

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Π.Σ.Ε. ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ:

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΕΠΑΓΩΓΙΚΩΝ ΤΗΣ ΙΝΩΣΗΣ ΣΕ ΒΛΑΒΕΣ ΑΣΘΕΝΩΝ
ΜΕ ΣΚΛΗΡΟΔΕΡΜΙΑ**

ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΓΚΕΛΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΛΑΖΑΡΟΣ Ι. ΣΑΚΚΑΣ,
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ.**

ΛΑΡΙΣΑ 2003

05/05/2003
2520

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 2841/1

Ημερ. Εισ.: 23/06/2004

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ

2003

ΓΚΕ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057009

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή έγινε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Παθολογίας.

Για τη διεκπεραίωση της παρούσης εργασίας θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου:

- Στον κ. Γ. Κουκούλη, Διευθυντή του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, που μας επέτρεψε να χρησιμοποιήσουμε το εργαστήριό του.
- Στον κ. Ι. Γκαρνίδη, Παρασκευαστή του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου, για την πολύτιμη βοήθειά του στη λήψη τομών δέρματος με τη χρήση κρουτόμου.
- Στην κ. Ε. Ζαφειρίου, Ειδικευόμενη στη Δερματολογία, η οποία πραγματοποίησε τις βιοψίες δέρματος στους ασθενείς.
- Στους κ. Σ. Μουνταντωνάκη και Α. Καλογύρου, υποψήφιους Διδάκτορες, για τη συλλογή κλινικών πληροφοριών.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους κ. Γ. Σίμο και Γ.Ν. Κουκούλη, μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, για τις υποδείξεις τους και ιδιαίτερας τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Α. Σακκά για τη συνεχή του καθοδήγηση στην διεκπεραίωση της διπλωματικής αυτής εργασίας.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΣΕΛΙΔΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
2. T- ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗ SSc.....	4
3.ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ T- ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΙΝΩΣΗ.....	5
4.ΑΛΛΕΣ ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΙΝΩΣΗ.....	6
5.ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΤΩΝ T –ΚΥΤΤΑΡΩΝ (TCR) ΣΤΗ SSc.....	7
6.ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΠΟΥ ΕΝΟΧΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗ SSc.....	9
7.T- ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΟΥ SSc.....	10
8.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	11
9.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	12
10. Α)ΑΣΘΕΝΕΙΣ.....	12
11. Β)ΤΕΧΝΙΚΗ: ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ.....	15
12. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	15
13. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	16
14. ΑΛΛΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΗΘΗΚΑΝ.....	17
15. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	17
16. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	19
17. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	24
18. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	25
19. SUMMARY.....	26
20. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	27

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Συστηματική Σκλήρυνση (SSc) είναι χρόνια αυτοάνοση ασθένεια με συχνότητα εμφάνισης 20-30 ανά 100.000 άτομα. Εμφανίζεται συχνότερα σε γυναίκες, ιδίως μέσης και μεγαλύτερης ηλικίας (1), με αναλογία ως προς τους άνδρες 9:1 (2). Είναι ένα πολυσυστηματικό νόσημα που επηρεάζει κυρίως το δέρμα αλλά και άλλα όργανα συμπεριλαμβανομένων των πνευμόνων, του γαστρεντερικού σωλήνα, των νεφρών και της καρδιάς (1,3,4,5,6).

Κύριο χαρακτηριστικό της ασθένειας είναι η υπέρμετρη παραγωγή κολλαγόνου στα παραπάνω όργανα. Στο δέρμα, η εναπόθεση κολλαγόνου οδηγεί στη σκλήρυνσή του, η οποία αποτελεί και την πιο χαρακτηριστική εκδήλωση (7,2). Άλλα χαρακτηριστικά της νόσου είναι η μικροαγγειακή βλάβη με επεισοδιακή αγγειοσύσπαση που προκαλεί το φαινόμενο Raynaud και η παραγωγή αυτοαντισωμάτων (8). Η SSc μπορεί να οδηγεί σε σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα (9,10,11), αφού η θεραπεία που εφαρμόζεται είναι κυρίως αναποτελεσματική.

Η νόσος μπορεί να ταξινομηθεί σύμφωνα με το βαθμό και την έκταση σκλήρυνσης του δέρματος (Πίνακας 1).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΣΚΛΗΡΟΔΕΡΜΑΤΟΣ (7)
Εντοπισμένο σκληρόδερμα
Συστηματική σκλήρυνση (Συστηματικό Σκληρόδερμα) (SSc)
Διάχυτη SSc (dSSc)
Περιορισμένη SSc (πρώην σύνδρομο CREST) (ISSc)
Συστηματική σκλήρυνση χωρίς σκληρόδερμα

Η αιτιολογία της νόσου είναι άγνωστη αν και έχουν αναφερθεί συγκεκριμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες που είναι ικανοί να προκαλέσουν σκληρυντικές αλλαγές (8). Οι παθογενετικοί μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτές τις αλλαγές παραμένουν ασαφείς. Υπάρχουν στοιχεία για ενεργοποίηση ινοβλαστών, μονοκυττάρων, ενδοθηλιακών κυττάρων, ηωσινοφιλών και Β-κυττάρων στη SSc. Κοινό στοιχείο και

στα τρία χαρακτηριστικά της ασθένειας, φαίνεται να είναι η εμπλοκή των T-κυττάρων (3,12).

Εξέταση ιστών από σκληροδερματικούς ασθενείς δείχνουν ότι η έναρξη της νόσου χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων και ινοβλαστών και ιστική διήθηση από ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος κυρίως στις περιαγγειακές περιοχές (3).

Καθώς η ασθένεια εξελίσσεται, η βλάβη των αγγείων καθίσταται εμφανής, με στένωση, θρόμβωση και ίνωση των μικρών αρτηριών και τριχοειδών (4). Η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων φαίνεται από την έκφραση E-σελεκτίνης (13-15), TGFβ (16) και ενδοθηλίνης-1 (17,18).

Παρομοίως έχουμε διαδικασίες ενεργοποίησης ινοβλαστών που οδηγούν σε ιστική ίνωση, με εναπόθεση υπερβολικής εξωκυττάριας ουσίας (3). Η ενεργοποίηση ινοβλαστών αποδεικνύεται από την υπέρμετρη παραγωγή κολλαγόνου, φιμπρονεκτίνης και πρωτεογλυκανών (19), πρωτοογκογονιδίου c-myc (8), IL-1 (20) και μορίων προσκόλλησης, όπως ο ICAM-1 (21).

Η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού μπορεί να είναι ένα βασικό γεγονός στην έναρξη ή στην διαίωσιση της αγγειοπάθειας των μικρών αγγείων και στην ίνωση που παρατηρείται στους ασθενείς με SSc. Αυξημένη παραγωγή στο περιφερικό αίμα ανιόντος υπεροξειδίου (22), IL-6 (23), IL-1 και TGFβ (24), υποδηλώνουν ενεργοποίηση μονοκυττάρων, ενώ παρατηρείται επίσης ενεργοποίηση ηωσινοφίλων (25), μαστοκυττάρων (13) και T-κυττάρων. Ενεργοποιημένα στρογγυλοκύτταρα, κυρίως μακροφάγα και T-κύτταρα (26), εισβάλλουν στους ιστούς πρώιμα κατά την εξέλιξη της SSc στον άνθρωπο (3,27,28) και είναι ικανά να εκκρίνουν κυτταροκίνες και άλλους παράγοντες που μπορούν να ενεργοποιήσουν ή να βλάψουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τους ινοβλάστες (3,26).

Η υπεργαμμασφαιριναιμία και η ανίχνευση αυτοαντισώματων ειδικών για την ασθένεια, όπως τα αντισώματα έναντι της DNA τοποϊσομεράσης I, υποδηλώνουν επαγωγή και της χυμικής ανοσίας στη SSc (8). Παρόλα αυτά, πρωτοπαθής ενεργοποίηση κυττάρων δεν είναι γνωστή.

Πρόσφατα αναφέρθηκε η παρουσία ολιγοκλωνικών T-κυττάρων σε βιοψίες δέρματος ασθενών με SSc (29). Αυτό έγινε με κλωνοποίηση και ανάλυση αλληλουχίας μεταγράφων της β-αλυσίδας του υποδοχέα αντιγόνου των T-κυττάρων (T-Cell antigen Receptor, TCR), όπου βρέθηκε μεγάλο ποσοστό εντελώς ίδιων TCR μεταγράφων, υποδηλώνοντας έτσι την ύπαρξη ολιγοκλωνικών ή μονοκλωνικών T-

κυττάρων σε σκληροδερματικές βλάβες (29). Ο μόνος μηχανισμός, που θα μπορούσε να δώσει μια ικανοποιητική εξήγηση στην κλωνική ανάπτυξη των T-λεμφοκυττάρων είναι η ενεργοποίησή τους ως αναγνώριση συγκεκριμένου αντιγόνου. Τα αποτελέσματα αυτά φέρνουν στο προσκήνιο το σημαντικό ρόλο των T-κυττάρων στην παθογένεια της ασθένειας. Η SSc μπορεί να είναι ασθένεια που προκαλείται από συγκεκριμένο αντιγόνο.

T- ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗ SSc

Πολλά στοιχεία υποδηλώνουν τη σημασία των T-κυττάρων στην παθογένεια της SSc. Σε δύο εργασίες διαδοχικές βιοψίες δέρματος από ασθενείς με SSc έδειξαν διήθηση από στρογγυλοκύτταρα, που αποτελείται από T-κύτταρα και μακροφάγα (30,31) και εμφανίζεται στο δέρμα πρώιμα ακόμα και πριν τη μικροσκοπική εμφάνιση της ίνωσης (30). Επίσης, T-κύτταρα μνήμης ανευρίσκονται σε βιοψίες πνεύμονα ασθενών με SSc και προσβολή των πνευμόνων (32).

Ευρήματα που υποδηλώνουν την ενεργοποίηση των T-κυττάρων είναι: **α)** η παρουσία ορισμένων μορίων ενεργοποίησης στην κυτταρική επιφάνεια των T-λεμφοκυττάρων του αίματος όπως ο υποδοχέας της IL-2 (IL-2R) (4,12,33,34), HLA-DR (35) και CD-29 (12,33,34,36-38), **β)** τα αυξημένα επίπεδα κυτοκινών που παράγονται από τα T-λεμφοκύτταρα, όπως IL-2 (39-42), IL-4, IL-6 (39-41), IL-17 (43), **γ)** η αυξημένη έκφραση πρωτοογκογονιδίων (12,44), **δ)** η αυξημένη συχνότητα T-κυττάρων με μετάλλαξη του γονιδίου της φωσφοριβοσυλ-τρανσφεράσης υποξανθίνης-γουανίνης (HPRT, Hypoxanthine Guanine Phosphorybosyl Transferase) (45) και αυξημένη δραστηριότητα δεαμινάσης της αδενοσίνης (46), **ε)** τα αυξημένα επίπεδα διαλυτού IL-2R (sIL-2R) σε υγρό φυσαλίδας προκλητής στο προσβεβλημένο δέρμα ασθενών με SSc (47).

Τα T-κύτταρα έχει δειχθεί ότι είναι αναγκαία για την παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι της τοποϊσομεράσης, που είναι ειδικά για τη SSc (3,4,12,33,48). Επιπροσθέτως, στοιχεία για την εμπλοκή των T-κυττάρων στην SSc προέρχονται από δυο νόσους που μοιάζουν με το SSc: το σκληρόδερμα πτηνών (3,49) και την νόσο μοσχεύματος κατά ξενιστή (chronic Graft-Versus-Host Disease, GVHD) σε ανθρώπους και ποντίκια. Η τελευταία νόσος χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση T-κυττάρων (3,49,50) και αυξημένη συχνότητα αντισωμάτων έναντι της

τοποϊσομεράσης 1 και των HLA αλληλίων που συσχετίζονται με την ανθρώπινη SSc (50).

Θεραπείες που έχουν ως στόχο τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα, όπως Κυκλοσπορίνη-A (51,52) και tacrolimus (52), έχουν ωφέλιμες επιδράσεις στην ελαστικότητα δέρματος σε ασθενείς με SSc.

ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ T- ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΙΝΩΣΗ

Τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα και οι κυτοκίνες τους μπορούν να εξηγήσουν και τα τρία χαρακτηριστικά γνωρίσματα της νόσου: την ίνωση, την μικροαγγειακή ινοενδοθηλιακή βλάβη και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Ανάλογα με τις κυτοκίνες που εκκρίνουν τα T-κύτταρα χωρίζονται σε δυο τύπους: τα TH-1 T-κύτταρα, που παράγουν INF- γ και IL-2 και τα TH-2, που εκκρίνουν IL-4 και IL-5 (53-57).

