολλαπλών διαφορετικών δειγμάτων.

Αναλυτικά, όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν και τα strips που περιείχαν το αντιγόνο (ή τα αντιγόνα) προς εξέταση ήταν σε RT. Επίσης, όλα τα διαλύματα καθώς και τα δείγματα ορού που χρησιμοποιούνται αναδεύτηκαν καλά πριν τη χρήση. Αρχικά, τα strips τοποθετήθηκαν προσεκτικά σε φρεάτιο ειδικού πλαστικού πλακιδίου προμηθευόμενο από την κατασκευάστρια εταιρία και εξισορροπήθηκε με 1.5 ml ρυθμιστικού διαλύματος «Universal Buffer». Έπειτα, τα δείγματα ορού αραιώθηκαν 1:51 σε «Universal Buffer». Τα strips επώαστηκαν με 1.5 ml αραιωμένου ορού υπό ανάδευση για 30 λεπτά σε RT. Σε μια παραλλαγή του πειράματος, αντι 1.5 ml αραιωμένου ορού χρησιμοποιήθηκε 1.5 ml αντι-Scl-70 σε συγκέντρωση 1:1000 σε «Universal Buffer». Στη συνέχεια, ξεπλύθηκαν τρεις φορές με 1.5 ml «Universal Buffer» υπό ανάδευση για 5 λεπτά σε RT και έπειτα το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Τα strips επώαστηκαν με 1.5 ml διαλύματος ενζυμικού συμπλόκου «Enzyme

Conjugate» υπό ανάδευση για 30 λεπτά σε RT. Στη συνέχεια, ξεπλύθηκαν τρεις φορές με 1.5 ml «Universal Buffer» υπό ανάδευση για 5 λεπτά και έπειτα το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Η εμφάνιση του σήματος έγινε με επώαση των strips με 1.5 ml διαλύματος υποστρώματος «Substrate Solution» (nitro-blue tetrazolium chloride, NBT/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, BCIP) υπό ανάδευση για 10 λεπτά σε RT. Η αντίδραση χρώσης σταμάτησε με απομάκρυνση του «Substrate Solution» και επώαση των strips με νερό για 1 λεπτό σε RT και τα strips σαρώθηκαν με σαρωτή-scanner. Η ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση της μεμβράνης έγινε με το λογισμικό πυκνομετρικής σάρωσης EUROLineScan της κατασκευάστριας εταιρίας. Ζώνες με ένταση εικονοστοιχείων ≥ 23 arbitrary units (AU) χαρακτηρίστηκαν θετικές, ζώνες με ένταση < 23 και ≥ 13 χαρακτηρίστηκαν οριακά θετικές και ζώνες με ένταση < 13 χαρακτηρίστηκαν ως αρνητικές, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας.

2.2.4 Κυτταρομετρία ροής

2.2.4.1 Εισαγωγή

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια αυτοματοποιημένη μέθοδος μέτρησης και ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων σημασμένων με φθορίζοντα αντισώματα με τη χρήση ενός κυτταρόμετρου. Το κυτταρόμετρο χρησιμοποιεί τρία επιμέρους συστήματα, ένα υδραυλικό, ένα οπτικό και ένα ηλεκτρονικό, για να μετράει και να αναλύει τα φυσικά χαρακτηριστικά ξεχωριστών, άθικτων κυττάρων μεγέθους 0.2-50 μικρομέτρων σε εναιώρημα καθώς αυτά διέρχονται σε ροή από μια δέσμη laser. Το υδραυλικό σύστημα του κυτταρόμετρου μεταφέρει τα κύτταρα από το εναιώρημα ενός μικτού πληθυσμού σε εστιασμένη ροή κυττάρων και φροντίζει ώστε να κύτταρα να διέρχονται ένα-ένα από το κέντρο της δέσμης laser. Το οπτικό σύστημα αποτελείται από τις laser συγκεκριμένου μήκους κύματος, οπτικά πρίσματα και φακούς που κατευθύνουν τις δέσμες laser, καθώς και ανιχνευτές φωτονίων. Οι δέσμες laser έχουν την ικανότητα να

διεγείρουν φθορίζουσες χρωστικές ουσίες, οι οποίες είναι προσδεμένες σε αντισώματα που χρησιμοποιούμε για να σημάνουμε κατάλληλα τα κύτταρα του εναιωρήματος και εκπέμπουν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος, διαφορετικό από το μήκος κύματος του φωτός της πηγής, όταν διεγείρονται. Κάθε φορά που ένα κύτταρο διέρχεται από την δέσμη laser, το εκπεμπόμενο φως συλλέγεται από τους ανιχνευτές φθορισμού. Παράλληλα, η σκέδαση της δέσμης laser από τα κύτταρα προκαλεί την αλλαγή της πορείας της και την ανάκλαση της από ανιχνευτές πρόσθιας και πλάγιας σκέδασης, οι οποίοι καταγράφουν τη διακοπή της ακτίνας laser. Το φως της πρόσθιας σκέδασης (forward scatter channel, FSC) παρέχει πληροφορίες για το μέγεθος του κυττάρου και μπορεί να ξεχωρίσει κυτταρικά υπολείμματα ή νεκρά κύτταρα από ζωντανά κύτταρα. Το φως της πλάγιας σκέδασης (side scatter channel, SSC) παρέχει πληροφορίες για την κοκκίωση και την εσωτερική πολυπλοκότητα του κυττάρου. Ο συνδυασμός της πρόσθιας και της πλάγιας σκέδασης μπορεί να διακρίνει τους διάφορους λευκοκυτταρικούς πληθυσμούς σε εναιώρημα PBMCs. Το ηλεκτρονικό σύστημα του κυτταρόμετρου μετατρέπει το οπτικό σήμα που ανιχνεύεται αρχικά σε ηλεκτρικό ρεύμα και στη συνέχεια σε ψηφιακό σήμα. Το ψηφιακό σήμα χρησιμοποιείται για τη δημιουργία γραφικών παραστάσεων που απεικονίζουν τον αριθμό των κυττάρων, την ένταση του φθορισμού, την ένταση της πρόσθιας ή την ένταση της πλάγιας σκέδασης. Η μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη, καθώς μπορεί να ανιχνεύσει σπάνιους κυτταρικούς πληθυσμούς. Ακόμα, επιτρέπει την ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού κυττάρων σε σύντομο χρονικό διάστημα, καθώς επίσης και την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών παραμέτρων φθορισμού ανά κύτταρο, η οποία επιτρέπει την τυποποίηση κυτταρικών υποπληθυσμών. Στην ανοσολογία με την κυτταρομετρία ροής είναι δυνατή η φαινοτύπηση ενός κυτταρικού πληθυσμού μέσω σήμανσης επιφανειακών αντιγόνων, η μελέτη της επαγωγής και έκφρασης

ενδοκυττάρων κυτταροκινών από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, η μελέτη σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στους ανοσοποιητικούς μηχανισμούς και ο διαχωρισμός κυττάρων σύμφωνα με το πρότυπο φθορισμού τους. Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε για τη φαινοτυπική τυποποίηση λεμφοκυττάρων μέσω σήμανσης των επιφανειακών αντιγόνων-συμπλόκων διαφοροποίησης (cluster of differentiation, CD) CD3 για T λεμφοκύτταρα, CD4 για T βοηθητικά λεμφοκύτταρα (T_H) και CD19/CD27 για B ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Bregs) και τη μελέτη της ενδοκυττάριας παραγωγής των κυτταροκινών IFN- γ και IL-10 από T και B λεμφοκύτταρα, αντίστοιχα, ύστερα από ενεργοποίηση.

2.2.4.2 Πρωτόκολλο CD3/IFN- γ

Η μελέτη της παραγωγής της IFN- γ από ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα πραγματοποιήθηκε με βάση το παρακάτω πρωτόκολλο. Το αρχικό στάδιο της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε σε απαγωγό αερίων στο δωμάτιο της κυτταροκαλλιέργειας. Τα PBMCs των ασθενών ή των μαρτύρων προς εξέταση βγήκαν από τη δεξαμενή του υγρού αζώτου. Για ένα πείραμα κυτταρομετρίας ροής απαιτούνταν $5 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ κύτταρα ανά δείγμα ασθενή ή μάρτυρα, συνεπώς λήφθηκε από το υγρό άζωτο ανάλογος αριθμός cryovials που περιείχε τον απαιτούμενο αριθμό κυττάρων. Συνήθως ένα cryovial περιείχε ικανοποιητικό αριθμό PBMCs. Η τήξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με επαναδιάλυση των παγωμένων κυττάρων σε 6 ml RPMI-160. Η τήξη των κυττάρων έπρεπε να είναι σβέλτη, με σκοπό την άμεση αραίωση του DMSO προς αποφυγή της κυτταροτοξικής του δράσης και της νέκρωσης των κυττάρων. Το διάλυμα των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 2000 rpm για 5 λεπτά σε RT και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά. Η πελέτα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε 1 ml πλήρες θρεπτικό υλικό, η σύσταση του οποίου ήταν 10% FBS

και 10 U/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη σε RPMI-1640. 0.5 ml του διαλύματος των κυττάρων μεταφέρθηκαν σε 2 πηγαδάκια ενός 24-well plate και σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκε 0.5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού προς τελικό όγκο 1 ml. Για κάθε ασθενή ή μάρτυρα απαιτούνταν 2 δείγματα, ένα ενεργοποιημένο (treated) με PMA σε τελική συγκέντρωση 20 ng/ml και ιονομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 1 µg/ml, καθώς και ένα μη-ενεργοποιημένο (untreated), το οποίο ήταν ο αρνητικός μάρτυρας. Στο μη-ενεργοποιημένο δείγμα προστέθηκε RPMI-1640 σε ποσότητα ίδια με αυτή της συνολικής ποσότητας PMA και ιονομυκίνης που προστέθηκε το ενεργοποιημένο δείγμα. Σε κάθε δείγμα προστέθηκε μπρεφελντίνη σε τελική συγκέντρωση 1 µg/ml. Τα κύτταρα επωάστηκαν σε κλίβανο επώασης κυττάρων για 5 ώρες στους 37°C με 5% CO₂. Τα επόμενα στάδια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν στον πάγκο εργασίας του εργαστηρίου. Με το πέρας του πενταώρου τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 ml και φυγοκεντρήθηκαν στις 5000 rpm για 2 λεπτά στους 10°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά και η κυτταρική πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml διαλύματος χρώσης, η σύσταση του οποίου ήταν 2% FBS σε 1X PBS. Το διάλυμα κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 2 λεπτά στους 10°C, έπειτα το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά και η κυτταρική πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 100 µl διαλύματος χρώσης. Για τη σήμανση του επιφανειακού αντιγόνου CD3 προστέθηκε σε κάθε δείγμα κυττάρων αντίσωμα mouse anti-CD3 σημασμένο με τη φθορίζουσα χρωστική FITC σε τελική συγκέντρωση 1:20 και τα κύτταρα επωάστηκαν για 30 λεπτά στους 4°C στο σκοτάδι. Η συγκέντρωση του αντισώματος αυτή ορίστηκε ύστερα από πείραμα τιτλοδότησης του αντισώματος, με σκοπό η ποσότητα του αντισώματος να είναι σε περίσσεια ώστε να υπερκαλύπτει όλα τα διαθέσιμα αντιγόνα. Για την απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος, τα κύτταρα πλύθηκαν μια φορά με 1 ml διαλύματος χρώσης. Το διάλυμα κυττάρων

φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 2 λεπτά στους 10°C και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά. Για τη μονιμοποίηση των κυττάρων προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 300 μl 2% παραφορμαλδεΐδη (paraformaldehyde, PFA) σε 1X PBS και ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά σε RT στο σκοτάδι. Στη συνέχεια το διάλυμα κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 2 λεπτά στους 10°C και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά. Για την απομάκρυνση της περίσσειας PFA, τα κύτταρα πλύθηκαν μια φορά με 1 ml διαλύματος χρώσης. Το διάλυμα κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 2 λεπτά στους 10°C και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά. Για την αναστρέψιμη διαπερατοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης με σκοπό τη σήμανση των ενδοκυττάρων κυτταροκινών προστέθηκαν 500 μl διαλύματος διαπερατοποίησης, του οποίου η σύσταση ήταν 0.5% σαπονίνη και 1% FBS σε 1X PBS και τα κύτταρα επωάστηκαν για 10 λεπτά στους 4°C στο σκοτάδι, αφού αναδεύτηκαν για 30 δευτερόλεπτα σε αναδευτήρα τύπου Vortex. Στη συνέχεια το διάλυμα κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 2 λεπτά στους 10°C και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά. Η κυτταρική πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 100 μl διαλύματος διαπερατοποίησης. Για τη σήμανση της ενδοκυττάριας παραγωγής IFN- γ προστέθηκε σε κάθε δείγμα κυττάρων αντίσωμα mouse anti-IFN- γ σημασμένο με τη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 647 σε τελική συγκέντρωση 1:100 και τα κύτταρα επωάστηκαν για 30 λεπτά στους 4°C στο σκοτάδι. Η συγκέντρωση του αντισώματος αυτή ορίστηκε ύστερα από πείραμα τιτλοδότησης του αντισώματος, με σκοπό η ποσότητα του αντισώματος να είναι σε περίσσεια ώστε να υπερκαλύπτει όλα τα διαθέσιμα αντιγόνα. Για την απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος, τα κύτταρα πλύθηκαν μια φορά με 1 ml διαλύματος διαπερατοποίησης. Το διάλυμα κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 2 λεπτά στους 10°C και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά. Η κυτταρική πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 100 μl

διαλύματος χρώσης και κάθε δείγμα αναλύθηκε σε κυτταρόμετρο Guava easyCyte 5. Ως αρνητικοί μάρτυρες της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα χωρίς κανένα αντίσωμα προς μέτρηση του αυτοφθορισμού των κυττάρων και ένα δείγμα με σήμανση με κατάλληλα ισοτυπικά IgG αντισώματα προς μέτρηση της μη ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων.

2.2.4.3 Πρωτόκολλο CD19/CD27/IL-10

Η μελέτη της παραγωγής της IL-10 από Bregs πραγματοποιήθηκε με βάση το παρακάτω διήμερο πρωτόκολλο. Τα αρχικά στάδια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν σε απαγωγό αερίων στο δωμάτιο της κυτταροκαλλιέργειας. Τα PBMCs των ασθενών ή των μαρτύρων προς εξέταση βγήκαν από τη δεξαμενή του υγρού αζώτου. Για ένα πείραμα κυτταρομετρίας ροής απαιτούνταν $5 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ κύτταρα ανά δείγμα ασθενή ή μάρτυρα, συνεπώς λήφθηκε από το υγρό άζωτο ανάλογος αριθμός cryovials που περιείχε τον απαιτούμενο αριθμό κυττάρων. Συνήθως ένα cryovial περιείχε ικανοποιητικό αριθμό PBMCs. Η τήξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με επαναδιάλυση των παγωμένων κυττάρων σε 6 ml RPMI-160. Η τήξη των κυττάρων έπρεπε να είναι σβέλτη, με σκοπό την άμεση αραιώση του DMSO προς αποφυγή της κυτταροτοξικής του δράσης και της νέκρωσης των κυττάρων. Το διάλυμα των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 2000 rpm για 5 λεπτά σε RT και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά. Η πελέτα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε 1 ml πλήρες θρεπτικό υλικό, η σύσταση του οποίου ήταν 10% FBS και 10 U/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη σε RPMI-1640. 0.5 ml του διαλύματος των κυττάρων μεταφέρθηκαν σε 2 πηγαδάκια ενός 24-well plate και σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκε 0.5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού προς τελικό όγκο 1 ml. Για κάθε ασθενή ή μάρτυρα απαιτούνταν 2 δείγματα, ένα ενεργοποιημένο (treated) με ODN2006 σε τελική συγκέντρωση 10 μg/ml, καθώς και ένα μη-ενεργοποιημένο (untreated), το οποίο

ήταν ο αρνητικός μάρτυρας. Στο μη-ενεργοποιημένο δείγμα προστέθηκε RPMI-1640 σε ποσότητα ίδια με αυτή της ποσότητας ODN2006 που προστέθηκε το ενεργοποιημένο δείγμα. Τα κύτταρα επωάστηκαν σε κλίβανο επώασης κυττάρων για 24 ώρες στους 37°C με 5% CO₂. Με το πέρας του 24ώρου σε κάθε δείγμα προστέθηκαν PMA σε τελική συγκέντρωση 20 ng/ml, ιονομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 1 μg/ml και μπρεφελντίνη σε τελική συγκέντρωση 1 μg/ml. Τα κύτταρα επωάστηκαν σε κλίβανο επώασης κυττάρων για επιπλέον 5 ώρες στους 37°C με 5% CO₂. Τα επόμενα στάδια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν στον πάγκο εργασίας του εργαστηρίου. Με το πέρας του πενταώρου τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 ml και φυγοκεντρήθηκαν στις 5000 rpm για 2 λεπτά στους 10°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά και η κυτταρική πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml διαλύματος χρώσης, η σύσταση του οποίου ήταν 2% FBS σε 1X PBS. Το διάλυμα κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 2 λεπτά στους 10°C, έπειτα το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά και η κυτταρική πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 100 μl διαλύματος χρώσης. Για τη σήμανση των επιφανειακών αντιγόνων DC19 και CD27 προστέθηκαν σε κάθε δείγμα αντίσωμα mouse anti-CD19 σημασμένο με τη φθορίζουσα χρωστική PE σε τελική συγκέντρωση 1:20 και αντίσωμα mouse anti-CD27 σημασμένο με τη φθορίζουσα χρωστική FITC σε τελική συγκέντρωση 1:20 και τα κύτταρα επωάστηκαν για 30 λεπτά στους 4°C στο σκοτάδι. Η συγκέντρωση των αντισωμάτων αυτή ορίστηκε ύστερα από πείραμα τιτλοδότησης των αντισωμάτων, με σκοπό οι ποσότητες των αντισωμάτων να είναι σε περίσσεια ώστε να υπερκαλύπτουν όλα τα διαθέσιμα αντιγόνα. Για την απομάκρυνση της περίσσειας αντισωμάτων, τα κύτταρα πλύθηκαν μια φορά με 1 ml διαλύματος χρώσης. Το διάλυμα κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 2 λεπτά στους 10°C και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά. Για τη μονιμοποίηση των κυττάρων

προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 300 µl 2% παραφορμαλδεΐδη (paraformaldehyde, PFA) σε 1X PBS και ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά σε RT στο σκοτάδι. Στη συνέχεια το διάλυμα κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 2 λεπτά στους 10°C και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά. Για την απομάκρυνση της περίσσειας PFA, τα κύτταρα πλύθηκαν μια φορά με 1 ml διαλύματος χρώσης. Το διάλυμα κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 2 λεπτά στους 10°C και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά. Για την αναστρέψιμη διαπερατοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης με σκοπό τη σήμανση των ενδοκυττάρων κυτταροκινών προστέθηκαν 500 µl διαλύματος διαπερατοποίησης, του οποίου η σύσταση ήταν 0.5% σαπονίνη και 1% FBS σε 1X PBS και τα κύτταρα επωάστηκαν για 10 λεπτά στους 4°C στο σκοτάδι, αφού αναδεύτηκαν για 30 δευτερόλεπτα σε αναδευτήρα τύπου Vortex. Στη συνέχεια το διάλυμα κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 2 λεπτά στους 10°C και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά. Η κυτταρική πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 100 µl διαλύματος διαπερατοποίησης. Για τη σήμανση της ενδοκυττάριας παραγωγής IL-10 προστέθηκε σε κάθε δείγμα κυττάρων αντίσωμα mouse anti-IL-10 σημασμένο με τη φθορίζουσα χρωστική APC σε τελική συγκέντρωση 1:50 και τα κύτταρα επωάστηκαν για 30 λεπτά στους 4°C στο σκοτάδι. Η συγκέντρωση του αντισώματος αυτή ορίστηκε ύστερα από πείραμα τιτλοδότησης του αντισώματος, με σκοπό η ποσότητα του αντισώματος να είναι σε περίσσεια ώστε να υπερκαλύπτει όλα τα διαθέσιμα αντιγόνα. Για την απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος, τα κύτταρα πλύθηκαν μια φορά με 1 ml διαλύματος διαπερατοποίησης. Το διάλυμα κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 2 λεπτά στους 10°C και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά. Η κυτταρική πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 100 µl διαλύματος χρώσης και κάθε δείγμα αναλύθηκε σε κυτταρόμετρο Guava easyCyte 5. Ως αρνητικοί μάρτυρες της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα

χωρίς κανένα αντίσωμα προς μέτρηση του αυτοφθορισμού των κυττάρων και ένα δείγμα με σήμανση με κατάλληλα ισοτοπικά IgG αντισώματα προς μέτρηση της μη ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων.

2.2.5 Protein BLAST

2.2.5.1 Εισαγωγή

Το Protein Basic Local Alignment Sequence Tool (Protein BLASTO, BLASTp) είναι ένα πρόγραμμα συγκριτικής ανάλυσης και στοίχισης αλληλουχιών αμινοξέων κατά ζεύγη, με σκοπό της εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την ομοιότητα και την ομολογία μεταξύ των μελετούμενων αλληλουχιών. Το πρόγραμμα αυτό συγκρίνει μια πρωτεϊνική ακολουθία επερώτησης (query sequence) με υποκείμενες πρωτεϊνικές ακολουθίες (subject sequences) μιας πρωτεϊνικής βάσης δεδομένων. Η πιο διαδεδομένη βάση είναι η μη πλεονάζουσα (non-redundant, nr) πρωτεϊνική βάση δεδομένων του National Centre for Biotechnology Information (NCBI), η οποία αποτελεί συγχώνευση των βάσεων δεδομένων SWISS-PROT, PDB, PIR και PRF και των πρωτεϊνών που παράγονται από τις κωδικές ακολουθίες της νουκλεοτιδικής βάσης GenBank. Το BLASTp βασίζεται σε έναν αλγόριθμο βέλτιστης τοπικής στοίχισης για να αναγνωρίσει τις περιοχές με αυξημένη ομοιότητα ανάμεσα στις μελετούμενες αλληλουχίες. Ο αλγόριθμος διασπά τις αλληλουχίες αυτές σε βραχεία διαδοχικά τμήματα και στη συνέχεια τα βαθμολογεί σύμφωνα με το ταίριασμα τους. Το σύστημα βαθμολόγησης λαμβάνει υπόψιν τις αντιστοιχίες των αμινοξέων, τους λανθασμένους συνδυασμούς και την εισαγωγή κενών. Η βαθμολογία των αντικαταστάσεων των αμινοξέων γίνεται με τη χρήση ενός πίνακα-μήτρα αντικατάστασης (substitution matrix), ο οποίος βαθμολογεί οποιοδήποτε ζευγάρι αμινοξέων. Κατά τη βαθμολόγηση, οι πίνακες δίνουν μεγαλύτερη βαθμολογία σε ταυτόσημα αμινοξέα σε σύγκριση με μη ταυτόσημα αμινοξέα, όπως επίσης οι συντηρητικές αντικαταστάσεις βαθμολογούνται με

μεγαλύτερες τιμές από τις μη συντηρητικές. Η εμφάνιση ενός ταιριάσματος ακολουθείται από μια προσπάθεια να βρεθεί μια τοπικά βέλτιστη στοίχιση με διαδοχικές διαδικασίες επέκτασης της στοίχισης προς τα αριστερά και προς τα δεξιά και άθροισης της βαθμολογίας της στοίχισης. Αν η βαθμολογία είναι τουλάχιστον ίση με ένα καθορισμένο κατώφλι βαθμολογίας, η διαδικασία τοπικής στοίχισης συνεχίζεται, αλλιώς η επέκταση ολοκληρώνεται. Το τμήμα από τις μελετούμενες αλληλουχίες με την υψηλότερη βαθμολογία αναφέρεται ως βέλτιστη τοπική στοίχιση.

2.2.5.2 Παράμετροι Protein BLAST

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, η ανάλυση των μελετούμενων αλληλουχιών με το BLASTp έγινε χρησιμοποιώντας παραμέτρους για βραχείες αλληλουχίες. Αναλυτικά, σε συνδυασμό αυτές ήταν: το κατώφλι της βαθμολογίας (Expect Threshold, E-value) ήταν 20000, το μήκος των διαδοχικών βραχέων τμημάτων (Word Size) ήταν 2, ο πίνακας αντικατάστασης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο PAM30, χωρίς προσαρμογή συγκρότησης (no compositional adjustments), απενεργοποιημένο το φίλτρο περιοχών χαμηλής πολυπλοκότητας (low complexity filter off) και ενεργοποιημένη επιλογή αυτόματης προσαρμογής για βραχείες αλληλουχίες (automatically adjusted parameters for short input sequences on). Η βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε για την αναζήτηση ήταν η non-redundant. Για κάθε αναζήτηση ομοιότητας, ο μέγιστος αριθμός αποτελεσμάτων που προβαλλόταν ήταν 100. Από τις στοιχισμένες αλληλουχίες στα αποτελέσματα αποκλείστηκαν όλες όσες ήταν μερικές (partial), υποθετικές (hypothetical), πιθανές (probable), μη χαρακτηρισμένες (uncharacterized), χωρίς όνομα (unnamed), θεωρούμενες (putative) ή αλληλουχίες ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (open reading frame). Από τις υπόλοιπες στοιχισμένες αλληλουχίες επιλέχτηκαν όλες όσες είχαν ομοιότητα τουλάχιστον 5 συνεχόμενων αμινοξέων, χωρίς κενά. Επιτρέπονταν συντηρητικές αντικαταστάσεις ([STAG], P, C,

[LIVM], [HKR], [DENQ], [FYW]) ή αντικαταστάσεις που παρατηρούνται συχνά σε συγγενικές πρωτεΐνες.

2.2.6 Στατιστική ανάλυση

Τα κατηγορικά δεδομένα παρουσιάζονται ως απόλυτες τιμές περιπτώσεων και ως συχνότητες εμφάνισης με τη μορφή εκατοστιαίου ποσοστού. Οι διαφορές ανάμεσα σε ανεξάρτητες κατηγορικές μεταβλητές προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Η παρουσίαση των αριθμητικών δεδομένων γίνεται με τη μορφή μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (mean \pm standard deviation). Οι διαφορές ανάμεσα σε ανεξάρτητες αριθμητικές μεταβλητές με κανονική κατανομή προσδιορίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). Η ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ αριθμητικών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το γραμμικό συντελεστή R του Pearson (Pearson's correlation R). Ως στατιστικά σημαντικές χαρακτηρίστηκαν όλες οι διαφορές με τιμή σημαντικότητας (p-value) <0.05 , ενώ διαφορές με $0.1 > p \geq 0.05$ χαρακτηρίστηκαν πως έχουν τάση να είναι στατιστικά σημαντικές. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα στατιστικών αναλύσεων SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Όλα τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με το SPSS και με το πρόγραμμα γραφημάτων και στατιστικής ανάλυσης GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, USA), εκτός από τα διαγράμματα τύπου Venn, τα οποία έγιναν με τη χρήση του προγράμματος InteractiVenn [462].

2.2.7 Εκτέλεση πειραματικής διαδικασίας και στατιστικής ανάλυσης

Όλη η προετοιμασία των πειραμάτων, τα πειράματα και οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν από τον υποψήφιο, εκτός από:

- 1) Η συλλογή βιολογικού υλικού από ασθενείς και μάρτυρες πραγματοποιήθηκε από ιατρούς, ειδικευμένους, ειδικευόμενες, ειδικές και ειδικούς, από την Πανεπιστημιακή Κλινική Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας (Διευθυντές Καθηγητής Λάζαρος Σακκάς και Καθηγητής Δημήτριος Μπόγδανος) και από την Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική (Διευθυντές Καθηγητής Γεώργιος Χατζηγεωργίου και Αναπληρωτής Καθηγητής Ευθύμιος Δαρδιώτης) στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας. Στη διαδικασία αυτή η αρωγή του νοσηλευτικού προσωπικού ήταν αξιόλογη.
- 2) Η συλλογή των κλινικών χαρακτηριστικών πραγματοποιήθηκε επίσης από ιατρούς των δύο προαναφερθέντων κλινικών.

Τα δεδομένα των IgG SSc-ειδικών αυτοαντισωμάτων (Scl-70, CENPA, CENPB, RNAp_{o11}, RNAp_{o155}) είναι αποτέλεσμα γραμμικής ανοσοαποτύπωσης και η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε από την Εμμανουέλα Μάρου και το Δρ. Χρήστο Λιάσκο. Το πειραματικό πρωτόκολλο μπορεί να βρεθεί στις αναφορές [417, 418].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αντιγονοειδικά αντισώματα έναντι του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* στην κατά πλάκας σκλήρυνση

3.1 Εισαγωγή

Το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*, Hp) έχει προταθεί ως πιθανός αιτιολογικός παράγοντας της κατά πλάκας σκλήρυνσης (πολλαπλή σκλήρυνση, multiple sclerosis, MS), με βάση την αυξημένη συχνότητα και τους υψηλούς τίτλους αντι-Hp αντισωμάτων που παρατηρούνται σε ασθενείς με MS [361, 369, 378, 379]. Εντούτοις, αρκετές άλλες μελέτες έχουν αναφέρει χαμηλότερη συχνότητα των αντισωμάτων αυτών σε ασθενείς σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, προτείνοντας έναν προστατευτικό ρόλο του Hp στη νόσο αυτή [363-367, 370-372].

Οι αντιγονοειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις εναντίον του Hp φαίνεται ότι εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου, όπως αποδεικνύεται από τη μελέτη της χυμικής απόκρισης έναντι της ελικοβακτηριδιακής πρωτεΐνης neutrophil-activating protein (NAP) [368]. Στη μελέτη αυτή, οι τίτλοι των αντι-NAP αντισωμάτων ήταν ανάλογοι της βαρύτητας της νόσου σε μια υποκατηγορία ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση, αυτών που ήταν θετικοί για αντισώματα έναντι της ακουαπορίνης 4 (aquaporin 4, AQP4). Η δράση των αντι-NAP αντισωμάτων συσχετίστηκε με την ικανότητα της NAP να ενεργοποιεί κύτταρα τόσο της έμφυτης, όσο και της επίκτητης ανοσίας [463-465].

Για την αναγνώριση αντιγονοειδικών ανοσολογικών αποκρίσεων σε ασθενείς με MS και υποθέτοντας ότι αυτές ευθύνονται για την κατάρρευση της ανοσολογικής ανοχής που οδηγεί στη νόσο, αναζητήθηκαν τα αντισώματα έναντι πρωτεϊνών του Hp που εμφανίζονται σε διαφορετικές συχνότητες και τίτλους στον ορό των ασθενών σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες ή παθολογικά δείγματα ελέγχου. Για το λόγο αυτό, ακολουθήθηκε μια συστηματική προσέγγιση ελέγχου των ορών όλων των ασθενών και

των μαρτύρων για την παρουσία αντισωμάτων έναντι του H_ρ με τη χρήση ELISA. Στη συνέχεια, σε όλους τους αντι-H_ρ θετικούς ασθενείς και μάρτυρες εξετάστηκε η παρουσία αντισωμάτων έναντι 14 ανοσογονικών πρωτεϊνών του H_ρ, μεταξύ αυτών τα κύρια ελικοβακτηριδιακά αντιγόνα που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της λοίμωξης από H_ρ. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στις διαφορές της ανοσολογικής απάντησης έναντι των πρωτεϊνών του H_ρ μεταξύ ασθενών με RRMS και SPMS, με την υπόθεση ότι αυτές παίζουν ρόλο στον καθορισμό της κλινικής εικόνας της νόσου. Εξετάστηκαν επίσης πιθανές συσχετίσεις των αντισωμάτων αυτών με κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

3.2 Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1 Υλικά

Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα 2.1.

3.2.2 Μέθοδοι

3.2.2.1 Βιολογικό υλικό ασθενών και μαρτύρων

Συνολικά, συλλέχθηκαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος από 139 ασθενείς με MS (98 γυναίκες, 70.5%· διάμεση ηλικία 42 έτη, εύρος ηλικίας 20-69 έτη), εκ των οποίων τα 102 από ασθενείς με RRMS (73.4% των ασθενών με MS· 70 γυναίκες, 68.6%· διάμεση ηλικία 38 έτη· εύρος ηλικίας 20-66 έτη) και τα 37 από ασθενείς με SPMS (26.6% των ασθενών με MS· 28 γυναίκες, 75.7%· διάμεση ηλικία 58 έτη· εύρος ηλικίας 30-69 έτη). Ο Πίνακας 3.1 παρουσιάζει τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με MS. Η διάγνωση της RRMS βασίστηκε στα ανανεωμένα Κριτήρια McDonald του 2011 [460], ενώ η μετάβαση στην SPMS βασίστηκε στα κριτήρια που θεσπίστηκαν το 2016 από τον Lorscheider et al [461]. Κατά την αιμοληψία 38 (27.3%)

ασθενείς δε λάμβαναν κάποια θεραπευτική αγωγή. Ανάμεσα στους υπόλοιπους ασθενείς, 33 (23.7%) λάμβαναν ιντερφερόνη β (συμπεριλαμβανομένου 19 σε ιντερφερόνη β-1α και 14 σε ιντερφερόνη β-1β), 23 (16.5%) λάμβαναν ναταλιζουμάμπη/Tysabri, 20 (14.4%) λάμβαναν φινγκολιμόδη/Gilenya, 18 (12.9%) λάμβαναν οξική γλατιραμέρη/Coraxone, 5 (3.6%) λάμβαναν τεριφλουνομίδη/Aubagio και 2 (1.4%) λάμβαναν μιτοξαντρόνη. Όλοι οι ασθενείς παρακολουθούνταν σε τακτική βάση στην Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική (Διευθυντές Καθηγητής Γεώργιος Χατζηγεωργίου και Αναπληρωτής Καθηγητής Ευθύμιος Δαρδιώτης) στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

Ως παθολογικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ολικό περιφερικό αίμα από 39 (20 γυναίκες, 51.3%· διάμεση ηλικία 70 έτη, εύρος ηλικίας 38-84 έτη) ασθενείς με νόσο Πάρκινσον (Parkinson's disease, PD) και 21 (13 γυναίκες, 61.9%· διάμεση ηλικία 77 έτη, εύρος ηλικίας 63-86 έτη) ασθενείς με νόσο Αλτςχάιμερ (Alzheimer's disease, ALZ). Ο Πίνακας 3.1 παρουσιάζει τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με PD και ALZ.

Ως υγιή δείγματα ελέγχου (healthy controls, HC) χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος από 68 υγιείς μάρτυρες (40 γυναίκες, 58.8%· διάμεση ηλικία 53 έτη, εύρος ηλικίας 16-73). Ο Πίνακας 3.1 παρουσιάζει τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των υγιών μαρτύρων. Οι υγιείς μάρτυρες ήταν μέλη του προσωπικού του Εργαστηρίου και της Κλινικής Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, καθώς και συνοδοί ασθενών. Κανένας υγιής μάρτυρας δεν είχε οικογενειακό ιστορικό αυτοάνοσης νόσου, ούτε άλλη συννοσηρότητα ή χρόνια νόσο, όπως καρκίνο, αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη ή χρόνια καρδιαγγειακή νόσο.

Όλοι οι ασθενείς και οι μάρτυρες ήταν Λευκοί Καυκάσιοι. Όλα τα δείγματα ολικού περιφερικού αίματος διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση σε φικόλη και τα παράγωγα του αίματος αποθηκεύτηκαν κατάλληλα στους -20°C (Ενότητα 2.2.1).

3.2.2.2 Ανίχνευση IgG αντι-Hp αντισωμάτων με ELISA

Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ELISA «Anti-Helicobacter pylori ELISA (IgG)» της Euroimmun AG (Γερμανία), η οποία χρησιμοποιεί ως αντιγονική πηγή πρωτεϊνικό εκχύλισμα του στελέχους Lior 1 (Brussels) του Hp. Το πειραματικό πρωτόκολλο της ELISA παρουσιάζεται στην Ενότητα 2.2.2.

3.2.2.3 Ανίχνευση IgG αντιγονοειδικών Hp αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ELISA «Antibodies against Helicobacter pylori (IgG) EUROLINE-WB» της Euroimmun AG (Γερμανία), η οποία χρησιμοποιεί ως αντιγονική πηγή πρωτεϊνικό εκχύλισμα του στελέχους ATCC 43504 του Hp [466, 467]. Όλα τα αντι-Hp+ δείγματα ασθενών με MS και ελέγχου εξετάστηκαν για την ύπαρξη αντιδραστικών αντισωμάτων έναντι 12 πρωτεϊνών-αντιγόνων του Hp: p75, p67-FSH, p66-UreB, p54, p50, p41, p33, p30-OMP, p29-UreA, p26, p19-OMP και p17. Το πειραματικό πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western παρουσιάζεται στην Ενότητα 2.2.3.

Πίνακας 3.1: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών και υγείων δειγμάτων ελέγχου

	MS (n=139)	RRMS (n=102)	SPMS (n=37)	PD (n=39)	ALZ (n=21)	HC (n=68)	p (MS vs HC)	p (RRMS vs SPMS)	p (RRMS vs HC)	p (SPMS vs HC)	p (MS vs PD)	p (MS vs ALZ)
Φύλο												
Γυναίκες	98 (70.5%)	70 (68.6%)	28 (75.7%)	20 (51.3%)	13 (61.9%)	40 (58.8%)	ns	ns	ns	0.093 [†]	0.034[†]	ns
Αντρες	41 (29.5%)	32 (31.4%)	9 (24.3%)	19 (48.7%)	8 (38.1%)	28 (41.2%)						
Ηλικία	43.2 ± 12	39.2 ± 9.8	54.5 ± 10	68.7 ± 9.4	77.7 ± 7.5	47.4 ± 16.9	ns	<0.001[‡]	<0.001[‡]	0.008[‡]	<0.001[‡]	<0.001[‡]
Ηλικία εμφάνισης νόσου	31.7 ± 10.4	29.2 ± 9	38.6 ± 11.2	31.7 ± 10.4	29.2 ± 9	38.6 ± 11.2	N/A	<0.001[‡]	N/A	N/A	N/A	N/A
Διάρκεια νόσου	11.5 ± 7.2	10 ± 6	15.9 ± 8.4	11.5 ± 7.2	10 ± 6	15.9 ± 8.4	N/A	<0.001[‡]	N/A	N/A	N/A	N/A
EDSS	3.5 ± 2.2	2.8 ± 1.9	5.5 ± 1.8	3.5 ± 2.2	2.8 ± 1.9	5.5 ± 1.8	N/A	<0.001[‡]	N/A	N/A	N/A	N/A
Εξάρσεις	5.1 ± 3.5	5.44 ± 3.7	4.2 ± 3	5.1 ± 3.5	5.44 ± 3.7	4.2 ± 3	N/A	0.049[‡]	N/A	N/A	N/A	N/A
Δείκτης εξέλιξης νόσου	0.42 ± 0.54	0.38 ± 0.41	0.53 ± 0.8	0.42 ± 0.54	0.38 ± 0.41	0.53 ± 0.8	N/A	ns	N/A	N/A	N/A	N/A
Αντι-Ηρ θετικότητα	60 (43.2%)	41 (40.2%)	19 (51.4%)	60 (43.2%)	41 (40.2%)	19 (51.4%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των 139 ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), συμπεριλαμβάνοντας 102 με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και 37 με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS), των 68 υγείων δειγμάτων ελέγχου (HC), των 39 παθολογικών δειγμάτων ελέγχου με Πάρκινσον (PD) και των 21 παθολογικών δειγμάτων ελέγχου με Αλτςχάιμερ (ALZ). Τα δεδομένα του φύλλου και της αντι-Ηρ θετικότητας αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Τα δεδομένα της ηλικίας, της ηλικίας εμφάνισης νόσου, της διάρκειας νόσου, του EDSS, των εξάρσεων και το Progression Index αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean ± standard deviation). [†]Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). [‡]Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται

και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συνομηύσεις: EDSS, extended disability status scale N/A, not available ns, not significant.

3.2.2.4 Ανίχνευση αντι-CagA και αντι-VacA αντισωμάτων με γραμμική ανοσοαποτύπωση

Οι πρωτεΐνες cytotoxin-associated gene A (CagA) και vacuolating cytotoxin A (VacA) είναι κύριοι παράγοντες λοιμογονικότητας του *Hp* και ιδιαίτερα ανοσοεπικρατή αντιγόνα για αντι-*Hp* αντισώματα. Επειδή η έκφραση τους στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα που χρησιμοποιείται στη δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης κατά Western είναι ανεπαρκής [466-470], παρακωλύοντας την αποτελεσματική ανίχνευση από αντισώματα, η ανίχνευση των αντισωμάτων εναντίον τους έγινε με τη μέθοδο της γραμμικής ανοσοαποτύπωσης. Για το σκοπό αυτό, ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες CagA και VacA μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, οι οποίες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στην άκρη των strips της δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης κατά Western της Euroimmun AG (Γερμανία). Το πειραματικό πρωτόκολλο της ανίχνευσης των αντι-CagA και αντι-VacA αντισωμάτων με τη μέθοδο της γραμμικής ανοσοαποτύπωσης είναι το ίδιο με το πειραματικό πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western και παρουσιάζεται στην Ενότητα 2.2.3.

3.2.2.5 Κλινικές συσχετίσεις

Τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του *Hp* αναλύθηκαν για πιθανές συσχετίσεις με κλινικά χαρακτηριστικά της MS χρησιμοποιώντας το γραμμικό συντελεστή R του Pearson (Pearson's correlation R). Τα κλινικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ήταν η ηλικία εμφάνισης της νόσου, η διάρκεια της νόσου, η διευρυμένη κλίμακα κατάστασης αναπηρίας (extended disability status scale, EDSS), οι εξάρσεις της νόσου και ο δείκτης εξέλιξης της νόσου ή progression index, δείκτης που αποτελεί το πηλίκο του λόγου της EDSS προς τη διάρκεια της νόσου.

3.2.2.6 Στατιστική ανάλυση

Όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα 2.2.6.

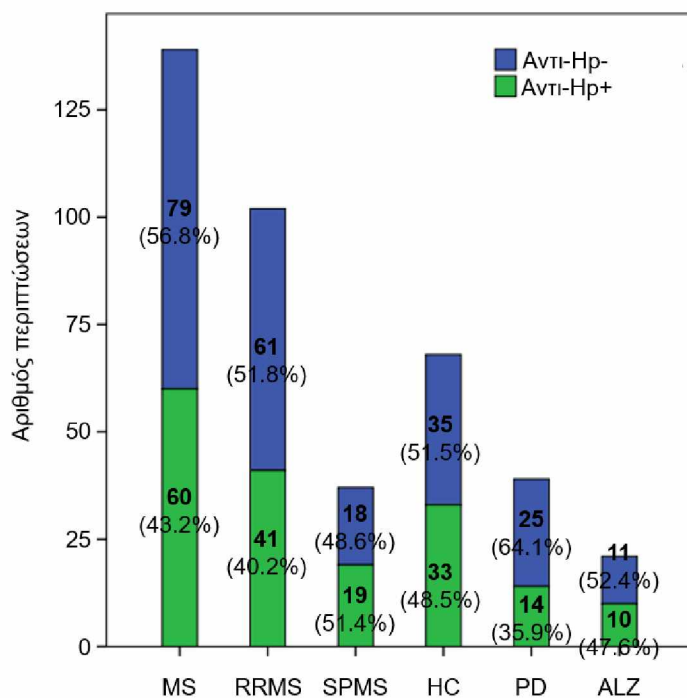
3.3 Αποτελέσματα

3.3.1 IgG αντι-Hp αντισώματα σε ασθενείς με MS

Η παρουσία αντισωμάτων έναντι του Hp (αντι-Hp+) ανιχνεύτηκε με ELISA σε 60 (43.2%) ασθενείς MS, από τους οποίους οι 41 (40.2%) ήταν RRMS και οι 19 (51.4%) ήταν SPMS, χωρίς αυτή η διαφορά ανάμεσα στις δύο κλινικές μορφές να είναι στατιστικά σημαντική ($p > 0.05$, Εικόνα 3.1). Όσον αφορά τα δείγματα ελέγχου, θετικοί σε αντισώματα έναντι του Hp εμφανίστηκαν 33 (48.5%) HC, 14 (35.9%) PD και 10 (47.6%) ALZ δείγματα (Εικόνα 3.1). Συνεπώς, η συχνότητα εμφάνισης των αντισωμάτων έναντι του Hp δε διέφερε ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες. Όλοι τα υπόλοιπα δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως αρνητικά σε αντισώματα έναντι του Hp (αντι-Hp-).

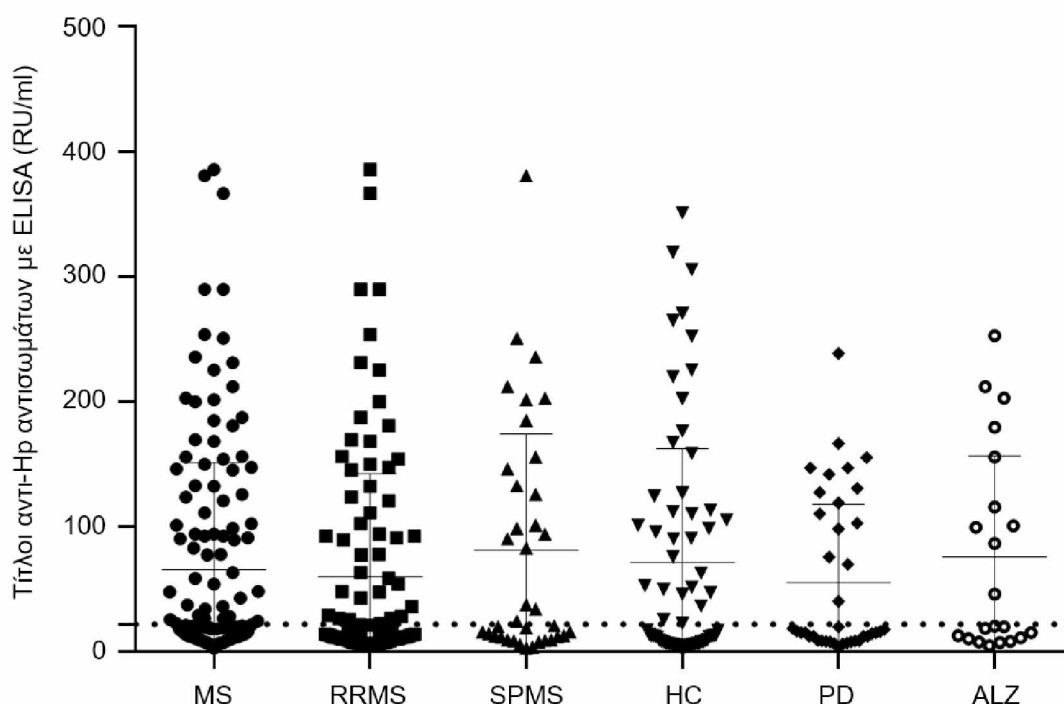
Οι τίτλοι των αντισωμάτων έναντι του Hp, όπως μετρήθηκαν με ELISA, ήταν 65.5 ± 85.5 RU/ml σε ασθενείς με MS, με τους RRMS να έχουν 59.9 ± 82.5 RU/ml και τους SPMS να έχουν 81.1 ± 92.7 RU/ml (Εικόνα 3.2). Όσον αφορά τα δείγματα ελέγχου, οι HC είχαν 71.3 ± 91.2 RU/ml, οι ασθενείς με PD είχαν 55.1 ± 62.2 RU/ml και οι ασθενείς με ALZ είχαν 75.5 ± 81 RU/ml (Εικόνα 3.2). Στατιστικά, οι τίτλοι των αντι-Hp αντισωμάτων δε διέφεραν ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες.

Εικόνα 3.1: Διάγραμμα θετικών και αρνητικών δειγμάτων για αντισώματα έναντι του Ηρ με ELISA



Ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS, n=139), υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS, n=102), δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS, n=37), υγιή δείγματα ελέγχου (HC, n=68), παθολογικά δείγματα ελέγχου με Πάρκινσον (PD, n=39) και παθολογικά δείγματα ελέγχου με Αλτςχάιμερ (ALZ, n=21).

Εικόνα 3.2: Διάγραμμα διασποράς που απεικονίζει τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι του H_p με ELISA

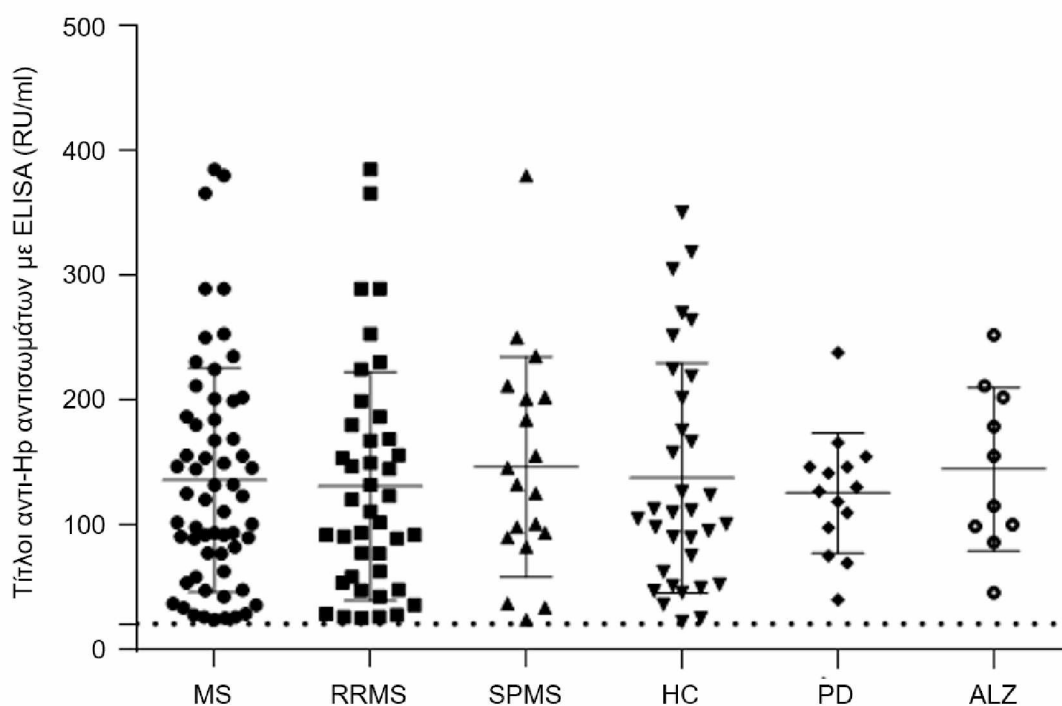


Ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS, n=139), υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS, n=102), δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS, n=37), υγιή δείγματα ελέγχου (HC, n=68), παθολογικά δείγματα ελέγχου με Πάρκινσον (PD, n=39) και παθολογικά δείγματα ελέγχου με Αλτςχάιμερ (ALZ, n=21). Οι γραμμές αναπαριστούν το μέσο όρο με την τυπική απόκλιση. Το όριο θετικότητας ορίστηκε στο ≥ 21 RU/ml και αναπαρίσται από τη διακεκομμένη γραμμή. Συντομεύσεις: H_p, *Helicobacter pylori*; RU/ml, relative units/milliliter.

Όταν οι τίτλοι των αντισωμάτων έναντι του H_p υπολογίστηκαν μόνο σε αντι-H_p+ δείγματα (Εικόνα 3.3), οι ασθενείς με MS είχαν 136.3 ± 90 RU/ml, οι RRMS είχαν 131.4 ± 91.5 RU/ml και οι SPMS 146.8 ± 88.2 RU/ml, οι HC είχαν 137.9 ± 92.2 RU/ml, οι ασθενείς με PD είχαν 125.6 ± 48.5 RU/ml και οι ασθενείς με ALZ είχαν 145.1 ± 65.7

RU/ml. Από τη σύγκριση των τιμών ανάμεσα στις παραπάνω ομάδες δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Εικόνα 3.3: Διάγραμμα διασποράς που απεικονίζει τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι του H_p με ELISA

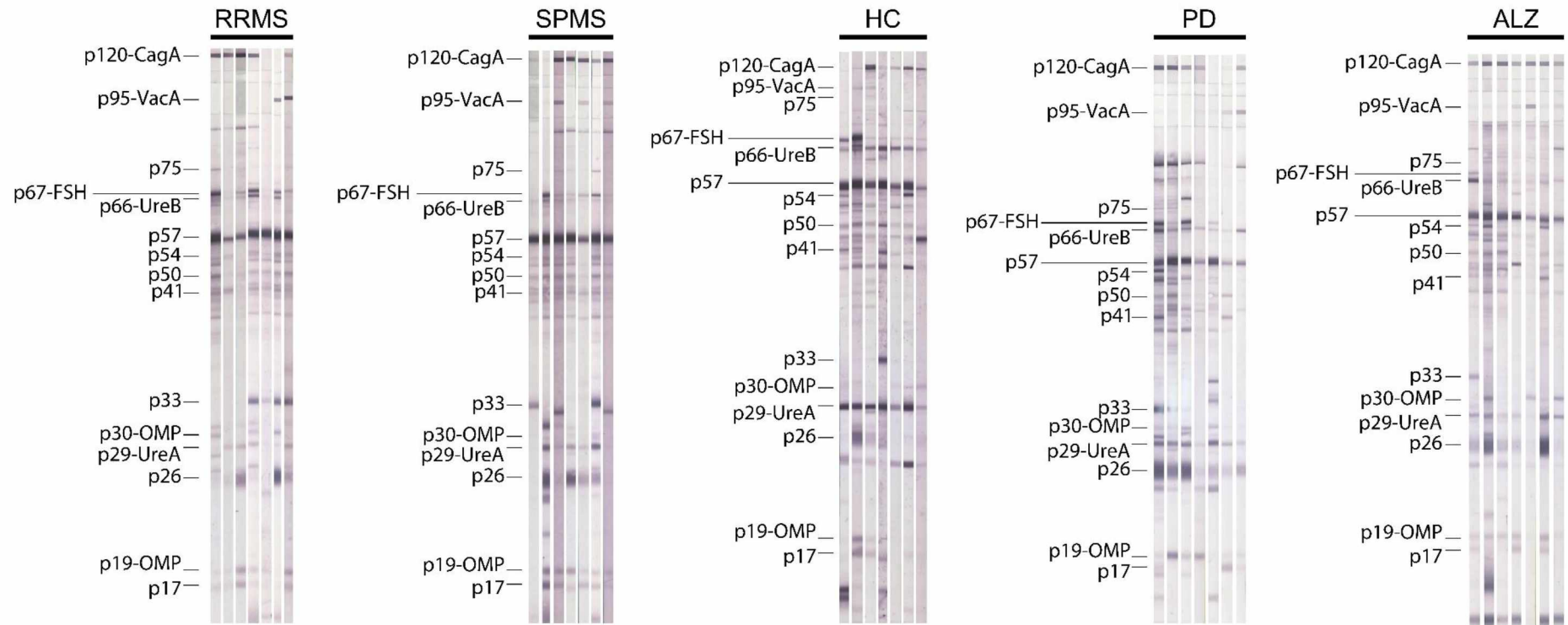


Αντι-H_p+ ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS, n=60), αντι-H_p+ ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS n=41), αντι-H_p+ ασθενείς με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS, n=19), αντι-H_p+ υγιή δείγματα ελέγχου (HC, n=33), αντι-H_p+ παθολογικά δείγματα ελέγχου με Πάρκινσον (PD, n=14) και αντι-H_p+ παθολογικά δείγματα ελέγχου με Αλτςχάιμερ (ALZ, n=10). Οι γραμμές αναπαριστούν το μέσο όρο με την τυπική απόκλιση. Το όριο θετικότητας ορίστηκε στο ≥ 21 RU/ml και αναπαρίσταται από τη διακεκομμένη γραμμή. Συντομεύσεις: H_p, *Helicobacter pylori*; RU/ml, relative units/milliliter.

3.3.2 Συχνότητες IgG αντιγονοειδικών Ηρ αντισωμάτων σε ασθενείς με MS

Η Εικόνα 3.4 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western από 35 αντιπροσωπευτικά δείγματα (7 RRMS, 7 SPMS, 7 HC, 7 PD και 7 ALZ), ενώ ο Πίνακας 3.2 παρουσιάζει τις συχνότητες εμφάνισης των αντισωμάτων έναντι των 14 πρωτεϊνών-αντιγόνων σε ασθενείς και δείγματα ελέγχου.

Εικόνα 3.4: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για αντισώματα έναντι 14 πρωτεϊνών-αντιγόνων του H_ρ



172

Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για αντισώματα έναντι 14 πρωτεϊνών-αντιγόνων του H_ρ σε 35 αντιπροσωπευτικά δείγματα, 7 από ασθενείς με δευτερογενή προϊούσα πολλαπλή σκλήρυνση (SPMS), 7 από ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα πολλαπλή σκλήρυνση (RRMS), 7 από υγιή δείγματα ελέγχου (HC), 7 από παθολογικά δείγματα ελέγχου με Πάρκινσον (PD) και 7 από

παθολογικά δείγματα ελέγχου με Αλτζχάιμερ (ALZ). Συντομεύσεις: *CagA*, protein from cytotoxin-associated gene A · *FSH*, flagellar sheath protein · *OMP*, outer membrane protein · *UreA*, urease A · *UreB*, urease B · *VacA*, vacuolating cytotoxin A.

Πίνακας 3.2: Συχνότητες εμφάνισης αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του Hr σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες

Αντιδρώσα ζώνη	MS (n=60)	RRMS (n=41)	SPMS (n=19)	HC (n=33)	PD (n=14)	ALZ (n=10)	<i>p</i> (MS vs HC)	<i>p</i> (RRMS vs SPMS)	<i>p</i> (RRMS vs HC)	<i>p</i> (SPMS vs HC)	<i>p</i> (MS vs PD)	<i>p</i> (RRMS vs PD)	<i>p</i> (SPMS vs PD)	<i>p</i> (MS vs ALZ)	<i>p</i> (RRMS vs ALZ)	<i>p</i> (SPMS vs ALZ)
p120-CagA	44 (73.3%)	29 (70.7%)	15 (78.9%)	30 (90.9%)	9 (64.3%)	10 (100%)	0.060	ns	0.042	ns	ns	ns	ns	ns	0.092	ns
p95-VacA	17 (28.3%)	9 (21.9%)	8 (42.1%)	4 (12.1%)	5 (35.7%)	3 (30%)	ns	ns	ns	0.019	ns	ns	ns	ns	ns	ns
p75	4 (6.7%)	2 (4.9%)	2 (10.5%)	3 (9.1%)	4 (28.6%)	0	ns	ns	ns	ns	0.037	0.031	ns	ns	ns	ns
p67-FSH	33 (55%)	19 (46.3%)	14 (73.7%)	24 (72.7%)	7 (50%)	4 (40%)	ns	ns	0.033	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
p66-UreB	40 (66.7%)	26 (63.4%)	14 (73.7%)	25 (75.8%)	12 (85.7%)	8 (80%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
p54	11 (18.3%)	4 (9.8%)	7 (36.8%)	13 (39.4%)	6 (42.9%)	4 (40%)	0.046	0.027	0.005	ns	0.075	0.012	ns	ns	0.038	ns
p50	32 (53.3%)	16 (39%)	16 (84.2%)	19 (57.6%)	10 (71.4%)	6 (60%)	ns	0.002	ns	0.068 [†]	ns	0.061 [†]	ns	ns	ns	ns
p41	15 (25%)	5 (12.2%)	10 (52.6%)	16 (48.5%)	10 (71.4%)	6 (60%)	0.037	0.003	0.001	ns	0.003	<0.001	ns	0.056	0.004	ns
p33	15 (25%)	9 (21.9%)	6 (31.6%)	9 (27.3%)	4 (28.6%)	1 (10%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
p30-OMP	7 (11.7%)	4 (9.8%)	3 (15.8%)	7 (21.2%)	7 (50%)	3 (30%)	ns	ns	ns	ns	0.003	0.003	0.057	ns	ns	ns
p29-UreA	27 (45%)	13 (31.7%)	14 (73.7%)	20 (60.6%)	12 (85.7%)	7 (70%)	ns	0.005	0.019	ns	0.007	0.001	ns	ns	0.036	ns
p26	31 (51.7%)	20 (48.8%)	11 (57.9%)	23 (69.7%)	12 (85.7%)	8 (80%)	ns	ns	0.098	ns	0.033	0.026	ns	ns	0.091	ns
p19-OMP	21 (35%)	15 (36.6%)	6 (31.6%)	10 (30.3%)	8 (57.1%)	7 (70%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.077	0.079	0.064
p17	23 (38.3%)	14 (34.1%)	9 (47.4%)	10 (30.3%)	5 (35.7%)	4 (40%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

60 αντι-Hr+ ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), συμπεριλαμβάνοντας 41 ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και 19 με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS), 33 αντι-Hr+ υγιή δείγματα ελέγχου (HC), 14 αντι-Hr+ παθολογικά δείγματα ελέγχου με Πάρκινσον (PD) και 10 αντι-Hr+ παθολογικά δείγματα ελέγχου με Αλτςχάιμερ (ALZ), όπως ανιχνεύθηκαν με από ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες

με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντομεύσεις: CagA, protein from cytotoxin-associated gene A · FSH, flagellar sheath protein · ns, not significant · OMP, outer membrane protein · UreA, urease A · UreB, urease B · VacA, vacuolating cytotoxin A.

Πίνακας 3.3: Τίτλοι αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του Ηρ

Αντιδρώσα ζώνη	MS	RRMS	SPMS	HC	PD	ALZ	ρ (MS vs HC)	ρ (RRMS vs SPMS)	ρ (RRMS vs HC)	ρ (SPMS vs HC)	ρ (MS vs PD)	ρ (RRMS vs PD)	ρ (SPMS vs PD)	ρ (MS vs ALZ)	ρ (RRMS vs ALZ)	ρ (SPMS vs ALZ)
p120-CagA	103.8 ± 33.7	103.7 ± 35.2	104.1 ± 31.7	76.6 ± 42	95.7 ± 37.7	66.7 ± 26.4	ns	0.005	0.010	0.019	ns	ns	ns	0.002	0.002	0.004
p95-VacA	38.1 ± 30.9	38.3 ± 33.4	37.8 ± 30.2	21.3 ± 5.9	32.2 ± 12.9	30.7 ± 16.2	ns	0.051	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
p75	36 ± 18.1	35.5 ± 14.8	36.5 ± 27.6	26.3 ± 12.6	24.5 ± 17.9	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	N/A	N/A	N/A
p67-FSH	49.2 ± 40	55.1 ± 41.9	41.1 ± 37.2	43.5 ± 34.6	79 ± 40.8	42.3 ± 36.8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.036	ns	ns	ns
p66-UreB	45.7 ± 25.3	47.6 ± 27.6	42.2 ± 21.1	65.2 ± 31.7	59 ± 32	45.4 ± 35.6	ns	0.013	0.040	0.010	ns	ns	ns	ns	ns	ns
p54	29.8 ± 16.9	27.8 ± 17.4	31 ± 17.9	55.9 ± 39.6	66.8 ± 31.2	42.8 ± 17.6	ns	0.046	0.067	0.070	0.032	0.035	0.039	ns	ns	ns
p50	31.8 ± 16.1	32.9 ± 18.5	30.8 ± 13.8	46.9 ± 22.4	34.5 ± 11.1	33.3 ± 15.7	ns	0.016	0.051	0.014	ns	ns	ns	ns	ns	ns
p41	29.1 ± 15.7	30.6 ± 22	28.4 ± 13	37.5 ± 22.4	41.1 ± 29.3	32 ± 13.5	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
p33	73.3 ± 35.8	73.9 ± 42.1	72.3 ± 27.6	74.7 ± 34.3	53 ± 42.1	42	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	N/A	N/A	N/A
p30-OMP	35.1 ± 23	22.5 ± 9.8	52 ± 26.3	29.3 ± 13.5	27.9 ± 12.5	37.7 ± 10.1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.077	ns
p29-UreA	36.3 ± 22.4	30.1 ± 20	42 ± 23.7	64.1 ± 49.1	60.8 ± 30.1	34 ± 16.8	ns	0.026	0.010	0.092	0.022	0.008	0.096	ns	ns	ns
p26	56.3 ± 35.5	52.8 ± 34	62.8 ± 38.9	53.5 ± 34	61.6 ± 33.7	46.1 ± 31.7	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
p19-OMP	31.9 ± 14	31.4 ± 14.7	33.2 ± 13.2	42.5 ± 32.8	47.5 ± 24.2	25.6 ± 16.3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
p17	34.6 ± 17.3	34.4 ± 17.9	35 ± 17.2	39 ± 21.8	38.8 ± 15.8	34.8 ± 26.3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Τίτλοι αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του Ηρ σε αντι-Ηρ+ ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), συμπεριλαμβάνοντας ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και ασθενείς με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS), σε αντι-Ηρ+ υγιή δείγματα ελέγχου (HC), σε αντι-Ηρ+ παθολογικά δείγματα ελέγχου με Πάρκινσον (PD) και σε αντι-Ηρ+ παθολογικά δείγματα ελέγχου με Αλτςχάιμερ (ALZ), όπως υπολογίστηκαν με από ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα δεδομένα αναπαριστούν

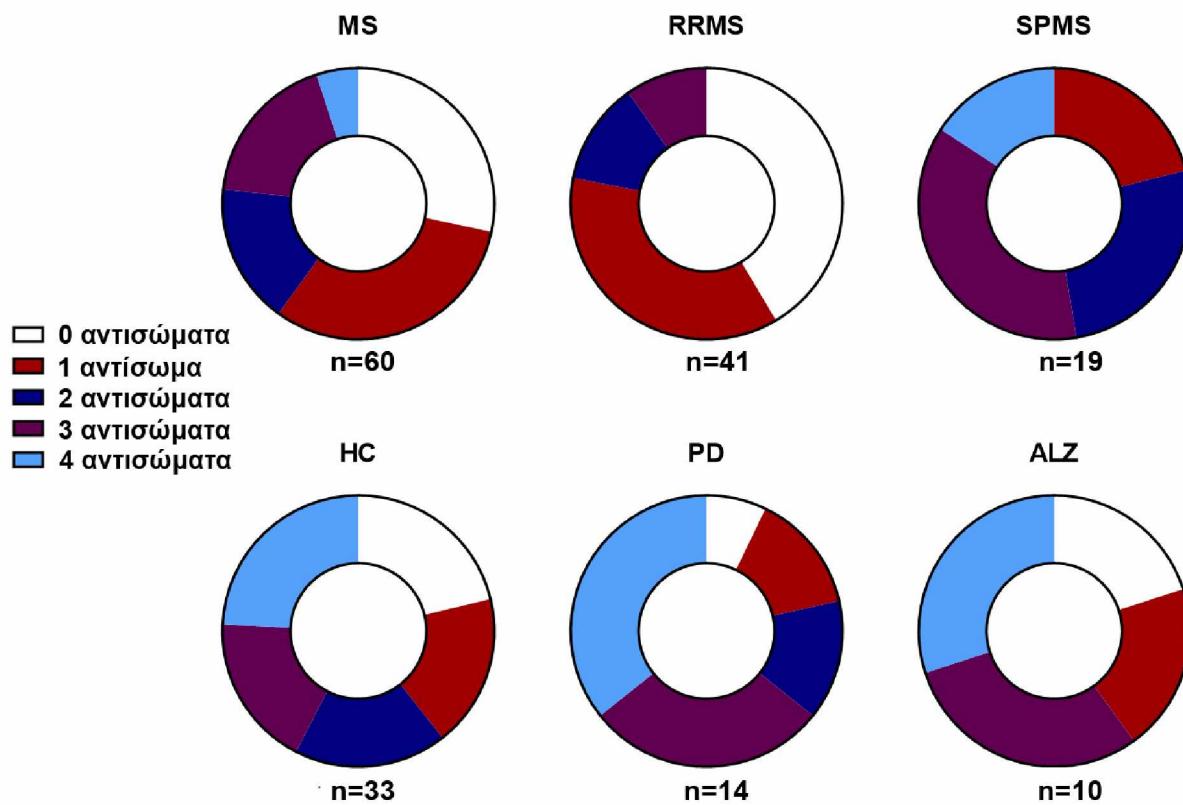
τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (*mean ± standard deviation*). Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία *t* του Student (*Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed*), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των *Mann-Whitney* (*Mann-Whitney test*). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντομεύσεις: *CagA*, protein from cytotoxin-associated gene A · *FSH*, flagellar sheath protein · *N/A*, not available · *ns*, not significant · *OMP*, outer membrane protein · *UreA*, urease A · *UreB*, urease B · *VacA*, vacuolating cytotoxin A.

Όλα τα 14 ελικοβακτηριδιακά αντιγόνα αναγνωρίστηκαν από αντισώματα, σε διάφορες συχνότητες, σε ασθενείς με MS και δείγματα ελέγχου (Πίνακας 3.2). Τα πιο ανοσοεπικρατή αντιγόνα με συχνότητα εμφάνισης μεγαλύτερη από 50% σε ασθενείς με MS ήταν το p120-CagA (73.3%), το p66-UreB (66.7%), το p67-FSH (55%), το p50 (53.3%) και το p26 (51.7%). Η αντιδραστικότητα για 6 από τα 15 αντιγόνα (p95-VacA, p67-FSH, p66-UreB, p50, p33 και p17) ανάμεσα σε ασθενείς με MS και δείγματα ελέγχου ήταν συγκρίσιμη. Για δύο από τα υπόλοιπα 8 αντιγόνα, το p54 (MS: 18.3%, HC: 39.4%, PD: 42.9%, MS έναντι HC, $p=0.046$ MS έναντι PD, $p=0.074$) και το p41 (MS: 25%, HC: 48.5%, PD: 71.4%, ALZ: 60% MS έναντι HC, $p=0.037$ MS έναντι PD, $p=0.003$ MS έναντι ALZ, $p=0.056$), τα αντισώματα εναντίον τους εμφανίστηκαν σε στατιστικά χαμηλότερες συχνότητες ή είχαν την τάση να εμφανίζονται σε χαμηλότερες συχνότητες στους ασθενείς με MS συγκριτικά με τα HC, ενώ τα αντισώματα έναντι του p120-CagA (MS: 73.3%, HC: 90.9% MS έναντι HC, $p=0.060$) είχαν την τάση να εμφανίζονται σε μικρότερη συχνότητα στους ασθενείς με MS συγκριτικά με τους HC. Ακόμα, τα αντισώματα έναντι του p30-OMP (MS: 11.7%, PD: 50%, MS έναντι PD, $p=0.003$), τα αντισώματα έναντι του p29-UreA (MS: 45%, PD: 85.7%, MS έναντι PD, $p=0.007$) και τα αντισώματα έναντι του p26 (MS: 51.7%, PD: 85.7%, MS έναντι PD, $p=0.033$) και τα αντισώματα έναντι του p75 (MS: 6.7%, PD: 28.6% MS έναντι PD, $p=0.037$) εμφανίστηκαν σε στατιστικά χαμηλότερες συχνότητες στους ασθενείς με MS συγκριτικά με τους PD, ενώ τα αντισώματα έναντι του p19-OMP (MS:35%, ALZ:70%, MS έναντι ALZ, $p=0.077$), είχαν την τάση να εμφανίζονται σε μικρότερη συχνότητα στους ασθενείς με MS συγκριτικά με τους ALZ.

Όταν οι ασθενείς με MS διαχωρίστηκαν σε RRMS και SPMS, η σύγκριση των συχνοτήτων εμφάνισης των αντισωμάτων έναντι των 14 αντιγόνων του Hρ αποκάλυψε ότι 4 από αυτά (p54, p50, p41 και p29-UreA) εμφανίζονται πιο συχνά στους ασθενείς

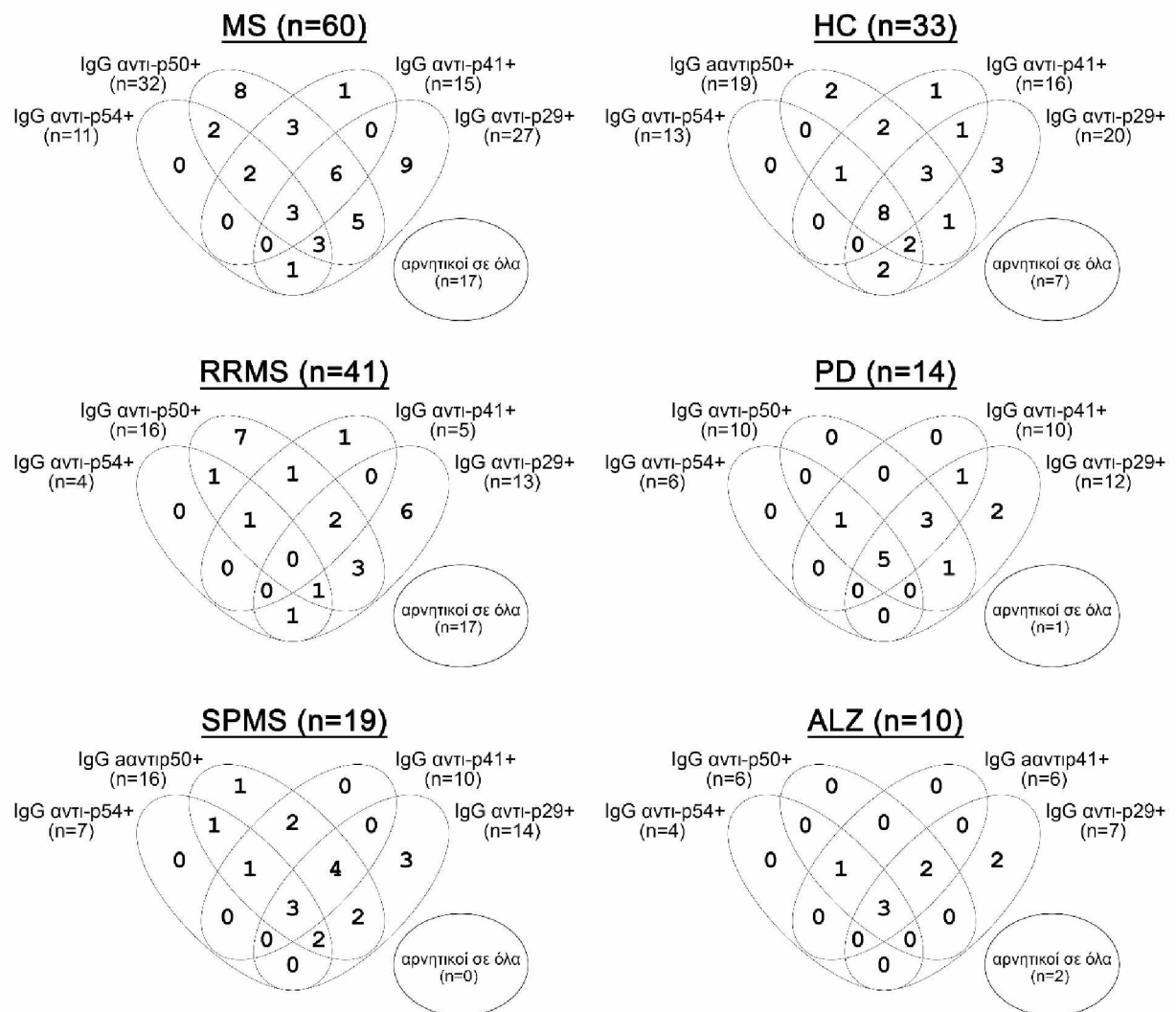
με SPMS, με τη διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική (Πίνακας 3.2), ενώ για τα για τα υπόλοιπα 10 αντιγόνα η αντιδραστικότητα ανάμεσα σε ασθενείς με RRMS και SPMS ήταν συγκρίσιμη. Αναλυτικά, p54 (RRMS: 9.8%, SPMS: 36.8% · RRMS έναντι SPMS, $p=0.027$), p50 (RRMS: 39%, SPMS: 84.2% · RRMS έναντι SPMS, $p=0.002$), p41 (RRMS: 12.2%, SPMS: 52.6% · RRMS έναντι SPMS, $p=0.003$) και p29-UreA (RRMS: 31.7%, SPMS: 73.7% · RRMS έναντι SPMS, $p=0.005$). Τα 4 αυτά αντισώματα μελετήθηκαν περαιτέρω, αρχικά με ανάλυση της συνδυασμένης παρουσίας δύο, τριών ή τεσσάρων εξ αυτών (Εικόνα 3.5). Από την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι το 22% των ασθενών με RRMS αντιδρούσαν με τουλάχιστον δύο αντιγόνα και το 78% αντιδρούσε με ένα ή κανένα αντιγόνο, ενώ το 79% των ασθενών με SPMS αντιδρούσαν με τουλάχιστον δύο αντιγόνα και το 21% με ένα ή κανένα αντιγόνο ($p<0.001$). Η ανάλυση της παρουσίας των αντισωμάτων αυτών σε συνδυασμούς μέσω διαγραμμάτων Venn δεν ανέδειξε κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο αντιδραστικότητας στην MS, RRMS ή SPMS (Εικόνα 3.6).

Εικόνα 3.5: Διαγράμματα δακτυλίου που απεικονίζουν την παρουσία ενός, δύο, τριών ή τεσσάρων αντισωμάτων έναντι των p54, p50, p41 και p29-UreA



Διαγράμματα δακτυλίου που απεικονίζουν την παρουσία ενός, δύο, τριών ή τεσσάρων αντισωμάτων έναντι των p54, p50, p41 και p29-UreA σε αντι-Hr+ ασθενείς με MS, ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS), ασθενείς με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS), υγιή δείγματα ελέγχου (HC), παθολογικά δείγματα ελέγχου με Πάρκινσον (PD) και παθολογικά δείγματα ελέγχου με Αλτςχάιμερ (ALZ).

Εικόνα 3.6: Διαγράμματα Venn που απεικονίζουν τη συνδυαστική παρουσία των αντισωμάτων έναντι των p54, p50, p41 και p29-UreA



Διαγράμματα Venn που απεικονίζουν τη συνδυαστική παρουσία των αντισωμάτων έναντι των p54, p50, p41 και p29-UreA σε αντι-Hr+ ασθενείς με MS, ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS), ασθενείς με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS), υγιά δείγματα ελέγχου (HC), παθολογικά δείγματα ελέγχου με Πάρκινσον (PD) και παθολογικά δείγματα ελέγχου με Αλτςχάιμερ (ALZ).

Από τη σύγκριση των συχνοτήτων εμφάνισης αντισωμάτων έναντι των 14 αντιγόνων του Hr ανάμεσα σε ασθενείς με RRMS ή SPMS και σε δείγματα ελέγχου HC, PD ή

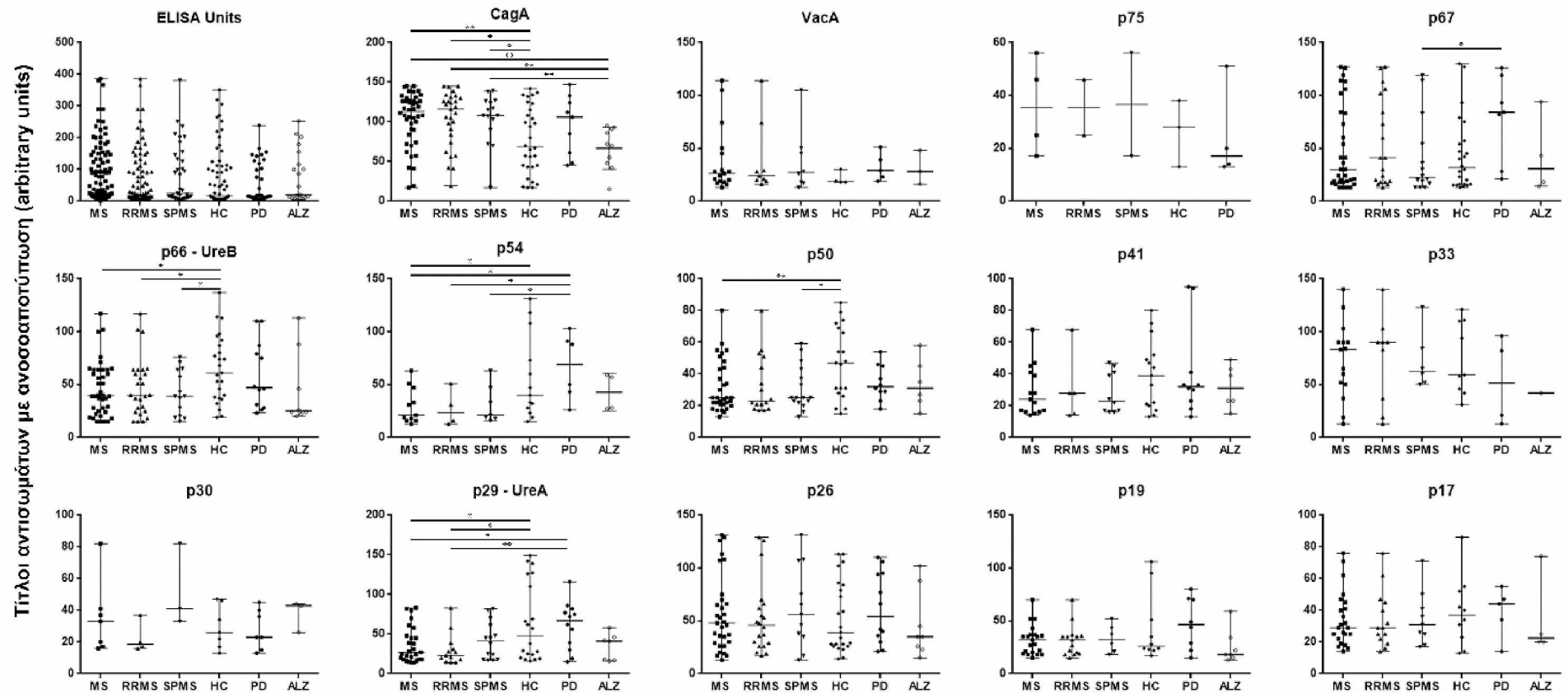
ALZ προέκυψε ότι μεγαλύτερες διαφορές υπήρχαν ανάμεσα σε ασθενείς με RRMS και σε δείγματα ελέγχου παρά ανάμεσα σε ασθενείς με SPMS και σε δείγματα ελέγχου. Η αντιδραστικότητα για 3 αντιγόνα, το p54 (RRMS: 18.3%, HC: 39.4%, PD: 42.9%, ALZ: 40%· RRMS έναντι HC, $p=0.005$ · RRMS έναντι PD, $p=0.012$ · RRMS έναντι ALZ, $p=0.038$), το p41 (RRMS: 25%, HC: 48.5%, PD: 71.4%, ALZ: 60%· RRMS έναντι HC, $p=0.001$ · RRMS έναντι PD, $p<0.001$ · RRMS έναντι ALZ, $p=0.004$) και το p29-UreA (RRMS: 45%, HC: 60.6%, PD: 85.7%, ALZ: 70%· RRMS έναντι HC, $p=0.019$ · RRMS έναντι PD, $p=0.001$ · RRMS έναντι ALZ, $p=0.036$), τα αντισώματα έναντι τους εμφανίστηκαν σε στατιστικά χαμηλότερες συχνότητες στους ασθενείς με RRMS συγκριτικά με τους HC, τους ασθενείς με PD και τους ασθενείς με ALZ, ενώ τα αντισώματα έναντι του p26 (RRMS: 51.7%, HC: 69.7%, PD: 85.7%, ALZ: 80%· RRMS έναντι HC, $p=0.098$ · RRMS έναντι PD, $p=0.026$ · RRMS έναντι ALZ, $p=0.091$) είχαν την τάση να εμφανίζονται σε μικρότερη συχνότητα στους ασθενείς με RRMS συγκριτικά με τους HC και τους ασθενείς με ALZ και εμφανίστηκαν σε στατιστικά χαμηλότερες συχνότητες στους ασθενείς με RRMS συγκριτικά με τους ασθενείς με PD. Ακόμα, τα αντισώματα έναντι του p120-CagA (RRMS: 73.3%, HC: 90.9%· RRMS έναντι HC, $p=0.042$), έναντι του p67-FSH (RRMS: 55%, HC: 72.7%· RRMS έναντι HC, $p=0.033$) εμφανίστηκαν στατιστικά λιγότερο συχνά σε ασθενείς με RRMS σε σχέση με τους HC, τα αντισώματα έναντι του p30-OMP (RRMS: 11.7%, PD: 50%· RRMS έναντι PD, $p=0.003$) και του p75 (RRMS: 6.7%, PD: 28.6%· RRMS έναντι PD, $p=0.031$) εμφανίστηκαν στατιστικά λιγότερο συχνά σε ασθενείς με RRMS σε σχέση με ασθενείς με PD. Τέλος, το μοναδικό αντιγόνο του H₉ για το οποίο τα αντισώματα εμφανίστηκαν σε στατιστική σημαντική διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς με SPMS και στους HC, με τη συχνότητα να είναι μεγαλύτερη στους SPMS παρά στους υγιείς μάρτυρες, ήταν το p95-VacA (SPMS: 42.1%, HC: 12.1%· SPMS έναντι HC, $p=0.019$).

3.3.3 Τίτλοι IgG αντιγονοειδικών H_ρ αντισωμάτων σε ασθενείς με MS

Ο Πίνακας 3.3 παρουσιάζει και η Εικόνα 3.7 απεικονίζει τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι των 14 αντιγόνων του H_ρ σε ασθενείς με MS και σε δείγματα ελέγχου, όπως ποσοτικοποιήθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα επίπεδα των 7 από τα 14 αντισώματα, αυτά έναντι των p75, p41, p33, p30-OMP, p26, p19-OMP και p17 στους ασθενείς με MS και στα δείγματα ελέγχου ήταν συγκρίσιμα. Το μοναδικό αντίσωμα που εμφάνισε στατιστικά υψηλότερους τίτλους στους ασθενείς με MS σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου ήταν αυτό έναντι του p120-CagA (MS: 103.8 ± 33.7, RRMS: 103.7 ± 35.2, SPMS: 104.1, HC: 76.6 ± 42, PD: 95.7 ± 37.7, ALZ: 66.7 ± 26.4 MS έναντι HC, $p=0.005$ RRMS έναντι HC, $p=0.010$ SPMS έναντι HC, $p=0.019$ RRMS έναντι ALZ, $p=0.002$ SPMS έναντι ALZ, $p=0.004$). Ακόμα, τα αντισώματα έναντι του p95-VacA (MS: 38.1 ± 30.9, HC: 21.3 ± 5.9 MS έναντι HC, $p=0.051$) εμφάνισαν την τάση να έχουν υψηλότερους τίτλους στους ασθενείς με MS συγκρινόμενα με τους υγιείς μάρτυρες. Όλα τα υπόλοιπα αντισώματα βρέθηκαν σε μικρότερα επίπεδα στους ασθενείς με MS σχετικά με τα δείγματα ελέγχου. Αναλυτικά, τα αντισώματα έναντι του p66-UreB (MS: 45.7 ± 25.3, RRMS: 47.6 ± 27.6, SPMS: 42.2 ± 21.1, HC: 65.2 ± 31.7 MS έναντι HC, $p=0.013$ RRMS έναντι HC, $p=0.040$ SPMS έναντι HC, $p=0.010$), έναντι του p54 (MS: 29.8 ± 16.9, RRMS: 27.8 ± 17.4, SPMS: 31 ± 17.9, HC: 55.9 ± 39.6, PD: 66.8 ± 31.2 MS έναντι HC, $p=0.046$ RRMS έναντι HC, $p=0.067$ SPMS έναντι HC, $p=0.070$ MS έναντι PD, $p=0.032$ RRMS έναντι PD, $p=0.035$ SPMS έναντι PD, $p=0.039$), έναντι του p50 (MS: 31.8 ± 16.1, RRMS: 32.9 ± 18.5, SPMS: 30.8 ± 13.8, HC: 46.9 ± 22.4 MS έναντι HC, $p=0.016$ RRMS έναντι HC, $p=0.051$ SPMS έναντι HC, $p=0.014$) και έναντι του p29-UreA (MS: 36.3 ± 22.4, RRMS: 30.1 ± 20, SPMS: 42 ± 23.7, HC: 64.1 ± 49.1, PD: 60.8 ± 30.1 MS έναντι HC, $p=0.026$ RRMS έναντι HC, $p=0.010$ SPMS έναντι HC, $p=0.092$ MS έναντι PD, $p=0.0022$ RRMS έναντι PD,

$p=0.008$ SPMS έναντι PD, $p=0.096$) είχαν στατιστικά χαμηλότερους τίτλους ή είχαν την τάση για χαμηλότερους τίτλους στους ασθενείς με MS, RRMS ή SPMS σε σύγκριση με τους HC ή τους ασθενείς με PD. Ακόμα, τα αντισώματα έναντι του p67-FSH (SPMS: 41.1 ± 37.2 , PD: 79 ± 40.8 SPMS έναντι PD, $p=0.036$) εμφανίστηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα στους ασθενείς με SPMS σε σχέση με τους PD.

Εικόνα 3.7: Διαγράμματα διασποράς που απεικονίζουν τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι των 14 αντιγόνων του Hp



Διαγράμματα διασποράς που απεικονίζουν τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι των 14 αντιγόνων του Hp σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS), δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS), υγιή δείγματα ελέγχου (HC), παθολογικά δείγματα ελέγχου με Πάρκινσον (PD) και παθολογικά δείγματα με Αλτςχάιμερ (ALZ). Οι γραμμές αναπαριστούν τη

διάμεσο με το εύρος των τιμών. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Συντομεύσεις: *CagA*, protein from cytotoxin-associated gene A; *UreA*, urease A; *UreB*, urease B; *VacA*, vacuolating cytotoxin A.

3.3.4 Συσχετίσεις των αντιγονοειδικών H_p ανοσολογικών αποκρίσεων

Ο Πίνακας 3.4 ανακεφαλαιώνει τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με MS ανάλογα με τη θετικότητα για το H_p, όπως αυτή καθορίστηκε με ELISA. Οι αντι-H_p+ MS ασθενείς (n=60) ήταν μεγαλύτεροι σε ηλικία (46.4 ± 12.3 ετών) σε σύγκριση με τους αντι-H_p- MS ασθενείς (n=79, 40.8 ± 11.2 ετών, αντι-H_p+ έναντι αντι-H_p-, $p=0.007$). Ακόμα, η ηλικία εμφάνισης της ασθένειας ήταν υψηλότερη στους αντι-H_p+ MS ασθενείς (34.4 ± 10.5) σε σύγκριση με τους αντι-H_p- MS ασθενείς (29.7 ± 10 ετών, αντι-H_p+ έναντι αντι-H_p-, $p=0.008$). Στα υπόλοιπα κλινικά χαρακτηριστικά δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε αντι-H_p+ και αντι-H_p- ασθενείς.

Ακόμα, γυναίκες αντι-H_p+ ασθενείς με MS ήταν μεγαλύτερες σε ηλικία (47.8 ± 12) σε σχέση με γυναίκες αντι-H_p- ασθενείς (41.5 ± 11.6 · αντι-H_p+ έναντι αντι-H_p-, $p=0.011$). Επιπρόσθετα, γυναίκες αντι-H_p+ ασθενείς με MS είχαν μεγαλύτερη ηλικία εμφάνισης της ασθένειας (35 ± 10.1) σε σχέση με γυναίκες αντι-H_p- ασθενείς (30.3 ± 9.8 · αντι-H_p+ έναντι αντι-H_p-, $p=0.021$). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές αυτές στην ηλικία και στην ηλικία εμφάνισης της ασθένειας δεν παρατηρήθηκαν όταν έγιναν οι αντίστοιχες συγκρίσεις ανάμεσα σε άντρες αντι-H_p+ και αντι-H_p- ασθενείς, ή όταν συγκρίθηκαν γυναίκες αντι-H_p+ έναντι αντρών αντι-H_p+ ασθενείς με MS.

