



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ - ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΥΓΕΙΑΣ**

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΒΙΕ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Έκφραση κυτταροκινών από Τ κύτταρα περιφερικού
αίματος στο σύνδρομο Sjogren και τροποποίηση από
πεπτίδια που χαρτογραφούν Τ αντιγονικούς επιτόπους των
αυτοαντιγόνων La-SSB**

Ψιάνου Κωνσταντία

Πάτρα

Ιούνιος 2014

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΜΟΥΖΑΚΗ ΑΘΑΝΑΣΙΑ

Τριμελής Συμβουλευτική επιτροπή

- Μουζάκη Αθανασία, Καθηγήτρια Εργαστηριακής Αιματολογίας-Αιμοδοσίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)
- Γκρέκα-Σπηλιώτη Βασιλική, Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Ενδοκρινολογίας, Υπεύθυνη της Μονάδας Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας και Διαβήτη της Παιδιατρικής Κλινικής, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών (Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)
- Κουρέα Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογοανατομίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών (Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)

*Αφιερωμένο στα παιδιά μου,
Θάλεια και Πάυλο*

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος.....	6
Περίληψη.....	8
Abstract	10
Εισαγωγή.....	11
Σύνδρομο Sjogren - Ορισμός.....	12
Ιστορία συνδρόμου Sjogren.....	13
Επιδημιολογικά δεδομένα.....	15
Κλινική εικόνα ΣΣ.....	17
Ξηροστομία	17
Ξηρά επιπεφυκίτιδα.....	18
Συστηματικές εκδηλώσεις	18
Λέμφωμα	21
Διάγνωση.....	23
Διαγνωστικές δοκιμασίες.....	27
Οφθαλμική δοκιμασία	27
Σιελομετρία.....	29
Σιελοχημεία	29
Βιοψία σιελογόνων αδένων	30
Ορολογικοί δείκτες και εργαστηριακά ευρήματα.....	34
Πολυαυτοανοσία	36
Θεραπευτική αντιμετώπιση	38
Αιτιοπαθογένεια ΣΣ	42
Αιτιοπαθογένεια.....	42
Γενετικοί παράγοντες	42
Περιβαλλοντικοί.....	43
Ενδοκρινικές μεταβολές σε ΣΣ	45
Παθογένεια –Ανοσολογικές μεταβολές.....	46
Πεπτίδια	86
Ειδικό μέρος	88
Σκοπός μελέτης.....	89
Ασθενείς και μέθοδοι	90
Μέθοδοι.....	94

<i>Κύτταρα και καλλιέργειες</i>	96
<i>Κυτταρομετρία ροής</i>	97
<i>Κυτταρικός πολλαπλασιασμός</i>	98
<i>Ανοσοφαινοτυποποίηση της επιφάνειας των κυττάρων και ανάλυση FACS</i>	98
<i>ELISA</i>	99
<i>Αποτελέσματα</i>	102
<i>Κυτταρικός πολλαπλασιασμός παρουσία πεπτιδίων</i>	102
<i>ELISA</i>	102
<i>Αποτελέσματα: Κυτταρομετρία ροής</i>	108
<i>Συζήτηση</i>	110
<i>Βιβλιογραφία</i>	113

Πρόλογος

Από την πρώτη στιγμή της ζωής μας υπάρχει πάντοτε κάποιος δίπλα μας που μας στηρίζει, μας διδάσκει και μας καθοδηγεί. Κάποιες φορές είναι οι γονείς, άλλες οι καθηγητές αλλά και οι φίλοι μας που είναι πρόθυμοι να μας βοηθήσουν. Καθετί, λοιπόν, που πετυχαίνουμε στη ζωή μας είναι αποτέλεσμα συλλογικής προσπάθειας και ομαδικής εργασίας, ακόμα και αν πολλές φορές δεν φαίνεται. Για το λόγο αυτό και εγώ θα ήθελα, παρακάτω, να εκφράσω ένα «ευχαριστώ» σε όλους αυτούς που συνέβαλλαν ώστε να ολοκληρώσω τη διπλωματική μου εργασία. Το αποτέλεσμα αυτής προήλθε από μία συλλογική προσπάθεια που έγινε τα τελευταία χρόνια και από άλλα μέλη του εργαστηρίου που συμμετείχαν, ο καθένας με το δικό του τρόπο, στο πειραματικό μέρος.

Αρχικά θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επιβλέπουσα καθηγήτρια την Κα Μουζάκη, την οποία θαυμάζω παράλληλα και ως άνθρωπο, που μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ στη διπλωματική μου εργασία με ένα ενδιαφέρον θέμα όπως είναι το Sjogren. Με αυτόν τον τρόπο κατάφερα να αποκτήσω πάρα πολλές καινούριες γνώσεις, πάντα υπό την συνεχή καθοδήγηση της καθηγήτριάς μου, που μελλοντικά θα αποτελέσουν σημαντικά εφόδια στην επαγγελματική μου πορεία.

Πρέπει να ομολογήσω ότι η εκπόνηση της εργασίας μου δεν ήταν εύκολη για μένα. Πολλές φορές είχα απορίες και άλλες συναντούσα δυσκολίες και εμπόδια τα οποία συχνά με έκαναν να νιώθω πως δεν υπήρχε λύση. Ευτυχώς, όμως, που εκτός από την Κα Μουζάκη βρισκόταν δίπλα μου όλη η ομάδα του εργαστηρίου της Εργαστηριακής Αιματολογίας – Αιμοδοσίας. Μαρία, Παναγιώτα, Ιωάννα σας ευχαριστώ που με βοηθήσατε σε κάθε μου δυσκολία και κάνατε πιο ευχάριστες τις ώρες που περνούσα στο εργαστήριο. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον Παναγούλια Ιωάννη, του οποίου η συμβολή ήταν πολύ σημαντική σε όλη τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας.

Ευχαριστώ την κα Σπηλιώτη και την κα Κουρέα, μέλη της τριμελούς επιτροπής για τις επισημάνσεις και τις διορθώσεις τους κατά την συγγραφή της παρούσας διατριβής. Να ευχαριστήσω τον κο Παπαναστασίου Αναστάσιο (ειδικευόμενο του

Νοσοκομείου Άγιος Ανδρέας) και τους κο Δεράο και κο Ματσούκα του τμήματος Χημείας για την πολύτιμη συμβολή τους στο πειραματικό μέρος.

Απ' όλη αυτή τη προσπάθεια δεν θα μπορούσα να παραλείψω τη φίλη μου και συμφοιτήτρια Ελένη Καυκιά. Ελένη μου σε ευχαριστώ για την αμέριστη συμπαράσταση και την πολύτιμη βοήθεια που μου χάρισες. Ήσουν δίπλα μου όποτε σε χρειαζόμουν, μερικές φορές ακόμα και μετά τα μεσάνυχτα.

Κατά τη διάρκεια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος γνώρισα άτομα τα οποία, σε αυτά τα χρόνια που έζησα στην Πάτρα, έγιναν καλοί φίλοι με τους οποίους αρκετές φορές μοιράστηκα τις ίδιες ανησυχίες και προβληματισμούς. Δεν μπορώ, λοιπόν, παρά να ευχαριστήσω και αυτούς για το ρόλο που έπαιξαν.

Κλείνοντας, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και το σύζυγό μου που στάθηκαν κοντά μου και με στήριξαν ψυχικά με τα λόγια και τις συμβουλές τους. Χωρίς τη δική τους υποστήριξη δεν θα κατάφερνα να συνεχίσω και να ολοκληρώσω τη διπλωματική εργασία μου.

Περίληψη

Το σύνδρομο Sjögren (ΣΣ) είναι μια αυτοάνοση νόσος που προσβάλλει κυρίως τους σιελογόνους και δακρυϊκούς αδένες οδηγώντας στην ξηρά επιπεφυκίτιδα και την ξηροστομία. Ιστοπαθολογικά χαρακτηρίζεται από λεμφοκυτταρική διήθηση T και B κυττάρων, με επικράτηση των ενεργοποιημένων CD4 + T βοηθητικών κυττάρων. Οι ακριβείς παθογενετικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για το ΣΣ δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστοί, ωστόσο φαίνεται ότι συμμετέχουν περιβαλλοντικοί, ορμονικοί και γενετικοί παράγοντες. Ακόμη, απορρύθμιση των κυτταροκινών που παράγονται από Th1, Th2 και Th17 κύτταρα εμπλέκονται στην ανάπτυξη του ΣΣ.

Σκοπός: Σε αυτή τη μελέτη, αναλύσαμε την έκκριση κυτταροκινών από υποσύνολα T-κυττάρων από το περιφερικό αίμα ασθενών με πρωτοπαθές ΣΣ, χρησιμοποιώντας συνθετικά πεπτίδια τα οποία αντιστοιχούσαν σε επιτόπους T-κυττάρων των αυτοαντιγόνων La / SSB.

Μέθοδοι: Μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) απομονώθηκαν από 23 ασθενείς με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren (πΣΣ) και 14 από την ομάδα ελέγχου και καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία μιτογόνου διέγερσης (PHA) και σε διάφορες συγκεντρώσεις των πεπτιδίων. Το PBMC υποβλήθηκε σε κυτταρική ανοσοφαινοτύπιση και κυτταρομετρία ροής μετά από επώαση με το πεπτίδιο. ELISA χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TGF-β και IFN-γ σε υπερκείμενα από καλλιέργειες κυττάρων των PBMC ή καθαρές ομάδες κυττάρων.

Αποτελέσματα: Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στο περιφερικό αίμα των υγιών είτε παρουσία είτε απουσία PHA ενώ ανεστάλη ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός σε ασθενείς με πΣΣ παρουσία PHA. Το ποσοστό των CD4 + CD25 + T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα αυξήθηκε σε ασθενείς με πΣΣ σε σύγκριση με τους υγιείς. Οι IL-4, IL-2, IFN-γ και IL-5 δεν ανιχνεύθηκαν στα υπερκείμενα των υγιών και ασθενών, είτε τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μόνα ή υπό την παρουσία των πεπτιδίων. Η IL-10 και ο TGF-β, έδειξαν μια διαφοροποίηση στην έκκριση τους σε σχέση με τους υγιείς.

Συμπεράσματα: Το αυξημένο ποσοστό των CD4+CD25+ T κυττάρων δείχνει την ύπαρξη ανοσορυθμιστικού μηχανισμού που είναι παρόν στο ΣΣ, ενώ η αύξηση της IL-10 μπορεί τελικά να συμβάλλει στην παθογένεια της νόσου.

Abstract

Sjögren's syndrome (SS) is a common autoimmune disease mainly of salivary and lachrymal glands, leading to xerostomia and keratoconjunctivitis sicca. Histopathological findings in SS include focal lymphocytic infiltrates that contain T cells and B cells with a predominance of activated CD4⁺ helper T cells. The exact pathogenetic mechanisms responsible for SS are not yet fully known, however environmental, hormonal and genetic factors may be involved in SS pathogenesis. Dysregulation of several cytokines produced by the infiltrating Th1, Th2 and also Th17 cells have also been implicated in the development and progression of SS.

Purpose: In this study, we analyzed the cytokine expression patterns of peripheral blood T-cell subsets in primary SS (pSS) patients using synthetic peptides that map to T-cell epitopes of the La/SSB autoantigen.

Methods: Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were isolated from 23 patients with pSS and 14 controls and were cultured in the presence or absence of mitogenic stimulation (PHA) and various concentrations of the peptides. PBMC were subjected to cell phenotyping and FACS analysis after incubation with peptide. ELISA was used to measure IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β and IFN- γ cytokine production in culture supernatants from cell culture of PBMC or purified cell groups.

Results: No significant difference in cellular proliferation was observed in isolated PBMCs from healthy donors in the presence or absence PHA, whereas an inhibition of cellular proliferation was noticed in the presence of PHA in pSS patients. The percentage of CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes in peripheral blood (PB) was increased in pSS patients compared with controls. IL-4, IL-2, IFN- γ and IL-5 were not detected in the supernatants of both controls and patients, whether the cells were cultured alone or in the presence of the peptides. IL-10 and TGF- β showed a differentiation in their secretion from controls.

Conclusion: The increased percentage of the CD4⁺CD25⁺ T cells, shows that an enhanced immunoregulatory mechanism is present in SS and increased production of IL-10 in SS patients may contribute to the pathogenesis of the disease.

Εισαγωγή

Σύνδρομο Sjogren - Ορισμός

Το σύνδρομο Sjogren (ΣΣ) ή αυτοάνοση επιθηλίτιδα (Moutsopoulos, 2007) είναι μια χρόνια αυτοάνοση φλεγμονώδης νόσος που προσβάλλει κατά κύριο λόγο τους εξωκρινείς αδένες οδηγώντας στην διαταραχή της λειτουργικότητας τους. Χαρακτηρίζεται από λεμφοκυτταρική διήθηση κυρίως των δακρυϊκών και σιελογόνων αδένων , οδηγώντας σε ξηρά επιπεφυκίτιδα και ξηροστομία αντίστοιχα.

Το σύνδρομο Sjogren μπορεί να εμφανιστεί ως πρωτοπαθές (πΣΣ), χωρίς την παρουσία άλλης νόσου του συνδετικού ιστού, είτε ως δευτεροπαθές, που είναι πιο σύνηθες και εμφανίζεται μαζί με άλλη ρευματική αυτοάνοση νόσο όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ), ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ), η σκληροδερμία κ.α. (C Vitali et al., 2002).

Ιστορία συνδρόμου Sjogren

Ο Σουηδός οφθαλμίατρος Henrik Sjögren (1899–1986), δημοσίευσε το 1933 την διδακτορική του διατριβή με τίτλο «Zur kenntnis der keratoconjunctivitis sicca», στην οποία παρουσίαζε 19 γυναίκες ασθενείς με ξηροφθαλμία, που στην πλειοψηφία τους εμφάνιζαν και ρευματοειδή αρθρίτιδα, καταφέροντας να συσχετίσει την ξηρά επιπεφυκίτιδα με την ξηροστομία και την πολυαρθρίτιδα (Sjogren, 1933). Αρχικά δέχτηκε επικρίσεις και δεν του δόθηκε ο τίτλος του διδάκτορα. Ωστόσο όταν το 1943 δημοσίευσε την εργασία του στα αγγλικά, αναγνωρίστηκε το έργο του και το 1961 του απονεμήθηκε ο τίτλος του ομότιμου καθηγητή στο πανεπιστήμιο του Gothenburg. Έκτοτε προς τιμήν του το σύνδρομο ονομάστηκε Sjogren (Ghafoor, 2012).

Κατά την διάρκεια του 19^{ου} αιώνα είχαν περιγραφεί περιστατικά ασθενών που εμφάνιζαν ξηροστομία, ξηροφθαλμία και χρόνια αρθρίτιδα (Jonsson, Moen, Vestrheim, & Szodoray, 2002). Ιστορικά δεδομένα δείχνουν ότι το 1871 οι W.B. Hadden και J.W. Hutchinson ανέφεραν για πρώτη φορά περιστατικό με συνδυασμό ξηροστομίας και ξηροφθαλμίας (Ghafoor, 2012).

Επίσης το σύνδρομο Sjogren είναι συνώνυμο με το sicca complex (ένας λατινικός όρος που χρησιμοποιείται για να ορίσει την ξηρότητα) και τη νόσο του Mikulicz.

Ο Johann von Mikulicz–Radecki περιέγραψε το 1888 το περιστατικό ενός αγρότη με δίογκωση των παρωτίδων και των δακρυϊκών αδένων (Ghafoor, 2012). Το 1953 ο Άγγλος παθολόγος Morgan συσχέτισε το Sjogren και τη λεμφοκυτταρική διήθηση, και αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι η ιστοπαθολογία της νόσου του Mikulicz και του συνδρόμου Sjogren ήταν ανάλογη (Ghafoor, 2012). Αργότερα η κλινική εικόνα του ΣΣ μελετήθηκε περαιτέρω, ενώ ορολογικά και ιστολογικά δεδομένα κατέδειξαν το αυτοάνοσο υπόβαθρο της νόσου (Goules, Tzioufas, & Moutsopoulos, 2014).

Το 1965, ο Bloch και οι συν. μελέτησαν τα χαρακτηριστικά 62 ασθενών με ΣΣ σύμφωνα με τη τριάδα συμπτωμάτων της ξηροφθαλμίας, ξηροστομίας και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας ή άλλης νόσου του συνδετικού ιστού (Goules et al., 2014).

Το 1968, οι Chisholm και Mason (Chisholm, 1968) εισήγαγαν την βιοψία ελάσσονων σιελογόνων αδένων για την εκτίμηση της ιστοπαθολογικής διήθησης με βάση το

focus score όπως ορίστηκε από τους Waterhouse και Doniach. (Waterhouse, 1966, Goules et al., 2014). Σύμφωνα με αυτό η παρουσία τουλάχιστον μίας εστίας λεμφοκυττάρων σε 4 mm² ιστού βιοψίας ήταν ένα ειδικό χαρακτηριστικό του ΣΣ.

Το 1975, υπήρξε συσχέτιση των συμπτωμάτων και της κλινικής εικόνας με την μέτρηση της παρωτιδικής έκκρισης κατόπιν διέγερσης και της ιστοπαθολογικής εικόνας των σιελογόνων αδένων, η οποία θα μπορούσε να αποτελεί αντικειμενικό διαγνωστικό κριτήριο για το ΣΣ (Daniels, 1975) (Goules et al., 2014).

Το 1986 παρουσιάστηκαν τέσσερα διαφορετικά κριτήρια κατάταξης: της Κοπεγχάγης, τα ιαπωνικά, τα ελληνικά και της Καλιφόρνια. Ωστόσο τα κριτήρια παρά την υψηλή ειδικότητα, είχαν χαμηλή ευαισθησία κυρίως λόγω της αδυναμίας να αξιολογήσουν την ξηρότητα του βλεννογόνου (Goules et al., 2014).

Το 1993, προτάθηκαν τα προκαταρκτικά Ευρωπαϊκά κριτήρια κατάταξης για το ΣΣ (EU) που παρουσίαζαν υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ευρέως έως και το 2002 (C Vitali, Bombardieri, Moutsopoulos, Balestrieri, Bencivelli, Bernstein, Bjerrum, Braga, Coll, de Vita, et al., 1993), οπότε και αναθεωρήθηκαν από την Αμερικανο-ευρωπαϊκή ομάδα μελέτης (C Vitali et al., 2002).

Το 2012 το Αμερικανικό Κολλέγιο Ρευματολογίας (American College of Rheumatology- ACR/Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance -SICCA) πρότεινε νέα αναθεωρημένα κριτήρια για το ΣΣ (Shiboski et al., 2012).

Επιδημιολογικά δεδομένα

Μέχρι σήμερα ένας σχετικά μικρός αριθμός επιδημιολογικών μελετών για το πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren έχουν δημοσιευθεί. Η απουσία κοινών διαγνωστικών κριτηρίων για το ΣΣ και η διάσταση των απόψεων σχετικά με τον ακριβή ορισμό του συνδρόμου, είχε σαν αποτέλεσμα την ετερογένεια των αποτελεσμάτων που προέκυπταν από τις διαφορετικές ομάδες μελέτης (Gabriel & Michaud, 2009).

Η επίπτωση της νόσου σε έναν πληθυσμό αναφέρεται στα νέα περιστατικά, που εμφανίζονται σε μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο, εκφράζοντας το ρυθμό με τον οποίο εμφανίζεται η νόσος στον συγκεκριμένο πληθυσμό. Συγκεκριμένα για το ΣΣ, σε μελέτη που διεξήχθη στην Μινεσότα, εκτιμήθηκε η ετήσια επίπτωση περίπου 3.9 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους.

Το ΣΣ, ενώ αρχικά είχε θεωρηθεί σπάνιο νόσημα, φαίνεται ότι είναι αρκετά πιο σύννηθες, με εκτιμώμενο επιπολασμό της τάξης του 0,1-4,8% (Mavragani & Moutsopoulos, 2010). Στη Σουηδία, ο επιπολασμός υπολογίστηκε περίπου 2,7%, ενώ σε μελέτη που διεξήχθη στην Νορβηγία ήταν περίπου επτά φορές υψηλότερος σε ηλικιωμένους ασθενείς ηλικίας από 71-74 σε σχέση με μέσης ηλικίας άτομα (40-44) (Haugen, 2008) (Gabriel & Michaud, 2009). Στην Δανία υπολογίστηκε 0,2-0,8% σε άτομα ηλικίας 30-60ετών (Bjerrum, 1997), και στην Κίνα 0,77% (Zhang, 1995; Gabriel & Michaud, 2009).

Σε δυο μελέτες που δημοσιεύτηκαν στην Ελλάδα και την Σλοβενία ο επιπολασμός εκτιμήθηκε στο 0,1% και 0,6% αντίστοιχα (Alamanos et al., 2006), ενώ μια τουρκική μελέτη του 2006 εκτίμησε το ποσοστό των ασθενών στο 1,56% (Kabasakal et al., 2006) (Gabriel & Michaud, 2009). Σε πληθυσμιακή μελέτη που διεξήχθη από τον Απρίλιο του 2007 έως και τον Ιούνιο του 2008 στην περιφέρεια της Μαγνησίας ο επιπολασμός υπολογίστηκε περίπου 0,23% (Anagnostopoulos et al., 2010).

Η νόσος φαίνεται ότι προσβάλλει κυρίως τις γυναίκες σε αναλογία 9/1 σε σχέση με τους άνδρες, και εμφανίζεται κυρίως στη μέση ηλικία (40-50 έτη) (Mavragani & Moutsopoulos, 2010). Προς το παρόν, δεν υπάρχουν αρκετά επιδημιολογικά

δεδομένα σε παιδιά λόγω απουσίας ειδικών διαγνωστικών κριτηρίων, και κατά συνέπεια το νεανικό σύνδρομο Sjogren συχνά υποδιαγιγνώσκεται (Lieberman, 2013). Επιπροσθέτως η κλινική συμπτωματολογία στα παιδιά μπορεί να διαφέρει σημαντικά από τους ενήλικες, παρά το γεγονός ότι τα εργαστηριακά ευρήματα που προκύπτουν ενδέχεται να είναι παρόμοια (Shahi, Donati, Gattinara, Pontikaki, & Gerloni, 2011).

Τα ποσοστά θνησιμότητας ασθενών με ΣΣ δεν φαίνεται να διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό. Ωστόσο σε μελέτη για τις υποομάδες του πρωτοπαθούς ΣΣ βρέθηκε αυξημένη θνησιμότητα σε ασθενείς με αρνητικούς προγνωστικούς παράγοντες. Ο ισχυρότερος προγνωστικός παράγοντας για τη δυσμενή έκβαση της νόσου είναι τα χαμηλά επίπεδα συμπληρώματος C3 και / ή C4 κατά το χρόνο της διάγνωσης ενώ σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν αρνητικά την πορεία της νόσου αποτελούν η σοβαρή εμπλοκή των εξωκρινών αδένων, η αγγειίτιδα, η πορφύρα κτλ (Theander, Manthorpe, & Jacobsson, 2004).

Ωστόσο παρά την αυξημένη επίπτωση του ΣΣ, συγκριτικά με άλλες ανοσολογικές διαταραχές, η υποδιάγνωση ή η λανθασμένη διάγνωση είναι συχνή λόγω της απουσίας κοινών και αυστηρών κριτηρίων διάγνωσης, και λόγω της ήπιας συμπτωματολογίας και των μη ειδικών κλινικών εκδηλώσεων, με αποτέλεσμα να παραμένει αδιάγνωστο στο μισό περίπου των περιπτώσεων, ενώ περίπου 30% των ασθενών με άλλη αυτοάνοση διαταραχή έχουν πρωτοπαθές ΣΣ (Peri, Agmon-Levin, Theodor, & Shoenfeld, 2012).

Κλινική εικόνα ΣΣ

Οι κύριες κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου περιλαμβάνουν την τριάδα συμπτωμάτων ξηροστομίας, ξηροφθαλμίας και πολυαθραλγίας. Το ΣΣ χαρακτηρίζεται από μία πληθώρα κλινικών εκδηλώσεων, αλλά παρά την κλινική ανομοιογένεια η εμφάνιση της νόσου σε όλες τις φυλετικές ομάδες και σε μεγάλης ηλικίας άτομα, στην πλειοψηφία τους γυναίκες, αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό της νόσου (Soyfoo & Cogan, 2011).

Ξηροστομία

Η ξηροστομία είναι συχνό σύμπτωμα και εμφανίζεται σε ποσοστό 90%, λόγω της λεμφοκυτταρικής διήθησης των μείζονων και ελάσσονων σιελογόνων αδένων (Soyfoo & Cogan, 2011). Η διόγκωση των παρωτίδων πολλές φορές αποτελεί το πρώτο σημείο που μπορεί να δηλώσει την εμφάνιση της νόσου (Chiorini, Cihakova, Ouellette, & Caturegli, 2009).

Ο ασθενής μπορεί στην αρχή να περιγράφει το σύμπτωμα αυτό σαν να έχει βαμβάκι μέσα στο στόμα του, ενώ στη συνέχεια και με την εξέλιξη της νόσου, ενδέχεται να μην μπορεί να μιλήσει για μεγάλο χρονικό διάστημα, και να δυσκολεύεται στην κατάποση στερεών ξηρών τροφών χωρίς την ταυτόχρονη και επαρκή λήψη υγρού, το καλούμενο «**cracker sign**», που είναι χαρακτηριστικό σύμπτωμα της νόσου.

Επιπροσθέτως η απώλεια των προστατευτικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του σιέλου προκαλεί αλλαγές στη στοματική χλωρίδα, κυρίως υπερανάπτυξη *Candida albicans* και τερηδογόνων στρεπτοκόκκων (Fox, 2005)(Soyfoo & Cogan, 2011) Peri et al., 2012), όπως επίσης και τριχοειδικές αλλοιώσεις στην μικροκυκλοφορία των ούλων (Scardina, Ruggieri, & Messina, 2010).

Ξηρά επιπεφυκίτιδα

Η ξηρά επιπεφυκίτιδα ή ξηροφθαλμία, αποτελεί βασική εκδήλωση του συνδρόμου και μπορεί να προκαλέσει διαβρωτικές-ελκωτικές βλάβες του κερατοειδούς και του επιπεφυκότα. Η ξηροφθαλμία συναντάται σε όλους σχεδόν τους ασθενείς και οφείλεται στην λεμφοκυτταρική διήθηση των δακρυϊκών αδένων, η οποία και οδηγεί στην υπολειτουργία τους. Κλινικά ο ασθενής μπορεί να αναφέρει την αίσθηση ξένου σώματος (κόκκοι άμμου), μειωμένη παραγωγή δακρύων, οφθαλμική κόπωση, φωτοευαισθησία, διαταραχές της όρασης και συχνές λοιμώξεις (Fox, 2005)(Soyfoo & Cogan, 2011).

Συστηματικές εκδηλώσεις

Το 70% των ασθενών παρουσιάζει αρθραλγίες ή λιγότερο συχνό αρθρίτιδα (17%) (Fauchais et al., 2010), και η συχνότερη εντόπιση της είναι στους αστραγάλους, την μετακαρποφαλαγγική και μεταταρσοφαλαγγική άρθρωση (Haga, 2007).

Μυϊκή συμμετοχή τεκμηριώνεται στο 27% των ασθενών ΣΣ, με κύρια ενόχληση την μυαλγία ενώ μπορεί να ανευρεθεί ιστολογικά ήπια φλεγμονώδης μυοπάθεια (Peri, Agmon-Levin, Theodor, & Shoenfeld, 2012b). Η λήψη στεροειδών και ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων φαίνεται ότι έχει καλή ανταπόκριση στους ασθενείς αυτούς.

Η συμμετοχή των πνευμόνων είναι λιγότερο συχνή, ενώ η συχνότητα της στις διάφορες μελέτες μεταβάλλεται λόγω απουσίας συγκεκριμένων διαγνωστικών κριτηρίων. Πρόσφατα, σε μελέτη που περιελάμβανε 522 ασθενείς με πρωτοπαθές ΣΣ, αναφέρθηκε εμπλοκή των πνευμόνων στο 47%, με πιο κοινή εκδήλωση την διάμεση πνευμονοπάθεια, η οποία είναι συχνά ασυμπτωματική, αλλά σχετίζεται με αυξημένη θνησιμότητα (Parambil, 2006) (Soyfoo & Cogan, 2011).

Ο βήχας είναι συχνά το κύριο σύμπτωμα του αναπνευστικού και συνήθως εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της ξηρότητας της τραχείας (Soyfoo & Cogan, 2011). Άλλες πιθανές πνευμονικές επιλοκές περιλαμβάνουν την λεμφοκυτταρική κυψελίτιδα, την λεμφοκυτταρική διάμεση πνευμονία και την πνευμονική ίνωση (Soyfoo & Cogan, 2011).

Επίσης μπορεί να υπάρξει προσβολή των νεφρών με κύρια εκδήλωση την διάμεση σωληναριακή νεφρίτιδα, με ή χωρίς νεφρική σωληναριακή οξέωση, λόγω της λεμφοκυτταρικής διήθησης του σπειράματος, σε αντίθεση με άλλες αυτοάνοσες παθήσεις στις οποίες φαίνεται να κυριαρχεί η σπειραματονεφρίτιδα (Soyfoo & Cogan, 2011). Η προσβολή των νεφρών οφείλεται σε λεμφοκυτταρική διήθηση του διάμεσου χώρου και όχι σε εναπόθεση ανοσοσυμπλέγματος που εμφανίζεται σε άλλες αυτοάνοσες νόσους, όπως στον συστηματικό ερυθματώδη λύκο (ΣΕΛ) (Lindvall, 2002). Αρκετοί δείκτες στον ορό συσχετίζονται με νεφρική βλάβη στο ΣΣ, συμπεριλαμβανομένων της υπεργαμμασφαιριναιμίας, των αυξημένων πρωτεϊνών ορού και της β2- μικροσφαιρίνης του ορού (Peri et al., 2012)(Pertovaara , 2001)

Η ξηροδερμία επηρεάζει περίπου το 55% των ασθενών. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε, περισσότεροι από 10% των ασθενών ανέφεραν εξάνθημα, συγκριτικά με το μηδενικό ποσοστό της ομάδας ελέγχου, και 18% ανέφεραν αίσθημα καύσου (Kittridge et al., 2011). Οι εκδηλώσεις από το δέρμα περιλαμβάνουν ξηρότητα, αίσθημα νυγμών ή κνησμού, ενώ η πορφύρα στα άκρα είναι μάλλον συχνό εύρημα στους υπεργαμμασφαιρινικούς ασθενείς, και η ψηλαφητή πορφύρα είναι εκδήλωση λευκοκυτταροκλαστικής αγγειίτιδας (Ramos-Casals et al., 2004). Το φαινόμενο Raynaud επηρεάζει περίπου το ένα τρίτο των ασθενών με πρωτοπαθές ΣΣ, και μπορεί να προηγείται των άλλων εκδηλώσεων, ενώ συχνά συνδέεται με αυξημένη εκδήλωση εξωαδενικών συμπτωμάτων (Soyfoo & Cogan, 2011).

Τα συμπτώματα από το γαστρεντερικό σύστημα, οφείλονται στην προσβολή του παρεγχύματος διαφόρων οργάνων, και στη γενικότερη ανοσολογική διαταραχή. Περιλαμβάνουν δυσφαγία, λόγω μειωμένης έκκρισης σιέλου, ναυτία, επιγαστρικό άλγος και δυσπεψία. Η κοιλιοκάκη και η ατροφική γαστρίτιδα είναι πιο συχνές στους ασθενείς με ΣΣ συγκριτικά με υγιείς ομάδες ελέγχου (Szodoray P, 2004). Υποκινητικότητα του οισοφάγου έχει αναφερθεί σε ποσοστό 36% έως 90% των ασθενών. Η πρωτοπαθής χολική κίρρωση μπορεί να σχετίζεται με το ΣΣ, καθώς χαρακτηρίζεται από μια προοδευτική φλεγμονή του επιθηλιακού ιστού των δακρυϊκών και σιελογόνων αδένων αλλά και των ενδοηπατικών χοληφόρων (Selmi, Meroni, & Gershwin, 2012).

Περίπου 20% των ασθενών με ΣΣ παρουσιάζουν αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, κυρίως θυρεοειδίτιδα Hashimoto και λιγότερο συχνά ασθένεια του Grave's. Τα αντισώματα

εναντίον της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης και τα αντιθυρεοσφαιρινικά αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώιμοι δείκτες για την εκδήλωση μελλοντικής θυρεοειδικής νόσου στους ασθενείς (Tincani et al., 2013).

Οι νευρολογικές εκδηλώσεις στο ΣΣ αφορούν τόσο το κεντρικό νευρικό σύστημα όσο και το περιφερικό, και το ποσοστό προσβολής τους, όπως έχει δημοσιευτεί σε μελέτες, εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις καθώς κυμαίνεται από 1-68% με μέση τιμή περίπου 30% (Pavlakakis et al., 2011). Εκδηλώσεις από το περιφερικό και το κεντρικό νευρικό σύστημα μπορούν να προηγηθούν της διάγνωσης ΣΣ, ή να εμφανιστούν σε μεταγενέστερο στάδιο. Στην πλειοψηφία των ασθενών, εμφανίζεται ως μια καθυστερημένη εκδήλωση.

Η προσβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος σε ασθενείς με ΣΣ πιστεύεται ότι είναι σπάνια, αλλά υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα για τη συχνότητα συμμετοχής του, με τα ποσοστά να κυμαίνονται από 2,5-60% (Morreale et al., 2014).

Το κλινικό φάσμα των περιφερικών νευροπαθειών που συναντώνται σε ασθενείς με σύνδρομο Sjögren είναι ευρύ, με τις αισθητηριακές νευροπάθειες να είναι οι πιο κοινές (Mori, 2005). Σε μια μελέτη των Sene και συν., αναφέρεται εμφάνιση περιφερικής νευροπάθειας στο 25% των ασθενών με πρωτοπαθές ΣΣ, με πρώτη σε συχνότητα την μη-αταξική αισθητηριακή νευροπάθεια (67%), και έπειτα την αισθητικοκινητική νευροπάθεια σε ποσοστό 23%, και την αταξική αισθητηριακή νευροπάθεια σε ποσοστό 10% (Sène, 2011). Η αισθητηριακή-αταξική νευροπάθεια μπορεί να εκδηλώνεται ως ασύμμετρες παραισθησίες που αρχίζουν στο πόδι ή το χέρι, και στη συνέχεια εξαπλώνονται στα άκρα ή τον κορμό. Άλλες αισθητικές/αισθητηριακές νευροπάθειες προκαλούν αίσθημα καύσου στον κορμό, τα άκρα ή το πρόσωπο. Σε μια μελέτη 30 γυναικών με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren το 46% είχαν νευροαισθητηριακή απώλεια ακοής η οποία ίσως σχετίζεται με την παρουσία αντικαρδιολιπιδικών αντισωμάτων (Tumiatì, 1997).

Εν αντιθέσει με τα αποτελέσματα αυτά, μια άλλη μελέτη υποστηρίζει ότι η πολυνευροπάθεια είναι μια σπάνια εκδήλωση του πρωτοπαθούς ΣΣ και συμβαίνει στο 1,8% (Pavlakakis et al., 2011), μια διαφορά που ίσως μπορεί να εξηγηθεί από τις διαφορετικές διαγνωστικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται.

Συχνή είναι επίσης η παρουσία νευροψυχιατρικών εκδηλώσεων όπως η αγχώδης διαταραχή και η κλινική κατάθλιψη, τόσο λόγω της χρόνιας φύσης της νόσου όσο και λόγω της δυσλειτουργικής αντιμετώπισης του άγχους εξαιτίας της υπολειτουργίας του υποθαλαμικού-υποφυσιακού-επινεφριδιακού άξονα (Καραΐσκος, 2010).

Οι γυναίκες με ΣΣ φαίνεται ότι μπορεί να εμφανίσουν συχνότερα επιπλοκές κατά την διάρκεια της κύησης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, και ενδεχομένως υψηλότερο ποσοστό αυτόματων αποβολών, πρόωρου τοκετού και γέννησης παιδιών με μικρότερο βάρος σώματος (Priori et al., 2013). Η κύρια επιπλοκή στα έμβρυα είναι ο συγγενής καρδιακός αποκλεισμός, που ίσως προκαλείται από την βλάβη των anti-Ro/SSA και/ή των anti-La/SSB στον κολποκοιλιακό κόμβο. Το ποσοστό εμφάνισης του είναι περίπου 2% σε παιδιά από μητέρες θετικές για anti-Ro/SSA, και 3% από γυναίκες θετικές για anti-La/SSB (De Carolis et al., 2014).

