



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΟΜΩΝΥΜΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Π. ΜΠΟΓΔΑΝΟΣ

Διδακτορική Διατριβή

**«Ανίχνευση αντιγονοειδικών αντισωμάτων έναντι λοιμωδών
παραγόντων που σχετίζονται με την παθογένεια αυτοάνοσων
ρευματικών και νευρολογικών παθήσεων»**

ΥΠΟ

ΜΑΡΟΥ Ι. ΕΜΜΑΝΟΥΕΛΑΣ

Τεχνολόγος Ιατρικών εργαστηρίων & Νοσηλεύτρια

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2023

© 2022 ΜΑΡΟΥ ΕΜΜΑΝΟΥΕΛΑ

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).

Στα παιδιά μου

Μαρίλια, Κωνσταντίνο, Ελισάβετ

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (5^η/01-04-2009 ΓΣΕΣ):

1^ο Μέλος Δημήτριος Μπόγδανος (Επιβλέπων)

Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2^ο Μέλος Λάζαρος Σακκάς

Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3^ο Μέλος Ευθύμιος Δαρδιώτης

Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

4^ο Μέλος Ειρήνη Ρηγοπούλου

Καθηγήτρια Παθολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

5^ο Μέλος Ζωή Δανιήλ

Καθηγήτρια Πνευμονολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

6^ο Μέλος Χριστίνα Κατσιάρη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας-Ρευματολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

7^ο Μέλος Ζαφειρίου Ευτέρπη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα της διατριβής μου Καθηγητή κ. Δημήτριο Μπόγδανο του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθυντή της Ρευματολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας που με τίμησε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριο του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια. Επιπλέον, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την έμπρακτη και συνεχή υποστήριξη του, την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση του, την αμέριστη βοήθεια του, τις πολύτιμες συμβουλές του, τις εύστοχες παρατηρήσεις του και ενθάρρυνση για την επίτευξη του βέλτιστου δυνατού αποτελέσματος. Όλα αυτά τα χρόνια ο επαγγελματισμός του, η μεθοδικότητα και η επιμονή του αποτελέσαν για μένα πηγή έμπνευσης. Η συνεργασία μαζί του ήταν μια από τις σημαντικότερες, πολύτιμες και ωραιότερες εμπειρίες της ζωής μου. Δεν θα ξεχάσω επίσης ποτέ την υποστήριξη του όσον αφορά εμένα και την οικογενειά μου, καθώς η διδακτορική μου διατριβή συνέπαισε το ίδιο χρονικό διάστημα με τις εγκυμοσύνες μου.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής.

Ένα θερμό ευχαριστώ στον Καθηγητή Κύριο Λάζαρο Σακκά, επειδή μου έδωσε την ευκαιρία να είμαι μέλος του Εργαστηρίου της Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας και του οποίου οι συμβουλές υπήρξαν πολύτιμες για την λογική ροή και την βέλτιστη δομή της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Κύριο Ευθύμιο Δαρδιώτη, τρίτο μέλος της επιτροπής της διατριβής αυτής, για την επίβλεψη της εργασίας μου και την άμεση ανταπόκριση κάθε φορά που χρειαζόμουν τη βοήθειά του.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ το οφείλω στον κ. Λιάσκο Χρήστο, επιστημονικό συνεργάτη της Ρευματολογικής κλινικής του πανεπιστημιακού γενικού νοσοκομείου Λάρισας, για τη βοήθεια του στη συλλογή και στην πρωτογενή επεξεργασία των κλινικών δειγμάτων, για την αμέριστη βοήθεια του στην διεκπεραίωση των πειραμάτων, τις πολύτιμες συμβουλές του, την υποστήριξη του και την αμείωτη προθυμία του να απαντήσει στους προβληματισμούς μου, καθώς επίσης για την πολύτιμη βοήθεια του στην συγγραφή της διατριβής μου και την διεκπεραίωση των στατιστικών αναλύσεων, για την άψογη συνεργασία μας και το υλικό που μου προσέφερε.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Ρευματολογίας –Κλινικής ανοσολογίας Μαυρόπουλο Θάνο, Ευθυμίου Γεώργιο, Γκουτζουρέλα Αθανάσιο και Πατρικίου Ελένη για την άριστη και αρμονική συνεργασία που είχαμε, τις επιστημονικές γνώσεις και την βοήθεια τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θέλω να εκφράσω στο στήριγμα της ζωής μου, στον σύζυγό μου, Αλεξίου Χρήστο, για την συναισθηματική στήριξη του, την πολύτιμη βοήθεια του, την κατανόηση του, την εμπιστοσύνη του στις δυνατότητες μου, την αισιοδοξία του, την ενθάρρυνση του και την ανεξάντλητη υπομονή του στις πολυάριθμες ώρες ενασχόλησής μου με τη διατριβή. Χωρίς την στήριξη του, την αγάπη του και την φροντίδα του δεν θα τα είχα καταφέρει.

Ένα πολύ πολύ μεγάλο ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου οφείλω στις τρεις μεγαλύτερες αγάπες της ζωής μου, τα παιδιά μου, Μαρίλια, Κωνσταντίνο και Ελισάβετ, για την υπομονή και ηρεμία που έδειξαν κατά τη συγγραφή της διατριβής μου και ένα μεγάλο συγνώμη για το χρόνο που στερήθηκαν μαζί μου.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στους γονείς μου και στον αδελφό μου για όλα όσα έχουν προσφέρει για μένα και που συνεχίζουν να προσφέρουν με υπομονή και αγάπη και που πάντα είναι δίπλα

μου. Η κατανόηση τους, η συνεχής ενθάρρυνση τους, η αμέριστη στήριξη τους, η συμπαράσταση τους και η πίστη τους στις δυνατότητές μου σε κάθε βήμα και στάδιο της ζωής μου δίνουν δύναμη και θάρρος να προσπαθώ και να μην υποκύπτω στις δυσκολίες. Σε αυτούς τους τρεις ανθρώπους και τον σύζυγο μου οφείλω την επιτυχή διεκπεραίωση της εργασίας μου και όλα όσα έχω πετύχει μέχρι σήμερα.

Σας ευχαριστώ όλες και όλους,

Μάρου Εμμανουέλα

Σύντομο Βιογραφικό

Εκπαίδευση

- Ιαν 16/
Οκτ 19 **Πτυχίο Νοσηλευτικής**
ΑΤΕΙ Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα
Βαθμός πτυχίου: 8,51
Τίτλος πτυχιακής εργασίας: “Νοσηλευτική φροντίδα σε μουσουλμάνους”
- Ιουλ 15/
Σήμερα **Υποψήφια Διδάκτωρ (Ph.D.) Ιατρικής**
Τμήμα Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα (Ελλάδα) Τίτλος διδακτορικής εργασίας: “Ανίχνευση αντιγονοειδικών αντισωμάτων έναντι λοιμωδών παραγόντων που σχετίζονται με την παθογένεια αυτοάνοσων ρευματικών και νευρολογικών Παθήσεων”
- Σεπ 13/
Ιουλ 14 **Μεταπτυχιακό στην “Γενετική του ανθρώπου”**
Τμήμα Ιατρικής του πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Βαθμός πτυχίου: 7,01
Τίτλος μεταπτυχιακής εργασίας: “ηπατοκυτταρικός καρκίνος: μοριακοί μηχανισμοί και θεραπευτικοί Στόχοι”
- Σεπ 12/
Ιουλ 13 **ΑΣΠΑΙΤΕ “Ετήσιο Πρόγραμμα Παιδαγωγικής Κατάρτισης”**
Βαθμός πτυχίου: 9,4
Τίτλος πτυχιακής εργασίας: “Διαχρονικός έλεγχος της συναισθηματικής αντιληπτικότητας των ενηλίκων”
- Σεπ 07/
Ιουν 12 **Πτυχίο Ιατρικών εργαστηρίων**
ΑΤΕΙ Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα
Βαθμός πτυχίου: 7,55
Τίτλος πτυχιακής εργασίας: “ Ηπατίτιδα c”
- Σεπ 04/
Ιουν 07 **Απολυτήριο Ενιαίου Λυκείου**
Δημόσιο Γενικό Λύκειο, Άρτα (Ελλάδα)

Επαγγελματική εμπειρία

- 01-09/
Σήμερα **Εκπαιδευτικός σε Επαγγελματικό Λύκειο**
Ειδικότητα ‘Ιατρικά Εργαστήρια’
- Μαρ 20/
Αυγ 21 **Τεχνολόγος Ιατρικών εργαστηρίων**
Επικουρικό προσωπικό με σύμβαση εργασίας ιδιωτικού δικαίου ορισμένου χρόνου
στο “Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας”

- 02-12-19/ 11-03-20 **Νοσηλεύτρια** στην ψυχιατρική κλινική “Μιχαήλ Θωμά Α.Ε. Αναγέννηση”
- 01-04-19/ 30-09-19 **Πρακτική άσκηση στη Νοσηλευτική** στο “Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας”
- Ιουλ 15/ Σήμερα **Υποψήφια Διδάκτωρ (Ph.D.) Ιατρικής**
Τομέας Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή
Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα (Ελλάδα)
- Απρ 16/ Δεκ 16 **Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων**
Εννιάμηνη εργασία σε Εργαστήριο Μικροβιολογίας-Βιοπαθολογίας.
Λάρισα, Υπεύθυνη: Πραπτή Αναστασία
- Σεπ 13/ Ιουλ 14 **Μεταπτυχιακός Ερευνητικός Συνεργάτης**
Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσοθεραπείας και Μοριακής Ανοσοδιαγνωστικής, Τομέας Βιοϊατρικής, Ινστιτούτο Έρευνας και Τεχνολογίας Θεσσαλίας, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης, Λάρισα, Ελλάδα
- Ιαν 14/ Ιουλ 14 **Πρακτική Άσκηση**
Εργαστήριο Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας, Διευθύντρια: Καθηγήτρια Α.Τσέζου
Εξοικείωση στις εξής μοριακές τεχνικές:
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
- Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης
- Φθορίζων in situ υβριδισμός (Fluorescent in situ hybridization, FISH)
- Ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA)
- Μέθοδο Ανοσοαποτύπωσης
- 1-10-13/ 31-01-14 **Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων**
Πεντάμηνη εργασία (μέσω προγράμματος ΕΣΠΑ) στην εταιρεία “Διαγνωστικό Ιατρική ΑΕ”.
Λάρισα, Υπεύθυνος: Παραφέστας Βασίλειος
- 01-07-15/ 30-10-15 **Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων**
Πεντάμηνη εργασία (μέσω προγράμματος ΕΣΠΑ) σε Μικροβιολογικό εργαστήριο
Λάρισα, Υπεύθυνος: Ράπτης Χαράλαμπος
- 01-04-11/ 30-09-11 **Πρακτική άσκηση στα Ιατρικά Εργαστήρια** στο “Γενικό Νοσοκομείο Άρτας”

Δημοσιεύσεις άρθρων στο Διεθνή Ιατρικό Τύπο

- Efthymiou G, Dardiotis E, Liaskos C, Marou E, Tsimourtou V, Rigopoulou EI, Scheper T, Daponte A, Meyer W, Sakkas LI, Hadjigeorgiou G, Bogdanos DP. Immune responses against Helicobacter pylori-specific antigens differentiate relapsing remitting from secondary progressive multiple sclerosis. *Sci Rep*. 2017 Aug 11;7(1):7929. doi: 10.1038/s41598-017-07801-9.
- Liaskos C, Marou E, Simopoulou T, Barmakoudi M, Efthymiou G, Scheper T, Meyer W, Bogdanos DP, Sakkas LI. Disease-related autoantibody profile in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity*. 2017 Nov;50(7):414-421. doi: 10.1080/08916934.2017.1357699. Epub 2017 Jul 27.
- Marou E, Liaskos C, Efthymiou G, Dardiotis E, Daponte A, Scheper T, Meyer W, Hadjigeorgiou G, Bogdanos DP, Sakkas LI. Increased immunoreactivity against human cytomegalovirus UL83 in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2017 Sep-Oct;35 Suppl 106(4):31-34. Epub 2017 Feb 27.
- Marou E, Liaskos C, Simopoulou T, Efthymiou G, Dardiotis E, Katsiari C, Scheper T, Meyer W, Hadjigeorgiou G, Bogdanos DP, Sakkas LI. Human cytomegalovirus (HCMV) UL44 and UL57 specific antibody responses in anti-HCMV-positive patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. 2017 Apr;36(4):863-869. doi: 10.1007/s10067-017-3553-5. Epub 2017 Jan 26.
- Efthymiou G, Dardiotis E, Liaskos C, Marou E, Tsimourtou V, Scheper T, Meyer W, Daponte A, Sakkas LI, Hadjigeorgiou G, Bogdanos DP. Anti-hsp60 antibody responses based on Helicobacter pylori in patients with multiple sclerosis: (ir)Relevance to disease pathogenesis. *J Neuroimmunol*. 2016 Sep 15;298:19-23. doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.06.009. Epub 2016 Jun 23.
- Christos Liaskos¹, Emmanouela Marou¹, Theodora Simopoulou¹, Athanasios Gkoutzourelas¹, Maria Barmakoudi¹, George Efthymiou¹, Thomas Scheper², Wolfgang Meyer², Christina G. Katsiari¹, Dimitrios P. Bogdanos¹, Lazaros I. Sakkas¹. Multiparametric autoantibody profiling of patients with systemic sclerosis in Greece. *Mediterr J Rheumatol* 2018;29(3):120-6 <https://doi.org/10.31138/mjr.29.3.120> Article Submitted: 11/06/2018; Revised Form: 13/09/2018; Article Accepted 23/09/2018.
- G Efthymiou, E Dardiotis, C. Liaskos, E Marou, T Scheper, W Meyer, A Daponte, D. Daoussis, G. Hadjigeorgiou, DP Bogdanos, LI Sakkas. A comprehensive analysis of antigen-specific antibody responses against human cytomegalovirus in patients with systemic sclerosis. *Clin Immunol*. 2019 Jul 29;207:87-96. doi: 10.1016/j.clim.2019.07.012. [Epub ahead of print].

- Efthymiou G, Liaskos C, Simopoulou T, Marou E, Patrikiou E, Scheper T, Meyer W, Daoussis D, Sakkas LI, Bogdanos DP. Immunol Res. Antigen-specific humoral responses against Helicobacter pylori in patients with systemic sclerosis. 2020 Feb;68(1):39-47. doi: 10.1007/s12026-020-09124-w. PMID: 32253703

Peer Reviewed Περιλήψεις σε Πρακτικά Συνεδρίων

1. C. Liaskos, E. Marou, T. Simopoulou, Barmakoudi, T. Scheper, W. Meyer, C. G. Katsiari, D. Bogdanos, L. I. Sakkas. A Comprehensive analysis of 12 disease-specific autoantibodies in Greek patients with systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 2016;75 (Suppl2) : 1114 DOI: 10.1136/annrheumdis-2016-eular.4355
2. Z. Tsouris, G. Efthymiou, C. Liaskos, E. Marou, M. Sokratous, A. Michalopoulou, V. Tsimourtu, G. Tsivgoulis, T. Scheper, W. Meyer, L.I. Sakkas, G. Hadjigeorgiou, D.P. Bogdanos, E. Dardiotis. "Antibodies against Helicobacter pylori-specific antigens differentiate relapsing remitting from secondary progressive multiple sclerosis". Multiple Sclerosis Journal 2016; 22: (Suppl3), poster P449, page 189
3. C. Liaskos, E. Marou, T. Simopoulou, M. Barmakoudi, G. Efthymiou, T. Scheper, W. Meyer, D. P. Bogdanos, L. Sakkas. Disease-related autoantibody profile in systemic sclerosis in Greece. Ann Rheum Dis 2017; 76 (Suppl2): page 903, (poster SAT048)
4. C. Liaskos, A. Gkoutzourelas, T. Simopoulou, E. Marou, T. Scheper, W. Meyer, L. Sakkas, D. P. Bogdanos. Epitope profiling of anti-Ro52 antibodies in patients with systemic sclerosis, systemic sclerosis-associated primary biliary Cirrhosis, and Primary Biliary Cirrhosis alone. Ann Rheum Dis 2017; 76, page 1271 (Suppl2): (poster AB0626)
5. G. Efthymiou, C. Liaskos, E. Marou, T. Simopoulou, T. Scheper, W. Meyer, D. Bogdanos, L. Sakkas. The first comprehensive analysis of antigen specific cytomegalovirus antibody responses in patients with SSc. Journal of Scleroderma and related disorders. 2018; 3(IS):32-68, poster P016, page 40

Παρουσιάσεις σε συνέδρια (Αναρτημένες)

- G. Efthymiou, E. Dardiotis, E. Marou, C. Liaskos, W. Meyer, LI. Sakkas, G. Hadjigeorgiou, DP. Bogdanos, Helicobacter pylori-specific antibody responses in patients with multiple sclerosis: relevance to disease pathogenesis (12th Dresden Symposium on Autoantibodies. From Autoantibody research to standardized diagnostic assays in the management of Human Diseases. 23-26 September. Dresdes. 2015)
- C. Liaskos, E. Marou, G. Efthymiou, T. Simopoulou, C. Katsiari, W. Meyer, DP. Bogdanos, LI. Sakkas. Human cytomegalovirus specific antibody responses in patients with systemic sclerosis (12th Dresden Symposium on Autoantibodies. From Autoantibody research to standardized diagnostic assays in the management of Human Diseases. 23-26 September. Dresdes. 2015)

- G. Efthymiou, E. Dardiotis, E. Marou, C. Liaskos, T. Scheper, W. Meyer, L.I. Sakkas, G. Hadjigeorgiou, D.P. Bogdanos. Helicobacter Pylori CagA and VacA antibody reactivity in multiple sclerosis from central Greece. (10th International Congress on Autoimmunity. 6-10 April. Leipzig. Germany. 2016)
- G. Efthymiou, E. Dardiotis, E. Marou, C. Liaskos, V. Tsimourtou, S. Thomas, W. Meyer, L. Sakkas, G. Hadjigeorgiou, D. Bogdanos. Immune responses against Helicobacter Pylori heat shock 60 in patients with multiple sclerosis. (10th International Congress on Autoimmunity. 6-10 April. Leipzig. Germany. 2016)
- G. Efthymiou, E. Dardiotis, C. Liaskos, E. Marou, S. Arseniou, D. Rikos, V. Tsimourtou, W. Meyer, L. Sakkas, G. Hadjigeorgiou, D. Bogdanos. Diagnostic and clinical significance of antigen-specific anti-Helicobacter pylori antibodies in patients with multiple sclerosis. (2nd Congress of the European Academy of Neurology. Copenhagen, Denmark, May 28-31 2016)
- C. Liaskos, E. Marou, T. Simopoulou, M. Barmakoudi, T. Scheper, W. Meyer, C. G. Katsiari, D. Bogdanos, L. Sakkas. A Comprehensive analysis of 12 disease-specific autoantibodies in Greek patients with systemic sclerosis. (EULAR 2016 Annual European Congress of Rheumatology. London. England)
- Z. Tsouris, G. Efthymiou, C. Liaskos, E. Marou, M. Sokratous, A. Michalopoulou, V. Tsimourtou, G. Tsivgoulis, T. Scheper, W. Meyer, L.I. Sakkas, G. Hadjigeorgiou, D.P. Bogdanos, E. Dardiotis. "Antibodies against Helicobacter pylori-specific antigens differentiate relapsing remitting from secondary progressive multiple sclerosis". (32nd Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS). 14-17 September. London, England. 2016)
- Χ.Λιάσκος, Ε. Μάρου, Θ. Σιμοπούλου, Μ. Μπαρμακούδη, Ε. Πατρικίου, W. Meyer, Χ. Κατσιάρη, Δ.Π. Μπόγδανος, Λ.Ι.Σακκάς. Διαγνωστική και κλινική σημασία 13 νοσοειδικών αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση. (Πόστερ Α43). (24^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ρευματολογίας. 8-11 Δεκεμβρίου. Αθήνα. 2016)
- C. Liaskos, E. Marou, T. Simopoulou, M. Barmakoudi, G. Efthymiou, T. Scheper, W. Meyer, D. P. Bogdanos, L. Sakkas. Disease-related autoantibody profile in systemic sclerosis in Greece (poster AB0648). (Eular 2017. Annual European Congress of Rheumatology. Spain, Madrid. 14-17 June 2017)
- C. Liaskos, A. Gkoutzourelas, T. Simopoulou, E. Marou, T. Scheper, W. Meyer, L. Sakkas, D. P. Bogdanos. Epitope profiling of anti-Ro52 antibodies in patients with systemic sclerosis, systemic sclerosis-associated primary biliary Cirrhosis, and Primary Biliary Cirrhosis alone. (Eular 2017. Annual European Congress of Rheumatology. Spain, Madrid. 14-17 June 2017)
- G. Efthymiou, C. Liaskos, E. Marou, T. Simopoulou, T. Scheper, W. Meyer, DP Bogdanos, LI. Sakkas. Antibody responses against human

cytomegalovirus antigens in patients with systemic sclerosis (P46). (13th DSA (Dresden Symposium on Autoantibodies). 27-30 September, Dresden, Germany)

- G. Efthymiou, C. Liaskos, E. Marou, T. Simopoulou, T. Scheper, W. Meyer, D. Bogdanos, L. Sakkas. The first comprehensive analysis of antigen specific cytomegalovirus antibody responses in patients with SSc (P016). 5th Systemic Sclerosis World Congress February 15-17, 2018. Bordeaux.
- G. Efthymiou, C. Liaskos, E. Marou, T. Simopoulou, T. Scheper, W. Meyer, D.P Bogdanos, L.I. Sakkas. Antibody responses against human cytomegalovirus antigens in patients with systemic sclerosis. (11th International Congress on Autoimmunity 16-20 May, Lisbon, Portugal. 2018)
- G. Efthymiou, C. Liaskos, E. Marou, E. Dardiotis, V. Tsimourtou, T. Scheper, W. Meyer, D. P. Bogdanos, G. Hadjigeorgiou, L. I. Sakkas. The Epstein-Barr virus infection in systemic sclerosis (poster AB0751). (Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) 2018. 13-16 June. Amsterdam. 2018).
- G. Efthymiou, C. Liaskos, E. Marou, V. Tsimourtou, T. Scheper, W. Meyer, G. Hadjigeorgiou, L.I. Sakkas, E. Dardiotis, D.P. Bogdanos. The role of immune responses against Epstein - Barr virus in Systemic Sclerosis. (Πανελλήνιο Πολυθεματικό Συνέδριο Αυτοάνοσων Νοσημάτων, Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας. 5 - 7 Απρ 2019. Μακρυνίτσα Πηλίου, Μαγνησία.)
- G. Efthymiou, Z. Tsouris, C. Liaskos, E. Marou, M. Sokratous, V. Tsimourtou, T. Scheper, W. Meyer, G. Hadjigeorgiou L.I. Sakkas, E. Dardiotis, D.P. Bogdanos. Immune responses to Helicobacter pylori-specific antigens differentiate relapsing remitting from secondary progressive multiple sclerosis.
- E. Marou, C. Liaskos, E. Patrikiou, T. Scheper, W. Meyer, L.I. Sakkas, D.P. Bogdanos. Antibodies against Borrelia specific antigens in patients with systemic sclerosis.
- G. Efthymiou, E. Dardiotis, C. Liaskos, E. Marou, V. Tsimourtou, T. Simopoulou, T. Scheper, W. Meyer, A. Daponte, G. Hadjigeorgiou, D.P. Bogdanos, L.I. Sakkas. Anti-human Cytomegalovirus Humoral responses in patients with Systemic Sclerosis.

Ατομικές δεξιότητες

- Πτυχίο Αγγλικών Test of Interactive English (TIE)
- Πτυχίο Πληροφορικής ECDL CORE
- Πτυχίο Πληροφορικής It Skills Proficiency university of Cambridge

**«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΕΙΔΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ
ΛΟΙΜΩΔΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ
ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΩΝ ΡΕΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΠΑΘΗΣΕΩΝ»**

ΜΑΡΟΥ ΕΜΜΑΝΟΥΕΛΑ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Περίληψη

Η παρούσα διδακτορική διατριβή μελέτησε το ρόλο των χυμικών ανοσιακών αποκρίσεων έναντι αντιγόνων του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (HCMV) στην συστηματική σκλήρυνση (ΣΣκ), μια αυτοάνοση μη οργανοειδική ρευματική πάθηση, με απώτερο σκοπό την προσπάθεια συσχέτισης της νόσου με αντιγονοειδικές χυμικές αποκρίσεις που θα μπορούσαν να αποβούν παθοφυσιολογικά εμπλεκόμενοι. Επιδημιολογικές έρευνες ενοχοποιούν τον HCMV ως άμεσα εμπλεκόμενο στην ανάπτυξη αυτοαντισωμάτων της ΣΣκ. Σε ασθενείς με ΣΣκ έχει αναφερθεί αυξημένο ποσοστό αντισωμάτων έναντι του HCMV σε αντίθεση με υγιείς μάρτυρες ή άλλες μη σχετιζόμενες ασθένειες.

Η εργασία αυτή είναι η πρώτη που εστιάζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων εναντίον διαφόρων αντιγόνων του HCMV σε ασθενείς με ΣΣκ. Μελετήθηκαν επίσης ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣκΠ). Η ανίχνευση των αντισωμάτων κατά του HCMV έγινε με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας ως πηγή αντιγόνων εκχύλισμα HCMV, οι πρωτεΐνες του οποίου διαχωρίστηκαν ηλεκτροφορητικά βάσει του μοριακού τους βάρους. Οι κύριες HCMV πρωτεΐνες που μελετήθηκαν είναι οι UL44, UL57, UL55, UL83, UL99, p38, που αποτελούν και τα κύρια αντιγόνα του ιού. Ο στατιστικός υπολογισμός και οι γραφικές παραστάσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση των λογισμικών SPSS και GraphPadPrism 5.

Παρόλο που δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην συχνότητα των anti-HCMV αντισωμάτων στους ασθενείς με ΣΣκ (τόσο στο σύνολο όσο και στους υποτύπους) σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, εν τούτοις ο τίτλος των anti-UL83, anti-UL57 και anti-UL99 αντισωμάτων ήταν αυξημένος στους ασθενείς με ΣΣκ σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες.

Πιθανά ο συνδυασμός αυξημένης συχνότητας και μεγάλου αυξημένου τίτλου αντισωμάτων εναντίον συγκεκριμένων ιικών αντιγόνων ίσως να συντελεί στην απώλεια της ανοσολογικής ανοχής στις αυτοάνοσες ασθένειες όπως η Συστηματική σκλήρυνση.

<i>ACE</i>	Angiotensin Converting Enzyme	Μετατρεπτικό Ένζυμο Αγγειοτενσίνης
<i>ACR</i>	American College of Rheumatology	Αμερικανικό Κολέγιο Ρευματολογίας
<i>ALP</i>	Alkaline Phosphatase	Αλκαλική Φωσφατάση
<i>AUs</i>	Arbitrary units	Σχετικές Μονάδες
<i>BCIP</i>	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate	
<i>Bgp</i>	Glycosaminoglycan	
<i>CENP</i>	Centromere Protein	Πρωτεΐνη Κεντρομεριδίου
<i>CRASPs</i>	Complement Regulator Acquiring Surface Proteins	
<i>Dbps</i>	Decorin binding proteins	
<i>dcSSc (ΔΣΣκ)</i>	Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis	Διάχυτη Δερματική Συστηματική Σκλήρυνση
<i>DLCO</i>	Diffusing Capacity for Carbon Monoxide	Διαχυτική Ικανότητα ή Παράγοντα Μεταφοράς του Πνεύμονα για το Μονοξείδιο του Ανθρακα
<i>EBV</i>	Ebstein Bar Virus	Ιός Λοιμώδους μονοκυττάρωσης
<i>ELISA</i>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Ενζυμικός Ανοσοπροσροφητικός Προσδιορισμός Συνδεδεμένος με Ένζυμο
<i>EULAR</i>	European League Against Rheumatism	
<i>Fbp</i>	Fibronectin binding proteins	
<i>FH-FHL-L</i>	Factor Like Protein	
<i>FITC</i>	Fluorescein Isothiocyanate	Φθοριούχος Φλορεσκειΐνη
<i>FLAB</i>		
<i>GAVE</i>	Gastric Antral Vascular Ectasia	Αγγειακή εκτασία άνδρου στομάχου
<i>GVHD</i>	Graft versus –host disease	
<i>GWAS</i>	genome wide association studies	μελέτες συσχέτισης ολόκληρου γονιδιώματος
<i>HC(YM)</i>	Healthy Control	Υγιής Μάρτυρας
<i>HCMV</i>	Human Cytomegalovirus	Ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός
<i>HEp-2</i>	Human Epithelial type 2	Ανθρώπινα Επιθηλιακά Κύτταρα Τύπου Β
<i>HLA</i>	Human Leukocyte Antigen	Ανθρώπινο Αντιγόνο Λευκοκυττάρων
<i>HRP</i>	Horseradish Peroxidase	Υπεροξειδάση από ραπανάκι
<i>HSCT</i>	Hematopoietic Stem Cell Transplantation	Αιμοποιητικά Αρχέγονα Βλαστικά Κύτταρα
<i>ICP</i>	Infected Cell Protein	Μολυσματική Κυτταρική Πρωτεΐνη
<i>IE</i>	Immediate-Early	Πρώιμες Ιικές Πρωτεΐνες
<i>ILD</i>	Interstitial Lung Disease	Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση
<i>IFL</i>	Indirect Immunofluorescence	Έμμεσος Ανοσοφθορισμός
<i>IFNγ</i>	Interferon Gamma	Ιντερφερόνη- γ
<i>IRS</i>	Internal repeat sequences	Εσωτερικές Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες

<i>ISGs</i>	Interferon-Stimulated Genes	Γονίδια που διεγείρονται από Ιντερφερόνη
<i>kDa</i>	Kilo Dalton	Κιλοντάλτον
<i>lcSSc (ΠΣΣκ)</i>	Limited Cutaneous Sestemic Sclerosis	Περιορισμένη Δερματική Συστηματική Σκλήρυνση
<i>MCTD</i>	Mixed connective tissue disease	Μικτή νόσος συνδετικού ιστού
<i>MHC</i>	Major histocompatibility Complex	Μείζων Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας
<i>MRI</i>	Magnetic Resonance Imaging	Μαγνητική Τομογραφία
<i>MS (ΣκΠ)</i>	Multiple Sclerosis	Σκλήρυνση κατά Πλάκας
<i>NBT</i>	Nitro Blue Tetrazolium	
<i>NIEPS</i>	Non Infectious Enveloped Particles	Μη Μολυσματικά Σωματίδια Φακέλου
<i>NK</i>	Natural Killer	Κύτταρα Φυσιικοί Φονείς
<i>NLRP3</i>	NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3	
<i>NT-proBNP</i>	N-terminal Prob-typenatriuretic Peptide	N-τερματικό προ-νατριουρητικό Πεπτίδιο
<i>OMP's</i>	Outer membrane proteins	Πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης
<i>ORFs</i>	Open Reading Frame	Ανοικτό Πλαίσιο Ανάγνωσης
<i>(RRMS)ΕΥΣκΠ</i>	Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis	Σκλήρυνση κατά πλάκας με εξάρσεις και υφέσεις
<i>SLE(ΣΕΛ)</i>	Systemic Erythematodus lupus	Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος
<i>SRC</i>	Scleroderma Renal Crisis	Σκληροδερματική Νεφρική κρίση
<i>SPMS(ΔΠΣκΠ)</i>	Secondary Progressive Multiple Sclerosis	Δευτεροπαθώς Προοδευτική Σκλήρυνση κατά πλάκας
<i>SSc (ΣΣκ)</i>	Systemic Sclerosis	Συστηματική Σκλήρυνση
<i>TLR</i>	Toll-like receptors	
<i>TROSPA</i>	Tick Receptor for OspA	
<i>UL</i>	Unique Long	Μεγάλη Περιοχή
<i>US</i>	Unique Short	Μικρή Περιοχή
<i>VLsE</i>	Variable Major Protein- Like Sequence	
<i>Vmp</i>	Variable major protein	
<i>WB</i>	Western Blot	Ανοσοαποτύπωση
<i>ANA</i>	Anti-Nuclear Antibody	Αντιπυρηνικά Αντισώματα
<i>OriLyt</i>		
<i>PAH (ΠΑΥ)</i>	Pulmonary Arterial Hypertension	Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση
<i>PCNA</i>	Processivity factor Cell Nuclear Antigen)	

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	14
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	16
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	20
1.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΥΡΗΝΣΗ.....	21
1.2 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	21
1.3 ΜΟΡΦΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΣΚΛΥΗΡΥΝΣΗΣ.....	21
1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ, ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ.....	22
ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ.....	22
1.5 ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ.....	23
1.6 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ.....	26
1.6.1 ΔΕΡΜΑΤΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ.....	26
1.6.2 ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ.....	26
1.6.3 ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ.....	27
1.6.4 ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ.....	28
1.6.5 ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΟ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	29
1.6.6 ΝΕΦΡΙΚΗ ΚΡΙΣΗ ΣΚΛΗΡΟΔΕΡΜΑΤΟΣ.....	30
1.6.7 ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ.....	31
1.6.8 ΑΛΛΕΣ ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ.....	32
1.7 ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΣΣκ.....	34
1.8 ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	37
1.9 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	37
1.10 ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΣΚΟΠΗΣΗ.....	39
1.11 ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ.....	40
1.11.1 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: HCMV ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ.....	44
2.1 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΙΟΥ HCMV.....	44
2.1.1 UL55.....	49
2.1.2 UL57.....	50
2.1.3 UL80.....	50
2.1.4 ΠΡΩΤΕΙΝΗ pp65 (UL83) (LOWER MATRIX PROTEIN).....	52
2.1.5 ΠΡΩΤΕΙΝΗ pp28(UL99).....	55
2.2 ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΙ ΜΕ HCMV.....	57
2.2.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗΣ ΛΥΚΟΣ.....	57
2.2.2 ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ.....	62
2.2.3 ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ.....	66
2.2.5 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 1.....	70
2.2.6 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΥΡΗΝΣΗ.....	71
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	75
3.1 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	75
3.2 ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ.....	75
3.3 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ.....	76
3.4 ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΓΡΑΜΜΗΣ.....	77

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ UL44 ΚΑΙ UL57 ΤΟΥ HCMV ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ.....	80
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	80
4.2 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	80
4.2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ.....	80
4.2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	81
4.2.2.1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ UL44 ΚΑΙ UL57.....	81
4.2.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΣΣκ.....	83
4.2.2.3 ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ.....	84
4.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	84
4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	84
4.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ UL83 ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΤΟΥ HCMV ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣΚΛΗΡΥΝΣΗ.....	93
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	93
5.2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	93
5.2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ.....	93
5.2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ.....	94
5.2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΣΣκ.....	94
5.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	96
5.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	97
5.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	103
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΤΟΥ HCMV ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΙ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ.....	105
6.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	105
6.2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	105
6.2.1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ.....	105
6.2.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΤΟΥ HCMV.....	107
6.2.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΣΣκ.....	107
6.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	107
6.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	108
6.4.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ HCMV.....	108
6.4.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΞΕΧΩΡΙΣΤΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΤΟΥ HCMV.....	108
6.4.3 Anti-HCMV ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΥΠΟΤΥΠΟΥΣ ΤΗΣ ΣΣκ.....	113
6.4.4 ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ Anti-HCMV ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ.....	116
6.4.5 ΣΥΚΓΡΙΣΗ ΤΙΤΛΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΤΟΥ HCMV.....	116
6.4.6 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ Anti-HCMV ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	123
6.4.7 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ Anti-HCMV ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΕΚΔΗΛΩΣΕΩΝ.....	124
6.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	131

1.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

Η συστηματική σκλήρυνση (ΣΣκ) ή σκληρόδερμα είναι μια ανοσοεπαγώμενη νόσος με μεγάλη θνησιμότητα, μεγαλύτερη ίσως από από κάθε άλλο ρευματικό νόσημα, ειδικά στους ασθενείς με διάχυτη δερματική μορφή συστηματικής σκλήρυνσης (ΔΣΣκ, dcSSc: diffuse cutaneous systemic sclerosis) [1, 2]. Η πορεία της ασθένειας στα άτομα αυτά είναι εν πολλοίς αβέβαιη και εξαρτάται κυρίως από την προσβολή εσωτερικών οργάνων (πνεύμονες, νεφροί, γαστρεντερικός σωλήνας κ.α.) που μπορούν να διαταράξουν τη λειτουργία των οργάνων και την ποιότητα ζωής των ασθενών και να οδηγήσουν ακόμη και σε θανατηφόρα έκβαση αν το νόσημα εξελιχθεί. Η ΣΣκ ανήκει στην κατηγορία των σπάνιων-ορφανών νοσημάτων [3, 4]. Η διάγνωση μπορεί να καθυστερήσει λόγω της ήπιας, υποκλινικής ή πρόδρομης μορφής της νόσου και έτσι να επιβαρυνθούν περισσότερο οι ασθενείς. Η καθυστέρηση στην έγκαιρη διάγνωση έχει αποδοθεί και στην έλλειψη εμπειρίας των μη ειδικών γιατρών της πρωτοβάθμιας υγείας όσο και λόγω των μη ειδικών συμπτωμάτων, ιδιαίτερα στα πρώτα στάδια της νόσου. Ακόμα και σε μη εξειδικευμένα κέντρα ή γενικά νοσοκομεία που δεν διαθέτουν ρευματολόγους υπάρχει δυσκολία έγκαιρης διάγνωσης της νόσου και καθορισμό της προσβολής οργάνων που με τη σειρά της καθορίζει και το είδος της θεραπείας [5, 6]. Η μεγαλύτερη πρόκληση στο νόσημα αυτό από την στιγμή της διάγνωσης είναι να γίνει προσδιορισμός του ρίσκου για πιθανές μελλοντικές επιπλοκές και της τελικής πρόγνωσης και να καθοριστεί ή βέλτιστη θεραπεία. Παρόλο που τα τελευταία χρόνια, ανευρίσκονται συνεχώς καινούργια διαγνωστικά εργαλεία και βιοδείκτες, κυρίως η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων με ιδιαίτερη διαγνωστική και προγνωστική σημασία, η θεραπεία του κάθε ασθενούς είναι κατά κανόνα εξατομικευμένη [7].

1.2 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική πρόοδος σε ότι αφορά την κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας της ΣΣκ εξαιτίας της χρησιμοποίησης σύγχρονων μοριακών τεχνικών καθώς και της ανάπτυξης πειραματικών μοντέλων ποντικών [8]. Παρόλο που η ΣΣκ θεωρείται στην κλασική βιβλιογραφία μια ινωτική ασθένεια με χαρακτηριστικό έυρημα την ίνωση ανήκοντας στην οικογένεια των αυτοάνοσων ρευματικών παθήσεων, ο χαρακτηρισμός αυτός μάλλον είναι υπεραπλουστευμένος [9]. Εκτός από την κλασική διαταραχή που εκφράζεται σε τρία επίπεδα (αγγειακή διαταραχή, διαταραχή ανοσολογικών μηχανισμών και ίνωση) [10], στην παθογένεια της ΣΣκ φαίνεται να εμπλέκονται και άλλα κύτταρα (όπως τα επιθηλιακά) αλλά και άλλες διεργασίες που σχετίζονται με τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς επούλωσης ιστών [11].

Είναι γενικά παραδεκτό ότι στην πρώιμη της μορφή η νόσος χαρακτηρίζεται από μικροαγγειοπαθητική δυσλειτουργία και εμφάνιση αυτοάνοσων φαινομένων [12, 13]. Επιπρόσθετα, η διαπίστωση της συσχέτισης μεταξύ ΣΣκ και της εμφάνισης κακοήθειας έχουν ενισχύσει το σενάριο ότι η διάσπαση της ανοσοανοχής μπορεί να παίζει κεντρικό ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη της νόσου [14, 15]. Οι μορφές της ΣΣκ που σχετίζονται συχνά με κακοήθεια είναι σοβαρής μορφής και χαρακτηριστικά αυτοαντισώματα όπως τα anti-RNA polymerase III.

1.3 ΜΟΡΦΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ

Η ΣΣΚ αναλόγως την έκταση της δερματικής βλάβης και την παρουσία ή όχι άλλων εκδηλώσεων μπορεί να χωριστεί σε δύο επιμέρους μορφές. Οι ασθενείς με επεκταμένες βλάβες χαρακτηρίζονται ως διάχυτη δερματική μορφή (diffused) της συστηματικής σκλήρυνσης (ΔΣΣκ), ενώ αυτοί με περιορισμένες βλάβες που εντοπίζονται μόνο στα άκρα μέχρι τους αγκώνες ή τα γόνατα, στο πρόσωπο,

χαρακτηρίζονται ως περιορισμένη δερματική μορφή (limited) συστηματικής σκλήρυνσης (ΠΣΣκ) [16].

Οι δύο αυτές μορφές έχουν συνήθως τα δικά τους κλινικά χαρακτηριστικά, καθώς επίσης και ξεχωριστά προφίλ αυτοαντισωμάτων που ανιχνεύονται στους ορούς των ασθενών. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν και περιπτώσεις ατόμων που δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρο σε ποιον υπότυπο ανήκουν. Επιπρόσθετα, ένα μικρό ποσοστό ασθενών (<5%) εμφανίζουν κλινικά χαρακτηριστικά (κυρίως φαινόμενο Raynaud's, δακτυλικά έλκη ή συμμετοχή εσωτερικών οργάνων) και τα ειδικά αυτοαντισώματα της νόσου, αλλά δεν εμφανίζουν εμφανείς δερματικές εκδηλώσεις, και αποτελούν μια υπομορφή της ΣΣκ που ονομάζεται ΣΣκ (sine scleroderma) [17].

1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ, ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ

Η ακριβής αιτιολογία και οι παθογενετικοί μηχανισμοί που οδηγούν στην εμφάνιση ΣΣκ είναι εν πολλοίς άγνωστοι [18]. Υπολογίζεται ότι σε παγκόσμιο επίπεδο, περίπου 1 στους 10.000 ανθρώπους πάσχουν από ΣΣκ [19]. Σε ότι αφορά τους παράγοντες κινδύνου που μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση ΣΣκ, οι περισσότερες μελέτες έχουν εστιάσει στην γενετική προδιάθεση και στους περιβαλλοντικούς παράγοντες [20, 21]. Άλλοι παράγοντες όπως επιγενετικές τροποποιήσεις έχουν επίσης μελετηθεί, αλλά σε λιγότερο βαθμό. Έρευνες γενετικών συσχετισμών καθώς και ανάλυση αλληλουχιών γονιδίων έχουν αναδείξει κάποιους γονιδιακούς τόπους που μπορεί να σχετίζονται με γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση ΣΣκ (Πίνακας 1,2).

Οι γενετικοί παράγοντες μπορεί να είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση ποικιλίας κλινικών εκδηλώσεων και παρουσίας ανοσοβιολογικών δεικτών όπως αυτοαντισωμάτων, κυτοκινών, κ.α.. Επιπρόσθετα, έχει διαπιστωθεί ότι ο περισσότεροι από τους γενετικούς αυτούς παράγοντες δεν είναι απόλυτα ειδικοί για

την εμφάνιση ΣΣκ αλλά χαρακτηρίζουν και άλλα αυτοάνοσα ρευματικά ή άλλα αυτοάνοσα νοσήματα [22, 23].

Σε ότι αφορά την σχέση περιβαλλοντικών παραμέτρων με την εμφάνιση ΣΣκ, μελέτες δείχνουν ότι έκθεση σε διάφορα χημικά και παρασιτοκτόνα μπορεί δυνητικά να οδηγήσει στην εμφάνιση σκληροδερματικών βλαβών στο δέρμα [24, 25]. Στις περισσότερες όμως των περιπτώσεων αυτών δεν υπάρχουν άλλες συστηματικές εκδηλώσεις υποδηλωτικές συστηματικής σκληροδερμίας. Τα κυριότερα από τα χημικά αυτά είναι τα μονομερή του βυνυλοχλωριδίου και διάφοροι οργανικοί διαλύτες. Είναι επίσης ενδιαφέρουσα η παρατήρηση ότι σε ορισμένες από αυτές τις μελέτες η ανάπτυξη σκληροδερματικών βλαβών επαγόμενων από χημικές ουσίες σχετιζονταν τόσο με ειδικούς HLA απλοτύπους όσο και με την ανάπτυξη ειδικών της ΣΣκ αυτοαντισωμάτων [23]. Θεωρείται επομένως πιθανό ότι οι διάφοροι περιβαλλοντικοί και χημικοί παράγοντες που προκαλούν σκληροδερματικές τοπικές βλάβες μπορούν να οδηγήσουν και στην εμφάνιση της ΣΣκ [24, 25].

1.5 ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Το βασικό πρώτο σύμπτωμα που μπορεί να υποκρύπτει ΣΣκ ως υποκείμενο νόσημα είναι το φαινόμενο Raynaud. Το φαινόμενο Raynaud ορίζεται ως μια διαλείπουσα, υπερβολική αγγειοσυστολή του μικροαγγειακού συστήματος, που προκαλείται από έκθεση στο κρύο ή από έντονο συναισθηματικό στρες [26]. Η κλασσική κλινική εικόνα περιλαμβάνει αλλαγές στο χρώμα του δέρματος από λευκό (ισχαιμία), σε μπλε (κυάνωση), και κόκκινο (επανασαιμάτωση). Αυτές οι αλλαγές συνδέονται με σημαντικό φορτίο πόνου και αδυναμία χειρισμών με τα χέρια [27]. Το φαινόμενο Raynaud εμφανίζεται συχνότερα στα δάκτυλα των χεριών/ποδιών.

Πίνακας 1. Κυριότεροι γονιδιακοί τόποι, τα λειτουργικά προϊόντα των οποίων έχουν εμπλακεί στην παθογένεια της Συστηματικής Σκλήρυνσης

ΓΟΝΙΔΙΟ	SNP	Τύπος Μελέτης
Innate immunity		
IRF 4	rs9328192	GWAS
IRF 5	rs4728142,rs10488631,rs10488631,rs3757385,rs109542313,rs2004640, rs12537284,rs2280714	GWAS
IRF5-TNPO3	rs36073657,rs12155080	meta-Gwas
IRF 7	rs1131665,rs4963128,rs702966	GGA, meta-GWAS
IRF 8	rs11642873,rs2280381,rs11117432,rs11644034,rs12711490,rs7202472,rs11117420	GWAS, meta-GWAS
TNF Alp	rs55029929,rs2230926,rs6932056	GWAS
TNP1	rs54958881,rs2233287,rs3792783	GWAS, meta-GWAS
TAP2	rs12538892,rs17500468,	ImmunoChip
NFKB1	rs230534	meta-Gwas
Adaptive immune response		
TNFSF4	rs4916334,rs10798269,rs12039904	GWAS
TNFSF4-LOC100506023	Rs2022449,rs1857066	meta-Gwas
CD247	rs2056626	GWAS, meta-GWAS
CSK	rs1378942	GWAS, GWAS Follow up
PTPN22	rs2476601	GWAS
STAT4	rs13277113,rs2736340	GWAS, Immunochip, meta-GWAS
BLK	rs13277113,rs2736340	GWAS
IL-12 Signaling Pathway and cytokines		
IL12 A	rs7758790,rs589446,	GWAS, ImmunoChip
TYK 2	Rs2304256,rs34536443	ImmunoChip, Follow up
IL-12 RB1	Rs12720356,rs35018800	meta-Gwas
IL-12RB2	Rs3790566,rs924080,rs3790567	GWAS, meta-GWAS
Apoptosis Autophagy pathway		
Dna SEIL3	rs35677470	ImmunoChip
FLNB-DNASEIL3-PXK	rs7355798,rs4076852	meta-Gwas
ATG5	rs9373839,rs633724	GWAS, ImmunoChip, Meta-GWAS
PRDM1	rs3894194	GWAS
GSDMA	rs3894194,	GWAS
GSDMB	rs883770	meta-Gwas
NOTCH4	rs443198	GWAS
Vascular homeostasis and fibrosis		
PPARG	rs310746	GWAS Follow up
Other		
NAB1	rs16832798	meta-Gwas
DDX6	rs11217020	meta-Gwas
DGKQ	rs11724804	meta-Gwas
POGLUT1-TIMMDC1-CD80-ARHG AP31	rs9884090	meta-Gwas
RAB2A-CHD7	rs6598008	meta-Gwas
TSPAN 32,CD81-AS1	rs2651804	meta-Gwas
NUP85-GRB2	rs1005714	meta-Gwas

Πίνακας 2. Κυριότεροι πολυμορφισμοί που έχουν εμπλακεί στην παθογένεια της ΣΣκ

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ	ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ
PTPN22	SNP	T cell receptor (TCR) signaling
BANK1	SNP	B cell signaling
CTGF	SNP	Fibroblast proliferation and production of extracellular matrix
FAM167A-BLK	SNP	B cell receptor signaling and B cell development
IRF5	SNP	TLR-dependent type I interferon production
TNFAIP3	SNP	Negative feedback regulation
STAT4	SNP	Induction of T helper 1 cells
FAS	SNP	Apoptosis of a wide variety of cells types
TBX21	SNP	T helper 1 cells differentiation
TNFSF4	SNP	Immune regulation
TNIP1	SNP	Regulation of the NF-KB signaling pathway
IRAK1	SNP	Innate immune signaling
KCNA5	SNP	Potassium voltage-gated channel
TNFa13	VNTR	Modulator of inflammation
COLTA2	VNTR	Component of type I collagen
NOS2	VNTR	Production of a reactive free radical
CD19	VNTR	Regulation of B cell function
IRAK1	SNP	Mediator of innate immune response
IL-21	SNP	Mediator acquired immune response
IL-2RA	SNP	T cell activation

Λιγότερο συχνά, η μύτη, η γλώσσα, οι θηλές και τα πτερύγια των αυτιών μπορεί να εμπλέκονται [28]. Το φαινόμενο Raynaud μπορεί να υποδιαιρεθεί σε πρωτογενές (ιδιοπαθές) και δευτεροπαθές. Το πρωτογενές φαινόμενο Raynaud (PRP) έχει εκτιμώμενο επιπολασμό 5% στο γενικό πληθυσμό και συχνότερα εμφανίζεται σε νεαρές γυναίκες [28]. Το φαινόμενο Raynaud είναι πιο κοινό σε ψυχρά κλίματα [29].

Σε αρκετές περιπτώσεις τα αρχικά συμπτώματα με τα οποία μπορεί να εμφανισθεί η ΣΣκ οίδημα δακτύλων χεριών (puffy fingers) που σταδιακά εξελίσσεται σε σκληροδακτυλία, σκλήρυνση του δέρματος και μείωση της ελαστικότητας του, κνησμός, μυοσκελετικοί πόνοι [30]. Επιπρόσθετα, μπορεί να εμφανισθεί, μυϊκή αδυναμία και αίσθημα εύκολης κόπωσης [5]. Οι εκδηλώσεις από το γαστρεντερικό περιλαμβάνουν γαστροισοφαγική παλινδρόμηση, αλλά μπορεί να εξελιχθούν σε

οδυνοφαγία, δυσκαταποσία, απώλεια βάρους, δυσκοιλιότητα ή διάρροια, ενώ οι επιπλοκές λόγω της ανάπτυξης πνευμονικής ίνωσης εκδηλώνονται με εύκολη κόπωση, αίσθημα δύσπνοιας με μικρή προσπάθεια [6].

1.6 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ

1.6.1 ΔΕΡΜΑΤΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Οι δερματικές εκδηλώσεις εμφανίζονται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις ασθενών με ΣΣκ εκτός από σπάνιες περιπτώσεις. Παρ' όλο που οι επιπλοκές του δέρματος (κνησμός, Raynaud, ανοιχτά έλκη) μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή νοσηρότητα εντούτοις δεν επηρεάζουν γενικά την θνητότητα των ασθενών [31, 32]. Παρόλα αυτά η εμφάνιση ταχέως εξελισσόμενων δερματικών βλαβών πχ. δακτυλικά έλκη συνήθως σημαίνει και εμφάνιση εκδηλώσεων σε εσωτερικά όργανα και χρήζουν άμεσης αντιμετώπισης. Γενικά οι επιπλοκές του δέρματος τείνουν να αυξάνονται στα αρχικά στάδια της ΔΣΣκ και να μειώνονται στα τελικά στάδια, με κορύφωση περίπου στους 12-18 μήνες από την έναρξη της δερματικής βλάβης [33]. Αντίθετα οι αλλαγές στο χρώμα του δέρματος (περιοχές υπέρχρωσης και άλλες περιοχές με σημάδια μεταφλεγμονώδους αποχρωματισμού-εικόνα αλατοπίπερου) που μπορούν να προκαλέσουν σοβαρό θέμα αισθητικής και να είναι ενοχλητικές για τους ασθενείς, αλλά οι υπάρχουσες θεραπευτικές αντιμετώπισης δεν έχουν αποδώσει τα αναμενόμενα αποτελέσματα.

1.6.2 ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Χαρακτηριστικά συμπτώματα από το μυοσκελετικό σύστημα είναι οι αρθραλγίες, φλεγμονώδεις πολυαρθρίτιδες, κριγμός τενόντων, υποδόριες ασβεστώσεις-καλσίνωση και αναδιαμόρφωση-εκφύλιση των μικρών και των μεγάλων αρθρώσεων. Η θεραπεία για αυτές τις επιπλοκές περιλαμβάνει φυσιοθεραπεία και εργοθεραπεία και καθημερινό πρόγραμμα ασκήσεων. Επίσης μπορεί να βοηθήσει και η

φαρμακευτική αγωγή με μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα καθώς επίσης και μικρές ημερήσιες δόσεις πρεδνισολόνης (μικρότερες από 10-15 mg/μέρα).