Η IL-4 είναι μια κυτοκίνη που επάγει την ίνωση. Διεγείρει τη σύνθεση κολλαγόνου, φμπρονεκτίνης, γλυκοσαμινογλυκάνης και πρωτεογλυκάνης (58-61) *in vitro*. Υπερέκφραση του γονιδίου της IL-4 σε παγκρεατικά κύτταρα Langerhans διαγονιδιακών ποντικών έχει ως αποτέλεσμα την τοπική ίνωση (62). Επιπλέον, χορήγηση αντι-IL-4 MoAb προλαμβάνει την GVHD σε ποντίκια, με συνακόλουθο περιορισμό της ηπατικής ίνωσης (63) και μειώνει φανερά την ηπατική ίνωση σε ποντίκια που έχουν μολυνθεί από το παράσιτο σχιστόσωμα (64). Τέλος, η IL-4 επάγει την παραγωγή μιας άλλης κυτοκίνης που προκαλεί ίνωση, του παράγοντα TGF β (Transforming Growth Factor β) (65) και διεγείρει την έκφραση του αγγειακού μορίου προσκόλλησης (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) στα ενδοθηλιακά κύτταρα (66).

Στη SSc ενεργοποιούνται τα TH2 κύτταρα. Έτσι, τα επίπεδα της IL-4 στο πλάσμα είναι αυξημένα σε πολλούς ασθενείς με SSc (39-41,67). Οι Sakkas et al έχουν βρει αυξημένα επίπεδα εναλλακτικά ματισμένων μεταγράφων της IL-4 (IL-4 δ) σε στρογγυλοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με SSc (41). Όπως στο αίμα, έτσι και στις βιοψίες δέρματος και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (bronchoalveolar lavage, BAL), τα T-λεμφοκύτταρα εμφανίζουν έναν TH2 προσανατολισμό. Έτσι, CD8 T κύτταρα από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με SSc παράγουν κυρίως IL-4, ενώ στους υγιείς μάρτυρες παράγεται INF γ (68).

Αντίθετα με την IL-4, η INF γ αναστέλλει τη σύνθεση κολλαγόνου από τους ινοβλάστες *in vitro* (61,69) και *in vivo* στα ποντίκια (70). Η INF γ μπορεί να έχει

ευεργετική επίδραση σε ασθενείς με SSc (71-74). Η σημασία των κυτοκινών, που παράγονται από τα TH1 ή τα TH2 κύτταρα στην ίνωση, υποστηρίζεται από το εύρημα ότι τα MRL/lpr ποντίκια, στα οποία υπάρχει έλλειψη του γονιδίου του υποδοχέα της INF γ , εκδηλώνουν ένα σύνδρομο που μοιάζει με το ανθρώπινο SSc (75).

Η IL-17, μια κυτοκίνη των T-κυττάρων που μπορεί να παράγεται και από τα TH1 και από τα TH2 κύτταρα (76), υπερεκφράζεται στο περιφερικό αίμα και στις δερματικές βλάβες ασθενών με SSc (43). Η IL-17 διεγείρει τον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών (43) και προκαλεί την παραγωγή IL-6 από τους ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα (77), καθώς και την παραγωγή IL-1 και μορίων προσκόλλησης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (43).

ΆΛΛΕΣ ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΙΝΩΣΗ

Εκτός από την IL-4, μια άλλη κύρια κυτοκίνη που επάγει την ίνωση στη SSc είναι ο TGF β 1 (78-81). Ο TGF β 1 παράγεται από πολλούς κυτταρικούς τύπους και μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση ινοβλαστών και υπερπλασία, καθώς και αυξημένη σύνθεση κολλαγόνου και φιβρονεκτίνης (78,79). Όταν ο TGF β αναστέλλεται με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων, μειώνεται και η μεταγραφή του γονιδίου του κολλαγόνου (82). Ένα άλλο στοιχείο που ενισχύει την άποψη ότι ο TGF β παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της SSc, είναι τα αυξημένα επίπεδα συνεντοπισμού TGF- β ₂ mRNA και pro α ₁(I) mRNA στις φλεγμονώδεις διηθήσεις δέρματος ασθενών με SSc στην πρόιμη φάση της ασθένειας (3). Ινοβλάστες δέρματος ασθενών με SSc μπορούν να παράγουν TGF β κατά τρόπο όμοιο με τους ινοβλάστες του φυσιολογικού δέρματος, αλλά εκφράζουν μεγαλύτερα επίπεδα υποδοχέων τύπου I και II του TGF β (82,84). Η IL-1, που παράγεται από τα μονοκύτταρα και τους ινοβλάστες στη SSc, μπορεί να επάγει την παραγωγή από τους ινοβλάστες IL-6 και PDGF (Platelet Derived Growth Factor) (85). Η IL-1 α εκφράζεται σε ινοβλάστες στη SSc, αλλά δεν ανιχνεύεται σε φυσιολογικούς ινοβλάστες, ενώ αναστολή ενδογενούς IL-1 α οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα IL-6 και έκφραση PDGF-A σε ινοβλάστες στη SSc (83). Ο PDGF, ένας ισχυρός διεγέρτης της σύνθεσης κολλαγόνου, είναι επίσης αυξημένος στη SSc (80) και μπορεί να αυξάνεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά από ενεργοποίηση του συμπληρώματος (86) ή από την υποξία (87). Η επαγωγή παραγωγής κολλαγόνου από τους ινοβλάστες που

προκαλεί ο TGFβ μπορεί να επιτυγχάνεται δια μέσου αύξησης των υποδοχέων του PDGF (80).

Αυξημένα επίπεδα IL-6 στον ορό ανευρίσκονται σε ασθενείς με SSc (88). Η IL-6, που μπορεί να προκαλεί την TH2 διαφοροποίηση (89), αυξάνεται υπό την επίδραση της IL-1 (85), της IL-17 (77) ή του PDGF (90) σε ινοβλάστες ασθενών με SSc. Ο παράγοντας αύξησης του συνδετικού ιστού (Connective Tissue Growth Factor, CTGF), ένας χημειοτακτικός παράγοντας και μιτογόνο για τους ινοβλάστες (91,92,93), εμφανίζεται αυξημένος στον ορό ασθενών με SSc (91,94). Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CTGF γονιδίου και της σκλήρυνσης του δέρματος, η οποία υποστηρίζει την υπόθεση ότι ο TGFβ παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της SSc, αφού ο TGFβ είναι ο μόνος επαγωγέας του CTGF που έχει αναγνωριστεί έως σήμερα (95). Αυξημένα είναι επίσης και τα επίπεδα στον ορό της χημειοτακτικής πρωτεΐνης-1 των μονοκυττάρων (Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1), του MIP-1 (Macrophage Inflammatory Protein-1) (96) και του TNFα (97).

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΤΩΝ T –ΚΥΤΤΑΡΩΝ (TCR) ΣΤΗ SSc

Μέχρι προσφάτως δεν ήταν γνωστό εάν στη SSc τα T-κύτταρα ενεργοποιούνται μη ειδικά (από κυτοκίνες) ή ειδικά (από συγκεκριμένο αντιγόνο). Γενικά, τα T-κύτταρα χρησιμοποιούν τους αντιγονικούς υποδοχείς (TCR) για αναγνώριση αντιγονικών πεπτιδίων και σε συνδυασμό με HLA προκαλούν την έναρξη της ανοσιακής απάντησης. Δύο διαφορετικοί TCR έχουν αναφερθεί: ο αβTCR και ο γδTCR, που εκφράζονται σε μικρή αναλογία (συνήθως <10%) στα T- κύτταρα του περιφερικού αίματος. Και οι τέσσερις αλυσίδες του TCR είναι έντονα πολυμορφικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulin-like transmembrane proteins). Η μεταβλητή περιοχή του γονιδίου της α-αλυσίδας αποτελείται από Va και Ja τμήματα ενώ η μεταβλητή περιοχή του γονιδίου της β-αλυσίδας από Vβ, Dβ και Jβ τμήματα. Υπάρχουν τουλάχιστον 65 Vβ και περίπου 42 Va λειτουργικά τμήματα του γονιδίου (98,99), που ομαδοποιούνται σε 26Vβ και 32Va οικογένειες. Η τεράστια ποικιλία των TCR προκαλείται από: α) διαφορετικούς ανασυνδυασμούς των διαφόρων μεταβλητών (V), ποικίλων (D) και συνδετικών (J) τμημάτων των γονιδίου, β) όχι επακριβής V (D) J σύνδεση, γ) προσθήκη εκμαγειο-ανεξάρτητων νουκλεοτιδίων (template-independent nucleotides) (ετερογένεια N περιοχής) στις V (D) J συνδέσεις και δ) χρησιμοποίηση δύο ή περισσότερων Dβ

τμημάτων. Σε αναλογία με τις Ig υπερμεταβλητές περιοχές των ανοσοσφαιρινών, οι αντίστοιχες Va και Vβ υπερμεταβλητές περιοχές ονομάζονται περιοχές που ορίζουν τη συμπληρωματικότητα (CDR, complementarity determining regions), CDR1, CDR2 και CDR3. Οι CDR1 και CDR2 κωδικοποιούνται από Va και Vβ τμήματα του γονιδίου και το CDR3 δημιουργεί επαφές με το πεπτίδιο (100,101).

Ο πληθυσμός των T-κυττάρων αποτελείται από μεγάλο αριθμό διαφορετικών κλώνων T-κυττάρων, κάθε ένας εκ των οποίων εκφράζει διαφορετικό TCR. Ο μέγιστος θεωρητικός αριθμός διαφορετικών μεταγραφών της β-αλυσίδας του TCR έχει υπολογιστεί ότι είναι περίπου 10^{12} (102). Η πιθανότητα τυχαίας ανεύρεσης πολλαπλών ταυτόσημων αντιγράφων (δύο ή περισσότερων) ενός μεταγράφου συγκεκριμένης β-αλυσίδας TCR σε ένα ανεξάρτητο δείγμα T-κυττάρων, είναι πολύ μικρή ή αμελητέα.

Τα T-κύτταρα μπορεί να ενεργοποιούνται, ή να πολλαπλασιάζονται, είτε με μη ειδικό τρόπο, είτε ως απάντηση σε συγκεκριμένο αντιγόνο. Μη ειδική ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμός των T-κυττάρων μπορεί να συμβαίνει in vivo, ως απάντηση σε κυτοκίνες ή μιτογόνα και να έχει ως αποτέλεσμα έναν ετερογενή, πολυκλωνικό πληθυσμό T-κυττάρων. Καθένα από αυτά τα κύτταρα θα εκφράζει μοναδικό (διαφορετικό) TCR. Ενεργοποίηση που προκαλείται λόγω απάντησης σε υπεραντιγόνα, είναι επίσης πιθανή και θα έχει ως αποτέλεσμα την πολυκλωνική ενεργοποίηση των T-κυττάρων, τα οποία θα χρησιμοποιήσουν περιορισμένο αριθμό των Vβ τμημάτων και μοναδικό CDR3. Ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμός έναντι συγκεκριμένου αντιγόνου θα έχει ως αποτέλεσμα την κλωνική επέκταση μόνο εκείνων των κλώνων των T-κυττάρων που αναγνωρίζουν αυτό το συγκεκριμένο αντιγόνο μέσω του TCR τους. Μια τέτοια κλωνική επέκταση, που καθοδηγείται από ένα συγκεκριμένο αντιγόνο, θα αναγνωριστεί από την παρουσία πολλαπλών πανομοιότυπων TCR μεταγραφών. Αυτό δείχνει ξεκάθαρα την παρουσία μονοκλωνικού ή ολιγοκλωνικού πληθυσμού T-κυττάρων. Μια τέτοια ολιγοκλωνική επέκταση βρέθηκε πρόσφατα σε δερματικές βλάβες ασθενών με SSc από τους Sakkas et al (29). Παρομοίως, σε BAL ασθενών με SSc ανιχνεύονται CD8⁺ T-κύτταρα με συγκεκριμένα συνδετικά τμήματα (J) του TCR, γεγονός που υποδηλώνει μια ολιγοκλωνική επέκταση των κυττάρων αυτών (103).

Χρήση περιορισμένων Vβ τμημάτων του γονιδίου του TCR παρατηρείται επίσης σε CD4(-) CD8(-) T κύτταρα περιφερικού αίματος σε ασθενείς με SSc (104). Εκτός από τα αβ T-κύτταρα και γδ T-κύτταρα βρέθηκαν να εμφανίζουν στοιχεία

ενεργοποίησης και ολιγοκλωνικής επέκτασης. Αυξημένη αναλογία των Vδ1 T-κυττάρων του περιφερικού αίματος, τα οποία ενεργοποιήθηκαν μετά από έκθεση σε αντιγόνο (105) και περιορισμένα μήκη συνδετικών περιοχών (J) (junctional region lengths) βρέθηκε ότι δεν έχουν κανονική κατανομή. Αυτό υποδηλώνει ολιγοκλωνικό πολλαπλασιασμό των TCRγδ κυττάρων (106). Έχουν, επίσης, αναφερθεί μη-γαμετικοί (non-germline) ανασυνδυασμοί της γ-αλυσίδας του TCR (111) που υποδηλώνουν την παρουσία ολιγοκλωνικών γδ T-κυττάρων.

ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΠΟΥ ΕΝΟΧΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗ SSc.

Το αντιγόνο ή τα αντιγόνα που οδηγούν σε ενεργοποίηση και κλωνική επέκταση των T-κυττάρων στη SSc δεν είναι γνωστά. Στα υποψήφια αντιγόνα συμπεριλαμβάνεται η DNA-τοποϊσομεράση I (3,4,26,108), ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV) (3,109,110) οι ρετροϊοί (3,111), αλλά και το κεντρομερίδιο, (3,4,6,26) η RNA πολυμεράση I, (3,4) η RNA πολυμεράση III, (3,26) ένα αντιγόνο που αναφέρεται ως PM-Scl και U3 ριβονουκλεοπρωτεϊνικά συστήματα (3,7).

Τα T-κύτταρα είναι απαραίτητα για την παραγωγή αντισωμάτων έναντι της τοποϊσομεράσης I (20). Περαιτέρω, στα T-κύτταρα, που δρουν έναντι της DNA τοποϊσομεράσης I, παρατηρούνται συγκεκριμένες CDR3 περιοχές του TCR (108). Παρόλα αυτά, πανομοιότυπες CDR3 αλληλουχίες του TCR παρατηρήθηκαν και σε T-κύτταρα που δρουν έναντι της DNA τοποϊσομεράσης I σε υγιή άτομα (108). Η πιθανότητα να είναι ένα αυτοαντιγόνο για τα B-κύτταρα και αυτοαντιγόνο για τα T-κύτταρα στη SSc υποστηρίζεται από ευρήματα που δείχνουν ότι υπάρχει μεγαλύτερος συσχετισμός HLA με αυτοαντισωματικά προφίλ, παρά με την ασθένεια αυτή καθεαυτή (112-115). Συγκεκριμένα HLA-DQ και -DR αλληλία σε ασθενείς, βρέθηκε να σχετίζονται με υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων έναντι της τοποϊσομεράσης (116) και επομένως αυτοαντιδράσεις με την DNA τοποϊσομεράση I να σχετίζονται με τα αλληλία αυτά (113,116). Επίσης παρατηρήθηκε συσχέτιση συγκεκριμένων HLA-DQ αλληλίων με αντικεντρομεριδιακά αντισώματα (3,117). Η παραγωγή αντικεντρομεριδιακών αντισωμάτων φαίνεται ότι σχετίζεται με HLA-DQB1 αλληλία (3).

Αναμφίβολα ο γονότυπος του ξενιστή παίζει ρόλο στην ύπαρξη ευαισθησίας για την ανάπτυξη αυτοάνοσων ασθενειών (118). Ο γονότυπος HLA DRB1*03 βρέθηκε ότι εμφανίζεται συχνά μεταξύ των Καυκασίων σε πολυάριθμες αυτοάνοσες νόσους. Στους Καυκάσιους επίσης, ο DRB1*11 γονότυπος στις περισσότερες μελέτες

αναφέρεται ότι σχετίζεται με το διάχυτο σκληρόδερμα (dSSc) αν και σε μερικές άλλες περιγράφεται αύξηση του DRB1*03 γονότυπου (118). Γενετικές μελέτες προσπάθησαν να συσχετίσουν το SSc και με παράγοντες που δεν σχετίζονται με το ανοσιακό σύστημα. Έχουν παρατηρηθεί ασθενείς συσχετισμοί μεταξύ του SSc και των ενζύμων του συστήματος p450 που παρουσιάζουν χαμηλή ενεργότητα και τα οποία εμπλέκονται στην υδροξυλίωση της δαπσόνης και της S-μεφαινοτοΐνης (3).

Ο κυτταρομεγαλοϊός έχει βρεθεί ότι μπορεί να συμμετέχει στην παθογένεση της SSc, λόγω των αυξημένων επιπέδων των αντι-CMV αντισωμάτων που ανευρίσκονται στους ασθενείς με SSc και τις αξιοσημείωτες ομοιότητες μεταξύ της αγγειοπάθειας που προκαλεί ο CMV και των αγγειακών μεταβολών που προκαλεί η SSc (109,110). Ως πιθανά αντιγόνα στη SSc έχουν ενοχοποιηθεί και οι ρετροϊοί (111). Αυξημένη συχνότητα καρκίνου σε συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με SSc μπορεί να αποδοθεί σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως οι ρετροϊοί (119).

Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η SSc προκαλείται από εμβρυικές αντι-μητρικές GVH αντιδράσεις και αυτό βασίζεται στην παρουσία εμβρυικών κυττάρων σε γυναίκες με SSc (120-122). Αυτή είναι μια ενδιαφέρουσα θεωρία που ταιριάζει πολύ με τις κλινικές εκδηλώσεις και το ορολογικό προφίλ ασθενών με GVHD (10). Σε γυναίκες με SSc T κλώνοι εμβρυικής προέλευσης αντιδρούν με μητρικά HLA αντιγόνα (123). Επτά από τους τριάντα ένα κλώνους T-κυττάρων από γυναίκες με SSc και ένας στους έντεκα κλώνους T-κυττάρων από υγιείς γυναίκες, οι οποίοι αντιδρούν έναντι μητρικών MHC αντιγόνων, προερχόταν από T-κύτταρα αρσενικών απογόνων (123). Επιπροσθέτως, αυτοί οι κλώνοι T-κυττάρων από γυναίκες με SSc ήταν TH2 τύπου (123). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο γονότυπος HLA-DQA1*1501 ο οποίος σχετίζεται με τη SSc (124). Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την παραμονή του μικροχμαιοσμού σε γυναίκες με SSc (125). Παρόλα αυτά, ο μικροχμαιοσμός δεν ανευρίσκεται πάντοτε αυξημένος στη νόσο(126).

T- ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΟΥ SSc.

Στα TSK (tight-skin) ποντίκια, ένα ζωικό πρότυπο για το SSc, τα T-κύτταρα που διηθούν τις δερματικές βλάβες είναι TH2 τύπου και παράγουν IL-4 (127). Σε αυτό το ζωικό μοντέλο η ίνωση μπορεί να παρεμποδιστεί από μια μετάλλαξη του γονιδίου της IL-4 που οδηγεί σε ανενεργό προϊόν (127), με θεραπεία με αντι-IL-4

(128) ή με εισαγωγή ενός πλασμιδίου που κωδικοποιεί για την IL-12 (129). In vivo χορήγηση IgIV μειώνει την έκκριση από τα σπληνοκύτταρα της IL-4 και του TGFβ παρεμποδίζοντας έτσι την ίνωση (130). Τα T- κύτταρα που διηθούν το δέρμα στο σημείο της βλάβης φαίνεται ότι έχουν συγκεκριμένα τμήματα Vβ στο γονίδιο του TCR (131). Επιπροσθέτως, αποκλειστική χρήση του γονιδίου Vβ8.2 από τα T- κύτταρα στα ζώα αυτά επαρκούσε για να παρεμποδίσει την ίνωση (127). Παρόλα αυτά, δερματική ίνωση μπορεί να συμβαίνει ακόμα και στα TSK ποντίκια που έχουν ανεπάρκεια T- και B- κυττάρων (132). Σε ένα μοντέλο ποντικού για το σκληρόδερμα, το οποίο προκαλείται από ενέσεις μπλεομυκίνης στο δέρμα, ο TGFβ ανιχνεύεται πρώιμα στις δερματικές βλάβες (133).

Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι τα T-κύτταρα είναι πολύ σημαντικά στην παθογένεση της ασθένειας και θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχο ανοσοθεραπείας στην SSc. Μια άλλη θεραπεία μπορεί να έχει ως στόχο την στροφή των κυτοκινών που παράγουν τα T-κύτταρα προς τον TH1 τύπο. Αυτό δοκιμάστηκε σε πειραματικά μοντέλα με επιτυχία (62,65,72,134,135). Έτσι, η IFNγ που χορηγήθηκε σε ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση έχει οδηγήσει σε αυξημένη επιβίωση των ασθενών και σε μείωση της έκκρισης του TGFβ (136). Τέλος, η ταυτοποίηση των αντιγόνων που προκαλούν την απάντηση των T-κυττάρων στην SSc, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων που βασίζονται στην επαγωγή ανοχής έναντι αυτών των αντιγόνων για την θεραπεία της ασθένειας.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ενώ υπάρχουν ευρήματα που υποδεικνύουν την ενεργοποίηση φλεγμονωδών κυττάρων στη συστηματική σκλήρυνση και έχει αρχίσει να αναγνωρίζεται η συμβολή των κυττάρων αυτών στη SSc, υπάρχουν αναφορές για σπανιότητα των λεμφοκυττάρων στις δερματικές βλάβες σκληροδέρματος, κυρίως στα προχωρημένα στάδια εξέλιξης της νόσου. Πιθανολογείται ότι σε διάφορα στάδια της νόσου μπορεί να εμπλέκονται διαφορετικοί μηχανισμοί παθογένειας. Κατά την έναρξη του SSc παρατηρείται ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων, ινοβλαστών αλλά και κυττάρων του ανοσιακού συστήματος, ενώ αργότερα κυρίως ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων και ινοβλαστών. Πιθανώς, λοιπόν, τα φλεγμονώδη κύτταρα να μην ευθύνονται εξ'ολοκλήρου για την ίνωση που παρατηρείται στη σκληροδερμία. Τα παραπάνω έχουν ως συνέπεια να απαιτείται διαφορετική θεραπευτική

αντιμετώπιση για ασθενείς που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια εξέλιξης της νόσου. Έτσι, σε ασθενείς που στις δερματικές βλάβες τους δεν ανευρίσκονται, ή ανευρίσκονται ελάχιστα ανοσιακά κύτταρα, θεραπεία με φάρμακα έναντι των ανοσιακών κυττάρων προφανώς δεν θα έχει τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Στην παρούσα μελέτη γίνεται ανίχνευση (και μέτρηση) φλεγμονωδών κυττάρων (T-λεμφοκυττάρων, ενεργοποιημένων T-κυττάρων και μακροφάγων), σε βιοψίες δέρματος ασθενών που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια εξέλιξης του SSc, προκειμένου να εκτιμήσουμε την παρουσία των κυττάρων αυτών σε ασθενείς που βρίσκονται στα διάφορα στάδια της νόσου. Η ανίχνευση αυτή γίνεται με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

ΑΣΘΕΝΕΙΣ:

Για τη μελέτη αυτή έγινε βιοψία δέρματος σε δεκαέξι ασθενείς, δεκαπέντε γυναίκες και έναν άνδρα, με μέσο όρο ηλικίας τα 50,75 έτη (διακύμανση 34-75 έτη), από την περιοχή της Θεσσαλίας και Μακεδονίας (Πίνακας 2). Όλοι οι ασθενείς πληρούσαν τα κριτήρια για την ταξινόμηση του SSc που περιγράφεται από το Αμερικανικό Κολέγιο Ρευματολογίας και παρακολουθούνται στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας. Στην πλειοψηφία τους είναι οροθετικοί για τα αντι-Sc1 70, ANA και αντι-ENA αντισώματα, ενώ εμφανίζονται οροαρνητικοί για αντι-dsDNA, αντι-RNP, αντι-Sm, αντι-SSA(Ro), αντι-SSB(La) και αντι-Jo1 αντισώματα (Πίνακας 3).