Λέμφωμα

Οι ασθενείς με ΣΣ εμφανίζουν 20-40 φορές υψηλότερο κίνδυνο για εμφάνιση λεμφώματος non-Hodgkin (NHL) συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό. Οι Kassan συν., περιέγραψαν το 1978 για πρώτη φορά ότι οι ασθενείς με ΣΣ είχαν 44 φορές πιο υψηλό κίνδυνο για εμφάνιση NHL συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό. Ο επιπολασμός του είναι της τάξης του 4% και εμφανίζεται κατά μέσο όρο 7,5 χρόνια μετά την αρχική διάγνωση για ΣΣ (Soyfoo & Cogan, 2011).

Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς με λέμφωμα Hodgkin (HL) και NHL έχουν υψηλότερο κίνδυνο για εμφάνιση αυτοάνοσης νόσου, και φάνηκε ότι το ΣΣ, εμφανιζόταν πιο συχνά σε σχέση με τα λοιπά αυτοάνοσα (Váróczy et al., 2012).

Το λέμφωμα της οριακής ζώνης (ΛΟΖ) συνιστά ετερογενή ομάδα Β-νεοπλασμάτων τα οποία αναπτύσσονται πρωτοπαθώς σε λεμφαδένες, στο σπλήνα ή σε εξωλεμφαδενικούς ιστούς (λέμφωμα MALT). Το εξωλεμφαδενικό λέμφωμα της οριακής ζώνης του λεμφικού ιστού των βλεννογόνων (Extranodal Marginal Zone Lymphoma Of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue - MALT) είναι το συχνότερο. Σε μελέτη 584 ασθενών με ΣΣ από το 1980 έως το 2010, 53 ασθενείς με NHL μελετήθηκαν και βρέθηκε ότι το λέμφωμα τύπου MALT εμφανίστηκε σε ποσοστό 59%, ακολουθούμενο από το λεμφαδενικό λέμφωμα οριακής ζώνης (nodal marginal

zone lymphoma - NMZL) στο 15%, και το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-Λεμφοκύτταρα (Diffuse Large B-Cell Lymphoma- DLBCL) στο ίδιο ποσοστό (Michael Voulgarelis et al., 2012).

Η ανάπτυξη λεμφώματος σε ΣΣ ασθενείς σχετίζεται με την επίμονη διόγκωση των παρωτίδων, την λεμφαδενοπάθεια, την διήθηση των πνευμόνων, την αγγειίτιδα, την ηπατοσπληνομεγαλία, την ψηλαφητή πορφύρα και την υπεργαμμασφαιριναιμία, την μονοκλωνική κρυοσφαιριναιμία και τα χαμηλά επίπεδα του C4 κλάσματος του συμπληρώματος (Tzioufas, 2007; Skopouli, Dafni, Ioannidis, & Moutsopoulos, 2000; Theander et al., 2006). Πιο πρόσφατα, φάνηκε ότι η ανεπάρκεια του συστήματος συμπληρώματος και η λεμφοκυτοπενία κατά τη διάγνωση του SS ήταν οι ισχυρότεροι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για την ανάπτυξη λεμφώματος και η επιβίωση ήταν σαφώς μειωμένη σε ασθενείς με hypocomplementemia (Solans-Laqué et al., 2011) (Soyfoo & Cogan, 2011).

Από το 1999 είχε προταθεί συσχέτιση μεταξύ του σχηματισμού έκτοπου βλαστικού κέντρου και λεμφώματος σε ΣΣ (M Voulgarelis, Dafni, Isenberg, & Moutsopoulos, 1999). Η παρουσία τους σε βιοψία σιελογόνων αδένων μπορεί να αποτελεί υψηλό προγνωστικό δείκτη για την ανάπτυξη NHL, ώστε να αρχίσει νωρίς και η θεραπευτική του αντιμετώπιση (Theander et al., 2011)

Διάγνωση

Δεν υπάρχει “gold standard” για την διάγνωση του ΣΣ. Λόγω της υποκειμενικής συμπτωματολογίας και του μη ακριβούς ορισμού του συνδρόμου, ενδέχεται να υπάρξει μεγάλη χρονική καθυστέρηση μέχρι τη διάγνωση του. Η απουσία ειδικών διαγνωστικών κριτηρίων και τα υψηλά ποσοστά sicca (ξηρότητας) στον γενικό πληθυσμό, οδηγούν σε μια καθυστέρηση 6 έως 10 ετών μέχρι να γίνει η διάγνωση του. Για το λόγο αυτό, για να γίνει έγκαιρα η διάγνωση του στους ασθενείς, απαιτείται ο συνδυασμός διαφορετικών κλινικών ειδικοτήτων και εργαστηριακών ευρημάτων (Soyfoo & Cogan, 2011) (Bayetto & Logan, 2010).

Κατά τα προηγούμενα χρόνια είχαν προταθεί αρκετά διαφορετικά διαγνωστικά κριτήρια, αλλά κανένα δεν είχε χρησιμοποιηθεί ευρέως από την επιστημονική κοινότητα, μέχρι το 1993 οπότε προτάθηκαν τα Preliminary European Classification criteria, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τόσο στην έρευνα όσο και στην κλινική πράξη (C Vitali, Bombardieri, Moutsopoulos, Balestrieri, Bencivelli, Bernstein, Bjerrum, Braga, Coll, & de Vita, 1993).

Αργότερα το 2002, τα κριτήρια αυτά αναθεωρήθηκαν από την Αμερικανο-ευρωπαϊκή ομάδα μελέτης ώστε να έχουν υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα (American and European Consensus Group classification criteria (AECG-criteria))(C Vitali et al., 2002). Τα κριτήρια αυτά αποτέλεσαν χρήσιμο εργαλείο τόσο σε κλινικές δοκιμές και επιδημιολογικές έρευνες, όσο και στην κατάταξη του ΣΣ, σε πρωτοπαθές και δευτεροπαθές (Gomes, Juodzbaly, Fernandes, & Guobis, 2012) (Baldini, Talarico, Tzioufas, & Bombardieri, 2012) (Bayetto & Logan, 2010).

Αναθεωρημένα διεθνή κριτήρια ταξινόμησης του ΣΣ (Vitali, 2002)

I. Συμπτώματα από οφθαλμούς θετική απάντηση σε μία τουλάχιστον από τις ακόλουθες ερωτήσεις:

1. Είχατε καθημερινά επίμονο πρόβλημα ξηροφθαλμίας για περισσότερο από τρεις μήνες;
2. Αισθάνεστε συχνά σαν να έχετε άμμο ή πριονίδια στα μάτια σας;
3. Χρησιμοποιείτε τεχνητά δάκρυα περισσότερο από τρεις φορές την ημέρα;

II. Συμπτώματα από τη στοματική κοιλότητα θετική απάντηση σε μία τουλάχιστον από τις ακόλουθες ερωτήσεις:

1. Είχατε καθημερινό αίσθημα ξηροστομίας για περισσότερο από τρεις μήνες;
2. Είχατε υποτροπιάζουσα ή μόνιμη διόγκωση των παρωτίδων σαν ενήλικας;
3. Πίνετε συχνά υγρά για να υποβοηθήσετε την κατάποση ξηρής τροφής;

III. Σημεία από τους οφθαλμούς: αντικειμενικά ευρήματα οφθαλμικής συμμετοχής, καθοριζόμενα από την παρουσία θετικού αποτελέσματος σε μία τουλάχιστον από τις δύο ακόλουθες δοκιμασίες:

1. Δοκιμασία Schirmer's-I χωρίς αναισθησία ($\leq 5\text{mm}/5\text{ min}$)
2. Βαθμός δοκιμασίας χρώσης με ερυθρό της Βεγγάλης ή άλλης δοκιμασίας χρώσης (≥ 4 σύμφωνα με το σύστημα διαβάθμισης van Bijsterveld)

V. Ιστοπαθολογία Εκτίμηση από ειδικό ιστοπαθολόγο της παρουσίας σε ελάχιστονες σιελογόνους αδένες (με λήψη της βιοψίας από περιοχή κλινικά υγιούς βλεννογόνου) της λεμφοκυτταρικής σιελαδενίτιδας με focus score ≥ 1 , το οποίο ορίζεται ως ο αριθμός των λεμφοκυτταρικών εστιών (οι οποίες αποτελούνται από περισσότερα από 50 λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα και βρίσκονται σε παρακείμενες θέσεις από αδενοκυψέλες με φυσιολογική εικόνα) ανά 4 mm^2 αδενικού ιστού.

V. Προσβολή σιελογόνων αδένων αντικειμενικά ευρήματα της συμμετοχής των σιελογόνων αδένων καθοριζόμενα από την παρουσία θετικού αποτελέσματος σε μία τουλάχιστον από τις ακόλουθες διαγνωστικές δοκιμασίες:

1. Ολική ροή σιέλου ανάπαυσης ($\leq 1,5\text{ ml}/15\text{ min}$)
2. Σιελογραφία παρωτίδων με παρουσία διάχυτης σιελεκτασίας (με στικτό, σπηλαιώδες ή καταστρεπτικό πρότυπο) χωρίς ένδειξη απόφραξης των μειζόνων εκφορητικών πόρων
3. Σπινθηρογράφημα σιελογόνων αδένων με ένδειξη καθυστερημένης πρόσληψης, μειωμένης συγκέντρωσης και/ή καθυστερημένης απέκκρισης του ανιχνευτικού υλικού

VI. Αυτοαντισώματα παρουσία στον ορό των ακόλουθων αυτοαντισωμάτων:

Αντισώματα στο Ro (SS-) ή στο La (SS-B) αντιγόνο, ή και στα δύο.

Αναθεωρημένες αρχές ταξινόμησης του ΣΣ

Πρωτοπαθές ΣΣ

Σε ασθενείς χωρίς κάποια δυνητικά συσχετιζόμενη νόσο, το πρωτοπαθές SS μπορεί να προσδιορισθεί ως εξής:

α) η παρουσία οποιονδήποτε τεσσάρων από τις έξι παραμέτρους είναι ενδεικτική πρωτοπαθούς συνδρόμου Sjögren, εφ'όσον είτε η παράμετρος IV (Ιστοπαθολογία) είτε η VI (Ορολογικά ευρήματα) είναι θετικές

β) η παρουσία οποιονδήποτε 3 από τις 4 παραμέτρους αντικειμενικών ευρημάτων (III, IV, V, VI)

γ) η διαδικασία της δημιουργίας δένδρου ταξινόμησης (classification tree) αντιπροσωπεύει μία έγκυρη εναλλακτική μέθοδο ταξινόμησης, αν και είναι σωστότερο να χρησιμοποιείται σε κλινικο-επιδημιολογικές μελέτες.

Δευτεροπαθές ΣΣ

Σε ασθενείς με πιθανή συσχετιζόμενη νόσο (π.χ. κάποια άλλη σαφώς καθοριζόμενη νόσο του συνδετικού ιστού), η παρουσία των παραμέτρων I ή II, συν δύο οποιεσδήποτε άλλες από τις III, IV, V μπορεί να θεωρηθεί ενδεικτική δευτεροπαθούς SS.

Κριτήρια αποκλεισμού ΣΣ

Προηγούμενη ακτινοθεραπεία κεφαλής-τραχήλου

Λοίμωξη από Ηπατίτιδα C

Σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS)

Προϋπάρχον λέμφωμα

Σαρκοείδωση

Νόσος αντίδρασης μοσχεύματος κατά ξενιστή (GVHD)

Λήψη αντιχολινεργικών φαρμάκων (εντός χρονικού διαστήματος μικρότερου από το τετραπλάσιο του χρόνου ημίσειας ζωής του φαρμάκου)

Σχετικά πρόσφατα το Sjogren's International Collaborative Clinical Alliance (SICCA) πρότεινε νέα προσέγγιση για την διάγνωση που βασίζεται σε αντικειμενικά ευρήματα και απαιτεί την παρουσία τουλάχιστον δυο από τα ακόλουθα 3 αντικειμενικά κριτήρια (Shiboski et al., 2012).

1. Θετικός ορός anti-SSA/Ro ή / και anti-SSB/La ή (θετικό ρευματοειδή παράγοντα και τίτλος αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) 1:320)
2. Βιοψία σιελογόνων αδένων που παρουσιάζουν λεμφοκυτταρική σιελαδενίτιδα με focus score $\geq 1/4 \text{ mm}^2$
3. Ξηρή κερατοεπιπεφυκίτιδα με σκορ οφθαλμικής χρώσης 3 (με την προϋπόθεση ότι δεν χρησιμοποιούνται οφθαλμικές σταγόνες για το γλαύκωμα και δεν έχει προηγηθεί χειρουργική επέμβαση κερατοειδούς ή αισθητική χειρουργική των βλεφάρων κατά τα τελευταία 5 έτη)

Η προγενέστερη διάγνωση οποιουδήποτε από τα ακόλυθα αποκλείει τη συμμετοχή στις μελέτες ΣΣ ή τις θεραπευτικές δοκιμές λόγω των επικαλυπτόμενων κλινικών γνωρισμάτων:

Μόλυνση με ηπατίτιδα C (HCV)

Ιστορικό ακτινοθεραπείας κεφαλής-τραχήλου

Μόλυνση με HIV

Σαρκοείδωση

Αμυλοείδωση

Νόσος μοσχεύματος κατά του ξενιστή σχετιζόμενη με IG4 (GvHD)

Διαγνωστικές δοκιμασίες

Οφθαλμική δοκιμασία

Η δοκιμασία Schirmer I, ή αλλιώς η δοκιμασία Schirmer χωρίς αναισθησία, είναι η πιο κοινή δοκιμασία που μπορεί να γίνει στην κλινική πράξη, καθώς με αυτή εκτιμάται η ποσοτική μείωση της έκκρισης των δακρύων. Μια τυποποιημένη λωρίδα ταινίας χαρτιού 30 mm τοποθετείται το χείλος του βλεφάρου και παραμένει για διάστημα πέντε λεπτών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες και χωρίς χρήση αναισθησίας αναμένονται τουλάχιστον 15 χιλιοστά διαβροχής σε άτομα ηλικίας κάτω των 40 ετών, και τουλάχιστον 10 χιλιοστά της διαβροχής σε ηλικιωμένους ασθενείς. Τιμές διαβροχής μικρότερες των 5mm θεωρούνται ως μη φυσιολογικές, και αποτελούν ισχυρή ένδειξη μειωμένης ροής δακρύων και ξηροφθαλμίας. Ένα αποτέλεσμα της τάξης 6-10 mm ίσως υποδηλώνει πρόβλημα ξηροφθαλμίας (Lemp, 2000) (Soyfoo & Cogan, 2011).

Η δοκιμή του Schirmer II γίνεται με αναισθησία και είναι αρκετά παρόμοια με τη δοκιμή I, με τη διαφορά ότι ένα τολύπιο βάμβακος χρησιμοποιείται για να ενεργοποιήσει το δακρυικό αντανακλαστικό στο εσωτερικό της μύτης (Soyfoo & Cogan, 2011)

Η εμφάνιση της ξηροφθαλμίας μπορεί να σχετίζεται με αλλαγή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων ή της ποιότητας των δακρύων, ενώ για την εκτίμηση της μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ο αριθμός διαβρώσεων του κερατοειδούς (Jonsson et al., 2011).

Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η χρώση Rose Bengal η οποία αποτελεί παράγωγο της φθορεσκεΐνης ή άλλη χρώση όπως το πράσινο λισσαμίνης. Αυτές οι δοκιμασίες χρησιμοποιούνται πιο συχνά για την αξιολόγηση της επιθηλιακής βλάβης των οφθαλμών. Η βαθμολογία της Rose Bengal, είναι μια ποσοτική έκδοση της αρχικής δοκιμής με Rose Bengal και συνήθως χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση του βαθμού της χρώσης. Η δοκιμή διεξάγεται με την εφαρμογή 1% διαλύματος Rose Bengal, εντός της κατώτερης θόλου και στα δυο μάτια. Έπειτα ζητείται από τον ασθενή να ανοιγοκλείσει μια ή δυο φορές τους οφθαλμούς του. Ο

εξεταστής χρησιμοποιεί λευκό φως για να εκτιμήσει το βαθμό της χρώσης του επιπεφυκότα (έσω και έξω) και του κερατοειδούς (Gomes et al., 2012).

Η βαθμολογία για κάθε τμήμα γίνεται σύμφωνα με το σκορ Van Bijsterveld (Van Bijsterveld, 1969), και έχει ως εξής:

1. αραιά διάσπαρτα σημεία
2. πυκνά διάσπαρτα σημεία
3. συρρέοντα σημεία.

Ενώ η μέγιστη βαθμολογία είναι 9, ένα σκορ 4 ή περισσότερο, ή 3 ή περισσότερο, θεωρήθηκε ως θετικό για τη διάγνωση του ΣΣ, σύμφωνα με τα διεθνή κριτήρια ταξινόμησης, ή ιαπωνικά κριτήρια για ΣΣ, αντίστοιχα. Σε ασθενείς με ΣΣ, η χρώση με Rose Bengal μπορεί να προκαλέσει πόνο στους οφθαλμούς των ασθενών. Η χρώση με πράσινο της λισσαμίνης είναι λιγότερο επώδυνη, αλλά πιο δύσκολη να αξιολογηθεί (Kalk, 2002).



Εικόνα 1: Schirmer test (A) και αποτελέσματα εξέτασης που δείχνουν σημαντική μείωση στην δακρυική έκκριση (Gomes et al., 2012)

Σιελομετρία

Η ξηροστομία που εμφανίζεται στους ασθενείς με σύνδρομο Sjogren μπορεί να σχετίζεται με την μείωση της παραγωγής σιέλου. Η σιελομετρία στοχεύει στην μέτρηση της ροής σιέλου, και μπορεί να γίνει είτε με ολικό σίελο, που είναι πιο εύκολη και κλινικά προσιτή, είτε με σίελο που λαμβάνεται από ένα συγκεκριμένο αδέν, με ή χωρίς διέγερση (Gomes et al., 2012). Στην κλινική πράξη προτιμάται η σιελομετρία χωρίς ερεθισμό/διέγερση. Ο ασθενής συλλέγει το σίελο σε ένα φιαλίδιο για χρονικό διάστημα 15 λεπτών (Gomes et al., 2012). Αν ο όγκος που συγκεντρωθεί είναι μικρότερος από 1,5 ml θεωρείται ως μη φυσιολογικός. Ωστόσο η σιελομετρία δεν μπορεί από μόνη της ως διαγνωστική εξέταση να ξεχωρίσει τις διαφορετικές αιτίες ξηροστομίας (Kassan & Moutsopoulos, 2004).

Σιελοχημεία

Η σιελοχημεία είναι μέθοδος ανάλυσης της σύνθεσης του σιέλου. Στους ασθενείς με ΣΣ στους οποίους εμφανίζεται μικρότερη ροή σιέλου, ο σίελος περιέχει υψηλότερα επίπεδα χλωρίου και καλίου. Η αυξημένη έκκριση τους μπορεί να σχετίζεται με την απελευθέρωση τους από την απόπτωση των κυττάρων των αδενοκυψελών. Επίσης έχουν παρατηρηθεί υψηλά επίπεδα ασβεστίου σε ασθενείς με ΣΣ σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό, ενώ δεν βρέθηκε συσχέτιση με άλλες παραμέτρους όπως το νάτριο, μαγνήσιο, φώσφορο κτλ. (Miller et al., 2012).

Ο συνδυασμός της σιελομετρίας και της sialochemistry μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμα διαγνωστικά εργαλεία για την διαφοροδιάγνωση του συνδρόμου Sjogren από άλλες παθήσεις των σιελογόνων αδένων (Kalk et al., 2001) (Kalk et.al. 2002).

Βιοψία σιελογόνων αδένων

Η βιοψία των σιελογόνων αδένων αποτελεί την πιο καθοριστική και την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη διαγνωστική δοκιμασία για το ΣΣ. Κύριο χαρακτηριστικό της ιστοπαθολογικής εικόνας του ΣΣ είναι η παρουσία λεμφοκυτταρικών διηθήσεων κυρίως στους δακρυϊκούς και σιελογόνους αδένες. Οι αλλοιώσεις προκαλούν εκτεταμένη προσβολή των επιθηλιακών ιστών, για αυτό το λόγο το ΣΣ χαρακτηρίζεται και ως αυτοάνοση επιθηλίτιδα. Η ιστοπαθολογία έχει μελετηθεί καλύτερα στους σιελογόνους αδένες αφ' ενός γιατί είναι πιο προσιτοί χειρουργικά, και αφ' ετέρου γιατί προσβάλλονται σχεδόν σε όλους τους ασθενείς (Gomes et al., 2012) (Kassan & Moutsopoulos, 2004).

Λαμβάνεται βιοψία από του ελάσσονες σιελογόνους αδένες με μια τομή 1.5 με 2 εκ. μεταξύ της μέσης γραμμής και της γωνίας του στόματος διαμέσου του βλεννογόνου με διήθηση του επιθηλίου υπό τοπική αναισθησία. Εκτέμνονται 4 με 6 λόβια τουλάχιστον, λόγω της διαφοροποίησης του βαθμού φλεγμονής και της καταστροφής των σιελογόνων αδένων (Gomes et al., 2012) (Varela-Centelles et al., 2014) (Kassan & Moutsopoulos, 2004)

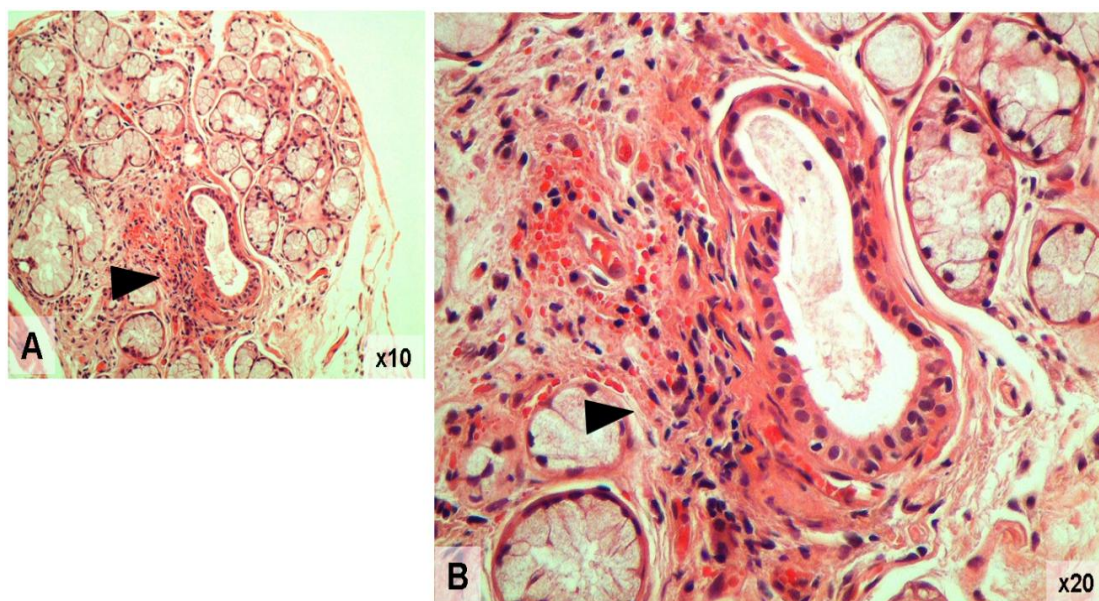
Ο υπολογισμός της φλεγμονώδους διήθησης γίνεται με βάση το focus score, δηλαδή τον αριθμό των foci ανά 4 mm^2 του εκτέμνοντος σιελογόνου αδένου (Greenspan et al., 1974). Ιστολογικά η παρουσία φλεγμονώδους διήθησης ≥ 50 λεμφοκυττάρων σε 4 mm^2 ή εναλλακτικά focus score ≥ 1 καθιστά την δοκιμασία θετική για ΣΣ (Soyfoo & Cogan, 2011).

Η βιοψία των ελάσσονων σιελογόνων αδένων παρά τη χρήσιμη διαγνωστική αξία της στο ΣΣ, πρέπει να αξιολογείται με προσοχή (Gomes et al., 2012). Η ειδικότητα είναι υψηλή αλλά η ευαισθησία παρουσιάζει διακυμάνσεις (Guellec et al., 2013). Μια ανασκόπηση για την βιοψία των ελάσσονων σιελογόνων αδένων έδειξε ότι υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση ως προς την ευαισθησία που κυμαίνεται από 63,5 έως και 93,7% και μια υψηλή ειδικότητα άνω του 89% (Guellec et al., 2013).

Ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα κυμαίνεται από 20 έως 40%, ενώ έχουν βρεθεί θετικά αποτελέσματα βιοψίας μέχρι και σε 10% των υγιών ατόμων (Soto-Rojas, 2002) Σε μια μελέτη, οι μη φυσιολογικές βιοψίες (με σκορ λεμφοκυτταρικής

διήθησης που κυμαίνεται από 2 έως 6) έχουν βρεθεί σε 15% των υγιών χωρίς υποκειμενική ξηροστομία ή ξηροφθαλμία (Radfar, 2002). Επίσης, ασθενείς που πάσχουν από μυασθένεια, και άλλες αυτοάνοσες διαταραχές που δεν συνδέονται με συμπτώματα ξηρότητας, μπορεί επίσης να εμφανίσουν διήθηση των ελάσσονων σιελογόνων αδένων (Vitali, 1988).

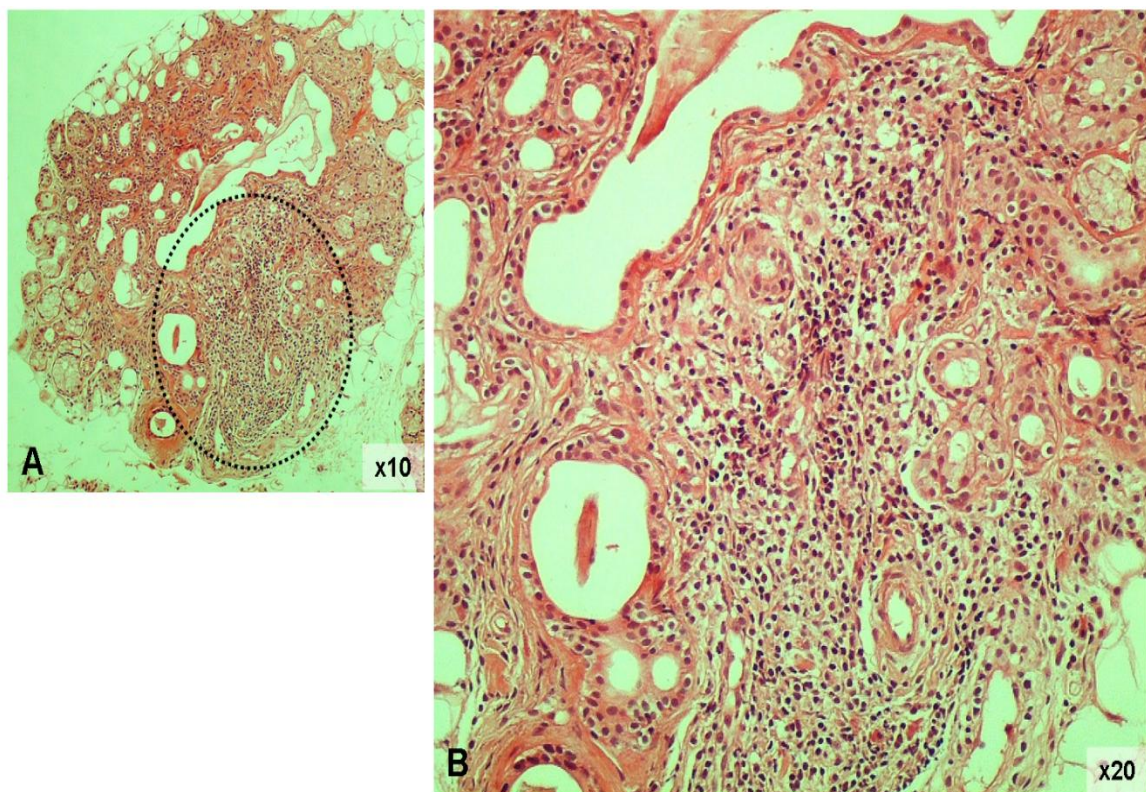
Το παθολογικό ιστολογικό εύρημα σε βιοψίες αδένων είναι μια προοδευτική διήθηση από μονοπύρρηνα λεμφοειδών κυττάρων, αντικαθιστώντας το αδενικό επιθήλιο (λεμφοεπιθηλιακές αλλοιώσεις). Αυτό συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τη μειωμένη έκκριση σιέλου. Ωστόσο, οι μηχανισμοί που οδηγούν στην συσσώρευση και ο ακριβής ρόλος των διηθούντων κυττάρων παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Τα διηθούντα κύτταρα επηρεάζουν τη λειτουργία των αδένων με διάφορους μηχανισμούς όπως είναι η έκκριση κυτταροκινών, η τοπική παραγωγή αυτοαντισωμάτων και η καταστροφή των αδενικών δομών με μηχανισμό διακυττάρων μεσολαβούμενης ανοσίας (Johnson et al., 2011).



Εικόνα 2: Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε ελάσσονα σιελογόνο αδέν ασθενή με ΣΣ A) Λεμφοκυτταρική διήθηση <50 κυττάρων x10 (focus score<1) B) Μεγέθυνση x20 (παθολογοανατομικό εργαστήριο του Νοσοκομείου Πατρών «Άγιος Ανδρέας»)

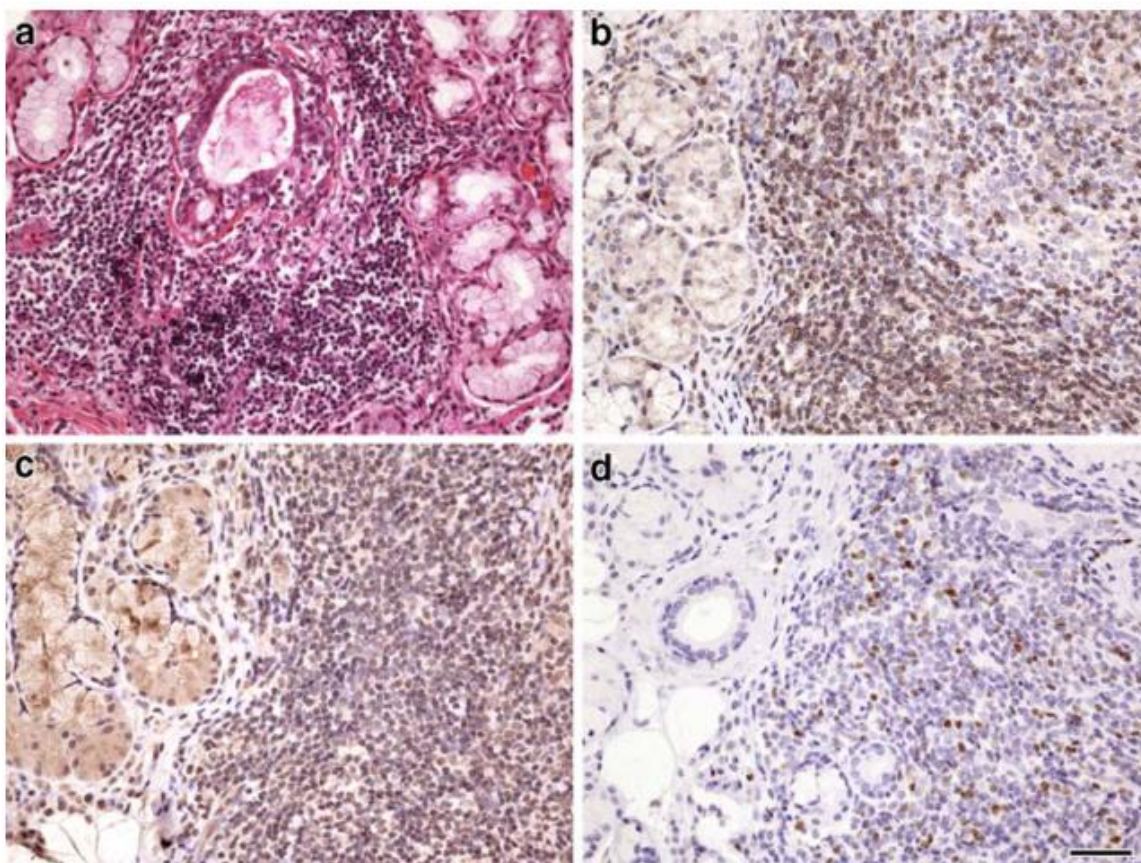
Η διήθηση αποτελείται κυρίως από T κύτταρα, αλλά επίσης, και από μακροφάγα και πλασματοκύτταρα. Υπό κανονικές συνθήκες τα λεμφοκύτταρα κυκλοφορούν στο

αίμα και όταν υπάρχει φλεγμονή ή τραυματισμός εισέρχονται στον ιστό. Αυτή είναι μια σύνθετη διαδικασία, η οποία ρυθμίζεται από μια σειρά μορίων προσκόλλησης στα φλεγμονώδη κύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα λεμφοκύτταρα προσκολλώνται στο ενδοθήλιο με μια σειρά μορίων προσκόλλησης και μετακινούνται από τη κυκλοφορία στον ιστό. Είναι ενδιαφέρον, ότι στον ορό έχουν βρεθεί αυξημένα τα επίπεδα της E-καδχερίνης, που είναι μόριο προσκόλλησης των επιθηλιακών κυττάρων, υποδεικνύοντας στενή αλληλεπίδραση μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων και λεμφοκυτταρικής οργάνωσης (Jonhson, 2005).



Εικόνα 3: Χειλική βιοψία ασθενούς με ΣΣ, με περιπορική και λοβιακή λεμφοκυτταρική διήθηση. Α Λεμφοκυτταρική διήθηση άνω των 50 κυττάρων (διακεκομμένος κύκλος). Μεγέθυνση x10. Β. Η περιοχή στον διακεκομμένο κύκλο x20 (focus score>1) (παθολογοανατομικό εργαστήριο του Νοσοκομείου Πατρών «Άγιος Ανδρέας»)

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι στο 1/3 από τις βιοψίες των σιελογόνων αδένων ανευρίσκονται δομές βλαστικού κέντρου, και συμπίπτουν με τους αυξημένους τίτλους ρευματοειδούς παράγοντα, την παρουσία άλλων αυτοαντισωμάτων, και την υψηλότερη βαθμολογία focus score. Αυτό δείχνει ότι ο σχηματισμός έκτοπων λεμφοειδών δομών σε μη λεμφοειδή όργανα μπορεί να παίζει ρόλο στη παθογένεια του συνδρόμου Sjogren.



Εικόνα 4. Πληθυσμοί Τ κυττάρων διεισδύουν στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με σύνδρομο Sjögren a) ιστοί από ασθενείς με πΣΣ, κατόπιν χρώσης με αιματοξυλίνη και ηωσίνη b) Η ανοσο-ιστοχημική χρώση με CD3 (TCR) αντίσωμα δείχνει πολλά Τ κύτταρα εντός των σιελογόνων αδένων c) Ο TGF-β , φάνηκε ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια στους σιελογόνους αδένες d) Η ανοσο-ιστοχημική χρώση έδειξε ότι τα CD4 + CD25 + Foxp3 + Treg είναι παρόντα στο διήθημα των Τ κυττάρων. (Katsifis, Moutsopoulos, & Wahl, 2007)

Ασθενείς που πάσχουν από ΣΣ παρουσιάζουν συνήθως ένα ευρύ φάσμα ορολογικών και εργαστηριακών ευρήματων, όπως κυτταροπενία (π.χ., αναιμία, λευκοπενία, θρομβοκυτοπενία), ρευματοειδείς παράγοντες και υπεργαμμασφαιριναιμία (συνήθως της τάξης IgG, σπανιότερα από τις κατηγορίες IgA και IgM), αυξημένη ταχύτητα καθίζησης ερυθροκυττάρων (ΤΚΕ), αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης C, και αυτοαντισώματα (Kassan & Moutsopoulos, 2004) (Gomes et al., 2012) (Jonsson et al., 2011).

Τα αντιπυρηνικά αντισώματα συνήθως παρατηρούνται στον ορό των ασθενών με ΣΣ. Τα anti-SSA αυτοαντισώματα ανευρίσκονται σε ποσοστό 30 έως 50%, ενώ τα anti-SSB αυτοαντισώματα σε ποσοστό 20 έως 30% στους ασθενείς (Soyfoo & Cogan, 2011).