1.6.3 ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

Η διάμεση πνευμονοπάθεια και η πνευμονική ίνωση είναι παρούσες σχεδόν στο 80% των ατόμων με ΣΣκ αλλά μόνο στο 25 - 30% είναι κλινικά έκδηλη και χαρακτηρίζεται από προοδευτική επιδείνωση [34]. Η πνευμονική ίνωση είναι συνήθως μια επιπλοκή που συμβαίνει σε σχετικά αρχικά στάδια της νόσου και οι περισσότεροι ασθενείς αναπτύσσουν σοβαρή περιοριστική νόσο μέσα στα 5 πρώτα χρόνια από την εμφάνιση συμπτωμάτων. Η αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας είναι η εξέταση εκλογής για την αρχική διάγνωση της ILD. Η παρακολούθηση όμως γίνεται με σπειρομέτρηση και η διάγνωση [35, 36]. Επίσης αρκετοί ασθενείς έχουν ινωτικά στοιχεία από μη ειδική διάμεση πνευμονίτιδα. Αξονική τομογραφία θώρακα απαιτείται σε ετήσια βάση μόνο σε εκείνους τους ασθενείς που έχουν εγκατεστημένη πνευμονική ίνωση, μόνο όταν υπάρχει μεταβολή των αποτελεσμάτων της σπειρομέτρησης ή διαταραχές στην ανταλλαγή των αερίων με DLCO (diffusing capacity for carbon monoxide).

Η θεραπευτική αντιμετώπιση της πνευμονικής ίνωσης περιλαμβάνει την χορήγηση ανοσοκατασταλτικής αγωγής κυρίως κύκλων κυκλοφωσφαμίδης ή ριτουξιμάμπης ή την χορήγηση μυκοφαινολικού οξέος [37, 38]. Παρ'όλο που δεν υπάρχει πλήρη συμφωνία για την διάρκεια της ανοσοκατασταλτικής αγωγής μέχρι να υπάρχουν σταθερά σπειρομετρικά ευρήματα πριν αποφασισθεί η βέλτιστη θεραπευτική προσέγγιση [39].

Η χρήση των HSCT μπορεί να έχει αποτελέσματα σε ασθενείς με μέτρια ή ταχέως εξελισσόμενη διάμεση πνευμονική νόσο, το 85% των ασθενών που υπολογίστηκαν ότι μπορούν να λάβουν HSCT είχαν διάμεση πνευμονική νόσο στην μελέτη ASTIS

[40], ενώ 93% των ασθενών έχουν υποκείμενη διάμεση πνευμονική νόσο στην έρευνα SCOT [41]. Κλινικές δοκιμές [39] μελέτησαν επίσης άλλα φάρμακα για την θεραπεία της πνευμονικής νόσου, τα οποία χρησιμοποιούνται ήδη σε ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση όπως το nintedanib και άλλα αντι-ινωτικά φάρμακα. Η ριτουξιμάμπη (αντι-B θεραπεία) επίσης μπορεί να αποδειχθεί σημαντική ως θεραπεία διάσωσης [42].

1.6.4 ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ

Η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση εμφανίζεται σε περίπου 15% των ασθενών με ΣΣκ [5]. Αντίθετα με την συμμετοχή άλλων εσωτερικών οργάνων η οποία γενικώς είναι πιο συχνή και μεγαλύτερης βαρύτητας στην ΔΣΣκ, η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση συμβαίνει συνήθως σε ασθενείς με ΠΣΣκ καθώς θεωρείται σοβαρή και θανατηφόρα επιπλοκή, η έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία αυτής θεωρείται μείζονος σημασίας για την επιβίωση του ασθενούς. Αν και η αρχική διαγνωστική προσέγγιση γίνεται με διαθωρακική ηχοκαρδιογραφία, παλινδρόμηση τριγλώχινας μπορεί να απουσιάζει στο 15-20% των ασθενών και στο 30% των ασθενών να μην υπάρχουν υπερηχογραφικά σημεία πνευμονικής υπέρτασης [43].

Ο αλγόριθμος DETECT συσχετίζει κλινικά εργαστηριακά και λειτουργικά τεστ αναπνευστικής λειτουργίας, καθώς επίσης και ευρήματα ηχοκαρδιογραφίας για τον έγκαιρο εντοπισμό ασθενών με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση [44]. Ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου θεωρούνται το μειωμένο DLCO, αυξημένη αναλογία FVC (forced vital capacity) προς το DLCO, η παρουσία των anti-centromere αντισωμάτων, το πρότυπο των ANA, και η μεγάλη διάρκεια νόσου. Η εξέταση εκλογής για την διάγνωση της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης είναι ο δεξιός καρδιακός καθετηριασμός όπου μπορεί να διαχωρίσει την πνευμονική αρτηριακή

υπέρταση από άλλες αιτίες πνευμονικής υπέρτασης (όπως μορφές αρ.καρδιακής ανεπάρκειας).

Η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση που σχετίζεται με ΣΣκ φαίνεται να έχει χειρότερη πρόγνωση από την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση που σχετίζεται με μεικτή νόσο συνδετικού ιστού ή με συστηματικό ερυθματώδη λύκο [45]. Σε ασθενείς με οριακή αύξηση πίεσης στην πνευμονική αρτηρία πρέπει να παρακολουθούνται στενά για τον κίνδυνο ανάπτυξης κλινικά έκδηλης ΠΑΥ [46].

1.6.5 ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΟ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η εμφάνιση επιπλοκών της γαστρεντερικής οδού, είναι σχεδόν καθολική στους ασθενείς με ΣΣκ αλλά διαφέρει ως προς τη σοβαρότητα και την κλινική μορφή [47]. Πιο συχνά εμφανίζονται επιπλοκές από την ανώτερη γαστρεντερική οδό [48]. Θεωρητικά μπορεί να επηρεαστεί οποιαδήποτε περιοχή της γαστρεντερικής οδού, ωστόσο πιο συχνά επηρεάζεται ο οισοφάγος [47]. Οι κλινικές εκδηλώσεις μπορεί να περιλαμβάνουν παλινδρόμηση, δυσκοιλιότητα, διάρροια ή και ακράτεια κοπράνων [49, 50].

Παρόλο που η αγγειοπάθεια και η ίνωση αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες που προκαλούν τις γαστρεντερικές επιπλοκές, μελέτες [51-54] προτείνουν ότι οι θεραπείες ανοσοτροποποίησης μπορούν να αποφέρουν σημαντικά οφέλη σε κάποιες περιπτώσεις. Η απώλεια βάρους και η υποθρεψία αποτελούν σημαντικές κλινικές εκδηλώσεις και μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την λειτουργικότητα και τη ποιότητα ζωής των ασθενών και να οδηγήσουν σε συννοσηρότητες [55, 56]. Η παρακολούθηση αυτών των εκδηλώσεων είναι σημαντική και η εντερική ή παρεντερική χορήγηση συμπληρωμάτων διατροφής μπορεί να επιφέρει ευεργετικά αποτελέσματα [57]. Ωστόσο η εντερική χορήγηση πρέπει να γίνεται με προσοχή εξαιτίας του μεγάλου κινδύνου αναρρόφησης.

1.6.6 ΝΕΦΡΙΚΗ ΚΡΙΣΗ ΣΚΛΗΡΟΔΕΡΜΑΤΟΣ

Η νεφρική κρίση σκληροδέρματος είναι μια σπάνια εκδήλωση που χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη θρομβωτικής μικροαγγειοπάθειας με αποτέλεσμα υπέρταση και προοδευτική βλάβη του νεφρού. Έχουν προταθεί [58] κριτήρια διάγνωσης και διαχείρισης των νεφρικών κρίσεων όμως είναι σημαντικό στην κλινική εφαρμογή να μπορεί να λάβει κανείς υπόψη το κατά πόσο παρουσιάζονται άλλες μορφές νεφρικής νόσου στον ασθενή με συστηματική σκλήρυνση και ιδιαίτερα αν παρατηρούνται κλινικά ή ορολογικά χαρακτηριστικά αλληλοεπικαλυπτόμενων συνδρόμων με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα όπως ο συστηματικός ερυθρεμάτης ή ο λύκος ή η αγγειίτιδα. Κάποιες περιπτώσεις ασθενών με νεφρικές κρίσεις παρουσίαζαν φυσιολογική πίεση αίματος και αυτές γενικά έχουν κακή πρόγνωση. Η νεφρική κρίση σκληροδερμίας μπορεί να εκδηλωθεί με μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία [59, 60]. Η διαχείριση της νεφρικής κρίσης σκληροδερμίας περιλαμβάνει άμεση έναρξη του αναστολέα μετατρεπτικού ενζύμου αγγειοτενσίνης (ACE) [61]. Η εμφάνιση όμως πνευμονικού οιδήματος ή κάποιων άλλων οργανοειδικών επιπλοκών οργάνων λόγω υπέρτασης μάλλον αντικατοπτρίζει την ύπαρξη συστηματικής αγγειακής ενδοθηλιακής διαταραχής [58]. Υπάρχουν αρκετοί δείκτες που αντικατοπτρίζουν την έκβαση, όπως οι αυξημένες συγκεντρώσεις του αμινοτελικού προ-νατριουρητικού πεπτιδίου (NT-proBNP) [62]. Η ύπαρξη anti-RNA polymerase III αντισωμάτων επίσης έχει συσχετισθεί με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης νεφρικών κρίσεων σκληροδερμίας καθώς σύμφωνα με δημοσιευμένα δεδομένα περίπου το 25% των θετικών ασθενών μπορεί να αναπτύξουν νεφρικές επιπλοκές.

Η συχνότητα εμφάνισης των νεφρικών κρίσεων φαίνεται ότι μειώνεται με το χρόνο αν και αυτό μπορεί να αντικατοπτρίζει αυξανόμενο αριθμό ασθενών με ΣΣκ

που διαγνώσκονται και που αφορούν ασθενείς πολύ χαμηλού κινδύνου για εμφάνιση νεφρικής κρίσης όπως αυτοί με περιορισμένη μορφή σκληροδέρματος [63]. Έχει προταθεί ότι η θεραπευτική στόχευση της ενεργοποίησης του συμπληρώματος μπορεί να οφελήσει ορισμένους ασθενείς με νεφρική κρίση. Η χρήση των αναστολέων ACE βρίσκεται υπό έντονη συζήτηση καθώς υπάρχουν μελέτες [64] που έδειξαν χειρότερη έκβαση στους ασθενείς με νεφρική κρίση μετά τη χορήγηση αναστολέων. Φαίνεται ότι οι μισοί ασθενείς με νεφρική κρίση που χρειάζονται αιμοκάθαρση απαιτούν την χορήγηση αναστολέων ACE για την μακροχρόνια υποστήριξη της νεφρικής λειτουργίας. Επειδή η θνητότητα στους ασθενείς αυτούς είναι πολύ υψηλή, πρέπει να υπάρχει πάντοτε το ενδεχόμενο μεταμόσχευσης νεφρού, αν και τέτοιου είδους αποφάσεις καλό είναι να καθυστερούν μέχρι και 18-24 μήνες ώστε να αφήσουμε χρόνο για μειωμένη αλλά πιθανή αυτόματη ανάκαμψη της νεφρικής λειτουργίας σε ικανοποιητικό επίπεδο.

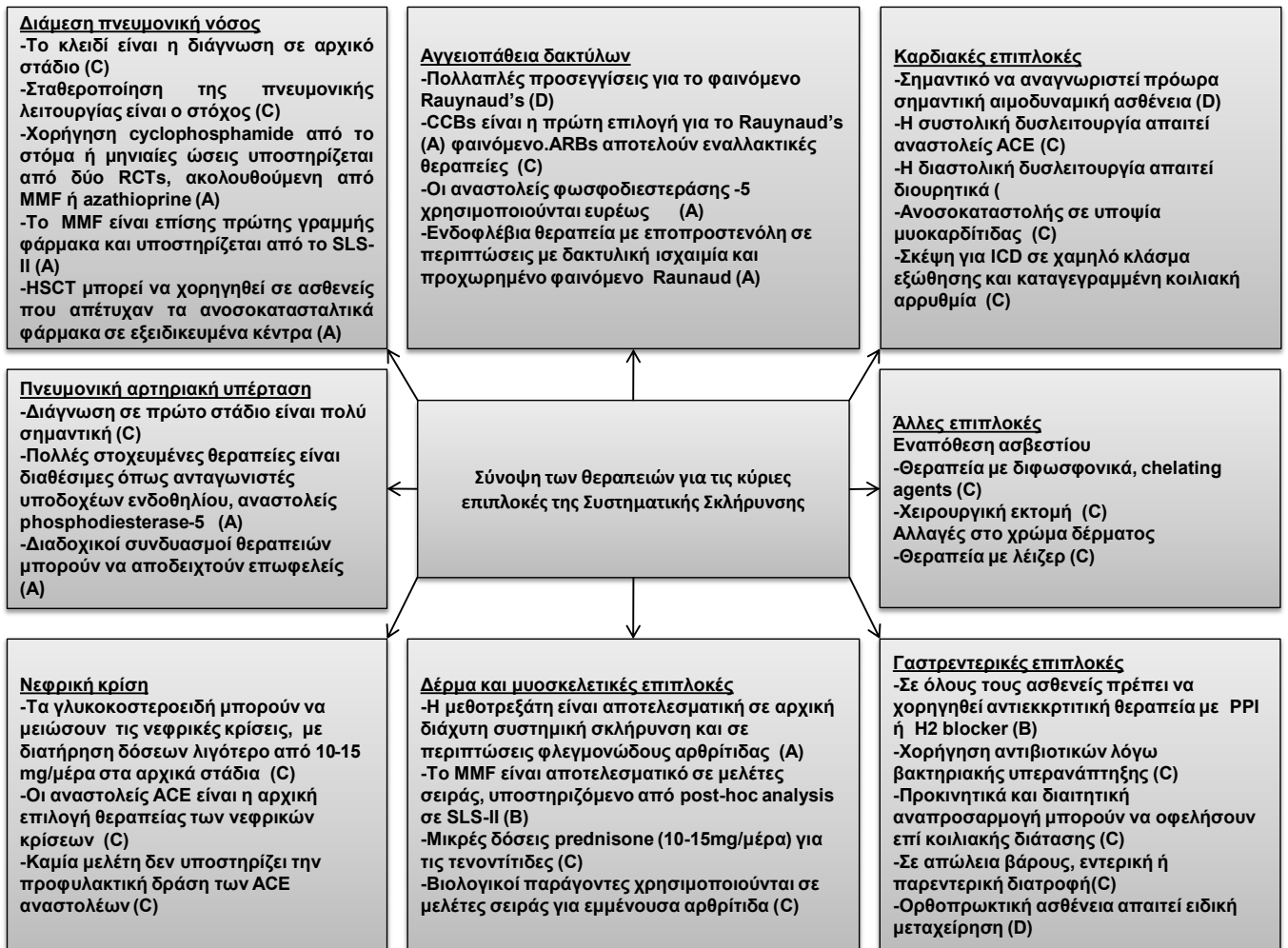
1.6.7 ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ

Η συχνότητα εμφάνισης καρδιακών επιπλοκών στη συστηματική σκλήρυνση μάλλον υποτιμάται και υποδιαγιγνώσκεται [65]. Οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν σοβαρή και αιφνίδια καρδιακή επιπλοκή, η οποία δεν προυπήρχε. Οι υποκείμενες καρδιακές επιπλοκές, συμβάλουν στο θάνατο των ασθενών με ΣΣκ [66]. Η εξέταση εκλογής που απαιτείται είναι η MRI μυοκαρδίου αλλά η χρήση της στην κλινική πρακτική είναι μάλλον περιορισμένη. Η εικόνα καθυστερημένης ενίσχυσης με γαδολίνιο θεωρείται παθογνωμονική για να επιβεβαιώσει εστιακή ή διάχυτη μυοκαρδική ίνωση, ωστόσο η λιγότερο εμφανής (intrafascicular) ίνωση δεν μπορεί να ανιχνευτεί εύκολα. [67]. Είναι σημαντικό να γίνεται αξιολόγηση για τυχόν τοποθέτηση εμφυτέψιμου απινιδωτή ενώ συσκευές καταγραφής (loop recording) μπορούν να αποκαλύψουν καρδιακές αρρυθμίες. Οι μέθοδοι αυτοί [68] μπορούν να καθορίσουν

τους ασθενείς με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης σοβαρής αρρυθμίας, οι οποίοι και θα μπορούν να επωφεληθούν από την εμφύτευση βηματοδότη.

1.6.8 ΑΛΛΕΣ ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Άλλες κλινικές εκδηλώσεις που μπορεί να εμφανισθούν σε ασθενείς με ΣΣκ, περιλαμβάνουν το φαινόμενο Raynaud, η περιοχική η γενικευμένη ασβεστοποίηση, μυοσκελετικοί πόνοι, σύνδρομο χρόνιας κόπωσης, σεξουαλική δυσλειτουργία, ψυχολογικές διαταραχές, διαταραχές ύπνου, καταθλιπτική συνδρομή και νευροψυχιατρικές εκδηλώσεις στις οποίες θα πρέπει να δοθεί προσοχή σε αυτά τα διότι επηρεάζουν σημαντική την ποιότητα ζωής, την επαγγελματική ενασχόληση και την καθημερινή λειτουργικότητα των ασθενών. Επιπλέον, υπάρχουν και άλλες λιγότερο εμφανείς εκδηλώσεις όπως αλλαγές στην εκφραστικότητα του προσώπου, και στο στόμα με εμφάνιση συνδρόμου sicca, διατροφικές διαταραχές οδόντων, περιορισμός στην διάνοιξη των σιαγόνων κλπ, οι οποίες μπορούν να θεραπευτούν αλλά απαιτούν ειδική εκπαίδευση και συμβουλή [69]. Το πρόβλημα των δακτυλικών ελκών είναι επίσης από τα πιο συχνά προβλήματα που αντιμετωπίζει ο ασθενής ως επιπλοκή της νόσου [70]. Τα δακτυλικά έλκη εμφανίζονται περίπου στους μισούς ασθενείς με ΣΣκ στην πορεία της νόσου έστω και μια φορά [71, 72]. Κλινικά χαρακτηρίζονται από μειωμένη λειτουργικότητα των δαχτύλων, κυτταρίτιδα, οστεομυελίτιδα ισχαιμία και αποφράξεις των αγγείων των χεριών και έντονο πόνο [73]. Η συστηματική αγωγή με φάρμακα θα πρέπει να συνδυάζεται με ειδική τοπική φροντίδα των χεριών. Ως αγωγή μπορούν να χρησιμοποιηθούν αναστολείς φωσφοδιεστεράσης-5 και ανταγωνιστές των υποδοχέων ενδοθηλίνης, αν και κάποιες μελέτες δεν έδειξαν σημαντική ωφελιμότητα από τη χρήση αυτών των φαρμάκων [74, 75].



Εικόνα 1. Σύνοψη των θεραπευτικών προσεγγίσεων σε εξατομικευμένες επιπλοκές της συστηματικής σκλήρυνσης σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές συγγραφέων και με τις ενημερωμένες συστάσεις της EULAR το 2017. Η ισχύς των συστάσεων (όπου A είναι η υψηλότερη απόδειξη και D βασίζεται στη γνώμη των ειδικών) παρέχεται με βάση τις ενημερωμένες συστάσεις της EULAR το 2014. EULAR: European League Against Rheumatism, RCT: Randomized Controlled Trials Τυχαίοποιημένες ελεγχόμενες δοκιμές. MMF: mycophenolate mofetil. SGC: soluble guanylate cyclase CCBs: calcium channel blockers, ανταγωνιστής καναλιού ασβεστίου. ARB: angiotensin receptor blockers- ανταγωνιστής υποδοχέα αγγειοτενσίνης. ACE: angiotensin converting enzyme.- μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης SLS-II: Scleroderma Lung Study-II. HSCT: haemopoietic stem-cell transplantation. ICD: implantable cardioverter defibrillator PPI: Αναστολέας αντλίας πρωτονίων [76].

1.7 ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΣΣκ

Το προφίλ των αυτοαντισωμάτων θεωρείται πολύ σημαντικό στη διάγνωση της ΣΣκ, και το πρότυπο και η ειδικότητα των ανιχνεύσιμων ANA αποτελεί πλέον μέρος των διαγνωστικών κριτηρίων της νόσου [77]. Υπάρχει ένα μεγάλο εύρος αυτοαντισωμάτων που αναγνωρίζονται σε ασθενείς με ΣΣκ και κάποια από αυτά φαίνεται να έχουν και κλινικές και προγνωστικές συσχετίσεις. [78]. Στα αυτοαντισώματα της ΣΣκ περιλαμβάνονται τα anti-κεντρομεριδιακά (η παρουσία των οποίων σχετίζεται με περιορισμένη ΣΣκ, και την ύπαρξη πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης), τα anti-Scl-70 (η παρουσία των οποίων σχετίζεται με την ύπαρξη διάχυτης μορφής ΣΣκ, την εμφάνιση ταχεία εξελισσόμενης πνευμονικής ίνωσης και των δακτυλικών ελκών), και τα anti-RNA polymerase III (η παρουσία των οποίων σχετίζεται με διάχυτη μορφή ΣΣκ και επεισοδίων νεφρικών κρίσεων). Η παρουσία πρότυπου ανοσοφθορισμού έναντι πυρηνίσκου (nucleolar pattern) σε υπόστρωμα HEp-2 έχει επίσης συσχετισθεί με ταχέως εξελισσόμενη διάμεση πνευμονική νόσο και πνευμονική αρτηριακή υπέρταση [79]. Αυτά τα αυτοαντισώματα μπορούν να βοηθήσουν και για την διάγνωση της νόσου αλλά και για την πρόγνωση αυτής κατά την παρακολούθηση [80]. Σε σπάνιες περιπτώσεις δεν ανιχνεύεται παρουσία ANA, και οι ασθενείς αυτοί αναφέρεται ότι έχουν γενικότερα κακή πρόγνωση [81], ενώ άλλα αυτοαντισώματα είναι ενδεικτικά συνδρόμου επικάλυψης. Μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι πολλά από τα αυτοαντισώματα αυτά ανευρίσκονται στον ορό ασθενών με ΣΣκ ακόμα και αρκετά χρόνια πριν εμφανισθούν κλινικές εκδηλώσεις της νόσου και επομένως αποτελούν χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο για την πρώιμη ή πολύ πρώιμη μορφή της ΣΣκ [78, 82].

Αρκετά ειδικά αυτοαντισώματα σχετίζονται όπως προαναφέραμε με κλινικές εκδηλώσεις της νόσου [83, 84]. Αυτό οδήγησε τις ανοσοδιαγνωστικές εταιρείες που ασχολούνται με τις προτυποποίηση διαγνωστικών τεστ να αναπτύξουν μια

πολυπαραμετρική μέθοδο με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κηλίδας ή γραμμής, με την οποία μπορούν να παρέχουν ένα προφίλ αυτοαντισωμάτων, που περιλαμβάνει αυτό των αυτοαντισωμάτων ειδικών ή σχετιζόμενων για την ΣΣκ (disease-specific or disease-related SSc autoantibody profile) [83, 85]. Εκτός από τα κλασσικά καθιερωμένα αυτοαντισώματα έναντι κεντρομεριδίου (anti-Centromere και συγκεκριμένα έναντι των δυο πιο συχνά συσχετιζόμενων με την ΣΣκ που είναι τα Cenp-B και Cenp-A), και τα anti-τοποισομεράσης I (anti-TopoI γνωστά και ως anti-Scl70), ανιχνεύονται επίσης και άλλα που δεν εμφανίζονται τόσο συχνά όπως εκείνα που στοχεύουν την RNA polymerase III (και πιο συγκεκριμένα στις δομικές περιοχές-υπομονάδες RNp11 και RNp155) καθώς και πλήθος άλλων πιο σπάνιων αυτοαντισωμάτων όπως τα παρακάτω: anti-fibrillarin αντισώματα (γνωστά και ως anti-U3 ρουβονουκλεοπρωτεϊνικά αντισώματα), anti-Pm-Scl (αντισώματα εναντίον υπομονάδων 100 και 75kDa), anti-Th/To αντισώματα, anti-NOR90 (nucleolus organizing region90), anti-Ku αντισώματα, anti-platelet-derived growth factor receptors (PDGFR) και anti-Ro52 αντισώματα [83, 84].

Οι τεχνικές λοιπόν που παρέχουν την δυνατότητα ανίχνευσης και διερεύνησης profil αυτοαντισωμάτων και επιτρέπουν τον ταυτόχρονο έλεγχο αρκετών αντισωμάτων που σχετίζονται με την ΣΣκ, μπορούν να παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες με διαγνωστική και κλινική σημασία για την μελέτη ασθενών με ΣΣκ. Ενώ τα αυτοαντισώματα anti-CEN, anti-Scl70 και RNAPolymeraseIII παραμένουν μακράν τα πιο σημαντικά αυτοαντισώματα για τη διάγνωση της ασθένειας [83, 85], ωστόσο η παρουσία κάποιων άλλων αυτοαντισωμάτων συνδέθηκε ως ένα βαθμό με κάποια κλινικά χαρακτηριστικά της ασθένειας όπως δακτυλικά έλκη, πνευμονική ίνωση, πνευμονική υπέρταση και νεφρική κρίση. Οι κυριότερες από αυτές τις συσχετίσεις φαίνονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Τα σημαντικότερα αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται στους ασθενείς με ΣΣκ και οι κλινικές τους συσχετίσεις.

Ειδικά αυτοαντισώματα ΣΣκ	Αντιγόνο στόχος	Κλινικοί Συσχετισμοί
Sci70	Τοποϊσομεράση I	Διάχυτη μορφή ΣΣκ, δακτυλικά έλκη, ILD
CENPA and CENBP	Πρωτεΐνη A και B των κεντομεριδίων	Περιορισμένη μορφή ΣΣκ, χαμηλός κίνδυνος για ανάπτυξη SRC.
RN11 and RN 155	RNA πολυμεράσηIII υπομονάδες 11 και 155	Νεφρική κρίση, κακοήθεια GAVE, μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης
U1-RNP	Μικρή πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη	PAH, MCTD
Fibrillarin	UR-RNP	Διάχυτη μορφή ΣΣκ, ILD επικαλυπτόμενο σύνδρομο με μυοσίτιδα ή ΣΕΛ
NOR90	Πρωτεΐνη 90kDa που αναγνωρίζει ένα συστατικό της περιοχής της χρωματίνης που συμμετέχει στην οργάνωση του πυρηνίσκου	Περιορισμένη μορφή ΣΣκ, επικαλυπτόμενο σύνδρομο με σύνδρομο Sjogren
PM-Sci	Πολυπεπτίδιο 15-16 αμινοξέων.Κύρια αντιγόνα PM-Sci75 και PM scl100 (major antigens)	Δακτυλικά έλκη, ILD επικαλυπτόμενο σύνδρομο με μυοσίτιδα
Th/To	Σύμπλεγμα RNA πρωτεΐνης 7-2 RNP/ 7-2	Δακτυλικά έλκη, ILD επικαλυπτόμενο σύνδρομο με μυοσίτιδα
Ku	Αντιγόνο (p70-p80). Μια binding πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην επιδιόρθωση της διπλής έλικας DNA	Περιορισμένη μορφή ΣΣκ, ILD, αυξημένα επίπεδα CK
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor	NA

ΣΣκ: Συστηματική σκλήρυνση, PAH: Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση, ILD: Διάμεση Πνευμονική νόσος, ΣΕΛ: Συστηματικός Ερυθηματώδης λύκος, GAVE: Αγγειακή εκτασία άνδρου στο γαστρικό, MCTD: Μικτή νόσος συνδετικού ιστού, SRC: Σκληροδερματική νεφρική κρίση.

1.8 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Παρ'όλο που τα κύρια βασικά συμπτώματα που εμφανίζονται στα αρχικά στάδια της ΣΣκ είναι το φαινόμενο Raynaud, οι αρθραλγίες, η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση [86, 87], εντούτοις γενικά η νόσος μπορεί να ξεκινήσει με άλλα διαφορετικά πιο άτυπα πρώτα συμπτώματα τα περισσότερα από τα οποία είναι μη ειδικά όπως για παράδειγμα, τηλεγγειακτεσίες οιδηματώδη δάκτυλα, μυαλγίες, αίσθημα εύκολης κόπωσης κλπ. [88]. Πιο σπάνια η διάγνωση μπορεί να γίνει σε προχωρημένα στάδια, όταν ο ασθενής θα έχει εγκατεστημένες επιπλοκές σε διάφορα όργανα και να πρωτοδιαγνωσθεί με συμπτώματα όπως πνευμονική ίνωση, πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, νεφρική ανεπάρκεια (συνήθως με επιταχυνόμενη κλινική εικόνα υπέρτασης και θρομβωτικής μικροαγγειοπαθολογίας) ή γαστρεντερικές επιπλοκές [89, 90].

Η διάγνωση της συστηματικής σκλήρυνσης βασίζεται στα κριτήρια κατάταξης του 2013 της EULAR (European League Against Rheumatism) και του ACR (American College of Rheumatology), (πίνακας 4) [77, 91]. Η εγκυρότητα και η χρησιμότητα των αναθεωρημένων αυτών κριτηρίων είναι σαφώς πιο ακριβής σε σχέση με τα προηγούμενα κριτήρια του ACR του 1980 [92] αλλά και πάλι υπάρχουν περιστατικά ατόμων με άτυπες εκδηλώσεις που δεν πληρούν τα παραπάνω κριτήρια.

1.9 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διερεύνηση της ΣΣκ περιλαμβάνει στην διαφορική διάγνωση άλλες δερματικές παθήσεις, από αγγειακές παθήσεις ή από παθήσεις εσωτερικών οργάνων. Όσο αφορά το δέρμα θα πρέπει να γίνει αποκλεισμός άλλων αιτιών που προκαλούν υποδόρια ή διηθητική ίνωση του δέρματος [93]. Επιπρόσθετα το εντοπισμένο σκληρόδερμα, γνωστό επίσης και ως μορφέας, μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα διαφορικής διάγνωσης ιδιαίτερα στην γενικευμένη του μορφή.

Πίνακας 4. Κριτήρια για τη Κατάταξη της συστηματικής σκλήρυνσης από το ACR και την EULAR.

<p>Εγγύς δερματική βλάβη</p> <p>-πάχυνση δακτύλων και στα δυο χέρια που επεκτείνονται έως στις εγγύς μετακαρποφαλαγγικές αρθρώσεις</p>	(score 9)
<p>Πάχυνση δέρματος δακτύλων (Λαμβάνεται υπόψη το μεγαλύτερο score)</p> <p>-πρησμένα δάκτυλα (score 2)</p> <p>-σκληροδακτυλία των δακτυλικών αρθρώσεων (άπω τμήμα μετακαρποφαλαγγικών και εγγύς τμήμα μεσοφαλαγγικών αρθρώσεων) (score 4)</p>	
<p>Βλάβες στα ακροδάχτυλα (Λαμβάνεται υπόψη το μεγαλύτερο score)</p> <p>Δακτυλικά έλκη (score 2)</p> <p>Βοθρία-ουλές στα ακροδάχτυλα (score 3)</p>	
Τηλεαγγειεκτασία	(score 2)
Παθολογική τριχοειδοσκόπηση	(score 2)
<p>Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση ή διάμεση πνευμονική νόσος</p> <p>Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (score 2)</p> <p>Διάμεση Πνευμονοπάθεια (score 2)</p>	
Φαινόμενο Raynaud	(score 3)
<p>Αντισώματα σχετιζόμενα με τη συστηματική σκλήρυνση</p> <p>Anti-centromere (score 3)</p> <p>Anti-topoisomerase I (score 3)</p> <p>Anti-RNA polymerase III (score 3)</p>	

Απαιτείται συνολικό score 9 για την διάγνωση της ΣΣκ

Η διάγνωση επίσης απαιτεί αποκλεισμό όλων των άλλων αγγειακών αιτιών που μπορούν να εκδηλωθούν ως φαινόμενο Raynaud ή ως περιφερική αγγειοπάθεια όπως η αγγειίτιδα [94]. Δεν πρέπει επίσης να ξεχνάμε ότι ένα ποσοστό της τάξης του 20% των ασθενών με ΣΣκ έχουν και εκδηλώσεις επικάλυψης με άλλα αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα [95]. Η τριχοειδοσκόπηση σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να βοηθήσει στην διαφορική διάγνωση του φαινομένου Raynaud καθώς εμφανίζονται χαρακτηριστικές αλλοιώσεις στα τριχοειδή των ατόμων με ΣΣκ και επομένως μπορεί να βοηθήσει στην διάγνωση ΣΣκ σε αρχικό στάδιο [96].

1.10 ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΣΚΟΠΗΣΗ

Η τριχοειδοσκόπηση ονύχων είναι μια απλή, μη επεμβατική τεχνική που επιτρέπει τόσο ποιοτική όσο και ποσοτική αξιολόγηση της μικροκυκλοφορίας, επιτρέποντας έτσι την έγκαιρη ανίχνευση ανωμαλιών. Στην πτυχή των νυχιών, τα τριχοειδή αγγεία είναι δομημένα παράλληλα με την επιφάνεια του δέρματος, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό την πλήρη μορφολογική εκτίμηση [97, 98]. Η τριχοειδοσκόπηση είναι σημαντικό εργαλείο για την διαφορική διάγνωση μεταξύ πρωτοπαθούς και δευτερογενούς φαινομένου Raunaud. Η τριχοειδοσκόπηση έχει συμπεριληφθεί στις συστάσεις των ACR/EULAR [77]. Θεωρείται σημαντικό εργαλείο για την βασική διερεύνηση τόσο στα πολύ πρώιμα στάδια της νόσου όσο και για την παρακολούθηση και εξέλιξη της νόσου, κυρίως σε ερευνητικό επίπεδο. Οι Cutolo et al. πρότειναν τρία προοδευτικά τριχοσκοπικά πρότυπα για την SSc—«πρώιμη», «ενεργή» και «όψιμη». Το «πρώιμο» πρότυπο ορίζεται ως η παρουσία λίγων γιγαντιαίων τριχοειδών αγγείων, μεμονωμένες μικροαιμορραγίες και διατήρηση της τριχοειδούς αρχιτεκτονικής χωρίς απώλεια τριχοειδών. Το «ενεργό» πρότυπο εμφανίζεται ως πολυάριθμα γιγάντια τριχοειδή αγγεία και μικροαιμορραγίες, με ήπιες

διαταραχές της αρχιτεκτονικής των τριχοειδών και μέτρια απώλεια τριχοειδών. Το «όψιμο» πρότυπο χαρακτηρίζεται από σοβαρή απώλεια τριχοειδών με εκτεταμένες μη αγγειακές περιοχές, αποδιοργάνωση της τριχοειδούς αρχιτεκτονικής και διακλαδισμένων/θαμνωδών τριχοειδών [99]. Η γαστρική αγγειακή δυσπλασία του άντρου (που είναι επίσης γνωστή ως στομάχι δίκην καρπουζιού-watermelon stomach) είναι μία σημαντική και αναγνωρίσιμη επιπλοκή της γαστρεντερικής οδού, η οποία απαιτεί και ειδική θεραπεία [47]. Η γαστρική αγγειακή δυσπλασία του άντρου μπορεί να προκαλέσει λανθάνουσα αναιμία η οποία εκδηλώνεται κλινικά με άτυπα συμπτώματα όπως κούραση και αδυναμία, και σε μερικές έρευνες [47] σχετίζεται με τη παρουσία anti-RNA polymerase III αυτοαντισωμάτων.

Χημειοθεραπευτικά φάρμακα όπως οι ταξάνες και η γερμισιταμπίνη όπως επίσης και οι ακτινοθεραπείες μπορούν επίσης να οδηγήσουν στην εμφάνιση ΣΣκ, όπως κυρίως αναδεικνύεται από μελέτες σε πειραματόζωα [100]. Άλλες μελέτες έχουν επίσης συσχετίσει την τοποθέτηση σιλικονούχων εμφυτευμάτων στήθους με την εμφάνιση ΣΣκ, αλλά μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες που να επιβεβαιώνουν την παρατήρηση αυτή δεν έχουν πραγματοποιηθεί [101, 102]. Τέλος εμφάνιση σκληροδερματικών εκδηλώσεων έχουν παρατηρηθεί κατά την συχνή χρήση χημικών ουσιών όπως η L-τρουπτοφάνη και το γαδολίνιο που χρησιμοποιείται ως παραμαγνητική ουσία για την πραγματοποίηση MRI απεικονίσεων. Επιπρόσθετα η χρήση γαδολινίου έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση νεφρικής κρίσης σκληροδέρματος [102].

1.11 ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ

1.11.1 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

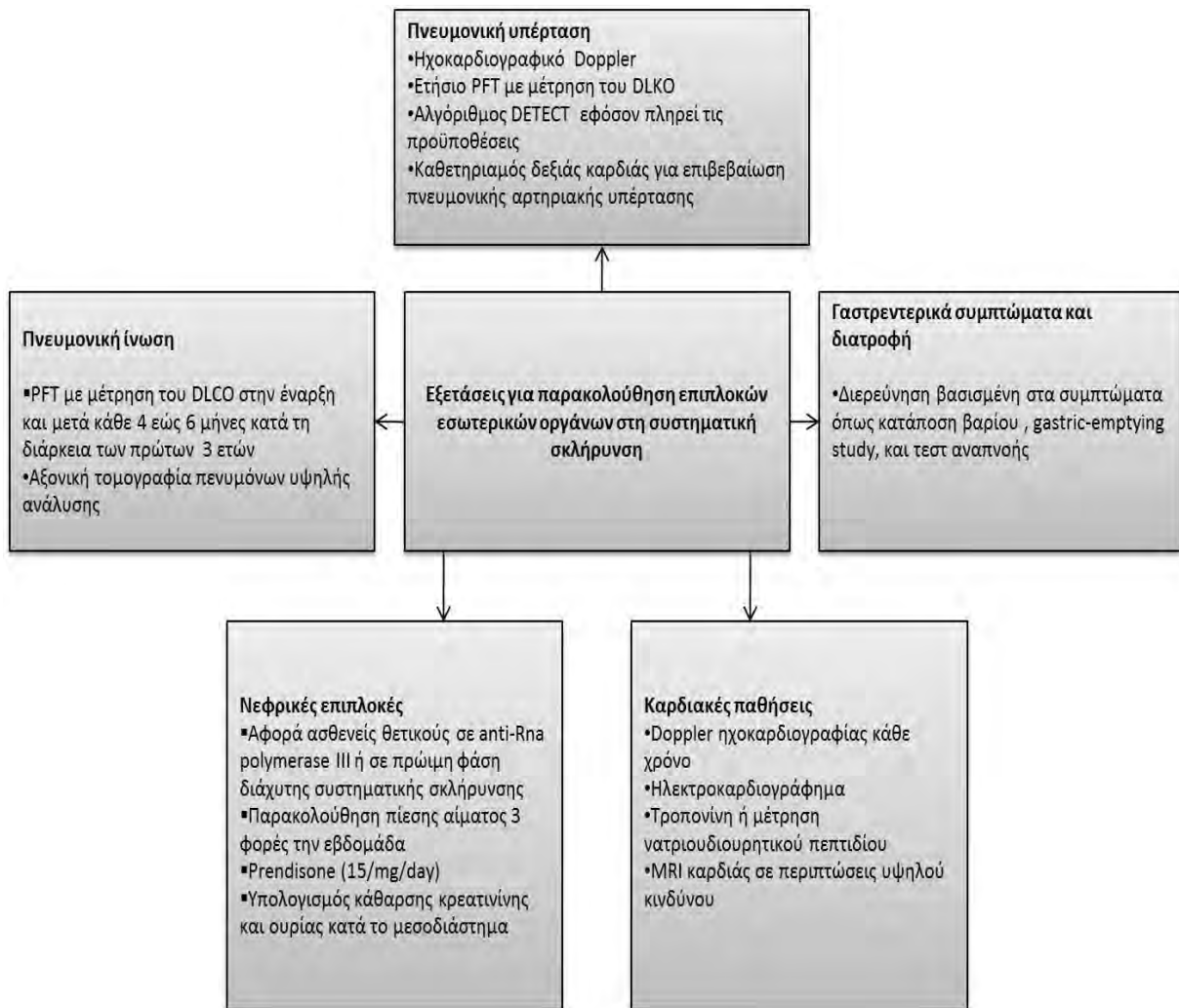
Από την στιγμή που ο ασθενής διαγιγνώσκεται με ΣΣκ πρέπει να γίνει ο απαιτούμενος αριθμός εργαστηριακών, απεικονιστικών και ενδοσκοπικών εξετάσεων

προκειμένου να διαπιστωθεί η μορφή και η βαρύτητα της νόσου. Εκτός από τα δημογραφικά στοιχεία απαραίτητη είναι η καταγραφή του τύπου της ΣΣκ, η χρονική διάρκεια των συμπτωμάτων της νόσου, και η παρουσία εκδηλώσεων επικάλυψης με άλλα νοσήματα του συνδετικού ιστού. Οι απαραίτητες ενέργειες και εξετάσεις που πρέπει να γίνουν σε ασθενή με νέα διάγνωση ΣΣκ σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της EULAR και της EUSTAR (EULAR Scleroderma Trialas and Research), συνοψίζονται στο παρακάτω σχεδιάγραμμα [103].

1.11.2 ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ

Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν πλήρως αποτελεσματικά φάρμακα για την αντιμετώπιση των επιπλοκών της ΣΣκ, η πρώιμη διάγνωση και η τακτική παρακολούθηση των ασθενών είναι σημαντική για την βελτίωση της επιβίωσης τους. Η εικόνα 2 δείχνει τον συνιστώμενο αλγόριθμο της βασικής παρακολούθησης των οργάνων που εμπλέκονται ώστε να ανιχνευτεί η ασθένεια σε πρώιμο στάδιο. Γενικά από την στιγμή της διάγνωσης, συστήνεται έλεγχος για πνευμονική ίνωση στα πρώτα 3-5 χρόνια μετά τη διάγνωση, καθώς η διάμεση πνευμονοπάθεια μπορεί να εμφανισθεί ακόμη και σε πρώιμα στάδια σε ασθενείς με ΣΣκ [89, 104]. Ειδικά οι ασθενείς με θετικά τα αντισώματα έναντι RNA polymerase III που σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης νεφρικής κρίσης, πρέπει να ελέγχονται για την σωστή συμμόρφωση για την ρύθμιση της αρτηριακής τους πίεσης [58]. Οποιοδήποτε εργαστηριακό εύρημα ή κλινικό σύμπτωμα θέτει την υπόνοια υποκείμενης κακοήθειας πρέπει να διερευνάται άμεσα. Αντίθετα δεν συνιστάται έλεγχος ρουτίνας προς αποκλεισμό κακοήθειας σε όλους τους ασθενείς με ΣΣκ. Τέλος πρέπει να γίνεται έλεγχος επί ενδείξεων για την πιθανότητα ανάπτυξης σοβαρών επιπλοκών όπως αγγειοπάθεια των δαχτύλων-δακτυλικά έλκη, γαστρεντερικές επιπλοκές, πνευμονική ίνωση, πνευμονική υπέρταση, καρδιακή ίνωση, νεφρικές κρίσεις,

εναπόθεση αλάτων ασβεστίου και ακροστεόλυση και να γίνεται η κατάλληλη θεραπευτική παρέμβαση και αντιμετώπιση.



Εικόνα 2. Η συστηματική διερεύνηση των νέων περιπτώσεων συστηματικής σκλήρυνσης, καθώς και κατά τη διάρκεια παρακολούθησης των υπαρχόντων είναι βασική για την αναγνώριση διάφορων επιπλοκών και τη διαχείριση τους. Αυτή η συστηματική προσέγγιση επιτρέπει μια δυναμική διαχείριση και σχετίζεται με αυξημένα ποσοστά επιβίωσης σε ομάδα ασθενών με συστηματική σκλήρυνση. Ο αλγόριθμος DETECT συνδυάζει κλινικά χαρακτηριστικά, εργαστηριακά τεστ, PFTs και διαθωρακικό ηχοκαρδιογράφημα για την ανίχνευση πνευμονικής υπέρτασης σε αρχικό στάδιο. PFT: έλεγχος λειτουργικότητας πνευμόνων. DLCO: Ικανότητα διάχυσης του διοξειδίου του άνθρακα [76].

Η εναπόθεση ασβεστίου παραμένει μία πρόκληση παρόλο που έγιναν σημαντικά βήματα στην κατανόηση της παθογένειας της [105, 106]. Έχουν αναφερθεί φάρμακα σε μια σειρά μελετών, [107] ωστόσο δεν υπάρχουν αρκετά αποδεικτικά στοιχεία ώστε να συστήνονται αυτά ως συνήθη πρακτική αντιμετώπισης της καλσίνωσης. Παρόμοια με άλλες αιτίες ασβεστοποίησης και καταστροφής του ιστού από εναπόθεση ασβεστίου, έχει χρησιμοποιηθεί τόσο με τοπική όσο και με συστηματική χρήση ή χορήγηση θειο-θεικού νατρίου, με αμφιλεγόμενα όμως αποτελέσματα [108]. Ελλείπει μιας ολιστικής θεραπευτικής προσέγγισης συνήθως καταφεύγουμε σε λύσεις χειρουργικής εξαίρεσης μεγάλων εναποθέσεων ασβεστίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

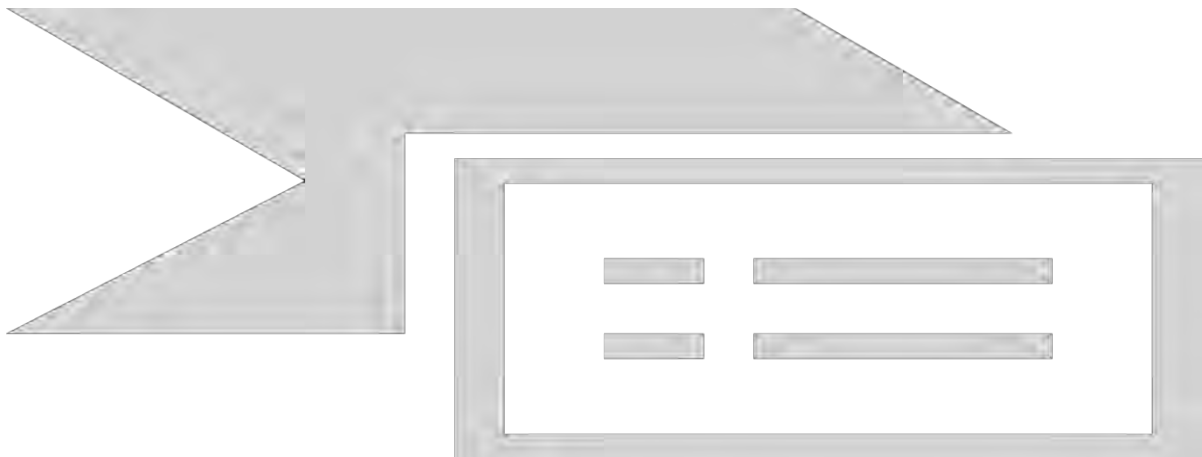
Μεταξύ των περιβαλλοντικών παραγόντων που έχουν μελετηθεί στην παθογένεια της ΣΣκ, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει δοθεί σε παθογόνα και κυρίως ιούς. Μεταξύ των ιών που έχουν συσχετισθεί με την ΣΣκ, ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (human cytomegalovirus, HCMV) έχει μελετηθεί σε κάποιο βαθμό.

2.1 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΙΟΥ HCMV

Ο HCMV είναι ένας ευρύτατα διαδεδομένος ιός που έχει μολύνει την πλειονότητα των ενηλίκων παγκοσμίως. Ο ιός επιτυγχάνει εφ' όρου ζωής λοίμωξη παραμένοντας στα μολυσμένα κύτταρα είτε σε λανθάνουσα μορφή, είτε ενεργοποιείται σποραδικά διασκορπίζοντας ιικά σωματίδια. Πολλά είδη κυττάρων μπορεί να μολυνθούν από τον ιό και έτσι πρακτικά ο ιός μπορεί να ανευρεθεί με διάφορες τεχνικές σε πολλά όργανα και συστήματα [109]. Ο HCMV θεωρείται υπεύθυνος για περίπου 8% των περιπτώσεων της λοιμώδους μονοπυρήνωσης και σε περιπτώσεις ανθρώπων με επηρεασμένο ανοσολογικό σύστημα (ανοσοανεπάρκεια) αποτελεί αίτιο αυξημένης νοσηρότητας και θνητότητας [110]. Επίσης θεωρείται από τους κυριότερους ιούς που προκαλεί προβλήματα στα νεογνά όπως κώφωση και νοητική υστέρηση [111]. Σε ασθενείς με AIDS μπορεί να προκαλέσει αμφιβληστροειδοπάθεια και τύφλωση. Επιπρόσθετα η λοίμωξη με HCMV μπορεί να αποτελέσει σημαντική αιτία απώλειας μοσχεύματος μυελού των οστών καθώς και των άλλων οργάνων, ενώ πιθανόν να συμβάλλει στην φθορά και την γήρανση του ανοσοποιητικού συστήματος [112, 113]. Ο HCMV έχει επίσης συσχετισθεί με διάφορες καρδιαγγειακές ασθένειες και ορισμένους τύπους καρκίνου [114]. Τόσο η πρωτογενής λοίμωξη όσο και η ενεργοποίηση της λανθάνουσας μορφής μπορούν να προκαλέσουν κλινική συμπτωματολογία. Δεν υπάρχει εμβόλιο που να αποτρέπει την λοίμωξη από τον ιό και τα διαθέσιμα φάρμακα που είναι εγκεκριμένα από τον παγκόσμιο οργανισμό

φαρμάκων χαρακτηρίζονται από χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, τοξικότητα και πολλές φορές στην δημιουργία ανθεκτικών στελεχών [115].

Ο HCMV ανήκει στην οικογένεια των β ερπητοϊών και έχει την κλασική δομή των ερπητοϊών και διαθέτει τα ίδια μονοπάτια έκφρασης των γονιδίων τους. Κάθε ιικό σωματίο (virion) αποτελείται από γονιδίωμα με την μορφή διπλής έλικας DNA μοριακού βάρους 235 Kb, που περιβάλλεται από ένα εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο και αυτό με τη σειρά του από ένα πρωτεϊνικό περίβλημα (tegument) και τελικά από ένα πυρηνικό φάκελλο (λιπιδικής κυρίως σύστασης) (εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1 Δομή των virion του HCMV. Γραφική αναπαράσταση (αριστερά πάνω) και εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (δεξιά πάνω). Το κάτω σχεδιάγραμμα δείχνει (όχι σε κλίμακα), τη δομή ενός μέσου μολυσματικού ιικού σωματιδίου HCMV. Οι πιο σημαντικές πρωτεΐνες αυτού, pp65, pUL47, pUL 48, pp150, pp28 και pp71, παρατίθενται ως σύμβολα [116].

Το γονιδίωμα του ιού διαιρείται μέσω εσωτερικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (IRS), σε γονιδιακές περιοχές άλλες μακρές (περιοχές unique Long-UL) και άλλες μικρότερες (περιοχές unique short-US). Τα ιικά γονίδια (στον HCMV είναι πάνω από 166) παίρνουν το όνομα τους σύμφωνα με το τμήμα του γονιδιώματος στο οποίο εντοπίζονται και αριθμούνται διαδοχικά. Στο γονιδίωμα επίσης υπάρχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες τερματισμού (Terminal Repeat Sequences-TRS). Οι ιικές γλυκοπρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλλου είναι πολύ σημαντικές στην πορεία της μόλυνσης διότι προάγουν διαδικασίες σύντηξης του πυρηνικού φακέλλου του ιού με την κυτταρική μεμβράνη οδηγώντας έτσι στην απελευθέρωση μέσα στο κύτταρο του ιικού DNA και των ιικών πρωτεϊνών. Εν συνεχεία ενεργοποιούνται γονίδια πρώιμης έκφρασης (Immediate early genes-IE) που έχουν ως αποτέλεσμα την έναρξη του λυτικού κύκλου αναπαραγωγής. Οι IE πρωτεΐνες τροποποιούν το περιβάλλον του κυττάρου ξενιστή και διεγείρουν την έκφραση των υπόλοιπων πρώιμων ιικών γονιδίων (early genes) οι πρωτεΐνες των οποίων επάγουν τον πολλαπλασιασμό του ιικού γονιδιώματος. Όταν ολοκληρωθεί αυτός αρχίζουν να εκφράζονται τα όψιμα γονίδια (late genes). Οι πρωτεΐνες που παράγονται από τα γονίδια αυτά είναι κυρίως δομικά στοιχεία των νιρίον και επιτρέπουν τη συναρμολόγηση και απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ιικών 'απογόνων'.

Σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων τα IE γονίδια, αποσιωπούνται με αποτέλεσμα να οδηγούμαστε σε μία λανθάνουσα κατάσταση [117]. Κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας αυτής κατάστασης η έκφραση των γονιδίων ελαχιστοποιείται πιθανόν για να αποφύγει ο ιός μία ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού και δεν παράγεται κανένας απόγονος του ιού. Κατά περιόδους όμως υπάρχει πιθανότητα επαναδραστικοποίησης του ιού, περνώντας από την λανθάνουσα κατάσταση στον λυτικό κύκλο οδηγώντας σε κλινική εκδήλωση νόσου και στην εξάπλωση του ιού.