Πίνακας 3.4: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των 139 ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), κατηγοριοποιημένων ανάλογα με τη θετικότητα για αντισώματα έναντι του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού (αντι-Hp) σε θετικούς (αντι-Hp+) και αρνητικούς (αντι-Hp-), όπως αυτή καθορίστηκε με ELISA.

	MS (n=139)	αντι-Hp+ (n=60)	αντι-Hp- (n=79)	p (αντι-Hp+ vs αντι-Hp-)
Φύλο				
Γυναίκες	98 (70.5%)	42 (70%)	56 (70.9%)	ns
Άντρες	41 (29.5%)	18 (30%)	23 (29.1%)	
Ηλικία	43.2 ± 12	46.4 ± 12.3	40.8 ± 11.2	0.007[‡]
(>20/≤20 ετών)	138 (99.3%)/ 1 (0.7%)	60 (100%)/ 0	78 (98.7%)/ 1 (1.3%)	ns
(>30/≤30 ετών)	116 (83.5%)/ 23 (16.5%)	54 (90%)/ 6 (10%)	62 (78.5%)/ 17 (21.5%)	ns
(>40/≤40 ετών)	77 (55.4%)/ 62 (44.6%)	37 (61.7%)/ 23 (38.3%)	40 (50.6%)/ 39 (49.4%)	ns
(>50/≤50 ετών)	42 (30.2%)/ 97 (69.8%)	24 (40%)/ 36 (60%)	18 (22.8%)/ 61 (77.2%)	0.040[†]
Ηλικία εμφάνιση νόσου	31.7 ± 10.4	34.4 ± 10.5	29.7 ± 10	0.008[‡]
Διάρκεια ασθένειας	11.5 ± 7.2	12 ± 7.6	11.1 ± 6.9	ns
RRMS	102 (73.4%)	41 (68.3%)	61 (77.2%)	ns
SPMS	37 (26.6%)	19 (31.7%)	18 (22.8%)	
EDSS	3.5 ± 2.2	3.6 ± 2.3	3.5 ± 2.2	ns
Εξάρσεις	5.1 ± 3.5	4.5 ± 3.7	5.6 ± 3.3	ns
Δείκτης εξέλιξης νόσου	0.42 ± 0.54	0.44 ± 0.79	0.41 ± 0.39	ns
Αντι-Hp τίτλοι (RU/ml)	65.6 ± 85.5	136.3 ± 90	11.7 ± 4.8	<0.001[‡]

Τα δεδομένα του φύλλου και των κατηγοριοποιήσεων με βάση το έτος της ηλικίας αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Τα δεδομένα της ηλικίας, της ηλικίας εμφάνισης νόσου, της

δάρκειας νόσου, του EDSS, των υποτροπών, το Progression Index και οι αντι-Ηρ τίτλοι αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (*mean ± standard deviation*). †Η τιμή *p* υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity). ‡Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία *t* του Student (Student's *t*-test, two-tailed, equal variances not assumed), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). Συντομεύσεις: EDSS, *expanded disability status scale*· *ns, not significant*· RRMS, *relapse-remitting multiple sclerosis*, υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα κατά πλάκας σκλήρυνση· RU/ml, *relative units/milliliter*· SPMS, *secondary progressive multiple sclerosis*, δευτερογενή προϊούσα κατά πλάκας σκλήρυνση.

Αρκετές συσχετίσεις βρέθηκαν ανάμεσα στα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του H_p, όπως μετρήθηκαν με ELISA, στα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του H_p, όπως μετρήθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, και σε κλινικά χαρακτηριστικά (Πίνακας 3.5). Ενώ τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του H_p, όπως μετρήθηκαν με ELISA, δε συσχετίστηκαν με κανένα κλινικό χαρακτηριστικό, τα επίπεδα αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων, όπως μετρήθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, εμφάνισαν συσχετίσεις με ένα ή περισσότερα κλινικά χαρακτηριστικά. Συνολικά, 6 αντισώματα εναντίον αντιγόνων του H_p εμφάνισαν συσχέτιση με ένα ή περισσότερα κλινικά χαρακτηριστικά. Αναλυτικά, τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του p54 συσχετίστηκαν με το EDSS ($R=0.310$, $p=0.017$), τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του p41 συσχετίστηκαν με την ηλικία ($R=0.342$, $p=0.008$), τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του p33 συσχετίστηκαν με την ηλικία ($R=0.267$, $p=0.039$) και την ηλικία εμφάνισης της ασθένειας ($R=0.291$, $p=0.024$), τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του p29-UreA συσχετίστηκαν με το EDSS ($R=0.364$, $p=0.005$), τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του p26 συσχετίστηκαν με το EDSS ($R=0.392$, $p=0.002$) και με τον αριθμό των εξάρσεων της ασθένειας ($R=0.274$, $p=0.037$) και τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του p17 συσχετίστηκαν με τον αριθμό των εξάρσεων της ασθένειας ($R=0.262$, $p=0.047$).

Οι ίδιες αναλύσεις κλινικών συσχετίσεων πραγματοποιήθηκαν και όταν οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε RRMS και SPMS. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6. Στους ασθενείς με RRMS παρέμειναν 3 από τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με MS συνολικά, δηλαδή τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του p26 με το EDSS ($R=0.437$, $p=0.004$) και με τον αριθμό των εξάρσεων της ασθένειας ($R=0.371$, $p=0.017$) και τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του p17 με τον αριθμό των εξάρσεων της ασθένειας ($R=0.345$, $p=0.027$).

Τέσσερις νέες συσχετίσεις εμφανίστηκαν στους ασθενείς με RRMS. Αναλυτικά, τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του με το δείκτη εξέλιξης της νόσου ($R=0.345$, $p=0.027$), τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του p30 με το δείκτη εξέλιξης της νόσου ($R=0.340$, $p=0.030$), τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του p30 με την ηλικία εμφάνισης της νόσου ($R=0.331$, $p=0.034$) και τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του p29-UreA με τον αριθμό των εξάρσεων ($R=0.471$, $p=0.002$). Στους ασθενείς με SPMS δεν εμφανίστηκε καμία συσχέτιση από αυτές που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με MS συνολικά, όμως δύο νέες συσχετίσεις εμφανίστηκαν. Αναλυτικά, τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι της VacA με την ηλικία ($R=0.496$, $p=0.031$) και τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του p66-UreB με το EDSS ($R=0.477$, $p=0.046$).

Ακόμα, αρκετά αντισώματα έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του H_ρ εμφάνισαν συσχέτιση με τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του H_ρ, όπως μετρήθηκαν με ELISA. Αυτά ήταν τα αντι-p95-VacA ($R=0.286$, $p=0.027$), αντι-p75 ($R=0.312$, $p=0.015$), αντι-p67 ($R=0.315$, $p=0.014$), αντι-p33 ($R=0.376$, $p=0.003$), αντι-p30 ($R=0.375$, $p=0.003$), αντι-p26 ($R=0.482$, $p<0.001$) και αντι-p17 ($R=0.282$, $p=0.029$).

Τέλος, αρκετές συσχετίσεις εμφανίστηκαν ανάμεσα σε διαφορετικά αντισώματα έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του H_ρ, οι οποίες και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5.

Πίνακας 3.5: Κλινικές συσχετίσεις αντιγονοειδικών Ηρ ανοσολογικών αντιδράσεων σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση.

		Ηλικία	Ηλικία εμφάνισης ασθένειας	EDSS	Διάρκεια ασθένειας	Δείκτης εξέλιξης νόσου	Εξάρσεις	Αντι-Ηρ τίτλοι (RU/ml)	p120-CagA	p95-VacA	p75	p67	p66-UreB	p54	p50	p41	p33	p30	p29-UreA	p26	p19-OMP	p17
Ηλικία	R		0.787**	0.497**	0.530**	0.081	-0.085	0.103	0.108	0.006	-0.046	0.108	0.163	0.094	0.201	0.342**	0.267	0.210	0.190	0.129	0.119	0.071
	p		<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.008	0.039	ns	ns	ns	ns	
Ηλικία εμφάνισης νόσου	R			0.201	-0.106	0.334**	-0.273*	0.185	0.187	0.067	0.000	0.197	0.172	0.1010	0.198	0.225	0.291*	0.253	0.080	0.034	0.027	0.080
	p			ns	ns	0.010	0.038	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.084	0.024	0.051	ns	ns	ns	
EDSS	R				0.522**	0.226	0.120	0.192	0.053	0.061	0.190	0.151	0.099	0.310*	0.092	0.225	-0.006	0.208	0.364**	0.392**	0.174	0.227
	p				<0.001	0.086	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.017	ns	0.086	ns	0.005	0.002	ns	0.083	
Διάρκεια ασθένειας	R					-0.326*	0.243	-0.086	-0.081	-0.084	-0.074	-0.091	0.029	0.148	0.052	0.246	0.035	-0.003	0.202	0.163	0.157	0.008
	p					0.012	0.066	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.058	ns	ns	ns	ns	ns	
Δείκτης εξέλιξης νόσου	R						-0.157	0.037	0.195	0.050	0.064	0.116	0.214	0.105	0.064	0.091	-0.074	0.045	0.050	-0.033	-0.103	-0.030
	p						ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
Εξάρσεις	R							0.112	-0.127	-0.108	-0.033	-0.047	-0.174	-0.073	-0.223	-0.175	-0.105	-0.073	0.242	0.274*	0.123	0.262*
	p							ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.092	ns	ns	0.067	0.037	ns	0.047	
Αντι-Ηρ τίτλοι (RU/ml)	R								0.023	0.286*	0.312*	0.315*	0.057	0.134	0.193	0.040	0.376**	0.375**	0.219	0.482**	0.131	0.282*
	p								ns	0.027	0.015	0.014	ns	ns	ns	ns	0.003	0.003	0.093	<0.001	0.318	0.029
p120-CagA	R									0.130	0.252	0.321*	0.197	0.223	0.085	-0.141	-0.042	-0.103	0.078	0.002	0.044	0.182
	p									ns	0.052	0.012	ns	0.087	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
p95-VacA	R										0.498*	0.133	0.076	-0.031	0.221	0.006	0.247	0.119	0.157	0.303*	-0.031	0.258*
	p										<0.001	ns	ns	ns	0.090	ns	0.057	ns	ns	0.019	ns	0.046
p75	R											0.228	0.077	-0.061	0.155	-0.077	0.023	-0.030	0.139	0.293*	0.029	0.522*
	p											0.083	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.023	ns	<0.001
p67-FSH	R												0.354*	0.130	0.552**	0.267	0.416*	0.570**	0.233	0.248	0.189	0.370*
	p												0.006	ns	<0.001	0.039	0.001	<0.001	0.073	0.056	ns	0.004
p66-UreB	R													0.217	0.249	0.306*	0.147	0.313*	0.089	-0.042	-0.079	-0.034
	p													0.096	0.055	0.018	ns	0.015	ns	ns	ns	
p54	R														0.173	0.201	0.012	0.107	0.295*	0.115	0.051	-0.080
	p														ns	ns	ns	0.022	ns	ns	ns	
p50	R															0.613**	0.456**	0.343**	0.302*	0.065	-0.016	0.143
	p															<0.001	<0.001	0.007	0.019	ns	ns	
p41	R																0.330*	0.345**	0.345**	-0.048	0.006	0.030
	p																0.010	0.007	0.007	ns	ns	
p33	R																	0.288*	0.153	0.077	0.120	0.159
	p																	0.026	ns	ns	ns	
p30-OMP	R																		0.332**	0.342**	0.328*	0.390**
	p																		0.010	0.008	0.011	0.002
p29-UreA	R																			0.476**	0.353*	0.451**
	p																			<0.001	0.006	<0.001
p26	R																				0.336*	0.483*
	p																				0.009	<0.001
p19-OMP	R																					0.538*
	p																					<0.001
p17	R																					0.538*
	p																					<0.001

Τα δεδομένα αναπαριστούν το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson (R). Το p είναι η τιμή p (2 tailed) της συσχέτισης. *Η συσχέτιση είναι σημαντική και μικρότερη του 0.05 (p<0.05). **Η συσχέτιση είναι σημαντική και μικρότερη ή ίση του 0.01 (p≤0.01).

Συντομώσεις: CagA, protein from cytotoxin-associated gene A` EDSS, extended disability status scale` FSH, flagellar sheath protein`

ns, not significant · *OMP, outer membrane protein* · *UreA, RU/ml, relative units/milliliter* · *urease A* · *UreB, urease B* · *VacA, vacuolating cytotoxin A.*

Πίνακας 3.6: Κλινικές συσχετίσεις αντιγονοειδικών Ηρ ανοσολογικών αντιδράσεων σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS) ταξινομημένες σε υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS) και αναλύσεις πολλαπλής παλινδρόμησης μετά από διόρθωση για την ηλικία, την ηλικία εμφάνισης της νόσου, τη διάρκεια της νόσου και το φύλλο.

MS	RRMS	SPMS
		VacA-age (R=-0.496, p=0.031) adj. for age (R=N/A, p=N/A) adj. age at onset (R=-0.543, p=0.20) adj. for disease duration (R=-0.476, p=0.046) adj. for sex (R=-0.513, p=0.029)
	p67-PI (R=0.345, p=0.027) adj. for age (R=0.352, p=0.026) adj. age at onset (R=0.320, p=0.044) adj. for disease duration (R=0.311, p=0.051) adj. for sex (R=0.341, p=0.031)	
		p66-UreB-EDSS (R=0.477, p=0.046) adj. for age (R=0.493, p=0.044) adj. age at onset (R=0.488, p=0.047) adj. for disease duration (R=0.573, p=0.016) adj. for sex (R=0.481, p=0.051)
p54-EDSS (R=0.310, p=0.017) adj. for age (R=0.309, p=0.018) adj. age at onset (R=0.316, p=0.016) adj. for disease duration (R=0.279, p=0.034) adj. for sex (R=0.312, p=0.017)		
p41-age (R=0.342, p=0.008) adj. for age (R=N/A, p=N/A) adj. age at onset (R=0.273, p=0.036) adj. for disease duration (R=0.257, p=0.050) adj. for sex (R=0.357, p=0.005)		
p33-age (R=0.267, p=0.039) adj. for age (R=N/A, p=N/A) adj. age at onset (R=0.065, p=0.622) adj. for disease duration (R=0.294, p=0.024) adj. for sex (R=0.266, p=0.033)		
p33-age at onset (R=0.291, p=0.024) adj. for age (R=0.135, p=0.307) adj. age at onset (R=N/A, p=N/A)		

adj. for disease duration (R=0.297, $p=0.023$) adj. for sex (R=0.289, $p=0.026$)		
	p30-PI (R=0.340, $p=0.030$) adj. for age (R=0.362, $p=0.022$) adj. age at onset (R=0.301, $p=0.059$) adj. for disease duration (R=0.314, $p=0.049$) adj. for sex (R=0.338, $p=0.033$)	
	p30-age at onset (R=0.331, $p=0.034$) adj. for age (R=0.285, $p=0.074$) adj. age at onset (R=N/A, $p=N/A$) adj. for disease duration (R=0.316, $p=0.047$) adj. for sex (R=0.326, $p=0.040$)	
p29-UreA-EDSS (R=0.364, $p=0.005$) adj. for age (R=0.327, $p=0.012$) adj. age at onset (R=0.364, $p=0.006$) adj. for disease duration (R=0.316, $p=0.016$) adj. for sex (R=0.262, $p=0.045$)		
	p29-UreA-relapses (R=0.471, $p=0.002$) adj. for age (R=0.468, $p=0.002$) adj. age at onset (R=0.459, $p=0.003$) adj. for disease duration (R=0.472, $p=0.002$) adj. for sex (R=0.450, $p=0.004$)	
p26-EDSS (R=0.392, $p=0.002$) adj. for age (R=0.393, $p=0.002$) adj. age at onset (R=0.397, $p=0.002$) adj. for disease duration (R=0.316, $p=0.016$) adj. for sex (R=0.397, $p=0.002$)	p26-EDSS (R=0.437, $p=0.004$) adj. for age (R=0.423, $p=0.006$) adj. age at onset (R=0.437, $p=0.005$) adj. for disease duration (R=0.416, $p=0.008$) adj. for sex (R=0.439, $p=0.005$)	
p26-relapses (R=0.274, $p=0.037$) adj. for age (R=0.288, $p=0.030$) adj. age at onset (R=0.291, $p=0.028$) adj. for disease duration (R=0.242, $p=0.069$) adj. for sex (R=0.250, $p=0.061$)	p26-relapses (R=0.371, $p=0.017$) adj. for age (R=0.385, $p=0.014$) adj. age at onset (R=0.396, $p=0.011$) adj. for disease duration (R=0.346, $p=0.029$) adj. for sex (R=0.346, $p=0.029$)	
p17-relapses (R=0.262, $p=0.047$) adj. for age (R=0.273, $p=0.040$) adj. age at onset (R=0.300, $p=0.023$) adj. for disease duration (R=0.261, $p=0.050$) adj. for sex (R=0.238, $p=0.075$)	p17-relapses (R=0.345, $p=0.027$) adj. for age (R=0.349, $p=0.027$) adj. age at onset (R=0.326, $p=0.024$) adj. for disease duration (R=0.339, $p=0.032$) adj. for sex (R=0.318, $p=0.046$)	

Τα δεδομένα αναπαριστούν το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson (R). Το p είναι η τιμή p (2 tailed) της συσχέτισης.

Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική

σημαντικότητα ($p<0.1$). Συντομεύσεις: adj., adjusted; EDSS, extended disability status scale, διευρυμένη κλίμακα κατάστασης

αναπηρίας; *N/A*, not applicable; *PI*, Progression Index, δείκτης εξέλιξης; *UreA*, urease A; *UreB*, urease B; *VacA*, vacuolating cytotoxin A.

3.3.5 Ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης στις αντιγονοειδικές Ηρ ανοσολογικές αποκρίσεις

Για να εκτιμηθεί αν οι συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στα επίπεδα των αντιγονοειδικών Ηρ αντισωμάτων με τα κλινικά χαρακτηριστικά εξαρτώνται από την ηλικία, την ηλικία εμφάνισης της ασθένειας, τη διάρκεια της ασθένειας και το φύλο, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις πολλαπλής παλινδρόμησης (Πίνακας 3.6).

Οι περισσότερες συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν παρέμειναν αμετάβλητες μετά τη διόρθωση ως προς την ηλικία, την ηλικία εμφάνιση της ασθένειας, τη διάρκεια της ασθένειας και το φύλο. Οι συσχετίσεις που μεταβλήθηκαν ήταν: τα επίπεδα των αντι-p33 αντισωμάτων με την ηλικία ($R=0.267$, $p=0.039$) όταν διορθώθηκε για την ηλικία εμφάνισης της ασθένειας ($R=0.065$, $p=0.622$), τα επίπεδα των αντι-p33 αντισωμάτων με την ηλικία εμφάνισης της ασθένειας ($R=0.291$, $p=0.024$) όταν διορθώθηκε για την ηλικία ($R=0.135$, $p=0.307$), τα επίπεδα των αντι-p26 αντισωμάτων με τις εξάρσεις της ασθένειας ($R=0.274$, $p=0.037$) όταν διορθώθηκε για τη διάρκεια της ασθένειας ($R=0.242$, $p=0.069$), και τα επίπεδα των αντι-p17 αντισωμάτων με τις εξάρσεις της ασθένειας ($R=0.262$, $p=0.047$) όταν διορθώθηκε για το φύλο ($R=0.238$, $p=0.075$).

3.4 Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη της ανοσολογικής απόκρισης έναντι συγκεκριμένων, ανοσογονικών αντιγόνων του Ηρ αποτελεί την πρώτη συστηματική προσπάθεια εκτίμησης της κλινικής σημασίας της ανοσολογικής απόκρισης αυτής σε ασθενείς με MS. Επίσης, είναι η πρώτη φορά που οι ασθενείς κατατάσσονται με βάση τον κλινικό φαινότυπο της νόσου σε RRMS και SPMS στο πλαίσιο τέτοιας ανάλυσης. Η μελέτη καλύπτει ένα μεγάλο εύρος αντιγονοειδικών Ηρ ανοσολογικών αποκρίσεων. Ακόμα, η χρησιμοποίηση παθολογικών δειγμάτων ελέγχου από νευρολογικές ασθένειες μη

αυτοάνοσης φύσης, δηλαδή τη νόσο του Πάρκινσον και τη νόσο Αλτςχάιμερ, αποτελεί ακόμα ένα πλεονέκτημα της μελέτης αυτής.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι δεν υπάρχει διαφορά στη συχνότητα ή στο επίπεδο των αντι-Hr αντισωμάτων ανάμεσα σε ασθενείς με MS και υγιείς μάρτυρες ή ανάμεσα σε ασθενείς με RRMS και SPMS όταν χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ELISA για ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος του Hr. Προηγούμενες σχετικές μελέτες απέδωσαν αντικρουόμενα αποτελέσματα, με τις περισσότερες να αναφέρουν χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης των αντι-Hr αντισωμάτων σε ασθενείς με MS σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [364-366, 371, 372], δύο να αναφέρουν συγκρίσιμες συχνότητες [367, 468] και μία να αναφέρει υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης στην MS [369]. Οι παρατηρούμενες διαφορές πιθανώς να οφείλονται στην επίδραση συγχυτικών παραγόντων, όπως η εθνικότητα, το φύλλο και η ηλικία των ασθενών, καθώς και τα δείγματα ελέγχου που χρησιμοποιούνται στις μελέτες [364, 371].

Εντούτοις, οι ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι συγκεκριμένων ανοσογονικών και ανοσοεπικρατών αντιγόνων του Hr διέφεραν ανάμεσα σε ασθενείς με MS και σε υγιείς μάρτυρες, αλλά κυρίως ανάμεσα σε ασθενείς με RRMS και με SPMS. Το πρώτο σημαντικό εύρημα ήταν ότι η συχνότητα των αντι-VacA αντισωμάτων ήταν 4 φορές υψηλότερη σε ασθενείς με SPMS σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Το αντι-VacA αντίσωμα ήταν το μοναδικό αντίσωμα έναντι ελικοβακτηριδιακών αντιγόνων που ανιχνεύθηκε πιο συχνά σε ασθενείς παρά σε υγιείς μάρτυρες. Όλα τα υπόλοιπα, ανάμεσα στα οποία ήταν τα αντι-p120-CagA, αντι-p67-FSH, αντι-p50, αντι-p41 και αντι-p29-UreA, εμφανίστηκαν πιο συχνά στους υγιείς μάρτυρες σε σύγκριση με τους ασθενείς ή δε διέφεραν.

Ο λόγος γιατί η πρωτεΐνη VacA, μια τοξίνη που εκκρίνεται από το H_ρ και οδηγεί σε καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων μέσω του σχηματισμού πόρων στην κυτταρική μεμβράνη [471], αποτελεί συχνό στόχο της ανοσολογικής απόκρισης σε ασθενείς με SPMS δεν είναι κατανοητός. Η λοίμωξη με το H_ρ θα μπορούσε να οδηγήσει στην παραγωγή αντιδραστικών αντισωμάτων, ή και T λεμφοκυττάρων, έναντι της VacA. Μέσω διασταυρούμενης αντιδραστικότητας σε άτομα με γενετική προδιάθεση, τα αντισώματα αυτά θα μπορούσαν να αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα του ελύτρου της μυελίνης των νευρικών αξόνων, επάγοντας ή παρατείνοντας την απομυελινοποίηση στην SPMS. Η VacA είναι μια από τις μικροβιακές πρωτεΐνες που έχει προταθεί ως αιτιολογικός παράγοντας αυτοανοσίας μέσω του μηχανισμού της μοριακής μίμησης. Αντισώματα έναντι της VacA έχουν ανιχνευθεί σε εγκεφαλονωτιαίου υγρό από ασθενείς με σύνδρομο Guillain-Barré και Miller-Fisher [472, 473]. Η ύπαρξη ομοιοτήτων στις αλληλουχίες αμινοξέων της VacA και της υπομονάδας A της ανθρώπινης αντλίας ATP νατρίου-καλίου που εντοπίζεται στο έλυτρο μυελίνης κυττάρων Schwann [474] υποστηρίζει την υπόθεση ότι η καταστροφή των νευραξόνων στις παραπάνω νόσους μεσολαβείται από αντι-VacA αντισώματα που αναγνωρίζουν πρωτεϊνικές αντλίες ιόντων στο έλυτρο της μυελίνης. Επίσης, η μόλυνση ποντικών C57BL/6 με το H_ρ επάγει την παραγωγή υψηλών τίτλων αντι-VacA αντισωμάτων, αλλά και αυτοάνοση χολαγγειίτιδα, δηλαδή το πειραματικό μοντέλο της πρωτοπαθούς χολικής χολαγγειίτιδας [475]. Εντούτοις, έχει αποκλειστεί η πιθανότητα της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας ανάμεσα στα αντι-VacA αντισώματα και σε αυτοαντισώματα έναντι της υπομονάδας E της μιτοχονδριακής πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, ένα ένζυμο που αποτελεί το κύριο αυτοαντιγόνο του νοσήματος αυτού [476].

Μια πιθανή εξήγηση της αυξημένης συχνότητας των αντι-VacA αντισωμάτων στο ορό ασθενών με SPMS σε σύγκριση με το RRMS και τους υγιείς μάρτυρες είναι αυτή να οφείλεται στην αυξημένη ηλικία των ασθενών με SPMS. Από μελέτες σε υγιή άτομα είναι γνωστό ότι οι ανοσολογικές αντιδράσεις για το Hρ αυξάνουν ποιοτικά και ποσοτικά με την αύξηση της ηλικίας, φτάνοντας σε αποκορύφωση σε άτομα ηλικίας 65 ετών [355]. Το φαινόμενο αυτό είναι πιθανό να επηρεάζει τις αντιδράσεις έναντι συγκεκριμένων Hρ αντιγόνων σε ασθενείς και σε δείγματα ελέγχου ή τις στατιστικά σημαντικά διαφορές που παρατηρήθηκαν στις αναλύσεις. Ωστόσο, η στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας των αντι-VacA αντισωμάτων παρατηρήθηκε και όταν η σύγκριση έγινε μονάχα σε ασθενείς SPMS και RRMS και σε υγιείς μάρτυρες άνω των 40 ετών (44.4% σε ασθενείς με SPMS και 13.33% σε υγιείς μάρτυρες, $p=0.036$), αποδεικνύοντας ότι η αυξημένη αντιδραστικότητα έναντι της VacA συνδέεται με την κλινική μορφή της νόσου και όχι με την ηλικία.

Με την ίδια λογική, οι αυξημένες συχνότητες των αντισωμάτων έναντι των ελικοβακτηριδιακών p54, p50, p41 και p29-UreA που ανιχνεύθηκαν σε ασθενείς με SPMS σε σύγκριση με τους ηλικιακά νεότερους ασθενείς με RRMS θα μπορούσαν να αποδοθούν στην επίδραση της ηλικίας στην ανοσολογική απόκριση έναντι του Hρ. Όμως, και πάλι η σύγκριση μεταξύ ασθενών SPMS και SPMS άνω των 40 ετών έδειξε ότι οι διαφορές αυτές παραμένουν. Η σημασία των παραπάνω αποτελεσμάτων χρίζει περαιτέρω έρευνας, αν ληφθεί υπόψιν ότι οι συχνότητες των αντισωμάτων έναντι του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος του Hρ, όπως αναλύθηκαν με ELISA, ήταν συγκρίσιμες ανάμεσα με ασθενείς με MS και σε υγιείς μάρτυρες ή σε ασθενείς με RRMS και SPMS.

Τα αυξημένα επίπεδα αντι-CagA αντισωμάτων σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες ήταν ένα αξιοπρόσεκτο αποτέλεσμα. Αυξημένα επίπεδα της CagA έχουν συσχετισθεί

με αυξημένο ρίσκο για πεπτικό έλκος, έλκος του δωδεκαδακτύλου, καρκίνο του στομάχου, και λέμφωμα MALT [477, 478]. Οι αυξημένοι τίτλοι των αντισωμάτων έναντι της CagA θα μπορούσε να οφείλονται στην υπερέκφραση του αντιγόνου αυτού από το H_p, καθώς η αύξηση της έκφρασης της CagA είναι ανάλογη με αυξημένα επίπεδα IL-6 στην κυκλοφορία σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο [479]. Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα αντι-CagA αντισωμάτων έχουν αναφερθεί και στην ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα, όπου η μείωση των επιπέδων των αντι-CagA αντισωμάτων έπειτα από θεραπεία εκρίζωσης στους ασθενείς αυτούς αποτελεί θετικό προγνωστικό δείκτη ανταπόκρισης στη θεραπεία και βελτίωσης του αριθμού των αιμοπεταλίων [480].

Αρκετές στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις προέκυψαν κατά την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων ανάμεσα στα επίπεδα των αντιγονοειδικών αντισωμάτων και σε κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με MS. Η πιο αξιοσημείωτη κλινική συσχέτιση είναι αυτή ανάμεσα στα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι της ουρεάσης A (αντι-p29-UreA) και της EDSS. Σχετικά με την κλίμακα αυτή, γυναίκες ασθενείς με MS θετικές για το H_p είχαν χαμηλότερη βαθμολογία EDSS σε σύγκριση με γυναίκες ασθενείς μη μολυσμένες με το H_p [364], χωρίς όμως να έχει αξιολογηθεί προηγουμένως η σχέση ανάμεσα σε ξεχωριστά ελικοβακτηριδιακά αντιγόνα και στη βαρύτητα της νόσου. Είναι ενδιαφέρον ότι τα επίπεδα αντισωμάτων έναντι 6 από τα 14 αντιγόνα του H_p που μελετήθηκαν (p54, p41, p33, p29-UreA, p26, p17) συσχετίστηκαν με τουλάχιστον ένα κλινικό χαρακτηριστικό της MS και ότι ακόμα και μετά τη διόρθωση της ανάλυσης της συσχέτισης μέσω της ανάλυσης της πολλαπλής παλινδρόμησης, οι στατιστικά σημαντικές διαφορές παρέμειναν για το p54, το p29-UreA και το p26.

Αναφορικά με τις αδυναμίες της παρούσας προσέγγισης του ρόλου των ανοσοαποκρίσεων έναντι αντιγόνων του H_p στην MS, όπως και σε άλλες μελέτες, είναι δύσκολο να ελέγξεις την επιρροή της ηλικίας στην αντιμικροβιακή ανοσολογική

αντίδραση. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αυτό αφορά τη συχνότητα και τον τίτλο των αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών-αντιγόνων του H_ρ σε ασθενείς με MS, ιδιαίτερα στη θετική σχέση που παρατηρήθηκε ανάμεσα στα αντι-VacA αντισώματα και στην SPMS. Η χρησιμοποίηση μαρτύρων ανάλογης ηλικίας με τους ασθενείς, η ανάλυση των συχνοτήτων των αντισωμάτων έπειτα από κατηγοριοποίηση των ασθενών σε ηλικιακές ομάδες και η χρήση στατιστικών αναλύσεων προς διόρθωση της επίδρασης της ηλικίας βοήθησαν στην επίλυση του προβλήματος αυτού. Ιδανικά, μια προοπτική μελέτη πασχόντων-μαρτύρων που θα αξιολογούσε τα αντισώματα έναντι αντιγόνων του H_ρ σε βάθος χρόνου θα έλυε το παραπάνω πρόβλημα.

Δεύτερον, αρκετοί μη-παθογενετικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με αυξημένες χυμικές αντιδράσεις έναντι νευρικών αντιγόνων θα μπορούσαν να εξηγήσουν επίσης τις αυξημένες χυμικές αντιδράσεις έναντι μικροβιακών αντιγόνων. Για παράδειγμα, υπάρχει η υπόθεση ότι οι ασθενείς με SPMS έχουν αυξημένη χυμική ανοσία έναντι αντιγόνων του κεντρικού νευρικού συστήματος και ότι αυτός ο μηχανισμός πιθανόν να αυξάνει και μη ειδικές ανοσολογικές αντιδράσεις που δε σχετίζονται με νευρολογική παθολογία [481]. Σε αυτήν την περίπτωση, η σχέση ανάμεσα στο H_ρ και στην MS θα ήταν τυχαία και όχι αιτιολογική. Εντούτοις, η απόδειξη αυτού του ερωτήματος παραμένει δύσκολη.

Τέλος, σημαντικό ερώτημα σχετικά με την εγκυρότητα της παρούσας προσέγγισης είναι κατά πόσο οι πολλαπλές συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν για την ανάλυση των διαφορών στις συχνότητες και τους τίτλους του κάθε αντιγονοειδικού αντισώματος επηρεάζουν τα αποτελέσματα και εάν αυτά θα έπρεπε να διορθωθούν. Η προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε εξετάζει τις συγκρίσεις αυτές ως συμπληρωματικές και όχι αθροιστικές και ότι δεν υπάρχει ανάγκη για διόρθωση ως προς τις πολλαπλές συγκρίσεις, ακολουθώντας τη λογική της μελέτης των Ridker και συνεργατών [482].

Εντούτοις, στις συγκρίσεις των συχνοτήτων των ελικοβακτηριδιακών αντιγονοειδικών αποκρίσεων πραγματοποιήθηκε διόρθωση για συνεχή κατανομή κατά Yates, ώστε να αυξηθεί η αυστηρότητα της στατιστικής σημαντικότητας και η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Η διόρθωση κατά Yates δεν άλλαξε τις περισσότερες από τις διαφορές που είχαν παρατηρηθεί, όμως αυτά τα αποτελέσματα απαιτούν επικύρωση και από άλλες μελέτες σε μεγαλύτερες ομάδες ασθενών και μαρτύρων.

Εν κατακλείδι, οι ασθενείς με MS φαίνεται ότι αναγνωρίζουν σε διαφορετικές συχνότητες ορισμένα αντιγόνα του H_ρ σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Επίσης, υπάρχει διαφορά στην ανοσολογική αντίδραση έναντι αντιγόνων του H_ρ και ανάμεσα στους δύο κύριους κλινικούς υποτύπους της MS, δηλαδή στην RRMS και στην SPMS, γεγονός που τονίζει το πόσο πολύπλοκο είναι να αξιολογηθεί ο πιθανός ρόλος της χυμικής απόκρισης έναντι αντιγόνων του H_ρ στην ανοσολογική απορρύθμιση που εμφανίζεται στην MS. Η διαλεύκανση της συμμετοχής του H_ρ στην παθογένεια της MS θα μπορούσε να προσφέρει νέες επιλογές στην πρόληψη και στη θεραπεία της νόσου αυτής, μέσω εμβολιασμού ή θεραπείας εκκρίωσης του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Αντισώματα έναντι της Hsp60 του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* στην κατά πλάκας σκλήρυνση

4.1 Εισαγωγή

Από τα βασικά αντιγόνα του Hsp τα οποία έχουν μελετηθεί για το ρόλο τους στην απώλεια της ανοσολογικής ανοχής και στην παθογένεση της MS είναι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins, Hsp) [483-487]. Τα πιο ανοσοεπικρατή από αυτά είναι η Hsp60 και η Hsp70, πρωτεΐνες που λειτουργούν ως μοριακές τσαπερόνες, προστατεύουν τις πρωτεΐνες του Hsp από αποδιάταξη σε τοξικές συνθήκες και επιτρέπουν το Hsp να αναπτυχθεί στο όξινο γαστρικό περιβάλλον [488].

Ο ρόλος των ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι μικροβιακών Hsp60 και Hsp70 πρωτεϊνών σε αυτοάνοσα νοσήματα έχει εκτενώς μελετηθεί στο παρελθόν [483, 485, 487, 489, 490]. Αντισώματα έναντι μυκοβακτηριδιακών Hsp60 και Hsp70 έχουν ανιχνευθεί σε αρκετές αυτοάνοσες νόσους, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος και σε φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου, αν και αρχικά ο ρόλος του στην εμφάνιση των νοσημάτων αυτών αμφισβητήθηκε, λόγω της συχνής παρουσίας τους σε υγιείς μάρτυρες επίσης [487]. Εντούτοις, αντισώματα έναντι της μυκοβακτηριδιακής Hsp60 ανιχνεύθηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με αγγειίτιδα σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, υποστηρίζοντας το ρόλο των αντι-Hsp60 αντισωμάτων στην αυτοανοσία [489]. Στην MS, αντισώματα έναντι μικροβιακών Hsp70 ανιχνεύθηκαν σε μεγαλύτερη συχνότητα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [483], ενώ έχει επίσης αποδειχθεί ότι η T κυτταρική ανοσολογική αντίδραση έναντι των πρωτεϊνών αυτών είναι αυξημένη σε ασθενείς με MS [485].

Εξαιτίας της εξελικτικής συντήρησης των πρωτεϊνών Hsp από τα βακτήρια μέχρι τον άνθρωπο και της μεγάλης ομολογίας που υπάρχει ανάμεσα στις αμινοξικές αλληλουχίες αυτών, έχει παρατηρηθεί μεγάλου βαθμού διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ανάμεσα σε Hsp60 διαφορετικών ειδών [491]. Για το λόγο αυτό, οι φυσιολογικές ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι μικροβιακών Hsp θα μπορούσαν να επάγουν διασταυρούμενες χυμικές και κυτταρικές αποκρίσεις έναντι των ανθρώπινων ομόλογων Hsp. Η παρουσία χυμικών αποκρίσεων έναντι της ανθρώπινης Hsp60 έχει αναφερθεί στην MS [483] και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 [492], η ρευματοειδής αρθρίτιδα [493-496], ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος [484, 493, 494], η συστηματική σκλήρυνση [493, 494], το σύνδρομο Sjogren [493], η νόσος Αδαμαντιάδη-Behcet [493] και διάφορες αγγειίτιδες [493, 497], όπως και η παρουσία κυτταρικών αποκρίσεων έναντι της ανθρώπινης Hsp60 σε διάφορα φλεγμονώδη νοσήματα [491, 498]. Υπό αυτό το πρίσμα, η μοριακή μίμηση μεταξύ βακτηριακών και ανθρώπινης Hsp60 και η ανοσολογική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα έχουν διερευνηθεί ως μηχανισμοί παραγωγής αντισωμάτων και T κυττάρων έναντι της ανθρώπινης Hsp60 έπειτα από βακτηριακές λοιμώξεις, με αρκετές μελέτες να συνηγορούν υπέρ αυτής της υπόθεσης [499-502].

Λόγω της έλλειψης δεδομένων σχετικά με την ανοσολογική απόκριση έναντι της Hsp60 του Hr σε ασθενείς με MS, αλλά κυρίως λόγω της φαινομενικής σημασίας αυτής στην επαγωγή της νόσου, η μελέτη αυτής έγινε ξεχωριστά και ανεξάρτητα από τη μελέτη των υπόλοιπων αντιγονοειδικών ανοσολογικών αποκρίσεων σε ασθενείς με MS. Όπως και στο Κεφάλαιο 3, ακολουθήθηκε μια συστηματική προσέγγιση ελέγχου των ορών όλων των ασθενών και των μαρτύρων για την παρουσία αντισωμάτων έναντι του Hr με τη χρήση ELISA και στη συνέχεια εξετάστηκε η παρουσία αντισωμάτων έναντι της Hsp60 του Hr σε όλους τους αντι-Hr θετικούς ασθενείς και μάρτυρες.

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1 Υλικά

Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα 2.1.

4.2.2 Μέθοδοι

4.2.2.1 Βιολογικό υλικό ασθενών και μαρτύρων

Συνολικά, συλλέχθηκαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος από 129 (91 γυναίκες, 70.5%· διάμεση ηλικία 41 έτη, εύρος ηλικίας 20-69 έτη) ασθενείς με MS, εκ των οποίων τα 102 από ασθενείς με RRMS (79% των ασθενών με MS· 70 γυναίκες, 68.6%· διάμεση ηλικία 38 έτη, εύρος ηλικίας 20-66 έτη) και τα 27 από ασθενείς με SPMS (21% των ασθενών με MS· 21 γυναίκες, 77.8%· διάμεση ηλικία 58 έτη, εύρος ηλικίας 30-69 έτη). Ο Πίνακας 4.1 παρουσιάζει τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με MS. Η διάγνωση της RRMS βασίστηκε στα ανανεωμένα Κριτήρια McDonald του 2011 [460], ενώ ή μετάβαση στην SPMS βασίστηκε στα κριτήρια που θεσπίστηκαν το 2016 από τον Lorscheider et al [461]. Κατά την αιμοληψία 30 (23.3%) ασθενείς δε λάμβαναν κάποια θεραπευτική αγωγή. Ανάμεσα στους υπόλοιπους ασθενείς, 33 (25.6%) λάμβαναν ιντερφερόνη β (συμπεριλαμβανομένων 19 σε ιντερφερόνη β-1α και 14 σε ιντερφερόνη β-1β), 23 (17.8%) λάμβαναν ναταλιζουμάμπη/Tysabri, 20 (15.5%) λάμβαναν φινγκολιμόδη/Gilenya, 5 (3.9%) λάμβαναν οξική γλατιραμέρη/Coraxone, 5 (3.9%) λάμβαναν τεριφλουνομίδη/Aubagio και 2 (1.6%) λάμβαναν μιτοξαντρόνη. Όλοι οι ασθενείς παρακολουθούνταν σε τακτική βάση στην Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική (Διευθυντές Καθηγητής Γεώργιος Χατζηγεωργίου και Αναπληρωτής Καθηγητής Ευθύμιος Δαρδιώτης) στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

Ως υγιή δείγματα ελέγχου (healthy controls, HC) χρησιμοποιήθηκε ολικό περιφερικό αίμα από 48 υγιείς μάρτυρες (31 γυναίκες, 64.6%· διάμεση ηλικία 46.6 έτη, εύρος ηλικίας 16-74). Ο Πίνακας 4.1 παρουσιάζει τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των υγείων μαρτύρων. Οι υγιείς μάρτυρες ήταν μέλη του προσωπικού του Εργαστηρίου και της Κλινικής Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, καθώς και συνοδοί ασθενών. Κανένας υγιής μάρτυρας δεν είχε οικογενειακό ιστορικό αυτοάνοσης νόσου, ούτε άλλη συννοσηρότητα ή χρόνια νόσο, όπως καρκίνο, αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη ή χρόνια καρδιαγγειακή νόσο.

Όλοι οι ασθενείς και οι υγιείς μάρτυρες ήταν Λευκοί Καυκάσιοι. Όλα τα δείγματα ολικού περιφερικού αίματος διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση σε φικόλη και τα παράγωγα του αίματος αποθηκεύτηκαν κατάλληλα στους -20°C (Ενότητα 2.2.1).

4.2.2.2 Ανίχνευση IgG αντι-Hp αντισωμάτων με ELISA

Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ELISA «Anti-Helicobacter pylori ELISA (IgG)» της Euroimmun AG (Γερμανία), η οποία χρησιμοποιεί ως αντιγονική πηγή πρωτεϊνικό εκχύλισμα του στελέχους Lior 1 (Brussels) του Hp. Το πειραματικό πρωτόκολλο της ELISA παρουσιάζεται στην Ενότητα 2.2.2.

4.2.2.3 Ανίχνευση IgG αντι-Hsp60 Hp αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η χυμική απόκριση έναντι του αντιγόνου Hsp60 του Hp δοκιμάστηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western, με βάση προηγούμενες αναφορές της μεθόδου με μικρές τροποποιήσεις [476, 503, 504]. Μεμβρανώδεις ταινίες της δοκιμασίας (strips) στις οποίες είχε μεταφερθεί το ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένο πρωτεϊνικό εκχύλισμα του Hp χρησιμοποιήθηκε ως πηγή του Hsp60 (Euroimmun AG, Γερμανία). Με σκοπό της μείωση του θορύβου από τα υπόλοιπα αντιγόνα του εκχυλίσματος,

πραγματοποιήθηκαν πειράματα τιτλοδότησης τόσο του αντιγόνου όσο και του ορού, με σκοπό τον καθορισμό των βέλτιστων συγκεντρώσεων. Τα strips κόπηκαν στο αντίστοιχο ύψος του αντιγόνου Hsp60, το οποίο καθορίστηκε σύμφωνα με κατάλληλο μάρτυρα πρωτεϊνικού μοριακού βάρους, με ένα εσωτερικό control της κατασκευάστριας εταιρίας (Euroimmun AG, Γερμανία) και με ένα πολυκλωνικό anti-*Escherichia coli* GroEL αντίσωμα (1:40.000, Enzo Life Sciences) που αντιδρά διασταυρούμενα και με την Hp Hsp60 [504, 505], το οποίο και χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της Hp VacA (1:2.000, Abcam, Ηνωμένο Βασίλειο). Το υπόλοιπο πειραματικό πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western παρουσιάζεται στην Ενότητα 2.2.3.

Πίνακας 4.1: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των 129 ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), συμπεριλαμβάνοντας 102 με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και 27 με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS) και των 48 υγιών δειγμάτων ελέγχου (HC).

	MS (n=129)	RRMS (n=102)	SPMS (n=27)	HC (n=48)	p (MS vs HC)	p (RRMS vs SPMS)	p (RRMS vs HC)	p (SPMS vs HC)
Φύλο								
Γυναίκες	91 (70.5%)	70 (68.6%)	21 (77.8%)	31 (64.6%)	ns	ns	ns	ns
Αντρες	38 (29.5%)	32 (31.4%)	6 (22.2%)	17 (35.4%)				
Ηλικία	42.4 ± 11.7	39.2 ± 9.8	54.8 ± 9.9	46.6 ± 14.3	ns	<0.001 [‡]	<0.001 [‡]	0.009
Ηλικία εμφάνισης νόσου	31.2 ± 10.2	29.2 ± 9	38.9 ± 11	N/A	N/A	<0.001 [‡]	N/A	N/A
Διάρκεια νόσου	11.2 ± 7.2	10 ± 6	16 ± 9.3	N/A	N/A	0.004 [‡]	N/A	N/A
EDSS	3.3 ± 2.1	2.8 ± 1.9	5.1 ± 1.6	N/A	N/A	<0.001 [‡]	N/A	N/A
Εξάρσεις	5.1 ± 3.6	5.44 ± 3.7	3.9 ± 2.9	N/A	N/A	0.024 [‡]	N/A	N/A
Progression Index	0.42 ± 0.56	0.38 ± 0.41	0.55 ± 0.92	N/A	N/A	ns	N/A	N/A
Αντι-Ηρ θετικότητα	55 (42.6%)	41 (40.2%)	14 (51.8%)	21 (43.8%)	ns	ns	ns	ns
Αντι-Ηρ τίτλοι (RU/ml) στις αντι-Ηρ+ περιπτώσεις	131 ± 87.1	131.4 ± 91.5	129.7 ± 76	94.1 ± 58.8	0.038 [‡]	ns	0.057	ns

Τα δεδομένα του φύλλου και της αντι-Ηρ θετικότητας αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Τα δεδομένα της ηλικίας, της ηλικίας εμφάνισης νόσου, της διάρκειας νόσου, του EDSS, των εξάρσεων και το Progression Index αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean ± standard deviation). [‡] Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα (p<0.1). Συντομεύσεις: EDSS, extended disability status scale· Ηρ, Helicobacter pylori· N/A, not available· ns, not significant· RU/ml, relative units/milliliter.

4.2.2.4 Ανίχνευση IgG αντι-CagA και αντι-VacA αντισωμάτων με γραμμική ανοσοαποτύπωση

Οι πρωτεΐνες CagA και VacA είναι κύριοι παράγοντες λοιμογονικότητας του Hρ και ιδιαίτερα ανοσοεπικρατή αντιγόνα για αντι-Hρ αντισώματα. Επειδή η έκφραση τους στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα που χρησιμοποιείται στη δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης κατά Western είναι ανεπαρκής [466-470], παρακωλύοντας την αποτελεσματική ανίχνευση από αντισώματα, η ανίχνευση των αντισωμάτων εναντίον τους έγινε με τη μέθοδο της γραμμικής ανοσοαποτύπωσης. Για το σκοπό αυτό, ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες CagA και VacA μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, οι οποίες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στην άκρη των strips της δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης κατά Western της Euroimmun AG (Γερμανία). Το πειραματικό πρωτόκολλο της ανίχνευσης των αντι-CagA και αντι-VacA αντισωμάτων με τη μέθοδο της γραμμικής ανοσοαποτύπωσης είναι το ίδιο με το πειραματικό πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western και παρουσιάζεται στην Ενότητα 2.2.3.

4.2.2.5 Κλινικές συσχετίσεις

Τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του Hρ αναλύθηκαν για πιθανές συσχετίσεις με κλινικά χαρακτηριστικά της MS χρησιμοποιώντας το γραμμικό συντελεστή R του Pearson (Pearson's correlation R). Τα κλινικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ήταν η ηλικία εμφάνισης της νόσου, η διάρκεια της νόσου, η EDSS, οι εξάρσεις της νόσου και ο δείκτης εξέλιξης της νόσου ή progression index, δείκτης που αποτελεί το πηλίκο του λόγου της EDSS προς τη διάρκεια της νόσου.

4.2.2.6 Ανίχνευση διασταυρούμενων αντιδράσεων με τα IgG αντι-Hp Hsp60 αντισώματα

Λαμβάνοντας υπόψιν αναφορές διασταυρούμενης αντιδραστικότητας μεταξύ των αντι-Hsp60 αντισωμάτων και αντισωμάτων έναντι της C αντιδρώσας πρωτεΐνης (C-reactive protein, CRP) [506], χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ELISA «ELISA Kit for C Reactive Protein» (Cloud Clone Corporation, Κίνα) με σκοπό την εκτίμηση της σχέσης με τα αντι-Hp Hsp60 αντισώματα στους ασθενείς με MS. Το πειραματικό πρωτόκολλο της ELISA παρουσιάζεται στην Ενότητα 2.2.2.

Επίσης, για την εκτίμηση της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας των αντι-Hp Hsp60 αντισωμάτων με αντισώματα έναντι άλλων μικροβιακών Hsp60, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ELISA «anti-Chlamydia trachomatis Hsp60 ELISA» (Medac GmbH, Γερμανία). Το πειραματικό πρωτόκολλο έχει περιγραφεί από τους Δαπόντε και συνεργάτες [507].

4.2.2.7 Στατιστική ανάλυση

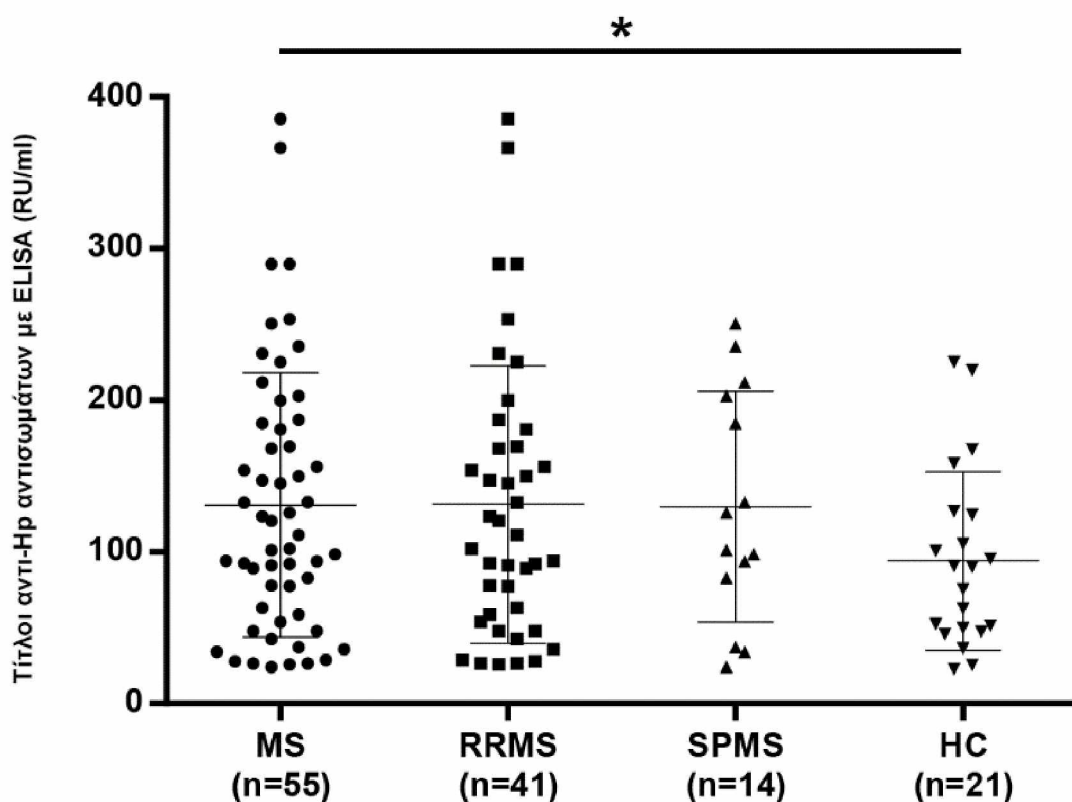
Όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα 2.2.6.

4.3 Αποτελέσματα

Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.1, ανάμεσα στους 129 ασθενείς με MS, οι 55 (42.6%) ήταν θετικοί για αντι-Hp αντισώματα, συμπεριλαμβάνοντας 41 ασθενείς με RRMS (40.2% από τους MS) και 14 ασθενείς με SPMS (51.8% από τους MS), χωρίς η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Από τους 48 υγιείς μάρτυρες, οι 21 ήταν θετικοί για αντι-Hp αντισώματα (43.8%), συχνότητα στατιστικά συγκρίσιμη με αυτή της MS. Όμως, οι τίτλοι των αντι-Hp αντισωμάτων, όπως αυτοί μετρήθηκαν με ELISA (Εικόνα 4.1), ήταν υψηλότεροι στους αντι-Hp+ ασθενείς με MS συγκριτικά με τους αντι-

Hr+ υγιείς μάρτυρες (131 ± 87.1 έναντι 93.3 ± 57.8 RU/ml, $p=0.037$). Οι τίτλοι των αντι-Hr αντισωμάτων δε διέφεραν ανάμεσα σε αντι-Hr+ ασθενείς με RRMS και SPMS. Επίσης, οι αντι-Hr+ ασθενείς με MS ήταν μεγαλύτεροι σε ηλικία και εμφάνισαν τη νόσο σε μεγαλύτερη ηλικία σε σύγκριση με τους αντι-Hr- ασθενείς.

Εικόνα 4.1: Διάγραμμα διασποράς που απεικονίζει τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι του Hr με ELISA



Διάγραμμα διασποράς που απεικονίζει τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι του Hr με ELISA σε αντι-Hr+ ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), συμπεριλαμβανομένων ασθενών με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS), και αντι-Hr+ υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Οι γραμμές αναπαριστούν το μέσο όρο με την τυπική απόκλιση. * $p < 0.05$. Συντομεύσεις: Hr, *Helicobacter pylori* RU/ml, relative units/milliliter.

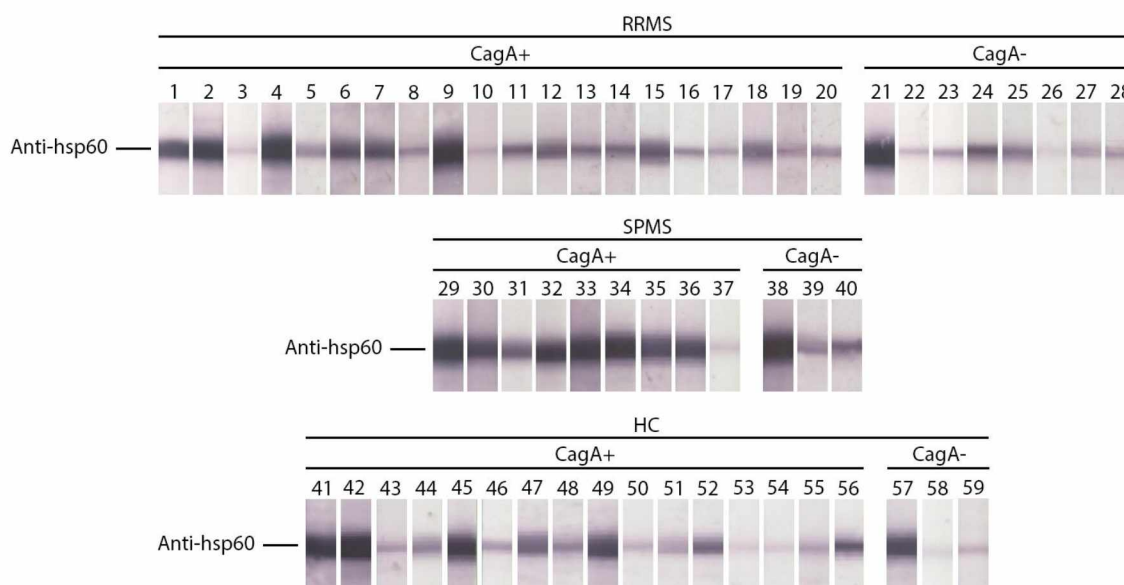
Τα αντι-CagA αντισώματα (MS: 39/55, 71% έναντι HC: 18/21, 58.7%, p =μη σημαντικό) και τα αντι-VacA αντισώματα (MS: 15/55, 27.3% έναντι HC: 2/21, 9.5%, p =μη σημαντικό) δε διέφεραν ανάμεσα σε αντι-Hp+ ασθενείς με MS και υγιείς μάρτυρες (MS: 39/55, 71% έναντι HC: 18/21, 58.7%, p =μη σημαντικό).

Η Εικόνα 4.2 απεικονίζει τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τα αντι-Hsp60 αντισώματα από αντιπροσωπευτικά δείγματα ασθενών με RRMS και SPMS και υγιών μαρτύρων ταξινομημένων ανάλογα με τη θετικότητα για αντι-CagA αντισώματα. Η Εικόνα 4.3 απεικονίζει τους τίτλους των αντι-Hsp60 αντισωμάτων. Όλοι οι αντι-Hp+ ασθενείς με MS είχαν αντισώματα έναντι της Hsp60 (55/55, 100%), σε σύγκριση με τους 19 (90.5%) αντι-Hp+ υγιείς μάρτυρες ($p=0.074$).

Τα επίπεδα των αντι-Hsp60 αντισωμάτων, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με ανοσοαποτύπωση, είχαν θετική συσχέτιση με τα αντι-Hp αντισώματα, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με ELISA (Pearson's $r=0.465$, $p<0.001$, Εικόνα 4.4). Από τους 55 αντι-Hp+ ασθενείς με MS, οι 39 (70.9%) ήταν θετικοί για αντι-CagA αντισώματα (28 με RRMS, 71.8% και 11 με SPMS, 28.2%), ενώ 15 (27.3%) ήταν θετικοί για αντι-VacA αντισώματα (8 με RRMS, 53.3% και 7 με SPMS, 46.7%). Ανάμεσα τους υπήρχαν 14 ασθενείς (25.5%) με διπλή αντιδραστικότητα για τα CagA και VacA, ενώ 40 ασθενείς (72.7%) ήταν θετικοί είτε για το αντι-CagA ή για το αντι-VacA αντίσωμα. Δεν υπήρχε συσχέτιση ανάμεσα στους τίτλους των αντι-Hp αντισωμάτων και στους τίτλους των αντι-CagA αντισωμάτων (Pearson's $r=-0.004$, p =μη σημαντικό) και η απουσία της συσχέτισης παρέμεινε όταν η συσχέτιση αναλύθηκε μονάχα στους 14 αντι-CagA+/αντι-VacA+ ασθενείς με MS (Pearson's $r=-0.348$, p =μη σημαντικό). Οι τίτλοι των αντι-Hp αντισωμάτων είχαν την τάση να σχετίζονται θετικά με τους τίτλους των αντι-VacA αντισωμάτων (Pearson's $r=0.504$, $p=0.056$).

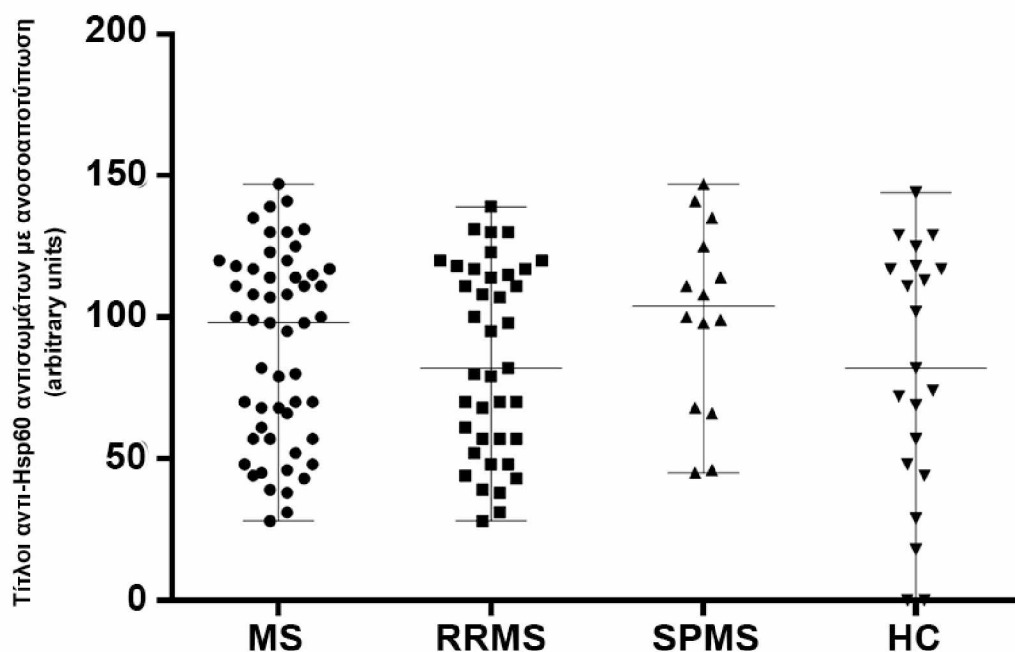
Τα επίπεδα των αντι-Hsp60 αντισωμάτων ήταν 89.2 ± 33.7 στους ασθενείς με MS, 85.3 ± 33.4 σε ασθενείς με RRMS και 100 ± 33.1 σε ασθενείς με SPMS. Η διαφορά στους τίτλους ανάμεσα σε RRMS και SPMS δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Στους υγιείς μάρτυρες, τα επίπεδα ήταν 75.3 ± 47.2 και δε διέφεραν με αυτά των ασθενών με MS, RRMS και SPMS.

Εικόνα 4.2: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για αντισώματα έναντι της Hsp60 του Hp



Αντιπροσωπευτικά δείγματα ασθενών με υποτροπιάζουσα διαλείπουσα κατά πλάκας σκλήρυνση (RRMS) και δευτερογενώς προϊούσα κατά πλάκας σκλήρυνση (SPMS) και υγιών μαρτύρων ταξινομημένων ανάλογα με την αντι-CagA θετικότητα. Συντομεύσεις: CagA, protein from cytotoxin-associated gene A; Hsp60, heat shock protein 60.

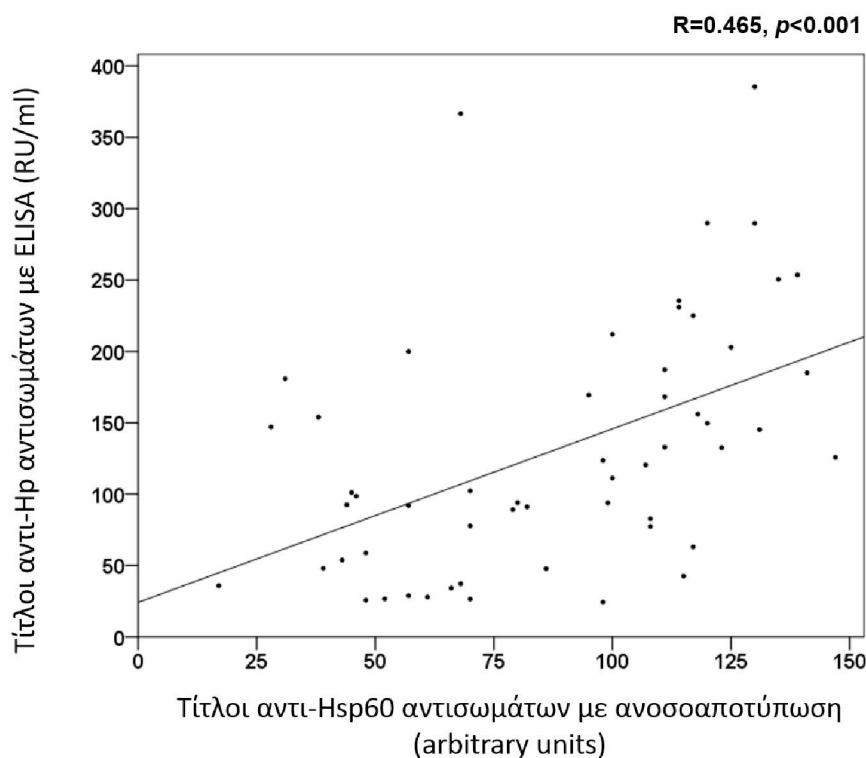
Εικόνα 4.3: Διάγραμμα διασποράς που απεικονίζει τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι της Hsp60 του H_p



55 αντι-H_p+ ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), ανάμεσα τους 41 με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και 14 με δευτερογενή προϊούσα MS (MS), και 21 αντι-H_p+ υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Οι γραμμές αναπαριστούν τη διάμεσο με το εύρος των τιμών. Συντόμευση: Hsp60, heat shock protein 60

Όταν οι αντι-H_p+ ασθενείς με MS ταξινομήθηκαν με βάση το επίπεδο της θετικότητας τους σε θετικούς (21-25 arbitrary units), μετρίως θετικούς (26-50 arbitrary units) και υψηλά θετικούς (>50 arbitrary units), προέκυψαν 2 (3.6%) θετικοί, 10 (18.2%) μετρίως θετικοί και 43 (78.2%) υψηλά θετικοί. Οι συχνότητες των θετικών, μετρίως θετικών και υψηλά θετικών ασθενών με RRMS και SPMS δε διέφερε.

Εικόνα 4.4: Διάγραμμα διασποράς που απεικονίζει τη συσχέτιση μεταξύ των τίτλων των αντι-Hp αντισωμάτων με ELISA με τους τίτλους των αντι-Hsp60 αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση σε 55 αντι-Hp+ ασθενείς με MS.



Συνοτμεύσεις: Hp, Helicobacter pylori · Hsp60, heat shock protein 60 · RU/ml, relative units/milliliter.

Από την ανάλυση πιθανών κλινικών συσχετίσεων των τίτλων των αντι-Hp αντισωμάτων, δεν προέκυψε καμία αναλογία με τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με MS. Οι τίτλοι των αντι-Hsp60 αντισωμάτων είχαν θετική συσχέτιση με την ηλικία των ασθενών (Pearson's $r=0.337$, $p=0.014$) και είχαν την τάση να είναι ανάλογα με την ηλικία εμφάνισης της νόσου (Pearson's $r=0.252$, $p=0.068$).

Για την εκτίμηση της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας ανάμεσα στην Hsp60 του Hp και άλλων βακτηριακών Hsp60, δεδομένης της μεγάλης ομολογίας μεταξύ αυτών, 12

δείγματα αντι-Hsp60+ ασθενών με MS και 6 δείγματα αντι-Hsp60+ υγιών μαρτύρων εξετάστηκαν με ELISA για αντισώματα έναντι της Hsp60 του *Chlamydia trachomatis*. Και τα 18 δείγματα αντέδρασαν με τη χλαμυδιακή Hsp60. Επίσης, αντι-Hr+ δείγματα ασθενών και μαρτύρων εξετάστηκαν για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με τη CRP με ELISA. Από τα 26 δείγματα ασθενών με MS τα 23 (88.5%) ήταν θετικά για αντι-CRP αντισώματα, ενώ κατά 6 δείγματα υγιών μαρτύρων που εξετάστηκαν ήταν θετικά. Αντίστοιχα, όταν εξετάστηκαν αντι-Hr- δείγματα ασθενών και μαρτύρων, μόνο το 1 από τα 12 δείγματα (8.3%) ήταν θετικό για αντι-CRP αντισώματα και κανένα από τα 6 δείγματα υγιών μαρτύρων.

4.4 Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη περιγράφει με λεπτομέρεια τη χυμική ανοσολογική απόκριση έναντι της Hsp60 του Hr σε ασθενείς με MS. Τα αποτελέσματα της μελέτης αποδεικνύουν την ευρέως διαδεδομένη παρουσία των αντισωμάτων αυτών σε αντι-Hr+ ασθενείς με MS, ανεξάρτητα από τον κλινικό φαινότυπο τους. Η καθολική παρουσία των αντι-Hsp60 αντισωμάτων στους ασθενείς με MS αρχικά δίνει την εντύπωση ότι αυτά έχουν έναν εξέχων ρόλο στην ανοσοπαθογένεια της νόσου, ιδιαίτερα στους ασθενείς με SPMS, στους οποίους και οι τίτλοι των αντισωμάτων αυτών ήταν αυξημένοι. Ωστόσο η συγκρίσιμη παρουσία των αντισωμάτων αυτών και στους υγιείς μάρτυρες δεν υποστηρίζει την παραπάνω υπόθεση.

Κατά το παρελθόν έχουν αναφερθεί αυξημένοι τίτλοι αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών Hsp σε ασθενείς με αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα σε σχέση με υγιείς μάρτυρες [494]. Επίσης, αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν εκτενώς μελετήσει τις χυμικές αποκρίσεις έναντι Hsp σε διάφορες ανοσομεσολαβούμενες ασθένειες, όπως η αρτηριοσκλήρυνση, η νόσος του Grave, η σαρκοείδωση, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1, η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, ο συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος, η

ρευματοειδής αρθρίτιδα και η συστηματική σκλήρυνση [487, 493, 494]. Αυξημένοι τίτλοι αντι-μυκοβακτηριδιακής Hsp65 αντισωμάτων έχουν αναφερθεί στο συστηματικό ερυθματώδη λύκο και στη ρευματοειδή αρθρίτιδα σε σύγκριση με παθολογικά δείγματα ελέγχου [484], αλλά το αποτέλεσμα αυτό έχει αμφισβητηθεί [489, 490]. Τα επίπεδα των αντι-Hsp65 αντισωμάτων ήταν συγκρίσιμα μεταξύ ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο και παθολογικά δείγματα ελέγχου, αλλά ήταν αυξημένα σε ασθενείς με αρτηριοσκλήρυνση και σε ασθενείς με αγγειίτιδα [489]. Η ασυμφωνία ανάμεσα στις διαφορετικές μελέτες σχετικά με τη συχνότητα και τα επίπεδα των αντιμικροβιακών Hsp αντισωμάτων σε αυτοάνοσες νόσους θα μπορούσε να αποδοθεί στην έλλειψη τυποποιημένων μεθόδων ανίχνευσης και μελέτης αντισωμάτων [487, 490].

Εκτός από χυμικές αποκρίσεις, η ύπαρξη κυτταρικών ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι μικροβιακών και ανθρώπινων Hsp έχει αποδειχθεί σε αυτοάνοσα νοσήματα [485], υποστηρίζοντας έναν πιθανό ρόλο των ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι των πρωτεϊνών αυτών στην αυτοανοσία. Εξάλλου, σημαντικό στην υπόθεση αυτή είναι η ικανότητα των Hsp να επάγουν αμυντικούς μηχανισμούς της έμφυτης ανοσίας οι οποίοι στη συνέχεια προκαλούν ενδογενή ιστική βλάβη [491, 508].

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, προσδιορίστηκαν η συχνότητα και τα επίπεδα των αντι-ελικοβακτηριδιακών Hsp60 αντισωμάτων σε ασθενείς με MS, καθώς επίσης εξετάστηκαν διεξοδικά πιθανές διαφορές ανάμεσα στους δυο κύριους κλινικούς φαινοτύπους της νόσου, δηλαδή της RRMS και της SPMS. Η παρουσία των αντι-Hsp60 αντισωμάτων σε αντι-Hp+ ασθενείς με MS ήταν καθολική. Ακόμα, η αντιδραστικότητα για το αντιγόνο αυτό σχετιζόταν με αντισώματα έναντι της χλαμυδιακής ομόλογης πρωτεΐνης Hsp65, υποστηρίζοντας τη σημαντική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα που παρατηρείται ανάμεσα σε αντισώματα έναντι

Hsp διαφορετικών μικροβιακών ειδών. Επιβεβαιώθηκε επίσης η σχέση ανάμεσα σε αντι-μικροβιακή Hsp αντισώματα και σε αντι-CRP αντισώματα, λόγω διασταυρούμενης αντιδραστικότητας, όπως έχει αναφερθεί από τους Udvarnoki και συνεργάτες [506].

Τα αντισώματα έναντι της ελικοβακτηριδιακής Hsp60 ήταν ευθέως ανάλογα των αντι-Hp αντισωμάτων στους ασθενείς με MS. Αυτό σημαίνει ότι ένα σημαντικό κομμάτι της συνολικής αμυντικής αποκρίσεις του οργανισμού έναντι του Hp στρέφεται εναντίον της Hsp60. Άλλα ανοσοεπικρατή αντιγόνα του Hp και κύριοι παράγοντες λοιμογονικότητας κατά τη λοίμωξη από το βακτήριο αυτό είναι οι πρωτεΐνες CagA και VacA. Ενώ η εξέταση της σχέσης μεταξύ των αντι-Hsp60 και αντι-CagA αντισωμάτων δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, τα αντι-Hsp60 αντισώματα εμφάνισαν θετική συσχέτιση με τα αντισώματα έναντι της VacA. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σημαντικά, υπό το πρίσμα αναφορών ότι η πρωτεΐνη CagA του Hp μπορεί να αναστέλλει την έκφραση πρωτεϊνών Hsp σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα [509]. Τέτοιες μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηριακών και ανθρώπινων πρωτεϊνών, ιδιαίτερα με τη συμμετοχή ενός απορυθμισμένου ανοσοποιητικού συστήματος, έχουν ενοχοποιηθεί για την επαγωγή αυτοανοσίας [486, 510] και θα μπορούσαν να παίζουν σημαντικό ρόλο και στην παθογένεια της MS.

Σχετικά με τις κλινικές συσχετίσεις των αντι-Hsp60 αντισωμάτων που πραγματοποιήθηκαν, η μόνη στατιστικά σημαντική σχέση που προέκυψε κατά την ανάλυση ήταν αυτή μεταξύ των τίτλων των αντι-Hsp60 αντισωμάτων και της ηλικίας των ασθενών. Μια πιθανή εξήγηση, η οποία συζητήθηκε και στο Κεφάλαιο 3 (Ενότητα 3.4) είναι ότι οι ανοσολογικές αντιδράσεις για το Hp αυξάνουν ποιοτικά και ποσοτικά με την αύξηση της ηλικίας, φτάνοντας σε αποκορύφωση σε άτομα ηλικίας 65 ετών [355], πιθανώς επηρεάζοντας και τις ανοσοειδικές αντιδράσεις. Ιδανικά, μια προοπτική μελέτη πασχόντων-μαρτύρων που θα αξιολογούσε τα αντισώματα έναντι αντιγόνων

του H_r σε βάθος χρόνου θα έδινε την απάντηση στο ερώτημα αυτό. Καμία συσχέτιση δεν προέκυψε με κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου, όπως η διάρκεια της νόσου, η EDSS και ο αριθμός των εξάρσεων, αποτέλεσμα που μειώνει τη σημασία των αντι-Hsp60 αντισωμάτων ως προγνωστικός δείκτης τη MS.

Αν και αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τη συχνότητα των αντι-H_r αντισωμάτων σε ασθενείς με MS [361, 364, 365, 367, 371, 379, 511, 512], η παρούσα ανάλυση δεν κατάφερε να αναδείξει διαφορά ανάμεσα σε ασθενείς με MS και υγιείς μάρτυρες. Ακόμα, δεν υπήρχε καμία διαφορά στα αντισώματα έναντι της Hsp60 του H_r ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες, όπου και στις δύο ομάδες η παρουσία των αντισωμάτων αυτών ήταν καθολική ή σχεδόν καθολική. Συνεπώς, τα αντι-Hsp60 αντισώματα είναι απίθανο να παίζουν κάποιο παθογενετικό ρόλο στην MS.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Αντιγονοειδικά αντισώματα έναντι του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* στη συστηματική σκλήρυνση

5.1 Εισαγωγή

Η συστηματική σκλήρυνση (systemic sclerosis, SSc) είναι ένα αυτοάνοσο νόσημα για την αιτιολογία και την παθογένεια του οποίου ελάχιστα είναι γνωστά [172, 430, 513-515]. Ένα από τα πιθανά ερεθίσματα που επάγουν τη νόσο και έχουν μελετηθεί είναι το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* (*Helicobacter pylori*, Hp), για το οποίο μια πληθώρα επιδημιολογικών και ορολογικών μελετών υποστηρίζουν τη συμμετοχή του στην παθογένεια της συστηματικής σκλήρυνσης [380, 446, 450-452, 454, 455, 516-520].

Ανάμεσα στις παραπάνω μελέτες βρίσκεται μια μετα-ανάλυση οχτώ επιδημιολογικών μελετών, η οποία συγκέντρωσε και ανέλυσε τη συχνότητα της μόλυνσης από το Hp σε περίπου 1500 ασθενείς με SS [454]. Η ανάλυση έδειξε ότι οι ασθενείς με SSc είναι δύο φορές πιο πιθανό να έχουν ιστορικό μόλυνσης από το Hp σε σύγκριση με υγιή άτομα. Όταν υπο-αναλύθηκε σε πέντε επιμέρους μελέτες η παρουσία αντι-Hp αντισωμάτων, όπως αυτά ανιχνεύθηκαν με ELISA, βρέθηκε ότι οι ασθενείς με SSc ήταν δύομιση φορές πιο πιθανό να είναι αντι-Hp θετικοί σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες.

Προς υπεράσπιση των παραπάνω αποτελεσμάτων, η εκρίζωση του Hp με τριπλή θεραπεία αμοξυκιλλίνης, κλαριθρομυκίνης και λανσοπραζόλης εξαφάνισε ή μείωσε σημαντικά επεισόδια του φαινομένου Raynaud σε ασθενείς [456, 457]. Επίσης, σε ασθενείς όπου το Hp δεν εκριζώθηκε, ακόμα και μετά από τριπλή φαρμακευτική θεραπεία, η συχνότητα και η διάρκεια των επεισοδίων του φαινομένου Raynaud δε βελτιώθηκαν. Το φαινόμενο Raynaud είναι μια αγγειοσυσπαστική διαταραχή που εμφανίζεται ως σύμπτωμα σε σχεδόν όλους του ασθενείς με SSc, πολύ συχνά ως η

πρώτη κλινική εκδήλωση της νόσου [521]. Η ελάττωση των αγγειοδραστικών ουσιών έπειτα από την εκκρίωση του βακτηρίου που οδηγεί σε ύφεση του φαινομένου ενισχύει τη συμμετοχή του Ηρ σε μηχανισμούς εμφάνισης της νόσου. Εντούτοις, η υπόθεση αυτή έχει αμφισβητηθεί από μελέτες που ανέφεραν απουσία σχέσης ανάμεσα στο Ηρ και στο φαινόμενο Raynaud ή την SSc [448, 458, 459].

Τα αντιγόνα του Ηρ που αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα είναι συγκεκριμένα και γνωστά [476, 522-526], όπως οι πρωτεΐνες CagA και VacA. Οι ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι των δύο αυτών ανοσοεπικρατών αντιγόνων έχουν μελετηθεί στην πολλαπλή σκλήρυνση στα πλαίσια της παρούσας διατριβής στο Κεφάλαιο 3, καθώς και σε άλλα αυτοάνοσα και μη νοσήματα [466, 472, 473, 480]. Παρά τις αρκετές μελέτες της συνολικής αντι-Ηρ θετικότητας, καμία ερευνητική ομάδα δεν έχει αναφέρει την ανοσολογική απόκριση έναντι μεμονωμένων αντιγόνων του Ηρ. Η υπόθεση είναι ότι αν η αντι-Ηρ θετικότητα είναι αυξημένη σε ασθενείς με SSc σε σχέση με υγιείς μάρτυρες, τότε θα πρέπει κάποια αντιγονοειδικά Ηρ αντισώματα να εμφανίζονται αναλόγως πιο συχνά στους ασθενείς.

Για την αναγνώριση των ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι 15 ανοσογονικών αντιγόνων του Ηρ σε ασθενείς με SSc, έγινε μια συστηματική ανάλυση της συχνότητας και των επιπέδων των αντισωμάτων αυτών σε δείγματα από δύο ανεξάρτητες κοόρτες ασθενών με SSc και από υγιείς μάρτυρες αντίστοιχων δημογραφικών χαρακτηριστικών. Η ανίχνευση των αντισωμάτων έγινε με ανοσοαποτύπωση κατά Western, ενώ ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στις διαφορές της ανοσολογικής απόκρισης ανάμεσα στους δύο κλινικούς φαινοτύπους της SSc, δηλαδή στη διάχυτη δερματική SSc (diffuse cutaneous, dcSSc) και την περιορισμένη δερματική SSc (limited cutaneous, lcSSc). Εξετάστηκαν επίσης πιθανές συσχετίσεις των αντισωμάτων αυτών με κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών και με αντισώματα ειδικά για την SSc.

5.2 Υλικά και Μέθοδοι

5.2.1 Υλικά

Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα 2.1.

5.2.2 Μέθοδοι

5.2.2.1 Βιολογικό υλικό ασθενών και μαρτύρων

Δείγματα ολικού περιφερικού αίματος συλλέχθηκαν από 91 ασθενείς με SSc (74 γυναίκες, 81.3%· διάμεση ηλικία, 56 έτη· εύρος ηλικίας, 25-87 έτη), συμπεριλαμβάνοντας 41 ασθενείς με dcSSc (31 γυναίκες, 75.6%· διάμεση ηλικία, 50 έτη· εύρος ηλικίας, 25-79 έτη) και 50 ασθενείς με lcSSc (43 γυναίκες, 86%· διάμεση ηλικία, 60 έτη· εύρος ηλικίας, 35-87 έτη). Οι ασθενείς αυτοί αποτέλεσαν την πρώτη ομάδα ασθενών με SSc (Ομάδα 1) και παρακολουθούνταν σε τακτική βάση στην Πανεπιστημιακή Κλινική Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας (Διευθυντές Καθηγητής Λάζαρος Σακκάς και Δημήτριος Μπόγδανος) στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας. Τα κύρια δημογραφικά, κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1. Όλοι οι ασθενείς βρίσκονταν υπό συμβατική θεραπευτική αγωγή χαμηλής δόσης κορτικοστεροειδών φαρμακευτικών παραγόντων (<7.5 mg/ημέρα) μαζί με αζαθειοπρίνη ή μεθοτρεξάτη. Ασθενείς με πνευμονική ίνωση ή πνευμονική αρτηριακή υπέρταση λάμβαναν συμπληρωματική θεραπεία. Όλοι οι ασθενείς ήταν θετικοί για αντιπυρηνικά αντισώματα, όπως αυτά ανιχνεύθηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Η διάγνωση της νόσου βασίστηκε στα κριτήρια που θέσπισε το Αμερικανικό Κολλέγιο Ρευματολόγων [396].

Ως υγιή δείγματα ελέγχου (healthy controls, HC) χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος από 59 υγιείς μάρτυρες με αντίστοιχα δημογραφικά χαρακτηριστικά με τους ασθενείς (41 γυναίκες, 69.5%· διάμεση ηλικία, 56 έτη· εύρος ηλικίας, 20-73 έτη). Ο Πίνακας 5.1 παρουσιάζει τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των υγιών μαρτύρων. Οι υγιείς μάρτυρες ήταν μέλη του προσωπικού του Εργαστηρίου και της Κλινικής Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, καθώς και συνοδοί ασθενών. Κανένας υγιής μάρτυρας δεν είχε οικογενειακό ιστορικό αυτοάνοσης νόσου, ούτε άλλη συννοσηρότητα ή χρόνια νόσο, όπως καρκίνο, αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη ή χρόνια καρδιαγγειακή νόσο.

Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης της ανοσολογικής απόκρισης σε αντιγόνα του H_p, χρησιμοποιήθηκαν οροί από μια ανεξάρτητη ομάδα 35 ασθενών με SSc. Οι ασθενείς αυτοί αποτέλεσαν τη δεύτερη ομάδα ασθενών με SSc (Ομάδα 2) και παρακολουθούνταν σε τακτική βάση στο Ρευματολογικό Τμήμα της Πανεπιστημιακής Κλινικής Παθολογίας (Διευθυντής Καθηγητής Σταμάτιος Λιόσης) στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πάτρας. Οι ασθενείς είχαν δημογραφικά χαρακτηριστικά αντίστοιχα με τους ασθενείς της Ομάδας 1 (30 γυναίκες, 85.7%· διάμεση ηλικία, 56 έτη· εύρος ηλικίας, 20-84 έτη) και αποτελούνταν από 26 ασθενείς με dcSSc (22 γυναίκες, 84.6%· διάμεση ηλικία, 59 έτη· εύρος ηλικίας, 27-78 έτη) και 9 ασθενείς με lcSSc (8 γυναίκες, 88.9%· διάμεση ηλικία, 56 έτη· εύρος ηλικίας, 43-84 έτη).

Όλοι οι ασθενείς και οι μάρτυρες ήταν Λευκοί Καυκάσιοι. Όλα τα δείγματα ολικού περιφερικού αίματος της Ομάδας 1 και των υγιών μαρτύρων διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση σε φικόλη και τα παράγωγα του αίματος αποθηκεύτηκαν κατάλληλα στους -20°C (Ενότητα 2.2.1). Όλα τα δείγματα ορών της Ομάδας 2 απεστάλησαν από

την Πάτρα στη Λάρισα με συσκευασία ξηρού πάγου και αποθηκεύτηκαν κατάλληλα στους -20°C.

5.2.2.2 Ανίχνευση IgG αντι-CagA και αντι-VacA αντισωμάτων με γραμμική ανοσοαποτύπωση

Οι πρωτεΐνες CagA και VacA είναι κύριοι παράγοντες λοιμογονικότητας του H_p και ιδιαίτερα ανοσοεπικρατή αντιγόνα για αντι-H_p αντισώματα. Επειδή η έκφραση τους στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα που χρησιμοποιείται στη δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης κατά Western είναι ανεπαρκής [466-470], παρακωλύοντας την αποτελεσματική ανίχνευση από αντισώματα, η ανίχνευση των αντισωμάτων εναντίον τους έγινε με τη μέθοδο της γραμμικής ανοσοαποτύπωσης. Για το σκοπό αυτό, ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες CagA και VacA μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, οι οποίες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στην άκρη των strips της δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης κατά Western της Euroimmun AG (Γερμανία). Το πειραματικό πρωτόκολλο της ανίχνευσης των αντι-CagA και αντι-VacA αντισωμάτων με τη μέθοδο της γραμμικής ανοσοαποτύπωσης είναι το ίδιο με το πειραματικό πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western και παρουσιάζεται στην Ενότητα 2.2.3.

5.2.2.3 Ανίχνευση IgG αντιγονοειδικών H_p αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ELISA «Antibodies against Helicobacter pylori (IgG) EUROLINE-WB» της Euroimmun AG (Γερμανία), η οποία χρησιμοποιεί ως αντιγονική πηγή πρωτεϊνικό εκχύλισμα του στελέχους ATCC 43504 του H_p [466, 467]. Όλα τα αντι-H_p+ δείγματα ασθενών και μαρτύρων εξετάστηκαν για την ύπαρξη αντιδραστικών αντισωμάτων έναντι 13 πρωτεϊνών-αντιγόνων του H_p: p75, p67-FSH, p66-UreB, p57, p54, p50, p41, p33, p30-OMP, p29-UreA, p26, p19-OMP και p17. Το πειραματικό

πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western παρουσιάζεται στην Ενότητα
2.2.3.

Πίνακας 5.1: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των 91 ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (SSc) της Ομάδας 1 και των 59 υγείων δειγμάτων ελέγχου (HC).

Χαρακτηριστικό	SSc (n=91)	HC (n=48)	p (SSc vs HC)
Φύλο			
Γυναίκες	74 (81.3%)	41 (69.5%)	ns
Άντρες	17 (18.7%)	18 (30.5%)	
Ηλικία	55.9 ± 12.9	52.8 ± 12.7	ns
Πνευμονική ίνωση	29 (21.9%)	N/A	N/A
Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση	15 (16.5%)	N/A	N/A
Δακτυλικά έλκη	38 (41.8%)	N/A	N/A
Συμμετοχή ΓΕΣ	54 (60%)	N/A	N/A
Αρθρίτιδα	17 (18.7%)	N/A	N/A
Ορογονίτιδα	5 (5.5%)	N/A	N/A
Τελαγγειεκτασίες	60 (65.9%)	N/A	N/A
Δερματική ασβέστωση	14 (15.4%)	N/A	N/A
Νεφρική συμμετοχή	2 (2.2%)	N/A	N/A
Συννοσηρότητα	6 (6.6%)	N/A	N/A
αντι-Scl-70 θετικότητα	38 (41.8%)	N/A	N/A
αντι-CENPA θετικότητα	26 (28.6%)	N/A	N/A
αντι-CENPB θετικότητα	26 (28.6%)	N/A	N/A
αντι-RNAρο11 θετικότητα	9 (9.9%)	N/A	N/A
αντι-RNAρο155 θετικότητα	11 (12.1%)	N/A	N/A
αντι-RNAρο1 θετικότητα (και/ή)	29 (21.9%)	N/A	N/A
Αντι-Hp θετικότητα	61 (67%)	45 (76.3%)	ns

Τα δεδομένα του φύλλου, των κλινικών και των ανοσολογικών χαρακτηριστικών και της αντι-Hp θετικότητας αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Τα δεδομένα της ηλικίας αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean ± standard deviation). Συντομεύσεις: ΓΕΣ, γαστρεντερικός σωλήνας

CENPA, centromeric protein A · CENPB, centromeric protein B · Hp, Helicobacter pylori · N/A, not available · RNAPol, RNA polymerase ·

ScI-70, scleroderma 70.

5.2.2.4 Κλινικές συσχετίσεις

Τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του Hρ αναλύθηκαν για πιθανές συσχετίσεις με κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά της SSc. Τα κλινικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ήταν η παρουσία πνευμονικής ίνωσης, πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης, δακτυλικών ελκών, συμμετοχής του γαστρεντερικού σωλήνα, αρθρίτιδας, ορογονίτιδας, τελαγγεικτασιών, δερματικής ασβέστωσης, νεφρικής συμμετοχής και συννοσηρότητας, συμπεριλαμβανομένου καρκίνου ή άλλης αυτοάνοσης νόσου. Τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ήταν οι θετικότητες για αντι-Scl-70, για αντι-CENPA, για αντι-CENPB, για αντι-RNApol11 και για αντι-RNA pol155 αντισώματα.

5.2.2.5 Στατιστική ανάλυση

Όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα 2.2.6.

5.3 Αποτελέσματα

5.3.1 Συχνότητες IgG αντι-Hρ αντισωμάτων σε ασθενείς με SSc της Ομάδας 1

Η συνολική αντι-Hρ οροθετικότητα ανιχνεύτηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western σε 61 (67%) ασθενείς με SSc, ανάμεσα στους οποίους υπήρχαν 28 (66%) ασθενείς με dcSSc και 33 (66%), και σε 45 (76.3% υγιείς μάρτυρες (SSc έναντι HC, p =μη σημαντικό, dcSSc έναντι HC, p =μη σημαντικό, lcSSc έναντι HC, p =μη σημαντικό).