Το SS-A (Ro) είναι εκχυλίσσιμο πυρηνικό αντιγόνο (ENA) που περιέχει δύο πρωτεϊνικά αντιγόνα (Ro) μοριακού βάρους 52 και 60 kDa. Τα αυτοαντισώματα έναντι των SSA / Ro ή SSB / La αντιγόνων είναι ενδεικτικά για την διάγνωση του συνδρόμου Sjogren, αν και μπορεί να βρεθούν και σε άλλες συστηματικές ασθένειες, όπως συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ), υποξύ δερματικό λύκο, δερματική αγγειίτιδα (ψηλαφητή πορφύρα), διάμεση πνευμονική ίνωση, νεογνικό λύκο και συγγενή καρδιακό αποκλεισμό. Περισσότερο από το 50% των ασθενών με σύνδρομο Sjogren έχουν ένα ή περισσότερα από αυτά τα αυτοαντισώματα και οι υψηλοί τίτλοι συνδυάζονται με μεγαλύτερη συχνότητα εξωαδενικής προσβολής, ειδικότερα πορφύρας και αγγειίτιδας

Αυτοαντισώματα έναντι της a-fodrin, έναντι των M3 μουσκαρινικών υποδοχέων (σε ποσοστό 9-100%), και των αντικεντρομερών αντισωμάτων έχουν επίσης περιγραφεί στο ΣΣ (Sumida, 2014).

Πολυαυτοανοσία

Με τον όρο πολυαυτοανοσία εννοούμε την παρουσία περισσότερων από μια αυτοάνοσης νόσου στον ίδιο ασθενή. Όταν τρεις ή περισσότερες διαταραχές συνυπάρχουν, τότε ονομάζεται πολλαπλό αυτοάνοσο σύνδρομο (multiple autoimmune syndrome- MAS) (Rojas-Villarraga, Amaya-Amaya, Rodriguez-Rodriguez, Mantilla, & Anaya, 2012).

Το σύνδρομο Sjogren φαίνεται να συσχετίζεται με άλλες αυτοάνοσες διαταραχές, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ), η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ), αυτοάνοση θυρεοειδική νόσος, η συστηματική σκλήρυνση και λιγότερο συχνά η πολλαπλή σκλήρυνση και το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο (Rojas-Villarraga et al., 2012). Σε μελέτη που διεξήχθη σε 410 ασθενείς με ΣΣ η πιο συχνή αυτοάνοση διαταραχή που συνυπήρχε ήταν η αυτοάνοση θυρεοειδική νόσος (21,5%), η ρευματοειδής αρθρίτιδα (8,3%) και ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (7,6%) (Amador-Patarroyo et al., 2012).

Σε πρωτοπαθές ΣΣ η πιο συχνή θυρεοειδική νόσος ήταν η θυρεοειδίτιδα και ο υποκλινικός υποθυρεοειδισμός (Jara et al. 2007). Οι ασθενείς με αυτοάνοση νόσο θυρεοειδούς εμφανίζουν 10 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για την ανάπτυξη ΣΣ, και αντίστοιχα οι ασθενείς με ΣΣ έχουν εννέα φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για ανάπτυξη θυρεοειδικής νόσου (Jara et al. 2007). Η συνύπαρξη τους μπορεί να εξηγηθεί λόγω της κοινής φυλογενετικής προέλευσης του θυρεοειδούς και των σιελογόνων αδένων, οι οποίοι προέρχονται από το γαστρεντερικό σύστημα. Επίσης η ανεύρεση του HLA-DR3 (DRB1:03:01) τόσο στο σύνδρομο Sjogren όσο και στον υποθυρεοειδισμό δείχνει ότι μπορεί να υπάρχει πιθανή γενετική προδιάθεση (Amador-Patarroyo et al., 2012).

Η εμφάνιση του ΣΣ μαζί με την ρευματοειδή αρθρίτιδα έχει συσχετιστεί σε διάφορες μελέτες. Όπως αναφέρθηκε η αρθρίτιδα είναι αρκετά συχνή εξωαδενική εκδήλωση, και ο ρευματοειδής παράγοντας είναι θετικός σε ποσοστό περίπου 50% των ασθενών (Amador-Patarroyo et al., 2012). Οι κλινικές εκδηλώσεις της ρευματοειδούς αρθρίτιδας είναι περισσότερο συχνές στους ασθενείς με θετικό ρευματοειδή παράγοντα, και anti-SS-B/La και/ή -SS-A/Ro αντισώματα.

Ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ) υπολογίζεται σε ποσοστό 19-33% ασθενών με ΣΣ (McDonagh & Isenberg, 2000). Σε ασθενείς με ΣΣ-ΣΕΛ η φωτοευασθησία, και το φαινόμενο raynaud εμφανίζονται λιγότερο συχνά συγκριτικά με ασθενείς με ΣΕΛ μόνο, και γενικότερα έχουν καλύτερη πρόγνωση και απαιτούν λιγότερη δραστική θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή και ανοσοκατασταλτικά (Xu et al., 2010) (Amador-Patarroyo et al., 2012). Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών με ΣΣ-ΣΕΛ είναι μικρότερος από ότι σε ασθενείς με ΣΣ μόνο αλλά υψηλότερος σε ασθενείς απ'ότι σε ασθενείς με ΣΕΛ μόνο. Οι ασθενείς με ΣΕΛ εμφανίζουν αυτοάνοση θυρεοειδική νόσο σε ποσοστό 18%, σύνδρομο Sjogren και αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο σε ποσοστό 14% (Rojas-Villarraga et al., 2010).

Η συνύπαρξη ΣΣ και πολλαπλής σκλήρυνσης αναφέρεται σε ποσοστό 1-3% (Miro et al. 1990). Μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε ότι τα συμπτώματα ΣΣ εμφανίζονται στο 9,5% των ασθενών με σκλήρυνση (Annunziata et al., 2011)(Amador-Patarroyo et al., 2012).

Επιδημιολογικές μελέτες αναφέρουν ότι ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση εμφανίζουν αυτοάνοση νόσο θυρεοειδούς (από 10,4% έως 38%), ΣΣ (από 7,7% έως 18%), ρευματοειδή αρθρίτιδα (21%), δερματομυοσίτιδα (5,6%) και πρωτοπαθή χολική κίρρωση (4%) (Elhai, Avouac, Kahan, & Allanore, 2013) (Hudson et al., 2008)

Θεραπευτική αντιμετώπιση

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του συνδρόμου Sjogren είναι κυρίως συμπτωματική, καθώς δεν έχει καθοριστεί ο ακριβής αιτιοπαθογενετικός παράγοντας. Κύριος στόχος είναι η έγκαιρη αναγνώριση και αντιμετώπιση των επιμέρους συμπτωμάτων, και κατά κύριο λόγο της χρόνιας ξηροστομίας και ξηράς κερατοεπιπεφυκίτιδας. Η θεραπευτική προσέγγιση λοιπόν, βασίζεται στην ανακούφιση των συμπτωμάτων, και στην χρήση ανοσοτροποποιητικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση των συστηματικών εκδηλώσεων (Ramos-Casals, Brito-Zerón, Sisó-Almirall, Bosch, & Tzioufas, 2012)

Τοπική ύγρανση (τεχνητά δάκρυα και στοματικό διάλυμα), ήταν η μόνη θεραπεία για χρόνια, και εξακολουθεί να συνιστάται ως πρώτη γραμμή ή συμπληρωματική θεραπεία (Peri, Agmon-Levin, Theodor, & Shoenfeld, 2012c). Η συμπτωματική θεραπευτική αντιμετώπιση της ξηροστομίας είναι η διατήρηση της υγρασίας του στοματικού βλεννογόνου, κάνοντας στοματοπλύσεις συνήθως με νερό. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν υποκατάστατα σιέλου με μορφή σταγόνων και ενυδατικά σκευάσματα με τη μορφή γέλης, ή ακόμα και τσίχλες χωρίς ζάχαρη. Σημαντικό είναι να διατηρείται υψηλό επίπεδο στοματικής υγιεινής, ώστε να προλαμβάνεται ή να θεραπεύεται έγκαιρα η οδοντική τερηδόνα, αλλά και οποιαδήποτε άλλη φλεγμονή του στόματος (ενώ το αλκοόλ, ο καφές και το κάπνισμα θα πρέπει να αποφεύγονται (Kassan, 2011), (Ramos-Casals, 2007) (Tincani 2013) (Vitali, 2010).

Χολινεργικοί παράγοντες, όπως πιλοκαρπίνη και σεβιμελίνη, είναι γνωστοί εδώ και χρόνια για την αποτελεσματικότητά τους. Για τους ασθενείς με υπολειπόμενη λειτουργία σιελογόνων, η από του στόματος χορήγηση πιλοκαρπίνης και σεβιμελίνης είναι η θεραπεία επιλογής. Διεγείροντας τους M1 και M3 μουσκαρινικούς υποδοχείς των αδενικών κυττάρων, η πιλοκαρπίνη και η σεβιμελίνη εμποδίζουν την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων και περιορίζουν την δράση των κυτταροκινών που προάγουν την φλεγμονή. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα των δυο φαρμάκων δεν έχει συγκριθεί. Το 1999 μελετήθηκαν 373 ασθενείς με πρωτοπαθές ή δευτεροπαθές ΣΣ και κλινικά σημαντική ξηροστομία και ξηροφθαλμία. Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν για να λάβουν 2,5 mg πιλοκαρπίνης, 5-mg πιλοκαρπίνης ή εικονικό φάρμακο 4 φορές ημερησίως για 12 εβδομάδες. Σημαντική βελτίωση παρατηρήθηκε στην ομάδα που

έλαβε 5-mg πιλοκαρπίνης σε σύγκριση με την ομάδα του εικονικού φαρμάκου, και η πιο συχνή αρνητική επίδραση ήταν η εφίδρωση (Vivino, 1999) (Claudio Vitali, Palombi, & Cataleta, 2010). Οι δόσεις με την καλύτερη σχέση αποτελεσματικότητας και ανεπιθύμητων ενεργειών ήταν 5 mg κάθε 6 ώρες για την πιλοκαρπίνη και 30 mg κάθε 8 ώρες για την σεβιμελίνη. Σε ασθενείς με αντένδειξη ή δυσανεξία σε μουσκαρινικούς αγωνιστές, η N-ακετυλοκυστεΐνη μπορεί να είναι μια εναλλακτική λύση (Ramos-Casals, 2010). Μια νέα θεραπεία για την ξηροστομία είναι ηλεκτρική διέγερση του γλωσσικού νεύρου, η οποία ανακουφίζει από τα συμπτώματα, αν και η ροή σιελογόνων δεν αυξάνεται (Strietzel et al., 2011).

Η θεραπεία της ξηροφθαλμίας περιλαμβάνει την αποφυγή παραγόντων που μπορεί να την επιδεινώσουν όπως για παράδειγμα το ξηρό περιβάλλον και το κάπνισμα, και την τοπική χρήση σταγόνων που έχει ως στόχο την εφύγρανση του κερατοειδούς και του επιπεφυκότα και την προστασία τους από λοιμώξεις. Η τοπική χρήση 0,05% κυκλοσπορίνης δύο φορές ημερησίως για τους ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ξηροφθαλμία φαίνεται ότι μπορεί να έχει ευεργετικά αποτελέσματα (Sall, 2000) (Stevenson, 2000). Ωστόσο, σε μία μελέτη, δεν παρατηρήθηκε βελτίωση μετά από 6 επιπλέον μήνες θεραπείας (Barber, 2005).

Οι ασθενείς με σοβαρή ξηροφθαλμία μπορεί να χρειαστούν την χορήγηση ΜΣΑΦ ή γλυκοκορτικοειδών, ωστόσο η χρήση τους θα πρέπει να γίνεται με μέτρο λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών που σχετίζονται με τη μακροπρόθεσμη χρήση (Tincani et al., 2013) (Stone, 2010) (Claudio Vitali et al., 2010)

Η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή φαίνεται ότι επιβραδύνει την ανάπτυξη της νεφρικής νόσου (Maripuri et al., 2009). Η θεραπεία των συμπτωμάτων από το περιφερικό νευρικό σύστημα, μπορεί να γίνει με αντικαταθλιπτικά ή με γκαμπαπεντίνη. Αν αυτά είναι αναποτελεσματικά, μπορεί να δοθεί ενδοφλέβια γάμμα σφαιρίνη (Claudio Vitali et al., 2010) (Keilp, 2005) (Levy, 2003) (Peri et al., 2012).

Για τον πόνο από τις αρθρώσεις ή τους μυς, και για την αντιμετώπιση της χρόνιας τοπικής φλεγμονής, χορηγούνται αναλγητικά και μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα. Οι δερματολογικές εκδηλώσεις μπορούν να αντιμετωπιστούν σε τοπικό επίπεδο ή με Plaquenil ενώ η αγγειίτιδα απαιτεί την προσθήκη των κορτικοστεροειδών και κυκλοφωσφαμίδης (Ramos-Casals, 2004). Η θεραπεία με

γλυκοκορτικοειδή ή άλλους ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες φαίνεται να επιβραδύνει την εξέλιξη της νεφροπάθειας και να βελτιώνει τη νεφρική λειτουργία στο πρωτοπαθές ΣΣ (Maripuri et al., 2009).

Κατά την τελευταία δεκαετία, βιολογικές θεραπείες, όπως αντι-TNFs έχουν αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη θεραπεία των αυτοάνοσων-ρευματικών παθήσεων. Ωστόσο, σε αντίθεση με την επιτυχία τους στην ρευματοειδή αρθρίτιδα και αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, αυτά βρέθηκαν να είναι αναποτελεσματικά σε ΣΣ (Peri et al., 2012).

Υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία σχετικά με τη χρήση ανοσοκατασταλτικών παραγόντων, δεδομένου οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί είναι λίγες και σε μικρό ποσοστό ασθενών (Yan, 2008). Σε σχετικά πρόσφατες μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα, που κατευθύνονται εναντίον των αντιγόνων B-κυττάρων, ειδικά αντι- CD- 20 (rituximab), αλλά και εναντίον του CD - 22 (epratuzimab), εκ των οποίων η μεγαλύτερη εμπειρία έχει αποκτηθεί με το rituximab. Το rituximab έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει ορισμένες εξωαδενικές εκδηλώσεις, όπως αγγειίτιδα, νευροπάθεια, σπειραματονεφρίτιδα, και αρθρίτιδα (Gottenberg 2005) (Ramos-Casals, 2010).

Μια μελέτη για την επίδραση της χορήγησης rituximab σε 30 ασθενείς με ΣΣ έδειξε σημαντική βελτίωση στη λειτουργία των σιελογόνων αδένων, καθώς και μείωση των B-κυττάρων, μείωση του ρευματοειδούς παράγοντα, και βελτίωση των εξω-αδενικών εκδηλώσεων. Σε αυτή τη μελέτη, οι ασθενείς παρακολουθήθηκαν για 48 εβδομάδες, και το μέγιστο αποτέλεσμα της θεραπείας παρατηρήθηκε μετά την 36η εβδομάδα (Meiners, Vissink, Kallenberg, Kroese, & Bootsma, 2011)

Αντίθετα, σε άλλη μελέτη φάνηκε ότι η χορήγηση ριτουξιμάμπης στους ασθενείς αυτούς είχε ως αποτέλεσμα μετρίου βαθμού βελτίωση της κόπωσης και της ξηροστομίας, χωρίς να υπάρχει αντίστοιχα βελτίωση στην λειτουργία των σιελογόνων και δακρυϊκών αδένων (St Clair et al., 2013). (Tarella, Gueli, Ruella, & Cignetti, 2013). Είναι σαφές λοιπόν ότι χρειάζεται να γίνουν μεγαλύτερες κλινικές δοκιμές για να διαπιστωθούν οι μακροχρόνιες επιπλοκές της θεραπείας και να εκτιμηθούν τα ευεργετικά αποτελέσματα των ασθενών με ΣΣ.

Η αποτελεσματικότητα της επρατουζιμάμπης μελετήθηκε σε 16 ασθενείς με ΣΣ στους οποίους χορηγήθηκαν 4 ενέσεις με 360mg/m^2 μια κάθε δυο εβδομάδες και follow up 6 μηνών. Στους μισούς ασθενείς περίπου παρατηρήθηκε μια κλινική βελτίωση στις 6 εβδομάδες, πιθανόν μέσω της ρύθμισης προς τα κάτω της υπερέκφρασης του CD22 στα περιφερικά Β κύτταρα (Steinfeld, S.D, 2006)

Πρόοδοι στη γνώση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην αιτιοπαθογένεια του πρωτογενούς συνδρόμου Sjögren, μπορεί να επιτρέψει την ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών, εξαιρετικά επιλεκτικών θεραπειών χωρίς τις αρνητικές επιπτώσεις που συχνά συνδέονται με τα καθιερωμένα, λιγότερο επιλεκτικά, φάρμακα.

Αιτιοπαθογένεια

Παρά τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια, δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί ποιοι ακριβώς είναι οι αιτιολογικοί παράγοντες που οδηγούν στην εμφάνιση του συνδρόμου. Με βάση τα μέχρι στιγμής επιστημονικά δεδομένα, φαίνεται να υπάρχει κάποια γενετική προδιάθεση ενώ περιβαλλοντικοί, ορμονικοί και ανοσολογικοί παράγοντες φαίνεται να συμμετέχουν και να πυροδοτούν την εκδήλωση του συνδρόμου (Michael Voulgarelis & Tzioufas, 2010)

Γενετικοί παράγοντες

Γενετικοί παράγοντες φαίνεται να συμβάλλουν στην εμφάνιση του συνδρόμου Sjogren, όπως φάνηκε από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν και έδειξαν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης του σε 2 ή περισσότερα μέλη της ίδιας οικογένειας και ιδιαίτερα σε μονοζυγωτικούς διδύμους (Bayetto & Logan, 2010).

Επιπλέον, σε ασθενείς με ΣΣ και στα μέλη των οικογενειών τους, υπάρχει μια υψηλή συχνότητα εμφάνισης άλλων αυτοάνοσων νόσων, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η αυτοάνοση νόσος θυρεοειδούς, η ψωρίαση και η πολλαπλή σκλήρυνση, αποδεικνύοντας ότι γενετικοί παράγοντες σχετίζονται με την παθογένεια των αυτοάνοσων γενικά, και με το ΣΣ ειδικότερα (Peri et al., 2012).

Συσχέτιση φάνηκε να υπάρχει μεταξύ αλληλόμορφων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II και κυρίως των γονιδίων HLA-DR και HLA-DQ στην παθογένεια του ΣΣ (Michael Voulgarelis & Tzioufas, 2010). Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση ανέφερε ότι τα DQA1 * 5:01, DQB1 * 2:01 και DRB1 * 3:01 αλληλόμορφα βρέθηκαν να είναι παράγοντες κινδύνου για το ΣΣ (Cruz-Tapias, 2012). Το HLA-DR3 φαίνεται ότι σχετίζεται με τον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, το ΣΣ και κάποιους υποτύπους της μυοσίτιδας. Στο ΣΣ το HLA-DRB1*03 σχετίζεται με την παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι των Ro (Wahren-Herlenius & Dörner, 2013). Σε

μία άλλη μελέτη, τα HLA-DQ2 και HLA-B8 ήταν κοινά σε ασθενείς του Καυκάσου, ενώ τα HLA-DR5 ήταν ιδιαίτερα κοινά μεταξύ Ελλήνων και Ισραηλινών ασθενών (Roitberg-Tambur, 1993). Το HLA-DR5 επίσης συσχετίστηκε με την παρουσία των αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων.

Πολυμορφισμοί σε μη HLA-γονίδια περιλαμβάνουν το μονοπάτι της ιντερφερόνης α, όπως τον παράγοντα ιντερφερόνης 5 και τον STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4), οι οποίοι φαίνεται να σχετίζονται με το ΣΣ (Nordmark et al., 2009). Το γονίδιο της IRF-5 κωδικοποιεί ένα παράγοντα μεταγραφής που είναι σημαντικός για την παραγωγή ιντερφερόνης τύπου I που επάγει την φλεγμονή (Peri, 2012). Στο ΣΣ βρέθηκε συσχέτιση με το rs2004640 T αλληλόμορφο της ιντερφερόνης 5 (Miceli-Richard et al., 2007). Το STAT4 είναι ένα μόριο μεταγωγής σήματος που επάγει τη διαφοροποίηση T λεμφοκυττάρων σε Th1 υπότυπο, και η μετάλλαξη του φαίνεται να σχετίζεται με διάφορες αυτοάνοσες παθήσεις όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και το ΣΣ (Nordmark et al. 2009) (Peri et al., 2012). Μια μελέτη ανέφερε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του T αλληλόμορφου rs7574865 σε πρωτοπαθές ΣΣ το οποίο ανευρίσκεται στο 29,6% των χρωμοσωμάτων σε ασθενείς με ΣΣ συγκριτικά με το 22,3% των χρωμοσωμάτων στα controls (Korman et al., 2008).

Σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου για την πρωτεΐνη IFN-α-inducible protein 27 (IFI27), αναφέρθηκε επίσης σε μια μικρή μελέτη σε ασθενείς, ενισχύοντας περαιτέρω τον ρόλο της IFN στην παθογένεια του ΣΣ (Kimoto, 2011).

Περιβαλλοντικοί

- Ιοί

Οι ιοί θεωρούνται ως πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες για την εκκίνηση της ανοσολογικής απόκρισης, που μπορεί να γίνει είτε μέσω του μηχανισμού μοριακής μίμησης, είτε μέσω της τοπικής εισβολής και την μετέπειτα μετανάστευση των λεμφοκυττάρων (Bayetto & Logan, 2010). Από τους λοιμογόνους παράγοντες, αυτοί που ενοχοποιούνται για την εμφάνιση του ΣΣ είναι ο ιός Epstein Barr (EBV) (Toussiro, 2009), ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) (Haddad, 1992), ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) και ο ανθρώπιος ιός της T-κυτταρικής λευχαιμίας (HTLV-

1). Αναφέρεται ακόμα, η συμμετοχή και των ιών Coxsackie (Triantafylloroulou & Moutsopoulos, 2007) (Pflugfelder et al. 1993) (Green et al. 1989).

Ο ιός Epstein-Bar είναι ένας DNA ιός, και φαίνεται να ανευρίσκεται σε υψηλό ποσοστό στο σίελο και στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με ΣΣ (Draborg, Duus, & Houen, 2013). Σε μελέτη του 2004 σε Έλληνες ασθενείς φάνηκε ότι ο ιός Coxsackie μπορεί να προσβάλλει τους ελάσσονες σιελογόνους αδένες (Triantafylloroulou et al. 2004), σε αντίθεση με τα αποτελέσματα άλλης μελέτης σε Γάλλους ασθενείς (Gottenberg et al., 2006) (Michael Voulgarelis & Tzioufas, 2010).

- Βιταμίνη D

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση της βιταμίνης D και του ΣΣ. Συγκεκριμένα σε μια μεγάλη διεθνή μελέτη ανάμεσα σε 176 ασθενείς με πρωτοπαθές ΣΣ και 163 υγιείς εθελοντές φάνηκε ότι τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D σε ασθενείς με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren μπορεί να συσχετιστούν με την εμφάνιση περιφερικής νευροπάθειας (23%) και λεμφώματος (4,3%). (Agmon-Levin, 2012,). Φαίνεται λοιπόν, ότι η έλλειψη βιταμίνης D μπορεί να συμμετέχει στην παθογένεια της νευροπάθειας σε ΣΣ, και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την παρακολούθηση και την θεραπεία της (Turner, 2008) (Skalli, 2012) (Tincani et al, 2012).

- Κάπνισμα

Το κάπνισμα φαίνεται ότι συμβάλλει στην παθογένεια διαφόρων νόσων ενώ σχετίζεται και με την σοβαρότητα διαφόρων αυτοάνοσων ασθενειών όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος. Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός πιθανόν έχει να κάνει με την διαταραχή των κυτταρικών λειτουργιών, την απόπτωση και την επίδραση στην έκκριση κυτταροκινών και ορμονικών παραγόντων (Amador-Patarroyo et al., 2012).

Στο πρωτοπαθές ΣΣ φαίνεται ότι η ανεύρεση αντιπυρηνικών αντισωμάτων σχετίζεται σημαντικά με την συνήθεια του καπνίσματος ενώ δεν υπήρχε συσχέτιση με άλλα συτοαντισώματα ή με την εκδήλωση εξωαδενικών συμπτωμάτων (Karabulut et al., 2011) (Amador-Patarroyo et al., 2012)

- Στρες

Το έντονο ψυχικό στρες μπορεί να πυροδοτήσει την αυτοανοσία. Πριν την διάγνωση της νόσου, οι ασθενείς με ΣΣ φαίνεται ότι έχουν περάσει έντονο ψυχικό στρες χωρίς την ανάπτυξη αντισταθμιστικών μηχανισμών για την καταπολέμηση του (Καραϊσκος, 2009). Επιπροσθέτως η έλλειψη κοινωνικών δομών και υποστήριξης μπορεί να συμμετέχει στον σχετικό κίνδυνο για την ανάπτυξη της νόσου (Καραϊσκος, 2009).

Ενδοκρινικές μεταβολές σε ΣΣ

Στους ασθενείς με πρωτοπαθές ΣΣ φαίνεται ότι ο υποθαλαμο-υποφυσιακο-επινεφριδικός άξονας, ένας μείζον μηχανισμός ομοιόστασης έναντι του στρες, υπολειτουργεί.

Τα ανδρογόνα όπως το (DHEA-S) φαίνεται ότι είναι μειωμένα στον ορό των ασθενών με ΣΣ (Mavragani, Fragoulis, & Moutsopoulos, 2012). Αλλαγές στα επίπεδα των οιστρογόνων και ανδρογόνων επηρεάζουν την ανάπτυξη του ΣΣ και πιο συγκεκριμένα τα οιστρογόνα διαδραματίζουν έναν ανοσοτροποποιητικό ρόλο στα φυσιολογικά κύτταρα των σιελογόνων αδένων μέσω της παρεμπόδισης της επαγόμενης από την IFN-γ έκφρασης του ICAM-1, ένα μόριο προσκόλλησης ενδεικτικό της κυτταρικής ενεργοποίησης. Η ανεπαρκής οιστρογονική έκκριση σε ΣΣ έχει προταθεί ως μεσολαβητής της εγγενούς επιθηλιακής ενεργοποίησης (Manoussakis et al., 2012). Η μείωση των οιστρογόνων κατά την εμμηνόπαυση οδηγεί σε αυξημένη απόπτωση των κυττάρων των εξωκρινών αδένων (Konttinen et al., 2012).. Επιπροσθέτως, η προλακτίνη φαίνεται ότι είναι αυξημένη σε ασθενείς με ΣΣ (Jara, Medina, Saavedra, Vera-Lastra, & Navarro, 2011).

Παθογένεια –Ανοσολογικές μεταβολές

Μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στην ανοσολογία είναι η κατανόηση των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην διάκριση μεταξύ παθογόνων παραγόντων και αυτοαντιγόνων. Το ανοσοποιητικό σύστημα βρίσκεται σε ισοζύγιο μεταξύ της ανοσολογικής ανοχής και της αντιμετώπισης των νοσογόνων παραγόντων. Αυτοανοσία, ωστόσο, εμφανίζεται σε μόνο το 5% του γενικού του πληθυσμού, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη άλλων μηχανισμών για την πρόληψη αυτοάνοσων αποκρίσεων (Gershon, 1970) (Gershon 1971).

Η ανοσολογική ανοχή, διακρίνει τα ξένα από τα αυτοαντιγόνα και καταστέλλει την υπερβολική ανοσολογική απόκριση έναντι των αυτοαντιγόνων, η οποία επιτυγχάνεται με τρεις μηχανισμούς, 1) μέσω κεντρικής ανοχής, 2) μέσω της περιφερικής ανοχής, 3) μέσω ανοσολογικής άγνοιας. Με την κεντρική ανοχή επιτυγχάνεται θυμική κλωνική διαγραφή ή αδρανοποίηση αυτοαντιδρώντων T λεμφοκυττάρων. Η περιφερική ανοχή ενεργοποιείται όταν τα T λεμφοκύτταρα ξεφύγουν από τον θύμο και επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους, όπως η καταστολή από τα T ρυθμιστικά κύτταρα, η έκκριση κυτταροκινών που εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων, η επαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης μέσω του μονοπατιού Fas/FasL, το μπλοκάρισμα μορίων επιφανείας όπως το CTLA-4. Στην ανοσολογική άγνοια, τα B και T λεμφοκύτταρα δεν διακρίνουν τα αυτοαντιγόνα, είτε λόγω χαμηλής συγκέντρωσης τους, είτε λόγω αιματοϊστικών φραγμών. Σε περίπτωση αποτυχίας αυτών των μηχανισμών τα αυτοαντιδρώντα T- κύτταρα της περιφέρειας στρέφονται έναντι αντιγόνων του ίδιου του οργανισμού (Danke, 2004), (Dubois, 2003)

T κύτταρα

Τα T λεμφοκύτταρα χρησιμοποιούν μεμβρανικούς υποδοχείς χαμηλής συγγένειας, τους T Cell receptors-TCR, για την αναγνώριση αντιγόνων που παρουσιάζονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα συνδεδεμένα με τις μεμβανικές πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I και τάξης II.

Η αυτοανοσία ξεκινά όταν η κεντρική ή περιφερική ανοχή αποτύχουν και η ενεργοποίηση των αυτοαντιδραστικών T κυττάρων επάγει την ιστική καταστροφή.

Τα περισσότερα αυτοαντιδρώντα Τ κύτταρα εξαλείφονται από τον θύμο (κεντρική ανοχή) ενώ τα υπόλοιπα που εισέρχονται στην περιφέρεια ελέγχονται από τους περιφερικούς μηχανισμούς ανοχής (Sakaguchi et al., 2006). Τα Τ κύτταρα φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στο ΣΣ όπως φαίνεται από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τις τελευταίες δεκαετίες.

Παρά τις αναφορές για ανοσολογικές μεταβολές στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με ΣΣ, ο ακριβής ρόλος των λεμφοκυττάρων και των κυτταροκινών στην παθογένεια του ΣΣ είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Όπως προαναφέρθηκε, το χαρακτηριστικό ιστοπαθολογικό γνώρισμα είναι η λεμφοκυτταρική διήθηση των σιελογόνων αδένων από Τ κύτταρα (κυρίως CD4⁺ Τ αλλά και CD8⁺ Τ κύτταρα) και Β κύτταρα σε ποσοστό 4:1 (Maehara et al., 2012). Τα CD4⁺Τ βοηθητικά κύτταρα (Τ βοηθητικά κύτταρα) διαφοροποιούνται σε δυο διαφορετικές ομάδες τα Th1 και Th2 που ρυθμίζονται από διαφορετικές κυτταροκίνες (O'Garra & Arai, 2000). Επίσης και μια νέα σχετικά κατηγορία, τα Th17 κύτταρα, έχει φανεί ότι παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη αυτοάνοσων διαταραχών (Steinman, 2007). Πολλές μελέτες που έχουν δημοσιευτεί έχουν δείξει ότι η διαταραχή της ισορροπίας της Th1/Th2 απόκρισης σχετίζεται με την εμφάνιση αυτοάνοσων παθήσεων (Fox et al., 1994).

Το 1983 δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά ότι τα Τ κύτταρα αποτελούσαν την πλειοψηφία (>75%) των λεμφοκυττάρων στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με ΣΣ (Fox, Adamson, Fong, Young, & Howell, 1983). Οι Fox και συν. χρησιμοποιώντας αντίστροφη μεταγραφάση και ποσοτική PCR για τη μέτρηση του mRNA κυτταροκινών, ανέφεραν ότι τα CD4⁺ Τ κύτταρα στους σιελογόνους αδένες παράγουν πάνω από 40 φορές περισσότερη IL-2, IFN-γ και IL-10 σε σχέση με CD4⁺ Τ κύτταρα περιφερικού αίματος, αλλά όχι IL-4 ή IL-5 (Fox et al., 1994).

Οι Szodoray και συν., ανέφεραν αυξημένα επίπεδα περιφερικών κυττάρων φονέων (natural killer (NK)), Τ κυττάρων φονέων (natural killer T (NK T)), και Τ regulatory type 1 (Tr1) κυττάρων σε πρωτοπαθές ΣΣ συγκριτικά με τους controls, ενώ τα CD4⁺ CD25⁺ Treg κύτταρα ήταν μειωμένα. Σε πρωτοπαθές ΣΣ τα NK T, Tr1 και CD4⁺ CD25⁺ Treg κύτταρα ήταν σε υψηλότερα επίπεδα στους ασθενείς με εξωαδενικές εκδηλώσεις και τα επίπεδα των CD4⁺ CD25⁺ Treg συσχετίζονταν αρνητικά με τα αποτελέσματα της σιελομετρίας (Szodoray et al., 2009)

Επιπροσθέτως αυξημένα επίπεδα ενεργών CD3+/CD69+ T κυττάρων βρέθηκαν σε ασθενείς συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες (Szodoray et al., 2008) (Osnes, Nakken, Bodolay, & Szodoray, 2013).

- *T ρυθμιστικά κύτταρα –Regulatory T κύτταρα (Tregs)*

Η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος πρέπει να ελέγχεται και να καταστέλλεται όταν ολοκληρωθεί η αποστολή του. Χωρίς τους μηχανισμούς καταστολής, η φυσιολογική αυτή διαδικασία μπορεί εύκολα να μετατραπεί σε παθολογική, που τελικώς αντί να προστατεύει τον οργανισμό μας στρέφεται εναντίον του. Τα Ρυθμιστικά T κύτταρα (regulatory T cells-Tregs) είναι κυρίως CD4+ αλλά και CD8+ κύτταρα, ικανά να εμποδίσουν ανοσοπαθολογικές καταστάσεις ή αυτοάνοσα νοσήματα in vivo. Ο ρόλος τους είναι η καταστολή του πολλαπλασιασμού των αρχέγονων T λεμφοκυττάρων in vitro και ο ποσοτικός έλεγχος των CD4 ή CD8 λεμφοκυττάρων in vivo. Η απουσία τους μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση αυτοανοσίας.

Τα Tregs μπορούν να περιορίσουν την ανοσοαπόκριση σε ορισμένες λοιμώξεις προλαμβάνοντας μια υπερβολική απόκριση, αλλά διατηρώντας μια αποτελεσματική απάντηση για την εξάλειψη του μολυσματικού παράγοντα. Από την άλλη πλευρά όμως, τα Treg μπορεί να ρυθμίζουν προς τα κάτω την ανοσολογική απόκριση σε ένα τέτοιο βαθμό ώστε που μπορούν να οδηγήσουν σε χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις (Belkaid & Rouse, 2005).

Τα T κατασταλτικά κύτταρα του ανοσοποιητικού απαντήσες πρωτοπεριγράφονται στις αρχές της δεκαετίας του 1970 από τον Gershon και Kondo (Gershon, 1970). Η αδυναμία ακριβούς προσδιορισμού και απομόνωσης των κυττάρων αυτών και των παραγόντων που αυτά εκκρίνουν, είχε ως αποτέλεσμα την αμφισβήτηση της ύπαρξης τους. Η ανακάλυψη των T ρυθμιστικών κυττάρων στηρίχθηκε στη παρατήρηση ότι αυτός ο πληθυσμός κυττάρων περιόριζε τα αυτοαντιδρώντα κύτταρα που βρίσκονται στη κυκλοφορία σε νεογέννητα ποντίκια τα οποία είχαν υποστεί τη τρίτη μέρα μετά τη γέννηση τους θυμεκτομή, και κατά συνέπεια εμφανίζαν αυτοάνοσο νόσημα.

Στα μέσα της δεκαετίας του 1990, ο Sakaguchi και συν. (Sakaguchi, 2006) επανέφεραν το παράδειγμα της διαμεσολαβούμενης από T κύτταρα αυτοανοχής, με τον προσδιορισμό ενός υποσυνόλου των περιφερικών CD4 + T κυττάρων, που εκφράζουν τον υποδοχέα της α-αλυσίδας της IL-2 (CD25), τα οποία βρέθηκαν να είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την πρόληψη αυτοανοσίας. Στα πειράματα τους, απομόνωσαν CD25+ κύτταρα από σπληνικά CD4+ και κατόπιν χορήγησαν CD4+/CD25- κύτταρα στα ποντίκια που είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη αυτοάνοσης γαστρίτιδας, όταν όμως αυτά εμπλουτίζονταν με CD25+ κύτταρα τα ποντίκια δεν προσβάλλονταν από την ασθένεια (Sakaguchi et al., 2007) (Sakaguchi et al. 1995).