Επιπλέον από τα λοιμογόνα σωματίδια (virion), υπάρχουν δύο άλλα είδη μη μολυσματικών σωματιδίων που μπορεί να δημιουργηθούν κατά την διάρκεια μιας λοίμωξης: οι μη μολυσματικοί φάκελλοι (non-infectious enveloped particles-NIEPS) και τα πυκνά σωματίδια (dense bodies) [118]. Τα NIEPS έχουν αρκετές ομοιότητες με τα λοιμογόνα virions και περιέχουν μια σημαντική ποικιλία από πανομοιότυπες πρωτεΐνες όμως στερούνται του ιικού γονιδιώματος που περιέχεται μέσα στο εικοσαεδρικό καψίδιο. Τα πυκνά σωματίδια περιέχουν πρωτεΐνες περιβλήματος που στερούνται καψιδίου (και κατ' επέκταση γονιδιώματος). Συντίθενται κυρίως από την ιική πρωτεΐνη pp65. Η σημασία αυτών των δύο σωματιδίων δεν έχει ακόμα κατανοηθεί πλήρως.

Σε λιγότερες από τις μισές πρωτεΐνες έχει προσδιορισθεί πλήρως η λειτουργικότητα τους. Φαινοτυπικές μελέτες σε πειράματα με null μεταλλάξεις έχουν δείξει ότι ορισμένα από τα γονίδια είναι εντελώς απαραίτητα, άλλα γιατί κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για την δημιουργία του περιβλήματος και άλλες για τον πολλαπλασιασμό του ιού ή για την επαγωγή του λυτικού κύκλου [119, 120].

Στον πίνακα 2.1 αναφέρονται τα σημαντικότερα γονίδια που υπάρχουν στο ιικό γονιδίωμα του HCMV και οι βασικές λειτουργίες των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά.

Στην συνέχεια του κεφαλαίου αυτού θα περιγραφούν με περισσότερες λεπτομέρειες τα κυριότερα γονίδια, οι πρωτεΐνες των οποίων είναι ανοσογονικές και αποτελούν βασικούς στόχους της ανοσολογικής απόκρισης.

Πίνακας 2.1. Γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες περιβλήματος μαζί με τα ονόματα των πρωτεϊνών (όπου υπάρχουν). Η στήλη με τον τίτλο λειτουργίες περιγράφει τις λειτουργίες αυτών των πρωτεϊνών. Όπου υπάρχει κενό δεν έχει παρατηρηθεί κάποια λειτουργία. Οι περιβαλλόμενες γλυκοπρωτεΐνες και τα μέρη του καψιδίου δεν συμπεριλαμβάνονται.

ΓΟΝΙΔΙΟ (ΠΡΩΤΕΙΝΗ)	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ
UL23	Άγνωστη
UL24	Άγνωστη
UL25	Παρουσιάζεται πάντα μαζί με την pp28
UL26	Αυξάνει την σταθερότητα των ιικών πρωτεϊνών
UL32 (pp 150)	Οδηγεί το καψίδιο στη περιοχή του τελικού περιβλήματος
UL35	Ενεργοποιεί την έκφραση ιικών γονιδίων
UL36	Αναστέλλει την απόπτωση
UL38	Αναστέλλει την απόπτωση
UL43	Άγνωστη
UL44	HCMV DNA πολυμεράση μεταγραφικόςπαράγοντας
UL45	Απενεργοποιεί τη υπομονάδα ριβονουκλεϊκής ρεδοκτάσης
UL47	Απελευθερώνει το ιικόDNA από το καψίδιο
UL48	Πρωτεάση αποουμοικουίνωσης Απελευθερώνει το ιικόDNA από το καψίδιο
UL50	Πυρηνική έξοδος των καψιδίων
UL53	Πυρηνική έξοδος ή συναρμολόγηση των καψιδίων
UL54	Ιϊκή DNA πολυμεράση
UL57	Πρωτεΐνη δέσμευσης σε απλή έλικα DNA
UL 69	Πυρηνική εξαγωγή του unspliced mRNA's Αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1
UL71	Άγνωστη
UL72	Απενεργοποιεί τηdUTPάση
UL76	Πυρηνική Λειτουργία
UL77	Αποκαρβοξυλάση πυρρυβικού οξέος
UL79	Άγνωστη
UL82 (pp71)	Αποδόμηση του Daxx: Διευκολύνει την έκφραση των ΙΕ πρωτεϊνών Υαποδόμηση το RB: Διεγείρει τον κυτταρικό κύκλο Αποτρέπει την έκφραση του MHC
UL83 (pp65)	Ενδογενής δραστηριότητα κινάσης Σχετίζεται με την δραστηριότητα της κινάσης Αποφυγή του επίκτητου ανοσοποιητικού Αποφυγή του έμφυτου ανοσοποιητικού
UL84	Αντιγραφικός /Μεταγραφικός παράγοντας του HCMV
UL88	Άγνωστη
UL 93	Άγνωστη
UL 94	Πρωτεΐνης δέσμευσης στο DNA Παρόμοια δομή με αυτοαντιγόνο στη συστημική σκληρύωση
UL 96	Άγνωστη
UL97	Κινάση που φωσφορυλιώνει την γανσικλοβίρη Ενεργοποιητής της αντιγραφής του DNA Λειτουργίες εξαρτώμενες από κινάση Διαταράσσει πυρηνικά σωματίδια
UL 99	Άμεση περίφραξη των τμημάτων του φακέλλου
UL 103	Άγνωστη
UL 112	Αντιγραφικός παράγοντας του DNA του HCMV
IRS1/TRS1	Αναστέλλει την αντίική ανταπόκριση του PKR Συναρμολόγηση των ιικών πρωτεϊνών
US22	Άγνωστη
US23	Άγνωστη
US24	Ενεργοποιεί την έκφραση των ιικών γονιδίων

2.1.1 UL55

Σε όλες τις μελέτες που αφορούν ερπητοϊούς, αναφέρεται ένας αριθμός γονιδίων τα οποία χαρακτηρίζουν όλη την οικογένεια των ιών αυτών [121, 122]. Τα πιο σημαντικά όσον αφορά το μέγεθος είναι ένα σύμπλεγμα συνεχόμενων γονιδίων (gB/POLblock) που χαρακτηρίζονται από ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORFs) και κωδικοποιούν διάφορες πρωτεΐνες όπως την DNA Πολυμεράση του ιού, την γλυκοπρωτεΐνη B, την 18.5 ομόλογη μολυσματική κυτταρική πρωτεΐνη (infected cell protein-ICP) του ερπητοϊού, και την DNA-binding πρωτεΐνη. Αντιθέτως η γειτονική περιοχή του τμήματος gB/POL δεν παρουσιάζει κάποια προφανή ομόλογη αλληλουχία νουκλεοτιδίων και δεν φαίνεται ότι κωδικοποιεί ομόλογα προϊόντα. Η δομή της διαδοχικής σειράς τεσσάρων ORFs στο τμήμα Gb/pol έχει αναγνωρισθεί στους β και γ ερπητοϊούς αλλά διαφέρει στο γονιδίωμα των α-ερπητοϊών όπου το γονίδιο της DNA πολυμεράσης βρίσκεται δίπλα από αυτό της DNA-Binding πρωτεΐνης και προσανατολισμένο προς την αντίθετη κατεύθυνση [122]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα ORFs της διατηρούμενης γονιδιακής αγωγής κωδικοποιούν προϊόντα που φαίνεται να εμφανίζουν διαφορετικές λειτουργίες, ήτοι από την μία, μη δομικές πρωτεΐνες (την κύρια single stranded DNA-binding πρωτεΐνη και την DNA πολυμεράση) και από την άλλη, δύο δομικές πρωτεΐνες, την ομόλογη ICP 18.5 η οποία μπορεί επίσης να είναι και η DNA-binding πρωτεΐνη που εμπλέκεται στο πακετάρισμα του DNA [123, 124] και το ομόλογο gB το οποίο αποτελεί συστατικό του ιικού περιβλήματος στους περισσότερους ερπητοϊούς, με τον Epstein-Barr virus να αποτελεί τη μόνη γνωστή εξαίρεση [125]. Η ομόλογη gB πρωτεΐνη είναι γνωστή ως UL-55 η οποία εκφράζεται πολύ νωρίς κατά την διάρκεια του λυτικού κύκλου. Τα ομόλογα προϊόντα [126] αυτής της συστάδας των γονιδίων φαίνεται ότι παρέχουν ζωτικής σημασίας λειτουργίες κατά τη αρχική φάση του ιικού κύκλου και στην ωρίμανση των μολυσματικών απογόνων των ερπητοϊών [123, 126-

130]. Η μεταγραφή των μοναδικών γονιδίων της συστάδας αυτής έχει μελετηθεί για διάφορα είδη ερπητοϊών και έχει αποκαλύψει ένα πολύπλοκο σχέδιο από πιθανώς επικαλυπτόμενου [128, 131, 132]. Στην περίπτωση του HCMV, η προηγούμενη ανάλυση του αντίστοιχου συμπλέγματος των γονιδίων [132] υποδεικνύει ότι για όλα τα ORFs, τα mRNAs μεταγράφονται χωρίς συγκεκριμένη κατεύθυνση από την συμπληρωματική σειρά [133].

2.1.2 UL57

Το γονίδιο UL57 του HCMV βρίσκεται κοντά στο μέσο της αλληλουχίας των μακριών περιοχών (long unique) ακριβώς δίπλα από το γονίδιο oriLyt και κωδικοποιεί μία πρώιμη, μη συμμετέχουσα στην δομή του ιικού σωματιδίου (virion) πρωτεΐνη απλής έλικας DNA binding πρωτεΐνης, μοριακού βάρους περίπου 140 kDa [131, 134-136]. Είναι ένα γονίδιο ομόλογο με το γονίδιο για το ICP8, της πιο καλά μελετημένης DNA-binding πρωτεΐνης του ιού του απλού έρπητα HSV-1 [137-140]. Όπως μπορεί να καταλάβει κανείς από την μεγάλη αμινοξική ομολογία του με το ICP8, το pUL57 είναι απαραίτητο για τη συμπληρωματική δράση στην πορεία αντιγραφής του DNA της διαμεσολαβούμενης από το oriLyt [141-143].

2.1.3 UL80

Όλοι οι ιοί που ανήκουν στην οικογένεια των ερπητοϊών έχουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεάσες ωρίμανσης οι οποίες δρουν κατά την διάρκεια σχηματισμού του νουκλεοκαψιδίου και θεωρούνται εντελώς απαραίτητες για την παραγωγή μολυσματικών απογόνων. Η αντίστοιχη πρωτεάση ωρίμανσης του HCMV είναι προϊόν έκφρασης μιας γονιδιακής περιοχής (ORF) UL80a που οδηγεί στην παραγωγή μιας πρωτεΐνης μοριακού βάρους 74-kDa (pPR, pUL80a). Αποτελείται από μια πρωτεολυτική περιοχή 28-kDa (που αποκαλείται και assembling) στο αμινοτελικό άκρο του μορίου και μέσω μιας συνδετικής περιοχής 8-kDa ενώνεται με

την καρβοξυτελική δομική περιοχή 46-kDa περιοχή. Όλα τα ομόλογα γονίδια έχουν την ίδια αυτή γονιδιακή δομή.

Η γονιδιακή αυτή περιοχή ORF που κωδικοποιεί την πρωτεάση του HCMV, κωδικοποιεί επίσης και μία πρωτεΐνη περίπου στο μισό μέγεθος αυτής που λέγεται πρόδρομη πρωτεΐνη συναρμολόγησης (pAP; 38kDa), η οποία εκφράζεται ανεξαρτήτως και σε αφθονία από την εσωτερική 3'-περιοχή του UL80 ORF [144, 145]. Δρώντας συνεργικά, οι δύο αυτές πρωτεΐνες συντονίζουν τα πρώιμα στάδια οργάνωσης και ωρίμανσης σχηματισμού του καψιδίου [146] συμπεριλαμβανομένου και της αυτοαλληλεπίδρασης, ώστε να σχηματιστούν ομο-ολιγομερή [147, 148] αλληλεπιδράσεις το ένα με το άλλο ώστε να σχηματιστούν ετερο-ολιγομερή [148, 149], και αλληλεπιδράσεις με τη μείζονα πρωτεΐνη του καψιδίου (major capsid protein-MCP, pUL86) ώστε να σχηματιστούν μεγάλα συμπλέγματα που προορίζονται να γίνουν υπομονάδες του καψιδίου [148, 150-152]. Πολλές από αυτές τις αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν στο κυτόπλασμα, συμπεριλαμβανομένου και αυτών με την MCP που έχει σαν αποτέλεσμα να επιτρέπει την μετεγκατάσταση του μέσα στο πυρήνα μέσω αλληλουχιών πυρηνικής εντόπισης (nuclear localization sequences) που υπάρχουν στις UL80 πρωτεΐνες [149, 153].

Αφού βρεθούν μέσα στο πυρήνα, οι pRP και pAp αλληλεπιδρούν περαιτέρω οθώντας τα MCP πρωτομερή να συνενωθούν μεταξύ τους αλλά και με άλλες καψιδικές υπομονάδες ώστε να σχηματιστεί το προκαψιδικό περίβλημα [146, 154]. Αν και δεν είναι απολύτως απαραίτητη η ύπαρξη της πρωτεάσης για να σχηματιστεί η καψιδική δομή [155, 156], εντούτοις η λειτουργία της θεωρείται απαραίτητη για την εξάλειψη των εσωτερικών δομικών (scaffolding) πρωτεϊνών ώστε να δημιουργηθεί χώρος για το ιικό DNA [157-159]. Η μεταφορά της πρωτεάσης αυτής στον εσωτερικό του προκαψιδίου είναι επίσης ένα σημαντικό βήμα καθώς οδηγεί σε

διακοπή της δράσης της και αποτρέπεται η επανενεργοποίηση αυτής και αυτό γίνεται μέσω μη καλά μελετημένων μηχανισμών [148, 150, 160, 161].

2.1.4 ΠΡΩΤΕΙΝΗ pp65 (UL83) (LOWER MATRIX PROTEIN)

Η φωσφοπρωτεΐνη pp65 είναι ένα από τα κύρια συστατικά της δημιουργίας των σωματιδίων του HCMV [118, 162] και μεταφέρεται στο πυρήνα του κυττάρου ξενιστή από τα πρώτα στάδια της λοίμωξης [163]. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί στόχο τόσο της χυμικής όσο και της κυτταρικής ανοσίας και είναι ο κυριότερος αντιγονικός στόχος των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων [164-169]. Η παραμονή αυτής της πρωτεΐνης παρά την παρουσία ισχυρής ανοσιακής απάντησης υποδηλώνει ότι πρέπει να διαδραματίζει κάποιο σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του ιού. Πολλά εργαστήρια χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους έχουν ανακαλύψει ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί την pp65 βρίσκεται στην γονιδιακή θέση UL83 [133, 170-172]. Παρόλο που το γονίδιο UL83 είναι περιττό (μη απαραίτητο) για τον πολλαπλασιασμό του ιού σε καλλιέργειες ινοβλαστών, θεωρείται απαραίτητο για τον σχηματισμό των πυκνών σωματιδίων του πυρήνα (dense bodies) [173].

Σε ότι αφορά τον λειτουργικό της ρόλο, φαίνεται ότι η pp65 σχετίζεται με την εξουδετέρωση του έμφυτου και επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος. Η pp65 βρέθηκε ότι προκαλεί την φωσφορυλίωση των ΙΕ πρωτεϊνών του ιού, διαδικασία που τελικά μπλοκάρει την αντιγονο-παρουσίαση τους από τα μόρια MHC τάξης I [174]. Επιπρόσθετα προκαλεί αποδόμηση της άλφα αλυσίδας του υποδοχέα HLA-DR, ενώ συγχρόνως μεσολαβεί στην μεταφορά μορίων HLA τάξης II για αποδόμηση σε λυσοσωμάτα [175]. Επιπλέον όμως αυτής της δράσης της στο επίκτητο ανοσολογικό σύστημα, η pp65 επίσης προστατεύει την καταστροφή των μολυσμένων από HCMV κυττάρων από το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα με το να αναστέλλει την κυτταροτοξική δράση των NK κυττάρων (Natural Killers-φυσικοί φονιάδες)

παρεμποδίζοντας την δράση του NKp30 υποδοχέα (υποδοχέας των NK κυττάρων που όταν διεγείρεται προκαλεί ενεργοποίηση των NK) [176].

Ένα ακόμη σκέλος του ανοσολογικού συστήματος που μπλοκάρεται από την pp65 είναι η παραγωγή ιντερφερονών [177]. Μελέτες σε κυτταρικές σειρές που έχουν μολυνθεί με μεταλλαγμένα στελέχη HCMV ιών με αδυναμία παραγωγής pp65 πρωτεΐνης (pp65-null virus) έδειξαν ότι υπήρχε υπερέκφραση των γονιδίων που ελέγχουν την παραγωγή ιντερφερόνης (ISGs, interferon-stimulated genes). Αυτό το αποτέλεσμα μάλλον είναι αινιγματικό για δύο λόγους: Πρώτον, η παραγωγή ιντερφερονών ως ανταπόκριση στην λοίμωξη με HCMV είναι πιο ενισχυμένη στην απουσία γονιδιακής έκφρασης του ιού (όπως για παράδειγμα στην μόλυνση των κυτταρικών σειρών με UV-αδρανοποιημένους ιούς), μια κατάσταση στην οποία η μεταφορά του pp65 στα κύτταρα θα έπρεπε πιθανότατα να περιορίσει την έκφραση των ISGs. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι μια τοπικά νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη μειώνει την κυτταρική αντιική απόκριση [178]. Δεύτερο, είναι πολύ πιθανόν ότι μία υπερπαραγωγή ιντερφερόνης, λόγω λοίμωξης από pp65-null ιό θα οδηγούσε σε αναχαίτιση του πολλαπλασιασμού και της επέκτασης του ιού, κάτι όμως που δεν παρατηρείται. Μία εξήγηση στο παράδοξο αυτό μπορεί να δοθεί από τα αποτελέσματα μιας άλλης μελέτης όπου η μόλυνση με pp65-null ιό οδηγεί στην καθυστέρηση της έκφρασης και των ΙΕ γονιδίων του ιού και επομένως μάλλον η ιική πρωτεΐνη ΙΕ2 είναι εκείνη που προκαλεί καταστολή της έκφρασης των ISGs στα μολυσμένα με HCMV κύτταρα [179]. Να σημειωθεί επίσης ότι η ΙΕ1 εμπλέκεται στην καταστολή της απόκρισης των ιντερφερονών [180]. Η μειωμένη έκφραση των ΙΕ γονιδίων στους pp65-null ιούς είναι πιθανόν να προκαλείται από μείωση έκφρασης της pp71 που προκαλείται από αλλαγές υποκατάστασης του γονιδίου UL83 [179]. Τα pp65 και pp71 είναι γειτονικά γονίδια που εκφράζονται ως ενιαίο δισιστρονικό

(bicistronic) mRNA [172], ενώ προηγούμενες έρευνες έδειξαν τη μείωση έκφρασης του pp71 με την χρήση antisense RNA [181].

Το πιο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό που έχει αποδοθεί στη pp65 είναι ότι έχει δραστηριότητα κινάσης. Αρχικά είχε ανακαλυφθεί ότι οι λοιμογόνοι παράγοντες (virion) του HCMV εμπεριέχουν δράση κινάσης [182] και αυτή η δραστηριότητα τελικά βρέθηκε να σχετίζεται με την παρουσία pp65 [183-185]. Αυτό επιβεβαιώνεται με το γεγονός ότι η δράση της κινάσης είναι σημαντικά μειωμένη σε UL83-null ιούς [173]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι η δραστηριότητα της κινάσης φαίνεται ότι είναι σημαντική στην αποτροπή της αντιγονοπαρουσίασης των ΙΕ πρωτεϊνών στο MHC στα αρχικά στάδια της λοίμωξης με τον HCMV, (όπως προαναφέραμε μέσω του μηχανισμού της φωσφορυλίωσης των ΙΕ πρωτεϊνών σε κατάλοιπα θρεονίνης) [174].

Επίσης είναι γνωστό βιβλιογραφικά ότι η pp65 παρά το γεγονός ότι δομικά έχει μικρές ομοιότητες στο γονιδίωμα με άλλες κινάσες [185] έχει αλληλεπίδραση και με άλλες κινάσες όπως την polo-like κινάση 1 (Plk1) [186], την κινάση UL97 όπως και την κυτταρική κινάση καζεΐνης II (cellular casein kinase II) [187]. Το γεγονός ότι τα virions του HCMV περιέχουν πολλαπλές κινάσες και ότι η pp65 σχετίζεται τόσο με τις ιικές κινάσες όσο και με τις κυτταρικές δεν σημαίνει απαραίτητα ότι η pp65 δεν μπορεί να έχει η ίδια δραστηριότητα κινάσης (παρά τη φτωχή, όπως αναφέρθηκε, δομική ομοιότητα με άλλες γνωστές κινάσες). Συνεπώς παραμένει αναπάντητο το ερώτημα κατά πόσο η δράση κινάσης που σχετίζεται με την pp65 είναι της ίδιας της πρωτεΐνης, ή των σχετιζόμενων κινασών με τις οποίες συνδέεται ή συνυπάρχουν και οι δύο παραπάνω λόγοι μαζί.

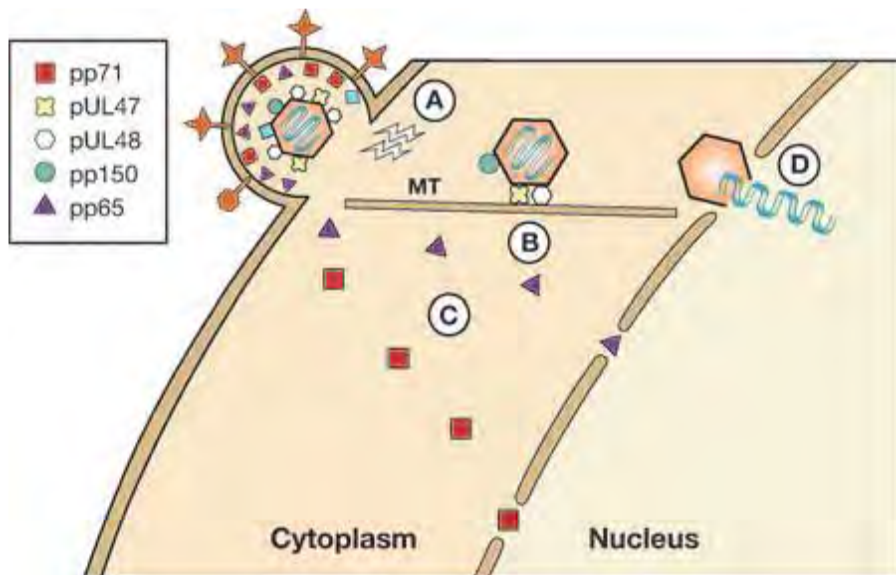
2.1.5 ΠΡΩΤΕΙΝΗ pp28(UL99)

Η pp28 είναι μια φωσφοπρωτεΐνη έντονα ανοσογονική που βρίσκεται στα ιικά σωμάτια (virions), τα NIEPS (non infectious enveloped particles, μη μολυσματικά σωμάτια που περιβάλλονται από μεμβράνη), και στα πυκνά σωμάτια (densebodies) του ιού [118, 170, 188, 189]. Αποτελείται από 190 αμινοξέα και κωδικοποιείται από το γονίδιο UL99 [55, 133, 189-192]. Για την ενεργοποίηση της και για να αποκτήσει ικανότητα να προσδένεται σε κυτταρικές μεμβράνες απαιτείται μετα-μεταγραφική τροποποίηση της μέσω μυριστοιλίωσης (στο κατάλοιπο της γλυκίνης στη θέση 2 [193]. (myristoylation, μια διαδικασία προσθήκης μυριστικού οξέος ή αλλιώς 1-τετραδεκανοϊκό οξύ- $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$ σε αμινοξικό κατάλοιπο. Με τον τρόπο αυτό ενισχύεται σημαντικά η αδύναμη αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεΐνης και λιπιδίων. Είναι μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση που χρησιμοποιείται ευρέως για την πρόσδεση σε μεμβράνες, την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και σε ενίσχυση μιας ποικιλίας οδών μεταγωγής σήματος). Στα μολυσμένα κύτταρα με HCMV, η pp28 παρευρίσκεται μαζί με άλλες ιικές γλυκοπρωτεΐνες σε δομικές περιοχές δίπλα στο πυρήνα που πιθανώς να είναι δομές συμπλέγματος Golgi που πιθανόν να αποτελεί και την θέση συνάθροισης τους [193-195]. Εκτός από την διαδικασία της μυριστοιλίωσης, απαραίτητη για την λειτουργικότητα της θεωρείται και η αμινοξική αλληλουχία 44 έως 59 [193, 196, 197]. Μεταλλάξεις που οδηγούν σε παραγωγή pp28-null [198] στελεχών HCMV, αποτυγχάνουν να κάνουν τον ιό μολυσματικό χωρίς να δημιουργούνται προβλήματα στο διπλασιασμό του ιικού DNA ή στην έκφραση των υπολοίπων γονιδίων [198]. Πράγματι, πειράματα έχουν δείξει ότι μόλυνση κυτταρικών σειρών με pp28-null, θα προκαλέσει κανονικά παραγωγή και εγκατάσταση των λοιπών άλλων ιικών πρωτεϊνών μέσα στο κυτταρόπλασμα, χωρίς όμως να υπάρχει δυνατότητα συγκρότησης τους σε οργανωμένα σωματίδια [198]. Φαίνεται επομένως ότι η pp28 απαιτείται για την τελική συγκρότηση των ιικών

σωματιδίων. Παρομοίως, μεταλλαγμένο στέλεχος που παράγει pp28 πρωτεΐνη με αδυναμία να υποστεί μυριστοιλίωση, επίσης αποτυγχάνει να παράγει ιικά σωματίδια [199].

Ωστόσο οι ιοί που εκφράζουν μόνο τα τελευταία 61 [197] ή κατ'άλλους 57 αμινοτελικά αμινοξέα [196] αντιγράφονται σχεδόν τόσο καλά όσο ο φυσικός (wild) τύπος του ιού, υποδεικνύοντας ότι μια μεγάλη περιοχή (~75%) του καρβοξυ-τελικού άκρου της πρωτεΐνης δεν είναι εντελώς απαραίτητη. Διαγραφή του καρβοξυτελικού άκρου κατά 50 αμινοξέα έχει ως αποτέλεσμα τη παραγωγή βιώσιμων ιών αλλά με σοβαρά ελαττώματα στην ανάπτυξή τους [197], ενώ αντίθετα διαγραφή του αμινοτελικού άκρου κατά 43 αμινοξέα καθιστά τον ιό μη βιώσιμο [196]. Η απάλειψη επίσης της αμινοξικής αλληλουχίας 44 έως και 59 οδηγεί στην αδυναμία μεταδοτικότητας του ιού.

Για αυτό το λόγο, οι μέχρι τώρα έρευνες αποδεικνύουν ότι η μεταφορά της pp28 στη περιοχή δίπλα στον πυρήνα είναι απαραίτητη για τη προαγωγή της μολυσματικότητας. Από την άλλη πάλι μεριά, πειράματα με μεταλλαγμένα pp28-null στελέχη δείχνουν ότι ναι μεν αυτά έχουν αδυναμία παραγωγής μολυσματικών σωματίων μέσα στο κύτταρο που μολύνουν, αλλά διαθέτουν εξαιρετική ικανότητα να εξαπλώνονται από το ένα κύτταρο στα γειτονικά τους [200]. Χρειάζεται επομένως αρκετές μελέτες ακόμα για να διαπιστωθεί με ποιόν τρόπο αποφεύγεται η εξουδετέρωση τους από το ανοσολογικό σύστημα.



Εικόνα 2.2 Οι πρωτεΐνες περιβλήματος που βοηθούν στην μεταφορά του γονιδιώματος του HCMV που βρίσκεται στο καψίδιο μέσα στον πυρήνα κατά τη διαδικασία εισόδου του ιού. (A): Σήματα τα οποία ενεργοποιούνται μέσω σύνδεσης υποδοχέων προκαλούν την κυτταρική αντιική ανταπόκριση αλλά ταυτόχρονα προετοιμάζουν τα κύτταρα για τα επακόλουθα γεγονότα. (B): Οι σχετιζόμενες με το καψίδιο πρωτεΐνες περιβλήματος UL47 και UL48 (και ίσως και η pp150) οδηγούν τα καψίδια μέσω μικροσωληνίσκων (MTs) προς το σύμπλεγμα των πυρηνικών πόρων. Διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες κίνησης όπως η δυνείνη επίσης βοηθούν σε αυτή τη μεταφορά. (C): Ένα άλλο υποσύνολο πρωτεϊνών περιβλήματος (όπως η pp65 και η pp71) μεταφέρονται στο πυρήνα ανεξάρτητα από τα καψίδια. (D): Τα καψίδια τελικά διαχωρίζονται από τους μικροσωληνίσκους προσδένονται στους πυρηνικούς πόρους και απελευθερώνουν το DNA μέσα στον πυρήνα [116]

2.2 ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΙ ΜΕ HCMV

2.2.1. HCMV ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗΣ ΛΥΚΟΣ

Ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (ΣΕΛ) είναι μια χρόνια αυτοάνοση νόσος που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή του συνδετικού ιστού και ετερογενείς κλινικές εκδηλώσεις, που κυμαίνονται από απλή δερματική βλάβη με συνοδά μυοσκελετικά ενοχλήματα μέχρι την προσβολή ζωτικών οργάνων όπως των νεφρών και/ή του

κεντρικού νευρικού συστήματος, η προσβολή των οποίων σχετίζεται συχνά με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα. Αν και τα ακριβή αίτια που προκαλούν τον ΣΕΛ δεν είναι πλήρως γνωστά και κατανοητά, πολλοί έχουν προτείνει ότι ο ΣΕΛ μπορεί να οφείλεται σε συνδυασμό γενετικής προδιάθεσης και περιβαλλοντικών παραγόντων (π.χ. έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, μόλυνση και άγχος, μολύνσεις με ιούς και μικρόβια κ.α.) [78, 201].

Όλοι οι ασθενείς με ΣΕΛ εμφανίζουν αναπόφευκτα ανωμαλίες στην κυτταρική σειρά των μονοκυττάρων, η οποία τελικά μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση πολυκλωνικών Β-κυττάρων, σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων, και παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Από αυτή την άποψη, η ιδιόμορφη ικανότητα του HCMV να μεταπίπτει σε λανθάνουσα μορφή ζωής και η περιοδική εναλλαγή μεταξύ του λυτικού και του λανθάνοντος σταδίου έχει συσχετισθεί με την παρεκκλίνουσα χυμική απόκριση στον ΣΕΛ. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι αυξημένος τίτλος anti-HCMV IgM/IgG αντισωμάτων τείνει να συσχετίζεται με κλινικές και ανοσολογικές εκδηλώσεις του ΣΕΛ [202]. Μελέτες που διαπίστωσαν συσχέτιση μεταξύ του HCMV και του ΣΕΛ πραγματοποιήθηκαν συχνά σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες [203, 204]. Επιπρόσθετα, διαφορές στον επιπολασμό της λοίμωξης από HCMV σε ασθενείς με ΣΕΛ αναφέρθηκαν από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες. Για παράδειγμα, οι Takizawa et al. [205] διαπίστωσαν ότι σχεδόν η πλειονότητα των ασθενών με κάποια ρευματική νόσο (149 από τους 151 ασθενείς) είχαν μολυνθεί από HCMV, ελέγχοντας την αντιγοναιμία της πρωτεΐνης pp65, μεταξύ των οποίων και οι 74 ασθενείς με ΣΕΛ ήταν θετικοί για μόλυνση από HCMV. Οι Newkirk et al. διαπίστωσαν ότι ο επιπολασμός της λοίμωξης από HCMV σε ασθενείς με ΣΕΛ ήταν 60% με τη χρήση kit ELISA για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων για τον HCMV [206]. Σε μια άλλη μελέτη και μετά την προσαρμογή για τον ρευματοειδή παράγοντα, οι Su et al. [207] διαπίστωσαν ότι 84 από τους 87 ασθενείς με ΣΕΛ (96,55%) είχαν HCMV IgG-

θετικότητα, ενώ μόνο οι εννέα (10,34%) ήταν HCMV IgM-θετικοί. Από την άλλη, αρκετές άλλες μελέτες δεν παρατήρησαν τέτοια άμεση συσχέτιση μεταξύ της θετικότητας για HCMV και του ΣΕΛ [208-210]. Για παράδειγμα, οι James et al. ανέφεραν ότι η λοίμωξη από HCMV δεν σχετίζεται με την παρουσία ή ανάπτυξη ΣΕΛ [210]. Συγκεντρωτικά, τα μέχρι τώρα πειραματικά δεδομένα δεν είναι αρκετά για να έχουμε πλήρη κατανόηση της σχέσης μεταξύ της λοίμωξης από HCMV και της ανάπτυξης ΣΕΛ, ούτε για να κατανοήσουμε πιθανές συσχετίσεις με ανοσιακές αποκρίσεις κατά ειδικών αντιγόνων.

Ένας πιθανός ρόλος του HCMV στην παθογένεση του ΣΕΛ προτάθηκε αρχικά από αρκετές ομάδες μετά τον εντοπισμό συγκεκριμένων αυτοαντιγόνων που άρχισαν να ανιχνεύονται στο αίμα ασθενών με ΣΕΛ μετά την μόλυνση από HCMV [206]. Η μοριακή μίμηση έχει περιγραφεί επίσης για ένα άλλο μέλος της οικογένειας των Herpesviridae, τον EBV, που επίσης μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεση του ΣΕΛ. Πράγματι, αντισώματα έναντι του πυρηνικού αντιγόνου 1 του EBV (EBNA1) μπορούν να αντιδράσουν με ανθρώπινες πρωτεΐνες όπως τις SmB και Ro60 [211]. Επιπρόσθετα ο HCMV μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι πυρηνικών πρωτεϊνών, όπως στην περίπτωση της πρωτεΐνης LA. Πιο ειδικά, ο HCMV μπορεί άμεσα ή έμμεσα, μέσω μοριακής μίμησης να προκαλέσει την έκφραση στην κυτταρική επιφάνεια αυτής της μικρής πυρηνικής ριβονουκλεοπρωτεΐνης, οδηγώντας έτσι στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων, πιθανότατα μόνο σε γενετικά προδιαθετιμένα άτομα [206]. Μεταγενέστερα από αυτή την παρατήρηση, ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες [212, 213] έδειξαν ότι η ανοσοποίηση προηγουμένως μη αυτοάνοσων ποντικών με πεπτίδια που περικλείουν τον επίτοπο 422-439 της pp65 του HCMV οδήγησαν στην εμφάνιση αυτοαντισωμάτων έναντι πυρηνικών συστατικών ενώ προκλήθηκε και νεφρική βλάβη που ομοιάζει με αυτή στον ανθρώπινο ΣΕΛ. Είναι σημαντικό ότι βρέθηκαν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων anti-

pp65⁴²²⁻⁴³⁹ στον ορό ασθενών με ΣΕΛ, υποδηλώνοντας ότι η pp65 εμπεριέχει επίτοπο(ους) Β-κυττάρου που θα μπορούσαν να προκαλέσουν αυτοάνοσια σε άτομα με γενετική προδιάθεση [212]. Οι ίδιοι συγγραφείς αποκάλυψαν ομολογία αλληλουχίας αμινοξέων μεταξύ του HCMV pp65⁴²²⁻⁴³⁹ και της πρωτεΐνης TAF9¹³⁴⁻¹⁴⁴ (TATA-box πρωτεΐνη δέσμησης που σχετίζεται με τον παράγοντα 9) και εν συνεχεία ανίχνευσαν την παρουσία ειδικών αντισωμάτων εναντίον αυτών των επιτόπων σε συνδυασμό με ANA και anti-dsDNA αντισώματα, που τυπικά ανευρίσκονται σε ασθενείς με ΣΕΛ, παράλληλα με τα αυξημένα αντισώματα anti-TAF9 σε ορούς από ασθενείς με ΣΕΛ [213].

Πιο πρόσφατα, οι Neo et al. περιέγραψαν μια πιθανή εναλλακτική διαδικασία στην οποία εμπλέκεται η ιική πρωτεΐνη UL44, μια φωσφοπρωτεΐνη που δεσμεύει το DNA, και θεωρείται απαραίτητη για την αντιγραφή του DNA του HCMV [214]. Η αρχική παρατήρηση ήταν ότι μετά τη μετατόπιση του στον πυρήνα, η UL44 αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες τόσο του ιού όσο και του ξενιστή, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα αντιγραφής του DNA του ιού. Αυτό οδήγησε τους συγγραφείς να υποθέσουν ότι η καθυστερημένη κάθαρση των αποπτωτικών κυτταρικών υλικών σε άτομα με γενετική προδιάθεση μπορεί να ευνοούν την παρουσίαση ενδοκυτταρικών αυτο-αντιγόνων στη χυμική ανοσία. Έτσι κατάφεραν και πειραματικά να αναδείξουν την ύπαρξη ανθρώπινου αντισώματος UL44 από τους ορούς οροθετικών ασθενών με SLE/HCMV IgG, δείχνοντας ότι θα μπορούσαμε να έχουμε την δημιουργία ενός συμπλέγματος μεταξύ UL44 με εντοπισμένα στην κυτταρική επιφάνεια αυτοαντιγόνα ΣΕΛ κατά τη διάρκεια της απόπτωσης που προκαλείται από τον ιό. Έτσι, με βάση αυτά τα ευρήματα, είναι κατανοητό πως ο HCMV μπορεί να πυροδοτήσει και/ή να ενισχύσει τη χυμική ανοσιακή απόκριση του ξενιστή σε πυρηνικά αυτο-αντιγόνα, προδιαθέτοντας μολυσμένα άτομα με HCMV για κλινική εκδήλωση ΣΕΛ.

Μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος (GWAS) έχουν εντοπίσει πάνω από 50 γονιδιακές θέσεις προδιαθετικές για ΣΕΛ στον γενικό πληθυσμό (αφορούν κυρίως γονιδιακές ρυθμιστικές περιοχές) [211]. Ως εκ τούτου, είναι εξαιρετικού ερευνητικού ενδιαφέροντος να μελετήσει κανείς τη σχέση μεταξύ γενετικής ευαισθησίας και ιογενών λοιμώξεων στην ανάπτυξη του ΣΕΛ. Για παράδειγμα, οι Harley και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι τα γενετικά προϊόντα του EBV χρησιμεύουν ως μεταγραφικοί παράγοντες και έχουν προτίμηση αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένους γονιδιακούς τόπους [211]. Ωστόσο, κατά πόσο κάποια από τις πρωτεΐνες του HCMV δεσμεύει κατά προτίμηση τους συγκεκριμένους επίτοπους του ΣΕΛ είναι ένα ερώτημα που παραμένει αναπάντητο.

Επιπρόσθετα, από κλινικής απόψεως, η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος είναι γνωστό από παλιά ότι αυξάνει τον κίνδυνο μόλυνσης μεταξύ των ασθενών με ΣΕΛ, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 50% των αιτιών νοσηλείας ασθενών με ΣΕΛ [215], υποδηλώνοντας ότι δια βίου η ανοσοκαταστολή ενός ατόμου, όπως συμβαίνει συχνά στους ασθενείς με ΣΕΛ, μπορεί να ευνοήσει την επανενεργοποίηση του HCMV [216]. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε αργότερα από τα ευρήματα μιας 26ετούς αναδρομικής μελέτης που έδειξε ότι οι λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που προκαλούνται από τον HCMV, ήταν μεταξύ των τριών κορυφαίων αιτιών θανάτου σε ασθενείς με ΣΕΛ [217], εγείροντας το σημαντικό ερώτημα ποιοι είναι οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την εμφάνιση λοίμωξης από HCMV σε ασθενείς με ΣΕΛ. Αυτή η ερώτηση απαντήθηκε πρόσφατα από μια συστηματική ανασκόπηση [218] που προσδιορίζει τα ακόλουθα ως βασικούς παράγοντες κινδύνου: (i) το υψηλό ιικό φορτίο, το οποίο μαζί με αυξημένα επίπεδα αντιγοναιμίας του HCMV συσχετίζεται με την ανάπτυξη απειλητικής για τη ζωή βλάβης των ζωτικών οργάνων. (ii) λεμφοπενία, με αποτέλεσμα την αποτυχία δημιουργίας μιας κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης

ξενιστή έναντι του HCMV και (iii) Είδος της θεραπείας, η εξέλιξη της νόσου του HCMV συσχετίζεται με υψηλότερες δόσεις κορτικοστεροειδών και/ή ανοσοκατασταλτικών [219]. Η λοίμωξη από HCMV είναι επίσης γνωστό ότι πυροδοτεί εξάρσεις ΣΕΛ μέσω άμεσων κυτταροπαθητικών επιδράσεων και/ή ενεργοποίηση φλεγμονωδών διεργασιών, προκαλώντας έτσι τόσο συστηματικές όσο και οργανοειδικές νόσους. Τέλος, και η ίδια η κλινική εκδήλωση μιας HCMV λοίμωξης μιμείται εν πολλοίς την εικόνα εξάρσης του ΣΕΛ, περιπλέκοντας ακόμα περαιτέρω την κλινική εικόνα των ασθενών με ΣΕΛ.

2.2.2 HCMV ΚΑΙ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

Παρά τον ολοένα και αυξανόμενο όγκο πειραματικών δεδομένων, η ύπαρξη ενός βασικού λειτουργικού ρόλου του HCMV στην παθογένεση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (ΡΑ) δεν έχει ακόμη αποδειχθεί λόγω αμφιλεγόμενων ευρημάτων, σε αντίθεση ίσως με την συσχέτιση μεταξύ EBV και ΡΑ. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα μηχανισμού μοριακής μίμησης μεταξύ EBV και αυτο-αντιγόνων που σχετίζονται με την ΡΑ, όπως πολυμορφισμοί HLA-DRB1, ανθρώπινη ιντερλευκίνη IL-10 και υποδοχείς χημειοκίνης CXCR [220]. Ενώ ορισμένες πρώιμες μελέτες βρήκαν υψηλό επιπολασμό HCMV σε ασθενείς με ΡΑ [204, 221], άλλες δεν μπόρεσαν να αποδείξουν σαφή συσχέτιση μεταξύ HCMV και ΡΑ [222-225]. Προς υποστήριξη του παθογενετικού ρόλου του HCMV στη ΡΑ, ορισμένοι συγγραφείς έχουν αναφέρει πιο πρόσφατα την παρουσία αντιγράφων του HCMV σε αρθρικό υγρό από ασθενείς με ΡΑ, η οποία και συσχετίσθηκε με αυξημένη βαρύτητα της νόσου, αναφέροντας συγχρόνως και υψηλότερη επίπτωση λοίμωξης από HCMV σε ασθενείς με ΡΑ από ό,τι πιστεύαμε προηγουμένως [226]. Ωστόσο, το γεγονός ότι η ανοσοκατασταλτική θεραπεία μπορεί να οδηγήσει σε επανενεργοποίηση του HCMV δεν μπορεί να επιτρέψει τη λήψη οριστικών συμπερασμάτων σχετικά με το εάν ο HCMV μπορεί να εμπλέκεται στην έναρξη της ΡΑ ή στην έξαρση της νόσου.

Αντισώματα που απομονώθηκαν από ασθενείς με ΡΑ φαίνεται ότι στρέφονται έναντι κιτρολινιωμένων πρωτεϊνών (anti-κιτρολινιωμένα πεπτιδικά αντισώματα, ACPAs) καθώς και έναντι ανοσοσφαιρινών IgG (ρευματοειδής παράγοντας, RF) [227]. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτά τα αυτοαντισώματα βρέθηκαν να υπάρχουν ήδη σε μια υποομάδα ασθενών με ΡΑ πολλά χρόνια πριν από την έναρξη της νόσου και θα μπορούσε να λειτουργήσουν ως ένας προβλεπτικός δείκτης για ανάπτυξη της νόσου [228, 229].

Η κιτρολίνη είναι μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση που καταλύεται από μια οικογένεια απαμινασών πεπτιδυλαργινίνης (PADs) που μετατρέπουν την πεπτιδυλαργινίνη σε πεπτιδυλοκιτρολίνη, της οποίας η παρεκκλίνουσα απορρύθμιση έχει συνδεθεί με διάφορες φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως οι αυτοάνοσες νόσοι, ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες [230-234]. Η θεωρία ότι η κιτρολίωση εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια της ΡΑ έχει υποστηριχθεί από διάφορες σειρές πειραματικών δεδομένων [235-238], αλλά οι μηχανισμοί που πυροδοτούν την κιτρολίωση και, ως εκ τούτου, ξεκινούν την ανάπτυξη ΡΑ είναι υπό μελέτη. Είναι ενδιαφέρον ότι πολλοί γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν συσχετιστεί με την παθογένεια ΡΑ, ειδικά μεταξύ ACPA θετικών ασθενών. Σύμφωνα με το λεγόμενο μοντέλο των «δύο χτύπημάτων», σε άτομα με γενετική προδιάθεση, το πρώτο χτύπημα αναπαρίσταται από περιβαλλοντικούς παράγοντες ενεργοποίησης, όπως το κάπνισμα ή η μόλυνση, που προκαλούν κιτρολίωση πεπτιδίων που παρουσιάζονται διαδοχικά σε αυτοαντιδραστικά Τ-κύτταρα, οδηγώντας στη δημιουργία αντισωμάτων έναντι anti-κιτρολινιωμένων πεπτιδίων υψηλής συγγένειας δέσμησης. Αυτά τα γεγονότα πιστεύεται ότι συμβαίνουν χρόνια πριν από την εμφάνιση της νόσου. Κατά το δεύτερο χτύπημα, η περαιτέρω κιτρολίωση μαζί με τα προϋπάρχοντα ACPA οδηγούν στην ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονής λόγω επίμονου σχηματισμού

ανοσοσυμπλεγμάτων ή/και ενεργοποίηση αυτοδραστικών λεμφοκυτταρικών πληθυσμών [239]. Είναι ενδιαφέρον ότι ανεξάρτητες ομάδες [240-242] έχουν δείξει ότι η κιτρολίωση των πρωτεϊνών του EBV μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση νεοεπιτόπων που αναγνωρίζονται από τα ACPA που απομονώθηκαν από ασθενείς με PA, υποδεικνύοντας ότι τα ACPA μπορούν πράγματι να αντιδράσουν με μια ιική απαμινωμένη πρωτεΐνη. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι οι ερπητοϊοί, όπως ο EBV, είναι παθογόνα που συμβάλλουν στην εμφάνιση και/ή την ανάπτυξη της PA. Λόγω έλλειψης άμεσων στοιχείων όμως δεν μπορεί να διατυπωθεί παρόμοιος ισχυρισμός για τον HCMV. Από αυτή την άποψη, θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν οι ιογενείς λοιμώξεις εμπλέκονται άμεσα στην ενεργοποίηση της PAD και εάν η επακόλουθη κιτρολίωση των κυτταρικών και/ή ιικών πρωτεϊνών είναι απορυθμισμένη σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. Πολύ πρόσφατα, οι Casanova et al. [243] έχουν αναφέρει κιτρολίωση της ανθρώπινης καθελικιδίνης LL37, ένα αμυντικό πεπτιδίο έναντι ξενιστή, σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα μολυσμένα με ανθρώπινο ρινοϊό (HRV), που επηρέασε αρνητικά την αντιμικροβιακή και αντιική δράση αυτού του πεπτιδίου, υποδηλώνοντας ότι η κιτρολίωση μπορεί να συνιστά μηχανισμό ιικής ανοσοδιαφυγής.

Από την άλλη πλευρά, μια ανοσολογική απόκριση έναντι του λανθάνοντα HCMV έχει αποδειχθεί ότι παίζει κρίσιμο ρόλο στην εξέλιξη της φλεγμονής και της δομικής βλάβης των αρθρώσεων σε ασθενείς με PA [244]. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι οι ασθενείς με PA τείνουν να εμφανίζουν σχετικά μεγάλη ανάπτυξη ενός συγκεκριμένου υποσυνόλου T-κυττάρων CD4+ χωρίς το συνδιεγερτικό μόριο CD28, που απαιτείται για την ενεργοποίηση και την επιβίωση των T-κυττάρων [245, 246]. Παραδόξως, ο ρυθμός συχνότητας αυτής της κλωνικής επέκτασης, που σπάνια υπερβαίνει το 1% στους ηλικιωμένους, αρκετά συχνά φτάνει σε τιμές μεταξύ 5% και 10% σε ασθενείς με PA, και η παρουσία του σχετίζεται με εξωαρθρικές εκδηλώσεις,

όπως πρώιμη αθηροσκληρωτική βλάβη των αγγείων [247], πιθανώς λόγω της ικανότητας των CD4+CD28 - T-κυττάρων να ασκούν κυτταροτοξική δράση και να επιτίθενται άμεσα στο αγγειακό ιστό [248]. Καθώς συσχετίζονται με τη σοβαρότητα της νόσου και την έκταση της εξωαρθρικής συμμετοχής, η συχνότητα των CD4+CD28- T-κυττάρων στη PA έχει προταθεί να είναι προβλεπτικός παράγοντας στην πρόβλεψη μελλοντικών οξέων στεφανιαίων συμβαμάτων. Περιέργως, η λοίμωξη από HCMV είναι ένας σημαντικός παράγοντας πρόκλησης της επέκτασης των CD4+CD28- T-κυττάρων [249]. Το γεγονός ότι αυτά τα T-κύτταρα βρίσκονται μόνο σε HCMV θετικούς ασθενείς με PA και ανταποκρίνονται στη διέγερση με αντιγόνα του HCMV *in vitro* υποδηλώνει ότι η λοίμωξη από HCMV πιθανώς συμβάλλει στην αύξηση της φλεγμονής και στην επιδείνωση της PA επιταχύνοντας επιπλέον εκδηλώσεις, όπως την στεφανιαία βλάβη. Η ανίχνευση των CD4+CD28- T-κυττάρων σε άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως ψωριασική αρθρίτιδα, σκλήρυνση κατά πλάκας, φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου (IBDs), καρδιαγγειακές παθήσεις, χρόνια απόρριψη, αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα και κοκκιωμάτωση Wegener's, οδήγησε στην υπόθεση ότι ο HCMV μπορεί να προκαλέσει επαγωγή CD4+CD28-T-κυττάρων και αυτός μπορεί να είναι ένας κοινός μηχανισμός των αυτοανόσων νοσημάτων [249-251]. Τελικώς, τα CD4+CD28 -T-κύτταρα μπορεί να ανταποκρίνονται σε αυτοαντιγόνα του αρθρικού υμένα και να επάγουν παραγωγή κυτταροτοξικών μορίων ή να ενεργοποιήσουν τα μακροφάγα για να απελευθερώσουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες που οδηγούν στην διάβρωση του χόνδρου [252]. Όπως ήδη αναφέρθηκε, HCMV ειδικά αντιγόνα και σωματίδια μολυσματικού ιού έχουν ανιχνευθεί σε αρθρικό ιστό και υγρό στις αρθρώσεις, σε ποσοστό 10% έως 50% των ασθενών με PA [253-256]. Είναι ενδιαφέρον να τονιστεί ότι ο HCMV έχει συσχετιστεί με σημαντικά αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου και σε ασθενείς χωρίς PA [257-259], κάτι που δεν αποτελεί και τόσο μεγάλη έκπληξη

υπό το φως των αυξανόμενων πειραματικών δεδομένων που υποστηρίζουν την ικανότητα του HCMV να επηρεάζει τον μεταβολισμό του κυττάρου ξενιστή για να ευνοήσει την ανάπτυξη του ιού [260].

Η αυξημένη δραστηριότητα της νόσου της PA σε άτομα οροθετικά για HCMV μπορεί επίσης να συνδέεται και με την επέκταση ενός άλλου ειδικού υποσυνόλου CD8+ T-κυττάρων, το οποίο κατά προτίμηση εκφράζει τον ανασταλτικό υποδοχέα LIR-1 των NK κυττάρων και ασκεί σημαντική κυτταρολυτική δράση [261]. Πράγματι η έκφραση του LIR-1 στα CD8+ T-κύτταρα επάγεται προς τα πάνω μετά από μόλυνση από HCMV [262] και έχει ως αποτέλεσμα τον μειωμένο πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων [263]. Το LIR-1 θεωρείται επίσης δείκτης πρόωρης ανοσιακής γήρανσης, καθώς η προς τα άνω ρύθμισή του μπορεί να περιορίσει τη βλάβη των ιστών που διαφορετικά προκαλείται από επίμονη ανοσοαπόκριση έναντι του HCMV [264].

Συμπερασματικά, τα περισσότερα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι ο HCMV μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη της PA ή την επιδείνωση και/ή επιτάχυνση της σοβαρότητας της νόσου, ιδιαίτερα σε ασθενείς με αγγειακές εκδηλώσεις. Ωστόσο, υπάρχει διαφωνία σχετικά με το εάν η μόλυνση από HCMV είναι ένα σημαντικό παθογενετικό εναρκτήριο γεγονός ή απλώς ένα επιφανόμενο.