Οι βιοψίες δέρματος ελήφθησαν από την περιοχή της βλάβης. Κάποιοι από τους ασθενείς, οι οποίοι ήταν υπό αγωγή (Πίνακας 2), υποβλήθηκαν σε προσωρινή διακοπή της θεραπείας τουλάχιστον για ένα δίμηνο πριν τη λήψη της βιοψίας. Πραγματοποιήθηκε, επίσης, βιοψία λεμφαδένων ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Τα δείγματα καταψύχθηκαν αμέσως στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ όπου φυλάχθηκαν μέχρι τη λήψη τομών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΤΩΝ ΥΠΟ ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ						
Α/α ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΕΤΟΣ ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ	ΛΗΨΗ ΒΙΩΣΙΑΣ	ΦΥΛΟ	ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ Raynaud ΑΠΟ	ΣΚΛΗΡΟΔΕΡΜΙΑ ΑΠΟ	ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΡΙΝ ΤΗ ΛΗΨΗ ΤΟΜΩΝ
1	1952	2/11/2001	ΓΥΝΑΙΚΑ	άνοιξη 1983	1993	D-Penicillamine&Colcicine (1993-1997) Ilomedin (1997-1999), Imukin (1999) Εισπνοές Ilomedin (2000-2001)
2	1963	25/1/2002	ΑΝΔΡΑΣ	Σεπ-00	Σεπ-00	Prezolon, Neoral & Μεθοτρεξάτη
3	1943	15/5/2002	ΓΥΝΑΙΚΑ	Μαϊ-96	Μαϊ-96	Έναρξη Ilomedin 13/5/2002
4	1964	3/6/2002	ΓΥΝΑΙΚΑ	Δεκ-01	Αυγ-01	-----
5	1965	26/2/2002	ΓΥΝΑΙΚΑ	1982	1999	-----
6	1953	26/11/2001	ΓΥΝΑΙΚΑ	Σεπ-00	Δεκ-00	-----
7	1941	8/1/2002	ΓΥΝΑΙΚΑ	1998	1999	Διακοπή Colcicine & Penicillamine πρω 2μήνου
8	1959	26/3/2002	ΓΥΝΑΙΚΑ	1993	1998	-----
9	1962	9/9/2002	ΓΥΝΑΙΚΑ	Φεβ-01	Απρ-02	-----
10	1927	10/12/2002	ΓΥΝΑΙΚΑ	1988	1988	-----
11	1941	11/11/2001	ΓΥΝΑΙΚΑ	1985	1996	Κορτιζόνη, Mendrol
12	1950	14/6/2002	ΓΥΝΑΙΚΑ	δεν αναφέρει	Απρ-01	1 έτος Imukin
13	1934	2/11/2001	ΓΥΝΑΙΚΑ	1993	1995	Mendrol, Μεθοτρεξάτη
14	1968	2/12/2002	ΓΥΝΑΙΚΑ	Οκτ-02	Μαρ-02	-----
15	1953	19/11/2002	ΓΥΝΑΙΚΑ	2000	2000	Εισπνοές Ilomedin
16	1941	22/5/2002	ΓΥΝΑΙΚΑ	1987	1988	Penicillamine & Medrol (1998-2002)

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΤΩΝ ΥΠΟ ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ

A/α	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΒΙΟΥΤΑΣ	skin score	TKE	CRP	ANA	Αντι-dsDNA	Αντι-scl 70	Αντι-ENA	Αντι-RNP	Αντι-Sm	Αντι- SSA(Ro)	Αντι- SSB(La)	Αντι-Jo1
1	2/11/01	42,5	11	-	+		+						
2	25/1/02	32	92	4	+	-	+	+	-	-	-	-	-
3	15/5/02	28,5	28	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
4	3/6/02	27	40	9,7	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	26/2/02	32	27	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
6	26/11/01	39	13	+		-	-	-	-	-	-	-	-
7	8/1/02	38	13	+	+		+	+	-	-	-	-	-
8	26/3/02	22	19	-			-						
9	9/9/02	19	32	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
10	10/12/02	30,5		<0,35			+						
11	11/11/01	16	15	0,5		-		-					
12	14/6/02	22,5	6	<0,5	+	-	-	+	+	-	+	+	-
13	2/11/01	46,5	22	1	+		+	+					
14	2/12/02	30,5	7	0,2	+	-	+	+	-	-	-	-	-
15	19/11/02	37	51	0,4	+	-	+	+	-	-	+	+	-
16	22/5/02	15	10	+++	+		-		-		-		

ΤΕΧΝΙΚΗ:

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Πραγματοποιήθηκαν στον κρυοτόμο τομές πάχους 6μ. Οι τομές στέγνωσαν στον αέρα για περίπου μία ώρα και μονιμοποιήθηκαν με ακετόνη στους -20 °C για 30 min. Στη συνέχεια για την ανίχνευση των κυττάρων εφαρμόστηκε μία έμμεση μέθοδος συμπλέγματος Αβιδίνης-Βιοτίνης (ABC) Ανοσοϋπεροξειδάσης (VECTASTAIN Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame CA, USA). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ανίχνευση βασίζεται στο σχηματισμό του συμπλόκου Αβιδίνης-Βιοτίνης (ABC) με το πρωτεύον αντίσωμα (primary antibody), το οποίο αντιδρά με τα αντιγόνα του υπό εξέταση ιστού. Η χρώση βασίζεται στην ενζυματική μετατροπή ενός χρωμογόνου υποστρώματος, της 3,3' Διαμινοβενζιδίνης (DAB), σε ένα έγχρωμο (καφέ) ίζημα από την υπεροξειδάση αγριοραπανίδας (horseradish peroxidase, HRP), στις περιοχές εντοπισμού του αντιγόνου. Η ανάγνωση γίνεται χρησιμοποιώντας οπτικό μικροσκόπιο. Η μέθοδος αυτή έχει μεγάλη ευαισθησία.

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Για ανίχνευση παρουσίας T-λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκαν αντι-ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού anti hCD3ε (R&D systems: Purified mouse monoclonal IgG1, clone UCHT1, C= 500 μg/ml). Το αντίσωμα αυτό αντιδρά με την ε-αλυσίδα του συμπλόκου του αντιγονικού υποδοχέα του CD3/T-κυττάρου(137).

Για την ανίχνευση μακροφάγων χρησιμοποιήθηκαν αντι-ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού αντι-CD68 (anti-human CD68, clone KP1, εταιρεία DAKO, C= 435mg/L), ενώ για την ανίχνευση ενεργοποιημένων T-κυττάρων αντι-ανθρώπινα CD69 αντισώματα ποντικού (anti-human CD69, clone FN50, εταιρεία DAKO, C= 225mg/L).

Το CD68 είναι μία υψηλά γλυκοζυλιωμένη διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 110 kDa, η οποία εντοπίζεται κυρίως στα λυσοσώματα και φαίνεται να παίζει ρόλο στη λυσοσωμική κυκλοφορία (lysosomal trafficking) και στην ενδοκύττωση(138).

Το CD69, γνωστό και ως Μόριο Επαγωγής Ενεργοποίησης (Activation Inducer Molecule, AIM) είναι ένα φωσφορυλιωμένο δεμερές που συνδέεται με δισουλφιδικούς δεσμούς (phosphorylated disulphide-linked dimer) και αποτελείται από δύο αλυσίδες (26-28 kDa και 32-34 kDa). Είναι το πρώτο γνωστό αντιγόνο που εκφράζεται στα λεμφοκύτταρα μετά από ενεργοποίηση των T ή B κυττάρων, αλλά δεν ανιχνεύεται στα λεμφοκύτταρα σε ηρεμία (139).

ΑΝΤΙΑΠΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα διαλύματα που απαιτήθηκαν είναι:

1. Blocking Serum (DILUTED NORMAL BLOCKING SERUM): 150μl normal blocking serum stock σε 10ml ρυθμιστικού διαλύματος (PBS).
2. Biotinylated Ab (DILUTED BIOTINYLATED SECONDARY ANTIBODY): 150μl normal blocking serum stock σε 10ml ρυθμιστικού διαλύματος και προσθήκη στο διάλυμα αυτό 50μl biotinylated antibody stock.
3. VECTASTAIN ELITE ABC REAGENT: δύο σταγόνες από το Reagent A σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος και στη συνέχεια προσθήκη δύο σταγόνων από το Reagent B.
4. Διάλυμα χρωμογόνου DAB (PEROXIDASE SUBSTRATE SOLUTION): προσθήκη δύο σταγόνων buffer stock solution σε 5ml απιονισμένο νερό και έπειτα προσθήκη, μετά από ανάδευση, τεσσάρων σταγόνων DAB stock solution. Προσθήκη στο διάλυμα δύο σταγόνων Hydrogen Peroxide Solution.

ΑΛΛΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΗΘΗΚΑΝ:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα: αποστειρωμένο PBS.
2. Αιματοξυλίνη Harris.
3. Mounting medium και καλυπτρίδες για την κάλυψη των τομών.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Εμβάπτιση των μονιμοποιημένων σε ακετόνη τομών σε PBS για 5 min.
2. Οριοθέτηση τομών με PAP PEN.
3. Εμβάπτιση πλακιδίων σε buffer για 5 min.
4. Εμβάπτιση τομών σε διάλυμα H₂O₂ (0,3% H₂O₂ σε Μεθανόλη) για 30 min, προκειμένου να εξουδετερωθεί η δράση της ενδογενούς υπεροξειδάσης.
5. Εμβάπτιση σε buffer για 5 min.
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τα στάδια 4 και 5 δεν πραγματοποιήθηκαν για όλες τις τομές.
6. Κάλυψη τομών με DILUTED NORMAL BLOCKING SERUM για 20 min.
7. Απομάκρυνση της περίσσειας. (Οι τομές δεν ξεπλύθηκαν με buffer).
8. Επώαση τομών με PRIMARY ANTIBODY για 1 ώρα. Τα διαλύματα των αντισωμάτων προκύπτουν με αραιώση των αρχικών διαλυμάτων των αντισωμάτων με buffer (C=10μg/ml για το CD3 και αραιώσεις 1:100 με 1:200 για το CD68 και 1:50 για το CD69). Στη συνέχεια οι τομές ξεπλύθηκαν και εμβαπτίστηκαν σε buffer για 5 min.
9. Επώαση τομών με DILUTED BIOTINYLATED SECONDARY ANTIBODY για 30 min.
10. Ξέπλυμα των τομών σε buffer για 5 min.
11. Επώαση τομών με VECTASTAIN ELITE ABC REAGENT για 30 min.
12. Επανάληψη του σταδίου 10.
13. Κάλυψη των τομών με PEROXIDASE SUBSTRATE SOLUTION για 4-7 min.

14. Ξέπλυμα των τομών με νερό βρύσης και εμβάπτιση σε νερό βρύσης για 5 min.

Στη συνέχεια γινόταν χρώση με αιματοξυλίνη ως ακολούθως:

1. Εμβάπτιση δειγμάτων για 10 sec σε αιματοξυλίνη Harris και έπειτα ξέπλυμα σε ρέον νερό βρύσης.
2. Ακολουθούσε αφυδάτωση τομών με διαδοχική εμβάπτιση σε αιθανόλη: 70%, 80% και 100% (από 10 βουτιές).
3. Εμβάπτιση των πλακιδίων με τις τομές σε xylene (10 βουτιές).
4. Τοποθέτηση mounting medium και επικάλυψη των τομών με καλυπτρίδα.

Οι τομές αφέθησαν να στεγνώσουν και στη συνέχεια ήταν έτοιμες για μικροσκοπία.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου και μεγέθυνση 400X μετρήσαμε τον μέγιστο αριθμό θετικών κυττάρων (T-λεμφοκυττάρων, ενεργοποιημένων T-κυττάρων και μακροφάγων), που ανιχνεύονται με ανοσοϊστοχημική χρώση σε διαδοχικές τομές βιοψίας δέρματος δεκαέξι ασθενών. Τα αποτελέσματα καταγράφονται στον Πίνακα 4.

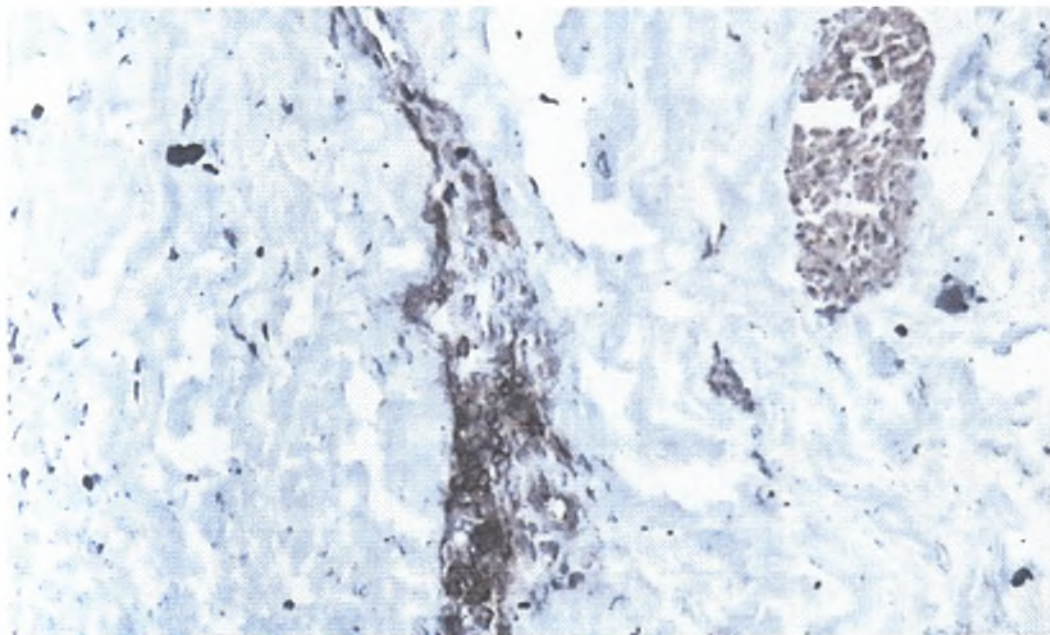
Όλες οι τομές είχαν αυξημένο συνδετικό ιστό, συμβατό με τη διάγνωση της σκληροδερμίας, ενώ τα φλεγμονώδη κύτταρα σχημάτιζαν περιαγγειακές διηθήσεις. Ο αριθμός των ανοσο-αντιδραστικών κυττάρων που ανιχνεύθηκαν με το αντι-CD3 m₀Ab ήταν κατά μέσο όρο 62,75 (διακύμανση 7-210) (Πίνακας 4). CD3+ T λεμφοκύτταρα φαίνονται στην Εικόνα 1 (μεγέθυνση X100) και στην Εικόνα 2 (μεγέθυνση X400). Ο αριθμός των ανοσο-αντιδραστικών κυττάρων που ανιχνεύθηκαν με το αντι-CD69 MoAb κατά μέσο όρο ήταν 19,94 (διακύμανση 1-47) και των κυττάρων που ανιχνεύθηκαν με το αντι-CD68 MoAb 78,81 (διακύμανση 34-141). CD69+ κύτταρα φαίνονται στην Εικόνα 3 (σε μεγέθυνση X400) και στην Εικόνα 4 (σε μεγέθυνση X400), ενώ η Εικόνα 5 δείχνει (σε μεγέθυνση X400) CD68+ μακροφάγα.