Τα κύτταρα Treg σε ανθρώπους ταυτοποιήθηκαν σε διάφορες μελέτες την τελευταία δεκαετία επιβεβαιώνοντας την υψηλή έκφραση του CD25 και της κατασταλτικής τους ικανότητας in vitro.

Διαταραχές στον αριθμό και τη λειτουργία των ρυθμιστικών T κυττάρων, και αντίσταση των τελεστών T κυττάρων στην καταστολή, μπορεί να συμβάλλουν στην αυτοανοσία. Μεταξύ των πιθανών μηχανισμών είναι: 1) μείωση του αριθμού των Treg ή / και δυσλειτουργία των Tregs σε άτομα με προδιάθεση για ανάπτυξη αυτοάνοσων, 2) αναστολή κατασταλτικής λειτουργίας των Treg, εκτροπή ή μετατροπή λόγω της χρόνιας φλεγμονής που εμφανίζεται σε αυτοανοσία, 3) αυτοαντιδραστικά T κύτταρα (Teff) γίνονται ασυνήθιστα επιθετικά και ανθεκτικά σε ρύθμιση από λειτουργικά Tregs επειδή έχουν ξεπεράσει τον κανονιστικό έλεγχο ή εκφράζουν μόρια που τα καθιστούν ανθεκτικά (Bettini & Vignali, 2009).

Μια σειρά από μελέτες περιγράφουν μείωση του αριθμού των ρυθμιστικών κυττάρων ή, εναλλακτικά, μειωμένη λειτουργικότητα σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα όπως συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (SLE), ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA) ή μικτή νόσο του συνδετικού ιστού (MCTD) (Osnes et al., 2013).

Κατηγορίες Τ ρυθμιστικών κυττάρων

Υπάρχουν δύο κατηγορίες Τ ρυθμιστικών κυττάρων, τα φυσικά Τ ρυθμιστικά κύτταρα (natural T regs-nTregs), που προέρχονται από το θύμο, και τα επαγώγιμα (inducible Tregs-iTregs) (Chen et al., 2003)(Alunno, Nocentini, Bistoni, Petrillo, & Bocci, 2012). Αυτοί οι κυτταρικοί τύποι φαίνεται να διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το προφίλ παραγωγής κυτταροκινών και της ικανότητας τους να καταστέλλουν τις ανοσοαπαντήσεις μέσω της άμεσης επαφής κύτταρο με κύτταρο ή μέσω της έκκρισης ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών.

- Φυσικά Τ ρυθμιστικά κύτταρα

Τα φυσικά Τ ρυθμιστικά (nTregs) προέρχονται από το θύμο και χαρακτηριστικά εκφράζουν CD25 που είναι ο υποδοχέας α αλυσίδας της ιντερλευκίνης-2 (IL-2). Η ανάπτυξη και λειτουργία τους εξαρτάται από την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3. Για την ανάπτυξη τους φαίνεται ότι απαιτείται αλληλεπίδραση μεταξύ των TCR υποδοχέων τους με πεπτίδια του MHC συστήματος που εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων του στρώματος του θύμου, και φαίνεται να έχει ιδιαίτερη σημασία η συγγένεια των TCR υποδοχέων με τα πεπτίδια των θυμικών αντιγόνοπαρουσιαστικών κυττάρων. Εάν ο βαθμός συγγένειας είναι χαμηλός τότε καταλήγουν στη παραγωγή CD4⁺/CD25⁻ κυττάρων. Αντίθετα, η εξαιρετικά υψηλή συγγένεια θα οδηγούσε σε εξάλειψη του κλώνου. Αποτελούν ένα μικρό αλλά ξεχωριστό υποσύνολο των κυττάρων CD4 + T και ανευρίσκονται σε ποσοστό 5-10% του συνόλου των CD4⁺ κυττάρων της περιφέρειας.

Τα CD4 + CD25 + nTregs αναπτύσσονται εντός του θύμου νωρίς στην ανάπτυξη και η εξάλειψη τους εντός των πρώτων ημερών γέννησης έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση συστημικής αυτοάνοσης απόκρισης (Bluestone et al., 2003). Είναι σημαντικά για τη διατήρηση της ανοσιακής ανοχής, τη καταπολέμηση των ξένων αντιγόνων και την αναγνώριση αντιγόνων του ίδιου του οργανισμού (Sakaguchi et al., 2007). Στην επιφάνεια τους βρίσκονται διάφοροι δείκτες, όπως CD25, CD127, GITR, CTLA-4, CD71, HLA-DR, CD122, CD132, CD45, CD62L, CD103 που όμως

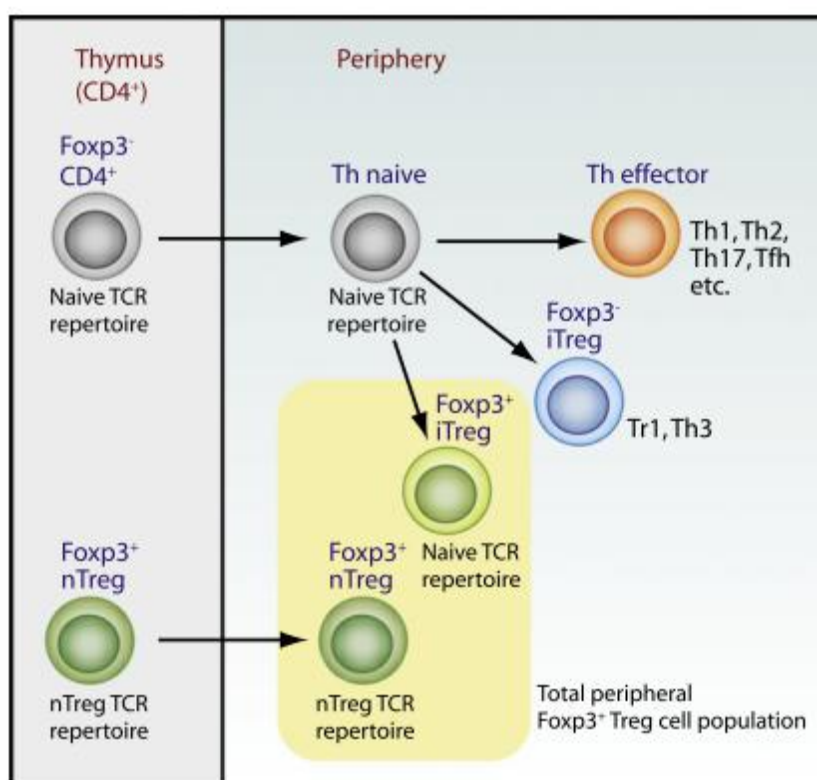
δεν είναι ειδικοί και για αυτό δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση και απομόνωση τους.

- Επαγωγή T ρυθμιστικά κύτταρα

Τα επαγωγή ή προσαρμοσμένα Tregs προέρχονται επίσης από το θύμο αλλά διαφοροποιούνται περαιτέρω στην περιφέρεια όπου αποκτούν κατασταλτικές ιδιότητες ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των ώριμων T κυττάρων όταν εκτίθεται σε αντιγόνο (Leving et al., 2005) (Bluestone & Tang, 2005) (Wang, 2007) (Maggi, 2005).

Τα επαγωγή T ρυθμιστικά κύτταρα μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε Tr1 κύτταρα που παράγουν IL-10, Th3 κύτταρα που εκκρίνουν τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού β (TGF-β), γ / δ T κύτταρα που εκφράζουν τον TCR και CD8 + CD28-T κύτταρα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα Th-2 κύτταρα και NK κύτταρα μπορεί να δρουν και ως ρυθμιστικά, καθώς είναι ικανά να καταστέλλουν την αυτοανοσία σε ορισμένα μοντέλα ποντικού (Osnes et al., 2013) (Toda et al., 2006)

Πρόσφατα, μία κατηγορία T κυττάρων που εκκρίνουν IL-17, τα Th17, περιγράφηκε και η οποία φαίνεται να είναι σημαντική σε αυτοάνοσες νόσους (Osnes, 2013) (Steinman, 2007)



Εικόνα 5: Τα FoxP3 + Treg natural cells διαφοροποιούνται στον θύμο και μεταναστεύουν στην περιφέρεια. Τα επαγωγή Foxp3⁺ Treg (iTreg) κύτταρα διαφοροποιούνται σε δευτερογή λεμφικά όργανα. (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009)

CD4+CD25^{high} ρυθμιστικά T cells

Δεν υπάρχει συγκεκριμένος δείκτης για τα CD4 + CD25^{high} ρυθμιστικά T-κύτταρα. Ο Foxp3 έχει θεωρηθεί ο πλέον αξιόπιστος, αλλά μόνος του δεν μπορεί να είναι ειδικός δείκτης για τα CD4+ CD25^{high} ρυθμιστικά T-κύτταρα του ανθρώπου (Gavin et al., 2006). Ένα άλλο μόριο που σχετίζεται με τα CD4 + CD25^{high} ρυθμιστικά T κύτταρα είναι το CD25, ή εναλλακτικά η α-αλυσίδα του υποδοχέα της IL-2, που εκφράζεται τόσο στα nTreg όσο και στα iTreg. Ωστόσο, το CD25 από μόνο του έχει περιορισμούς ως δείκτης καθώς μπορεί να υπερρυθμίζεται σε ενεργοποιημένα T κύτταρα τελεστές (Milojevic, Nguyen, Wara, & Mellins, 2008).

Ο Liu και συν. ανέφεραν ότι ο υποδοχέας της IL-7 (CD127) είναι ρυθμίζεται προς τα κάτω σε ένα υποσύνολο των CD4 (+) T κύτταρα στο περιφερικό αίμα (Liu W et al., 2006). Ωστόσο, ορισμένα ρυθμιστικά CD4 + T κύτταρα που είναι Foxp3 + CD127^{low} εκφράζουν ελάχιστα έως καθόλου CD25.

Περιγράφηκαν και άλλα μόρια που φαίνονται να συνδέονται με τα CD4 + CD25^{high} ρυθμιστικά T-κύτταρα, όπως το ενδοκυτταρικό αντιγόνο κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων 4 (CTLA-4), GITR (glucocorticoid-induced tumor-necrosis-factor-receptor-related protein), CD69, CD45RA/CD45RO, CD134 (OX40), CD95, και ο PD-L1 (Milojevic et al., 2008).

- FoxP3

Ο Foxp3, (Forkhead/winged helix) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, που εκφράζεται σε υποσύνολα των T λεμφοκυττάρων και παίζει ρόλο στην ανάπτυξη και την λειτουργία των κατασταλτικών φυσικών κυττάρων Treg (Hori, 2003). Τα foxp3 + Treg είναι ικανά να καταστείλουν την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τις διάφορες λειτουργίες, όπως η παραγωγή των κυτταροκινών από δραστικά κύτταρα συμπεριλαμβανομένων των CD4 + και CD8 + T κυττάρων, NK και NK T, B και αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, όπως είναι τα δενδριτικά κύτταρα ή τα μακροφάγα (Miyara et al., 2011).

Εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά σε λεμφικούς ιστούς, και κυρίως στα CD4 κύτταρα, ενώ σχεδόν δεν ανιχνεύεται στα CD8 και B κύτταρα. Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXP3 ανήκει στην οικογένεια των forkhead/winged helix πρωτεϊνών λόγω του χαρακτηριστικού σχηματισμού διχάλας (forkhead) που δημιουργείται στη περιοχή πρόσδεσης του DNA, και είναι μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ελέγχει μια μεγάλη ποικιλία βιολογικών διαδικασιών. Στον άνθρωπο, το γονίδιο εντοπίζεται στο X χρωμόσωμα, και με γενετική χαρτογράφηση η θέση του είναι στο Xp11.23-Xq13.3. Εμφανίζει υψηλό ποσοστό συντήρησης και κωδικοποιεί την παραγωγή της πρωτεΐνης «scurfin», η οποία προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου της ιντερλευκίνης-2 κοντά στη θέση πρόσδεσης του NFAT (Nuclear Factor of Activated Cells). Η πρόσδεση του εκεί προκαλεί καταστολή της έκφρασης του γονιδίου, πιθανώς επειδή εμποδίζει τη πρόσδεση του NFAT και κατά συνέπεια μείωση της παραγωγής ιντερλευκίνης-2 από τα CD4 κύτταρα. Συνολικά, φέρει το C-τελικό άκρο με μορφή διχάλας που αποτελεί τη περιοχή πρόσδεσης του DNA, ένα δακτύλιο ψευδαργύρου, C2H2, ένα τομέα που φέρει το λεγόμενο «φερμουάρ λευκίνης» και ένα N-τελικό άκρο πλούσιο σε προλίνη. Το γονίδιο του FoxP3 αποτελείται από έντεκα εξόνια. Στα εξόνια 1-4 αντιστοιχεί το N-άκρο, στα 4-5 ο δακτύλιος ψευδαργύρου, στο 7 το φερμουάρ λευκίνης και στα τελευταία τρία εξόνια εντοπίζονται οι χαρακτηριστικές διχάλες (forkheads).

Τα Foxp3 + CD4 + Tregs, αποτελούν περίπου το 10% των περιφερικών CD4 + T κυττάρων, και παράγονται από τον θύμο ως υποπληθυσμός των λειτουργικά ώριμων κατασταλτικών T κυττάρων. Μπορούν επίσης να επάγονται από παρθένα T κύτταρα μετά την αντιγονική έκθεση υπό συγκεκριμένες συνθήκες στην περιφέρεια, ειδικά στο έντερο (Yamaguchi, Wing, και Sakaguchi, 2011). Ο κύριος ρόλος τους είναι να μεταναστεύσουν σε θέσεις φλεγμονής και να καταστείλουν διάφορα δραστικά λεμφοκύτταρα, ειδικά υποσύνολα T βοηθητικών κυττάρων όπως τα είναι τα Th1, Th2, Th17, και θυλακιώδη follicular κύτταρα Th (TFH) (Linterman et al, 2011). (Askenasy, Kaminitz, και Yarkoni, 2008).

Ο ρόλος του FOXP3 στην ανοσολογική ομοιόσταση έχει αποδειχθεί από τη μελέτη οικογενειών που εκφράζουν πολύ-οργανικά αυτοάνοσα σύνδρομα. Το FoxP3 γονίδιο, που κωδικοποιεί την λεγόμενη scurfin πρωτεΐνη, εντοπίστηκε για πρώτη φορά ως ένα μεταλλαγμένο γονίδιο στο πιτυρίων στέλεχος ποντικού, το οποίο είναι ένα

φυλοσύνδετο υπολειπόμενο μεταλλαγμένο ποντίκι. Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί σε θνησιμότητα των ετερόζυγων αρσενικών σε 1625 ημέρες μετά τη γέννηση, σε συνδυασμό με πολλαπλασιασμό λεμφοκυττάρων και διήθηση από CD4 + T κυττάρων σε πολλαπλά όργανα με την υπερπαραγωγή κυτταροκινών από αυτά τα κυττάρων (Brunkow , 2001).

Μεταλλάξεις του FOXP3 στον άνθρωπο οδηγούν σε ένα σύνδρομο ανοσολογικής δυσλειτουργίας, πολυενδοκρινοπάθειας, και εντεροπάθειας με φυλοσύνδετη κληρονομικότητα (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy and X-linked inheritance, IPEX Syndrome) (Bennett et al., 2001) (Ohkura, Hamaguchi, & Sakaguchi, 2011). Το σύνδρομο αυτό αφορά συνήθως άνδρες, ενώ οι γυναίκες είναι συνήθως φορείς και εκφράζεται με σακχαρώδη διαβήτη, διάρροια, έκζεμα, υποτροπιάζουσες λοιμώξεις και αιμολυτική αναιμία. Αυτά τα ευρήματα καταδεικνύουν την σημασία του FoxP3 ως ρυθμιστή της nTReg ανάπτυξης και λειτουργίας.

Εκτός από τα φυσικά κύτταρα Foxp3 + Treg, παρθένα T κύτταρα στην περιφέρεια μπορούν επίσης να εκφράσουν Foxp3 και να μετατρέπονται σε κύτταρα Treg με λειτουργική και φαινοτυπική ομοιότητα με τα φυσικά κύτταρα Treg. Τα επαγόμενα Treg (iTreg) μπορεί να προκύψουν ως επακόλουθα του in vitro αντιγονικού ερεθίσματος των ανώριμων T κυττάρων παρουσία του TGF-β (Sakaguchi et al., 2007)

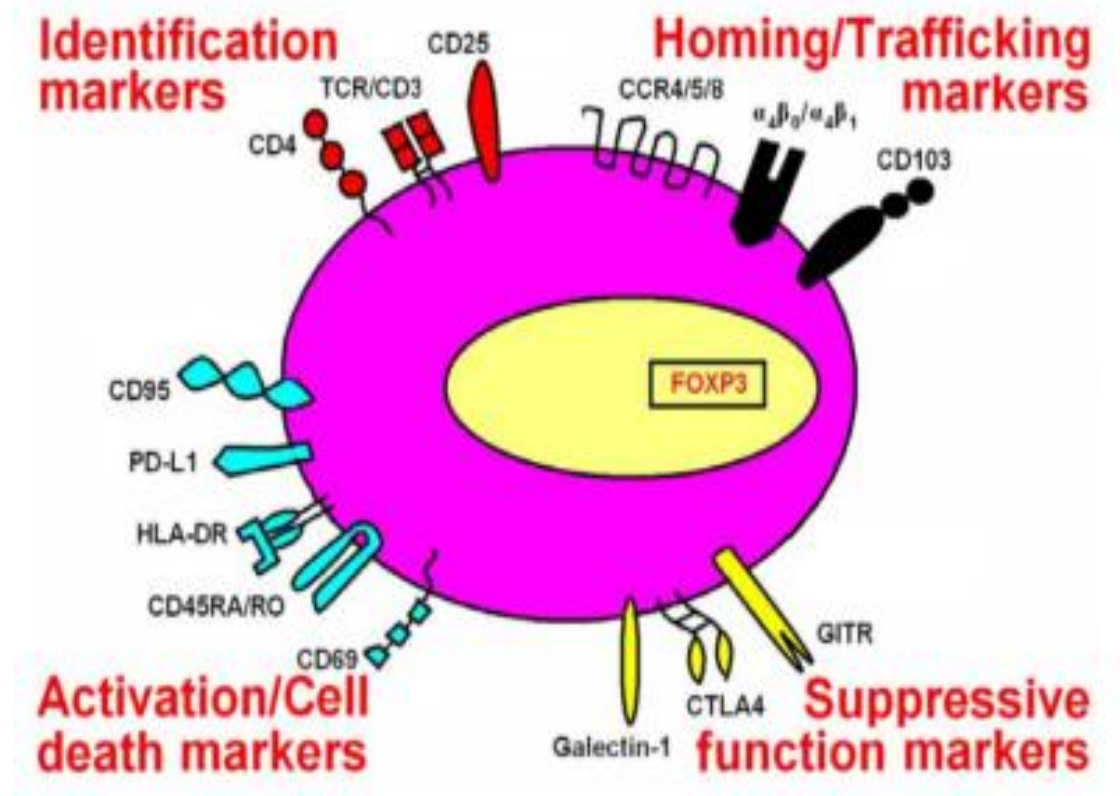
Ωστόσο, η έκφραση του FoxP3 σε ανθρώπινα T κύτταρα δεν ήταν άμεσα συσχετισμένη με τις κατασταλτικές ικανότητες, και το FoxP3 επίσης αποδείχθηκε ότι εκφράζεται σε ενεργοποιημένα μη ρυθμιστικά T-κύτταρα, υποδεικνύοντας ότι δεν αποτελεί μοναδικό δείκτη για τον εντοπισμό των ρυθμιστικών κυττάρων T του ανθρώπου (Vieira, 2004).

Άλλοι δείκτες T ρυθμιστικών κυττάρων

Υψηλά επίπεδα FOXP3 ανευρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα CD4+CD25+ λεμφοκύτταρα του θύμου και στα περιφερικά T λεμφοκύτταρα με αυτό το δείκτη. Στους ποντικούς φαίνεται ο FOXP3 να εκφράζεται αποκλειστικά στα CD4+CD25bright T λεμφοκύτταρα. Ωστόσο στον άνθρωπο ο FOXP3 μπορεί να εκφράζεται και σε ενεργοποιημένα παρθενικά (naïve) CD4+CD25- και CD8 T λεμφοκύτταρα. Επομένως δεν θεωρείται ειδικός δείκτης και η ανεύρεση του στα T λεμφοκύτταρα δεν αποδεικνύει πλήρως το ρυθμιστικό χαρακτήρα των κυττάρων. Ως εκ τούτου, από μόνος του ο FoxP3 δεν μπορεί είναι ένας ειδικός δείκτης για τα CD4 + CD25high ρυθμιστικά T κύτταρα του ανθρώπου (Gavin, 2006).

Για το λόγο αυτό μελετητές σήμερα τον συνδυάζουν με άλλους δείκτες όπως τον CTLA4 (Takahashi,2000), τον GITR (McHugh, 2002), την ιντερλευκίνη 10 και τον TGF-β για την επιβεβαίωση ότι τα υπό μελέτη κύτταρα είναι όντως ρυθμιστικά. Κανένας επιφανειακός σηματοδότης δεν βρέθηκε να διακρίνει οριστικά τα ρυθμιστικά T-κύτταρα από τα συμβατικά, ενεργοποιημένα CD4 + T κύτταρα δεδομένου ότι η πλειοψηφία των προαναφερόμενων επιφανειακών δεικτών εκφράζονται επίσης σε ενεργοποιημένα T κύτταρα.

Το GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor) είναι κύριο μέλος της οικογένειας των υποδοχέων του TNF, και φαίνεται ότι χαρακτηρίζει μία υποομάδα ρυθμιστικών κυττάρων που είναι GITR+/CTLA-4+/CD25- και έχουν τη δυνατότητα να καταστέλλουν αυτοάνοσα νοσήματα. Το CTLA-4 δεν είναι αποκλειστικός μάρτυρας και εντοπίζεται και στα ενεργοποιημένα T κύτταρα (Liu, 2006) (Seddiki, 2006).



Εικόνα 6: Δείκτες CD4⁺CD25⁺ ρυθμιστικών T κυττάρων: **CD25, FOXP3, CTLA-4, CD127** (Milojevic et al., 2008)

Τελικά, η IL-7R (CD127) έχει αναγνωριστεί ως νέος βιοδείκτης για τη διάκριση διάκριση των T ρυθμιστικών κυττάρων. Η ιντερλευκίνη-7 είναι μια κυτταροκίνη με βασικό ρόλο στην επιβίωση και τη διατήρηση της ομοιόστασης τόσο των CD4 όσο και των CD8 κυττάρων. Εν αντιθέσει με τους υπόλοιπους δείκτες, ο CD127 μπορεί να συμβάλλει στη ταυτοποίηση τους καθώς εντοπίζεται σε μηδενικά ή πολύ χαμηλά ποσοστά. Αντίστοιχα με το CD25, μπορεί να γίνει διαχωρισμός με βάση το CD127 των κυττάρων σε CD127^{high} και CD127^{dim}. Ο μεταγραφικός παράγοντας FoxP3 προσδένεται στον υποκινητή του CD127 και με αυτόν τον τρόπο καταστέλλει την έκφραση του. Η πρόσφατη ανακάλυψη της χαμηλής έκφρασης του CD127 (α υποδοχέας IL-7) σε CD4 + CD25^{high} ρυθμιστικών T κυττάρων, παρέχει περαιτέρω οριοθέτηση αυτού του πληθυσμού. Τα ρυθμιστικά T-κύτταρα ρυθμίζουν προς τα κάτω την έκφραση των CD127 και η έκφρασή του συσχετίζεται αντίστροφα με την έκφραση του FoxP3 και την κατασταλτική λειτουργία. Έτσι, αυτός ο δείκτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να απομονώσει ένα άκρως καθαρισμένο πληθυσμό των ρυθμιστικών κυττάρων T μέσω της διαλογής κυττάρων και να διευκολύνει τη

ταυτοποίηση των ρυθμιστικών κυττάρων σε συνδυασμό όμως πάντα με τη χρήση των υπόλοιπων δεικτών.

Επιπλέον, πρόσφατες εκθέσεις έχουν προσδιορίσει τον υποδοχέα φολικού 4 (FR4) (Yamaguchi, 2011) και ectonucleotidase CD39 (Mandapathil, 2009) ως μοναδικούς δείκτες κυτταρικής επιφάνειας που διακρίνουν τα nTRegs από τελεστικά T κύτταρα. Επιπλέον, μια πρόσφατη δημοσίευση υποστήριξε ότι η λανθάνουσα κατάσταση πεπτιδίου που σχετίζεται με (LAP) και IL-1 υποδοχέα τύπου I (CD121a) και Τύπου II (CD121b) εκφράζεται επιλεκτικά σε ενεργοποιημένα FoxP3 + T ρυθμιστικά T-κύτταρα αλλά όχι σε FoxP3 + μη ρυθμιστικά T-κύτταρα (Tran, 2009). Αυτές οι μελέτες μπορούν να συμβάλλουν στο σχεδιασμό στρατηγικών για τη διαλογή των λειτουργικά ενεργών nTRegs.

Ρυθμιστικά T κύτταρα τύπου 1 (Regulatory T cells type 1 (Tr1))

Τα T ρυθμιστικά κύτταρα τύπου 1 (Regulatory T cells type –Tr1) δεν εκφράζουν υψηλά επίπεδα CD25 ή Foxp3. Τα κύτταρα αυτά φαίνεται ότι εμπλέκονται στην εκδήλωση διαφόρων ασθενειών και διαδραματίζουν έναν βασικό ρόλο στη ανοσοαπόκριση τόσο σε ποντικούς όσο και σε ανθρώπους (Roncarolo et al., 2006). Περιγράφηκαν για πρώτη φορά σε ασθενείς με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (SCID), που είχαν μεταμοσχευθεί επιτυχώς με αλλογενή αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs).

Τα Tr1 κύτταρα έχουν δειχθεί ότι ρυθμίζουν προς τα κάτω ανοσοαποκρίσεις μέσω της παραγωγής των ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών IL-10 και TGF-β. Τα κύτταρα Tr1 διατηρούν την περιφερική ανοχή, συμμετέχουν στον έλεγχο της αυτοανοσίας, και στην πρόληψη της απόρριψης μοσχεύματος έναντι ξενιστή (GVHD). Επίσης χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα έκκρισης τους TGF-β και, όπως και FoxP3 + Tregs, από την ικανότητα τους να καταστέλλουν το ανοσοποιητικό και αυτοάνοσες αποκρίσεις. Στους ανθρώπους, τα κύτταρα Tr1 περιγράφηκαν για πρώτη φορά σε ασθενείς με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (SCID), οι οποίοι είχαν αναπτύξει μακροχρόνια ανοχή σε αλλογενή βλαστικά κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα κύτταρα θα μπορούσαν να ρυθμίζουν τις ανοσοαποκρίσεις (Bacchetta et al., 1994).

Τα κύτταρα Tr1, κατόπιν της ενεργοποίησης μέσω του TCR υποδοχέα, παράγουν υψηλές ποσότητες IL-10, αλλά είναι διακριτές από τα κύτταρα Th2, δεδομένου ότι δεν παράγουν IL-4, και παράγουν πολύ χαμηλά επίπεδα της IL-2 (Battaglia, Gregori, Bacchetta, και Roncarolo, 2006).

Τα Tr1 προκύπτουν στην περιφέρεια μετά από ενεργοποίηση των παρθένων/φυσικών T κυττάρων με αντιγόνο παρουσία IL-10, και ενεργούν ως ρυθμιστές της ανοσιακής απόκρισης με την καταστολή των κυττάρων T (Shalev et al., 2012).

Κύτταρα Tr1 έχουν επίσης εντοπιστεί σε διάφορους ιστούς κατά τη διάρκεια της αυτοάνοσης φλεγμονής, όπως για παράδειγμα στο έντερο, έχοντας πιθανόν να προστατευτικό ρόλο κατά της κολίτιδας (Pot, Apetoh, και Kuchroo, 2011). Η IL-27, ένα μέλος της οικογένειας της IL-12, έχει ταυτοποιηθεί ως παράγοντας διαφοροποίησης για τα κύτταρα Tr1 (Pot et al, 2011).

T βοηθητικά τύπου 3 (T helper 3 (Th3))

Τα T βοηθητικά τύπου 3 εκφράζουν τον TGF-β. Τα Th3 πιστεύεται ότι είναι σημαντικά στην επαγωγή και διατήρηση ανοχής έναντι μη παθογόνων βακτηρίων. Τα κύτταρα Th3 ενεργοποιούνται έναντι ειδικών αντιγόνων, και μέσω της απελευθέρωσης του TGF-β, καταστέλλουν και ρυθμίζουν προς τα κάτω, τόσο τα κύτταρα Th1 και Th2 και παρέχουν βοήθεια στα B κύτταρα για την παραγωγή IgA αντισωμάτων (Shalev et al., 2012).

CD8+ regulatory T cells

Υπάρχουν διάφοροι τύποι των CD8 + T κυττάρων με ρυθμιστική ή κατασταλτική λειτουργία, που είτε παράγονται φυσικά στον θύμο είτε στην περιφέρεια έναντι ξένων ή αυτο-αντιγόνων. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα CD8 + CD25 + ανθρώπινα θυμοκύτταρα μοιράζονται παρόμοια φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά με τα ρυθμιστικά CD4 + CD25 + T κύτταρα. Τα CD8 + CD25 + κύτταρα, εκφράζουν υψηλά επίπεδα του Foxp3, του glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (GITR), CCR8, του tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2), and cytotoxic T-

lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) (Cosmi et al., 2003). Μετά την ενεργοποίηση, τα κύτταρα αυτά δεν παράγουν κυτταροκίνες, αλλά εκφράζουν στην επιφάνεια τους TGF- β και CTLA-4 (Shalev et al., 2012).

Double negative T cells (DN)

Σε τρωκτικά τα CD4-CD8-CD3 + ρυθμιστικά T κύτταρα (Treg DN) αποτελούν το 1-3% των περιφερικών T κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα Treg DN εκφράζουν ένα μοναδικό σύνολο δεικτών κυτταρικής επιφάνειας, συμπεριλαμβανομένου του TCR $\alpha\beta$, CD25, LFA-1, CD69, CD45, CD30, CD62L και CTLA-4. Τα ενεργοποιημένα κύτταρα DN Treg χαρακτηρίζονται από την παραγωγή αυξημένης ποσότητας IFN- γ , TNF- α και χαμηλά επίπεδα του TGF- β . Κύτταρα Treg DN μπορεί να καταστείλουν τις CD4 + και CD8 + ανοσοαποκρίσεις in vitro και in vivo. Τα κύτταρα αυτά δρουν απευθείας στα δραστικά T κύτταρα με ένα αντιγονοειδικό τρόπο antigen-specific μέσω μιας διαδικασίας που απαιτεί επαφή κυττάρου-προς-κύτταρο.

Τα κύτταρα DN έχουν επίσης ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο και αποτελούν το 1-2% του συνόλου των CD3 + T κυττάρων στο αίμα και τους λεμφαδένες των υγιών ατόμων. Παρόμοια με τα κύτταρα σε ποντικούς, τα ενεργοποιημένα ανθρώπινα κύτταρα Treg DN παράγουν υψηλά επίπεδα της IFN- γ , αλλά όχι IL-2 και πολύ χαμηλά επίπεδα της IL-10 και IL-4. Τα ανθρώπινα κύτταρα Treg DN φαίνεται να εμφανίζουν παρόμοιες λειτουργικές ιδιότητες όπως τα κύτταρα DN Treg του ποντικού (Shalev et al., 2012).

Ρυθμιστικά T κύτταρα και σύνδρομο Sjogren

Το ποσοστό των κυκλοφορούντων ρυθμιστικών κυττάρων σε πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren διαφοροποιείται στα αποτελέσματα διαφόρων μελετών καθώς έχουν αναφερθεί μειωμένα (Liu, 2008) (Li, 2007), φυσιολογικά (Christodoulou, 2007)(Sarigul, 2010), ή αυξημένα επίπεδα (Gottenberg, 2005). Σε όλες τις μελέτες που ανέλυσαν την κατασταλτική λειτουργία των Treg in vitro, φάνηκε ότι η καταστολή παρέμεινε αμετάβλητη (Miyara, 2011).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Gottenberg και συν., φάνηκε ότι τα επίπεδα των CD4 CD25^{high} T κυττάρων αυξήθηκαν σε ασθενείς με πρωτοπαθές ΣΣ.

Ωστόσο αυτή η αύξηση θα πρέπει να ερμηνεύεται με προσοχή, δεδομένου ότι τα CD4 CD25^{high} ρυθμιστικά T-κύτταρα θα μπορούσαν να έχουν μολυνθεί από πρόσφατα ενεργοποιημένα T κύτταρα σε ένα ορισμένο βαθμό. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της μελέτης απέδειξαν για πρώτη φορά ότι τα κύτταρα CD4 CD25^{high} αυξάνουν με την ηλικία. Ο ρόλος των κυττάρων αυτών, διερευνήθηκε σε μόνο μερικά αυτοάνοσα νοσήματα, συμπεριλαμβανομένου του συστηματικού ερυθματώδους λύκου, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (RA), της νεανικής ιδιοπαθούς αρθρίτιδας, της σκλήρυνσης κατά πλάκας και του διαβήτη τύπου 1 (Crispin , 2003) (Boyer , 2004) (Cao,2003) (Kukreja, 2002). Αυτά τα αποτελέσματα για το πρωτοπαθές ΣΣ είναι παρόμοια με εκείνα που δημοσιεύθηκαν όσον αφορά ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, στους οποίους παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό λειτουργικών CD4 CD25 T κυττάρων στο περιφερικό αίμα, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Van Amelsfort, 2004).

Εναλλακτικά, η αυξημένη αναλογία στο αίμα των λειτουργικών κυττάρων CD4CD25^{high} θα μπορούσε να αποτελέσει μια αντίδραση για τον περιορισμό της φλεγμονής, η οποία δεν είναι αρκετά αποτελεσματική για την πρόληψη της εν εξελίξει αυτοάνοσης πάθησης. Έτσι, μια μικρή αλλά όχι σημαντική αύξηση των CD4 CD25^{high} κυττάρων παρατηρήθηκε σε ασθενείς με πιο ενεργό νόσο (με εξωαδενική συμμετοχή, ή αντι-SSA / SSB), καθώς και σε λίγους ασθενείς με πιο σοβαρή νόσο, υπό ανοσοκατασταλτική θεραπεία (πρεδνιζόνη και / ή μεθοτρεξάτη).

Η αύξηση των κυττάρων CD4 CD25^{high} θα μπορούσε επίσης να είναι ανεπαρκής από άποψη χρόνου. Κύτταρα CD4CD25^{high} παρόντα κατά την έναρξη της αυτοάνοσης διεργασίας, θα μπορούσαν να είναι πιο αποτελεσματικά στην ρύθμιση της αυτοάνοσης διεργασίας, ενώ μια χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση μπορεί να είναι δύσκολο να τροποποιηθεί με ρυθμιστικά T-κύτταρα.

Μια ακόμη υπόθεση είναι ότι τα κύτταρα CD4 CD25^{high} ίσως έχουν ένα αιτιολογικό ρόλο στην ανάπτυξη του ΣΣ. Πράγματι, χρόνια διέγερση από αυτο-ή εξωγενή αντιγόνα οδηγεί σε κλωνική επέκταση των B κυττάρων, τα οποία μπορεί τελικά να οδηγήσουν σε λέμφωμα B κυττάρων σε έως και 5% των ασθενών (Gasparotto,2003)

Τα ρυθμιστικά T-Κύτταρα θα μπορούσαν να καταστείλουν τον προστατευτικό πολυκλωνικό ρόλο των T λεμφοκυτταρικών διηθήσεων που παρατηρούνται στα

όργανα στόχους των ασθενών με PSS, και να επιτρέπουν την διαφυγή των κλώνων λεμφοειδών B κύτταρων από ανοσολογική επιτήρηση και κάθαρση. Πολύ πρόσφατα, το λέμφωμα Hodgkin με διηθούντα λεμφοκύτταρα αναφέρθηκε να είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένο για ρυθμιστικά T-κύτταρα (Gottenberg , 2005) (Marshall 2004).