2.2.3 HCMV ΚΑΙ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ

Η σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣκΠ) είναι μια χρόνια αυτοάνοση φλεγμονώδης νόσος που επηρεάζει το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) που χαρακτηρίζεται από την καταστροφή της νευραξονικής μυελίνης. Επηρεάζει κυρίως νεαρούς ενήλικες, με υψηλότερο επιπολασμό στις γυναίκες, που συχνά οδηγεί σε μη τραυματικές νευρολογικές αναπηρίες. Η προοδευτική επιδείνωση των κινητικών, αισθητηριακών και γνωστικών λειτουργιών χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένους ιστοπαθολογικούς δείκτες, όπως η απομυελίνωση, η διήθηση λευκοκυττάρων, ο νευροεκφυλισμός και η

αντιδραστική γλοιώση του ΚΝΣ [265]. Αν και η ακριβής αιτιολογία της ΣκΠ δεν είναι ακόμη σαφής, πιστεύεται ότι εμφανίζεται σε γενετικά ευπαθή άτομα μετά από αλληλεπίδραση με έναν ή περισσότερους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οι πιο συνηθισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου είναι η έκθεση στο ηλιακό φως, τα επίπεδα βιταμίνης D, το τσιγάρο και μολυσματικοί παράγοντες [266]. Συγκεκριμένα, αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει σημαντική συσχέτιση των λοιμώξεων από τον ιό του έρπητα με την παθογένεια της ΣκΠ. Ανάμεσα στους ερπητοϊούς, ο EBV, που μολύνει περίπου το 95% του παγκόσμιου ενήλικου πληθυσμού, έχει συχνά προταθεί ως ο κύριος υποψήφιος παράγοντας ανάπτυξης της νόσου [267, 268]. Αν και δεν έχουν υπάρξει άλλα παθογόνα που να έχουν τόσο ισχυρά συσχετισθεί πειραματικά με την ΣκΠ όσο ο EBV, εντούτοις υπάρχουν αρκετές μελέτες που έχουν εξετάσει την πιθανότητα υπάρξης συσχέτισης μεταξύ ΣκΠ και της μόλυνσης με άλλους ερπητοϊούς, ιδιαίτερα τον HCMV. Μια από τις ιδιαιτερότητες του HCMV είναι ότι μπορεί να δημιουργήσει μόνιμη λανθάνουσα λοίμωξη της οποίας ο επιπολασμός φαίνεται να σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με την κοινωνικοοικονομική κατάσταση του κάθε πληθυσμού — σε πλήρη ταύτιση με την λεγόμενη «υπόθεση υγιεινής», σύμφωνα με την οποία η συσχέτιση μεταξύ HCMV και MS μπορεί να συνδέεται έμμεσα με έκθεση και σε άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες [269]. Σε αντίθεση με αυτή την υπόθεση, άλλοι ερευνητές έχουν προτείνει ότι η ανοσοπαθολογία της ΣκΠ μπορεί στην πραγματικότητα να επηρεαστεί από τον HCMV, υπό την έννοια ότι η επίδραση αυτού του τελευταίου στο ανοσοποιητικό σύστημα τελικά παρεμβαίνει και στην ανοσολογική απόκριση του ξενιστή απέναντι και σε άλλα παθογόνα [270].

Όσον αφορά τις μοριακές αποδείξεις που υποστηρίζουν την ύπαρξη σχέσης μεταξύ ΣκΠ και HCMV λοίμωξης, μελέτες βρήκαν υψηλότερα φορτία HCMV DNA σε μια ομάδα ασθενών με ΣκΠ σε σύγκριση με τους υγιείς που χρησιμοποιήθηκαν ως

ομάδα ελέγχου [271, 272]. Επιπλέον, βρέθηκε θετικότητα anti-HCMV αντισωμάτων IgG σχεδόν στο 80% των ασθενών με ΣΚΠ που εξετάστηκαν. Ωστόσο, το γεγονός ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση anti-HCMV αντισωμάτων μεταξύ ασθενών με ΣκΠ και της ομάδας ελέγχου, οδήγησαν τους συγγραφείς στο συμπέρασμα ότι η παρουσία αυτών των αντισωμάτων από μόνη της δεν ήταν σημαντικός δείκτης για την ανάπτυξη ΣκΠ. Τέλος, η υπόθεση ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης ΣκΠ αυξάνεται λόγω συστηματικής λοίμωξης από HCMV υποστηρίζεται επίσης από ορισμένες μεμονωμένες περιπτώσεις ασθενών με ΣκΠ όπου η ευκαιριακή επανενεργοποίηση της HCMV λοίμωξης έχει συνδεθεί με επιδείνωση της προϋπάρχουσας κλινικής εικόνας ατόμου με ΣκΠ [273, 274].

Αντίθετα, άλλες μελέτες έχουν δείξει αρνητική συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης ΣκΠ και της οροθετικότητας του HCMV [269, 270], αν και οι σκεπτικιστές υποστηρίζουν ότι αυτό μπορεί να μην είναι το αποτέλεσμα μιας άμεσης προστατευτικής δράσης αλλά απλώς ενός επιφανομένου που σχετίζεται με την υιοθέτηση ενός δυτικού τρόπου ζωής ή σε πρώιμες ιογενείς λοιμώξεις. Από αυτή την άποψη, οι Alari-Pahissa et al [269] διεξήγαγαν μια μελέτη με στόχο να προσδιορίσουν εάν το ορολογικό προφίλ έναντι του HCMV στους πρώιμους ασθενείς με ΣκΠ ήταν διαφορετικό από αυτό που παρατηρήθηκε σε μη πρώιμους ασθενείς με ΣκΠ, και ιδιαίτερα εξετάζοντας την πιθανή συσχέτιση αυτού του ιού με την κλινική πορεία της νόσου και τη χυμική ανοσολογική απόκριση έναντι άλλων ερπητοϊών. Το τελικό συμπέρασμα στο οποίο κατέληξαν ήταν ότι ο HCMV αύξησε όχι μόνο την παραγωγή υπερφλεγμονωδών κυτοκινών (π.χ., TNF- και IFN-) αλλά και την εξαρτώμενη από αντισώματα κυτταροτοξικότητα διαμεσολαβούμενη από NKs, μια δραστηριότητα που είναι γνωστό ότι επηρεάζει την ανοσιακή απόκριση του ξενιστή έναντι και άλλων παθογόνων [275, 276]. Δεδομένου ότι τα επίπεδα αντισωμάτων anti-EBNA-1 είχαν προηγουμένως αποδειχθεί ότι συσχετίζονται άμεσα με την

αυξημένη δραστηριότητα της νόσου της ΣκΠ [277], οι συγγραφείς διερωτήθηκαν επιπλέον ένα θα μπορούσε να υπάρχει μια σαφής συσχέτιση μεταξύ μιας συγκεκριμένης χυμικής απόκρισης σε ασθενείς με ΣκΠ και της θετικότητας έναντι HCMV. Είναι ενδιαφέρουσα η παρατήρηση τους ότι υπήρξε μείωση του δείκτη EBNA-1 στη διάρκεια της νόσου σε ασθενείς με ΣκΠ και λοίμωξη από HCMV, ηλικίας 40 ετών ή μικρότερης [270, 278]. Επιπλέον, οι ίδιοι ασθενείς εμφάνισαν αυξημένο ποσοστό T-κύτταρων τελικής διαφοροποίησης. Έτσι, συνολικά, τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα άτομα με ΣκΠ που γίνονται οροθετικά για HCMV όσο πιο κοντά στην έναρξη της νόσου, τείνουν να αναπτύξουν μια φλεγμονώδη διαδικασία που περιλαμβάνει ανάπτυξη μιας ομάδας πλήρως διαφοροποιημένων T-κυττάρων σε σχέση με τα HCMV οροαρνητικά άτομα. Υπό αυτό το πρίσμα, η επιμονή μιας HCMV λοίμωξης μπορεί να εκτρέψει το ανοσολογικό σύστημα με τελικό αποτέλεσμα την μείωση του κινδύνου εμφάνισης αυτοανοσίας, οδηγώντας τελικά στην υπόθεση ότι μπορεί να δράσει προστατευτικά στην ανάπτυξη ΣκΠ. Μια πολύ πρόσφατη μελέτη έχει καταγράψει αρκετά χαμηλότερα ποσοστά οροεπιπολασμού anti-HCMV IgG σε ασθενείς με ΣκΠ—είτε νεότερους ή άνω των 40 ετών—σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες της ομάδας ελέγχου [278]. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτοί οι ασθενείς είχαν υποτροπιάζουσα μορφή ΣκΠ και δεν είχαν υποβληθεί σε θεραπείες με στεροειδή ή τροποποιητική της ασθένειας αγωγή τη στιγμή της δειγματοληψίας. Συνολικά, αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι, σε ασθενείς με ΣκΠ, η λοίμωξη από HCMV όχι μόνο ρυθμίζει την ανοσολογική απόκριση μειώνοντας τη σοβαρότητα της νόσου, αλλά μπορεί επίσης να επηρεάσει την απόκριση έναντι και της μόλυνσης από EBV.

Μια άλλη πρόσφατη μελέτη εξέτασε την πιθανότητα ο HCMV να προκαλέσει αλλαγές στα περιφερικά B-κύτταρα των ασθενών με ΣκΠ. Τόσο ο φαινότυπος όσο και η λειτουργικότητα των B-κυττάρων φαίνεται να επηρεάζεται από τη μόλυνση με HCMV, προάγοντας τα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης στην υποτροπιάζουσα-

διαλείπουσα μορφή ΣκΠ (RRMS) και της μείωσης του παραγόμενου προφίλ προφλεγμονωδών κυτταροκινών σε ασθενείς με προχωρημένη ΣκΠ. Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συνηγορούν υπέρ της υπόθεσης ότι η μόλυνση από HCMV ρυθμίζει την κατανομή των Β-κυττάρων και την παραγωγή IFN-β σε ασθενείς με ΣκΠ. Επιπλέον, υποδεικνύουν ότι η μόλυνση από HCMV σχετίζεται με μειωμένο προφίλ υπερφλεγμονωδών κυτταροκινών στην προϊούσα μορφή της ΣΚΠ, παρέχοντας έτσι πιθανά παθογενετικά μοντέλα σχετικά με την υποτιθέμενη προστατευτική δράση του HCMV στη νόσο [279].

Συμπερασματικά, πιθανοί συσχετισμοί μεταξύ της λοίμωξης από HCMV και της ανάπτυξης και εξέλιξης της ΣκΠ φαίνεται να υπάρχουν, και αξίζουν επομένως περαιτέρω ερευνητικής προσοχής. Αν και επί του παρόντος είναι δύσκολο να πούμε με βεβαιότητα εάν ο HCMV ασκεί ευεργετική ή επιβλαβή επίδραση στη ΣκΠ, τα τελευταία ευρήματα φαίνεται να συμφωνούν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ λοίμωξης από HCMV και μικρότερης ευαισθησίας στη σκλήρυνση κατά πλάκας.

2.2.5 HCMV ΚΑΙ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 1

Ο διαβήτης τύπου 1 (type 1 diabetes, T1D) είναι μια χρόνια ασθένεια, που χαρακτηρίζεται από την καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος, με αποτέλεσμα την ανεπάρκεια παραγωγής ινσουλίνης. Αυτοάνοσες διεργασίες που προκαλούνται από ιούς και άλλες λοιμώξεις σε συνδυασμό με γενετική προδιάθεση καθώς και περιβαλλοντικοί παράγοντες εμπλέκονται στη παθογένεια του T1D [237, 280].

Πειραματικές μελέτες από διάφορες ομάδες σχετικά με την πιθανή αιτιοπαθογενετική εμπλοκή του HCMV στην παθογένεια της T1D έδωσαν αμφιλεγόμενα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, δύο ανεξάρτητες φινλανδικές μελέτες δεν έδειξαν συσχέτιση μεταξύ HCMV και εμφάνισης T1D σε μικρά παιδιά [281, 282].

Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν μια Σουηδική προοπτική μελέτη σχετικά με τον επιπολασμό T1D σε βρέφη που μολύνθηκαν συγγενώς από HCMV [283]]. Αντίθετα, άλλες μελέτες δείχνουν μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας-ανίχνευσης γενετικού υλικού του HCMV σε PBMCs ασθενών με T1D από τον Καναδά και της παρουσίας αυτοαντισωμάτων έναντι νησιδίων του παγκρέατος [284] καθώς και περιπτώσεις παιδιών με περιγεννητική λοίμωξη από HCMV, το οποίο ανέπτυξε T1D σε ηλικία 13 μηνών [285]. Εκτός από τον HCMV και ο EBV έχει επίσης προταθεί ότι σχετίζεται με την ανάπτυξη T1D [286]. Μια πιο πρόσφατη εργασία που μελέτησε τη σχέση μεταξύ HCMV και EBV με T1D αποκάλυψε υψηλότερο ποσοστό IgM έναντι του HCMV και του EBV σε ασθενείς με T1D σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου [287]. Αυτές οι μελέτες συλλογικά πρότειναν ότι ο HCMV, καθώς και ο EBV, θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει μάλλον έναν συμπαράγοντα, και όχι έναν βασικό σημαντικό παράγοντα, στην ανάπτυξη του T1D. Επιπρόσθετα, ο HCMV θεωρείται επίσης γενικά ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για πρώιμο στάδιο ανάπτυξης σακχαρώδους διαβήτη μετά τη μεταμόσχευση (PTDM), που υποστηρίζεται από την πειραματική παρατήρηση ικανότητας να προκαλεί ανοσολογική βλάβη στα παγκρεατικά κύτταρα [288].

2.2.6 HCMV ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΥΡΗΣΗ

Μεταξύ των μολυσματικών παραγόντων, οι ερπητοϊοί έχουν προταθεί ως αιτιολογικοί παράγοντες για την ανοσοπαθογένεια της νόσου [289, 290]. Πράγματι, αντισώματα κατά του HCMV και του EBV ανιχνεύονται πιο συχνά σε ασθενείς με SSc παρά σε υγιείς μάρτυρες [291, 292]. Ο HCMV πιθανόν να παίζει κάποιο ρόλο στη παθογένεια της ΣΣκ, λόγω της ικανότητας να μολύνει τα επιθηλιακά/ενδοθηλιακά και τα μονοκύτταρα/μακροφάγα κύτταρα, να αυξάνει τις ινογενείς κυτοκίνες και να απορυθμίζει το ανοσοποιητικό σύστημα [293, 294]. Ο HCMV προτάθηκε ως αιτία

πρόκλησης της ΣΣκ μετά από κάποια περιστατικά εμφάνισης ΣΣκ αμέσως μετά από μόλυνση των ασθενών από τον ιό [295].

Η στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ λοίμωξης από HCMV σε ασθενείς με SSc σε μια μελέτη στην Ελβετία (59% οροθετικότητα σε ασθενείς με SSc σε σύγκριση με το ποσοστό του 12-21% στην ομάδα ελέγχου) [222] δεν έχει διαπιστωθεί εκ νέου σε μεταγενέστερες μελέτες [292, 296], παρόλο που οι συγκεντρώσεις αντισωμάτων έναντι του HCMV είναι γενικά υψηλότερες σε ασθενείς με ΣΣκ σε σχέση με υγιείς μάρτυρες [293]. Υπό αυτό το πρίσμα, μελλοντικές μελέτες χρειάζονται για να διευκρινήσουν πως μπορεί ένας υψηλού επιπολασμού ιός όπως ο HCMV να προκαλεί μια αυτοδραστική απόκριση μόνο σε ορισμένα άτομα, ενώ σε άλλα να μην έχει κανένα αποτέλεσμα. Ο HCMV μπορεί να διατηρήσει μια ικανότητα ενεργού, επίμονου πολλαπλασιασμού για όλη τη διάρκεια ζωής του σε έναν άτομο-ξενιστή με ανοσοανεπάρκεια, ιδιαίτερα χάρη στον τροπισμό του στα μακροφάγα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα [297].

Ξεκινώντας από την παρατήρηση ότι τα αντισώματα HCMV επικρατούν σε ασθενείς με ΣΣκ [222] και ότι η ιική πρωτεΐνη UL70 μπορεί να αναγνωριστεί από το αντίσωμα κατά της τοποϊσομεράσης I, οι Lunardi et al. ήταν οι πρώτοι που πρότειναν έναν νέο μηχανισμό παθογένεσης της ΣΣκ με πιθανή κινητήρια δύναμη τον HCMV. Σύμφωνα με τους ερευνητές, τα αυτοαντισώματα αντιτοποϊσομεράση I (Scl-70) μπορούν να αλληλεπιδράσουν, μέσω διασταυρούμενης αντίδρασης με μια παρόμοια πεπτιδική αλληλουχία της πρωτεΐνης UL70 του HCMV [298]. Ο προτεινόμενος μηχανισμός είναι αυτός της γνωστής σε όλους μοριακής μίμησης και αφορά σε πρωτεΐνες του HCMV και της κυτταρικής πρωτεΐνης NAG-2 που εκφράζεται σε επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες, δημιουργώντας έναν «φαινότυπο που μοιάζει με σκληρόδερμα» που πιθανώς να συνδέεται με την παθογένεια της ΣΣκ [299].

Σε γενικές όμως γραμμές δεν υπάρχουν σαφή βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τον ρόλο των διαφόρων ιικών πρωτεϊνών του HCMV στην παθογένεια της ΣΣκ, και κατά πόσο η αντιδραστικότητα έναντι των αντιγόνων αυτών μπορεί να σχετίζεται με συγκεκριμένες μορφές ή κλινικές εκδηλώσεις της νόσου.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα διατριβή σκοπεύει να μελετήσει την αντιγονοειδική χυμική απόκριση κατά των κύριων και δευτερευόντων ιικών αντιγόνων του HCMV στην ΣΣκ και να την συσχετίσει με δημογραφικές, κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους συμπεριλαμβανομένων και των ειδικών για την νόσο αυτοαντισωμάτων.

3.1 ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι κυριότερες πειραματικές τεχνικές που χρησιμοποιήσαμε ήταν η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Western blot) για τον προσδιορισμό αντισωμάτων έναντι διάφορων αντιγόνων των ιών καθώς και η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού και της ανοσοτύπωσης γραμμής (lineblot immunoassay) για τον προσδιορισμό των αυτοαντισωμάτων που χαρακτηρίζουν τους ασθενείς με Συστηματική Σκλήρυνση.

3.2 ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Χρησιμοποιούμε έτοιμα εμπορικά κιτ της εταιρίας INOVA. Το κιτ περιέχει αντικειμενοφόρο πλάκα 12 θέσεων, η οποία αποτελείται από ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα (HEp-2) για τον προσδιορισμό αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA), ρυθμιστικό διάλυμα PBS (φωσφορικό διάλυμα άλατος, διατηρεί σταθερό το PH στο 7,2 για να μην υποστούν τα κύτταρα στρες), Controls, δευτερογενές αντίσωμα σημασμένο με φλουρεσκεΐνη (μια οργανική χρωστική η οποία, απορροφά μπλέ φως 490 nm και εκπέμπει έντονο κίτρινο-πράσινο φθορισμό 517 nm), καλυπτρίδες και γλυκερόλη. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να μεταφερθούν σε θερμοκρασία δωματίου (18 έως 25°C) 30 λεπτά πριν τη χρήση. Μετά το αρχικό άνοιγμα τα αντιδραστήρια θα πρέπει να αποθηκεύονται στους +2 έως 8°C για 12 μήνες ή μέχρι την ημερομηνία λήξης τους και να προστατεύονται από επιμολύνσεις. Τα αραιωμένα δείγματα θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν μέσα σε μία μέρα.

Κατασκευάζουμε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Για τη προετοιμασία του έτοιμου προς χρήση ρυθμιστικού διαλύματος PBS, θα χρειαστούμε 8γρ NaCl, 0.2γρ KCl, 1.44γρ Na_2HPO_4 , 0.24γρ KH_2PO_4 , τα οποία αραιώνουμε σε ένα λίτρο αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια αραιώνουμε τους ορούς των ασθενών που θέλουμε

να αναλύσουμε με αραιώση 1:40 με αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS και τους αναδεύουμε στο vortex. Τοποθετούμε 40 μl από τα controls στα 4 πρώτα βοθρία της αντικειμενοφόρου πλάκας και στα υπόλοιπα 8 τοποθετούμε τους αραιωμένους ορούς των ασθενών και επωάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (+18 έως 25°C). Ακολουθεί πλύσιμο. Απομακρύνουμε τους ορούς των ασθενών από την αντικειμενοφόρο πλάκα ξεπλένοντας καλά με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Εκτελούμε την διαδικασία τουλάχιστον 3 φορές. Στη συνέχεια τοποθετούμε 40 μl δευτερογενές αντίσωμα σημασμένο με φθοριούχο φλουρεσκεΐνη (FITC) σε κάθε βοθρίο της αντικειμενοφόρου πλάκας και επωάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (+18 έως 25°C). Ακολουθεί πλύσιμο. Απομακρύνουμε το δευτερογενές αντίσωμα από την αντικειμενοφόρο πλάκα ξεπλένοντας καλά με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Τοποθετούμε γλυκερόλη στα βοθρία της αντικειμενοφόρου πλάκας και σκεπάζουμε με καλυπτρίδα για την μονιμοποίηση των κυττάρων. Μετά την πειραματική διαδικασία εκτιμούμε τα αποτελέσματα σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού.

3.3 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

Για τον προσδιορισμό αντιδραστικότητας έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων των ιών, χρησιμοποιήσαμε εμπορικά διαθέσιμα κιτ (EUROIMMUN). Το κιτ περιέχει ταινίες οι οποίες εμπεριέχουν ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένες πρωτεΐνες των διαφόρων ιών που μελετήσαμε (και πιο συγκεκριμένα του HCMV και του EBV) που εν συνεχεία έχουν μεταφερθεί σε φύλλα νιτροκυτταρίνης. Όλα τα αντιδραστήρια μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (18 έως 25°C) τουλάχιστον 30 λεπτά πριν την έναρξη των πειραμάτων. Τοποθετούμε τις ταινίες σε ειδικές τάφρους-κανάλια και προεπωάζουμε με 1.5 ml ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα με σκοπό να αποφευχθεί η μετέπειτα μη ειδική σύνδεση (universal buffer, 1/10 αραιώση σε αποσταγμένο νερό σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή) για 15 λεπτά. Όλες οι επωάσεις γίνονται σε ειδικό

μηχάνημα συνεχούς ανάδευσης με αιώρηση (rocking shaker) και σε θερμοκρασία δωματίου (+18 έως 25°C).

Εν συνεχεία η κάθε ταινία επωάζεται με ορό ασθενούς σε αραιώση 1/51 σε universal buffer για 30 λεπτά. Ακολουθεί πλύσιμο των ταινιών με επώαση τους με universal buffer 3 φορές για 5 λεπτά και εν συνεχεία προστίθεται 1,5 ml από το δευτερογενές αντίσωμα (αντίσωμα έναντι του Fc τμήματος ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης), το οποίο είναι συζευγμένο με ένζυμο αλκαλικής φωσφατάσης) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί εκ νέου πλύσιμο με buffer 3 φορές για πέντε λεπτά. Έπειτα τοποθετούμε 1.5ml υποστρώματος(bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (*BCIP*)/nitro blue tetrazolium) σε κάθε κανάλι. Επωάζουμε για 10 λεπτά και ξεπλύνουμε τις ταινίες με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό για 1 λεπτό. Όταν υπάρχει θετική αντιδραστικότητα παρατηρούμε την εμφάνιση διαφόρων μπαντών στην ταινία που αντιστοιχούν σε αντιδραστικότητες έναντι διαφόρων αντιγόνων του ιού (διαχωρισμένα με βάση το μοριακό τους βάρος). Η εκτίμηση του βαθμού αντιδραστικότητας γίνεται με την χρήση ειδικού λογισμικού, το οποίο μετατρέπει την πυκνότητα κάθε μπάντας σε ποσοτικές σχετικές μονάδες (Arbitrary units, AU) έτσι ώστε να μπορούμε να έχουμε ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων μας για μετέπειτα στατιστική επεξεργασία (EurolineScan, Euroimmun)

3.4 ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΓΡΑΜΜΗΣ

Χρησιμοποιήσαμε έτοιμα εμπορικά kit της εταιρίας EUROIMMUN. Το kit περιέχει ταινίες με τις πρωτεΐνες του ΣΣκ, οι οποίες έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά και μεταφερθεί σε φύλλα νιτροκυτταρίνης (πάνω στις οποίες αναγράφεται ο αριθμός της παρτίδας), sample buffer, wash buffer, δευτερογενές αντίσωμα και υπόστρωμα. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να μεταφερθούν σε θερμοκρασία δωματίου (18 έως 25°C) 30 λεπτά πριν τη χρήση. Μετά το αρχικό άνοιγμα τα αντιδραστήρια θα πρέπει να

αποθηκεύονται στους +2 έως 8°C για 12 μήνες ή μέχρι την ημερομηνία λήξης τους και να προστατεύονται από επιμολύνσεις. Τα δείγματα ασθενών προς διερεύνηση μπορούν γενικά να αποθηκευτούν στους +2 έως 8°C μέχρι 14 μέρες. Τα αραιωμένα δείγματα θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν μέσα σε μία μέρα.

Τοποθετούμε τα blot strips στην βάρκα και γεμίζουμε κάθε κανάλι της βάρκας με 1.5 ml έτοιμου προς χρήση sample buffer. Επωάζουμε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (+18 έως 25°C) σε rocking shaker. Στη συνέχεια αραιώνουμε τους ορούς των ασθενών που θέλουμε να αναλύσουμε με αραιώση 1:101 με έτοιμο sample buffer και τους αναδεύουμε στο vortex. Τοποθετούμε κάθε ορό σε διαφορετικό κανάλι της βάρκας και επωάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (+18 έως 25°C) σε rocking shaker. Έπειτα απομακρύνουμε τον ορό από κάθε κανάλι της βάρκας και ακολουθεί πλύσιμο με wash buffer. Για τη προετοιμασία του έτοιμου προς χρήση wash buffer η αραιώση είναι 1:10 με απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό. Απομακρύνουμε τον ορό από κάθε κανάλι της βάρκας, τοποθετούμε 1.5 ml wash buffer και επωάζουμε για 5 λεπτά. Η διαδικασία εκτελείται 3 φορές. Στη συνέχεια τοποθετούμε 1.5ml δευτερογενές αντίσωμα (αντιανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη IgG συζευγμένο με ένζυμο αλκαλική φωσφατάση) σε κάθε κανάλι της βάρκας και επωάζουμε για 30 λεπτά. Ακολουθεί πλύσιμο. Απομακρύνουμε το δευτερογενές αντίσωμα από κάθε κανάλι της βάρκας, τοποθετούμε 1.5 ml wash buffer και επωάζουμε για 5 λεπτά. Η διαδικασία εκτελείται 3 φορές. Έπειτα τοποθετούμε 1.5ml υπόστρωμα σε κάθε κανάλι και επωάζουμε για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνουμε όλα τα υγρά από κάθε κανάλι και πλένουμε τα strip με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό για 1 λεπτό. Η διαδικασία εκτελείται 3 φορές. Μετά την πειραματική διαδικασία εκτιμούμε τα αποτελέσματα στο πρόγραμμα EurolineScan όπως ακριβώς και τα αντίστοιχα της ανοσοαποτύπωσης (Euroimmun),

μετατρέποντας την πυκνότητα των μπαντών σε αντίστοιχες ποσοτικές σχετικές μονάδες (Arbitrary units, AU).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ UL44 ΚΑΙ UL57 ΤΟΥ HCMV ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές που εμπλέκουν την παραγωγή IgM και/ή IgG αντισωμάτων έναντι άλλων ιικών αντιγόνων του HCMV όπως των UL44 και UL57 στην επαγωγή διαφόρων ανοσοεπαγόμενων νοσημάτων [300]. Παρόμοια ευρήματα βρέθηκαν επίσης και σε άτομα με σύνδρομο χρόνιας κόπωσης [300].

Με βάση τα παραπάνω αποφασίσαμε να μελετήσουμε την πιθανή ανοσολογική απάντηση έναντι των πρωτεϊνών UL44 και UL57 του HCMV σε ασθενείς με ΣΣκ και δευτερευόντως να δούμε εάν υπάρχει πιθανή συσχέτιση της παρουσίας των αντισωμάτων αυτών με ταυτόχρονη παρουσία αυτοαντισωμάτων ειδικών για την συστηματική σκλήρυνση, καθώς ένα τέτοιο πιθανό εύρημα θα ενίσχυε την άποψη ότι η λοίμωξη από HCMV οδηγεί στην παραγωγή των αυτοαντισωμάτων και επομένως στην παθογενετική επαγωγή της νόσου.

4.2 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Μελετήθηκαν 60 ασθενείς με ΣΣκ που προηγουμένως είχαν ελεγχθεί με ELISA και είχαν βρεθεί να έχουν θετικά IgG αντισώματα έναντι του HCMV (53 γυναίκες, μέσος όρος ηλικίας 60 έτη, εύρος 25-81 έτη, 30 με περιορισμένη και 30 με διάχυτη μορφή ΣΣκ). Τα συνολικά δημογραφικά, κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 4.1 Οι ασθενείς ελάμβαναν

αγωγή με χαμηλή δόση στεροειδών (<7.5 mg/ανά ημέρα), μόνη ή σε συνδυασμό με αζαθειοπρίνη ή μεθοτρεξάτη. Όλοι οι ασθενείς με ΣΣκ, είχαν θετικά ANA με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Οι ασθενείς με ΣΣκ πληρούσαν τα κριτήρια του Αμερικάνικου Κολεγίου Ρευματολογίας και προέρχονταν από την Κλινική Ρευματολογίας και κλινικής Ανοσολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείο Λάρισας.

Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 40 ασθενείς με ιστορικό Σκλήρυνσης κατά Πλάκας (ΣκΠ), ομοίως θετικοί για IgG αντισώματα έναντι του HCMV (31 γυναίκες, με ηλικία μέσο όρο 44 ετών, εύρους 20-69 ετών) και τέλος μελετήθηκαν και 17 υγιή άτομα, προεπιλεγμένα ως προς το φύλο και την ηλικία (14 γυναίκες μέση ηλικία 48 έτη, εύρος 21-72 έτη). Όλοι οι ασθενείς και οι φυσιολογικοί μάρτυρες παρέδωσαν γραπτή συναίνεση. Το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του οικείου Ιδρύματος.

4.2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.2.1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ UL44 ΚΑΙ UL57

Η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι UL44 και UL57 του HCMV έγινε με τεχνική ανοσοαποτύπωσης [301]. Εμπορικά διαθέσιμες ταινίες νιτροκυτταρίνης που εμπεριείχαν τις ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένες πρωτεΐνες του HCMV (HCMV strain A169, EUROIMMUN, Germany) χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή για τα αντιγόνα UL44 και UL57. Οι μεμβράνες κόπηκαν στο ανάλογο ύψος που αντιστοιχούσε στις πρωτεΐνες UL44 και UL57 με την χρήση ειδικών δεικτών μοριακού βάρους. Οι μεμβράνες αυτές επωάστηκαν για 1 ώρα με τον κάθε ορό με αραιώση 1/51 σε ειδικό διάλυμα (sample buffer).

Πίνακας 4.1 Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των 60 ασθενών με ΣΣκ, με θετικά anti-HCMV αντισώματα που συμπεριλήφθησαν στην μελέτη.

	Ασθενείς με Συστηματική Σκλήρυνση (ΣΣκ) (n=60)
Μέση ηλικία, έτη (\pm SD)	57,62 (13,31)
Γυναίκες, n (%) / Άνδρες, n (%)	53 (88,33%) / 7 (11,67%)
Τύπος ΣΣκ	
Περιορισμένο, n (%)	30 (50)
Διάχυτο, n (%)	30 (50)
Κλινικοί Παράμετροι	
Έλκη, n (%)	35 (58,3)
Πνευμονική ίνωση, n (%)	25 (41,7)
Έλκη και/ή πνευμονική ίνωση, n (%)	41 (68,3)
Έλκη και πνευμονική ίνωση, n (%)	18 (30)
Ειδικά αυτοαντισώματα της ΣΣκ *	
Anti-CEN, n (%)	14 (23,3)
Anti-Topo I, n (%)	29 (48,3)
Anti-RNA polymeraseIII, n (%)	7 (11,7)
Anti-CEN or anti-Topo I or RNA polymeraseIII, n (%)	49 (76,7)

*με ανοσοαποτύπωση. anti-CEN: αντικεντρομεριδιακά, anti-Topo I: Scl-70 έναντι τοποϊσομεράσης I, anti-RNA polymeraseIII: έναντι RNA πολυμεράσης III.

Εν συνεχεία οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν 3 φορές με ειδικό διάλυμα (washing buffer) για να γίνει στο επόμενο βήμα επώαση με δευτερογενές αντίσωμα (έναντι του Fc τμήματος των IgG ανοσοσφαιρινών), το οποίο ήταν συζευγμένο με ένζυμο-αλκαλική φωσφατάση (ALP) για χρονική διάρκεια 30 min. Ακολούθησε εκ νέου πλύσιμο με το

διάλυμα πλύσεων και τοποθετήθηκαν 100 µl υποστρώματος [NBT/BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)/ nitro blue tetrazolium (NBT)] σε κάθε μεμβράνη και έγινε επώαση για 15 λεπτά προκειμένου να οδηγηθούμε σε εμφάνιση ζώνης στην μεμβράνη (εφόσον ο ασθενής είναι θετικός για τα το συγκεκριμένο αντίσωμα). Οι μεμβράνες αξιολογήθηκαν με την χρήση ειδικού λογισμικού EurolineScan (EUROIMMUN) για να μετατραπούν οι απεικονιζόμενες μπάντες σε ποσοτικά δεδομένα. Μόνο το ύψος της καμπύλης που αναλύει την οπτική πυκνότητα χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω ανάλυση, ενώ προκαταρκτικά πειράματα πιστοποίησαν ότι ο λόγος του εύρους προς το ολοκλήρωμα της καμπύλης ήταν μια έγκυρη μεταβλητή. Εν συνεχεία γίνονταν μετατροπή της τιμής της οπτικής πυκνότητας της ζώνης ανίχνευσης σε σχετικές μονάδες (arbitrary units-AUs). Το κατώτερο όριο θετικότητας που ορίστηκε με βάση τον κατασκευαστή ήταν τα 12 AU, τιμές 12-22 AU χαρακτηρίζονταν ως οριακά θετικές, ενώ τιμές >23 AU θεωρούνταν ευκρινώς θετικές. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας του Πανεπιστημίου της Θεσσαλίας, ένα εργαστήριο αναφοράς για προσδιορισμό αυτοαντισωμάτων στην Ελλάδα, επίσημο Κέντρο Αναφοράς του European Autoimmune Standardization Initiative (EASI).

4.2.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΣΣκ.

Όλοι οι οροί των ασθενών με ΣΣκ ελέγχθησαν για την παρουσία ANA με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων που θεωρούνται ειδικά για την ΣΣκ και συγκεκριμένα εκείνα έναντι τοποϊσομεράσης I (anti-TopoI) έναντι κεντρομεριδίου (anti-CEN) και έναντι RNAπολυμεράσης (anti-RNApolymeraseIII) ελέγχθηκαν με ειδική τεχνική ανοσοτύπωσης γραμμής.

4.2.2.3 ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ

Η πιθανότητα το αντιγόνο UL57 του HCMV καθώς και τα ειδικά αυτοαντιγόνα-στόχοι της ΣΣκ δηλαδή τα CEN ή το Topo I ή το RNApol III να αποτελούν στόχο αντισωμάτων διασταυρούμενης αντίδρασης έχει αποκλεισθεί μέσω πειραμάτων αναστολής. Η ανίχνευση θετικότητας έναντι του UL57 έχει ελεγχθεί μέσω ανοσοαποτύπωσης τόσο πριν όσο και μετά την επώαση των δειγμάτων των θετικών ορών με τα ειδικά αντιγόνα (ανασυνδυασμένο CEN, φυσικό Topo I ή ανασυνδυασμένο RNApol III), χρησιμοποιώντας πρωτόκολλα που έχουν αναφερθεί για μελέτες μοριακής μίμησης που συστηματικά έχουν χρησιμοποιηθεί από την ερευνητική ομάδα μας.

4.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Όλα τα αποτελέσματα θετικότητας εκφράστηκαν ως ποσοστά επί τοις εκατό (%). Τα επίπεδα διακυμάνσεων των τιμών του κάθε αυτοαντισώματος που ανιχνεύθηκε εκφράστηκαν ως μέση τιμή και τυπική απόκλιση. Οι διαφορές μεταξύ των ασθενών με ΣΣκ, των ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣκΠ) και των υγιών μαρτύρων καθώς και μεταξύ των δύο μορφών της ΣΣκ (διάχυτη ή τοπική) ελέγχθηκαν με two-tailed t-test. Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές του p μικρότερες ή ίσες του 0,05. Ο στατιστικός υπολογισμός και οι γραφικές παραστάσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση των λογισμικών SPSS και GraphPadPrism 5.

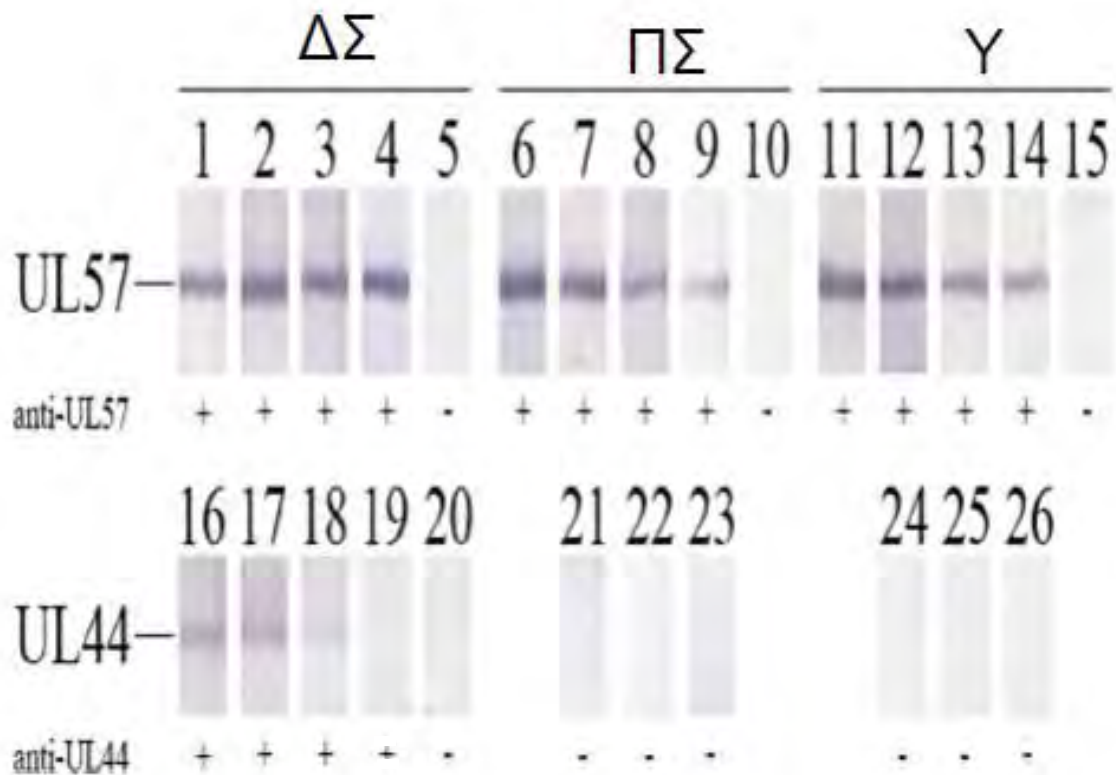
4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μεταξύ των 60 ασθενών με ΣΣκ που ελέχθησαν, οι 3 (5%) βρέθηκαν θετικοί για την παρουσία anti-UL44 του HCMV (2 γυναίκες, 1 άνδρας), όλοι τους με διάχυτη μορφή ΣΣκ (συγκεκριμένα 3/30 με διάχυτη μορφή ΣΣκ, 10% σε σχέση με 0/30, 0%, των ασθενών με τοπική μορφή ΣΣκ, p=ns) σε σύγκριση με την ανίχνευση μόνο σε

έναν ασθενή με ΣκΠ (1/40 2.5%) και σε ένα άτομο από την ομάδα των υγιών μαρτύρων (1/17, 5,9%) ($p=ns$ και στις δυο συσχετίσεις).

Αντίθετα η ανίχνευση των anti-UL57 του HCMV ήταν σχεδόν καθολική ευρισκόμενη στους 58 ασθενείς με ΣΣκ (96,7%) (57 γυναίκες-1 άνδρας, 29 με διάχυτη μορφή ΣΣκ και 29 με συστηματική μορφή ΣΣκ). Τα ποσοστά αυτά ήταν παρόμοια σε σύγκριση με αυτά που ανιχνεύθηκαν στους ασθενείς με ΣκΠ (35/40 θετικοί, 87,5%) καθώς και με τους υγιείς (16/17 θετικοί, 94,1%) ($p=ns$ και στις δυο συσχετίσεις). Η εικόνα 4.1 δείχνει αντιπροσωπευτικά παραδείγματα ανίχνευσης αντισωμάτων anti-UL44 και anti-UL57, σε ποικίλους τίτλους και ένταση σήματος που ανιχνεύθηκαν σε ασθενείς και μάρτυρες με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης.

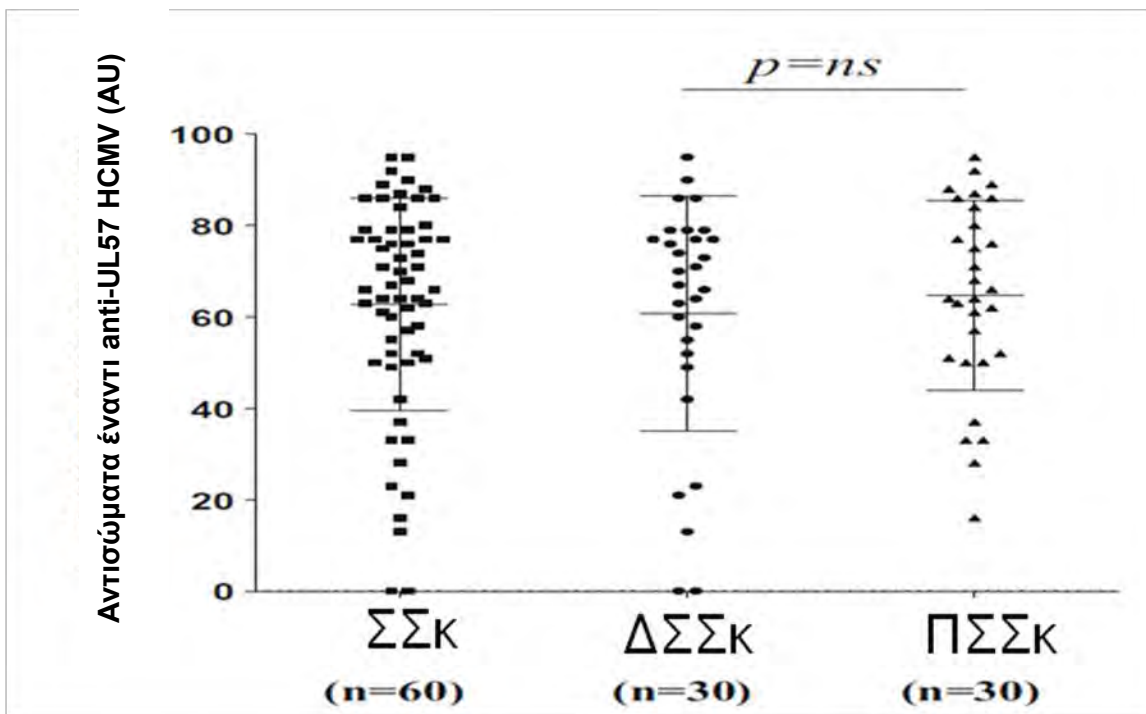
Εν συνεχεία δεδομένου των παρόμοιων ποσοστών ανίχνευσης του anti-UL57 μεταξύ ασθενών και ομάδων ελέγχου, έγινε στατιστική επεξεργασία με βάση το βαθμό θετικότητας των ασθενών (σχετικές τιμές AU των θετικών ατόμων). Η εικόνα 4.2 δείχνει τα επίπεδα των anti-UL57 στους ασθενείς με ΣΣκ, όπως αυτά στρωματοποιούνται με βάση το είδος της ΣΣκ (συστηματική ή διάχυτη). Οριακά θετικοί ασθενείς με ΣΣκ (θετικότητα τίτλου μέχρι και το διπλάσιο του ορίου ανίχνευσης θετικότητας δηλαδή μεταξύ 11-23 AU) για το anti-UL57 ήταν 4 (4/58, 6,9%). Αντίθετα μέτρια θετικοί (τίτλος 23-50 AU), εμφανώς θετικοί (τίτλος 51-75 AU) και πολύ θετικοί (>75 AU) τίτλοι ευρέθησαν σε 8 (13,8%), 24 (41,4%) και 22 (37,9%) των ασθενών με ΣΣκ αντιστοίχως. Γενικά 46 ασθενείς με ΣΣκ (76,67%) είχαν θετικά/πολύ θετικά αποτελέσματα (τίτλος >50 -75% AU) εν συγκρίσει με το 70% των ασθενών με ΣκΠ (δηλαδή 28/40, $p=ns$) καθώς και στους 7 από τους υγιείς μάρτυρες (7/17, 41,2%, $p=0,007$).



Εικόνα 4.1 Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι UL44 και UL57 του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (HCMV) με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης σε ασθενείς με διάχυτο σκληρόδερμα (ΔΣΣκ), περιορισμένο (ΠΣΣκ), καθώς και υγείων μαρτύρων (ΥΜ), όλοι τους θετικοί για ανίχνευση anti-HCMV. Τα παραδείγματα 1-4, 6-9 και 11-14 δείχνουν ασθενείς με θετική αντιδραστικότητα έναντι UL57, τα παραδείγματα 5,10 και 15 δείχνουν ασθενείς με αρνητική αντιδραστικότητα έναντι UL57. Τα παραδείγματα 16-18 δείχνουν 3 ασθενείς με θετική αντιδραστικότητα έναντι του UL44, ενώ τα παραδείγματα 19-26 ασθενείς με αρνητική αντιδραστικότητα έναντι του UL44. ΣΣκ: Συστηματική σκλήρυνση, ΔΣΣκ: Διάχυτη Συστηματική σκλήρυνση, ΠΣΣκ: Περιορισμένη Συστηματική Σκλήρυνση, ΥΜ: Υγείς μάρτυρες.

Η έκταση της αντιδραστικότητας έναντι του anti-UL57 του HCMV, αναλύθηκε μέσω πειραμάτων αραιώσεων των ορών (1/200, 1/500, 1/5.000, 1/10.000) (εικόνα 4.3) Μεταξύ 11 ασθενών που μελετήθηκαν η ανίχνευση του αντισώματος anti-UL57 του HCMV επέμνε στις αραιώσεις 1/200 και 1/500 σε όλους τους ασθενείς ενώ σε 5

από αυτούς επέμενε και στην αραιώση 1/5.000. Αντιθέτως η αντιδραστικότητα μηδενίζονταν σε όλους τους θετικούς ορούς στην αραιώση 1/20.000.

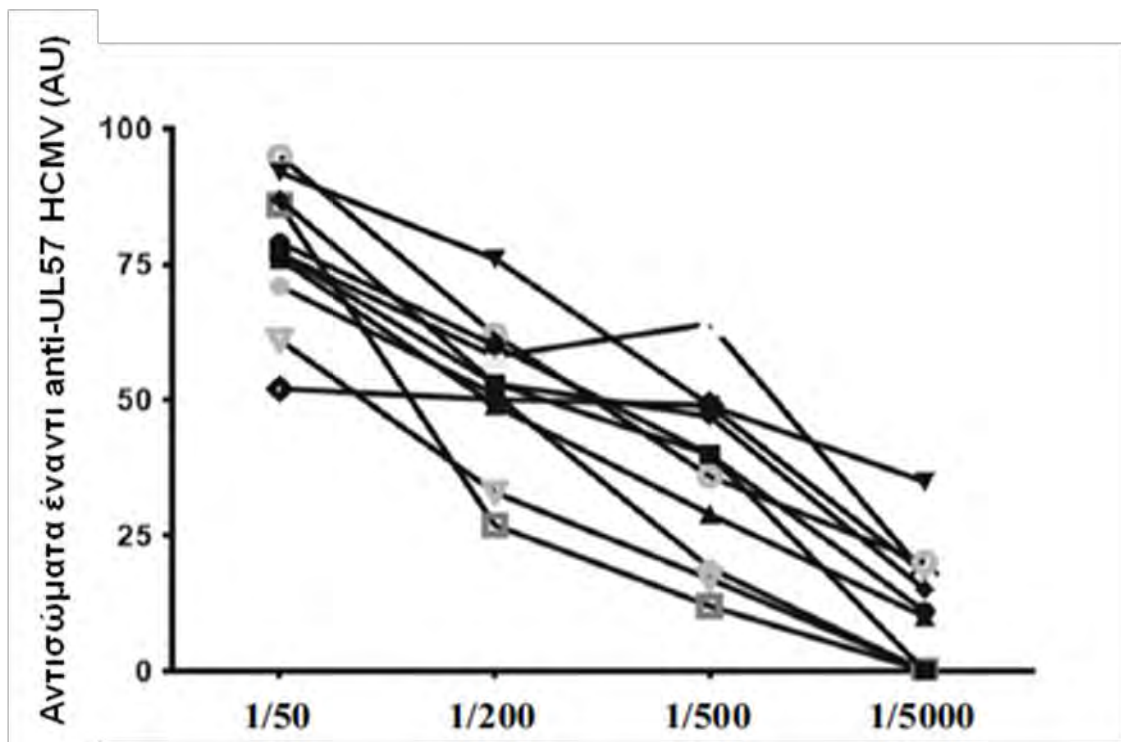


Εικόνα 4.2 Τα επίπεδα των anti-UL57 αντισωμάτων σε θετικούς ασθενείς με σκληρόδερμα (ΣΣκ), διάχυτο σκληρόδερμα (ΔΣΣκ) και περιορισμένο σκληρόδερμα (ΠΣΣκ). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε AU (arbitrary units). Το κατώτερο όριο που έχει οριστεί από τον κατασκευαστή είναι τα 11 AU. ΣΣκ: Συστηματική σκλήρυνση, ΔΣΣκ: Διάχυτη Συστηματική σκλήρυνση, ΠΣΣκ: Περιορισμένη Συστηματική Σκλήρυνση.

Επιπρόσθετα δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά των τιμών ανίχνευσης του anti-UL57 μεταξύ του ΔΣΣκ και του ΠΣΣκ ($65,45 \pm 20,19$ vs $64,31 \pm 21,11$ AU, $p > 0,05$) (εικόνα 4.2) Τέλος η παρουσία anti-UL57 του HCMV δεν συσχετίσθηκε με καμιά κλινικο-εργαστηριακή παράμετρο των ασθενών με ΣΣκ (ηλικία, φύλο, διάρκεια νόσου, παρουσία ελκών, πνευμονικής ίνωσης ή πνευμονικής υπέρτασης). Ούτε η διαστρωμάτωση των αποτελεσμάτων των ασθενών με εμφανώς θετικό/πολύ θετικό αποτέλεσμα (>50 AU) ανίχνευσης anti-UL57 σε σύγκριση με εκείνους με χαμηλό/μέτριο τίτλο (11-49 AU) δεν ανέδειξε κάποιο στατιστικά σημαντικό

συσχετισμό με κλινική παράμετρο (παρουσία ελκών, πνευμονικής ίνωσης ή πνευμονικής υπέρτασης). Επίσης δεν βρέθηκε συσχετισμός της παρουσίας anti-UL57 αντισωμάτων με τον τύπο θεραπείας που ελάμβαναν οι ασθενείς με ΣΣκ).

Επιπρόσθετα δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των ειδικών αυτοαντισωμάτων για την ΣΣκ και του anti-UL57. Η εικόνα 4.4 είναι ένα Venn διάγραμμα που παρουσιάζει τον συσχετισμό του anti-UL57 σε σχέση με την ύπαρξη anti-TopoI, anti-CEN και anti-RNAPolymersaseIII αντισωμάτων. Επίσης δεν υπήρχε συσχετισμός αν η σύγκριση συμπεριελάμβανε μόνο τους θετικούς/πολύ θετικούς ασθενείς για anti-UL57, όπως επίσης δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των anti-UL57 σε σχέση με τα επίπεδα των τριών αυτοαντισωμάτων των ειδικών για ΣΣκ.



Εικόνα 4.3 Συγκέντρωση αντισωμάτων έναντι UL-57 σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση σε διάφορες αραιώσεις. Μεταξύ των 11 θετικών ασθενών για anti-UL57, η δραστηριότητα παρέμεινε θετική σε όλους σε αραιώση 1/200 και 1/500, στους 5 ασθενείς (5/11, 45.5%) η δραστηριότητα συνέχισε να παραμένει σε αραιώση 1/5000 ενώ γινόταν αρνητική σε όλους σε αραιώση 1/20.000.