5.3.2 Συχνότητες IgG αντιγονοειδικών Hρ αντισωμάτων σε ασθενείς με SSc της Ομάδας 1

Η ανάλυση των χυμικών αποκρίσεων σε ξεχωριστά αντιγόνα του Hρ πραγματοποιήθηκε μονάχα στους αντι-Hρ+ ασθενείς και υγιείς μάρτυρες. Η Εικόνα 5.1 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western από 21

αντιπροσωπευτικά δείγματα (7 dcSSc, 7 lcSSc και 7 HC). Οι συχνότητες εμφάνισης των αντισωμάτων έναντι των ελικοβακτηριδιακών 15 αντιγόνων παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2. Και τα 15 αντιγόνα αναγνωρίζονταν σε διαφορετικές συχνότητες, με τα πιο ανοσοεπικρατή να είναι τα αντισώματα έναντι της p57 (96.7%), τα αντι-p66-UreB (91.8%), τα αντι-p120-CagA (72.1%), τα αντι-p29-UreA (65.5%) και τα αντι-p26 (55.7%). Η αντιδραστικότητα έναντι της p67 εμφανιζόταν λιγότερο συχνά στους ασθενείς σε σύγκριση με τους μάρτυρες (34.4% έναντι 60%, $p=0.016$). Τα αντι-p66-UreB αντισώματα εμφάνιζαν την τάση να είναι πιο συχνά στους ασθενείς με SSc σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (91.8% έναντι 80%, $p=0.076$), ενώ τα αντι-p33 αντισώματα την τάση για το αντίθετο (11.5% έναντι 24.4%, $p=0.079$). Οι συχνότητες των ανοσολογικών αποκρίσεων των υπόλοιπων 12 αντιγόνων δε διέφεραν μεταξύ ασθενών και υγιών.

Τα αντι-p67 αντισώματα εμφανιζόταν λιγότερο συχνά σε ασθενείς με dcSSc σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (28.6% έναντι 60%, $p=0.018$). Καμία διαφορά δεν εμφανίστηκε όταν έγινε η σύγκριση των συχνοτήτων εμφάνισης των 15 αντιγονοειδικών H_ρ αντισωμάτων μεταξύ ασθενών με dcSSc και lcSSc (Πίνακας 5.2).

Όταν υπολογίστηκε η μέση τιμή όλων των συχνοτήτων των αντιγονοειδικών αντισωμάτων, καμία διαφορά δεν προέκυψε ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες (Πίνακας 5.2).

5.3.3 Τίτλοι IgG αντιγονοειδικών H_ρ αντισωμάτων σε ασθενείς με SSc της Ομάδας 1

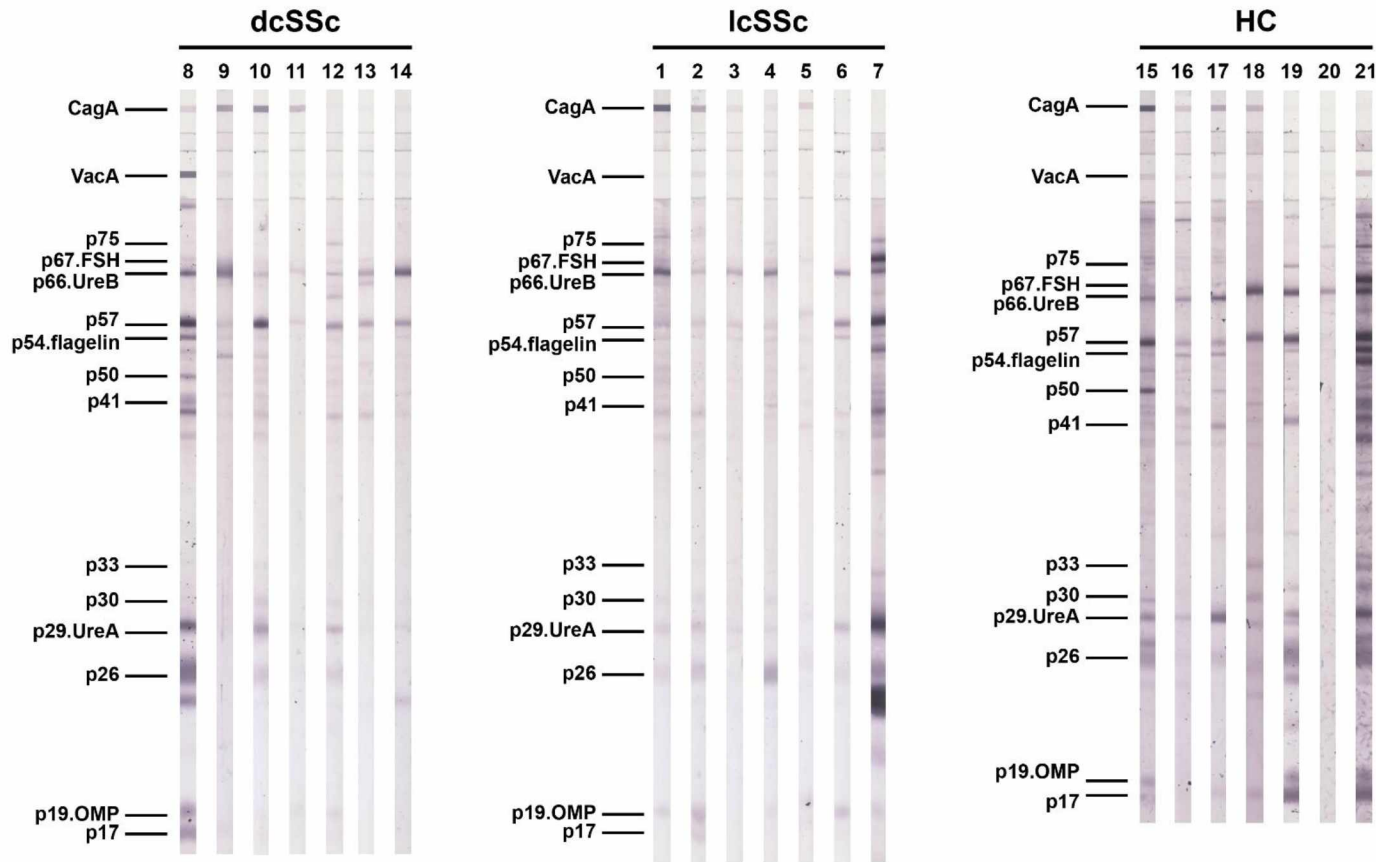
Ο Πίνακας 5.3 παρουσιάζει και η Εικόνα 5.2 απεικονίζει τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι των 15 αντιγόνων του H_ρ σε ασθενείς με SSc και σε υγιείς μάρτυρες, όπως ποσοτικοποιήθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Οι τίτλοι των αντι-p57 και των αντι-p33 αντισωμάτων ήταν χαμηλότεροι σε ασθενείς με SSc σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (αντι-p57: SSc, 69.1 ± 41.2 HC, 91.5 ± 39.1 SSc έναντι HC, $p=0.007$ αντι-p33: SSc, 33.7 ± 24.9 HC, 66.6 ± 35.8 SSc έναντι HC, $p=0.035$). οι τίτλοι των αντι-p67-FSH αντισωμάτων είχαν την τάση να είναι χαμηλότεροι σε ασθενείς με SSc σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (SSc, 29.2 ± 22.9 HC, 43.5 ± 31.2 SSc έναντι HC, $p=0.073$). Επίσης, οι τίτλοι των αντι-p33 αντισωμάτων ήταν χαμηλότεροι στους ασθενείς με dcSSc σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (dcSSc, 21.3 ± 5 HC, 66.6 ± 35.8 dcSSc έναντι HC, $p=0.024$) και οι τίτλοι των αντι-p57 αντισωμάτων είχαν την τάση να είναι χαμηλότεροι (dcSSc, 72.2 ± 42.9 HC, 91.5 ± 39.1 dcSSc έναντι HC, $p=0.062$). Όσον αφορά τους ασθενείς με lcSSc, οι τίτλοι των αντι-p57 αντισωμάτων ήταν χαμηλότεροι σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (lcSSc: 66.3 ± 40.2 HC: 91.5 ± 39.1 lcSSc έναντι HC, $p=0.010$).

Η σύγκριση των τίτλων των αντισωμάτων ανάμεσα στους δύο κλινικούς φαινοτύπους της SSc αποκάλυψε την τάση των τίτλων των αντι-p50 και των αντι-p17 αντισωμάτων να είναι πιο υψηλοί στους ασθενείς με dcSSc σε σχέση με τους lcSSc.

Η σύγκριση των μέσων τιμών των τίτλων των αντιγονοειδικών αντισωμάτων ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες, όταν μονάχα οι περιπτώσεις που ήταν θετικές για τα αντισώματα συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση, έδειξε ότι οι μέσοι τίτλοι των αντιγονοειδικών αντισωμάτων ήταν χαμηλότεροι στην SSc ή στους δύο φαινοτύπους (Πίνακας 5.3).

Εικόνα 5.1: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για αντισώματα έναντι 15 πρωτεϊνών-αντιγόνων του Hp



21 αντιπροσωπευτικά δείγματα, 7 από ασθενείς με διάχυτη δερματική συστηματική σκλήρυνση (dcSSc), 7 από ασθενείς με περιορισμένη δερματική συστηματική σκλήρυνση (lcSSc) και 7 από υγιή δείγματα ελέγχου (HC) Συνομηύσεις: CagA, protein from

cytotoxin-associated gene A · *FSH, flagellar sheath protein* · *OMP, outer membrane protein* · *UreA, urease A* · *UreB, urease B* · *VacA, vacuolating cytotoxin A*.

Πίνακας 5.2: Συχνότητες εμφάνισης αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του Hr σε ασθενείς και υγιή δείγματα ελέγχου

Αντιδρώσα ζώνη	SSc (n=61)	dcSSc (n=28)	lcSSc (n=33)	HC (n=45)	<i>p</i> SSc vs HC	<i>p</i> dcSSc vs lcSSc	<i>p</i> dcSSc vs HC	<i>p</i> lcSSc vs HC
p120-CagA	44 (72.1%)	18 (64.3%)	26 (78.8%)	37 (82.2%)	ns	ns	ns	ns
p95-VacA	8 (13.1%)	3 (10.7%)	5 (15.2%)	3 (6.7%)	ns	ns	ns	ns
p75	7 (11.5%)	1 (3.6%)	6 (18.2%)	4 (8.9%)	ns	ns	ns	ns
p67-FSH	21 (34.4%)	8 (28.6%)	13 (39.4%)	27 (60%)	0.016	ns	0.018	ns
p66-UreB	56 (91.8%)	26 (92.9%)	30 (90.9%)	36 (80%)	0.076	ns	ns	ns
p57	59 (96.7%)	28 (100%)	31 (93.9%)	41 (91.1%)	ns	ns	ns	ns
p54	26 (42.6%)	11 (39.3%)	15 (45.5%)	16 (35.6%)	ns	ns	ns	ns
p50	28 (45.9%)	14 (50%)	15 (42.2%)	25 (55.6%)	ns	ns	ns	ns
p41	29 (47.5%)	14 (50%)	15 (45.5%)	18 (40%)	ns	ns	ns	ns
p33	7 (11.5%)	3 (10.7%)	4 (12.1%)	11 (24.4%)	0.079	ns	ns	ns
p30-OMP	11 (18%)	6 (21.4%)	5 (15.2%)	9 (20%)	ns	ns	ns	ns
p29-UreA	40 (65.5%)	17 (60.7%)	23 (69.7%)	24 (53.3%)	ns	ns	ns	ns
p26	34 (55.7%)	14 (50%)	20 (60.6%)	25 (55.6%)	ns	ns	ns	ns
p19-OMP	15 (24.6%)	5 (17.9%)	10 (30.3%)	11 (24.4%)	ns	ns	ns	ns
p17	15 (24.6%)	7 (25%)	8 (24.2%)	11 (24.4%)	ns	ns	ns	ns
Mean \pm SD frequency of reactivities to all bands	43.7% \pm 28.1%	41.7% \pm 29.2%	45.4% \pm 27.7%	44.1% \pm 26.8%	ns*	ns*	ns*	ns*

61 αντι-Hr+ ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 28 με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 33 με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 45 αντι-Hr+ υγιή δείγματα ελέγχου (HC), όπως ανιχνεύθηκαν με από ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). * Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία *t* του Student (Student's *t*-test, two-tailed, equal variances not assumed). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με

έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντομεύσεις: CagA, protein from cytotoxin-associated gene A · FSH, flagellar sheath protein · ns, not significant · OMP, outer membrane protein · UreA, urease A · UreB, urease B · VacA, vacuolating cytotoxin A.

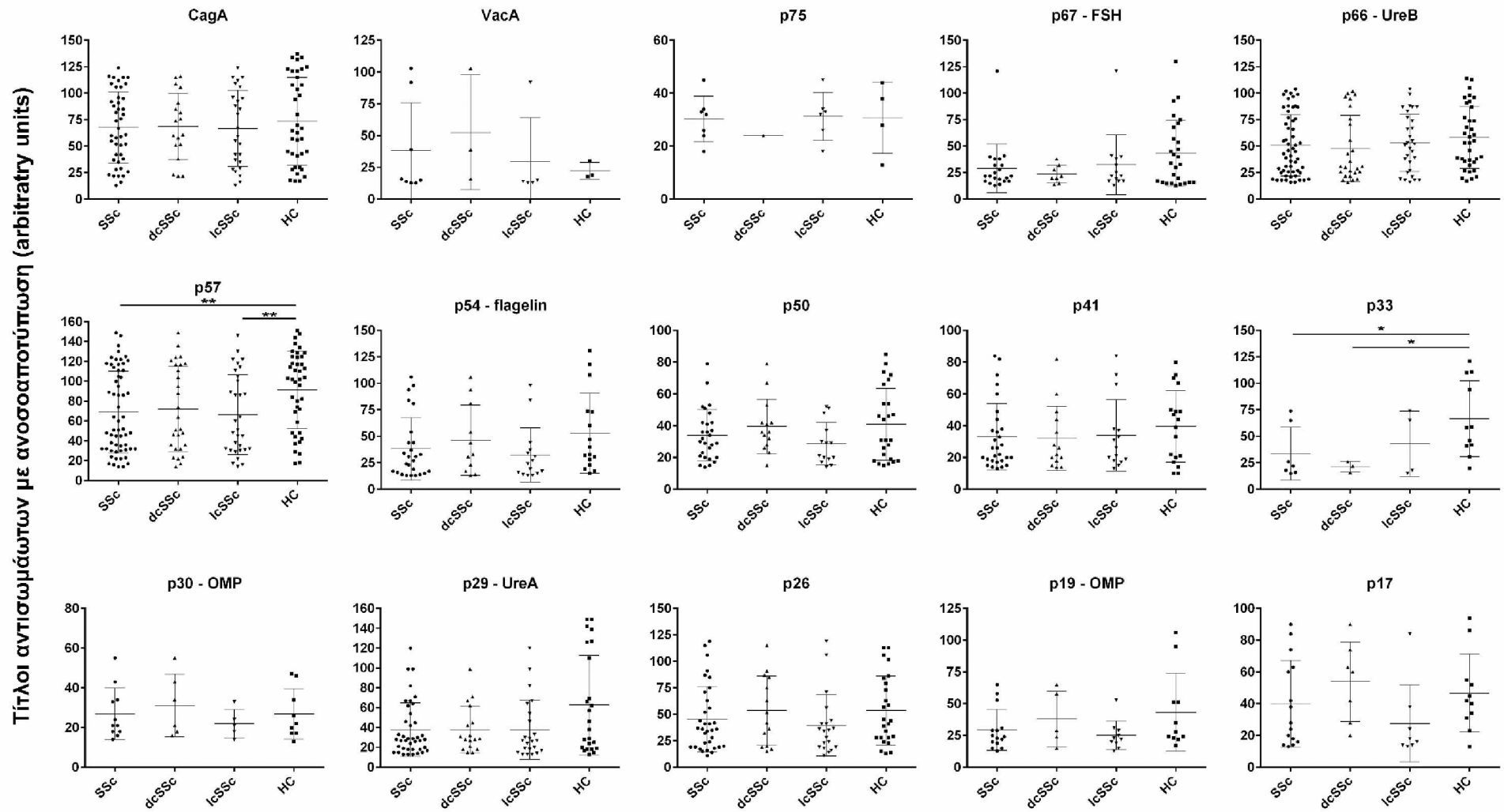
Πίνακας 5.3: Τίτλοι αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του Hρ σε αντι-Hρ+ ασθενείς και υγιή δείγματα ελέγχου

Αντιδρώσα ζώνη	SSc	dcSSc	lcSSc	HC	<i>p</i> SSc vs HC	<i>p</i> dcSSc vs lcSSc	<i>p</i> dcSSc vs HC	<i>p</i> lcSSc vs HC
p120-CagA	67.8 ± 33.7	68.9 ± 31.3	66.9 ± 35.9	73.6 ± 41.2	ns	ns	ns	ns
p95-VacA	38.1 ± 37.8	52.7 ± 45.1	29.4 ± 35	22.3 ± 6.7	ns	ns	ns	ns
p75	30.3 ± 8.7	24	31.3 ± 9	30.8 ± 13.5	ns	ns	ns	ns
p67-FSH	29.2 ± 22.9	23.6 ± 8.4	32.6 ± 28.2	43.5 ± 31.2	0.073	ns	ns	ns
p66-UreB	50.8 ± 28.9	48 ± 31.1	53.2 ± 27.2	58.1 ± 29.2	ns	ns	ns	ns
p57	69.1 ± 41.2	72.2 ± 42.9	66.3 ± 40.2	91.5 ± 39.1	0.007	ns	0.062	0.010
p54-flagelin	38.3 ± 29.4	46.4 ± 33.3	32.4 ± 25.8	53.1 ± 37.6	ns	ns	ns	0.084
p50	34.1 ± 16.1	39.6 ± 17.1	28.7 ± 13.4	41 ± 22.7	ns	0.074	ns	ns
p41	33 ± 21	32 ± 20.2	34 ± 22.4	39.7 ± 22.6	ns	ns	ns	ns
p33	33.7 ± 24.9	21.3 ± 5	43 ± 30.8	66.6 ± 35.8	0.035	ns	0.024	ns
p30-OMP	27 ± 12.9	31.2 ± 15.6	22 ± 7.2	26.9 ± 12.7	ns	ns	ns	ns
p29-UreA	38 ± 27	38.1 ± 23.6	37.8 ± 29.8	62.8 ± 50.3	ns	ns	ns	0.097
p26	45.3 ± 30.9	53.5 ± 32.7	39.6 ± 29.1	53.6 ± 32.5	ns	ns	ns	ns
p19-OMP	29.4 ± 16.2	38.2 ± 22	25 ± 11.3	43.3 ± 30.5	ns	ns	ns	ns
p17	39.9 ± 27.3	53.9 ± 25.1	27.6 ± 24.2	46.8 ± 24.6	ns	0.062	ns	ns
Μέση τιμή τίτλων όλων των αντισωμάτων	44.6 ± 14.7	46.4 ± 15.8	43.1 ± 13.8	55.7 ± 14.2	<0.001	ns	0.014	<0.001

Ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας αντι-Hρ+ ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και αντι-Hρ+ ασθενείς με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), και υγιή δείγματα ελέγχου (HC), όπως υπολογίστηκαν με από ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα δεδομένα αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean ± standard deviation). Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία *t* του Student (Student's *t*-test, two-tailed, equal variances not assumed), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$).

Συντομώσεις: CagA, protein from cytotoxin-associated gene A; FSH, flagellar sheath protein; ns, not significant; OMP, outer membrane protein; UreA, urease A; UreB, urease B; VacA, vacuolating cytotoxin A.

Εικόνα 5.2: Διάγραμμα διασποράς που απεικονίζει τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι των 15 αντιγόνων του Hp



Ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), διάχυτη δερματική SSc (dcSSc), περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc) και υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Οι γραμμές αναπαριστούν τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Συντομώσεις: CagA, protein from cytotoxin-associated gene A; FSH, flagellar sheath protein; OMP, outer membrane protein; UreA, urease A; UreB, urease B; VacA, vacuolating cytotoxin A.

5.3.4 Αντιγονοειδικές Ηρ ανοσολογικές αποκρίσεις σε ασθενείς με SSc της Ομάδας 2

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης στην Ομάδα 1 των ασθενών με SSc ελέγχθηκαν για την αξιοπιστία τους σε μία δεύτερη και ανεξάρτητη ομάδα ασθενών με SSc αντίστοιχων δημογραφικών χαρακτηριστικών. Οι 18 (51.4%) ασθενείς της Ομάδας 2 ήταν αντι-Hp+, ανάμεσα τους 11 (42.3%) ασθενείς με dcSSc και 7 (77.8%) ασθενείς με lcSSc (dcSSc έναντι lcSSc, p =μη σημαντικό). Η θετικότητα για τα αντι-Hp αντισώματα ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και συγκρίσιμη με αυτή των ασθενών με SSc από την Ομάδα 1 (SSc₂ έναντι HC, p =0.013· SSc₂ έναντι SSc₁, p =μη σημαντικό· dcSSc₂ έναντι HC, p =μη σημαντικό· lcSSc₂ έναντι HC, p =μη σημαντικό).

Ο Πίνακας 5.4 παρουσιάζει τις συχνότητες των αντισωμάτων έναντι των 15 αντιγόνων του Ηρ στους ασθενείς με SSc της Ομάδας 2. Τα αντι-p67-FSH, αντι-p50 και αντι-p19 αντισώματα ανιχνεύτηκαν σε χαμηλότερες συχνότητες στους ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (αντι-p67-FSH: 27.8% έναντι 60%, p =0.042· αντι-p50: 11.1% έναντι 55.6%, p =0.003· αντι-p19: 16.7% έναντι 24.4%, p =0.052). Τα αντι-p50 και τα αντι-p19 αντισώματα ήταν πιο συχνά στους ασθενείς με SSc της ομάδας 1 σε σύγκριση με αυτούς της Ομάδας 2 (αντι-p50: SSc₁, 45.9%· SSc₂, 11.1%· SSc₁ έναντι SSc₂, p =0.017· αντι-p19: SSc₁, 24.6%· SSc₂, 0%· SSc₁ έναντι SSc₂, p =0.046). Ακόμα, η συχνότητα των αντι-p50 αντισωμάτων ήταν χαμηλότερη στους ασθενείς με dcSSc της Ομάδας 2 σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (0% έναντι 55.6%, p =0.003).

Ο Πίνακας 5.5 παρουσιάζει τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι των 15 αντιγόνων του Ηρ στους ασθενείς με SSc της Ομάδας 2. Τα επίπεδα των αντι-VacA αντισωμάτων ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με SSc συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες (53 ± 7.1 έναντι 22.3 ± 6.7 , p = 0.034). Ανάμεσα στους ασθενείς με dcSSc και τους υγιείς μάρτυρες, 3 αντιγονοειδικά αντισώματα είχαν χαμηλότερους τίτλους στη dcSSc, το

αντι-p57 (57.8 ± 46.4 έναντι 91.5 ± 39.1 , $p=0.044$), το αντι-p54 (20.3 ± 3.5 έναντι 53.1 ± 37.6 , $p=0.012$) και το αντι-p17 (21.5 ± 3.5 έναντι 46.8 ± 24.6 , $p=0.008$).

Πίνακας 5.4: Συχνότητες εμφάνισης αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του H_p σε 18 αντι-H_p+ ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc) της Ομάδας 2, συμπεριλαμβάνοντας 11 με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 7 με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), καθώς και σε 45 αντι-H_p+ υγιή δείγματα ελέγχου (HC), όπως ανιχνεύθηκαν έπειτα από ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Αντιδρώσα ζώνη	SSc ₂ (n=18)	dcSSc ₂ (n=11)	lcSSc ₂ (n=7)	HC (n=45)	<i>p</i> SSc ₂ vs HC	<i>p</i> dcSSc ₂ vs lcSSc ₂	<i>p</i> dcSSc ₂ vs HC	<i>p</i> lcSSc ₂ vs HC	<i>p</i> SSc ₁ vs SSc ₂
p120-CagA	14 (77.8%)	9 (81.8%)	5 (71.4%)	37 (82.2%)	ns	ns	ns	ns	ns
p95-VacA	2 (11.1%)	1 (9.1%)	1 (14.3%)	3 (6.7%)	ns	ns	ns	ns	ns
p75	1 (5.6%)	0	1 (14.3%)	4 (8.9%)	ns	ns	ns	ns	ns
p67-FSH	5 (27.8%)	3 (27.3%)	2 (28.6%)	27 (60%)	0.042	ns	ns	ns	ns
p66-UreB	17 (94.4%)	11 (100%)	6 (85.7%)	36 (80%)	ns	ns	ns	ns	ns
p57	17 (94.4%)	11 (100%)	6 (85.7%)	41 (91.1%)	ns	ns	ns	ns	ns
p54	7 (38.8%)	3 (27.3%)	4 (57.1%)	16 (35.6%)	ns	ns	ns	ns	ns
p50	2 (11.1%)	0	2 (28.6%)	25 (55.6%)	0.003	ns	0.003	ns	0.017
p41	7 (38.9%)	2 (18.2%)	5 (71.4%)	18 (40%)	ns	0.078	ns	ns	ns
p33	6 (33.3%)	2 (18.2%)	4 (57.1%)	11 (24.4%)	ns	ns	ns	ns	0.066
p30-OMP	5 (27.8%)	2 (18.2%)	3 (42.9%)	9 (20%)	ns	ns	ns	ns	ns
p29-UreA	10 (55.6%)	6 (54.5%)	4 (57.1%)	24 (53.3%)	ns	ns	ns	ns	ns
p26	10 (55.6%)	5 (45.5%)	5 (71.4%)	25 (55.6%)	ns	ns	ns	ns	ns
p19-OMP	0	0	0	11 (24.4%)	0.052	N/A	0.098	ns	0.046
p17	3 (16.7%)	2 (18.2%)	1 (14.3%)	11 (24.4%)	ns	ns	ns	ns	ns

Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντομεύσεις: CagA, protein from

cytotoxin-associated gene A · *FSH, flagellar sheath protein* · *N/A, not available* · *ns, not significant* · *OMP, outer membrane protein* ·
UreA, urease A · *UreB, urease B* · *VacA, vacuolating cytotoxin A*.

Πίνακας 5.5: Τίτλοι αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του Ηρ σε αντι-Ηρ+ ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc) της Ομάδας 2, συμπεριλαμβάνοντας αντι-Ηρ+ ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και αντι-Ηρ+ ασθενείς με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), καθώς και σε αντι-Ηρ+ υγιή δείγματα ελέγχου (HC), όπως υπολογίστηκαν έπειτα από ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Αντιδρώσα ζώνη	SSc ₂	dcSSc ₂	lcSSc ₂	HC	<i>p</i> _{SSc2 vs HC}	<i>p</i> _{dcSSc2 vs lcSSc2}	<i>p</i> _{dcSSc2 vs HC}	<i>p</i> _{lcSSc2 vs HC}	<i>p</i> _{SSc1 vs SSc2}
p120-CagA	65.6 ± 37.2	62.2 ± 31.3	71.8 ± 49.7	73.6 ± 41.2	ns	ns	ns	ns	ns
p95-VacA	53 ± 7.1	48	58	22.3 ± 6.7	0.034	ns	ns	ns	ns
p75	30	N/A	30	30.8 ± 13.5	ns	N/A	N/A	ns	ns
p67-FSH	41.4 ± 33.2	27 ± 16.5	63 ± 48.1	43.5 ± 31.2	ns	ns	ns	ns	ns
p66-UreB	41.6 ± 34.2	43.2 ± 34.4	38.8 ± 36.9	58.1 ± 29.2	0.098	ns	ns	ns	ns
p57	66.9 ± 44.1	57.8 ± 46.4	83.5 ± 37.7	91.5 ± 39.1	0.056	ns	0.044	ns	ns
p54	31.4 ± 23.2	20.3 ± 3.5	39.8 ± 14.6	53.1 ± 37.6	ns	ns	0.012	ns	ns
p50	29 ± 17	N/A	29 ± 17	41 ± 22.7	ns	N/A	N/A	ns	ns
p41	36 ± 15.9	34.5 ± 7.8	36.6 ± 19	39.7 ± 22.6	ns	ns	ns	ns	ns
p33	46.2 ± 30.5	56 ± 4.2	41.3 ± 38	66.6 ± 35.8	ns	ns	ns	ns	ns
p30-OMP	29.2 ± 18.4	24 ± 12.7	32.7 ± 23.5	26.9 ± 12.7	ns	ns	ns	ns	ns
p29-UreA	37.3 ± 26.4	27.7 ± 8.7	51.8 ± 38.7	62.8 ± 50.3	ns	ns	ns	ns	ns
p26	40.7 ± 25.5	41.8 ± 19.1	39.6 ± 33.1	53.6 ± 32.5	ns	ns	ns	ns	ns
p19-OMP	N/A	N/A	N/A	43.3 ± 30.5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
p17	31.7 ± 17.8	21.5 ± 3.5	52	46.8 ± 24.6	ns	ns	0.008	ns	ns

Τα δεδομένα αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (*mean ± standard deviation*). Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία *t* του Student (*Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed*), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (*Mann-Whitney test*). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$).

Συντομώσεις: *CagA*, protein from cytotoxin-associated gene A · *FSH*, flagellar sheath protein · *N/A*, not available · *ns*, not significant · *OMP*, outer membrane protein · *UreA*, urease A · *UreB*, urease B · *VacA*, vacuolating cytotoxin A.

5.3.5 Πολλαπλές αντιγονοειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις

Όταν οι ασθενείς και οι υγιείς μάρτυρες ταξινομήθηκαν σε επτά ομάδες με βάση την παρουσία πολλαπλών αντισωμάτων ανά ασθενή έναντι αντιγόνων του H_p (0-2 αντιδραστικότητες, 3 ή 4, 5 ή 6, 7 ή 8, 9 ή 10, 11 ή 12, 13-15), καμία διαφορά στις συχνότητες δεν εμφανίστηκε ανάμεσα στις ομάδες (Πίνακας 5.6 και Εικόνα 5.3).

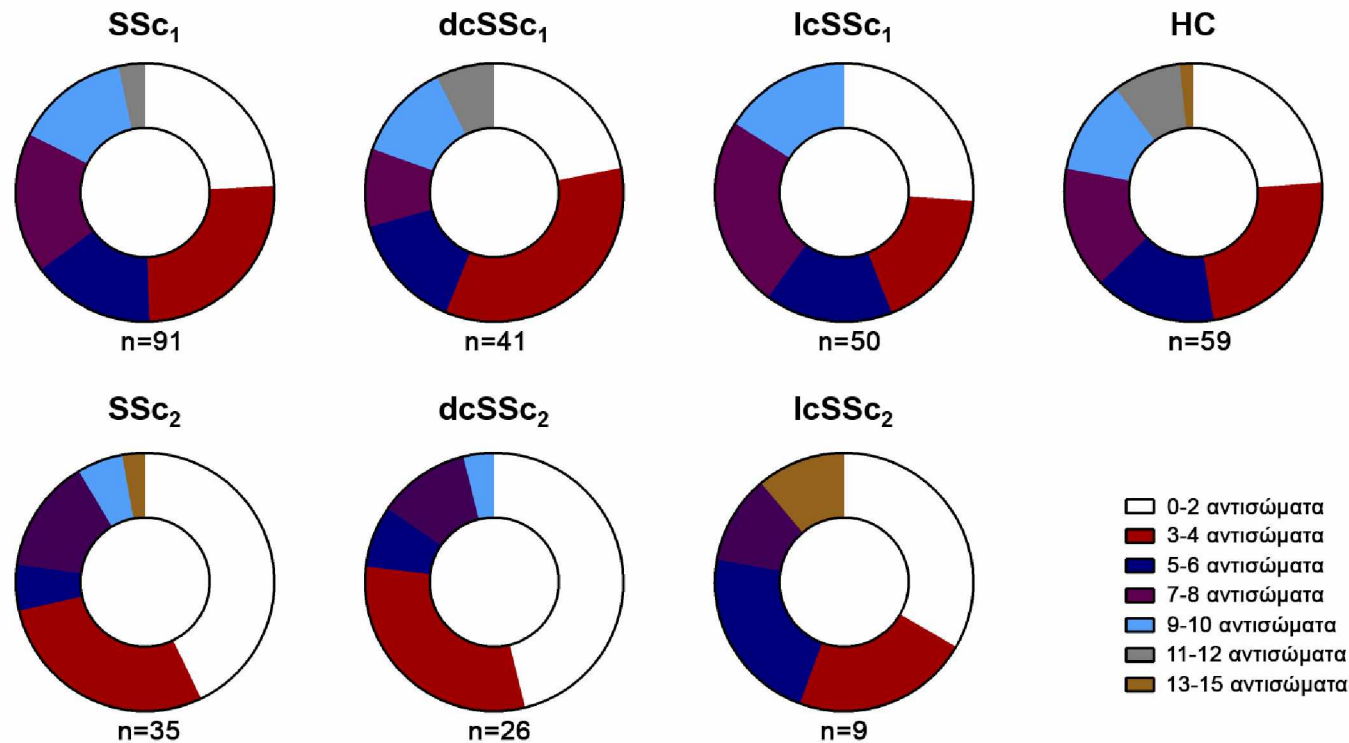
Στη συνέχεια, οι αντι-H_p+ ασθενείς και από τις δύο Ομάδες και οι υγιείς μάρτυρες ταξινομήθηκαν ανάλογα με την αντίδραση τους σε τουλάχιστον ένα αντιγόνο του H_p (Πίνακας 5.7), τουλάχιστον τρία αντιγόνα (Πίνακας 5.8), τουλάχιστον πέντε αντιγόνα (Πίνακας 5.9), τουλάχιστον επτά αντιγόνα (Πίνακας 5.10), τουλάχιστον εννιά αντιγόνα (Πίνακας 5.11) ή τουλάχιστον έντεκα αντιγόνα (Πίνακας 5.12). Από τη στατιστική ανάλυση, η μοναδική διαφορά που προέκυψε ήταν η χαμηλότερη συχνότητα ασθενών με IcSSc που είχαν τουλάχιστον 11 αντιδραστικότητες σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (0% έναντι 13.3%, $p=0.036$).

Πίνακας 5.6: Συχνότητες παρουσίας πολλαπλών αντιγονοειδικών H_p αντισωμάτων, όπως ανιχνεύθηκαν με ανοσοαποτύπωση Western, στους 91 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc) της Ομάδας 1, συμπεριλαμβάνοντας 41 με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 50 με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), τους 35 ασθενείς με SSc της Ομάδας 2, συμπεριλαμβάνοντας 26 με dcSSc και 50 με lcSSc, και τους 59 υγιείς μάρτυρες (HC).

Αριθμός αντιγονοειδικών αντισωμάτων	SSc (n=91)	dcSSc (n=41)	lcSSc (n=50)	SSc ₂ (n=35)	dcSSc ₂ (n=26)	lcSSc ₂ (n=9)	HC (n=59)	<i>p</i> SSc vs HC	<i>p</i> dcSSc vs HC	<i>p</i> lcSSc vs HC	<i>p</i> SSc ₂ vs HC	<i>p</i> dcSSc ₂ vs HC	<i>p</i> lcSSc ₂ vs HC	<i>p</i> SSc vs SSc ₂	<i>p</i> dcSSc vs lcSSc	<i>p</i> dcSSc ₂ vs lcSSc ₂
0-2 αντισώματα	22 (24.2%)	9 (22%)	13 (26%)	15 (42.9%)	12 (46.2%)	3 (33.3%)	14 (23.7%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
3-4 αντισώματα	23 (25.3%)	14 (34.1%)	9 (18%)	10 (28.6%)	8 (30.8%)	2 (22.2%)	14 (23.7%)									
5-6 αντισώματα	14 (15.4%)	6 (14.6%)	8 (16%)	2 (5.7%)	2 (7.7%)	0	9 (15.3%)									
7-8 αντισώματα	16 (17.6%)	4 (9.8%)	12 (24%)	5 (14.3%)	3 (11.5%)	2 (22.2%)	9 (15.3%)									
9-10 αντισώματα	13 (14.3%)	5 (12.2%)	8 (16%)	2 (5.7%)	1 (3.8%)	1 (11.1%)	7 (11.9%)									
11-12 αντισώματα	3 (3.3%)	3 (7.3%)	0	0	0	0	5 (8.5%)									
13-15 αντισώματα	0	0	0	1 (2.9%)	0	1 (11.1%)	1 (1.7%)									

Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Συντόμηση: ns, not significant.

Εικόνα 5.3: Διαγράμματα δακτυλίου που απεικονίζουν την παρουσία πολλαπλών αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του H_p σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc) της Ομάδας 1, συμπεριλαμβάνοντας ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), ασθενείς με SSc της Ομάδας 2, συμπεριλαμβάνοντας ασθενείς με dcSSc και με lcSSc, και σε υγιείς μάρτυρες (HC)



Πίνακας 5.7: Συχνότητα περιπτώσεων με αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον ένα (≥ 1) αντιγόνο του Hρ, όπως ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Αντιδραστικότητες	SSc (n=61)	dcSSc (n=28)	lcSSc (n=33)	SSc group 2 (n=18)	dcSSc group 2 (n=11)	lcSSc group 2 (n=7)	HC (n=45)	$p_{SSc vs HC}$	$p_{dcSSc vs HC}$	$p_{lcSSc vs HC}$	$p_{SSc group 2 vs HC}$	$p_{dcSSc group 2 vs HC}$	$p_{lcSSc group 2 vs HC}$	$p_{SSc vs SSc group 2}$	$p_{dcSSc vs lcSSc}$	$p_{dcSSc group 2 vs lcSSc group 2}$
≥ 1 αντίσωμα	61 (100%)	28 (100%)	33 (100%)	18 (100%)	11 (100%)	7 (100%)	44 (97.8%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	-	-
<1 αντίσωμα	0	0	0	0	0	0	1 (2.2%)									

61 αντι-Hρ+ ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 28 με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 33 με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 18 αντι-Hρ+ ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc) της Ομάδας 2, συμπεριλαμβάνοντας 11 με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 7 με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 45 αντι-Hρ+ υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Συντόμηση: ns, not significant.

Πίνακας 5.8: Συχνότητα περιπτώσεων με αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον τρία (≥ 3) αντιγόνα του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, όπως ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Αντιδραστικότητες	SSc (n=61)	dcSSc (n=28)	lcSSc (n=33)	SSc group 2 (n=18)	dcSSc group 2 (n=11)	lcSSc group 2 (n=7)	HC (n=45)	p SSc vs HC	p dcSSc vs HC	p lcSSc vs HC	p SSc group 2 vs HC	p dcSSc group 2 vs HC	p lcSSc group 2 vs HC	p SSc vs SSc group 2	p dcSSc vs lcSSc	p dcSSc group 2 vs lcSSc group 2
≥ 3 αντισώματα	61 (100%)	28 (100%)	33 (100%)	16 (88.9%)	10 (90.0%)	6 (85.7%)	42 (93.3%)	0.074	ns	ns	ns	ns	ns	0.050	-	ns
<3 αντισώματα	0	0	0	8 (11.1%)	1 (9.1%)	1 (14.3%)	3 (6.7%)									

61 αντι-Hp+ ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 28 με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 33 με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 18 αντι-Hp+ ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc) της Ομάδας 2, συμπεριλαμβάνοντας 11 με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 7 με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 45 αντι-Hp+ υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$) αναφέρονται. Συντόμηση: ns, not significant.

Πίνακας 5.9: Συχνότητα περιπτώσεων με αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον πέντε (≥5) αντιγόνα του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, όπως ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Αντιδραστικότητες	SSc (n=61)	dcSSc (n=28)	lcSSc (n=33)	SSc group 2 (n=18)	dcSSc group 2 (n=11)	lcSSc group 2 (n=7)	HC (n=45)	<i>p</i> SSc vs HC	<i>p</i> dcSSc vs HC	<i>p</i> lcSSc vs HC	<i>p</i> SSc group 2 vs HC	<i>p</i> dcSSc group 2 vs HC	<i>p</i> lcSSc group 2 vs HC	<i>p</i> SSc vs SSc group 2	<i>p</i> dcSSc vs lcSSc	<i>p</i> dcSSc group 2 vs lcSSc group 2
≥5 αντισώματα	45 (73.8%)	17 (60.7%)	28 (84.8%)	10 (55.6%)	6 (54.5%)	4 (57.1%)	32 (71.1%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<5 αντισώματα	16 (26.2%)	11 (39.3%)	5 (15.2%)	8 (44.4%)	5 (45.5%)	3 (42.9%)	13 (28.9%)									

61 αντι-Hr+ ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 28 με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 33 με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 18 αντι-Hr+ ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc) της Ομάδας 2, συμπεριλαμβάνοντας 11 με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 7 με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 45 αντι-Hr+ υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Συντόμηση: ns, not significant.

Πίνακας 5.10: Συχνότητα περιπτώσεων με αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον επτά (≥7) αντιγόνα του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, όπως ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Αντιδραστικότητες	Ssc (n=61)	dcSSc (n=28)	lcSSc (n=33)	Ssc group 2 (n=18)	dcSSc group 2 (n=11)	lcSSc group 2 (n=7)	HC (n=45)	<i>p</i> Ssc vs HC	<i>p</i> dcSSc vs HC	<i>p</i> lcSSc vs HC	<i>p</i> Ssc group 2 vs HC	<i>p</i> dcSSc group 2 vs HC	<i>p</i> lcSSc group 2 vs HC	<i>p</i> Ssc vs Ssc group 2	<i>p</i> dcSSc vs lcSSc	<i>p</i> dcSSc group 2 vs lcSSc group 2
≥7 αντισώματα	30 (49.2%)	11 (39.3%)	19 (57.6%)	8 (44.4%)	4 (36.4%)	4 (57.1%)	22 (48.9%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<7 αντισώματα	31 (50.8%)	17 (60.7%)	14 (42.4%)	10 (55.6%)	7 (63.6%)	3 (42.9%)	23 (51.1%)									

61 αντι-Hr+ ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 28 με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 33 με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 18 αντι-Hr+ ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc) της Ομάδας 2, συμπεριλαμβάνοντας 11 με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 7 με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 45 αντι-Hr+ υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Συντόμηση: ns, not significant.

Πίνακας 5.11: Συχνότητα περιπτώσεων με αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον εννιά (≥9) αντιγόνα του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, όπως ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Αντιδραστικότητες	Ssc (n=61)	dcSSc (n=28)	lcSSc (n=33)	Ssc group 2 (n=18)	dcSSc group 2 (n=11)	lcSSc group 2 (n=7)	HC (n=45)	<i>p</i> Ssc vs HC	<i>p</i> dcSSc vs HC	<i>p</i> lcSSc vs HC	<i>p</i> Ssc group 2 vs HC	<i>p</i> dcSSc group 2 vs HC	<i>p</i> lcSSc group 2 vs HC	<i>p</i> Ssc vs Ssc group 2	<i>p</i> dcSSc vs lcSSc	<i>p</i> dcSSc group 2 vs lcSSc group 2
≥9 αντισώματα	16 (26.2%)	8 (28.6%)	8 (24.2%)	3 (16.7%)	1 (9.1%)	2 (28.6%)	13 (28.9%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
9 αντισώματα	45 (73.8%)	20 (71.4%)	25 (75.8%)	15 (83.3%)	10 (90.9%)	5 (71.4%)	32 (71.1%)									

61 αντι-Hr+ ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 28 με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 33 με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 18 αντι-Hr+ ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc) της Ομάδας 2, συμπεριλαμβάνοντας 11 με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 7 με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 45 αντι-Hr+ υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Συντόμηση: ns, not significant.

Πίνακας 5.12: Συχνότητα περιπτώσεων με αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον έντεκα (≥ 11) αντιγόνα του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, όπως ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Αντιδραστικότητες	SSc (n=61)	dcSSc (n=28)	lcSSc (n=33)	SSc group 2 (n=18)	dcSSc group 2 (n=11)	lcSSc group 2 (n=7)	HC (n=45)	$p_{SSc vs HC}$	$p_{dcSSc vs HC}$	$p_{lcSSc vs HC}$	$p_{SSc group 2 vs HC}$	$p_{dcSSc group 2 vs HC}$	$p_{lcSSc group 2 vs HC}$	$p_{SSc vs SSc group 2}$	$p_{dcSSc vs lcSSc}$	$p_{dcSSc group 2 vs lcSSc group 2}$
≥ 11 αντισώματα	3 (4.9%)	3 (10.7%)	0	1 (5.6%)	0	1 (14.3%)	6 (13.3%)	ns	ns	0.036	ns	ns	ns	ns	0.091	ns
<11 αντισώματα	58 (95.1%)	25 (89.3%)	33 (100%)	17 (94.4%)	11 (100%)	6 (85.7%)	39 (86.7%)									

61 αντι-Hr+ ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 28 με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 33 με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 18 αντι-Hr+ ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc) της Ομάδας 2, συμπεριλαμβάνοντας 11 με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 7 με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 45 αντι-Hr+ υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντόμηση: ns, not significant.

5.3.6 Συσχετίσεις των αντιγονοειδικών Hp ανοσολογικών αποκρίσεων

Αρκετές συσχετίσεις προέκυψαν κατά την ανάλυση των αντιγονοειδικών ανοσολογικών αποκρίσεων με κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με SSc. Τα αντι-VacA αντισώματα ήταν πιο συχνά σε ασθενείς με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση παρά σε ασθενείς χωρίς (36.4% έναντι 8%, $p=0.042$). Τα αντι-p29-UreA αντισώματα ήταν πιο συχνά σε ασθενείς με SSc και συμμετοχή του ανωτέρου γαστρεντερικού σωλήνα σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς συμμετοχή του γαστρεντερικού σωλήνα (76.9% έναντι 45.5%, $p=0.028$). Τα αντι-p30 αντισώματα ήταν πιο συχνά σε ασθενείς με δερματική ασβέστωση (55.6% έναντι 11.5%, $p=0.007$). Τα αντι-p50 αντισώματα ήταν λιγότερο συχνά σε ασθενείς με αρθρίτιδα (20% έναντι 54.3%, $p=0.043$), τα αντι-p75 λιγότερο συχνά σε ασθενείς με τελαγγειεκτασίες (4.5% έναντι 29.4%, $p=0.022$) και τα αντι-p120-CagA αντισώματα λιγότερο συχνά σε ασθενείς με αντι-Scl-70 αντισώματα σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς αντι-Scl-70 αντισώματα (53.8% έναντι 85.7%, $p=0.014$).

Οι τίτλοι των αντι-VacA αντισωμάτων ήταν αυξημένοι σε ασθενείς με SSc που είχαν πνευμονική ίνωση σε σύγκριση με αυτούς που δεν είχαν (62.5 ± 41.7 έναντι 13.8 ± 1 , $p=0.02$), ενώ οι τίτλοι των αντι-p67 αντισωμάτων ήταν χαμηλότεροι σε ασθενείς με SSc που είχαν πνευμονική αρτηριακή υπέρταση σε σχέση με όσους δεν είχαν (17 ± 3 έναντι 31.2 ± 24.1 , $p=0.027$). Τα αντι-VacA και τα αντι-p30 αντισώματα βρίσκονταν σε χαμηλότερα επίπεδα σε ασθενείς με αρθρίτιδα (αντι-VacA: 13 έναντι 46.5 ± 40.7 , $p=0.044$ · αντι-p30: 16 ± 2.8 έναντι 29.4 ± 13 , $p=0.021$). Τέλος, οι τίτλοι των αντι-VacA των αντι-p57 αντισωμάτων ήταν υψηλότεροι σε ασθενείς με SSc θετικούς για αντι-Scl-70 σε σύγκριση με αρνητικούς (αντι-VacA: 62.3 ± 42.1 έναντι 14 ± 1.4 , $p=0.042$ · αντι-p57: 83.6 ± 40.7 έναντι 58.5 ± 38.9 , $p=0.021$).

5.4 Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη συστηματική αποτίμηση της χυμικής αντιδραστικότητας έναντι ανοσοεπικρατών και μη αντιγόνων του H_p σε μια μεγάλη ομάδα ασθενών με SSc. Σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων σε ανεξάρτητη ομάδα ασθενών αντίστοιχων δημογραφικών χαρακτηριστικών. Τα κύρια ευρήματα της μελέτης είναι δύο: πρώτον, η συγκρίσιμη συχνότητα της μόλυνσης από H_p σε ασθενείς με SSc και σε υγιείς μάρτυρες· δεύτερον, οι αντιγονοειδικές H_p χυμικές αποκρίσεις είναι συγκρίσιμες ή χαμηλότερες στους ασθενείς με SSc σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.

Τα παραπάνω ευρήματα έρχονται σε αντίθεση με τα προηγούμενα ερευνητικά δεδομένα και με την αρχική υπόθεση της εργασίας αυτής. Όλες οι μελέτες μέχρι σήμερα εξέτασαν τη μόλυνση από το H_p ανιχνεύοντας τις ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι του H_p χρησιμοποιώντας δοκιμασία ELISA ή χρησιμοποιώντας δοκιμασία ουρίας αναπνοής (urea breath test) ή δοκιμασία ουρίας σε γαστρική βιοψία. Η πρώτη σχετική μελέτη δημοσιεύθηκε το 1998, ανέλυσε την παρουσία IgG αντι-H_p αντισωμάτων με ELISA σε ένα σύνολο 124 ασθενών με SSc, συμπεριλαμβάνοντας 57 ασθενών με dcSSc και 67 ασθενών με lcSSc, και ανέφερε σημαντικά αυξημένη συχνότητα των αντι-ελικοβακτηριδιακών αντισωμάτων στους ασθενείς συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες (55.6% έναντι 32%, με λόγο πιθανοτήτων=2.67 και 95% διάστημα εμπιστοσύνης=1.33-5.32) [446].

Σε μια άλλη μελέτη, όπου χρησιμοποιήθηκε δοκιμασία ELISA με ανασυνδυασμένα ελικοβακτηριδιακά αντιγόνα ως υπόστρωμα [450], παρατηρήθηκε υψηλότερη συχνότητα των αντι-H_p αντισωμάτων σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (78% έναντι 59%, $p<0.01$), αλλά και υψηλότεροι τίτλοι ($p<0.01$). Η μελέτη αυτή χρησιμοποίησε έναν πολύ ικανοποιητικό αριθμό υγιών μαρτύρων ($n=349$), αλλά περιορισμένο αριθμό

ασθενών με SSc (n=55), χωρίς να τους κατατάσσει με βάση τον κλινικό φαινότυπο τους. Σημαντικό μειονέκτημα της μελέτης αυτής είναι ότι οι υγιείς μάρτυρες δε φαίνονταν να αντιστοιχούν στην ηλικία και το φύλλο των ασθενών με SSc, ούτε πραγματοποιήθηκε κάποια διόρθωση των αποτελεσμάτων για την ηλικία και το φύλλο. Αν και οι χαμηλές τιμές p που αναφέρονται υποστηρίζουν ότι οι διαφορές που παρατηρούνται δεν είναι τυχαίες, αυτές θα μπορούσαν να είναι εξαρτώμενες από την ηλικία και το φύλλο. Δεδομένο ότι οι ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι του H_p μπορεί να επηρεάζονται τόσο από την ηλικία [355], όσο και από το φύλλο [364], τα αποτελέσματα των Kalabay και συνεργατών θα πρέπει να εξεταστούν πολύ προσεκτικά [450].

Μια ακόμη μελέτη που χρησιμοποίησε δοκιμασία ELISA για την ανίχνευση των αντι-H_p αντισωμάτων σε 79 ασθενείς με SSc και 245 υγιείς μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας και φύλλου ανέφερε αυξημένη συχνότητα των αντισωμάτων αυτών στους ασθενείς (55.6% έναντι 39%, $p=0.012$) [449].

Σε δυο σχετικές μελέτες χρησιμοποιήθηκε το ίδιο πρωτεϊνικό εκχύλισμα του H_p που χρησιμοποιήθηκε και στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής· τα δεδομένα τους είναι ενδιαφέροντα. Οι Bilgin και συνεργάτες μελέτησαν τη συχνότητα IgG και IgM αντι-H_p αντισωμάτων με ELISA σε 30 ασθενείς με SSc, 12 με dcSSc και 18 με lcSSc, και σε 30 υγιείς μάρτυρες [452]. Η ανάλυση των IgG αντισωμάτων δεν αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες, αποτέλεσμα που συμφωνεί με τις παρατηρήσεις της παρούσα μελέτης. Εντούτοις, η συχνότητα των IgM αντισωμάτων ήταν αυξημένη σε ασθενείς με SSc, ενώ εξίσου αυξημένη η συχνότητα των αντισωμάτων όταν υπολογίστηκε η παρουσία IgG και/ή IgM αντισωμάτων (SSc: 73.3%· dcSSc: 75%· lcSSc: 72.2%· HC: 46.6%· SSc έναντι HC, $p=0.035$). Στη δεύτερη μελέτη, οι Balaji και συνεργάτες μελέτησαν τη συχνότητα και τα επίπεδα IgG αντι-H_p αντισωμάτων με ELISA σε 55 ασθενείς με SSc, 32 με dcSSc και 23 με lcSSc,

και σε 25 υγιείς μάρτυρες [453]. Το 61.8% των ασθενών με SSc ήταν αντι-Hp+ σε σύγκριση με το 24% των υγείων μαρτύρων. Η διαφορά αυτή φαίνεται μεγάλη, όμως οι συγγραφείς της δημοσίευσης δεν αναφέρουν τιμή σημαντικότητας και πιθανώς να μην είναι στατιστικά σημαντική, λόγω του μικρού αριθμού των μαρτύρων. Όταν ανέλυσαν τους τίτλους των αντι-Hp αντισωμάτων, αυτοί ήταν σημαντικά υψηλότεροι στους ασθενείς με SSc ($p=0.003$). Εντούτοις, το αποτέλεσμα αυτό χρειάζεται προσοχή, επειδή οι ερευνητές, χωρίς να αναλύουν τη μεθοδολογία τους αναλυτικά, φαίνεται ότι υπολόγισαν τους μέσους τίτλους των αντισωμάτων σε όλα τα επιμέρους δείγματα ασθενών και μαρτύρων. Δηλαδή, οι μέσοι τίτλοι δεν υπολογίστηκαν μονάχα σε αντι-Hp+ δείγματα, μια μεθοδολογία που αντιπροσωπεύει πιο αξιόπιστα την πραγματικότητα και που εφαρμόστηκε στην παρούσα διατριβή. Συνεπώς, φαίνεται λογικό οι υγιείς μάρτυρες να έχουν χαμηλούς τίτλους αντι-Hp αντισωμάτων, όταν οι 19/25 είναι αντι-Hp-.

Σε τρεις μελέτες της παρουσίας του Hp σε ασθενείς με SSc χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος ανίχνευσης η δοκιμασία ουρίας. Στη μία μελέτη η συχνότητα των Hp+ ασθενών με SSc ήταν 61%, ενώ υπήρχαν 68% Hp+ ασθενείς με γαστροοισοφαγική παλινδρομική νόσο χωρίς SSc και 38% Hp+ υγιείς μάρτυρες [447], χωρίς όμως να αναφέρεται αν η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική. Στις άλλες δύο μελέτες η θετικότητα για το Hp ήταν συγκρίσιμη μεταξύ των ασθενών με SSc και των υγείων μαρτύρων και κυμαίνονταν μεταξύ 44%-58% [448, 451].

Η μοναδική μελέτη που χρησιμοποίησε ανοσοαποτύπωση για την ανίχνευση αντιγονοειδικών Hp ανοσολογικών αποκρίσεων σε 11 ασθενείς με SSc δημοσιεύθηκε το 1996 από τους Showji και συνεργάτες [455]. Στη μελέτη αυτή, η παρουσία των αντισωμάτων αυτών αρχικά πραγματοποιήθηκε τόσο με δοκιμασία ELISA, όσο και με ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα

από Ηρ γαστρικών βιοψιών από ασθενείς με καρκίνο του στομάχου. Επίσης, δε χρησιμοποιήθηκαν υγιείς μάρτυρες ως δείγματα ελέγχου, αλλά παθολογικά δείγματα ελέγχου από ασθενείς με νοσήματα των πνευμόνων. Καμία αναφορά δεν έγινε σχετικά με τη συχνότητα των αντισωμάτων αυτών σε ασθενείς με SSc. Όμως υπήρχε αναφορά για υψηλότερους τίτλους σε ασθενείς σε σύγκριση με τα παθολογικά δείγματα ελέγχου με απεικόνιση ως εικόνα και χωρίς ρητή αναφορά της σημαντικότητας. Οι 7 από τους 11 ασθενείς με SSc είχαν υψηλότερους τίτλους από τη μέση τιμή των τίτλων των μαρτύρων, δίχως να γίνεται ρητή παρουσίαση των δεδομένων. Στη συνέχεια, οι ερευνητές προσπάθησαν να αναζητήσουν αντιγόνα του Ηρ που επάγουν ανοσολογική απόκριση στους ασθενείς με SSc που είχαν τους υψηλότερους τίτλους αντι-Ηρ αντισωμάτων. Συνολικά, 4 αντιγόνα ανιχνεύθηκαν με μοριακό βάρος 58 kDa, 34 kDa, 32 kDa και 26 kDa. Τα 4 αυτά αντιγόνα θα μπορούσαν να αντιστοιχούν στα αντιγόνα p57, p33, p30 και p26-Urea της παρούσας μελέτη, αντίστοιχα, δύο εκ των οποίων είναι ανοσοεπικρατή με συχνότητα εμφάνισης σε αντι-Ηρ+ ασθενείς με SSc πάνω από 50%. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επαληθεύτηκαν σε μια δεύτερη και ανεξάρτητη ομάδα ασθενών από διαφορετική περιοχή της Ελλάδας, τονίζοντας την αξιοπιστία της μελέτης και αποκλείοντας την πιθανότητα τα αποτελέσματα αυτά να οφείλονται σε ιδιαιτερότητες της ομάδας των ασθενών που μελετήθηκε. Σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση των συχνοτήτων εμφάνισης του Ηρ σε ασθενείς με SSc [454], η συχνότητα κυμαίνονταν μεταξύ 52%-78%, δεδομένο που συμφωνεί με τις συχνότητες που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη (67% στην Ομάδα 1 και 51.4% στην Ομάδα 2). Εντούτοις, η συχνότητα των αντισωμάτων στους υγιείς μάρτυρες ήταν χαμηλή σε σύγκριση με αυτή που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη (24%-53% έναντι 76%).

Πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει ότι η μόλυνση με H_ρ βελτιώνει τη βαρύτητα της νόσου σε πειραματικά μοντέλα ανοσομεσολαβούμενων νόσων, όπως η κατά πλάκας σκλήρυνση (MS) [372], το αλλεργικό άσθμα [527] και η κολίτιδα που επάγεται από σαλμονέλα [528]. Τα αποτελέσματα αυτά είναι άκρως ενδιαφέροντα και στηρίζουν την υπόθεση ότι το H_ρ περισσότερο προστατεύει παρά αυξάνει την προδιάθεση για αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η MS [365, 371, 373, 529]. Με την ίδια λογική, το H_ρ θα μπορούσε να προστατεύει και από την ανάπτυξη της SSc. Μια διαφορετική εξήγηση είναι ότι η αρνητική σχέση που εξήχθη από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μεταξύ του H_ρ και της SSc είναι ένα επιφαινόμενο και ότι το H_ρ είναι απλά ένας συγχυτικός παράγοντας που σχετίζεται με κάποιον προστατευτικό παράγοντα έναντι της SSc [530].

Όσον αφορά προηγούμενες αναφορές σε ανοσοειδικές αποκρίσεις σε ασθενείς με SSc, η συχνότητα των αντισωμάτων έναντι της λοιμογονικής και ανοσοσοεπικρατούς πρωτεΐνης CagA εμφανιζόταν στο 90% των ασθενών σε σύγκριση με το 37% των μαρτύρων, μια στατιστικά σημαντική διαφορά [451]. Το αποτέλεσμα αυτό δε συνάδει με το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης, όπου τα αντι-CagA αντισώματα εμφανίστηκαν σε μεγάλη συχνότητα στους ασθενείς με SSc, αλλά συγκρίσιμη με αυτή των υγείων μαρτύρων (72% στους ασθενείς έναντι 82% στους υγιείς).

Σχετικά με την ανοσολογική απόκριση έναντι της VacA, στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης δεν εντοπίστηκε οποιαδήποτε διαφορά στη συχνότητα των αντι-VacA αντισωμάτων ανάμεσα στους ασθενείς με SSc και στους υγιείς μάρτυρες. Όμως, παρατηρήθηκε μια σχέση των αντισωμάτων αυτών με την παρουσία πνευμονικής ίνωσης και πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης σε ασθενείς με SSc. Η στατιστική αυτή σχέση θα μπορούσε να οφείλεται σε κάποιον μηχανισμό που εμπλέκεται η VacA ή τα

αντι-VacA αντισώματα και οδηγεί σε πνευμονική βλάβη ή βλάβη που εκδηλώνεται στους πνεύμονες [531].

Ακόμα μια θετική σχέση που προέκυψε κατά τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ήταν η αυξημένη συχνότητα των αντι-p30 αντισωμάτων σε ασθενείς με δερματικές ασβετώσεις σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς. Ωστόσο, η στατιστική ανάλυση εξήγαγε πολλές αρνητικές σχέσεις των αντιγονοειδικών Hρ αντισωμάτων με κλινικά χαρακτηριστικά, η εξήγηση των οποίων είναι αινιγματική.

Εν κατακλείδι, τα αντισώματα έναντι αντιγόνων του Hρ βρίσκονται σε ασθενείς με SSc ή με τους κλινικούς υποτύπους της σε συχνότητες και τίτλους συγκρίσιμους ή χαμηλότερους συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες αντίστοιχων δημογραφικών χαρακτηριστικών. Τα αποτελέσματα αυτά δεν αποκλείουν τη συμμετοχή του Hρ στη νόσο αυτή, στην παθογένεια της, στην εξέλιξη της και στις επιπλοκές αυτής. Άλλοι μηχανισμοί, μη ανοσολογικής φύσης, θα μπορούσαν να παίζουν κάποιο ρόλο στις διαδικασίες αυτές, με βάση την αγγειοπαθογόνο και ινωτική δράση του Hρ [532].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Αντιγονοειδικά αντισώματα έναντι του ιού Epstein-Barr στη συστηματική σκλήρυνση

6.1 Εισαγωγή

Ο ιός Epstein-Barr (Epstein-Barr virus, EBV) αποτελεί ένα από του κύριους υποψήφιους παράγοντες επαγωγής αυτοανοσίας εδώ και δεκαετίες, από τότε που έγινε η πρώτη αναφορά για αυξημένα επίπεδα αντι-EBV αντισωμάτων σε ασθενείς με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο [533]. Οι λόγοι για τον πιθανό ρόλο του EBV αυτό είναι οι αρκετοί [309]: πρώτον, η καθολική παρουσία του ιού στον ανθρώπινο πληθυσμό· δεύτερον, η ικανότητα του ιού για μακροχρόνια, λανθάνουσα μόλυνση με δυνατότητα συνεχούς επανενεργοποίησης του ιικού πολλαπλασιασμού· τρίτον, η ανοσοτροποποιητική ικανότητα του ιού.

Ο ιός παρουσιάζει τροπισμό για Β λεμφοκύτταρα και για επιθηλιακά κύτταρα του ρινοφάρυγγα, όμως παραμένει σε χρόνια λανθάνουσα κατάσταση μονάχα στα Β λεμφοκύτταρα [305]. Μέσα στα Β κύτταρα μπορεί και επιβιώνει μέσω της παραγωγής δέκα ιικών πρωτεϊνών λανθάνουσας φάσης, ανάμεσα τους το πυρηνικό αντιγόνο 1 του EBV (EBV nuclear antigen 1, EBNA-1) [307]. Οι πρωτεΐνες λανθάνουσας φάσης δεν επιτρέπουν μονάχα την αναπαραγωγή του ιού, αλλά και τον πολλαπλασιασμό των Β λεμφοκυττάρων και τη διαφοροποίησή τους προς Β κύτταρα μνήμης, μέσω CD40-μεσολαβούμενης σηματοδότησης, ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και της κινάσης c-Jun [534-536]. Ο μικρός αριθμός πρωτεϊνών που εκφράζονται κατά τη λανθάνουσα φάση της ιικής λοίμωξης εξυπηρετεί στη μείωση των διαθέσιμων αντιγόνων που θα επιτρέψουν την αναγνώριση των μολυσμένων κυττάρων από Τ λεμφοκύτταρα, συμβάλλοντας έτσι στη διαφυγή από το ανοσοποιητικό σύστημα.

Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι οι κυτταρικές και χυμικές ανοσολογικές αντιδράσεις έναντι του EBV και η ρύθμιση της λανθάνουσας κατάστασης στα Β κύτταρα μνήμης διαφέρουν σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα [345, 537, 538]. Στην MS, διαχρονικές μελέτες ανάλυσης δειγμάτων ορού δεκαετίες πριν την έναρξη της συμπτωματολογίας της νόσου αποκάλυψαν ότι ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου είναι ευθέως ανάλογος με τα επίπεδα των αντι-EBV αντισωμάτων, ιδιαίτερα των IgG αντισωμάτων έναντι της EBNA-1 [310-313]. Πλέον, η μόλυνση από EBV είναι εδραιωμένος παράγοντας κινδύνου της MS, καθώς η συχνότητα των αντισωμάτων εναντίον του EBV είναι αυξημένη σε ασθενείς με πολλαπλής σκλήρυνση σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [310, 316], η λοιμώδης μονοκυττάρωση αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο πολλαπλής σκλήρυνσης [318] και ασυμπτωματικοί υγιείς νεαροί μάρτυρες με αυξημένο τίτλο αντισωμάτων έναντι του EBV έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου [311, 315]. Οι μηχανισμοί της μοριακής μίμησης και της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας μεταξύ EBNA-1 και συστατικών του ελύτρου μυελίνης των νευραξόνων πιθανώς να εμπλέκονται στην αιτιοπαθογένεια της πολλαπλής σκλήρυνσης, καθώς αντισώματα έναντι του EBNA-1 είναι σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς και Τ λεμφοκύτταρα από ασθενείς εναντίον του EBNA-1 αντιδρούν με αντιγόνα της μυελίνης [285, 313, 330, 539-541].

Στην SSc, ο EBV μπορεί να μολύνει ινοβλάστες του δέρματος, να τους ενεργοποιεί, κάνοντας τους να αποκτήσουν προ-ινωτικό φαινότυπο, και να τροποποιεί την έμφυτη ανοσολογική απόκριση [441, 442]. Η παρουσία γενετικού υλικού και πρωτεϊνών του ιού σε ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα του δέρματος ασθενών με SSc είναι σχεδόν καθολική, υποστηρίζοντας ότι EBV συμμετέχει στην παθογένεια της SSc προκαλώντας συνεχόμενη ιστική βλάβη και ίνωση [442]. Επίσης, σημαντικός στην παθογένεια της SSc φαίνεται ότι είναι και ο ρόλος των αντισωμάτων έναντι

συγκεκριμένων αντιγόνων του EBV. Οι Mahler και συνεργάτες έχουν δείξει ότι αντισώματα έναντι της EBNA-1 αντιδρούν μέσω κοινών επιτόπων-μιμητών με την ανθρώπινη πρωτεΐνη CENPA [171], η οποία αποτελεί ένα από τα ειδικά αυτοαντιγόνα της SSc [418], στηρίζοντας την υπόθεση ότι η SSc είναι αποτέλεσμα μοριακής μίμησης και ανοσολογικής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας. Προς υπεράσπιση της υπόθεσης αυτής είναι και αναφορές ότι οι χυμικές αποκρίσεις έναντι του EBV και έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων του EBV είναι αυξημένες σε ασθενείς με SSc σε σχέση με υγιή άτομα [444, 445].

Ελλείπει δημοσιευμένων δεδομένων σχετικά με την αναλυτική και συστηματική μελέτη των χυμικών αποκρίσεων έναντι αντιγόνων του EBV στην SSc, στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αναλύθηκαν με μεγάλη λεπτομέρεια οι συχνότητες και οι τίτλοι αντισωμάτων έναντι 12 χαρακτηρισμένων, ιικών αντιγόνων που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της λοίμωξης από τον EBV [542, 543], όπως αναζητήθηκαν επίσης πιθανές κλινικές συσχετίσεις. Επίσης, αναλύθηκε εκτενώς η χυμική απόκριση έναντι ενός άγνωστου, μη χαρακτηρισμένου αντιγόνου του EBV που αποκαλύφθηκε κατά την ανοσοαποτύπωση. Επειδή το αντιγόνο αυτό εντοπιζόταν ανάμεσα στα αντιγόνα p125.VCA και p93.EAR, εφεξής θα αναφέρεται ως αντιγόνο «EBV.p100». Μελετήθηκαν επίσης διεξοδικά οι κλινικές συσχετίσεις των αντι-EBV.p100 αντισωμάτων, καθώς και οι συσχετίσεις με νοσοειδικά αυτοαντισώματα. Για τη διερεύνηση διασταυρούμενης αντιδραστικότητας, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western χρησιμοποιώντας πρωτογενή αντισώματα έναντι του αυτοαντιγόνου Scl-70. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση αλληλουχιών με BLASTp μεταξύ πρωτεϊνών του EBV και της ανθρώπινης πρωτεΐνης τοποϊσομεράση Ι (Scl-70) προς αναζήτηση ομοιοτήτων.

6.2 Υλικά και Μέθοδοι

6.2.1 Υλικά

Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα 2.1.

6.2.2 Μέθοδοι

6.2.2.1 Βιολογικό υλικό ασθενών και μαρτύρων

Δείγματα ολικού περιφερικού αίματος συλλέχθηκαν από 59 ασθενείς με SSc (45 γυναίκες, 76.3%· διάμεση ηλικία, 49 έτη· εύρος ηλικίας, 25-87 έτη), συμπεριλαμβανομένου 31 ασθενείς με dcSSc (52.5% των ασθενών με SSc· 23 γυναίκες, 74.2%· διάμεση ηλικία, 45 έτη· εύρος ηλικίας, 25-79 έτη) και 28 ασθενείς με lcSSc (47.5% των ασθενών με SSc· 22 γυναίκες, 78.6%· διάμεση ηλικία, 51 έτη· εύρος ηλικίας, 35-87 έτη). Οι ασθενείς αυτοί παρακολουθούνταν σε τακτική βάση στην Πανεπιστημιακή Κλινική Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας (Διευθυντές Καθηγητής Λάζαρος Σακκάς και Καθηγητής Δημήτριος Μπόγδανος) στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας. Τα κύρια δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1, ενώ τα κλινικά και τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά τους στον Πίνακα 6.2. Όλοι οι ασθενείς βρίσκονταν υπό συμβατική θεραπευτική αγωγή χαμηλής δόσης κορτικοστεροειδών φαρμακευτικών παραγόντων (<7.5 mg/ημέρα) μαζί με αζαθειοπρίνη ή μεθοτρεξάτη. Ασθενείς με πνευμονική ίνωση ή πνευμονική αρτηριακή υπέρταση λάμβαναν συμπληρωματική θεραπεία. Όλοι οι ασθενείς ήταν θετικοί για αντιπυρηνικά αντισώματα, όπως αυτά ανιχνεύθηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Η διάγνωση της νόσου βασίστηκε στα κριτήρια που θέσπισε το Αμερικανικό Κολλέγιο Ρευματολόγων [396].

Ως παθολογικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος που συλλέχθηκαν από 43 ασθενείς με MS (25 γυναίκες, 58.1%· διάμεση ηλικία 45 έτη· εύρος ηλικίας 23-69 έτη), εκ των οποίων τα 30 από ασθενείς με RRMS (69.8% των ασθενών με MS· 15 γυναίκες, 50%· διάμεση ηλικία 42 έτη· εύρος ηλικίας 23-60 έτη) και τα 13 από ασθενείς με SPMS (30.2% των ασθενών με MS· 10 γυναίκες, 76.9%· διάμεση ηλικία 51 έτη· εύρος ηλικίας 30-69 έτη). Ο Πίνακας 6.1 παρουσιάζει τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με MS. Όλοι οι ασθενείς παρακολουθούνταν σε τακτική βάση στην Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική (Διευθυντές Καθηγητής Γεώργιος Χατζηγεωργίου και Αναπληρωτής Καθηγητής Ευθύμιος Δαρδιώτης) στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας. Η διάγνωση της RRMS βασίστηκε στα ανανεωμένα Κριτήρια McDonald του 2011 [460], ενώ η μετάβαση στην SPMS βασίστηκε στα κριτήρια που θεσπίστηκαν το 2016 από τον Lorscheider et al [461]. Κατά την αιμοληψία 10 (23.3%) ασθενείς δε λάμβαναν κάποια θεραπευτική αγωγή. Ανάμεσα στους υπόλοιπους ασθενείς 33 ασθενείς, 11 (33.3%) λάμβαναν ιντερφερόνη β (συμπεριλαμβάνοντας 7 σε ιντερφερόνη β-1α και 4 σε ιντερφερόνη β-1β), 8 (24.2%) λάμβαναν ναταλιζουμάμπη/Tysabri, 5 (15.2%) λάμβαναν φινγκολιμόδη/Gilenya, 7 (21.2%) λάμβαναν οξική γλατιραμέρη/Coraxone, 1 (3.3%) λάμβανε τεριφλουνομίδη/Aubagio και 1 (3.3%) λάμβανε μιτοξαντρόνη.

Ως υγιή δείγματα ελέγχου (healthy controls, HC) χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος από 32 υγιείς μάρτυρες με αντίστοιχα δημογραφικά χαρακτηριστικά με τους ασθενείς (19 γυναίκες, 59.4%· διάμεση ηλικία, 47 έτη· εύρος ηλικίας, 30-88 έτη). Ο Πίνακας 6.1 παρουσιάζει τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των υγιών μαρτύρων. Οι υγιείς μάρτυρες ήταν μέλη του προσωπικού του Εργαστηρίου και της Κλινικής Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, καθώς και συνοδοί ασθενών. Κανένας υγιής μάρτυρας δεν είχε οικογενειακό ιστορικό αυτοάνοσης νόσου, ούτε άλλη

συννοσηρότητα ή χρόνια νόσο, όπως καρκίνο, αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη ή χρόνια καρδιαγγειακή νόσο.

Όλοι οι ασθενείς και οι μάρτυρες ήταν Λευκοί Καυκάσιοι. Όλα τα δείγματα ολικού περιφερικού αίματος των ασθενών και των μαρτύρων διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση σε φικόλη και τα παράγωγα του αίματος αποθηκεύτηκαν κατάλληλα στους -20°C (Ενότητα 2.2.1).

6.2.2.2 Ανίχνευση IgG αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ELISA «Anti-EBV WESTERNBLOT (IgG)» της Euroimmun AG (Γερμανία), η οποία χρησιμοποιεί ως αντιγονική πηγή πρωτεϊνικό εκχύλισμα του στελέχους P3HR1 του EBV. Όλα τα δείγματα ασθενών και μαρτύρων εξετάστηκαν για την ύπαρξη αντιδραστικών αντισωμάτων έναντι 12 πρωτεϊνών-αντιγόνων του EBV: p125.VCA, p93.EAR, p79.EBNA-1, p65.VCA, p45.EAD, p43.EAD, p42.VCA, p41.VCA, p40.VCA, p33.VCA, EBV.p27 και p22.VCA. Τα αντιγόνα του ιού ταξινομήθηκαν σε τρεις κατηγορίες: τα αντιγόνα του καψιδίου του ιού (viral capsid antigens, VCA) ήταν επτά (p125, p65, p42, p41, p40, p33 και p22), τα πρόωρα αντιγόνα του ιού (early antigens, EA) ήταν τρία (p39, p45 και p43), και το πυρηνικό αντιγόνο (EBV nuclear antigen, EBNA) ήταν ένα (EBNA-1). Το αντιγόνο EBV.p27 δεν κατατάχθηκε σε κάποια από τις τρεις κατηγορίες. Το πειραματικό πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western παρουσιάζεται στην Ενότητα 2.2.3.

Πίνακας 6.1: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών και υγιών δειγμάτων ελέγχου

Χαρακτηριστικό	SSc (n=59)	dcSSc (n=31)	lcSSc (n=28)	MS (n=43)	RRMS (n=30)	SPMS (n=13)	HC (n=32)	p SSc vs HC	p SSc vs MS	p SSc vs RRMS	p SSc vs SPMS	p dcSSc vs lcSSc	p dcSSc vs HC	p lcSSc vs HC	p dcSSc vs MS	p dcSSc vs RRMS	p dcSSc vs SPMS	p lcSSc vs MS	p lcSSc vs RRMS	p lcSSc vs SPMS	p MS vs HC	p RRMS vs SPMS	p RRMS vs HC	p SPMS vs HC
Age	49.9 ± 11.8	46.8 ± 10.5	53.3 ± 12.5	45.4 ± 11	43.3 ± 10.5	50.2 ± 11.1	49.5 ± 12.1	ns	0.053*	0.010*	ns	0.038*	ns	ns	ns	ns	ns	0.009*	0.002*	ns	ns	0.073*	0.035*	ns
Φύλο Γυναίκες/ Άντρες	45 (76.3%)/ 14 (23.7%)	23 (74.2%)/ 8 (25.8%)	22 (78.6%)/ 6 (21.4%)	25 (58.1%)/ 18 (41.9%)	15 (50%)/ 15 (50%)	10 (76.9%)/ 3 (23.1%)	19 (59.4%)/ 13 (40.6%)	0.092**	0.051**	0.012**	ns	ns	ns	ns	ns	0.051**	ns	0.075**	0.024**	ns	ns	0.100**	ns	ns
Αντι-VCA θετικότητα	55 (93.2%)	29 (93.5%)	26 (92.9%)	42 (97.7%)	29 (96.7%)	13 (100%)	31 (96.9%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Αντι-EA θετικότητα	20 (33.9%)	10 (32.3%)	10 (35.7%)	14 (32.6%)	10 (33.3%)	4 (30.8%)	1 (3.1%)	0.002**	ns	ns	ns	ns	0.007**	0.003**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.004**	ns	0.005**	0.031**
Αντι-EBNA θετικότητα	53 (89.8%)	27 (87.1%)	26 (92.9%)	40 (93%)	27 (90%)	13 (100%)	22 (68.8%)	0.025**	ns	ns	ns	ns	ns	0.045**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.015**	ns	0.082**	0.059**

59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 31 ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 28 ασθενείς με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 43 ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), συμπεριλαμβάνοντας 30 ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και 13 ασθενείς με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS), 32 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα του φύλλου και θετικότητας έναντι των τριών κατηγοριών των ιικών αντιγόνων αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Τα δεδομένα της ηλικίας αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean ± standard deviation). *Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). **Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ² του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Συντομεύσεις: EA, early antigens' EBNA, EBV nuclear antigen' ns, not significant' VCA, viral capsid antigens.

Πίνακας 6.2: Κλινικά χαρακτηριστικά των 59 ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 31 ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 28 ασθενείς με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc).

Χαρακτηριστικό	SSc (n=59)	dcSSc (n=31)	lcSSc (n=28)	p _{dcSSc vs lcSSc}
Πνευμονική ίνωση	23 (39%)	20 (64.5%)	3 (10.7%)	<0.001
Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση	5 (8.5%)	5 (16.1%)	0	0.080
Δακτυλικά έλκη	30 (50.8%)	19 (61.3%)	11 (39.3%)	ns
Αρθρίτιδα	13 (22%)	7 (22.6%)	6 (21.4%)	ns
Ορογονίτιδα	3 (5.1%)	1 (3.2%)	2 (7.1%)	ns
Τελαγγειεκτασίες	37 (62.7%)	21 (67.7%)	16 (57.1%)	ns
Δερματική ασβέστωση	8 (13.6%)	5 (16.1%)	3 (10.7%)	ns
Νεφρική συμμετοχή	2 (3.4%)	1 (3.2%)	1 (3.6%)	ns
Αντι-Scl-70 θετικότητα	27 (45.8%)	17 (54.8%)	10 (35.7%)	ns
Αντι-CENPA θετικότητα	11 (18.6%)	2 (6.5%)	9 (32.1%)	0.028
Αντι-CENPB θετικότητα	11 (18.6%)	2 (6.5%)	9 (32.1%)	0.028
Αντι-RNApol11 θετικότητα	7 (11.9%)	4 (12.9%)	3 (10.7%)	ns
Αντι-RNApol55 θετικότητα	8 (13.6%)	6 (19.4%)	2 (7.1%)	ns

Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντομεύσεις: CENPA, centromeric protein A· CENPB, centromeric protein B· ns, not significant· RNApol, RNA polymerase· Scl-70, Scleroderma 70.

6.2.2.3 Ανοσοαποτύπωση με μονοκλωνικά αντισώματα αντι-Scl-70

Για την εξερεύνηση της πιθανότητας της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας των αντισωμάτων έναντι του EBV.p100 και του Scl-70, χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για το Scl-70 ως πρωτογενή αντισώματα σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western και χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα εκχύλισμα πρωτεϊνών του EBV. Το πειραματικό πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης παρουσιάζεται στην Ενότητα 2.2.3. Η μοναδική διαφορά ήταν ότι αντί της πρώτης επώασης με 1.5 ml αραιωμένου ορού υπό ανάδευση για 30 λεπτά σε RT, οι μεμβρανώδεις ταινίες της δοκιμασίας επώαστηκαν με 1.5 ml αντι-Scl-70 σε συγκέντρωση 1:1000 σε «Universal Buffer» για 30 λεπτά σε RT.

6.2.2.4 Κλινικές συσχετίσεις

Τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του EBV αναλύθηκαν για πιθανές συσχετίσεις με κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά της SSc. Τα κλινικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ήταν η παρουσία πνευμονικής ίνωσης, πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης, δακτυλικών ελκών, συμμετοχής του γαστρεντερικού σωλήνα, αρθρίτιδας, ορογονίτιδας, τελαγγεικτασιών, δερματικής ασβέστωσης και νεφρικής συμμετοχής. Τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ήταν η θετικότητα για αντι-Scl-70, για αντι-CENPA, για αντι-CENPB, για αντι-RNApol11 και για αντι-RNA pol155 αντισώματα.

6.2.2.5 Παράμετροι Uniprot και Protein BLAST

Για την αναζήτηση πρωτεϊνών του EBV με μοριακό βάρος από 93 kilodalton (kDa) έως 125 kDa στη βάση δεδομένων πρωτεϊνικών αλληλουχιών Uniprot, έγινε αναζήτηση με βάση τον όρο «Epstein-Barr virus» και στη συνέχεια επιλέχθηκαν τα αποτελέσματα

επιθεωρημένων καταχωρήσεων (Reviewed Entry) από οργανισμούς που περιείχαν το «Epstein-Barr virus» και με μοριακό βάρος 93-123 kDa.

Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν στο BLASTp περιγράφονται στην Ενότητα 2.2.5.

6.2.2.6 Στατιστική ανάλυση

Όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα 2.2.6.

6.3 Αποτελέσματα

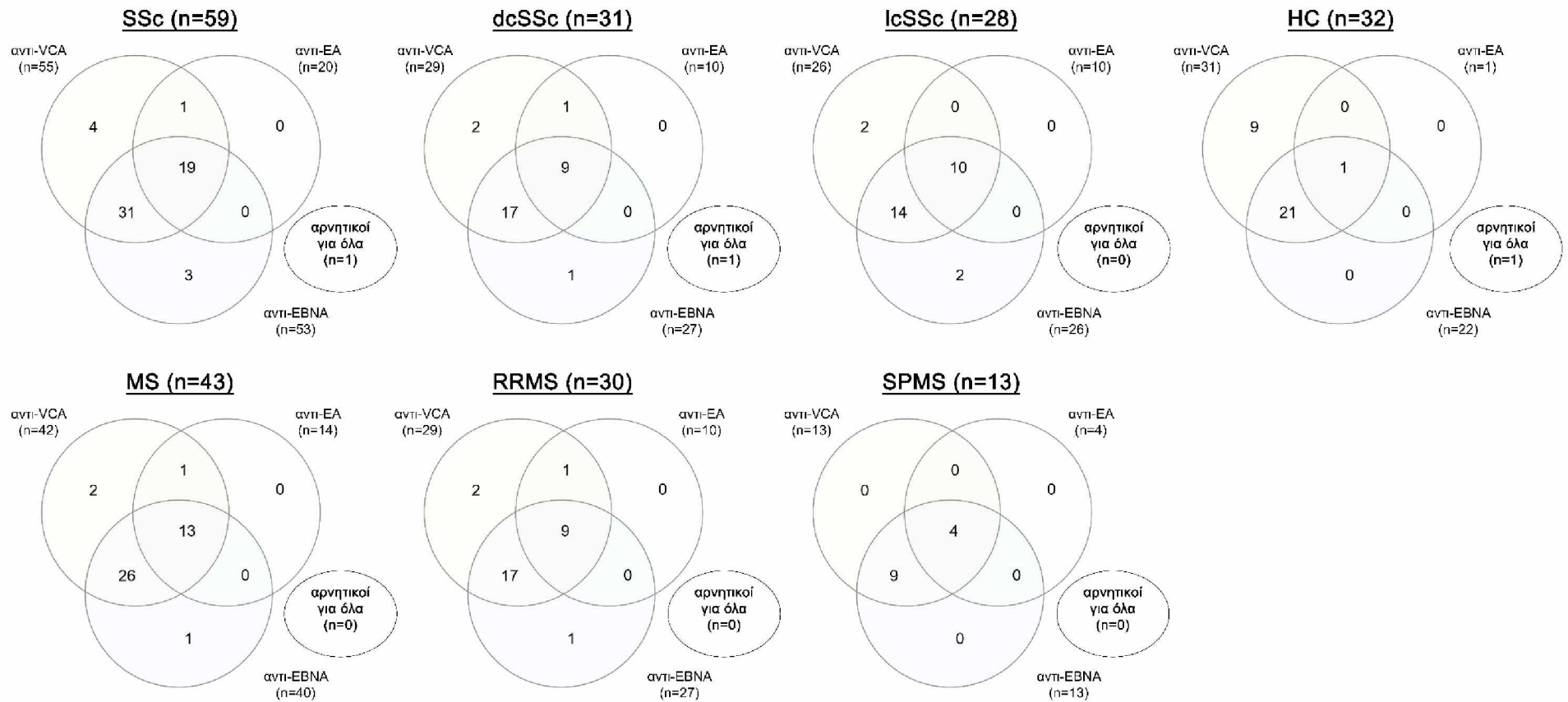
6.3.1 IgG αντι-EBV αντισώματα σε ασθενείς με SSc

Η θετικότητα για αντισώματα έναντι των τριών κατηγοριών αντιγόνων του EBV εκτιμήθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Πίνακας 6.1). Από του 59 ασθενείς με SSc, οι 55 (93.2%) ήταν αντι-VCA θετικοί, ανάμεσα τους 29 (93.5%) ασθενείς με dcSSc και 26 (92.9%) ασθενείς με lcSSc (dcSSc έναντι lcSSc, p =μη σημαντικό)· οι 20 (33.9%) ήταν αντι-EA θετικοί, ανάμεσα τους 10 (32.3%) ασθενείς με dcSSc και 10 (35.7%) ασθενείς με lcSSc (dcSSc έναντι lcSSc, p =μη σημαντικό)· οι 53 (89.8%) ήταν αντι-EBNA-1 θετικοί, ανάμεσα τους 27 (87.1%) ασθενείς με dcSSc και 26 (92.9%) ασθενείς με lcSSc (dcSSc έναντι lcSSc, p =μη σημαντικό· SSc έναντι HC, p =μη σημαντικό). Τα αντι-VCA αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε 42 (97.7%) ασθενείς με MS και σε 31 υγιείς μάρτυρες (SSc έναντι MS, p =μη σημαντικό· SSc έναντι HC, p =μη σημαντικό· MS έναντι HC, p =μη σημαντικό· dcSSc έναντι HC, p =μη σημαντικό· lcSSc έναντι HC, p =μη σημαντικό)· τα αντι-EA αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε 14 (32.6%) ασθενείς με MS και σε 1 (3.1%) υγιή μάρτυρα (SSc έναντι MS, p =μη σημαντικό· SSc έναντι HC, p =0.002· MS έναντι HC, p =0.004· dcSSc έναντι HC, p =0.007· lcSSc έναντι HC, p =0.003)· τα αντι-EBNA-1 αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε 40 (93%) ασθενείς με MS και σε 22 υγιείς

μάρτυρες (SSc έναντι MS, p =μη σημαντικό· SSc έναντι HC, $p=0.025$ · MS έναντι HC, $p=0.015004$ · dcSSc έναντι HC, p =μη σημαντικό· lcSSc έναντι HC, $p=0.045$).

Η τριπλή θετικότητα και για τις τρεις κατηγορίες αντιγόνων (Εικόνα 6.1) παρατηρήθηκε πιο συχνά στην SSc σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (32.2% έναντι 3,1%, $p=0.001$), αλλά ήταν συγκρίσιμη μεταξύ SSc και MS (32.2% έναντι 35.7%, p =μη σημαντικό). Η μονή αντι-VCA θετικότητα παρατηρήθηκε λιγότερο συχνά στους ασθενείς με SSc σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (6.8% έναντι 28.1%, $p=0.010$) και ήταν συγκρίσιμη με τους ασθενείς με MS (6.8% έναντι 4.7%, p =μη σημαντικό).

Εικόνα 6.1: Διαγράμματα Venn των προτύπων θετικότητας των αντι-VCA, των αντι-EA και των αντι-EBNA-1 αντισωμάτων



59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 31 ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 28 ασθενείς με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 43 ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), συμπεριλαμβάνοντας 30 ασθενείς με

υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και 13 ασθενείς με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS), καθώς και 32 υγιή δείγματα ελέγχου (HC).