Σε μερικές περιπτώσεις υπήρχε ενδογενής υπεροξειδάση στα κύτταρα της επιδερμίδας με κοκκώδη εμφάνιση, η οποία ήταν εύκολα αναγνωρίσιμη. Ο αρνητικός μάρτυρας δεν έδειχνε θετικά κύτταρα (Εικόνα 6, μεγέθυνση X400). Ο αριθμός των CD68+ μακροφάγων σε όλους τους ασθενείς, εκτός από δυο, ήταν μεγαλύτερος των CD3+ T λεμφοκυττάρων. Παρατηρήθηκε επίσης, ότι ο αριθμός των CD3+, CD69+, και CD68+ κυττάρων γινόταν μικρότερος με τη διάρκεια νόσου. Σε ασθενείς με διάρκεια της νόσου μικρότερη των 12 μηνών ο μέσος όρος των CD3+ T λεμφοκυττάρων ήταν 76,5 ενώ σε ασθενείς με διάρκεια της νόσου μεγαλύτερη των 5 ετών ο μέσος όρος των CD3+ T λεμφοκυττάρων ήταν 20. Παρόλα αυτά, δεν υπήρχε συσχέτιση των φλεγμονωδών κυττάρων με το βαθμό σκλήρυνσης του δέρματος κατά Rodman.

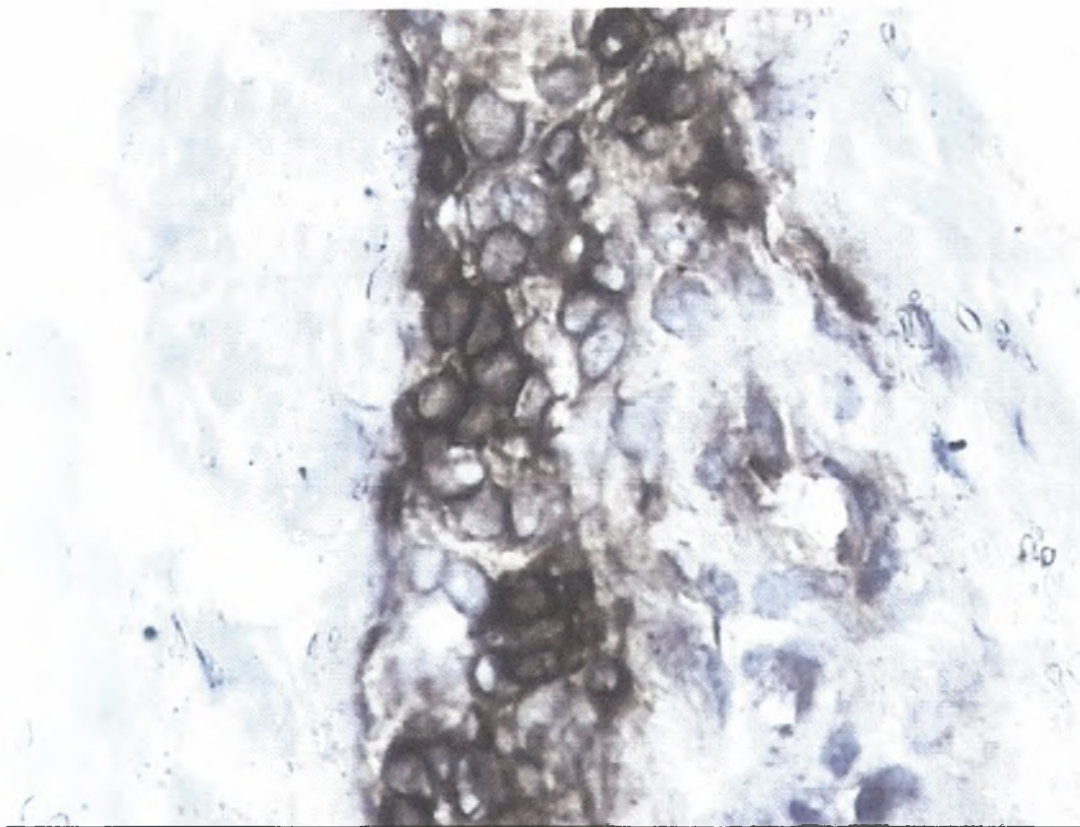
ΠΙΝΑΚΑΣ 4. ΜΕΓΙΣΤΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΝΑ ΟΠΤΙΚΟ ΠΕΔΙΟ 400X (ΧΡΩΣΗ ΜΕ ANTI-CD3, ANTI-CD68 ΚΑΙ ANTI-CD69 ABS).

A/α	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΒΙΟΨΙΑΣ	CD3+ ΚΥΤΤΑΡΑ	CD68+ ΚΥΤΤΑΡΑ	CD69+ ΚΥΤΤΑΡΑ
1	2/11/2001	21	84	19
2	25/1/2002	13	47	1
3	15/5/2002	17	53	12
4	3/6/2002	210	45	35
5	26/2/2002	55	70	4
6	26/11/2001	26	56	25
7	8/1/2002	112	68	47
8	26/3/2002	9	141	2
9	9/9/2002	20	34	15
10	10/12/2002	16	99	13
11	11/11/2001	7	61	3
12	14/6/2002	180	52	14
13	2/11/2001	52	120	40
14	2/12/2002	70	108	45
15	19/11/2002	140	120	37
16	22/5/2002	56	102	7

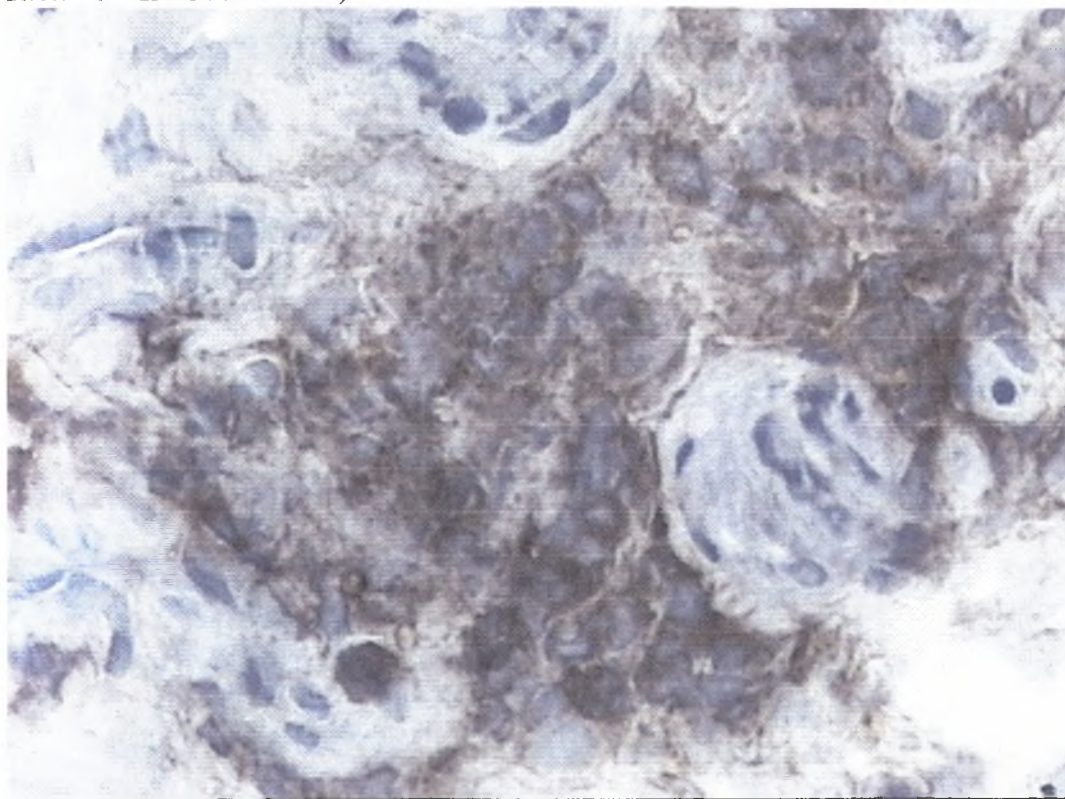
ΕΙΚΟΝΑ 1: ΕΣΤΙΑ ΜΕ ΑΦΘΟΝΑ CD3+ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ (~ 210) ΣΕ ΤΟΜΗ ΒΙΟΨΙΑΣ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ ΜΕ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΒΙΟΨΙΑΣ 03/06/02 (ΜΕΓΕΘΥΝΣΗ Χ100).



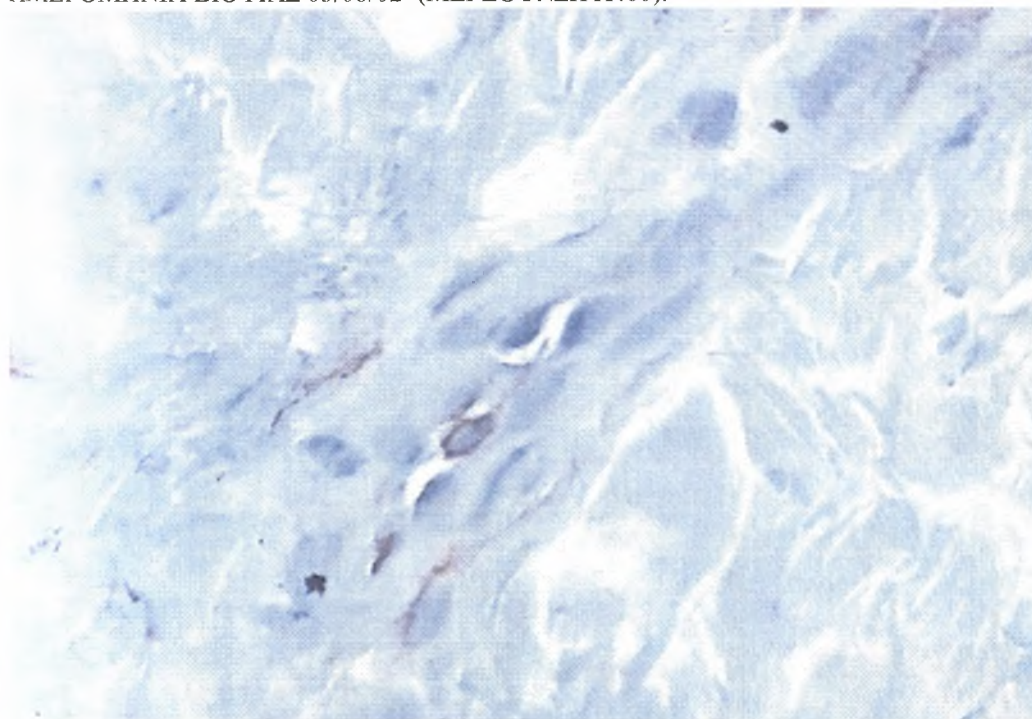
ΕΙΚΟΝΑ 2: Η ΙΔΙΑ ΕΣΤΙΑ CD3+ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΜΕΓΕΘΥΝΣΗ Χ400.