Σε άλλη μελέτη φάνηκε ότι τα κύτταρα FoxP3 + Treg είναι αυξημένα στους σιελογόνους αδένες ασθενών με πρωτοπαθές ΣΣ, και αυτή η αύξηση FoxP3+T κυττάρων συσχετίζεται με την καταστροφή στους σιελογόνους αδένες (Sarigul, 2010).

Τα κύτταρα Treg είναι αυξημένα σε ιστούς στόχους του ΣΣ όπως και σε άλλες αυτοάνοσες διαταραχές π.χ. PA (Cao, 2003), ελκώδη κολίτιδα (Yu, 2007) , νεανική ιδιοπαθή αρθρίτιδα, ψωρίαση. Οι Χριστοδούλου και συν., ανέφεραν ότι η συχνότητα των κυττάρων FoxP3 + Treg στους ελάσσονες σιελογόνους αδένες των ασθενών με πρωτοπαθές ΣΣ συσχετίζονται με τον βαθμό φλεγμονής (Christodoulou, 2008) .

Σε αντίθεση με αυτή τη μελέτη, μελέτες που διεξάγονται από τους Li και συνεργάτες, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα CD4+CD25+FoxP3+T κύτταρα και CD4+CD25+T κύτταρα μειώθηκαν στους σιελογόνους αδένες (Li, 2007), και ότι T κύτταρα CD25-FoxP3- απουσίαζαν παντελώς από δείγματα που ελήφθησαν από υγιείς ομάδες ελέγχου. Οι Miyara και συν., έχουν επίσης αναφερθεί ότι η έκφραση FoxP3 δεν είναι σημαντικά αυξημένη στους νεφρούς των ασθενών με συστηματικό ερυθρεματώδη λύκο (SLE) σε σύγκριση με το τους νεφρούς υγιών μαρτύρων (Miyara, 2005). Σε αντίθεση, μια σημαντική μείωση του αριθμού των κυττάρων FoxP3 + Treg σε βλάβες του δερματικού ερυθρεματώδους λύκου έχουν παρατηρηθεί, ενώ οι ασθενείς με πρωτοπαθή χολική κίρρωση βρέθηκαν επίσης να έχουν λιγότερα FoxP3 + κύτταρα σε σύγκριση με ασθενείς που έπασχαν από άλλες αιτίες της ηπατίτιδας (Lan, 2006).

Σε μελέτη των Szodoray και συν, βρέθηκαν μειωμένα ποσοστά CD4+CD25+Treg κυττάρων σε ασθενείς με πρωτοπαθές ΣΣ, και πιθανώς λόγω αυτής της μείωσης δεν καταστέλλονται επαρκώς οι αυτοάνοσες διεργασίες. Είναι ενδιαφέρον, ότι σημαντικά αυξημένα επίπεδα των κυττάρων CD4 + CD25 + Treg βρέθηκαν σε ασθενείς με εξωαδενικές εκδηλώσεις, σε σχέση με ασθενείς χωρίς εξωαδενικές εκδηλώσεις. Παρ'όλα αυτά, τα επίπεδα τους ήταν σημαντικά χαμηλότερα από τα αντίστοιχα της

ομάδας ελέγχου και τα αποτελέσματά αυτά δείχνουν ότι οι ποσοτικές αλλαγές των κυττάρων CD4 + CD25 + Treg διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτυχία της ανοσορύθμισης, η οποία τελικά οδηγεί στη διαίωνιση της νόσου.

B κύτταρα

Αμφότερα τα T κύτταρα και τα B κύτταρα παίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη του πρωτοπαθούς ΣΣ. Κατά τα τελευταία χρόνια ο ρόλος των ρυθμιστικών T κυττάρων έχει ευρέως μελετηθεί. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των αυτοάνοσων ασθενειών με την ικανότητά τους να καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων (Wahren-Herlenius & Dörner, 2013). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η κατανόηση του ρόλου του B λεμφοκυττάρου για την ανάπτυξη του ΣΣ, καθώς τα μέχρι στιγμής επιστημονικά δεδομένα δείχνουν ότι οι διαταραχές στην ομοιόσταση των B λεμφοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του ρόλου τους στον σχηματισμό έκτοπων βλαστικών κέντρων στους δακρυϊκούς και σιελογόνους αδένες, είναι σημαντικά χαρακτηριστικά του ΣΣ (Nguyen & Ammon, 2009).

Παθοφυσιολογία

Η υπερδραστηριότητα των B κυττάρων είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα του πρωτοπαθούς ΣΣ και αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί σε υπεργαμμοσφαιριναιμία, σε παραγωγή αυτοαντιδραστικών αντισωμάτων, και σε μονοκλωνική επέκταση των B κυττάρων που μπορούν να οδηγήσουν σε B λέμφωμα σε ένα υποσύνολο των ασθενών (Cornec et al., 2012). Τα αυξημένα επίπεδα της IgA είναι ένα συχνό εύρημα σε πΣΣ, και συσχετίζονται με μη φυσιολογική βιοψία σιελογόνων αδένων (Cornec et al., 2012).

Τα B-κύτταρα συμμετέχουν στην λεμφοκυτταρική διήθηση των σιελογόνων αδένων σε ασθενείς με πΣΣ, και σχηματίζουν έκτοπα βλαστικά κέντρα που δείχνουν την ενεργοποίηση των B-κυττάρων, και μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση κακοήθους B λεμφώματος τύπου MALT σε περίπου 5% των ασθενών. Οι Theander και συν. έδειξαν ότι η παρουσία δομών βλαστικού κέντρου, είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη του MALT λεμφώματος. Η θεραπεία έναντι των B

κυττάρων με αντιδραστήρια αντι-CD20, φαίνεται να είναι μια αποτελεσματική μέθοδος θεραπείας για τη θεραπεία του πΣΣ (Abdulahad, Kroese, Vissink, και Bootsma, 2012)

Υποτύποι B κυττάρων και ρυθμιστικών B κυττάρων

Στις αμυγδαλές του ανθρώπου, ανευρίσκονται περίπου επτά τύποι B κυττάρων που ταυτοποιούνται με βάση την έκφραση του CD38 και της IgD, που οδήγησε στην πρόταση για μια T κύτταρο-εξαρτώμενη διαφοροποίηση των ώριμων B κυττάρων (Cornec et al., 2012). Στο αίμα των ασθενών εμφανίζονται διαταραχές στην κατανομή τους και μια αύξηση στα επίπεδα του Bm2/Bm2' (naïve mature B (Bm) cells) κυττάρων, και μείωση των eBm5/Bm5., που φαίνονται να είναι ειδικές για το πΣΣ καθώς δεν εμφανίζονται σε PA και ΣΕΛ (Binard et al., 2009)

Σε ιστούς στόχους, τα μνημονικά B κύτταρα αθροίζονται σε σιελογόνους αδένες πιθανόν λόγω της υπέρμετρης έκφρασης του CD6 στα μνημονικά B κύτταρα και της μετανάστευσης τους στον προσδέτη CD166 που εκφράζεται σε υψηλό ποσοστό στα επιθηλιακά κύτταρα των σιελογόνων αδένων στους ασθενείς (Alonso et al., 2010) (Cornec et al., 2012).

Τα ρυθμιστικά B κύτταρα ή αλλιώς τα Bregs μελετήθηκαν για πρώτη φορά στα ποντίκια. Παρόλο που δεν έχει περιγραφεί ακόμη συγκεκριμένος φαινότυπος στους ανθρώπους, τα B ρυθμιστικά κύτταρα φαίνεται να συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των T και δενδριτικών κυττάρων (Cornec et al., 2012). Στο περιφερικό αίμα των ασθενών με π ΣΣ, έχει παρατηρηθεί μια αύξηση των πληθυσμών των Breg (Cornec, Jamin, & Pers, 2014).

Η αύξηση των επιπέδων της ανοσοσφαιρίνης A είναι ένα συνηθισμένο εύρημα σε ΣΣ. Επίσης υπάρχει συσχέτιση των ανοσοσυμπλεγμάτων που περιέχουν IgA και της λεμφοκυτταρικής διήθησης των ελάσσονων σιελογόνων αδένων των ασθενών με ΣΣ (Basset, Pers, Youinou, & Pennec, n.d.)

BAFF and APRIL

Έχουν αναφερθεί αυξημένα επίπεδα των παραγόντων ενεργοποίησης των B κυττάρων, BAFF (BLyS) (παράγοντα ενεργοποίησης των B κυττάρων της οικογένειας TNF) και του APRIL, στους σιελογόνους και των δακρυϊκούς αδένες, αντίστοιχα. Ο BAFF προστατεύει τα B κύτταρα από την απόπτωση και αυξημένα επίπεδα του μπορούν να βρεθούν στον ορό των ασθενών με αυτοάνοσες παθήσεις. (Mackay F et al., 2003). Ο APRIL, συμμετέχει στην ενεργοποίηση των B-κυττάρων. Ο APRIL και ο BAFF έχουν δύο κοινούς υποδοχείς: το αντιγόνο ωρίμανσης B κυττάρων (BCMA) και τον TACI (transmembrane activator calcium modulator and cyclophilin ligand interactor) (Cornec et al., 2012).

Ο BAFF είναι ένας τύπος διαμεμβρανικής πρωτεΐνης τύπου I που μπορεί να διασπαστεί από μια κονβερτάση φουρίνης για να παραχθεί ένα 17-kDa διαλυτής μορφής. Η βιολογικώς δραστική μορφή του BAFF είναι τριμερής, αλλά 20 τριμερή μπορούν επίσης να συνδεθούν για να σχηματίσουν μια δομή 60-μερών (Youinou & Pers, 2011). Υπάρχει σε δυο μορφές, μια δεσμευτική της μεμβράνης και μια εκκρινόμενη μορφή. Ο BAFF συνδέεται ειδικά με τον υποδοχέα BAFF 3 (BR3) και παράγεται κυρίως από μακροφάγα, δένδριτικά κύτταρα, και από επιθηλιακά κύτταρα και ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα (Cornec et al., 2012).

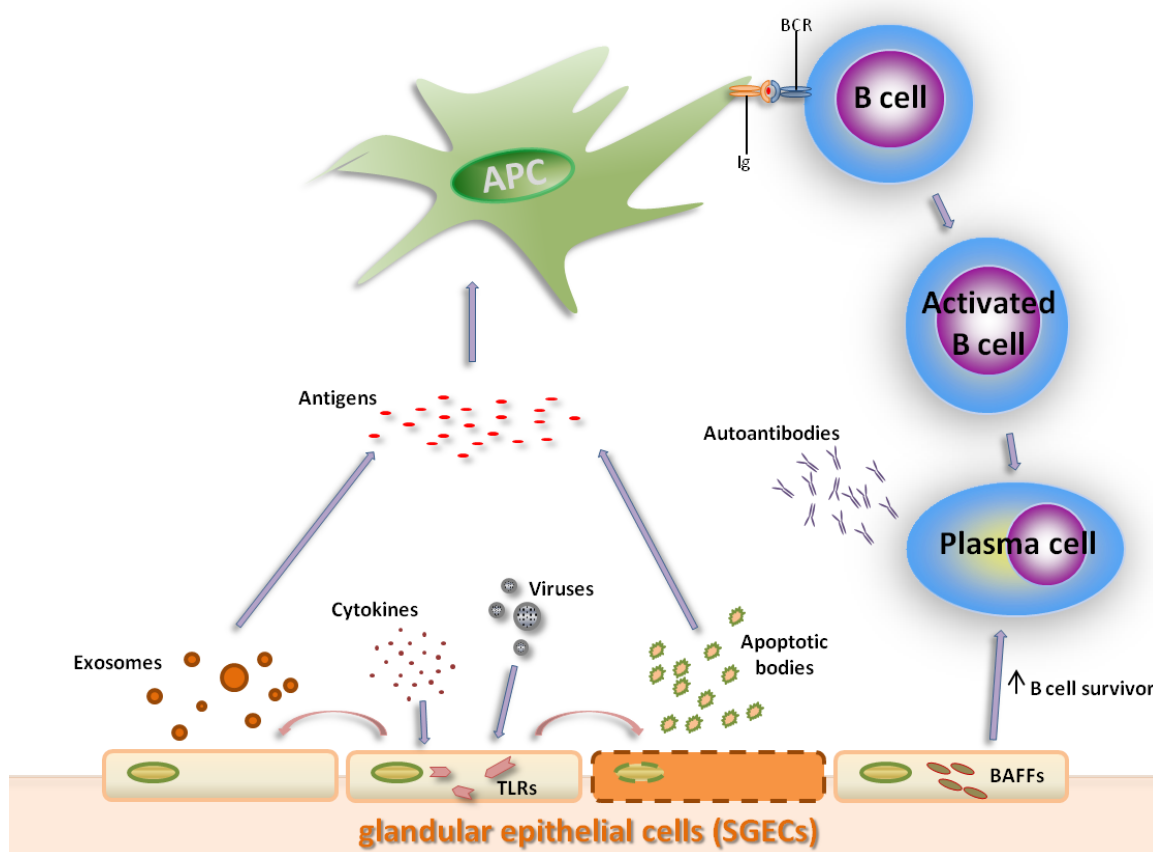
Ο BAFF υπερεκφράζεται σε πΣΣ και σε άλλες συστηματικές αυτοάνοσες νόσους, και τα επίπεδα του BAFF στον ορό συσχετίζονται με αυτο-αντισώματα σε ασθενείς με πΣΣ. Επίσης είναι αυξημένα στους σιελογόνους αδένες, στο σίελο και στον ορό των ασθενών με Sjogren. (Nikolov & Illei, 2009)

Η υπερδραστηριότητα των B-κυττάρων μπορεί να εξαρτάται από τον BAFF, που ρυθμίζεται αυξητικά από ιντερφερόνες τύπου I (IFN α / β) (Abdulahad et al., 2012).

Η έκφραση του υποδοχέα BAFF (BAFF-R) μειώνεται σε B και T κύτταρα στο σύνδρομο Sjogren χωρίς διαφορά μεταξύ παρθενικών και μνημονικών B κυττάρων και συσχετίζεται με τα επίπεδα BAFF (Nikolov & Illei, 2009). Οι Lahiri και συν. απέδειξαν ότι ο BR3 συμμετέχει στην επιβίωση των επιθηλιακών κυττάρων

καλλιέργειας χάρη στην αυτοκρινή επίδραση του BAFF και πρότειναν επίσης ότι τα επιθηλιακά κύτταρα παράγουν διαφορετικές μορφές του BAFF και ότι μόνο μερικά από αυτά είναι υπεύθυνα για αυτό το αποτέλεσμα (Lahiri et al., 2014).

Η θεραπεία εξάλειψης των B-κυττάρων σε ασθενείς με πΣΣ, με αντι-CD20 αντιδραστήρια, φαίνεται ότι μπορεί να αποτελέσει πιθανή μέθοδο θεραπείας (Abdulahad et al., 2012) (Cornec et al., 2012).



Εικόνα 7: Προτεινόμενο μοντέλο για την ανάπτυξη και τη ρύθμιση της αυτοανοσίας στο ΣΣ. Αρχικά το σύνδρομο Sjorgen ενεργοποιείται από έναν ιό ή άλλα σήματα επαγωγής απόπτωσης, όπως οι κυτταροκίνες οδηγώντας σε φλεγμονή των αδενικών επιθηλιακών κυττάρων (SGECs) που εκφράζουν ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες (*Kyriakidis et al* et al. 2013). Η παρουσίαση αυτοαντιγόνου και η υπερπαραγωγή του BAFF από APCs και τα επιθηλιακά κύτταρα διεγείρουν τα B και T-κύτταρα ((Low & Witte, 2011). Αυτή η διέγερση οδηγεί στην ενεργοποίηση των B-κυττάρων τα οποία διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα που παράγουν αυτοαντισώματα (Παναγούλιας Ιωάννη, Τμήμα Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών)

Αυτοαντισώματα

Όπως προαναφέρθηκε πολλές πρόσφατες μελέτες τα τελευταία χρόνια, αποκάλυψαν ένα σημαντικό ρόλο για τα B κύτταρα στο ΣΣ. Σε ΣΣ υπάρχει υπερδραστηριότητα των B κυττάρων, και εκδηλώνεται με άφθονη παραγωγή αυτοαντισωμάτων και σοβαρή υπεργαμματοσφαιριναιμία (Kramer, Holodick, Vizconde, & Rothstein, 2013).

Τα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) ανευρίσκονται στον ορό στο 59-85% των ασθενών. Έχειδειχθεί ότι οι ασθενείς θετικοί για ANA είναι συχνότερα γυναίκες, με μικρότερο μέσο όρο ηλικίας κατά την στιγμή της διάγνωσης και μια αυξημένη συχνότητα εξωαδενικών εκδηλώσεων (Bournia et al., 2012)

Τα αυτοαντισώματα σε ΣΣ κατευθύνονται έναντι των ενδοκυττάρων αντιγόνων La / SSB, Ro52/TRIM21 και Ro60/TROVE2, που είναι τμήματα των συμπλόκων ριβονουκλεοπρωτεϊνών-RNA (Nardi et al., 2006). Η ανίχνευση των αυτοαντιδραστικών αντισωμάτων έναντι αυτών των αντιγόνων είναι σημαντική για τον καθορισμό της πρόγνωσης, την ταξινόμηση και τη διάγνωση των αυτοάνοσων διαταραχών. Τα επιθηλιακά κύτταρα μπορεί να παίζουν ρόλο στην έναρξη και ρύθμιση των αυτοάνοσων αποκρίσεων και μπορεί επίσης να εμπλέκονται σε αυτοάνοσες αντιδράσεις έναντι Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 και La / SSB αυτοαντιγόνων (Oke & Wahren-Herlenius, 2012).

Τα anti-Ro/SSA αντισώματα αντιπροσωπεύουν δύο διαφορετικά υποσύνολα των αυτοαντισωμάτων που αντιδρούν με δύο μη ομόλογες πρωτεΐνες, το Ro52 / TRIM21 (OKE & Wahren-Herlenius, 2012), και Ro60/TROVE2. Το Ro52 είναι ένας κοινός στόχος των κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων σε αυτοάνοσες νόσους και τα αντισώματα έναντι του Ro52 συνδέονται με ξεχωριστές κλινικές εκδηλώσεις. Ο Ro52, είναι μέλος της οικογένειας τριμερών πρωτεϊνών (TRIM), που συμβολίζεται επίσης με TRIM21, και περιέχει ένα δαχτυλίδι και ένα μοτίβο B-box, που ακολουθείται από μια περιοχή διπλής ελίκωσης και μια B30.2 (ή PRYSPRY) περιοχή στο C-τελικό άκρο. Τα αντι-Ro52 είναι τα πιο συνηθισμένα σε ασθενείς με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren (66,7%) και συχνά συν-εμφανίζονται με Ro60 και La,

που είναι λιγότερο συχνές (52,1% και 49%, αντίστοιχα) (Oke & Wahren-Herlenius, 2012).

Τα La / SSB είναι RNA πρωτεΐνη σύνδεσης, που εμπλέκεται στο μεταβολισμό του RNA και στη ρύθμιση της έκφρασης των μικρο-RNAs (miRNAs) (Oke & Wahren-Herlenius, 2012)

Τα αντισώματα έναντι του κεντρομεριδίου (ACA) βρίσκονται στο 4-17% των ασθενών με ΣΣ συσχετίζονται με μεγαλύτερη βλάβη των σιελογόνων και δακρυικών αδένων και πιθανόν θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμο δείκτη για το ΣΣ. Οι ασθενείς με θετικά ACA μπορούν να εμφανίζουν χαρακτηριστικά επικάλυψης μεταξύ του ΣΣ και της σκλήρυνσης (SSC) (Bournia et al., 2012).

Επιπροσθέτως αυτοαντισώματα έναντι των κυκλικών κιτρολινωμένων πεπτιδίων (αντι-CCP), έχουν αποδειχθεί ότι είναι ένα ειδικός δείκτης για τη διάγνωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, αλλά μπορούν επίσης να βρεθούν σε ασθενείς με ΣΣ σε ποσοστό μεταξύ 3-10% (Kyriakidis, Kapsogeorgou, & Tzioufas, 2013).

Τα αντι-μιτοχονδριακά αντισώματα (AMA), θεωρούνται σημαντικοί δείκτες για την διάγνωση της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης (PBC) με επικράτηση του AMA περισσότερο από 90%. Σε ασθενείς με ΣΣ ανευρίσκονται σε ποσοστό μεταξύ 1,7 έως 13% ή ακόμη και 3-27%, ανάλογα με τη διαγνωστική μέθοδο που χρησιμοποιείται (Selmi et al., 2012) (Bogdanos & Komorowski, 2011).

Αντισώματα έναντι λείων μυικών κυττάρων (ASMA) μπορούν να βρεθούν σε ΣΣ σε ποσοστό έως 33%. Θετικά ASMA και θετικά ANA, δηλώνουν αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1 (Manthorpe, Permin, & Tage-Jensen, 1979). Ο ρόλος αυτών των αντισωμάτων στο ΣΣ εξακολουθεί να είναι υπό διερεύνηση (Kyriakidis et al., 2013).

Ο ρευματοειδής παράγοντας είναι αντίσωμα που κατευθύνεται έναντι του τμήματος Fc της ανοσοσφαιρίνης IgG. Τα επίπεδα RF βρέθηκαν αυξημένα σε 36-74% των ασθενών με πΣΣ και σε αρκετές μελέτες συσχετίζεται με εξωαδενικές εκδηλώσεις και ένα ενεργό ανοσολογικό προφίλ (Bournia et al., 2012)

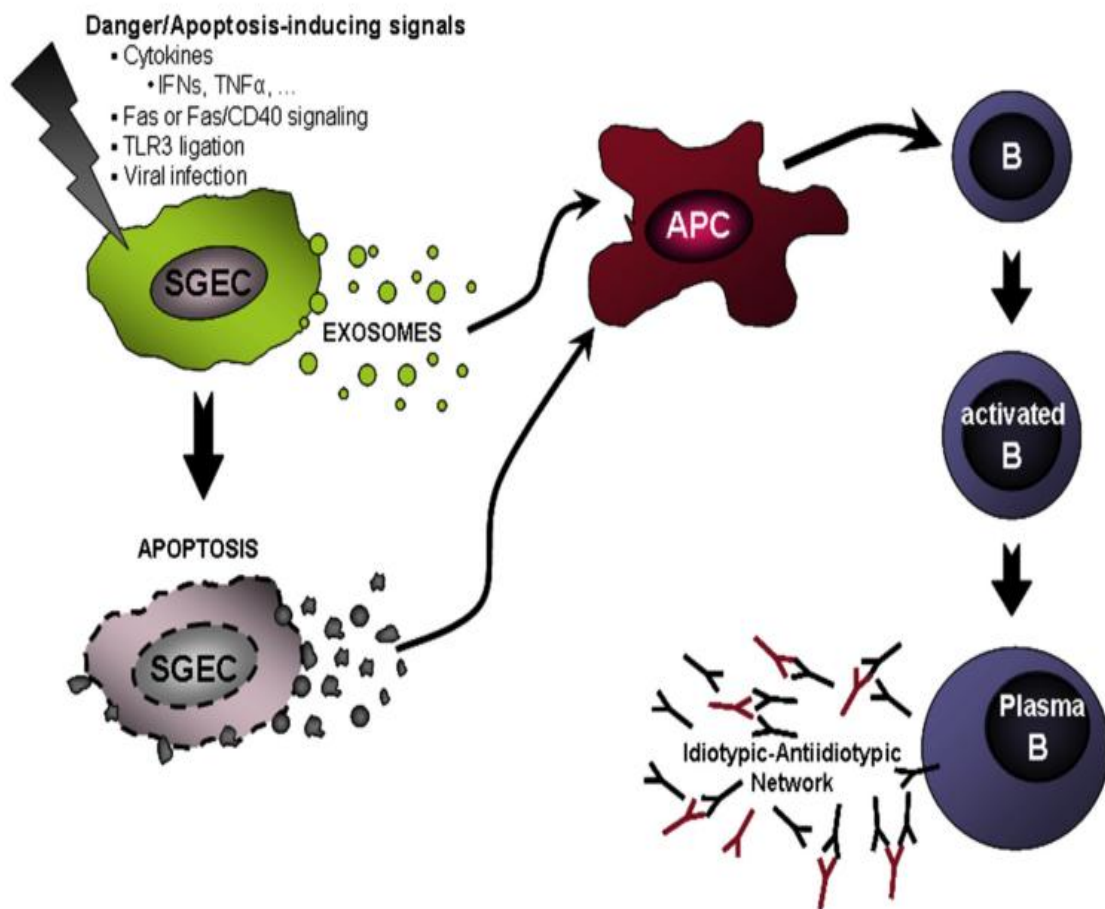
Οι κρυοσφαιρίνες βρίσκονται στο 9-15% των ασθενών με πΣΣ και έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης μη-Hodgkin λέμφωματος. Η ανεύρεση τους δείχνει κακή πρόγνωση, εκδήλωση εξωαδενικών συμπτωμάτων και εμφάνιση της νόσου σε μικρότερη ηλικία (Bournia et al., 2012)

M3R

Αντισώματα έναντι των μουσκαρινικών υποδοχέων ανιχνεύθηκαν με λειτουργικές μεθόδους ή με χρήση συνθετικών πεπτιδίων σε ασθενείς με ΣΣ (Kyriakidis et al., 2013). Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς (MRS) είναι υποδοχείς ακετυλοχολίνης που σχηματίζουν σύμπλοκα πρωτεΐνης-υποδοχέα G στις πλασματικές μεμβράνες ορισμένων νευρώνων ή άλλων κυττάρων.

Έχουν αναγνωριστεί πέντε διαφορετικοί υπότυποι των μουσκαρινικών υποδοχέων ακετυλοχολίνης (M1R-M5R). Ο M3R εκφράζεται σε εξωκρινείς αδένες, όπως οι σιελογόνοι και οι δακρυϊκοί αδένες και σχετίζεται με την λειτουργία τους (Kyriakidis et al., 2013). Η ακετυλοχολίνη δεσμεύει και ενεργοποιεί τον M3R σε κύτταρα σιελογόνων αδένων και αυξάνει την συγκέντρωση ασβεστίου (Dawson et al., 2005). Ενεργοποίηση του M3R προκαλεί επίσης την μεταφορά της ακουαπορίνης 5 (AQP5) στην μεμβράνη από το κυτταρόπλασμα, η οποία προκαλεί ταχεία μεταφορά του νερού κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης (Li et al., 2004) (Park, Park, & Jackson, 2013).

Σε προηγούμενες μελέτες φάνηκε ότι στο περιφερικό αίμα, περίπου το 40% των ασθενών με ΣΣ είχε M3R αντιδραστικά T κύτταρα (Naito και συν., 2005), και 9 - 100% είχε αυτοαντισώματα έναντι M3R στον ορό (Summida συν., 2013) (Sumida et al., 2012).



Εικόνα 8: Ανάπτυξη και ρύθμιση των χυμικών αυτοάνοσων αποκρίσεων σε ΣΣ. Στους σιελογόνους αδένες, η έκθεση σε κίνδυνο ή σήματα που επάγουν την απόπτωση οδηγεί τα αδενικά επιθηλιακά κύτταρα (SGECs) που εκφράζουν τις ενδοκυτταρικές αυτοαντιγονικές πρωτεΐνες να τις αποβάλλουν στο μικροπεριβάλλον μέσω εξωσωμάτων ή αποπτωτικών σωμάτων. Τα αυτοαντιγόνα μέσω των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs) οδηγούν στην ενεργοποίηση των B κυττάρων και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων (Kyriakidis et al. 2013).

Κυτταροκίνες

Οι κυτταροκίνες είναι μικρού μοριακού βάρους, συχνά γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες, με μάζα που ανέρχεται στα 8-30kDa, και παράγονται σε απάντηση επαγωγικών ερεθισμάτων αναστέλλοντας ή διεγείροντας την λειτουργία κυττάρων. Συμμετέχουν τόσο στη μη ειδική ανοσία, παραγόμενες από μακροφάγα, κυρίως ως απάντηση σε λοιμογόνους παράγοντες, όσο και στην ειδική ανοσία παραγόμενες από τα Τ λεμφοκύτταρα, σε απάντηση ειδικής αναγνώρισης ξένων αντιγόνων. Μπορούν να δράσουν είτε κατά ενδοκρινή είτε κατά παρακρινή τρόπο. Ελέγχουν την ένταση και την διάρκεια της ανοσοαπόκρισης, με τη διέγερση ή την αναστολή της ενεργοποίησης, του πολλαπλασιασμού ή και της διαφοροποίησης διαφόρων κυττάρων, καθώς επίσης και με το να ρυθμίζουν την έκκριση αντισωμάτων ή άλλων κυτταροκινών. Παρουσιάζουν ομοιότητες τόσο με τις ορμόνες, όσο και με τους νευροδιαβιβαστές και επιτρέπουν την επικοινωνία των κυττάρων μεταξύ τους, αλλά και με το περιβάλλον τους, και παίζουν ρόλο στην ανοσοαπόκριση και στη διατήρηση της ομοιόστασης των Τ κυττάρων (Ψαρρά).

Οι κυτταροκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα έναντι μικροβίων και στην παθογένεια των αυτοάνοσων νόσων με την έναρξη και την διαίωνιση των διαφόρων κυτταρικών και χυμικών αυτοάνοσων διεργασιών (Osnes et al., 2013). Ο ρόλος των κυτταροκινών στο ΣΣ έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον καθώς η παραγωγή τους φαίνεται να είναι απορυθμισμένη με μεταβολές έκφρασης των προ-φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών (Lisi et al., 2013)

- IL-1β

Η οικογένεια των κυτταροκινών της IL-1 περιλαμβάνει έντεκα πρωτεΐνες που καθεμία μοιράζεται μια παρόμοια δομή βαρελιού και δεσμεύονται με Ig-like υποδοχείς. Τα μέλη της οικογένειας IL-1 αποτελούνται από μορφές αγωνιστή της IL-1 (IL-1α και IL-1β), το φυσικό ανταγωνιστή υποδοχέα IL-1 (IL-1 ra), IL-18, IL-33, IL-36, IL-36Ra, IL-37 και IL-38 (R. Zhao, Zhou, & Su, 2013).

Η IL-1α, IL-1β, και IL-18 είναι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που δραστηριοποιούνται στην έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης και στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις Th1

και Th17, ενώ η IL-1 Ra μειώνει τη φλεγμονή αναστέλλοντας την δέσμευση των προσδεμάτων στον υποδοχέα αγωνιστή (Boraschi et al., 2011)

Η Ιντερλευκίνη-1β (IL-1β) ανήκει στην οικογένεια της IL-1 και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη του καταρράκτη των ανοσοφλεγμονωδών διεργασιών. Επίσης, εμπλέκεται σε μια ποικιλία κυτταρικών δραστηριοτήτων, περιλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης (R. Zhao et al, 2013).

Έχουν ανευρεθεί αυξημένα επίπεδα της IL-1 β σε κύτταρα παρωτίδας και κύτταρα δακρυϊκών αδένων σε μοντέλο ποντικού ή σε ασθενείς με σύνδρομο Sjogren. Όταν αναλύθηκαν τα επίπεδα των κυτταροκινών στο πλάσμα από μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) των ασθενών, μια σημαντική διαφορά βρέθηκε μεταξύ ασθενών και μαρτύρων (Szodoray, Brun, Centola, & Jonsson, 2004). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι η IL-1β μπορεί να εμπλέκεται στην καταστροφή των σιελογόνων και των δακρυϊκών αδένων σε ΣΣ. Οι Muraki και συν., μελέτησαν την σημασία των πολυμορφισμών της IL-1 β σε ΣΣ και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι πολυμορφισμοί μπορούν να επηρεάσουν την ευαισθησία στην εκδήλωση της νόσου (Muraki et al., 2004) (R. Zhao et al, 2013).

IL-4

IL-4, είναι η κύρια κυτταροκίνη της Th2 ανοσοαπόκρισης και εμπλέκεται στην Th2 διαφοροποίηση, στην αλλεργία, στην ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων, την αναστολή της ενεργοποίησης της Th1 απόκρισης και της κυτταρικής ανοσίας (Paul & Zhu, 2010) .

Μια μελέτη εκτίμησε τα επίπεδα της IL-4 στο σίελο των ασθενών με σύνδρομο Sjogren και διαπίστωσε ότι η IL-4 ήταν μη ανιχνεύσιμη σε όλα τα δείγματα σιέλου. (Bertorello et al., 2004)

Οι Moriyama και συν έδειξαν ότι η IL-4 ήταν σημαντικά υψηλότερη στους σιελογόνους αδένες με μεγάλη λεμφοκυτταρική διήθηση σε σύγκριση με εκείνους με χαμηλότερη λεμφοκυτταρική διήθηση (Moriyama et al., 2012).

IL-6

Η IL-6 είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που εμπλέκεται στην οξεία φάση της φλεγμονώδους αντίδρασης και παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση των πολυκλωνικών B κυττάρων. Σε ασθενείς με ΣΣ βρέθηκε ότι είναι αυξημένη στο σίελο και στον ορό (Szodoray et al., 2009), και επίσης βρέθηκε αυξημένη έκφραση στους σιελογόνους αδένες.

Η χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του υποδοχέα της IL-6 οδήγησε σε κανονικοποίηση των B λεμφοκυττάρων σε πιλοτική μελέτη ασθενών με ΣΕΛ (Illei et al., 2009). Όπως προαναφέρθηκε το ΣΣ και ο ΣΕΛ παρουσιάζουν παρόμοιες διαταραχές των B λεμφοκυττάρων, επομένως το blocking της IL-6 ή του υποδοχέα της μπορεί έχει ευεργετικό αποτέλεσμα στο ΣΣ (Roescher, Tak, & Illei, 2010).

Ο Souza και συν., ανέφεραν ότι ο πολυμορφισμός IL-6 -174GC σχετίζεται με ευαισθησία στο ΣΣ και μπορεί να επηρεάσει τη λεμφοκυτταρική διήθηση στους σιελογόνους αδένες και να μειώσει την λειτουργία των δακρυϊκών αδένων (Souza et al., 2014). Η IL-6 στα δάκρυα βρέθηκε να είναι αυξημένη σε ασθενείς με ΣΣ συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Lee et al., 2013).

Ο Moriyama και συν., ανέφεραν ότι η συγκέντρωση της IL-6 ήταν υψηλότερη στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Moriyama et al., 2012). Ο Boras και συν, βρήκαν αυξημένα επίπεδα της IL-6 στους σιελογόνους σε ΣΣ συγκριτικά με τους υγιείς προτείνοντας ότι αυτή η αύξηση μπορεί να προέρχεται από τοπική παραγωγή, πιθανόν από τους σιελογόνους αδένες (Boras et al., 2004).

IL-7

Η IL-7 είναι μια σημαντική ανοσορυθμιστική κυτταροκίνη που εμπλέκεται στην ανάπτυξη, πολλαπλασιασμό, επιβίωση και διαφοροποίηση των ώριμων, παρθένων και μνημονικών T κυττάρων. Είναι σημαντικός παράγοντας επιβίωσης για τα λεμφοκύτταρα και πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι η στόχευση του μονοπατιού της IL-7/IL-7Ra μπορεί να είναι αποτελεσματική για την θεραπεία των αυτοάνοσων παθήσεων. Οι πολυμορφισμοί του IL-7Ra έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη αυτοάνοσης νόσου.

Ο Bikker και συν., παρατήρησαν υψηλά επίπεδα της IL-7 στο σπείρο και στους σιελογόνους αδένες σε ΣΣ. Η IL-7 επάγει την παραγωγή των προφλεγμονωδών μεσολαβητών στο περιφερικό αίμα των ασθενών (Bikker et al., 2010). Για το λόγο αυτό θα μπορούσε να έχει παθογενετικό ρόλο στο ΣΣ και η στόχευση του μονοπατιού της IL-7 μπορεί να είναι πιθανός θεραπευτικός στόχος για την πρόληψη και θεραπεία του ΣΣ (Jin, Kawai, Cha, & Yu, 2013).