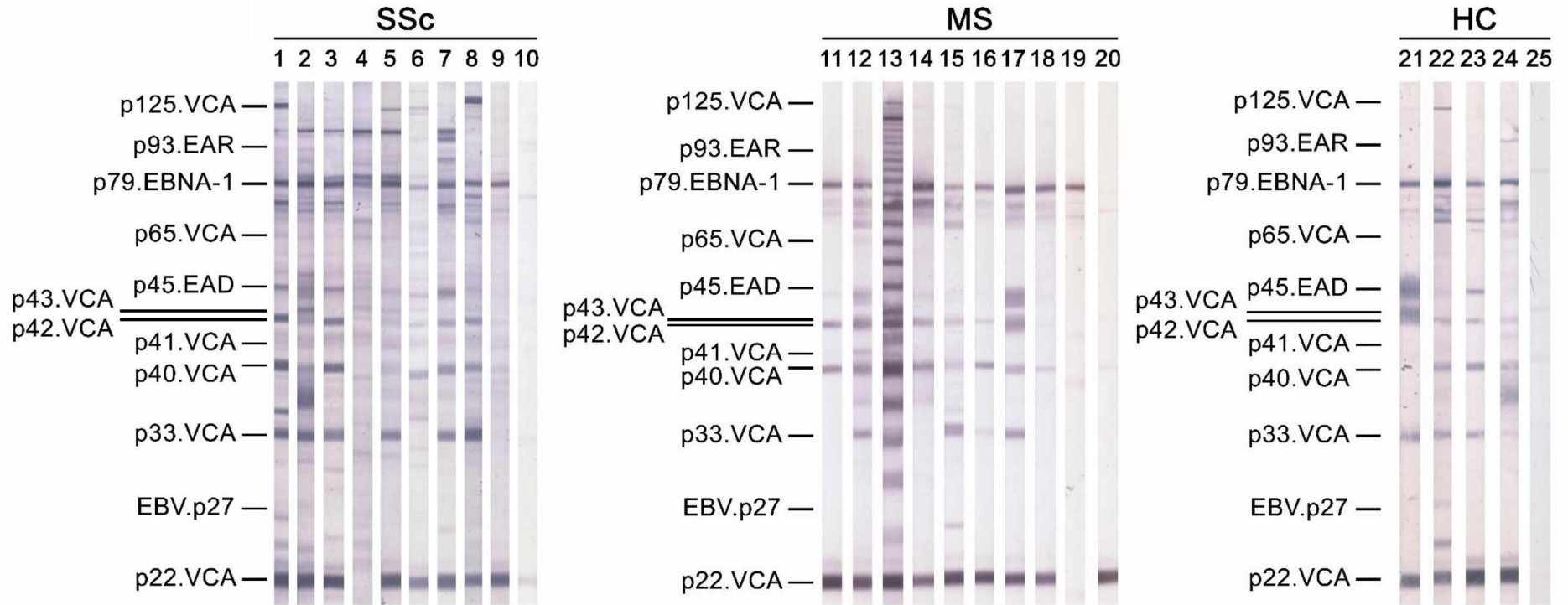
6.3.2 Συχνότητες IgG αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων σε ασθενείς με SSc

Η παρουσία αντισωμάτων έναντι χαρακτηρισμένων αντιγόνων του EBV εξετάστηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αντιγόνα αυτά ήταν το p125.VCA, το p93.EAR, το p79.EBNA-1, το p65.VCA, το p45.EAD, το p43.EAD, το p42.VCA, το p41.VCA, το p40.VCA, το p33.VCA, το EBV.p27 και το p22.VCA. Η Εικόνα 6.2 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western από 25 αντιπροσωπευτικά δείγματα (10 SSc, 10 MS και 10 HC), ενώ ο Πίνακας 6.3 παρουσιάζει τις συχνότητες εμφάνισης των αντισωμάτων σε ασθενείς και δείγματα ελέγχου. Και τα 12 αντιγόνα του EBV αναγνωρίζονταν σε ποικίλες συχνότητες σε ασθενείς και σε μάρτυρες. Στην SSc, τα πιο ανοσοεπικρατή ήταν τα p79.EBNA-1 (89.8%), p22.VCA (88.1%), p33.VCA (72.9%), p42.VCA (67.8%) και p40.VCA (55.9%).

Τα αντισώματα που βρέθηκαν πιο συχνά σε ασθενείς με SSc συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες ήταν τα αντι-p79.EBNA-1 (89.8% έναντι 68.6%, $p=0.012$), τα αντι-p45.EAD (42.4% έναντι 0%, $p<0.001$) και τα αντι-p33.VCA (72.9% έναντι 42.8%, $p=0.0012$). Οι αντιδραστικότητες έναντι των υπόλοιπων 9 αντιγόνων του EBV ήταν συγκρίσιμη ανάμεσα στους ασθενείς με SSc και τους υγιείς μάρτυρες.

Στη σύγκριση μεταξύ SSc και MS, αυξημένη συχνότητα στο SSc είχαν τα αντι-p45.EAD (42.4% έναντι 16.3%, $p=0.010$), τα αντι-p42.VCA (67.8% έναντι 14%, $p<0.001$) και τα αντι-p33.VCA (72.9% έναντι 37.2%, $p=0.001$). Αντίθετα, χαμηλότερη συχνότητα στο SSc είχαν τα αντι-p43.EAD (10.2% έναντι 53.5%, $p<0.001$). Οι αντιδραστικότητες έναντι των υπόλοιπων 8 αντιγόνων του EBV ήταν συγκρίσιμη ανάμεσα στους ασθενείς με SSc και με MS.

Εικόνα 6.2: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για αντισώματα έναντι αντιγόνων του EBV σε 35 αντιπροσωπευτικά δείγματα, 10 από ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), 10 από ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS) και 5 από υγιή δείγματα ελέγχου (HC).



Πίνακας 6.3: Συχνότητες εμφάνισης των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς και υγιή δείγματα ελέγχου

Αντιδρώσα ζώνη	SSc (n=59)	dcSSc (n=31)	lcSSc (n=28)	MS (n=43)	RRMS (n=30)	SPMS (n=13)	HC (n=32)	P SSc vs HC	P SSc vs MS	P dcSSc vs lcSSc	P dcSSc vs HC	P lcSSc vs HC	P SSc vs RRMS	P SSc vs SPMS	P dcSSc vs MS	P dcSSc vs RRMS	P dcSSc vs SPMS	P lcSSc vs MS	P lcSSc vs RRMS	P lcSSc vs SPMS	P MS vs HC	P RRMS vs SPMS	P RRMS vs HC	P SPMS vs HC	
p125.VCA	10 (16.9%)	4 (12.9%)	6 (21.4%)	3 (7%)	1 (3.3%)	2 (15.4%)	1 (3.1%)	ns	ns	ns	ns	0.073	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.087	ns	ns	ns	ns	
p93.EAR	4 (6.8%)	4 (12.9%)	0	0	0	0	1 (3.1%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.057	ns	ns	N/A	N/A	N/A	ns	N/A	ns	ns	
p79.EBNA-1	53 (89.8%)	27 (87.1%)	26 (92.9%)	40 (93%)	27 (90%)	13 (100%)	22 (68.6%)	0.012	ns	ns	ns	0.045	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.015	ns	0.082	0.059
p65.VCA	5 (8.5%)	2 (6.5%)	3 (10.7%)	5 (11.6%)	3 (10%)	2 (15.4%)	0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
p45.EAD	25 (42.4%)	11 (35.5%)	14 (50%)	7 (16.3%)	6 (20%)	1 (7.7%)	0	<0.001	0.010	ns	0.001	<0.001	0.063	0.042	ns	ns	ns	ns	0.005	0.034	0.023	0.046	ns	0.026	ns
p43.EAD	6 (10.2%)	5 (16.1%)	1 (3.6%)	23 (53.5%)	17 (56.7%)	6 (46.2%)	1 (3.1%)	ns	<0.001	ns	ns	ns	<0.001	0.006	0.002	0.002	0.086	<0.001	<0.001	0.003	<0.001	ns	<0.001	0.002	
p42.VCA	40 (67.8%)	20 (64.5%)	20 (71.4%)	6 (14%)	3 (10%)	3 (23.1%)	16 (50%)	ns	<0.001	ns	ns	ns	<0.001	0.008	<0.001	<0.001	0.029	<0.001	<0.001	0.010	0.002	ns	0.002	ns	
p41.VCA	7 (11.9%)	5 (16.1%)	2 (7.1%)	4 (9.3%)	1 (3.3%)	3 (23.1%)	0	ns	ns	ns	0.057	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.031	
p40.VCA	33 (55.9%)	19 (61.3%)	14 (50%)	30 (69.8%)	19 (63.3%)	11 (84.6%)	16 (50%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<0.001	ns	ns	ns	ns	ns	0.077	ns	ns	ns	0.070	
p33.VCA	43 (72.9%)	16 (51.6%)	27 (96.4%)	16 (37.2%)	9 (30%)	7 (53.8%)	14 (42.8%)	0.012	0.001	<0.001	ns	<0.001	<0.001	ns	ns	ns	ns	<0.001	<0.001	0.003	ns	ns	ns	ns	
EBV.p27	1 (1.7%)	0	1 (3.6%)	0	0	0	0	ns	ns	ns	N/A	ns	ns	ns	N/A	N/A	N/A	ns	ns	1.000	N/A	N/A	N/A	N/A	
p22.VCA	52 (88.1%)	26 (83.9%)	26 (92.9%)	42 (97.7%)	29 (96.7%)	13 (100%)	30 (93.8%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.086	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 31 ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 28 ασθενείς με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 43 ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), συμπεριλαμβάνοντας 30 ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και 13 ασθενείς με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS), 32 υγιή δείγματα ελέγχου (HC), όπως ανιχνεύθηκαν με από ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ² του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική

σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντομεύσεις: EAD, early antigen D; EAR, early antigen R; EBNA-1, EBV nuclear antigen 1; N/A, not available; ns, not significant; VCA, viral capsid antigen.

Διαφορές εντοπίστηκαν και μεταξύ των ασθενών με MS και των υγιών μαρτύρων. Πιο συχνά στην MS ήταν τα αντι-p79.EBNA-1 (93% έναντι 68.6%, $p=0.015$), τα αντι-p45.EAD (16.3% έναντι 0%, $p=0.046$) και τα αντι-p43.EAD (53.5% έναντι 3.1%, $p<0.001$), ενώ πιο συχνά τους HC ήταν τα αντι-p42.VCA (14% έναντι 50%, $p=0.002$).

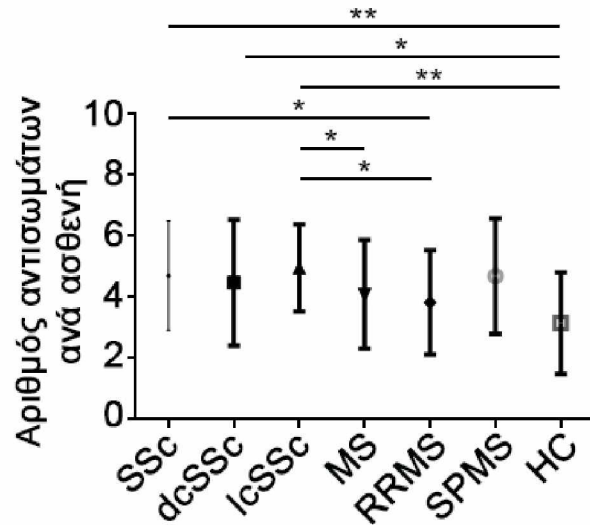
Όταν οι ασθενείς με SSc διαχωρίστηκαν σε dcSSc και lcSSc, η σύγκριση ανάμεσα τους αποκάλυψε ότι τα αντι-p33.VCA εμφανίζονταν πιο συχνά στους ασθενείς με lcSSc παρά σε ασθενείς με dcSSc (96.4% έναντι 51.6%, $p<0.001$). Ανάμεσα σε ασθενείς με dcSSc και σε υγιείς μάρτυρες, μονάχα τα αντι-p45.EAD αντισώματα ήταν πιο συχνά στους dcSSc (35.5% έναντι 0%, $p=0.001$). Ανάμεσα σε ασθενείς με lcSSc και σε υγιείς μάρτυρες, μεγαλύτερη συχνότητα στους lcSSc είχαν τα αντισώματα έναντι του p79.EBNA-1 (92.9% έναντι 68.6%, $p=0.045$), τα αντισώματα έναντι του p45.EAD (50% έναντι 0%, $p<0.001$) και τα αντισώματα έναντι του p33.VCA (96.4% έναντι 42.8%, $p<0.001$). Ανάμεσα σε ασθενείς με dcSSc και σε ασθενείς με MS, τα αντι-p42.VCA αντισώματα ήταν πιο συχνά στη dcSSc (64.5% έναντι 14%, $p<0.001$), ενώ τα αντι-p43.EAD ήταν λιγότερο συχνά στην dcSSc (16.1% έναντι 53.5%, $p=0.002$). Τέλος, ανάμεσα σε ασθενείς με lcSSc και σε ασθενείς με MS, πιο συχνά στην lcSSc ήταν τα αντι-p45.EAD (50% έναντι 16.3%, $p=0.005$), τα αντι-p42.VCA (71.4% έναντι 14%, $p<0.001$) και τα αντι-p33.VCA (96.4% έναντι 37.2%, $p<0.001$), ενώ λιγότερο συχνά στην lcSSc ήταν τα αντι-p43.EAD (3.6% έναντι 52.5%, $p<0.001$). Για τα υπόλοιπα αντιγονοειδικά αντισώματα δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συχνότητες ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες.

Η ανάλυση του συνολικού αριθμού αντισωμάτων ανά ασθενή αποκάλυψε ότι οι ασθενείς με SSc, είτε dcSSc ή lcSSc είχαν περισσότερες αντιδραστικότητες έναντι αντιγόνων του EBV από τους υγιείς μάρτυρες και από τους ασθενείς με MS, με τη

διαφορά με τους υγιείς μάρτυρες να είναι στατιστικά σημαντική, ενώ αυτή με τους MS να έχει τάση για σημαντικότητα (SSc: 4.7 ± 1.8 μπάντες ανά ασθενή, dcSSc: 4.5 ± 2.1 , lcSSc: 5 ± 1.4 , MS: 4.1 ± 1.8 , HC: 3.2 ± 1.7 : SSc έναντι HC, $p < 0.001$: SSc έναντι MS, $p = 0.088$: dcSSc έναντι HC, $p = 0.007$: lcSSc έναντι HC, $p < 0.001$) (Εικόνα 6.3 και Πίνακας 6.4). Οι ασθενείς με MS είχαν επίσης περισσότερα αντισώματα σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες ($p = 0.022$).

Ακόμα, όταν οι ασθενείς και οι μάρτυρες ταξινομήθηκαν σε 4 κατηγορίες με βάση το συνολικό αριθμό των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV (0-2 αντισώματα, 3 ή 4 αντισώματα, 5 ή 6 αντισώματα, 7 ή 8 αντισώματα), προέκυψε ότι οι ασθενείς με SSc, dcSSc και lcSSc είχαν υψηλότερες συχνότητες στις κατηγορίες των αυξημένων αντιδραστικότητων (Εικόνα 6.4 και Πίνακας 6.5).

Εικόνα 6.3: Αριθμός αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV ανά ασθενή



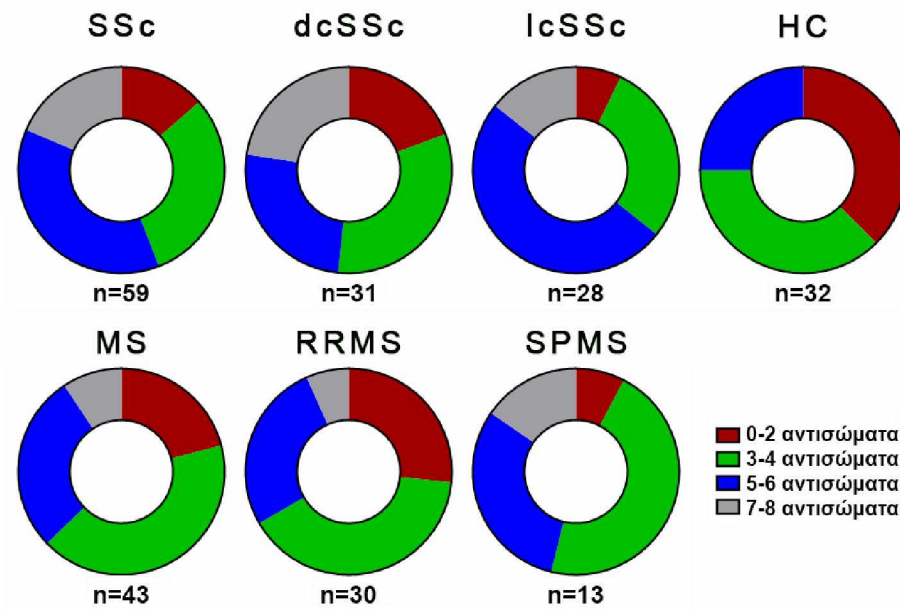
Αριθμός αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV ανά ασθενή όπως ανιχνεύθηκαν με από ανοσοαποτύπωση κατά Western, στον ορό των 59 ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 31 ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 28 ασθενείς με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), των 43 ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), συμπεριλαμβάνοντας 30 ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και 13 ασθενείς με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS), καθώς και των 32 υγείων δειγμάτων ελέγχου (HC). Οι γραμμές αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση ($mean \pm standard deviation$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Πίνακας 6.4: Αριθμός αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV ανά ασθενή

	SSc (n=59)	dcSSc (n=31)	lcSSc (n=28)	MS (n=43)	RRMS (n=30)	SPMS (n=13)	HC (n=32)	P SSc vs HC	P SSc vs MS	P dcSSc vs lcSSc	P dcSSc vs HC	P lcSSc vs HC	P SSc vs RRMS	P SSc vs SPMS	P dcSSc vs MS	P dcSSc vs RRMS	P dcSSc vs SPMS	P lcSSc vs MS	P lcSSc vs RRMS	P MS vs HC	P RRMS vs SPMS	P RRMS vs HC	P SPMS vs HC	
Αριθμός αντισωμάτων ανά ασθενή	4.7 ± 1.8	4.5 ± 2.1	5 ± 1.4	4.1 ± 1.8	3.8 ± 1.7	4.7 ± 1.9	3.2 ± 1.7	<0.001	0.088	ns	0.007	<0.001	0.027	ns	ns	ns	ns	0.026	0.008	ns	0.022	ns	ns	0.019

Αριθμός αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV ανά ασθενή, όπως ανιχνεύθηκαν με από ανοσοαποτύπωση κατά Western, στον ορό των 59 ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 31 ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 28 ασθενείς με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), των 43 ασθενών με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), συμπεριλαμβάνοντας 30 ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και 13 ασθενείς με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS), καθώς και των 32 υγείων δειγμάτων ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean ± standard deviation). Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή. Συντομογραφία: ns, not significant.

Εικόνα 6.4: Διαγράμματα δακτυλίου που απεικονίζουν την παρουσία πολλαπλών αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV



Παρουσία πολλαπλών αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και ασθενείς με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), συμπεριλαμβάνοντας ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και ασθενείς με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS), καθώς και σε υγιή δείγματα ελέγχου (HC), όπως ανιχνεύθηκαν με από ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Πίνακας 6.5: Συχνότητες παρουσίας πολλαπλών αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων

	SSc (n=59)	dcSSc (n=31)	lcSSc (n=28)	MS (n=43)	RRMS (n=30)	SPMS (n=13)	HC (n=32)	p SSc vs HC	p SSc vs MS	p dcSSc vs lcSSc	p dcSSc vs HC	p lcSSc vs HC	p SSc vs RRMS	p SSc vs SPMS	p dcSSc vs MS	p dcSSc vs RRMS	p dcSSc vs SPMS	p lcSSc vs MS	p lcSSc vs RRMS	p lcSSc vs SPMS	p MS vs HC	p RRMS vs SPMS	p RRMS vs HC	p SPMS vs HC
0-2 αντισώματα	8 (13.6%)	6 (19.4%)	2 (7.1%)	9 (20.9%)	8 (26.7%)	1 (7.7%)	12 (37.5%)	0.005	ns	ns	0.027	0.004	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.084	ns	ns	ns	ns	0.045
3-4 αντισώματα	18 (30.5%)	10 (32.3%)	8 (28.6%)	18 (41.9%)	12 (40%)	6 (46.2%)	12 (37.5%)																	
5-6 αντισώματα	22 (37.3%)	8 (25.8%)	14 (50%)	12 (27.9%)	8 (26.7%)	4 (30.8%)	8 (25%)																	
7-8 αντισώματα	11 (18.6%)	7 (22.6%)	4 (14.3%)	4 (9.3%)	2 (6.7%)	2 (6.7%)	0																	

Συχνότητες παρουσίας πολλαπλών αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων, σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και ασθενείς με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), συμπεριλαμβάνοντας ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και ασθενείς με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS), καθώς και σε υγιή δείγματα ελέγχου (HC), όπως ανιχνεύθηκαν με από ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) για πίνακα 4 x 2. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντόμηση: ns, not significant.

6.3.3 Τίτλοι IgG αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων σε ασθενείς με SSc

Τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.6 και απεικονίζονται στην Εικόνα 6.5. Ανάμεσα στους ασθενείς με SSc και τους υγιείς μάρτυρες, μονάχα τα αντι-p22.VCA αντισώματα είχαν διαφορά, με χαμηλότερους τίτλους στην SSc (89.8 ± 17.2 έναντι 89.8 ± 17.2 , $p=0.008$). Η διαφορά αυτή παρέμεινε και στους δύο κλινικούς φαινοτύπους της SSc (dcSSc: 92.9 ± 19.1 , lcSSc: 86.7 ± 14.8 · dcSSc έναντι HC, $p=0.071$ · lcSSc έναντι HC, $p<0.001$). Ακόμα, οι ασθενείς με lcSSc είχαν χαμηλότερους τίτλους των αντι-p79.EBNA-1 αντισωμάτων σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (65.5 ± 16.7 έναντι 78.1 ± 26.2 , $p=0.025$).

Σε σύγκριση με τους MS, οι ασθενείς με SSc είχαν υψηλότερους τίτλων των αντισωμάτων έναντι του p125.VCA (53.5 ± 18.9 έναντι 30.3 ± 5.8 , $p=0.006$) και του p33.VCA (64.3 ± 20.2 έναντι 51.7 ± 18.9 , $p=0.033$), ενώ είχαν χαμηλότερους τίτλους των αντισωμάτων έναντι του p79.EBNA-1 (67.8 ± 18.9 έναντι 79 ± 28.4 , $p=0.043$), του p40.VCA (53.8 ± 20 έναντι 66.1 ± 25.7 , $p=0.040$) και του p22.VCA (89.8 ± 17.2 έναντι 131.6 ± 17.5 , $p<0.001$).

Κάποιες από αυτές τις διαφορές παρέμειναν όταν οι ασθενείς με SSc ταξινομήθηκαν σε dcSSc και lcSSc. Πιο συγκεκριμένα, τόσο οι ασθενείς με dcSSc, όσο οι ασθενείς με lcSSc, είχαν χαμηλότερους τίτλους των αντι-p22.VCA αντισωμάτων σε σύγκριση με την MS (dcSSc: 92.9 ± 19.1 , lcSSc: 86.7 ± 14.8 · dcSSc έναντι MS, $p<0.001$ · lcSSc έναντι MS, $p<0.001$). Επίσης, οι ασθενείς με lcSSc είχαν χαμηλότερα επίπεδα των αντι-p125.VCA αντισωμάτων σε σύγκριση με την MS (45 ± 5.7 έναντι 30.3 ± 5.8 , $p=0.022$), αλλά είχαν χαμηλότερα επίπεδα των αντι-p79.EBNA-1 (65.5 ± 16.7 έναντι 79 ± 28.4 , $p=0.040$) και των αντι-p40.VCA (52.6 ± 16.6 έναντι 66.1 ± 25.7 , $p=0.043$).

Για την εκτίμηση του συνολικού μεγέθους της χυμικής αντίδρασης στους ασθενείς και στους μάρτυρες, αυτοί κατατάχθηκαν σε δύο κατηγορίες με βάση την παρουσία

τουλάχιστον ενός αντισώματος με τίτλο μεγαλύτερο από 100 AU (Πίνακας 6.7). Η συχνότητα των ασθενών με SSc με τουλάχιστον μία αντιδραστικότητα μεγαλύτερη του ορίου ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με τους ασθενείς με MS και με τους υγιείς μάρτυρες (SSc: 30.5%; MS: 93%; HC: 61.3%· SSc έναντι HC, $p=0.005$ · SSc έναντι MS, $p<0.001$). Οι διαφορές αυτές παρέμειναν σχεδόν πάντα όταν οι ασθενείς με SSc χωρίστηκαν σε dcSSc και lcSSc (dcSSc: 38.7%, lcSSc: 21.4%· dcSSc έναντι HC, p =μη σημαντικό· lcSSc έναντι HC, $p=0.005$ · dcSSc έναντι MS, $p<0.001$ · lcSSc έναντι MS, $p<0.001$).

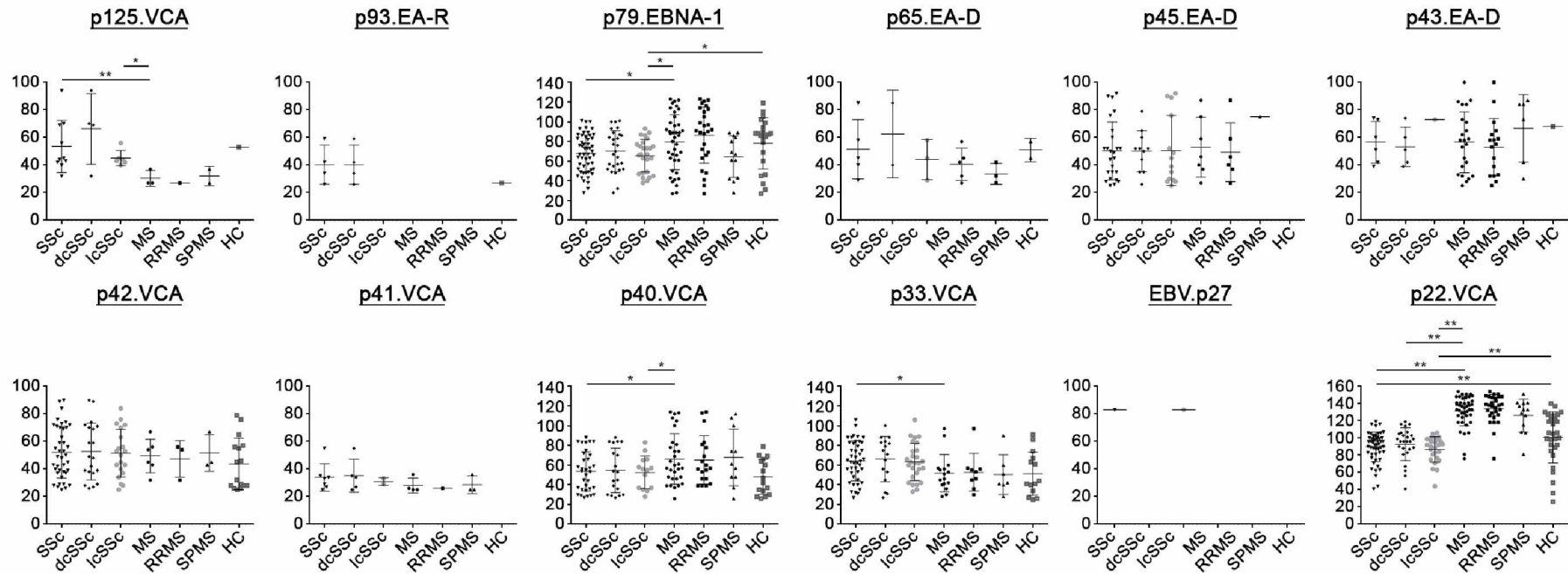
Αρκετές συσχετίσεις εντοπίστηκαν ανάμεσα στους τίτλους διαφορετικών αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων των ασθενών με SSc, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.8.

Πίνακας 6.6: Τίτλοι αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV σε ασθενείς και υγιή δείγματα ελέγχου με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Αντιγόνο	SSc (n=59)	dcSSc (n=31)	lcSSc (n=28)	MS (n=43)	RRMS (n=30)	SPMS (n=13)	HC (n=32)	P SSc vs HC	P SSc vs MS	P dcSSc vs lcSSc	P dcSSc vs HC	P lcSSc vs HC	P SSc vs RRMS	P SSc vs SPMS	P dcSSc vs RRMS	P dcSSc vs SPMS	P lcSSc vs RRMS	P lcSSc vs SPMS	P MS vs HC	P RRMS vs SPMS	P RRMS vs HC	P SPMS vs HC			
p125.VCA	53.5 ± 18.9	66.3 ± 25.6	45 ± 5.7	30.3 ± 5.8	27	32 ± 7.1	53	ns	0.006	ns	ns	ns	ns	0.042	0.064	ns	0.072	0.022	ns	ns	ns	ns	ns		
p93.EAR	40.3 ± 14.1	40.3 ± 14.1	N/A	N/A	N/A	N/A	27	ns	N/A	N/A	ns	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		
p79.EBNA-1	67.8 ± 18.9	70.1 ± 20.8	65.5 ± 16.7	79 ± 28.4	86.3 ± 29.1	64.5 ± 21	78.1 ± 26.2	ns	0.043	ns	ns	0.025	0.003	ns	ns	0.024	ns	0.040	0.004	ns	ns	0.012	ns	ns	
p65.VCA	51.4 ± 21.5	62.5 ± 31.8	44 ± 14.5	40.6 ± 11.7	33.7 ± 7.6	51 ± 8.5	N/A	N/A	ns	ns	N/A	N/A	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	N/A	ns	N/A	N/A	
p45.EAD	50.3 ± 21	50 ± 15	50.5 ± 25.4	53 ± 21.7	49.3 ± 21.3	75	N/A	N/A	ns	ns	N/A	N/A	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	N/A	ns	N/A	N/A	
p43.EAD	56.5 ± 15.1	53.2 ± 14.2	73	56.6 ± 22.1	53 ± 20.7	66.7 ± 24.5	68	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
p42.VCA	52.1 ± 18.8	52.8 ± 20.6	51.5 ± 17.2	49.5 ± 12.1	47.3 ± 13.3	51.7 ± 13.3	43.8 ± 18.8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
p41.VCA	34 ± 10	35.2 ± 11.9	31 ± 2.8	28 ± 5.4	26	28.7 ± 6.4	-	N/A	ns	ns	N/A	N/A	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	N/A	ns	N/A	N/A	
p40.VCA	53.8 ± 20	54.7 ± 22.6	52.6 ± 16.6	66.1 ± 25.7	65.2 ± 24.5	67.7 ± 28.9	48.1 ± 17.8	ns	0.040	ns	ns	ns	0.096	ns	ns	ns	ns	ns	0.043	0.089	ns	0.008	ns	0.023	0.062
p33.VCA	64.3 ± 20.2	66.2 ± 22.9	63.1 ± 18.8	51.7 ± 18.9	52.8 ± 19	50.3 ± 20.1	51.4 ± 22.2	0.068	0.033	ns	0.084	ns	ns	ns	0.061	ns	ns	0.063	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
EBV.p27	83	N/A	83	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
p22.VCA	89.8 ± 17.2	92.9 ± 19.1	86.7 ± 14.8	131.6 ± 17.5	134.1 ± 16.4	126.2 ± 19.2	100.8 ± 29.7	0.008	<0.001	ns	0.071	0.006	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	ns	<0.001	0.002

59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 31 ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 28 ασθενείς με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 43 ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), συμπεριλαμβάνοντας 30 ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και 13 ασθενείς με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS), 32 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean ± standard deviation). Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (Mann-Whitney test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα (p<0.1). Συνομεύσεις: EAD, early antigen D` EAR, early antigen R` EBNA-1, EBV nuclear antigen 1` N/A, not available` ns, not significant` VCA, viral capsid antigen.

Εικόνα 6.5: Διαγράμματα διασποράς που απεικονίζουν τους τίτλους των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV με ανοσοαποτύπωση κατά Western



59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 31 ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 28 ασθενείς με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 43 ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), συμπεριλαμβάνοντας 30 ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και 13 ασθενείς με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS), 32 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Οι γραμμές αναπαριστούν τη διάμεσο τιμή με το εύρος. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Πίνακας 6.7: Συχνότητες περιπτώσεων με τουλάχιστον ένα (≥ 1) αντιγονοειδικό EBV αντίσωμα με τίτλο μεγαλύτερο από 100 arbitrary units (AU)

	SSc (n=59)	dcSSc (n=31)	lcSSc (n=28)	MS (n=43)	RRMS (n=30)	SPMS (n=13)	HC (n=32)	P SSc vs HC	P SSc vs MS	P dcSSc vs lcSSc	P dcSSc vs HC	P lcSSc vs HC	P SSc vs RRMS	P SSc vs SPMS	P dcSSc vs MS	P dcSSc vs RRMS	P dcSSc vs SPMS	P lcSSc vs MS	P lcSSc vs RRMS	P lcSSc vs SPMS	P MS vs HC	P RRMS vs SPMS	P RRMS vs HC	P SPMS vs HC
≥ 1 αντίσωμα με τίτλο > 100 AU	18 (30.5%)	12 (38.7%)	6 (21.4%)	40 (93%)	28 (93.3%)	12 (92.3%)	19 (61.3%)	0.009	<0.001	0.073	ns	0.005	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	0.002	ns	0.008	0.068

59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 31 ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 28 ασθενείς με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 43 ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), συμπεριλαμβάνοντας 30 ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και 13 ασθενείς με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS), 32 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντόμηση: ns, not significant.

Πίνακας 6.8: Συσχετίσεις ανάμεσα στους τίτλους των αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV αναμεταξύ στους 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc).

		p125.VCA	p93.EAR	p79.EBNA	p65.VCA	p45.EAD	p43.EAD	p42.VCA	p41.VCA	p40.VCA	p33.VCA	EBV.p27	p22.VCA
p125.VCA	R	1				0.348					0.482		
	p		ns	ns	ns	0.007	ns	ns	ns	ns	0.000	ns	ns
p93.EAR	R		1	-0.258							-0.341		
	p			0.049	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.008	ns	ns
p79.EBNA	R			1		0.230		0.265	0.373	0.332	0.309		0.290
	p				ns	0.079	ns	0.042	0.004	0.010	0.017	ns	0.026
p65.VCA	R				1	0.288							
	p					0.027	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
p45.EAD	R					1	0.319	0.319			0.431		
	p						0.014	0.014	ns	ns	0.001	ns	ns
p43.EAD	R						1						
	p							ns	ns	ns	ns	ns	ns
p42.VCA	R							1		0.567	0.349		
	p								ns	0.000	0.007	ns	ns
p41.VCA	R								1				
	p									ns	ns	ns	ns
p40.VCA	R									1	0.329		0.258
	p										0.011	ns	0.048
p33.VCA	R										1		
	p											ns	ns
EBV.p27	R											1	-0.236
	p												0.072
p22.VCA	R												1
	p												

Τα δεδομένα αναπαριστούν το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson (R). Το p είναι η τιμή p (2 tailed) της συσχέτισης. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντομεύσεις: EAD, early antigen D; EAR, early antigen R; EBNA-1, EBV nuclear antigen 1; ns, not significant; VCA, viral capsid antigen.

6.3.4 Συσχετίσεις των αντιγονοειδικών EBV ανοσολογικών αποκρίσεων

Αρκετές συσχετίσεις βρέθηκαν ανάμεσα στις αντιγονοειδικές EBV ανοσοαποκρίσεις και σε κλινικά χαρακτηριστικά της SSc (Πίνακες 6.9 έως 6.16), συμπεριλαμβάνοντας την πνευμονική ίνωση, την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, τα δακτυλικά έλκη, την αρθρίτιδα, την ορογονίτιδα, τις τελαγγειεκτασίες, τη δερματική ασβέστωση και τη νεφρική συμμετοχή, καθώς και σε ανοσολογικά χαρακτηριστικά της SSc, συμπεριλαμβάνοντας τα αντισώματα έναντι των SSc-ειδικών αυτοαντιγόνων Scl-70, CENPA, CENPB, RNAp11 και RNAp155 (Πίνακας 6.17).

Ανάμεσα στους 59 ασθενείς με SSc, όσοι είχαν πνευμονική ίνωση είχαν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης των αντι-p93.EAR αντισωμάτων σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς πνευμονική ίνωση (17.4% έναντι 0%, $p=0.039$). Οι ασθενείς με αρθρίτιδα είχαν υψηλότερους τίτλους των αντι-p33.VCA αντισωμάτων (74.3 ± 15.3 έναντι 60.8 ± 29.7 , $p=0.032$) και οι ασθενείς με νεφρική συμμετοχή υψηλότερους τίτλους των αντι-p42.VCA αντισωμάτων (87 ± 2.4 έναντι 50.3 ± 17.3 , $p=0.002$). Επί παρουσίας τελαγγεικτασιών, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του p42.VCA (56.4 ± 19.1 έναντι 43.2 ± 15 , $p=0.025$) και του p40.VCA (60.7 ± 21 έναντι 45.6 ± 15.7 , $p=0.025$). Επίσης, επί παρουσίας ασβέστωσης, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του p45.EAD (65.8 ± 15.9 έναντι 45.4 ± 20.3 , $p=0.027$) και του p22.VCA (102.6 ± 10.5 έναντι 87.5 ± 17.2 , $p=0.005$). Αντίθετα, οι ασθενείς με δακτυλικά έλκη είχαν χαμηλότερη συχνότητα, αλλά και τίτλους των αντι-p79.EBNA-1 αντισωμάτων σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς έλκη (80% έναντι 100%, $p=0.035$; 61.9 ± 16.9 έναντι 72.8 ± 19.2 , $p=0.032$).

Από την ανάλυση των συσχετίσεων μεταξύ των τίτλων των αντι-EBV αντισωμάτων και των αυτοαντισωμάτων προέκυψε μια χαμηλή, αλλά σημαντική, συσχέτιση ανάμεσα στα αντι-p93.EAR αντισώματα και τα αντι-Scl-70 στους 59 ασθενείς με SSc ($R=0.361$,

$p=0.005$). Η συσχέτιση αυτή παρέμεινε όταν έγινε διόρθωση ως προς την ηλικία και το φύλλο με πολλαπλή παλινδρόμηση (Πίνακας 6.17). Επιπρόσθετα, η συσχέτιση αυτή έγινε πιο δυνατή όταν η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μονάχα στους ασθενείς με dcSSc ($R=0.459$, $p=0.009$), όχι όμως και στους ασθενείς με lcSSc. Εντούτοις, στους ασθενείς με lcSSc παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στα αντι-p93.EAR και στα δύο αυτοαντισώματα έναντι της RNA πολυμεράσης, δηλαδή τα αντι-RNApol11 και αντι-RNApol155 ($R=0.444$, $p=0.018$ και $R=0.430$, $p=0.022$, αντίστοιχα).

Πίνακας 6.9: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση την παρουσία πνευμονικής ίνωσης.

	Με πνευμονική ίνωση (n=23)	Χωρίς πνευμονική ίνωση (n=36)	p
αντι-p125.VCA συχνότητα	4 (17.4%)	6 (16.7%)	ns
αντι-p125.VCA τίτλοι	46 ± 16.6	58.5 ± 20	ns
αντι-p93.EAR συχνότητα	4 (17.4%)	0	0.039*
αντι-p93.EAR τίτλοι	40.3 ± 14.1	N/A	N/A
αντι-p79.EBNA συχνότητα	20 (87%)	33 (91.7%)	ns
αντι-p79.EBNA τίτλοι	69.2 ± 22.1	67 ± 16.9	ns
αντι-p65.VCA συχνότητα	2 (8.7%)	3 (8.3%)	ns
αντι-p65.VCA τίτλοι	62.5 ± 31.8	44 ± 14.5	ns
αντι-p45.EAD συχνότητα	12 (52.2%)	13 (36.1%)	ns
αντι-p45.EAD τίτλοι	47.3 ± 15.2	53.1 ± 25.6	ns
αντι-p43.EAD συχνότητα	5 (21.7%)	1 (2.8%)	0.056*
αντι-p43.EAD τίτλοι	53.2 ± 14.2	73	ns
αντι-p42.VCA συχνότητα	15 (65.2%)	25 (69.4%)	ns
αντι-p42.VCA τίτλοι	49.4 ± 17.9	53.7 ± 19.4	ns
αντι-p41.VCA συχνότητα	3 (13%)	4 (11.1%)	ns
αντι-p41.VCA τίτλοι	31.3 ± 5.5	36 ± 12.9	ns
αντι-p40.VCA συχνότητα	14 (60.9%)	19 (52.8%)	ns
αντι-p40.VCA τίτλοι	58.4 ± 22.2	50.5 ± 18.1	ns
αντι-p33.VCA συχνότητα	14 (60.9%)	29 (80.6%)	ns
αντι-p33.VCA τίτλοι	67.4 ± 21	62.8 ± 20	ns
αντι-EBV.p27 συχνότητα	0	1 (2.8%)	ns
αντι-EBV.p27 τίτλοι	-	83	N/A
αντι-p22.VCA συχνότητα	21 (91.3%)	31 (86.1%)	ns
αντι-p22.VCA τίτλοι	95 ± 17.8	86.3 ± 16.1	0.081**

Οι συχνότητες αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τίτλοι αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (*mean ± standard deviation*). *Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (*Pearson's Chi-Square*) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (*Yates Correction for Continuity*), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (*Fisher's Exact Test*). **Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (*Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed*), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (*Mann-Whitney test*). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντομεύσεις: EAD, early antigen D; EAR, early

antigen R EBNA-1, EBV nuclear antigen 1 N/A, not available ns, not significant
VCA, viral capsid antigen.

Πίνακας 6.10: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση την παρουσία πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης.

	Με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (n=5)	Χωρίς πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (n=54)	p
αντι-p125.VCA συχνότητα	1 (20%)	9 (16.7%)	ns
αντι-p125.VCA τίτλοι	70	51.7 ± 19.1	ns
αντι-p93.EAR συχνότητα	1 (20%)	3 (5.6%)	ns
αντι-p93.EAR τίτλοι	26	45 ± 12.8	ns
αντι-p79.EBNA συχνότητα	5 (100%)	48 (88.9%)	ns
αντι-p79.EBNA τίτλοι	60.2 ± 10.1	68.6 ± 19.4	ns
αντι-p65.VCA συχνότητα	0/5	5 (9.3%)	ns
αντι-p65.VCA τίτλοι	0	51.4 ± 21.5	ns
αντι-p45.EAD συχνότητα	1 (20%)	24 (44.4%)	ns
αντι-p45.EAD τίτλοι	79	49.1 ± 20.6	ns
αντι-p43.EAD συχνότητα	1 (20%)	5 (.3%)	ns
αντι-p43.EAD τίτλοι	74	53 ± 13.9	ns
αντι-p42.VCA συχνότητα	2 (40%)	38 (70.4%)	ns
αντι-p42.VCA τίτλοι	40.5 ± 2.1	52.7 ± 19	ns
αντι-p41.VCA συχνότητα	1 (20%)	6 (11.1%)	ns
αντι-p41.VCA τίτλοι	27	35.2 ± 10.4	ns
αντι-p40.VCA συχνότητα	2 (40%)	31 (57.4%)	ns
αντι-p40.VCA τίτλοι	42 ± 17	54.6 ± 20.2	ns
αντι-p33.VCA συχνότητα	2 (40%)	41 (75.9%)	ns
αντι-p33.VCA τίτλοι	66 ± 18.4	64.2 ± 20.5	ns
αντι-EBV.p27 συχνότητα	0	1 (1.9%)	ns
αντι-EBV.p27 τίτλοι	N/A	83	N/A
αντι-p22.VCA συχνότητα	5 (100%)	47 (87%)	ns
αντι-p22.VCA τίτλοι	86.4 ± 26	90.2 ± 16.4	ns

Οι συχνότητες αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τίτλοι αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (*mean ± standard deviation*). Συντομεύσεις: EAD, early antigen D; EAR, early antigen R; EBNA-1, EBV nuclear antigen 1; N/A, not available; ns, not significant; VCA, viral capsid antigen.

Πίνακας 6.11: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση την παρουσία δακτυλικών ελκών.

	Με δακτυλικά έλκη (n=30)	Χωρίς δακτυλικά έλκη (n=29)	p
αντι-p125.VCA συχνότητα	4 (13.3%)	6 (20.7%)	ns
αντι-p125.VCA τίτλοι	50.3 ± 13.2	55.7 ± 22.9	ns
αντι-p93.EAR συχνότητα	3 (10%)	1 (3.4%)	ns
αντι-p93.EAR τίτλοι	34 ± 8	59	ns
αντι-p79.EBNA συχνότητα	24 (80%)	29 (100%)	0.035*
αντι-p79.EBNA τίτλοι	61.9 ± 16.9	72.8 ± 19.2	0.032**
αντι-p65.VCA συχνότητα	4 (13.3%)	1 (3.4%)	ns
αντι-p65.VCA τίτλοι	49.8 ± 24.4	58	ns
αντι-p45.EAD συχνότητα	11 (36.7%)	14 (48.3%)	ns
αντι-p45.EAD τίτλοι	53.5 ± 24.3	47.8 ± 18.6	ns
αντι-p43.EAD συχνότητα	3 (10%)	3 (10.3%)	ns
αντι-p43.EAD τίτλοι	55.7 ± 16.5	57.3 ± 17.2	ns
αντι-p42.VCA συχνότητα	20 (66.7%)	20 (69%)	ns
αντι-p42.VCA τίτλοι	48.9 ± 19.7	55.3 ± 17.7	ns
αντι-p41.VCA συχνότητα	3 (10%)	4 (13.8%)	ns
αντι-p41.VCA τίτλοι	31.7 ± 4.2	35.8 ± 13.4	ns
αντι-p40.VCA συχνότητα	17 (56.7%)	16 (55.2%)	ns
αντι-p40.VCA τίτλοι	49.8 ± 18.4	58.1 ± 21.2	ns
αντι-p33.VCA συχνότητα	19 (63.3%)	24 (82.8%)	ns
αντι-p33.VCA τίτλοι	63.5 ± 20	64.9 ± 20.8	ns
αντι-EBV.p27 συχνότητα	0	1 (3.4%)	ns
αντι-EBV.p27 τίτλοι	N/A	83	N/A
αντι-p22.VCA συχνότητα	27 (90%)	25 (86.2%)	ns
αντι-p22.VCA τίτλοι	88.8 ± 15.9	91 ± 18.7	ns

Οι συχνότητες αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τίτλοι αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (*mean ± standard deviation*). *Η τιμή p υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον ακριβή έλεγχο του Fisher (*Fisher's Exact Test*). **Η τιμή p υπολογίστηκε με τη δοκιμασία t του Student (*Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed*). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή. Συντομεύσεις: EAD, early antigen D; EAR, early antigen R; EBNA-1, EBV nuclear antigen 1; N/A, not available; ns, not significant; VCA, viral capsid antigen.

Πίνακας 6.12: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση την παρουσία αρθρίτιδας.

	Με αρθρίτιδα (n=13)	Χωρίς αρθρίτιδα (n=46)	p
αντι-p125.VCA συχνότητα	4 (30.8%)	6 (13%)	ns
αντι-p125.VCA τίτλοι	46.3 ± 16.5	58.3 ± 20.2	ns
αντι-p93.EAR συχνότητα	0	4 (8.7%)	ns
αντι-p93.EAR τίτλοι	N/A	40.3 ± 14.1	ns
αντι-p79.EBNA συχνότητα	12 (92.3%)	41 (89.1%)	ns
αντι-p79.EBNA τίτλοι	74.1 ± 16.7	66 ± 10.2	ns
αντι-p65.VCA συχνότητα	1 (7.7%)	4 (8.7%)	ns
αντι-p65.VCA τίτλοι	85	43 ± 12	ns
αντι-p45.EAD συχνότητα	7 (53.8%)	18 (39.1%)	ns
αντι-p45.EAD τίτλοι	60.9 ± 22.5	46.2 ± 19.5	ns
αντι-p43.EAD συχνότητα	3 (23.1%)	3 (6.5%)	ns
αντι-p43.EAD τίτλοι	63 ± 18.2	50 ± 10.5	ns
αντι-p42.VCA συχνότητα	8 (61.5%)	32 (69.9%)	ns
αντι-p42.VCA τίτλοι	54.1 ± 19.4	51.6 ± 18.9	ns
αντι-p41.VCA συχνότητα	2 (15.4%)	5 (10.9%)	ns
αντι-p41.VCA τίτλοι	32 ± 4.2	34.8 ± 11.9	ns
αντι-p40.VCA συχνότητα	6 (46.2%)	27 (58.7%)	ns
αντι-p40.VCA τίτλοι	55.3 ± 23.2	53.5 ± 19.7	ns
αντι-p33.VCA συχνότητα	11 (84.6%)	32 (69.6%)	ns
αντι-p33.VCA τίτλοι	74.3 ± 15.3	60.8 ± 29.7	0.032*
αντι-EBV.p27 συχνότητα	0	1 (2.2%)	ns
αντι-EBV.p27 τίτλοι	N/A	83	N/A
αντι-p22.VCA συχνότητα	10 (76.9%)	42 (91.3%)	ns
αντι-p22.VCA τίτλοι	96.4 ± 9.3	88.3 ± 18.3	ns

Οι συχνότητες αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τίτλοι αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (*mean ± standard deviation*). *Η τιμή p υπολογίστηκε με τη δοκιμασία t του Student (*Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed*) Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή. Συντομεύσεις: EAD, early antigen D; EAR, early antigen R; EBNA-1, EBV nuclear antigen 1; N/A, not available; ns, not significant; VCA, viral capsid antigen.

Πίνακας 6.13: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση την παρουσία ορογονίτιδας.

	Με ορογονίτιδα (n=3)	Χωρίς ορογονίτιδα (n=56)	p
αντι-p125.VCA συχνότητα	1 (33.3%)	9 (16.1%)	ns
αντι-p125.VCA τίτλοι	44	54.6 ± 19.7	ns
αντι-p93.EAR συχνότητα	0	4 (7.1%)	ns
αντι-p93.EAR τίτλοι	N/A	40.3 ± 14.1	N/A
αντι-p79.EBNA συχνότητα	2 (66.7%)	51 (91.1%)	ns
αντι-p79.EBNA τίτλοι	58.5 ± 16.3	68.2 ± 19	ns
αντι-p65.VCA συχνότητα	0	5 (8.9%)	ns
αντι-p65.VCA τίτλοι	N/A	51.4 ± 21.5	N/A
αντι-p45.EAD συχνότητα	1 (33.3%)	24 (42.9%)	ns
αντι-p45.EAD τίτλοι	39	50.8 ± 21.3	ns
αντι-p43.EAD συχνότητα	0	6 (10.7%)	ns
αντι-p43.EAD τίτλοι	N/A	56.5 ± 15.1	N/A
αντι-p42.VCA συχνότητα	3 (100%)	37 (66.1%)	ns
αντι-p42.VCA τίτλοι	38.3 ± 13.1	53.2 ± 18.8	ns
αντι-p41.VCA συχνότητα	1 (33.3%)	6 (10.7%)	ns
αντι-p41.VCA τίτλοι	33	34.2 ± 10.9	ns
αντι-p40.VCA συχνότητα	2 (66.7%)	31 (55.4%)	ns
αντι-p40.VCA τίτλοι	46.5 ± 16.3	54.3 ± 20.3	ns
αντι-p33.VCA συχνότητα	3 (100%)	40 (71.4%)	ns
αντι-p33.VCA τίτλοι	74 ± 25.1	63.6 ± 20	ns
αντι-EBV.p27 συχνότητα	0	1 (1.8%)	ns
αντι-EBV.p27 τίτλοι	N/A	83	N/A
αντι-p22.VCA συχνότητα	3 (100%)	49 (87.5%)	ns
αντι-p22.VCA τίτλοι	86.3 ± 3.1	90 ± 17.7	ns

Οι συχνότητες αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τίτλοι αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (*mean ± standard deviation*). Συντομεύσεις: EAD, early antigen D; EAR, early antigen R; EBNA-1, EBV nuclear antigen 1; N/A, not available; ns, not significant; VCA, viral capsid antigen.

Πίνακας 6.14: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση την παρουσία τελαγγεικτασιών.

	Με τελαγγεικτασίες (n=37)	Χωρίς τελαγγεικτασίες (n=22)	p
αντι-p125.VCA συχνότητα	7 (18.9%)	3 (13.6%)	ns
αντι-p125.VCA τίτλοι	52.7 ± 21.4	55.3 ± 15	ns
αντι-p93.EAR συχνότητα	4 (10.8%)	0	ns
αντι-p93.EAR τίτλοι	40.3 ± 14.1	-	NA
αντι-p79.EBNA συχνότητα	31 (83.8%)	22 (100%)	ns
αντι-p79.EBNA τίτλοι	69.1 ± 18.7	66.1 ± 19.4	ns
αντι-p65.VCA συχνότητα	3 (8.1%)	2 (9.1%)	ns
αντι-p65.VCA τίτλοι	51.3 ± 29.7	51.5 ± 9.2	ns
αντι-p45.EAD συχνότητα	16 (43.2%)	9 (40.9%)	ns
αντι-p45.EAD τίτλοι	49.6 ± 21.7	51.4 ± 21	ns
αντι-p43.EAD συχνότητα	3 (8.1%)	3 (13.6%)	ns
αντι-p43.EAD τίτλοι	58.3 ± 15.6	54.7 ± 17.8	ns
αντι-p42.VCA συχνότητα	27 (73%)	13 (59.1%)	ns
αντι-p42.VCA τίτλοι	56.4 ± 19.1	43.2 ± 15	0.025*
αντι-p41.VCA συχνότητα	3 (8.1%)	4 (18.2%)	ns
αντι-p41.VCA τίτλοι	29 ± 4	37.8 ± 12	ns
αντι-p40.VCA συχνότητα	18 (48.6%)	15 (68.2%)	ns
αντι-p40.VCA τίτλοι	60.7 ± 21	45.6 ± 15.7	0.025*
αντι-p33.VCA συχνότητα	26 (70.3%)	17 (77.3%)	ns
αντι-p33.VCA τίτλοι	69.2 ± 16.4	56.8 ± 23.5	0.071*
αντι-EBV.p27 συχνότητα	1 (2.7%)	0	ns
αντι-EBV.p27 τίτλοι	83	-	NA
αντι-p22.VCA συχνότητα	33 (89.2%)	19 (86.4%)	ns
αντι-p22.VCA τίτλοι	89.7 ± 18.7	90 ± 14.7	ns

Οι συχνότητες αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τίτλοι αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (*mean ± standard deviation*). *Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (*Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed*), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (*Mann-Whitney test*). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντομεύσεις: EAD, *early antigen D*· EAR, *early antigen R*· EBNA-1, *EBV nuclear antigen 1*· N/A, *not available*· ns, *not significant*· VCA, *viral capsid antigen*.

Πίνακας 6.15: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση την παρουσία ασβέστωσης.

	Με ασβέστωση (n=8)	Χωρίς ασβέστωση (n=51)	p
αντι-p125.VCA συχνότητα	3 (37.5%)	7 (13.7%)	ns
αντι-p125.VCA τίτλοι	64.3 ± 26.5	48.9 ± 14.7	ns
αντι-p93.EAR συχνότητα	1 (12.5%)	3 (5.9%)	ns
αντι-p93.EAR τίτλοι	59	34 ± 8	ns
αντι-p79.EBNA συχνότητα	7 (87.5%)	46 (90.2%)	ns
αντι-p79.EBNA τίτλοι	75.6 ± 15.5	66.7 ± 19.2	ns
αντι-p65.VCA συχνότητα	1 (12.5%)	4 (7.8%)	ns
αντι-p65.VCA τίτλοι	40	54.3 ± 23.7	ns
αντι-p45.EAD συχνότητα	6 (75%)	19 (37.3%)	ns
αντι-p45.EAD τίτλοι	65.8 ± 15.9	45.4 ± 20.3	0.027*
αντι-p43.EAD συχνότητα	1 (12.5%)	5 (9.8%)	ns
αντι-p43.EAD τίτλοι	73	53.2 ± 14.2	ns
αντι-p42.VCA συχνότητα	5 (62.5%)	35 (68.6%)	ns
αντι-p42.VCA τίτλοι	67.4 ± 20.4	49.9 ± 17.7	ns
αντι-p41.VCA συχνότητα	1 (12.5%)	6 (11.8%)	ns
αντι-p41.VCA τίτλοι	25	35.5 ± 10	ns
αντι-p40.VCA συχνότητα	3 (37.5%)	30 (58.8%)	ns
αντι-p40.VCA τίτλοι	67 ± 33	52.5 ± 18.6	ns
αντι-p33.VCA συχνότητα	6 (75%)	37 (72.5%)	ns
αντι-p33.VCA τίτλοι	74.2 ± 26.2	62.7 ± 19	ns
αντι-EBV.p27 συχνότητα	0	1 (2%)	ns
αντι-EBV.p27 τίτλοι	-	83	N/A
αντι-p22.VCA συχνότητα	8 (100%)	44 (86.3%)	ns
αντι-p22.VCA τίτλοι	102.6 ± 10.5	87.5 ± 17.2	0.005*

Οι συχνότητες αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τίτλοι αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (*mean ± standard deviation*). *Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (*Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed*), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (*Mann-Whitney test*). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή. Συντομεύσεις: EAD, early antigen D; EAR, early antigen R; EBNA-1, EBV nuclear antigen 1; N/A, not available; ns, not significant; VCA, viral capsid antigen.

Πίνακας 6.16: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση την παρουσία νεφρικής συμμετοχής.

	Με νεφρική συμμετοχή (n=2)	Χωρίς νεφρική συμμετοχή (n=57)	p
αντι-p125.VCA συχνότητα	1 (50%)	9 (15.8%)	ns
αντι-p125.VCA τίτλοι	94	49 ± 13.2	ns
αντι-p93.EAR συχνότητα	0	4 (7%)	ns
αντι-p93.EAR τίτλοι	N/A	40.3 ± 14.1	N/A
αντι-p79.EBNA συχνότητα	2 (100%)	51 (89.5%)	ns
αντι-p79.EBNA τίτλοι	83 ± 5.7	67.3 ± 19	0.078*
αντι-p65.VCA συχνότητα	0	5 (8.8%)	ns
αντι-p65.VCA τίτλοι	N/A	51.4 ± 21.5	N/A
αντι-p45.EAD συχνότητα	2 (100%)	23 (40.4%)	ns
αντι-p45.EAD τίτλοι	76 ± 22.6	48 ± 19.8	ns
αντι-p43.EAD συχνότητα	0	6 (10.5%)	ns
αντι-p43.EAD τίτλοι	N/A	56.6 ± 15.1	N/A
αντι-p42.VCA συχνότητα	2 (100%)	38 (66.7%)	ns
αντι-p42.VCA τίτλοι	87 ± 2.4	50.3 ± 17.3	0.002*
αντι-p41.VCA συχνότητα	0/2	7 (12.3%)	ns
αντι-p41.VCA τίτλοι	0	34 ± 10	NA
αντι-p40.VCA συχνότητα	1 (50%)	32 (56.1%)	ns
αντι-p40.VCA τίτλοι	88	52.8 ± 19.3	ns
αντι-p33.VCA συχνότητα	2 (100%)	41 (71.9%)	ns
αντι-p33.VCA τίτλοι	76 ± 17	63.7 ± 20.3	ns
αντι-EBV.p27 συχνότητα	0	1 (1.8%)	ns
αντι-EBV.p27 τίτλοι	N/A	82	N/A
αντι-p22.VCA συχνότητα	2 (100%)	50 (87.7%)	ns
αντι-p22.VCA τίτλοι	107 ± 12.7	89.1 ± 17.1	ns

Οι συχνότητες αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τίτλοι αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (*mean ± standard deviation*). *Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία t του Student (*Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed*), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (*Mann-Whitney test*). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή. Συντομεύσεις: EAD, early antigen D' EAR, early antigen R' EBNA-1, EBV nuclear antigen 1' N/A, not available' ns, not significant' VCA, viral capsid antigen.

Πίνακας 6.17: Συσχετίσεις ανάμεσα στους τίτλους των αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του EBV με τους τίτλους των ειδικών για τη συστηματική σκλήρυνση αυτοαντισωμάτων στους 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση.

		p125.VCA	p93.EAR	p79.EBNA	p65.VCA	p45.EAD	p43.EAD	p42.VCA	p41.VCA	p40.VCA	p33.VCA	EBV.p27	p22.VCA
Scl-70	R (adj. age) (adj. sex)		0.361 (0.378) (0.359)										
	p (adj. age) (adj. sex)	ns	0.005 (0.003) (0.006)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CENPA	R												
	p	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CENPB	R												
	p	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
RNApol11	R												
	p	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
RNApol155	R												
	p	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Τα δεδομένα αναπαριστούν το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson (R). Το p είναι η τιμή p (2 tailed) της συσχέτισης. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές διορθώθηκαν ως προς την ηλικία και το φύλο με ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης. Συντομεύσεις: *adj.*, adjusted for; *EAD*, early antigen D; *EAR*, early antigen R; *EBNA-1*, EBV nuclear antigen 1; *CENPA*, centromeric protein A; *CENPB*, centromeric protein B; *ns*, not significant; *RNApol*, RNA polymerase; *Scl-70*, scleroderma 70; *VCA*, viral capsid antigen.

6.3.5 Συχνότητες και τίτλοι των αντι-EBV.p100 αντισωμάτων σε ασθενείς με SSc

Η Εικόνα 6.6 απεικονίζει τις θετικές για τα αντι-EBV.p100 αντισώματα μονάχα περιπτώσεις ανάμεσα στους ασθενείς με SSc και με MS, ενώ ο Πίνακας 6.18 παρουσιάζει τις συχνότητες και τους τίτλους σε ασθενείς και μάρτυρες. Τα αντισώματα για το EBV.p100 εντοπίστηκαν σε 21 (35.6%) ασθενείς με SSc, ανάμεσα στους οποίους 13 (41.9%) ασθενείς με dcSSc και 8 ασθενείς με lcSSc (28.6%), σε 4 ασθενείς με MS (9.3%) και σε κανένα υγιή μάρτυρα (SSc έναντι HC, $p < 0.001$; SSc έναντι MS, $p = 0.005$; dcSSc έναντι HC, $p < 0.001$; lcSSc έναντι HC, $p = 0.004$; dcSSc έναντι MS, $p = 0.003$; lcSSc έναντι MS, $p = 0.073$; dcSSc έναντι lcSSc, $p =$ μη σημαντικό). Οι τίτλοι των αντισωμάτων αυτών δε διέφεραν ανάμεσα στους ασθενείς με SSc ή με κάποιον φαινότυπο της SSc και με MS.

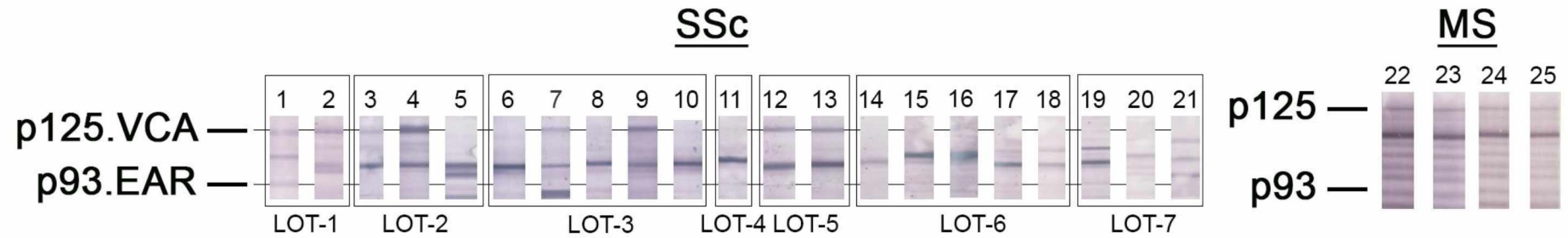
6.3.6 Συσχετίσεις της αντι-EBV.p100 ανοσολογικών απόκρισης

Αρκετές συσχετίσεις εντοπίστηκαν ανάμεσα στη χυμική απόκριση έναντι του αντιγόνου EBV.p100 και σε κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά των 59 ασθενών με SSc (Πίνακας 6.18). Οι ασθενείς που ήταν θετικοί για το αυτοαντίσωμα αντι-Scl-70 είχαν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα παρουσίας των αντι-EBV.p100 αντισωμάτων σε σύγκριση με τους αντι-Scl-70 αρνητικούς ασθενείς (55.6% έναντι 18.8%, $p = 0.008$), αλλά και σημαντικά υψηλότερους τίτλους (73.1 ± 19.5 έναντι 43.8 ± 21.6 , $p = 0.019$). Αντίθετα, τόσο οι ασθενείς με ασβέστωση, όσο και οι αντι-RNApol155 θετικοί ασθενείς είχαν χαμηλότερους τίτλους των αντι-EBV.p100 αντισωμάτων ($p < 0.001$ και για τα δύο). Στη συνέχεια δόθηκε περισσότερη έμφαση στη σχέση ανάμεσα στα αντι-EBV.p100 και στα αντι-Scl-70. Ανάμεσα στους 59 ασθενείς με SSc, οι 15 ήταν διπλά θετικοί για τα δύο αντισώματα (25.4%· 10 dcSSc, 32.3%· 5 lcSSc, 17.9%· $p =$ μη σημαντικό), οι 6 ήταν θετικοί μονάχα για τα αντι-EBV.p100 αντισώματα (10.2%· 3 dcSSc, 9.7%· 3 lcSSc, 10.7%· $p =$ μη σημαντικό), οι 12 ήταν θετικοί μονάχα για τα αντι-Scl-70 αυτοαντισώματα

(20.3%· 7 dcSSc, 22.6%· 5 lcSSc, 17.9%· p = μη σημαντικό) και οι 26 ήταν διπλά αρνητικοί (44.1%· 11 dcSSc, 35.5%· 15 lcSSc, 53.6%· p = μη σημαντικό) (Εικόνα 6.7). Στους 21 ασθενείς με SSc θετικούς για τα αντι-Scl-70 θετικοί, οι τίτλοι των αντι-Scl-70 δε διέφεραν ανάμεσα στους αντι-EBV.p100 θετικούς και στους αντι-EBV.p100 αρνητικούς (αντι-EBV.p100+: 47.9 ± 31.7 · αντι-EBV.p100-: 53.8 ± 31.8 · θετικοί έναντι αρνητικών, p =μη σημαντικό).

Η ανάλυση της συσχέτισης των τίτλων των δύο αντισωμάτων αποκάλυψε μια δυνατή θετική συσχέτιση ($R=0.798$, $p<0.001$ · Εικόνα 6.8), η οποία παρέμεινε και αφού εφαρμόστηκε διόρθωση ως προς την ηλικία ($R=0.796$, $p<0.001$) και το φύλο ($R=0.7826$, $p<0.001$). Η συσχέτιση αυτή έγινε πολύ δυνατή όταν η ανάλυση εφαρμόστηκε μονάχα στους ασθενείς με dcSSc ($R=0.926$, $p<0.001$), χάθηκε όμως στους ασθενείς με lcSSc ($R=0.483$, p =μη σημαντικό). Οι τίτλοι των αντι-EBV.p100 αντισωμάτων δε συσχετίστηκαν με τους τίτλους κανενός άλλου αυτοαντισωμάτων.

Εικόνα 6.6: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τα αντισώματα έναντι του αντιγόνου EBV.p100



Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τα αντισώματα έναντι του αντιγόνου EBV.p100 στους 21 θετικούς ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc, 1-21) και στους 4 θετικούς ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS, 22-25). Οι ασθενείς με SSc εξετάστηκαν σε επτά διαφορετικά πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν επτά διαφορετικές παρτίδες ταινιών μεμβράνης της δοκιμασίας, οι οποίες απεικονίζονται ως LOT-1, LOT-2, LOT-3, LOT-4, LOT-5, LOT-6 και LOT-7. Οι ασθενείς με MS εξετάστηκαν σε μία παρτίδα. Τα ύψη των ζωνών p125.VCA και p93.EAR απεικονίζονται με μαύρη γραμμή.

Πίνακας 6.18: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι του EBV.p100 με ανοσοαποτύπωση κατά Western

	SSc (n=59)	dcSSc (n=31)	lcSSc (n=28)	MS (n=43)	HC (n=32)	p_{SSc vs HC}	p_{SSc vs MS}	p_{dcSSc vs lcSSc}	p_{dcSSc vs HC}	p_{lcSSc vs HC}	p_{dcSSc vs MS}	p_{lcSSc vs MS}	p_{MS vs HC}
EBV.p100 συχνότητες	21 (35.6%)	13 (41.9%)	8 (28.6%)	4 (9.3%)	0	<0.001	0.005	ns	<0.001	0.004	0.003	0.073	ns
EBV.p100 τίτλοι	64.7 ± 23.8	65.3 ± 27.5	63.8 ± 17.9	71.8 ± 4.8	N/A	N/A	ns	ns	N/A	N/A	ns	ns	N/A

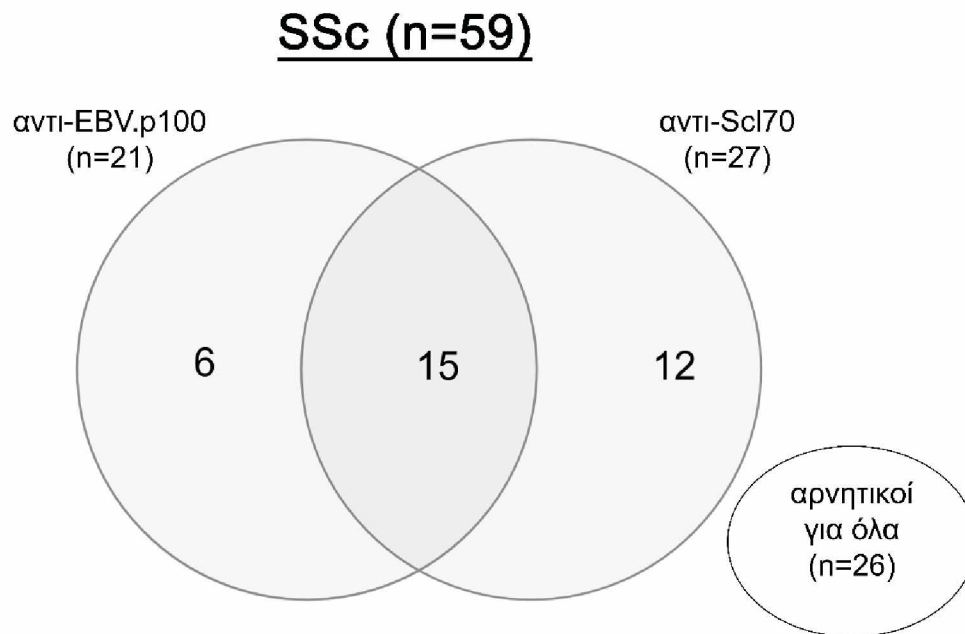
59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), συμπεριλαμβάνοντας 31 ασθενείς με διάχυτη δερματική SSc (dcSSc) και 28 ασθενείς με περιορισμένη δερματική SSc (lcSSc), 43 ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS), 32 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Οι συχνότητες αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τίτλοι αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (mean ± standard deviation). Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντομεύσεις: N/A, not available; ns, not significant.

Πίνακας 6.18: Συχνότητες και τίτλοι των αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου EBV.p100 σε 59 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, ταξινομημένους με βάση τα κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά τους.

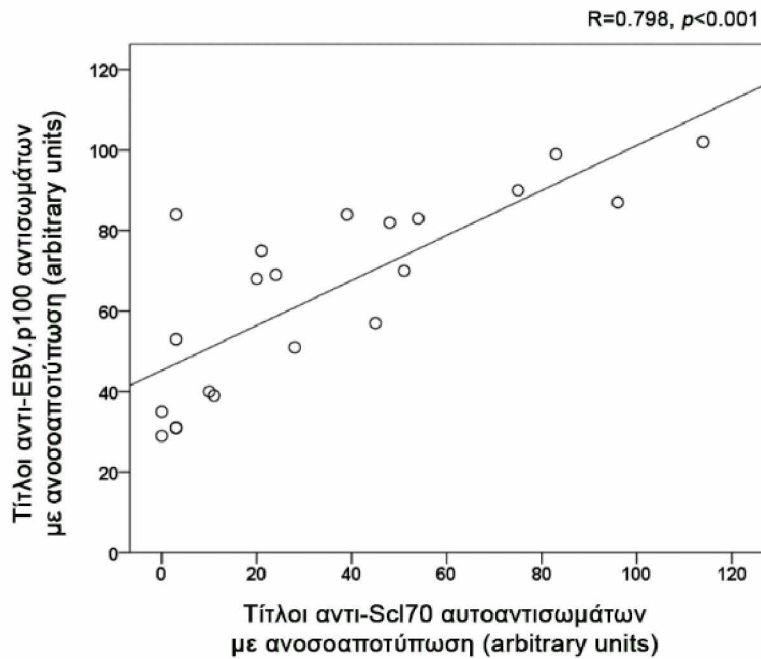
Κλινικό χαρακτηριστικό	EBV.p100 συχνότητες	p συχνότητων	EBV.p100 τίτλοι	p τίτλων
Με πνευμονική ίνωση (n=23)	11 (47.8%)	ns	69.4 ± 22.3	ns
Χωρίς πνευμονική ίνωση (n=36)	10 (27.8%)		59.6 ± 25.5	
Με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (n=5)	3 (60%)	ns	84.3 ± 14.5	0.084**
Χωρίς πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (n=54)	18 (33.3%)		61.4 ± 23.7	
Με δακτυλικά έλκη (n=30)	12 (40%)	ns	63.2 ± 24.8	ns
Χωρίς δακτυλικά έλκη (n=29)	9 (31%)		66.8 ± 23.7	
Με αρθρίτιδα (n=13)	7 (53.8%)	ns	71.5 ± 25.1	ns
Χωρίς αρθρίτιδα (n=46)	14 (30.4%)		61.3 ± 23.3	
Με ορογονίτιδα (n=3)	3 (100%)	0.076*	53.3 ± 14.5	ns
Χωρίς ορογονίτιδα (n=56)	18 (32.1%)		66.6 ± 24.8	
Με τελαγγειεκτασίες (n=37)	12 (32.4%)	ns	58.7 ± 20.9	ns
Χωρίς τελαγγειεκτασίες (n=22)	9 (40.9%)		72.8 ± 26.2	
Με ασβέστωση (n=8)	2 (25%)	ns	32 ± 4.2	<0.001**
Χωρίς ασβέστωση (n=51)	19 (37.3%)		68.2 ± 22.3	
Με νεφρική συμμετοχή (n=2)	1 (50%)	ns	35	ns
Χωρίς νεφρική συμμετοχή (n=57)	20 (35.1%)		66.2 ± 23.4	
αντι-Scl-70 θετικοί (n=27)	15 (55.6%)	0.008*	73.1 ± 19.5	0.019**
αντι-Scl-70 αρνητικοί (n=32)	6 (18.8%)		43.8 ± 21.6	
αντι-CENPA θετικοί (n=11)	1 (9.1%)	0.092*	53	ns
αντι-CENPA αρνητικοί (n=48)	20 (41.7%)		68.1 ± 23	
αντι-CENPB θετικοί (n=11)	1 (9.1%)	0.092	53	ns
αντι-CENPB αρνητικοί (n=48)	20 (41.7%)		65.3 ± 24.3	
αντι-RNAp11 θετικοί (n=7)	1 (14.3%)	ns	35	ns
αντι-RNAp11 αρνητικοί (n=52)	20 (38.5%)		66.2 ± 23.4	
αντι-RNAp155 θετικοί (n=8)	2 (25%)	ns	33 ± 2.8	<0.001**
αντι-RNAp155 αρνητικοί (n=51)	19 (37.3%)		68.1 ± 22.5	

Οι συχνότητες αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοσφαίων ποσοστών. Οι τίτλοι αναπαριστούν τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (*mean ± standard deviation*). * Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (*Pearson's Chi-Square*) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (*Yates Correction for Continuity*), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (*Fisher's Exact Test*). ** Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία *t* του Student (*Student's t-test, two-tailed, equal variances not assumed*), ενώ για την ανάλυση ανεξάρτητων, μη παραμετρικών μεταβλητών έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία των Mann-Whitney (*Mann-Whitney test*). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντόμηση: *ns*, *not significant*.

Εικόνα 6.7: Διάγραμμα Venn που απεικονίζουν τη σχέση ανάμεσα στους 59 ασθενείς με SSc που είναι θετικοί για τα αντι-EBV.p100 αντισώματα και θετικοί για τα αντι-Sci-70 αντισώματα.



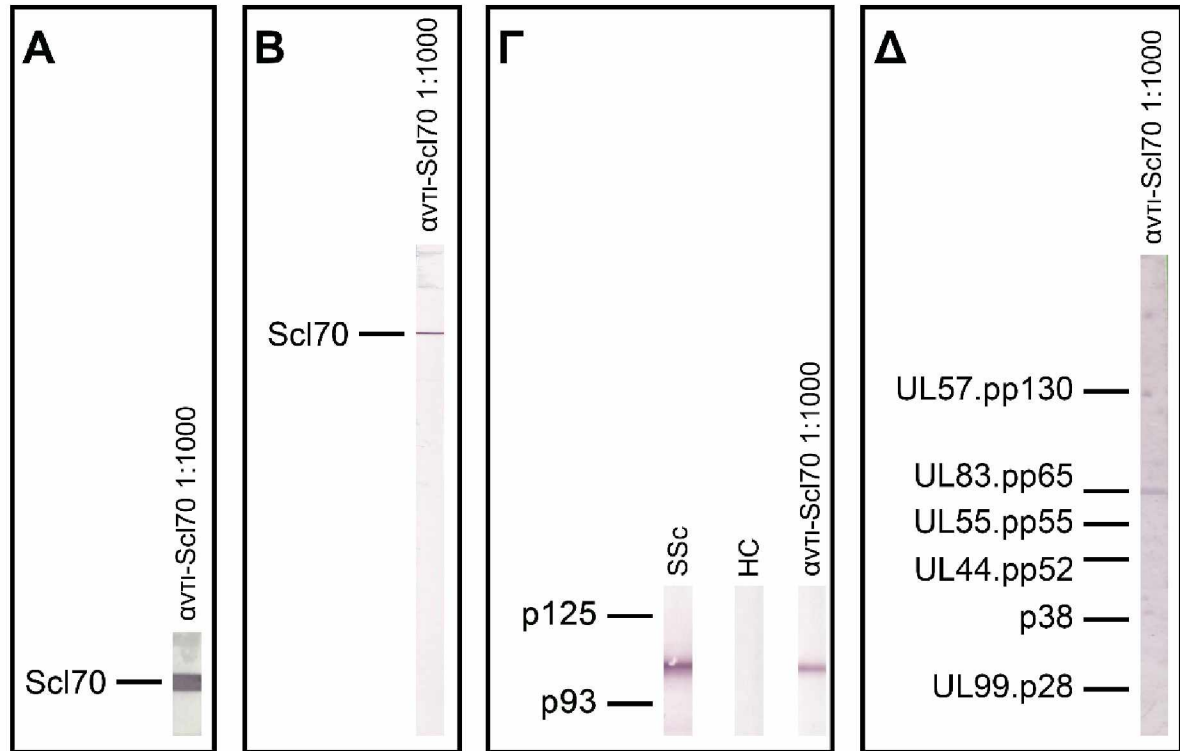
Εικόνα 6.8: Διάγραμμα διασποράς που απεικονίζει τη συσχέτιση μεταξύ των τίτλων των αντι-EBV.p100 αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western με τους τίτλους των αντι-Sci-70 αυτοαντισωμάτων με γραμμική ανοσοαποτύπωση σε 21 αντι-EBV.p100+ ασθενείς με SSc.



6.3.7 Αναζήτηση της ταυτότητας του αντιγόνου EBV.p100 και μελέτη διασταυρούμενης αντιδραστικότητας των αντι-EBV.p100 αντισωμάτων

Η ειδικότητα των μονοκλωνικών αντι-Scl-70 αντισωμάτων επιβεβαιώθηκε με γραμμική ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ανασυνδυασμένη ανθρώπινη τοποϊσομεράση I (Εικόνα 6.9Α), καθώς και με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων Hep-2 (Εικόνα 6.9Β). Η ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας EBV πρωτεϊνικό υπόστρωμα επιβεβαίωσε την παρουσία αντιδραστικής ζώνης στο ύψος που αντιστοιχεί στο υποτιθέμενο αντιγόνο EBV.p100 (Εικόνα 6.9Γ). Για τη διερεύνηση της πιθανότητας η αντιδραστική ζώνη στην EBV ανοσοαποτύπωση να είναι επιμόλυνση των ιικών καλλιιεργειών με ανθρώπινη τοποϊσομεράση I, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας ως πρωτογενές αντίσωμα το μονοκλωνικό αντι-Scl-70 και ως υπόστρωμα πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυτταρομεγαλοϊού (CMV) (Εικόνα 6.9Δ). Στη CMV ανοσοαποτύπωση δεν εμφανίστηκε αντιδραστική ζώνη στο ύψος που αντιστοιχούσε στην ανθρώπινη τοποϊσομεράση I, όμως εμφανίστηκε μια αντιδραστική ζώνη στο ύψος της ιικής πρωτεΐνης UL83.pp65.

Εικόνα 6.9: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας ως πρωτογενές αντίσωμα το μονοκλωνικό αντι-ScI-70 αντίσωμα σε συγκέντρωση 1:1000.



A) Γραμμική ανοσοαποτύπωση με ανασυνδυασμένη ανθρώπινη τοποϊσομεράση I ως υπόστρωμα. B) Ανοσοαποτύπωση κατά Western με πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων Hep-2 ως υπόστρωμα. Γ) Ανοσοαποτύπωση κατά Western με πρωτεϊνικό εκχύλισμα EBV ως υπόστρωμα σε δείγμα ασθενούς με συστηματική σκλήρυνση (SSc, το δείγμα αυτό αντιστοιχεί στον ασθενή 6 της Εικόνα 6.6), σε δείγμα υγιούς δείγματος ελέγχου (HC, το δείγμα αυτό αντιστοιχεί στο δείγμα 21 της Εικόνας 6.2) και με χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος αντι-ScI-70 σε συγκέντρωση 1:1000. Δ) Ανοσοαποτύπωση κατά Western με πρωτεϊνικό εκχύλισμα CMV ως υπόστρωμα.

6.3.8 Αναζήτηση ομοιοτήτων μεταξύ αλληλουχιών πρωτεϊνών του EBV και της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I με BLAST

Με σκοπό την εξακρίβωση της ταυτότητας του αντιγόνου EBV.p100 ανάμεσα σε πρωτεΐνες του EBV με μέγεθος που αντιστοιχεί σε αυτό της αντιδρώσας ζώνης, αναζητήθηκαν στη βάση δεδομένων αλληλουχιών πρωτεϊνών Uniprot όλες οι πρωτεΐνες του EBV με μοριακό βάρος από 93 kDa έως 125 kDa. Τα αποτελέσματα της έρευνας ήταν 25 καταχωρήσεις, οι οποίες όμως αντιστοιχούσαν σε 12 πρωτεΐνες, αρκετές από τις οποίες είχαν διπλές ή τριπλές καταχωρήσεις με κοινή αλληλουχία (Πίνακας 6.19). Συνεπώς επιλέχθηκαν μονάχα 12 καταχωρήσεις για την ανάλυση των αλληλουχιών τους με το BLAST. Η σύγκριση των αλληλουχιών των 12 πρωτεϊνών αυτών με την αλληλουχία της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I είχε ως αποτέλεσμα 57 ζευγάρια ομοιότητας αλληλουχιών μεγέθους πέντε ή έξι αμινοξέων, ποσοστό ομοιότητας μεταξύ 50%-100% και κατώφλι βαθμολογίας (E-value) μεταξύ 0.24-718 (Πίνακας 6.20).

Πίνακας 6.19: Καταχωρήσεις στη βάση δεδομένων αλληλουχιών πρωτεϊνών UniProt όλων των πρωτεϊνών του EBV με μοριακό βάρος από 93 kiloDalton (kDa) έως 125 kDa.

AA	Όνομα πρωτεΐνης	Μήκος	Μοριακό βάρος (kDa)
P03227	Major DNA-binding protein	1128	123,122
Q1HVB8	Major DNA-binding protein	1128	123,051
Q3KSN9	Major DNA-binding protein	1128	123,034
Q69140	Epstein-Barr nuclear antigen 6 (EBNA-6) (EBV nuclear antigen 6) (Epstein-Barr nuclear antigen 3C) (EBNA-3C) (EBV nuclear antigen 3C) (Epstein-Barr nuclear antigen 4B) (EBNA-4B) (EBV nuclear antigen 4B)	1069	118,146
Q3KSP1	DNA polymerase catalytic subunit (EC 2.7.7.7)	1015	113,436
Q1HVC1	DNA polymerase catalytic subunit (EC 2.7.7.7)	1015	113,432
P03198	DNA polymerase catalytic subunit (EC 2.7.7.7)	1015	113,418
Q3KST0	Epstein-Barr nuclear antigen 6 (EBNA-6) (EBV nuclear antigen 6) (Epstein-Barr nuclear antigen 3C) (EBNA-3C) (EBV nuclear antigen 3C) (Epstein-Barr nuclear antigen 4B) (EBNA-4B) (EBV nuclear antigen 4B)	1009	112,164
P03204	Epstein-Barr nuclear antigen 6 (EBNA-6) (EBV nuclear antigen 6) (Epstein-Barr nuclear antigen 3C) (EBNA-3C) (EBV nuclear antigen 3C) (Epstein-Barr nuclear antigen 4B) (EBNA-4B) (EBV nuclear antigen 4B)	992	109,129
Q1HVG4	Epstein-Barr nuclear antigen 4 (EBNA-4) (EBV nuclear antigen 4) (Epstein-Barr nuclear antigen 3B) (EBNA-3B) (EBV nuclear antigen 3B)	946	104,104
P12977	Epstein-Barr nuclear antigen 3 (EBNA-3) (EBV nuclear antigen 3) (Epstein-Barr nuclear antigen 3A) (EBNA-3A) (EBV nuclear antigen 3A)	944	103,494
Q3KST1	Epstein-Barr nuclear antigen 4 (EBNA-4) (EBV nuclear antigen 4) (Epstein-Barr nuclear antigen 3B) (EBNA-3B) (EBV nuclear antigen 3B)	938	102,923
P03203	Epstein-Barr nuclear antigen 4 (EBNA-4) (EBV nuclear antigen 4) (Epstein-Barr nuclear antigen 3B) (EBNA-3B) (EBV nuclear antigen 3B)	938	102,860
Q3KST2	Epstein-Barr nuclear antigen 3 (EBNA-3) (EBV nuclear antigen 3) (Epstein-Barr nuclear antigen 3A) (EBNA-3A) (EBV nuclear antigen 3A)	935	102,426
Q69138	Epstein-Barr nuclear antigen 3 (EBNA-3) (EBV nuclear antigen 3) (Epstein-Barr nuclear antigen 3A) (EBNA-3A) (EBV nuclear antigen 3A)	925	102,423
P03193	DNA primase (EC 2.7.7.-)	874	98,041
P03188	Envelope glycoprotein B (gB)	857	95,639
P0C763	Envelope glycoprotein B (gB)	857	95,609
P0C762	Envelope glycoprotein B (gB)	857	95,609
P03200	Envelope glycoprotein GP350 (Membrane antigen) (MA)	907	94,432
P0C728	Uncharacterized protein LF3	924	94,306
P0C727	Uncharacterized protein LF3	924	94,306
Q3KSU5	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit (R1) (EC 1.17.4.1) (Ribonucleotide reductase large subunit)	826	93,102
P03190	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit (R1) (EC 1.17.4.1) (Ribonucleotide reductase large subunit)	826	93,031
P0C702	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit (R1) (EC 1.17.4.1) (Ribonucleotide reductase large subunit)	826	93,031

Πίνακας 6.20: Αποτελέσματα σύγκρισης αλληλουχιών των πρωτεϊνών του EBV με μοριακό βάρος από 93 kiloDalton (kDa) έως 125 kDa με την αλληλουχία της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I (Sci-70) με BLAST.

AA	Πρωτεΐνη EBV	Uniprot	Αλληλουχία	Θέση	Sci-70 αλληλουχία	Sci-70 θέση	E-value	Ομοιότητα
1	DNBI_EBVB Major DNA-binding protein	P03227	DDAEY	1032-1036	DDADY	143-147	4.2	5/5 (100%)
2			HEESN	812-816	KEEGE	493-497	637	5/5 (100%)
3	DPOL_EBVA DNA polymerase catalytic subunit	Q1HVC1	LADAR	847-851	LADAR	658-662	2.8	5/5 (100%)
4			DEDGK	64-68	EEDGK	168-172	9.2	5/5 (100%)
5			ANTKV	427-431	ADAKV	670-674	176	4/5 (80%)
6			DKLSL	447-451	DKLAL	483-487	318	4/5 (80%)
7			KIRAGG	405-410	KVRASG	93-98	73	5/6 (83%)
8			KRKAI	653-657	KKKAV	687-691	54	4/5 (80%)
9	EBNA6_EBV Epstein-Barr nuclear antigen 6	Q3KST0	EQERY	236-240	EEERY	207-211	2.8	5/5 (100%)
10			PTPPP	491-495	PSPPP	393-397	6.8	4/5 (80%)
11			KKPRK	414-418	KKPKK	193-197	17	4/5 (80%)
12			QVSQF	863-867	QMSQY	304-308	316	4/5 (80%)
13			LQTEE	278-282	LDGQE	518-522	316	3/5 (60%)
14			KAQRQ	345-349	KTQRE	746-750	18	4/5 (80%)
15	EBNA4_EBVA Epstein-Barr nuclear antigen 4	Q1HVG4	IVTDL	416-421	IITNLS	293-298	6.4	6/6 (100%)
16			TDKQE	919-923	TDREE	706-710	68	4/5 (80%)
17			EEPDE	74-78	DEPED	118-122	122	5/5 (100%)
18			KDEEE	371-375	KEENE	328-332	164	4/5 (80%)
19			DDDESE	358-363	DEDDAD	141-146	392	4/6 (67%)
20			LSPRA	764-768	LSPKA	249-253	718	4/5 (80%)
21			SMLDL	504-508	SMMNL	643-647	21	5/5 (100%)
22			DEEES	372-376	DEDDA	140-144	50	4/5 (80%)
23			EDDDE	357-361	EEEEED	166-170	718	5/5 (100%)
24			LALRA	756-760	LALRA	485-489	3.5	5/5 (100%)
25	EBNA4_EBV Epstein-Barr nuclear antigen 4	Q3KST1	LTNEE	237-331	MTNEE	286-290	6.3	5/5 (100%)
26			EEEDK	371-375	EEEQK	198-202	15	4/5 (80%)
27			PWQPLP	477-482	PYEPLP	230-235	28	5/6 (83%)
28	EBNA3_EBVB Epstein-Barr nuclear antigen 3	P12977	DSSSEK	43-48	DGSSEK	71-76	4.7	5/6 (83%)
29			NPASR	151-155	NPSSR	430-434	11	4/5 (80%)
30			GEGSDT	846-851	GETADT	496-501	4.7	4/6 (67%)
31			NPASR	150-154	NPSSR	430-434	11	4/5 (80%)
32			APDDNI	10-15	APDENI	607-612	0.24	6/6 (100%)
33			PPPTH	445-449	PPPGH	395-399	0.44	4/5 (80%)
34	PRIM_EBVB DNA primase	P03193	IQNLL	676-680	LQDLM	575-581	152	4/5 (80%)
35			HPEEE	660-664	QPEDD	559-563	152	5/5 (100%)
36			EEDKH	663-667	EENKQ	709-713	367	5/5 (100%)
37			DYLIQ	704-708	EYVVE	522-526	47	4/5 (80%)
38			EDKFPQ	755-760	EERYPE	208-213	11	4/6 (67%)
39			EEDKH	663-667	EENKQ	709-713	494	5/5 (100%)

40	GB_EBVB Envelope glycoprotein B	P03188	FYDGK	235-239	YYDGK	616-620	4.3	5/5 (100%)
41			RHEEK	120-124	RKEEK	89-93	46	4/5 (80%)
42			ELTTP	398-402	ELTAP	604-608	4.3	4/5 (80%)
43			AVLRRR	425-430	GMLKRR	371-376	200	3/6 (50%)
44			EQKRQ	486-490	EHKKE	37-41	484	4/5 (80%)
45	GP350_EBVB Envelope glycoprotein GP350	P03200	CIMED	211-215	CIMDN	341-345	4.6	5/5 (100%)
46			THKVI	416-420	TKKVV	680-684	512	4/5 (80%)
47			DFGQLT	64-69	DFTQMS	301-306	381	4/6 (66.7%)
48			ESHVPS	236-241	DAKVPS	389-394	688	4/6 (66.7%)
49	LF3_EBV Uncharacterized protein LF3	P0C728	PELQG	854-860	PELDG	516-520	27	4/5 (80%)
50	RIR1_EBVB Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	P03190	LTPPD	189-193	LTAPD	605-609	13	4/5 (80%)
51			RAQRA	422-426	RANRA	621-265	44	4/5 (80%)
52			AVKAG	356-360	ALRAG	486-490	627	3/5 (60%)
53			TNKEE	620-626	TDREE	706-710	44	4/5 (80%)
54			LAVRA	419-423	LALRA	485-489	33	4/5 (80%)
55			TSQTV	163-167	TADTV	498-502	143	3/5 (60%)
56			LETRV	73-77	LQTKI	647-651	347	4/5 (80%)
57			PEIESD	146-151	PELDGQ	516-521	347	3/6 (50%)

Οι αλληλουχίες του Scl-70 που έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή και υπογράμμιση αλληλοεπικαλύπτονται πλήρως ή μερικώς με αλληλουχίες γνωστών επιτόπων του αυτοαντιγόνου Scl-70.