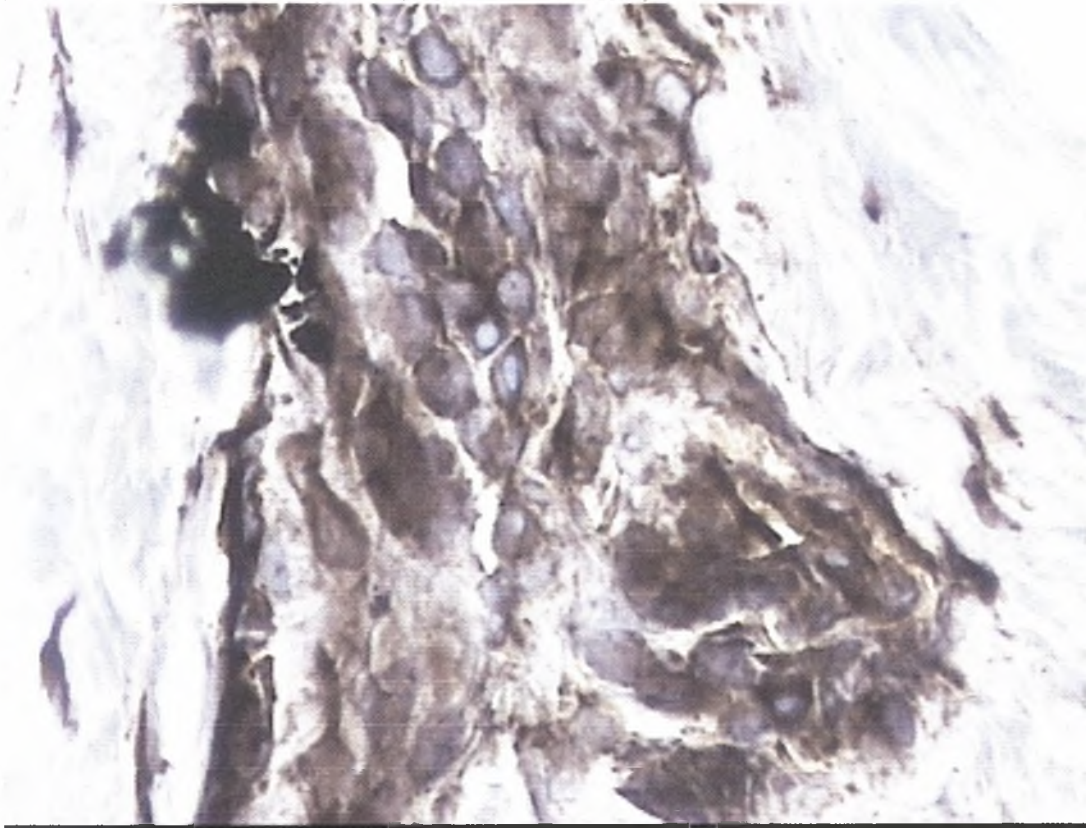
ΕΙΚΟΝΑ 3: ΕΣΤΙΑ CD69+ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ (ΑΣΘΕΝΗΣ ΜΕ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΒΙΟΨΙΑΣ 26/03/01. ΜΕΓΕΘΥΝΣΗ X400).



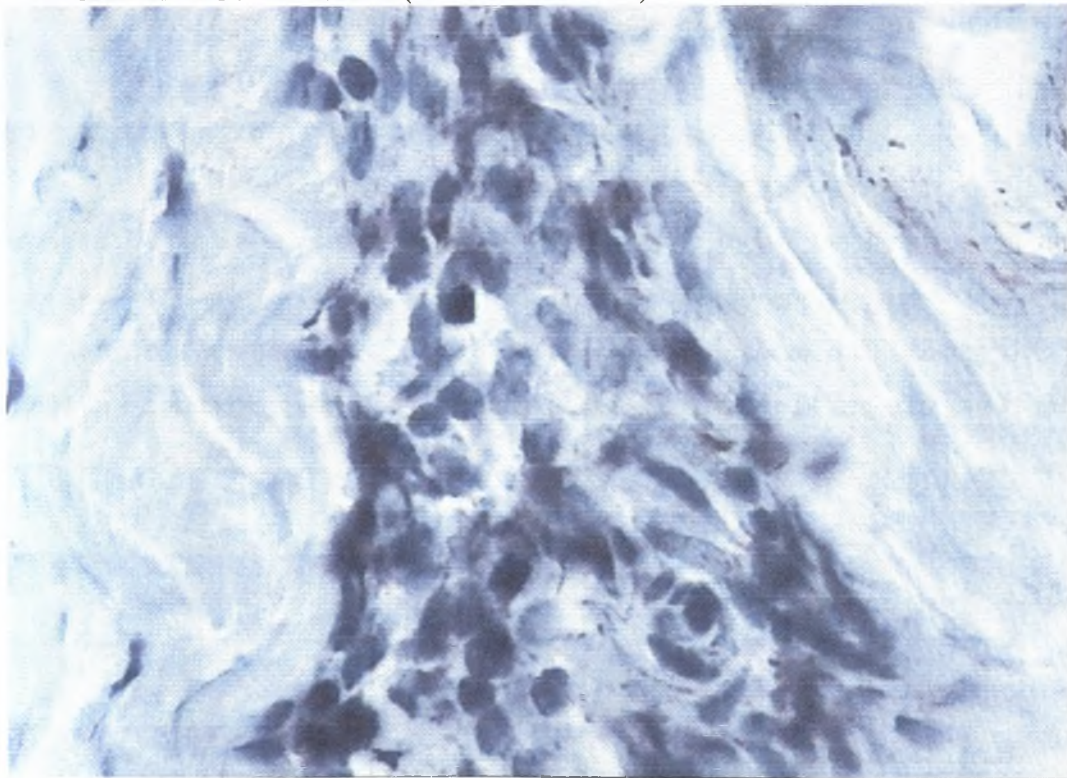
ΕΙΚΟΝΑ 4: CD69+ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΤΟΜΗ ΒΙΟΨΙΑΣ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ ΜΕ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΒΙΟΨΙΑΣ 03/06/02 (ΜΕΓΕΘΥΝΣΗ X400).



ΕΙΚΟΝΑ 5: ΠΕΡΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΔΙΗΘΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ 45 CD68+ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ (ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΒΙΟΨΙΑΣ 03/06/02, ΜΕΓΕΘΥΝΣΗ X400).



ΕΙΚΟΝΑ 6: ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ. ΤΟΜΗ ΒΙΟΨΙΑΣ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ ΜΕ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΒΙΟΨΙΑΣ 03/06/02 (ΜΕΓΕΘΥΝΣΗ 400X).



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη επιβεβαίωσε προηγούμενες μελέτες για την ύπαρξη φλεγμονωδών κυττάρων στις βλάβες του δέρματος στη σκληροδερμία. Επιπρόσθετα έδειξε ότι τα T λεμφοκύτταρα που διηθούν τις δερματικές βλάβες είναι σε πρώιμο στάδιο ενεργοποίησης αφού εκφράζουν το πρώιμο αντιγόνο ενεργοποίησης CD69. Αυτό περαιτέρω ενισχύει το εύρημα του ολιγοκλωνικού πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων στις δερματικές βλάβες του σκληροδέρματος (29) και ενισχύει την άποψη ότι αντιγόνα στο δέρμα οδηγούν την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων στη σκληροδερμία. Επιπλέον, το μόριο CD69 πιθανότατα εμπλέκεται στις με επαφή διακυτταρικές επιδράσεις των T λεμφοκυττάρων με άλλα γειτονικά κύτταρα, όπως ινοβλάστες και μακροφάγα (145). Στη μελέτη αυτή δεν βρέθηκε συσχέτιση των CD3+, CD69+, και CD68+ κυττάρων με το βαθμό της ίνωσης. Αυτό σημαίνει ότι τα φλεγμονώδη κύτταρα δεν ευθύνονται εξ ολοκλήρου για την ίνωση στη σκληροδερμία. Τελευταία δημοσιεύτηκε ότι σε προχωρημένα στάδια της νόσου, όπου δεν αναγνωρίζονται φλεγμονώδη κύτταρα στις δερματικές βλάβες, εκλείπουν οι κολλαγονο-επαγωγικές κυτταροκίνες των φλεγμονωδών κυττάρων και ανιχνεύονται άλλες. Αυτό υποδηλώνει ότι, στην εξέλιξη της σκληροδερμίας αρχικά ευθύνονται T-λεμφοκύτταρα ενώ στη συνέχεια διατηρείται η ίνωση με άλλα κύτταρα.

Η ανίχνευση φλεγμονωδών κυττάρων στη σκληροδερμία έχει όχι μόνο θεωρητική αλλά και πρακτική σημασία. Η χορήγηση αντι-T κυτταρικής θεραπείας δικαιολογείται μόνο στα αρχικά στάδια της σκληροδερμίας όταν υπάρχουν φλεγμονώδεις διηθήσεις στο δέρμα. Επιπρόσθετα η μελέτη αυτή έδειξε ότι T-λεμφοκύτταρα ανιχνεύονται στις δερματικές βλάβες έως και 14 έτη από την έναρξη της σκληροδερμίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ενώ υπάρχουν στοιχεία για την ενεργοποίηση φλεγμονωδών κυττάρων στη συστηματική σκλήρυνση υπάρχουν αναφορές για σπανιότητα των λεμφοκυττάρων στις δερματικές βλάβες σκληροδέρματος. Το γεγονός αυτό έχει σημασία για την επιλογή της θεραπευτικής αγωγής σε ασθενείς που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια εξέλιξης της νόσου, αφού θεραπεία έναντι ανοσιακών κυττάρων ίσως δεν έχει τα επιθυμητά αποτελέσματα. Στην παρούσα μελέτη γίνεται ανίχνευση T-λεμφοκυττάρων, ενεργοποιημένων T-κυττάρων και μακροφάγων σε διαδοχικές τομές βιοψίας δέρματος ασθενών που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια εξέλιξης του SSc.

Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών που μελετήθηκαν (δεκαπέντε γυναίκες και ένας άνδρας) ήταν τα 50,75 έτη (διακύμανση 34-75 έτη). Για την ανίχνευση των φλεγμονωδών κυττάρων εφαρμόστηκε μία έμμεση Ανοσοϊστοχημική μέθοδος Συμπλόκου Αβιδίνης-Βιοτίνης (ABC) και χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα για το CD3 (δείκτης των T-κυττάρων), το CD69 (πρώιμο αντιγόνο ενεργοποίησης των ενεργοποιημένων T-κυττάρων) και το CD68 (δείκτης των μακροφάγων).

Ο αριθμός των ανοσοαντιδραστικών κυττάρων που ανιχνεύθηκαν με το αντι-CD3 MoAb ήταν κατά μέσο όρο 62,75, με το αντι-CD69 MoAb 19,94 και με το αντι-CD68 MoAb 78,81. Παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των CD3+, CD69+, και CD68+ κυττάρων γινόταν μικρότερος με τη διάρκεια νόσου, ενώ δεν βρέθηκε συσχέτιση των φλεγμονωδών κυττάρων με το βαθμό της ίνωσης.

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι T-λεμφοκύτταρα ανιχνεύονται στις δερματικές βλάβες κυρίως σε πρώιμα στάδια της νόσου αλλά σε μικρό αριθμό έως και 14 έτη από την έναρξη της SSc. Επιπλέον, τα T-λεμφοκύτταρα που διηθούν τις δερματικές βλάβες είναι σε πρώιμο στάδιο ενεργοποίησης, αφού εκφράζουν το αντιγόνο CD69. Είναι εμφανές, λοιπόν, ότι τα T-κύτταρα πιθανώς να μην ευθύνονται εξ' ολοκλήρου για την ίνωση στην SSc.

Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν το ρόλο των T λεμφοκυττάρων στην παθογένεια της σκληροδερμίας και υποδηλώνουν ότι η χορήγηση αντι-T-κυτταρικής θεραπείας δικαιολογείται κυρίως στα αρχικά στάδια της νόσου.

SUMMARY

Even though there is evidence of activation of inflammatory cells in SSc there are reports that lymphocytes are rarely found in the skin lesions in scleroderma. This fact is significant in the choice of therapeutic treatment for the different stages of the disease because therapy directed against immune cells may not always be effective. In this study the presence of T lymphocytes, activated T cells and macrophages was investigated in skin biopsies from patients with SSc in various stages of the disease.

The average age of the patients studied (15 female and 1 male) was 50,75 years. Inflammatory cells were detected with the use of indirect immunoperoxidase method (Avidin-Biotin Complex) and monoclonal antibodies for CD3 (marker of T cells), CD69 (early activation antigen of T cells) and CD68 (marker of macrophages).

The average number of immunoreactive cells detected with the anti-CD3 MoAb was 62,75, with anti-CD69 MoAb was 19,94 and with anti-CD68 MoAb was found to be 78,81. The number of CD3+, CD69+ and CD68+ cells decreased with the evolution of the disease. No correlation was found between the number of inflammatory cells and the degree of fibrosis.

This present study has shown that immune cells are detected in skin lesions mainly in the early stages of SSc but small numbers may also be found up to 14 years into the disease. Infiltrating T cells express early activation antigens. Furthermore, immune cells may not be solely responsible for the fibrosis in SSc.