IL-10

Η IL10 είναι μία αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη, που παράγεται κυρίως από την υποομάδα Th2 των CD4+ βοηθητικών κυττάρων, αλλά μπορεί να παράγεται και από ενεργοποιημένα B-κύτταρα, κάποια Th1 κύτταρα και από μερικά ενεργοποιημένα μακροφάγα. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, και οι δυο κύριες δράσεις της περιλαμβάνουν την αναστολή της παραγωγής κυτταροκινών από τα μακροφάγα, και την παρεμπόδιση της βοηθητικής δράσης των μακροφάγων κατά την ενεργοποίηση των T κυττάρων. Επίσης συμμετέχει στην παραγωγή κυτταροκινών από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και μπορεί να καταστείλει την διαφοροποίηση των T κυττάρων σε Th17 και Th1 υποομάδες (Pot, Apetoh, & Kuchroo, 2011).

Η ανθρώπινη ιντερλευκίνη 10 είναι διμερές με MB 37 kDa. Υψηλά επίπεδα στο πλάσμα της IL10 συσχετίζονται με μεγαλύτερη ευαισθησία για εμφάνιση του ΣΣ (Anaya, 2005). Τα υψηλά επίπεδα ορού της IL10 σε ασθενείς με ΣΣ συνδέονται με υψηλότερους τίτλους του IgA ρευματοειδούς παράγοντα, αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων, καθώς και με τη σοβαρότητα λεμφοκυτταρικής διήθησης στον σιελογόνους αδένες. Προηγούμενες μελέτες ανέφεραν μια σημαντική αύξηση της IL-10 σε ασθενείς με ΣΣ συγκριτικά με τον υγιή πληθυσμό και συσχέτιση με την ξηροστομία και ξηροφθαλμία (Bertorello et al., 2004).

Ενώ ο Perrier και συν, βρήκαν αυξημένα επίπεδα της IL-10 σε πρωτοπαθές ΣΣ που συσχετιζόνταν θετικά με τα επίπεδα της IgG1 (Perrier et al., 2000) (Jin et al., 2013), ο Szodoray και συν. ανέφεραν μια σημαντική μείωση στα επίπεδα της IL-10 στον ορό και αρνητική συσχέτιση μεταξύ της IL-10 και των ποσοστών των Tr1 κυττάρων

(Szodoray et al., 2009). Η IL-10, παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα στα δάκρυα των ασθενών σε σχέση με τους υγιείς (Lee et al., 2013).

Μια πρόσφατη μελέτη αναγνώρισε το αλληλόμορφο της IL-10 -1082 G και του γενότυπου genotype "GCC/ATA" ως υποψήφιο παράγοντα κινδύνου για το πρωτοπαθές ΣΣ. Αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι η IL-10 ενδεχομένως παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του ΣΣ. Επιπροσθέτως ο Moriyama και συν., ανέφεραν ότι η IL-10 ανευρίσκεται συνεχώς στους σιελογόνους αδένες των ασθενών (Moriyama et al., 2012).

Σε ασθενείς, τα αυξημένα επίπεδα της IL10 στο σίελο συσχετίστηκαν σημαντικά με την σοβαρότητα της ξηροστομίας και ξηροφθαλμίας και με την ταχύτητα καθίζησης ερυθρών (Bertorello, 2004). Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι τα υψηλότερα επίπεδα IL10 σχετίζονται με πιο συστηματική συμμετοχή και παίζουν επίσης ρόλο στην τοπική φλεγμονώδη διαδικασία. Δεδομένου ότι τα υψηλά επίπεδα IL10 σχετίζονται με πιο σοβαρή εκδήλωση της νόσου, είναι πιθανό ότι η αυξημένη έκκριση της IL10 παριστά ένα αντι-φλεγμονώδη μηχανισμό ελέγχου, ενώ συμβάλλει παράλληλα στην ενεργοποίηση των Β-κυττάρων (Roescher, 2010).

IL-12

Η οικογένεια της ιντερλευκίνης 12 (IL-12) διαμεσολαβεί σε ποικίλες λειτουργίες και εμπλέκεται στην παθογένεια πολλών αυτοάνοσων νοσημάτων. Σε αυτήν ανήκουν ετεροδιμερείς κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένων των IL-12, IL-23, IL-27 και IL-35 (Vignali & Kuchroo, 2012).

Σε ΣΣ, η IL-12 παράγεται κυρίως από μακροφάγα και δένδριτικά κύτταρα (DCs) και προάγει την παραγωγή της IFN- γ από T δραστικά κύτταρα και NK κύτταρα (Vignali & Kuchroo, 2012). Τα επίπεδα της IL-12 βρέθηκαν να είναι αυξημένα σε ασθενείς με ΣΣ και μια σημαντική αύξηση της IL-12 ανιχνεύθηκε στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης της νόσου σε μοντέλα ποντικών του ΣΣ σε σύγκριση με τους ποντικούς της ομάδας ελέγχου (Gao et al., 2006). (Jin et al., 2013).

IL-17

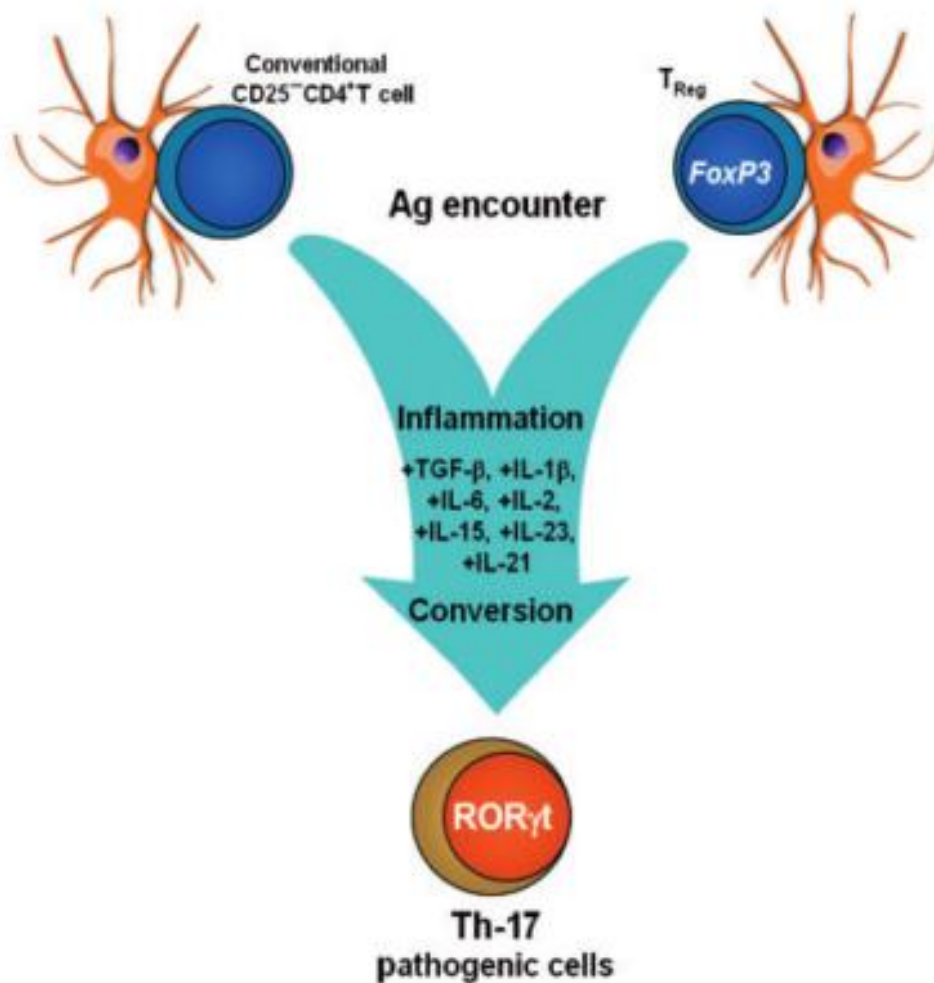
Οι κυτταροκίνες της οικογένειας της ιντερλευκίνη-17 (IL-17) συμμετέχουν σε οξείες και χρόνιες φλεγμονώδεις αποκρίσεις (Song & Qian, 2013). Από την ανακάλυψή τους, σχεδόν πριν από μία δεκαετία, τα Th17 κύτταρα εμπλέκονται στη ρύθμιση πολλών φλεγμονωδών αντιδράσεων. Τα Th17 κύτταρα αποτελούν ένα υποσύνολο των CD4 + T δραστικών κυττάρων που χαρακτηρίζεται από την έκφραση των κυτταροκινών της οικογένειας IL-17 (Sundrud & Trivigno, 2013), και παράγουν κυτταροκίνες IL-17A έως L-17F, και, σε μικρότερο βαθμό, TNF-α και IL-22 (Miossec et al., 2009).

Η IL-17 είναι προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη που είναι στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος λόγω της συμμετοχής της στην αυτοανοσία και στις φλεγμονώδεις διαδικασίες. Αποτελεί την κύρια κυτταροκίνη που παράγεται από τα κύτταρα Th17 (Ambrosi et al., 2012).

Αυξημένα επίπεδα της IL-17 έχουν βρεθεί στις λεμφοκυτταρικές διηθήσεις στους σιελογόνους αδένες, που δείχνουν τον πιθανό ρόλο της στην ανοσοπαθολογία του ΣΣ (Singh & Cohen, 2012). Η αύξηση της στους αδένες συσχετίστηκε με το focus score. Τα επίπεδα της στον ορό δεν είναι ανιχνεύσιμα στους περισσότερους ασθενείς με πΣΣ, σε αντίθεση με τα υψηλά επίπεδα αυτής της κυτταροκίνης σε αδενικό επίπεδο. Αυτό μπορεί να δείχνει ότι η IL-17 παίζει έναν πιο σημαντικό ρόλο σε τοπικό επίπεδο στους σιελογόνους αδένες και όχι συστηματικά, όπως συμβαίνει στον συστηματικό ερυθματώδη λύκο (ΣΕΛ) (Katsifis και συν., 2009).

Τα διπλά αρνητικά (DN) κύτταρα, παράγουν ιντερλευκίνη 17 β και φαίνεται να διαδραματίζουν έναν κεντρικό ρόλο στην παθολογία των αυτοάνοσων διαταραχών (A. Alunno., 2012), ενώ φαίνεται ότι επεκτείνονται στο περιφερικό αίμα και στους ελάσσονες σιελογόνους αδένες στο πΣΣ. Στα αρχικά στάδια της νόσου δεν επεκτείνονται και μεγαλύτερος αριθμός των DN T κυττάρων στους αδένες συνδέεται με πιο σοβαρή φλεγμονή των ιστών, παρουσία των δομών βλαστικού κέντρου και με αυξημένη ξηροστομία (Alunno, 2014). Αυτό δείχνει ότι τα DN T κύτταρα συμμετέχουν ενεργά στους παθολογικούς μηχανισμούς του ΣΣ και μπορεί να παίζουν

ρόλο στην ανάπτυξη έκτοπης λεμφαγγειογένεσης (Alessia Alunno et al., 2014). Η IL-17 στα δάκρυα αυξάνεται και τα επίπεδα της IL-17 συσχετίζονται θετικά με την κλινική σοβαρότητα της ξηροφθαλμίας (Kang et al., 2011). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η -17 παίζει ρόλο στην παθογένεια (Jin et al., 2013).



Εικόνα 9: Μετατροπή των CD4 + T κυττάρων σε Th-17. Τα παρθένα T κύτταρα (CD4 + CD25⁻) και τα FoxP3 + TReg, παρουσία αντιγόνου, μπορούν να μετατραπούν σε προ-φλεγμονώδη Th-17 κύτταρα (Abdulahad, 2011).

IL-18

Η IL-18, είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που εμπλέκεται στην παθογένεια φλεγμονωδών παθήσεων όπως η ατοπική δερματίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο διαβήτης τύπου 1, το σύνδρομο Sjogren, και η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου. Η IL-18 προάγει την παραγωγή κυτταροκινών Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, και IL-13) από τα T κύτταρα, τα κύτταρα NK, τα βασεόφιλα, και σιτευτικά κύτταρα, και συμμετέχει στην ανάπτυξη των κυττάρων Th2 και την παραγωγή IgE. Επίσης παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των κυττάρων Th17 (Kawayama et al., 2012). Επιπλέον, η IL-18 προάγει την σύνθεση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών, την έκκριση χημειοκινών και την ιστική βλάβη (Youinou & Pers, 2011). Σε ασθενείς με ΣΣ έχει ανιχνευθεί στον ορό, στους σιελογόνους αδένες και το σπείρο των ασθενών και συσχετίστηκε με την σοβαρότητα της νόσου (Jin et al., 2013).

IL-21

Η IL-21 είναι μια πλειοτροπική κυτταροκίνη η οποία παράγεται από ενεργοποιημένα CD4 + T κύτταρα και κύτταρα NKT και ελέγχει τη λειτουργική δράση του δραστικών T βοηθητικών κυττάρων και τη διαφοροποίηση των κυττάρων Th17.

Παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα στον ορό σε ασθενείς με ΣΣ συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, και συσχετίζεται θετικά με την υπεργαμμασφαιριναιμία και τα αυτοαντισώματα (Kang et al., 2011). Επίσης ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν υψηλά επίπεδα της IL-21 και χαμηλότερα επίπεδα της IL-21R σε λεμφοκυτταρικές διηθήσεις των δακρυϊκών και σιελογόνων αδένων σε ασθενείς με ΣΣ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Kang et al., 2011).

IL-22

Η ιντερλευκίνη-22 (IL-22), είναι μέλος της οικογένειας της IL-10, και παράγεται από πολλές διαφορετικές κυτταρικές πηγές αλλά κυρίως Th17 κύτταρα. Η IL-22 συμμετέχει στην φλεγμονή και την παθογένεια πολλών αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως ο ερυθηματώδης λύκος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η σκλήρυνση κατά πλάκας και το ΣΣ (Sonnenberg, Fouser, & Artis, 2011).

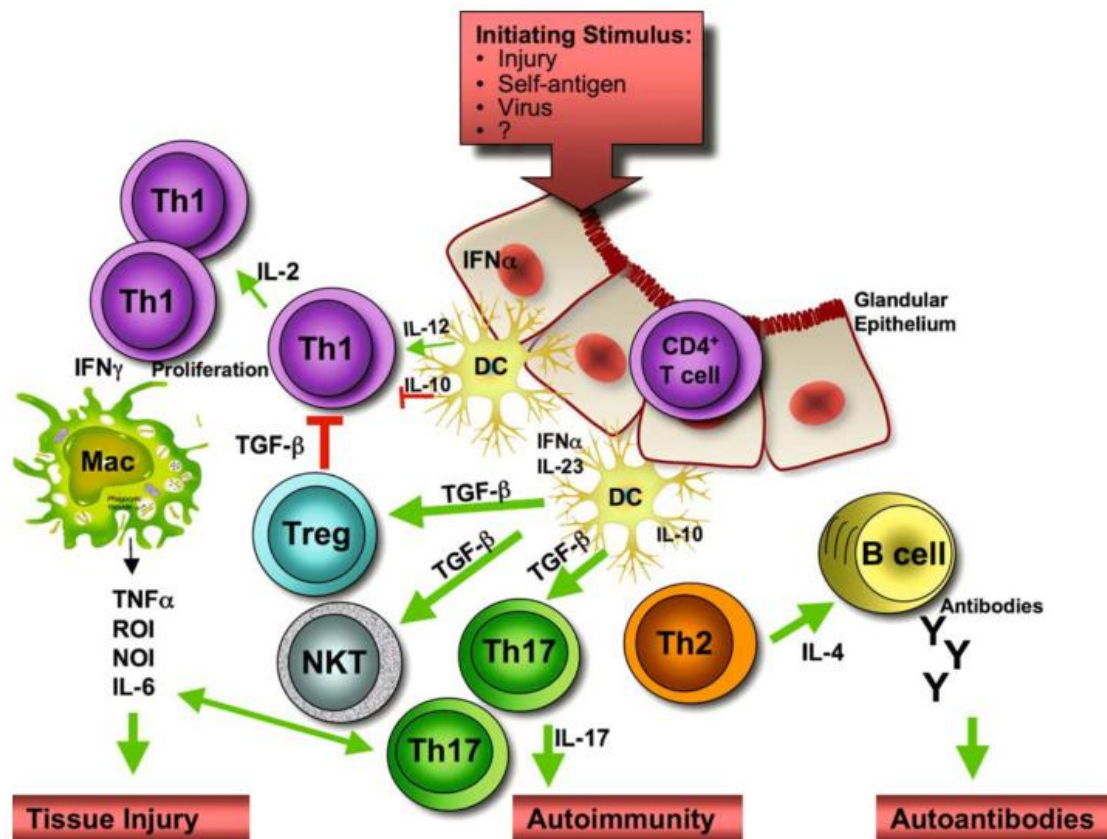
Οι Lavoie και συν. έδειξαν ότι τα επίπεδα της IL-22 στον ορό ήταν σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με ΣΣ σε σύγκριση με υγιείς και συσχετίστηκαν με την μείωση σιέλου, τα αντι-SSB, τα anti-SSA/SSB, την υπεργαμμασφαιριναιμία τους ρευματοειδείς παράγοντες και τις κλινικές παραμέτρους, γεγονός που υποδηλώνει ότι η IL-22 παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην νόσο (Lavoie, Stewart, Berg, Li, και Nguyen, 2011). Οι Ciccio και συν., έδειξαν ότι η IL-22, IL-23 και IL-17 ήταν σημαντικά αυξημένες στους σιελογόνους αδένες των ασθενών που ίσως δείχνει ότι παίζουν προ-φλεγμονώδη ρόλο στην παθογένεια του πΣΣ (Pan, Li, Zheng, & Ye, 2013) (Ciccio et al., 2012).

IL-23

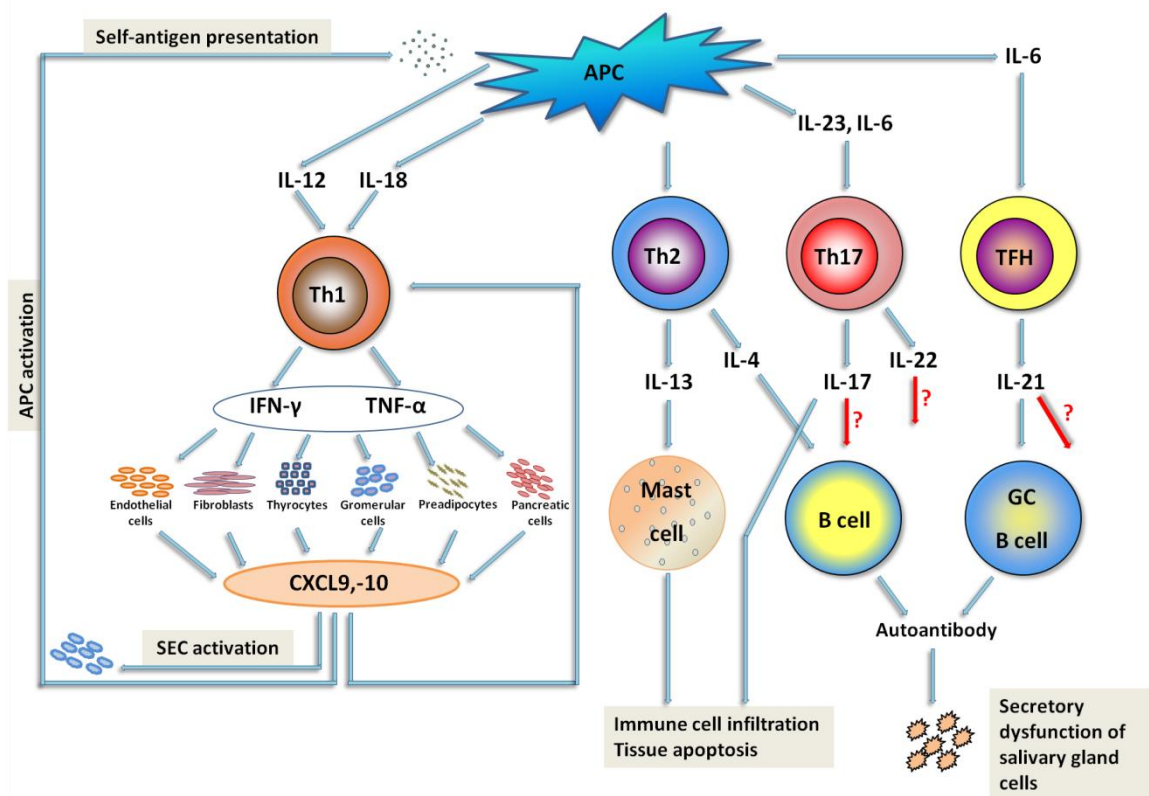
Η IL-23, ένα μέλος της οικογένειας της IL-12, αποτελείται από την υπομονάδα p40 της IL-12, και έχει φανεί ότι είναι κρίσιμη κυτταροκίνη για την επαγωγή, τη σταθεροποίηση και την επέκταση των Th17 κυττάρων (Jin et al., 2014) (Vignali et al., 2012), Αυξημένα επίπεδα IL-17 και IL-23 αναφέρθηκαν στους σιελογόνους αδένες και στον ορό ασθενών με πρωτοπαθές ΣΣ.

TNF- α

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-άλφα (TNF- α) παράγεται από πολλούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων Th1 και CD8 κυττάρων και εμπλέκεται στην παθογένεια διαφόρων αυτοάνοσων και ρευματικών νόσων. Σε ασθενείς με ΣΣ, έχουν ανιχνευτεί αυξημένα επίπεδα στους σιελογόνους αδένες (Kang et al., 2011). Επίσης, στον ορό τα επίπεδα του TNF- α ήταν αυξημένα, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Szodoray et al., 2009). Τα επίπεδα του TNF- α , στα δάκρυα ήταν υψηλότερα στην ομάδα των ασθενών σε σύγκριση με τους υγιείς (S. Y. Lee et al., 2013).



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση των διηθούντων Τ κυττάρων και η ρύθμισή τους σε σιελογόνους αδένες ασθενών με ΣΣ. Μια αρχική προσβολή / μόλυνση των επιθηλιακών κυττάρων των σιελογόνων αδένων πιστεύεται ότι εκκινεί μια ανοσοαπόκριση στην οποία τα χημειοτακτικά σήματα και IFN α συμμετέχουν από την αρχή. Τα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα, και / ή τα επιθηλιακά κύτταρα λειτουργούν ως APC με σκοπό να ενεργοποιήσουν αντιγόνο-ειδικούς πληθυσμούς Τ κυττάρων για να παράγουν κυτταροκίνες. Τα Th1, Th2, Th17, NKT, και / ή Treg επηρεάζουν την εξέλιξη της ανοσοπαθολογική βλάβης και την ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων για να αναπτύξουν αυτοαντισώματα (Katsifis, 2007).



Sjögren's Syndrome

Εικόνα 11: Προτεινόμενο μοντέλο για τη συμμετοχή των κυτταροκινών στην παθογένεια του συνδρόμου Sjogren. Η IL-4 (που παράγεται από τα κύτταρα Th2) παρέχει σήματα διέγερσης για την ανάπτυξη των ενεργοποιημένων B κυττάρων που παράγουν αυτοαντισώματα. Τα Th17 κύτταρα διαφοροποιούνται από τα μνημονικά T-κύτταρα κάτω από την επιρροή της IL-6 ή / και IL-23 και παράγουν IL-17. IL-17 προάγει την παραγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) από τα επιθηλιακά κύτταρα και τις ινοβλάστες (Cortez, DM et al. 2007) και ενισχύει την απόπτωση. Η IL-6 επάγει την παραγωγή αυτοαντιδραστικών αντισωμάτων από τα B-κύτταρα (Ishihara και Hirano, 2002). Η IL-12 και IL-18 συνεργάζονται για την Th1 απόκριση. Ο TNF-α, σε συνδυασμό με IFN-γ, οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση (Kamachi et al., 2002) και ενεργοποιεί τα APCs και τα επιθηλιακά κύτταρα των εξωκρινών αδένων. Ο TNF-α και η IFN-γ διεγείρουν επίσης την έκκριση CXCL9-10 (Antonelli et al. 2014). Η IL-21 είναι αυξημένη στον ορό των ασθενών με ΣΣ και εκφράζεται από τα λεμφοκύτταρα που διηθούν τους σιελογόνους αδένες. Η IL-21 εμπλέκεται στην διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των B και T-κυττάρων (KY Kang et al., 2011). Η IL-13 επάγει τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των μαστοκυττάρων που θα μπορούσε να οδηγήσει σε εκκριτική δυσλειτουργία (Jin et al., 2013) (Παναγούλιας Ιωάννη, Τμήμα Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών)

Ιντερφερόνες

Οι ιντερφερόνες (IFNs) εμφανίστηκαν αρχικά ως πρωτεΐνες που «παρεμβαίνουν» στον πολλαπλασιασμό των ιών. Ανήκουν στην οικογένεια των τάξης II των α-ελικοειδών κυτταροκινών, και διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην άμυνα έναντι των ιών. Κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την ακολουθία των αμινοξέων τους, την χρωμοσωμική θέση και την ειδικότητα του υποδοχέα τους σε α) τύπου I (IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ και IFN ν), β) τύπου II (IFN γ) και γ) τύπου III (IL28B, και IL29) ιντερφερόνες (Mavragani & Crow, 2010).

Τα τελευταία χρόνια αρκετές μελέτες έχουν δείξει απορύθμιση του μονοπατιού της ιντερφερόνης (IFN), ιδιαίτερα υπερ-έκφραση της ιντερφερόνης τύπου I (IFN), στο περιφερικό αίμα και τους σιελογόνους αδένες των ασθενών με ΣΣ που χαρακτηρίζεται ως «IFN signature» (υπογραφή ιντερφερόνης) (Li, Ice, Lessard, & Sivils, 2013).

Επιπροσθέτως οι ιντερφερόνες επάγουν τη μεταγραφή πολλών κυτταροκινών που υπερεκφράζονται σε ασθενείς με ΣΣ και παίζουν κρίσιμο ρόλο στην παθογένεια της ασθένειας (Lisi et al., 2013).

- IFN- α

Η IFN α κυκλοφορεί σε χαμηλά επίπεδα στο αίμα, αλλά αυξάνεται παρουσία σημάτων κινδύνου, όπως είναι για παράδειγμα μια ιογενής λοίμωξη. Παράγεται από τα περισσότερα κύτταρα, αλλά κυρίως από τα δενδριτικά κύτταρα (DC).

Τα δενδριτικά κύτταρα αποτελούν μια ετερογενή ομάδα αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων που προέρχονται από ένα κοινό προγονικό κύτταρο και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιγονοπαρουσίαση και στην ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων. Με βάση την μοναδική ικανότητά τους να συμμετέχουν στη δημιουργία περιφερικής ανοχής, τα DC έχουν αποκτήσει μεγαλύτερο ενδιαφέρον σχετικά με τον ενδεχόμενο ρόλο τους σε αυτοάνοσες ασθένειες τα τελευταία χρόνια.

Διαταραχή στον αριθμό ή τη λειτουργία τους μπορεί να συμβάλλει στην παράλογη ανοσολογική ενεργοποίηση, που εμφανίζεται σε ασθενείς με αυτοάνοσες διαταραχές, όπως στο σύνδρομο Sjögren (Steinman, 2003).

Αυτο-αντιδραστικά T κύτταρα συχνά διαφεύγουν από τους μηχανισμούς κεντρικής ανοχής, και σε άτομα με αυτοάνοσες εκδηλώσεις, ο ρόλος των αντιγονοπαρουσιαστικών DC στον έλεγχο των T κυττάρων στην περιφέρεια, φαίνεται να είναι πιο σημαντικός από ό, τι πιστευόταν παλαιότερα. Τα DC παίζουν ρόλο στην περιφερική ανοχή και, όπως τα επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, είναι σε θέση να ξεκινήσουν και να διατηρήσουν μια αποτελεσματική ανοσολογική απόκριση (Jonsson, 2011). Οι ανοσολογικοί μηχανισμοί πίσω από την αυτοκατευθυνόμενη καταστροφή των σιελογόνων αδένων ιστού, και οι αιτίες της δυσλειτουργίας των αδένων αυτών, δεν έχουν ακόμα πλήρως κατανοηθεί παρά τις δεκαετίες έρευνας. Ανοσοϊστοχημική χρώση σε βιοψίες ασθενών, αποκάλυψε ότι συγκεντρώνονται B και T κύτταρα σε μεγάλες ποσότητες αλλά επίσης και τα μακροφάγα, τα NK κύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα (DC), αποτελούν ένα μικρό ποσοστό εντός των φλεγμονωδών εστιών (Jonsson, 2008).

Τα DC, είναι ένα σπάνιος πληθυσμός κυττάρων στο περιφερικό αίμα, και έχει δύο υποσύνολα: τα μυελοειδή DC (MDC) και τα πλασματοκυτταροειδή DC (PDC). Τα κύτταρα PDC μπορούν να παράγουν έως και 1000 φορές περισσότερη IFN- α , σε σχέση με άλλα κύτταρα. Ο ρόλος τους τα τελευταία χρόνια έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον λόγω της παρουσίας τους σε αυτοάνοσες παθήσεις και της υψηλότερης συγκέντρωσης τους στα όργανα στόχους (Wahren-Herlenius & Dörner, 2013). Έτσι, τα pDC ως πιθανή δεξαμενή της IFN- α θα μπορούσε να συνεισφέρει στην παθογένεια του συνδρόμου Sjögren, ενεργοποιώντας διάφορα άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της μη κατάλληλης έκκρισης IFN- α . Ανωμαλίες στην λειτουργία ή τον αριθμό τους θα μπορούσε να συμβάλει στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως το Sjogren (Mavragani & Crow, 2010).

Σε βιοψίες σιελογόνων αδένων από ασθενείς με ΣΣ, η IFN α ανιχνεύεται σε υψηλότερα επίπεδα στα ενδοθηλιακά κύτταρα συγκριτικά με υγιείς, αλλά, η IFN α κυρίως εκκρίνεται από πλασμακυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα (pDCs), τα οποία βρίσκονται στους σιελογόνους αδένες ασθενών με ΣΣ και όχι σε υγιείς μάρτυρες. Ενώ τα επίπεδα ορού της IFN α βρέθηκαν να είναι υψηλά σε ασθενείς με ΣΣ, σε σύγκριση

με τα φυσιολογικά άτομα από ορισμένες ομάδες μελετητών, αντίθετα αποτελέσματα προέκυψαν από άλλες ομάδες μελετητών που ανέφεραν μειωμένα επίπεδα PDC στο περιφερικό αίμα (Widdenberg et al. 2008), (Vogelsang et al., 2010).

Εκτός από τα pDC, και άλλα είδη έχουν αναλυθεί σε σιελογόνους αδένες και το περιφερικό αίμα από ασθενείς με Sjögren σύνδρομο. CD1a + και CD83 + κύτταρα έχουν ανιχνευθεί σε βιοψίες από ελάσσονες σιελογόνους αδένες ασθενών με σύνδρομο Sjogren αλλά όχι σε υγιείς ομάδες ελέγχου (Jonsson et al., 2011). Το CD83 εκφράζεται μόνο σε ενεργοποιημένα κύτταρα, ενώ το CD1a είναι κυρίως γνωστός ως δείκτης για κύτταρα Langerhans που είναι ένας τύπος δερματικών δενδριτικών κυττάρων, καθώς προέρχονται από μονοκύτταρα. Μειωμένα επίπεδα του CD141+mDC2 υποσύνολου βρέθηκαν στο περιφερικό αίμα ασθενών με σύνδρομο Sjogren (Vogelsang et al., 2010).

Παρ' όλα αυτά, πρέπει ακόμα να αποδειχθεί αν τα mDC2 (myeloid DC) είναι στην πραγματικότητα παρόντα στους σιελογόνους αδένες των ασθενών αυτών. Συμπερασματικά, η στρατολόγηση των δενδριτικών κυττάρων στους σιελογόνους αδένες έχει έως τώρα δείχθει επανειλημμένα και επίσης αυξημένη έκφραση σε γονίδια IFN βρέθηκε τοπικά και συστηματικά σε ασθενείς με σύνδρομο Sjogren.

Πολυμορφισμοί στα γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι της IFN α , όπως της IRF5 και του STAT4, βρέθηκαν να σχετίζονται με την ευαισθησία της νόσου (Mavragani & Crow, 2010). Όπως προαναφέρθηκε οι τύπου I IFNs επάγονται από ιογενή λοίμωξη και ενδεχομένως όσον αφορά το ΣΣ αυτοί οι ιοί μπορεί να είναι ο ιός Epstein-Barr (EBV), ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV), ο ιός της ηπατίτιδας B (HBV), και ο ιός ηπατίτιδας C (HCV) (H. Li et al., 2013).

- IFN- γ

Η IFN- γ παράγεται από NK κύτταρα, Th1 και CD8 + κυτταροτοξικά T κύτταρα (CTL), και παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανοσία και την άμυνα έναντι ενδοκυτταρικών παθογόνων (Jin et al, 2013). Η παραγωγή IFN- γ από τα ενεργοποιημένα NK κύτταρα, κινητοποιεί την έκκριση των κυτταροκινών μετά την έκθεση του οργανισμού σε βακτηριακά προϊόντα. Η υπερέκφραση της και η

υπερβολική Th1 απόκριση, φαίνεται ότι συμμετέχει σε πολλές αυτοάνοσες νόσους, όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η σκλήρυνση κατά πλάκας (MS).

Σε ασθενείς με πΣΣ, τα επίπεδα της IFN- γ σε σιελογόνους αδένες και σίελο είναι υψηλότερα από ό, τι σε υγιείς, και επίσης υπάρχει αυξημένη Th1 απόκριση σε σχέση με την Th2 στους σιελογόνους αδένες, σίελο και τον ορό, σε σύγκριση με τους ασθενείς με κερατοεπιπεφυκίτιδα χωρίς όμως ΣΣ (van Woerkom et al., 2005) (Kang et al., 2011). Επιπροσθέτως, επάγει την έκφραση των χημειοκινών CXCL9 -10, οι οποίες είναι συνδεδεμένες για το CXCR3 (Jin et al., 2013)

Η CXCL10 ρυθμίζει την ανοσοαπόκριση μέσω της ενεργοποίησης και της στρατολόγησης των λευκοκυττάρων, όπως τα T-λεμφοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα και τα μονοκύτταρα. Η έκκριση του CXCL10 από CD4 +, CD8 +, NK και NK- T κύτταρα εξαρτάται από την IFN- γ , η οποία μεσολαβείται από την οικογένεια της IL-12. Ο CXCL10 και ο υποδοχέας του, CXCR3 παίζουν ρόλο στην αιτιοπαθογένεια αρκετών αυτοάνοσων διαταραχών, συμπεριλαμβανομένου του ΣΣ (EY Lee, Lee & Song, 2009). Μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε ότι η έκφραση του CXCL9, -10, -11, και CXCR3 είναι αυξημένη στα δάκρυα και στην επιφάνεια των οφθαλμών ασθενών με ξηροφθαλμία, ιδιαίτερα σε εκείνους με Sjögren σύνδρομο (Yoon et al., 2010). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η IFN- γ -CXCR3 οδός μπορεί να είναι ένας μηχανισμός με τον οποίο η IFN- γ προάγει την συγκέντρωση δραστικών T κυττάρων σε ιστούς-στόχους και εκκινεί τοπικές αυτοάνοσες αποκρίσεις (Jin et al., 2013).

Τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας - β (TGF β)

Ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας - β (TGF- β), είναι μια κυτταροκίνη σημαντική για την ανοσία, που παράγεται από διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων και των T λεμφοκυττάρων, των οποίων αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό. Μια κρίσιμη λειτουργία του TGF- β στο ανοσοποιητικό σύστημα είναι η καταστολή του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων και της διαφοροποίησής τους, εμποδίζοντας έτσι την αυτοάνοση απόκριση.

Λειτουργεί δηλαδή ως αρνητικός ρυθμιστικός παράγοντας της ανοσιακής απάντησης. Έτσι, η απουσία του TGF-β1 σε "knockout" ποντικούς οδηγεί σε πολυεστιακή φλεγμονώδη αντίδραση σε πολλά όργανα, συμπεριλαμβανομένων, της καρδιάς, των πνευμόνων, του ήπατος και των νεφρών, του στομάχου, του παγκρέατος και των σιελογόνων αδένων. Ιστολογικά, η λεμφοκυτταρική διήθηση των σιελογόνων αδένων σε knockout ποντικούς είναι όμοια με εκείνη που παρατηρήθηκε σε ΣΣ (Moustakas, 2002) (Mason, 2003).