6.4 Συζήτηση

Το κομμάτι αυτό της διδακτορικής διατριβής εστίασε στη μελέτη των χυμικών αποκρίσεων σε ασθενείς με SSc έναντι αντιγόνων VCA, EA και EBNA του EBV, τα οποία χρησιμοποιούνται στη διάγνωση της μόλυνσης, της λοίμωξης αλλά και του σταδίου της λοίμωξης από τον ιό [542, 544, 545]. Η πειραματική διαδικασία της μελέτης βασίστηκε στην ανοσοαποτύπωση κατά Western, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ολικό εκχύλισμα του EBV που διαχωρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σύμφωνα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών και μεταφέρθηκε σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ασθενείς με MS, μία νόσος στην οποία η συμμετοχή του EBV έχει διερευνηθεί εκτενώς [310-313, 316], καθώς και υγιείς μάρτυρες ελέγχου αντίστοιχης ηλικίας και φύλου με τους ασθενείς με SSc.

Η μόλυνση με EBV ήταν σχεδόν καθολική σε ασθενείς και μάρτυρες, καθώς μονάχα ένας ασθενής με dcSSc και ένας υγιής μάρτυρας ήταν αρνητικοί για αντισώματα έναντι και των τριών αντιγονικών τάξεων. Η παρουσία των αντι-VCA αντισωμάτων ήταν επίσης σχεδόν καθολική στις ομάδες της μελέτης. Εντούτοις, η παρουσία των αντι-EA και αντι-EBNA αντισωμάτων ήταν πιο συχνή στους ασθενείς με SSc και με MS σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Η αυξημένη παρουσία των αντι-EA αντισωμάτων σε ασθενείς με SSc και με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (SLE) έχει επίσης αναφερθεί από τους Fattal και συνεργάτες [444]. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο του EBV και των αντισωμάτων εναντίον του και στην SSc, όπως συμβαίνει στην MS, καθώς και την ικανότητα του ιού να προκαλεί αυτοανοσία. Παράλληλα, η τριπλή θετικότητα για αντισώματα έναντι των ιικών πρωτεϊνικών κατηγοριών εμφανίστηκε πιο συχνά σε ασθενείς με SSc και με MS, υποστηρίζοντας περισσότερο ότι οι δύο ασθένειες μοιράζονται κοινό παθογενετικό μηχανισμό.

Όσον αφορά τις συχνότητες των αντιγονοειδικών χυμικών αποκρίσεων, αυτές συνέχισαν να επιβεβαιώνουν ότι οι ασθενείς με SSc είναι πιο αντιδραστικοί από τους υγιείς μάρτυρες. Τρία αντιγονοειδικά αντισώματα ήταν πιο συχνά στην SSc, τα αντι-p79.EBNA-1, αντι-p45.EAD και αντι-p33.VCA, ενώ εξίσου αυξημένες συχνότητες παρουσίασαν και στους δύο κλινικούς φαινοτύπους της νόσου, την dcSSc και την lcSSc, και ιδιαίτερα στο δεύτερο φαινότυπο. Ακόμα, κάποιες διαφορές στη συχνότητα των αντιγονοειδικών αντισωμάτων εμφανίστηκαν μεταξύ της SSc και της MS, με τρία αντισώματα να είναι πιο συχνά στην SSc (αντι-p45.EAD, αντι-p33.VCA και αντι-p42.VCA), ενώ το αντι-p43.EAD εμφανιζόταν πιο συχνά στην MS. Οι Διαφορές αυτές παρέμειναν και πάλι όταν οι ασθενείς με SSc χωρίστηκαν σε dcSSc και lcSSc, ενώ η μοναδική διαφορά σε σύγκριση μεταξύ των δύο κλινικών φαινοτύπων του σκληροδέρματος ήταν στα αντι-p33.VCA αντισώματα που ήταν πιο συχνά στην lcSSc. Οι παραπάνω διαφορές προτείνουν ότι παρόλο την πιθανή ύπαρξη κοινών μηχανισμών παθογένειας των δύο νόσων, υπάρχουν διαφορές στην παθογένεια που οδηγούν σε διαφορετική κλινική εκδήλωση της αυτοανοσίας και μπορεί να σχετίζονται με τα διαφορετικά πρότυπα χυμικής αντιδραστικότητας που παρατηρούνται για τον EBV.

Η αυξημένη συχνότητα των αντι-EBNA-1 αντισωμάτων δε συμφωνεί με τις δημοσιευμένες αναφορές των Fattal και συνεργατών [444], οι οποίοι μελέτησαν τις χυμικές αποκρίσεις έναντι των αντιγόνων EA και του EBNA-1 σε ασθενείς με SSc και με SLE, μεταξύ άλλων, από το Ισραήλ και την Ιταλία χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες αντιγόνων για την ανίχνευση αντισωμάτων. Από τα πειράματα τους προέκυψε τα αντι-EBNA-1 αντισώματα ήταν λιγότερο συχνά στους SSc. Οι διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στις δύο μελέτες θα μπορούσαν να οφείλονται στη διαφορετική απόκριση στο αντιγόνο αυτό των ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν, στο ιικό στέλεχος που

χρησιμοποιήθηκε ή στις διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης των αντισωμάτων. Το EBNA-1 είναι βασικός παράγοντας ρύθμισης της λανθάνουσας φάσης της λοίμωξης από EBV [307] και τα αντι-EBNA-1 αντισώματα φαίνεται να έχουν ρόλο στους μηχανισμούς αυτοανοσίας [285, 546]. Μεγαλύτερες, πολυκεντρικές μελέτες απαιτούνται για να διαλευκανθεί ο πιθανός ρόλος των αντισωμάτων έναντι των αντι-EBNA-1 αντισωμάτων στην SSc.

Η αυξημένη αντιδραστικότητα έναντι αντιγόνων του EBV στην SSc παρατηρήθηκε και όταν αναλύθηκε ο συνολικός αριθμός αντισωμάτων ανά περίπτωση ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες. Οι ασθενείς με SSc είχαν περισσότερα αντιγονοειδικά αντισώματα ανά ασθενή απ' ό,τι οι υγιείς μάρτυρες και το ίδιο ίσχυε και για τους ασθενείς με dcSSc και lcSSc. Επίσης, οι ασθενείς με SSc ήταν πιο πιθανό να έχουν τουλάχιστον 5 αντισώματα και περισσότερα, ενώ η πλειοψηφία των υγιών μαρτύρων είχαν μέχρι τέσσερα.

Σε αντίθεση με τις συχνότητες των αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων, οι τίτλοι τους ήταν συγκρίσιμοι ή και χαμηλότεροι (αντι-p22.VCA και αντι-p79.EBNA-1) στους ασθενείς με SSc σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Τα αποτελέσματα αυτά δε συμφωνούν με τις δημοσιευμένες αναφορές των Sternbaek και συνεργατών για αυξημένους τίτλους αρκετών αντιγονοειδικών αντισωμάτων σε ασθενείς με SSc σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, καθώς και σε ασθενείς με άλλα αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα [445]. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν αυξημένα επίπεδα των IgG αντι-EBNA-1, IgG αντι-EBNA-2, IgG αντι-BALF5, IgG αντι-EAD, IgG αντι-BALF2, IgG αντι-EAR, IgG αντι-gB, IgG αντι-gp350 και IgG αντι-gp42. Ενώ τα αντισώματα από τα αντισώματα αυτά δε μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, τα τρία τα οποία μελετήθηκαν, δηλαδή τα IgG αντι-EBNA-1, τα IgG αντι-EAD και τα IgG αντι-EAR, δεν είχαν το ίδιο αποτέλεσμα. Βεβαίως, οι Sternbaek και συνεργάτες δε μελέτησαν την

αντιδραστικότητα έναντι των αντιγόνων του EBV σε κάθε ασθενή ξεχωριστά, μέθοδος που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία, αλλά ανέμειξαν του ορούς όλων των ασθενών σε δεξαμενή ορών, απ' όπου και χρησιμοποίησαν υλικό για τη διενέργεια του πειράματος. Αν και οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι από μαθηματικής άποψης τα αποτελέσματα της δεξαμενής αντιστοιχούν στο μέσο όρο των αποτελεσμάτων του κάθε δείγματος ξεχωριστά και ότι αντιπροσωπεύουν ικανοποιητικά την πλειοψηφία των ασθενών με SSc [547], η πιθανότητα αλληλεπιδράσεων μεταξύ συστατικών των διαφορετικών ορών θα μπορούσε να αλλοιώνει το αποτέλεσμα. Επίσης, η μέθοδος αυτή δε δίνει αποτελέσματα αντιπροσωπευτικά για κάθε δείγμα, πιθανώς αποκρύπτοντας μεγάλες διακυμάνσεις των επιπέδων του κάθε αντισώματος για την κάθε νόσο και θα έπρεπε να χρησιμοποιείται με φειδώ.

Σε σύγκριση με την MS μονάχα τα αντι-p125.VCA και τα αντι-p33.VCA αντισώματα είχαν υψηλότερους τίτλους. Οι αυξημένοι τίτλοι των αντι-p33.VCA, σε συνδυασμό με την υψηλότερη συχνότητα τους στους SSc σε σχέση με τους MS, όπως περιγράφηκε στην παρούσα μελέτη και συζητήθηκε πιο πάνω, συνηγορούν υπέρ του ρόλου των αντισωμάτων αυτών σε μηχανισμούς αυτοανοσίας ειδικούς για την SSc. Το p33 είναι μια πρωτεΐνη του EBV που εκφράζεται από το γονίδιο *BARF1* [548], η έκφραση του οποίου είναι αυξημένη σε επιθηλιακές κακοήθειες, όπως το ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα και το καρκίνωμα του στομάχου που σχετίζεται με τον EBV [549]. Αν και ο ρόλος των αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης αυτής δεν έχει μελετηθεί σε αυτοάνοσα νοσήματα, η πρωτεΐνη έχει νευροπροστατευτική δραστηριότητα, με πιθανές εφαρμογές στη θεραπεία νευροεκφυλιστικών νόσων [550]. Η δραστηριότητα της αυτή θα μπορούσε να συνδέεται με τη μειωμένη αντιδραστικότητα των ασθενών με MS εναντίον της.

Ένα αποτέλεσμα της μελέτης αυτής που εξάπτει την περιέργεια είναι η εμφάνιση της αντιδραστικής ζώνης EBV.p100 στην ανοσοαποτύπωση κατά Western σε αρκετούς

ασθενείς με SSc και σε τέσσερις ασθενείς με MS, αλλά σε κανένα υγιή μάρτυρα. Η παρουσία της αναγνωρίστηκε έπειτα από αξιολόγηση των μη χαρακτηρισμένων αντιδραστικών ζωνών που εμφανίζονται στην ανοσοαποτύπωση. Αυτή η μη χαρακτηρισμένη ζώνη ήταν η μοναδική που εμφανιζόταν συστηματικά και διέφερε ανάμεσα στους ασθενείς με SSc και στους μάρτυρες. Η συχνότητα της εμφάνισης της είναι σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς με SSc σε σύγκριση με τους μάρτυρες, ενώ η μέση τιμή των εντάσεων σε arbitrary units των ζωνών δε διαφέρουν μεταξύ SSc και MS. Η πιθανότητα η αντιδραστική ζώνη αυτή να αντιστοιχεί σε κάποια πρωτεΐνη-αντιγόνο του EBV που αναγνωρίζεται διαφορετικά από ασθενείς με SSc είναι μια ενδιαφέρουσα υπόθεση.

Βεβαίως, η αξιολόγηση του αποτελέσματος αυτού θα πρέπει να πραγματοποιηθεί με προσοχή. Ο εντοπισμός της αντιδραστικής ζώνης αυτής βασίστηκε στην παρουσία αντιδραστικής ζώνης ανάμεσα στις χαρακτηρισμένες ζώνες p125.VCA και p93.EAR, οι οποίες αντιστοιχούν στα αντισώματα έναντι των ιικών αντιγόνων p125.VCA και p93.EAR, αντίστοιχα (Εικόνα 6.2 και Εικόνα 6.6). Ένα σημαντικό ζήτημα είναι ότι τα δείγματα εξετάστηκαν σε διαφορετικά πειράματα ανοσοαποτύπωσης, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές παρτίδες ταινιών μεμβράνης της δοκιμασίας. Σε κάθε παρτίδα ο διαχωρισμός των ιικών πρωτεϊνών του εκχυλίσματος με ηλεκτροφόρηση ακολουθεί το ίδιο πρωτόκολλο, όμως δεν είναι απολύτως ακριβής. Ως αποτέλεσμα, οι αντιδραστικές ζώνες «τρέχουν» στην ηλεκτροφόρηση σε διαφορετικά ύψη σε κάθε ηλεκτροφόρηση, τα οποία δε διαφέρουν σημαντικά, αλλά κάποιες φορές αισθητά [551, 552]. Δηλαδή, δεν γίνεται να είναι κάποιος τελείως σίγουρος ότι η αντιδραστική ζώνη EBV.p100 στη μία παρτίδα αντιστοιχεί στο ίδιο αντιγόνο με αυτό της αντιδραστικής ζώνης EBV.p100 σε διαφορετική παρτίδα. Επίσης, σε πολλά δείγματα στην περιοχή αυτή της μεμβράνης εντοπίζονται δύο ή περισσότερες αντιδραστικές ζώνες. Είναι

ακόμα πιθανό η αντιδραστική ζώνη αυτή να μην αντιστοιχεί σε ένα αντιγόνο, αλλά σε περισσότερα, καθώς κατά την ηλεκτροφόρηση ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται εκχύλισμα πρωτεϊνών του ιού· άρα υπάρχει η πιθανότητα πρωτεΐνες με παραπλήσιο μοριακό βάρος να «τρέχουν» στο ίδιο ύψος. Για την όσο το δυνατόν καλύτερη αντιμετώπιση των ζητημάτων αυτών, επιλέχθηκε ως αντιδραστική ζώνη EBV.p100 η ζώνη που ήταν κοινή ανάμεσα στα διαφορετικά δείγματα της ίδιας παρτίδας. Η ταυτοποίηση του αντιγόνου ή των αντιγόνων που αντιστοιχούν στην αντιδραστική ζώνη EBV.p100 απαιτούνται επιπλέον πειράματα ηλεκτροφόρησης σε δύο διαστάσεις για πρωτεϊνικό διαχωρισμό τόσο με βάση το μέγεθος, όσο και με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο, και στη συνέχεια εξαγωγή του αντιγόνου από το πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης ή ανοσοκατακρήμνιση χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα και φασματομετρία μάζας για προσδιορισμό της αλληλουχίας [552-560].

Από την ανάλυση των σχέσεων των αντι-EBV.p100 με κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με SSc προέκυψε αυξημένη συχνότητα αυξημένα επίπεδα των αντισωμάτων αυτών σε αντι-Scl-70 θετικούς ασθενείς και θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα των αντι-EBV.p100 και αντι-Scl-70. Πειράματα ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας ως πρωτογενές αντίσωμα ένα ειδικό, μονοκλωνικό αντι-Scl-70 αντίσωμα και ως υπόστρωμα το πρωτεϊνικό εκχύλισμα EBV επιβεβαίωσε ότι το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της Scl-70 αντιδρά με το αντιγόνο που αντιστοιχεί στο EBV.p100 και αναγνωρίζεται και από τους ασθενείς με SSc. Το συμπέρασμα είναι ότι είτε το αντιγόνο αυτό είναι η τοποϊσομεράση I από ευκαρυωτικά επιθηλιακά κύτταρα τα οποία χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια του EBV και επιμόλυνε το ιικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα ή πρόκειται για χυμική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ανάμεσα σε κάποιο αντιγόνο του EBV και στο αυτοαντιγόνο Scl-70. Προς υπεράσπιση της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας, όταν το αντι-Scl-70

αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε ανοσοαποτύπωση με εκχύλισμα πρωτεϊνών ενός άλλου ιού, του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού, δεν εμφανίστηκε ζώνη αντιδραστικότητας στο ύψος που θα αντιστοιχούσε στην τοποϊσομεράση I. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ενδεικτικό της απουσίας επιμόλυνσης του ιικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από πρωτεΐνες των ευκαρυωτικών κυττάρων της καλλιέργειας. Δεδομένο ότι το πειραματικό πρωτόκολλο της παραγωγής των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων του EBV και του CMV είναι κοινό, είναι εύλογο να θεωρηθεί ότι το εκχύλισμα του EBV δεν έχει επιμολυνθεί από ανθρώπινη τοποϊσομεράση I.

Παραπάνω από τους μισούς αντι-Scl-70 θετικούς ασθενείς με SSc έχουν αντισώματα έναντι του EBV.p100. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύει περισσότερο την υπόθεση ότι το EBV.p100 δεν είναι η τοποϊσομεράση I, καθώς αν ήταν, τότε όλοι ή σχεδόν όλοι οι αντι-Scl-70 θετικοί ασθενείς θα είχαν αντι-EBV.p100 αντισώματα. Αν όμως ισχύει η υπόθεση της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας, γιατί δεν έχουν υπάρχουν περισσότεροι ασθενείς με διπλή αντιδραστικότητα για το EBV.p100 και το Scl-70; Η απάντηση θα μπορούσε να είναι ότι τα αντι-EBV.p100 αντισώματα αναγνωρίζουν και αντιδρούν με συγκεκριμένους επιτόπους της τοποϊσομεράσης I, ενώ τα αντι-Scl-70 αυτοαντισώματα αναγνωρίζουν αυτούς και άλλους επιτόπους, όπως κρυπτικούς επιτόπους στο μόριο της τοποϊσομεράσης I. Το μηχανισμό αυτό έχουν αναδείξει οι Mahler και συνεργάτες για τα αντισώματα έναντι της EBNA-1 και της κεντρομεριδιακής πρωτεΐνης A (CENPA) [171, 561]. Αρχικά, προσδιόρισαν το μοτίβο αλληλουχίας αμινοξέων που αναγνωρίζεται από τα αυτοαντισώματα στο μόριο της τοποϊσομεράσης I, το οποίο είναι η πενταμερής, γραμμική αλληλουχία G/A-P-R/S-R-R στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης [561]. Το μοτίβο αυτό απαντάται τρεις φορές στην CENPA, αλλά και μία φορά στην κεντρομεριδιακή πρωτεΐνη B (CENPB), γεγονός που εξηγεί την αυξημένη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα που έχουν τα αντισώματα έναντι των δύο

αυτών διαφορετικών SSc-ειδικών αυτοαντιγόνων [562]. Επίσης, το μοτίβο αυτό απαντάται και στην πρωτεΐνη EBNA-1 του EBV. Τα αντισώματα έναντι του επιτόπου στην EBNA-1 αναγνωρίζουν και τους τρεις επιτόπους στην CENPA, αλλά με διαφορετική συγγένεια. Το ίδιο ισχύει και για τα αντισώματα έναντι των τριών επιτόπων της CENPA, δηλαδή το καθένα αναγνωρίζει τους άλλους δύο επιτόπους και τον επίτοπο της EBNA-1 με διαφορετική συγγένεια. Ένας από τους τρεις επιτόπους στην CENPA είναι κρυπτικός, δηλαδή δε βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου αλλά κρυμμένος στο εσωτερικό, και μάλιστα, η αναγνώριση των επιτόπων επεκτείνεται από τους επιφανειακούς επιτόπους προς τον κρυπτικός καθώς η νόσος εξελίσσεται [169]. Εντούτοις, οι συγγραφείς δεν υποστηρίζουν τη μοριακή μίμηση μεταξύ της EBNA-1 και της CENPA ως μηχανισμό παραγωγής των αντι-CENPA αυτοαντισωμάτων, επειδή η παρουσία των αντι-EBNA-1 αντισωμάτων έπεται χρονολογικά τα αντι-CENPA αυτοαντισώματα [169].

Τα αποτελέσματα των Mahler και συνεργατών δεν αποκλείουν την πιθανότητα ο μηχανισμός της μοριακής μίμησης μεταξύ της EBV.p100 και της τοποϊσομεράσης I να ευθύνεται για την παραγωγή αντισωμάτων που αναγνωρίζουν το Scl-70. Με την πρόοδο της νόσου, νέοι κρυπτικοί επίτοποι θα μπορούσαν να γίνονται προσβάσιμοι στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, με αποτέλεσμα την παραγωγή νέων αυτοαντισωμάτων χωρίς διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με την EBV.p100. Αρκετές μελέτες έχουν αναζητήσει επιτόπους και αντιγονικές περιοχές που αναγνωρίζονται από αντισώματα ή/και από T λεμφοκύτταρα στο μόριο της τοποϊσομεράσης I σε ασθενείς με SSc [563-570], οι οποίοι παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.21. Για να διερεύνηση πιθανού μοριακού μιμητισμού ανάμεσα στο EBV.p100 και στην ανθρώπινη τοποϊσομεράση I, συγκρίθηκαν με BLASTp όλες οι αλληλουχίες των πρωτεϊνών του EBV με μοριακό βάρος γύρω στα 100 kDa με την αλληλουχία της τοποϊσομεράσης I.

Από τα 57 ζευγάρια ομοιότητας που προέκυψαν, τα 16 αντιστοιχούν σε αλληλουχίες της τοποϊσομεράσης I που αλληλοεπικαλύπτονται πλήρως ή μερικώς με αλληλουχίες γνωστών επιτόπων του αυτοαντιγόνου αυτού (Πίνακας 6.20 και Πίνακας 6.21). Συνεπώς, δεν αποκλείεται μία από αυτές τις πρωτεΐνες του EBV να είναι το αντιγόνο EBV.p100 και να εμπλέκεται στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι του SSc-ειδικού Scl-70 και στην παθογένεια της SSc.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας είναι άκρως ενθαρρυντικά αναφορικά με το ρόλο της ανοσολογικής απόκρισης έναντι EBV στην SSc. Τόσο η επιδημιολογική ανάλυση των αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών-αντιγόνων του ιού, και κυρίως του πιθανολογούμενου EBV.p100, όσο και η συσχέτιση τους με κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά της νόσου συνηγορούν υπέρ της συμμετοχής του EBV στις παθογενετικές εξεργασίες της νόσου αυτής.

Κλείνοντας το κεφάλαιο αυτό, στη μελέτη αυτή ο ρόλος του EBV στην MS δεν αναλύθηκε διεξοδικά, όμως έχει παρουσιαστεί λεπτομερώς στην Ενότητα 1.5.6 της Εισαγωγής. Στην ουσία, οι ασθενείς με MS χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες, γνωρίζοντας ότι ο ρόλος του ιού στη νευρολογική αυτή νόσο έχει μελετηθεί εκτενώς σε επιδημιολογικό επίπεδο [307, 314, 322, 342, 345, 571, 572], σε κλινικό επίπεδο [320, 341, 573-575] και σε επίπεδο παθογένειας [309, 322, 346]. Κάποια από τα ήδη γνωστά δεδομένα επιβεβαιώθηκαν και εδώ, όπως για παράδειγμα η αυξημένη συχνότητα των αντι-EBNA-1 αντισωμάτων σε ασθενείς με MS σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες [539, 541]. Ενδιαφέρον όμως αποτελεί η παρουσία της αντιδραστικής ζώνης EBV.p100 και σε τέσσερις ασθενείς με MS. Σε περίπτωση που το αντιγόνο αυτό αντιστοιχεί στο Scl-70, είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται η παρουσία αντι-Scl-70 αντισωμάτων στην MS. Η παρουσία τους έχει αναφερθεί μονάχα σε περιστατικά ασθενών με SSc που ανέπτυξαν και MS, αν και οι κλινικές περιπτώσεις αυτές είναι ιδιαίτερα σπάνιες [576-

578]. Συνεπώς, σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές αναφορές, δεν είναι πιθανό το 9% των ασθενών στη μελέτη αυτή να είναι θετικοί για αντι-Scl-70 αντισώματα. Σε περίπτωση που το αντιγόνο EBV.p100 αντιστοιχεί σε κάποια πρωτεΐνη του EBV καθατού, τότε θα πρέπει να αναγνωρισθεί, όπως έχει συζητηθεί πιο πάνω, ως ένας ακόμα παράγοντας του EBV με συμμετοχή στην MS, όπως το EBNA-1.

Πίνακας 6.21: Ανοσοεπικρατείς επίτοποι ή αντιγονικές περιοχές της τοποϊσομεράσης I που αναγνωρίζονται από αντισώματα ή/και από T λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση.

AA	Αλληλουχία επιτόπου Scl-70	Θέση επιτόπου	Αναφορά
1	WWEEERYPEGIKWKFLEHKG	205-224	[567]
2	RIANFKIEPPGLFRGRGNHP	349-368	[567]
3	PGHKWKEVRHDNKVTWLVSW	397-416	[567]
4	ELDGQEYVVEFDLFGKDSIR	517-536	[567]
5	KFAWAIDMADED	751-762	[568]
6	LQTKIDAKKEQLADARRDLKSAKAD	647-671	[566]
7	HKEHKKEKDREKSKHSNSEHKDSEK	35-59	[566]
8	GKLLKPKNKDKDKKVPDPNKKKKP	171-195	[566]
9	KGEKDWQKYETARRLKKCVDKIRNQYRE DWKSKEMKVRQRAVALYFIDKLALRAGN EKEEGETADTVGCCSLRVEHINLHPELDG QEYVVEFDLFGKDSIRYYNKVPVEKRVFK NLQLFMENKQPEDDLFDRLNTGILNKHLQ DLMEGLTAKVFRTYNASITLQQQLKELTA PDENIPAKILSYNRANRAVAILCNHQRAP	436-636	[564]
10	SQIEADFRLNDSHKHKD	10-26	[565]
11	HPKMGMLKRRIMPED	367-381	[565]
12	LKRRIMPEDIIINC	373-387	[565]
13	PEDIIINCSDAKVP	379-393	[565]
14	AKVFRTYNASITLQQQL	586-602	[565]
15	EKSMMNLQTKIDAKKE	641-656	[565]
16	HLHNDSQIEADFRLNDSHKHKDKHKD	5-30	[569]
17	RIANFKIEPPGLFRGRGNHP	349-368	[563]
18	AGNEKEEGETADTVGCCSLRVEHINLHPE LDGQEYVVEFDLFGKDSIRYYNKVPVEKR VFKNLQLFMENKQPEDDLFDRLNTGIL	489-573	[570]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Συνδυασμένη ανοσολογική απόκριση έναντι του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού και του ιού Epstein-Barr στη συστηματική σκλήρυνση και στην κατά πλάκας σκλήρυνση

7.1 Εισαγωγή

Στα προηγούμενα κεφάλαια μελετήθηκαν ξεχωριστά οι ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι του H_ρ και του EBV σε ασθενείς με MS και σε ασθενείς με SSc. Εντούτοις, η προσέγγιση αυτή πιθανώς να μην είναι αρκετή για να διαλευκάνει τους παθογενετικούς μηχανισμούς της αυτοανοσίας.

Η εκδήλωση των νοσημάτων αυτοάνοσης αρχής, σύμφωνα με την επικρατούσα επιστημονική θεωρία, καθορίζεται από την πολύπλοκη αλληλεπίδραση ανάμεσα στο γενετικό υλικό και στο περιβάλλον. Ο τυχαίος συνδυασμός γενετικής επιδεκτικότητας και περιβαλλοντικών ερεθισμάτων αποτελεί τη βάση της αυτοανοσίας. Τα βακτήρια και οι ιοί αποτελούν λογικούς υποψήφιους περιβαλλοντικούς παράγοντες που πιθανώς να εμπλέκονται στην αυτοανοσία. Παρά την πληθώρα μικροβιακών και ιικών παραγόντων που έχουν συνδεθεί με συγκεκριμένα αυτοάνοσα νοσήματα μέσω ορολογικών μελετών και μελετών παθογένειας, η σχέση αυτή είναι δύσκολο να αποδειχθεί. Η δυσκολία αναγνώρισης ενός μονάχα αιτιολογικού μικροβιακού ή ιικού παράγοντα για κάθε αυτοάνοσο νόσημα ξεχωριστά αντικρούει τα αναθεωρημένα κριτήρια του Koch σχετικά με το «ένας παράγοντας-ένα νόσημα» για τα αυτοάνοσα νοσήματα [99], υποστηρίζοντας ότι αυτός ο κανόνας μάλλον δε βρίσκει εφαρμογή στα πολύπλοκα νοσήματα αυτά. Τουναντίον, αρκετοί μολυσματικοί παράγοντες συμμετέχουν στην επαγωγή και στην εξέλιξη της αυτοανοσίας, ιδιαίτερα όσοι έχουν υψηλό επιπολασμό στον ανθρώπινο πληθυσμό [13, 579]. Καθώς η συχνότητα στον πληθυσμό της μόλυνσης από H_ρ είναι υψηλή και από EBV σχεδόν καθολική, όπως παρουσιάστηκε και στα προηγούμενα κεφάλαια, είναι λογική η υπόθεση να αλληλοεπιδρούν οι

ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι των δύο αυτών κοινών παραγόντων και αυτό να επηρεάζει τους μηχανισμούς αυτοανοσίας στην MS και στην SSc.

Για τη διερεύνηση της υπόθεσης αυτή, μελετήθηκαν οι συχνότητες συνδυασμένης εμφάνισης των αντισωμάτων έναντι του H₉ και του EBV σε ασθενείς με SSc και με MS.

7.2 Υλικά και Μέθοδοι

7.2.1 Υλικά

Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα 2.1.

7.2.2 Μέθοδοι

7.2.2.1 Βιολογικό υλικό ασθενών και μαρτύρων

Συνολικά, στη μελέτη αυτή συμπεριελήφθησαν 44 ασθενείς με MS (26 γυναίκες, 59.1% ηλικία, μέση τιμή: 45.2 ± 11, διάμεση τιμή: 45, εύρος: 23-69). Η διάγνωση βασίστηκε στα ανανεωμένα Κριτήρια McDonald του 2011 [460] και στα κριτήρια που θεσπίστηκαν το 2016 από τον Lorscheider et al [461]. Όλοι οι ασθενείς παρακολουθούνταν σε τακτική βάση στην Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική (Διευθυντές Καθηγητής Γεώργιος Χατζηγεωργίου και Αναπληρωτής Καθηγητής Ευθύμιος Δαρδιώτης) στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

Επίσης, συμπεριελήφθησαν 55 ασθενείς με SSc (43 γυναίκες, 78.2% ηλικία, μέση τιμή: 50.7 ± 9.6, διάμεση τιμή: 50, εύρος: 27-68). Η διάγνωση της νόσου βασίστηκε στα κριτήρια που θέσπισε το Αμερικανικό Κολλέγιο Ρευματολόγων [396]. Οι ασθενείς αυτοί παρακολουθούνταν σε τακτική βάση στην Πανεπιστημιακή Κλινική Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας (Διευθυντές Καθηγητής Λάζαρος Σακκάς και Καθηγητής Δημήτριος Μπόγδανος) στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

Ως υγιή δείγματα ελέγχου (healthy controls, HC) χρησιμοποιήθηκαν 17 υγιείς μάρτυρες (12 γυναίκες, 70.6% ηλικία, μέση τιμή: 45.9 ± 8.3 , διάμεση τιμή: 45, εύρος: 30-60). Οι υγιείς μάρτυρες ήταν μέλη του προσωπικού του Εργαστηρίου και της Κλινικής Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, καθώς και συνοδοί ασθενών. Κανένας υγιής μάρτυρας δεν είχε οικογενειακό ιστορικό αυτοάνοσης νόσου, ούτε άλλη συννοσηρότητα ή χρόνια νόσο, όπως καρκίνο, αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη ή χρόνια καρδιαγγειακή νόσο.

Όλοι οι ασθενείς και οι μάρτυρες ήταν Λευκοί Καυκάσιοι. Από όλους τους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες έγινε λήψη δειγμάτων ολικού περιφερικού αίματος, τα οποία διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση σε φικόλη και τα παράγωγα του αίματος αποθηκεύτηκαν κατάλληλα στους -20°C (Ενότητα 2.2.1).

7.2.2.2 Ανίχνευση IgG αντι-Hp αντισωμάτων με ELISA

Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ELISA «Anti-Helicobacter pylori ELISA (IgG)» της Euroimmun AG (Γερμανία), η οποία χρησιμοποιεί ως αντιγονική πηγή πρωτεϊνικό εκχύλισμα του στελέχους Lior 1 (Brussels) του Hp. Το πειραματικό πρωτόκολλο της ELISA παρουσιάζεται στην Ενότητα 2.2.2.

7.2.2.3 Ανίχνευση IgG αντι-EBV αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ELISA «Anti-EBV WESTERNBLOT (IgG)» της Euroimmun AG (Γερμανία), η οποία χρησιμοποιεί ως αντιγονική πηγή πρωτεϊνικό εκχύλισμα του στελέχους P3HR1 του EBV. Το πειραματικό πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western παρουσιάζεται στην Ενότητα 2.2.3.

7.2.2.4 Κλινικές συσχετίσεις

Η παρουσία συνδυασμένης αντιδραστικότητας έναντι αντι-Hp και αντι-EBV αντισωμάτων αναλύθηκε σε ασθενείς με SSc και σε ασθενείς με MS. Στην SSc τα κλινικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ήταν η παρουσία πνευμονικής ίνωσης, πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης, δακτυλικών ελκών, συμμετοχής του γαστρεντερικού σωλήνα, αρθρίτιδας, ορογονίτιδας, τελαγγεικτασιών, δερματικής ασβέστωσης, νεφρικής συμμετοχής και συννοσηρότητας, συμπεριλαμβανομένου καρκίνου ή άλλης αυτοάνοσης νόσου. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση και ανοσολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία ήταν οι θετικότητες για αντι-Scl-70, για αντι-CENPA, για αντι-CENPB, για αντι-RNApol11 και για αντι-RNA pol155 αντισώματα. Στην MS Τα κλινικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ήταν η EDSS, οι εξάρσεις της νόσου και ο δείκτης εξέλιξης της νόσου ή progression index, δείκτης που αποτελεί το πηλίκο του λόγου της EDSS προς τη διάρκεια της νόσου.

7.2.2.5 Στατιστική ανάλυση

Όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα 2.2.6.

7.3 Αποτελέσματα

7.3.1 Συχνότητες IgG αντι-Hp και IgG αντι-EBV αντισωμάτων στην SSc και στην MS

Ο Πίνακας 7.1 παρουσιάζει τις συχνότητες ξεχωριστών αντισωμάτων έναντι του Hp, των αντιγόνων VCA, των αντιγόνων EA και του αντιγόνου EBNA του EBV. Οι Πίνακες 7.2, 7.3 και 7.4 παρουσιάζουν τις συχνότητες της συνδυασμένης παρουσίας των αντι-Hp αντισωμάτων με τα αντι-VCA, των αντι-Hp αντισωμάτων με τα αντι-EA και των αντι-Hp αντισωμάτων με τα αντι-EBNA, αντίστοιχα. Οι παραπάνω συνδυασμοί

απεικονίζονται στην Εικόνα 7.1. Ο Πίνακας 7.5 παρουσιάζει τις συχνότητες της συνδυασμένης παρουσίας και των τεσσάρων κατηγοριών αντισωμάτων και η Εικόνα 7.2 απεικονίζει τις σχέσεις αυτές.

Η συχνότητα της διπλής θετικότητας για αντι-Hp και αντι-EBNA είναι αυξημένη σε ασθενείς με SSc, αλλά και σε ασθενείς με MS, σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (SSc: 63.6%· MS: 47.4%· HC: 23.5%· SSc έναντι HC, $p=0.005$ · MS έναντι HC, $p=0.002$ · SSc έναντι MS, p =μη σημαντικό). Η συχνότητα της διπλής θετικότητας για αντι-Hp και αντι-EA είχε τάση να είναι αυξημένη σε ασθενείς με SSc, αλλά και σε ασθενείς με MS, σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (SSc: 21.8%· MS: 13.6%· HC: 0%· SSc έναντι HC, $p=0.050$ · MS έναντι HC, $p=0.071$ · SSc έναντι MS, p =μη σημαντικό). Η συχνότητα της διπλής θετικότητας για αντι-Hp και αντι-VCA ήταν συγκρίσιμη σε ασθενείς και μάρτυρες, αν υπήρχε μια τάση να είναι αυξημένη στους ασθενείς με SSc σε σύγκριση με την MS (70.9% έναντι 50%, $p=0.086$).

Όσον αφορά τη συνδυασμένη παρουσία όλων των αντισωμάτων, οι ασθενείς με SSc χαρακτηρίζονταν από τετραπλή θετικότητα (21.8%) και θετικότητα για τα αντι-Hp, τα αντι-VCA και τα αντι-EBNA (41.8%), οι ασθενείς με MS χαρακτηρίζονταν από τριπλή θετικότητα για τα αντι-Hp, τα αντι-VCA και τα αντι-EBNA (31.8%) και διπλή θετικότητα για τα αντι-VCA και τα αντι-EBNA (27.3%), ενώ οι υγιείς μάρτυρες χαρακτηρίζονταν από διπλή θετικότητα για τα αντι-Hp και τα αντι-VCA (29.4%).

Πίνακας 7.1: Συχνότητες εμφάνισης αντισωμάτων έναντι του *Hp* και των αντιγόνων VCA, EA και EBNA του EBV με ανοσοαποτύπωση κατά Western

	SSc (n=55)	MS (n=44)	HC (n=17)	p_{SSc vs MS}	p_{SSc vs HC}	p_{MS vs HC}
Αντι- <i>Hp</i> θετικότητα	39 (70.9%)	23 (52.3%)	10 (58.8%)	0.090	ns	ns
Αντι-EBV.VCA θετικότητα	54 (98.2%)	43 (97.7%)	16 (94.1%)	ns	ns	ns
Αντι-EBV.EA θετικότητα	17 (30.9%)	14 (31.8%)	0	ns	0.008	0.006
Αντι-EBV.EBNA θετικότητα	47 (85.5%)	40 (90.9%)	8 (47.1%)	ns	0.003	0.001

55 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), 44 ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS) και 17 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντομεύσεις: EA, early antigens' EBNA, EBV nuclear antigen' EBV, Epstein-Barr virus' *Hp*, *Helicobacter pylori*' VCA, viral capsid antigen.

Πίνακας 7.2: Συχνότητες συνδυασμένης εμφάνισης αντισωμάτων έναντι του Hp και των αντιγόνων VCA του EBV με ανοσοαποτύπωση κατά Western

	SSc (n=55)	MS (n=44)	HC (n=17)	p_{SSc vs MS}	p_{SSc vs HC}	p_{MS vs HC}
Αντι-Hp+/αντι-EBV.VCA+	39 (70.9%)	22 (50%)	9 (52.9%)	0.086	ns	ns
Αντι-Hp+/αντι-EBV.VCA-	0	1 (2.3%)	1 (5.9%)			
Αντι-Hp-/αντι-EBV.VCA+	15 (27.3%)	21 (47.7%)	7 (41.2%)			
Αντι-Hp-/αντι-EBV.VCA-	1 (1.8%)	0	0			

55 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), 44 ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS) και 17 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square). Αναφέρονται οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντομεύσεις: EBV, Epstein-Barr virus; Hp, Helicobacter pylori; VCA, viral capsid antigen.

Πίνακας 7.3: Συχνότητες συνδυασμένης εμφάνισης αντισωμάτων έναντι του Hp και των αντιγόνων EA του EBV με ανοσοαποτύπωση κατά Western

	SSc (n=55)	MS (n=44)	HC (n=17)	p_{SSc vs MS}	p_{SSc vs HC}	p_{MS vs HC}
Αντι-Hp+/αντι-EBV.EA+	12 (21.8%)	6 (13.6%)	0	ns	0.050	0.071
Αντι-Hp+/αντι-EBV.EA-	27 (49.1%)	17 (38.6%)	10 (58.8%)			
Αντι-Hp-/αντι-EBV.EA+	5 (9.1%)	8 (18.2%)	0			
Αντι-Hp-/αντι-EBV.EA-	11 (20%)	13 (29.5%)	7 (41.2%)			

55 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), 44 ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS) και 17 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square). Αναφέρονται οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντομεύσεις: EA, early antigens EBV, Epstein-Barr virus Hp, Helicobacter pylori.

Πίνακας 7.4: Συχνότητες συνδυασμένης εμφάνισης αντισωμάτων έναντι του Hρ και του αντιγόνου EBNA του EBV με από ανοσοαποτύπωση κατά Western.

	SSc (n=55)	MS (n=44)	HC (n=17)	p SSc vs MS	p SSc vs HC	p MS vs HC
Αντι-Hρ+/αντι-EBV.EBNA+	35 (63.6%)	21 (47.7%)	4 (23.5%)	ns	0.005	0.002
Αντι-Hρ+/αντι-EBV.EBNA-	4 (7.3%)	2 (4.5%)	6 (35.3%)			
Αντι-Hρ-/αντι-EBV.EBNA+	12 (21.8%)	19 (43.2%)	4 (23.5%)			
Αντι-Hρ-/αντι-EBV.EBNA-	4 (7.3%)	2 (4.5%)	3 (17.6%)			

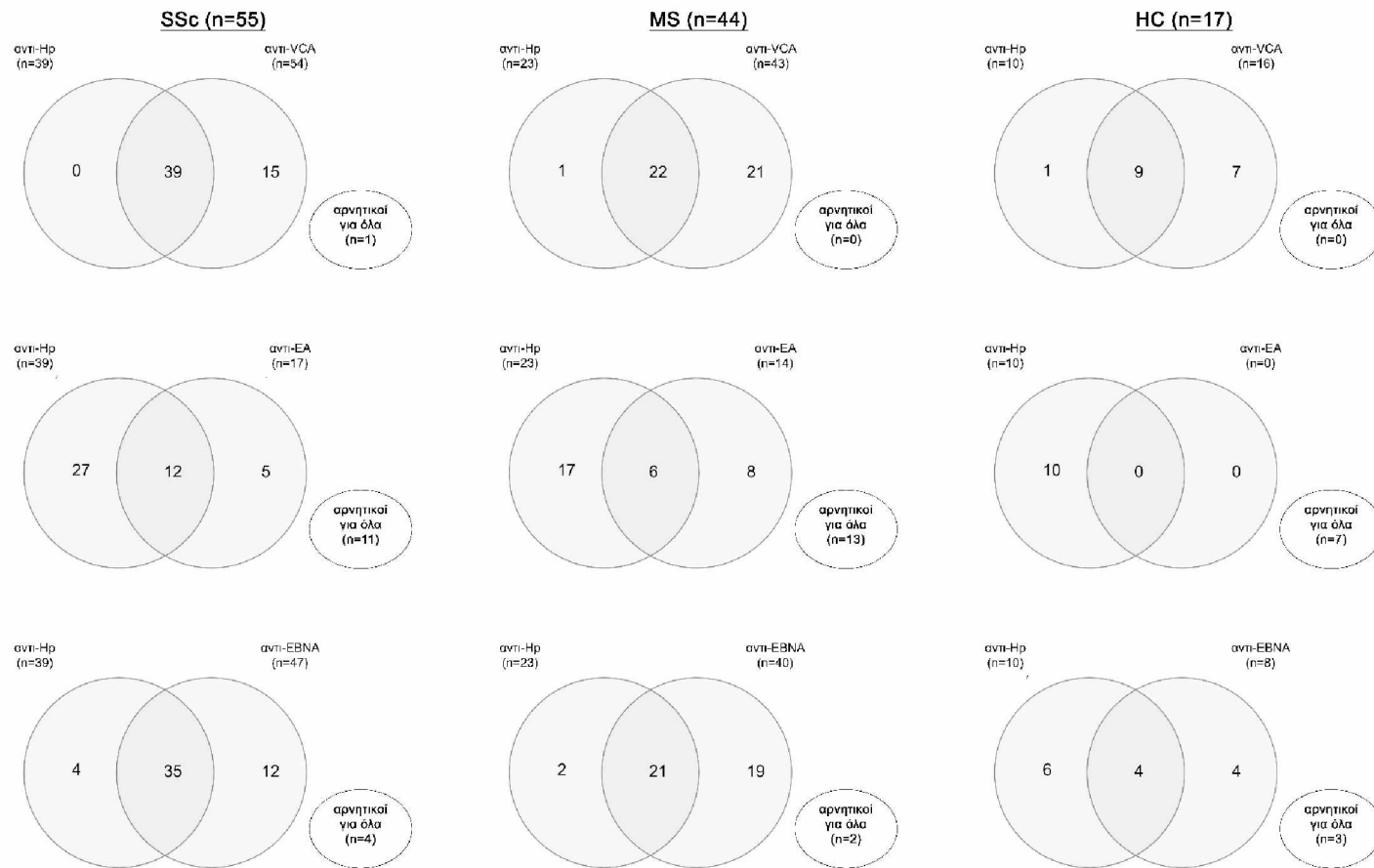
55 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), 44 ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS) και 17 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστίαιων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή. Συντομεύσεις: EBNA, EBV nuclear antigen; EBV, Epstein-Barr virus; Hρ, *Helicobacter pylori*.

Πίνακας 7.5: Συχνότητες συνδυασμένης εμφάνισης αντισωμάτων έναντι του *Hp* και των αντιγόνων VCA, EA και EBNA του με από ανοσοαποτύπωση κατά Western.

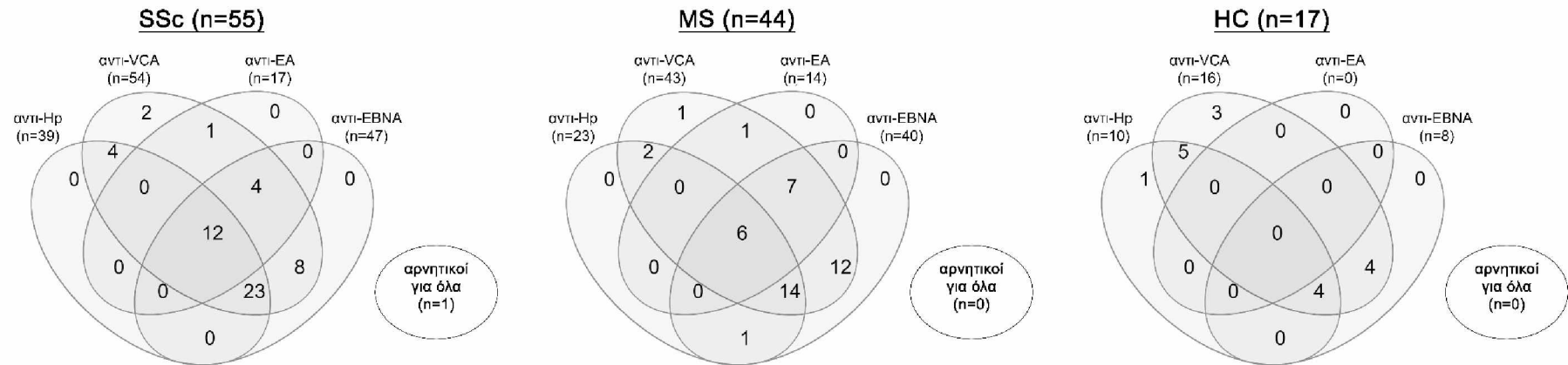
	SSc (n=55)	MS (n=44)	HC (n=17)	p_{SSc vs MS}	p_{SSc vs HC}	p_{MS vs HC}
Αντι- <i>Hp</i> +/αντι-VCA+/αντι-EA+/αντι-EBNA+	12 (21.8%)	6 (13.6%)	0	ns	0.013	0.001
Αντι- <i>Hp</i> +/αντι-VCA+/αντι-EA-/αντι-EBNA+	23 (41.8%)	14 (31.8%)	4 (23.5%)			
Αντι- <i>Hp</i> +/αντι-VCA+/αντι-EA-/αντι-EBNA-	4 (7.3%)	2 (4.5%)	5 (29.4%)			
Αντι- <i>Hp</i> +/αντι-VCA-/αντι-EA-/αντι-EBNA+	0	1 (2.3%)	0			
Αντι- <i>Hp</i> +/αντι-VCA-/αντι-EA-/αντι-EBNA-	0	0	1 (5.9%)			
Αντι- <i>Hp</i> -/αντι-VCA+/αντι-EA+/αντι-EBNA+	4 (7.3%)	7 (15.9%)	0			
Αντι- <i>Hp</i> -/αντι-VCA+/αντι-EA-/αντι-EBNA-	1 (1.8%)	1 (2.3%)	0			
Αντι- <i>Hp</i> -/αντι-VCA+/αντι-EA-/αντι-EBNA+	8 (14.5%)	12 (27.3%)	4 (23.5%)			
Αντι- <i>Hp</i> -/αντι-VCA+/αντι-EA-/αντι-EBNA-	2 (3.6%)	1 (2.3%)	3 (17.6%)			
Αντι- <i>Hp</i> -/αντι-VCA-/αντι-EA-/αντι-EBNA-	1 (1.8%)	0	0			

55 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (SSc), 44 ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση (MS) και 17 υγιή δείγματα ελέγχου (HC). Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή. Συντομεύσεις: EA, early antigens; EBNA, EBV nuclear antigen; EBV, Epstein-Barr virus; *Hp*, *Helicobacter pylori*; VCA, viral capsid antigen.

Εικόνα 7.1: Διαγράμματα Venn των προτύπων διπλής θετικότητας των αντι-Hp, των αντι-VCA, των αντι-EA και των αντι-EBNA-1 αντισωμάτων σε 55 ασθενείς με συστηματικής σκλήρυνση (SSc), σε 44 ασθενείς με MS και σε 17 υγιείς μάρτυρες, όπως ανιχνεύθηκαν με από ανοσοαποτύπωση κατά Western.



Εικόνα 7.2: Διαγράμματα Venn των προτύπων πολλαπλής θετικότητας των αντι-Hp, των αντι-VCA, των αντι-EA και των αντι-EBNA-1 αντισωμάτων σε 55 ασθενείς με συστηματικής σκλήρυνση (SSc), σε 44 ασθενείς με MS και σε 17 υγιείς μάρτυρες, όπως ανιχνεύθηκαν με από ανοσοαποτύπωση κατά Western.



7.3.2 Κλινικές συσχετίσεις των συνδυασμένων ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι του H_p και του EBV στην SSc και στην MS

Οι συνδυασμένες ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι του H_p και έναντι των τριών αντιγονικών κατηγοριών του EBV σχετίζονταν με κλινικά χαρακτηριστικά της SSc, συμπεριλαμβάνοντας την πνευμονική ίνωση, την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, τα δακτυλικά έλκη, την αρθρίτιδα, την ορογονίτιδα, τις τελαγγειεκτασίες, τη δερματική ασβέστωση και τη νεφρική συμμετοχή, αλλά όχι με ανοσολογικά χαρακτηριστικά της SSc, συμπεριλαμβάνοντας τα αντισώματα έναντι των SSc-ειδικών αυτοαντιγόνων Scl-70, CENPA, CENPB, RNAp_{ol11} και RNAp_{ol155}.

Από τους 55 ασθενείς με SSc, οι ασθενείς με τελαγγειεκτασίες ήταν πιο συχνά διπλά θετικοί για αντι-H_p και αντι-VCA (79.5%) και διπλά θετικοί για αντι-H_p και αντι-EBNA αντισώματα (69.2%) σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς τελαγγειεκτασίες (50% και για τους δύο συνδυασμούς με $p=0.048$ και $p=0.007$, αντίστοιχα), ενώ ήταν επίσης πιο συχνά θετικοί μονάχα για τα αντι-H_p αντισώματα (53.8% έναντι 37.5%, $p=0.044$). Οι ασθενείς με ασβέστωση ήταν διπλά θετικοί για τα αντι-H_p και για τα αντι-EA αντισώματα (50%) σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς ασβέστωση που ήταν θετικοί μονάχα για τα αντι-H_p (53.2%). Τέλος, οι ασθενείς με δακτυλικά έλκη λιγότερο συχνά διπλά θετικοί για τα αντι-H_p και τα αντι-EBNA αντισώματα σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς έλκη (46.4% έναντι 81.5%, $p=0.014$).

Στους ασθενείς με MS η ανάλυση των συσχετίσεων ανάμεσα στις συχνότητες της ταυτόχρονης παρουσίας των αντισωμάτων και σε κλινικά χαρακτηριστικά, όπως η EDSS, ο αριθμός των εξάρσεων και ο δείκτης εξέλιξης της νόσου, δεν απέδωσε κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.

7.4 Συζήτηση

Στο Κεφάλαιο 3 και στο Κεφάλαιο 5 παρουσιάστηκαν οι συχνότητες των χυμικών αποκρίσεων έναντι του H_p στην SSc και στην MS, αντίστοιχα, ενώ στο Κεφάλαιο 6 παρουσιάστηκαν οι συχνότητες έναντι του EBV και στις δύο νόσους. Όπως παρουσιάστηκε, η συχνότητα των αντι-H_p αντισωμάτων δε διέφερε ανάμεσα σε MS ή SSc και σε υγιείς μάρτυρες και το ίδιο παρατηρήθηκε και για τα αντι-VCA αντισώματα. Η θετικότητα, όμως, για τα αντι-EA και η θετικότητα για τα αντι-EBNA αντισώματα ήταν σημαντικά αυξημένες στους SSc και στους MS σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες.

Στο παρόν κεφάλαιο εξετάστηκε η συνύπαρξη αντισωμάτων έναντι των δύο αυτών μολυσματικών παραγόντων σε ασθενείς με SSc και με MS. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης, οι ασθενείς με SSc και με MS ήταν πιο πιθανό να είναι διπλά, τριπλά ή τετραπλά θετικοί για αντι-H_p, αντι-VCA, αντι-EA και αντι-EBNA αντισώματα. Τόσο οι SSc, όσο και οι MS, εμφάνισαν αυξημένη συχνότητα διπλής αντι-H_p και αντι-EBNA θετικότητας. Για τους ασθενείς με SSc φαίνεται ότι υπάρχει αυξημένη συχνότητα πολλαπλής θετικότητας με συμμετοχή των αντι-H_p αντισωμάτων, είτε τετραπλής ή τριπλής θετικότητας μαζί με τα αντι-VCA και τα αντι-EBNA, σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, αλλά και με τους MS. Επίσης, από την ανάλυση κλινικών συσχετίσεων προέκυψε θετική σχέση ανάμεσα στην παρουσία τελαγγεικτασιών στους ασθενείς με MS και στη διπλή θετικότητα για αντι-H_p και είτε αντι-VCA ή αντι-EBNA.

Τα αντισώματα έναντι του H_p και του EBV θα μπορούσαν να δρουν συνεργικά στην παθογένεια της αυτοανοσίας, όμως μέχρι σήμερα τέτοιου είδους συνέργεια δεν έχει αναφερθεί για κάποιο αυτοάνοσο νόσημα. Ένας πιθανός μηχανισμός είναι η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα αντισωμάτων που αναγνωρίζουν ανθρώπινους επιτόπους με αντιγόνα του H_p και του EBV. Ο μηχανισμός αυτός προϋποθέτει την ύπαρξη μοριακής μίμησης ανάμεσα σε αντιγονικούς επιτόπους του H_p και του EBV

και σε αυτοαντιγονικούς επιτόπους. Για το H₉ και τον EBV κάτι τέτοιο δεν έχει αναφερθεί, όμως έχει αναφερθεί ότι αντιγονικά πεπτίδια από τον EBV και από το μυκοβακτηρίδιο της παραφυματίωσης των πτηνών (*Mycobacterium avium paratuberculosis*, MAP) αναγνωρίζονται από αντισώματα έναντι της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης (myelin basic protein, MBP) σε ασθενείς με MS [346]. Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκαν στον ορό ασθενών με MS αντισώματα που αντιδρούσαν με το πεπτίδιο 400-413 της EBNA-1, το πεπτίδιο 121-132 της πρωτεΐνης MAP_0106c του MAP και το πεπτίδιο 85-98 της MBP. Το ιικό και το μικροβιακό πεπτίδιο εμφανίζουν σημαντική ομολογία αλληλουχίας, ενώ το πεπτίδιο του EBNA-1 και της MBP εμφανίζουν δομική ομολογία [580]. Η εμφάνιση δομικής ομολογίας ενισχύει σημαντικά την υπόθεση της μοριακής μίμησης ως μηχανισμό επαγωγής αυτοανοσίας, όμως είναι πιο δύσκολο να μελετηθεί σε σχέση με τη γραμμική ομολογία. Επίσης, η πειραματική απόδειξη της παρουσία διασταυρούμενης αντιδραστικότητας καθαυτή δεν αποδεικνύει και αυτοανοσία, καθώς θα πρέπει να εξακριβωθεί πως τα αντισώματα αυτά οδηγούν σε ιστική βλάβη, αλλά και ποιος είναι ο ρόλος της κυτταρομεσολαβούμενης απόκρισης στη διαδικασία αυτή και αν τα T κύτταρα αντιδρούν επίσης με τους εμπλεκόμενους επιτόπους. Σε κάθε περίπτωση, η μοριακή μίμηση ανάμεσα σε αντιγόνα του H₉, του EBV και σε ανθρώπινα αντιγόνα δεν είναι απίθανη.

Ένας ακόμα πιθανός μηχανισμός που εμπλέκει το H₉ και τον EBV είναι η ενεργοποίηση παρακείμενων κυττάρων (*bystander activation*). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, ένας μολυσματικός παράγοντας μπορεί να επάγει αυτοανοσία μέσω της ενεργοποίησης της έμφυτης ανοσίας, της ενεργοποίησης αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και της απελευθέρωσης προφλεγμονοδών κυτταροκινών που ενεργοποιούν παρακείμενα αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα [581]. Ο EBV είναι ιδανικός υποψήφιος παράγοντας πρόκλησης του μηχανισμού αυτού σε βάθος χρόνου, λόγω της ιδιότητας

του να προκαλεί χρόνια, λανθάνουσα λοίμωξη με συνεχείς ενεργοποιήσεις [307]. Η θεωρία της ενεργοποίησης παρακείμενων κυττάρων ορίζει ότι η ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την επαγωγή αυτοανοσίας από αυτοαντιγόνα, γεγονός που υποστηρίζεται από την ανάγκη προσθήκης ανοσοενισχυτικών ουσιών, όπως το ανοσοενισχυτικό του Freund, σε πειραματικά μοντέλα για την επαγωγή αυτοανοσίας [156].

Η συλλοίμωξη με H_ρ και EBV έχει συνδεθεί με σοβαρή γαστρίτιδα, με την ταυτόχρονη παρουσία των δύο παραγόντων να θεωρείται ότι αυξάνει τα επίπεδα της φλεγμονής σε σύγκριση με τη λοίμωξη είτε από H_ρ ή από EBV μονάχα [582, 583], καθώς επίσης έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του στομάχου [584]. Η ταυτόχρονη παρουσία μόλυνσης από H_ρ και EBV δεν έχει αναφερθεί στο παρελθόν για κάποιο αυτοάνοσο νόσημα, συνεπώς είναι δύσκολο να αποτιμηθεί ο ρόλος τους στη δημιουργία ή στην εξέλιξη της αυτοανοσίας. Δεν αποκλείεται κάποιες από τις πρωτεΐνες των παραγόντων αυτών να αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους ή/και με άλλους παράγοντες στο περιβάλλον ή κυτταρικά προϊόντα προς την επαγωγή αυτοανοσίας, χωρίς να αποκλείεται η περίπτωση η αυξημένη παρουσία μολυσματικών παραγόντων σε ασθενείς με κάποιο αυτοάνοσο νόσημα να πρόκειται για ευκαιριακή λοίμωξη σε ανοσοανεπαρκείς ξενιστές. Κλείνοντας, είναι σημαντικό να διερευνηθεί αν η επαγωγή και η εξέλιξη μιας αυτοάνοσης νόσου προκαλούνται από διαφορετικούς μικροβιακούς και ιικούς παράγοντες και αν η αλληλεπίδραση τους τη μεταβάλλει, γεγονότα που θα μπορούσαν να εξηγήσουν εν μέρει τις διαφορές στην κλινική εικόνα που παρατηρούνται σε ασθενείς με την ίδια νόσο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Αυτοαντισώματα σχετιζόμενα με την κατά πλάκας σκλήρυνση και αντιγονοειδικά αντισώματα έναντι του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού και του ιού Epstein-Barr σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση

8.1 Εισαγωγή

Η ανίχνευση Β κυττάρων και IgG αντισωμάτων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, στις απομυελινωτικές πλάκες και στον ορό ασθενών με MS είναι αποτελεί σημαντική ένδειξη ότι η χυμική ανοσία συμμετέχει μαζί με την Τ κυτταρομεσολαβούμενη ανοσία στην παθογένεια της νόσου [288, 585, 586]. Η παρουσία ολιγοκλωνικών αντισωμάτων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι χαρακτηριστική στην MS, σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου και με την κλινική βαρύτητα [587-589], ενώ χρησιμοποιείται και στη διάγνωση [460]. Η αντιγονική ειδικότητα των αντισωμάτων αυτών παραμένει αιγιματική, καθώς αυτά στοχεύουν αυτοαντιγόνα του κεντρικού νευρικού συστήματος [590], όπως συστατικά της μυελίνης και των νευροϊνιδίων, όμως έχει γίνει αναφορά για παρουσία αντισωμάτων έναντι μολυσματικών παραγόντων [572, 591] και έναντι ενδοκυττάρων αντιγόνων που εκφράζονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και απελευθερώνονται έπειτα από ιστική νέκρωση [592].

Οι μηχανισμοί επαγωγής της παραγωγής των αυτοαντισωμάτων παραμένουν επίσης αιγιματικοί. Ο ρόλος διάφορων μολυσματικών παραγόντων έχει μελετηθεί, με έμφαση στον EBV, οι οποίοι μέσω της μοριακής μίμησης και της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας αντιμικροβιακών αντισωμάτων με αυτοαντιγόνα συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου. Αντισώματα έναντι του πεπτιδίων 400-413 της EBNA-1 του EBV και του πεπτιδίου 121-132 της πρωτεΐνης MAP_0106c του MAP είναι ιδιαίτερα συχνά ανάμεσα σε ασθενείς με MS σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [346]. Τα αντισώματα αυτά αντιδρούν επίσης με το πεπτιδίο 85-98 της πρωτεΐνης MBP της μυελίνης, πιθανώς μέσω μοριακής μίμησης. Επίσης, αντισώματα έναντι της EBNA-1

του EBV από ασθενείς με MS αντιδρούν και με την πυρηνική πρωτεΐνη HNRNPL, αν και αυτοαντισώματα έναντι της HNRNPL ανιχνεύονται τόσο σε ασθενείς με MS όσο και σε υγιείς μάρτυρες [285]. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν ότι οι ιοί και τα μικρόβια συμμετέχουν στην επαγωγή αυτοανοσίας, ενδεχομένως μέσω κοινών μηχανισμών και στόχων.

Για τη διερεύνηση πιθανής σχέσης των χυμικών αποκρίσεων έναντι του H_ρ και του EBV με τις χυμικές αποκρίσεις έναντι αυτοαντιγόνων που εμπλέκονται στην MS, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της συνάφειας με βάση τα δεδομένα των αντι-H_ρ και αντι-EBV αποκρίσεων που παρουσιάστηκαν στο Κεφάλαιο 3 και στο Κεφάλαιο 6, αντίστοιχα, και δεδομένα συχνότητας αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς με MS.

8.2 Υλικά και Μέθοδοι

8.2.1 Υλικά

Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα 2.1.

8.2.2 Μέθοδοι

8.2.2.1 Βιολογικό υλικό ασθενών

Συνολικά, συλλέχθηκαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος από 139 ασθενείς με MS (98 γυναίκες, 70.5%· διάμεση ηλικία 42 έτη, εύρος ηλικίας 20-69 έτη), εκ των οποίων τα 102 από ασθενείς με RRMS (73.4% των ασθενών με MS· 70 γυναίκες, 68.6%· διάμεση ηλικία 38 έτη· εύρος ηλικίας 20-66 έτη) και τα 37 από ασθενείς με SPMS (26.6% των ασθενών με MS· 28 γυναίκες, 75.7%· διάμεση ηλικία 58 έτη· εύρος ηλικίας 30-69 έτη). Η διάγνωση της RRMS βασίστηκε στα ανανεωμένα Κριτήρια McDonald του 2011 [460], ενώ η μετάβαση στην SPMS βασίστηκε στα κριτήρια που θεσπίστηκαν το 2016 από τον Lorscheider et al [461]. Κατά την αιμοληψία 38 (27.3%) ασθενείς δε

λάμβαναν κάποια θεραπευτική αγωγή. Ανάμεσα στους υπόλοιπους ασθενείς, 33 (23.7%) λάμβαναν ιντερφερόνη β (συμπεριλαμβανομένου 19 σε ιντερφερόνη β-1α και 14 σε ιντερφερόνη β-1β), 23 (16.5%) λάμβαναν ναταλιζουμάμπη/Tysabri, 20 (14.4%) λάμβαναν φινγκολιμόδη/Gilenya, 18 (12.9%) λάμβαναν οξική γλατιραμέρη/Coraxone, 5 (3.6%) λάμβαναν τεριφλουνομίδη/Aubagio και 2 (1.4%) λάμβαναν μιτοξαντρόνη. Όλοι οι ασθενείς παρακολουθούνταν σε τακτική βάση στην Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική (Διευθυντές Καθηγητής Γεώργιος Χατζηγεωργίου και Αναπληρωτής Καθηγητής Ευθύμιος Δαρδιώτης) στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

Όλοι οι ασθενείς ήταν Λευκοί Καυκάσιοι. Από όλους τους ασθενείς έγινε λήψη δειγμάτων ολικού περιφερικού αίματος, τα οποία διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση σε φικόλη και τα παράγωγα του αίματος αποθηκεύτηκαν κατάλληλα στους -20°C (Ενότητα 2.2.1). Ποσότητα από κάθε δείγμα απεστάλη στη Γερμανία και στη Euroimmun AG με συσκευασία ξηρού πάγου (δες παρακάτω).

8.2.2.2 Ανίχνευση IgG αντι-Hp αντισωμάτων με ELISA

Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ELISA «Anti-Helicobacter pylori ELISA (IgG)» της Euroimmun AG (Γερμανία), η οποία χρησιμοποιεί ως αντιγονική πηγή πρωτεϊνικό εκχύλισμα του στελέχους Lior 1 (Brussels) του Hp. Το πειραματικό πρωτόκολλο της ELISA παρουσιάζεται στην Ενότητα 2.2.2.

8.2.2.3 Ανίχνευση IgG αντι-EBV αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ELISA «Anti-EBV WESTERNBLOT (IgG)» της Euroimmun AG (Γερμανία), η οποία χρησιμοποιεί ως αντιγονική πηγή πρωτεϊνικό

εκχύλισμα του στελέχους P3HR1 του EBV. Το πειραματικό πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western παρουσιάζεται στην Ενότητα 2.2.3.

8.2.2.4 Ανίχνευση IgM και IgG αυτοαντισωμάτων σχετιζόμενων με την MS με έμμεσο ανοσοφθορισμό

Τα δεδομένα των IgM και IgG αυτοαντισωμάτων σχετιζόμενων με την MS είναι αποτέλεσμα έμμεσου ανοσοφθορισμού και η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε από τον Δρ. Kai Fechner στα εργαστήρια της Euroimmun AG στη Γερμανία. Οι στόχοι των αυτοαντισωμάτων που ανιχνεύθηκαν ήταν η πρωτεΐνη myelin-associated glycoprotein (MAG), η πρωτεΐνη CV2, αντιγόνα κυττάρων Purkinje, αντιγόνα της μυελίνης, αντιγόνα των νευροϊνιδίων και αντιγόνα του αγγειακού επιθηλίου. Ως υπόστρωμα στα πειράματα του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν κομμάτι παρεγκεφαλίδας πιθήκου, κομμάτι ισχιακού νεύρου πιθήκου ή ευκαρυωτικά Hep-2 κύτταρα διαμολυσμένα ώστε να υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη MAG ή την πρωτεΐνη glial fibrillary acidic protein (GFAP). Οι οροί που χρησιμοποιήθηκαν απεστάλησαν στη Γερμανία από τη Λάρισα με συσκευασία ξηρού πάγου. Τα αποτελέσματα του έμμεσου ανοσοφθορισμού απεστάλησαν ηλεκτρονικώς.

8.2.2.5 Στατιστική ανάλυση

Όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα 2.2.6.

8.3 Αποτελέσματα

8.3.1 Συχνότητες αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς με MS

Οι συχνότητες των αυτοαντισωμάτων που σχετίζονται με την MS σε ασθενείς με MS, όπως ανιχνεύθηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό, παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.1. Πιο συχνά σε ασθενείς με MS ανιχνεύθηκαν τα IgG αντισώματα έναντι αντιγόνων της

μυελίνης (43.9%), τα IgG αντισώματα έναντι νευροϊνιδιακών αντιγόνων (36.7%) και τα IgM αντισώματα έναντι νευροϊνιδιακών αντιγόνων (25.9%). Τα IgM αντι-MAG αυτοαντισώματα ανιχνεύθηκαν στο 10.8% των ασθενών με MS χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα MAG-διαμολυσμένα Hep-2 κύτταρα, όμως ανιχνεύθηκαν σε πολύ λιγότερους ως και σε κανένα ασθενή όταν χρησιμοποιήθηκε άλλο υπόστρωμα, είτε IgM ή IgG (0% έως 3.6%). Τα IgG αντισώματα έναντι της μυελίνης ανιχνεύθηκαν συχνά σε ασθενείς με MS είτε σε ισχιακό νεύρο ή σε παρεγκεφαλίδα (43.9% και 33.1%, αντίστοιχα), ενώ τα IgM αντισώματα έναντι της μυελίνης ανιχνεύθηκαν σε πολύ λίγους ασθενείς. Τα IgG αντισώματα έναντι αντιγόνων του αγγειακού επιθηλίου εντοπίστηκαν σε 19.4% ασθενών σε παρεγκεφαλίδα πιθήκου αλλά όχι στο ισχιακό νεύρο, ενώ τα αντίστοιχα IgM αντισώματα σε κανένα. Ο επιπολασμός των αντισωμάτων έναντι του CV2, των αντιγόνων των κυττάρων Purkinje και της GFAP ανιχνεύθηκαν, είτε IgM ή IgG, ήταν πολύ χαμηλός έως ανύπαρκτος στους ασθενείς με MS.

Καμία διαφορά στη συχνότητα των αυτοαντισωμάτων δεν εντοπίστηκε ανάμεσα σε ασθενείς με RRMS και με SPMS (Πίνακας 8.1). Επίσης, καμία διαφορά δεν υπήρχε ανάμεσα σε ασθενείς ήταν υπό θεραπευτική φαρμακευτική αγωγή και σε ασθενείς χωρίς (Πίνακας 8.2).

Πίνακας 8.1: Συχνότητες αυτοαντισωμάτων έναντι αντιγόνων που σχετίζονται με την κατά πλάκας σκλήρυνση με έμμεσο ανοσοφθορισμό.

Αυτοαντίσωμα	MS (n=139)	RRMS (n=102)	SPMS (n=37)	p RRMS vs SPMS
MAG IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	0	0	0	N/A
MAG IgM (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	5 (3.6%)	4 (3.9%)	1 (2.7%)	ns
MAG IgM (διαμολυσμένα κύτταρα)	15 (10.8%)	10 (9.8%)	5 (13.5%)	ns
MAG IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	1 (0.7%)	1 (1%)	0	ns
MAG IgG (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	1 (0.7%)	1 (1%)	0	ns
CV2 IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	0	0	0	N/A
CV2 IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	1 (0.7%)	1 (1%)	0	ns
Κύτταρα Purkinje IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	2 (1.4%)	2 (2%)	0	ns
Κύτταρα Purkinje IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	2 (1.4%)	2 (2%)	0	ns
Μυελίνη IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	1 (0.7%)	1 (1%)	0	ns
Μυελίνη IgM (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	2 (1.4%)	1 (1%)	1 (2.7%)	ns
Μυελίνη IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	46 (33.1%)	38 (37.3%)	8 (21.6%)	ns
Μυελίνη IgG (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	61 (43.9%)	49 (48%)	12 (32.4%)	ns
Νευροϊνίδια IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	36 (25.9%)	27 (26.5%)	9 (24.3%)	ns
Νευροϊνίδια IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	51 (36.7%)	38 (37.3%)	13 (35.1%)	ns
Αγγειακό ενδοθήλιο IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	0	0	0	N/A
Αγγειακό ενδοθήλιο IgM (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	0	0	0	N/A
Αγγειακό ενδοθήλιο IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	27 (19.4%)	22 (21.6%)	5 (13.5%)	ns
Αγγειακό ενδοθήλιο IgG (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	0	0	0	N/A
GFAP IgM (διαμολυσμένα κύτταρα)	2 (1.4%)	1 (1%)	1 (2.7%)	ns

139 ασθενείς με MS, συμπεριλαμβανομένων 102 ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα MS (RRMS) και 39 ασθενείς με δευτερογενή προϊούσα MS (SPMS). Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's

Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (*Yates Correction for Continuity*), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (*Fisher's Exact Test*). Συντομεύσεις: *GFAP*, *glial fibrillary acidic protein*· *MAG*, *myelin-associated glycoprotein*· *N/A*, *not applicable*· *ns*, *not significant*.

Πίνακας 8.2: Συχνότητες αυτοαντισωμάτων έναντι αντιγόνων που σχετίζονται με την κατά πλάκας σκλήρυνση, όπως αυτά ανιχνεύθηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό, σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση ταξινομημένους με βάση τη λήψη θεραπευτικής φαρμακευτικής αγωγής.

Αυτοαντίσωμα	Χωρίς θεραπεία (n=38)	Με θεραπεία (n=101)	p
MAG IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	0	0	N/A
MAG IgM (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	0	5 (5%)	ns
MAG IgM (διαμολυσμένα κύτταρα)	6 (15.8%)	9 (8.9%)	ns
MAG IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	0	1 (1%)	ns
MAG IgG (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	0	1 (1%)	ns
CV2 IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	0	0	N/A
CV2 IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	0	1 (1%)	ns
Κύτταρα Purkinje IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	0	2 (2%)	ns
Κύτταρα Purkinje IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	0	2 (2%)	ns
Μυελίνη IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	0	1 (1%)	ns
Μυελίνη IgM (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	1 (2.6%)	1 (1%)	ns
Μυελίνη IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	9 (23.7%)	37 (36.6%)	ns
Μυελίνη IgG (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	13 (34.2%)	48 (47.5%)	ns
Νευροϊνίδια IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	11 (28.9%)	25 (24.8%)	ns
Νευροϊνίδια IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	12 (31.6%)	39 (38.6%)	ns
Αγγειακό ενδοθήλιο IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	0	0	N/A
Αγγειακό ενδοθήλιο IgM (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	0	0	N/A
Αγγειακό ενδοθήλιο IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	4 (10.5%)	23 (22.8%)	ns
Αγγειακό ενδοθήλιο IgG (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	0	0	N/A
GFAP IgM (διαμολυσμένα κύτταρα)	1 (2.6%)	1 (1%)	ns

Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του

Yates για συνεχή κατανομή (*Yates Correction for Continuity*), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (*Fisher's Exact Test*). Συντομεύσεις: GFAP, *glial fibrillary acidic protein*; MAG, *myelin-associated glycoprotein*; N/A, *not applicable*; ns, *not significant*.

8.3.2 Σχέση αυτοαντισωμάτων σχετιζόμενων με την MS με αντισώματα έναντι αντιγόνων του H_ρ και του EBV σε ασθενείς με MS

Οι σχέσεις ανάμεσα στα αυτοαντισώματα της MS με αντι-μικροβιακά και αντι-ιικά αντισώματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.3. Τα IgM αντι-νευροϊνιδιακά αντισώματα ήταν λιγότερα συχνά σε ασθενείς με αντι-H_ρ αντισώματα σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς (15% έναντι 34.2%, $p=0.018$), ενώ τα IgG αντι-νευροϊνιδιακά αντισώματα είχαν την τάση να είναι πιο συχνά στους ασθενείς με αντι-H_ρ αντισώματα (46.7% έναντι 29.1%, $p=0.051$). Ακόμα, οι ασθενείς με αντισώματα έναντι της μυελίνης είχαν πιο συχνά αντι-EA αντισώματα (64.3% έναντι 26.7%, $p=0.040$).

Οι στατιστικά σημαντικές σχέσεις ανάμεσα στα αυτοαντισώματα της MS και στα αντιγονοειδικά H_ρ και EBV αντισώματα σε ασθενείς με MS παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.4. Τα IgM αντι-νευροϊνιδιακά αντισώματα ανιχνεύονταν πιο συχνά σε αντι-p41 θετικούς ασθενείς (40% έναντι 9.8%, $p=0.013$) και σε αντι-p29.UreA θετικούς ασθενείς (29% έναντι 6.7%, $p=0.021$). Τα IgM αντι-MAG αντισώματα ήταν πιο συχνά σε αντι-VacA ασθενείς (22.2% έναντι 3.4%, $p=0.038$), ενώ τα IgG αντισώματα έναντι της μυελίνης ήταν πιο συχνά σε αντι-p67 θετικούς ασθενείς (40% έναντι 14.6%, $p=0.025$). Τέλος, τα IgM αντι-MAG αντισώματα ήταν πιο συχνά σε αντι-EBV.p33 θετικούς ασθενείς (25% έναντι 0%, $p=0.013$). Αρκετές σχέσεις ανάμεσα σε αντι-νευροϊνιδιακά αντισώματα ή σε αντισώματα έναντι αντιγόνων της μυελίνης και σε αντιγονοειδικά αντισώματα είχαν την τάση να είναι στατιστικά σημαντικές και παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.4. Οι υπόλοιπες σχέσεις δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Πίνακας 8.3: Συχνότητες αυτοαντισωμάτων έναντι αντιγόνων που σχετίζονται με την κατά πλάκας σκλήρυνση, όπως αυτά ανιχνεύθηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό, σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση ταξινομημένους με βάση τη θετικότητα για αντι-Hp, για αντι-VCA για αντι-EA για αντι-EBNA αντισώματα.

	αντι-Hp+/αντι-Hp-	p	αντι-VCA+/ αντι-VCA-	p	αντι-EA+/ αντι-EA-	p	αντι-EBNA+/ αντι-EBNA-	p
MAG IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	0/0	N/A	0/0	N/A	0/0	N/A	0/0	N/A
MAG IgM (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	2 (3.3%)/3 (3.8%)	ns	3 (7%)/0	ns	1 (7.1%)/2 (6.7%)	ns	3 (7.5%)/0	ns
MAG IgM (διαμολυσμένα κύτταρα)	4 (6.7%)/11 (13.9%)	ns	4 (9.3%)/0	ns	3 (21.4%)/1 (3.3%)	0.088	4 (10%)/0	ns
MAG IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	1 (1.7%)/0	ns	1 (2.3%)/0	ns	0/1 (3.3%)	ns	1 (2.5%)/0	ns
MAG IgG (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	1 (1.7%)/0	ns	1 (2.3%)/0	ns	0/1 (3.3%)	ns	1 (2.5%)/0	ns
CV2 IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	0/0	N/A	0/0	N/A	0/0	N/A	0/0	N/A
CV2 IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	0/1 (1.3%)	ns	0/0	ns	0/0	N/A	0/0	N/A
Κύτταρα Purkinje IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	0/2 (2.5%)	ns	0/0	N/A	0/0	N/A	0/0	N/A
Κύτταρα Purkinje IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	1 (1.7%)/1 (1.3%)	ns	0/0	ns	0/0	N/A	0/0	N/A
Μυελίνη IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	0/1 (1.3%)	ns	0/0	N/A	0/0	N/A	0/0	N/A
Μυελίνη IgM (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	0/2 (2.5%)	ns	1 (2.3%)/0	ns	1 (7.1%)/0	ns	1 (2.5%)/0	ns
Μυελίνη IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	16 (26.7%)/30 (38%)	ns	16 (37.2%)/1 (100%)	ns	9 (64.3%)/8 (26.7%)	0.040	15 (37.5%)/2 (50%)	ns
Μυελίνη IgG (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	24 (40%)/37 (46.8%)	ns	25 (58.1%)/1 (100%)	ns	11 (78.6%)/15 (50%)	ns	23 (57.5%)/3 (75%)	ns
Νευροϊνίδια IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	9 (15%)/27(34.2%)	0.018	7 (16.3%)/0	ns	4 (28.6%)/3 (10%)	ns	5 (12.5%)/2 (50%)	ns
Νευροϊνίδια IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	28 (46.7%)/23 (29.1%)	0.051	20 (46.5%)/1 (100%)	ns	7 (50%)/14 (46.7%)	ns	19 (47.5%)/2 (50%)	ns
Αγγειακό ενδοθήλιο IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	0/0	N/A	0/0	N/A	0/0	N/A	0/0	N/A
Αγγειακό ενδοθήλιο IgM (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	0/0	N/A	0/0	N/A	0/0	N/A	0/0	ns
Αγγειακό ενδοθήλιο IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	13 (21.7%)/14 (17.7%)	ns	12 (27.9%)/0	ns	6 (42.9%)/6 (20%)	ns	11 (27.5%)/1 (25%)	ns
Αγγειακό ενδοθήλιο IgG (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	0/0	N/A	0/0	N/A	0/0	N/A	0/0	N/A
GFAP IgM (διαμολυσμένα κύτταρα)	1 (1.7%)/1 (1.3%)	ns	1 (2.3%)/0	ns	1 (7.1%)/0	ns	1 (2.5%)/0	ns

Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστιαίων ποσοστών. Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντομεύσεις: EA, early antigen; EBNA,

Epstein-Barr virus nuclear antigen · *GFAP, glial fibrillary acidic protein* · *Hp, Helicobacter pylori* · *MAG, myelin-associated glycoprotein* ·
N/A, not applicable · *ns, not significant* · *VCA, viral capsid antigen*.

Πίνακας 8.4: Συχνότητες αυτοαντισωμάτων έναντι αντιγόνων που σχετίζονται με την κατά πλάκας σκλήρυνση, όπως αυτά ανιχνεύθηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό, σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση ταξινομημένους με βάση τη θετικότητα για αντιγονοειδικά H_p και EBV αντισώματα.

	Anti-H _p p41 θετικοί (n=15)	Anti-H _p p41 αρνητικοί (n=61)	<i>p</i>
Νευροϊνίδια IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	6 (40%)	6 (9.8%)	0.013
	Anti-H _p p29.UreA θετικοί (n=31)	Anti-H _p p29.UreA αρνητικοί (n=45)	<i>p</i>
Νευροϊνίδια IgM (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	9 (29%)	3 (6.7%)	0.021
	Anti-H _p VacA θετικοί (n=18)	Anti-H _p VacA αρνητικοί (n=58)	<i>p</i>
MAG IgM (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	2 (11.1%)	0	0.084
	Anti-H _p VacA θετικοί (n=18)	Anti-H _p VacA αρνητικοί (n=58)	<i>p</i>
MAG IgM (διαμολυσμένα κύτταρα)	4 (22.2%)	2 (3.4%)	0.038
	Anti-H _p p67 θετικοί (n=35)	Anti-H _p p67 αρνητικοί (n=41)	<i>p</i>
Μυελίνη IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	14 (40%)	6 (14.6%)	0.025
	Anti-H _p p33 θετικοί (n=16)	Anti-H _p p33 αρνητικοί (n=60)	<i>p</i>
Νευροϊνίδια IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	10 (62.5%)	21 (35%)	0.089
	Anti-H _p p19.OMP θετικοί (n=22)	Anti-H _p p19.OMP αρνητικοί (n=54)	<i>p</i>
Νευροϊνίδια IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	13 (59.1%)	18 (33.3%)	0.070
	Anti-H _p VacA θετικοί (n=18)	Anti-H _p VacA αρνητικοί (n=58)	<i>p</i>
Μυελίνη IgG (ισχιακό νεύρο πιθήκου)	4 (22.2%)	28 (48.3%)	0.092
	Anti-EBV p42.VCA θετικοί (n=16)	Anti-EBV p42.VCA αρνητικοί (n=29)	<i>p</i>
MAG IgM (διαμολυσμένα κύτταρα)	2 (33.3%)	2 (5.3%)	0.083
	Anti-EBV p33.VCA θετικοί (n=16)	Anti-EBV p33.VCA αρνητικοί (n=29)	<i>p</i>
MAG IgM (διαμολυσμένα κύτταρα)	4 (25%)	0	0.013
	Anti-EBV p33.VCA θετικοί (n=16)	Anti-EBV p33.VCA αρνητικοί (n=29)	<i>p</i>
Μυελίνη IgG (παρεγκεφαλίδα πιθήκου)	3 (100%)	14 (34.1%)	0.051

*Τα δεδομένα αναπαριστούν τον απόλυτο αριθμό των περιπτώσεων και σε παρένθεση τις συχνότητες με τη μορφή εκατοστίαιων ποσοστών. Οι τιμές *p* υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 του Pearson (Pearson's Chi-Square) και τη διόρθωση του*

Yates για συνεχή κατανομή (Yates Correction for Continuity), ενώ σε περιπτώσεις ανεξάρτητων δειγμάτων μικρού μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's Exact Test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή, ενώ αναφέρονται και οι διαφορές με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.1$). Συντομεύσεις: EA, early antigen; EBNA, Epstein-Barr virus nuclear antigen; GFAP, glial fibrillary acidic protein; Hp, Helicobacter pylori; MAG, myelin-associated glycoprotein; N/A, not applicable; ns, not significant; VCA, viral capsid antigen.

8.4 Συζήτηση

Η MS είναι μια φλεγμονώδης νόσος του ΚΝΣ που επάγεται και συντηρείται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Ενώ τον κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου αναλαμβάνουν τα Τ λεμφοκύτταρα, τα Β λεμφοκύτταρα φαίνεται ότι συμμετέχουν επίσης στη διαδικασία αυτή [288, 585, 586]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα Β λεμφοκύτταρα δε διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό· όμως, στην MS ο κυτταρικός αυτός φραγμός διαταράσσεται, με αποτέλεσμα Β κύτταρα, αντισώματα και συστατικά του συμπληρώματος να εισέρχονται στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. Η σημασία του πιθανού ρόλου των Β λεμφοκυττάρων στην MS αναδεικνύεται από τη βελτίωση της κλινικής και της απεικονιστικής κατάστασης της νόσου έπειτα από θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν το Β λεμφοκυτταρικό αντιγόνο CD20 και μειώνουν τον αριθμό των Β λεμφοκυττάρων [593, 594]. Τα Β λεμφοκύτταρα ενδεχομένως συμβάλλουν στις φλεγμονώδεις διεργασίες της MS με την παραγωγή αντισωμάτων [595], την παρουσίαση αντιγόνων και αυτοαντιγόνων σε Τ λεμφοκύτταρα [596, 597], την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών που έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν Τ λεμφοκύτταρα, όπως ο TNF-α, η Β cell lymphotoxin (LT-β), η IFNγ και η IL-6 [598], και το σχηματισμό έκτοπων βλαστικών κέντρων [599, 600].

Τα αυτοαντισώματα φαίνεται ότι έχουν επίσης σημαντικό ρόλο στην MS. *In vivo*, αντισώματα και συστατικά του συμπληρώματος εντοπίζονται σε απομυελινωτικές πλάκες κάποιων ασθενών με MS, τόσο κατά την εμφάνιση της νόσου, όσο και σε προχωρημένο στάδιο [601, 602], ενώ η θεραπεία με πλασμαφαίρεση βελτίωσε σημαντικά τη νευρολογική εικόνα των ασθενών αυτών [603]. *In vitro*, αντισώματα από τον ορό ασθενών με MS είχαν την ικανότητα να επάγουν απομυελινοποίηση και νευραξονική βλάβη σε νευρικές κυτταροκαλλιέργειες [604]. Παρά τη διαφαινόμενη συμμετοχή αυτοαντισωμάτων στην MS, τα αυτοαντιγόνα που εμπλέκονται στη νόσο

αυτή δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί. Τα πιο ευρέως μελετημένα αυτοαντιγόνα στην MS είναι συστατικά του ελύτρου της μυελίνης που περικλείει τους άξονες των νευρώνων, όπως η MBP, η MAG και η myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) [605, 606].

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, μελετήθηκε ο επιπολασμός αυτοαντισωμάτων έναντι αντιγόνων του ΚΝΣ σε ασθενείς με MS, συμπεριλαμβάνοντας αντιγόνα των κυττάρων Purkinje, αντιγόνα της μυελίνης, αντιγόνα των νευροϊνιδίων, αντιγόνα του ενδοθηλίου, καθώς και τη MAG, την GFAP και τη CV2. Η ανίχνευση IgM και IgG αυτοαντισωμάτων έγινε με έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας τρία διαφορετικά υποστρώματα. Πιο συχνά στους ασθενείς με MS ανιχνεύθηκαν τα αυτοαντισώματα έναντι αντιγόνων της μυελίνης και νευροϊνιδιακών αντιγόνων, ενώ συχνά ήταν και τα αυτοαντισώματα έναντι ενδοθηλιακών αντιγόνων. Όσον αφορά τα αυτοαντισώματα έναντι της μυελίνης, η ειδικότητα τους για την MS είναι χαμηλή, καθώς εκτός από ασθενείς με RRMS και SPMS, εντοπίζονται και σε άλλες φλεγμονώδεις νευρολογικές ασθένειες, όπως συστηματικό ερυθρεμάτωδη λύκο με νευρολογική συμμετοχή, βακτηριακή μηνιγγίτιδα και εγκεφαλίτιδα από ερπητοϊό, αλλά και σε υγιείς μάρτυρες [607]. Εντούτοις, τα αυτοαντισώματα αυτά συσχετίζονται με την απεικονιστική βαρύτητα τη και με την έναρξη των εξάρσεων της MS [607].

Ο στόχος κάποιων από τα αντι-μυελικά αντισώματα που ανιχνεύθηκαν στους ασθενείς με MS στη μελέτη αυτή θα μπορούσε να είναι η πρωτεΐνη MAG, καθώς αντι-MAG αντισώματα ανιχνεύθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα κυτταρική σειρά με υπερέκφραση της ανθρώπινης MAG, αν και ανιχνεύθηκαν σε λίγους ασθενείς ή σε κανένα με τα άλλα δύο υποστρώματα. Η MAG εντοπίζεται στην περιαξονική μεμβράνη των ολιγοδενδροκυττάρων που σχηματίζουν τη μυελίνη και παίζει ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση, συμβάλλοντας στο σχηματισμό και στη σταθεροποίηση του ελύτρου

της μυελίνης [608]. Αντι-MAG αυτοαντισώματα και Β κύτταρα που παράγουν αντι-MAG αυτοαντισώματα έχουν ανιχνευθεί στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό αρκετών ασθενών με MS με χρήση ιδιαίτερα ευαίσθητων τεχνικών ανίχνευσης αντισωμάτων, όπως η ραδιοανοσολογική δοκιμασία [609, 610], όμως δεν ανιχνεύονται με τεχνικές λιγότερο ευαίσθητες, όπως η ELISA και η ανοσοαποτύπωση [611], υποδεικνύοντας το χαμηλό βαθμό της χυμικής απόκρισης έναντι στη MAG. Επίσης, ενώ έχει αναφερθεί η Τ και Β αντιδραστικότητα έναντι συγκεκριμένων πεπτιδίων της MAG σε ασθενείς με MS [612], η αντιδραστικότητα αυτή δεν μπόρεσε να αναπαραχθεί [613] και έτσι τόσο οι πιθανοί αντιγονικοί επίτοποι της MAG, όσο και η συμβολή των αντι-MAG αντισωμάτων στην MS χρίζουν επαλήθευσης.