Τελικά πειράματα απορρόφησης πραγματοποιήθηκαν σε 3 δείγματα με διπλή αντιδραστικότητα έναντι αντιγόνου του ιού και ενός αυτοαντισώματος. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν ένας διπλά θετικός ορός anti-UL57/CEN, ένας anti-UL57/Topol, και ένας anti-UL57/RNApol III ορός, χρησιμοποιώντας για την απορρόφηση στο πρώτο δείγμα αντιγόνο CEN, Topol για το δεύτερο, και RNApol III για το τρίτο. Όπως αναμενόταν υπήρχε αναστολή της ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων αντίστοιχα: anti-CEN κατά 89%, anti-Topol κατά 93,5% και anti-RNApolIII κατά 91%. Αντίθετα σε καμιά από τις τρεις περιπτώσεις, η χρήση αυτοαντιγόνου δεν είχε σημαντική επίδραση στην αντιδραστικότητα έναντι UL57 (λιγότερο από 8% αναστολή και στις 3 περιπτώσεις).

4.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη στην βιβλιογραφία που αναφέρεται στην ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών UL44 και UL57 του HCMV σε ασθενείς με ΣΣκ. Τα ευρήματα μας δείχνουν σχεδόν ελάχιστο ποσοστό ανίχνευσης anti-UL44 αντισωμάτων στους ασθενείς με ΣΣκ σε αντίθεση με τα anti-UL57 αντισώματα που ανευρίσκονται σχεδόν στην ολότητα των ασθενών με ΣΣκ (ανευρέθηκε σε όλους εκτός από δύο). Η πρώτη εντύπωση είναι ότι μάλλον θα πρέπει να αμφισβητήσει κανείς την συσχέτιση των αντισωμάτων έναντι των ιικών αυτών αντιγόνων με την επαγωγή της νόσου.

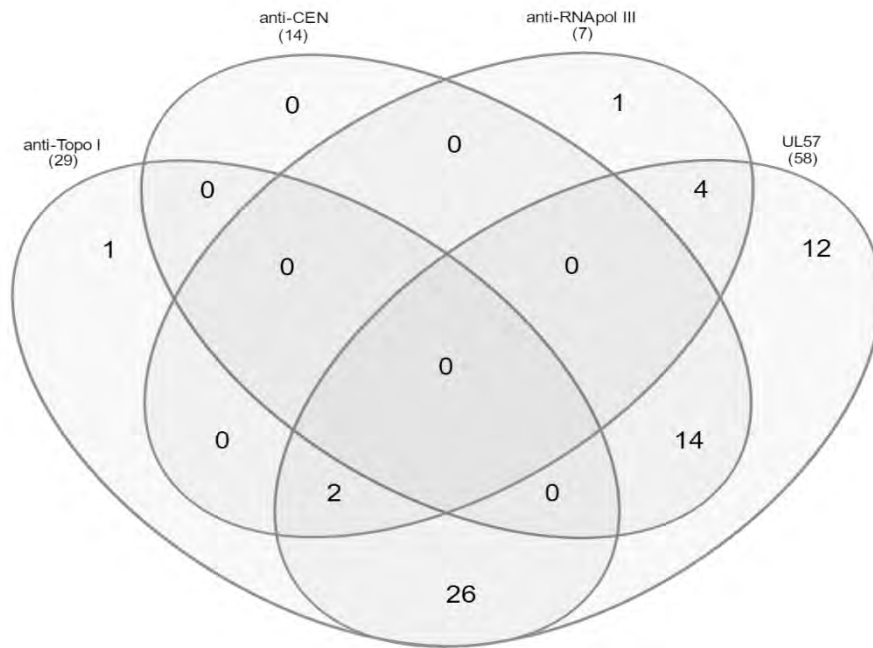
Ο ιός του HCMV, έχει βιβλιογραφικά θεωρηθεί ότι μπορεί να πυροδοτήσει παθογενετικούς μηχανισμούς που να οδηγούν στην εμφάνιση συστηματικής σκλήρυνσης για διάφορους λόγους [294]. Καταρχήν, ο HCMV έχει την ικανότητα να μολύνει ανθρώπινα κύτταρα συμπεριλαμβανομένου και των ανοσολογικών κυττάρων και να παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση για αρκετές δεκαετίες ή για ολόκληρη

την ζωή μέσα στον ξενιστή. Συνεπώς ο HCMV έχει την ιδιότητα να μολύνει ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς επίσης και μακροφάγα κυττάρα συμβάλλοντας στην ανοσολογική απορύθμιση του οργανισμού. Σε ασθενείς με ΣΣκ έχει αναφερθεί αυξημένο ποσοστό αντισωμάτων έναντι του HCMV σε σχέση με άλλες ασθένειες ή ακόμα και με υγιείς μάρτυρες [222, 302]. Επιπλέον οι διασταυρούμενες αντιδράσεις έναντι ιικών αντιγόνων καθώς και αυτοαντιγόνων της ΣΣκ υποδεικνύουν την συμμετοχή μηχανισμού μοριακής μίμησης στην προώθηση της αυτοανοσίας [299].

Από μελέτες στην βιβλιογραφία φαίνεται ότι τα αντισώματα έναντι της UL94 πρωτεΐνης του HCMV που ανευρίσκονται σε ασθενείς με ΣΣκ [303] έχουν διασταυρούμενη αντίδραση με την NAG 2 πρωτεΐνη και έτσι τα anti-UL94 αντισώματα μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση, ενδοθηλιακή βλάβη [299], καθώς επίσης και ενεργοποίηση των ινοβλαστών [304, 305]. Μια άλλη διασταυρούμενη αντίδραση που έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με ΣΣκ είναι αυτή όπου αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης UL70 του HCMV εμφανίζει αντιδραστικότητα και έναντι της τοποϊσομεράσης I (TopoI) [298], υποδεικνύοντας ένα ακόμη πιθανό ζεύγος αντιγόνων που μέσω μηχανισμού μοριακής μίμησης μπορεί να παίζει ρόλο στην προώθηση της νόσου.

Η αρχική υπόθεση της μελέτης μας ήταν ότι η ανοσιακή απόκριση έναντι των UL44 και UL57 αντιγόνων του ιού του HCMV θα ήταν παρούσα στους ασθενείς με ΣΣκ. Η υπόθεση μας αυτή αποδείχθηκε σωστή, σε ότι αφορά το πρώτο σκέλος, καθώς ιικά αντισώματα (anti-UL57) ανιχνεύονται σχεδόν στην ολότητα των ασθενών με ΣΣκ. Ωστόσο εξαιτίας της πανταχού παρουσίας τους, τα anti-UL57 HCMV αντισώματα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αναδείξουμε κάποιον ειδικό-κλινικό φαινότυπο. Επιπρόσθετα ακόμα και αν κάνουμε υποκατηγοριοποίηση των ασθενών με anti-HCMV αντισώματα ανάλογα με τον τίτλο των anti-UL57 σε αυτούς με χαμηλά και σε αυτούς με υψηλά επίπεδα, επίσης δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με κάποια κλινική εκδήλωση [303]. Αυτά τα ευρήματα έρχονται σε αντίθεση, με

προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες όπου υψηλά επίπεδα αντισωμάτων του HCMV που στοχεύουν άλλες ιικές πρωτεΐνες (όπως οι UL94 και UL83) ανευρίσκονται πιο συχνά σε ασθενείς με διάχυτη μορφή ΣΣκ σε σχέση με ασθενείς με περιορισμένη μορφή ΣΣκ. Όπως περιέργως η ισχυρή ανταπόκριση έναντι των UL57 ιικών αντιγόνων ήταν πιο συχνή σε ασθενείς με ΣΣκ (καθώς επίσης και σε ΣκΠ ασθενείς) σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.



Εικόνα 4.4 Διάγραμμα Venn που δείχνει την συσχέτιση της ύπαρξης anti-UL57 αντισωμάτων του HCMV σε σχέση με anti-centromere (CEN), anti-topoisomerase I (Topo I) και anti-RNA polymerase III (RNA pol III) σε 60 anti-HCMV θετικούς ασθενείς με ΣΣκ.

Χρησιμοποιήσαμε ως ομάδα ελέγχου ασθενείς με ΣκΠ, επειδή και η ΣκΠ θεωρείται μια αυτοάνοση ασθένεια η οποία στην βιβλιογραφία έχει ισχυρά συνδεθεί με τον HCMV [273, 306]. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι είτε οι ασθενείς με ΣΣκ ή ΣκΠ έχουν μια γενετική προδιάθεση που επάγει μια πιο ισχυρότερη αντιική ανταπόκριση ή ότι το αντιγονικό φορτίο (ιικά αντιγόνα ή/και αυτοαντιγόνα-στόχοι)

είναι μεγαλύτερο σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Η ανταπόκριση έναντι των UL57 πρωτεϊνών ήταν παρούσα και σε αυτοάνοσες ασθένειες, καθώς επίσης και σε υγιή άτομα, το οποίο έρχεται σε διαφωνία με την υπόθεση για τον πιθανό παθογενετικό ρόλο τους στην επαγωγή της ΣΣκ. Παρ' όλα αυτά εάν τα anti-UL57 στους ασθενείς με ΣΣκ είναι ικανά να προάγουν ενδοθηλιακή βλάβη ή εάν αυτά τα αντισώματα έχουν διασταυρούμενη αντίδραση με συγκεκριμένα αυτοαντισώματα της ΣΣκ, αυτό θα ήταν υποστηρικτικό του κατά πόσο μπορούν να συμμετέχουν στην ανοσοπαθογένεια της νόσου. Με παρόμοιο τρόπο, η διασταυρούμενη αντίδραση που έχει καταγραφεί μεταξύ του πεπτιδίου UL-70 του ιού HCMV και του μονοκλωνικού αυτοαντισώματος έναντι τοποϊσομεράσης I στους ασθενείς με ΣΣκ καθώς και σε βιοψία δέρματος ποντικού υποδηλώνει πιθανό παθογενετικό ρόλο στην επαγωγή ΣΣκ [298]. Μια σειρά μελετών με πειράματα αναστολής που ερευνούν την περαιτέρω διασταυρούμενη αναγνώριση μεταξύ του UL57 και συγκεκριμένων αυτοαντιγόνων της ΣΣκ, όπως τα Topo I, CEN και RNA polymeraseIII απέτυχε στο να αποκαλύψει κάποια στοιχεία διασταυρούμενης αντίδρασης μεταξύ των κυρίων αυτοαντιγόνων της ΣΣκ και του UL57 του HCMV. Ωστόσο δεν μπορεί να αποκλειστεί τέτοια συσχέτιση με κάποια νέα αυτοαντιγόνα που επίσης είναι ειδικά της ΣΣκ [307, 308].

Συμπερασματικά από την μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη UL57 του HCMV είναι ένας πολύ συχνός στόχος των αντισωμάτων κατά του HCMV σε ασθενείς με ΣΣκ. Όμως, η ανοσολογική ανταπόκριση έναντι του UL57 υστερεί ειδικότητας και δεν φαίνεται να σχετίζεται με το κλινικό φαινότυπο των ασθενών με ΣΣκ. Αυτά τα ευρήματα σε συνδυασμό με την έλλειψη συσχέτισης μεταξύ των αντισωμάτων anti-UL57 και των ειδικών αυτοαντισωμάτων της ΣΣκ, μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι μάλλον δεν υποστηρίζεται πιθανός παθογενετικός ρόλος των anti-UL57 του HCMV σε ασθενείς με ΣΣκ.

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ UL83 ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΤΟΥ HCMV ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο προηγούμενο κεφάλαιο μελετήσαμε την παραγωγή αντισωμάτων εναντίον των αντιγόνων UL44 και UL57 του HCMV, αλλά δεν μπορέσαμε να εντοπίσουμε κάποιες διαφορές μεταξύ των ασθενών με ΣΣκ και των υγιών μαρτύρων [309]. Κάποιοι άλλοι ερευνητές επικέντρωσαν την ερευνά τους σε άλλες πρωτεΐνες του HCMV όπως η UL83 (pp66) [310], η οποία είναι πυρηνική πρωτεΐνη και αποτελεί κύριο στόχο της ανοσολογικής ανταπόκρισης κατά τη διάρκεια της λοίμωξης από τον HCMV [311]. Στο κεφάλαιο αυτού του πειραματικού μέρους θα μελετήσουμε την παραγωγή αντισωμάτων έναντι UL83 του HCMV σε ασθενείς με ΣΣκ.

5.2.ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Μελετήθηκαν 84 ασθενείς με ΣΣκ (67 γυναίκες μέσος όρος ηλικίας 55,1 έτη, εύρος 25-81, 40 με περιορισμένη μορφή ΣΣκ, 44 με διάχυτη μορφή ΣΣκ), όλοι τους θετικοί για αντισώματα IgG έναντι του HCMV. Τα κύρια δημογραφικά, κλινικά ανοσολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών που μελετήθηκαν εμφανίζονται στον πίνακα 5.1

Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 30 ασθενείς με ΣκΠ, επίσης θετικοί για IgG αντισώματα έναντι του HCMV (23 γυναίκες, μέσος όρος ηλικίας 44 έτη, εύρος 20-69 έτη, 15 από αυτούς είχαν κλινική μορφή ΕΥΣκΠ και 15 μορφή ΔΠΣκΠ). Οι ασθενείς παρακολουθούνταν από την Νευρολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Επίσης στην μελέτη συμπεριλήφθησαν και 28 υγιή άτομα (θετικοί για IgG αντισώματα έναντι του HCMV), με ταυτόσημα δημογραφικά

χαρακτηριστικά σε σχέση με τα άτομα με ΣΣκ (21 γυναίκες, μέσος όρος ηλικίας 45 έτη, εύρος 19-72 έτη). Όλα τα πειράματα έγιναν ακολουθώντας τις αναθεωρημένες αρχές δεοντολογίας της Διακήρυξης του Ελσίνκι. Όλοι οι ασθενείς και τα άτομα ελέγχου παρέδωσαν γραπτή συναίνεση. Το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την τοπική επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας.

5.2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ

Έγινε προσδιορισμός της παρουσίας αντισωμάτων έναντι του UL83 του HCMV ακολουθώντας την τεχνική που έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο των πειραματικών μεθόδων [301]. Ως πηγή για το UL83 αντιγόνο χρησιμοποιήθηκαν blot strips με εκχύλισμα HCMV στο οποίο έγινε διαχωρισμός των διαφόρων πρωτεϊνών του ιού με ηλεκτροφόρηση, όπως περιγράφηκε λεπτομερώς στο προηγούμενο κεφάλαιο. Το κατώτερο όριο θετικότητας με βάση τον κατασκευαστή ήταν τα 11 AU, τιμές μεταξύ 11-22 AU θεωρήθηκαν οριακά θετικές ενώ τιμές >23 AU αντιστοιχούσαν σε ευκρινώς θετικό αποτέλεσμα ανίχνευσης anti-UL83.

5.2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΣΣκ

Ο έλεγχος της παρουσίας αυτοαντισωμάτων ειδικών για την ΣΣκ πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα εμπορικά διαθέσιμο kit (EUROIMMUN “Systemic Sclerosis Profile), το οποίο επιτρέπει την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων IgG έναντι 13 διαφορετικών αντιγόνων ειδικών για την συστηματική σκλήρυνση και συγκεκριμένα των: Scl-70, CENPA, CENPB, RNA polymeraseIII υπομονάδα 11 (RP11) και υπομονάδα 115 (RP155), fibrillarin, NOR90, Th/To, PM-Scl175, Ku, PDGFR και Ro-52.

Πίνακας 5.1 Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΣΣκ (n=84) που συμπεριλήφθησαν στην μελέτη ανάλογα με την αντιδραστικότητα έναντι του UL83 αντιγόνου του HCMV (τα οριακά θετικά, 6-10 AU θεωρήθηκαν αρνητικά).

	Σύνολο ασθενών με ΣΣκ (n=84)	Anti-UL83 θετικοί* (n=50)	Anti-UL83 αρνητικοί (n=34)
Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά			
Μέση ηλικία, έτη (± SD)	53,9 (± 13,7)	58,2 (± 13,3)	52,6 (± 13,8)
Γυναίκες, n (%)	67 (79,8%)	40 (80%)	27 (79,4%)
/ Άνδρες, n (%)	/17 (20,2%)	/10 (20%)	/7 (20,6%)
Τύπος σκληροδέρματος			
• Περιορισμένο, n (%)	40 (47,6%)	21 (42%)	19 (55,9 %)
Γυναίκες, n (%)	29 (72,5 %)	15 (71,4%)	14 (73,7%)
/Μέση ηλικία, έτη (±SD)	/54,3 (± 12,9)	/52,1 (±13,2)	/50,8 (±12,9)
• Διάχυτο, n (%)	44 (52,4%)	29 (58%)	15 (44,1%)
Γυναίκες, n (%) /	38 (86,4%)	25(86%)	13 (38,2%)
Μέση ηλικία(±SD)	/60,1 (±13,3)	/62,3 (±11,8)	/56 (±15,1)
Κλινικά Χαρακτηριστικά			
Έλκος, n (%)	44 (52,4%)	25 (50%)	19 (55,6%)
Πνευμονική ίνωση, n (%)	32 (38,1%)	23 (46%)**	9 (26,4%)**
Έλκος και/ή πνευμονική ίνωση, n (%)	53 (63,1%)	32 (64%)	19 (55,6%)
Έλκος και πνευμονική ίνωση, n (%)	20 (23,8%)	13 (26%)	7 (20,6%)
Ανίχνευση αυτοαντισωμάτων, n (%)			
Anti-Scl-70	44 (52,4%)	25 (50%)	19 (55,6%)
Anti-CENPA	21 (25%)	16 (32%)	5 (14,7%)
Anti-CENPB	20 (23,8%)	15 (30%)	5 (14,7%)
Anti-CENPA or Anti-CENPB	21 (25%)	11 (22%)	2 (5,9%)
Anti-RNA pol III RP11	12 (14,3%)	6 (12%)	6 (17,6%)
Anti-RNA pol III RP155	15 (17,9%)	9 (18%)	6 (17,6%)
Anti-RP11 or RP155	15 (17,9%)	9 (18%)	6 (17,6%)
Anti-fibrillarin	1 (1,2%)	1 (2%)	0 (0 %)
Anti-NOR90	5 (6%)	4 (8%)	1 (2,9%)
Anti-Th/To	0 (0 %)	0 (0 %)	0
Anti-PM/Scl100	3 (3,6%)	1 (2%)	2 (5,9%)
Anti-PM/Scl75	3 (3,6%)	2 (4%)	1 (2,9%)
Anti-PM/Scl100 or PM/Scl75	3 (5%)	2 (4%)	1 (2,9 %)
Anti-Ku	2 (2,4%)	2 (4%)	0 (0%)
Anti-PDGFR	0 (0 %)	0 (0%)	0 (0%)
Anti-Ro-52	18 (21,4%)	9 (18%)	9 (26,5%)

** (anti-UL83 θετικά >11 AU (περιλαμβάνοντας τα οριακά θετικά anti-UL83) δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των anti-UL83 θετικών και των anti-UL83 αρνητικών ασθενών με ΣΣκ)**, p=0,067.

Όλα τα αντιγόνα είναι ανασυνδυασμένα εκτός από το Scl-70 που είναι φυσικό αντιγόνο που απομονώθηκε από το θύμο αδένες βοοειδών και κουνελιού. Τα δείγματα ορών ελέγχθηκαν σε αραιώση 1/101. Ομοίως με προηγουμένως γίνονταν μετατροπή της τιμής της οπτικής πυκνότητας της ζώνης ανίχνευσης σε σχετικές μονάδες (arbitrary units-AUs). Τιμές μικρότερες των 5 AU θεωρήθηκαν αρνητικές, τιμές μεταξύ 6-10 AU, ως οριακά θετικές, τιμές μεταξύ 11-20 AU ως ασθενώς θετικές και τιμές >20 AU ως ευκρινώς θετικές. Η αρχή της μεθόδου της αποτύπωσης γραμμής (line blot) για τον προσδιορισμό των αυτοαντισωμάτων έναντι αντιγόνων ειδικών για ΣΣκ περιγράφεται αναλυτικά στο εισαγωγικό κεφάλαιο των τεχνικών.



Εικόνα 5.1 Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι UL83 του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (HCMV) με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, σε ασθενείς με διάχυτη συστηματική σκλήρυνση (ΔΣΣκ), περιορισμένη συστηματική σκλήρυνση (ΠΣΣκ), σκλήρυνση κατά πλάκας (ΕΥΣκΠ και ΔΠΣκΠ) καθώς και σε υγιείς μάρτυρες (ΥΜ). Τα παραδείγματα 1-4 (ασθενείς με ΔΣΣκ), 6-9 (ασθενείς με ΠΣΣκ), 11-15 (ασθενείς με ΕΥΣκΠ), 16-19 (ασθενείς με ΔΠΣκΠ), και 21-24 (υγιείς μάρτυρες) δείχνουν άτομα με θετική αντιδραστικότητα έναντι του UL-83, ενώ τα παραδείγματα, 5, 10, 20 και 25 αναφέρονται σε άτομα με έλλειψη αντιδραστικότητας έναντι UL-83.. ΣΣκ: Συστηματική σκλήρυνση, ΔΣΣκ: Διάχυτη Συστηματική σκλήρυνση, ΠΣΣκ: Περιορισμένη Συστηματική Σκλήρυνση, ΥΜ: Υγιείς μάρτυρες.

5.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τις εκατό (%). Οι διαφορές μεταξύ των ασθενών με ΣΣκ, των ασθενών με ΣκΠ και των υγιών μαρτύρων και μεταξύ των ομάδων των ασθενών με ΣΣκ ελέγχθηκαν με το two-tailed t-test. Στατιστικώς

σημαντικές θεωρήθηκαν οι συγκρίσεις που οι τιμές του p ήταν μικρότερες ή ίσες με 0,05. Η στατιστική επεξεργασία και τα γραφήματα έγιναν με χρήση των προγραμμάτων Graph Pad Prism software 5 και SPSS v18.

5.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

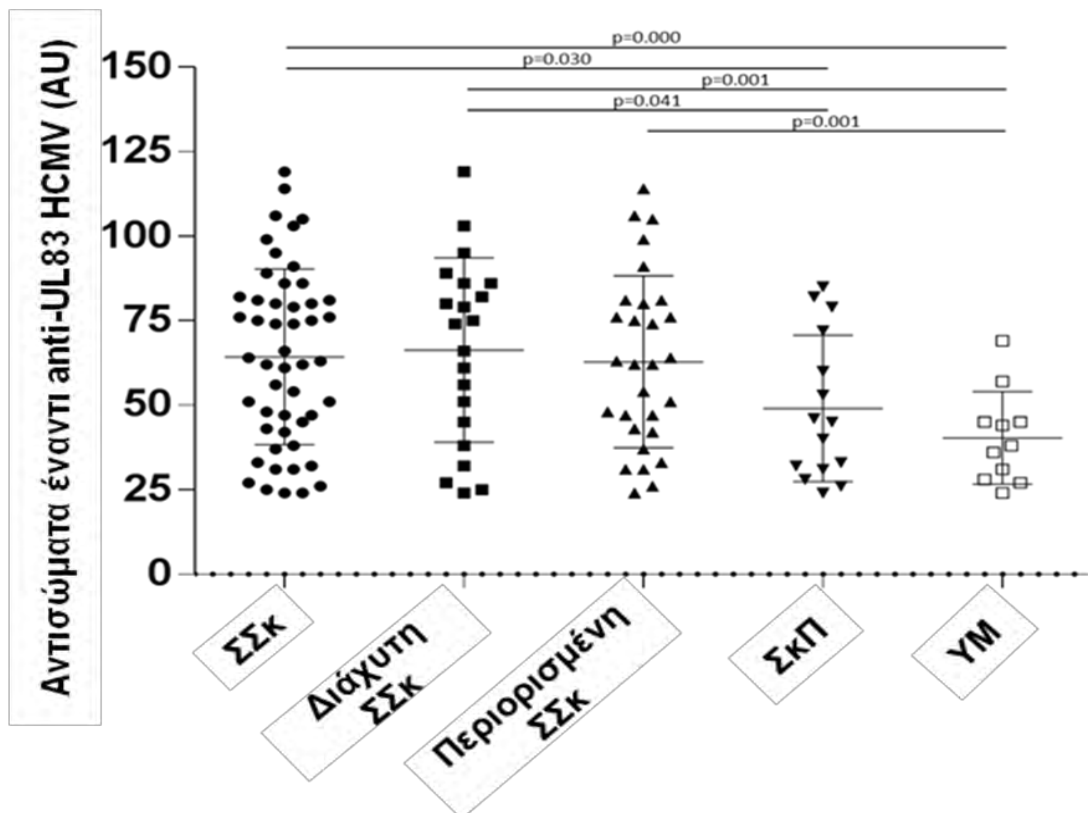
Anti-UL83 αντισώματα (έντονα θετικά και οριακά θετικά) ανιχνεύθηκαν σε 69 ασθενείς με ΣΣκ. Ανάλογα με τον τύπο της νόσου (διάχυτο ή εντοπισμένο σκληρόδερμα), anti-UL83 αντισώματα ανιχνεύθηκαν στους 35/40 (87,5%) ασθενείς με ΠΣΣκ και στους 34/44 (77,2%) ασθενείς με ΔΣΣκ, ($p=ns$). Στις ομάδες ελέγχου ανιχνεύθηκαν αντισώματα στους 22/30 (73,3%) ασθενείς με ΣκΠ (ΣΣκ ή τύποι ΣΣκ vs ΣκΠ, $p=ns$) καθώς και στους 17/28 (60,71%) υγιείς (ΣΣκ ή ΠΣΣκ vs ΥΜ, $p=0,02$. ΔΣΣκ vs ΥΜ, $p=ns$, ΣκΠ vs ΥΜ, $p=ns$). Επιπρόσθετα εάν οι οριακά θετικοί ασθενείς (θετικότητα 6-10 units) θεωρηθούν ως αρνητικοί, τότε θετικότητα (έντονη >11 units) έναντι του UL83 παρατηρήθηκε σε 50 (59,5%) ασθενείς με ΣΣκ και πιο συγκεκριμένα σε 21/40 ασθενείς με ΠΣΣκ και 29/44 ασθενείς με ΔΣΣκ (ΠΣΣκ vs ΔΣΣκ, $p=ns$) εν συγκρίσει με τους 15/30 (50%) ασθενείς με ΣκΠ (ΣΣκ ή τύποι ΣΣκ vs ΣκΠ, $p=ns$) και τους 11/28 (39,3%) των υγιών μαρτύρων (ΣΣκ vs NC, $p=ns$, ΠΣΣκ vs ΥΜ, $p=ns$, ΔΣΣκ vs ΥΜ, $p=0,027$. ΣκΠ vs ΥΜ, $p=ns$). Οι πίνακες 5.1 και 5.2 παρουσιάζουν τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα και τις συσχετίσεις με κλινικές παραμέτρους των ασθενών με ΣΣκ ανάλογα με το όριο θετικότητας για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης UL83 του HCMV. Η εικόνα 5.1 παρουσιάζει αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα αντιδραστικότητας έναντι του UL-83 στις διάφορες ομάδες ασθενών που μελετήθηκαν.

Οι τιμές των anti-UL83 αντισωμάτων (μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση, SD) στους ασθενείς και στους μάρτυρες έχουν ως εξής: 64,3 \pm 26,0 στους ασθενείς με ΣΣκ (62,9 \pm 25,5 στους ΠΣΣκ vs 66,3 \pm 27,2 στους ΔΣΣκ), 49,1 \pm 21,6 στους ασθενείς με ΣκΠ

($44,2 \pm 18,4$ στους ΕΥΣκΠ και $56,3 \pm 25,6$ AU στους ΔΠΣκΠ, ΣΣκ vs ΣκΠ, $p=0,030$, ΠΣΣκ vs ΣκΠ, $p=ns$, ΔΣΣκ vs ΣκΠ, $p=0,041$, ΠΣΣκ vs ΕΥΣκΠ $p=0,027$, ΠΣΣκ vs ΔΠΣκΠ, $p=ns$, ΔΣΣκ vs ΕΥΣκΠ $p=0,017$, ΔΣΣκ vs ΔΠΣκΠ $p=ns$) καθώς και $40,4 \pm 13,7$ στους ΥΜ (ΣΣκ ή τύποι ΣΣκ vs ΥΜ, $p<0,001$, ΣκΠ ή τύποι ΣκΠ vs ΥΜ $p=ns$) Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται συνοπτικά στην εικόνα 5.2).

Σε ότι αφορά μόνο τους ασθενείς που ανιχνεύθηκαν θετικοί για την παρουσία anti-UL83 οι τιμές αυτών (μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση, SD) έχουν ως εξής (εικόνα 5.3): Υψηλός και πολύ υψηλός τίτλος αντισωμάτων έναντι UL83 (μεγαλύτερος από 50 AU) ανευρέθηκε σε 34 ασθενείς με ΣΣκ (16 με ΠΣΣκ και 18 με ΔΣΣκ) 6 ασθενείς με ΣκΠ (2 ΕΥΣκΠ και 4 ΔΠΣκΠ) και 2 υγιείς μάρτυρες (7,1%) ΥΜ (ΣΣκ ή τύποι ΣΣκ vs ΥΜ, $p<0,001$, ΣΣκ vs ΣκΠ, $p=0,043$, ΔΣΣκ vs ΣκΠ, $p=0,049$, ΠΣΣκ vs ΣκΠ, $p=0,074$, ΣκΠ vs ΥΜ, $p=ns$).

Η αντιδραστικότητα του anti-UL83 αναλύθηκε περαιτέρω με πειράματα αραίωσης (1/200, 1/500, 1/5000). Μεταξύ των 10 πολύ θετικών anti-UL83 ασθενών, ανιχνεύτηκε ανοσοδραστικότητα των anti-UL83 σε 10 ασθενείς στην αραίωση 1/200, 8 ασθενείς στην αραίωση 1/500 και 3 ασθενείς στην αραίωση 1/5000. Δεν βρέθηκε συσχετισμός μεταξύ των anti-UL83 αντισωμάτων και των αυτοαντισωμάτων που σχετίζονται με την ΣΣκ (πίνακας 5.1). Η πιο συχνή συνύπαρξη αυτοαντισωμάτων και anti-UL83 που βρέθηκε ήταν το anti-Scl-70 (25/84, 29,8%) ακολουθεί το anti-CENP (16/84, 19%) και το anti-RNAPolymeraseIII (9/84, 10,7%). Όσον αφορά τα δημογραφικά στοιχεία στους ασθενείς με ΣΣκ δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ των anti-UL83(+) και των anti-UL83(-) όπως επίσης και στους τύπους της ΣΣκ ή στα κλινικά χαρακτηριστικά (έλκη, πνευμονική ίνωση, πνευμονική αρτηριακή υπέρταση) Εικόνα 5.4.



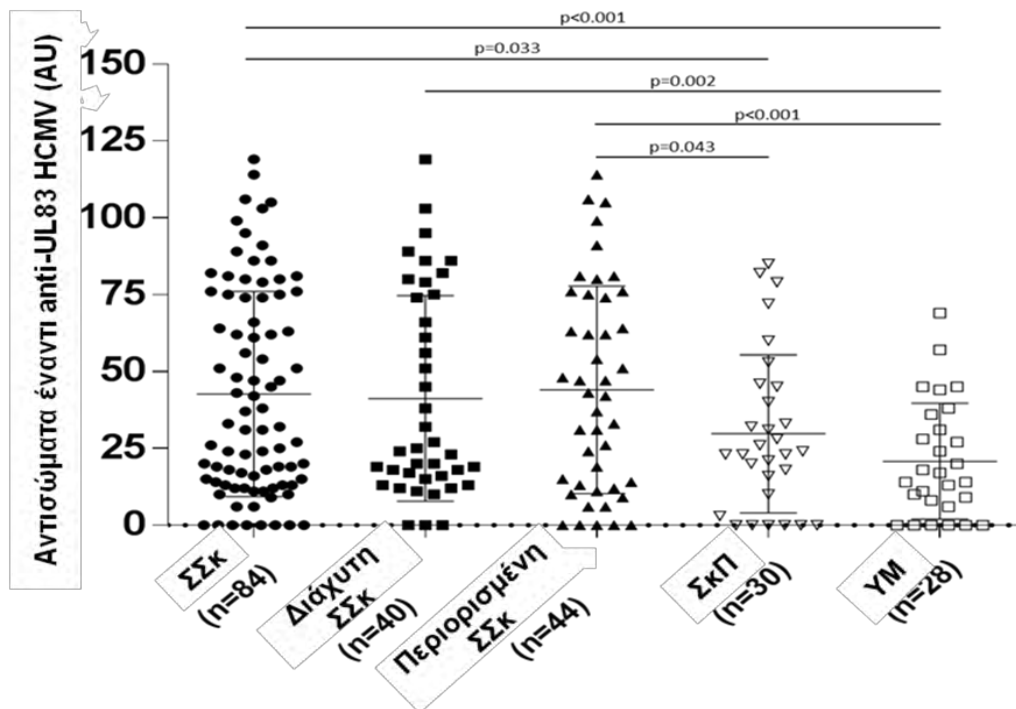
	p
ΣΣκ-ΣκΠ	0,030
ΣΣκ-ΥΜ	0,000
ΔΣΣκ-ΣκΠ	0,041
ΔΣΣκ-ΥΜ	0,001
ΠΣΣκ-ΣκΠ	0,068
ΠΣΣκ-ΥΜ	0,001

Εικόνα 5.2 Τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του UL83 του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (HCMV) σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (ΣΣκ) διάχυτη συστηματική σκλήρυνση (ΔΣΣκ), περιορισμένη συστηματική σκλήρυνση (ΠΣΣκ), σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣκΠ) καθώς και σε υγιείς μάρτυρες (ΥΜ). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε arbitrary units (AU). Το κατώτερο όριο θετικότητας που έχει οριστεί από τον κατασκευαστή είναι τα 11 AU. ΣΣκ: Συστηματική σκλήρυνση, ΔΣΣκ: Διάχυτη Συστηματική σκλήρυνση, ΠΣΣκ: Περιορισμένη Συστηματική Σκλήρυνση, ΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας, ΥΜ: Υγιείς μάρτυρες.

Πίνακας 5.2 Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΣΣκ (n=84) που συμπεριλήφθησαν στην μελέτη ανάλογα με την αντιδραστικότητα έναντι του UL83 αντιγόνου του HCMV (τα οριακά θετικά, 6-10 AU θεωρήθηκαν θετικά).

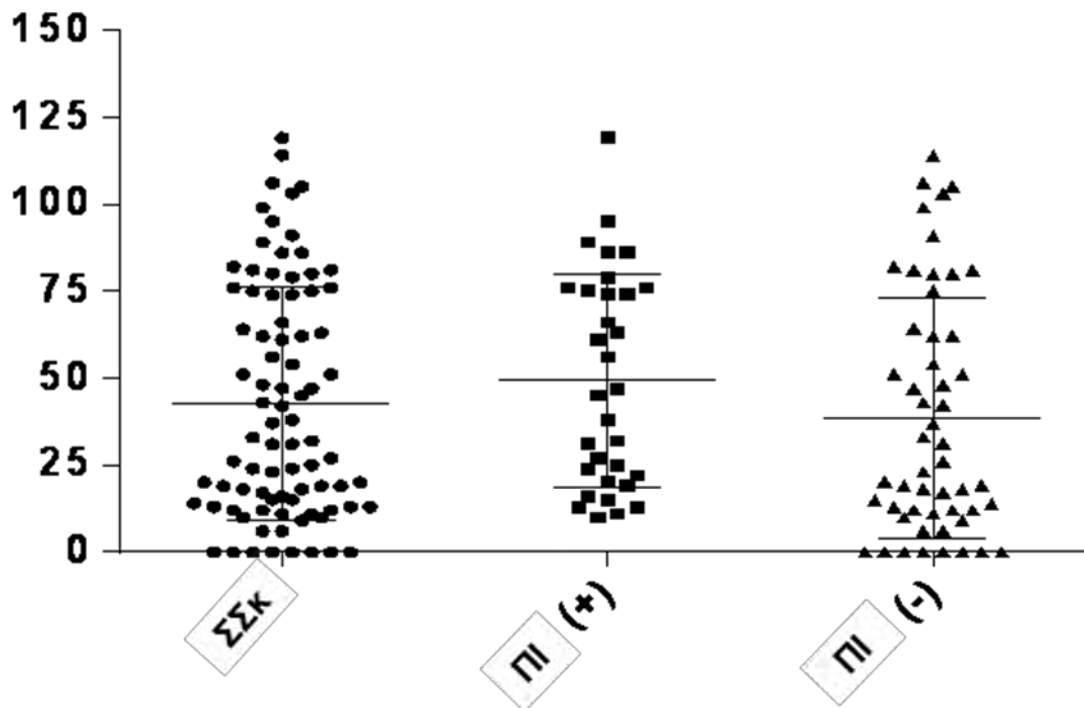
	Σύνολο ασθενών με ΣΣκ (n=84)	Anti-UL83 θετικοί* (n=69)	Anti-UL83 αρνητικοί (n=15)
Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά			
Μέση ηλικία, έτη (± SD)	53,9 (± 13,7)	56,5 (± 13,3)	53,5 (± 13,7)
Γυναίκες, n (%)	67 (79,8%)	54 (78,3%)	13 (86,7%)
/Ανδρες, n (%)	/17 (20,2%)	/15 (21,7%)	/2 (13,3%)
Τύπος Σκληροδέρματος			
• Περιορισμένο, n (%)	40 (47,6%)	35 (50,7%)	5 (33,3 %)
Γυναίκες, n (%) /			
Μέση ηλικία, έτη (±SD)	29 (72,5 %) /54,3 (± 12,9)	24 (68,6%) /52 (±13)	5 (100%) /47,2 (±12,2)
• Διάχυτο, n (%)			
Γυναίκες, n (%) /			
Μέση ηλικία, έτη (±SD)	44 (52,4%) 38 (86,4%) /60,1 (±13,3)	34 (49,3%) 30 (88,3%) /61 (±12,2)	10 (66,6%) 8 (80%) / 56,6 (±12,9)
Κλινικά χαρακτηριστικά			
Έλκος, n (%)	44 (52,4%)	36 (52,2%)	8 (53,3%)
Πνευμονική ίνωση, n (%)	32 (38,1%)	30 (43,5%)**	2 (13,3%)**
(p=0.039)	53 (63,1%)	45 (65,2%)	8 (53,3%)
Έλκος και/ή πνευμονική ίνωση, n (%)	20 (23,8%)	18 (26,1%)	2 (13,3%)
Έλκος και πνευμονική ίνωση, n (%)			
Ανίχνευση αυτοαντισωμάτων n (%)			
Anti-Scl-70	44 (52,4%)	37 (53,6%)	7 (46,7%)
Anti-CENPA	21 (25%)	18 (26,1%)	3 (20%)
Anti-CENPB	20 (23,8%)	17 (24,6%)	3 (20%)
Anti-CENPA or Anti-CENPB	21 (25%)	11 (26,1%)	2 (13,3%)
Anti-RNA pol III RP11	12 (14,3%)	10 (14,5%)	2 (13,3%)
Anti-RNA pol III RP155	15 (17,9%)	12 (17,4%)	3 (20%)
Anti-RP11 or RP155	15 (17,9%)	12 (17,4%)	3 (20%)
Anti-fibrillarin	1 (1,2%)	1 (1,5%)	0 (0 %)
Anti-NOR90	5 (6%)	5 (7,2%)	1 (6,7%)
Anti-Th/To	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (6,7%)
Anti-PM/Scl100	3 (3,6%)	3 (4,3%)	0 (0 %)
Anti-PM/Scl75	3 (3,6%)	3 (4,3%)	0 (0 %)
Anti-PM/Scl100 or PM/Scl75	3 (5%)	3 (4,3%)	0 (0 %)
Anti-Ku	2 (2,4 %)	2 (2,9%)	0 (0 %)
Anti-PDGFR	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Anti-Ro-52	18 (21,4 %)	14 (20,3%)	4 (26,7%)

** (anti-UL83 θετικά >11 AU (περιλαμβάνοντας τα οριακά θετικά anti-UL83) δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των anti-UL83 θετικών και των anti-UL83 αρνητικών ασθενών με ΣΣκ)**, p=0,067.



	p
ΣΣκ-ΣκΠ	0,033
ΣΣκ -ΥΜ	0,000
ΔΣΣκ-ΣκΠ	0,110
ΔΣΣκ -ΥΜ	0,002
ΠΣΣκ-ΣκΠ	0,043
ΠΣΣκ-ΥΜ	0, 000

Εικόνα 5.3 Τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι του UL83 του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (HCMV) των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (ΣΣκ) διάχυτη συστηματική σκλήρυνση (ΔΣΣκ), περιορισμένη συστηματική σκλήρυνση (ΠΣΣκ), σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣκΠ) καθώς και υγιών μαρτύρων (ΥΜ) που ανιχνεύθηκαν θετικοί για την παρουσία αντισωμάτων έναντι UL-83 (τίτλος > 11 AU) και οι μεταξύ των ομάδων συσχετίσεις. ΣΣκ: Συστηματική σκλήρυνση, ΔΣΣκ: Διάχυτη Συστηματική σκλήρυνση, ΠΣΣκ: Περιορισμένη Συστηματική Σκλήρυνση, ΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας, ΥΜ: Υγιείς μάρτυρες.



	Μέση τιμή ± SD
ΣΣκ	42,7 ± 33,4
ΠΙ (+)	49,5 ± 30,6
ΠΙ (-)	38,5 ± 34,7

Εικόνα 5.4 Τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι UL83 σε ασθενείς με ΣΣκ καθώς επίσης και με βάση την ύπαρξη ή όχι πνευμονικής ίνωσης (ΠΙ). Δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα των anti-UL83 μεταξύ των ασθενών με ΣΣκ που έχουν πνευμονική ίνωση και σε αυτούς που δεν έχουν (p=NS). ΣΣκ: Συστηματική σκλήρυνση, ΠΙ: Πνευμονική ίνωση.

Παρ' όλα αυτά η πνευμονική ίνωση έχει συσχετισθεί με υψηλά επίπεδα anti-UL83 αντισωμάτων (καθαρά θετικοί) ($p=0,039$). Αυτός ο συσχετισμός δεν έχει μεγάλη στατιστική βαρύτητα στους ασθενείς με ΣΣκ με οριακά και καθαρά θετικά anti-UL83 αντισώματα (cutoff 11 Aus) (46% vs 26,4%, $p=0,067$) πίνακας 5.1.

5.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας αυτής, επιβεβαιώνουν προηγούμενες προσπάθειες να συσχετισθεί ο HCMV και πιο συγκεκριμένα μια ανοσολογική απόκριση έναντι του UL83 με την ανάπτυξη της ΣΣκ. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι συγκρίνοντας anti-HCMV θετικούς ασθενείς με ΣΣκ και υγιείς μάρτυρες, τα anti-UL83 αντισώματα είναι πιο συχνά σε ασθενείς με ΣΣκ. Σε μια προηγούμενη εργασία από τους Namboodiri et al [310] μελετήθηκαν τα επίπεδα των anti-UL 83 αντισωμάτων σε ασθενείς με ΣΣκ καθώς και σε διάφορες άλλες ομάδες ατόμων ως παθολογικοί μάρτυρες (οστεοαρθρίτιδα, ινομυαλγία, ουρική αρθρίτιδα και άτομα με τοπικούς μυοσκελετικούς πόνους), ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι anti-HCMV αντισωμάτων και διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα anti-UL 83 αντισωμάτων στους ασθενείς με ΣΣκ. Η ερευνά μας, (η οποία εστιάστηκε μόνο στους anti-HCMV θετικούς ασθενείς και μάρτυρες), έδειξε επίσης ότι η αντιδραστικότητα έναντι του anti-UL83 ήταν ισχυρή και πολύ συχνή σε ασθενείς με ΣΣκ. Επιπλέον διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας anti-UL83 αντισωμάτων σε υψηλό τίτλο στους ασθενείς με ΣΣκ και της παρουσίας πνευμονικής ίνωσης. Επομένως, το αντιγόνο UL83 του HCMV είναι πιθανό αντιγόνο που μπορεί να πυροδοτήσει μια αυτοάνοση αντίδραση, αφού βρέθηκε ότι είναι ένα από τα πιο σημαντικότερα αντιγόνα που επάγει ειδική CTL και CD4 ανοσολογική απόκριση έναντι του ιού κατά την διάρκεια της φυσικής πορείας της λοίμωξης από HCMV [312]. Το UL83 του HCMV, σε πειραματικά μοντέλα οδήγησε στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων σε ποντίκια [313]. Επιπρόσθετα δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα ότι η αυξημένη αντιδραστικότητα έναντι

του UL83 να σχετίζεται με ανοσογενετικούς ή άλλους παράγοντες που χαρακτηρίζουν την νόσο της ΣΣκ, αφού οι μηχανισμοί της επίκτητης ανοσίας ενεργοποιούνται ισχυρά σε αυτήν την νόσο. Συμπερασματικά, η μελέτη μας αυτή η οποία εστιάστηκε σε ασθενείς με ΣΣκ που ήταν θετικοί για την παρουσία anti-HCMV αντισωμάτων, δείχνει μια σαφή συσχέτιση μεταξύ της υψηλής αντιδραστικότητας έναντι του UL-83 και της παρουσίας πνευμονικής ίνωσης. Μεγαλύτερες μελλοντικές έρευνες που θα εστιάσουν στην ανοσολογική απόκριση έναντι του anti-UL83 αντισώματος στους ασθενείς με πρώιμη μορφή ΣΣκ, χρειάζονται προκειμένου να ξεκαθαρισθεί κατά πόσο υπάρχει αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ του HCMV και της ανάπτυξης ΣΣκ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΤΟΥ HCMV ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΙ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ

6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιούμε έναν μεγάλο αριθμό ασθενών ώστε να μελετήσουμε την ανοσολογική ανταπόκριση εναντίον 6 κύριων αντιγόνων του HCMV, και συγκεκριμένα των UL57, UL83, UL55, UL44, p38 και UL99, ώστε να ανιχνεύσουμε την παρουσία και τον τίτλο των αντισωμάτων και να τα συσχετίσουμε με κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον συγκρίναμε την παρουσία αντισωμάτων έναντι HCMV αντιγόνων σε ασθενείς με ΣΣκ με την αντίστοιχη ανίχνευση τους σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣκΠ), η οποία επίσης θεωρείται ότι αποτελεί ένα μοντέλο ανοσοεπαγώμενης νευρολογικής νόσου.

6.2 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

Συνολικά μελετήθηκαν 110 ασθενείς με ΣΣκ (90 γυναίκες 81,8%, μέση ηλικία 55 έτη, εύρος 25-87 έτη), εκ των οποίων 59 με περιορισμένη ΣΣκ (51 γυναίκες 86,4%, μέση ηλικία 60 έτη, εύρος 34-87 έτη) και 59 με διάχυτη ΣΣκ (39 γυναίκες 76,5%, μέση ηλικία 50 έτη, εύρος 25-79 έτη). Τα συνολικά δημογραφικά, κλινικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 6.1.

Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 60 ασθενείς με ΣκΠ, ταυτισμένοι κατά ηλικία και φύλο με την ομάδα των ασθενών (όπως επίσης είχαν κοινή καταγωγή και εθνικότητα) (πίνακας 6.1) Οι 47 από τους ασθενείς με ΣκΠ ήταν γυναίκες (78,3%,

μέση ηλικία 54,5 έτη, εύρος 30-69 έτη), ενώ σε ότι αφορά τον υπότυπο της νόσου, 35 ασθενείς είχαν ΕΥΣκΠ (58.3% του συνόλου, 27 γυναίκες) και 25 ασθενείς ΔΠΣκΠ (41.7 του συνόλου, 20 γυναίκες). Οι ασθενείς παρακολουθούνταν στο Εξωτερικό Ιατρείο της Νευρολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Από το σύνολο των ασθενών με ΣκΠ, οι 22 δεν ελάμβαναν καμία θεραπεία. Από τους υπόλοιπους 38, οι 13 ασθενείς ελάμβαναν interferon-β (εκ των οποίων οι 7 ελάμβαναν interferon-beta-1a, και οι 6 interferon-beta-1β), 7 ασθενείς ελάμβαναν natalizumab (εξανθωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον του $\alpha_4\beta_1$ -μορίου κυτταρικής προσκόλλησης –ιντεγκρίνης-cell adhesion molecule α_4 -integrin), 6 ασθενείς ελάμβαναν fingolimod (τροποποιητής του υποδοχέα της φωσφορικής σφιγγοσίνης 1 -sphingosine-1-phosphate receptor modulator,-που καταστέλλει την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων σε επίπεδο λεμφαδένων μπλοκάροντας έτσι την αυτοάνοση αντίδραση), 8 ασθενείς ελάμβαναν glatiramer (μείγμα από πεπτίδια που αποτελούνται από 4 αμινοξέα και συγκεκριμένα τα γλουταμικό οξύ, γλυκίνη, αλανίνη και τυροσίνη , που αποτελούν τα βασικά αμινοξέα σύνθεσης της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης ώστε τα πεπτίδια να αποτελέσουν στροφή της επίθεσης του ανοσολογικού συστήματος προς αυτά), 3 ασθενείς ελάμβαναν τεριφλουνομίδη (ανοσοτροποποιητικό μόριο που μπλοκάρει την δράση του ενζύμου της dihydroorotate dehydrogenase και επομένως αναστέλλει την de novo σύνθεση της πυριμιδίνης) και ένας ασθενής ελάμβανε μιτοξανδρόνη (υδροχλωρική μιτοξανδρόνη-mitoxantrone hydrochloride, ένας παράγοντας που παρεμβάλλεται στο DNA και δημιουργεί χιασμούς και διασπάσεις αλυσίδων. Η υδροχλωρική μιτοξανδρόνη επίσης αλληλεπιδρά με το RNA και είναι ισχυρός αναστολέας της τοποϊσομεράσης).

Εξετάστηκαν επίσης 51 δείγματα υγείων μαρτύρων (34 γυναίκες, 66,7% του συνόλου, μέση ηλικία 53 έτη, εύρος 29-88 έτη) χωρίς προηγούμενο οικογενειακό

ιστορικό αυτοάνοσων διαταραχών ή χρόνιων νοσημάτων όπως καρκίνος, καρδιαγγειακές ασθένειες, υπέρταση, διαβήτης, ή κατάθλιψη.

Όλοι οι ασθενείς και τα άτομα ελέγχου παρέδωσαν γραπτή συναίνεση. Το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την οικεία Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας (Αριθμός πρωτοκόλλου: 2406/18-06-2015).

6.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΤΟΥ HCMV

Η ανταπόκριση των αντισωμάτων εναντίον συγκεκριμένων αντιγόνων του HCMV ελέγχθησαν με τη τεχνική της ανοσοαποτύπωσης [301], όπως προαναφέρθηκε στα προηγούμενα Κεφάλαια. Το κατώτερο όριο με βάση τον κατασκευαστή, είναι τα 10 AU, τιμές μεταξύ 11-22 AU θεωρούνται οριακά/γκρίζα ζώνη, ενώ τιμές μεγαλύτερες των 23 AU θεωρήθηκαν θετικές.

6.2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΣΣκ.

Όλοι οι οροί των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση ελέγχθηκαν για τη παρουσία ANA με ανοσοφθορισμό και αυτοαντισωμάτων που θεωρούνται ειδικά για την ΣΣκ όπως προαναφέρθηκε στα προηγούμενα Κεφάλαια.

6.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Όλα τα αποτελέσματα θετικότητας εκφράστηκαν ως ποσοστά επί τοις εκατό (%). Τα επίπεδα διακυμάνσεων των τιμών του κάθε αυτοαντισώματος που ανιχνεύθηκε εκφράστηκαν ως μέση τιμή και τυπική απόκλιση. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων ελέγχθηκαν με Pearsons chi-square, Fishers Exact test and t-test. Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές του p μικρότερες ή ίσες του 0,05. Όλοι οι στατιστικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα IBM SPSS Statistics version 20.

6.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.4.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ HCMV

Η παρουσία αντισωμάτων IgG έναντι διαφόρων αντιγόνων του HCMV όπως ανιχνεύτηκαν με ανοσοαποτύπωση Western αναφέρονται στον πίνακα 6.1.

Γενικά ανιχνεύτηκε παρουσία anti-HCMV αντισωμάτων σε 102 ασθενείς με ΣΣκ (92,7%) (54 ασθενείς με περιορισμένο σκληρόδερμα [91,5%], 48 με διάχυτο [94.1%]), εν συγκρίσει με τους 54 ασθενείς με ΣκΠ (31 με ΕΥΣκΠ [88.6%] και 23 με ΔΠΣκΠ [92%]), και σε 36 (70.6%) των υγιών μαρτύρων (ΥΜ) (Εικόνα 6.1).