These results re-enforce the role of T cells in the pathogenesis of SSc and suggest that therapy directed against immune cells is justified during the first 14 years of the disease.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Παθολογική Ανατομική (Alan Stevens, James Lowe. Μτφρ-επιμέλεια Π.Δαβάρης. 1998, κεφ.23, σελ.498-500).
2. Medsger T.A. Jr. Mc Carthy Dj ed, Williams & Wilkins, Baltimore, 1997, p.p.1433-64,1.
3. Clinical Immunology. Principles and Practice-Volume II (Robert R. Rich, Thomas Fleisher, Benjamin D. Schwartz, William T. Shearer, Warren Strober) 1996, chapter 76, p.1154-1163.
4. Basic and Clinical Immunology (Mark Peakman, Diego Vergani) 1997, p.179-181.
5. Hawk A., English JC 3rd, Semin Cutan Med Surg 2001 Mar; 20(1): 27-37 [Localized and Systemic Scleroderma].
6. CECIL-Βασική παθολογία (Β' τόμος)- Thomas E. Andreoli, Claude Bennett, Charles C.J. Carpenter, Fred Plum 1997.
7. Haustein U.F., Systemic sclerosis-Scleroderma. Dermatol Online J 2002 Jun; 8(1): 3 .
8. Medsger T.A. Jr. Systemic sclerosis (scleroderma). Clinical aspects. In Arthritis and allied conditions W.J. Koopman, editor. 14th edition 2001, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. P1590-1624.
9. Hesselstrand R, Scheja A, Akesson A. Mortality and causes of death in a Swedish series of systemic sclerosis patients. Ann Rheum Dis 1998; 57:682-6.
10. Steen VD, Medsger TA Jr. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. Arthritis Rheum 2000; 43: 2437-44.
11. Clements PJ, Hurwitz EL, Wong WK, Seibold JR, Mayes M, White B, Wigley F et al. Skin thickness score as a predictor and correlate of outcome in systemic sclerosis. High dose versus low dose D-penicillamine trial. Arthritis Rheum 2000; 43: 2445-54.
12. Lazaros I. Sakkas, Bin Xu, Carol M. Artlett, Song Lu, Sergio A. Jimenez and Chris D. Platsoukas. Oligoclonal T cell Expansion in the skin of patients with Systemic Sclerosis. The Journal of Immunology, 2002, 168:3649-3659.
13. Hebbar M, Lassalle P, Janin A, Vanhee D, Bislau S, Hatron P-Y, Tonnel A-B, Gosselin B.E-selectin expression in salivary endothelial cells from patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum 1995;37:406-12.
14. Gruschwitz MS, Hornstein OP, von Den Driesch P. Correlation of soluble adhesion molecules in the peripheral blood of scleroderma patients with their in situ expression and with disease activity. Arthritis Rheum 1995; 38:184-9.
15. Hebbar M, Gillot J-M, Hachulla E, Lassale P, Hatron PY, Devulder B, Janin A. Early expression of E-selectin, tumor necrosis factor-alpha, and mast cell infiltration in the salivary glands of patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum 1996;39:1161-65.
16. Gabrielli A, di Loreto C, Taborro R, Candela M, Sambro P, Nitti C, Danieli MG, DeLustro F, Dasch JR, Danieli G. Immunohistochemical localization of intracellular and extracellular TGFbeta in the skin of patients with systemic sclerosis (scleroderma), and primary Raynaud's phenomenon. Clin Immunol Immunopathol 1993; 68:340-9.

17. Vancheeswaran R, Azam A, Black C, Dashwood MR. Localization of endothelin-1 and its binding sites in scleroderma skin. *J Rheumatol* 1994;21:1268-76.
18. Vancheeswaran R, Magoulas T, Efrat G, Wheeler Jones C, Olsen I, Penny R, Black CM. Circulating endothelin-1 levels in systemic sclerosis subsets-a marker of fibrosis or vascular dysfunction? *J Rheumatol* 1994;21:1838-44.
19. Varga J, Bashey RI. Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. *Intern Rev Immunol* 1995; 12:187-99.
20. Kawaguchi Y. IL-1 α expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *ClinExp Immunol* 1994;97:445-50.
21. Xu S-W, Panesar M, Vancheewaran R, Mason J, Haskard D, Black C, Olsen I, Abraham D. Expression and shedding of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen 3 by normal and scleroderma fibroblasts. Effects of interferon- γ , tumor necrosis factor α and estrogen. *Arthritis Rheum* 1994;37:1689-97.
22. Sampo P, Jannino L, Candela M, Salvi A, Donini M, Dusi S, Luchetti MM, Gabrielli A. Monocytes of patients with systemic sclerosis(scleroderma) spontaneously release in vitro increased amounts of superoxide anion. *J Invest Dermatol* 1999; 12:78-84.
23. Cresatni B, Seta N, De Bandt M, Soler P, Rolland C, Dehoux M, Boutten A, Dornbret MC. Palazzo E, Kahn MF. Interleukin-6 secretion by monocytes and alveolar macrophages in systemic sclerosis with lung involvement. *Am J Resp Crit Care med* 1994;149: 1260-5.
24. Kantor TV, Friberg D, Medsger TA Jr, Buckingham RB, Whiteside TL. Cytokine production and serum levels in systemic sclerosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 65: 278-85.
25. Gustafsson R, Fredens K, Nettelbladt O, Hallgren R. Eosinophil activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1991;34:414-22.
26. Mouthon L., Garcia De la Pena-Lefebvre P., Chanseaud Y., Tamby MC., Boissier MC., Guillevin L. - *Ann Med Interne (Paris)* 2002 May; 153(3): 167-78 [Pathogenesis of systemic scleroderma: Immunological aspects].
27. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA Jr, Rodman GP. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 645-653.
28. Kraling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuclear cell infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiol* 1995; 63: 48-56.
29. Sakkas LI, Xu, B, Artlett CM, Lu S, Jimenez SA, Platsoucas CD. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Immunol* 2002; 168: 3649-59.
30. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJP, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 1992; 166: 255-263.
31. Fleischmajer R, Perlsh JS, Reeves JR. Cellular infiltration in scleroderma skin. *Arthritis Rheum* 1977;20:975-84.
32. Wells AU, Lorimer S, Majumdar S, Harrison NK, Corrin B, Black CM, Jeffery PK, du Bois RM. Fibrosing alveolitis in systemic sclerosis: increase in memory T-cells in lung interstitium. *Eur Resp J* 1995 ; 8 :266-271.
33. Dau PC, Callahan JP *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 70:159-65.

34. Freundlich B, Jimenez SA. Phenotype of peripheral blood lymphocytes in patients with progressive systemic sclerosis: activated T lymphocytes and the effect of D-penicillamine therapy. *Clin Exp Immunol* 1987;69:375-84.
35. Kantor TV, Friberg D, et al. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 65:278-85.
36. Fiocco U, Rosada M, Cozzi L, Ortolani C, de Silvestro G, Ruffatti A, Cozzi E, Gallo C. Early phenotypic activation of circulating helper memory T cells in scleroderma: correlation with disease activity. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 272-277.
37. Dau PC, Callahan JP. Immune modulation during treatment of systemic sclerosis with immunosuppressive drugs. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;70: 159-65.
38. Steen VD, Engel EE, Charley MR, Medsger TA Jr. Soluble serum interleukin-2 receptors in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1996;23:646-9.
39. Needleman BW, Wigley FM, Stair RW. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1992;35:67-72.
40. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin-4 (IL-4), IL-10, IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1997;24:328-32.
41. Sakkas LI, Tourtellotte C, Myer A, Berney S, Platsoucas CD. Increased levels of alternatively spliced interleukin 4 (IL-482) transcripts in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6: 660-64.
42. Kahaleh MB. Soluble Immunologic products in scleroderma sera. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;58:139-44.
43. Kurasawa K, Hirose K, Sano H et al. Increased IL-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000;43:2455-63.
44. Kahan A, Gerfaux J, Kahan A, Joret AM, Menkes CJ, Amor B. Increased protooncogene expression in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1989;32:430-36.
45. Sfikakis PP, Tesar J, Theocharakis S, Klipple GL, Tsokos GC. Increased frequency of in vivo hprt gene-mutated T cells in the peripheral blood of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1994;53:122-27.
46. Sasaki T, Nakajima H. Serum adenosine deaminase activity in systemic sclerosis (scleroderma) and related disorders. *J Am Acad Dermatol* 1992;27:41 1-14.
47. Sondergaard K, Stengaard-Pedersen K, Zachariae H, Heickendorff L, Deleuran M, Deleuran B. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) in scleroderma skin. *Br J Rheumatol* 1998;37:304-10.
48. Kuwana M, Medsger TA, Wright TM. T and B collaboration is essential for the autoantibody response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis. *J Immunol* 1995;155: 2703-2714.
49. Van de Water J., Wilson TJ., Haapanen LA, Boyd RL, Adplanald H, Gershwin ME. Ontogeny of T-cell development in avian scleroderma. *Clin Immunol Immunopathol* 1990 Aug; 56(2):169-84.
50. Bell SA, Faust H, Mittermuller J, Kolb HJ, Meurer M. Specificity of antinuclear antibodies in scleroderma-like graft versus host disease:

- clinical correlation and histocompatibility locus antigen association. *Br J Dermatol* 1996;134:848-54.
51. Filaci G, Cutolo M, Scudeletti M, Castagneto C, Derchi L, Gianrossi R. Cyclosporin-A and Iloprost treatment of systemic sclerosis: clinical results and interleukin-6 serum changes after 12 months of therapy. *Rheumatology* 1999;38: 992-6.
 52. Morton SJ, Powell RJ. Cyclosporin and Tacrolimus: their use in a routine clinical setting for scleroderma. *Rheumatol* 2000;39: 865.
 53. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991;254: 277-79.
 54. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994; 76: 241-251.
 55. Kumar V, Bhardwaj V, Scares L, Alexander, Sette A, Sercarz E. Major histocompatibility complex binding affinity of an antigenic determinant is crucial for the differential secretion of interleukin 4/5 or interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci(USA)* 1995;92: 9510-14.
 56. Duncan DD, Swain SL. Role of antigen presenting cells in the polarized development of helper T cell subsets: evidence for differential cytokine production by Th0 cells in response to antigen presentation by B cells and macrophages. *Eur J Immunol* 1994;24: 2506-14.
 57. Manetti R, Parronchi P, Giudizi G, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin[IL]-12) induces T helper type(Th)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 1993; 177:1199-1204.
 58. Fertin C, Nicolas JF, Gillery P, Kalis B, Banchereau J, Marquart FX. Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. *Cell Mol Biol* 1991; 37: 823-829.
 59. Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghov R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J Clin Invest* 1992; 90:1479-1485.
 60. Wegrowski Y, Paltot V, Gillery P, Kallis B, Randoux A, Maquat FX. Stimulation of sulfated glycosaminoglycan and decorin production in adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin-4. *Bioch J* 1995; 307(Pt3): 673-8.
 61. Seprowski GD, Derdak S, Phipps RP. Interleukin-4 and interferon-gamma discordantly regulate collagen biosynthesis by functionally distinct lung fibroblasts subsets. *J Cell Physiol* 1996; 167:290-296.
 62. Mueller R, Krahl T, Sarvetnick N. Tissue-specific expression on interleukin-4 induces extracellular matrix accumulation and extravasation of B cells. *Lab Invest* 1997; 76:117-128.
 63. Ushiyama C, Hirano T, Miyajima H, Okumura K, Ovary Z, Hashimoto H. Anti-IL-4 antibody prevents graft-versus-host disease in mice after bone marrow transplantation. The IgE allotype is an important marker of graft-versus-host disease. *J Immunol* 1995; 154:2687-2696.
 64. Cheever AW, Williams ME, Wynn TA, Finkelman FD, Seder RA, Cox TM, Hieny S, Caspar P, Sher A. Anti-IL-4 treatment of schistosoma mansoni-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J Immunol* 1994; 153:753-759.

65. Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R, Neurath M. Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today* 1997; 18:61-64.
66. Iademarco MF, Barks JL, Dean DC. Regulation of vascular adhesion molecule-1 expression by IL-4 and TNF-alpha in cultured endothelial cells. *J Clin Invest* 1995;95:264-71.
67. Mavalia C, Scaletti C, Romagnani P, Carossino AM, Pignone A, Emmi L, Pulilli C, Pizzolo G, Maggi E, Romagnani S. Type-2 helper T cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. *Am J Pathol* 1997; 151:1751-58.
68. Atamas SP, Yorovsky W, Wise R, Wigley FM, Goter Robinson CJ, Henry P, Alms WJ, White B. Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999;42:1168-78.
69. Jimenez SA, Freundlich B, Rosenbloom J. Selective inhibition of human diploid fibroblast collagen synthesis by interferons. *J Clin Invest* 1984;74:1112-6.
70. Granstein RD, Murphy GF, Margolis RJ, Byrne MH, Amento EP. Gamma-interferon inhibits collagen synthesis in vivo in the mouse. *J Clin Invest* 1987; 79:1254-8.
71. Freundlich B, Jimenez SA, Steen VD, Medsger TA Jr, Szkonicki M, Jaffe HS. Treatment of systemic sclerosis with recombinant interferon-gamma. A phase I/II clinical trial. *Arthritis Rheum* 1992;35:1134-42.
72. Polisson RP, Gilkeson GS, Pyun EH, Pisetsky DS, Smith EA, Simon LS. A multicenter trial of recombinant human interferon gamma in patients with systemic sclerosis: effects on cutaneous fibrosis and interleukin-2 receptor levels. *J Rheumatol* 1996; 23:654-658.
73. Hunzelmann N, Anders S, Fierlbeck G, Hein R, Herrmann K, Albrecht M, Bell S, Thur J, Muehle R, Adelman-Grill B, Wehner-Caroli J, Gaus W, Krieg T. Systemic sclerosis: Multicenter trial of 1 year of treatment with recombinant interferon-gamma. *Arch Dermatol* 1997;133: 609-13.
74. Grassegger A, Schuler G, Hessenberger G, Walder-Hantich B, Jabkowski J, MacHeiner W, Salmhofer W, Zahel B, Pinter G, Herold M, Klein G, Fritsch PO. Interferon gamma in the treatment of systemic sclerosis: a randomized controlled multicenter trial. *Br J Dermatol* 1998;139:639-48.
75. Le Hir M, Martin M, Haas C. A syndrome resembling human systemic sclerosis (scleroderma) in MRL/lpr mice lacking interferon-gamma(IFN-g) receptor (MRL/lprgR-/-). *ClinExpImmunol* 1999;115:281-87.
76. Albanesi C, Scarponi C, Cavanf A, Federici M, Nasorri F, Girolomoni G. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes and modulates interferon-gamma and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes. *J Invest dermatol* 200; 115:81-87.
77. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo I, Ait-Yahia S, Maat C et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce pro-inflammatory, and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996;183: 2593-603.
78. Nabel EG, Shum L, Pompili VJ, Yang Z-Y. Direct transfer of transforming factor β 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:10759-63.
79. Varga J, Jimenez SA. Modulation of collagen gene expression: its relation to fibrosis in systemic sclerosis and other disorders. *Ann Intern Med.* 1995; 122:60-2.