Τα αντι-νευροϊνιδιακά αυτοαντισώματα έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με προϊούσα νόσο και σχετίζονταν με την έκταση της ιστικής βλάβης και την νευραξονική απώλεια [614, 615]. Επίσης, τα αυξημένα επίπεδα των αντι-νευροϊνιδιακών αντισωμάτων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με κλινικά μεμονωμένο σύνδρομο ήταν προγνωστικός δείκτης μετάπτωσης σε MS [616], ενώ τα επίπεδα τους στον ορό ασθενών με κλινικά μεμονωμένο σύνδρομο, RRMS και άλλων νευρολογικών νόσων ήταν συγκρίσιμα [617]. Εντούτοις, η συχνότητα εμφάνισης των αντι-νευροϊνιδιακών αντισωμάτων στον ορό ασθενών με PPMS ήταν αυξημένη [618]. Τα αντισώματα αυτά έχουν ως στόχο τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και ιδιαίτερα τα ινίδια της ακτίνης [617, 618]. Τα νευροϊνίδια είναι ένας δείκτης της νευρικής και νευραξονικής βλάβης, καθώς οι νευροϊνιδιακές πρωτεΐνες απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο μετά ακολουθώντας τη βλάβη, ενώ μπορούν να διαρρεύσουν και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στο αίμα. Η ανοσοποίηση ποντικών με νευροϊνίδια οδήγησε σε φλεγμονή στο κεντρικό νευρικό σύστημα, νευραξονική εκφύλιση και νευρολογική νόσο με παρουσία Τ λεμφοκυττάρων και αντισωμάτων ειδικών για τα νευροϊνίδια και με εναποθέσεις

ανοσοσφαιρινών στους νευράξονες [619]. Ωστόσο, η παρουσία των αυτοαντισωμάτων έναντι αντιγόνων των νευροϊνιδίων έχει αναφερθεί και σε ασθενείς που αναρρώνουν από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και σε ασθενείς με πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση, μειώνοντας την ειδικότητά τους για την MS [620, 621].

Τα αυτοαντισώματα έναντι αντιγόνων του αγγειακού ενδοθηλίου ανιχνεύτηκαν σε αρκετούς ασθενείς με MS, αν και η συμβολή τους στην MS δεν έχει μελετηθεί, επειδή η παρουσία τους δεν έχει ανιχνευθεί σε ασθενείς με MS [622].

Αρκετές σχέσεις εντοπίστηκαν ανάμεσα σε αυτοαντισώματα και σε αντισώματα έναντι αντιγόνων του H_ρ και του EBV. Τα IgM αντι-νευροϊνιδιακά αντισώματα ήταν ανάλογα με τα αντι-p41 και τα αντι-p29.UreA αντισώματα, αν και ήταν αντιστρόφως ανάλογα με τα αντι-H_ρ αντισώματα. Η εξήγηση του αποτελέσματος αυτού είναι αινιγματική· πιθανώς να πρόκειται για επιφαινόμενο και όχι για φαινόμενο με κλινική ή παθογενετική σημασία. Επίσης, τα αντι-MAG αντισώματα ήταν ανάλογα με τα αντι-VacA και τα αντι-EBV.p33 αντισώματα. Η σχέση των αντι-MAG με τα αντι-EBV.p33 είναι υποσχόμενη, καθώς κανένας αντι-EBV.p33 αρνητικός ασθενής δεν είχε αντι-MAG αντισώματα. Ο ρόλος της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας κάποιων από τα αντι-EBV.p33 αντισώματα χρειάζεται διερεύνηση. Τέλος, τα αντισώματα έναντι της μυελίνης είχαν σχέση με αντισώματα έναντι του p67 του H_ρ, μία πρωτεΐνη της θήκης του μαστίγιου του βακτηρίου και τα αντισώματα εναντίον της δεν είναι ειδικά για το H_ρ, επειδή μπορεί να αντιδρούν με την ομόλογη πρωτεΐνη άλλων μαστιγοφόρων βακτηρίων.

Ένα αποτέλεσμα που αξίζει να συζητηθεί είναι η θετική και σημαντική σχέση ανάμεσα στα αντισώματα έναντι της μυελίνης και στα αντι-EA αντισώματα. Η αναλογία αυτή λογικά θα έπρεπε να οδηγήσει και σε κάποια σχέση των αντι-μυελινικών αντισωμάτων με αντισώματα έναντι τουλάχιστον ενός εκ των δύο πρώιμων αντιγόνων του EBV,

δηλαδή του του p45.EAD ή του p43.EAD. Για το τρίτο πρώιμο αντιγόνο του EBV, το p93.EAR, η αντιδραστικότητα ήταν μηδενική στους ασθενείς με MS και δεν ήταν αναμενόμενο να προκύψει κάποια θετική σχέση. Η συνολική θετικότητα για τα πρώιμα αντιγόνα EA του EBV ορίστηκε από την ισχυρή θετικότητα για τουλάχιστον ένα αντίσωμα έναντι πρώιμου αντιγόνου. Η ισχυρή θετικότητα χαρακτηρίστηκε από ένταση εικονοστοιχείων στην ανοσοαποτύπωση ≥ 50 AU, ενώ η θετικότητα, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.3.3, από ένταση εικονοστοιχείων ≥ 23 AU. Κάποιες από τις ζώνες αντιδραστικότητας των αντι-p45.EAD και των αντι-p43.EAD αντισωμάτων ήταν θετικές, όχι όμως ισχυρά θετικές ώστε να αυξηθεί και συχνότητα της συνολικής αντι-EBV θετικότητας. Αυτή η αναντιστοιχία εξηγεί το δυσκατανόητο, εκ πρώτης όψεως, αποτέλεσμα σχετικά με τα αντι-μυελινικά και τα αντι-EA αντισώματα. Αν εφαρμοστεί το κριτήριο της ισχυρής θετικότητας στα αντι-p43.EAD αντισώματα τότε προκύπτει η ίδια θετική σχέση με τα αντι-μυελινικά αντισώματα που παρατηρείται με τα αντι-συνολικά EA αντισώματα.

Μια παρατήρηση κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης στο παρόν κεφάλαιο είναι η ικανότητα ανίχνευσης των αυτοαντισωμάτων ανάλογα με το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε βιοψία από παρεγκεφαλίδα πιθήκου, βιοψία από ισχιακό νεύρο πιθήκου ή διαμολυσμένα Hep-2 κύτταρα για υπερέκφραση κάποια πρωτεΐνης εκ των MAG, GFAP, CV2. Η χρήση διαμολυσμένων κυττάρων με υπερέκφραση κάποιας πρωτεΐνης εμφάνισε τριπλάσιους ασθενείς θετικούς για IgM αντι-MAG αντισώματα, ενώ ορατές διαφορές παρατηρήθηκαν ανάμεσα στην παρεγκεφαλίδα και στο ισχιακό νεύρο του πιθήκου για τα IgG αντισώματα έναντι της μυελίνης και τα IgG αντι-ενδοθηλιακά αντισώματα. Ένα ζήτημα που προκύπτει αφορά την ομολογία των πρωτεϊνών ανάμεσα στον άνθρωπο και στα πρωτεύοντα θηλαστικά, βιοψίες των

οποίων χρησιμοποιούνται συχνά στον έμμεσο ανοσοφθορισμό. Η ομολογία των πρωτεϊνών ανάμεσα στα είδη αυτά είναι αρκετά μεγάλη, ώστε τα ανθρώπινα αυτοαντισώματα να αναγνωρίζουν τα αντίστοιχα αντιγόνα στις πιθήκειες βιοψίες [623-625]. Επίσης, αναγνώριση του αντιγόνου από το αυτοαντίσωμα δεν απαιτεί μονάχα η πρωτεΐνη να έχει τη φυσιολογική της δομή, αλλά και όλες τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες ενδεχομένως αναγνωρίζονται επίσης από τα αυτοαντισώματα. Η διαφορετική διαμόρφωση των αντιγόνων στα διαφορετικά υποστρώματα μπορεί να οφείλεται για τη διαφορετική αναγνώριση αυτών από τα αυτοαντισώματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Παραγωγή ιντερλευκίνης 10 από Β λεμφοκύτταρα και ιντερφερόνης γ από Τ λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση

9.1 Εισαγωγή

Οι κυτταροκίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις φλεγμονώδεις ανοσολογικές αποκρίσεις και στην παθογένεια της MS. Από μελέτες σε ασθενείς με MS, αλλά και στην πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα, το πειραματικό μοντέλο της MS, είναι γνωστή η συμμετοχή των κυτταροκινών στην απομυελινοποίηση, στη βλάβη των νευρικών αξόνων και στην εκφύλιση των νευρώνων [602, 626-628]. Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που εκκρίνονται κυρίως από CD4+ Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα (Th), όπως η ιντερφερόνη γ (IFN-γ), είναι αυξημένες στην MS και συμμετέχουν στην έναρξη και στην εξέλιξη της. Αντίθετα, αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που εκκρίνονται κυρίως από ρυθμιστικά Β και Τ λεμφοκύτταρα, όπως η ιντερλευκίνη 10 (IL-10), έχουν προστατευτικό επίδραση και την ικανότητα καταστολής της φλεγμονής, όμως είναι μειωμένες στην MS.

Η IFN-γ παράγεται από Τ λεμφοκύτταρα και φυσικά φονικά (NK) κύτταρα και επάγει την ενεργοποίηση μονοκυττάρων, τη διαφοροποίηση Τ λεμφοκυττάρων προς Th1 κύτταρα, την έκφραση MHC I και MHC II μορίων στην επιφάνεια αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και την Β λεμφοκυτταρική ισοτυπική εναλλαγή [629]. Παράγεται κυρίως από CD4+ Th1 λεμφοκύτταρα και είναι ο βασικός μεσολαβητής της Th1 ανοσολογικής απόκρισης. Αν και υπό φυσιολογικές συνθήκες η IFN-γ δεν ανιχνεύεται στο ΚΝΣ, τόσο η ίδια η πρωτεΐνη IFN-γ, όσο και IFN-γ mRNA μπορούν να ανιχνευθούν σε πλάκες στο ΚΝΣ σε ασθενείς με MS [630-632]. Επίσης, αυξημένα επίπεδα της IFN-γ ανιχνεύονται σε ασθενείς με MS σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, ενώ η αύξηση των επιπέδων συμβαίνει πριν από την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων [633, 634]. Επιπλέον, Th1 κύτταρα που παράγουν IFN-γ εντοπίζονται

στο ΚΝΣ πριν από την έξαρση της νόσου και εξαφανίζονται κατά την ύφεση [635-637], καθώς επίσης σχετίζονται με τη βαρύτητα της νόσου [637, 638].

Η IL-10 παράγεται από μονοκύτταρα, μακροφάγα, Β λεμφοκύτταρα και Th2 λεμφοκύτταρα [629]. Η IL-10 ασκεί την αντιφλεγμονώδη δράση της μέσω πολλών μηχανισμών, μερικοί από τους οποίους είναι η αναστολή των Th1 λεμφοκυττάρων και των προφλεγμονοδών κυτταροκινών IFN-γ, TNF-β και IL-2 [639], η αναστολή του πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων [640] και η ελάττωση της έκφρασης μορίων MHC II [641]. Η παραγωγή της από PBMC είναι μειωμένη πριν από την εμφάνιση έξαρσης σε ασθενείς με RRMS [642]. Επίσης, τα επίπεδα της είναι σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με SPMS σε σύγκριση με ασθενείς με RRMS αρκετές εβδομάδες πριν από την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων ή την εμφάνιση βλαβών του ΚΝΣ στον απεικονιστικό έλεγχο [643]. Αντίθετα, τα επίπεδα της αυξάνονται κατά την περίοδο των υφέσεων της MS [636, 644]. Η παραγωγή της IL-10 από Β ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα είναι ο κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου τα Β ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα ασκούν την ανοσορυθμιστική κατασταλτική τους δράση [645, 646]. Τα Β ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα που παράγουν IL-10 είναι μειωμένα και μη λειτουργικά σε ασθενείς με SSc, με ψωρίαση και με ψωριασική αρθρίτιδα, ενώ παράλληλα τα επίπεδα της IL-10 ήταν αντιστρόφως ανάλογα με τα επίπεδα της IFN-γ που παράγεται από T λεμφοκύτταρα [647, 648].

Με σκοπό τη μελέτη του ρόλου της IFN-γ εκ T βοηθητικών λεμφοκυττάρων και της IL-10 εκ Β ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στην παθογένεια της MS, εξετάστηκε με κυτταρομετρία ροής η έκφραση των κυτταροκινών αυτών από τους αντίστοιχους κυτταρικούς πληθυσμούς σε ασθενείς με RRMS, αρκετοί από τους οποίους ήταν πρωτοδιαγνωσθέντες πριν από την έναρξη της θεραπείας. Επίσης, μελετήθηκε η

πιθανή συσχέτιση των επιπέδων των δύο αυτών κυτταροκινών με αντιγονοειδικά αντισώματα έναντι του H_ρ και του EBV.

9.2 Υλικά και Μέθοδοι

9.2.1 Υλικά

Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα 2.1.

9.2.2 Μέθοδοι

9.2.2.1 Βιολογικό υλικό ασθενών και μαρτύρων

Δείγματα ολικού περιφερικού αίματος συλλέχθηκαν από 30 ασθενείς με RRMS (21 γυναίκες, 70%· διάμεση ηλικία, 41 έτη· εύρος ηλικίας, 21-60 έτη), συμπεριλαμβάνοντας 14 πρωτοδιαγνωσθέντες ασθενείς (10 γυναίκες, 71.4%· διάμεση ηλικία, 37 έτη· εύρος ηλικίας, 21-55 έτη). Από τους υπόλοιπους 16 ασθενείς με RRMS, οι 4 δε λάμβαναν κάποια φαρμακευτική αγωγή, 1 λάμβανε ιντερφερόνη β-1α, 8 λάμβαναν ναταλιζουμάμπη/Tysabri, 2 λάμβαναν οξική γλατιραμέρη/Coraxone και 1 λάμβανε τεριφλουνομίδη/Aubagio. Η διάγνωση της RRMS βασίστηκε στα ανανεωμένα Κριτήρια McDonald του 2011 [460]. Όλοι οι ασθενείς παρακολουθούνταν σε τακτική βάση στην Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική (Διευθυντές Καθηγητής Γεώργιος Χατζηγεωργίου και Αναπληρωτής Καθηγητής Ευθύμιος Δαρδιώτης) στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

Ως υγιή δείγματα ελέγχου (healthy controls, HC) χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος από 17 υγιείς μάρτυρες (14 γυναίκες, 82.4%· διάμεση ηλικία 47 έτη, εύρος ηλικίας 28-62). Οι υγιείς μάρτυρες ήταν μέλη του προσωπικού του Εργαστηρίου και της Κλινικής Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, καθώς και συνοδοί ασθενών. Κανένας υγιής μάρτυρας δεν είχε οικογενειακό ιστορικό αυτοάνοσης

νόσου, ούτε άλλη συννοσηρότητα ή χρόνια νόσο, όπως καρκίνο, αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη ή χρόνια καρδιαγγειακή νόσο.

Όλοι οι ασθενείς και οι μάρτυρες ήταν Λευκοί Καυκάσιοι. Όλα τα δείγματα ολικού περιφερικού αίματος διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση σε φικόλη και τα παράγωγα του αίματος αποθηκεύτηκαν κατάλληλα, είτε στους -20°C ή σε υγρό άζωτο (Ενότητα 2.2.1)..

9.2.2.2 Κυτταρομετρία ροής

Τα πειραματικά πρωτόκολλα της κυτταρομετρίας ροής για τη φαινοτυπική τυποποίηση λεμφοκυττάρων μέσω σήμανσης των επιφανειακών αντιγόνων CD3 για T λεμφοκύτταρα, CD4 για T βοηθητικά λεμφοκύτταρα (TH) και CD19/CD27 για B ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Bregs) και για τη μελέτη της ενδοκυττάριας παραγωγής των κυτταροκινών IFN-γ και IL-10 από T και B λεμφοκύτταρα, αντίστοιχα, ύστερα από ενεργοποίηση παρουσιάζονται στις Ενότητες 2.2.4.2 και 2.2.4.3.

9.2.2.3 Ανίχνευση IgG αντι-Hp αντισωμάτων με ELISA

Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ELISA «Anti-Helicobacter pylori ELISA (IgG)» της Euroimmun AG (Γερμανία), η οποία χρησιμοποιεί ως αντιγονική πηγή πρωτεϊνικό εκχύλισμα του στελέχους Lior 1 (Brussels) του Hp. Το πειραματικό πρωτόκολλο της ELISA παρουσιάζεται στην Ενότητα 2.2.2.

9.2.2.4 Ανίχνευση IgG αντιγονοειδικών Hp αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ELISA «Antibodies against Helicobacter pylori (IgG) EUROLINE-WB» της Euroimmun AG (Γερμανία), η οποία χρησιμοποιεί ως αντιγονική πηγή πρωτεϊνικό εκχύλισμα του στελέχους ATCC 43504 του Hp [466, 467]. Όλα τα αντι-Hp+ δείγματα ασθενών με MS και ελέγχου εξετάστηκαν για την ύπαρξη

αντιδραστικών αντισωμάτων έναντι 12 πρωτεϊνών-αντιγόνων του H_p: p75, p67-FSH, p66-UreB, p54, p50, p41, p33, p30-OMP, p29-UreA, p26, p19-OMP και p17. Το πειραματικό πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western παρουσιάζεται στην Ενότητα 2.2.3.

9.2.2.5 Ανίχνευση IgG αντι-EBV αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ELISA «Anti-EBV WESTERNBLOT (IgG)» της Euroimmun AG (Γερμανία), η οποία χρησιμοποιεί ως αντιγονική πηγή πρωτεϊνικό εκχύλισμα του στελέχους P3HR1 του EBV. Το πειραματικό πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western παρουσιάζεται στην Ενότητα 2.2.3.

9.2.2.6 Στατιστική ανάλυση

Όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων της Ενότητας αυτής παρουσιάζονται στην Ενότητα 2.2.6.

9.3 Αποτελέσματα

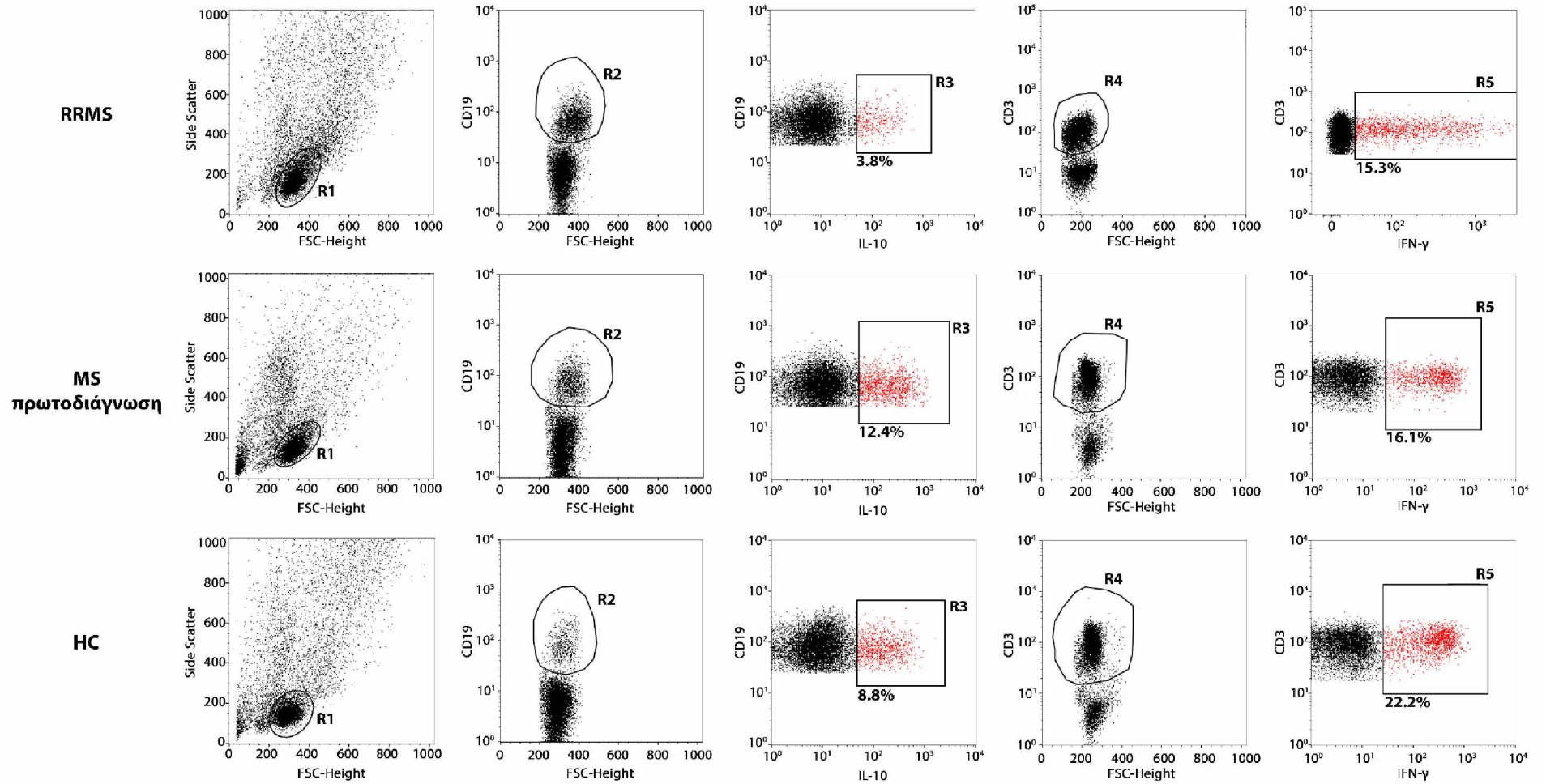
9.3.1 IL-10⁺ B λεμφοκύτταρα και IFN- γ T λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα κατά πλάκας σκλήρυνση και ασθενείς με πρωτοδιάγνωση κατά πλάκας σκλήρυνσης

Η Εικόνα 9.1 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής από 3 αντιπροσωπευτικά δείγματα (1 RRMS, 1 πρωτοδιαγνωσθέν MS και 1 HC), ενώ η Εικόνα 9.2 απεικονίζει την κατανομή των CD19⁺ B λεμφοκυττάρων που παρήγαγαν IL-10 και την κατανομή των CD3⁺ T λεμφοκυττάρων που παρήγαγαν IFN- γ .

Τα CD19⁺ B λεμφοκύτταρα που παρήγαγαν IL-10 ήταν σημαντικά μειωμένα σε ασθενείς με RRMS σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες (4% \pm 3.8% έναντι 8.8% \pm 3.4%, $p=0.001$). Όταν μετρήθηκαν τα CD19⁺/IL-10⁺ κύτταρα στους πρωτοδιαγνωσθέντες

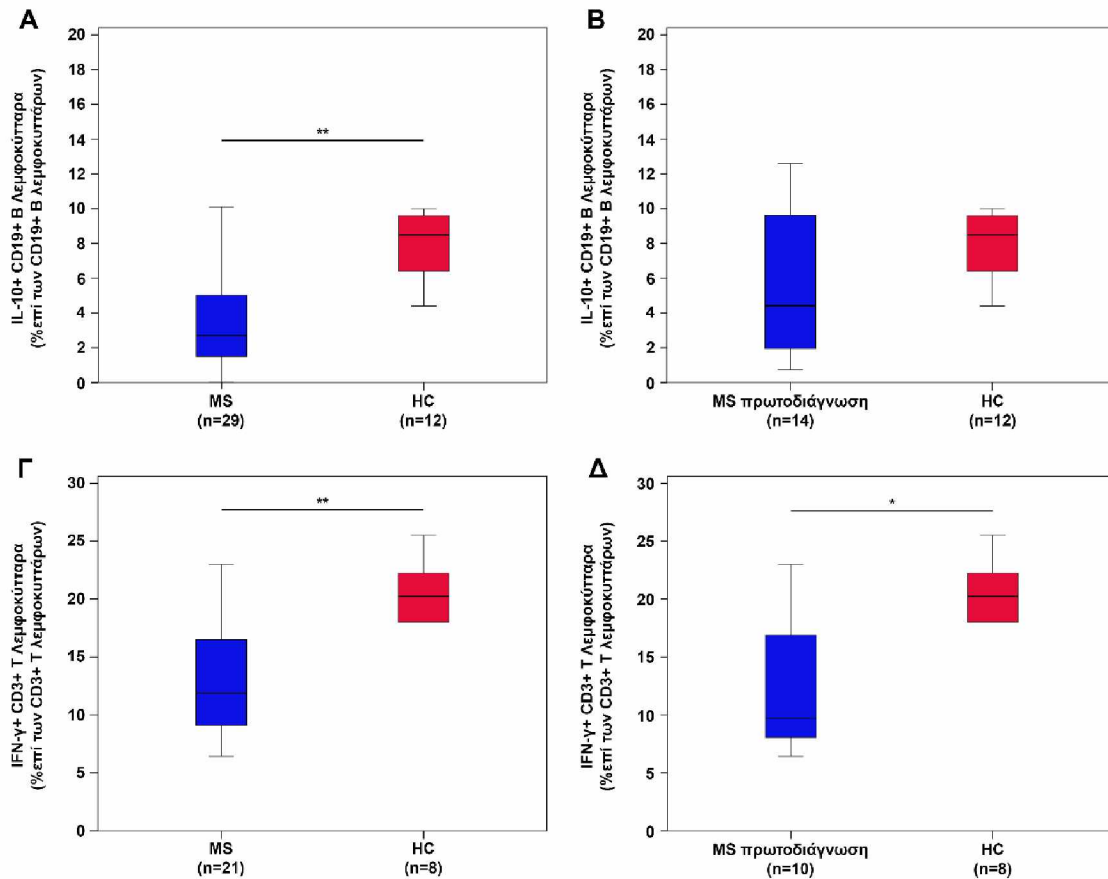
ασθενείς με MS που δεν είχαν λάβει ακόμα θεραπεία, τα ποσοστά δε διέφεραν σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες ($5.9\% \pm 4.5\%$ έναντι $8.8\% \pm 3.4\%$, p =μη σημαντικό). Μάλιστα, 5 πρωτοδιαγνωσθέντες ασθενείς είχαν ποσοστά των IL-10 παραγωγών CD19+ B λεμφοκυττάρων μεγαλύτερα από το μέσο όρο των υγιών μαρτύρων (12.6% , 12.4% , 10.1% , 9.6% και 9.4%). Τα CD3+ T λεμφοκύτταρα που παρήγαγαν IFN- γ ήταν σημαντικά μειωμένα σε ασθενείς με RRMS σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες ($13.1\% \pm 5.3\%$ έναντι $19.7\% \pm 4.4\%$, $p=0.005$) και το ίδιο παρατηρήθηκε και όταν αναλύθηκαν μονάχα οι πρωτοδιαγνωσθέντες ασθενείς με MS ($12.8\% \pm 6.3\%$ έναντι $19.7\% \pm 4.4\%$, $p=0.015$). Τα CD19+/IL-10+ κύτταρα δε συσχετίζονταν με τα CD3+/IFN- γ κύτταρα στους ασθενείς με RRMS ($R=-0.023$, p = μη σημαντικό, Εικόνα 9.3), αλλά ούτε και στους πρωτοδιαγνωσθέντες ασθενείς ($R=-0.022$, p = μη σημαντικό, Εικόνα 9.3). Ούτε τα CD19+/IL-10+, αλλά ούτε και τα CD3+/IFN- γ τα κύτταρα συσχετίζονταν με κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου, όπως η διευρυμένη κλίμακα κατάστασης αναπηρίας, η ηλικία έναρξης της νόσου, η διάρκεια της νόσου, ο δείκτης εξέλιξης της νόσου και ο αριθμός των εξάρσεων.

Εικόνα 9.1: Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής



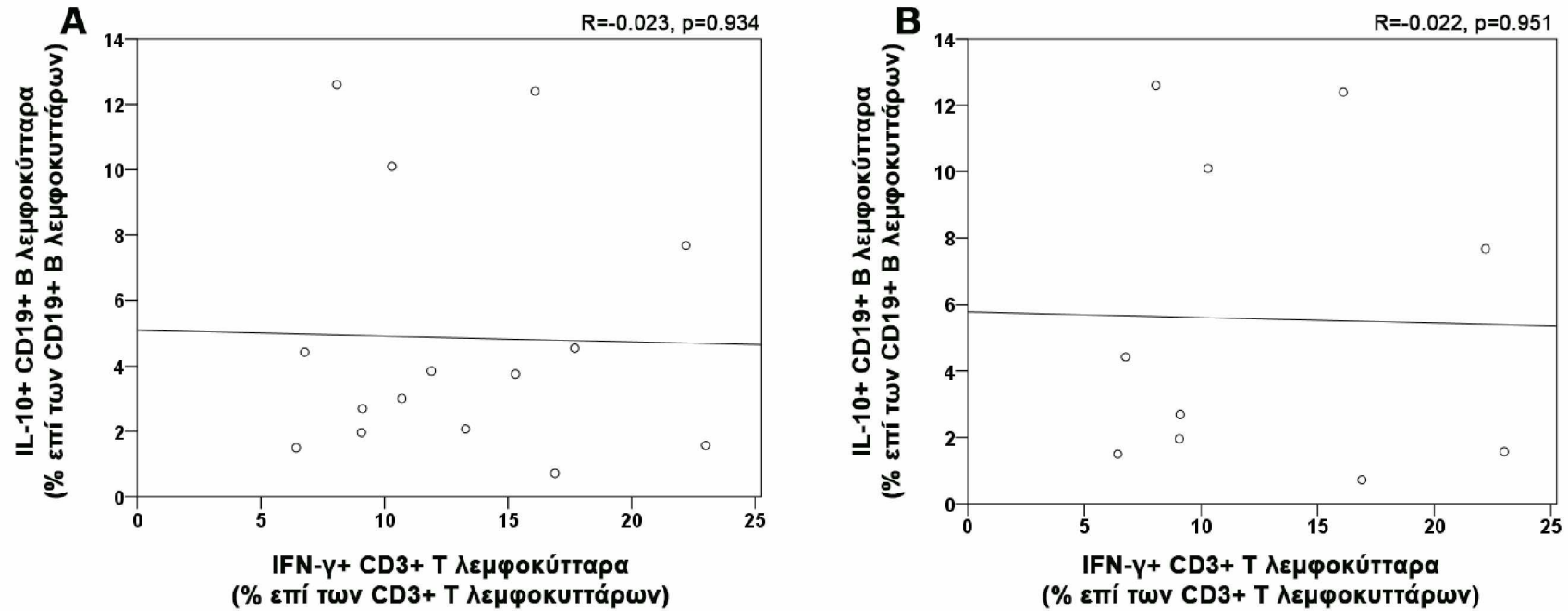
Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής από 3 αντιπροσωπευτικά δείγματα, 1 από ασθενή με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα κατά πλάκας σκλήρυνση (RRMS), 1 από ασθενή με πρωτοδιάγνωση κατά πλάκας σκλήρυνσης πριν από τη χορήγηση θεραπευτικής φαρμακευτικής αγωγής (MS πρωτοδιάγνωση) και 1 από υγιή μάρτυρα (HC). Η κυτταρική ομάδα R1 στις εικόνες της πρώτης στήλης αντιστοιχεί στον πληθυσμό των λεμφοκυττάρων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις. Η κυτταρική ομάδα R2 αντιστοιχεί στον πληθυσμό των CD19+ B λεμφοκυττάρων επί του συνόλου των λεμφοκυττάρων της ομάδας R1. Η κυτταρική ομάδα R3 αντιστοιχεί στον πληθυσμό των CD19+ B λεμφοκυττάρων που παρήγαγαν IL-10 επί του συνόλου των λεμφοκυττάρων της ομάδας R2. Η κυτταρική ομάδα R4 αντιστοιχεί στον πληθυσμό των CD3+ T λεμφοκυττάρων επί του συνόλου των λεμφοκυττάρων της ομάδας R1. Η κυτταρική ομάδα R5 αντιστοιχεί στον πληθυσμό των CD3+ T λεμφοκυττάρων που παρήγαγαν IFN- γ επί του συνόλου των λεμφοκυττάρων της ομάδας R4. Συντομώσεις: FSC, forward scatter; IFN- γ , ιντερφερόνη γ ; IL-10, ιντερλευκίνη 10.

Εικόνα 9.2: Θηκογράμματα απεικόνισης της κατανομής των CD19+ B λεμφοκυττάρων που παρήγαγαν IL-10 και την κατανομή των CD3+ T λεμφοκυττάρων που παρήγαγαν IFN- γ .



A) CD19+/IL-10+ κύτταρα σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα κατά πλάκας σκλήρυνση (RRMS) και σε υγιείς μάρτυρες (HC). B) CD19+/IL-10+ κύτταρα σε ασθενείς με πρωτοδιάγνωση κατά πλάκας σκλήρυνσης (MS πρωτοδιάγνωση) και σε HC. Γ) CD3+/IFN- γ + κύτταρα σε ασθενείς με RRMS και σε HC. Δ) CD3+/IFN- γ + κύτταρα σε ασθενείς με MS πρωτοδιάγνωση και σε HC. Η μέση γραμμή κάθε θηκογράμματος αντιστοιχεί στη διάμεση τιμή, η βάση αντιστοιχεί στο 25^ο εκατοστημόριο, η οροφή αντιστοιχεί στο 5^ο εκατοστημόριο, ο κάτω ακροδέκτης αντιστοιχεί στο 5^ο εκατοστημόριο και ο πάνω ακροδέκτης αντιστοιχεί στο 95^ο εκατοστημόριο. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. Συνομημύσεις: IFN- γ , ιντερφερόνη γ · IL-10, ιντερλευκίνη 10.

Εικόνα 9.3: Διαγράμματα διασποράς που απεικονίζουν τις συσχετίσεις ανάμεσα σε CD19+/IL-10+ κύτταρα και σε CD3+/IFN- γ + κύτταρα



A) ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα κατά πλάκας σκλήρυνση και B) ασθενείς με πρωτοδιάγνωση κατά πλάκας σκλήρυνσης.

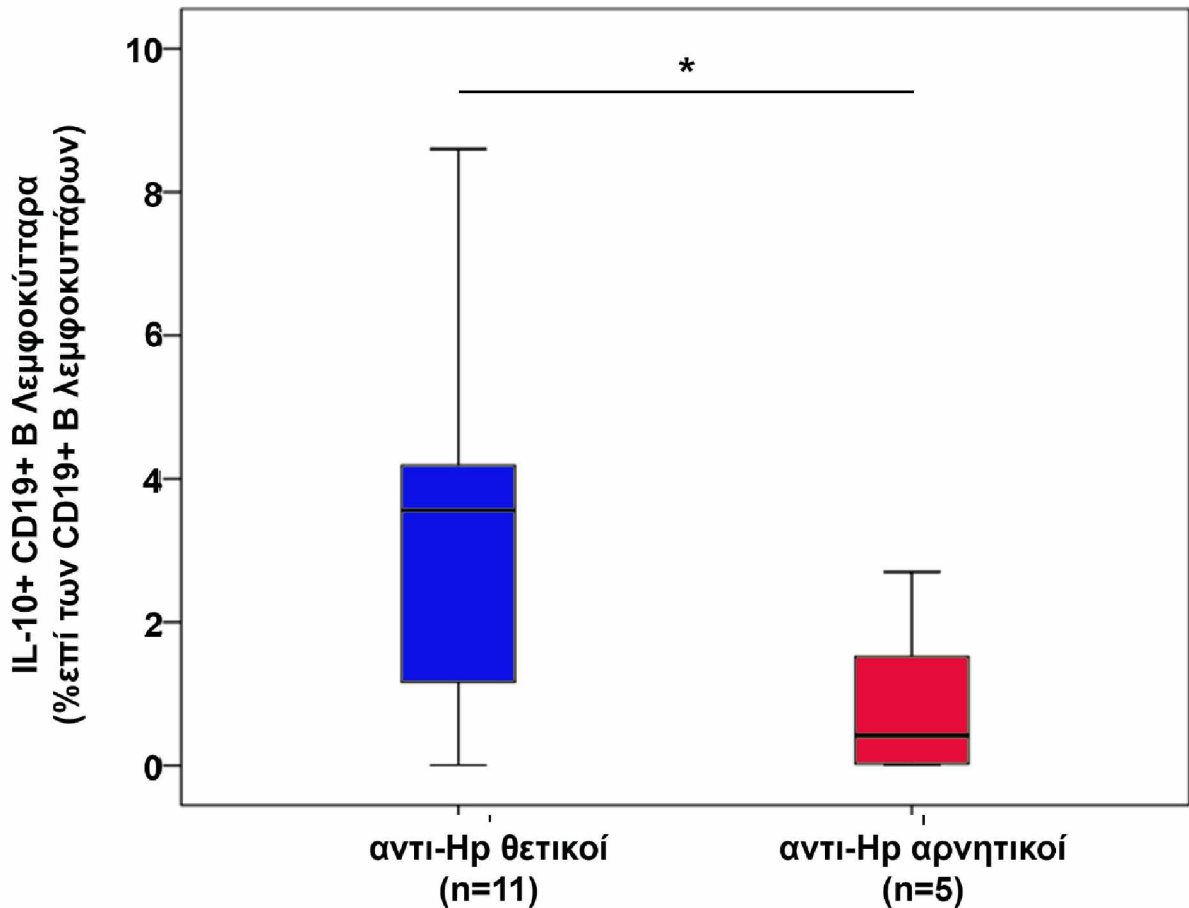
Συντομώσεις: IFN- γ , ιντερφερόνη γ , IL-10, ιντερλευκίνη 10.

9.3.2 Συσχετίσεις των IL-10 παραγωγών Β λεμφοκυττάρων και των IFN-γ παραγωγών Τ λεμφοκυττάρων με χυμικές αποκρίσεις έναντι του Ηρ και του EBV σε ασθενείς με RRMS

Όταν οι ασθενείς ταξινομήθηκαν με βάση τη θετικότητα τους για αντισώματα έναντι του Ηρ, οι αντι-Ηρ+ ασθενείς είχαν σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά CD19+ Β λεμφοκυττάρων που παρήγαγαν IL-10 σε σύγκριση με τους αντι-Ηρ- ασθενείς (3.2 ± 2.6 έναντι 0.9 ± 1.2 , $p=0.032$, Εικόνα 9.4), ενώ καμία διαφορά δεν εμφανίστηκε για τα ποσοστά των CD3+ Τ λεμφοκυττάρων. Επίσης, τα ποσοστά των CD19+/IL-10+ κυττάρων συσχετίζονταν θετικά με τα επίπεδα των αντι-p54 αντισωμάτων ($R=0.680$, $p=0.008$).

Όταν οι ασθενείς ταξινομήθηκαν με βάση την παρουσία αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων VCA, EA και EBNA του EBV, τα ποσοστά των και CD3+/IFN-γ+ κυττάρων δε διέφεραν ανάμεσα σε θετικούς και αρνητικούς. Από την ανάλυση συσχετίσεων ανάμεσα σε CD19+/IL-10+ ή CD3+/IFN-γ+ κύτταρα με τα επίπεδα των αντιγονοειδικών EBV αντισωμάτων, το ποσοστό των CD19+/IL-10+ κυττάρων ήταν ανάλογο με τα επίπεδα των αντι-p125.VCA αντισωμάτων ($R=0.797$, $p=0.032$).

Εικόνα 9.4: Θηκόγραμμα απεικόνισης της κατανομής των CD19+ B λεμφοκυττάρων που παρήγαγαν IL-10 σε αντι-Hp θετικούς και αντι-Hp αρνητικούς ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα κατά πλάκας σκλήρυνση.



Η μέση γραμμή κάθε θηκογράμματος αντιστοιχεί στη διάμεση τιμή, η βάση αντιστοιχεί στο 25^ο εκατοστημόριο, η οροφή αντιστοιχεί στο 5^ο εκατοστημόριο, ο κάτω ακροδέκτης αντιστοιχεί στο 5^ο εκατοστημόριο και ο πάνω ακροδέκτης αντιστοιχεί στο 95^ο εκατοστημόριο. * $p < 0.05$. Συντόμευση: IL-10, ιντερλευκίνη 10.

9.4 Συζήτηση

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήθηκαν η παραγωγή της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 από Β λεμφοκύτταρα και της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IFN- γ από Τ λεμφοκύτταρα με κυτταρομετρία ροής σε ασθενείς με RRMS, συμπεριλαμβάνοντας έναν ικανοποιητικό αριθμό ασθενών με πρωτοδιάγνωση της νόσου πριν τη χορήγηση οποιασδήποτε ανοσοτροποποιητικής ή ανοσοκατασταλτικής θεραπείας. Όπως αναμενόταν, τα ποσοστά των Β λεμφοκυττάρων που παρήγαγαν IL-10 ήταν σημαντικά μειωμένα στους ασθενείς με RRMS σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Εντούτοις, στους πρωτοδιαγνωσθέντες ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνσης τα ποσοστά των κυττάρων αυτών ήταν συγκρίσιμα με τους υγιείς μάρτυρες. Μάλιστα, σχεδόν στους μισούς ασθενείς με πρωτοδιάγνωση τα ποσοστά των IL-10+ Β λεμφοκυττάρων ήταν υψηλότερα από τους μάρτυρες. Εξίσου αναπάντεχο αποτέλεσμα ήταν τα σημαντικά χαμηλότερα των Τ λεμφοκυττάρων που παρήγαγαν IFN- γ στους ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση, είτε χρόνιας μορφής ή σε πρωτοδιάγνωση, σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες.

Η μείωση των IL-10+ Β λεμφοκυττάρων ήταν αναμενόμενη στους ασθενείς με κατά πλάκας σκλήρυνση, καθώς η μείωση των επιπέδων της θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος που οδηγεί στην εμφάνιση της νόσου [642-644]. Ο ίδιος μηχανισμός ενδέχεται να εμπλέκεται και στην παθογένεια και άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων, ρευματολογικών και δερματολογικών [647, 648]. Τα αυξημένα ποσοστά των IL-10 παραγωγών Β λεμφοκυττάρων είναι δύσκολο να εξηγηθούν. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι οι ασθενείς με την αυξημένη παραγωγή της IL-10 βρίσκονται σε στάδιο πριν την ύφεση της νόσου, καθώς υπάρχουν αναφορές ότι η παραγωγή της κυτταροκίνης αυτής αυξάνεται κατά την περίοδο των υφέσεων [636, 644]. Είναι πιθανό η μεγάλη αύξηση της IL-10 που παρατηρήθηκε σε μέρος των

ασθενών με πρωτοδιάγνωση MS να είναι μέρος μιας προσπάθειας των ανοσορρυθμιστικών μηχανισμών να αναστείλουν τη φλεγμονώδη αυτοάνοση απόκριση που οδήγησε στην εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων. Χωρίς να υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την πορεία της νόσου στους ασθενείς αυτούς, θα ήταν ενδιαφέρον να διαπιστωθεί αν οι ασθενείς αυτοί μπήκαν σε ύφεση κατά το άμεσο χρονικό διάστημα ή όχι.

Τα μειωμένα ποσοστά των IFN- γ παραγωγών T λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με RRMS ήταν ακόμα ένα αναπάντεχο αποτέλεσμα, επειδή η προφλεγμονώδης αυτή κυτταροκίνη είναι αυξημένη σε ασθενείς με MS, ιδιαίτερα πριν από την έναρξη κλινικών συμπτωμάτων και κατά τις εξάρσεις [633, 634]. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι οι ασθενείς που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή βρίσκονται σε μια αποδρομή του φλεγμονώδους σταδίου της νόσου, καθώς έχει αναφερθεί ότι T λεμφοκύτταρα που παράγουν IFN- γ εξαφανίζονται κατά την περίοδο των υφέσεων [635-637]. Χωρίς να υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την πορεία της νόσου, θα ήταν ενδιαφέρουσα η παρακολούθηση της κλινικής πορείας των ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή με σκοπό να διερευνηθεί αν μπήκαν σε ύφεση. Η μείωση των IFN- γ παραγωγών T λεμφοκυττάρων θα μπορούσε να οφείλεται στη δράση της φαρμακευτικής θεραπευτικής αγωγής που λάμβαναν κάποιοι από τους ασθενείς με RRMS στη μελέτη αυτή, όπως η ναταλιζουμάμπη, για την οποία υπάρχουν αναφορές ότι εξασθενεί την παραγωγή προφλεγμονοδών κυτταροκινών όπως η IFN- γ [649]. Εντούτοις, η μειωμένη παραγωγή IFN- γ θα μπορούσε να έχει παθογενετικό ρόλο στην MS, καθώς υπάρχουν αναφορές για προστατευτικό ρόλο της κυτταροκίνης αυτής στην MS [650], καθώς και στο πειραματικό μοντέλο της [651-653]. Τα επίπεδα της IFN- γ στον ορό ασθενών με προϊούσα MS είναι αυξημένα σε ασθενείς με κλινική βελτίωση της νόσου, ενώ αντιθέτως ήταν χαμηλά σε ασθενείς με επιδείνωση της κλινικής εικόνας

της νόσου [650]. Στην πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα, η IFN- γ μπορεί να ασκήσει προστατευτική δράση ρυθμίζοντας τόσο την έμφυτη ανοσία μέσω της αναστολής προφλεγμονοδών κυτταροκινών και της επαγωγής ανασταλτικών μεσολαβητών της φλεγμονής από NK κύτταρα και από δενδριτικά κύτταρα [654-656], όσο και την προσαρμοστική ανοσία μέσω της αναστολής δραστηκών Th17 λεμφοκυττάρων και της επαγωγής T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων [657, 658].

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής μελετήθηκαν επίσης πιθανές συσχετίσεις των IL-10+ B λεμφοκυττάρων και των IFN- γ + T λεμφοκυττάρων με τις ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι του H₁N₁ και του EBV σε ασθενείς με MS. Μέχρι στιγμής, αυτή είναι η πρώτη μελέτη των παραπάνω σχέσεων. Η παρουσία αντι-H₁N₁ αντισωμάτων σε ασθενείς με MS ήταν ανάλογη με τα ποσοστά των IL-10+ B λεμφοκυττάρων και αυτό ίσως σχετίζεται με πιθανή ανοσοτροποιοτική δράση του βακτηρίου αυτού. Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι το H₁N₁ έχει ανοσοκατασταλτική επίδραση επάγοντας την παραγωγή IL-10 από T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα, επίδραση που βοηθάει την μικροβιακή ανάπτυξη [659]. Ένας τέτοιος μηχανισμός συνηγορεί υπέρ μιας προστατευτικής δράσης της μόλυνσης από το H₁N₁ στην MS, όπως έχει αναφερθεί από αρκετές ερευνητικές ομάδες [364, 371, 372, 468]. Σχετικά με τις αντι-EBV ανοσολογικές αποκρίσεις, δεν προέκυψε κάποια συσχέτιση με τα IL-10 παραγωγά B λεμφοκύτταρα, αλλά ούτε και με τα IFN- γ παραγωγά T λεμφοκύτταρα. Το αποτέλεσμα αυτό ενδεχομένως οφείλεται στο γεγονός ότι όλοι σχεδόν οι ασθενείς με MS που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση αυτή ήταν αντι-EBV θετικοί, το οποίο σε συνδυασμό με το μικρό μέγεθος του δείγματος ελαχιστοποίησε τις πιθανότητες ανάδειξης κάποιας στατιστικά σημαντικής διαφοράς. Αυξημένα ποσοστά IL-10+ B λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με αντι-EBV αντισώματα δε θα ήταν αναπάντεχο εύρημα, καθώς ο ιός έχει τροπισμό προς το συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό και σχετίζεται με αυξημένα

επίπεδα παραγωγής της IL-10 από τα κύτταρα αυτά [660, 661]. Τέλος, η θετικές συσχετίσεις των IL-10+ B λεμφοκυττάρων με αντισώματα έναντι του αντιγόνου p54 του Ηρ και του αντιγόνου p125.EBV του EBV σε ασθενείς με MS είναι ένα εύρημα που χρήζει περισσότερης διερεύνησης με σκοπό τη διαλεύκανση της αλληλεπίδρασης της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης με τις αντιγονοειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις στην παθογένεια της MS.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: SARS-CoV-2 και μοριακή μίμηση

10.1 Εισαγωγή

Ο ιός Corona του σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου τύπου 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus 2, SARS-CoV-2) προκαλεί την ασθένεια του ιού Corona 2019 (Corona Virus Disease 2019, COVID-19) [662]. Η ταχεία εξάπλωση του SARS-CoV-2 στις αρχές του 2020 και η πανδημία που προκάλεσε αποτελούν μία επείγουσα υγειονομική κατάσταση σε παγκόσμιο επίπεδο που παρακίνησε πολλές βιοϊατρικές ερευνητικές ομάδες να κατευθύνουν την έρευνα τους στην κατανόηση της παθογένειας της νόσου αυτής. Η κατάσταση αυτή έχει ζορίσει σημαντικά τα εθνικά συστήματα υγείας ανά τον κόσμο, με το μέλλον να είναι αβέβαιο και την πιθανότητα της μακροχρόνιας παρουσίας του SARS-CoV-2 στον πλανήτη να είναι πιθανή [663].

Η COVID-19 εκδηλώνεται ως ένα φάσμα σημείων και συμπτωμάτων, από μια σχεδόν ασυμπτωματική γριπώδη συνδρομή ή μια λοίμωξη του αναπνευστικού με πυρετό, βήχα, δύσπνοια και σοβαρή πνευμονία με αναπνευστική ανεπάρκεια, έως μια καταστρεπτική πολυοργανική ανεπάρκεια με πιθανή προσβολή του καρδιαγγειακού συστήματος, των νεφρών, του κεντρικού νευρικού συστήματος, του ήπατος και του γαστρεντερικού σωλήνα [664-666]. Ουσιαστικά, η COVID-19 δεν είναι μια σοβαρή πνευμονία, αλλά μια συστηματική νόσος, με τη θνητότητα να είναι αρκετά υψηλή σε άρρνες ηλικιωμένους με συννοσηρότητες, ιδιαίτερα την αρτηριακή υπέρταση και στο σακχαρώδη διαβήτη [664].

Παρά την ταχεία συσσώρευση γνώσης σχετικά με την COVID-19, οι μοριακοί, κυτταρικοί και ανοσολογικοί μηχανισμοί που ευθύνονται για την πολυσυστηματική προσβολή της νόσου δεν έχουν διαλευκανθεί ακόμα [666, 667]. Ένας πιθανός μηχανισμός που έχει προταθεί είναι η μοριακή μίμηση. Η παρουσία δομικά όμοιων

περιοχών ανάμεσα σε ιικές και σε ανθρώπινες πρωτεΐνες θα μπορούσε να προκαλέσει ανοσολογικές αποκρίσεις που δε θα στοχεύουν μονάχα τον ιό, αλλά και ανθρώπινες πρωτεΐνες με επακόλουθη ιστική βλάβη αυτοάνοσης φύσης στον ανθρώπινο ξενιστή. Η πιθανότητα διασταυρούμενης αντιδραστικότητας, χυμικής ή κυτταρικής, θα μπορούσε να εξηγεί τις ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις της COVID-19. Έτσι, η πολυοργανική βλάβη που παρατηρείται στους βαρέως πάσχοντες θα μπορούσε να γίνεται μέσω μίας εξαρτώμενης από αντισώματα ενεργοποίησης συστατικών του συμπληρώματος ή μακροφάγων ή T κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων που στοχεύει ενδογενή αυτοαντιγόνα.

Ένας πιθανός μηχανισμός βλάβης των πνευμόνων στην COVID-19 είναι η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ κοινών πεπτιδίων της γλυκοπρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 και του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων [668]. Επίσης, οι ανοσολογικές αποκρίσεις μέσω μοριακής μίμησης και διασταυρούμενης αντιδραστικότητας έναντι των ανθρώπινων πρωτεϊνών DAB1, AIFM1 και SURF1 που εκφράζονται σε κύτταρα του αναπνευστικού κέντρου στο εγκεφαλικό στέλεχος θα μπορούσαν να επιβαρύνουν την αναπνευστική λειτουργία στην COVID-19, επιπροσθέτως της άμεσης πνευμονικής καταστροφής από τον ιό [669].

Οι καρδιαγγειακές διαταραχές που παρατηρούνται στην COVID-19 ενδεχομένως να είναι αποτέλεσμα της δράσης αντισωμάτων έναντι αντιγόνων των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία παράγονται μέσω μοριακής μίμησης με πρωτεΐνες του SARS-CoV-2 [670, 671]. Η δράση αυτών θα μπορούσε να οδηγήσει σε εκτεταμένη αγγειίτιδα με διάχυτη διαταραχή του ενδοαγγειακού πήκτικού μηχανισμού και πολυοργανική βλάβη και ανεπάρκεια [672, 673]. Επίσης, η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία που έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με COVID-19 και χαρακτηρίζεται από καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων που επάγεται από αυτοαντισώματα έναντι της

ερυθροκυτταρικής πρωτεΐνης Ankyrin 1 πιθανώς να οφείλεται σε μοριακή μίμηση, λόγω ομοιοτήτων στην αλληλουχίες της Ankyrin 1 και της ιικής γλυκοπρωτεΐνης S υποστηρίζουν [674, 675].

Εκτός από άμεση βλάβη στους πνεύμονες και σε άλλα συστήματα του οργανισμού, η μόλυνση με SARS-CoV-2 θα μπορούσε να έχει και μακροπρόθεσμες επιπτώσεις μέσω της επαγόμενης από μοριακή μίμηση αυτοανοσίας. Ήδη έχουν αναφερθεί περιπτώσεις εμφάνισης της νόσου Kawasaki, του συνδρόμου Guillain-Barré, καθώς και μυοσίτιδας που σχετίζονται με την COVID-19 [676-678]. Έπειτα από συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών των πρωτεϊνών του SARS-CoV-2, το αποτέλεσμα ήταν τουλάχιστον μία ομοιότητα για κάθε ιική με κάποια ανθρώπινη πρωτεΐνη, ομοιότητες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε απώλεια της ανοσολογικής αυτοανοχής και αυτοανοσία [679].

Το γονιδίωμα του ιού κωδικοποιεί για τέσσερις δομικές γλυκοπρωτεΐνες: την πρωτεΐνη spike (πρωτεΐνη S), την πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου (πρωτεΐνη N), τη μεμβρανική πρωτεΐνη (πρωτεΐνη M) και την πρωτεΐνη του φακέλου (πρωτεΐνη E). Για τη διερεύνηση πιθανής μοριακής μίμησης και διασταυρούμενης αντιδραστικότητας ανάμεσα σε ανθρώπινες πρωτεΐνες και σε δομικές πρωτεΐνες του SARS-CoV-2, στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε μια συστηματική συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών από ιικούς αντιγονικούς επιτόπους και από ανθρώπινες πρωτεΐνες. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση ανάμεσα στις αλληλουχίες των ιικών πρωτεϊνών και 16 γνωστών αυτοαντιγόνων για αυτοάνοσες, κυρίως ρευματικές, νόσους (Jo-1, PL-7, PL-12, Ro52/SSA-1, Ro60, La/SS-B, κεντρομεριδιακή πρωτεΐνη A (CENP-A), κεντρομεριδιακή πρωτεΐνη B (CENP-B), RNA πολυμεράση 11 (RNAPol11), RNA πολυμεράση 155 (RNAPol155), Scl70, μυελοπεροξειδάση (MPO), πρωτεΐνάση 3 (PR3), gp210, sp100 και β2GPI).

10.2 Υλικά και Μέθοδοι

10.2.1 Υλικά

Η εκπόνηση της ανάλυσης στο Κεφάλαιο αυτό δεν απαιτήσε χρήση υλικών, παρά μόνο ηλεκτρονικού υπολογιστή και κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων, τα οποία περιγράφονται παρακάτω.

10.2.2 Μέθοδοι

Προς διερεύνηση αντιγονικών επιτόπων των τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών του SARS-CoV-2, έγινε αναζήτηση της βιβλιογραφίας στην αγγλική γλώσσα στη βάση δεδομένων PubMed με ημερομηνία δημοσίευσης από την ημερομηνία έναρξης της πανδημίας μέχρι την 1^η Μαΐου. Οι όροι αναζήτησης ήταν «SARS COV 2 epitope», «SARS-CoV-2 epitope», «SARS COV 2 epitopes» και «SARS-CoV-2 epitopes». Στην αναζήτηση συμπεριλήφθηκαν πρωτότυπες εργασίες, ανασκοπήσεις, δημοσιεύσεις σχολιασμού, άρθρα σύνταξης, επιστολές και περιγραφές κλινικών περιστατικών σχετικές με το αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Βιβλιογραφικές αναφορές εντός των αποτελεσμάτων της PubMed που μελετήθηκαν με συνάφεια στο αντικείμενο χρησιμοποιήθηκαν επίσης.

Οι αμινοξικές αλληλουχίες των τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών του SARS-CoV-2 ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων πρωτεϊνικών αλληλουχιών UniProt (αριθμοί καταχώρησης στη UniProt: πρωτεΐνη N, P0DTC9· Πρωτεΐνη M, P0DTC5· Πρωτεΐνη E, P0DTC4· Πρωτεΐνη S, P0DTC2).

Οι αμινοξικές αλληλουχίες 16 γνωστών αυτοαντιγόνων ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων πρωτεϊνικών αλληλουχιών UniProt (αριθμοί καταχώρησης στη UniProt: Jo-1, P12081· PL-7, P26639· PL-12, P49588· Ro52/SSA-1, P19474· Ro60, P10155· La/SS-B, P05455· CENP-A, P49450· CENP-B, P07199· RNApol11, Q9Y2Y1·

RNApol155, O14802' Sci70, P11387' MPO, P05164' PR3, P24158' gp210, Q8TEM1' sp100, P23497' β2GPI, P02749).

Η συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών που επιλέχθηκαν πραγματοποιήθηκε με το υπολογιστικό πρόγραμμα συγκριτικής ανάλυσης και στοίχισης αλληλουχιών αμινοξέων κατά ζεύγη BLASTp. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 2.2.5.

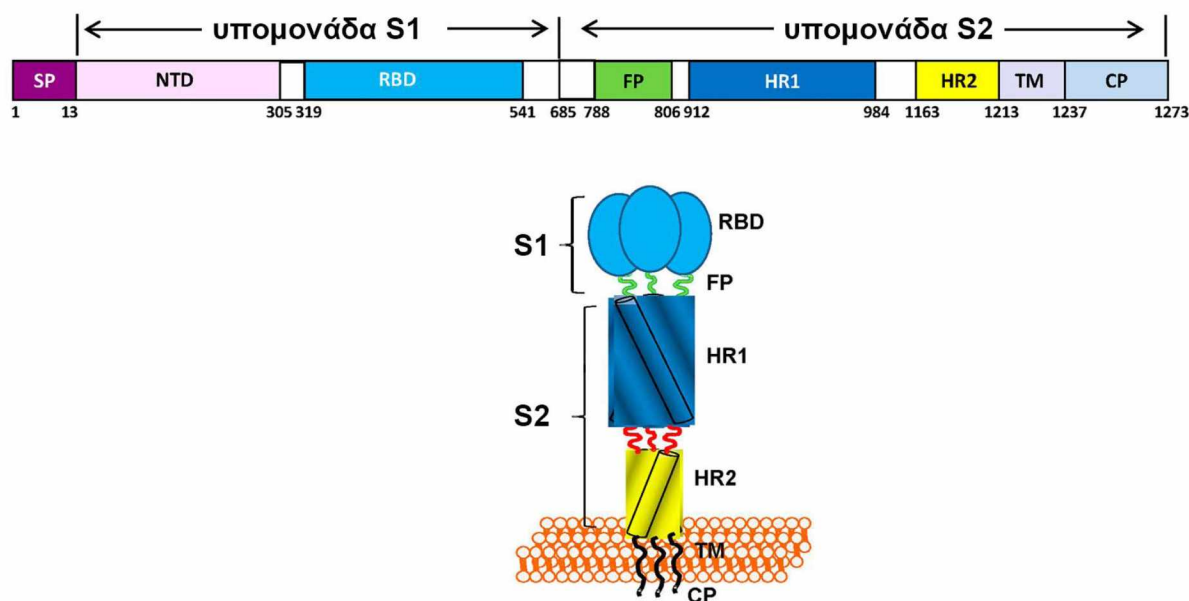
10.3 Αποτελέσματα

Από την αναζήτηση της βιβλιογραφίας βρέθηκαν 277 πιθανοί αντιγονικοί επίτοποι για την πρωτεΐνη S [679-688], 91 για την πρωτεΐνη N [679, 680, 683, 684], 31 για την πρωτεΐνη M [679, 683, 684] και 11 για την πρωτεΐνη E [683, 684]. Όλοι οι επίτοποι παρουσιάζονται στο Παράρτημα Β. Η αναγνώριση των περισσότερων πραγματοποιήθηκε μέσω βιοπληροφορικών προγραμμάτων πρόβλεψης Β και Τ επιτόπων [679, 681-686, 688], ενώ οι υπόλοιποι εμφανίζουν ομολογία με πειραματικώς προσδιορισμένους αντιγονικούς επιτόπους της πρωτεΐνης S του ιού SARS [680, 683, 687]. Αρκετοί από τους επιτόπους αλληλοεπικαλύπτονται, όπως παρουσιάζεται στο Παράρτημα Γ.

Από τους 277 πιθανούς επιτόπους της πρωτεΐνης S, οι 133 (48%) αντιστοιχούσαν στην υπομονάδα S1, οι 141 (50.9%) στην υπομονάδα S2 και οι 3 (0.1%) και στις δύο υπομονάδες. Πιο αναλυτικά, οι 62 (22.4%) επίτοποι αντιστοιχούσαν στην αμινοτελική πρωτεϊνική επικράτεια, οι 42 (15.2%) αντιστοιχούν στην επικράτεια πρόσδεσης του υποδοχέα, οι 2 (0.7%) αντιστοιχούν στην περιοχή διάσπασης της πρωτεΐνης S, οι 5 (1.8%) αντιστοιχούν στο πεπτιδίο σύντηξης της πρωτεΐνης S, οι 18 (6.5%) αντιστοιχούν στην περιοχή επταδικών επαναλήψεων 1, οι 16 (5.8%) αντιστοιχούν στην περιοχή επταδικών επαναλήψεων 2, οι 7 (2.5%) αντιστοιχούν στη διαμεμβρανική περιοχή, οι 4 (1.4%) αντιστοιχούν στην κυτταροπλασματική περιοχή, ενώ 121 (43.7%) επίτοποι

αλληλοεπικαλύπτουν πρωτεϊνικές περιοχές της πρωτεΐνης S. Οι υπομονάδες και οι περιοχές της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 απεικονίζονται στην Εικόνα 10.1 [689]. Οι 112 (40.4%) επίτοποι είναι B επίτοποι και οι υπόλοιποι 165 (59.6%) είναι T επίτοποι, από τους οποίους οι 29 είναι CD4, οι 116 CD8 και οι 20 χωρίς προσδιορισμό.

Εικόνα 10.1: Υπομονάδες και περιοχές της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2



Συνομεύσεις: CP, cytoplasmic domain, κυτταροπλασματική επικράτεια· FP, fusion peptide, πεπτίδιο σύντηξης· HR1, heptad repeat 1, περιοχή επταδικών επαναλήψεων 1· HR2, heptad repeat 2, περιοχή επταδικών επαναλήψεων 2· NTD, N-terminal domain, αμινοτελική πρωτεϊνική επικράτεια· RBD, receptor binding domain, επικράτεια πρόσδεσης υποδοχέα· SP, signal peptide· TM, transmembrane domain, διαμεμβρανική περιοχή. Η εικόνα προέρχεται από την αναφορά [689].

Για την ανάλυση με BLASTp επιλέχθηκαν 88 αλληλουχίες επιτόπων της πρωτεΐνης S, 30 αλληλουχίες επιτόπων της πρωτεΐνης N, 18 αλληλουχίες επιτόπων της πρωτεΐνης M και οι 11 αλληλουχίες όλων των επιτόπων της πρωτεΐνης E. Τα αποτελέσματα του BLASTp παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα Δ. Η ανάλυση απέφερε περίπου

2.620 ζευγάρια ομοιότητας ανάμεσα σε αλληλουχίες των επιτόπων των τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών του SARS-CoV-2 και σε αλληλουχίες ανθρώπινων πρωτεϊνών, με το μήκος των όμοιων αλληλουχιών να κυμαίνεται μεταξύ 5-15 αμινοξέα. Τα πιο αξιοπρόσεκτα ζευγάρια ήταν αυτά ανάμεσα σε επιτόπους της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 με τη θυρεοσφαιρίνη (αμινοξέα 1412-1416), με τη δεσμογλεΐνη 3 (αμινοξέα 339-347), με τη heat shock protein 70 (αμινοξέα 367-373) και με το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης 2 (αμινοξέα 396-401), καθώς και αυτό ανάμεσα σε επίτοπο της πρωτεΐνης E S του SARS-CoV-2 με την υπομονάδα α3 του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (Εικόνα 10.2). Τα ζευγάρια αυτά απεικονίζονται στην Εικόνα 10.2.

Εικόνα 10.2: Στοιχίση αλληλουχιών τεσσάρων πιθανών αντιγονικών επιτόπων της πρωτεΐνης S και ενός πιθανού αντιγονικού επιτόπου της πρωτεΐνης E του SARS-CoV-2 με αλληλουχίες ανθρώπινων πρωτεϊνών.

Αντιγόνο	Θέση	Αλληλουχία	Ομοιότητα
SARS-CoV-2 πρωτεΐνη S επίτοπος 242	110-114	L D S K T	5/5 (100%)
Θυρεοσφαιρίνη	1412-1416	: : : : :	
		L D S K T	
SARS-CoV-2 πρωτεΐνη S επίτοπος 116	172-177	S Q P F L M	4/6 (66.7%)
Μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης 2	396-401	. : : : .	
		A Q P F L L	
SARS-CoV-2 πρωτεΐνη S επίτοπος 77	304-312	K S F T V E K G I	7/9 (77.8%)
Δεσμογλεΐνη 3	388-396	: . : : . : : :	
		K T F T V Q K G I	
SARS-CoV-2 πρωτεΐνη S επίτοπος 147	665-670	I P I G A G I	6/7 (85.7%)
Heat shock protein 70	367-373	: : : : . :	
		I P I G A A I	
SARS-CoV-2 πρωτεΐνη E επίτοπος 3	25-29	V F L L V	5/5 (100%)
Νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης, υπομονάδα A	218-222	: : : : :	
		V F L L V	

Τα αμινοξέα των αλληλουχιών παρουσιάζονται με κωδικό ενός γράμματος. Οι διπλές τελείες δείχνουν απόλυτη ομοιότητα ανάμεσα στα αμινοξέα των δύο αλληλουχιών. Οι

μονές τελείες δείχνουν συντηρητική αντικατάσταση ή αντικατάσταση που παρατηρείται συχνά σε συγγενικές πρωτεΐνες.

Η σύγκριση των αλληλουχιών των τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών του SARS-CoV-2 με τις αλληλουχίες 16 γνωστών αυτοαντιγόνων είχε ως αποτέλεσμα 74 ζευγάρια ομοιότητας. Τα αποτελέσματα του BLASTp παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα Ε. Για τα αυτοαντιγόνα Ro52/SSA-1, RNApol11 και β2GPI δεν προέκυψε καμία ομοιότητα με τις ιικές πρωτεΐνες. Για όλα τα υπόλοιπα αυτοαντιγόνα προέκυψε τουλάχιστον μία ομοιότητα, με το μήκος των όμοιων αλληλουχιών να κυμαίνεται μεταξύ 5-7. Τα πιο αξιοπρόσεκτα ζευγάρια ήταν ανάμεσα στην πρωτεΐνη S του SARS-CoV-2 και το PL-7, το PL-12, το CENPA, το Scf70, το MPO και το gp210. Τα ζευγάρια αυτά απεικονίζονται στην Εικόνα 10.3.

Εικόνα 10.3: Στοιχισή αλληλουχιών της πρωτεΐνης S με αυτοαντιγόνων.

<u>Αντιγόνο</u>	<u>Θέση</u>	<u>Αλληλουχία</u>	<u>Ομοιότητα</u>
SARS-CoV-2 πρωτεΐνη S	665-669	P I G A G	5/5 (100%)
PL-7	19-23	: : : : : P I G A G	
SARS-CoV-2 πρωτεΐνη S	826-832	V T L A D A G	5/7 (71.4%)
PL-12	307-313	: . : : : . : V A L A D G G	
SARS-CoV-2 πρωτεΐνη S	32-36	F T R G V	5/5 (100%)
CENPA	78-82	: : : : : F T R G V	
SARS-CoV-2 πρωτεΐνη S	1141-1147	L Q P E L D S	5/7 (71.4%)
Sci70	514-520	: . : : : . . L H P E L D G	
SARS-CoV-2 πρωτεΐνη S	626-631	A D Q L T P	5/6 (83.3%)
MPO	238-243	. : : : : : T D Q L T P	
SARS-CoV-2 πρωτεΐνη S	326-330	I V R F P	5/5 (100%)
MPO	234-238	: : : : : I V R F P	
SARS-CoV-2 πρωτεΐνη S	876-881	A L L A G T	6/6 (100%)
gp210	1816-1821	: : : : : : A L L A G T	

Τα αμινοξέα των αλληλουχιών παρουσιάζονται με κωδικό ενός γράμματος. Οι διπλές τελείες δείχνουν απόλυτη ομοιότητα ανάμεσα στα αμινοξέα των δύο αλληλουχιών. Οι μονές τελείες δείχνουν συντηρητική αντικατάσταση ή αντικατάσταση που παρατηρείται

συχνά σε συγγενικές πρωτεΐνες. Συντομεύσεις: CENPA, centromeric protein A· MPO, myeloperoxidase· Scl70, scleroderma 70.

10.4 Συζήτηση

Η εμφάνιση του SARS-CoV-2 αποτελεί έναν παγκόσμιο κίνδυνο για την υγεία, λόγω της σοβαρής, πολυσυστηματικής λοίμωξης που προκαλεί. Εντούτοις, μακροπρόθεσμα η μόλυνση με τον ιό Corona αυτό θα μπορούσε να επάγει αυτοανοσία, με έναν από τους πιθανούς μηχανισμούς επαγωγής να είναι η μοριακή μίμηση.

Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται ομοιότητες ανάμεσα στις αμινοξικές αλληλουχίες πιθανών αντιγονικών επιτόπων του νέου SARS-CoV-2 και ανθρώπινων αλληλουχιών. Οι ομοιότητες αυτές θα μπορούσε να αποτελούν τη βάση της μοριακής μίμησης και της συνεπακόλουθης επαγωγής αυτοάνοσων νοσημάτων.

Η αναζήτηση πιθανών επιτόπων των τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών του SARS-CoV-2 ήταν εξοντωτική, ανιχνεύοντας και παραθέτοντας όλους τους δημοσιευμένους επιτόπους μέχρι την 1 Μαΐου 2020. Οι πιθανοί επίτοποι καλύπτουν σχεδόν όλο το μήκος των ιικών πρωτεϊνών, όπως γίνεται ορατό και στο Παράρτημα Γ, καθιστώντας σχεδόν βέβαιο ότι τουλάχιστον ένας από τους προβλεπόμενους επιτόπους θα αντιστοιχεί σε πραγματικό αντιγονικό επίτοπο. Ιδιαίτερα για την S, η γλυκοπρωτεΐνη αυτή αποτελεί κύριο στόχο της χυμικής ανοσίας, καθώς βρίσκεται στην επιφάνεια του ιού, μεσολαβώντας την πρόσδεση και σύντηξη του SARS-CoV-2 με κύτταρα του ξενιστή μέσω της αλληλεπίδρασης του με το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης 2 [690]. Οι επίτοποι 373-390 [681] και 369-393 [682] της πρωτεΐνης S αντιστοιχούν στην αλληλουχία που αναγνωρίζεται από ένα εξουδετερωτικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης S του ιού SARS, το CR3022, που όμως αναγνωρίζει με μεγάλη συγγένεια και την πρωτεΐνη S του ιού SARS-CoV-S [690]. Ο επίτοπος που αναγνωρίζει το CR3022 είναι δομικός, δηλαδή βασίζεται στην τρισδιάστατη μορφή του μορίου της

πρωτεΐνης S, και σχηματίζεται από τα αμινοξέα Y-369, N-370, S-371, A-372, F-374, S-375, T-376, F-377, K-378, C-379, Y-380, G-381, V-382, S-383, P-384, T-385, K-386, D-389, L-390, F-392, D-427, D-428, F-429, T-430, F-515, E-516, L-517, H-519. Συνεπώς, δεν θα πρέπει να αποκλειστεί η περίπτωση να επιβεβαιωθούν ως αντιγονικοί επίτοποι και άλλοι από τους προβλεπόμενους επιτόπους, είτε της πρωτεΐνης S, ή των τριών υπόλοιπων.

Η συγκριτική ανάλυση των δύο προαναφερθέντων επιτόπων της πρωτεΐνης S μέσω BLASTp απέδωσε αρκετές ομοιότητες με ανθρώπινες αλληλουχίες, καμία όμως δεν αποτελεί γνωστό αυτοαντιγόνο. Εντούτοις, το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι ο μέγιστος αριθμός αποτελεσμάτων που παρουσίαζε το BLASTp σε κάθε συγκριτική ανάλυση ήταν 100. Η αύξηση του αριθμού των αποτελεσμάτων θα αύξανε το χρόνο και τη δυσκολία της ανάλυσης των αποτελεσμάτων σημαντικά, όμως θα μπορούσε να αποκαλύψει ομοιότητες μεταξύ των ιικών δομικών πρωτεϊνών και αυτοαντιγόνων. Η συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών των τεσσάρων ιικών πρωτεϊνών με 16 συγκεκριμένα αυτοαντιγόνα, όπως θα συζητηθεί παρακάτω, απέδωσε αρκετές ομοιότητες, πολλές από τις οποίες αντιστοιχούν σε αλληλουχίες πιθανών επιτόπων των τεσσάρων ιικών πρωτεϊνών (επισήμανση με πορτοκαλί στο Παράρτημα E). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, όταν οι επίτοποι αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για συγκριτική ανάλυση με το BLASTp χρησιμοποιώντας ως μέγιστο αριθμό αποτελεσμάτων 1.000, 2.5000 ή και 5.000, τότε οι ομοιότητες με τα συγκεκριμένα αυτοαντισώματα εμφανίστηκαν στα αποτελέσματα.

Κατά την ανάλυση με BLASTp των πιθανών αντιγονικών επιτόπων των τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών του SARS-CoV-2 με ανθρώπινες πρωτεΐνες προέκυψαν ομοιότητες με τρία γνωστά αυτοαντιγόνα, τη θυρεοσφαιρίνη που είναι αυτοαντιγόνο της αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας [691], τη δεσμογλειΐνη 3 που είναι αυτοαντιγόνο της

πέμφιγας [692] και την υπομονάδα α του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης που εμπλέκεται στη μασθένεια Gravis [693]. Ωστόσο, η ανακάλυψη των ομοιοτήτων μεταξύ των πιθανών ιικών επιτόπων και των αυτοαντιγόνων δεν είναι απόδειξη της μοριακής μίμησης, αλλά μονάχα μια ελάχιστη ένδειξη. Για να είναι δυνατή η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ανάμεσα στους δύο επιτόπους θα πρέπει και οι δύο να αποτελούν στόχους του ανοσοποιητικού συστήματος, δηλαδή να είναι αντιγονικοί. Τότε και μόνο θα μπορούσαν οι παραπάνω ομοιότητες να μπορούσαν να θεωρηθούν ως ικανές να συμμετέχουν στην παθογένεια αυτοανοσίας μέσω μοριακής μίμησης και διασταυρούμενης αντιδραστικότητας.

Το πενταπεπτίδιο 1412-1416 της θυρεοσφαιρίνης είναι 100% όμοιο με το πενταπεπτίδιο 110-114 της ιικής πρωτεΐνης S και είναι τμήμα της περιοχής 1097-1560 του μορίου της θυρεοσφαιρίνης, στην οποία έχει αναφερθεί ότι εντοπίζονται αντιγονικοί επίτοποι [694]. Οι ακριβείς θέσεις των επιτόπων στην περιοχή αυτή δεν έχουν διερευνηθεί και αρκετές ακόμα μελέτες απέτυχαν να εντοπίσουν επιτόπους εκεί. Συνεπώς, η περίπτωση επαγωγής αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας που θα εμπλέκει το συγκεκριμένο πενταπεπτίδιο χρίζει περισσότερης μελέτης.

Η αλληλουχία μήκους εννέα αμινοξέων 388-396 της δεσμογλεΐνης 3 εμφανίζει 77.8% ομοιότητα με την αλληλουχία 304-312 της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2. Αν και οι μέχρι στιγμής αναφερόμενοι αντιγονικοί επίτοποι στο μόριο της δεσμογλεΐνης 3 είναι δομικοί και όχι γραμμικοί, αρκετές μελέτες έχουν προτείνει την περιοχή αυτή ως τμήμα των επιτόπων [695-698], αν και άλλες μελέτες δεν έχουν καταλήξει στο ίδιο συμπέρασμα [699, 700]. Η σημαντική ομοιότητα που εκτείνεται σε μήκος εννέα αμινοξέων σε μια αντιγονική περιοχή του αυτοαντιγόνου αποτελεί καλό δείκτη πιθανής μοριακής μίμησης, κάτι που θα πρέπει αυξήσει την επιφυλακή για την μακροπρόθεσμη εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων του δέρματος στην μετα-COVID-19 εποχή.

Όσον αφορά τον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, το πενταπεπτίδιο 218-222 έχει 100% ομοιότητα με το πενταπεπτίδιο 25-29 της πρωτεΐνης E του SARS-CoV-2. Η ιική πρωτεΐνη E αποτελεί συστατικό του ιικού φακέλου και είναι απαραίτητη για τη μόλυνση των κυττάρων του ξενιστή [701], ενώ αποτελεί ανοσοεπικρατές αντιγόνο του SARS-CoV-2 [702]. Όμως, καμία μελέτη μέχρι σήμερα δεν υποστηρίζει ότι το πενταπεπτίδιο αυτό του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης είναι τμήμα ενός επιτόπου [703] και για αυτό η ομοιότητα μεταξύ του υποδοχέα και της πρωτεΐνης E είναι αμφίβολο ότι θα έχει κάποια βιολογική σημασία.

Ακόμα δύο ομοιότητες είναι αξιοπρόσεκτες, αυτές ανάμεσα στο εξαπεπτίδιο 396-401 του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης 2 με το εξαπεπτίδιο 172-177 της ιικής πρωτεΐνης S και ανάμεσα στο εξαπεπτίδιο 367-373 της Hsp70 με το εξαπεπτίδιο 665-670 της ίδιας ιικής πρωτεΐνης. Σχετικά με το πρώτο ζευγάρι ομοιότητας, έχει ήδη αναφερθεί η υπόθεση αυτοάνοσης αντίδρασης έναντι του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης 2 στο πλαίσιο της COVID-19, κυρίως ως τρόπο εξήγησης της καθυστερημένης και πιθανώς δευτερογενούς-της-μόλυνσης βλάβης του πνεύμονα που παρατηρείται σε κάποιους από τους ασθενείς [704, 705]. Οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι το σύμπλοκο της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 με τον υποδοχέα του, δηλαδή το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης 2, σχηματίζει ένα νεοαντιγόνο που αναγνωρίζεται από το ανοσοποιητικό σύστημα και επάγει μια αυτοάνοση, ανοσολογική απόκριση που οδηγεί σε δευτερογενή βλάβη του πνεύμονα. Ένας δεύτερος μηχανισμός που προτάθηκε υποστηρίζει ότι η ιδιαίτερα ισχυρή πρόσδεση της πρωτεΐνης S στον υποδοχέα της [706] πιθανώς να συμπαρασύρει μόρια του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης 2 εντός αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στο πλαίσιο της ανοσολογικής απόκρισης έναντι των ανοσοεπικρατών αντιγόνων του ιού. Η είσοδος του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης 2 στα

αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και η πιθανή παρουσίαση του ως αντιγόνο σε T και B λεμφοκύτταρα, σε συνεργασία με την ενεργοποίηση λεμφοκυττάρων μέσω του μηχανισμού της ενεργοποίησης παρακείμενης φλεγμονής (bystander effect) που ενδεχομένως επάγεται από την ισχυρή ανοσολογική απόκριση έναντι των ανοσοεπικρατών αντιγόνων ντου SARS-CoV-2, θα μπορούσε να διασπάσει την ανοσολογική ανοχή έναντι του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης 2. Η ομοιότητα που εντοπίστηκε με την ιική πρωτεΐνη S θα μπορούσε να παίζει επίσης ρόλο στη διάσπαση της αυτοανοχής, καθιστώντας το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης 2 ένα αυτοαντιγόνο με άμεση συμμετοχή στην πνευμονική βλάβη που παρατηρείται στην COVID-19.

Με παρόμοιο τρόπο θα μπορούσε να συμμετέχει και η Hsp70 στην παθογένεια της νόσου. Η παρουσία ομοιοτήτων στην αλληλουχία πρωτεϊνών θερμικού σοκ με πρωτεΐνες του SARS-CoV-2 έχει αναφερθεί και από τους Gamazza και συνεργάτες [707]. Οι ερευνητές πρότειναν ότι οι πρωτεΐνες αυτές, δρώντας ως μοριακές τσαπερόνες που είναι γνωστό ότι εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη υπό συνθήκες στρες [708], θα μπορούσαν να λειτουργούν ως αυτοαντιγόνα και να μεσολαβούν την αυτοάνοση βλάβη του επιθηλίου των πνευμόνων. Επίσης, προτείνουν ότι το φυσικό και χημικό στρες που προκαλείται από την αρτηριακή υπέρταση και το σακχαρώδη διαβήτη, αντίστοιχα, αυξάνουν τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στο μόριο των πρωτεϊνών αυτών και έτσι αυξάνεται και η αντιγονικότητα τους και η πιθανότητα αυτοάνοσης ιστικής βλάβης. Ο μηχανισμός αυτός θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί οι ασθενείς με αρτηριακή υπέρταση και με σακχαρώδη διαβήτη διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο βαριάς νόσου και θανάτου από SARS-CoV-2.

Η μελέτη αυτή ακόμα εντόπισε αρκετές ομοιότητες ανάμεσα στις τέσσερις δομικές πρωτεΐνες του SARS-CoV-2 και σε γνωστά αυτοαντιγόνα. Συνολικά μελετήθηκαν 16

αυτοαντιγόνα· το Jo-1 συνδέεται με αυτοάνοσες μυοσίτιδες και κυρίως με την πολυμυοσίτιδα [709], το PL-7 και το PL-12 συνδέονται με το σύνδρομο αντισυνθετάσης [710], το Ro52/SSA-1, το Ro60 και το La/SS-B συνδέονται με το συστηματικό ερυθματώδη λύκο και το σύνδρομο Sjogren [711], το CENP-A, το CENP-B, το RNApol11, το RNApol155 και Scl70 συνδέονται με τη συστηματική σκλήρυνση [417, 418], όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενα κεφάλαια, το MPO και το PR3 με αγγειίτιδες σχετιζόμενες με αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετερόφιλων [712], το gp210 και το sp100 με την πρωτοπαθή χολική χολαγγειίτιδα [713], ενώ, τέλος, το β2GPI συνδέεται με το συστηματικό ερυθματώδη λύκο και το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο [714].

Όπως και αναφέρθηκε παραπάνω, η ομοιότητα δε συνεπάγεται αυτοανοσία. Για αυτό το λόγο οι πολλές ομοιότητες που εντοπίστηκαν ανάμεσα στις ιικές πρωτεΐνες και στα αυτοαντιγόνα δε συνεπάγεται ότι άτομα που μολύνθηκαν με SARS-CoV-2 θα αναπτύξουν κάποια από τα παραπάνω αυτοάνοσα νοσήματα λόγω της έκθεσης στον ιό αυτό. Εντούτοις, η ομοιότητα ανάμεσα σε αλληλουχίες που αποτελούν αποδεδειγμένους ή δυνητικούς αντιγονικούς επιτόπους είναι μια ένδειξη πιθανής μοριακής μίμησης και διασταυρούμενης αντιδραστικότητας. Για κάποια από τα ζευγάρια ομοιότητας, όπως παρουσιάζονται στο Παράρτημα Ε, έχει παρατηρηθεί η παραπάνω προϋπόθεση. Για παράδειγμα, το επταπεπτίδιο 1141-1147 της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2, το οποίο είναι τμήμα πιθανών αντιγονικών επιτόπων σύμφωνα με δύο δημοσιευμένες μελέτες [683, 687], έχει 71.4% ομοιότητα με το επταπεπτίδιο 514-520 της τοποϊσομεράσης I (Scl70), το οποίο αλληλοεπικαλύπτει έναν πειραματικά αποδεδειγμένο επίτοπο στο αντιγόνο αυτό [567].

Η παρούσα μελέτη προτείνει μια πληθώρα πιθανών αντιγονικών στόχων αυτοανοσίας σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί από τον νέο ιό Corona. Από την πλευρά ενός

ερευνητή, θα ήταν ενδιαφέρον αν τα αποτελέσματα της μελέτης μπορούσαν να εξακριβωθούν μέσω ελέγχου των ασθενών για αντισώματα έναντι των ανθρώπινων αντιγόνων αυτών. Από την πλευρά ενός κλινικού ιατρού, τα αποτελέσματα αυτά κρούουν το κώδωνα του κινδύνου για πιθανές, μελλοντικές δευτερογενείς επιπτώσεις της μόλυνσης με SARS-CoV-2 για τις οποίες θα πρέπει να είναι προετοιμασμένος.

Εξίσου σημαντική είναι συνεισφορά της μελέτης αυτής στο σχεδιασμό και στη εκπόνηση πειραμάτων και κλινικών μελετών με σκοπό την παραγωγή ενός ασφαλούς και αποτελεσματικού εμβολίου έναντι του SARS-CoV-2 [715]. Η χρήση ολόκληρων πρωτεϊνών του SARS-CoV-2 ως αντιγόνο σε εμβόλιο για επαγωγή προστατευτικής, ενεργητικής ανοσίας θα μπορούσε να έχει δυσμενείς παρενέργειες και εκδηλώσεις αυτοανοσίας, όπως έχει επισημανθεί στο παρελθόν [53, 716]. Το 2016 οι Agrawal και συνεργάτες παρουσίασαν ότι η ανοσοποίηση πειραματόζων με εμβόλιο που περιείχε απενεργοποιημένο ιό του αναπνευστικού συνδρόμου της Μέσης Ανατολής (Middle East Respiratory Syndrome, MERS) προκάλεσε πνευμονική βλάβη συγκρίσιμη τη βλάβη που παρατηρήθηκε έπειτα από ανοσοποίηση με ζώντα ιό MERS. Επίσης, παθολογικές βλάβες στον πνεύμονα σημειώθηκαν και έπειτα από πειράματα ανοσοποίησης πειραματόζων με εμβόλια κατά του SARS χρησιμοποιώντας ολόκληρο τον ιό, τμήματα πρωτεϊνών του ιού ή διαφορετικές μεθόδους απενεργοποίησης του ιού [717-720]. Τέλος, τα αντιγόνα του SARS με την ικανότητα να προκαλούν τις ανοσοπαθολογικές δυσμενείς επιπτώσεις του εμβολίου κατά του SARS ήταν η πρωτεΐνη N του νουκλεοκαψιδίου και η πρωτεΐνη S [718-720]. Τα πειραματικά δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και άλλων παρόμοιων μελετών πρέπει να ληφθούν υπόψιν κατά το σχεδιασμό και παραγωγή ενός εμβολίου έναντι του νέου SARS-CoV-2, το οποίο θα είναι αποτελεσματικό και χωρίς βραχυπρόθεσμες ή μακροπρόθεσμες παρενέργειες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11: Γενική Συζήτηση

Η παρούσα διδακτορική διατριβή μελέτησε το ρόλο των ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι αντιγόνων του ιού Epstein-Barr και αντιγόνων του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* στην παθογένεση της κατά πλάκας σκλήρυνσης και της συστηματικής σκλήρυνσης, εστιάζοντας στους μηχανισμούς της μοριακής μίμησης και της ανοσολογικής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας ανάμεσα σε ιικά και μικροβιακά αντιγόνα με αυτοαντιγόνα της κατά πλάκας σκλήρυνσης και της συστηματικής σκλήρυνσης.

Για πρώτη φορά μελετήθηκαν με συστηματικό τρόπο οι χυμικές ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι αντιγόνων του ιού Epstein-Barr και του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* στην κατά πλάκας σκλήρυνση και στη συστηματική σκλήρυνση. Οι αντιγονοειδικές αποκρίσεις αναλύθηκαν ξεχωριστά στους κλινικούς φαινοτύπους των δύο αυτών νοσημάτων. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν εκτενείς αναλύσεις συσχέτισης ανάμεσα στις αντιγονοειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις και σε κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά των δύο νοσημάτων αυτών. Οι συχνότητες και τα επίπεδα των αντιγονοειδικών αντισωμάτων μελετήθηκαν με τη χρήση ανοσολογικών μεθόδων, ενώ επιλέχθηκαν στατιστικές μέθοδοι υψηλής αυστηρότητας ως προς τη στατιστική σημαντικότητα για την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Στην κατά πλάκας σκλήρυνση, οι συχνότητες και τα επίπεδα των περισσότερων αντιγονοειδικών ελικοβακτηριδιακών αντισωμάτων ήταν συγκρίσιμα ανάμεσα στους ασθενείς, ανεξαρτήτως κλινικού υποτύπου, και στους υγιείς μάρτυρες. Αξιοπρόσεκτο αποτέλεσμα ήταν η αυξημένη συχνότητα των αντισωμάτων έναντι της ελικοβακτηριδιακής τοξίνης VacA στους ασθενείς με δευτεροπαθώς προϊούσα κατά πλάκας σκλήρυνση σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Από τις στατιστικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν δεν προέκυψε ότι η αύξηση των αντισωμάτων

πιθανώς οφείλεται στην αυξημένη ηλικία των ασθενών αυτών, όπως έχει προταθεί [355]. Η VacA έχει προταθεί ως αιτιοπαθογενετικός παράγοντας του συνδρόμου Guillain-Barré μέσω του μηχανισμού της μοριακής μίμησης [472, 474]. Αντισώματα έναντι της VacA έχουν ανιχνευθεί στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών του συνδρόμου αυτού [472], ενώ η VacA εμφανίζει ομοιότητες στην αμινοξική αλληλουχία με ένα αντιγόνο του ελύτρου της μυελίνης των περιφερειακών εμμύελων νευρικών ινών, της αντλίας ATP νατρίου-καλίου [474]. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι η καταστροφή των περιφερικών νευρικών αξόνων στο σύνδρομο Guillain-Barré μεσολαβείται από αντι-VacA αντισώματα που αναγνωρίζουν την αντλία νατρίου-καλίου στο έλυτρο της μυελίνης. Με αντίστοιχο μηχανισμό, τα αντισώματα έναντι της ελικοβακτηριδιακής VacA θα μπορούσαν να μεσολαβούν την εξέλιξη της κατά πλάκας σκλήρυνσης στη δευτεροπαθώς προϊούσα κλινική μορφή. Εντούτοις, στην πρωτοπαθή χολική χολαγγειίτιδα έχει αποκλειστεί η πιθανότητα διασταυρούμενης αντιδραστικότητας και μοριακής μίμησης μεταξύ της VacA και του αυτοαντιγόνου του νοσήματος αυτού, παρά την ικανότητα του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* να επάγει αυτοάνοση χολαγγειίτιδα σε πειραματόζωα με υψηλούς τίτλους αντι-VacA αντισωμάτων [475, 476]. Συνεπώς, η αξία της ανοσολογικής απόκρισης έναντι της VacA στη δευτεροπαθώς προϊούσα κατά πλάκας σκλήρυνσης χρειάζεται περισσότερη μελέτη.