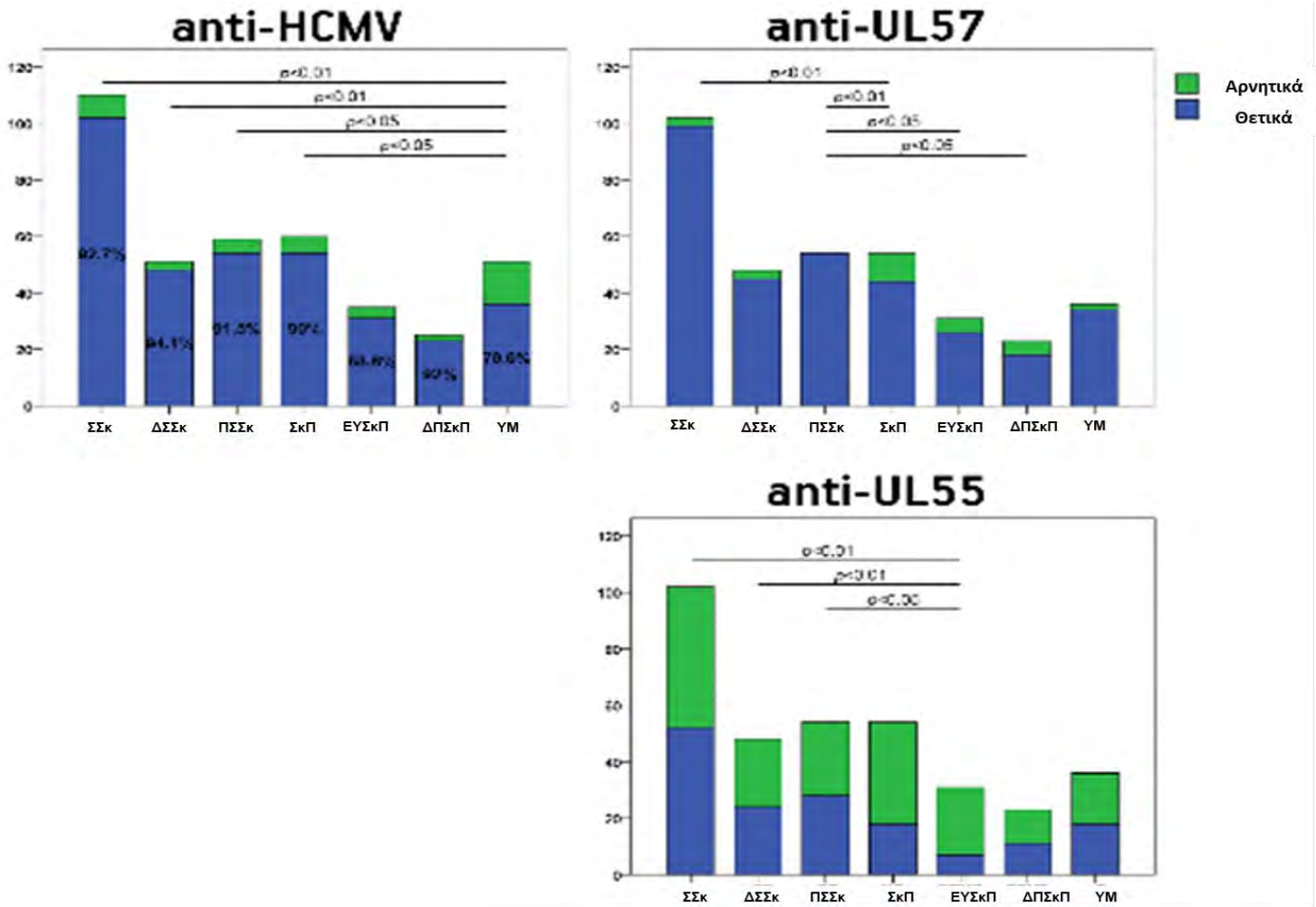
Η σύγκριση του ποσοστού θετικότητας μεταξύ των διαφόρων ομάδων έδειξε ότι οι ασθενείς με ΣΣκ είχαν αυξημένο ποσοστό ανίχνευσης anti-HCMV αντισωμάτων σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (ΣΣκ vs ΥΜ, $p < 0,001$). Το ίδιο αποτέλεσμα προκύπτει και από την σύγκριση υποτύπων του ΣΣκ (διάχυτο ή εντοπισμένο) με τους υγιείς (ΠΣΣκ vs ΥΜ, $p = 0,010$ και ΔΣΣκ vs ΥΜ, $p = 0,004$). Ομοίως οι ασθενείς με ΣκΠ είχαν αυξημένο ποσοστό ανίχνευσης anti-HCMV αντισωμάτων σε σχέση με τους υγιείς (ΣκΠ vs ΥΜ, $p = 0,018$). Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε σημαντική στατιστικώς διαφορά στην σύγκριση μεταξύ ασθενών με συστηματική σκλήρυνση και ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΣκ vs ΣκΠ, $p = ns$). (Εικόνα 6.1)

6.4.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΞΕΧΩΡΙΣΤΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΤΟΥ HCMV.

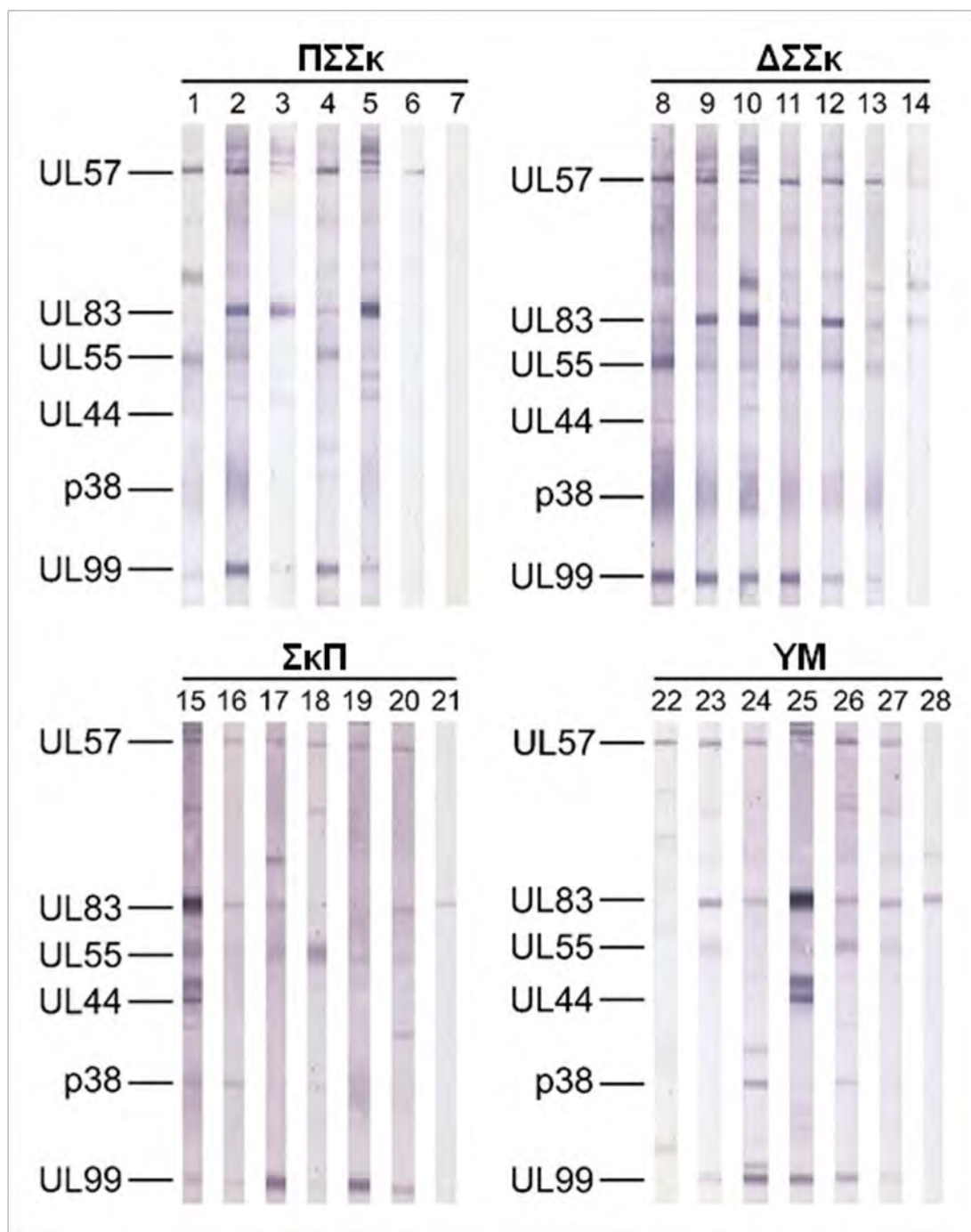
Όλοι οι θετικοί ασθενείς (ΣΣκ, και ΣκΠ) και υγιείς με παρουσία anti-HCMV αντισωμάτων, ελέχθησαν για αντιδραστικότητα έναντι των αντιγόνων UL57, UL83, UL55, UL44, p38 και UL99 με ανοσοαποτύπωση. Η εικόνα 6.2 δείχνει αντιπροσωπευτικά παραδείγματα ανίχνευσης διαφόρων αντισωμάτων σε διάφορους τίτλους σε όλες τις ομάδες που μελετήθηκαν ενώ οι πίνακες 6.2 και 6.3 συνοψίζουν τα αποτελέσματα ανίχνευσης τόσο ως ποσοστό αντισωμάτων (πίνακας 6.2) όσο και

ως σχετικές μονάδες μέτρησης (μέση τιμή και τυπική απόκλιση αντιδραστικότητας) (πίνακας 6.3) σε ασθενείς και μάρτυρες.

Τα πιο ανοσοδραστικά αντιγόνα στους ασθενείς με ΣΣκ ήταν τα UL57 (θετικότητα 97,1%), UL99 (θετικότητα 75,5%), UL83 (θετικότητα, 68,6%) και το UL55 (θετικότητα, 51%). (πίνακας 6.2) Συγκρίνοντας τις αντιδραστικότητες αυτές στους ασθενείς με ΣΣκ σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες προκύπτει ότι η αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι του UL83 ήταν λιγότερο συχνή στους ασθενείς με ΣΣκ από ότι στους μάρτυρες (ΣΣκ vs ΥΜ:68,6% vs 88,9%, $p=0.031$). Αντίθετα η αντιδραστικότητα έναντι των υπολοίπων αντιγόνων (UL57, UL55, UL44, P38, UL99) ήταν παρόμοια και στους ΣΣκ ασθενείς και στους ΥΜ. Τέλος συγκρίνοντας τα ποσοστά θετικότητας μεταξύ ΣΣκ και ΣκΠ προκύπτει ότι η αντιδραστικότητα έναντι του UL57 ήταν πιο συχνή στους ασθενείς με ΣΣκ απ' ότι στους ΣκΠ (ΣΣκ vs ΣκΠ: 97,1% vs 81,5%, $p=0,002$), ενώ οι αντιδραστικότητες στα υπόλοιπα αντιγόνα δεν είχαν στατιστικές διαφορές μεταξύ ασθενών με ΣΣκ και ΣκΠ.



Εικόνα 6.1 Διαγράμματα που απεικονίζουν τον αριθμό των θετικών και των αρνητικών ατόμων για ανίχνευση anti-HCMV στον ορό ασθενών με συστηματική σκλήρυνση, (τόσο ασθενείς με περιορισμένη συστηματική σκλήρυνση-ΠΣΣκ) όσο και με διάχυτη συστηματική σκλήρυνση-ΔΣΣκ), και στις ομάδες ελέγχου (ασθενείς με δευτεροπαθώς προοδευτική Σκλήρυνση κατά πλάκας με υποτροπές και υφέσεις-ΕΥΣκΠ) και ασθενείς με σταθερή προοδευτική σκλήρυνση κατά πλάκας-ΔΠΣκΠ) όπως και σε υγιείς μάρτυρες (ΥΜ), καθώς επίσης και αντιδραστικότητα έναντι του UL-57 και του UL-55. ΣΣκ: Συστηματική Σκλήρυνση, ΠΣΣκ: Περιορισμένη Συστηματική Σκλήρυνση, ΔΣΣκ: Διάχυτη Συστηματική Σκλήρυνση, ΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας, ΥΜ: Υγιείς μάρτυρες, ΕΥΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας με εξάρσεις και υφέσεις, ΔΠΣκΠ: Δευτεροπαθώς Προοδευτική σκλήρυνση κατά πλάκας.



Εικόνα 6.2 Αντιδραστικότητα αντισωμάτων εναντίον αντιγόνων του HCMV χρησιμοποιώντας την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, σε ασθενείς με περιορισμένη συστηματική σκλήρυνση (ΠΣΣκ 1-7), σε ασθενείς με διάχυτη συστηματική σκλήρυνση, (ΔΣΣκ 8-14), σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣκΠ, 15-21) και σε υγιείς μάρτυρες (ΥΜ, 22-28). ΣΣκ: Συστηματική Σκλήρυνση, ΠΣΣκ: Περιορισμένη Συστηματική Σκλήρυνση, ΔΣΣκ: Διάχυτη Συστηματική Σκλήρυνση, ΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας, ΥΜ: Υγιείς Μάρτυρες.

Πίνακας 6.1 Τα κύρια δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά 110 ασθενών με συστηματική σκλήρυνση, (59 με περιορισμένη μορφή και 51 με διάχυτη συστηματική σκλήρυνση (ΔΣΣκ), 60 ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας ΣκΠ (35 με ΕΥΣκΠ και 25 με ΔΠΣκΠ), και 51 υγιών μαρτύρων που συμπεριλήφθησαν στην μελέτη.

	ΣΣκ (n=110)	ΠΣΣκ (n=59)	ΔΣΣκ (n=51)	ΣκΠ (n=60)	ΥΜ (n=51)	ρΣΣκ vs ΣκΠ	ρΣΣκ vs ΥΜ	ρΠΣΣκ vs ΔΣΣκ	ρΠΣΣκ vs ΥΜ	ρΔΣΣκ vs ΥΜ
Ηλικία	56,1 ± 13,8	59 ± 13,8	52,7 ± 13	52,8 ± 8,8	52,5 ± 11,5	ns*	ns *	0,016*	0,009*	ns *
Φύλο										
Άντρες	20 (18,2%)	8 (13,6%)	12 (23,5%)	13 (21,7%)	17 (33,3%)	ns **	0,054**	ns **	0,025**	ns **
Γυναίκες	90 (81,8%)	51 (86,4%)	39 (76,5%)	47 (78,3%)	34 (66,7%)					
Πνευμονική Ίνωση	37 (33,6%)	6 (10,2%)	31 (60,8%)	NA	NA	NA	NA	<0.001*	NA	NA
Έλκη	51 (46,4%)	24 (40,7%)	27 (52,9%)	NA	NA	NA	NA	ns*	NA	NA
Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση	16 (14,5%)	7 (11,9%)	9 (17,6%)	NA	NA	NA	NA	ns*	NA	NA
Επιπλοκές γαστρεντερικού										
Ανώτερο	63 (57,3%)	31 (52,5%)	32 (62,7%)	NA	NA	NA	NA	ns**	NA	NA
Ανώτερο & Κατώτερο	4 (3,6%)	3 (5,2%)	1 (2%)	NA	NA	NA	NA		NA	NA
Καμία	43 (39,1%)	25 (42,4%)	18 (35,3%)							
Αρθρίτιδα	25 (22,7%)	15 (25,4%)	10 (19,6%)	NA	NA	NA	NA	ns**	NA	NA
Ορογονίτιδα	9 (8,2%)	6 (10,2%)	3 (5,9%)	NA	NA	NA	NA	ns **	NA	NA
Τηλεγγεκτασία	66 (60%)	33 (55,6%)	33 (64,7%)	NA	NA	NA	NA	ns **	NA	NA
Ασβέστωση	15 (13,6%)	7 (11,9%)	8 (15,7%)	NA	NA	NA	NA	ns **	NA	NA
Νεφρική κρίση	3 (2,7%)	1 (1,7%)	2 (3,9%)	NA	NA	NA	NA	ns **	NA	NA
Επικάλυψη ασθένειας	11 (10%)	5 (10,2%)	5 (9,8%)	NA	NA	NA	NA	ns **	NA	NA
Anti-Toro I αντισώματα	43 (39,1%)	14 (23,7%)	29 (56,9%)	NA	NA	NA	NA	0.001**	NA	NA
Anti-CEN αντισώματα	30 (27,3%)	25 (42,4%)	5 (9,8%)	NA	NA	NA	NA	<0.001**	NA	NA
Anti-RNApol III αντισώματα	12 (10,9%)	6 (10,2%)	6 (11,8%)	NA	NA	NA	NA	ns*	NA	NA
HCMV θετικότητα	102 (92,7%)	54 (91,5%)	48 (94,1%)	54 (90%)	36 (70,6%)	ns**	<0,001**	ns**	0,010**	0,004**

Τα ποσοτικά δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Τα ποιοτικά δεδομένα εκφράζονται ως αριθμοί και σε παρένθεση αναφέρεται το % ποσοστό. **p* τιμές στατιστικώς σημαντικές χρησιμοποιώντας 2-tailed t-test, (οι ίσες μεταβλητές δεν συναρροίζονται). ***p*-τιμές στατιστικής σημαντικότητας που υπολογίσθηκαν χρησιμοποιώντας Pearson Chi-square ή Fisher's Exact Test (2-sided), *p* τιμές μικρότερες του 0.005 (στατιστικώς σημαντικές) επισημαίνονται με έντονα γράμματα. Επισημαίνονται επίσης και οι *p* τιμές που έχουν μια τάση για στατιστική συσχέτιση (<0.100). Συντομογραφίες: CEN: αντικεντρομεριδιακά HCMV: ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός NA: μη διαθέσιμο ns: μη σημαντικό RNApolIII: RNA πολυμεράσηIII Toro I: Τοποϊσομεράση I.ΣΣκ: Συστηματική σκλήρυνση, ΠΣΣκ: Περιορισμένη Συστηματική Σκλήρυνση, ΔΣΣκ: Διάχυτη Συστηματική Σκλήρυνση, ΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας, ΥΜ: Υγιείς μάρτυρες.

6.4.3 Anti-HCMV ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΥΠΟΤΥΠΟΥΣ ΤΗΣ ΣΣκ

Οι ασθενείς με ΣΣκ που ήταν θετικοί για την παρουσία anti-HCMV αντισωμάτων δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ ασθενών με διάχυτη και συστηματική μορφή σκληροδέρματος (πίνακας 6.1) (91,5% vs 94,1%, $p=ns$).

Συγκρίνοντας την παρουσία αλλά και τον τίτλο αντισωμάτων έναντι διαφόρων αντιγόνων του ιού μεταξύ ασθενών με διάχυτο και περιορισμένο σκληρόδερμα προκύπτει ότι υπάρχει στατιστικώς μειωμένη αντιδραστικότητα έναντι του UL83 στην διάχυτη μορφή (64,6% στην διάχυτη vs 88,9%, στην περιορισμένη μορφή, $p=0,022$) και αντίστροφα μειωμένη αντιδραστικότητα έναντι του p38 στην περιορισμένη μορφή σε σχέση με την διάχυτη (9,3% vs 27,8%, $p=0,043$). Οι αντιδραστικότητες έναντι των υπολοίπων αντιγόνων (UL57, UL55, UL44, UL99) μεταξύ των δύο μορφών της ΣΣκ ήταν παρόμοιες (πίνακας 6.2).

Συγκρίνοντας τους ασθενείς με διάχυτο ή περιορισμένο σκληρόδερμα με τους ασθενείς με ΣκΠ και τους ξεχωριστούς υπότυπους αυτού, η αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι του UL57 ήταν πιο συχνή στους ασθενείς με περιορισμένη ΣΣκ εν συγκρίσει με τους ασθενείς με ΣκΠ και τους υποτύπους αυτού ΕΥΣκΠ και ΔΠΣκΠ ($p \leq 0,01$ για όλες τις συγκρίσεις), ενώ η αντιδραστικότητα των anti-UL55 αντισωμάτων ήταν πιο συχνή τόσο στους ασθενείς με περιορισμένη όσο και στους ασθενείς με διάχυτη μορφή σκληροδέρματος εν συγκρίσει με τους ΕΥΣκΠ. Αντίθετα, η αντιδραστικότητα έναντι του p38 ήταν λιγότερο συχνή στους ασθενείς με περιορισμένη μορφή ΣΣκ εν συγκρίσει με τους ΕΥΣκΠ (Πίνακας 6.2)

Πίνακας 6.2. Η ανοσοδραστικότητα των συγκεκριμένων αντιγόνων του HCMV όπως ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης Western σε 102 ασθενείς με ΣΣκ, εκ των οποίων 54 με περιορισμένο σκληρόδερμα και 48 με διάχυτο (ΔΣΣκ), 54 ασθενείς με ΣκΠ εκ των οποίων 31 με ΕΥΣκΠ και 23 με ΔΠΣκΠ, και 36 υγιείς μάρτυρες.

	ΣΣκ (n=102)	ΠΣΣκ (n=54)	ΔΣΣκ (n=48)	ΣκΠ (n=54)	ΕΥΣκΠ (n=31)	ΔΠΣκΠ (n=23)	ΥΜ (n=36)	ρΣΣκ vs ΣκΠ	ρΣΣκ vs ΥΜ	ρΠΣΣκ vs ΔΣΣκ	ρΠΣΣκ vs ΥΜ	ρΔΣΣκ vs ΥΜ
UL57 θετικότητα	99 (97,1%)	54 (100%)	45 (93,8%)	44 (81,5%)	26 (83,9%)	18 (78,3%)	34 (94,4%)	0,002	ns	ns	ns	ns
UL83 θετικότητα	70 (68,6%)	39 (72,2%)	31 (64,6%)	30 (55,6%)	18 (58,1%)	12 (52,2%)	32 (88,9%)	ns	0,031	ns	ns	0,022
UL55 θετικότητα	52 (51%)	28 (51,9%)	24 (50%)	18 (33,3%)	7 (22,6%)	11 (47,8%)	18 (50%)	0.052	ns	ns	ns	ns
UL44 θετικότητα	17 (16,7%)	8 (14,8%)	9 (18,8%)	9 (16,7%)	6 (19,4%)	3 (13%)	10 (27,8%)	ns	ns	ns	ns	ns
p38 θετικότητα	16 (15,7%)	5 (9,3%)	11 (22,9%)	15 (27,8%)	10 (32,3%)	5 (21,7%)	10 (27,8%)	ns	ns	ns	0,043	ns
UL99 θετικότητα	77 (75,5%)	39 (72,2%)	38 (79,2%)	44 (81,5%)	26 (83,9%)	18 (78,3%)	32 (88,9%)	ns	ns	ns	ns	ns

	ρ ΣΣκ vs ΕΥΣκΠ	ρ ΣΣκ vs ΔΠΣκΠ	ρ ΠΣΣκ vs ΣκΠ	ρ ΠΣΣκ vs ΕΥΣκΠ	ρ ΠΣΣκ vs ΔΠΣκΠ	ρ ΔΣΣκ vs ΣκΠ	ρ ΔΣΣκ vs ΕΥΣκΠ	ρ ΔΣΣκ vs ΔΠΣκΠ	ρ ΣκΠ vs ΥΜ	ρ ΕΥΣκΠ vs ΥΜ	ρ ΔΠΣκΠ vs ΥΜ
UL57 θετικότητα	0,023	0,004	0,003	0,010	0,002	ns	Ns	ns	ns	ns	ns
UL83 θετικότητα	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	0,002	0,009	0,004
UL55 θετικότητα	0,010	ns	0,080	0,016	ns	ns	0,028	ns	ns	0,039	ns
UL44 θετικότητα	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns
p38 θετικότητα	<u>0,075</u>	ns	0,026	0,017	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns
UL99 θετικότητα	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns

Τα δεδομένα εκφράζονται ως αριθμοί και σε παρένθεση αναφέρεται το % ποσοστό. Οι p τιμές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το Pearson Chi-square ή το Fisher's Exact Test (2 sided) Διόρθωση συνέχειας κατά Yates. Οι υπογραμμισμένες p τιμές αναφέρονται σε μεγαλύτερη συχνότητα στην ομάδα ελέγχου. Οι p τιμές <0,005 επισημαίνονται με έντονα γράμματα. Επισημαίνονται επίσης οι p τιμές που έχουν μια τάση για στατιστική συσχέτιση (<0,100) Συνομογραφίες: ns: μη σημαντικό. ΣΣκ: Συστηματική σκλήρυνση, ΠΣΣκ: Περιορισμένη Συστηματική Σκλήρυνση, ΔΣΣκ: Διάχυτη Συστηματική Σκλήρυνση, ΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας, ΥΜ: Υγιείς μάρτυρες, ΕΥΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας με εξάρσεις και υφέσεις, ΔΠΣκΠ: Δευτεροπαθώς Προοδευτική σκλήρυνση κατά πλάκας.

Πίνακας 6.3 Ο τίτλος δραστηριότητας των αντισωμάτων εναντίον των αντιγόνων του HCMV όπως μετρήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης σε θετικούς ασθενείς με ΣΣκ, συμπεριλαμβανομένου και των ασθενών με περιορισμένο και διάχυτο σκληρόδερμα, ασθενείς με ΣκΠ συμπεριλαμβανομένου και τους ασθενείς με ΕΥΣκΠ και ΔΠΣκΠ, καθώς επίσης και τους ΥΜ.

	ΣΣκ (n=102)	ΠΣΣκ(n=54)	ΔΣΣκ (n=48)	ΣκΠ (n=54)	ΕΥΣκΠ (n=31)	ΔΠΣκΠ(n=23)	ΥΜ (n=36)	ρΣΣκ vs ΣκΠ	ρΣΣκ vs ΥΜ	ρΠΣΣκ vs ΔΣΣκ	ρΠΣΣκ vs ΥΜ	ρΔΣΣκ vs ΥΜ
UL57	64,7 ± 17,4	64,3 ± 17,8	65 ± 17,2	51,7 ± 15,9	49,2 ± 14,2	55,3 ± 14,2	43,4 ± 14,2	<0,001	<0,001	ns	<0,001	<0,001
UL83	77,2 ± 31,2	74,4 ± 30,4	80,8 ± 32,2	65,5 ± 33,3	63,4 ± 31,4	68,7 ± 37,2	63,2 ± 31,4	ns	0,040	ns	ns	0,032
UL55	41,2 ± 14,8	38,6 ± 10,5	44,3 ± 18,3	39,6 ± 9,7	37,9 ± 5,5	40,7 ± 11,8	41,2 ± 13,4	ns	ns	ns	ns	ns
UL44	66,9 ± 27,6	70,8 ± 23,7	63,6 ± 31,7	65,1 ± 23,3	66,2 ± 23,5	63 ± 28	53,3 ± 27,8	ns	ns	ns	ns	ns
p38	48,4 ± 18,7	37,2 ± 10,3	53,5 ± 19,7	54,3 ± 16,8	49,9 ± 17,7	63 ± 11,7	50,1 ± 16,8	ns	ns	0,049	0,092	ns
UL99	62,3 ± 20,9	59,8 ± 20,2	64,9 ± 21,6	56,7 ± 19,9	54,8 ± 21,2	59,4 ± 18,1	53,1 ± 19,7	ns	0,032	ns	ns	0,019

	ρΠΣΣκ vs ΣκΠ	ρΔΣΣκ vs ΣκΠ	ρΠΣΣκ vs ΕΥΣκΠ	ρΔΣΣκ vs ΕΥΣκΠ	ρΠΣΣκ vs ΔΠΣκΠ	ρΔΣΣκ vs ΔΠΣκΠ	ρ ΣκΠ vs ΥΜ	ρ ΕΥΣκΠ vs ΥΜ	ρ ΔΠΣκΠ vs ΥΜ			
UL57	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,065	0,057	0,017	ns	0,021			
UL83	ns	0,074	ns	0,073	ns	Ns	ns	ns	ns			
UL55	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns			
UL44	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns			
p38	0,020	ns	ns	ns	0,006	Ns	ns	ns	ns			
UL99	ns	0,080	ns	0,070	ns	Ns	ns	ns	ns			

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση σε σχετικές (AU). Οι ρ τιμές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το 2-tailed t-test, ίσες μεταβλητές δεν συναθροίζονται, ή το 2-tailed many-Whitney test. Οι ρ τιμές <0,005 επισημαίνονται με έντονα γράμματα. Επισημαίνονται επίσης οι ρ τιμές που έχουν μια τάση για στατιστική συσχέτιση. Συντομογραφίες: ns: μη σημαντικό. ΣΣκ: Συστηματική σκλήρυνση, ΠΣΣκ: Περιορισμένη Συστηματική Σκλήρυνση, ΔΣΣκ: Διάχυτη Συστηματική Σκλήρυνση, ΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας, ΥΜ: Υγιείς μάρτυρες, ΕΥΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας με εξάρσεις και υφέσεις, ΔΠΣκΠ: Δευτεροπαθώς Προοδευτική σκλήρυνση κατά πλάκας.

6.4.4 ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ Anti-HCMV ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ

Τα διαγράμματα συνύπαρξης αντιδραστικότητας έναντι πολλαπλών HCMV αντιγόνων φαίνονται στην εικόνα 6.3 και στον πίνακα 6.4. Μετά από σύγκριση θετικών για anti-HCMV ασθενών με ΣΣκ με υγιείς μάρτυρες παρατηρήσαμε ότι οι ΣΣκ είχαν αντιδραστικότητα έναντι λιγότερων αντιγόνων σε σύγκριση με τους ΥΜ. Πιο συγκεκριμένα το 29,4% των ασθενών με ΣΣκ είχαν αντιδραστικότητα έναντι ενός ή δύο αντιγόνων του HCMV, 55,9% είχαν αντιδραστικότητα έναντι 3 ή 4 αντιγόνων και το 14,7% είχε αντιδραστικότητα έναντι 5 ή 6 αντιγόνων του HCMV εν συγκρίσει με το 13,9% των ΥΜ που είχαν αντιδραστικότητα έναντι 1 ή 2 αντιγόνων του ιού, 52,8% είχε αντιδραστικότητα έναντι 3 ή 4 αντιγόνων, και το 33,3% είχε αντιδραστικότητα έναντι 5 ή 6 αντιγόνων ($p=0,026$). Επιπρόσθετα και οι ασθενείς με ΣκΠ είχαν ενεργότητα σε λιγότερες μπάντες εν συγκρίσει με τους ΥΜ. Αντίθετα η σύγκριση μεταξύ ασθενών με ΣΣκ και ασθενών με ΣκΠ δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Εν συνεχεία αναλύσαμε την επικαλυπτόμενη αντιδραστικότητα έναντι των 4 πιο ανοσοδραστικών αντιγόνων του ιού και συγκεκριμένα έναντι των πρωτεϊνών UL57, UL83, UL55, UL99 (εικόνα 6.3). Παρατηρήσαμε έναν στατιστικά αυξημένο ποσοστό τετραπλής και τριπλής (UL57/UL83/UL99) αντιδραστικότητας στους ασθενείς με διάχυτη μορφή σκληροδέρματος εν συγκρίσει με τους ασθενείς με ΕΥΣκΠ ($p=0,029$) (πίνακας 6.5).

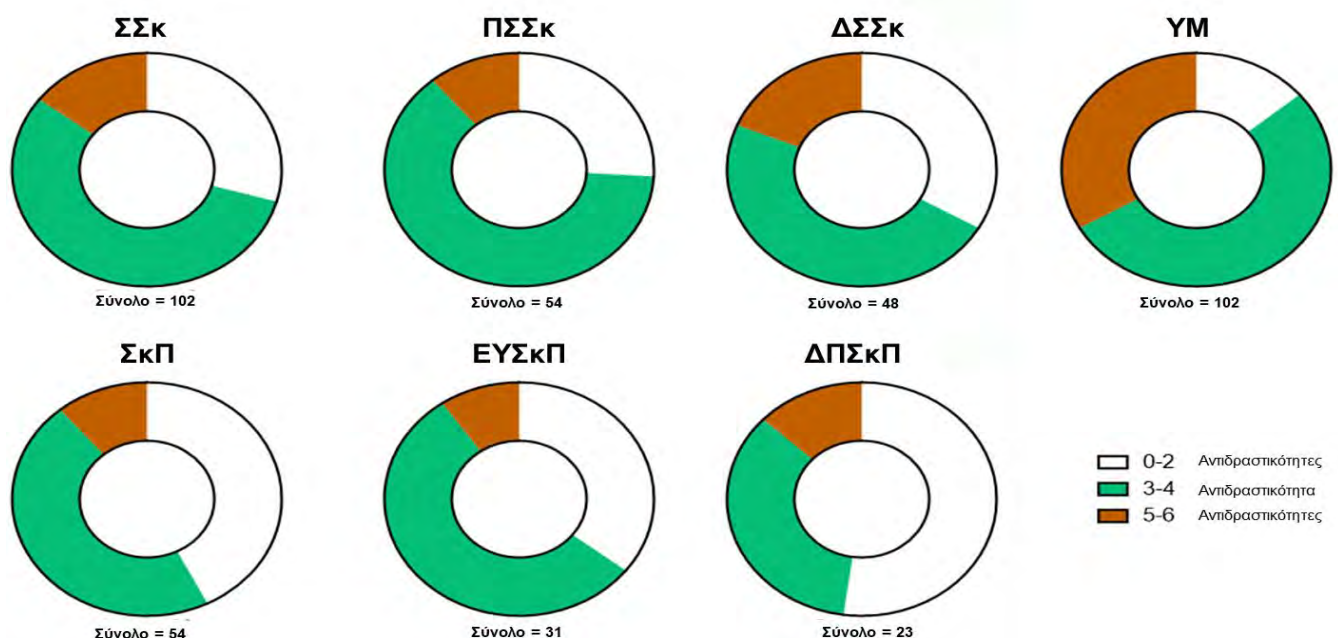
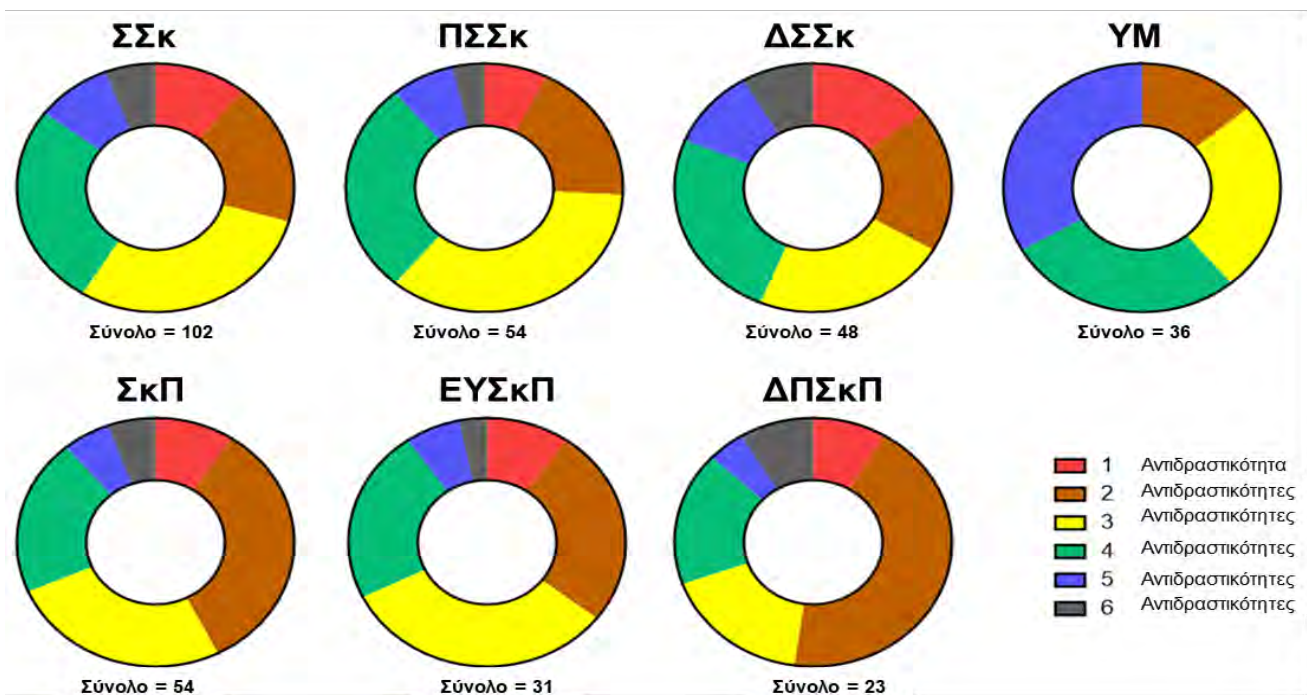
6.4.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΙΤΛΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΤΟΥ HCMV

Τα επίπεδα αντιδραστικότητας έναντι των διαφόρων αντιγόνων του HCMV παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 6.3 και στην εικόνα 6.1. Η αντιδραστικότητα έναντι του UL57 ήταν πιο έντονη στους ασθενείς με ΣΣκ, τόσο

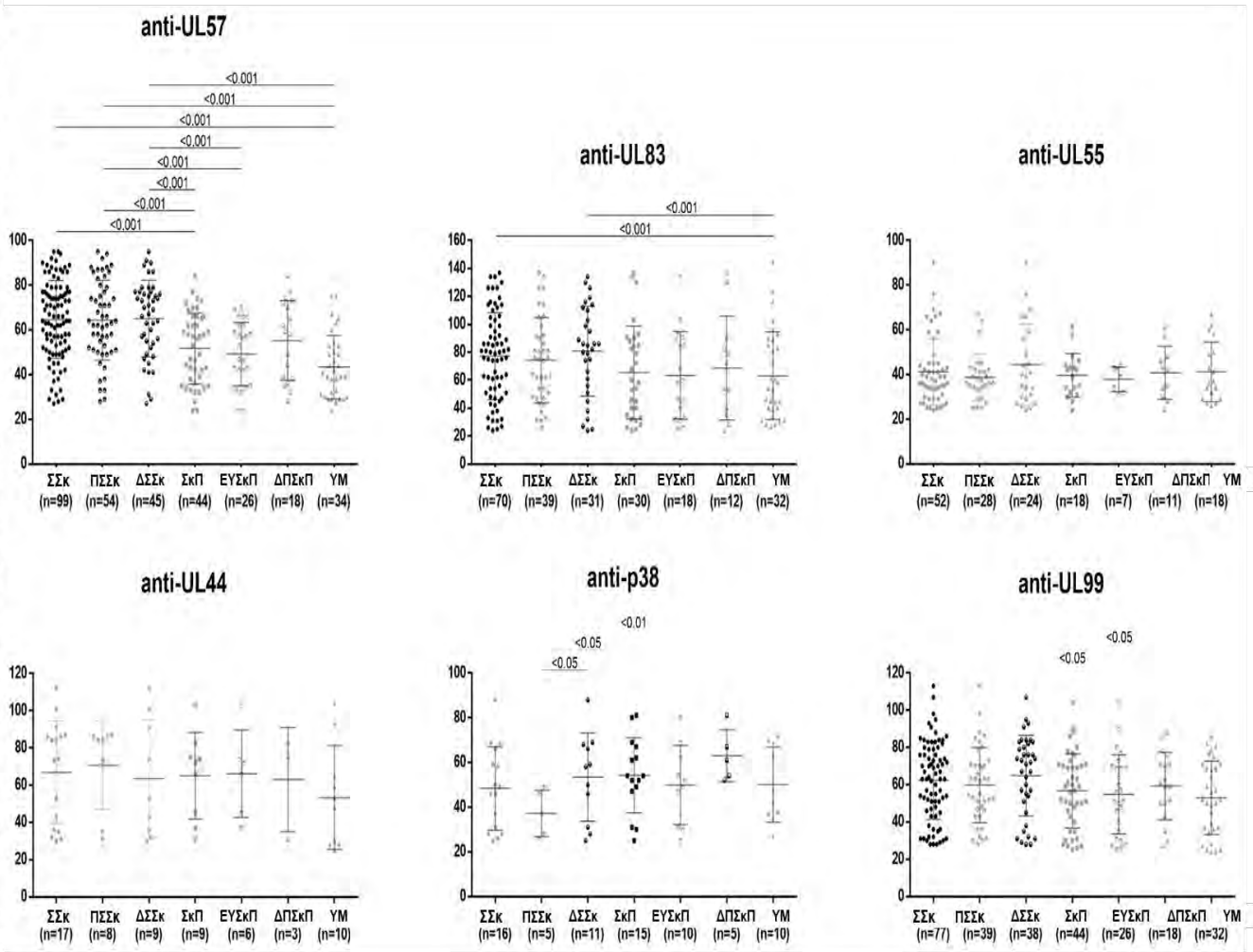
αυτών με διάχυτη όσο και αυτών με περιορισμένη μορφή, εν συγκρίσει με τους YM ($p < 0,001$ για όλες τις συσχετίσεις). Επιπρόσθετα, ο τίτλος των αντισωμάτων έναντι των UL83 και UL99 ήταν υψηλότερος στους ασθενείς με ΣΣκ και στους ασθενείς με διάχυτη μορφή ΣΣκ, σε σύγκριση με τους YM (ΣΣκ vs YM: $p = 0,040$ και ΔΣΣκ vs YM: $p = 0,032$ για την πρωτεΐνη UL57; ΣΣκ vs YM: $p = 0,032$ και ΔΣΣκ vs YM: $p = 0,019$ για την πρωτεΐνη UL99). (Εικόνα 6.4)

Διαφορές παρατηρήθηκαν επίσης και μεταξύ των ασθενών με ΣΣκ και των ασθενών με ΣκΠ ως προς τον τίτλο των αντισωμάτων έναντι του UL57. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αυξημένος τίτλος έναντι του UL57 μεταξύ των ασθενών με ΣΣκ (καθώς και των υποτύπων ΠΣΣκ και ΔΣΣκ) εν συγκρίσει με τους ασθενείς με ΣκΠ (και τον υπότυπο ΕΥΣκΠ) ($p < 0,001$ για όλες τις συσχετίσεις). Αντιθέτως οι τίτλοι έναντι του p38 ήταν χαμηλότεροι στους ασθενείς με περιορισμένη μορφή ΣΣκ εν συγκρίσει με τους ασθενείς με ΣκΠ και κυρίως με τους ασθενείς με υπότυπο ΔΠΣκΠ ($p = 0,020$ και $p = 0,006$ αντίστοιχα). (Εικόνα 6.4)

Όσον αφορά τον τίτλο των αντισωμάτων στους δύο υποτύπους του ΣΣκ, ο τίτλος των anti-p38 ήταν σημαντικά αυξημένος στους ασθενείς με διάχυτο σκληρόδερμα εν συγκρίσει με τους ασθενείς με περιορισμένη μορφή σκληροδέρματος. Καμία άλλη διαφορά έναντι άλλων αντιγόνων του HCMV δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των δυο υποτύπων. Τέλος, όπως ήταν αναμενόμενο η ύπαρξη αντιδραστικότητας έναντι κάποιου αντιγόνου του HCMV, σχετίζεται με τη συνύπαρξη αντιδραστικότητας έναντι και άλλου αντιγόνου του ιού (πίνακας 6.6)



Εικόνα 6.3 Διαγράμματα πίτας τα οποία απεικονίζουν την αναλογία των δειγμάτων ορών των 102 anti-HCMV ασθενών με συστηματική σκλήρυνση, συμπεριλαμβανομένου 54 ασθενών με (ΠΣΣκ) και 48 ασθενών με (ΔΣΣκ), 54 ασθενών anti-HCMV με σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣκΠ), συμπεριλαμβανομένου 31 ασθενών με ΕΥΣκΠ και 23 με ΔΠΣκΠ, 36 υγιείς μάρτυρες θετικοί anti-HCMV, οι οποίοι εμφάνιζαν αντίδραση σε πολλαπλά αντιγόνα του HCMV όπως UL57, UL83, UL55, UL44, P38 και UL99. ΣΣκ: Συστηματική σκλήρυνση, ΠΣΣκ: Περιορισμένη Συστηματική Σκλήρυνση, ΔΣΣκ: Διάχυτη Συστηματική Σκλήρυνση, ΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας, ΥΜ: Υγιείς μάρτυρες, ΕΥΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας με εξάρσεις και υφέσεις, ΔΠΣκΠ: Δευτεροπαθώς Προοδευτική σκλήρυνση κατά πλάκας.

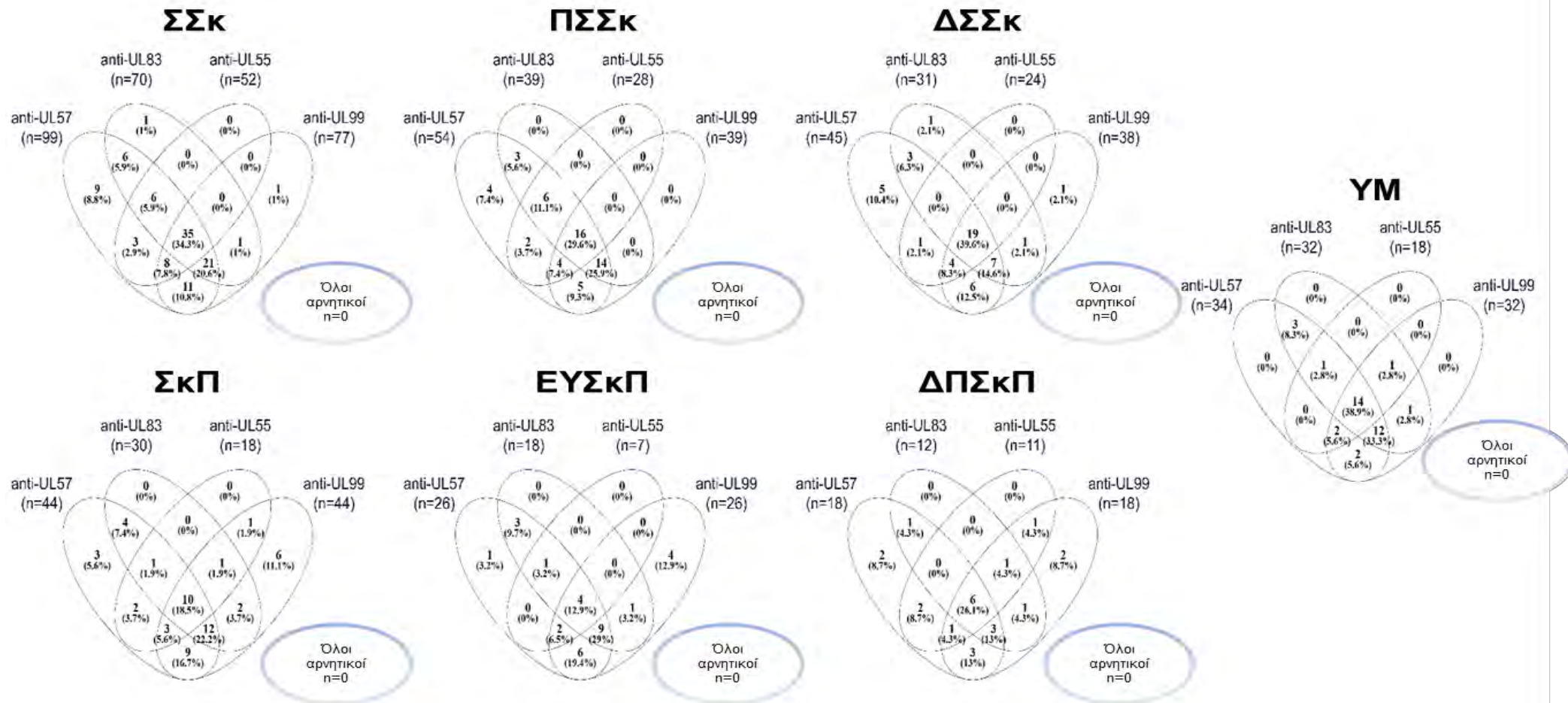


Εικόνα 6.4 Διαγράμματα διασποράς τίτλου αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων στον ορό ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (ΣΣκ) στον ορό ασθενών με συστηματική σκλήρυνση, (τόσο ασθενείς με περιορισμένη συστηματική σκλήρυνση-ΠΣΣκ) όσο και με διάχυτη συστηματική σκλήρυνση-ΔΣΣκ), και στις ομάδες ελέγχου (ασθενείς με δευτεροπαθώς προοδευτική Σκλήρυνση κατά πλάκας με υποτροπές και υφέσεις-ΕΥΣκΠ) και ασθενείς με σταθερή προοδευτική σκλήρυνση κατά πλάκας-ΔΠΣκΠ) όπως και σε υγιείς μάρτυρες (ΥΜ). ΣΣκ: Συστηματική Σκλήρυνση, ΠΣΣκ: Περιορισμένη Συστηματική Σκλήρυνση, ΔΣΣκ: Διάχυτη Συστηματική Σκλήρυνση, ΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας, ΥΜ: Υγιείς μάρτυρες, ΕΥΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας με εξάρσεις και υφέσεις, ΔΠΣκΠ: Δευτεροπαθώς Προοδευτική σκλήρυνση κατά πλάκας.

Πίνακας 6.4 Ταυτόχρονη δραστικότητα των συγκεκριμένων αντιγόνων του HCMV όπως ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης Western σε 102 ασθενείς με ΣΣκ, εκ των οποίων 54 με περιορισμένο σκληρόδερμα και 48 με διάχυτο, 54 ασθενείς με ΣκΠ, εκ των οποίων 31 με ΕΥΣκΠ και 23 με ΔΠΣκΠ, και 36 υγιείς μάρτυρες.

	ΣΣκ (n=102)	ΠΣΣκ (n=54)	ΔΣΣκ (n=48)	ΣκΠ (n=54)	ΕΥΣκΠ (n=31)	ΔΠΣκΠ (n=23)	ΥΜ (n=36)	ρ ΣΣκ vs ΣκΠ	ρ ΣΣκ vs ΥΜ	ρ ΠΣΣκ vs ΔΣΣκ	ρ ΠΣΣκ vs ΥΜ	ρ ΔΣΣκ vs ΥΜ	ρ ΣκΠ vs ΥΜ	ρ ΕΥΣκΠ vs ΥΜ	ρ ΔΠΣκΠ vs ΥΜ
0-2 μπάντες	30 (29,4%)	14 (25,9%)	16 (33,3%)	23 (42,6%)	11 (35,5%)	12 (52,2%)	5 (13,9%)	ns	0,026	ns	0,027	0,084	0,04	0,024	0,006
3-4 μπάντες	57 (55,9%)	34 (63%)	23 (47,9%)	25 (46,3%)	17 (54,8%)	8 (34,8%)	19 (52,8%)								
5-6 μπάντες	15 (14,7%)	6 (11,1%)	9 (18,8%)	6 (11,1%)	3 (9,7%)	3 (13%)	12 (33,3%)								

Τα δεδομένα εκφράζονται ως αριθμοί και σε παρένθεση αναφέρεται το % ποσοστό. Οι p τιμές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το Pearson Chi-square (2 sided). Τιμές <0,005 επισημαίνονται με έντονα γράμματα. Συντομογραφίες: ns: μη σημαντικό. ΣΣκ: Συστηματική Σκλήρυνση, ΠΣΣκ: Περιορισμένη Συστηματική Σκλήρυνση, ΔΣΣκ: Διάχυτη Συστηματική Σκλήρυνση, ΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας, ΥΜ: Υγιείς μάρτυρες, ΕΥΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας με εξάρσεις και υφέσεις, ΔΠΣκΠ: Δευτεροπαθώς Προοδευτική σκλήρυνση κατά πλάκας.



Εικόνα 6.5 Venn διαγράμματα τα οποία απεικονίζουν τα πρότυπα αντίδρασης αλληλοεπικάλυψης των anti-UL57, anti-UL83, anti-UL55 και anti-UL99 αντισωμάτων στους anti-HCMV θετικούς ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση (ΣΣκ), συμπεριλαμβανομένου ασθενείς με περιορισμένη συστηματική σκλήρυνση (ΠΣΣκ) και διάχυτη συστηματική σκλήρυνση (ΔΣΣκ), σε anti-HCMV θετικούς ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας, συμπεριλαμβανομένου ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας με υποτροπές και υφέσεις (ΕΥΣκΠ) και ασθενείς με δευτεροπαθώς προοδευτική σκλήρυνση κατά πλάκας (ΔΠΣκΠ) και σε υγιείς μάρτυρες θετικούς σε anti-HCMV. ΣΣκ: Συστηματική Σκλήρυνση, ΠΣΣκ: Περιορισμένη Συστηματική Σκλήρυνση, ΔΣΣκ: Διάχυτη Συστηματική Σκλήρυνση, ΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας, ΥΜ: Υγιείς μάρτυρες, ΕΥΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας με εξάρσεις και υφέσεις, ΔΠΣκΠ: Δευτεροπαθώς Προοδευτική σκλήρυνση κατά πλάκας.

Πίνακας 6.5 Σύγκριση μεταξύ της τετραπλής θετικότητας για τα UL57, UL83, UL55, UL99 και της τριπλής θετικότητας για τα UL57, UL83, UL99 όπως ανιχνεύτηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης Western σε anti-HCMV έντονα θετικούς ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, συμπεριλαμβανομένου και τους ασθενείς με περιορισμένο και διάχυτο σκληρόδερμα, τους έντονα θετικούς anti-HCMV ασθενείς με ΣκΠ συμπεριλαμβανομένου και τους ασθενείς με ΕΥΣκΠ και ΔΠΣκΠ, και τους έντονα θετικούς anti-HCMV υγιείς μάρτυρες.