80. Yamakage A, Kikuchi K, Smith EA, LeRoy EC. *J Exp Med* 1992; 175:1227-34.
81. Ludwicka A, Ohbva T, Trojanowska M, Yamakage A, Strange C, Smith EA, Leroy EC, Sutherland S, Silver RM. Elevated levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta-1 in bronchoalveolar lavage from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1995 ;22:1876-83.
82. Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Blockade of endogenous transforming growth factor b signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts. Association with increased expression of transforming growth factor b receptors. *Arthritis Rheum* 2001;44:474-80.
83. Kawaguchi Y., Hara M., Wright T.M., *J. Clin. Invest.* 1999; 103:1253-60.
84. Kubo M, Ihn H, Yamane K, Tamaki K. Upregulated expression of transforming growth factor b receptors in dermal fibroblasts in skin sections from patients with localized scleroderma. *Arthritis Rheum* 2001;44:73104.
85. Kawaguchi Y, Hara M, Wright TM. Endogenous IL-1a from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A. *J Clin Invest* 1999; 103:1253-60.
86. Sprot H, Muller-Ladner U, Distler O, Gay RE, Baraam SR, Landthaler M, Scholmerich J, Lang B, Gay S. Detection of activated complement complex C5b-9 and complement receptor C5a in skin biopsies of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2000;27:402-4.
87. Faller DV. Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26:74-84.
88. Hasegawa M, Sato S, Fujimoto M, Ihn H, Kikuchi K, Takehara K. Serum levels of interleukin-6(IL-6), oncostatin M, soluble IL-6 receptor, and soluble gp 130 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1998;25:308-13.
89. Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin(IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ cells. *J Exp Med* 1997;185:461-9.
90. Takemura H, Suzuki H, Fujisawa H, Yuhara T, Akama T, Yamane K, Kashiwagi H. Enhanced interleukin-6 production by cultured fibroblasts from patients with systemic sclerosis in response to platelet derived growth factor. *J Rheumatol* 1998;25:1534-9.
91. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, Takehara K. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 2000;27:149-54.
92. Steffen CL, Ball-Mirth DK, Harding PA, Bhattacharyya N, Pillai S, Brigstock DR. Characterization of cell-associated and soluble forms of connective tissue growth factor (CTGF) produced by fibroblast cells in vitro. *Growth factors* 1998; 15(3): 199-213.
93. Allen JT, Knight RA, Bloor CA, Spiteri MA. Enhanced insulin-like growth factor binding protein-related protein 2 (Connective tissue growth factor) expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999 Dec; 21(6): 693-700.
94. Sato s, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, Takehara K. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in

- patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 2000 Jan; 27(1): 149-54.
95. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Fujimoto M, Grotendorst GR, Takehara K. Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *J Invest Dermatol* 1996 Apr; 106(4): 729-33.
 96. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines(monocyte chemotactic protein-1(MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha(MIP-1 alpha) and Mip-1beta) in patients with systemic sclerosis:MCP-1 and MIP-1 alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 1999; 117:159-65.
 97. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi, Takehara K. Elevated serum tumor necrosis factor- alpha levels in patients with systemic sclerosis: association with pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 1997;24:663-65.
 98. Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW. Human T cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 1995;42:455-500.
 99. Rowen L, Koop BF, Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 1996;272:1755-62.
 100. Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC. Structure of the complex between human T cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 1996;384:134-41.
 101. Garcia KC, Degano M, Pease LR, Huang M, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA. Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science* 1998 ;279:1166-72.
 102. Boehm T, Rabbitts TH. The human T cell receptor genes are targets for chromosomal abnormalities in T cell tumors. *Faceb J* 1989;3:2344-59.
 103. Yurovsky W, Wigley FM, Wise RA, White B. Skewing of CD8+ T cells repertoire in the lungs of patients with systemic sclerosis. *Hum Immunol* 1996;48:84-97.
 104. Sakamoto A, Sumida T, Maeda T, Itoh M, Asai T, Takahishi H, Yoshida S, Koike T, Tomioka H, Yoshida S. T cell receptor VP repertoire of double negative α/β T cells in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1992;35:944-48.
 105. Giacomeli R, Matucci-Cerinic M, Cipriani P, Ghersetich I, Lattanzio R, Pavan A, Pignone A, Cagnoni ML, Loti T, Tonietti G. Circulating Vdelta 1 T cells are activated and accumulate in the skin of systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* 1998;41:327-34.
 106. Yurovsky VV, Sutton PA, Schultze DA, Wigley FM, Wise RA, Howard RF, White B. Expansion of selected V δ 1 $\gamma\delta$ T cells in systemic sclerosis patients. *J Immunol* 1994;153:881-86.
 107. French LE, Lessin SR, Addya K, Denardo B, Margolis DJ, Leonard DG, Rook AH. Identification of clonal T cells in the blood of patients with systemic sclerosis: positive correlation with response to photopheresis. *Arch Dermatol* 2001; 137:1309-13.
 108. Kuwana M, Medsger TA Jr, Wright TM. Highly restricted TCR- α usage by autoreactive human T cell clones specific for DNA topoisomerase I. Recognition of an immunodominant epitope. *J Immunol* 1997;158:485-491.
 109. Pandey JP, LeRoy EC. Current Comment: Human cytomegalovirus and the vasculopathies of autoimmune diseases (especially scleroderma), allograft rejection, and coronary restenosis. *Arthritis Rheum* 1998;41:10-15.

110. Neidhart M, Kuchen S, Distler O, Bruhlman P, Michel BA, Gay R, Gay S. Increased serum levels of antibodies against human cytomegalovirus and prevalence of antibodies in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999; 42:389-92.
111. Jimenez SA, Batuman O. Immunopathogenesis of systemic sclerosis: possible role of retroviruses. *Autoimmunity* 1993; 16:225-233.
112. Arnett FC. HLA and autoimmunity in scleroderma (systemic sclerosis). *Intern Rev Immunol* 1995; 12:107-28.
113. Rihs HP, Conrad K, Mehlor J, May-Taube K, Weltcke B, Frank KH, Baur X. Molecular analysis of HLA-DPB1 alleles in idiopathic systemic sclerosis and uranium miners with systemic sclerosis. *Intern Arch Allergy Immunol* 1996;109:216-22.
114. Falkner D, Wilson J, Medsger TA Jr, Morel PA. HLA and clinical associations in systemic sclerosis patients with anti-Th/To antibodies. *Arthritis Rheum* 1998;41:74-80.
115. Fanning GC, Welsh KI, Bunn C, Du Bois R, Black CM. HLA associations in three mutually exclusive autoantibody subgroups in UK systemic sclerosis patients. *Br J Rheumatol* 1998;37:201-7.
116. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Inoko H, Tsuji K. The HLA-DR and DQ genes control the autoimmune response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis (scleroderma). *J Clin Invest* 1993;92:1296-301.
117. Kang HI *Curr Opin Rheumatol* 1992 Dec; 4 (6): 857-61 [Genetic and environmental factors in systemic sclerosis.]
118. Natalie C. Lampert, Paul C. Evans, Tanya L. Hashizumi, Sean Maloney, Ted Cooley, Dan E. Furst and J. Lee Nelson, Cutting Edge: Persistent Fetal Microchimerism in T-Lymphocytes is associated with HLA-DQA1*0501: Implications in Autoimmunity *J. Immunol* 2002; 164:5545-8.
119. Sakkas LI, Moore DF, Akritidis NC. Cancer in families with systemic sclerosis. *Am J Med Genet* 1995;310:223-5.
120. Artlett, C.M., J.B. Smith, S.A. Jimenez. 1998. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 338:1186-1191.
121. Nelson JL, Furst DE, Maloney S, . Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 1998;351(9102):559-62.
122. Artlett CM, Cox LA, Jimenez SA./ detection of cellular microchimerism of male or female origin in systemic sclerosis patients by polymerase chain reaction analysis of HLA-Cw antigens. *Arthritis Rheum* 2000;43:1062-7.
123. Scaletti C, Vultaggio A, Bonifacio S, Emmi L, Torricelli F, Maggi E, Romagnani S, Piccinni MP. Th2-oriented profile of male offspring T cells present in women with systemic sclerosis and reactive with maternal major histocompatibility complex antigens. *Arthritis Rheum* 2002;46:445-50.
124. Labert N, Distler O, Muller-Ladner U, Tylee TS, Furst DE, Nelson JL. HLA-DQA1*0501 is associated with diffuse systemic sclerosis in Caucasian me *Arthritis Rheum* 2000;43:2005.
125. Labert NC, Evans PC, Hashizumi TL, Maloney S, Gooley T, Furst DE, Nelson JL. Cutting edge: persistence fetal microchimerism in T lymphocytes is associated with HLA*DQA10501: implications in autoimmunity. *J Immunol* 2000;164:5545-8.

126. Murata, Nakauchi H, Sumita T. Microchimerism in Japanese patients with systemic sclerosis. *Lancet* 1999;354:220.
127. Ong CJ, Ip S, The SJ, Wong C, Jirik FR, Grusby MJ, The HS. A role for T helper 2 cells in mediating skin fibrosis in tight-skin mice. *Cell Immunol* 1999; 196:60-8.
128. Ong C, Wong C, Roberts CR, The HS, Jirik FR. Anti-IL-4 treatment prevents dermal collagen deposition in the tight" skin mouse model of scleroderma. *Eur J Immunol* 1998;28:2619-29.
129. Tsuji-Yamada J, Nakazawa M, Takahashi K, Iijima K, Hattori S, Okuda K, Minami M, Ikezawa Z, Sasaki T. Effect of IL-12-encoding plasmid administration on tight-skin mice. *Biochem Biophys Res Comm* 2001 ;280:707-12.
130. Blank M, Levy Y, Amital H, Shoenfeld Y, Pines M, Genina O. The role of intravenous immunoglobulin therapy in mediating skin fibrosis in tight skin mice. *Arthritis Rheum* 2002;46:1689-90.
131. Wooley PH, Sud S, Langendorfer A, Calkins C, Christner PJ, Peters J, Jimenez SA. T cells infiltrating the skin of Tsk2 scleroderma-like mice exhibit T cell receptor bias. *Autoimmunity*. 1998;27(2):91-8.
132. Dodig TD, Mack KT, Cassarino DF, Clark SH. Development of the tight-skin phenotype in immune deficient mice. *Arthritis Rheum* 2002;44:723-7.
133. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. I. Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999; 112:456-62.
134. Wynn TA, Cheever AW, Jankovic D, Poindexter RW, Caspar P, Leiws FA, Sher A. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature* 1995; 376: 594-596.
135. Serpier H, Gillery P, Salmon-Her V, Garnotel R, Georges N, Kalis B, Marquart FX. Antagonistic effects of interferon-gamma and interleukin-4 on fibroblast cultures. *J Invest Dermatol* 1997; 109:158-162.
136. Ziesche R, Hofbauer E, Wittmann K, Petkov V, Block L-H. A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-Ib and low dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 1999;341:1264-9
137. R&D Systems, Monoclonal Anti-human CD3ε Antibody (clone UCHT1). Specification sheet. Catalog No. MAB100, Lot No ARH02.
138. DAKO, Monoclonal Mouse Anti-Human CD68 (clone KP1). Specification sheet. Code No. M 0814, Lot 120. Edition 13.12.00.
139. DAKO, Monoclonal Mouse Anti-Human CD69 (clone FN50). Specification sheet. Code No. M 7171, Lot 099. Edition 10.10.01.