Με παρόμοιο τρόπο, οι συχνότητες των αντισωμάτων έναντι τεσσάρων ελικοβακτηριδιακών αντιγόνων, των p54, p50, p41 και p29-UreA, ήταν αυξημένες σε ασθενείς με δευτεροπαθώς προϊούσα κατά πλάκας σκλήρυνση σε σύγκριση με ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα κατά πλάκας σκλήρυνση. Και στην περίπτωση αυτή, οι αναλύσεις έδειξαν ότι η αυξημένη αντιδραστικότητα μάλλον οφείλεται στην κλινική μορφή του νοσήματος παρά στην αυξημένη ηλικία των ασθενών αυτών. Ωστόσο, θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι οι ασθενείς με δευτεροπαθώς

προϊούσα κατά πλάκας σκλήρυνση φαίνεται ότι εμφανίζουν αυξημένες χυμικές αποκρίσεις [481] και έτσι η αυξημένη συχνότητα που παρατηρήθηκε στους ασθενείς με την κλινική μορφή αυτή στην παρούσα εργασία μπορεί να είναι μη ειδική και μη αιτιολογική. Η σημασία των παραπάνω αποτελεσμάτων χρίζει περαιτέρω έρευνας, αν ληφθεί υπόψιν ότι οι συχνότητες των αντισωμάτων έναντι του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος του Ηρ, όπως αναλύθηκαν με ELISA, ήταν συγκρίσιμες ανάμεσα στους ασθενείς των δύο κλινικών υποτύπων της κατά πλάκας σκλήρυνσης.

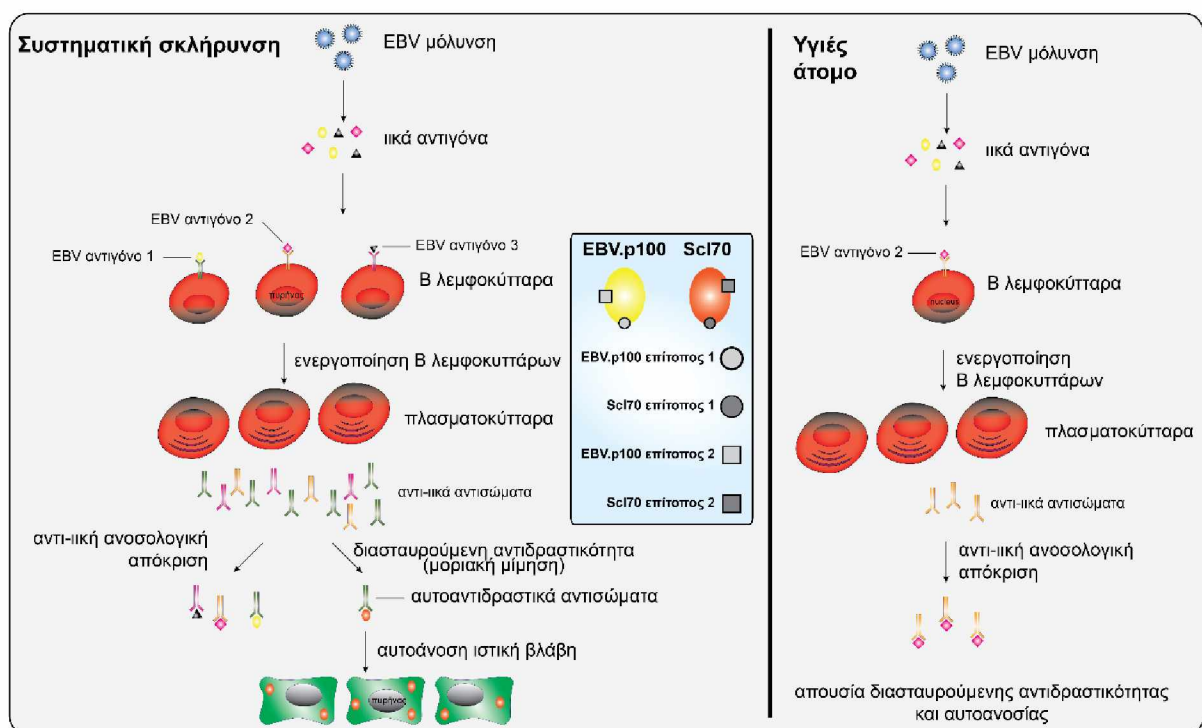
Στη συστηματική σκλήρυνση, οι συχνότητες και οι τίτλοι των αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του *Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού* ήταν συγκρίσιμοι ανάμεσα σε ασθενείς, ανεξαρτήτως κλινικού υποτύπου, και σε υγιείς μάρτυρες. Το αποτέλεσμα αυτό δε συμφωνεί με προηγούμενες οροεπιδημιολογικές μελέτες που υποστηρίζουν ότι η μόλυνση από το *Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* είναι δύο έως δύομιση φορές πιο συχνή στη συστηματική σκλήρυνση [454]. Ωστόσο, οι μελέτες αυτές παρουσιάζουν αξιοπρόσεκτα συστηματικά σφάλματα που ενδέχεται να έχουν επηρεάσει το αναφερόμενο αποτέλεσμα, όπως αναλύεται στο Κεφάλαιο 5, προς υπεράσπιση των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής εργασίας. Επίσης, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας επαληθεύτηκαν σε δύο ανεξάρτητες ομάδες ασθενών από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, υπογραμμίζοντας την αξιοπιστία της εργασίας και ελαττώνοντας την πιθανότητα τα αποτελέσματα αυτά να οφείλονται σε ιδιαιτερότητες της ομάδας των ασθενών που μελετήθηκε.

Το πιο ενδιαφέρον αποτέλεσμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η σημαντική σύνδεση και κλινική συσχέτιση των αντισωμάτων έναντι ενός μη χαρακτηρισμένου αντιγόνου του ιού Epstein-Barr, που για λόγους ευχέρειας ονομάστηκε EBV.p100, με τη συστηματική σκλήρυνση. Τα αντισώματα αυτά εμφανίστηκαν σε αρκετούς ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση και σε λίγους ασθενείς

με πολλαπλή σκλήρυνση, σε κανέναν όμως υγιή μάρτυρα. Η ισχυρή συσχέτιση των αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου αυτού με τα αυτοαντισώματα έναντι της τοποϊσομεράσης I προτείνει την πιθανότητα μοριακής μίμησης ανάμεσα στο ιικό αντιγόνο και στο ενδογενές αυτοαντιγόνο και την ανοσολογική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Πράγματι, η βιοπληροφορική ανάλυση ανέδειξε αρκετές ομοιότητες αλληλουχίας ανάμεσα σε ιικές πρωτεΐνες αντίστοιχου μεγέθους με το υποτιθέμενο αντιγόνο EBV.p100 και στην τοποϊσομεράση I, όπως φαίνεται στους Πίνακες 6.20 και 6.21. Μάλιστα, αρκετές από τις αλληλουχίες της τοποϊσομεράσης I που αναδείχθηκαν ανήκουν σε γνωστούς ανοσογονικούς επιτόπους του μορίου αυτού. Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, η παρακάτω υπόθεση προτείνεται σχετικά με τη συμμετοχή των του ιού Epstein-Barr και του αντιγόνου του EBV.p100 στη δημιουργία των αυτοαντισωμάτων έναντι της τοποϊσομεράσης I και στην παθογένεση της συστηματικής σκλήρυνσης (Εικόνα 11.1). Σε υγιή άτομα χωρίς προδιάθεση ανάπτυξη αυτοανοσίας, η μόλυνση με τον ιό Epstein-Barr οδηγεί στην παραγωγή αντισωμάτων έναντι των ιικών αντιγόνων με σκοπό της εξουδετέρωση και την εξάλειψη του ιού. Τα αντισώματα αυτά δεν αναγνωρίζουν ενδογενείς πρωτεΐνες και έτσι δεν εμφανίζεται διασταυρούμενη αντιδραστικότητα, ούτε αυτοαντιδραστικότητα. Αντιθέτως, σε άτομα με προδιάθεση ανάπτυξης αυτοανοσίας, η οποία εκφράζεται ως διαταραχή της ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος και των μηχανισμών της ανοσολογικής ανοχής, η μόλυνση με τον ιό Epstein-Barr οδηγεί στην παραγωγή αντι-ιικών αντισωμάτων που αντιδρούν επίσης με την τοποϊσομεράση I. Ο λόγος της χυμικής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας είναι η ύπαρξη μοριακής μίμησης ανάμεσα σε επιτόπους του ιικού αντιγόνου EBV.p100 και της τοποϊσομεράσης I. Το αποτέλεσμα είναι η επαγωγή όχι μόνο μιας αντι-ιικής ανοσολογικής απόκρισης, αλλά και μιας αυτοάνοσης ανοσολογικής απόκρισης με στόχο την τοποϊσομεράση I και εαυτά

κύτταρα που οδηγεί σε αυτοάνοση οργανική δυσλειτουργία ή ιστική βλάβη και την εμφάνιση της συστηματικής σκλήρυνσης.

Εικόνα 11.1: Η μοριακή μίμηση και η ανοσολογική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ανάμεσα στο αντιγόνο EBV.p100 του ιού Epstein-Barr και στην ανθρώπινη τοποϊσομεράση I ως μηχανισμοί παραγωγής του αυτοαντισώματος έναντι της τοποϊσομεράσης I.



Η σχέση ανάμεσα στον άνθρωπο και στους μικροοργανισμούς είναι πολύπλοκη και υπάρχουν αρκετές πτυχές της που ακόμα βρίσκονται υπό έρευνα. Αυτή η σχέση μπορεί να έχει προστατευτικά αποτελέσματα για τον άνθρωπο, όπως παρατηρείται σε περιπτώσεις βελτίωσης της ανοσολογικής ρύθμισης έπειτα από επαφή με μικροοργανισμούς κατά την παιδική ηλικία, ενδέχεται όμως να επάγει παθολογικούς μηχανισμούς αυτοανοσίας. Η αποσαφήνιση των μηχανισμών διάσπασης της ανοσολογικής ανοχής και ιδιαίτερα της συμμετοχής των μικροβίων και των ιών στη

διαδικασία αυτή αποτελεί προϋπόθεση για τον αποτελεσματικό σχεδιασμό προγραμμάτων πρόληψης και θεραπείας των αυτοάνοσων νοσημάτων, μέσω προγραμμάτων εμβολιασμού ή μέσω χημικοθεραπευτικών φαρμακευτικών αγωγών [249, 721].

Η κατανόηση του μηχανισμού της μοριακής μίμησης στην επαγωγή, στη διατήρηση και στην εξέλιξη της αυτοανοσίας έχει καταστεί αναγκαία τα τελευταία χρόνια με την εμφάνιση του ιού SARS-CoV-2 και της ασθένειας που προκαλεί, της COVID-19. Μελέτες έχουν προτείνει ότι η πολυοργανική βλάβη που παρατηρείται σε κάποιους ασθενείς είναι αποτέλεσμα μοριακής μίμησης και διασταυρούμενης αντιδραστικότητας ανάμεσα σε ιικά αντιγόνα και σε αυτοαντιγόνα [668, 669, 671, 674, 675, 679, 704, 722]. Πιθανή συμμετοχή της μοριακής μίμησης στην COVID-19, όπως μελετήθηκε στο Κεφάλαιο 10, κρούει τον κώδωνα του κινδύνου σχετικά με τα εμβόλια που έχουν πρόσφατα παραχθεί και πλέον κυκλοφορούν για την αντιμετώπιση της πανδημίας και σχετικά με την πρόκληση μακροπρόθεσμων ανεπιθύμητων παρενεργειών του εμβολιασμού με τη μορφή αυτοανοσίας [723-726]. Αυτήν η παρατήρηση βεβαίως αφορά τα εμβόλια που κυκλοφορούν ή σχεδιάζονται για την αντιμετώπιση όλων των νοσημάτων, όμως κρίνεται περισσότερο επιτακτική για την COVID-19, δεδομένης της επείγουσας κατάστασης που επικρατεί αυτήν την περίοδο παγκοσμίως. Έτσι, τα εμβόλια θα πρέπει να περιέχουν ανοσογονικούς επιτόπους που θα επάγουν εξουδετερωτικές ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι του λοιμογόνου παράγοντα, αλλά δε θα είναι ικανοί να επάγουν αυτοάνοσες ανοσολογικές αποκρίσεις [53, 723, 727].

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Theofilopoulos, A.N., Kono, D.H., and Baccala, R. (2017). The multiple pathways to autoimmunity. *Nature immunology* 18, 716-724.
2. Wang, L., Wang, F.S., and Gershwin, M.E. (2015). Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of internal medicine* 278, 369-395.
3. Avrameas, S., Ternynck, T., Tsonis, I.A., and Lymberi, P. (2007). Naturally occurring B-cell autoreactivity: a critical overview. *Journal of autoimmunity* 29, 213-218.
4. Shoenfeld, Y., and Toubi, E. (2005). Protective autoantibodies: role in homeostasis, clinical importance, and therapeutic potential. *Arthritis and rheumatism* 52, 2599-2606.
5. Avrameas, S., Alexopoulos, H., and Moutsopoulos, H.M. (2018). Natural Autoantibodies: An Undersugn Hero of the Immune System and Autoimmune Disorders-A Point of View. *Frontiers in immunology* 9, 1320.
6. Salinas, G.F., Braza, F., Brouard, S., Tak, P.P., and Baeten, D. (2013). The role of B lymphocytes in the progression from autoimmunity to autoimmune disease. *Clinical immunology* 146, 34-45.
7. Cooper, G.S., Bynum, M.L., and Somers, E.C. (2009). Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *Journal of autoimmunity* 33, 197-207.
8. Selmi, C. (2010). The worldwide gradient of autoimmune conditions. *Autoimmunity reviews* 9, A247-250.
9. Takahashi, A., Ohira, H., Abe, K., Zeniya, M., Abe, M., Arinaga-Hino, T., Torimura, T., Yoshizawa, K., Takaki, A., Kang, J.H., et al. (2020). Increasing incidence of acute autoimmune hepatitis: a nationwide survey in Japan. *Scientific reports* 10, 14250.
10. Lerner, A., and Matthias, T. (2015). Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmunity reviews* 14, 479-489.
11. Park, H., Bourla, A.B., Kastner, D.L., Colbert, R.A., and Siegel, R.M. (2012). Lighting the fires within: the cell biology of autoinflammatory diseases. *Nature reviews. Immunology* 12, 570-580.
12. Ciccarelli, F., De Martinis, M., and Ginaldi, L. (2014). An update on autoinflammatory diseases. *Current medicinal chemistry* 21, 261-269.
13. Kamradt, T., and Mitchison, N.A. (2001). Tolerance and autoimmunity. *The New England journal of medicine* 344, 655-664.

14. Cheng, M., and Anderson, M.S. (2018). Thymic tolerance as a key brake on autoimmunity. *Nature immunology* 19, 659-664.
15. Jenkins, M.K., Chu, H.H., McLachlan, J.B., and Moon, J.J. (2010). On the composition of the preimmune repertoire of T cells specific for Peptide-major histocompatibility complex ligands. *Annual review of immunology* 28, 275-294.
16. McCaughy, T.M., and Hogquist, K.A. (2008). Central tolerance: what have we learned from mice? *Seminars in immunopathology* 30, 399-409.
17. Hippen, K.L., Schram, B.R., Tze, L.E., Pape, K.A., Jenkins, M.K., and Behrens, T.W. (2005). In vivo assessment of the relative contributions of deletion, anergy, and editing to B cell self-tolerance. *Journal of immunology* 175, 909-916.
18. Tussiwand, R., Bosco, N., Ceredig, R., and Rolink, A.G. (2009). Tolerance checkpoints in B-cell development: Johnny B good. *European journal of immunology* 39, 2317-2324.
19. Teague, B.N., Pan, Y., Mudd, P.A., Nakken, B., Zhang, Q., Szodoray, P., Kim-Howard, X., Wilson, P.C., and Farris, A.D. (2007). Cutting edge: Transitional T3 B cells do not give rise to mature B cells, have undergone selection, and are reduced in murine lupus. *Journal of immunology* 178, 7511-7515.
20. Akkaraju, S., Canaan, K., and Goodnow, C.C. (1997). Self-reactive B cells are not eliminated or inactivated by autoantigen expressed on thyroid epithelial cells. *The Journal of experimental medicine* 186, 2005-2012.
21. Zinkernagel, R.M., Pircher, H.P., Ohashi, P., Oehen, S., Odermatt, B., Mak, T., Arnheiter, H., Burki, K., and Hengartner, H. (1991). T and B cell tolerance and responses to viral antigens in transgenic mice: implications for the pathogenesis of autoimmune versus immunopathological disease. *Immunological reviews* 122, 133-171.
22. Weller, R.O., Galea, I., Carare, R.O., and Minagar, A. (2010). Pathophysiology of the lymphatic drainage of the central nervous system: Implications for pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology* 17, 295-306.
23. Caspi, R.R. (2010). A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *The Journal of clinical investigation* 120, 3073-3083.
24. Niederkorn, J.Y. (2006). See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nature immunology* 7, 354-359.
25. Negi, N., and Das, B.K. (2018). CNS: Not an immunoprivileged site anymore but a virtual secondary lymphoid organ. *International reviews of immunology* 37, 57-68.
26. Kawakami, N., and Flugel, A. (2010). Knocking at the brain's door: intravital two-photon imaging of autoreactive T cell interactions with CNS structures. *Seminars in immunopathology* 32, 275-287.

27. Neefjes, J., Jongsma, M.L., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews. Immunology* *11*, 823-836.
28. Lanzavecchia, A., Iezzi, G., and Viola, A. (1999). From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* *96*, 1-4.
29. Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology* *21*, 685-711.
30. Lam, K.P., and Rajewsky, K. (1998). Rapid elimination of mature autoreactive B cells demonstrated by Cre-induced change in B cell antigen receptor specificity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 13171-13175.
31. Sakkas, L.I., Daoussis, D., Mavropoulos, A., Liossis, S.N., and Bogdanos, D.P. (2019). Regulatory B cells: New players in inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Seminars in arthritis and rheumatism* *48*, 1133-1141.
32. Grant, C.R., Liberal, R., Mieli-Vergani, G., Vergani, D., and Longhi, M.S. (2015). Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and--yet--unanswered questions. *Autoimmunity reviews* *14*, 105-116.
33. Tarbell, K.V., Yamazaki, S., Olson, K., Toy, P., and Steinman, R.M. (2004). CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *The Journal of experimental medicine* *199*, 1467-1477.
34. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* *133*, 775-787.
35. Sakkas, L.I., Mavropoulos, A., Perricone, C., and Bogdanos, D.P. (2018). IL-35: a new immunomodulator in autoimmune rheumatic diseases. *Immunologic research* *66*, 305-312.
36. Blair, P.A., Norena, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010). CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* *32*, 129-140.
37. Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., Dilillo, D.J., Yanaba, K., Venturi, G.M., Szabolcs, P.M., Bernstein, S.H., Magro, C.M., Williams, A.D., et al. (2011). Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* *117*, 530-541.
38. Zheng, M., Xing, C., Xiao, H., Ma, N., Wang, X., Han, G., Chen, G., Hou, C., Shen, B., Li, Y., et al. (2014). Interaction of CD5 and CD72 is involved in regulatory T and B cell homeostasis. *Immunological investigations* *43*, 705-716.
39. Giancchetti, E., Delfino, D.V., and Fierabracci, A. (2013). Recent insights into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity. *Autoimmunity reviews* *12*, 1091-1100.

40. Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 20, 197-216.
41. Mayer, C.T., Berod, L., and Sparwasser, T. (2012). Layers of dendritic cell-mediated T cell tolerance, their regulation and the prevention of autoimmunity. *Frontiers in immunology* 3, 183.
42. Nagata, S., Hanayama, R., and Kawane, K. (2010). Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 140, 619-630.
43. Rosenblum, M.D., Remedios, K.A., and Abbas, A.K. (2015). Mechanisms of human autoimmunity. *The Journal of clinical investigation* 125, 2228-2233.
44. Amital, H., Gershwin, M.E., and Shoenfeld, Y. (2006). Reshaping the mosaic of autoimmunity. *Seminars in arthritis and rheumatism* 35, 341-343.
45. Marson, A., Housley, W.J., and Hafler, D.A. (2015). Genetic basis of autoimmunity. *The Journal of clinical investigation* 125, 2234-2241.
46. Zenewicz, L.A., Abraham, C., Flavell, R.A., and Cho, J.H. (2010). Unraveling the genetics of autoimmunity. *Cell* 140, 791-797.
47. Rubtsov, A.V., Rubtsova, K., Kappler, J.W., and Marrack, P. (2010). Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity. *Autoimmunity reviews* 9, 494-498.
48. Borba, V.V., Zandman-Goddard, G., and Shoenfeld, Y. (2018). Prolactin and Autoimmunity. *Frontiers in immunology* 9, 73.
49. Sharif, K., Watad, A., Coplan, L., Lichtbroun, B., Krosser, A., Lichtbroun, M., Bragazzi, N.L., Amital, H., Afek, A., and Shoenfeld, Y. (2018). The role of stress in the mosaic of autoimmunity: An overlooked association. *Autoimmunity reviews* 17, 967-983.
50. Versini, M., Aljadeff, G., Jeandel, P.Y., and Shoenfeld, Y. (2014). Obesity: an additional piece in the mosaic of autoimmunity. *The Israel Medical Association journal : IMAJ* 16, 619-621.
51. Bogdanos, D.P., and Sakkas, L.I. (2017). From microbiome to infectome in autoimmunity. *Current opinion in rheumatology* 29, 369-373.
52. Li, B., Selmi, C., Tang, R., Gershwin, M.E., and Ma, X. (2018). The microbiome and autoimmunity: a paradigm from the gut-liver axis. *Cellular & molecular immunology* 15, 595-609.
53. Segal, Y., and Shoenfeld, Y. (2018). Vaccine-induced autoimmunity: the role of molecular mimicry and immune crossreaction. *Cellular & molecular immunology* 15, 586-594.
54. Aljadeff, G., Longhi, E., and Shoenfeld, Y. (2018). Bisphenol A: A notorious player in the mosaic of autoimmunity. *Autoimmunity* 51, 370-377.

55. Perricone, C., Versini, M., Ben-Ami, D., Gertel, S., Watad, A., Segal, M.J., Ceccarelli, F., Conti, F., Cantarini, L., Bogdanos, D.P., et al. (2016). Smoke and autoimmunity: The fire behind the disease. *Autoimmunity reviews* 15, 354-374.
56. Dahan, S., Segal, Y., and Shoenfeld, Y. (2017). Dietary factors in rheumatic autoimmune diseases: a recipe for therapy? *Nature reviews. Rheumatology* 13, 348-358.
57. Rojas, M., Restrepo-Jimenez, P., Monsalve, D.M., Pacheco, Y., Acosta-Ampudia, Y., Ramirez-Santana, C., Leung, P.S.C., Ansari, A.A., Gershwin, M.E., and Anaya, J.M. (2018). Molecular mimicry and autoimmunity. *Journal of autoimmunity* 95, 100-123.
58. Cardenas-Roldan, J., Rojas-Villarraga, A., and Anaya, J.M. (2013). How do autoimmune diseases cluster in families? A systematic review and meta-analysis. *BMC medicine* 11, 73.
59. Xavier, R.J., and Rioux, J.D. (2008). Genome-wide association studies: a new window into immune-mediated diseases. *Nature reviews. Immunology* 8, 631-643.
60. Lander, E.S. (2011). Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature* 470, 187-197.
61. Sollid, L.M., Pos, W., and Wucherpfennig, K.W. (2014). Molecular mechanisms for contribution of MHC molecules to autoimmune diseases. *Current opinion in immunology* 31, 24-30.
62. Horton, R., Wilming, L., Rand, V., Lovering, R.C., Bruford, E.A., Khodiyar, V.K., Lush, M.J., Povey, S., Talbot, C.C., Jr., Wright, M.W., et al. (2004). Gene map of the extended human MHC. *Nature reviews. Genetics* 5, 889-899.
63. Shiina, T., Hosomichi, K., Inoko, H., and Kulski, J.K. (2009). The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *Journal of human genetics* 54, 15-39.
64. Robinson, J., Halliwell, J.A., Hayhurst, J.D., Flicek, P., Parham, P., and Marsh, S.G. (2015). The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic acids research* 43, D423-431.
65. Cruz-Tapias, P., Perez-Fernandez, O.M., Rojas-Villarraga, A., Rodriguez-Rodriguez, A., Arango, M.T., and Anaya, J.M. (2012). Shared HLA Class II in Six Autoimmune Diseases in Latin America: A Meta-Analysis. *Autoimmune diseases* 2012, 569728.
66. Fernando, M.M., Stevens, C.R., Walsh, E.C., De Jager, P.L., Goyette, P., Plenge, R.M., Vyse, T.J., and Rioux, J.D. (2008). Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS genetics* 4, e1000024.
67. Stanford, S.M., and Bottini, N. (2014). PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene. *Nature reviews. Rheumatology* 10, 602-611.

68. Vandebroek, K. (2012). Cytokine gene polymorphisms and human autoimmune disease in the era of genome-wide association studies. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 32, 139-151.
69. Cotsapas, C., and Hafler, D.A. (2013). Immune-mediated disease genetics: the shared basis of pathogenesis. *Trends in immunology* 34, 22-26.
70. Sng, J., Ayoglu, B., Chen, J.W., Schickel, J.N., Ferre, E.M.N., Glauzy, S., Romberg, N., Hoenig, M., Cunningham-Rundles, C., Utz, P.J., et al. (2019). AIRE expression controls the peripheral selection of autoreactive B cells. *Science immunology* 4.
71. Ochs, H.D., Gambineri, E., and Torgerson, T.R. (2007). IPEX, FOXP3 and regulatory T-cells: a model for autoimmunity. *Immunologic research* 38, 112-121.
72. Whitacre, C.C. (2001). Sex differences in autoimmune disease. *Nature immunology* 2, 777-780.
73. Boonstra, K., Beuers, U., and Ponsioen, C.Y. (2012). Epidemiology of primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis: a systematic review. *Journal of hepatology* 56, 1181-1188.
74. Braun, J., and Sieper, J. (2007). Ankylosing spondylitis. *Lancet* 369, 1379-1390.
75. Quintero, O.L., Amador-Patarroyo, M.J., Montoya-Ortiz, G., Rojas-Villarraga, A., and Anaya, J.M. (2012). Autoimmune disease and gender: plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity. *Journal of autoimmunity* 38, J109-119.
76. Peeva, E., and Zouali, M. (2005). Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B-lymphocytes. *Immunology letters* 101, 123-143.
77. Mackern-Oberti, J.P., Jara, E.L., Riedel, C.A., and Kalergis, A.M. (2017). Hormonal Modulation of Dendritic Cells Differentiation, Maturation and Function: Implications for the Initiation and Progress of Systemic Autoimmunity. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 65, 123-136.
78. Tomio, A., Schust, D.J., Kawana, K., Yasugi, T., Kawana, Y., Mahalingaiah, S., Fujii, T., and Taketani, Y. (2008). Prolactin can modulate CD4+ T-cell response through receptor-mediated alterations in the expression of T-bet. *Immunology and cell biology* 86, 616-621.
79. Flores-Fernandez, R., Blanco-Favela, F., Fuentes-Panana, E.M., Chavez-Sanchez, L., Gorocica-Rosete, P., Pizana-Venegas, A., and Chavez-Rueda, A.K. (2016). Prolactin Rescues Immature B-Cells from Apoptosis Induced by B-Cell Receptor Cross-Linking. *Journal of immunology research* 2016, 3219017.

80. Saha, S., Gonzalez, J., Rosenfeld, G., Keiser, H., and Peeva, E. (2009). Prolactin alters the mechanisms of B cell tolerance induction. *Arthritis and rheumatism* 60, 1743-1752.
81. Dragin, N., Bismuth, J., Cizeron-Clairac, G., Biferi, M.G., Berthault, C., Serraf, A., Nottin, R., Klatzmann, D., Cumano, A., Barkats, M., et al. (2016). Estrogen-mediated downregulation of AIRE influences sexual dimorphism in autoimmune diseases. *The Journal of clinical investigation* 126, 1525-1537.
82. Markle, J.G., Frank, D.N., Mortin-Toth, S., Robertson, C.E., Feazel, L.M., Rolle-Kampczyk, U., von Bergen, M., McCoy, K.D., Macpherson, A.J., and Danska, J.S. (2013). Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science* 339, 1084-1088.
83. Schneiderman, N., Ironson, G., and Siegel, S.D. (2005). Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. *Annual review of clinical psychology* 1, 607-628.
84. Elenkov, I.J., Papanicolaou, D.A., Wilder, R.L., and Chrousos, G.P. (1996). Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proceedings of the Association of American Physicians* 108, 374-381.
85. Blotta, M.H., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (1997). Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. *Journal of immunology* 158, 5589-5595.
86. Fortune, D.G., Richards, H.L., Kirby, B., McElhone, K., Markham, T., Rogers, S., Main, C.J., and Griffiths, C.E. (2003). Psychological distress impairs clearance of psoriasis in patients treated with photochemotherapy. *Archives of dermatology* 139, 752-756.
87. Versini, M., Jeandel, P.Y., Rosenthal, E., and Shoenfeld, Y. (2014). Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander. *Autoimmunity reviews* 13, 981-1000.
88. Chooi, Y.C., Ding, C., and Magkos, F. (2019). The epidemiology of obesity. *Metabolism: clinical and experimental* 92, 6-10.
89. Cao, H. (2014). Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *The Journal of endocrinology* 220, T47-59.
90. Marzullo, P., Minocci, A., Tagliaferri, M.A., Guzzaloni, G., Di Blasio, A., De Medici, C., Aimaretti, G., and Liuzzi, A. (2010). Investigations of thyroid hormones and antibodies in obesity: leptin levels are associated with thyroid autoimmunity independent of bioanthropometric, hormonal, and weight-related determinants. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95, 3965-3972.
91. Verbeeten, K.C., Elks, C.E., Daneman, D., and Ong, K.K. (2011). Association between childhood obesity and subsequent Type 1 diabetes: a systematic

- review and meta-analysis. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 28, 10-18.
92. Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., and Cortot, A. (2011). Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140, 1785-1794.
 93. Rizk, A., Gheita, T.A., Nassef, S., and Abdallah, A. (2012). The impact of obesity in systemic lupus erythematosus on disease parameters, quality of life, functional capacity and the risk of atherosclerosis. *International journal of rheumatic diseases* 15, 261-267.
 94. Love, T.J., Zhu, Y., Zhang, Y., Wall-Burns, L., Ogdie, A., Gelfand, J.M., and Choi, H.K. (2012). Obesity and the risk of psoriatic arthritis: a population-based study. *Annals of the rheumatic diseases* 71, 1273-1277.
 95. Matarese, G., Carrieri, P.B., Montella, S., De Rosa, V., and La Cava, A. (2010). Leptin as a metabolic link to multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology* 6, 455-461.
 96. Lu, B., Hiraki, L.T., Sparks, J.A., Malspeis, S., Chen, C.Y., Awosogba, J.A., Arkema, E.V., Costenbader, K.H., and Karlson, E.W. (2014). Being overweight or obese and risk of developing rheumatoid arthritis among women: a prospective cohort study. *Annals of the rheumatic diseases* 73, 1914-1922.
 97. Sakkas, L.I., and Bogdanos, D.P. (2016). Infections as a cause of autoimmune rheumatic diseases. *Auto- immunity highlights* 7, 13.
 98. von Herrath, M.G., Fujinami, R.S., and Whitton, J.L. (2003). Microorganisms and autoimmunity: making the barren field fertile? *Nature reviews. Microbiology* 1, 151-157.
 99. Denman, A.M., and Rager-Zisman, B. (2004). Viruses and autoimmune diseases--adapting Koch's postulates. *Autoimmunity reviews* 3, 355-361.
 100. Guilherme, L., Kalil, J., and Cunningham, M. (2006). Molecular mimicry in the autoimmune pathogenesis of rheumatic heart disease. *Autoimmunity* 39, 31-39.
 101. Willison, H.J., Jacobs, B.C., and van Doorn, P.A. (2016). Guillain-Barre syndrome. *Lancet* 388, 717-727.
 102. Bogdanos, D.P., Baum, H., Grasso, A., Okamoto, M., Butler, P., Ma, Y., Rigopoulou, E., Montalto, P., Davies, E.T., Burroughs, A.K., et al. (2004). Microbial mimics are major targets of crossreactivity with human pyruvate dehydrogenase in primary biliary cirrhosis. *Journal of hepatology* 40, 31-39.
 103. Efthymiou, G., Dardiotis, E., Liaskos, C., Marou, E., Scheper, T., Meyer, W., Daponte, A., Daoussis, D., Hadjigeorgiou, G., Bogdanos, D.P., et al. (2019). A comprehensive analysis of antigen-specific antibody responses against human cytomegalovirus in patients with systemic sclerosis. *Clinical immunology* 207, 87-96.

104. Lunardi, C., Bason, C., Navone, R., Millo, E., Damonte, G., Corrocher, R., and Puccetti, A. (2000). Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. *Nature medicine* 6, 1183-1186.
105. Lunardi, C., Dolcino, M., Peterlana, D., Bason, C., Navone, R., Tamassia, N., Tinazzi, E., Beri, R., Corrocher, R., and Puccetti, A. (2007). Endothelial cells' activation and apoptosis induced by a subset of antibodies against human cytomegalovirus: relevance to the pathogenesis of atherosclerosis. *PLoS one* 2, e473.
106. Lunardi, C., Dolcino, M., Peterlana, D., Bason, C., Navone, R., Tamassia, N., Beri, R., Corrocher, R., and Puccetti, A. (2006). Antibodies against human cytomegalovirus in the pathogenesis of systemic sclerosis: a gene array approach. *PLoS medicine* 3, e2.
107. Alidjinou, E.K., Sane, F., Engelmann, I., Geenen, V., and Hober, D. (2014). Enterovirus persistence as a mechanism in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Discovery medicine* 18, 273-282.
108. Hiemstra, H.S., Schloot, N.C., van Veelen, P.A., Willemsen, S.J., Franken, K.L., van Rood, J.J., de Vries, R.R., Chaudhuri, A., Behan, P.O., Drijfhout, J.W., et al. (2001). Cytomegalovirus in autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 3988-3991.
109. Honeyman, M.C., Stone, N.L., Falk, B.A., Nepom, G., and Harrison, L.C. (2010). Evidence for molecular mimicry between human T cell epitopes in rotavirus and pancreatic islet autoantigens. *Journal of immunology* 184, 2204-2210.
110. Harkonen, T., Paananen, A., Lankinen, H., Hovi, T., Vaarala, O., and Roivainen, M. (2003). Enterovirus infection may induce humoral immune response reacting with islet cell autoantigens in humans. *Journal of medical virology* 69, 426-440.
111. Mentis, A.A., Dardiotis, E., Grigoriadis, N., Petinaki, E., and Hadjigeorgiou, G.M. (2017). Viruses and Multiple Sclerosis: From Mechanisms and Pathways to Translational Research Opportunities. *Molecular neurobiology* 54, 3911-3923.
112. Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H., and Bach, J.F. (2010). The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clinical and experimental immunology* 160, 1-9.
113. Hammond, S.R., English, D.R., and McLeod, J.G. (2000). The age-range of risk of developing multiple sclerosis: evidence from a migrant population in Australia. *Brain : a journal of neurology* 123 (Pt 5), 968-974.
114. Bodansky, H.J., Staines, A., Stephenson, C., Haigh, D., and Cartwright, R. (1992). Evidence for an environmental effect in the aetiology of insulin dependent diabetes in a transmigratory population. *Bmj* 304, 1020-1022.
115. Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., and Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome medicine* 8, 51.

116. Ruff, W.E., and Kriegel, M.A. (2015). Autoimmune host-microbiota interactions at barrier sites and beyond. *Trends in molecular medicine* 21, 233-244.
117. Doherty, M., Buchy, P., Standaert, B., Giaquinto, C., and Prado-Cohrs, D. (2016). Vaccine impact: Benefits for human health. *Vaccine* 34, 6707-6714.
118. Guimaraes, L.E., Baker, B., Perricone, C., and Shoenfeld, Y. (2015). Vaccines, adjuvants and autoimmunity. *Pharmacological research* 100, 190-209.
119. Partinen, M., Kornum, B.R., Plazzi, G., Jennum, P., Julkunen, I., and Vaarala, O. (2014). Narcolepsy as an autoimmune disease: the role of H1N1 infection and vaccination. *The Lancet. Neurology* 13, 600-613.
120. Salmon, D.A., Vellozzi, C., Chen, R.T., and Halsey, N.A. (2013). Did the influenza A (H1N1) 2009 monovalent inactivated vaccines increase the risk for Guillain-Barre syndrome? *Expert review of clinical immunology* 9, 795-797.
121. Nachamkin, I., Shadomy, S.V., Moran, A.P., Cox, N., Fitzgerald, C., Ung, H., Corcoran, A.T., Iskander, J.K., Schonberger, L.B., and Chen, R.T. (2008). Anti-ganglioside antibody induction by swine (A/NJ/1976/H1N1) and other influenza vaccines: insights into vaccine-associated Guillain-Barre syndrome. *The Journal of infectious diseases* 198, 226-233.
122. Segal, Y., Dahan, S., Calabro, M., Kanduc, D., and Shoenfeld, Y. (2017). HPV and systemic lupus erythematosus: a mosaic of potential crossreactions. *Immunologic research* 65, 564-571.
123. Blitshteyn, S. (2014). Postural tachycardia syndrome following human papillomavirus vaccination. *European journal of neurology* 21, 135-139.
124. Blitshteyn, S. (2010). Postural tachycardia syndrome after vaccination with Gardasil. *European journal of neurology* 17, e52.
125. Dahan, S., Tomljenovic, L., and Shoenfeld, Y. (2016). Postural Orthostatic Tachycardia Syndrome (POTS)--A novel member of the autoimmune family. *Lupus* 25, 339-342.
126. Bogdanos, D.P., Smith, H., Ma, Y., Baum, H., Mieli-Vergani, G., and Vergani, D. (2005). A study of molecular mimicry and immunological cross-reactivity between hepatitis B surface antigen and myelin mimics. *Clinical & developmental immunology* 12, 217-224.
127. Hernan, M.A., Jick, S.S., Olek, M.J., and Jick, H. (2004). Recombinant hepatitis B vaccine and the risk of multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology* 63, 838-842.
128. Maijers, M.C., de Blok, C.J., Niessen, F.B., van der Veldt, A.A., Ritt, M.J., Winters, H.A., Kramer, M.H., and Nanayakkara, P.W. (2013). Women with silicone breast implants and unexplained systemic symptoms: a descriptive cohort study. *The Netherlands journal of medicine* 71, 534-540.

129. Barilaro, G., Spaziani Testa, C., Cacciani, A., Donato, G., Dimko, M., and Mariotti, A. (2016). ASIA syndrome, calcinosis cutis and chronic kidney disease following silicone injections. A case-based review. *Immunologic research* 64, 1142-1149.
130. Watad, A., Sharif, K., and Shoenfeld, Y. (2017). The ASIA syndrome: basic concepts. *Mediterranean journal of rheumatology* 28, 64-69.
131. Landrigan, P.J., Fuller, R., Acosta, N.J.R., Adeyi, O., Arnold, R., Basu, N.N., Balde, A.B., Bertollini, R., Bose-O'Reilly, S., Boufford, J.I., et al. (2018). The Lancet Commission on pollution and health. *Lancet* 391, 462-512.
132. Colasanti, T., Fiorito, S., Alessandri, C., Serafino, A., Andreola, F., Barbati, C., Morello, F., Alfe, M., Di Blasio, G., Gargiulo, V., et al. (2018). Diesel exhaust particles induce autophagy and citrullination in Normal Human Bronchial Epithelial cells. *Cell death & disease* 9, 1073.
133. Yin, H., Wu, H., Chen, Y., Zhang, J., Zheng, M., Chen, G., Li, L., and Lu, Q. (2018). The Therapeutic and Pathogenic Role of Autophagy in Autoimmune Diseases. *Frontiers in immunology* 9, 1512.
134. Sakkas, L.I., Bogdanos, D.P., Katsiari, C., and Platsoucas, C.D. (2014). Anti-citrullinated peptides as autoantigens in rheumatoid arthritis-relevance to treatment. *Autoimmunity reviews* 13, 1114-1120.
135. Shoenfeld, Y., and Tincani, A. (2005). Autoantibodies-the smoke and the fire. *Autoimmunity* 38, 1-2.
136. Smyk, D.S., Rigopoulou, E.I., Muratori, L., Burroughs, A.K., and Bogdanos, D.P. (2012). Smoking as a risk factor for autoimmune liver disease: what we can learn from primary biliary cirrhosis. *Annals of hepatology* 11, 7-14.
137. Costenbader, K.H., and Karlson, E.W. (2005). Cigarette smoking and systemic lupus erythematosus: a smoking gun? *Autoimmunity* 38, 541-547.
138. Strickland, F.M., Li, Y., Johnson, K., Sun, Z., and Richardson, B.C. (2015). CD4(+) T cells epigenetically modified by oxidative stress cause lupus-like autoimmunity in mice. *Journal of autoimmunity* 62, 75-80.
139. Kearley, J., Silver, J.S., Sanden, C., Liu, Z., Berlin, A.A., White, N., Mori, M., Pham, T.H., Ward, C.K., Criner, G.J., et al. (2015). Cigarette smoke silences innate lymphoid cell function and facilitates an exacerbated type I interleukin-33-dependent response to infection. *Immunity* 42, 566-579.
140. Mahid, S.S., Minor, K.S., Soto, R.E., Hornung, C.A., and Galandiuk, S. (2006). Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clinic proceedings* 81, 1462-1471.
141. Fraga, X.F., Vergara, M., Medina, C., Casellas, F., Bermejo, B., and Malagelada, J.R. (1997). Effects of smoking on the presentation and clinical course of inflammatory bowel disease. *European journal of gastroenterology & hepatology* 9, 683-687.

142. Odes, H.S., Fich, A., Reif, S., Halak, A., Lavy, A., Keter, D., Eliakim, R., Paz, J., Broide, E., Niv, Y., et al. (2001). Effects of current cigarette smoking on clinical course of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Digestive diseases and sciences* *46*, 1717-1721.
143. Caio, G., Volta, U., Sapone, A., Leffler, D.A., De Giorgio, R., Catassi, C., and Fasano, A. (2019). Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC medicine* *17*, 142.
144. Schippa, S., Iebba, V., Barbato, M., Di Nardo, G., Totino, V., Checchi, M.P., Longhi, C., Maiella, G., Cucchiara, S., and Conte, M.P. (2010). A distinctive 'microbial signature' in celiac pediatric patients. *BMC microbiology* *10*, 175.
145. Wu, C., Yosef, N., Thalhamer, T., Zhu, C., Xiao, S., Kishi, Y., Regev, A., and Kuchroo, V.K. (2013). Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* *496*, 513-517.
146. Kleinewietfeld, M., Manzel, A., Titze, J., Kvakan, H., Yosef, N., Linker, R.A., Muller, D.N., and Hafler, D.A. (2013). Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature* *496*, 518-522.
147. Lee, G.R. (2018). The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *International journal of molecular sciences* *19*.
148. Hernandez, A.L., Kitz, A., Wu, C., Lowther, D.E., Rodriguez, D.M., Vudattu, N., Deng, S., Herold, K.C., Kuchroo, V.K., Kleinewietfeld, M., et al. (2015). Sodium chloride inhibits the suppressive function of FOXP3+ regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation* *125*, 4212-4222.
149. Bouneaud, C., Kourilsky, P., and Bousso, P. (2000). Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* *13*, 829-840.
150. Kaufman, D.L., Clare-Salzler, M., Tian, J., Forsthuber, T., Ting, G.S., Robinson, P., Atkinson, M.A., Sercarz, E.E., Tobin, A.J., and Lehmann, P.V. (1993). Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* *366*, 69-72.
151. Posselt, A.M., Barker, C.F., Friedman, A.L., and Naji, A. (1992). Prevention of autoimmune diabetes in the BB rat by intrathymic islet transplantation at birth. *Science* *256*, 1321-1324.
152. Khoury, S.J., Sayegh, M.H., Hancock, W.W., Gallon, L., Carpenter, C.B., and Weiner, H.L. (1993). Acquired tolerance to experimental autoimmune encephalomyelitis by intrathymic injection of myelin basic protein or its major encephalitogenic peptide. *The Journal of experimental medicine* *178*, 559-566.
153. Duncan, S.R., Rubin, R.L., Burlingame, R.W., Sinclair, S.B., Pekny, K.W., and Theofilopoulos, A.N. (1996). Intrathymic injection of polynucleosomes delays autoantibody production in BXSB mice. *Clinical immunology and immunopathology* *79*, 171-181.

154. Meffre, E., and Wardemann, H. (2008). B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Current opinion in immunology* 20, 632-638.
155. Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., and Nussenzweig, M.C. (2005). Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *The Journal of experimental medicine* 201, 703-711.
156. Gorton, D., Blyth, S., Gorton, J.G., Govan, B., and Ketheesan, N. (2010). An alternative technique for the induction of autoimmune valvulitis in a rat model of rheumatic heart disease. *Journal of immunological methods* 355, 80-85.
157. Parish, I.A., and Heath, W.R. (2008). Too dangerous to ignore: self-tolerance and the control of ignorant autoreactive T cells. *Immunology and cell biology* 86, 146-152.
158. Mueller, D.L. (2010). Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nature immunology* 11, 21-27.
159. Pieterse, E., and van der Vlag, J. (2014). Breaking immunological tolerance in systemic lupus erythematosus. *Frontiers in immunology* 5, 164.
160. Moraru, M., Roth, A., Keren, G., and George, J. (2006). Cellular autoimmunity to cardiac myosin in patients with a recent myocardial infarction. *International journal of cardiology* 107, 61-66.
161. Sanchez-Trincado, J.L., Gomez-Perosanz, M., and Reche, P.A. (2017). Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *Journal of immunology research* 2017, 2680160.
162. Van Regenmortel, M.H. (2009). What is a B-cell epitope? *Methods in molecular biology* 524, 3-20.
163. Joglekar, A.V., and Li, G. (2020). T cell antigen discovery. *Nature methods*.
164. Moudgil, K.D., and Sercarz, E.E. (2005). Understanding crypticity is the key to revealing the pathogenesis of autoimmunity. *Trends in immunology* 26, 355-359.
165. Lanzavecchia, A. (1995). How can cryptic epitopes trigger autoimmunity? *The Journal of experimental medicine* 181, 1945-1948.
166. Vanderlugt, C.L., Neville, K.L., Nikceвич, K.M., Eagar, T.N., Bluestone, J.A., and Miller, S.D. (2000). Pathologic role and temporal appearance of newly emerging autoepitopes in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 164, 670-678.
167. Vanderlugt, C.L., and Miller, S.D. (2002). Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nature reviews. Immunology* 2, 85-95.

168. Di Rosa, F., and Barnaba, V. (1998). Persisting viruses and chronic inflammation: understanding their relation to autoimmunity. *Immunological reviews* 164, 17-27.
169. Mahler, M., Mierau, R., Genth, E., and Bluthner, M. (2002). Development of a CENP-A/CENP-B-specific immune response in a patient with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism* 46, 1866-1872.
170. Arbuckle, M.R., Reichlin, M., Harley, J.B., and James, J.A. (1999). Shared early autoantibody recognition events in the development of anti-Sm B/B' in human lupus. *Scandinavian journal of immunology* 50, 447-455.
171. Mahler, M., Mierau, R., Schlumberger, W., and Bluthner, M. (2001). A population of autoantibodies against a centromere-associated protein A major epitope motif cross-reacts with related cryptic epitopes on other nuclear autoantigens and on the Epstein-Barr nuclear antigen 1. *Journal of molecular medicine* 79, 722-731.
172. Sakkas, L.I., and Bogdanos, D.P. (2016). Systemic sclerosis: New evidence re-enforces the role of B cells. *Autoimmunity reviews* 15, 155-161.
173. Doyle, H.A., and Mamula, M.J. (2012). Autoantigenesis: the evolution of protein modifications in autoimmune disease. *Current opinion in immunology* 24, 112-118.
174. Doyle, H.A., Gee, R.J., and Mamula, M.J. (2003). A failure to repair self-proteins leads to T cell hyperproliferation and autoantibody production. *Journal of immunology* 171, 2840-2847.
175. Zamvil, S.S., Mitchell, D.J., Moore, A.C., Kitamura, K., Steinman, L., and Rothbard, J.B. (1986). T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis. *Nature* 324, 258-260.
176. Nemazee, D.A. (1985). Immune complexes can trigger specific, T cell-dependent, autoanti-IgG antibody production in mice. *The Journal of experimental medicine* 161, 242-256.
177. Pedchenko, V., Bondar, O., Fogo, A.B., Vanacore, R., Voziyan, P., Kitching, A.R., Wieslander, J., Kashtan, C., Borza, D.B., Neilson, E.G., et al. (2010). Molecular architecture of the Goodpasture autoantigen in anti-GBM nephritis. *The New England journal of medicine* 363, 343-354.
178. Vinuesa, C.G., Cook, M.C., Angelucci, C., Athanasopoulos, V., Rui, L., Hill, K.M., Yu, D., Domaschenz, H., Whittle, B., Lambe, T., et al. (2005). A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* 435, 452-458.
179. Yu, D., Tan, A.H., Hu, X., Athanasopoulos, V., Simpson, N., Silva, D.G., Hutloff, A., Giles, K.M., Leedman, P.J., Lam, K.P., et al. (2007). Roquin represses autoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger RNA. *Nature* 450, 299-303.

180. Turbyville, J.C., and Rao, V.K. (2010). The autoimmune lymphoproliferative syndrome: A rare disorder providing clues about normal tolerance. *Autoimmunity reviews* 9, 488-493.
181. Strasser, A., Jost, P.J., and Nagata, S. (2009). The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30, 180-192.
182. Wang, X., and Xia, Y. (2019). Anti-double Stranded DNA Antibodies: Origin, Pathogenicity, and Targeted Therapies. *Frontiers in immunology* 10, 1667.
183. Yang, Y.G., Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2007). Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell* 131, 873-886.
184. Kavanagh, D., Spitzer, D., Kothari, P.H., Shaikh, A., Liszewski, M.K., Richards, A., and Atkinson, J.P. (2008). New roles for the major human 3'-5' exonuclease TREX1 in human disease. *Cell cycle* 7, 1718-1725.
185. Yasutomo, K., Horiuchi, T., Kagami, S., Tsukamoto, H., Hashimura, C., Urushihara, M., and Kuroda, Y. (2001). Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nature genetics* 28, 313-314.
186. Napirei, M., Karsunky, H., Zevnik, B., Stephan, H., Mannherz, H.G., and Moroy, T. (2000). Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nature genetics* 25, 177-181.
187. Buckner, J.H. (2010). Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nature reviews. Immunology* 10, 849-859.
188. Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., et al. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine* 203, 1701-1711.
189. Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30, 899-911.
190. Darrasse-Jeze, G., Deroubaix, S., Mouquet, H., Victora, G.D., Eisenreich, T., Yao, K.H., Masilamani, R.F., Dustin, M.L., Rudensky, A., Liu, K., et al. (2009). Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 206, 1853-1862.
191. Liston, A., and Rudensky, A.Y. (2007). Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. *Current opinion in immunology* 19, 176-185.
192. Yates, J., Rovis, F., Mitchell, P., Afzali, B., Tsang, J., Garin, M., Lechler, R.I., Lombardi, G., and Garden, O.A. (2007). The maintenance of human CD4+ CD25+ regulatory T cell function: IL-2, IL-4, IL-7 and IL-15 preserve optimal suppressive potency in vitro. *International immunology* 19, 785-799.

193. Vignali, D.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature reviews. Immunology* 8, 523-532.
194. Flores-Borja, F., Jury, E.C., Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2008). Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 19396-19401.
195. Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Hopner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M.L., et al. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110, 1225-1232.
196. Ben Ahmed, M., Belhadj Hmida, N., Moes, N., Buyse, S., Abdeladhim, M., Louzir, H., and Cerf-Bensussan, N. (2009). IL-15 renders conventional lymphocytes resistant to suppressive functions of regulatory T cells through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Journal of immunology* 182, 6763-6770.
197. Valencia, X., Stephens, G., Goldbach-Mansky, R., Wilson, M., Shevach, E.M., and Lipsky, P.E. (2006). TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 108, 253-261.
198. Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T.R., Backstrom, B.T., Sobel, R.A., Wucherpfennig, K.W., Strom, T.B., et al. (2007). Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nature medicine* 13, 423-431.
199. Monk, C.R., Spachidou, M., Rovis, F., Leung, E., Botto, M., Lechler, R.I., and Garden, O.A. (2005). MRL/Mp CD4+, CD25- T cells show reduced sensitivity to suppression by CD4+, CD25+ regulatory T cells in vitro: a novel defect of T cell regulation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 52, 1180-1184.
200. D'Alise, A.M., Auyeung, V., Feuerer, M., Nishio, J., Fontenot, J., Benoist, C., and Mathis, D. (2008). The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 19857-19862.
201. van Amelsfort, J.M., van Roon, J.A., Noordegraaf, M., Jacobs, K.M., Bijlsma, J.W., Lafeber, F.P., and Taams, L.S. (2007). Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4+, CD25+ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 56, 732-742.
202. Venigalla, R.K., Tretter, T., Krienke, S., Max, R., Eckstein, V., Blank, N., Fiehn, C., Ho, A.D., and Lorenz, H.M. (2008). Reduced CD4+, CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+, CD25high, CD127 -/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 58, 2120-2130.
203. Kohm, A.P., Carpentier, P.A., Anger, H.A., and Miller, S.D. (2002). Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune

- responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* *169*, 4712-4716.
204. Schneider, A., Rieck, M., Sanda, S., Pihoker, C., Greenbaum, C., and Buckner, J.H. (2008). The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4+ FOXP3+ regulatory T cells. *Journal of immunology* *181*, 7350-7355.
 205. Walker, L.S. (2009). Regulatory T cells overturned: the effectors fight back. *Immunology* *126*, 466-474.
 206. Yang, J., Brook, M.O., Carvalho-Gaspar, M., Zhang, J., Ramon, H.E., Sayegh, M.H., Wood, K.J., Turka, L.A., and Jones, N.D. (2007). Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 19954-19959.
 207. Choi, B.K., Bae, J.S., Choi, E.M., Kang, W.J., Sakaguchi, S., Vinay, D.S., and Kwon, B.S. (2004). 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4+CD25+ T cells. *Journal of leukocyte biology* *75*, 785-791.
 208. Takeda, I., Ine, S., Killeen, N., Ndhlovu, L.C., Murata, K., Satomi, S., Sugamura, K., and Ishii, N. (2004). Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *Journal of immunology* *172*, 3580-3589.
 209. Dorner, T., Giesecke, C., and Lipsky, P.E. (2011). Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE. *Arthritis research & therapy* *13*, 243.
 210. Dar, S.A., Janahi, E.M., Haque, S., Akhter, N., Jawed, A., Wahid, M., Ramachandran, V.G., Bhattacharya, S.N., Banerjee, B.D., and Das, S. (2016). Superantigen influence in conjunction with cytokine polymorphism potentiates autoimmunity in systemic lupus erythematosus patients. *Immunologic research* *64*, 1001-1012.
 211. Macias, E.S., Pereira, F.A., Rietkerk, W., and Safai, B. (2011). Superantigens in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology* *64*, 455-472; quiz 473-454.
 212. Matsubara, K., and Fukaya, T. (2007). The role of superantigens of group A Streptococcus and Staphylococcus aureus in Kawasaki disease. *Current opinion in infectious diseases* *20*, 298-303.
 213. Montes, C.L., Acosta-Rodriguez, E.V., Merino, M.C., Bermejo, D.A., and Gruppi, A. (2007). Polyclonal B cell activation in infections: infectious agents' devilry or defense mechanism of the host? *Journal of leukocyte biology* *82*, 1027-1032.
 214. Herman, A., Kappler, J.W., Marrack, P., and Pullen, A.M. (1991). Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annual review of immunology* *9*, 745-772.
 215. Nagata, K., Kumata, K., Nakayama, Y., Satoh, Y., Sugihara, H., Hara, S., Matsushita, M., Kuwamoto, S., Kato, M., Murakami, I., et al. (2017). Epstein-

- Barr Virus Lytic Reactivation Activates B Cells Polyclonally and Induces Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression: A Mechanism Underlying Autoimmunity and Its Contribution to Graves' Disease. *Viral immunology* 30, 240-249.
216. Lobo-Yeo, A., Senaldi, G., Portmann, B., Mowat, A.P., Mieli-Vergani, G., and Vergani, D. (1990). Class I and class II major histocompatibility complex antigen expression on hepatocytes: a study in children with liver disease. *Hepatology* 12, 224-232.
217. Ballardini, G., Mirakian, R., Bianchi, F.B., Pisi, E., Doniach, D., and Bottazzo, G.F. (1984). Aberrant expression of HLA-DR antigens on bile duct epithelium in primary biliary cirrhosis: relevance to pathogenesis. *Lancet* 2, 1009-1013.
218. Herkel, J., Jagemann, B., Wiegand, C., Lazaro, J.F., Lueth, S., Kanzler, S., Blessing, M., Schmitt, E., and Lohse, A.W. (2003). MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes. *Hepatology* 37, 1079-1085.
219. Kimura, H., Kimura, M., Tzou, S.C., Chen, Y.C., Suzuki, K., Rose, N.R., and Caturegli, P. (2005). Expression of class II major histocompatibility complex molecules on thyrocytes does not cause spontaneous thyroiditis but mildly increases its severity after immunization. *Endocrinology* 146, 1154-1162.
220. Kanazawa, S., Ota, S., Sekine, C., Tada, T., Otsuka, T., Okamoto, T., Sonderstrup, G., and Peterlin, B.M. (2006). Aberrant MHC class II expression in mouse joints leads to arthritis with extraarticular manifestations similar to rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14465-14470.
221. Coomans de Brachene, A., Dos Santos, R.S., Marroqui, L., Colli, M.L., Marselli, L., Mirmira, R.G., Marchetti, P., and Eizirik, D.L. (2018). IFN-alpha induces a preferential long-lasting expression of MHC class I in human pancreatic beta cells. *Diabetologia* 61, 636-640.
222. Li, C.K., Knopp, P., Moncrieffe, H., Singh, B., Shah, S., Nagaraju, K., Varsani, H., Gao, B., and Wedderburn, L.R. (2009). Overexpression of MHC class I heavy chain protein in young skeletal muscle leads to severe myositis: implications for juvenile myositis. *The American journal of pathology* 175, 1030-1040.
223. Cusick, M.F., Libbey, J.E., and Fujinami, R.S. (2012). Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clinical reviews in allergy & immunology* 42, 102-111.
224. Kaplan, M.H., and Meyeserian, M. (1962). An immunological cross-reaction between group-A streptococcal cells and human heart tissue. *Lancet* 1, 706-710.
225. Damian, R.T. (1964). Molecular Mimicry: Antigen Sharing by Parasite and Host and Its Consequences. *The American Naturalist* 98, 129-149.

226. Fujinami, R.S., Oldstone, M.B., Wroblewska, Z., Frankel, M.E., and Koprowski, H. (1983). Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *80*, 2346-2350.
227. Fujinami, R.S., and Oldstone, M.B. (1985). Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* *230*, 1043-1045.
228. Guggenmos, J., Schubart, A.S., Ogg, S., Andersson, M., Olsson, T., Mather, I.H., and Linington, C. (2004). Antibody cross-reactivity between myelin oligodendrocyte glycoprotein and the milk protein butyrophilin in multiple sclerosis. *Journal of immunology* *172*, 661-668.
229. Soderberg, C., Larsson, S., Rozell, B.L., Sumitran-Karuppan, S., Ljungman, P., and Moller, E. (1996). Cytomegalovirus-induced CD13-specific autoimmunity--a possible cause of chronic graft-vs-host disease. *Transplantation* *61*, 600-609.
230. Guarneri, F., Guarneri, C., and Benvenga, S. (2005). Helicobacter pylori and autoimmune pancreatitis: role of carbonic anhydrase via molecular mimicry? *Journal of cellular and molecular medicine* *9*, 741-744.
231. Kino-Ohsaki, J., Nishimori, I., Morita, M., Okazaki, K., Yamamoto, Y., Onishi, S., and Hollingsworth, M.A. (1996). Serum antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjogren's syndrome. *Gastroenterology* *110*, 1579-1586.
232. Kountouras, J., Zavos, C., and Chatzopoulos, D. (2005). A concept on the role of Helicobacter pylori infection in autoimmune pancreatitis. *Journal of cellular and molecular medicine* *9*, 196-207.
233. Kawa, S., Ota, M., Yoshizawa, K., Horiuchi, A., Hamano, H., Ochi, Y., Nakayama, K., Tokutake, Y., Katsuyama, Y., Saito, S., et al. (2002). HLA DRB10405-DQB10401 haplotype is associated with autoimmune pancreatitis in the Japanese population. *Gastroenterology* *122*, 1264-1269.
234. Henry, J., Miller, M.M., and Pontarotti, P. (1999). Structure and evolution of the extended B7 family. *Immunology today* *20*, 285-288.
235. Lindert, R.B., Haase, C.G., Brehm, U., Linington, C., Wekerle, H., and Hohlfeld, R. (1999). Multiple sclerosis: B- and T-cell responses to the extracellular domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Brain : a journal of neurology* *122 (Pt 11)*, 2089-2100.
236. Storch, M.K., Stefferl, A., Brehm, U., Weissert, R., Wallstrom, E., Kerschensteiner, M., Olsson, T., Linington, C., and Lassmann, H. (1998). Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain pathology* *8*, 681-694.
237. Wekerle, H. (2017). B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity* *50*, 57-60.

238. Malosse, D., Perron, H., Sasco, A., and Seigneurin, J.M. (1992). Correlation between milk and dairy product consumption and multiple sclerosis prevalence: a worldwide study. *Neuroepidemiology* 11, 304-312.
239. Stefferl, A., Schubart, A., Storch, M., Amini, A., Mather, I., Lassmann, H., and Linington, C. (2000). Butyrophilin, a milk protein, modulates the encephalitogenic T cell response to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 165, 2859-2865.
240. Yuki, N. (2007). Ganglioside mimicry and peripheral nerve disease. *Muscle & nerve* 35, 691-711.
241. Ang, C.W., Jacobs, B.C., and Laman, J.D. (2004). The Guillain-Barre syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends in immunology* 25, 61-66.
242. Lang, H.L., Jacobsen, H., Ikemizu, S., Andersson, C., Harlos, K., Madsen, L., Hjorth, P., Sondergaard, L., Svejgaard, A., Wucherpfennig, K., et al. (2002). A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nature immunology* 3, 940-943.
243. Levin, M.C., Lee, S.M., Kalume, F., Morcos, Y., Dohan, F.C., Jr., Hasty, K.A., Callaway, J.C., Zunt, J., Desiderio, D., and Stuart, J.M. (2002). Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. *Nature medicine* 8, 509-513.
244. Zhao, Z., Ren, J., Dai, C., Kannapell, C.C., Wang, H., Gaskin, F., and Fu, S.M. (2019). Nature of T cell epitopes in lupus antigens and HLA-DR determines autoantibody initiation and diversification. *Annals of the rheumatic diseases* 78, 380-390.
245. Wucherpfennig, K.W., Catz, I., Hausmann, S., Strominger, J.L., Steinman, L., and Warren, K.G. (1997). Recognition of the immunodominant myelin basic protein peptide by autoantibodies and HLA-DR2-restricted T cell clones from multiple sclerosis patients. Identity of key contact residues in the B-cell and T-cell epitopes. *The Journal of clinical investigation* 100, 1114-1122.
246. Routsias, J.G., and Tzioufas, A.G. (2010). B-cell epitopes of the intracellular autoantigens Ro/SSA and La/SSB: tools to study the regulation of the autoimmune response. *Journal of autoimmunity* 35, 256-264.
247. Hausmann, S., and Wucherpfennig, K.W. (1997). Activation of autoreactive T cells by peptides from human pathogens. *Current opinion in immunology* 9, 831-838.
248. Wucherpfennig, K.W. (2001). Structural basis of molecular mimicry. *Journal of autoimmunity* 16, 293-302.
249. Fujinami, R.S., von Herrath, M.G., Christen, U., and Whitton, J.L. (2006). Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clinical microbiology reviews* 19, 80-94.

250. Geginat, J., Paroni, M., Pagani, M., Galimberti, D., De Francesco, R., Scarpini, E., and Abrignani, S. (2017). The Enigmatic Role of Viruses in Multiple Sclerosis: Molecular Mimicry or Disturbed Immune Surveillance? *Trends in immunology* 38, 498-512.
251. Murali-Krishna, K., Altman, J.D., Suresh, M., Sourdive, D.J., Zajac, A.J., Miller, J.D., Slansky, J., and Ahmed, R. (1998). Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 8, 177-187.
252. Welsh, R.M., and Selin, L.K. (2002). No one is naive: the significance of heterologous T-cell immunity. *Nature reviews. Immunology* 2, 417-426.
253. Horwitz, M.S., Bradley, L.M., Harbertson, J., Krahl, T., Lee, J., and Sarvetnick, N. (1998). Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nature medicine* 4, 781-785.
254. Gangappa, S., Babu, J.S., Thomas, J., Daheshia, M., and Rouse, B.T. (1998). Virus-induced immunoinflammatory lesions in the absence of viral antigen recognition. *Journal of immunology* 161, 4289-4300.
255. Wesley, S., and Hafler, D.A. (2020). Chapter 51 - Multiple Sclerosis. In *The Autoimmune Diseases (Sixth Edition)*, N.R. Rose and I.R. Mackay, eds. (Academic Press), pp. 961-986.
256. World Health Organization, and Multiple Sclerosis International Federation (2013). *Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around The World*.
257. Murray, T.J. (2009). Robert Carswell: the first illustrator of MS. *International MS journal* 16, 98-101.
258. Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B.V., and Thompson, A.J. (2014). *Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity*. *Neurology* 83, 1022-1024.
259. Collaborators, G.B.D.M.S. (2019). Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet. Neurology* 18, 269-285.
260. Βοζίκης, Α., and Σωτηροπούλου, Ε. (2012). Πολλαπλή Σκλήρυνση στην Ελλάδα: Ανάλυση των ιδίων πληρωμών. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 29, 448-453.
261. Compston, A., and Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502-1517.
262. Haines, J.L., Terwedow, H.A., Burgess, K., Pericak-Vance, M.A., Rimmler, J.B., Martin, E.R., Oksenberg, J.R., Lincoln, R., Zhang, D.Y., Banatao, D.R., et al. (1998). Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. *The Multiple Sclerosis Genetics Group. Human molecular genetics* 7, 1229-1234.

263. Patsopoulos, N.A., Barcellos, L.F., Hintzen, R.Q., Schaefer, C., van Duijn, C.M., Noble, J.A., Raj, T., Imsgc, Anzgene, Gourraud, P.A., et al. (2013). Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS genetics* 9, e1003926.
264. Thompson, A.J., Baranzini, S.E., Geurts, J., Hemmer, B., and Ciccarelli, O. (2018). Multiple sclerosis. *Lancet* 391, 1622-1636.
265. International Multiple Sclerosis Genetics, C., Hafler, D.A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E.S., Daly, M.J., De Jager, P.L., de Bakker, P.I., Gabriel, S.B., Mirel, D.B., et al. (2007). Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *The New England journal of medicine* 357, 851-862.
266. Sawcer, S., Franklin, R.J., and Ban, M. (2014). Multiple sclerosis genetics. *The Lancet. Neurology* 13, 700-709.
267. Hadjigeorgiou, G.M., Kountra, P.M., Koutsis, G., Tsimourtou, V., Siokas, V., Dardioti, M., Rikos, D., Marogianni, C., Aloizou, A.M., Karadima, G., et al. (2019). Replication study of GWAS risk loci in Greek multiple sclerosis patients. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 40, 253-260.
268. Harroud, A., and Richards, J.B. (2018). Mendelian randomization in multiple sclerosis: A causal role for vitamin D and obesity? *Multiple sclerosis* 24, 80-85.
269. Belbasis, L., Bellou, V., Evangelou, E., and Tzoulaki, I. (2020). Environmental factors and risk of multiple sclerosis: Findings from meta-analyses and Mendelian randomization studies. *Multiple sclerosis* 26, 397-404.
270. Handel, A.E., Williamson, A.J., Disanto, G., Dobson, R., Giovannoni, G., and Ramagopalan, S.V. (2011). Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *PloS one* 6, e16149.
271. Ramanujam, R., Hedstrom, A.K., Manouchehrinia, A., Alfredsson, L., Olsson, T., Bottai, M., and Hillert, J. (2015). Effect of Smoking Cessation on Multiple Sclerosis Prognosis. *JAMA neurology* 72, 1117-1123.
272. Leary, P.F., Zamfirova, I., Au, J., and McCracken, W.H. (2017). Effect of Latitude on Vitamin D Levels. *The Journal of the American Osteopathic Association* 117, 433-439.
273. Ascherio, A., Munger, K.L., White, R., Kochert, K., Simon, K.C., Polman, C.H., Freedman, M.S., Hartung, H.P., Miller, D.H., Montalban, X., et al. (2014). Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA neurology* 71, 306-314.
274. Ascherio, A., and Munger, K.L. (2016). Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. *Seminars in neurology* 36, 103-114.
275. Sundstrom, P., Nystrom, M., Ruuth, K., and Lundgren, E. (2009). Antibodies to specific EBNA-1 domains and HLA DRB1*1501 interact as risk factors for multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 215, 102-107.

276. De Jager, P.L., Simon, K.C., Munger, K.L., Rioux, J.D., Hafler, D.A., and Ascherio, A. (2008). Integrating risk factors: HLA-DRB1*1501 and Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. *Neurology* 70, 1113-1118.
277. Sundqvist, E., Sundstrom, P., Linden, M., Hedstrom, A.K., Aloisi, F., Hillert, J., Kockum, I., Alfredsson, L., and Olsson, T. (2012). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: interaction with HLA. *Genes and immunity* 13, 14-20.
278. Simon, K.C., van der Mei, I.A., Munger, K.L., Ponsonby, A., Dickinson, J., Dwyer, T., Sundstrom, P., and Ascherio, A. (2010). Combined effects of smoking, anti-EBNA antibodies, and HLA-DRB1*1501 on multiple sclerosis risk. *Neurology* 74, 1365-1371.
279. Ciccarelli, O., Barkhof, F., Bodini, B., De Stefano, N., Golay, X., Nicolay, K., Pelletier, D., Pouwels, P.J., Smith, S.A., Wheeler-Kingshott, C.A., et al. (2014). Pathogenesis of multiple sclerosis: insights from molecular and metabolic imaging. *The Lancet. Neurology* 13, 807-822.
280. Yamout, B.I., and Alroughani, R. (2018). Multiple Sclerosis. *Seminars in neurology* 38, 212-225.
281. Sospedra, M., and Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annual review of immunology* 23, 683-747.
282. Planas, R., Santos, R., Tomas-Ojer, P., Cruciani, C., Lutterotti, A., Faigle, W., Schaeren-Wiemers, N., Espejo, C., Eixarch, H., Pinilla, C., et al. (2018). GDP-l-fucose synthase is a CD4(+) T cell-specific autoantigen in DRB3*02:02 patients with multiple sclerosis. *Science translational medicine* 10.
283. Cossu, D., Mamei, G., Galleri, G., Cocco, E., Masala, S., Frau, J., Marrosu, M.G., Manetti, R., and Sechi, L.A. (2015). Human interferon regulatory factor 5 homologous epitopes of Epstein-Barr virus and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis induce a specific humoral and cellular immune response in multiple sclerosis patients. *Multiple sclerosis* 21, 984-995.
284. Lindsey, J.W. (2017). Antibodies to the Epstein-Barr virus proteins BFRF3 and BRRF2 cross-react with human proteins. *Journal of neuroimmunology* 310, 131-134.
285. Lindsey, J.W., deGannes, S.L., Pate, K.A., and Zhao, X. (2016). Antibodies specific for Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 cross-react with human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *Molecular immunology* 69, 7-12.
286. Saxena, A., Martin-Blondel, G., Mars, L.T., and Liblau, R.S. (2011). Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS letters* 585, 3758-3763.
287. Michel, L., Touil, H., Pikor, N.B., Gommerman, J.L., Prat, A., and Bar-Or, A. (2015). B Cells in the Multiple Sclerosis Central Nervous System: Trafficking and Contribution to CNS-Compartmentalized Inflammation. *Frontiers in immunology* 6, 636.

288. Wanleenuwat, P., and Iwanowski, P. (2019). Role of B cells and antibodies in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis and related disorders* 36, 101416.
289. Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., and Aloisi, F. (2004). Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain pathology* 14, 164-174.
290. Howell, O.W., Reeves, C.A., Nicholas, R., Carassiti, D., Radotra, B., Gentleman, S.M., Serafini, B., Aloisi, F., Roncaroli, F., Magliozzi, R., et al. (2011). Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 134, 2755-2771.
291. Magliozzi, R., Howell, O.W., Reeves, C., Roncaroli, F., Nicholas, R., Serafini, B., Aloisi, F., and Reynolds, R. (2010). A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 68, 477-493.
292. Kinzel, S., and Weber, M.S. (2016). B Cell-Directed Therapeutics in Multiple Sclerosis: Rationale and Clinical Evidence. *CNS drugs* 30, 1137-1148.
293. Perry, V.H., Nicoll, J.A., and Holmes, C. (2010). Microglia in neurodegenerative disease. *Nature reviews. Neurology* 6, 193-201.
294. Frischer, J.M., Bramow, S., Dal-Bianco, A., Lucchinetti, C.F., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., Sorensen, P.S., and Lassmann, H. (2009). The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain : a journal of neurology* 132, 1175-1189.
295. Trapp, B.D., and Stys, P.K. (2009). Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *The Lancet. Neurology* 8, 280-291.
296. Lassmann, H., van Horssen, J., and Mahad, D. (2012). Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nature reviews. Neurology* 8, 647-656.
297. Waxman, S.G. (2008). Mechanisms of disease: sodium channels and neuroprotection in multiple sclerosis-current status. *Nature clinical practice. Neurology* 4, 159-169.
298. Werner, P., Pitt, D., and Raine, C.S. (2001). Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Annals of neurology* 50, 169-180.
299. Cambron, M., D'Haeseleer, M., Laureys, G., Clinckers, R., Debruyne, J., and De Keyser, J. (2012). White-matter astrocytes, axonal energy metabolism, and axonal degeneration in multiple sclerosis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32, 413-424.
300. Bannerman, P., Hahn, A., Soulika, A., Gallo, V., and Pleasure, D. (2007). Astrogliosis in EAE spinal cord: derivation from radial glia, and relationships to oligodendroglia. *Glia* 55, 57-64.

301. Sospedra, M., and Martin, R. (2006). Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Autoimmunity* 39, 3-8.
302. Chapagain, M.L., and Nerurkar, V.R. (2010). Human polyomavirus JC (JCV) infection of human B lymphocytes: a possible mechanism for JCV transmigration across the blood-brain barrier. *The Journal of infectious diseases* 202, 184-191.
303. Cohen, J.I. (1999). The biology of Epstein-Barr virus: lessons learned from the virus and the host. *Current opinion in immunology* 11, 365-370.
304. Dunmire, S.K., Hogquist, K.A., and Balfour, H.H. (2015). Infectious Mononucleosis. *Current topics in microbiology and immunology* 390, 211-240.
305. Babcock, G.J., Decker, L.L., Volk, M., and Thorley-Lawson, D.A. (1998). EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 9, 395-404.
306. Ok, C.Y., Li, L., and Young, K.H. (2015). EBV-driven B-cell lymphoproliferative disorders: from biology, classification and differential diagnosis to clinical management. *Experimental & molecular medicine* 47, e132.
307. Cohen, J.I. (2000). Epstein-Barr virus infection. *The New England journal of medicine* 343, 481-492.
308. Moore, K.W., Vieira, P., Fiorentino, D.F., Trounstein, M.L., Khan, T.A., and Mosmann, T.R. (1990). Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 248, 1230-1234.
309. Lunemann, J.D., Kamradt, T., Martin, R., and Munz, C. (2007). Epstein-barr virus: environmental trigger of multiple sclerosis? *Journal of virology* 81, 6777-6784.
310. Ascherio, A., Munger, K.L., Lennette, E.T., Spiegelman, D., Hernan, M.A., Olek, M.J., Hankinson, S.E., and Hunter, D.J. (2001). Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *Jama* 286, 3083-3088.
311. DeLorenze, G.N., Munger, K.L., Lennette, E.T., Orentreich, N., Vogelman, J.H., and Ascherio, A. (2006). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Archives of neurology* 63, 839-844.
312. Levin, L.I., Munger, K.L., Rubertone, M.V., Peck, C.A., Lennette, E.T., Spiegelman, D., and Ascherio, A. (2005). Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *Jama* 293, 2496-2500.
313. Munger, K.L., Levin, L.I., O'Reilly, E.J., Falk, K.I., and Ascherio, A. (2011). Anti-Epstein-Barr virus antibodies as serological markers of multiple sclerosis: a prospective study among United States military personnel. *Multiple sclerosis* 17, 1185-1193.

314. Deeba, E., Koptides, D., Gaglia, E., Constantinou, A., Lambrianides, A., Pantzaris, M., Krashias, G., and Christodoulou, C. (2019). Evaluation of Epstein-Barr virus-specific antibodies in Cypriot multiple sclerosis patients. *Molecular immunology* 105, 270-275.
315. Sundstrom, P., Juto, P., Wadell, G., Hallmans, G., Svenningsson, A., Nystrom, L., Dillner, J., and Forsgren, L. (2004). An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology* 62, 2277-2282.
316. Almohmeed, Y.H., Avenell, A., Aucott, L., and Vickers, M.A. (2013). Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein Barr virus and multiple sclerosis. *PloS one* 8, e61110.
317. Pakpoor, J., Disanto, G., Gerber, J.E., Dobson, R., Meier, U.C., Giovannoni, G., and Ramagopalan, S.V. (2013). The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: a meta-analysis. *Multiple sclerosis* 19, 162-166.
318. Handel, A.E., Williamson, A.J., Disanto, G., Handunnetthi, L., Giovannoni, G., and Ramagopalan, S.V. (2010). An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PloS one* 5.
319. Goldacre, M.J., Wotton, C.J., Seagroatt, V., and Yeates, D. (2004). Multiple sclerosis after infectious mononucleosis: record linkage study. *Journal of epidemiology and community health* 58, 1032-1035.
320. Farrell, R.A., Antony, D., Wall, G.R., Clark, D.A., Fisniku, L., Swanton, J., Khaleeli, Z., Schmierer, K., Miller, D.H., and Giovannoni, G. (2009). Humoral immune response to EBV in multiple sclerosis is associated with disease activity on MRI. *Neurology* 73, 32-38.
321. Latham, L.B., Lee, M.J., Lincoln, J.A., Ji, N., Forsthuber, T.G., and Lindsey, J.W. (2016). Antivirus immune activity in multiple sclerosis correlates with MRI activity. *Acta neurologica Scandinavica* 133, 17-24.
322. Burnard, S., Lechner-Scott, J., and Scott, R.J. (2017). EBV and MS: Major cause, minor contribution or red-herring? *Multiple sclerosis and related disorders* 16, 24-30.
323. Jilek, S., Schlupe, M., Meylan, P., Vingerhoets, F., Guignard, L., Monney, A., Kleeberg, J., Le Goff, G., Pantaleo, G., and Du Pasquier, R.A. (2008). Strong EBV-specific CD8+ T-cell response in patients with early multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 131, 1712-1721.
324. Jilek, S., Schlupe, M., Harari, A., Canales, M., Lysandropoulos, A., Zekeridou, A., Pantaleo, G., and Du Pasquier, R.A. (2012). HLA-B7-restricted EBV-specific CD8+ T cells are dysregulated in multiple sclerosis. *Journal of immunology* 188, 4671-4680.
325. Gronen, F., Ruprecht, K., Weissbrich, B., Klinker, E., Kroner, A., Hofstetter, H.H., and Rieckmann, P. (2006). Frequency analysis of HLA-B7-restricted

- Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with multiple sclerosis and healthy controls. *Journal of neuroimmunology* 180, 185-192.
326. Angelini, D.F., Serafini, B., Piras, E., Severa, M., Coccia, E.M., Rosicarelli, B., Ruggieri, S., Gasperini, C., Buttari, F., Centonze, D., et al. (2013). Increased CD8+ T cell response to Epstein-Barr virus lytic antigens in the active phase of multiple sclerosis. *PLoS pathogens* 9, e1003220.
 327. Cepok, S., Zhou, D., Srivastava, R., Nessler, S., Stei, S., Bussow, K., Sommer, N., and Hemmer, B. (2005). Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* 115, 1352-1360.
 328. Lindsey, J.W., and Hatfield, L.M. (2010). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: cellular immune response and cross-reactivity. *Journal of neuroimmunology* 229, 238-242.
 329. Pender, M.P., Csurhes, P.A., Lenarczyk, A., Pfluger, C.M., and Burrows, S.R. (2009). Decreased T cell reactivity to Epstein-Barr virus infected lymphoblastoid cell lines in multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 80, 498-505.
 330. Lunemann, J.D., Jelcic, I., Roberts, S., Lutterotti, A., Tackenberg, B., Martin, R., and Munz, C. (2008). EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *The Journal of experimental medicine* 205, 1763-1773.
 331. Dooley, M.M., de Gannes, S.L., Fu, K.A., and Lindsey, J.W. (2016). The increased antibody response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis is restricted to selected virus proteins. *Journal of neuroimmunology* 299, 147-151.
 332. Willis, S.N., Stadelmann, C., Rodig, S.J., Caron, T., Gattenloehner, S., Mallozzi, S.S., Roughan, J.E., Almendinger, S.E., Blewett, M.M., Bruck, W., et al. (2009). Epstein-Barr virus infection is not a characteristic feature of multiple sclerosis brain. *Brain : a journal of neurology* 132, 3318-3328.
 333. Peferoen, L.A., Lamers, F., Lodder, L.N., Gerritsen, W.H., Huitinga, I., Melief, J., Giovannoni, G., Meier, U., Hintzen, R.Q., Verjans, G.M., et al. (2010). Epstein Barr virus is not a characteristic feature in the central nervous system in established multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 133, e137.
 334. Tzartos, J.S., Khan, G., Vossenkamper, A., Cruz-Sadaba, M., Lonardi, S., Sefia, E., Meager, A., Elia, A., Middeldorp, J.M., Clemens, M., et al. (2012). Association of innate immune activation with latent Epstein-Barr virus in active MS lesions. *Neurology* 78, 15-23.
 335. Serafini, B., Severa, M., Columba-Cabezas, S., Rosicarelli, B., Veroni, C., Chiappetta, G., Magliozzi, R., Reynolds, R., Coccia, E.M., and Aloisi, F. (2010). Epstein-Barr virus latent infection and BAFF expression in B cells in the multiple sclerosis brain: implications for viral persistence and intrathecal B-cell activation. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 69, 677-693.

336. Sargsyan, S.A., Shearer, A.J., Ritchie, A.M., Burgoon, M.P., Anderson, S., Hemmer, B., Stadelmann, C., Gattenlohner, S., Owens, G.P., Gilden, D., et al. (2010). Absence of Epstein-Barr virus in the brain and CSF of patients with multiple sclerosis. *Neurology* 74, 1127-1135.
337. Serafini, B., Rosicarelli, B., Franciotta, D., Magliozzi, R., Reynolds, R., Cinque, P., Andreoni, L., Trivedi, P., Salvetti, M., Faggioni, A., et al. (2007). Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *The Journal of experimental medicine* 204, 2899-2912.
338. Cocuzza, C.E., Piazza, F., Musumeci, R., Oggioni, D., Andreoni, S., Gardinetti, M., Fusco, L., Frigo, M., Banfi, P., Rottoli, M.R., et al. (2014). Quantitative detection of Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid and blood samples of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *PLoS one* 9, e94497.
339. Mancuso, R., Hernis, A., Cavarretta, R., Caputo, D., Calabrese, E., Nemni, R., Ferrante, P., Delbue, S., and Clerici, M. (2010). Detection of viral DNA sequences in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Journal of medical virology* 82, 1051-1057.
340. van Nierop, G.P., Mautner, J., Mitterreiter, J.G., Hintzen, R.Q., and Verjans, G.M. (2016). Intrathecal CD8 T-cells of multiple sclerosis patients recognize lytic Epstein-Barr virus proteins. *Multiple sclerosis* 22, 279-291.
341. Otto, C., Oltmann, A., Stein, A., Frenzel, K., Schroeter, J., Habbel, P., Gartner, B., Hofmann, J., and Ruprecht, K. (2011). Intrathecal EBV antibodies are part of the polyspecific immune response in multiple sclerosis. *Neurology* 76, 1316-1321.
342. Franciotta, D., Di Stefano, A.L., Jarius, S., Zardini, E., Tavazzi, E., Ballerini, C., Marchioni, E., Bergamaschi, R., and Ceroni, M. (2011). Cerebrospinal BAFF and Epstein-Barr virus-specific oligoclonal bands in multiple sclerosis and other inflammatory demyelinating neurological diseases. *Journal of neuroimmunology* 230, 160-163.
343. Wucherpfennig, K.W., and Strominger, J.L. (1995). Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80, 695-705.
344. Holmoy, T., Kvale, E.O., and Vartdal, F. (2004). Cerebrospinal fluid CD4+ T cells from a multiple sclerosis patient cross-recognize Epstein-Barr virus and myelin basic protein. *Journal of neurovirology* 10, 278-283.
345. Lunemann, J.D., Edwards, N., Muraro, P.A., Hayashi, S., Cohen, J.I., Munz, C., and Martin, R. (2006). Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 129, 1493-1506.
346. Mameli, G., Cossu, D., Cocco, E., Masala, S., Frau, J., Marrosu, M.G., and Sechi, L.A. (2014). Epstein-Barr virus and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis peptides are cross recognized by anti-myelin basic protein

- antibodies in multiple sclerosis patients. *Journal of neuroimmunology* 270, 51-55.
347. Mameli, G., Madeddu, G., Cossu, D., Galleri, G., Manetti, R., Babudieri, S., Mura, M.S., and Sechi, L.A. (2016). Immune response induced by Epstein-Barr virus and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* peptides in current and past infectious mononucleosis: a risk for multiple sclerosis? *European journal of neurology* 23, 140-147.
348. Tengvall, K., Huang, J., Hellstrom, C., Kammer, P., Bistrom, M., Ayoglu, B., Lima Bomfim, I., Stridh, P., Butt, J., Brenner, N., et al. (2019). Molecular mimicry between Anoctamin 2 and Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 associates with multiple sclerosis risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116, 16955-16960.
349. Siapka, S., Patrino-Georgoula, M., Vlachoyiannopoulos, P.G., and Guialis, A. (2007). Multiple specificities of autoantibodies against hnRNP A/B proteins in systemic rheumatic diseases and hnRNP L as an associated novel autoantigen. *Autoimmunity* 40, 223-233.
350. Masuda, T., Iwamoto, S., Yoshinaga, R., Tozaki-Saitoh, H., Nishiyama, A., Mak, T.W., Tamura, T., Tsuda, M., and Inoue, K. (2014). Transcription factor IRF5 drives P2X4R+ reactive microglia gating neuropathic pain. *Nature communications* 5, 3771.
351. Vandebroek, K., Alloza, I., Swaminathan, B., Antiguada, A., Otaegui, D., Olascoaga, J., Barcina, M.G., de las Heras, V., Bartolome, M., Fernandez-Arquero, M., et al. (2011). Validation of IRF5 as multiple sclerosis risk gene: putative role in interferon beta therapy and human herpes virus-6 infection. *Genes and immunity* 12, 40-45.
352. Algood, H.M., and Cover, T.L. (2006). *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. *Clinical microbiology reviews* 19, 597-613.
353. Atherton, J.C. (2006). The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases. *Annual review of pathology* 1, 63-96.
354. Axon, A.T. (1996). The transmission of *Helicobacter pylori*: which theory fits the facts? *European journal of gastroenterology & hepatology* 8, 1-2.
355. Michel, A., Pawlita, M., Boeing, H., Gissmann, L., and Waterboer, T. (2014). *Helicobacter pylori* antibody patterns in Germany: a cross-sectional population study. *Gut pathogens* 6, 10.
356. Marshall, B.J., and Warren, J.R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1, 1311-1315.
357. Marshall, B.J., Armstrong, J.A., McGeachie, D.B., and Glancy, R.J. (1985). Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *The Medical journal of Australia* 142, 436-439.