	ΣΣκ	ΠΣΣκ	ΔΣΣκ	ΣκΠ	ΕΥΣκΠ	ΔΠΣκΠ	ΥΜ	ρΣΣκ vs ΣκΠ	ρΣΣκ vs ΥΜ	ρΔΣΣκ vs ΠΣΣκ	ρΠΣΣκ vs ΥΜ	ρΔΣΣκ vs ΥΜ
UL57 (+) UL83 (+) UL44 (+) UL99 (+)	35 (34,3%)	16 (29,6%)	19 (39,6%)	10 (18,5%)	4 (12,9%)	6 (26,1%)	14 (38,9%)	ns	ns	ns	ns	ns
UL57 (+) UL83 (+) UL44 (-) UL99 (+)	21 (20,6%)	14 (25,9%)	7 (14,6%)	12 (22,2%)	9 (29%)	3 (13%)	12 (33,3%)					

	ρ ΣΣκ vs ΕΥΣκΠ	ρ ΣΣκ vs ΔΠΣκΠ	ρ ΠΣΣκ vs ΣκΠ	ρ ΠΣΣκ vs ΕΥΣκΠ	ρ ΠΣΣκ vs ΔΠΣκΠ	ρ ΔΣΣκ vs ΣκΠ	ρ ΔΣΣκ vs ΕΥΣκΠ	ρ ΔΣΣκ vs ΔΠΣκΠ	ρ ΣκΠ vs ΥΜ	ρ ΕΥΣκΠ vs ΥΜ	ρ ΔΠΣκΠ vs ΥΜ
UL57 (+) UL83 (+) UL44 (+) UL99 (+)	0,077	ns	ns	ns	Ns	0,098	0,029	ns	ns	ns	ns
UL57 (+) UL83 (+) UL44 (-) UL99 (+)											

Τα δεδομένα εκφράζονται ως αριθμοί και σε παρένθεση αναφέρεται το % ποσοστό. Οι p τιμές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το Pearson Chi-square ή το Fisher's Exact Test (2 sided) Διόρθωση συνέχειας κατά Yates. Οι p τιμές <0,005 επισημαίνονται με έντονα γράμματα. Επισημαίνονται επίσης οι p τιμές που έχουν μια τάση για στατιστική συσχέτιση (<0,100) Συντομογραφίες: ns: μη σημαντικό. ΣΣκ: Συστηματική Σκλήρυνση, ΠΣΣκ: Περιορισμένη Συστηματική Σκλήρυνση, ΔΣΣκ: Διάχυτη Συστηματική Σκλήρυνση, ΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας, ΥΜ: Υγιείς μάρτυρες, ΕΥΣκΠ: Σκλήρυνση κατά πλάκας με εξάρσεις και υφέσεις, ΔΠΣκΠ: Δευτεροπαθώς Προοδευτική σκλήρυνση κατά πλάκας.

Πίνακας 6.6 Συσχετισμοί δραστηκότητας των anti-HCMV αντιγόνων με άλλα anti-HCMV αντιγόνα σε θετικούς anti-HCMV ασθενείς με ΣΣκ. Οι τιμές $p < 0,005$ απεικονίζονται με έντονο μαύρο.

		UL57	UL83	UL55	UL44	p38	UL99
UL57	R	1	0,094	0,319	-0,122	-0,266	0,164
	ρ		0,079	<0,001	0,023	<0,001	0,002
UL83	r		1	0,234	0,614	0,209	0,293
	ρ			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
UL55	R			1	0,155	0,133	0,294
	ρ				0,004	0,013	<0,001
UL44	R				1	0,471	0,218
	ρ					<0,001	<0,001
p38	R					1	0,311
	ρ						<0,001
UL99	R						1
	ρ						

6.4.6 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ Anti-HCMV ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Συγκρίνοντας την παρουσία αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών του HCMV με την παρουσία αυτοαντισωμάτων ειδικών για ΣΣκ προέκυψαν κάποιες παρατηρήσεις και συσχετίσεις. Όλοι οι συσχετισμοί φαίνονται αναλυτικά στους πίνακες 6.7-6.12. Πιο συγκεκριμένα τα αυτοαντισώματα έναντι πρωτεϊνών κεντρομεριδίου (CENPA και CENPB) ανευρίσκονται πιο συχνά στους ασθενείς που ήταν θετικοί έναντι του UL83 εν συγκρίσει με τους αρνητικούς anti-UL83 ασθενείς ($p=0,040$) (πίνακας 6.7), ενώ ο τίτλος των anti-CENPA καθώς και των anti-CENPB ήταν μεγαλύτερος στους anti-UL44 θετικούς ασθενείς εν συγκρίσει με τους αρνητικούς ($p=0,028$ και $p=0,002$ αντίστοιχα) (πίνακας 6.8). Επιπρόσθετα το ποσοστό ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων έναντι RNAp155 καθώς και ο τίτλος των αυτοαντισωμάτων έναντι RNAp11 ήταν

υψηλότερα στους anti-UL83 θετικούς ασθενείς εν συγκρίσει με τους αρνητικούς anti-UL83 ασθενείς ($p=0,044$ και $p=0,034$ αντίστοιχα) (πίνακας 6.7).

6.4.7 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ Anti-HCMV ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΕΚΔΗΛΩΣΕΩΝ

Τέλος η συσχέτιση της παρουσίας μεμονωμένων αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών του HCMV με κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου, δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές, παρά μόνο μια τάση συσχέτισης της παρουσίας αντισωμάτων έναντι UL44 με την εμφάνιση αρθρίτιδας ($p=0,067$). Όλες οι συσχετίσεις φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 6.8.

Πίνακας 6.7 Σύγκριση των κύριων δημογραφικών ανοσολογικών και κλινικών παραμέτρων των 102 anti-HCMV θετικών ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (ΣΣκ) ανάλογα με την παρουσία ή όχι anti-UL83 αντισωμάτων.

	HCMV (+) ΣΣκ (n=102)	HCMV (+) Anti-UL83 (+) (n=70)	HCMV (+) Anti-UL83 (-) (n=32)	panti-UL83(+) vs anti-UL83(-)
Μέση ηλικία, έτη ± SD	57,1 ± 13,5	58 ± 13,8	55,3 ± 12,8	ns*
Γυναίκες, n (%) / Άνδρες, n (%)	86 (84,3%) / 16 (15,7%)	59 (84,3%) / 11 (15,7%)	27 (84,4%) / 5 (15,6%)	ns**
<i>Τύποι ΣΣκ</i>				
Περιορισμένη ΣΣκ, n (%)	54 (52,9%)	39 (55,7%)	15 (46,9%)	NA
Γυναίκες, n (%) / Μέση ηλικία, έτη ± SD	48 (88,9%) / 60,4 ± 13,4	35 (89,7%) / 61,2 ± 13,4	13 (86,7%) / 58,1 ± 13,7	ns** / ns*
Διάχυτη ΣΣκ, n (%)	48 (47,1%)	31 (44,3%)	17 (53,1%)	NA
Γυναίκες, n (%) / Μέση ηλικία, έτη ± SD	38 (79,2%) / 53,5 ± 12,7	24 (77,4%) / 53,9 ± 13,3	14 (82,4%) / 52,8 ± 11,7	ns** / ns*
<i>Κλινικά χαρακτηριστικά</i>				
Πνευμονική ίνωση, n (%)	36 (35,3%)	28 (40%)	8 (25%)	ns**
Έλκη, n (%)	47 (46,1%)	30 (42,9%)	17 (53,1%)	ns**
Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, n (%)	15 (14,7%)	10 (14,3%)	5 (15,6%)	ns**
Αρθρίτιδα, n (%)	22 (21,6%)	18 (25,7%)	4 (12,5%)	ns**
Ορογονίτιδα, n (%)	9 (8,8%)	8 (11,4%)	1 (3,1%)	ns**
Τηλεγγεκτασία, n (%)	61 (59,8%)	44 (62,9%)	17 (53,1%)	ns**
Ασβέστωση, n (%)	13 (12,7%)	10 (14,3%)	3 (9,4%)	ns**
Anti-Toro I θετικότητα	41 (40,2%)	26 (37,1%)	15 (46,9%)	ns**
Anti-Toro I τίτλος***	47,7 ± 27,8	52,6 ± 29,5	40,9 ± 23,9	ns*
Anti-CENPA θετικότητα	28 (27,5%)	24 (34,3%)	4 (12,5%)	0,040**
Anti-CENPA τίτλος***	106,6 ± 31	104,4 ± 32,8	129,3 ± 10	0,076*
Anti-CENPB θετικότητα	28 (27,5%)	24 (34,3%)	4 (12,5%)	0,040**
Anti-CENPB τίτλος***	92,1 ± 40,1	90,6 ± 41,9	101,5 ± 28,8	ns*
Anti-CEN θετικότητα	28 (27,5%)	24 (34,3%)	4 (12,5%)	0,040**
Anti-RNApol11 θετικότητα	7 (6,9%)	4 (5,7%)	3 (9,4%)	ns**
Anti-RNApol11 τίτλος***	42,3 ± 38,3	17,5 ± 10,4	75,3 ± 37,1	0,034*
Anti-RNApol155 θετικότητα	9 (8,8%)	3 (4,3%)	6 (18,8%)	0,044**
Anti-RNApol155 τίτλος***	33,8 ± 37,2	16,7 ± 2,3	42,3 ± 44,1	ns*
Anti-RNA polymerase III θετικότητα	10 (9,8%)	5 (7,1%)	5 (15,6%)	ns**

Η ηλικία και ο τίτλοι εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Τα ποσοτικά δεδομένα εκφράζονται ως αριθμοί και σε παρένθεση το % ποσοστό. *Οι p τιμές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το 2-tailed t-test for Equality of Means, ίσες μεταβλητές δεν συναθροίζονται. ** Οι p τιμές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το Pearson Chi-square ή το Fisher's Exact Test (2 sided) Διόρθωση συνέχειας κατά Yates. ***Υπολογίστηκαν μόνο στις θετικές περιπτώσεις αυτοαντισωμάτων. Οι p-τιμές <0,005 επισημαίνονται με έντονα γράμματα. Επισημαίνονται επίσης οι p τιμές που έχουν μια τάση για στατιστική συσχέτιση (<0,100). Συνομογραφίες: CEN: αντικεντρομεριδικά, HCMV: ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός, NA: μη διαθέσιμο ns: μη σημαντικό, RNApol: RNA πολυμεράση, Toro: τοποϊσομεράση.

Πίνακας 6.8 Σύγκριση των κύριων δημογραφικών ανοσολογικών και κλινικών παραμέτρων των 102 anti-HCMV θετικών ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (ΣΣκ) ανάλογα με την παρουσία ή όχι anti-UL44 αντισωμάτων.

	HCMV (+) ΣΣκ (n=102)	HCMV (+) Anti-UL44 (+) (n=17)	HCMV (+) Anti-UL44 (-) (n=85)	panti- UL44(+) vs anti- UL44(-)
Μέση ηλικία, έτη ± SD	57,1 ± 13,5	55,5 ± 12,9	57,4 ± 13,6	ns*
Γυναίκες, n (%) / Άνδρες, n (%)	86 (84,3%) / 16 (15,7%)	15 (88,2%) / 2 (11,8%)	71 (83,5%) / 14 (16,5%)	ns**
Περιορισμένη ΣΣκ, n (%)	54 (52,9%)	8 (47,1%)	46 (54,1%)	NA
Γυναίκες, n (%) / Μέση ηλικία, έτη ± SD	48 (88,9%) / 60,4 ± 13,4	7 (87,5%) / 56,4 ± 14,1	41 (89,1%) / 61 ± 13,4	ns** / ns*
Διάχυτη ΣΣκ, n (%)	48 (47,1%)	9 (52,9%)	39 (45,9%)	NA
Γυναίκες, n (%) / Μέση ηλικία, έτη ± SD	38 (79,2%) / 53,5 ± 12,7	8 (88,9%) / 54,8 ± 12,5	30 (76,9%) / 53,2 ± 12,8	ns** / ns*
<i>Κλινικοί Παράμετροι</i>				
Πνευμονική ίνωση, n (%)	36 (35,3%)	5 (29,4%)	31 (36,5%)	ns**
Έλκη, n (%)	47 (46,1%)	6 (35,3%)	41 (48,2%)	ns**
Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, n (%)	15 (14,7%)	1 (5,9%)	14 (16,5%)	ns**
Αρθρίτιδα, n (%)	22 (21,6%)	7 (41,2%)	15 (17,6%)	0,067**
Ορογονίτιδα, n (%)	9 (8,8%)	3 (17,6%)	6 (7,1%)	ns**
Τηλεγγεκτασία, n (%)	61 (59,8%)	8 (47,1%)	53 (62,4%)	ns**
Ασβέστωση, n (%)	13 (12,7%)	2 (11,8%)	11 (12,9%)	ns**
Anti-Topo I θετικότητα	41 (40,2%)	3 (17,6%)	38 (44,7%)	0,071**
Anti-Topo I τίτλος***	47,7 ± 27,8	63,3 ± 17,9	46,5 ± 28,2	ns*
Anti-CENPA θετικότητα	28 (27,5%)	6 (35,3%)	22 (25,9%)	ns**
Anti-CENPA τίτλος***	106,6 ± 31	125,5 ± 17,4	101,5 ± 32,3	0,028*
Anti-CENPB θετικότητα	28 (27,5%)	6 (35,3%)	22 (25,9%)	ns**
Anti-CENPB τίτλος***	92,1 ± 40,1	122,8 ± 17,6	83,8 ± 40,6	0,002*
Anti-CEN θετικότητα	28 (27,5%)	6 (35,3%)	22 (25,9%)	ns**
Anti-RNApol11 θετικότητα	7 (6,9%)	0	7 (8,2%)	ns**
Anti-RNApol11 τίτλος***	42,3 ± 38,3	-	42,3 ± 38,3	NA
Anti-RNApol155 θετικότητα	9 (8,8%)	1 (5,9%)	8 (9,4%)	ns**
Anti-RNApol155 τίτλος***	33,8 ± 37,2	18	35,8 ± 39,3	NA
Anti-RNA polymerase III θετικότητα	10 (9,8%)	1 (5,9%)	9 (10,6%)	ns*

Η ηλικία και ο τίτλοι εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Τα ποσοτικά δεδομένα εκφράζονται ως αριθμοί και σε παρένθεση το % ποσοστό. *Οι p τιμές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το 2-tailed t-test for Equality of Means, ίσες μεταβλητές δεν συναθροίζονται. ** Οι p τιμές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το Pearson Chi-square ή το Fisher's Exact Test (2 sided) Διόρθωση συνέχειας κατά Yates. ***Υπολογίστηκαν μόνο στις θετικές περιπτώσεις αυτοαντισωμάτων. Οι p-τιμές <0,005 επισημαίνονται με έντονα γράμματα. Επισημαίνονται επίσης οι p τιμές που έχουν μια τάση για στατιστική συσχέτιση (<0,100). Συντομογραφίες: CEN: αντικεντρομεριδιακά, HCMV: ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός; NA: μη διαθέσιμο, ns: μη σημαντικό, RNApol: RNA πολυμεράση, Topo: τοποϊσομεράση.

Πίνακας 6.9 Σύγκριση των κύριων δημογραφικών ανοσολογικών και κλινικών παραμέτρων των 102 anti-HCMV θετικών ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (ΣΣκ) ανάλογα με την παρουσία ή όχι anti-UL57 αντισωμάτων.

	HCMV (+) ΣΣκ (n=102)	HCMV (+) Anti-UL57 (+) (n=99)	HCMV (+) Anti-UL57 (-) (n=3)	panti- UL57(+) vs anti-UL57(-)
<i>Επιδημιολογικό</i>				
Μέση ηλικία, έτη ± SD	57,1 ± 13,5	57,2 ± 13,6	53,7 ± 6,3	ns*
Γυναίκες, n (%) / Άντρες, n (%)	86 (84,3%) / 16 (15,7%)	84 (84,8%) / 15 (15,2%)	2 (66,7%) / 1 (33,3%)	ns**
<i>Τύποι ΣΣκ</i>				
Περιορισμένη ΣΣκ, n (%)	54 (52,9%)	54 (54,5%)	0	NA
Γυναίκες, n (%) / Μέση ηλικία, έτη ± SD	48 (88,9%) / 60,4 ± 13,4	48 (88,9%) / 60,4 ± 13,4	0 / -	NA / NA
Διάχυτη ΣΣκ, n (%)	48 (47,1%)	45 (45,5%)	3 (100%)	NA
Γυναίκες, n (%) / Μέση ηλικία, έτη ± SD	38 (79,2%) / 53,5 ± 12,7	36 (80%) / 53,5 ± 13	2 (66,7%) / 53,7 ± 6,3	ns** / ns*
<i>Κλινικά χαρακτηριστικά</i>				
Πνευμονική ίνωση, n (%)	36 (35,3%)	35 (35,4%)	1 (33, %)	ns**
Έλκη, n (%)	47 (46,1%)	45 (45,5%)	2 (66,7%)	ns**
Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, n (%)	15 (14,7%)	14 (14,1%)	1 (33,3%)	ns**
Αρθρίτιδα, n (%)	22 (21,6%)	22 (22,2%)	0	ns**
Ορογονίτιδα, n (%)	9 (8,8%)	9 (9,1%)	0	ns**
Τηλεγγεκτασία, n (%)	61 (59,8%)	59 (59,6%)	2 (66,7%)	ns**
Ασβέστωση, n (%)	13 (12,7%)	12 (12,1%)	1 (33,3%)	ns**
<i>Αντιδραστικότητα αυτοαντισωμάτων</i>				
Anti-Topo I θετικότητα	41 (40,2%)	39 (39,4%)	2 (66,7%)	ns**
Anti-Topo I τίτλος***	47,7 ± 27,8	46,6 ± 27,8	69,5 ± 20,5	ns*
Anti-CENPA θετικότητα	28 (27,5%)	27 (27,3%)	1 (33,3%)	ns**
Anti-CENPA τίτλος***	106,6 ± 31	106,9 ± 21,6	101	NA
Anti-CENPB θετικότητα	28 (27,5%)	27 (27,3%)	1 (33,3%)	ns**
Anti-CENPB τίτλος***	92,1 ± 40,1	91,3 ± 40,6	114	NA
Anti-CEN θετικότητα (και/ή)	28 (27,5%)	27 (27,3%)	1 (33,3%)	ns**
Anti-RNApol11 θετικότητα	7 (6,9%)	7 (7,1%)	0	ns**
Anti-RNApol11 τίτλος***	42,3 ± 38,3	42,3 ± 38,3	-	NA
Anti-RNApol55 θετικότητα	9 (8,8%)	9 (9,1%)	0	ns**
Anti-RNApol55 τίτλος***	33,8 ± 37,2	33,8 ± 37,2	-	NA
Anti-RNA polymerase III θετικότητα (και/ή)	10 (9,8%)	10 (10,1%)	0	ns**

Η ηλικία και οι τίτλοι εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Τα ποσοτικά δεδομένα εκφράζονται ως αριθμοί και σε παρένθεση το % ποσοστό. *Οι p τιμές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το 2-tailed t-test for Equality of Means, ίσες μεταβλητές δεν συναθροίζονται. ** Οι p τιμές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το Pearson Chi-square ή το Fisher's Exact Test (2 sided) Διόρθωση συνέχειας κατά Yates.***Υπολογίστηκαν μόνο στους θετικούς ασθενείς. Οι p-τιμές <0,005 επισημαίνονται με έντονα γράμματα. Επισημαίνονται επίσης οι p τιμές που έχουν μια τάση για στατιστική συσχέτιση (<0,100). Συνομογραφίες: CEN: αντικεντρομεριδικά, HCMV: ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός, NA: μη διαθέσιμο, ns: μη σημαντικό, RNApol: RNA πολυμεράση, Topo: τοποϊσομεράση.

Πίνακας 6.10 Σύγκριση των κύριων δημογραφικών ανοσολογικών και κλινικών παραμέτρων των 102 anti-HCMV θετικών ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (ΣΣκ) ανάλογα με την παρουσία ή όχι anti-UL55 αντισωμάτων.

	HCMV (+) ΣΣκ (n=102)	HCMV (+) Anti-UL55 (+) (n=52)	HCMV (+) Anti-UL55 (-) (n=50)	panti- UL55(+) vs anti-UL55(-)
<i>Επιδημιολογικό</i>				
Μέση ηλικία, έτη ± SD	57,1 ± 13,5	56,5 ± 13,4	57,7 ± 13,6	ns*
Γυναίκες, n (%) / Άνδρες, n (%)	86 (84,3%) / 16 (15,7%)	47 (90,4%)	39 (78%)	ns**
<i>Τύποι ΣΣκ</i>				
Περιορισμένη ΣΣκ, n (%)	54 (52,9%)	28 (53,8%)	26 (52%)	NA
Γυναίκες, n (%) / Μέση ηλικία, έτη, ± SD	48 (88,9%) / 60,4 ± 13,4	26 (92,9%) / 59,8 ± 12,5	22 (84,6%) / 61 ± 2,9	ns** / ns*
Διάχυτη ΣΣκ, n (%)	48 (47,1%)	24 (46,2%)	24 (48%)	NA
Γυναίκες, n (%) / Μέση ηλικία, έτη ± SD	38 (79,2%) / 53,5 ± 12,7	21 (87,5%) / 52,8 ± 13,8	17 (70,8%) / 54,2 ± 11,7	ns** / ns*
<i>Κλινικά χαρακτηριστικά</i>				
Πνευμονική ίνωση, n (%)	36 (35,3%)	19 (36,5%)	17 (34%)	ns**
Έλκη, n (%)	47 (46,1%)	22 (42,3%)	25 (50%)	ns**
Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, n (%)	15 (14,7%)	6 (11,5%)	9 (18%)	ns**
Αρθρίτιδα, n (%)	22 (21,6%)	11 (21,2%)	11 (22%)	ns**
Ορογονίτιδα, n (%)	9 (8,8%)	4 (7,7%)	5 (10%)	ns**
Τηλεγγεκτασία, n (%)	61 (59,8%)	31 (59,6%)	30 (60%)	ns**
Ασβέστωση, n (%)	13 (12,7%)	7 (13,5%)	6 (12%)	ns**
<i>Αντιδραστικότητα αυτοαντισωμάτων</i>				
Anti-Topo I θετικότητα	41 (40,2%)	21 (40,4%)	20 (40%)	ns**
Anti-Topo I τίτλος***	47,7 ± 27,8	49 ± 27,7	46,4 ± 28,5	ns*
Anti-CENPA θετικότητα	28 (27,5%)	14 (26,9%)	14 (28%)	ns**
Anti-CENPA τίτλος***	106,6 ± 31	100,1 ± 33,4	113,2 ± 28,2	ns*
Anti-CENPB θετικότητα	28 (27,5%)	14 (26,9%)	14 (28%)	ns**
Anti-CENPB τίτλος***	92,1 ± 40,1	85,9 ± 46,5	98,4 ± 33	ns*
Anti-CEN θετικότητα (και/ή)	28 (27,5%)	14 (26,9%)	14 (28%)	ns**
Anti-RNApol11 θετικότητα	7 (6,9%)	5 (9,6%)	2 (4%)	ns**
Anti-RNApol11 τίτλος ***	42,3 ± 38,3	25,4 ± 19,8	84,5 ± 47,4	ns*
Anti-RNApol155 θετικότητα	9 (8,8%)	5 (9,6%)	4 (8%)	ns**
Anti-RNApol155 τίτλος ***	33,8 ± 37,2	26,8 ± 24,8	42,5 ± 51,8	ns*
Anti-RNA polymerase III θετικότητα (και/ή)	10 (9,8%)	7 (13,5%)	3 (6%)	ns**

Η ηλικία και ο τίτλοι εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Τα ποσοτικά δεδομένα εκφράζονται ως αριθμοί και σε παρένθεση το % ποσοστό. *Οι p τιμές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το 2-tailed t-test for Equality of Means, ίσες μεταβλητές δεν συναθροίζονται. ** Οι p τιμές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το Pearson Chi-square ή το Fisher's Exact Test (2 sided) Διόρθωση συνέχειας κατά Yates.***Υπολογίστηκαν μόνο στις θετικές περιπτώσεις αυτοαντισωμάτων. Οι p-τιμές <0,005 επισημαίνονται με έντονα γράμματα. Επισημαίνονται επίσης οι p τιμές που έχουν μια τάση για στατιστική συσχέτιση (<0,100). Συντομογραφίες: CEN: αντικεντρομεριδιακά, HCMV: ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός; NA: μη διαθέσιμο; ns: μη σημαντικό; RNApol, RNA πολυμεράση, Topo, τοποϊσομεράση.

Πίνακας 6.11 Σύγκριση των κύριων δημογραφικών ανοσολογικών και κλινικών παραμέτρων των 102 anti-HCMV θετικών ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (ΣΣκ) ανάλογα με την παρουσία ή όχι των anti-p38 αντισωμάτων.

	HCMV (+) ΣΣκ (n=102)	HCMV (+) Anti-p38 (+) (n=16)	HCMV (+) Anti-p38 (-) (n=86)	panti-p38(+) vs anti-p38(-)
<i>Επιδημιολογικό</i>				
Μέση ηλικία, έτη ± SD	57,1 ± 13,5	54 ± 13,4	57,7 ± 13,5	ns*
Γυναίκες, n (%) / Άνδρες, n (%)	86 (84,3%) / 16 (15,7%)	15 (93,8%) / 1 (6,2%)	71 (82,6%) / 15 (17,4%)	ns**
<i>Τύποι ΣΣκ</i>				
Περιορισμένη ΣΣκ, n (%)	54 (52,9%)	5 (31,2%)	49 (57%)	NA
Γυναίκες, n (%) / Μέση ηλικία, έτη ± SD	48 (88,9%) / 60,4 ± 13,4	5 (100%) / 57,5 ± 9,9	43 (87,8%) / 60,6 ± 13,8	ns** / ns*
Διάχυτη ΣΣκ, n (%)	48 (47,1%)	11 (68,8%)	37 (43%)	NA
Γυναίκες, n (%) / Μέση ηλικία, έτη ± SD	38 (79,2%) / 53,5 ± 12,7	10 (90,9%) / 52,4 ± 14,8	28 (75,7%) / 53,8 ± 12,2	ns** / ns*
<i>Κλινικά χαρακτηριστικά</i>				
Πνευμονική ίνωση, n (%)	36 (35,3%)	7 (43,8%)	29 (33,7%)	ns**
Έλκη, n (%)	47 (46,1%)	7 (43,8%)	40 (46,5%)	ns**
Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, n (%)	15 (14,7%)	2 (12,5%)	13 (15,1%)	ns**
Αρθρίτιδα, n (%)	22 (21,6%)	5 (31,2%)	17 (19,8%)	ns**
Ορογονίτιδα, n (%)	9 (8,8%)	3 (18,8%)	6 (7%)	ns**
Τηλεγγεκτασία, n (%)	61 (59,8%)	8 (50%)	53 (61,6%)	ns**
Ασβέστωση, n (%)	13 (12,7%)	2 (12,5%)	11 (12,8%)	ns**
<i>Αντιδραστικότητα αυτοαντισωμάτων</i>				
Anti-Topo I θετικά	41 (40,2%)	7 (43,8%)	34 (39,5%)	ns**
Anti-Topo I τίτλος***	47,7 ± 27,8	69,3 ± 28,7	43,3 ± 25,8	0,057*
Anti-CENPA θετικά	28 (27,5%)	6 (37,5%)	22 (25,6%)	ns**
Anti-CENPA τίτλος***	106,6 ± 31	109,7 ± 39,9	105,8 ± 29,2	ns*
Anti-CENPB θετικότητα	28 (27,5%)	6 (37,5%)	22 (25,6%)	ns**
Anti-CENPB τίτλος***	92,1 ± 40,1	102,3 ± 41,5	89,4 ± 40,2	ns*
Anti-CEN θετικότητα (και/ή)	28 (27,5%)	6 (37,5%)	22 (25,6%)	ns**
Anti-RNApol11 θετικότητα	7 (6,9%)	0	7 (8,1%)	ns**
Anti-RNApol11 τίτλος***	42,3 ± 38,3	-	42,3 ± 38,3	NA
Anti-RNApol155 θετικότητα	9 (8,8%)	1 (6,2%)	8 (9,3%)	ns**
Anti-RNApol155 τίτλος***	33,8 ± 37,2	18	35,8 ± 39,3	NA
Anti-RNA polymerase III θετικότητα (και/ή)	10 (9,8%)	1 (6,2%)	9 (10,5%)	ns**

Η ηλικία και ο τίτλοι εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Τα ποσοτικά δεδομένα εκφράζονται ως αριθμοί και σε παρένθεση το % ποσοστό. *Οι p τιμές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το 2-tailed t-test for Equality of Means, ίσες μεταβλητές δεν συναθροίζονται. ** Οι p τιμές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το Pearson Chi-square ή το Fisher's Exact Test (2 sided) Διόρθωση συνέχειας κατά Yates.***Υπολογίστηκαν μόνο στις θετικές περιπτώσεις αυτοαντισωμάτων. Οι p-τιμές <0,005 επισημαίνονται με έντονα γράμματα. Επισημαίνονται επίσης οι p τιμές που έχουν μια τάση για στατιστική συσχέτιση (<0,100). Συντομογραφίες: CEN: αντικεντρομεριδικά, HCMV: ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός, NA: μη διαθέσιμο; ns: μη σημαντικό; RNApol, RNA πολυμεράση, Topo, τοποϊσομεράση.

Πίνακας 6.12. Σύγκριση των κύριων δημογραφικών ανοσολογικών και κλινικών παραμέτρων των 102 anti-HCMV θετικών ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (ΣΣκ) ανάλογα με την παρουσία ή όχι των anti-UL99 αντισωμάτων.

	HCMV (+) ΣΣκ (n=102)	HCMV (+) Anti-UL99(+) (n=77)	HCMV (+) Anti-UL99 (-) (n=25)	panti-UL99(+) vs anti-UL99(-)
<i>Επιδημιολογικό</i>				
Μέση ηλικία, έτη ± SD	57,1 ± 13,5	55,4 ± 13,2	62,3 ± 13,2	0,030*
Γυναίκες, n (%) / Άνδρες, n (%)	86 (84,3%) / 16 (15,7%)	67 (87%) / 10 (13%)	19 (76%) / 6 (24%)	ns**
<i>Τύποι ΣΣκ</i>				
Περιορισμένο ΣΣκ, n (%)	54 (52,9%)	39 (50,6%)	15 (60%)	NA
Γυναίκες, n (%) / Μέση ηλικία, έτη ± SD	48 (88,9%) / 60,4 ± 13,4	35 (89,7%) / 57,9 ± 14	13 (86,7%) / 66,7 ± 9,5	ns** / 0,012*
Diffuse cutaneous, n (%)	48 (47,1%)	38 (49,4%)	10 (40%)	NA
Γυναίκες, n (%) / Μέση ηλικία, έτη ± SD	38 (79,2%) / 53,5 ± 12,7	32 (84,2%) / 52,9 ± 12	6 (60%) / 55,6 ± 15,6	ns** / ns*
<i>Κλινικά χαρακτηριστικά</i>				
Πνευμονική ίνωση, n (%)	36 (35,3%)	27 (35,1%)	9 (36%)	ns**
Έλκη, n (%)	47 (46,1%)	33 (42,9%)	14 (56%)	ns**
Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, n (%)	15 (14,7%)	11 (14,3%)	4 (16%)	ns**
Αρθρίτιδα, n (%)	22 (21,6%)	18 (23,4%)	4 (16%)	ns**
Ορογονίτιδα, n (%)	9 (8,8%)	6 (7,8%)	3 (12%)	ns**
Τηλεγγεκτασία, n (%)	61 (59,8%)	43 (55,8%)	18 (72%)	ns**
Ασβέστωση, n (%)	13 (12,7%)	11 (14,3%)	2 (8%)	ns**
<i>Αντιδραστικότητα αυτοαντισωμάτων</i>				
Anti-Τορο I θετικότητα	41 (40,2%)	30 (39%)	11 (44%)	ns**
Anti-Τορο I τίτλος***	47,7 ± 27,8	49,2 ± 28,9	43,7 ± 25,3	ns*
Anti-CENPA θετικότητα	28 (27,5%)	20 (26%)	8 (32%)	ns**
Anti-CENPA τίτλος***	106,6 ± 31	113 ± 21,6	90,9 ± 45,2	ns*
Anti-CENPB θετικότητα	28 (27,5%)	20 (26%)	8 (32%)	ns**
Anti-CENPB τίτλος***	92,1 ± 40,1	97,6 ± 42,8	78,6 ± 30,5	NS*
Anti-CEN θετικότητα (και/ή)	28 (27,5%)	20 (26%)	8 (32%)	ns**
Anti-RNApol11 θετικότητα	7 (6,9%)	5 (6,5%)	2 (8%)	ns**
Anti-RNApol11 τίτλος***	42,3 ± 38,3	33,2 ± 20,9	65 ± 75	ns*
Anti-RNApol155 θετικότητα	9 (8,8%)	6 (7,8%)	3 (12%)	ns**
Anti-RNApol155 τίτλος***	33,8 ± 37,2	26,8 ± 22,6	47,7 ± 61,8	ns*
Anti-RNA polymerase III θετικότητα (και/ή)	10 (9,8%)	8 (10,4%)	2 (8%)	ns**

Η ηλικία και ο τίτλοι εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Τα ποσοτικά δεδομένα εκφράζονται ως αριθμοί και σε παρένθεση το % ποσοστό. *Οι p τιμές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το 2-tailed t-test for Equality of Means, ίσες μεταβλητές δεν συναθροίζονται. ** Οι p τιμές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το Pearson Chi-square ή το Fisher's Exact Test (2 sided) Διόρθωση συνέχειας κατά Yates. ***Υπολογίστηκαν μόνο στις θετικές περιπτώσεις αυτοαντισωμάτων. Οι p-τιμές <0,005 επισημαίνονται με έντονα γράμματα. Επισημαίνονται επίσης οι p τιμές που έχουν μια τάση για στατιστική συσχέτιση (<0,100). Συνομογραφίες: CEN: αντικεντρομεριδικά, HCMV: ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός, NA: μη διαθέσιμο; ns: μη σημαντικό, RNApol: RNA πολυμεράση, Τορο: τοποϊσομεράση.

6.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εργασία μας αυτή εστίασε στην ανίχνευση αντισωμάτων εναντίον διαφόρων αντιγόνων του HCMV σε ασθενείς με ΣΣκ και ΣκΠ χρησιμοποιώντας ως πηγή αντιγόνων εκχύλισμα HCMV, οι πρωτεΐνες του οποίου διαχωρίστηκαν ηλεκτροφορητικά βάσει του μοριακού τους βάρους.

Παρόλο που δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην συχνότητα των anti-HCMV αντισωμάτων στους ασθενείς με ΣΣκ (τόσο στο σύνολο όσο και στους υποτύπους) σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, εν τούτοις ο τίτλος των anti-UL83, anti-UL57 και anti-UL99 αντισωμάτων ήταν αυξημένος στους ασθενείς με ΣΣκ σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Αυτά τα δεδομένα καθιστούν την ανάγκη για έλεγχο όχι μόνο των συχνοτήτων των anti-HCMV αντισωμάτων αλλά καθώς επίσης και του τίτλου των αντισωμάτων έναντι διαφόρων ιικών αντιγόνων καθώς τα παραπάνω μπορεί να αποτελούν τα μοναδικά στοιχεία που διαφοροποιούνται μεταξύ διαφόρων ομάδων. Παλαιότερα δεδομένα από μελέτες υποδεικνύουν ότι η συχνότητα και ο τίτλος των αντισωμάτων έναντι του UL57 και του UL83 είναι πιο συχνή και πιο ισχυρή σε ασθενείς με ΣΣκ απ ό τι στους υγιείς μάρτυρες [309, 310, 314].

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι το UL83 είναι ένα πρωτεϊνικό μόριο που παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή λοίμωξης από τον ιό καθώς είναι υπεύθυνο στο να αποφεύγει ο ιός τις ανοσολογικές απαντήσεις του οργανισμού μέσω αναστολής της αντιγονοπαρουσίασης, τροποποίησης της δράσης των NK κυττάρων και καταστολή της παραγωγής ιντερφερόνης τύπου I και της IL-1β [315]. Εκτός ότι αποτελεί στόχο των B κυττάρων, το UL83 αποτελεί επίσης στόχο και των T κυττάρων. Κάποια πεπτιδία που προέρχονται από το UL83 αποτελούν αντιγονικούς επιτόπους των T-κυττάρων [316, 317], ρυθμίζοντας την ενεργή λοίμωξη σε ασθενείς με μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων [317]. Το UL57 είναι μία πρωτεΐνη με ικανότητα πρόσδεσης σε

DNA μονής αλυσίδας, ενώ το UL99 πολυμερίζεται και είναι απαραίτητο για την δημιουργία του φακέλου-περιβλήματος του HCMV [318] και είναι το πιο επικρατές αντιγόνο στην φάση λοίμωξης με τον ιό του HCMV [319].

Η αυξημένη συχνότητα των anti-UL57 και anti-UL55 αντισωμάτων σε ασθενείς με ΣΣκ εν συγκρίσει με τους ασθενείς με ΣκΠ, ήταν μη αναμενόμενη δεδομένου ότι βιβλιογραφικά υπάρχει ισχυρή παθογενετική συσχέτιση μεταξύ HCMV και ΣκΠ.

Κατά την άποψή μας, το πιο σημαντικό εύρημα της έρευνας μας είναι ο πιθανός συσχετισμός της παρουσίας anti-HCMV αντισωμάτων με την ύπαρξη ειδικών αυτοαντισωμάτων της ΣΣκ. Η παρουσία των anti-UL83 αντισωμάτων σε ασθενείς με ΣΣκ, βρέθηκε στατιστικά πιο συχνά σε ασθενείς που ήταν θετικοί για την παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι κεντρομεριδίου και RNApol 155. Επιπρόσθετα ο τίτλος των anti-UL83 αντισωμάτων ήταν αυξημένος σε ασθενείς με παρουσία anti-RNApol 11, ενώ ο τίτλος των anti-UL44 ήταν αυξημένος σε ασθενείς που ανιχνεύονταν θετικοί για παρουσία anti-CENPA και CENPB.

Δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως ο τρόπος που ο HCMV μπορεί να επάγει την παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Υπάρχουν αμινοξικές ακολουθίες πρωτεϊνών του ιού και του ανθρώπου με σημαντική ομολογία μεταξύ τους, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει στην εμφάνιση διασταυρούμενων αντιδράσεων. Σε μία παλαιότερη έρευνα όπου έγινε μελέτη του αμινοτελικού άκρου της DNA polymerase I, διαπιστώθηκε μία ομολογία αλληλουχίας 5 αμινοξέων (aa 121-126) με την πρωτεΐνη UL70 του HCMV [298]. Επίσης και η UL55 του HCMV έχει σημαντικό βαθμό αμινοξικής ομολογίας με πολλές ανθρώπινες πρωτεΐνες σε πέντα-έξα ή και έπτα-πεπτιδικό επίπεδο [320]. Επιπρόσθετα η πρωτεΐνη UL44 του ιού HCMV παρουσιάζει κοινή aa με την ευκαρυωτική πρωτεΐνη PCNA (processivity factor cell nuclear antigen) [321].

Η δική μας ανάλυση αμινοξικής αλληλουχίας χρησιμοποιώντας την μηχανή αναζήτησης Blast2p διαπίστωσε μια σημαντική ομολογία μεταξύ aa27-RQVSLRSYDNIPPT-aa41 που αποτελεί τμήμα του επίτοπου TTPGEPLKDALGRQVSLRSYDNIPPTSSSDEGEDDDC της πρωτεΐνης UL99 του ιού με την αμινοξική αλληλουχία aa311-RAVALYFIDKLALRA-aa324 της DNA polymerase I [319].

Ο δεύτερος πιο ανοσογονικός επίτοπος της πρωτεΐνης UL99 βρίσκεται στην θέση aa130- CETDDLDEEDTSIYLSPPPVPVQVAKRLPRPDTPRT- aa160 που επίσης παρουσιάζει σημαντικό βαθμό ομολογίας με δυο θέσεις στην πρωτεΐνη του Scl-70 ,τις aa132-DDLDEEDTSIYLS-aa144 και aa398-DDLFDRLTTTSLN-aa140. Σημαντική είναι επίσης η παρατήρηση ότι τέτοιου είδους συσχετίσεις δεν βρέθηκαν ,μεταξύ επιτόπων της πρωτεΐνης UL99 και της πρωτεΐνης A του κεντρομεριδίου που χαρακτηρίζει συνήθως ασθενείς με περιορισμένης μορφής συστηματική σκλήρυνση. Επομένως, θεωρούμε ότι έχει ερευνητική αξία να μελετήσει κανείς την πιθανή διασταυρούμενη αντίδραση που αφορούν ομόλογες περιοχές των πρωτεϊνών UL99 του HCMV και της τοποϊσομεράσης I (Scl70) του ασθενούς. (εικόνα 6.5)

Επίσης, σε ότι αφορά τις διάφορες κλινικές παραμέτρους της νόσου, μόνο η παρουσία αρθρίτιδας βρέθηκε να έχει την τάση συσχέτισης με την παρουσία αντισωμάτων anti-UL44, εν συγκρίσει με τους αρνητικούς ασθενείς. Αντίθετα καμία άλλη συσχέτιση δεν βρέθηκε μεταξύ της εμφάνισης αντισωμάτων εναντίον των anti-HCMV αντιγόνων και κάποιων άλλων κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με ΣΣκ. Αυτές οι παρατηρήσεις, υποδεικνύουν την υπόθεση ότι η ανταπόκριση έναντι ιικών αντιγόνων ίσως παίζει κάποιο ρόλο στη ρήξη της ανοσολογικής ανοχής, οδηγώντας πιθανά στην εμφάνιση της ασθένειας παρά στην εξέλιξη αυτής.

Τα ευρήματα μας αυτά εφόσον επικυρωθούν σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών, θα ενισχύσουν ακόμη περισσότερο το πιθανό ρόλο αυτών των ιικών αντιγόνων στη πρόκληση της παθογένειας του ΣΣκ. Μία μεγάλη προοπτική έρευνα που να περιλαμβάνει ασθενείς με ΣΣκ σε αρχικό στάδιο θα μπορούσε να αποσαφηνίσει καλύτερα τον ρόλο αυτών των ιικών πρωτεϊνών στην παθογένεια της ΣΣκ. Όταν εμβολιάστηκαν ποντίκια BALB/c με την πρωτεΐνη UL83 προκλήθηκε κλινικά έκδηλος συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος, με θετικά anti-dsDNA αντισώματα και σπειραματονεφρίτιδα του λύκου. Το γεγονός αυτό ενισχύει ακόμη περισσότερο την άποψη ότι τα αντιγόνα του HCMV μπορούν να προκαλέσουν αυτοάνοση ανοσολογική απόκριση και εμφάνιση ρευματικών νοσημάτων [212, 213, 313, 322].

Ένα άλλο αντιγόνο του HCMV που δεν έχει συσχετισθεί μέχρι τώρα με την παθογένεια της νόσου της ΣΣκ είναι και η πρωτεΐνη UL99, η οποία είναι μία εξωτερική πρωτεΐνη γνωστή και ως pp28 και κωδικοποιείται από την UL99 ORF περιοχή [133, 188]. Η pp28 είναι σημαντική πρωτεΐνη για τη συναρμολόγηση του ιού στο κυτταρόπλασμα και στην ενίσχυση της μολυσματικότητας του καθώς μελέτες σε ιούς HCMV με γονιδιακό έλλειμμα στην περιοχή UL99-ORF, οδηγεί σε αδυναμία δομικής ανασυγκρότησης του ιού σε πυρηνικό φάκελο [198, 323]. Η pp28 είναι μία από τις πιο ανοσογονικές πρωτεΐνες του ιού σε υγιείς αιμοδότες και έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον δύο γραμικοί επίτοποι του αντιγόνου [319].

Επιπρόσθετα η συσχέτιση της παρουσίας αντισωμάτων έναντι ιικών αντιγόνων με κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους των ασθενών με ΣΣκ έδειξε ότι η αντιδραστικότητα των anti-CENPA/CENPB αντισωμάτων ήταν συχνή στους anti-UL83 θετικούς ασθενείς εν συγκρίσει με τους anti-UL83 αρνητικούς ασθενείς ενώ και ο τίτλος των anti-CENPA και CENPB ήταν πιο υψηλός στους θετικούς anti-UL44 ασθενείς εν συγκρίσει με τους αρνητικούς ασθενείς. Επιπρόσθετα η συχνότητα των anti-RNApol155 και ο τίτλος των anti-RNApol11 αντισωμάτων ήταν υψηλότερος

στους ασθενείς που ανιχνεύθηκαν θετικοί για το anti-UL83, εν συγκρίσει με τους αρνητικούς. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να είναι τυχαίο στατιστικό γεγονός λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος αν και απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπάρχει αιτιολογική συσχέτιση της συνύπαρξης anti-UL83 αντισωμάτων και αυτοαντισωμάτων CENP ή RNAPolymeraseIII. Πιθανά ο συνδυασμός αυξημένης συχνότητας και μεγάλου αυξημένου τίτλου αντισωμάτων εναντίον συγκεκριμένων ιικών αντιγόνων ίσως να συντελεί στην απώλεια της ανοσολογικής ανοχής στις αυτοάνοσες ασθένειες όπως η ΣΣκ.

Συμπερασματικά, η μελέτη μας αναδεικνύει τον πιθανό καταλυτικό ρόλο της ανοσιακής απόκρισης κατά του HCMV στην ΣΣκ, χωρίς ωστόσο να παράξει αδιάσειστα στοιχεία υπέρ της αιτιολογικής συσχέτισης των δυο. Ωστόσο, είναι η πρώτη ουσιαστική λεπτομερής καταγραφή χυμικής ανοσιακής απόκρισης κατά των αντιγόνων του HCMV σε ασθενείς με ΣΣκ.

Ως τέτοια, μπορεί να φανεί χρήσιμη σε μελετητές που θα διερευνήσουν στα πλαίσια μεταφραστικής ή πειραματικής έρευνας τον ρόλο του HCMV την ΣΣκ στο μέλλον.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Nihtyanova, S.I., et al., *Improved survival in systemic sclerosis is associated with better ascertainment of internal organ disease: a retrospective cohort study*. QJM, 2010. 103(2): p. 109-15.
2. Tyndall, A.J., et al., *Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database*. Ann Rheum Dis, 2010. 69(10): p. 1809-15.
3. Denton, C.P., *Advances in pathogenesis and treatment of systemic sclerosis*. Clin Med (Lond), 2015. 15 Suppl 6: p. s58-63.
4. Chung, L., et al., *Clinical trial design in scleroderma: where are we and where do we go next?* Clin Exp Rheumatol, 2012. 30(2 Suppl 71): p. S97-102.
5. Nihtyanova, S.I., et al., *Prediction of pulmonary complications and long-term survival in systemic sclerosis*. Arthritis Rheumatol, 2014. 66(6): p. 1625-35.
6. Jaeger, V.K., et al., *Incidences and Risk Factors of Organ Manifestations in the Early Course of Systemic Sclerosis: A Longitudinal EUSTAR Study*. PLoS One, 2016. 11(10): p. e0163894.
7. Martyanov, V. and M.L. Whitfield, *Molecular stratification and precision medicine in systemic sclerosis from genomic and proteomic data*. Curr Opin Rheumatol, 2016. 28(1): p. 83-8.
8. Sargent, J.L., et al., *Identification of Optimal Mouse Models of Systemic Sclerosis by Interspecies Comparative Genomics*. Arthritis Rheumatol, 2016. 68(8): p. 2003-15.
9. Hinz, B., et al., *Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling*. Am J Pathol, 2012. 180(4): p. 1340-55.
10. Wang, Z., et al., *Establishment and gene expression analysis of disease-derived induced pluripotent stem cells of scleroderma*. J Dermatol Sci, 2016. 84(2): p. 186-196.
11. Wu, M., et al., *Genetic susceptibility loci of idiopathic interstitial pneumonia do not represent risk for systemic sclerosis: a case control study in Caucasian patients*. Arthritis Res Ther, 2016. 18: p. 20.
12. Gilbane, A.J., C.P. Denton, and A.M. Holmes, *Scleroderma pathogenesis: a pivotal role for fibroblasts as effector cells*. Arthritis Res Ther, 2013. 15(3): p. 215.
13. Mahoney, J.M., et al., *Systems level analysis of systemic sclerosis shows a network of immune and profibrotic pathways connected with genetic polymorphisms*. PLoS Comput Biol, 2015. 11(1): p. e1004005.
14. Shah, A.A., et al., *Close temporal relationship between onset of cancer and scleroderma in patients with RNA polymerase I/III antibodies*. Arthritis Rheum, 2010. 62(9): p. 2787-95.
15. Airo, P., et al., *Malignancies in Italian patients with systemic sclerosis positive for anti-RNA polymerase III antibodies*. J Rheumatol, 2011. 38(7): p. 1329-34.
16. Wirz, E.G., et al., *Incidence and predictors of cutaneous manifestations during the early course of systemic sclerosis: a 10-year longitudinal study from the EUSTAR database*. Ann Rheum Dis, 2016. 75(7): p. 1285-92.
17. Diab, S., et al., *Systemic sclerosis sine scleroderma: a multicenter study of 1417 subjects*. J Rheumatol, 2014. 41(11): p. 2179-85.
18. Bhattacharyya, S., J. Wei, and J. Varga, *Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities*. Nat Rev Rheumatol, 2011. 8(1): p. 42-54.
19. Bossini-Castillo, L., et al., *Genetics of systemic sclerosis*. Semin Immunopathol, 2015. 37(5): p. 443-51.

20. Murdaca, G., et al., *Genetic factors and systemic sclerosis*. *Autoimmun Rev*, 2016. 15(5): p. 427-32.
21. Assassi, S., et al., *Genetics of scleroderma: implications for personalized medicine?* *BMC Med*, 2013. 11: p. 9.
22. Pollard, K.M., *Silica, Silicosis, and Autoimmunity*. *Front Immunol*, 2016. 7: p. 97.
23. Black, C.M., et al., *Genetic susceptibility to scleroderma-like syndrome induced by vinyl chloride*. *Lancet*, 1983. 1(8314-5): p. 53-5.
24. De Martinis, M., et al., *An overview of environmental risk factors in systemic sclerosis*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2016. 12(4): p. 465-78.
25. Marie, I. and J.F. Gehanno, *Environmental risk factors of systemic sclerosis*. *Semin Immunopathol*, 2015. 37(5): p. 463-73.
26. Wigley, F.M. and N.A. Flavahan, *Raynaud's Phenomenon*. *N Engl J Med*, 2016. 375(6): p. 556-65.
27. Hughes, M. and A.L. Herrick, *Raynaud's phenomenon*. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2016. 30(1): p. 112-32.
28. Garner, R., et al., *Prevalence, risk factors and associations of primary Raynaud's phenomenon: systematic review and meta-analysis of observational studies*. *BMJ Open*, 2015. 5(3): p. e006389.
29. Meier, F.M., et al., *Update on the profile of the EUSTAR cohort: an analysis of the EULAR Scleroderma Trials and Research group database*. *Ann Rheum Dis*, 2012. 71(8): p. 1355-60.
30. Allanore, Y., et al., *Systemic sclerosis*. *Nat Rev Dis Primers*, 2015. 1: p. 15002.
31. Racine, M., et al., *The Impact of Pain and Itch on Functioning and Health-Related Quality of Life in Systemic Sclerosis: An Exploratory Study*. *J Pain Symptom Manage*, 2016. 52(1): p. 43-53.
32. Razykov, I., et al., *Prevalence and clinical correlates of pruritus in patients with systemic sclerosis: an updated analysis of 959 patients*. *Rheumatology (Oxford)*, 2013. 52(11): p. 2056-61.
33. Herrick, A.L., et al., *Observational study of treatment outcome in early diffuse cutaneous systemic sclerosis*. *J Rheumatol*, 2010. 37(1): p. 116-24.
34. Khanna, D., et al., *Predictors of lung function decline in scleroderma-related interstitial lung disease based on high-resolution computed tomography: implications for cohort enrichment in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease trials*. *Arthritis Res Ther*, 2015. 17: p. 372.
35. Khanna, D., et al., *Clinical course of lung physiology in patients with scleroderma and interstitial lung disease: analysis of the Scleroderma Lung Study Placebo Group*. *Arthritis Rheum*, 2011. 63(10): p. 3078-85.
36. Tashkin, D.P., et al., *Effects of 1-year treatment with cyclophosphamide on outcomes at 2 years in scleroderma lung disease*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. 176(10): p. 1026-34.
37. Panopoulos, S.T., et al., *Mycophenolate versus cyclophosphamide for progressive interstitial lung disease associated with systemic sclerosis: a 2-year case control study*. *Lung*, 2013. 191(5): p. 483-9.
38. Denton, C.P., *Scleroderma Lung Study II-clarity or obfuscation?* *Lancet Respir Med*, 2016. 4(9): p. 678-679.
39. Khanna, D., et al., *An Open-label, Phase II Study of the Safety and Tolerability of Pirfenidone in Patients with Scleroderma-associated Interstitial Lung Disease: the LOTUSS Trial*. *J Rheumatol*, 2016. 43(9): p. 1672-9.
40. van Laar, J.M., et al., *Autologous hematopoietic stem cell transplantation vs intravenous pulse cyclophosphamide in diffuse cutaneous systemic sclerosis: a randomized clinical trial*. *JAMA*, 2014. 311(24): p. 2490-8.