Ο TGFβ βρίσκεται στους σιελογόνους αδένες τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε ασθενείς με ΣΣ, αλλά είναι μειωμένο σε ασθενείς με υψηλή βαθμολογία λεμφοκυτταρικής διήθησης-focus score (Ogawa, 1995).

TLRs

Η παθοφυσιολογία του ΣΣ περιλαμβάνει την αναγνώριση των αντιγόνων από τα Τ κύτταρα μέσω του υποδοχέα TCR, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί την παραγωγή των κυτταροκινών και την χρόνια φλεγμονή (Sumida et al., 2014).

Οι Toll-like υποδοχείς (TLRs), ανήκουν σε μία οικογένεια εξελικτικά συντηρημένων υποδοχέων και ο ρόλος τους είναι η πρώτη γραμμή άμυνας κατά της εισβολής των παθογόνων με την αναγνώριση των ειδικών προσδεμάτων TLR (J. Li, Wang, Zhang, & Yin, 2013). Αυτά τα προσδέματα μπορεί να ενεργοποιήσουν δένδριτικά κύτταρα (DCs), μακροφάγα, Β κύτταρα, Τ κύτταρα και άλλα κύτταρα παρουσίασης αντιγόνου (APC). Οι Toll-like υποδοχείς (TLRs) μπορούν να βρεθούν σε διάφορες κυτταρικές μεμβράνες και να αμυνθούν έναντι εξωγενών και ενδογενών DAMPs (danger-associated molecular patterns) and PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) (J. Li et al., 2013).

Πεπτίδια

Όπως προαναφέρθηκε τα T κύτταρα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα με την βοήθεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας. Οι πρωτεΐνες ιστοσυμβατότητας, που κωδικοποιούνται από άκρως πολυμορφικά γονίδια στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC), έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν σταθερά βραχέα πεπτίδια και έτσι το σύμπλοκο MHC-πεπτιδίου εμφανίζει το πεπτίδιο (επίτοπο) στον ειδικό υποδοχέα του T-κυττάρου- με αποτέλεσμα την έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης.

Τα πεπτίδια είναι οργανικά μόρια που αποτελούνται από αμινοξέα, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με αμιδικό δεσμό. Τα T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν ένα αντιγόνο μέσω του TCR υποδοχέα τους, μόνο όταν παρουσιαστεί σε σύνδεση με μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας από κάποιο άλλο κύτταρο. Τα CD4+ T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν το αντιγόνο όταν συνδέεται με MHC τάξης II, ενώ τα CD8+ με MHC τάξης I. Τα MHC I και II μόρια περιέχουν μια περιοχή σύνδεσης που μπορεί να δεχθεί ένα αντιγονικό πεπτίδιο.

Η ανοσιακή απόκριση σε αυτοάνοσα νοσήματα, όπως το ΣΣ και ο ΣΕΛ, γίνεται εναντίον αυτοαντιγόνων, που συνήθως είναι μεγάλα κυτταρικά σύμπλοκα πρωτεϊνών. Τρεις διαφορετικές πρωτεΐνες, οι La/SSB, Ro60kD και Ro52kD φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στο ΣΣ (Scofield, 1999).

Πιθανώς, η απάντηση εναντίον των αυτοαντιγόνων La/SSB είναι καθοδηγούμενη από αντισώματα των B-κυττάρων, και η ενεργοποίησή τους εξαρτάται από τα αυτοαντιδρώντα T βοηθητικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό η ταυτοποίηση των επιτόπων των T βοηθητικών κυττάρων είναι σημαντική για την κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στις ασθένειες, καθώς και για την αποτελεσματική ανοσοθεραπεία.

Για την αναγνώριση των La/SSB αντιγονικών επιτόπων των T κυττάρων χρησιμοποιούνται μέθοδοι πρόβλεψης που βασίζονται στη σύνδεση πεπτιδίου με τα MHC τάξης II (Hammer, 1994). Η μια είναι το τεχνητό νευρωνικό δίκτυο (artificial neural network -ANN), από τον Brusic και συν. (Brusic, 1998), που συνδυάζει πειραματικά δεδομένα δέσμευσης, τις θέσεις σύνδεσης και τα μοτίβα δέσμευσης με

ένα εξελικτικό αλγόριθμο και ένα τεχνητό νευρωνικό δίκτυο. Η δεύτερη μέθοδος είναι το πρόγραμμα TERITOPE των Hammer και συν. (the TERITOPE program), και αναγνωρίζει συγκεκριμένους HLA-DR αντιγονικούς επίτοπους T κυττάρων συνδυάζοντας διαφορετικές ποσοτικές μετρήσεις (Hammer, 1994).

Ειδικό μέρος

Σκοπός μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση των επιμέρους υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων και των κυτταροκινών σε ασθενείς με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren, και ο ρόλος τους στην παθοφυσιολογία της νόσου. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν πεπτίδια για συγκεκριμένους επίτοπους T κυττάρων των La/SSB αντιγόνων για να διερευνήσουμε ποια κύτταρα αντιδρούν με αυτά και το αποτέλεσμα της αντίδρασης αυτής.

Ασθενείς και μέθοδοι

Συνολικά μελετήθηκαν 23 ασθενείς με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren (πΣΣ). Τα δείγματα αίματος που ελήφθησαν από τους ασθενείς προέρχονταν από το ρευματολογικό τμήμα του γενικού νοσοκομείου «Άγιος Ανδρέας» της Πάτρας. Οι ασθενείς πληρούσαν τα τροποποιημένα αμερικανοευρωπαϊκά διαγνωστικά κριτήρια για το πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren (C Vitali et al., 2002).

Στην μελέτη περιελήφθησαν ένας άνδρας και 22 γυναίκες με καταγωγή από περιοχές της νοτιοδυτικής Ελλάδας, ηλικίας από 34-78 ετών, με μέσο όρο ηλικίας τα 58 έτη. Αντίστοιχα δείγματα ελήφθησαν από 14 υγιείς δότες που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου για τη μελέτη αυτή.

Οι ασθενείς μελετήθηκαν για διάφορες κλινικές παραμέτρους, όπως η διόγκωση των σιελογόνων αδένων, η ψηλαφητή πορφύρα, το φαινόμενο Raynaud, περιφερική νευροπάθεια, η πνευμονική και νεφρική συμμετοχή. Επίσης όλοι οι ασθενείς εξετάστηκαν για παρουσία αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANAs), αντισώματα έναντι DNA διπλής έλικας (ds-DNA-anti-double-stranded DNA), αντισώματα κατά των εκχυλίσμων πυρηνικών αντιγόνων -anti-ENA antibodies (anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-Scl-70, anti-Sm, anti-RNP), και παρουσία ρευματοειδούς παράγοντα (rheumatoid factor (RF)). Επίσης εξετάστηκαν τα επίπεδα των C3 και C4, το επίπεδο της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, η ηπατική λειτουργία, η νεφρική λειτουργία, έγινε μέτρηση κυττάρων ολικού αίματος και της ταχύτητας καθίζησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Ελήφθησαν βιοψίες από τους ελάσσονες σιελογόνους αδένες ασθενών με ΣΣ και ταξινομήθηκαν σύμφωνα με το focus score (διήθηση λεμφοκυττάρων/ 4 mm²) σε δυο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα (SS-I, n=13) τα αποτελέσματα της βιοψίας ήταν ≤ 2 , ενώ στη δεύτερη ομάδα (SS-II, n=10) > 2 .

Στο πίνακα που ακολουθεί αναφέρονται τα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών. Σε όλους τους ασθενείς το αποτέλεσμα της βιοψίας ήταν ≥ 1 . Κανένας από τους ασθενείς ή από την ομάδα ελέγχου που μελετήθηκε δεν είχε προηγούμενο ιστορικό λεμφώματος, ή μόλυνσης με ηπατίτιδα B, C, HIV, σαρκοείδωση ή χρήση φαρμάκων που σχετίζονται με συμπτώματα ξηρότητας (sicca).

Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε στοιχεία για ύπαρξη λεμφώματος κατά τη διάρκεια της μελέτης. Δείγματα ολικού ηπαρινισμένου αίματος όγκου 5-10 ml συλλέχθηκαν από κάθε ασθενή 2-4 φορές και από τους υγιείς εθελοντές μόνο μια φορά.

Από κάθε ασθενή του νοσοκομείου «άγιος Ανδρέας» και την ομάδα ελέγχου που συμμετείχε στη μελέτη, ελήφθη συγκατάθεση κατόπιν ενημέρωσης σύμφωνα με τη διακήρυξη του Helsinki σχετικά με τις δεοντολογικές αρχές για την ιατρική έρευνα σε ανθρώπους.

Πίνακας 1. Κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΣΣ και της ομάδας ελέγχου				
	Ολικοί ασθενείς (n=23)	SS-I (n=13)	SS-II (n=10)	Ομάδα ελέγχου (n=38)
Ηλικία σε έτη (Μέσος όρος)	58 (34 to 80)	58 (34-80)	58(37-70)	30 (25-40)
Αριθμός κριτηρίων για SS (μέσος όρος)	4 (3 to 6)	3(3-5)	4(4-6)	-
Μέση διάρκεια σε έτη των συμπτωμάτων ξηρότητας (μέσος όρος)	6 (1to20)	6(1-20)	6(1-10)	-
Βαθμολογία λεμφοκυτταρικής διήθησης σε ελάχιστονες σιελογόνους αδένες (μέσος όρος)	2.0(1-8)	1.2(1-2)	3.65(2.2-8)	-
Θετικός ρευματοειδής παράγοντας (%)	56.5	54	60	-
Anti-Ro(SSA) αντισώματα (%)	78	69	90	-
Anti-La(SSB)-αντισώματα (%)	43.5	31	60	-
Λευκοπενία(%)	13	0	30	-
Διόγκωση σιελογόνων	4	8	0	--

αδένων(%)				
Ψηλαφηη πορφύρα(%)	4	8	0	-
Φαινόμενο Raynaud (%)	13	15	10	-
Συμμετοχή πνευμόνων(%)	13	8	20	

SS-I και SS-II: Ασθενείς με ΣΣ με ήπια προς μέτρια και προχωρημένη αντίστοιχα προσβολή των ελάσσονων σιελογόνων αδένων αντίστοιχα.

Μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν πεπτίδια για συγκεκριμένους επίτοπους T κυττάρων των La/SSB αντιγόνων με δυο μεθόδους πρόβλεψης βασισμένες στη σύνδεση τους με τα MHC πεπτίδια τάξης II , το artificial neural network– ANN και το πρόγραμμα TERITOPE .

Οι επίτοποι που προέκυψαν και από τις δυο μεθόδους είναι το LaT1 (261-269 περιοχή του La/SSB): WIDFVRGAG, LaT3 (272-280 περιοχή του La/SSB): IILFKEKAK, LaT4 (77-90 περιοχή του La/SSB): AELMEISEDKTKIR και LaT6 (316-329 περιοχή του La/SSB): KKIIEDQQESLNKW.

Μς την χρήση πεπτιδίων χαρτογραφήθηκαν αντιγονικοί επίτοποι έναντι anti-La που χαρτογραφήθηκαν από τους κο Δεράου και κο Ματσούκα του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών.

Μονοκύτταρα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από ηπαρινισμένο αίμα από ασθενείς και την ομάδα ελέγχου με την βοήθεια της βαθμίδωσης φικόλης. Η φικόλη είναι συνθετική ουσία υψηλού μοριακού βάρους και αποτελεί πολυμερές της σακχαρόζης και της επιγλωροϋδρίνης. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται απομόνωση λεμφοκυττάρων από το περιφερικό αίμα με την φυγοκέντρηση πυκνότητας σε κλίση φικόλης (Ficoll), η οποία βασίζεται στο ότι τα λεμφοκύτταρα έχουν μικρότερη πυκνότητα από τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα. Η φικόλη έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από εκείνη των λεμφοκυττάρων, αλλά μικρότερη από αυτή των ερυθροκυττάρων και κοκκιοκυττάρων.

Κατόπιν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε ποικιλία συγκεντρώσεων των πεπτιδίων παρουσία ή απουσία μιτογόνου διέγερσης (PHA). Τα ποσοστά κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετρήθηκαν με το BrdU proliferation assay. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας και οι κυτταροκίνες IL-2, INF- γ , IL-4, IL-5, IL-10 και TGF- β μετρήθηκαν με τη μέθοδο ELISA. Τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη εμφανίζονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2: Αντιγονικοί επίτοποι La/SSB κυττάρων	
Περιοχές La/SSB	Αλληλουχία αμινοξέων
65-73	FNVIVEALS
77-90	AELMEISEDKTKIR
179-192	DLLILFKDDYFAKK
261-269	WIDFVRGAG
272-280	IILFKEKAK
316-329	KKIIEDQQESLNKW

Κύτταρα και καλλιέργειες

Τα κύτταρα πλύθηκαν δυο φορές με μέσο καλλιέργειας RPMI 1640 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) και καλλιεργήθηκαν σε RPMI 1640 που περιέχει 10% βόειο εμβρυϊκό ορό (Gibco BRL), 1% πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη, $\pm 10\mu\text{g/ml}/10^6$ κύτταρα φυτοαιμοσυγκολλητίνη -phytohaemagglutinine (PHA) (Sigma, St Louis, MI, USA) (CM) για 72 ώρες. Έπειτα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με 10 pg / ml, 100 pg / ml, 1 ng / ml, 10 ng / ml, 100 ng / ml, 1 μg / ml ή 10 μg / ml των πεπτιδίων.

Για τον καθαρισμό των κυττάρων, τα PBMC από ασθενείς και μάρτυρες την ομάδα ελέγχου επώαστηκαν O / N $\pm$ πεπτίδιο σε συγκέντρωση 10 ng πεπτιδίου /ml/ 10^6 κύτταρα. Για την απομόνωση των T λεμφοκυττάρων έγινε χρήση nylon wool ((G. Kisker GbR, Steinfurt, Germany).

Κυτταρομετρία ροής

Τα Τ κύτταρα στη συνέχεια αναλύθηκαν τη μέθοδο κυτταρομετρίας ροής-FACS και βρέθηκαν να είναι >95% CD3+T κύτταρα. Η κυτταρομετρία ροής είναι μια αυτοματοποιημένη, πολυπαραμετρική και ποσοτική μέθοδος μέτρησης και ανάλυσης των σημάτων σκεδασμού και φθορισμού που παράγονται, καθώς μία μονήρης κυτταρική διάταξη διέρχεται μπροστά από μία φωτεινή δέσμη LASER. Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Το αποτέλεσμα της κυτταρομετρικής ανάλυσης είναι μία πληθώρα μετρήσεων φθορισμού, καθώς και των δύο μετρήσεων πρόσθιου (Forward Scatter-FS) και πλάγιου (Side Scatter-SS) σκεδασμού, που εξαρτώνται από τα φυσικά χαρακτηριστικά κάθε κυττάρου.

Κατά την ανάλυση των δειγμάτων αφήνουμε να περάσουν τουλάχιστον 10.000 κύτταρα. Στο πρώτο παράθυρο διαχωρίζουμε τους πληθυσμούς των λεμφοκυττάρων, με βάση τον πρόσθιο και πλάγιο σκεδασμό. Για καθένα από τα δυο φθοριοχρώματα FITC και PE που χρησιμοποιούμε, χρησιμοποιούμε και τους αντίστοιχους ισοτυπικούς μάρτυρες (IgG-1FITC, IgG-1PE).

Τα CD3+CD25+ διαχωρίστηκαν από τα CD3+T κύτταρα με την χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων (Dynal A.S. Oslo, Norway). Τα CD4+CD25+ κύτταρα απομονώθηκαν από τα CD25+ κύτταρα χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο. Τα υπόλοιπα CD3+CD25- κύτταρα μετά την επιλογή των CD25+ κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των CD8+CD25- κυττάρων με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια όπως περιγράφηκε. Τα κύτταρα που απομονώθηκαν καλλιεργήθηκαν στη συνέχεια για 72 ώρες. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους-80oC.

Κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Για να εκτιμηθεί η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων, τα κύτταρα περιφερικού αίματος που ελήφθησαν από τους ασθενείς και από την ομάδα ελέγχου καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία μιτογόνου διέγερσης (PHA) και με διάφορες συγκεντρώσεις των πεπτιδίων. Για την ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μια BrdU χρωματομετρική ανοσοδοκιμή χρησιμοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Γερμανία).

Ανοσοφαινοτυποποίηση της επιφάνειας των κυττάρων και ανάλυση FACS

Κύτταρα περιφερικού αίματος ελήφθησαν από ασθενείς με ΣΣ και την ομάδα ελέγχου και υποβλήθηκαν σε κυτταρική φαινοτύπιση και ανάλυση FACS ex vivo ή μετά από επώαση με το πεπτίδιο. Για τον προσδιορισμό του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε Foxp3 PE-Cy5 αρουραίου (e-Bioscience, San Diego, CA, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών.

Λόγω της διαδικασίας που έχουν υποστεί τα κύτταρα για τη διάτρηση της μεμβράνης κατά την ανάλυση δεν είναι τις περισσότερες φορές ορατός ο πληθυσμός των μονοκυττάρων, χωρίς αυτό να επηρεάζει την ανάλυση μας δεδομένου ότι ο πληθυσμός που μελετάμε και στον οποίο εντοπίζονται τα T ρυθμιστικά κύτταρα είναι ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων.

Κύτταρα επίσης επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 4 ° C με CD4-FITC/CD25-PE με φθορίζουσα σήμανση, με μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs). Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι καθαρά αντισώματα με προκαθορισμένη ειδικότητα. Εμφανίζουν ειδικότητα σε ένα μόνο επίτοπο και έχουν δυνατότητα να παράγονται επ' άπειρον. Τα μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε συνθήκες κορεσμού σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών (BD, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA).

Στη συνέχεια, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το σύστημα αντιδραστηρίων Immunoprep reagent system of Coulter EPICS και την αυτοματοποιημένη CoulterQ-Prep EPICS Immunology Workstation (Miami FL).

Οι αρνητικοί έλεγχοι αποτελούνταν από τις διαδοχικές επωάσεις όπως αναφέρθηκαν παραπάνω, υποκαθιστώντας ειδικά αντισώματα με ισότυπο άσχετο σε ισοδύναμες συγκεντρώσεις. Τα κύτταρα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας ένα Coulter EPICS XL-MCL. Τα κυτταρικά θραύσματα εξαιρέθηκαν από την ανάλυση. Για κάθε δείγμα 5.000 βιώσιμων κυττάρων συλλέχθηκαν δεδομένα τα οποία στη συνέχεια επεξεργάστηκαν με χρήση του λογισμικού EPICS-XL2. Όλα τα θετικά αποτελέσματα ελήφθησαν αφαιρώντας το ποσοστό των αρνητικών ελέγχων.

ELISA

Υπερκείμενα από καλλιέργειες κυττάρων των PBMC ή καθαρές ομάδες κυττάρων, συλλέχθηκαν μετά από 72 ώρες καλλιέργειας, όπως περιγράφεται ανωτέρω, με φυγοκέντρηση στις 12000 rpm στους 4 ° C για 1 λεπτό και φυλάχθηκαν στους -30°C.

Η ανάλυση με τη μέθοδο Elisa πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Η ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) είναι μία μορφή αναλυτικής βιοχημικής δοκιμής η οποία χρησιμοποιεί ένα είδος ετερογενούς και στερεάς φάσης ενζυματικής ανοσοανίχνευσης (EIA) με σκοπό την ανίχνευση μίας ουσίας, συνήθως ενός αντιγόνου, σε ένα υγρό δείγμα και προϋποθέτει τουλάχιστον ένα αντίσωμα με εξειδίκευση σε ένα συγκεκριμένο αντιγόνο.

Το δείγμα με έναν άγνωστο αριθμό αντιγόνων ακινητοποιείται πάνω σε μία στερεή βάση/πλάκα και έπειτα προστίθεται το κατάλληλο αντίσωμα ανίχνευσης σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα. Το αντίσωμα αυτό με τη σειρά του αναγνωρίζεται από δεύτερο αντίσωμα ('immuno') το οποίο είναι συνδεδεμένο με ένζυμο ('enzyme-linked'). Στη συνέχεια το υπόστρωμα αντιδρά με το ένζυμο για να παράγει προϊόν, συνήθως έγχρωμο.

Τα βασικά βήματα της είναι:

A. το αντίσωμα Ab αντιδρά με το αντιγόνο Ag και με το επισημασμένο αντιγόνο Ag*. $Ag + Ag^* + Ab \leftrightarrow AgAb + Ag^*Ab$.

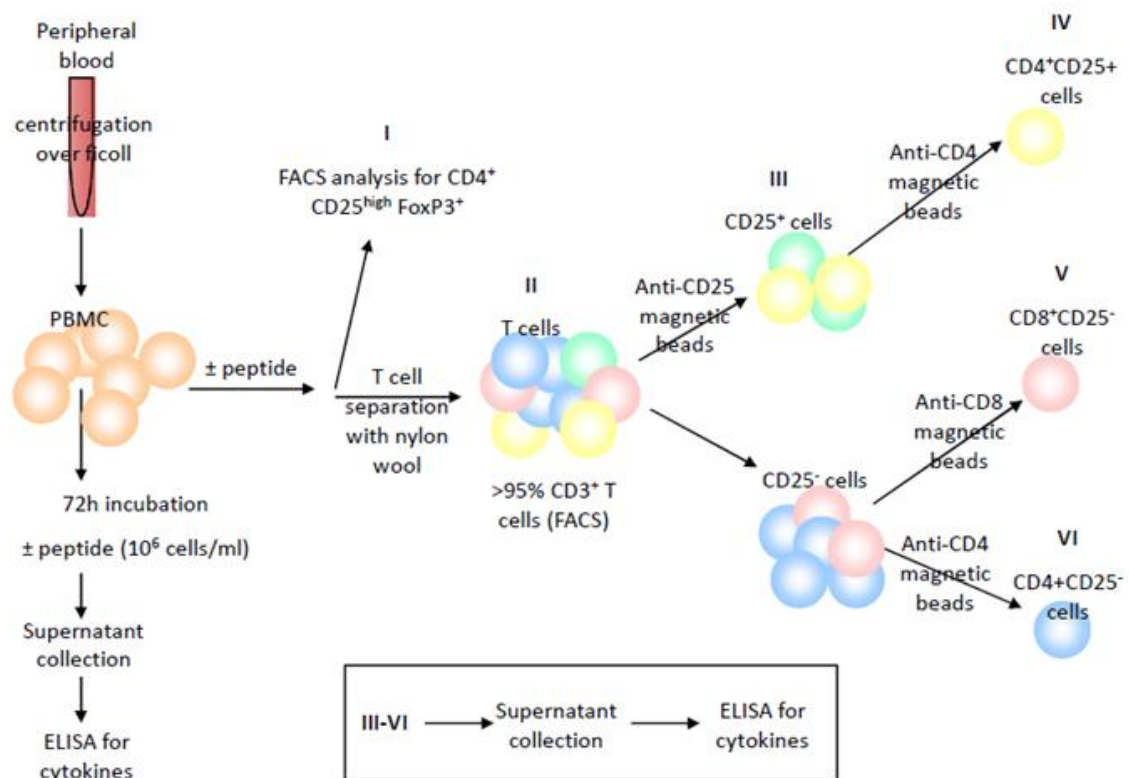
B. γίνεται διαχωρισμός των ελεύθερων αντιγόνων από τα δεσμευμένα.

Γ. προστίθεται υπόστρωμα και παράγεται χρωματική αντίδραση

Δ. ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης φωτομετρικά.

Ε. υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις του αντιγόνου με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης

Τα ακόλουθα κιτ Elisa χρησιμοποιήθηκαν: ανθρώπινη (h) IL-4, h-IL-5 και h-IL-10 ELISA από την Diaclone (Γαλλία), h-TGF-β ELISA από την R&D Systems Quantikine™ (Minneapolis, USA) και h - IL-2 και h-IFN-γ Elisa από την Anogen (Ontario, Καναδάς).



Εικόνα 12: Περιγραφή της μεθόδου διαχωρισμού και της καλλιέργειας για τον καθαρισμό των κυττάρων

Αποτελέσματα

Κυτταρικός πολλαπλασιασμός παρουσία πεπτιδίων

Η παρουσία των πεπτιδικών αναλόγων δεν είχε κάποιο αποτέλεσμα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στο περιφερικό αίμα των υγιών είτε παρουσία είτε απουσία μιτογόνου διέγερσης (PHA).

Όταν τα πεπτίδια προστέθηκαν σε PBMC ασθενών παρουσία PHA, τότε ανεστάλη ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, και οι συγκεντρώσεις των πεπτιδίων από 100pg/ml έως 100ng/ml ήταν οι πιο αποτελεσματικές. (Το LaT1 ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό σε συγκέντρωση 100 ng/ml , το LaT3 σε 10 ng/ml, το LaT4 σε 1 ng/ml και το LaT6 σε 100 ng/ml) 100 pg/ml , το LaT3 σε 10 ng/ml, το LaT4 σε 1 pg/ml και το LaT6 σε 100 ng/ml

Τα πεπτίδια δεν επηρέασαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στους ασθενείς σε απουσία μιτογόνου διέγερσης. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία LaT4 10ng/ml (βέλτιστη συγκέντρωση).

ELISA

Μετά από καλλιέργεια 72 h σε δραστική συγκέντρωση, συλλέχθηκαν υπερκείμενα από PBMC και μετρήθηκε η συγκέντρωση για τις ακόλουθες κυτταροκίνες: IL-4, IL-10, TGF-β, IL-5, IL-2 και IFN-γ

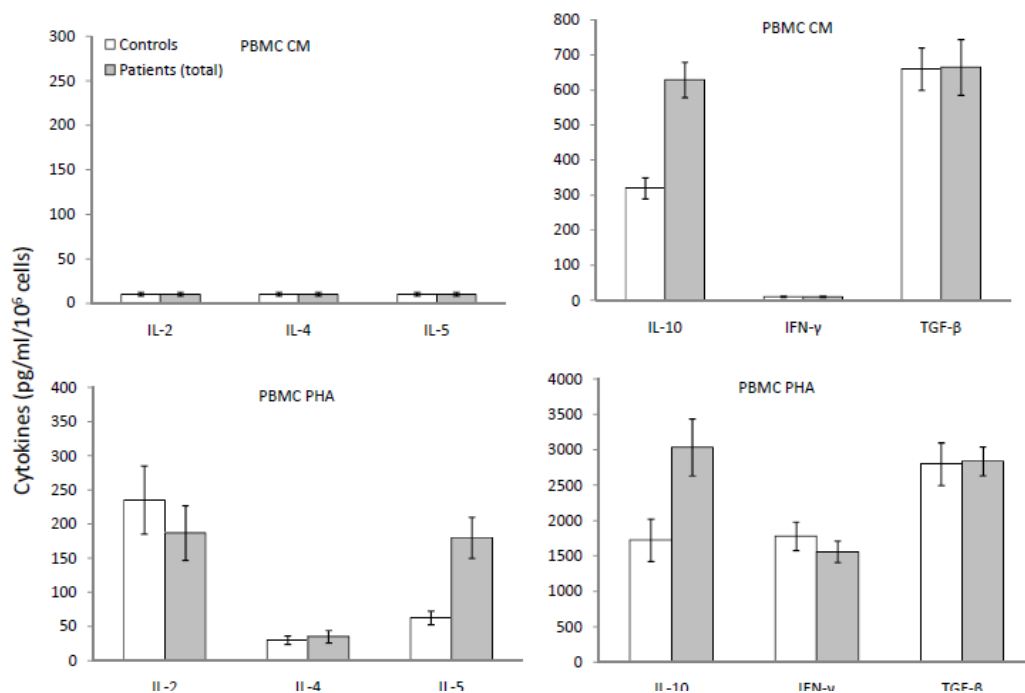
Οι IL-4, IL-2, IFN-γ και IL-5 δεν ανιχνεύθηκαν στα υπερκείμενα τόσο στους υγιείς δότες όσο και στους ασθενείς, είτε τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μόνα ή υπό την παρουσία των πεπτιδίων

Η IL-10 και ο TGF-β, έδειξαν μια διαφοροποίηση στην έκκριση τους σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Οι κυτταροκίνες αυτές είναι χαρακτηριστικές της Th2 απόκρισης και παίζουν ρόλο στην ρυθμιστική δράση των T κυττάρων

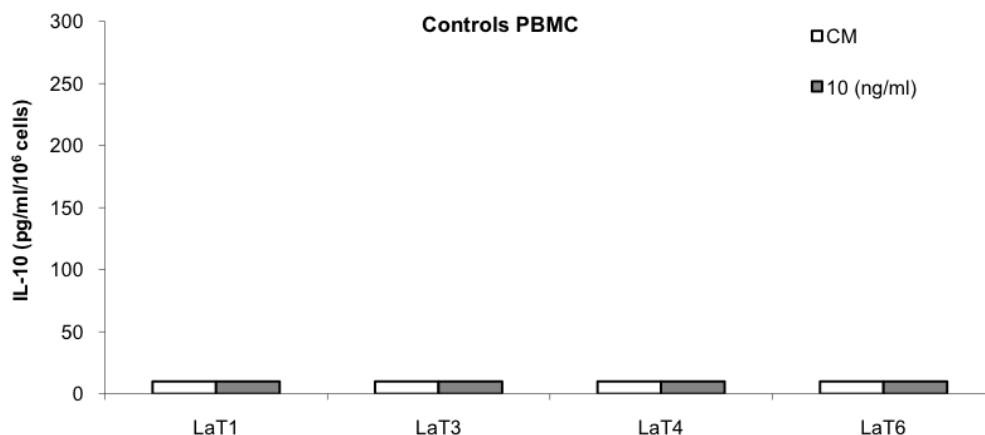
Η παρουσία των πεπτιδίων δεν επηρέασε την έκκριση της IL-10 σε υγιείς δότες.

Ωστόσο στους ασθενείς η έκκριση IL-10 επάγεται σημαντικά από την παρουσία των πεπτιδικών αναλόγων. Η IL-10 παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ΣΣ σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν μόνα ή υπό την παρουσία PHA. Σε υγιείς δότες, η παρουσία των πεπτιδίων δεν επηρέασε την έκκριση της IL-10. Στους ασθενείς με ΣΣ, η έκκριση IL-10 επάγεται σημαντικά από την παρουσία των πεπτιδικών αναλόγων

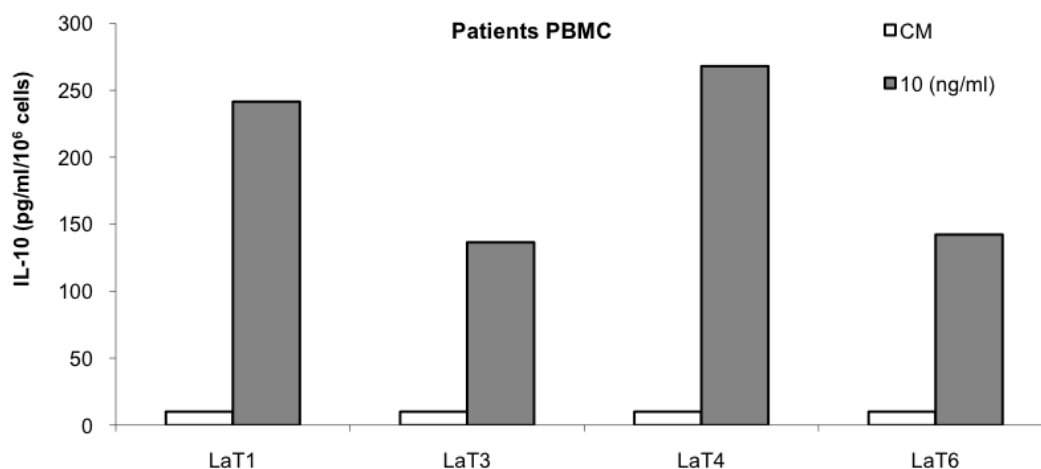
Σε καλλιέργειες κυττάρων μαρτύρων, η έκκριση του TGF- β δεν άλλαξε σημαντικά από την παρουσία των πεπτιδικών αναλόγων. Αντίθετα, σε καλλιέργειες κυττάρων ασθενών με ΣΣ, η έκκριση του TGF- β άλλαξε σημαντικά από την παρουσία των πεπτιδικών αναλόγων



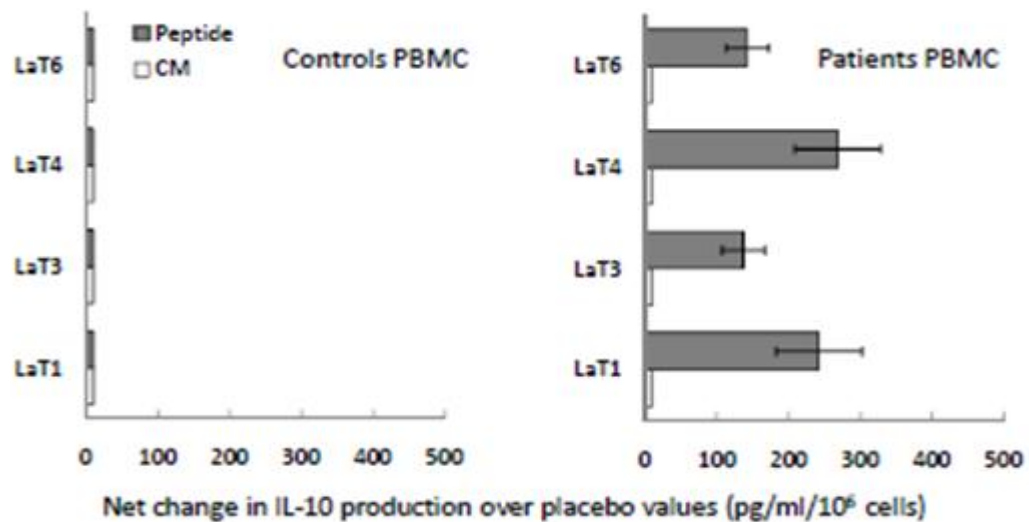
Σχήμα 1: Αποτελέσματα Elisa σε PBMC: Οι IL-4, IL-2 και IFN- γ δεν ανιχνεύθηκαν στα υπερκείμενα τόσο στους υγιείς δότες όσο και στους ασθενείς σε CM. Η IL-10 παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ μαρτύρων και ασθενών με ΣΣ σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν μόνα ή υπό την παρουσία PHA (PBMC: Peripheral blood mononuclear cells, PHA: phytohaemagglutinine, CM: culture medium)



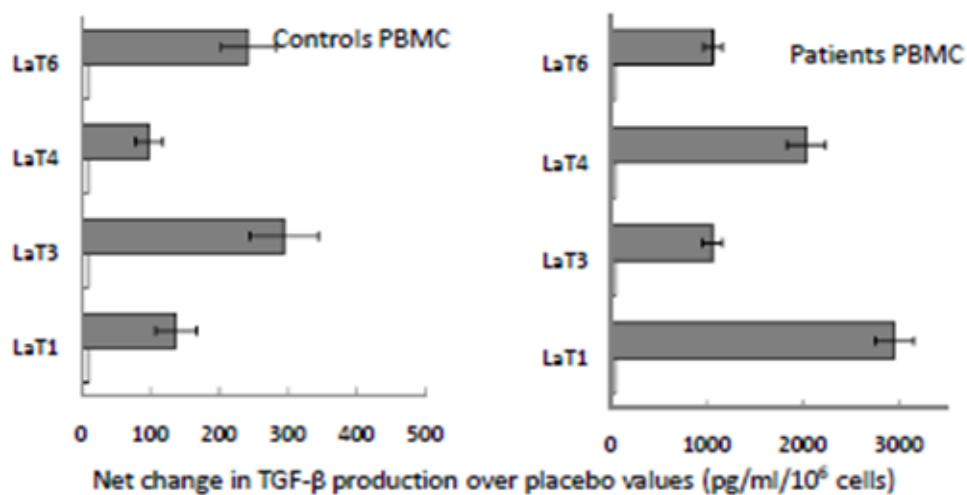
Σχήμα 2: Αποτελέσματα από την προσθήκη πεπτιδίων LaT1, LaT3, LaT4 και LaT6 στην έκκριση της IL-10 στο περιφερικό αίμα της ομάδας ελέγχου. Σε υγιείς δότες, η παρουσία των πεπτιδίων δεν επηρέασε την έκκριση της IL-10 σε κύτταρα PBMC