358. Waldum, H.L., Kleveland, P.M., and Sordal, O.F. (2016). Helicobacter pylori and gastric acid: an intimate and reciprocal relationship. *Therapeutic advances in gastroenterology* 9, 836-844.
359. Muotiala, A., Helander, I.M., Pyhala, L., Kosunen, T.U., and Moran, A.P. (1992). Low biological activity of Helicobacter pylori lipopolysaccharide. *Infection and immunity* 60, 1714-1716.
360. Jonsson, K., Guo, B.P., Monstein, H.J., Mekalanos, J.J., and Kronvall, G. (2004). Molecular cloning and characterization of two Helicobacter pylori genes coding for plasminogen-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 1852-1857.
361. Smyk, D.S., Koutsoumpas, A.L., Mytilinaiou, M.G., Rigopoulou, E.I., Sakkas, L.I., and Bogdanos, D.P. (2014). Helicobacter pylori and autoimmune disease: cause or bystander. *World journal of gastroenterology* 20, 613-629.
362. Amedei, A., Bergman, M.P., Appelmelk, B.J., Azzurri, A., Benagiano, M., Tamburini, C., van der Zee, R., Telford, J.L., Vandenbroucke-Grauls, C.M., D'Elia, M.M., et al. (2003). Molecular mimicry between Helicobacter pylori antigens and H⁺, K⁺ -adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 198, 1147-1156.
363. Jaruvongvanich, V., Sanguankeo, A., Jaruvongvanich, S., and Upala, S. (2016). Association between Helicobacter pylori infection and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Multiple sclerosis and related disorders* 7, 92-97.
364. Pedrini, M.J., Seewann, A., Bennett, K.A., Wood, A.J., James, I., Burton, J., Marshall, B.J., Carroll, W.M., and Kermodé, A.G. (2015). Helicobacter pylori infection as a protective factor against multiple sclerosis risk in females. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 86, 603-607.
365. Mohebi, N., Mamarabadi, M., and Moghaddasi, M. (2013). Relation of helicobacter pylori infection and multiple sclerosis in Iranian patients. *Neurology international* 5, 31-33.
366. Malli, C., Pandit, L., D'Cunha, A., and Mustafa, S. (2015). Environmental factors related to multiple sclerosis in Indian population. *PloS one* 10, e0124064.
367. Long, Y., Gao, C., Qiu, W., Hu, X., Shu, Y., Peng, F., and Lu, Z. (2013). Helicobacter pylori infection in Neuromyelitis Optica and Multiple Sclerosis. *Neuroimmunomodulation* 20, 107-112.
368. Li, W., Minohara, M., Piao, H., Matsushita, T., Masaki, K., Matsuoka, T., Isobe, N., Su, J.J., Ohayagi, Y., and Kira, J. (2009). Association of anti-Helicobacter pylori neutrophil-activating protein antibody response with anti-aquaporin-4 autoimmunity in Japanese patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Multiple sclerosis* 15, 1411-1421.
369. Gavalas, E., Kountouras, J., Boziki, M., Zavos, C., Polyzos, S.A., Vlachaki, E., Venizelos, I., Tsiftis, D., and Deretzi, G. (2015). Relationship between

- Helicobacter pylori* infection and multiple sclerosis. *Annals of gastroenterology* 28, 353-356.
370. Yao, G., Wang, P., Luo, X.D., Yu, T.M., Harris, R.A., and Zhang, X.M. (2016). Meta-analysis of association between *Helicobacter pylori* infection and multiple sclerosis. *Neuroscience letters* 620, 1-7.
371. Li, W., Minohara, M., Su, J.J., Matsuoka, T., Osoegawa, M., Ishizu, T., and Kira, J. (2007). *Helicobacter pylori* infection is a potential protective factor against conventional multiple sclerosis in the Japanese population. *J Neuroimmunol* 184, 227-231.
372. Cook, K.W., Crooks, J., Hussain, K., O'Brien, K., Braitch, M., Kareem, H., Constantinescu, C.S., Robinson, K., and Gran, B. (2015). *Helicobacter pylori* infection reduces disease severity in an experimental model of multiple sclerosis. *Frontiers in microbiology* 6, 52.
373. Yoshimura, S., Isobe, N., Matsushita, T., Masaki, K., Sato, S., Kawano, Y., Ochi, H., and Kira, J. (2014). Genetic and infectious profiles influence cerebrospinal fluid IgG abnormality in Japanese multiple sclerosis patients. *PLoS one* 9, e95367.
374. Ranjbar, R., Karampoor, S., and Jalilian, F.A. (2019). The protective effect of *Helicobacter Pylori* infection on the susceptibility of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 337, 577069.
375. Cook, K.W., Letley, D.P., Ingram, R.J., Staples, E., Skjoldmose, H., Atherton, J.C., and Robinson, K. (2014). CCL20/CCR6-mediated migration of regulatory T cells to the *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Gut* 63, 1550-1559.
376. Robinson, K. (2015). *Helicobacter pylori*-Mediated Protection against Extra-Gastric Immune and Inflammatory Disorders: The Evidence and Controversies. *Diseases* 3, 34-55.
377. Kountouras, J., Papaefthymiou, A., Gavalas, E., Polyzos, S.A., Boziki, M., Kyriakou, P., Katsinelos, P., Zavos, C., Liatsos, C., Tzivras, D., et al. (2020). *Helicobacter pylori* infection as a potential risk factor for multiple sclerosis. *Medical hypotheses* 143, 110135.
378. Kountouras, J., Zavos, C., Polyzos, S.A., Michael, S., Tsiaousi, E., Vardaka, E., Katsinelos, P., Kouklakis, G., Paikos, D., Gavalas, E., et al. (2013). Relationship between *Helicobacter pylori* infection and autoimmune disorders. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 51, e73-74.
379. Kountouras, J., Gavalas, E., Deretzi, G., Boziki, M., Zavos, C., Chatzopoulos, D., Katsinelos, P., Giartza-Taxidou, E., Grigoriadis, N., and Venizelos, I. (2010). *Helicobacter pylori* with or without its neutrophil-activating protein may be the common denominator associated with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Mult Scler* 16, 376-377; author reply 378-379.

380. Kountouras, J., Zavos, C., Gavalas, E., Deretzi, G., Katsinelos, P., Boura, P., Polyzos, S.A., and Venizelos, I. (2011). *Helicobacter pylori* may be a common denominator associated with systemic and multiple sclerosis. *Joint bone spine* 78, 222-223; author reply 223.
381. Kountouras, J., Zavos, C., Gavalas, E., Boziki, M., and Katsinelos, P. (2008). *Helicobacter pylori* may hold a variable role in multiple sclerosis based on ethnicity. *Medical hypotheses* 71, 614-615.
382. Gavalas, E., Kountouras, J., Deretzi, G., Boziki, M., Grigoriadis, N., Zavos, C., and Venizelos, I. (2007). *Helicobacter pylori* and multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 188, 187-189; author reply 190.
383. Deretzi, G., Gavalas, E., Boziki, M., Tsiptsios, D., Polyzos, S.A., Venizelos, I., Zavos, C., Koutlas, E., Tsiptsios, I., Katsinelos, P., et al. (2016). Impact of *Helicobacter pylori* on multiple sclerosis-related clinically isolated syndrome. *Acta neurologica Scandinavica* 133, 268-275.
384. Desbois, A.C., and Cacoub, P. (2016). Systemic sclerosis: An update in 2016. *Autoimmunity reviews* 15, 417-426.
385. Sakkas, L.I., Chikanza, I.C., and Platsoucas, C.D. (2006). Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nature clinical practice. Rheumatology* 2, 679-685.
386. Rodnan, G.P., and Benedek, T.G. (1962). An historical account of the study of progressive systemic sclerosis (diffuse scleroderma). *Annals of internal medicine* 57, 305-319.
387. Mayes, M.D., Lacey, J.V., Jr., Beebe-Dimmer, J., Gillespie, B.W., Cooper, B., Laing, T.J., and Schottenfeld, D. (2003). Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis and rheumatism* 48, 2246-2255.
388. Kuo, C.F., See, L.C., Yu, K.H., Chou, I.J., Tseng, W.Y., Chang, H.C., Shen, Y.M., and Luo, S.F. (2011). Epidemiology and mortality of systemic sclerosis: a nationwide population study in Taiwan. *Scandinavian journal of rheumatology* 40, 373-378.
389. Tamaki, T., Mori, S., and Takehara, K. (1991). Epidemiological study of patients with systemic sclerosis in Tokyo. *Archives of dermatological research* 283, 366-371.
390. Barnes, J., and Mayes, M.D. (2012). Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Current opinion in rheumatology* 24, 165-170.
391. Nietert, P.J., Mitchell, H.C., Bolster, M.B., Shaftman, S.R., Tilley, B.C., and Silver, R.M. (2006). Racial variation in clinical and immunological manifestations of systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology* 33, 263-268.

392. Arnett, F.C., Howard, R.F., Tan, F., Moulds, J.M., Bias, W.B., Durban, E., Cameron, H.D., Paxton, G., Hodge, T.J., Weathers, P.E., et al. (1996). Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype. *Arthritis and rheumatism* 39, 1362-1370.
393. Tyndall, A.J., Bannert, B., Vonk, M., Airo, P., Cozzi, F., Carreira, P.E., Bancel, D.F., Allanore, Y., Muller-Ladner, U., Distler, O., et al. (2010). Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Annals of the rheumatic diseases* 69, 1809-1815.
394. Silver, R.M., Bogatkevich, G., Tourkina, E., Nietert, P.J., and Hoffman, S. (2012). Racial differences between blacks and whites with systemic sclerosis. *Current opinion in rheumatology* 24, 642-648.
395. Man, A., Zhu, Y., Zhang, Y., Dubreuil, M., Rho, Y.H., Peloquin, C., Simms, R.W., and Choi, H.K. (2013). The risk of cardiovascular disease in systemic sclerosis: a population-based cohort study. *Annals of the rheumatic diseases* 72, 1188-1193.
396. van den Hoogen, F., Khanna, D., Fransen, J., Johnson, S.R., Baron, M., Tyndall, A., Matucci-Cerinic, M., Naden, R.P., Medsger, T.A., Jr., Carreira, P.E., et al. (2013). 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and rheumatism* 65, 2737-2747.
397. Wigley, F.M., and Boin, F. (2017). Chapter 84 - Clinical Features and Treatment of Scleroderma. In *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology (Tenth Edition)*, G.S. Firestein, R.C. Budd, S.E. Gabriel, I.B. McInnes and J.R. O'Dell, eds. (Elsevier), pp. 1424-1460.e1425.
398. Wollheim, F.A. (2005). Classification of systemic sclerosis. *Visions and reality. Rheumatology* 44, 1212-1216.
399. Dieude, P., Boileau, C., and Allanore, Y. (2011). Immunogenetics of systemic sclerosis. *Autoimmunity reviews* 10, 282-290.
400. Frech, T., Khanna, D., Markewitz, B., Mineau, G., Pimentel, R., and Sawitzke, A. (2010). Heritability of vasculopathy, autoimmune disease, and fibrosis in systemic sclerosis: a population-based study. *Arthritis and rheumatism* 62, 2109-2116.
401. Feghali-Bostwick, C., Medsger, T.A., Jr., and Wright, T.M. (2003). Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis and rheumatism* 48, 1956-1963.
402. Arnett, F.C., Gourh, P., Shete, S., Ahn, C.W., Honey, R.E., Agarwal, S.K., Tan, F.K., McNearney, T., Fischbach, M., Fritzler, M.J., et al. (2010). Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300

- Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Annals of the rheumatic diseases* 69, 822-827.
403. Gourh, P., Tan, F.K., Assassi, S., Ahn, C.W., McNearney, T.A., Fischbach, M., Arnett, F.C., and Mayes, M.D. (2006). Association of the PTPN22 R620W polymorphism with anti-topoisomerase I- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism* 54, 3945-3953.
404. Radstake, T.R., Gorlova, O., Rueda, B., Martin, J.E., Alizadeh, B.Z., Palomino-Morales, R., Coenen, M.J., Vonk, M.C., Voskuyl, A.E., Schuerwegh, A.J., et al. (2010). Genome-wide association study of systemic sclerosis identifies CD247 as a new susceptibility locus. *Nature genetics* 42, 426-429.
405. Dieude, P., Guedj, M., Wipff, J., Ruiz, B., Riemekasten, G., Airo, P., Melchers, I., Hachulla, E., Cerinic, M.M., Diot, E., et al. (2011). NLRP1 influences the systemic sclerosis phenotype: a new clue for the contribution of innate immunity in systemic sclerosis-related fibrosing alveolitis pathogenesis. *Annals of the rheumatic diseases* 70, 668-674.
406. Altorok, N., Tsou, P.S., Coit, P., Khanna, D., and Sawalha, A.H. (2015). Genome-wide DNA methylation analysis in dermal fibroblasts from patients with diffuse and limited systemic sclerosis reveals common and subset-specific DNA methylation aberrancies. *Annals of the rheumatic diseases* 74, 1612-1620.
407. Noda, S., Asano, Y., Nishimura, S., Taniguchi, T., Fujii, K., Manabe, I., Nakamura, K., Yamashita, T., Saigusa, R., Akamata, K., et al. (2014). Simultaneous downregulation of KLF5 and Fli1 is a key feature underlying systemic sclerosis. *Nature communications* 5, 5797.
408. Shin, J.Y., Beckett, J.D., Bagirzadeh, R., Creamer, T.J., Shah, A.A., McMahan, Z., Paik, J.J., Sampedro, M.M., MacFarlane, E.G., Beer, M.A., et al. (2019). Epigenetic activation and memory at a TGFB2 enhancer in systemic sclerosis. *Science translational medicine* 11.
409. Grossman, C., Dovrish, Z., Shoenfeld, Y., and Amital, H. (2011). Do infections facilitate the emergence of systemic sclerosis? *Autoimmunity reviews* 10, 244-247.
410. Hertzman, P.A., Blevins, W.L., Mayer, J., Greenfield, B., Ting, M., and Gleich, G.J. (1990). Association of the eosinophilia-myalgia syndrome with the ingestion of tryptophan. *The New England journal of medicine* 322, 869-873.
411. Tabuenca, J.M. (1981). Toxic-allergic syndrome caused by ingestion of rapeseed oil denatured with aniline. *Lancet* 2, 567-568.
412. McCormic, Z.D., Khuder, S.S., Aryal, B.K., Ames, A.L., and Khuder, S.A. (2010). Occupational silica exposure as a risk factor for scleroderma: a meta-analysis. *International archives of occupational and environmental health* 83, 763-769.
413. Varga, J. (2017). Chapter 83 - Etiology and Pathogenesis of Scleroderma. In Kelley and Firestein's *Textbook of Rheumatology* (Tenth Edition), G.S.

- Firestein, R.C. Budd, S.E. Gabriel, I.B. McInnes and J.R. O'Dell, eds. (Elsevier), pp. 1400-1423.e1403.
414. Varga, J., and Abraham, D. (2007). Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *The Journal of clinical investigation* 117, 557-567.
 415. Boin, F., and Rosen, A. (2007). Autoimmunity in systemic sclerosis: current concepts. *Current rheumatology reports* 9, 165-172.
 416. Sakkas, L.I., and Platsoucas, C.D. (2004). Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis and rheumatism* 50, 1721-1733.
 417. Liaskos, C., Marou, E., Simopoulou, T., Gkoutzourelas, A., Barmakoudi, M., Efthymiou, G., Scheper, T., Meyer, W., Katsiari, C.G., Bogdanos, D.P., et al. (2018). Multiparametric autoantibody profiling of patients with systemic sclerosis in Greece. *Mediterranean journal of rheumatology* 29, 120-126.
 418. Liaskos, C., Marou, E., Simopoulou, T., Barmakoudi, M., Efthymiou, G., Scheper, T., Meyer, W., Bogdanos, D.P., and Sakkas, L.I. (2017). Disease-related autoantibody profile in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity* 50, 414-421.
 419. Roumm, A.D., Whiteside, T.L., Medsger, T.A., Jr., and Rodnan, G.P. (1984). Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis and rheumatism* 27, 645-653.
 420. Kalogerou, A., Gelou, E., Mountantonakis, S., Settas, L., Zafiriou, E., and Sakkas, L. (2005). Early T cell activation in the skin from patients with systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases* 64, 1233-1235.
 421. Sakkas, L.I., Xu, B., Artlett, C.M., Lu, S., Jimenez, S.A., and Platsoucas, C.D. (2002). Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *Journal of immunology* 168, 3649-3659.
 422. Mavalia, C., Scaletti, C., Romagnani, P., Carossino, A.M., Pignone, A., Emmi, L., Pupilli, C., Pizzolo, G., Maggi, E., and Romagnani, S. (1997). Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. *The American journal of pathology* 151, 1751-1758.
 423. Lafyatis, R. (2014). Transforming growth factor beta--at the centre of systemic sclerosis. *Nature reviews. Rheumatology* 10, 706-719.
 424. Nishijima, C., Hayakawa, I., Matsushita, T., Komura, K., Hasegawa, M., Takehara, K., and Sato, S. (2004). Autoantibody against matrix metalloproteinase-3 in patients with systemic sclerosis. *Clinical and experimental immunology* 138, 357-363.
 425. Baroni, S.S., Santillo, M., Bevilacqua, F., Luchetti, M., Spadoni, T., Mancini, M., Fraticelli, P., Sambo, P., Funaro, A., Kazlauskas, A., et al. (2006). Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *The New England journal of medicine* 354, 2667-2676.

426. Fineschi, S., Goffin, L., Rezzonico, R., Cozzi, F., Dayer, J.M., Meroni, P.L., and Chizzolini, C. (2008). Antifibroblast antibodies in systemic sclerosis induce fibroblasts to produce profibrotic chemokines, with partial exploitation of toll-like receptor 4. *Arthritis and rheumatism* 58, 3913-3923.
427. Bordron, A., Dueymes, M., Levy, Y., Jamin, C., Leroy, J.P., Piette, J.C., Shoenfeld, Y., and Youinou, P.Y. (1998). The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *The Journal of clinical investigation* 101, 2029-2035.
428. Wolf, S.I., Howat, S., Abraham, D.J., Pearson, J.D., and Lawson, C. (2013). Agonistic anti-ICAM-1 antibodies in scleroderma: activation of endothelial pro-inflammatory cascades. *Vascular pharmacology* 59, 19-26.
429. Kill, A., Tabeling, C., Undeutsch, R., Kuhl, A.A., Gunther, J., Radic, M., Becker, M.O., Heidecke, H., Worm, M., Witzernath, M., et al. (2014). Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis. *Arthritis research & therapy* 16, R29.
430. Mavropoulos, A., Simopoulou, T., Varna, A., Liaskos, C., Katsiari, C.G., Bogdanos, D.P., and Sakkas, L.I. (2016). Breg Cells Are Numerically Decreased and Functionally Impaired in Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis & rheumatology* 68, 494-504.
431. Maddur, M.S., Sharma, M., Hegde, P., Stephen-Victor, E., Pulendran, B., Kaveri, S.V., and Bayry, J. (2014). Human B cells induce dendritic cell maturation and favour Th2 polarization by inducing OX-40 ligand. *Nature communications* 5, 4092.
432. Matucci-Cerinic, M., Kahaleh, B., and Wigley, F.M. (2013). Review: evidence that systemic sclerosis is a vascular disease. *Arthritis and rheumatism* 65, 1953-1962.
433. Cipriani, P., Di Benedetto, P., Ruscitti, P., Capece, D., Zazzeroni, F., Liakouli, V., Pantano, I., Berardicurti, O., Carubbi, F., Pecetti, G., et al. (2015). The Endothelial-mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis Is Induced by Endothelin-1 and Transforming Growth Factor-beta and May Be Blocked by Macitentan, a Dual Endothelin-1 Receptor Antagonist. *The Journal of rheumatology* 42, 1808-1816.
434. Beyer, C., Schett, G., Gay, S., Distler, O., and Distler, J.H. (2009). Hypoxia. Hypoxia in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis research & therapy* 11, 220.
435. Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A.S., The, T.H., and Jahn, G. (1995). Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *The Journal of general virology* 76 (Pt 4), 741-750.

436. Ferri, C., Cazzato, M., Giuggioli, D., Sebastiani, M., and Magro, C. (2002). Systemic sclerosis following human cytomegalovirus infection. *Annals of the rheumatic diseases* *61*, 937-938.
437. Arcangeletti, M.C., D'Accolti, M., Maccari, C., Soffritti, I., Conto, F., Chezzi, C., Calderaro, A., Ferri, C., and Caselli, E. (2020). Impact of Human Cytomegalovirus and Human Herpesvirus 6 Infection on the Expression of Factors Associated with Cell Fibrosis and Apoptosis: Clues for Implication in Systemic Sclerosis Development. *International journal of molecular sciences* *21*.
438. Marou, E., Liaskos, C., Efthymiou, G., Dardiotis, E., Daponte, A., Scheper, T., Meyer, W., Hadjigeorgiou, G., Bogdanos, D.P., and Sakkas, L.I. (2017). Increased immunoreactivity against human cytomegalovirus UL83 in systemic sclerosis. *Clinical and experimental rheumatology* *35 Suppl 106*, 31-34.
439. Arnson, Y., Amital, H., Guiducci, S., Matucci-Cerinic, M., Valentini, G., Barzilai, O., Maya, R., and Shoenfeld, Y. (2009). The role of infections in the immunopathogenesis of systemic sclerosis--evidence from serological studies. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1173*, 627-632.
440. Muryoi, T., Kasturi, K.N., Kafina, M.J., Cram, D.S., Harrison, L.C., Sasaki, T., and Bona, C.A. (1992). Antitopoisomerase I monoclonal autoantibodies from scleroderma patients and tight skin mouse interact with similar epitopes. *The Journal of experimental medicine* *175*, 1103-1109.
441. Farina, A., Peruzzi, G., Lacconi, V., Lenna, S., Quarta, S., Rosato, E., Vestri, A.R., York, M., Dreyfus, D.H., Faggioni, A., et al. (2017). Epstein-Barr virus lytic infection promotes activation of Toll-like receptor 8 innate immune response in systemic sclerosis monocytes. *Arthritis research & therapy* *19*, 39.
442. Farina, A., Cirone, M., York, M., Lenna, S., Padilla, C., McLaughlin, S., Faggioni, A., Lafyatis, R., Trojanowska, M., and Farina, G.A. (2014). Epstein-Barr virus infection induces aberrant TLR activation pathway and fibroblast-myofibroblast conversion in scleroderma. *The Journal of investigative dermatology* *134*, 954-964.
443. Tsukamoto, K., Hayakawa, H., Sato, A., Chida, K., Nakamura, H., and Miura, K. (2000). Involvement of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 in disease progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* *55*, 958-961.
444. Fattal, I., Shental, N., Molad, Y., Gabrielli, A., Pokroy-Shapira, E., Oren, S., Livneh, A., Langevitz, P., Pauzner, R., Sarig, O., et al. (2014). Epstein-Barr virus antibodies mark systemic lupus erythematosus and scleroderma patients negative for anti-DNA. *Immunology* *141*, 276-285.
445. Sternbaek, L., Draborg, A.H., Osterlund, M.T., Iversen, L.V., Troelsen, L., Theander, E., Nielsen, C.T., Jacobsen, S., and Houen, G. (2019). Increased antibody levels to stage-specific Epstein-Barr virus antigens in systemic autoimmune diseases reveal a common pathology. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* *79*, 7-16.

446. Yazawa, N., Fujimoto, M., Kikuchi, K., Kubo, M., Ihn, H., Sato, S., Tamaki, T., and Tamaki, K. (1998). High seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with systemic sclerosis: association with esophageal involvement. *The Journal of rheumatology* 25, 650-653.
447. Vardar, R., Vardar, E., and Bor, S. (2010). Is the prevalence of intestinal metaplasia at the squamocolumnar junction different in patients with progressive systemic sclerosis? *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology* 21, 251-256.
448. Sulli, A., Seriola, B., Savarino, V., and Cutolo, M. (2000). Lack of correlation between gastric *Helicobacter pylori* infection and primary or secondary Raynaud's phenomenon in patients with systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology* 27, 1820-1821.
449. Ram, M., Barzilai, O., Shapira, Y., Anaya, J.M., Tincani, A., Stojanovich, L., Bombardieri, S., Bizzaro, N., Kivity, S., Agmon Levin, N., et al. (2013). *Helicobacter pylori* serology in autoimmune diseases - fact or fiction? *Clinical chemistry and laboratory medicine* 51, 1075-1082.
450. Kalabay, L., Fekete, B., Czirjak, L., Horvath, L., Daha, M.R., Veres, A., Fonyad, G., Horvath, A., Viczian, A., Singh, M., et al. (2002). *Helicobacter pylori* infection in connective tissue disorders is associated with high levels of antibodies to mycobacterial hsp65 but not to human hsp60. *Helicobacter* 7, 250-256.
451. Danese, S., Zoli, A., Cremonini, F., and Gasbarrini, A. (2000). High prevalence of *Helicobacter pylori* type I virulent strains in patients with systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology* 27, 1568-1569.
452. Bilgin, H., Kocabas, H., and Kesli, R. (2015). The prevalence of infectious agents in patients with systemic sclerosis. *Turkish journal of medical sciences* 45, 1192-1197.
453. Balaji, C., Bhuvanesh, M., Saranya, C., Ramesh, R., Saravanan, M., and Rajeswari, S. (2017). *Helicobacter Pylori* infection in systemic sclerosis and its association with upper gastrointestinal dysfunction. *Indian Journal of Rheumatology* 12, 204-208.
454. Yong, W.C., Upala, S., and Sanguankeo, A. (2018). *Helicobacter pylori* infection in systemic sclerosis: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Clinical and experimental rheumatology* 36 Suppl 113, 168-174.
455. Showji, Y., Nozawa, R., Sato, K., and Suzuki, H. (1996). Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with connective tissue diseases. *Microbiology and immunology* 40, 499-503.
456. Gasbarrini, A., Massari, I., Serricchio, M., Tondi, P., De Luca, A., Franceschi, F., Ojetti, V., Dal Lago, A., Flore, R., Santoliquido, A., et al. (1998). *Helicobacter pylori* eradication ameliorates primary Raynaud's phenomenon. *Digestive diseases and sciences* 43, 1641-1645.

457. Csiki, Z., Gal, I., Sebesi, J., and Szegedi, G. (2000). [Raynaud syndrome and eradication of *Helicobacter pylori*]. *Orvosi hetilap* 141, 2827-2829.
458. Savarino, V., Sulli, A., Zentilin, P., Raffaella Mele, M., and Cutolo, M. (2000). No evidence of an association between *Helicobacter pylori* infection and Raynaud phenomenon. *Scandinavian journal of gastroenterology* 35, 1251-1254.
459. Herve, F., Cailleux, N., Benhamou, Y., Ducrotte, P., Lemeland, J.F., Denis, P., Marie, I., and Levesque, H. (2006). [*Helicobacter pylori* prevalence in Raynaud's disease]. *La Revue de medecine interne* 27, 736-741.
460. Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., et al. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology* 69, 292-302.
461. Lorscheider, J., Buzzard, K., Jokubaitis, V., Spelman, T., Havrdova, E., Horakova, D., Trojano, M., Izquierdo, G., Girard, M., Duquette, P., et al. (2016). Defining secondary progressive multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 139, 2395-2405.
462. Heberle, H., Meirelles, G.V., da Silva, F.R., Telles, G.P., and Minghim, R. (2015). InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC bioinformatics* 16, 169.
463. Algood, H.M., Gallo-Romero, J., Wilson, K.T., Peek, R.M., Jr., and Cover, T.L. (2007). Host response to *Helicobacter pylori* infection before initiation of the adaptive immune response. *FEMS immunology and medical microbiology* 51, 577-586.
464. Caruso, R., Pallone, F., and Monteleone, G. (2007). Emerging role of IL-23/IL-17 axis in *H pylori*-associated pathology. *World journal of gastroenterology* 13, 5547-5551.
465. Zanotti, G., Papinutto, E., Dundon, W., Battistutta, R., Seveso, M., Giudice, G., Rappuoli, R., and Montecucco, C. (2002). Structure of the neutrophil-activating protein from *Helicobacter pylori*. *Journal of molecular biology* 323, 125-130.
466. Filipec Kanizaj, T., Katicic, M., Presecki, V., Gasparov, S., Colic Cvrnje, V., Kolaric, B., and Mrzljak, A. (2009). Serum antibodies positivity to 12 *Helicobacter pylori* virulence antigens in patients with benign or malignant gastroduodenal diseases--cross-sectional study. *Croatian medical journal* 50, 124-132.
467. Reynders, M.B., Miendje Deyi, V.Y., Dahma, H., Scheper, T., Hanke, M., Decolvenaer, M., and Dediste, A. (2012). Performance of individual *Helicobacter pylori* antigens in the immunoblot-based detection of *H. pylori* infection. *FEMS immunology and medical microbiology* 64, 352-363.
468. Efthymiou, G., Dardiotis, E., Liaskos, C., Marou, E., Tsimourtou, V., Scheper, T., Meyer, W., Daponte, A., Sakkas, L.I., Hadjigeorgiou, G., et al. (2016). Anti-

- hsp60 antibody responses based on *Helicobacter pylori* in patients with multiple sclerosis: (ir)Relevance to disease pathogenesis. *Journal of neuroimmunology* 298, 19-23.
469. Sezikli, M., Guliter, S., Apan, T.Z., Aksoy, A., Keles, H., and Ozkurt, Z.N. (2006). Frequencies of serum antibodies to *Helicobacter pylori* CagA and VacA in a Turkish population with various gastroduodenal diseases. *International journal of clinical practice* 60, 1239-1243.
470. Us, D., Engin, D., and Hascelik, G. (2002). [Evaluation of western blot methods for serologic diagnosis of *Helicobacter pylori* infections]. *Mikrobiyoloji bulteni* 36, 153-160.
471. Necchi, V., Sommi, P., Vanoli, A., Fiocca, R., Ricci, V., and Solcia, E. (2017). Natural history of *Helicobacter pylori* VacA toxin in human gastric epithelium in vivo: vacuoles and beyond. *Scientific reports* 7, 14526.
472. Chiba, S., Sugiyama, T., Yonekura, K., Tanaka, S., Matsumoto, H., Fujii, N., Ebisu, S., and Sekiguchi, K. (2002). An antibody to VacA of *Helicobacter pylori* in cerebrospinal fluid from patients with Guillain-Barre syndrome. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 73, 76-78.
473. Chiba, S., Sugiyama, T., Yonekura, K., Tanaka, S., Matsumoto, H., Fujii, N., Yokota, S., and Hirayama, T. (2004). An antibody to VacA of *Helicobacter pylori* in the CSF of patients with Miller-Fisher syndrome. *Neurology* 63, 2184-2186.
474. Cover, T.L., and Blaser, M.J. (1992). Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *The Journal of biological chemistry* 267, 10570-10575.
475. Goo, M.J., Ki, M.R., Lee, H.R., Hong, I.H., Park, J.K., Yang, H.J., Yuan, D.W., Hwang, O.K., Do, S.H., Yoo, S.E., et al. (2008). Primary biliary cirrhosis, similar to that in human beings, in a male C57BL/6 mouse infected with *Helicobacter pylori*. *European journal of gastroenterology & hepatology* 20, 1045-1048.
476. Koutsoumpas, A., Mytilinaiou, M., Polymeros, D., Dalekos, G.N., and Bogdanos, D.P. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* antibody responses specific for VacA do not trigger primary biliary cirrhosis-specific antimitochondrial antibodies. *European journal of gastroenterology & hepatology* 21, 1220.
477. Klaamas, K., Kurtenkov, O., Covacci, A., Lipping, A., and Wadstrom, T. (1999). Immune response to a recombinant fragment of the CagA protein of *Helicobacter pylori* in blood donors and patients with gastric cancer: relation to ABO(H) blood group phenotype, stage of the disease and tumor morphology. *Medical microbiology and immunology* 187, 227-232.
478. Schmausser, B., Eck, M., Greiner, A., Kraus, M., and Muller-Hermelink, H.K. (2000). Mucosal humoral immune response to CagA shows a high prevalence in patients with gastric MALT-type lymphoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 436, 115-118.

479. Figura, N., Palazzuoli, A., Vaira, D., Campagna, M., Moretti, E., Iacoponi, F., Giordano, N., Clemente, S., Nuti, R., and Ponzetto, A. (2014). Cross-sectional study: CagA-positive *Helicobacter pylori* infection, acute coronary artery disease and systemic levels of B-type natriuretic peptide. *Journal of clinical pathology* 67, 251-257.
480. Kodama, M., Kitadai, Y., Ito, M., Kai, H., Masuda, H., Tanaka, S., Yoshihara, M., Fujimura, K., and Chayama, K. (2007). Immune response to CagA protein is associated with improved platelet count after *Helicobacter pylori* eradication in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Helicobacter* 12, 36-42.
481. Willis, S.N., Stathopoulos, P., Chastre, A., Compton, S.D., Hafler, D.A., and O'Connor, K.C. (2015). Investigating the Antigen Specificity of Multiple Sclerosis Central Nervous System-Derived Immunoglobulins. *Frontiers in immunology* 6, 600.
482. Ridker, P.M., Danielson, E., Fonseca, F.A., Genest, J., Gotto, A.M., Jr., Kastelein, J.J., Koenig, W., Libby, P., Lorenzatti, A.J., MacFadyen, J.G., et al. (2008). Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *The New England journal of medicine* 359, 2195-2207.
483. Chiba, S., Yokota, S., Yonekura, K., Tanaka, S., Furuyama, H., Kubota, H., Fujii, N., and Matsumoto, H. (2006). Autoantibodies against HSP70 family proteins were detected in the cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 241, 39-43.
484. Panchapakesan, J., Daglis, M., and Gatenby, P. (1992). Antibodies to 65 kDa and 70 kDa heat shock proteins in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Immunol Cell Biol* 70 (Pt 5), 295-300.
485. Salvetti, M., Buttinelli, C., Ristori, G., Carbonari, M., Cherchi, M., Fiorelli, M., Grasso, M.G., Toma, L., and Pozzilli, C. (1992). T-lymphocyte reactivity to the recombinant mycobacterial 65- and 70-kDa heat shock proteins in multiple sclerosis. *J Autoimmun* 5, 691-702.
486. Scotti, C., Mignosi, P., Filipazzi, P., Lazze, M.C., Savio, M., Cappelletti, D., Pasquetto, M.V., Solcia, E., Vannini, V., and Sommi, P. (2010). Molecular alterations in fibroblasts exposed to *Helicobacter pylori* broth culture filtrate: a potential trigger of autoimmunity? *Helicobacter* 15, 76-77.
487. Tishler, M., and Shoenfeld, Y. (1996). Anti-heat-shock protein antibodies in rheumatic and autoimmune diseases. *Semin Arthritis Rheum* 26, 558-563.
488. Mendoza, J.A., Weinberger, K.K., and Swan, M.J. (2017). The Hsp60 protein of *Helicobacter pylori* displays chaperone activity under acidic conditions. *Biochemistry and biophysics reports* 9, 95-99.
489. Gruber, R., Lederer, S., Bechtel, U., Lob, S., Riethmuller, G., and Feucht, H.E. (1996). Increased antibody titers against mycobacterial heat-shock protein 65 in patients with vasculitis and arteriosclerosis. *Int Arch Allergy Immunol* 110, 95-98.

490. Horvath, L., Czirjak, L., Fekete, B., Jakab, L., Prohaszka, Z., Cervenak, L., Romics, L., Singh, M., Daha, M.R., and Fust, G. (2001). Levels of antibodies against C1q and 60 kDa family of heat shock proteins in the sera of patients with various autoimmune diseases. *Immunol Lett* 75, 103-109.
491. van Eden, W., van der Zee, R., and Prakken, B. (2005). Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nature reviews. Immunology* 5, 318-330.
492. Horvath, L., Cervenak, L., Oroszlan, M., Prohaszka, Z., Uray, K., Hudecz, F., Baranyi, E., Madacsy, L., Singh, M., Romics, L., et al. (2002). Antibodies against different epitopes of heat-shock protein 60 in children with type 1 diabetes mellitus. *Immunol Lett* 80, 155-162.
493. Jamin, C., Dugue, C., Alard, J.E., Jousse, S., Saraux, A., Guillevin, L., Piette, J.C., and Youinou, P. (2005). Induction of endothelial cell apoptosis by the binding of anti-endothelial cell antibodies to Hsp60 in vasculitis-associated systemic autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 52, 4028-4038.
494. Jarjour, W.N., Jeffries, B.D., Davis, J.S.t., Welch, W.J., Mimura, T., and Winfield, J.B. (1991). Autoantibodies to human stress proteins. A survey of various rheumatic and other inflammatory diseases. *Arthritis Rheum* 34, 1133-1138.
495. de Graeff-Meeder, E.R., Rijkers, G.T., Voorhorst-Ogink, M.M., Kuis, W., van der Zee, R., van Eden, W., and Zegers, B.J. (1993). Antibodies to human HSP60 in patients with juvenile chronic arthritis, diabetes mellitus, and cystic fibrosis. *Pediatric research* 34, 424-428.
496. Nguyen, T.T., Zlacka, D., Vavrincova, P., Sedlacek, P., and Hromadnikova, I. (2006). Detection of antibodies against 60-, 65- and 70-kDa heat shock proteins in paediatric patients with various disorders using Western blotting and ELISA. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 44, 442-449.
497. Kumar Chauhan, S., Kumar Tripathy, N., Sinha, N., Singh, M., and Nityanand, S. (2004). Cellular and humoral immune responses to mycobacterial heat shock protein-65 and its human homologue in Takayasu's arteritis. *Clinical and experimental immunology* 138, 547-553.
498. van Eden, W., Jansen, M.A.A., Ludwig, I., van Kooten, P., van der Zee, R., and Broere, F. (2017). The Enigma of Heat Shock Proteins in Immune Tolerance. *Frontiers in immunology* 8, 1599.
499. Elfaitouri, A., Herrmann, B., Bolin-Wiener, A., Wang, Y., Gottfries, C.G., Zachrisson, O., Pipkorn, R., Ronnblom, L., and Blomberg, J. (2013). Epitopes of microbial and human heat shock protein 60 and their recognition in myalgic encephalomyelitis. *PloS one* 8, e81155.
500. Hirata, D., Hirai, I., Iwamoto, M., Yoshio, T., Takeda, A., Masuyama, J.I., Mimori, A., Kano, S., and Minota, S. (1997). Preferential binding with *Escherichia coli* hsp60 of antibodies prevalent in sera from patients with rheumatoid arthritis. *Clinical immunology and immunopathology* 82, 141-148.

501. Shoda, H., Hanata, N., Sumitomo, S., Okamura, T., Fujio, K., and Yamamoto, K. (2016). Immune responses to Mycobacterial heat shock protein 70 accompany self-reactivity to human BiP in rheumatoid arthritis. *Scientific reports* 6, 22486.
502. Yokota, S.I., Hirata, D., Minota, S., Higashiyama, T., Kurimoto, M., Yanagi, H., Yura, T., and Kubota, H. (2000). Autoantibodies against chaperonin CCT in human sera with rheumatic autoimmune diseases: comparison with antibodies against other Hsp60 family proteins. *Cell stress & chaperones* 5, 337-346.
503. Bogdanos, D.P., Baum, H., Gunsar, F., Arioli, D., Polymeros, D., Ma, Y., Burroughs, A.K., and Vergani, D. (2004). Extensive homology between the major immunodominant mitochondrial antigen in primary biliary cirrhosis and *Helicobacter pylori* does not lead to immunological cross-reactivity. *Scand J Gastroenterol* 39, 981-987.
504. Gonzalez-Lopez, M.A., Velazquez-Guadarrama, N., Romero-Espejel, M.E., and Olivares-Trejo Jde, J. (2013). *Helicobacter pylori* secretes the chaperonin GroEL (HSP60), which binds iron. *FEBS Lett* 587, 1823-1828.
505. Vanet, A., and Labigne, A. (1998). Evidence for specific secretion rather than autolysis in the release of some *Helicobacter pylori* proteins. *Infect Immun* 66, 1023-1027.
506. Udvarnoki, K., Cervenak, L., Uray, K., Hudecz, F., Kacs Kovics, I., Spallek, R., Singh, M., Fust, G., and Prohaszka, Z. (2007). Antibodies against C-reactive protein cross-react with 60-kilodalton heat shock proteins. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 14, 335-341.
507. Daponte, A., Pournaras, S., Deligeoroglou, E., Skentou, H., and Messinis, I.E. (2012). Serum interleukin-1beta, interleukin-8 and anti-heat shock 60 *Chlamydia trachomatis* antibodies as markers of ectopic pregnancy. *Journal of reproductive immunology* 93, 102-108.
508. Henderson, B. (2010). Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. *Cell biochemistry and function* 28, 1-14.
509. Targosz, A., Pierzchalski, P., Krawiec, A., Szczyrk, U., Brzozowski, T., Konturek, S.J., and Pawlik, W.W. (2006). *Helicobacter pylori* inhibits expression of heat shock protein 70 (HSP70) in human epithelial cell line. Importance of Cag A protein. *J Physiol Pharmacol* 57, 265-278.
510. Krzysiek-Maczka, G., Targosz, A., Ptak-Belowska, A., Korbut, E., Szczyrk, U., Strzalka, M., and Brzozowski, T. (2013). Molecular alterations in fibroblasts exposed to *Helicobacter pylori*: a missing link in bacterial inflammation progressing into gastric carcinogenesis? *J Physiol Pharmacol* 64, 77-87.
511. Pezeshki, M.Z., Zarrintan, S., and Zarrintan, M.H. (2008). *Helicobacter pylori* nanoparticles as a potential treatment of conventional multiple sclerosis. *Med Hypotheses* 70, 1223.

512. Wender, M. (2003). [Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among patients with multiple sclerosis]. *Neurol Neurochir Pol* 37, 45-48.
513. Manetti, M., Romano, E., Rosa, I., Guiducci, S., Bellando-Randone, S., De Paulis, A., Ibba-Manneschi, L., and Matucci-Cerinic, M. (2017). Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction and dermal fibrosis in systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases* 76, 924-934.
514. Mendoza, F.A., Piera-Velazquez, S., Farber, J.L., Feghali-Bostwick, C., and Jimenez, S.A. (2016). Endothelial Cells Expressing Endothelial and Mesenchymal Cell Gene Products in Lung Tissue From Patients With Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *Arthritis & rheumatology* 68, 210-217.
515. van Caam, A., Vonk, M., van den Hoogen, F., van Lent, P., and van der Kraan, P. (2018). Unraveling SSc Pathophysiology; The Myofibroblast. *Frontiers in immunology* 9, 2452.
516. Farina, G., Rosato, E., Francia, C., Proietti, M., Donato, G., Ammendolea, C., Pisarri, S., and Salsano, F. (2001). High incidence of *Helicobacter pylori* infection in patients with systemic sclerosis: association with Sicca Syndrome. *International journal of immunopathology and pharmacology* 14, 81-85.
517. Radic, M., Kaliterna, D.M., Bonacin, D., Vergles, J.M., Radic, J., Fabijanic, D., and Kovacic, V. (2013). Is *Helicobacter pylori* infection a risk factor for disease severity in systemic sclerosis? *Rheumatology international* 33, 2943-2948.
518. Radic, M., Kaliterna, D.M., and Radic, J. (2011). *Helicobacter pylori* infection and systemic sclerosis-is there a link? *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 78, 337-340.
519. Radic, M., Martinovic Kaliterna, D., Bonacin, D., Morovic Vergles, J., and Radic, J. (2010). Correlation between *Helicobacter pylori* infection and systemic sclerosis activity. *Rheumatology* 49, 1784-1785.
520. Yamaguchi, K., Iwakiri, R., Hara, M., Kikkawa, A., Fujise, T., Ootani, H., Shimoda, R., Tsunada, S., Sakata, H., Ushiyama, O., et al. (2008). Reflux esophagitis and *Helicobacter pylori* infection in patients with scleroderma. *Internal medicine* 47, 1555-1559.
521. Hughes, M., and Herrick, A.L. (2019). Systemic sclerosis. *British journal of hospital medicine* 80, 530-536.
522. Gu, H. (2017). Role of Flagella in the Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Current microbiology* 74, 863-869.
523. Matsuo, Y., Kido, Y., and Yamaoka, Y. (2017). *Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein-Related Pathogenesis. *Toxins* 9.
524. Delahay, R.M., and Rugge, M. (2012). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 17 Suppl 1, 9-15.

525. Knorr, J., Ricci, V., Hatakeyama, M., and Backert, S. (2019). Classification of *Helicobacter pylori* Virulence Factors: Is CagA a Toxin or Not? *Trends in microbiology* 27, 731-738.
526. Kountouras, J., Zavos, C., Deretzi, G., Gavalas, E., Chatzopoulos, D., Katsinelos, P., Tsiaousi, E., Gagalis, S., Polyzos, S.A., and Venizelos, I. (2012). Potential implications of *Helicobacter pylori*-related neutrophil-activating protein. *World journal of gastroenterology* 18, 489-490.
527. Arnold, I.C., Dehzad, N., Reuter, S., Martin, H., Becher, B., Taube, C., and Muller, A. (2011). *Helicobacter pylori* infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation* 121, 3088-3093.
528. Higgins, P.D., Johnson, L.A., Luther, J., Zhang, M., Sauder, K.L., Blanco, L.P., and Kao, J.Y. (2011). Prior *Helicobacter pylori* infection ameliorates *Salmonella typhimurium*-induced colitis: mucosal crosstalk between stomach and distal intestine. *Inflammatory bowel diseases* 17, 1398-1408.
529. Kira, J., Kanai, T., Nishimura, Y., Yamasaki, K., Matsushita, S., Kawano, Y., Hasuo, K., Tobimatsu, S., and Kobayashi, T. (1996). Western versus Asian types of multiple sclerosis: immunogenetically and clinically distinct disorders. *Annals of neurology* 40, 569-574.
530. Atherton, J.C., and Blaser, M.J. (2009). Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *The Journal of clinical investigation* 119, 2475-2487.
531. Nakashima, S., Kakugawa, T., Yura, H., Tomonaga, M., Harada, T., Hara, A., Hara, S., Nakano, M., Yamasaki, E., Sakamoto, N., et al. (2015). Identification of *Helicobacter pylori* VacA in human lung and its effects on lung cells. *Biochemical and biophysical research communications* 460, 721-726.
532. Arismendi Sosa, A.C., Salinas Ibanez, A.G., Perez Chaca, M.V., Penissi, A.B., Gomez, N.N., and Vega, A.E. (2018). Study of *Helicobacter pylori* infection on lung using an animal model. *Microbial pathogenesis* 123, 410-418.
533. Evans, A.S., Rothfield, N.F., and Niederman, J.C. (1971). Raised antibody titres to E.B. virus in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1, 167-168.
534. Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80, 389-399.
535. Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N., and Kikutani, H. (1999). Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 286, 300-303.
536. Adler, B., Schaadt, E., Kempkes, B., Zimmer-Strobl, U., Baier, B., and Bornkamm, G.W. (2002). Control of Epstein-Barr virus reactivation by activated

- CD40 and viral latent membrane protein 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 437-442.
537. Tosato, G., Steinberg, A.D., Yarchoan, R., Heilman, C.A., Pike, S.E., De Seau, V., and Blaese, R.M. (1984). Abnormally elevated frequency of Epstein-Barr virus-infected B cells in the blood of patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation* 73, 1789-1795.
 538. Tsokos, G.C., Magrath, I.T., and Balow, J.E. (1983). Epstein-Barr virus induces normal B cell responses but defective suppressor T cell responses in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology* 131, 1797-1801.
 539. Lunemann, J.D., Tintore, M., Messmer, B., Strowig, T., Rovira, A., Perkal, H., Caballero, E., Munz, C., Montalban, X., and Comabella, M. (2010). Elevated Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen-1 immune responses predict conversion to multiple sclerosis. *Annals of neurology* 67, 159-169.
 540. Lindsey, J.W., Hatfield, L.M., and Vu, T. (2010). Epstein-Barr virus neutralizing and early antigen antibodies in multiple sclerosis. *European journal of neurology* 17, 1263-1269.
 541. Mamei, G., Cossu, D., Cocco, E., Masala, S., Frau, J., Marrosu, M.G., and Sechi, L.A. (2013). EBNA-1 IgG titers in Sardinian multiple sclerosis patients and controls. *Journal of neuroimmunology* 264, 120-122.
 542. De Paschale, M., and Clerici, P. (2012). Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World journal of virology* 1, 31-43.
 543. Altuglu, I., Aksoy, A., Zeytinoglu, A., and Orman, M. (2010). [Evaluation of immunoblot-based assay for detecting Epstein-Barr virus viral capsid antibodies]. *Mikrobiyoloji bulteni* 44, 231-236.
 544. Gartner, B.C., Hess, R.D., Bandt, D., Kruse, A., Rethwilm, A., Roemer, K., and Mueller-Lantzsch, N. (2003). Evaluation of four commercially available Epstein-Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as the reference method. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 10, 78-82.
 545. Bertrand, K.A., Birmann, B.M., Chang, E.T., Spiegelman, D., Aster, J.C., Zhang, S.M., and Laden, F. (2010). A prospective study of Epstein-Barr virus antibodies and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 116, 3547-3553.
 546. Hedstrom, A.K., Huang, J., Michel, A., Butt, J., Brenner, N., Hillert, J., Waterboer, T., Kockum, I., Olsson, T., and Alfredsson, L. (2019). High Levels of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-1-Specific Antibodies and Infectious Mononucleosis Act Both Independently and Synergistically to Increase Multiple Sclerosis Risk. *Frontiers in neurology* 10, 1368.
 547. Sternbaek, L., Draborg, A.H., Nielsen, C.T., Jacobsen, S., Iversen, L.V., Troelsen, L., Theander, E., and Houen, G. (2017). Efficient evaluation of humoral immune responses by the use of serum pools. *Journal of immunological methods* 443, 1-8.

548. Wei, M.X., and Ooka, T. (1989). A transforming function of the BARP1 gene encoded by Epstein-Barr virus. *The EMBO journal* 8, 2897-2903.
549. Seto, E., Yang, L., Middeldorp, J., Sheen, T.S., Chen, J.Y., Fukayama, M., Eizuru, Y., Ooka, T., and Takada, K. (2005). Epstein-Barr virus (EBV)-encoded BARP1 gene is expressed in nasopharyngeal carcinoma and EBV-associated gastric carcinoma tissues in the absence of lytic gene expression. *Journal of medical virology* 76, 82-88.
550. Wynne, A., Kanwar, R.K., Khanna, R., and Kanwar, J.R. (2010). Recent Advances on the Possible Neuroprotective Activities of Epstein-Barr Virus Oncogene BARP1 Protein in Chronic Inflammatory Disorders of Central Nervous System. *Current neuropharmacology* 8, 268-275.
551. Mishra, M., Tiwari, S., and Gomes, A.V. (2017). Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert review of proteomics* 14, 1037-1053.
552. Bass, J.J., Wilkinson, D.J., Rankin, D., Phillips, B.E., Szewczyk, N.J., Smith, K., and Atherton, P.J. (2017). An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 27, 4-25.
553. Kurien, B.T., and Scofield, R.H. (2012). Extraction of proteins from gels: a brief review. *Methods in molecular biology* 869, 403-405.
554. Betteridge, Z., Chinoy, H., Vencovsky, J., Winer, J., Putschakayala, K., Ho, P., Lundberg, I., Danko, K., Cooper, R., and McHugh, N. (2020). Identification of a novel autoantigen eukaryotic initiation factor 3 associated with polymyositis. *Rheumatology* 59, 1026-1030.
555. Dib, H., Tamby, M.C., Bussone, G., Regent, A., Berezne, A., Lafine, C., Broussard, C., Simonneau, G., Guillevin, L., Witko-Sarsat, V., et al. (2012). Targets of anti-endothelial cell antibodies in pulmonary hypertension and scleroderma. *The European respiratory journal* 39, 1405-1414.
556. Thebault, S., Gilbert, D., Hubert, M., Drouot, L., Machour, N., Lange, C., Charlionet, R., and Tron, F. (2002). Orderly pattern of development of the autoantibody response in (New Zealand White x BXSB)F1 lupus mice: characterization of target antigens and antigen spreading by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of immunology* 169, 4046-4053.
557. Mor, F., Weinberger, A., and Cohen, I.R. (2002). Identification of alpha-tropomyosin as a target self-antigen in Behcet's syndrome. *European journal of immunology* 32, 356-365.
558. Di Lullo, G., Calabresi, V., Mariotti, F., Zambruno, G., Lanzavecchia, A., and Di Zenzo, G. (2019). Identification of a Novel Non-desmoglein Autoantigen in Pemphigus Vulgaris. *Frontiers in immunology* 10, 1391.

559. Ganesan, V., Ascherman, D.P., and Minden, J.S. (2016). Immunoproteomics technologies in the discovery of autoantigens in autoimmune diseases. *Biomolecular concepts* 7, 133-143.
560. Lee, A.Y.S., Chataway, T., Colella, A.D., Gordon, T.P., and Wang, J.J. (2019). Quantitative Mass Spectrometric Analysis of Autoantibodies as a Paradigm Shift in Autoimmune Serology. *Frontiers in immunology* 10, 2845.
561. Mahler, M., Mierau, R., and Bluthner, M. (2000). Fine-specificity of the anti-CENP-A B-cell autoimmune response. *Journal of molecular medicine* 78, 460-467.
562. Earnshaw, W.C., Sullivan, K.F., Machlin, P.S., Cooke, C.A., Kaiser, D.A., Pollard, T.D., Rothfield, N.F., and Cleveland, D.W. (1987). Molecular cloning of cDNA for CENP-B, the major human centromere autoantigen. *The Journal of cell biology* 104, 817-829.
563. Kongkaew, S., Rungrotmongkol, T., Punwong, C., Noguchi, H., Takeuchi, F., Kungwan, N., Wolschann, P., and Hannongbua, S. (2019). Interactions of HLA-DR and Topoisomerase I Epitope Modulated Genetic Risk for Systemic Sclerosis. *Scientific reports* 9, 745.
564. Czompoly, T., Simon, D., Czirjak, L., and Nemeth, P. (2009). Anti-topoisomerase I autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmunity reviews* 8, 692-696.
565. Veeraraghavan, S., Renzoni, E.A., Jeal, H., Jones, M., Hammer, J., Wells, A.U., Black, C.M., Welsh, K.I., and du Bois, R.M. (2004). Mapping of the immunodominant T cell epitopes of the protein topoisomerase I. *Annals of the rheumatic diseases* 63, 982-987.
566. Glaeser, L., Henes, J., Kotter, I., Vogel, W., Kanz, L., and Klein, R. (2018). Molecular recognition patterns of anti-topoisomerase I-antibodies in patients with systemic sclerosis before and after autologous stem cell transplantation. *Clinical and experimental rheumatology* 36 Suppl 113, 28-35.
567. Rizou, C., Ioannidis, J.P., Panou-Pomonis, E., Sakarellos-Daitsiotis, M., Sakarellos, C., Moutsopoulos, H.M., and Vlachoyiannopoulos, P.G. (2000). B-Cell epitope mapping of DNA topoisomerase I defines epitopes strongly associated with pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 22, 344-351.
568. Hu, P.Q., Oppenheim, J.J., Medsger, T.A., Jr., and Wright, T.M. (2006). T cell lines from systemic sclerosis patients and healthy controls recognize multiple epitopes on DNA topoisomerase I. *Journal of autoimmunity* 26, 258-267.
569. Simon, D., Czompoly, T., Berki, T., Minier, T., Peti, A., Toth, E., Czirjak, L., and Nemeth, P. (2009). Naturally occurring and disease-associated auto-antibodies against topoisomerase I: a fine epitope mapping study in systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus. *International immunology* 21, 415-422.

570. Kuwana, M., Kaburaki, J., Medsger, T.A., Jr., and Wright, T.M. (1999). An immunodominant epitope on DNA topoisomerase I is conformational in nature: heterogeneity in its recognition by systemic sclerosis sera. *Arthritis and rheumatism* 42, 1179-1188.
571. Tselis, A. (2012). Epstein-Barr virus cause of multiple sclerosis. *Current opinion in rheumatology* 24, 424-428.
572. Csuka, D., Simon, D., Hobor, R., Uray, K., Prohaszka, Z., Banlaki, Z., Jani, P.K., Szilagyi, A., Hudecz, F., Rajczy, K., et al. (2013). Serum concentration of immunoglobulin G-type antibodies against the whole Epstein-Barr nuclear antigen 1 and its aa35-58 or aa398-404 fragments in the sera of patients with systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis. *Clinical and experimental immunology* 171, 255-262.
573. Giess, R.M., Pfuhl, C., Behrens, J.R., Rasche, L., Freitag, E., Khalighy, N., Otto, C., Wuerfel, J., Brandt, A.U., Hofmann, J., et al. (2017). Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis. *PLoS one* 12, e0175279.
574. Castellazzi, M., Contini, C., Tamborino, C., Fasolo, F., Roversi, G., Seraceni, S., Rizzo, R., Baldi, E., Tola, M.R., Bellini, T., et al. (2014). Epstein-Barr virus-specific intrathecal oligoclonal IgG production in relapsing-remitting multiple sclerosis is limited to a subset of patients and is composed of low-affinity antibodies. *Journal of neuroinflammation* 11, 188.
575. Zivadinov, R., Weinstock-Guttman, B., Zorzon, M., Uxa, L., Serafin, M., Bosco, A., Bratina, A., Maggiore, C., Grop, A., Tommasi, M.A., et al. (2009). Gene-environment interactions between HLA B7/A2, EBV antibodies are associated with MRI injury in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 209, 123-130.
576. Chroni, E., Paschalis, C., Stergiou, T., Vlahanastasi, C., and Andonopoulos, A.P. (2002). Multiple sclerosis in the course of systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases* 61, 188.
577. Igarashi, A., Imakado, S., Ishibashi, Y., and Takehara, K. (1989). Systemic sclerosis associated with multiple sclerosis. *Archives of dermatology* 125, 1145.
578. Pelidou, S.H., Tsifetaki, N., Giannopoulos, S., Deretzi, G., Voulgari, P., and Kyritsis, A. (2007). Multiple sclerosis associated with systemic sclerosis. *Rheumatology international* 27, 771-773.
579. Sospedra, M., and Martin, R. (2016). Immunology of Multiple Sclerosis. *Seminars in neurology* 36, 115-127.
580. Kumar, A., Cocco, E., Atzori, L., Marrosu, M.G., and Pieroni, E. (2013). Structural and dynamical insights on HLA-DR2 complexes that confer susceptibility to multiple sclerosis in Sardinia: a molecular dynamics simulation study. *PLoS one* 8, e59711.

581. Owens, G.P., and Bennett, J.L. (2012). Trigger, pathogen, or bystander: the complex nexus linking Epstein- Barr virus and multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* 18, 1204-1208.
582. Cardenas-Mondragon, M.G., Carreon-Talavera, R., Camorlinga-Ponce, M., Gomez-Delgado, A., Torres, J., and Fuentes-Panana, E.M. (2013). Epstein Barr virus and Helicobacter pylori co-infection are positively associated with severe gastritis in pediatric patients. *PloS one* 8, e62850.
583. Davila-Collado, R., Jarquin-Duran, O., Dong, L.T., and Espinoza, J.L. (2020). Epstein-Barr Virus and Helicobacter Pylori Co-Infection in Non-Malignant Gastrointestinal Disorders. *Pathogens* 9.
584. Singh, S., and Jha, H.C. (2017). Status of Epstein-Barr Virus Coinfection with Helicobacter pylori in Gastric Cancer. *Journal of oncology* 2017, 3456264.
585. Weber, M.S., Hemmer, B., and Cepok, S. (2011). The role of antibodies in multiple sclerosis. *Biochimica et biophysica acta* 1812, 239-245.
586. Wootla, B., Denic, A., Keegan, B.M., Winters, J.L., Astapenko, D., Warrington, A.E., Bieber, A.J., and Rodriguez, M. (2011). Evidence for the role of B cells and immunoglobulins in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurology research international* 2011, 780712.
587. Avasarala, J.R., Cross, A.H., and Trotter, J.L. (2001). Oligoclonal band number as a marker for prognosis in multiple sclerosis. *Archives of neurology* 58, 2044-2045.
588. Calabrese, M., Poretto, V., Favaretto, A., Alessio, S., Bernardi, V., Romualdi, C., Rinaldi, F., Perini, P., and Gallo, P. (2012). Cortical lesion load associates with progression of disability in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 135, 2952-2961.
589. Joseph, F.G., Hirst, C.L., Pickersgill, T.P., Ben-Shlomo, Y., Robertson, N.P., and Scolding, N.J. (2009). CSF oligoclonal band status informs prognosis in multiple sclerosis: a case control study of 100 patients. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 80, 292-296.
590. Graner, M., Pointon, T., Manton, S., Green, M., Dennison, K., Davis, M., Braiotta, G., Craft, J., Edwards, T., Polonsky, B., et al. (2020). Oligoclonal IgG antibodies in multiple sclerosis target patient-specific peptides. *PloS one* 15, e0228883.
591. Sindic, C.J., Monteyne, P., and Laterre, E.C. (1994). The intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 54, 75-80.
592. Brandle, S.M., Obermeier, B., Senel, M., Bruder, J., Mentele, R., Khademi, M., Olsson, T., Tumani, H., Kristoferitsch, W., Lottspeich, F., et al. (2016). Distinct oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis recognize ubiquitous self-proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 7864-7869.

593. Hauser, S.L., Waubant, E., Arnold, D.L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., et al. (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 358, 676-688.
594. Bar-Or, A., Calabresi, P.A., Arnold, D., Markowitz, C., Shafer, S., Kasper, L.H., Waubant, E., Gazda, S., Fox, R.J., Panzara, M., et al. (2008). Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a 72-week, open-label, phase I trial. *Annals of neurology* 63, 395-400.
595. von Budingen, H.C., Gulati, M., Kuenzle, S., Fischer, K., Rupprecht, T.A., and Goebels, N. (2010). Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of patients with central nervous system autoimmune demyelination produce "oligoclonal bands". *Journal of neuroimmunology* 218, 134-139.
596. Jelcic, I., Al Nimer, F., Wang, J., Lentsch, V., Planas, R., Jelcic, I., Madjovski, A., Ruhrmann, S., Faigle, W., Frauenknecht, K., et al. (2018). Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4(+) T Cells in Multiple Sclerosis. *Cell* 175, 85-100 e123.
597. Rodriguez-Pinto, D. (2005). B cells as antigen presenting cells. *Cellular immunology* 238, 67-75.
598. Bar-Or, A., Fawaz, L., Fan, B., Darlington, P.J., Rieger, A., Ghorayeb, C., Calabresi, P.A., Waubant, E., Hauser, S.L., Zhang, J., et al. (2010). Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Annals of neurology* 67, 452-461.
599. Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., and Aloisi, F. (2007). Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain : a journal of neurology* 130, 1089-1104.
600. Lucchinetti, C.F., Popescu, B.F., Bunyan, R.F., Moll, N.M., Roemer, S.F., Lassmann, H., Bruck, W., Parisi, J.E., Scheithauer, B.W., Giannini, C., et al. (2011). Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 365, 2188-2197.
601. Metz, I., Weigand, S.D., Popescu, B.F., Frischer, J.M., Parisi, J.E., Guo, Y., Lassmann, H., Bruck, W., and Lucchinetti, C.F. (2014). Pathologic heterogeneity persists in early active multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology* 75, 728-738.
602. Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., and Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of neurology* 47, 707-717.
603. Keegan, M., Konig, F., McClelland, R., Bruck, W., Morales, Y., Bitsch, A., Panitch, H., Lassmann, H., Weinshenker, B., Rodriguez, M., et al. (2005). Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet* 366, 579-582.

604. Elliott, C., Lindner, M., Arthur, A., Brennan, K., Jarius, S., Hussey, J., Chan, A., Stroet, A., Olsson, T., Willison, H., et al. (2012). Functional identification of pathogenic autoantibody responses in patients with multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 135, 1819-1833.
605. Seil, F.J. (2018). Myelin Antigens and Antimyelin Antibodies. *Antibodies* 7.
606. Fraussen, J., Claes, N., de Bock, L., and Somers, V. (2014). Targets of the humoral autoimmune response in multiple sclerosis. *Autoimmunity reviews* 13, 1126-1137.
607. Vogt, M.H., Teunissen, C.E., Iacobaeus, E., Heijnen, D.A., Breij, E.C., Olsson, T., Brundin, L., Killestein, J., and Dijkstra, C.D. (2009). Cerebrospinal fluid anti-myelin antibodies are related to magnetic resonance measures of disease activity in multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 80, 1110-1115.
608. Dharmasaroja, P. (2003). Specificity of autoantibodies to epitopes of myelin proteins in multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 206, 7-16.
609. Baig, S., Olsson, T., Yu-Ping, J., Hojeberg, B., Cruz, M., and Link, H. (1991). Multiple sclerosis: cells secreting antibodies against myelin-associated glycoprotein are present in cerebrospinal fluid. *Scandinavian journal of immunology* 33, 73-79.
610. Wajgt, A., and Gorny, M. (1983). CSF antibodies to myelin basic protein and to myelin-associated glycoprotein in multiple sclerosis. Evidence of the intrathecal production of antibodies. *Acta neurologica Scandinavica* 68, 337-343.
611. Moller, J.R., Johnson, D., Brady, R.O., Tourtellotte, W.W., and Quarles, R.H. (1989). Antibodies to myelin-associated glycoprotein (MAG) in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Journal of neuroimmunology* 22, 55-61.
612. Andersson, M., Yu, M., Soderstrom, M., Weerth, S., Baig, S., Solders, G., and Link, H. (2002). Multiple MAG peptides are recognized by circulating T and B lymphocytes in polyneuropathy and multiple sclerosis. *European journal of neurology* 9, 243-251.
613. Hecker, M., Fitzner, B., Wendt, M., Lorenz, P., Flechtner, K., Steinbeck, F., Schroder, I., Thiesen, H.J., and Zettl, U.K. (2016). High-Density Peptide Microarray Analysis of IgG Autoantibody Reactivities in Serum and Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 15, 1360-1380.
614. Silber, E., Semra, Y.K., Gregson, N.A., and Sharief, M.K. (2002). Patients with progressive multiple sclerosis have elevated antibodies to neurofilament subunit. *Neurology* 58, 1372-1381.
615. Eikelenboom, M.J., Petzold, A., Lazeron, R.H., Silber, E., Sharief, M., Thompson, E.J., Barkhof, F., Giovannoni, G., Polman, C.H., and Uitdehaag,

- B.M. (2003). Multiple sclerosis: Neurofilament light chain antibodies are correlated to cerebral atrophy. *Neurology* 60, 219-223.
616. Fialova, L., Bartos, A., Svarcova, J., Zimova, D., Kotoucova, J., and Malbohan, I. (2013). Serum and cerebrospinal fluid light neurofilaments and antibodies against them in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 262, 113-120.
617. Bartos, A., Fialova, L., Soukupova, J., Kukul, J., Malbohan, I., and Pitha, J. (2007). Antibodies against light neurofilaments in multiple sclerosis patients. *Acta neurologica Scandinavica* 116, 100-107.
618. Ehling, R., Lutterotti, A., Wanschitz, J., Khalil, M., Gneiss, C., Deisenhammer, F., Reindl, M., and Berger, T. (2004). Increased frequencies of serum antibodies to neurofilament light in patients with primary chronic progressive multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* 10, 601-606.
619. Huizinga, R., Heijmans, N., Schubert, P., Gschmeissner, S., t Hart, B.A., Herrmann, H., and Amor, S. (2007). Immunization with neurofilament light protein induces spastic paresis and axonal degeneration in Biozzi ABH mice. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 66, 295-304.
620. Couratier, P., Yi, F.H., Preud'homme, J.L., Clavelou, P., White, A., Sindou, P., Vallat, J.M., and Jauberteau, M.O. (1998). Serum autoantibodies to neurofilament proteins in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 154, 137-145.
621. Bornstein, N.M., Aronovich, B., Korczyn, A.D., Shavit, S., Michaelson, D.M., and Chapman, J. (2001). Antibodies to brain antigens following stroke. *Neurology* 56, 529-530.
622. Tintore, M., Fernandez, A.L., Rovira, A., Martinez, X., Direskeneli, H., Khamashta, M., Schwartz, S., Codina, A., and Montalban, X. (1996). Antibodies against endothelial cells in patients with multiple sclerosis. *Acta neurologica Scandinavica* 93, 416-420.
623. Wolf, J., Jahnke, A., Fechner, K., Richter, T., Laass, M.W., Hauer, A., Stern, M., de Laffolie, J., Flemming, G., and Mothes, T. (2016). Primate liver tissue as an alternative substrate for endomysium antibody immunofluorescence testing in diagnostics of paediatric coeliac disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 460, 72-77.
624. Betterle, C., and Zanchetta, R. (2012). The immunofluorescence techniques in the diagnosis of endocrine autoimmune diseases. *Auto- immunity highlights* 3, 67-78.
625. Rajčáni, J., Korinkova, L., and Bencat, M. (2015). Detection of autoantibodies by indirect immunofluorescence and related techniques: the pathologist's view. *Medical Research Archives* 2.

626. Bjartmar, C., Wujek, J.R., and Trapp, B.D. (2003). Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *Journal of the neurological sciences* 206, 165-171.
627. Wagner, C.A., Roque, P.J., and Goverman, J.M. (2020). Pathogenic T cell cytokines in multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine* 217.
628. Wujek, J.R., Bjartmar, C., Richer, E., Ransohoff, R.M., Yu, M., Tuohy, V.K., and Trapp, B.D. (2002). Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 61, 23-32.
629. Imitola, J., Chitnis, T., and Khoury, S.J. (2005). Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacology & therapeutics* 106, 163-177.
630. Cannella, B., and Raine, C.S. (1995). The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology* 37, 424-435.
631. Woodroffe, M.N., and Cuzner, M.L. (1993). Cytokine mRNA expression in inflammatory multiple sclerosis lesions: detection by non-radioactive in situ hybridization. *Cytokine* 5, 583-588.
632. Mycko, M.P., Papoian, R., Boschert, U., Raine, C.S., and Selmaj, K.W. (2003). cDNA microarray analysis in multiple sclerosis lesions: detection of genes associated with disease activity. *Brain : a journal of neurology* 126, 1048-1057.
633. Arellano, G., Acuna, E., Reyes, L.I., Ottum, P.A., De Sarno, P., Villarroel, L., Ciampi, E., Uribe-San Martin, R., Carcamo, C., and Naves, R. (2017). Th1 and Th17 Cells and Associated Cytokines Discriminate among Clinically Isolated Syndrome and Multiple Sclerosis Phenotypes. *Frontiers in immunology* 8, 753.
634. Beck, J., Rondot, P., Catinot, L., Falcoff, E., Kirchner, H., and Wietzerbin, J. (1988). Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations? *Acta neurologica Scandinavica* 78, 318-323.
635. Wang, K., Song, F., Fernandez-Escobar, A., Luo, G., Wang, J.H., and Sun, Y. (2018). The Properties of Cytokines in Multiple Sclerosis: Pros and Cons. *The American journal of the medical sciences* 356, 552-560.
636. Correale, J., Gilmore, W., McMillan, M., Li, S., McCarthy, K., Le, T., and Weiner, L.P. (1995). Patterns of cytokine secretion by autoreactive proteolipid protein-specific T cell clones during the course of multiple sclerosis. *Journal of immunology* 154, 2959-2968.
637. Arbour, N., Holz, A., Sipe, J.C., Nanche, D., Romine, J.S., Zyroff, J., and Oldstone, M.B. (2003). A new approach for evaluating antigen-specific T cell responses to myelin antigens during the course of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 137, 197-209.
638. Moldovan, I.R., Rudick, R.A., Cotleur, A.C., Born, S.E., Lee, J.C., Karafa, M.T., and Pelfrey, C.M. (2003). Interferon gamma responses to myelin peptides in

- multiple sclerosis correlate with a new clinical measure of disease progression. *Journal of neuroimmunology* *141*, 132-140.
639. Fiorentino, D.F., Bond, M.W., and Mosmann, T.R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of experimental medicine* *170*, 2081-2095.
640. de Waal Malefyt, R., Yssel, H., and de Vries, J.E. (1993). Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *Journal of immunology* *150*, 4754-4765.
641. de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M.G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H., and de Vries, J.E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *The Journal of experimental medicine* *174*, 915-924.
642. Rieckmann, P., Albrecht, M., Kitze, B., Weber, T., Tumani, H., Broocks, A., Luer, W., and Poser, S. (1994). Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patients with multiple sclerosis. *Neurology* *44*, 1523-1526.
643. van Boxel-Dezaire, A.H., Hoff, S.C., van Oosten, B.W., Verweij, C.L., Drager, A.M., Ader, H.J., van Houwelingen, J.C., Barkhof, F., Polman, C.H., and Nagelkerken, L. (1999). Decreased interleukin-10 and increased interleukin-12p40 mRNA are associated with disease activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis. *Annals of neurology* *45*, 695-703.
644. Pelfrey, C.M., Rudick, R.A., Cotleur, A.C., Lee, J.C., Tary-Lehmann, M., and Lehmann, P.V. (2000). Quantification of self-recognition in multiple sclerosis by single-cell analysis of cytokine production. *Journal of immunology* *165*, 1641-1651.
645. Vadasz, Z., Peri, R., Eiza, N., Slobodin, G., Balbir-Gurman, A., and Toubi, E. (2015). The Expansion of CD25 high IL-10 high FoxP3 high B Regulatory Cells Is in Association with SLE Disease Activity. *Journal of immunology research* *2015*, 254245.
646. Carter, N.A., Rosser, E.C., and Mauri, C. (2012). Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis research & therapy* *14*, R32.
647. Mavropoulos, A., Varna, A., Zafiriou, E., Liaskos, C., Alexiou, I., Roussaki-Schulze, A., Vlychou, M., Katsiari, C., Bogdanos, D.P., and Sakkas, L.I. (2017). IL-10 producing Bregs are impaired in psoriatic arthritis and psoriasis and inversely correlate with IL-17- and IFN γ -producing T cells. *Clinical immunology* *184*, 33-41.
648. Mavropoulos, A., Liaskos, C., Simopoulou, T., Bogdanos, D.P., and Sakkas, L.I. (2017). IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells), IL-17⁺ T cells and autoantibodies in systemic sclerosis. *Clinical immunology* *184*, 26-32.

649. Khademi, M., Bornsen, L., Rafatnia, F., Andersson, M., Brundin, L., Piehl, F., Sellebjerg, F., and Olsson, T. (2009). The effects of natalizumab on inflammatory mediators in multiple sclerosis: prospects for treatment-sensitive biomarkers. *European journal of neurology* 16, 528-536.
650. Bever, C.T., Jr., Panitch, H.S., Levy, H.B., McFarlin, D.E., and Johnson, K.P. (1991). Gamma-interferon induction in patients with chronic progressive MS. *Neurology* 41, 1124-1127.
651. Heremans, H., Dillen, C., Groenen, M., Martens, E., and Billiau, A. (1996). Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CREAE) in mice: enhancement by monoclonal antibodies against interferon-gamma. *European journal of immunology* 26, 2393-2398.
652. Voorthuis, J.A., Uitdehaag, B.M., De Groot, C.J., Goede, P.H., van der Meide, P.H., and Dijkstra, C.D. (1990). Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by intraventricular administration of interferon-gamma in Lewis rats. *Clinical and experimental immunology* 81, 183-188.
653. Billiau, A., Heremans, H., Vandekerckhove, F., Dijkmans, R., Sobis, H., Meulepas, E., and Carton, H. (1988). Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN-gamma. *Journal of immunology* 140, 1506-1510.
654. Xiao, B.G., Wu, X.C., Yang, J.S., Xu, L.Y., Liu, X., Huang, Y.M., Bjelke, B., and Link, H. (2004). Therapeutic potential of IFN-gamma-modified dendritic cells in acute and chronic experimental allergic encephalomyelitis. *International immunology* 16, 13-22.
655. Furlan, R., Bergami, A., Cantarella, D., Brambilla, E., Taniguchi, M., Dellabona, P., Casorati, G., and Martino, G. (2003). Activation of invariant NKT cells by alphaGalCer administration protects mice from MOG35-55-induced EAE: critical roles for administration route and IFN-gamma. *European journal of immunology* 33, 1830-1838.
656. Willenborg, D.O., Staykova, M., Fordham, S., O'Brien, N., and Linares, D. (2007). The contribution of nitric oxide and interferon gamma to the regulation of the neuro-inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 191, 16-25.
657. Wang, Z., Hong, J., Sun, W., Xu, G., Li, N., Chen, X., Liu, A., Xu, L., Sun, B., and Zhang, J.Z. (2006). Role of IFN-gamma in induction of Foxp3 and conversion of CD4+ CD25- T cells to CD4+ Tregs. *The Journal of clinical investigation* 116, 2434-2441.
658. Yeh, W.I., McWilliams, I.L., and Harrington, L.E. (2014). IFNgamma inhibits Th17 differentiation and function via Tbet-dependent and Tbet-independent mechanisms. *Journal of neuroimmunology* 267, 20-27.
659. Garib, F.Y., and Rizopulu, A.P. (2015). T-Regulatory Cells as Part of Strategy of Immune Evasion by Pathogens. *Biochimica 80*, 957-971.

660. Benjamin, D., Park, C.D., and Sharma, V. (1994). Human B cell interleukin 10. *Leukemia & lymphoma* 12, 205-210.
661. Muti, G., Mancini, V., Ravelli, E., and Morra, E. (2005). Significance of Epstein-Barr virus (EBV) load and interleukin-10 in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Leukemia & lymphoma* 46, 1397-1407.
662. Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.M., Wang, W., Song, Z.G., Hu, Y., Tao, Z.W., Tian, J.H., Pei, Y.Y., et al. (2020). Author Correction: A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 580, E7.
663. Abd El-Aziz, T.M., and Stockand, J.D. (2020). Recent progress and challenges in drug development against COVID-19 coronavirus (SARS-CoV-2) - an update on the status. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 83, 104327.
664. Cappello, F., Gammazza, A.M., Dieli, F., de, M., and Macario, A.J. (2020). Does SARS-CoV-2 Trigger Stress-Induced Autoimmunity by Molecular Mimicry? A Hypothesis. *Journal of clinical medicine* 9.
665. Tu, Y.F., Chien, C.S., Yarmishyn, A.A., Lin, Y.Y., Luo, Y.H., Lin, Y.T., Lai, W.Y., Yang, D.M., Chou, S.J., Yang, Y.P., et al. (2020). A Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials. *International journal of molecular sciences* 21.
666. Rodriguez, Y., Novelli, L., Rojas, M., De Santis, M., Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D.M., Ramirez-Santana, C., Costanzo, A., Ridgway, W.M., Ansari, A.A., et al. (2020). Autoinflammatory and autoimmune conditions at the crossroad of COVID-19. *Journal of autoimmunity*, 102506.
667. Matheson, N.J., and Lehner, P.J. (2020). How does SARS-CoV-2 cause COVID-19? *Science* 369, 510-511.
668. Kanduc, D., and Shoenfeld, Y. (2020). On the molecular determinants of the SARS-CoV-2 attack. *Clinical immunology* 215, 108426.
669. Lucchese, G., and Floel, A. (2020). Molecular mimicry between SARS-CoV-2 and respiratory pacemaker neurons. *Autoimmunity reviews* 19, 102556.
670. Angileri, F., Legare, S., Marino Gammazza, A., Conway de Macario, E., JI Macario, A., and Cappello, F. (2020). Molecular mimicry may explain multi-organ damage in COVID-19. *Autoimmunity reviews* 19, 102591.
671. Helms, J., Tacquard, C., Severac, F., Leonard-Lorant, I., Ohana, M., Delabranche, X., Merdji, H., Clere-Jehl, R., Schenck, M., Fagot Gandet, F., et al. (2020). High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive care medicine* 46, 1089-1098.
672. van Paassen, P., Duijvestijn, A., Debrus-Palmans, L., Damoiseaux, J., Vroomen, M., and Tervaert, J.W. (2007). Induction of endothelial cell apoptosis by IgG antibodies from SLE patients with nephropathy: a potential role for anti-

- endothelial cell antibodies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1108, 147-156.
673. Dieude, M., Correa, J.A., Neville, C., Pineau, C., Levine, J.S., Subang, R., Landolt-Marticorena, C., Su, J., Kassis, J., Solymoss, S., et al. (2011). Association of autoantibodies to heat-shock protein 60 with arterial vascular events in patients with antiphospholipid antibodies. *Arthritis and rheumatism* 63, 2416-2424.
674. Angileri, F., Legare, S., Marino Gammazza, A., Conway de Macario, E., Macario, A.J.L., and Cappello, F. (2020). Is molecular mimicry the culprit in the autoimmune haemolytic anaemia affecting patients with COVID-19? *British journal of haematology* 190, e92-e93.
675. Lazarian, G., Quinquenel, A., Bellal, M., Siavellis, J., Jacquy, C., Re, D., Merabet, F., Mekinian, A., Braun, T., Damaj, G., et al. (2020). Autoimmune haemolytic anaemia associated with COVID-19 infection. *British journal of haematology* 190, 29-31.
676. Megremis, S., Walker, T.D.J., He, X., Ollier, W.E.R., Chinoy, H., Hampson, L., Hampson, I., and Lamb, J.A. (2020). Antibodies against immunogenic epitopes with high sequence identity to SARS-CoV-2 in patients with autoimmune dermatomyositis. *Annals of the rheumatic diseases* 79, 1383-1386.
677. Toscano, G., Palmerini, F., Ravaglia, S., Ruiz, L., Invernizzi, P., Cuzzoni, M.G., Franciotta, D., Baldanti, F., Daturi, R., Postorino, P., et al. (2020). Guillain-Barre Syndrome Associated with SARS-CoV-2. *The New England journal of medicine* 382, 2574-2576.
678. Verdoni, L., Mazza, A., Gervasoni, A., Martelli, L., Ruggeri, M., Ciuffreda, M., Bonanomi, E., and D'Antiga, L. (2020). An outbreak of severe Kawasaki-like disease at the Italian epicentre of the SARS-CoV-2 epidemic: an observational cohort study. *Lancet* 395, 1771-1778.
679. Lyons-Weiler, J. (2020). Pathogenic priming likely contributes to serious and critical illness and mortality in COVID-19 via autoimmunity. *Journal of translational autoimmunity* 3, 100051.
680. Ahmed, S.F., Quadeer, A.A., and McKay, M.R. (2020). Preliminary Identification of Potential Vaccine Targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies. *Viruses* 12.
681. Baruah, V., and Bose, S. (2020). Immunoinformatics-aided identification of T cell and B cell epitopes in the surface glycoprotein of 2019-nCoV. *Journal of medical virology* 92, 495-500.
682. Bhattacharya, M., Sharma, A.R., Patra, P., Ghosh, P., Sharma, G., Patra, B.C., Lee, S.S., and Chakraborty, C. (2020). Development of epitope-based peptide vaccine against novel coronavirus 2019 (SARS-COV-2): Immunoinformatics approach. *Journal of medical virology* 92, 618-631.

683. Grifoni, A., Sidney, J., Zhang, Y., Scheuermann, R.H., Peters, B., and Sette, A. (2020). A Sequence Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses to SARS-CoV-2. *Cell host & microbe* 27, 671-680 e672.
684. Lee, C.H., and Koohy, H. (2020). In silico identification of vaccine targets for 2019-nCoV. *F1000Research* 9, 145.
685. Robson, B. (2020). Computers and viral diseases. Preliminary bioinformatics studies on the design of a synthetic vaccine and a preventative peptidomimetic antagonist against the SARS-CoV-2 (2019-nCoV, COVID-19) coronavirus. *Computers in biology and medicine* 119, 103670.
686. Santoni, D., and Vergni, D. (2020). In the search of potential epitopes for Wuhan seafood market pneumonia virus using high order nullomers. *Journal of immunological methods* 481-482, 112787.
687. Tilocca, B., Soggiu, A., Musella, V., Britti, D., Sanguinetti, M., Urbani, A., and Roncada, P. (2020). Molecular basis of COVID-19 relationships in different species: a one health perspective. *Microbes and infection* 22, 218-220.
688. Zheng, M., and Song, L. (2020). Novel antibody epitopes dominate the antigenicity of spike glycoprotein in SARS-CoV-2 compared to SARS-CoV. *Cellular & molecular immunology* 17, 536-538.
689. Jiang, S., Du, L., and Shi, Z. (2020). An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. *Emerging microbes & infections* 9, 275-277.
690. Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y., and Zhou, Q. (2020). Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* 367, 1444-1448.
691. Gentile, F., Conte, M., and Formisano, S. (2004). Thyroglobulin as an autoantigen: what can we learn about immunopathogenicity from the correlation of antigenic properties with protein structure? *Immunology* 112, 13-25.
692. Amagai, M., Koch, P.J., Nishikawa, T., and Stanley, J.R. (1996). Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *The Journal of investigative dermatology* 106, 351-355.
693. Lindstrom, J. (2002). Autoimmune diseases involving nicotinic receptors. *Journal of neurobiology* 53, 656-665.
694. Henry, M., Malthiery, Y., Zanelli, E., and Charvet, B. (1990). Epitope mapping of human thyroglobulin. Heterogeneous recognition by thyroid pathologic sera. *Journal of immunology* 145, 3692-3698.
695. Futei, Y., Amagai, M., Sekiguchi, M., Nishifuji, K., Fujii, Y., and Nishikawa, T. (2000). Use of domain-swapped molecules for conformational epitope mapping

- of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris. *The Journal of investigative dermatology* 115, 829-834.
696. Kawasaki, H., Tsunoda, K., Hata, T., Ishii, K., Yamada, T., and Amagai, M. (2006). Synergistic pathogenic effects of combined mouse monoclonal anti-desmoglein 3 IgG antibodies on pemphigus vulgaris blister formation. *The Journal of investigative dermatology* 126, 2621-2630.
697. Muller, R., Svoboda, V., Wenzel, E., Muller, H.H., and Hertl, M. (2008). IgG against extracellular subdomains of desmoglein 3 relates to clinical phenotype of pemphigus vulgaris. *Experimental dermatology* 17, 35-43.
698. Amagai, M., Karpati, S., Prussick, R., Klaus-Kovtun, V., and Stanley, J.R. (1992). Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *The Journal of clinical investigation* 90, 919-926.
699. Dworschak, J., Recke, A., Freitag, M., Ludwig, R.J., Langenhan, J., Kreuzer, O.J., Zillikens, D., and Schmidt, E. (2012). Mapping of B cell epitopes on desmoglein 3 in pemphigus vulgaris patients by the use of overlapping peptides. *Journal of dermatological science* 65, 102-109.
700. Payne, A.S., Ishii, K., Kacir, S., Lin, C., Li, H., Hanakawa, Y., Tsunoda, K., Amagai, M., Stanley, J.R., and Siegel, D.L. (2005). Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. *The Journal of clinical investigation* 115, 888-899.
701. Tilocca, B., Soggiu, A., Sanguinetti, M., Babini, G., De Maio, F., Britti, D., Zecconi, A., Bonizzi, L., Urbani, A., and Roncada, P. (2020). Immunoinformatic analysis of the SARS-CoV-2 envelope protein as a strategy to assess cross-protection against COVID-19. *Microbes and infection* 22, 182-187.
702. Abdelmageed, M.I., Abdelmoneim, A.H., Mustafa, M.I., Elfadol, N.M., Murshed, N.S., Shantier, S.W., and Makhawi, A.M. (2020). Design of a Multi-epitope-Based Peptide Vaccine against the E Protein of Human COVID-19: An Immunoinformatics Approach. *BioMed research international* 2020, 2683286.
703. Vaughan, K., Kim, Y., and Sette, A. (2012). A comparison of epitope repertoires associated with myasthenia gravis in humans and nonhuman hosts. *Autoimmune diseases* 2012, 403915.
704. Townsend, A. (2020). Autoimmunity to ACE2 as a possible cause of tissue inflammation in Covid-19. *Medical hypotheses* 144, 110043.
705. McMillan, P., and Uhal, B.D. (2020). COVID-19-A theory of autoimmunity to ACE-2. *MOJ immunology* 7, 17-19.
706. Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., et al. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 581, 215-220.

707. Marino Gammazza, A., Legare, S., Lo Bosco, G., Fucarino, A., Angileri, F., Conway de Macario, E., Macario, A.J., and Cappello, F. (2020). Human molecular chaperones share with SARS-CoV-2 antigenic epitopes potentially capable of eliciting autoimmunity against endothelial cells: possible role of molecular mimicry in COVID-19. *Cell stress & chaperones* 25, 737-741.
708. Pfister, G., Stroh, C.M., Perschinka, H., Kind, M., Knoflach, M., Hinterdorfer, P., and Wick, G. (2005). Detection of HSP60 on the membrane surface of stressed human endothelial cells by atomic force and confocal microscopy. *Journal of cell science* 118, 1587-1594.
709. Zampieri, S., Ghirardello, A., Iaccarino, L., Tarricone, E., Gambari, P.F., and Doria, A. (2005). Anti-Jo-1 antibodies. *Autoimmunity* 38, 73-78.
710. Gallay, L., Gayed, C., and Hervier, B. (2018). Antisynthetase syndrome pathogenesis: knowledge and uncertainties. *Current opinion in rheumatology* 30, 664-673.
711. Robbins, A., Hentzien, M., Toquet, S., Didier, K., Servettaz, A., Pham, B.N., and Giusti, D. (2019). Diagnostic Utility of Separate Anti-Ro60 and Anti-Ro52/TRIM21 Antibody Detection in Autoimmune Diseases. *Frontiers in immunology* 10, 444.
712. Gapud, E.J., Seo, P., and Antiochos, B. (2017). ANCA-Associated Vasculitis Pathogenesis: A Commentary. *Current rheumatology reports* 19, 15.
713. Yamagiwa, S., Kamimura, H., Takamura, M., and Aoyagi, Y. (2014). Autoantibodies in primary biliary cirrhosis: recent progress in research on the pathogenetic and clinical significance. *World journal of gastroenterology* 20, 2606-2612.
714. Bruschi, A. (2016). The Significance of Anti-Beta-2-Glycoprotein I Antibodies in Antiphospholipid Syndrome. *Antibodies* 5.
715. Lucchese, G. (2020). Epitopes for a 2019-nCoV vaccine. *Cellular & molecular immunology* 17, 539-540.
716. Kanduc, D. (2012). Peptide cross-reactivity: the original sin of vaccines. *Frontiers in bioscience* 4, 1393-1401.
717. Agrawal, A.S., Tao, X., Algaissi, A., Garron, T., Narayanan, K., Peng, B.H., Couch, R.B., and Tseng, C.T. (2016). Immunization with inactivated Middle East Respiratory Syndrome coronavirus vaccine leads to lung immunopathology on challenge with live virus. *Human vaccines & immunotherapeutics* 12, 2351-2356.
718. Tseng, C.T., Sbrana, E., Iwata-Yoshikawa, N., Newman, P.C., Garron, T., Atmar, R.L., Peters, C.J., and Couch, R.B. (2012). Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus. *PLoS one* 7, e35421.

719. Yasui, F., Kai, C., Kitabatake, M., Inoue, S., Yoneda, M., Yokochi, S., Kase, R., Sekiguchi, S., Morita, K., Hishima, T., et al. (2008). Prior immunization with severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *Journal of immunology* *181*, 6337-6348.
720. Deming, D., Sheahan, T., Heise, M., Yount, B., Davis, N., Sims, A., Suthar, M., Harkema, J., Whitmore, A., Pickles, R., et al. (2006). Vaccine efficacy in senescent mice challenged with recombinant SARS-CoV bearing epidemic and zoonotic spike variants. *PLoS medicine* *3*, e525.
721. Krienke, C., Kolb, L., Diken, E., Streuber, M., Kirchhoff, S., Bukur, T., Akilli-Ozturk, O., Kranz, L.M., Berger, H., Petschenka, J., et al. (2021). A noninflammatory mRNA vaccine for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Science* *371*, 145-153.
722. Zhang, Q., Bastard, P., Liu, Z., Le Pen, J., Moncada-Velez, M., Chen, J., Ogishi, M., Sabli, I.K.D., Hodeib, S., Korol, C., et al. (2020). Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* *370*.
723. Kanduc, D., and Shoenfeld, Y. (2020). Molecular mimicry between SARS-CoV-2 spike glycoprotein and mammalian proteomes: implications for the vaccine. *Immunologic research* *68*, 310-313.
724. Zhao, J., Zhao, S., Ou, J., Zhang, J., Lan, W., Guan, W., Wu, X., Yan, Y., Zhao, W., Wu, J., et al. (2020). COVID-19: Coronavirus Vaccine Development Updates. *Frontiers in immunology* *11*, 602256.
725. Prubeta, B.M. (2021). Current State of the First COVID-19 Vaccines. *Vaccines* *9*.
726. Gostin, L.O., Salmon, D.A., and Larson, H.J. (2020). Mandating COVID-19 Vaccines. *Jama*.
727. Kanduc, D. (2009). "Self-nonsself" peptides in the design of vaccines. *Current pharmaceutical design* *15*, 3283-3289.

Παράρτημα Α. Συγκατάθεση ασθενούς για συμμετοχή σε ερευνητική μελέτη



Παράρτημα Α.
Συγκατάθεση ασθενο

Παράρτημα Β. Επίτοποι πρωτεϊνών SARS-CoV-2



Παράρτημα Β.
Επίτοποι πρωτεϊνών

Παράρτημα Γ. Αλληλοεπικάλυψη επιτόπων πρωτεϊνών SARS-CoV-2



Παράρτημα Γ.
Αλληλοεπικάλυψη επι

Παράρτημα Δ. Αποτελέσματα BLAST με ανθρώπινες πρωτεΐνες



Παράρτημα Δ.
Αποτελέσματα BLAST

Παράρτημα Ε. Αποτελέσματα BLAST με αυτοαντιγόνα



Παράρτημα Ε.
Αποτελέσματα BLAST