41. Sullivan, K., et al., *Myeloablative Autologous Transplantation of CD34+-Selected Hematopoietic Stem Cells (HSCT) Vs Monthly Intravenous Cyclophosphamide (CYC) for Severe Scleroderma with Internal Organ Involvement: Outcomes of a Randomized North American Clinical Trial*. *Arthritis & Rheumatology*, 2016. 68.
42. Keir, G.J., et al., *Severe interstitial lung disease in connective tissue disease: rituximab as rescue therapy*. *Eur Respir J*, 2012. 40(3): p. 641-8.
43. Hinchcliff, M., et al., *Survival in systemic sclerosis-pulmonary arterial hypertension by serum autoantibody status in the Pulmonary Hypertension Assessment and Recognition of Outcomes in Scleroderma (PHAROS) Registry*. *Semin Arthritis Rheum*, 2015. 45(3): p. 309-14.
44. Coghlan, J.G., et al., *Evidence-based detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: the DETECT study*. *Ann Rheum Dis*, 2014. 73(7): p. 1340-9.
45. Sobanski, V., et al., *Characteristics and Survival of Anti-U1 RNP Antibody-Positive Patients With Connective Tissue Disease-Associated Pulmonary Arterial Hypertension*. *Arthritis & Rheumatology*, 2016. 68(2): p. 484-493.
46. Valerio, C.J., et al., *Borderline mean pulmonary artery pressure in patients with systemic sclerosis: transpulmonary gradient predicts risk of developing pulmonary hypertension*. *Arthritis Rheum*, 2013. 65(4): p. 1074-84.
47. Shreiner, A.B., et al., *Gastrointestinal Manifestations of Systemic Sclerosis*. *J Scleroderma Relat Disord*, 2016. 1(3): p. 247-256.
48. Lepri, G., et al., *Evidence for oesophageal and anorectal involvement in very early systemic sclerosis (VEDOSS): report from a single VEDOSS/EUSTAR centre*. *Ann Rheum Dis*, 2015. 74(1): p. 124-8.
49. Thoua, N.M., et al., *Fecal incontinence in systemic sclerosis is secondary to neuropathy*. *Am J Gastroenterol*, 2012. 107(4): p. 597-603.
50. Thoua, N.M., et al., *Assessment of gastrointestinal symptoms in patients with systemic sclerosis in a UK tertiary referral centre*. *Rheumatology (Oxford)*, 2010. 49(9): p. 1770-5.
51. Marschall, M., et al., *The protein kinase pUL97 of human cytomegalovirus interacts with and phosphorylates the DNA polymerase processivity factor pUL44*. *Virology*, 2003. 311(1): p. 60-71.
52. Marschall, M., et al., *Cellular p32 recruits cytomegalovirus kinase pUL97 to redistribute the nuclear lamina*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. 280(39): p. 33357-33367.
53. Thoua, N.M., et al., *Gut fibrosis with altered colonic contractility in a mouse model of scleroderma*. *Rheumatology (Oxford)*, 2012. 51(11): p. 1989-98.
54. Raja, J., et al., *Sustained benefit from intravenous immunoglobulin therapy for gastrointestinal involvement in systemic sclerosis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2016. 55(1): p. 115-9.
55. Martinez, J., R.S. Lahijani, and S.C. St Jeor, *Analysis of a region of the human cytomegalovirus (AD169) genome coding for a 25-kilodalton virion protein*. *J Virol*, 1989. 63(1): p. 233-41.
56. Rosato, E., et al., *Nutritional status measured by BMI is impaired and correlates with left ventricular mass in patients with systemic sclerosis*. *Nutrition*, 2014. 30(2): p. 204-9.
57. Bharadwaj, S., et al., *Gastrointestinal Manifestations, Malnutrition, and Role of Enteral and Parenteral Nutrition in Patients With Scleroderma*. *J Clin Gastroenterol*, 2015. 49(7): p. 559-64.
58. Lynch, B.M., et al., *UK Scleroderma Study Group (UKSSG) guidelines on the diagnosis and management of scleroderma renal crisis*. *Clin Exp Rheumatol*, 2016. 34 Suppl 100(5): p. 106-109.

59. Penn, H., et al., *Scleroderma renal crisis: patient characteristics and long-term outcomes*. QJM, 2007. 100(8): p. 485-94.
60. Guillevin, L., et al., *Scleroderma renal crisis: a retrospective multicentre study on 91 patients and 427 controls*. Rheumatology (Oxford), 2012. 51(3): p. 460-7.
61. Penn, H., et al., *Targeting the endothelin axis in scleroderma renal crisis: rationale and feasibility*. QJM, 2013. 106(9): p. 839-48.
62. Chighizola, C.B., et al., *N-terminal pro Brain Natriuretic Peptide as predictor of outcome in scleroderma renal crisis*. Clin Exp Rheumatol, 2016. 34 Suppl 100(5): p. 122-128.
63. Devresse, A., et al., *Complement activation and effect of eculizumab in scleroderma renal crisis*. Medicine (Baltimore), 2016. 95(30): p. e4459.
64. Hudson, M., et al., *Exposure to ACE inhibitors prior to the onset of scleroderma renal crisis-results from the International Scleroderma Renal Crisis Survey*. Semin Arthritis Rheum, 2014. 43(5): p. 666-72.
65. Avouac, J., et al., *Cardiac biomarkers in systemic sclerosis: contribution of high-sensitivity cardiac troponin in addition to N-terminal pro-brain natriuretic peptide*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2015. 67(7): p. 1022-30.
66. Hachulla, E., et al., *Value of systolic pulmonary arterial pressure as a prognostic factor of death in the systemic sclerosis EUSTAR population*. Rheumatology (Oxford), 2015. 54(7): p. 1262-9.
67. Vacca, A., et al., *Cardiac arrhythmias and conduction defects in systemic sclerosis*. Rheumatology (Oxford), 2014. 53(7): p. 1172-7.
68. Bernardo, P., et al., *Implantable cardioverter defibrillator prevents sudden cardiac death in systemic sclerosis*. J Rheumatol, 2011. 38(8): p. 1617-21.
69. Crincoli, V., et al., *Orofacial Manifestations and Temporomandibular Disorders of Systemic Scleroderma: An Observational Study*. Int J Mol Sci, 2016. 17(7).
70. Nihtyanova, S.I., et al., *Clinical burden of digital vasculopathy in limited and diffuse cutaneous systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis, 2008. 67(1): p. 120-3.
71. Mihai, C., et al., *Digital ulcers predict a worse disease course in patients with systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis, 2016. 75(4): p. 681-6.
72. Herrick, A.L., et al., *Modified-release sildenafil reduces Raynaud's phenomenon attack frequency in limited cutaneous systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2011. 63(3): p. 775-82.
73. Allanore, Y., et al., *Clinical characteristics and predictors of gangrene in patients with systemic sclerosis and digital ulcers in the Digital Ulcer Outcome Registry: a prospective, observational cohort*. Ann Rheum Dis, 2016. 75(9): p. 1736-40.
74. Khanna, D., et al., *Effect of Macitentan on the Development of New Ischemic Digital Ulcers in Patients With Systemic Sclerosis: DUAL-1 and DUAL-2 Randomized Clinical Trials*. JAMA, 2016. 315(18): p. 1975-88.
75. Matucci-Cerinic, M., et al., *Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Ann Rheum Dis, 2011. 70(1): p. 32-8.
76. Denton, C.P. and D. Khanna, *Systemic sclerosis*. Lancet, 2017. 390(10103): p. 1685-1699.
77. van den Hoogen, F., et al., *2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative*. Arthritis Rheum, 2013. 65(11): p. 2737-47.
78. Nihtyanova, S.I. and C.P. Denton, *Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis*. Nat Rev Rheumatol, 2010. 6(2): p. 112-6.

79. Betteridge, Z.E., et al., *Brief Report: Anti-Eukaryotic Initiation Factor 2B Autoantibodies Are Associated With Interstitial Lung Disease in Patients With Systemic Sclerosis*. *Arthritis Rheumatol*, 2016. 68(11): p. 2778-2783.
80. Ghrenassia, E., et al., *Prevalence, correlates and outcomes of gastric antral vascular ectasia in systemic sclerosis: a EUSTAR case-control study*. *J Rheumatol*, 2014. 41(1): p. 99-105.
81. Salazar, G.A., et al., *Antinuclear antibody-negative systemic sclerosis*. *Semin Arthritis Rheum*, 2015. 44(6): p. 680-6.
82. Hamaguchi, Y., *Autoantibody profiles in systemic sclerosis: predictive value for clinical evaluation and prognosis*. *J Dermatol*, 2010. 37(1): p. 42-53.
83. Villalta, D., et al., *Diagnostic accuracy and predictive value of extended autoantibody profile in systemic sclerosis*. *Autoimmun Rev*, 2012. 12(2): p. 114-20.
84. Koenig, M., et al., *Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: a twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis*. *Arthritis Rheum*, 2008. 58(12): p. 3902-12.
85. Liaskos, C., et al., *Disease-related autoantibody profile in patients with systemic sclerosis*. *Autoimmunity*, 2017. 50(7): p. 414-421.
86. Rongioletti, F., et al., *Scleredema. A multicentre study of characteristics, comorbidities, course and therapy in 44 patients*. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2015. 29(12): p. 2399-404.
87. van den Hombergh, W.M., et al., *An easy prediction rule for diffuse cutaneous systemic sclerosis using only the timing and type of first symptoms and auto-antibodies: derivation and validation*. *Rheumatology (Oxford)*, 2016. 55(11): p. 2023-2032.
88. Bellando-Randone, S., S. Guiducci, and M. Matucci-Cerinic, *Very early diagnosis of systemic sclerosis*. *Pol Arch Med Wewn*, 2012. 122 Suppl 1: p. 18-23.
89. Domsic, R.T., et al., *Derivation and validation of a prediction rule for two-year mortality in early diffuse cutaneous systemic sclerosis*. *Arthritis Rheumatol*, 2014. 66(6): p. 1616-24.
90. Cavagna, L., et al., *Undiagnosed connective tissue diseases: High prevalence in pulmonary arterial hypertension patients*. *Medicine (Baltimore)*, 2016. 95(39): p. e4827.
91. Jordan, S., et al., *Performance of the new ACR/EULAR classification criteria for systemic sclerosis in clinical practice*. *Rheumatology (Oxford)*, 2015. 54(8): p. 1454-8.
92. Andreasson, K., et al., *Prevalence and incidence of systemic sclerosis in southern Sweden: population-based data with case ascertainment using the 1980 ARA criteria and the proposed ACR-EULAR classification criteria*. *Ann Rheum Dis*, 2014. 73(10): p. 1788-92.
93. Tyndall, A. and S. Fistarol, *The differential diagnosis of systemic sclerosis*. *Curr Opin Rheumatol*, 2013. 25(6): p. 692-9.
94. Hughes, M., et al., *Consensus best practice pathway of the UK Scleroderma Study Group: digital vasculopathy in systemic sclerosis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2015. 54(11): p. 2015-24.
95. Pakozdi, A., et al., *Does long term therapy with lansoprazole slow progression of oesophageal involvement in systemic sclerosis?* *Clin Exp Rheumatol*, 2009. 27(3 Suppl 54): p. 5-8.

96. Bissell, L.A., et al., *Absence of Scleroderma pattern at nail fold capillaroscopy valuable in the exclusion of Scleroderma in unselected patients with Raynaud's Phenomenon*. BMC Musculoskelet Disord, 2016. 17(1): p. 342.
97. Cutolo, M., W. Grassi, and M. Matucci Cerinic, *Raynaud's phenomenon and the role of capillaroscopy*. Arthritis Rheum, 2003. 48(11): p. 3023-30.
98. Chojnowski, M.M., A. Felis-Giemza, and M. Olesinska, *Capillaroscopy - a role in modern rheumatology*. Reumatologia, 2016. 54(2): p. 67-72.
99. Cutolo, M., A. Sulli, and V. Smith, *How to perform and interpret capillaroscopy*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2013. 27(2): p. 237-48.
100. Ogawa, T., et al., *Taxane-induced scleroderma-like skin changes resulting in gangrene: A case report*. J Dermatol, 2017. 44(4): p. e54-e55.
101. Motegi, S., et al., *Systemic sclerosis associated with silicone breast implantation*. Eur J Dermatol, 2013. 23(6): p. 894-5.
102. Bernstein, E.J., C. Schmidt-Lauber, and J. Kay, *Nephrogenic systemic fibrosis: a systemic fibrosing disease resulting from gadolinium exposure*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2012. 26(4): p. 489-503.
103. Denton, C.P., et al., *BSR and BHPR guideline for the treatment of systemic sclerosis*. Rheumatology (Oxford), 2016. 55(10): p. 1906-10.
104. Domsic, R.T., et al., *Derivation and External Validation of a Prediction Rule for Five-Year Mortality in Patients With Early Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis*. Arthritis Rheumatol, 2016. 68(4): p. 993-1003.
105. Chung, L., et al., *Validation of a novel radiographic scoring system for calcinosis affecting the hands of patients with systemic sclerosis*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2015. 67(3): p. 425-30.
106. Guillevin, L., et al., *Functional impairment of systemic scleroderma patients with digital ulcerations: results from the DUO Registry*. Clin Exp Rheumatol, 2013. 31(2 Suppl 76): p. 71-80.
107. Sultan, N., et al., *The health assessment questionnaire (HAQ) is strongly predictive of good outcome in early diffuse scleroderma: results from an analysis of two randomized controlled trials in early diffuse scleroderma*. Rheumatology (Oxford), 2004. 43(4): p. 472-8.
108. Valenzuela, A. and L. Chung, *Calcinosis: pathophysiology and management*. Curr Opin Rheumatol, 2015. 27(6): p. 542-8.
109. Sinzger, C., et al., *Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues*. J Gen Virol, 1995. 76 (Pt 4): p. 741-50.
110. Steininger, C., *Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system*. Clin Microbiol Infect, 2007. 13(10): p. 953-63.
111. Grosse, S.D., D.S. Ross, and S.C. Dollard, *Congenital cytomegalovirus (CMV) infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: a quantitative assessment*. J Clin Virol, 2008. 41(2): p. 57-62.
112. Koch, S., et al., *Human cytomegalovirus infection and T cell immunosenescence: a mini review*. Mech Ageing Dev, 2006. 127(6): p. 538-43.
113. Streblow, D.N., S.L. Orloff, and J.A. Nelson, *Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus*. Curr Opin Immunol, 2007. 19(5): p. 577-82.
114. Soderberg-Naucler, C., *Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer?* J Intern Med, 2006. 259(3): p. 219-46.
115. Biron, K.K., *Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases*. Antiviral Res, 2006. 71(2-3): p. 154-63.

116. Kalejta, R.F., *Tegument proteins of human cytomegalovirus*. Microbiol Mol Biol Rev, 2008. 72(2): p. 249-65, table of contents.
117. Sinclair, J. and P. Sissons, *Latency and reactivation of human cytomegalovirus*. J Gen Virol, 2006. 87(Pt 7): p. 1763-79.
118. Irmiere, A. and W. Gibson, *Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus*. Virology, 1983. 130(1): p. 118-33.
119. Dunn, W., et al., *Functional profiling of a human cytomegalovirus genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(24): p. 14223-8.
120. Yu, D., M.C. Silva, and T. Shenk, *Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(21): p. 12396-401.
121. Kouzarides, T., et al., *Sequence and transcription analysis of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene*. J Virol, 1987. 61(1): p. 125-33.
122. Albrecht, J.C. and B. Fleckenstein, *Structural organization of the conserved gene block of Herpesvirus saimiri coding for DNA polymerase, glycoprotein B, and major DNA binding protein*. Virology, 1990. 174(2): p. 533-42.
123. Mettenleiter, T.C., A. Saalmuller, and F. Weiland, *Pseudorabies virus protein homologous to herpes simplex virus type 1 ICP18.5 is necessary for capsid maturation*. J Virol, 1993. 67(3): p. 1236-45.
124. Bogner, E., et al., *Identification of the gene product encoded by ORF UL56 of the human cytomegalovirus genome*. Virology, 1993. 196(1): p. 290-3.
125. Gong, M. and E. Kieff, *Intracellular trafficking of two major Epstein-Barr virus glycoproteins, gp350/220 and gp110*. J Virol, 1990. 64(4): p. 1507-16.
126. Cai, W.H., B. Gu, and S. Person, *Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion*. J Virol, 1988. 62(8): p. 2596-604.
127. Herrold, R.E., et al., *Glycoprotein 110, the Epstein-Barr virus homolog of herpes simplex virus glycoprotein B, is essential for Epstein-Barr virus replication in vivo*. J Virol, 1996. 70(3): p. 2049-54.
128. Schleiss, M.R., *Cloning and characterization of the guinea pig cytomegalovirus glycoprotein B gene*. Virology, 1994. 202(1): p. 173-85.
129. Schleiss, M.R., *Sequence and transcriptional analysis of the guinea-pig cytomegalovirus DNA polymerase gene*. J Gen Virol, 1995. 76 (Pt 7): p. 1827-33.
130. Tengelsen, L.A., et al., *Herpes simplex virus type 1 DNA cleavage and encapsidation require the product of the UL28 gene: isolation and characterization of two UL28 deletion mutants*. J Virol, 1993. 67(6): p. 3470-80.
131. Anders, D.G. and W. Gibson, *Location, transcript analysis, and partial nucleotide sequence of the cytomegalovirus gene encoding an early DNA-binding protein with similarities to ICP8 of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 1988. 62(4): p. 1364-72.
132. Spaete, R.R., et al., *Human cytomegalovirus strain Towne glycoprotein B is processed by proteolytic cleavage*. Virology, 1988. 167(1): p. 207-25.
133. Chee, M.S., et al., *Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. 154: p. 125-69.
134. A, S., et al., *Paradoxical reaction in tuberculosis-An enigma*. J Assoc Physicians India, 2016. 64(1): p. 117.
135. Anders, D.G., A. Irmiere, and W. Gibson, *Identification and characterization of a major early cytomegalovirus DNA-binding protein*. J Virol, 1986. 58(2): p. 253-62.
136. Kemble, G.W., et al., *A cytomegalovirus protein with properties of herpes simplex virus ICP8: partial purification of the polypeptide and map position of the gene*. J Virol, 1987. 61(10): p. 3143-51.

137. Conley, A.J., et al., *Molecular genetics of herpes simplex virus. VII. Characterization of a temperature-sensitive mutant produced by in vitro mutagenesis and defective in DNA synthesis and accumulation of gamma polypeptides.* J Virol, 1981. 37(1): p. 191-206.
138. Lee, C.K. and D.M. Knipe, *Thermolabile in vivo DNA-binding activity associated with a protein encoded by mutants of herpes simplex virus type 1.* J Virol, 1983. 46(3): p. 909-19.
139. Quinlan, M.P., L.B. Chen, and D.M. Knipe, *The intranuclear location of a herpes simplex virus DNA-binding protein is determined by the status of viral DNA replication.* Cell, 1984. 36(4): p. 857-68.
140. Ruyechan, W.T. and A.C. Weir, *Interaction with nucleic acids and stimulation of the viral DNA polymerase by the herpes simplex virus type 1 major DNA-binding protein.* J Virol, 1984. 52(3): p. 727-33.
141. Pari, G.S. and D.G. Anders, *Eleven loci encoding trans-acting factors are required for transient complementation of human cytomegalovirus oriLyt-dependent DNA replication.* J Virol, 1993. 67(12): p. 6979-88.
142. Pari, G.S., M.A. Kacica, and D.G. Anders, *Open reading frames UL44, IRS1/TRS1, and UL36-38 are required for transient complementation of human cytomegalovirus oriLyt-dependent DNA synthesis.* J Virol, 1993. 67(5): p. 2575-82.
143. Sarisky, R.T. and G.S. Hayward, *Evidence that the UL84 gene product of human cytomegalovirus is essential for promoting oriLyt-dependent DNA replication and formation of replication compartments in cotransfection assays.* J Virol, 1996. 70(11): p. 7398-413.
144. Liu, F.Y. and B. Roizman, *The promoter, transcriptional unit, and coding sequence of herpes simplex virus 1 family 35 proteins are contained within and in frame with the UL26 open reading frame.* J Virol, 1991. 65(1): p. 206-12.
145. Welch, A.R., L.M. McNally, and W. Gibson, *Cytomegalovirus assembly protein nested gene family: four 3'-coterminally transcribed transcripts encode four in-frame, overlapping proteins.* J Virol, 1991. 65(8): p. 4091-100.
146. Gibson, W., *Structure and formation of the cytomegalovirus virion.* Curr Top Microbiol Immunol, 2008. 325: p. 187-204.
147. Loveland, A.N., et al., *The amino-conserved domain of human cytomegalovirus UL80a proteins is required for key interactions during early stages of capsid formation and virus production.* J Virol, 2007. 81(2): p. 620-8.
148. Wood, L.J., et al., *Human cytomegalovirus capsid assembly protein precursor (pUL80.5) interacts with itself and with the major capsid protein (pUL86) through two different domains.* J Virol, 1997. 71(1): p. 179-90.
149. Plafker, S.M. and W. Gibson, *Cytomegalovirus assembly protein precursor and proteinase precursor contain two nuclear localization signals that mediate their own nuclear translocation and that of the major capsid protein.* J Virol, 1998. 72(10): p. 7722-32.
150. Beaudet-Miller, M., et al., *Virus-specific interaction between the human cytomegalovirus major capsid protein and the C terminus of the assembly protein precursor.* J Virol, 1996. 70(11): p. 8081-8.
151. Desai, P. and S. Person, *Molecular interactions between the HSV-1 capsid proteins as measured by the yeast two-hybrid system.* Virology, 1996. 220(2): p. 516-21.
152. Pelletier, A., et al., *Self-association of herpes simplex virus type 1 ICP35 is via coiled-coil interactions and promotes stable interaction with the major capsid protein.* J Virol, 1997. 71(7): p. 5197-208.
153. Nguyen, N.L., A.N. Loveland, and W. Gibson, *Nuclear localization sequences in cytomegalovirus capsid assembly proteins (UL80 proteins) are required for virus*

- production: inactivating NLS1, NLS2, or both affects replication to strikingly different extents. J Virol, 2008. 82(11): p. 5381-9.*
154. *Spencer, J.V., et al., Assembly of the herpes simplex virus capsid: preformed triplexes bind to the nascent capsid. J Virol, 1998. 72(5): p. 3944-51.*
 155. *Tatman, J.D., et al., Assembly of herpes simplex virus type 1 capsids using a panel of recombinant baculoviruses. J Gen Virol, 1994. 75 (Pt 5): p. 1101-13.*
 156. *Thomsen, D.R., L.L. Roof, and F.L. Homa, Assembly of herpes simplex virus (HSV) intermediate capsids in insect cells infected with recombinant baculoviruses expressing HSV capsid proteins. J Virol, 1994. 68(4): p. 2442-57.*
 157. *Gao, M., et al., The protease of herpes simplex virus type 1 is essential for functional capsid formation and viral growth. J Virol, 1994. 68(6): p. 3702-12.*
 158. *Preston, V.G., J.A. Coates, and F.J. Rixon, Identification and characterization of a herpes simplex virus gene product required for encapsidation of virus DNA. J Virol, 1983. 45(3): p. 1056-64.*
 159. *Trang, P., et al., Expression of an RNase P ribozyme against the mRNA encoding human cytomegalovirus protease inhibits viral capsid protein processing and growth. J Mol Biol, 2003. 328(5): p. 1123-35.*
 160. *Kennard, J., et al., The 25 amino acid residues at the carboxy terminus of the herpes simplex virus type 1 UL26.5 protein are required for the formation of the capsid shell around the scaffold. J Gen Virol, 1995. 76 (Pt 7): p. 1611-21.*
 161. *Thomsen, D.R., et al., Assembly of the herpes simplex virus capsid: requirement for the carboxyl-terminal twenty-five amino acids of the proteins encoded by the UL26 and UL26.5 genes. J Virol, 1995. 69(6): p. 3690-703.*
 162. *Roby, C. and W. Gibson, Characterization of phosphoproteins and protein kinase activity of virions, noninfectious enveloped particles, and dense bodies of human cytomegalovirus. J Virol, 1986. 59(3): p. 714-27.*
 163. *Revello, M.G., et al., Nuclear expression of the lower matrix protein of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes of immunocompromised viraemic patients. J Gen Virol, 1992. 73 (Pt 2): p. 437-42.*
 164. *Beninga, J., B. Kropff, and M. Mach, Comparative analysis of fourteen individual human cytomegalovirus proteins for helper T cell response. J Gen Virol, 1995. 76 (Pt 1): p. 153-60.*
 165. *Grefte, J.M., et al., The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. J Gen Virol, 1992. 73 (Pt 11): p. 2923-32.*
 166. *Jahn, G., et al., The two major structural phosphoproteins (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties. J Gen Virol, 1987. 68 (Pt 5): p. 1327-37.*
 167. *Kern, F., et al., Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. J Infect Dis, 2002. 185(12): p. 1709-16.*
 168. *McLaughlin-Taylor, E., et al., Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. J Med Virol, 1994. 43(1): p. 103-10.*
 169. *Wills, M.R., et al., The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. J Virol, 1996. 70(11): p. 7569-79.*
 170. *Nowak, B., et al., Characterization of monoclonal antibodies and polyclonal immune sera directed against human cytomegalovirus virion proteins. Virology, 1984. 132(2): p. 325-38.*

171. Pande, H., et al., *Cloning and physical mapping of a gene fragment coding for a 64-kilodalton major late antigen of human cytomegalovirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. 81(15): p. 4965-9.
172. Ruger, B., et al., *Primary structure and transcription of the genes coding for the two virion phosphoproteins pp65 and pp71 of human cytomegalovirus*. J Virol, 1987. 61(2): p. 446-53.
173. Schmolke, S., et al., *The dominant phosphoprotein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture*. J Virol, 1995. 69(10): p. 5959-68.
174. Gilbert, M.J., et al., *Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product*. Nature, 1996. 383(6602): p. 720-2.
175. Odeberg, J., et al., *Human cytomegalovirus protein pp65 mediates accumulation of HLA-DR in lysosomes and destruction of the HLA-DR alpha-chain*. Blood, 2003. 101(12): p. 4870-7.
176. Arnon, T.I., et al., *Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus*. Nat Immunol, 2005. 6(5): p. 515-23.
177. Abate, D.A., S. Watanabe, and E.S. Mocarski, *Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response*. J Virol, 2004. 78(20): p. 10995-1006.
178. Browne, E.P., et al., *Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs*. J Virol, 2001. 75(24): p. 12319-30.
179. Taylor, R.T. and W.A. Bresnahan, *Human cytomegalovirus immediate-early 2 protein IE86 blocks virus-induced chemokine expression*. J Virol, 2006. 80(2): p. 920-8.
180. Paulus, C., S. Krauss, and M. Nevels, *A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(10): p. 3840-5.
181. Dal Monte, P., et al., *Stably expressed antisense RNA to cytomegalovirus UL83 inhibits viral replication*. J Virol, 1996. 70(4): p. 2086-94.
182. Mar, E.C., P.C. Patel, and E.S. Huang, *Human cytomegalovirus-associated DNA polymerase and protein kinase activities*. J Gen Virol, 1981. 57(Pt 1): p. 149-56.
183. Britt, W.J. and D. Auger, *Human cytomegalovirus virion-associated protein with kinase activity*. J Virol, 1986. 59(1): p. 185-8.
184. Michelson, S., M. Tardy-Panit, and O. Barzu, *Properties of a human cytomegalovirus-induced protein kinase*. Virology, 1984. 134(2): p. 259-68.
185. Somogyi, T., S. Michelson, and M.J. Masse, *Genomic location of a human cytomegalovirus protein with protein kinase activity (PK68)*. Virology, 1990. 174(1): p. 276-85.
186. Gallina, A., et al., *Polo-like kinase 1 as a target for human cytomegalovirus pp65 lower matrix protein*. J Virol, 1999. 73(2): p. 1468-78.
187. Nogalski, M.T., et al., *The human cytomegalovirus virion possesses an activated casein kinase II that allows for the rapid phosphorylation of the inhibitor of NF-kappaB, IkappaBalpha*. J Virol, 2007. 81(10): p. 5305-14.
188. Meyer, H., et al., *Identification and procaryotic expression of the gene coding for the highly immunogenic 28-kilodalton structural phosphoprotein (pp28) of human cytomegalovirus*. J Virol, 1988. 62(7): p. 2243-50.
189. Depto, A.S. and R.M. Stenberg, *Functional analysis of the true late human cytomegalovirus pp28 upstream promoter: cis-acting elements and viral trans-acting proteins necessary for promoter activation*. J Virol, 1992. 66(5): p. 3241-6.

190. Kerry, J.A., et al., *Translational regulation of the human cytomegalovirus pp28 (UL99) late gene*. J Virol, 1997. 71(2): p. 981-7.
191. Lahijani, R.S., et al., *Characterization of a human cytomegalovirus 1.6-kilobase late mRNA and identification of its putative protein product*. J Virol, 1991. 65(1): p. 373-81.
192. Wing, B.A. and E.S. Huang, *Analysis and mapping of a family of 3'-coterminally transcribed transcripts containing coding sequences for human cytomegalovirus open reading frames UL93 through UL99*. J Virol, 1995. 69(3): p. 1521-31.
193. Sanchez, V., E. Sztul, and W.J. Britt, *Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment*. J Virol, 2000. 74(8): p. 3842-51.
194. Landini, M.P., et al., *Human cytomegalovirus structural components: intracellular and intraviral localization of p28 and p65-69 by immunoelectron microscopy*. Virus Res, 1987. 8(1): p. 15-23.
195. Sanchez, V., et al., *Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly*. J Virol, 2000. 74(2): p. 975-86.
196. Jones, T.R. and S.W. Lee, *An acidic cluster of human cytomegalovirus UL99 tegument protein is required for trafficking and function*. J Virol, 2004. 78(3): p. 1488-502.
197. Seo, J.Y. and W.J. Britt, *Sequence requirements for localization of human cytomegalovirus tegument protein pp28 to the virus assembly compartment and for assembly of infectious virus*. J Virol, 2006. 80(11): p. 5611-26.
198. Silva, M.C., et al., *Human cytomegalovirus UL99-encoded pp28 is required for the cytoplasmic envelopment of tegument-associated capsids*. J Virol, 2003. 77(19): p. 10594-605.
199. Britt, W.J., et al., *Rapid genetic engineering of human cytomegalovirus by using a lambda phage linear recombination system: demonstration that pp28 (UL99) is essential for production of infectious virus*. J Virol, 2004. 78(1): p. 539-43.
200. Silva, M.C., J. Schroer, and T. Shenk, *Human cytomegalovirus cell-to-cell spread in the absence of an essential assembly protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(6): p. 2081-6.
201. Luo, S., H. Long, and Q. Lu, *Recent advances in understanding pathogenesis and therapeutic strategies of Systemic Lupus Erythematosus*. Int Immunopharmacol, 2020. 89(Pt A): p. 107028.
202. Perez-Mercado, A.E. and S. Vila-Perez, *Cytomegalovirus as a trigger for systemic lupus erythematosus*. J Clin Rheumatol, 2010. 16(7): p. 335-7.
203. Bendiksen, S., et al., *A longitudinal study of human cytomegalovirus serology and viraemia fails to detect active viral infection in 20 systemic lupus erythematosus patients*. Lupus, 2000. 9(2): p. 120-6.
204. Rider, J.R., et al., *Human cytomegalovirus infection and systemic lupus erythematosus*. Clin Exp Rheumatol, 1997. 15(4): p. 405-9.
205. Takizawa, Y., et al., *Clinical characteristics of cytomegalovirus infection in rheumatic diseases: multicentre survey in a large patient population*. Rheumatology (Oxford), 2008. 47(9): p. 1373-8.
206. Newkirk, M.M., W.J. van Venrooij, and G.S. Marshall, *Autoimmune response to U1 small nuclear ribonucleoprotein (U1 snRNP) associated with cytomegalovirus infection*. Arthritis Res, 2001. 3(4): p. 253-8.
207. Su, B.Y., et al., *Incidental discovery of high systemic lupus erythematosus disease activity associated with cytomegalovirus viral activity*. Med Microbiol Immunol, 2007. 196(3): p. 165-70.

208. McClain, M.T., et al., *An altered immune response to Epstein-Barr nuclear antigen 1 in pediatric systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(1): p. 360-8.
209. Parks, C.G., et al., *Association of Epstein-Barr virus with systemic lupus erythematosus: effect modification by race, age, and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 genotype*. *Arthritis Rheum*, 2005. 52(4): p. 1148-59.
210. James, J.A., et al., *Systemic lupus erythematosus in adults is associated with previous Epstein-Barr virus exposure*. *Arthritis Rheum*, 2001. 44(5): p. 1122-6.
211. Harley, J.B. and J.A. James, *Epstein-Barr virus infection induces lupus autoimmunity*. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 2006. 64(1-2): p. 45-50.
212. HoHsieh, A., et al., *B cell epitope of human cytomegalovirus phosphoprotein 65 (HCMV pp65) induced anti-dsDNA antibody in BALB/c mice*. *Arthritis Res Ther*, 2017. 19(1): p. 65.
213. Hsieh, A.H., et al., *Fragment of tegument protein pp65 of human cytomegalovirus induces autoantibodies in BALB/c mice*. *Arthritis Res Ther*, 2011. 13(5): p. R162.
214. Neo, J.Y.J., et al., *Characterisation of a human antibody that potentially links cytomegalovirus infection with systemic lupus erythematosus*. *Sci Rep*, 2019. 9(1): p. 9998.
215. Bouza, E., J.G. Moya, and P. Munoz, *Infections in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis*. *Infect Dis Clin North Am*, 2001. 15(2): p. 335-61, vii.
216. Bertsias, G., et al., *EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics*. *Ann Rheum Dis*, 2008. 67(2): p. 195-205.
217. Fei, Y., et al., *Death causes and pathogens analysis of systemic lupus erythematosus during the past 26 years*. *Clin Rheumatol*, 2014. 33(1): p. 57-63.
218. Choo, H.M.C., et al., *Risk factors for cytomegalovirus disease in systemic lupus erythematosus (SLE): a systematic review*. *Adv Rheumatol*, 2019. 59(1): p. 12.
219. Xue, Y., et al., *Cytomegalovirus Pneumonia in Patients with Rheumatic Diseases After Immunosuppressive Therapy: A Single Center Study in China*. *Chin Med J (Engl)*, 2016. 129(3): p. 267-73.
220. Balandraud, N. and J. Roudier, *Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis*. *Joint Bone Spine*, 2018. 85(2): p. 165-170.
221. Musiani, M., et al., *Comparison of the immune response to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in sera and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 1987. 46(11): p. 837-42.
222. Neidhart, M., et al., *Increased serum levels of antibodies against human cytomegalovirus and prevalence of autoantibodies in systemic sclerosis*. *Arthritis Rheum*, 1999. 42(2): p. 389-92.
223. Pierer, M., et al., *Association of anticytomegalovirus seropositivity with more severe joint destruction and more frequent joint surgery in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2012. 64(6): p. 1740-9.
224. Alvarez-Lafuente, R., et al., *Potential relationship between herpes viruses and rheumatoid arthritis: analysis with quantitative real time polymerase chain reaction*. *Ann Rheum Dis*, 2005. 64(9): p. 1357-9.
225. Mourgues, C., et al., *Monitoring of Epstein-Barr virus (EBV)/cytomegalovirus (CMV)/varicella-zoster virus (VZV) load in patients receiving tocilizumab for rheumatoid arthritis*. *Joint Bone Spine*, 2016. 83(4): p. 412-5.
226. Mehraein, Y., et al., *Latent Epstein-Barr virus (EBV) infection and cytomegalovirus (CMV) infection in synovial tissue of autoimmune chronic arthritis determined by RNA- and DNA-in situ hybridization*. *Mod Pathol*, 2004. 17(7): p. 781-9.

227. Taylor, P., et al., *A systematic review of serum biomarkers anti-cyclic citrullinated Peptide and rheumatoid factor as tests for rheumatoid arthritis*. *Autoimmune Dis*, 2011. 2011: p. 815038.
228. Nishimura, K., et al., *Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis*. *Ann Intern Med*, 2007. 146(11): p. 797-808.
229. Bizzaro, N., et al., *Anti-cyclic citrullinated peptide antibody titer predicts time to rheumatoid arthritis onset in patients with undifferentiated arthritis: results from a 2-year prospective study*. *Arthritis Res Ther*, 2013. 15(1): p. R16.
230. Vossenaar, E.R. and W.J. van Venrooij, *Citrullinated proteins: sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2004. 6(3): p. 107-11.
231. Acharya, N.K., et al., *Neuronal PAD4 expression and protein citrullination: possible role in production of autoantibodies associated with neurodegenerative disease*. *J Autoimmun*, 2012. 38(4): p. 369-80.
232. Knight, J.S., et al., *Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/lpr mice*. *Ann Rheum Dis*, 2015. 74(12): p. 2199-206.
233. Yang, L., D. Tan, and H. Piao, *Myelin Basic Protein Citrullination in Multiple Sclerosis: A Potential Therapeutic Target for the Pathology*. *Neurochem Res*, 2016. 41(8): p. 1845-56.
234. Yuzhalin, A.E., *Citrullination in Cancer*. *Cancer Res*, 2019. 79(7): p. 1274-1284.
235. Suzuki, A., et al., *Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis*. *Nat Genet*, 2003. 34(4): p. 395-402.
236. Kuhn, K.A., et al., *Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis*. *J Clin Invest*, 2006. 116(4): p. 961-73.
237. Faulkner, C.L., et al., *The virome in early life and childhood and development of islet autoimmunity and type 1 diabetes: A systematic review and meta-analysis of observational studies*. *Rev Med Virol*, 2021. 31(5): p. 1-14.
238. Willis, V.C., et al., *N-alpha-benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis*. *J Immunol*, 2011. 186(7): p. 4396-404.
239. Klareskog, L., et al., *A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination*. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(1): p. 38-46.
240. Deo, S.S., et al., *Detection of Viral Citrullinated Peptide Antibodies Directed Against EBV or VCP: In Early Rheumatoid Arthritis Patients of Indian Origin*. *J Lab Physicians*, 2010. 2(2): p. 93-9.
241. Kraal, L.J.N., et al., *Anti-citrullinated protein antibody response after primary EBV infection in kidney transplant patients*. *PLoS One*, 2018. 13(5): p. e0197219.
242. Trier, N.H., et al., *Antibodies to a strain-specific citrullinated Epstein-Barr virus peptide diagnoses rheumatoid arthritis*. *Sci Rep*, 2018. 8(1): p. 3684.
243. Casanova, V., et al., *Citrullination Alters the Antiviral and Immunomodulatory Activities of the Human Cathelicidin LL-37 During Rhinovirus Infection*. *Front Immunol*, 2020. 11: p. 85.
244. Davis, J.M., 3rd, et al., *A profile of immune response to herpesvirus is associated with radiographic joint damage in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2012. 14(1): p. R24.
245. Martens, P.B., et al., *Expansion of unusual CD4+ T cells in severe rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1997. 40(6): p. 1106-14.

246. Pawlik, A., et al., *The expansion of CD4+CD28- T cells in patients with rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2003. 5(4): p. R210-3.
247. Gerli, R., et al., *CD4+CD28- T lymphocytes contribute to early atherosclerotic damage in rheumatoid arthritis patients*. *Circulation*, 2004. 109(22): p. 2744-8.
248. Namekawa, T., et al., *Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis*. *Arthritis Rheum*, 1998. 41(12): p. 2108-16.
249. van Leeuwen, E.M., et al., *Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection*. *J Immunol*, 2004. 173(3): p. 1834-41.
250. Fasth, A.E., et al., *T cell infiltrates in the muscles of patients with dermatomyositis and polymyositis are dominated by CD28null T cells*. *J Immunol*, 2009. 183(7): p. 4792-9.
251. Hooper, M., et al., *Cytomegalovirus seropositivity is associated with the expansion of CD4+CD28- and CD8+CD28- T cells in rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 1999. 26(7): p. 1452-7.
252. Bano, A., et al., *CD28 (null) CD4 T-cell expansions in autoimmune disease suggest a link with cytomegalovirus infection*. *F1000Res*, 2019. 8.
253. Hamerman, D., I. Gresser, and C. Smith, *Isolation of cytomegalovirus from synovial cells of a patient with rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 1982. 9(5): p. 658-64.
254. Einsele, H., et al., *Demonstration of cytomegalovirus (CMV) DNA and anti-CMV response in the synovial membrane and serum of patients with rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 1992. 19(5): p. 677-81.
255. Murayama, T., et al., *Cytomegalovirus genomes demonstrated by polymerase chain reaction in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients*. *Clin Exp Rheumatol*, 1992. 10(2): p. 161-4.
256. Xu, X., et al., *Detection of human cytomegalovirus in synovial neutrophils obtained from patients with rheumatoid arthritis*. *Scand J Rheumatol*, 2021. 50(3): p. 183-188.
257. Melnick, J.L., et al., *Cytomegalovirus DNA in arterial walls of patients with atherosclerosis*. *J Med Virol*, 1994. 42(2): p. 170-4.
258. Xenaki, E., et al., *Detection of cytomegalovirus in atherosclerotic plaques and nonatherosclerotic arteries*. *Angiology*, 2009. 60(4): p. 504-8.
259. Wang, H., et al., *Cytomegalovirus Infection and Relative Risk of Cardiovascular Disease (Ischemic Heart Disease, Stroke, and Cardiovascular Death): A Meta-Analysis of Prospective Studies Up to 2016*. *J Am Heart Assoc*, 2017. 6(7).
260. Shenk, T. and J.C. Alwine, *Human Cytomegalovirus: Coordinating Cellular Stress, Signaling, and Metabolic Pathways*. *Annu Rev Virol*, 2014. 1(1): p. 355-74.
261. Rothe, K., et al., *Latent Cytomegalovirus Infection in Rheumatoid Arthritis and Increased Frequencies of Cytolytic LIR-1+CD8+ T Cells*. *Arthritis Rheumatol*, 2016. 68(2): p. 337-46.
262. Northfield, J., et al., *Does memory improve with age? CD85j (ILT-2/LIR-1) expression on CD8 T cells correlates with 'memory inflation' in human cytomegalovirus infection*. *Immunol Cell Biol*, 2005. 83(2): p. 182-8.
263. Wagner, C.S., et al., *Human cytomegalovirus-derived protein UL18 alters the phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells*. *J Leukoc Biol*, 2008. 83(1): p. 56-63.
264. Saverino, D., et al., *The CD85/LIR-1/ILT2 inhibitory receptor is expressed by all human T lymphocytes and down-regulates their functions*. *J Immunol*, 2000. 165(7): p. 3742-55.
265. Compston, A. and A. Coles, *Multiple sclerosis*. *Lancet*, 2008. 372(9648): p. 1502-17.

266. Olsson, T., L.F. Barcellos, and L. Alfredsson, *Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis*. *Nat Rev Neurol*, 2017. 13(1): p. 25-36.
267. Lucas, R.M., et al., *Epstein-Barr virus and multiple sclerosis*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2011. 82(10): p. 1142-8.
268. Ascherio, A., *Environmental factors in multiple sclerosis*. *Expert Rev Neurother*, 2013. 13(12 Suppl): p. 3-9.
269. Alari-Pahissa, E., et al., *Low cytomegalovirus seroprevalence in early multiple sclerosis: a case for the 'hygiene hypothesis'?* *Eur J Neurol*, 2018. 25(7): p. 925-933.
270. White, J. and R. Jago, *Fat distribution, physical activity and cardiovascular risk among adolescent girls*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2013. 23(3): p. 189-95.
271. Sanadgol, N., et al., *Prevalence of cytomegalovirus infection and its role in total immunoglobulin pattern in Iranian patients with different subtypes of multiple sclerosis*. *New Microbiol*, 2011. 34(3): p. 263-74.
272. Najafi, S., et al., *Prevalence of Cytomegalovirus in Patients With Multiple Sclerosis: A Case-Control Study in Northern Iran*. *Jundishapur J Microbiol*, 2016. 9(7): p. e36582.
273. Vanheusden, M., et al., *Cytomegalovirus: a culprit or protector in multiple sclerosis?* *Trends Mol Med*, 2015. 21(1): p. 16-23.
274. Clerico, M., et al., *Active CMV infection in two patients with multiple sclerosis treated with alemtuzumab*. *Mult Scler*, 2017. 23(6): p. 874-876.
275. Costa-Garcia, M., et al., *Antibody-mediated response of NKG2Cbright NK cells against human cytomegalovirus*. *J Immunol*, 2015. 194(6): p. 2715-24.
276. Lopez-Montanes, M., et al., *Antibody-Dependent NK Cell Activation Differentially Targets EBV-Infected Cells in Lytic Cycle and Bystander B Lymphocytes Bound to Viral Antigen-Containing Particles*. *J Immunol*, 2017. 199(2): p. 656-665.
277. Lunemann, J.D., et al., *Elevated Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen-1 immune responses predict conversion to multiple sclerosis*. *Ann Neurol*, 2010. 67(2): p. 159-69.
278. Maple, P.A.C., et al., *A different response to cytomegalovirus (CMV) and Epstein-Barr virus (EBV) infection in UK people with multiple sclerosis (PwMS) compared to controls*. *J Infect*, 2020. 80(3): p. 320-325.
279. Zabalza, A., et al., *Impact of cytomegalovirus infection on B cell differentiation and cytokine production in multiple sclerosis*. *J Neuroinflammation*, 2020. 17(1): p. 161.
280. Mine, K., et al., *Genetic Susceptibility of the Host in Virus-Induced Diabetes*. *Microorganisms*, 2020. 8(8).
281. Aarnisalo, J., et al., *Cytomegalovirus infection in early infancy: risk of induction and progression of autoimmunity associated with type 1 diabetes*. *Diabetologia*, 2008. 51(5): p. 769-72.
282. Hiltunen, M., et al., *Serological evaluation of the role of cytomegalovirus in the pathogenesis of IDDM: a prospective study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group*. *Diabetologia*, 1995. 38(6): p. 705-10.
283. Ivarsson, S.A., et al., *The prevalence of type 1 diabetes mellitus at follow-up of Swedish infants congenitally infected with cytomegalovirus*. *Diabet Med*, 1993. 10(6): p. 521-3.
284. Pak, C.Y., et al., *Human pancreatic islet cell specific 38 kilodalton autoantigen identified by cytomegalovirus-induced monoclonal islet cell autoantibody*. *Diabetologia*, 1990. 33(9): p. 569-72.
285. Ward, K.P., W.H. Galloway, and I.A. Auchterlonie, *Congenital cytomegalovirus infection and diabetes*. *Lancet*, 1979. 1(8114): p. 497.

286. Hyoty, H., et al., *Decreased antibody reactivity to Epstein-Barr virus capsid antigen in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus*. APMIS, 1991. 99(4): p. 359-63.
287. Saber, A.Z.A.B.I. and A.H. Mohammed, *The Roles of Human Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus in Type 1 Diabetes Mellitus*. Ann. Trop. Med. Health, 2019. 22: p. 90-99.
288. Hjelmesaeth, J., et al., *Is there a link between cytomegalovirus infection and new-onset posttransplantation diabetes mellitus? Potential mechanisms of virus induced beta-cell damage*. Nephrol Dial Transplant, 2005. 20(11): p. 2311-5.
289. Radic, M., D. Martinovic Kaliterna, and J. Radic, *Infectious disease as aetiological factor in the pathogenesis of systemic sclerosis*. Neth J Med, 2010. 68(11): p. 348-53.
290. Randone, S.B., S. Guiducci, and M.M. Cerinic, *Systemic sclerosis and infections*. Autoimmun Rev, 2008. 8(1): p. 36-40.
291. Bilgin, H., H. Kocabas, and R. Kesli, *The prevalence of infectious agents in patients with systemic sclerosis*. Turk J Med Sci, 2015. 45(6): p. 1192-7.
292. Esen, B.A., et al., *Serologic response to Epstein-Barr virus antigens in patients with systemic lupus erythematosus: a controlled study*. Rheumatol Int, 2012. 32(1): p. 79-83.
293. Vaughan, J.H., et al., *Evidence of activation of 2 herpesviruses, Epstein-Barr virus and cytomegalovirus, in systemic sclerosis and normal skins*. J Rheumatol, 2000. 27(3): p. 821-3.
294. Pandey, J.P. and E.C. LeRoy, *Human cytomegalovirus and the vasculopathies of autoimmune diseases (especially scleroderma), allograft rejection, and coronary restenosis*. Arthritis Rheum, 1998. 41(1): p. 10-5.
295. Ferri, C., et al., *Systemic sclerosis following human cytomegalovirus infection*. Ann Rheum Dis, 2002. 61(10): p. 937-8.
296. Pandey, J.P., *Immunoglobulin GM genes and IgG antibodies to cytomegalovirus in patients with systemic sclerosis*. Clin Exp Rheumatol, 2004. 22(3 Suppl 33): p. S35-7.
297. Jarvis, M.A. and J.A. Nelson, *Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages*. Curr Opin Microbiol, 2002. 5(4): p. 403-7.
298. Muryoi, T., et al., *Antitopoisomerase I monoclonal autoantibodies from scleroderma patients and tight skin mouse interact with similar epitopes*. J Exp Med, 1992. 175(4): p. 1103-9.
299. Lunardi, C., et al., *Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells*. Nat Med, 2000. 6(10): p. 1183-6.
300. Lerner, A.M., et al., *IgM serum antibodies to human cytomegalovirus nonstructural gene products p52 and CM2(UL44 and UL57) are uniquely present in a subset of patients with chronic fatigue syndrome*. In Vivo, 2002. 16(3): p. 153-9.
301. Efthymiou, G., et al., *Anti-hsp60 antibody responses based on Helicobacter pylori in patients with multiple sclerosis: (ir)Relevance to disease pathogenesis*. J Neuroimmunol, 2016. 298: p. 19-23.
302. Arnson, Y., et al., *The role of infections in the immunopathogenesis of systemic sclerosis--evidence from serological studies*. Ann N Y Acad Sci, 2009. 1173: p. 627-32.
303. Namboodiri, A.M., K.M. Rocca, and J.P. Pandey, *IgG antibodies to human cytomegalovirus late protein UL94 in patients with systemic sclerosis*. Autoimmunity, 2004. 37(3): p. 241-4.

304. Pastano, R., et al., *Antibodies against human cytomegalovirus late protein UL94 in the pathogenesis of scleroderma-like skin lesions in chronic graft-versus-host disease*. *Int Immunol*, 2012. 24(9): p. 583-91.
305. Lunardi, C., et al., *Antibodies against human cytomegalovirus in the pathogenesis of systemic sclerosis: a gene array approach*. *PLoS Med*, 2006. 3(1): p. e2.
306. Barzilai, O., et al., *Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in autoimmune diseases: are they truly notorious? A preliminary report*. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. 1108: p. 567-77.
307. Riccieri, V., et al., *Nedd5, a novel autoantigen in systemic sclerosis: is it a marker of more severe disease?* *Ann Rheum Dis*, 2010. 69(1): p. 314-5.
308. Riemekasten, G. and O. Cabral-Marques, *Antibodies against angiotensin II type 1 receptor (AT1R) and endothelin receptor type A (ETAR) in systemic sclerosis (SSc)-response*. *Autoimmun Rev*, 2016. 15(9): p. 935.
309. Marou, E., et al., *Human cytomegalovirus (HCMV) UL44 and UL57 specific antibody responses in anti-HCMV-positive patients with systemic sclerosis*. *Clin Rheumatol*, 2017. 36(4): p. 863-869.
310. Namboodiri, A.M., et al., *Antibodies to human cytomegalovirus protein UL83 in systemic sclerosis*. *Clin Exp Rheumatol*, 2006. 24(2): p. 176-8.
311. Ohlin, M., et al., *Human antibody reactivity against the lower matrix protein (pp65) produced by cytomegalovirus*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1995. 2(3): p. 325-9.
312. Malouli, D., et al., *Cytomegalovirus pp65 limits dissemination but is dispensable for persistence*. *J Clin Invest*, 2014. 124(5): p. 1928-44.
313. Chang, M., et al., *Human cytomegalovirus pp65 lower matrix protein: a humoral immunogen for systemic lupus erythematosus patients and autoantibody accelerator for NZB/W F1 mice*. *Clin Exp Immunol*, 2006. 143(1): p. 167-79.
314. Marou, E., et al., *Increased immunoreactivity against human cytomegalovirus UL83 in systemic sclerosis*. *Clin Exp Rheumatol*, 2017. 35 Suppl 106(4): p. 31-34.
315. Biolatti, M., et al., *The human cytomegalovirus tegument protein pp65 (pUL83): a key player in innate immune evasion*. *New Microbiol*, 2018. 41(2): p. 87-94.
316. Boppana, S.B. and W.J. Britt, *Recognition of human cytomegalovirus gene products by HCMV-specific cytotoxic T cells*. *Virology*, 1996. 222(1): p. 293-6.
317. Hebart, H., et al., *Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation*. *Blood*, 2002. 99(10): p. 3830-7.
318. Seo, J.Y. and W.J. Britt, *Multimerization of tegument protein pp28 within the assembly compartment is required for cytoplasmic envelopment of human cytomegalovirus*. *J Virol*, 2008. 82(13): p. 6272-87.
319. Greijer, A.E., et al., *Molecular fine-specificity analysis of antibody responses to human cytomegalovirus and design of novel synthetic-peptide-based serodiagnostic assays*. *J Clin Microbiol*, 1999. 37(1): p. 179-88.
320. Lucchese, G. and D. Kanduc, *Potential Crossreactivity of Human Immune Responses Against HCMV Glycoprotein B*. *Curr Drug Discov Technol*, 2016. 13(1): p. 16-24.
321. Appleton, B.A., et al., *Crystal structure of the cytomegalovirus DNA polymerase subunit UL44 in complex with the C terminus from the catalytic subunit. Differences in structure and function relative to unliganded UL44*. *J Biol Chem*, 2006. 281(8): p. 5224-32.
322. Fujimoto, D., et al., *Risk factors associated with elevated blood cytomegalovirus pp65 antigen levels in patients with autoimmune diseases*. *Mod Rheumatol*, 2013. 23(2): p. 345-50.

323. Britt, W.J. and S. Boppana, *Human cytomegalovirus virion proteins*. Hum Immunol, 2004. 65(5): p. 395-402.