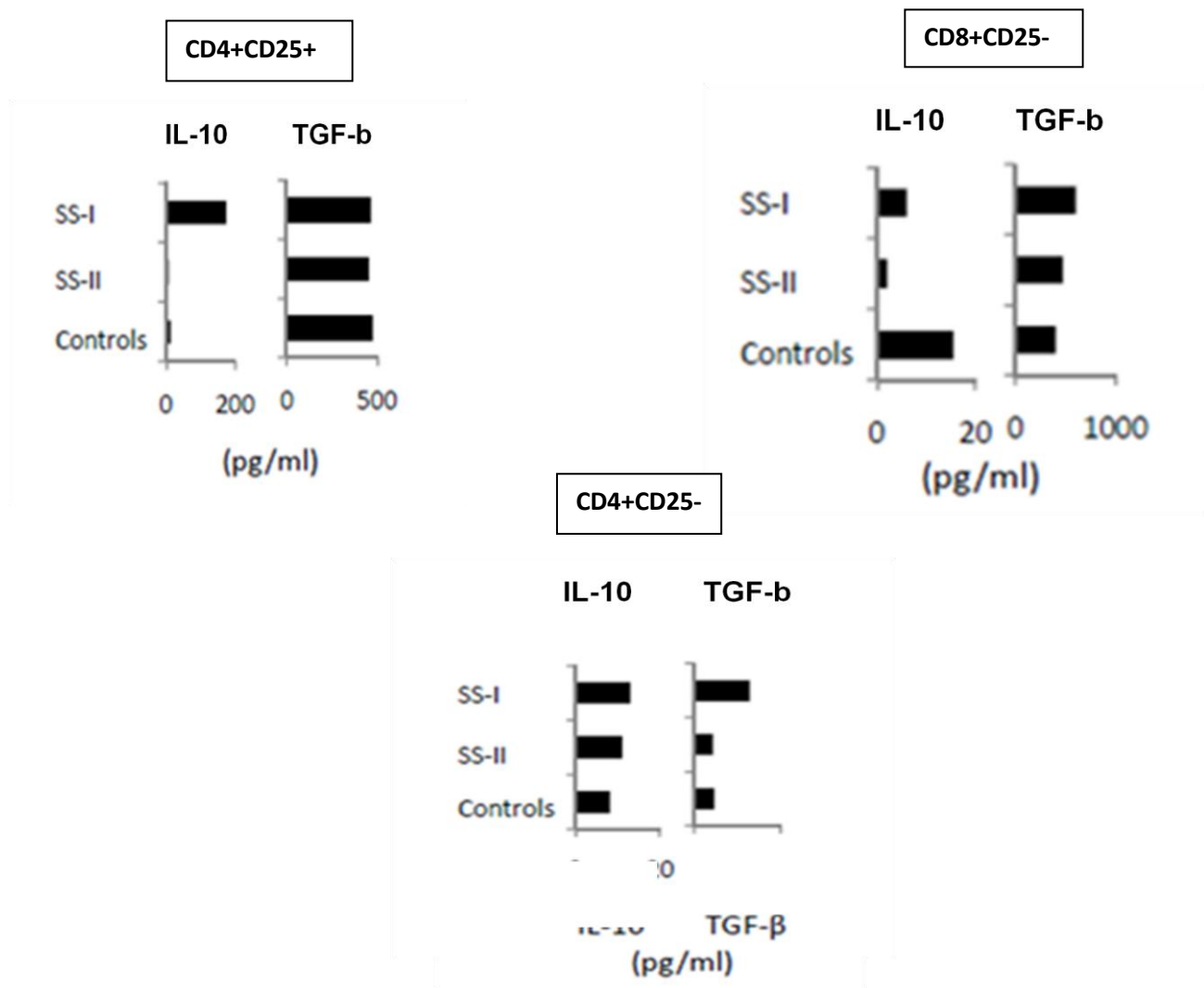
Σχήμα 3: Αποτελέσματα από την προσθήκη πεπτιδίων LaT1, LaT3, LaT4 και LaT6 στην έκκριση της IL-10 στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΣΣ. Στους ασθενείς με ΣΣ, η έκκριση IL-10 επάγεται σημαντικά από την παρουσία των πεπτιδικών αναλόγων σε κύτταρα PBMC



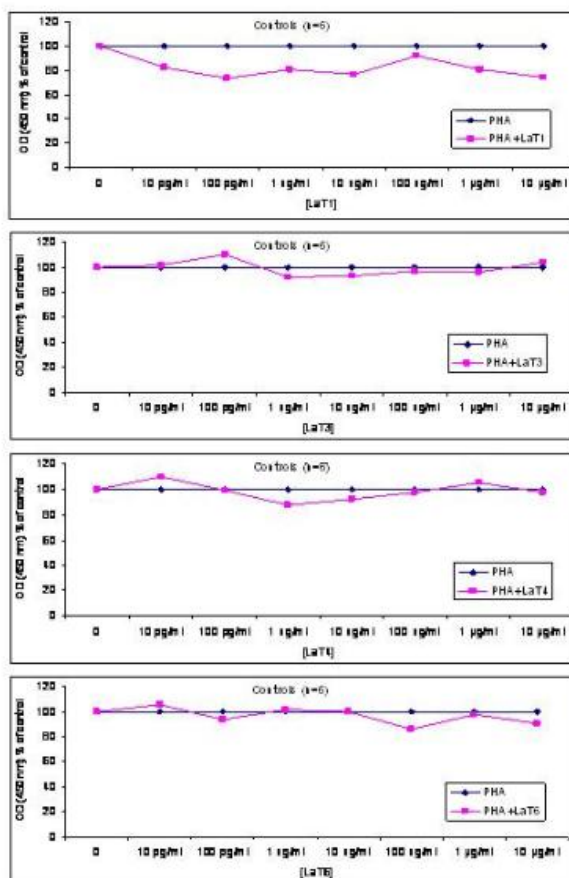
Σχήμα 4: Αποτελέσματα από την προσθήκη πεπτιδίων LaT1, LaT3, LaT4 και LaT6 στην έκκριση της IL-10 στο περιφερικό αίμα ομάδας ελέγχου και ασθενών με ΣΣ. **Η IL-10 αυξάνεται παρουσία πεπτιδίων σε κύτταρα PBMC σε ασθενείς με ΣΣ**



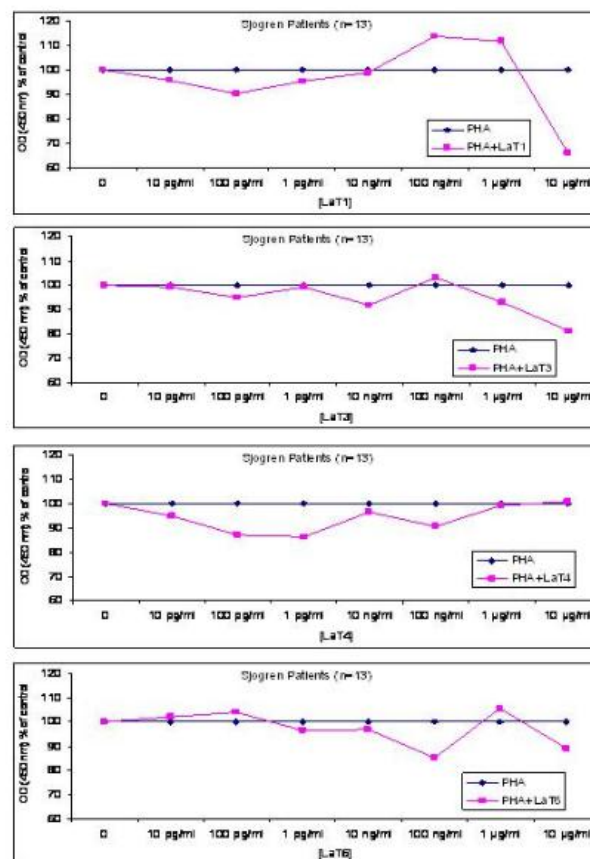
Σχήμα 5: Αποτελέσματα από την προσθήκη πεπτιδίων LaT1, LaT3, LaT4 και LaT6 στην έκκριση TGF-β στο αίμα ομάδας ελέγχου και ασθενών με ΣΣ. **Η αύξηση του TGF-β παρουσία πεπτιδίων σε PBMC σε ασθενείς με ΣΣ είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με την αύξηση που παρουσιάζεται στην ομάδα ελέγχου**



Σχήμα 6: Αποτελέσματα IL-10 και TGF- β σε υποπληθυσμούς T λεμφοκυττάρων a) CD4+CD25+Tregs b) κυτταροτοξικά CD8+CD25- c) δραστικά CD4+CD25-



Σχήμα 6: Αποτελέσματα φασματοσκοπίας: Συγκεντρώσεις πεπτιδίων, ομάδα ελέγχου



Σχήμα 7: Αποτελέσματα φασματοσκοπίας: Συγκεντρώσεις πεπτιδίων, ασθενείς με ΣΣ

Αποτελέσματα: Κυτταρομετρία ροής

Πίνακας 3: Φαινοτυπική ανάλυση των Τα βοηθητικών κυττάρων σε ασθενείς με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (controls) σε καλλιέργεια ± LaT4 πεπτιδίο % (CM culture medium; +LaT4 καλλιέργεια σε 10 ng/ml πεπτιδίου σε CM)

	Μάρτυρες			SS-I			SS-II		
	CM	CM + LaT4	% change	CM	CM + LaT4	% change	CM	CM + LaT4	% change
CD4+	54.70	54.70	0.0	37.25	31.35	-15.8	34.94	37.90	+8.5
CD4+CD25+	1.50	1.70	+11.8	8.20	10.00	+22.0	4.52	5.85	+29.4
CD4+CD25+FoxP3+	1.06	1.14	+7.5	5.28	6.87	+30.1	2.54	3.02	+18.9
CD4+CD25+FoxP3-	0.44	0.44	0	2.94	3.11	+5.8	1.99	2.83	+42.2
CD4+CD25-	53.88	53.88	0	34.16	33.51	-2.0	33.35	32.91	-1.32
CD4+CD25-FoxP3+	0.65	0.65	0	4.05	1.51	-62.7	1.41	0.60	-57.4
CD4+CD25-FoxP3-	53.23	53.23	0	31.43	32.61	+3.7	31.96	32.75	+2.47

Τα CD4+ δίνονται ως % ποσοστό των λεμφοκυττάρων, ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα ως % ποσοστό των CD4+ κυττάρων.

Στον παραπάνω πίνακα φαίνεται η ανάλυση των T βοηθητικών κυττάρων σε ασθενείς με σύνδρομο Sjogren σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε καλλιέργεια $\pm$ **LaT4 πεπτιδίο%**. Τα CD4+CD25+ αυξήθηκαν σε ΣΣΙ και ιδιαίτερα σε ΣΣΙΙ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ομοίως τα CD4+CD25+FoxP3+ ήταν πιο αυξημένα στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην προσθήκη του πεπτιδίου ιδιαίτερα σε ασθενείς ΣΣΙ.

Τα CD4+CD25-FoxP3+ μειώθηκαν σημαντικά παρουσία πεπτιδίου σε ΣΣ τύπου 1 και ΣΣ τύπου 2. Τα CD4 + CD25 + T-κύτταρα παρά το χαμηλό ποσοστό τους, σε σχέση με άλλες ομάδες κυττάρων, φάνηκαν να έχουν τη μεγαλύτερη συνεισφορά στην έκκριση της IL-10 στην ομάδα των ασθενών. Τα CD4 + CD25- εκκρίνουν σε υψηλό ποσοστό TGF-b σε ασθενείς με ΣΣ κυρίως ΣΣΙ.

Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε αν υπάρχει συγκεκριμένο προφίλ κυτταροκινών σε ασθενείς με ΣΣ και πως αυτό μπορεί να τροποποιηθεί παρουσία πεπτιδίων. Μελετήθηκε επίσης η συμμετοχή κυττάρων και ιδιαίτερα των T ρυθμιστικών στην αλλαγή του μοτίβου έκκρισης κυτταροκινών

Η κυτταρική ανοσοφαινοτύπιση και η ανάλυση με FACS έδειξαν αύξηση του ποσοστού των CD4/CD25+ κυττάρων στους ασθενείς με σύνδρομο Sjogren, τόσο σε SSI όσο και σε SSII, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης η ολονύχτια διέγερση με το πεπτιδικό ανάλογο LaT4, οδήγησε σε αύξηση των CD4/foxp3.

Το αυξημένο ποσοστό των κυττάρων CD4+CD25+ T σε συνδυασμό με τον κατασταλτικό τους ρόλο δείχνει ότι στους ασθενείς με σύνδρομο Sjogren ενεργοποιείται ως ανοσορυθμιστικός μηχανισμός αντιρροπιστική αντίδραση για τον περιορισμό της φλεγμονής η οποία ωστόσο δεν είναι αποτελεσματική για την πρόληψη της εν εξελίξει αυτοάνοσης πάθησης..

Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι ο ανοσοκατασταλτικός ρόλος των T ρυθμιστικών κυττάρων μπορεί να είναι αποτελεσματικός στα αρχικά στάδια της νόσου αλλά σε εγκατάσταση της χρόνιας φλεγμονής και σε πιο προχωρημένα στάδια αδυνατούν εκτελέσουν τον ρόλο τους. Πιο συγκεκριμένα ενδέχεται τελικά να βλάπτουν καθώς μπορούν να καταστέλλουν μια αποτελεσματική ανοσολογική απόκριση. Τελικά, θα μπορούσε τελικά η αύξηση των T ρυθμιστικών κυττάρων να παίζει ρόλο και στην αιτιοπαθογένεια της νόσου, αφού οι ασθενείς παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά σε σχέση με τους υγιείς.

Ωστόσο, οι μελέτες για τα Tregs στους ασθενείς με ΣΣ παρουσιάζουν αντιφατικά αποτελέσματα. Ο Gottenberg μαζί με τους συνεργάτες του, ανέφεραν ότι οι ασθενείς με ΣΣ παρουσίαζαν αύξηση στα ποσοστά των CD4 + CD25 + T κυττάρων στο περιφερικό αίμα (Gottenberg et al., 2005). Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι υπάρχει αύξηση των κυττάρων Treg σε φλεγμονώδεις περιοχές σε αυτοάνοσες διαταραχές.

Ενδεχομένως τα Treg κύτταρα που συγκεντρώνονται τοπικά στο σημείο της φλεγμονής να παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων. Συσσώρευση αυτών των κυττάρων σε ιστούς στόχους του ΣΣ θα μπορούσε να αποτελέσει αρνητικό σύστημα ανάδρασης, σε μια προσπάθεια αναστολής των αυτοδραστικών T κυττάρων στους σιελογόνους αδένες. Ο Sarigul με τους συν., βρήκαν ότι η έκφραση του CD25 σε CD4 (+) T κύτταρα στο περιφερικό αίμα ασθενών με πΣΣ ήταν σημαντικά υψηλότερη από ό, τι στους υγιείς. Με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού φάνηκε ότι τα FoxP3 (+) Treg κύτταρα ήταν συγκεντρωμένα στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με πρωτοπαθές ΣΣ και ότι υπήρχε θετική συσχέτιση με την διήθηση στον αδένα, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα φυσικά ρυθμιστικά T-κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του ΣΣ (Sarigul et al., 2010). Επιπλέον, τα διεισδύοντα CD4 + T κύτταρα στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με ΣΣ εξέφραζαν κυρίως IL-17, και τα επίπεδα της IL-17 αυξάνονταν προοδευτικά με το focus score, όπως τα ποσοστά των FoxP3 + κυττάρων (Abdulahad, Botts, & Kallenberg, 2011).

Σε αντίθεση, άλλες μελέτες ανέφεραν μειωμένα ποσοστά των CD4 + CD25 + T κυττάρων στο περιφερειακό αίμα και επίσης στους σιελογόνους αδένες των ασθενών με ΣΣ (Li et al., 2007) (M.-F. Liu, Lin, Weng, & Weng, 2008). Ο Liu και συν., υπέθεσαν ότι η μείωση αυτή θα μπορούσε να εξηγηθεί από μια ελαττωματική παραγωγή των CD4+CD25+ T κυττάρων (MF Liu, Lin, Weng, και Weng, 2008). Οι Χριστοδούλου και συν., έδειξαν ότι σε ελάσσονες σιελογόνους αδένες, τα κύτταρα Foxp3 (+) συσχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με τη βαρύτητα της νόσου, με τα υψηλότερα και χαμηλότερα ποσοστά να παρατηρούνται σε μέτριες και ήπιες αλλοιώσεις των ελάσσονων σιελογόνων αδένων αντίστοιχα ενώ σε προχωρημένες βλάβες δεν υπήρξε συσχέτιση λόγω της καταστροφής του αδένα. (Christodoulou, Kapsogeorgou, Moutsopoulos, & Moutsopoulos, 2008).

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε αν υπάρχει συγκεκριμένο προφίλ κυτταροκινών σε ασθενείς με ΣΣ και πως αυτό μπορεί να τροποποιηθεί παρουσία πεπτιδίων. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το προφίλ των κυτταροκινών ex vivo σε ασθενείς με ΣΣ δεν φάνηκε να διαφέρει από την υγιή ομάδα έλεγχου όσον αφορά τις IL-4, TGF-β, IL-5, IL-2 και IFN-γ, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές κυτταροκίνες τύπου 1 και τύπου 2 ανοσιακής απάντησης.

Υπό την επίδραση ερεθίσματος υπήρξε τροποποίηση στην έκκριση κυτταροκινών μόνο σε ασθενείς όσον αφορά την IL-10 και τον TGF- β στην περιφέρεια. Η IL-10 και ο TGF- β παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταστολή από Tregs και στην πρόληψη αυτοανοσίας. Η αύξηση της IL-10 σε ΣΣ μπορεί να συμβάλλει στην παθογένεια καθώς συμβάλλει στην ενεργοποίηση και στην διαφοροποίηση των B κυττάρων συμβάλλοντας στην διάσπαση αυτοανοχής και στη έναρξη αυτοάνοσης απόκρισης.

Η IL-10 και ο TGF- β βρέθηκαν να διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην καταστολή που προκαλείται από τα επαγωγίμα T ρυθμιστικά κύτταρα. In vitro ευρήματα υποδεικνύουν τον ρόλο αυτών των κυτταροκινών στην πρόληψη των αυτοάνοσων αντιδράσεων. Έχει παρατηρηθεί ότι τα ρυθμιστικά T-κύτταρα που απομονώθηκαν από IL-10 knockout ποντίκια στερούνται την εγγενή ικανότητα να προστατεύουν τους ποντικούς με ανοσοανεπάρκεια από την εκδήλωση κολίτιδας, ενώ, η θεραπεία με αντισώματα κατά του υποδοχέα της IL-10 επιτάχυνε την απόρριψη μοσχεύματος. Τα ποντίκια με έλλειψη του TGF- β αναπτύσσουν αυτοανοσα σύνδρομο, ενώ αντισώματα έναντι του TGF- β καταργούν την μεσολαβούμενη από τα ρυθμιστικά κύτταρα, καταστολή της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (Abdulahad, Boots, & Kallenberg, 2011)

Η αυξημένη παραγωγή της IL-10 σε ασθενείς με ΣΣ μπορεί να συνεισφέρει στην παθογένεια της νόσου, αφού είναι γνωστό ότι διευκολύνει την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των αυτοαντισωμάτων από τα B κύτταρα. Όλες αυτές οι αλλαγές συμβάλλουν στην διάσπαση της αυτο-ανοχής και την έναρξη της αυτοάνοσης διαδικασίας. Ωστόσο, η IL-10 συμμετέχει και σε άλλες λειτουργίες του ανοσοποιητικού όπως η προς τα κάτω ρύθμιση της ανοσολογικής δραστηριότητας και αναστολή της φλεγμονώδους αντίδρασης, τα οποία θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στην παθογένεια του ΣΣ.

Βιβλιογραφία

Καραϊσκος Α (2010). Διερεύνηση της συμβολής της ψυχικής καταπόνησης (stress) στην εκδήλωση του συνδρόμου Sjogren, Διδακτορική διατριβή, Αθήνα

Ψαρρά Α. Κυτταροκίνες - Γενικά χαρακτηριστικά

Abdulahad W. H., Kroese F. G. M., Vissink A., & Bootsma H. (2012). Immune regulation and B-cell depletion therapy in patients with primary Sjögren's syndrome. *Journal of Autoimmunity*.

Abdulahad W. H., Boots A. M. H., & Kallenberg C. G. M. (2011). FoxP3+ CD4+ T cells in systemic autoimmune diseases: the delicate balance between true regulatory T cells and effector Th-17 cells. *Rheumatology (Oxford, England)*, 50(4), 646–56. doi:10.1093/rheumatology/keq328

Agmon-Levin N, Kivity S, Tzioufas AG, López Hoyos M, Rozman B, Efes I, Shapira Y, Shamis A, Amital H, Youinou P, Shoenfeld Y (2012). Low levels of vitamin D are associated with neuropathy and lymphoma among patients with Sjögren's syndrome. *J Autoimmun*, 39:234–239

Alamanos Y., Tsifetaki N., Voulgari PV, Vanetsanopoulou Al., Siozos C., Drosos A (2006). Epidemiology of primary Sjogren's syndrome in Northwest Greece, 1982-2003. *Rheumatology*, 45: 187-191

Alonso R., Buors C., Le Dantec C., Hillion S., Pers J.-O., Saraux A., Renaudineau Y. (2010). Aberrant expression of CD6 on B-cell subsets from patients with Sjögren's syndrome. *Journal of Autoimmunity*, 35(4), 336–41. doi:10.1016/j.jaut.2010.07.005

Alunno A., Nocentini G., Bistoni O., Petrillo M. G., & Bocci E. B. (2012). T-cell subset in the peripheral blood of patients with primary Sjögren ' s syndrome : correlation with disease activity, 64(5), 293–298.

Alunno A., Bistoni O., Bartoloni E., Caterbi S., Bigerna B., Tabarrini A., Gerli R. (2012), IL-17-producing CD4-CD8- T cells are expanded in the peripheral blood, infiltrate salivary glands and are resistant to corticosteroids in patients with primary Sjogren's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201511

Alunno A., Carubbi F., Bistoni O., Caterbi S., Bartoloni E., Bigerna B., Gerli R. (2014). CD4(-)CD8(-) T-cells in primary Sjögren's syndrome: Association with the extent of glandular involvement. *Journal of Autoimmunity*, 6–11. doi:10.1016/j.jaut.2014.01.030

Amador-Patarroyo M. J., Arbelaez J. G., Mantilla R. D., Rodriguez-Rodriguez A., Cárdenas-Roldán J., Pineda-Tamayo R., Anaya J.-M. (2012). Sjögren's syndrome at the crossroad of polyautoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 39(3), 199–205. doi:10.1016/j.jaut.2012.05.008

Ambrosi A, Salomonsson S, Eliasson H, Zeffer E, Skog A, Dzikaite V, Bergman G, Fernlund E, Tingström J, Theander E, Rydberg A, Skogh T, Öhman A, Lundström U, Mellander M, Winqvist O, Fored M, Ekbom A, Alfredsson L, Källberg H, Olsson T, Gadler F, Jonzon A, Kockum I, Sonesson SE, Wahren- Herlenius M (2012) Development of heart block in children of SSA/SSB- autoantibody-positive women is associated with maternal age and displays a season-of-birth pattern. *Ann Rheum Dis* 71:334–340.

Anagnostopoulos I., Zinzaras E., Alexiou I., Papathanasiou A. a, Davas E., Koutroumpas A., Sakkas, L. I. (2010). The prevalence of rheumatic diseases in central Greece: a population survey. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 11, 98. doi:10.1186/1471-2474-11-98

Anaya JM, Mantilla RD, Correa PA (2005). Immunogenetics of primary Sjogren's syndrome in Colombians. *Semin Arthritis Rheum.*34:735–43.

Annunziata P, De Santi L, Di Rezze S, Millefiorini E, Capello E, Mancardi G, et al.(2011). Clinical features of Sjogren's syndrome in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 124:109e14

Askenasy N., Kaminitz A., & Yarkoni S. (2008). Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmunity Reviews*, 7(5), 370–5. doi:10.1016/j.autrev.2008.03.001

Bacchetta R, Bigler M, Touraine JL, Parkman R, Tovo PA, Abrams J, et al. (1994) High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 179:493–502.

Baldini C., Talarico R., Tzioufas A. G., & Bombardieri S. (2012). Classification criteria for Sjogren's syndrome: a critical review. *Journal of Autoimmunity*, 39(1-2), 9–14. doi:10.1016/j.jaut.2011.12.006

Baldini C., Pepe P., Luciano N., Ferro F., Talarico R., Grossi S., Bombardieri, S. (2012). A clinical prediction rule for lymphoma development in primary Sjögren's syndrome. *The Journal of Rheumatology*, 39(4), 804–8. doi:10.3899/jrheum.110754

Barber LD, Pflugfelder SC, Tauber J, Foulks GN (2005). Phase III safety evaluation of cyclosporine 0.1% ophthalmic emulsion administered twice daily to dry eye disease patients for up to 3 years. *Ophthalmology.* 112(10):1790-1794.

Basset C., Pers J. O., Youinou P., & Pennec Y. L. (1997). Practical usefulness of IgA-containing immune complex determination in the serum of patients with primary Sjögren's syndrome. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 15(2), 157–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9196867>

Battaglia M., Gregori S., Bacchetta R., & Roncarolo, M.-G. (2006). Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Seminars in Immunology*, 18(2), 120–7. doi:10.1016/j.smim.2006.01.007

Bayetto K., & Logan R. M. (2010). Sjögren's syndrome: a review of aetiology, pathogenesis, diagnosis and management. *Australian Dental Journal*, 55 Suppl 1, 39–47. doi:10.1111/j.1834-7819.2010.01197.x

Belkaid Y., & Rouse B. T. (2005). Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature Immunology*, 6(4), 353–360. doi:10.1038/ni1181

Bennett C.L. et al. (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27, 20–21

Bertorello R., Cordone M. P., Contini P., Rossi P., Indiveri F., Puppo F., & Cordone G. (2004). Increased levels of interleukin-10 in saliva of Sjögren's syndrome patients. Correlation with disease activity. *Clinical and Experimental Medicine*, 4(3), 148–51. doi:10.1007/s10238-004-0049-9

Bettini M., & Vignali D. a a. (2009). Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, 21(6), 612–8. doi:10.1016/j.coi.2009.09.011

Bikker a, van Woerkom J. M., Kruize a a, Wenting-van Wijk M., de Jager W., Bijlsma J. W. J., ... van Roon J. a G. (2010). Increased expression of interleukin-7 in labial salivary

glands of patients with primary Sjögren's syndrome correlates with increased inflammation. *Arthritis and Rheumatism*, 62(4), 969–77. doi:10.1002/art.27318

Bikker A, Kruize AA, Wenting M, Versnel MA, Bijlsma JW, Lafeber FP, et al.(2012) Increased interleukin (IL)-7R α expression in salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome is restricted to T cells and correlates with IL-7 expression, lymphocyte numbers and activity. *Annals of the Rheumatic Diseases* 71:1027e33

Binard A., Le Pottier L., Devauchelle-Pensec V., Saraux A., Youinou P., & Pers J.-O. (2009). Is the blood B-cell subset profile diagnostic for Sjogren syndrome? *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68(9), 1447–52. doi:10.1136/ard.2008.096172

Bjerrum KB (1997): Keratoconjunctivitis sicca and primary Sjogren's syndrome in a Danish population aged 30-60 years. *Acta Oph- thalmol Scand* 75:281-286

Bluestone JA, Abbas AK (2003) : Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, 3:253-257.

Bluestone J. a, & Tang Q. (2005). How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Current Opinion in Immunology*, 17(6), 638–42. doi:10.1016/j.coi.2005.09.002

Bogdanos D. P., & Komorowski L. (2011). Disease-specific autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Clinica Chimica Acta*

Boras V. V., Cikes N., Lukac J., Cekić-Arambasin A., Virag M., & Bosnjak A. (2004). The significance of salivary and serum interleukin 6 and basic fibroblast growth factor levels in patients with Sjögren's syndrome. *Collegium Antropologicum*, 28 Suppl 2, 305–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15571105>

Boraschi D., Lucchesi D., Hainzl S., Leitner M., Maier E., Mangelberger D., ... Dinarello, C. A. (2011). IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *European Cytokine Network*, 22(3), 127–47. doi:10.1684/ecn.2011.0288

Bournia V., & Vlachoyiannopoulos P. G. (2012). Subgroups of Sjögren syndrome patients according to serological profiles, 39. doi:10.1016/j.jaut.2012.03.001

Boyer O, Saadoun D, Abriol J, Dodille M, Piette JC, Cacoub P, et al (2004). CD4 CD25 regulatory T cells deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood* 103(9):3428e30.

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA et al (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27:68_73.

Brusic V, Rudy G, Honeyman M, Hammer J, Harrison L (1998). Prediction of MHC class II-binding peptides using an evolutionary algorithm and artificial neural work. *Bioinformatics*, 14, 121-130

Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C (2003). Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4^C T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 33(1):215e23.

Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K.-J., Li L., Marinos N., Wahl S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by

TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1875–1886.

Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL (1994) . Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. Aug 26; 265(5176):1237– 1240.

Chiorini J. A., Cihakova D., Ouellette C. E., & Caturegli P. (2009). Sjögren syndrome: Advances in the pathogenesis from animal models. *Journal of Autoimmunity*, 33(3-4), 190–196.

Chisholm DM, Mason DK.(1968) Labial salivary gland biopsy in Sjogren's disease. *J Clin Pathol*;21:656e60.

Christensen LB, Petersen PE, Thorn JJ, Schiodt M (2001). Dental caries and dental health behavior of patients with primary Sjögren's syndrome. *Acta Odontol Scand* n:116-120.

Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM (2008). Foxp3+ T-regulatory cells in Sjogren's syndrome: correlation with the grade of the autoimmune lesion and certain adverse prognostic factors. *Am J Pathol* 173:1389–96.

Cornec D., Devauchelle-Pense V., Tobón G. J., Pers J.-O., Jousse-Joulin S., & Saraux A. (2012). B cells in Sjögren's syndrome: from pathophysiology to diagnosis and treatment. *Journal of Autoimmunity*, 39(3), 161–7. doi:10.1016/j.jaut.2012.05.014

Cornec D., Jamin C., & Pers J.-O. (2014). Sjögren's syndrome: Where do we stand, and where shall we go? *Journal of Autoimmunity*, 1–6. doi:10.1016/j.jaut.2014.02.006

Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli R, Mazzinghi B, et al (2003). Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood*. 102(12):4107–4114.

Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varela J (2003). Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 21(3):273e6.

Cruz-Tapias P, Rojas-Villarraga A, Maier-Moore S, Anaya JM. HLA and Sjögren's syndrome susceptibility. A meta-analysis of worldwide studies. *Autoimmunity Reviews*,

Curotto de Lafaille, M. a, & Lafaille, J. J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*, 30(5), 626–35. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.002

Daniels TE, Silverman Jr S, Michalski JP, Greenspan JS, Sylvester RA, Talal N. (1975) The oral component of Sjogren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*;39:875e85.

Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW (2004). Autoreactive T cells in healthy individuals. *J Immunol* 172:5967_72.

De Carolis S., Salvi S., Botta A., Garofalo S., Garufi C., Ferrazzani S., & De Carolis M. P. (2014). The impact of primary Sjogren's syndrome on pregnancy outcome: our series and review of the literature. *Autoimmunity Reviews*, 13(2), 103–7. doi:10.1016/j.autrev.2013.09.003

Draborg A. H., Duus K., & Houen G. (2013). Epstein-Barr virus in systemic autoimmune diseases. *Clinical & Developmental Immunology*, 535738. doi:10.1155/2013/535738

Dubois B, Chapat L, Goubier A, Kaiserlian D (2003). CD4+CD25+ T cells as key regulators of immune responses. *Eur J Dermatol* 13:111–6.

Elhai M., Avouac J., Kahan A., & Allanore Y. (2013). Systemic sclerosis at the crossroad of polyautoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 12(11), 1052–7. doi:10.1016/j.autrev.05.002

Fauchais A. L., Ouattara B., Gondran G., Lalloue F., Petit D., Ly K., et al. (2010). Articular manifestations in primary Sjogren's syndrome: clinical significance and prognosis of 188 patients. *Rheumatology*, 49(6), 1164-1172,

Fox R. I. (2005). Sjogren's syndrome. *Lancet*, 366(9482), 321-331

Fox RI, Kang H, Ando D, Abrams J, Pisa E. (1994) Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol*;152:5532–9.

Fox R. I., Adamson T. C., Fong S., Young C., & Howell F. V. (1983). Characterization of the phenotype and function of lymphocytes infiltrating the salivary gland in patients with primary Sjogren syndrome. *Diagnostic Immunology*, 1(3), 233–239.

Gabriel S. E., & Michaud K. (2009). Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Research & Therapy*, 11(3), 229. doi:10.1186/ar2669

Gasparotto D, De Vita S, De Re V, Marzotto A, De Marchi G, Scott CA, et al (2003). Extrasalivary lymphoma development in Sjogren's syndrome: clonal evolution from parotid gland lymphoproliferation and role of local triggering. *Arthritis Rheum* 48(11):3181e6.

Gavin M. A., Torgerson T. R., Houston E., DeRoos P., Ho W. Y., Stray-Pedersen A., ... Rudensky A. Y. (2006). Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17), 6659–64. doi:10.1073/pnas.0509484103

Gershon RK, Kondo K (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18:723_37.

Gershon RK, Kondo K (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21:903_14.

Ghafoor M. (2012). Sjögren's Before Sjögren: Did Henrik Sjögren (1899-1986) Really Discover Sjögren's Disease? *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, 11(3), 373–4. doi:10.1007/s12663-011-0303-0

Gomes P. D. S., Juodzbals G., Fernandes M. H., & Guobis Z. (2012). Diagnostic Approaches to Sjögren's syndrome: a Literature Review and Own Clinical Experience. *Journal of Oral & Maxillofacial Research*, 3(1), e3. doi:10.5037/jomr.2012.3103

Gottenberg JE, Guillevin L, Lambotte O, et al (2005) Club Rheumatismes et Inflammation (CRI). Tolerance and short term efficacy of rituximab in 43 patients with systemic autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis*. 64(6):913-920

Gottenberg JE, Lavie F, Abbed K, Gasnault J, Le Nevot E, Delfraissy JF, et al (2005). CD4 CD25high regulatory T cells are not impaired in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 24:235–42

Goules A. V, Tzioufas A. G., & Moutsopoulos H. M. (2014). Classification criteria of Sjögren's syndrome. *Journal of Autoimmunity*, 8–11. doi:10.1016/j.jaut.2014.01.013

Green J. E., Hinrichs S. H., Vogel J. & Jay G. (1989) Exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. *Nature* 341, 72–74

Greenspan J. S., Daniels T. E., Talal N., & Sylvester R. A. (1974). The histopathology of Sjogren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, 37(2), 217-229

Guellec D., Cornec D., Jousse-Joulin S., Marhadour T., Marcorelles P., Pers J.-O., ... Devauchelle-Pensec V. (2013). Diagnostic value of labial minor salivary gland biopsy for Sjögren's syndrome: a systematic review. *Autoimmunity Reviews*, 12(3), 416–20. doi:10.1016/j.autrev.2012.08.001

Haddad J, Deny P, Munz-Gotheil, et al (1992). Lymphocytic sialadenitis of Sjögren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *Lancet* 339(8789):321–3.

Haga HJ, Peen E (2007). A study of the arthritis pattern in primary Sjögren's syndrome. *Clinical and Experimental Rheumatology* 25(1):88–91).

Hammer J, Bono E, Gallazzi F, Belunis C, Nagy Z, Sinigaglia F (1994). Precise prediction of MHC class II- peptide interaction based on peptide side chain scanning. *J.Exp.Med.*, 180, 2353-2358.

Haugen AJ, Peen E, Hulten B, Johannessen AC, Brun JG, Halse AK, Haga HJ (2008): Estimation of the prevalence of primary Sjogren's syndrome in two age-different community-based populations using two sets of classification criteria: the Hordaland Health Study. *Scand J Rheumatol* 37:30-34

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057_61

Hudson M., Rojas-Villarraga A., Coral-Alvarado P., López-Guzmán S., Mantilla R. D., Chalem P., ... Anaya J.-M. (2008). Polyautoimmunity and familial autoimmunity in systemic sclerosis. *Journal of Autoimmunity*, 31(2), 156–9. doi:10.1016/j.jaut.2008.05.002

Hulkkonen J, Pertovaara M, Anttonen J, et al (2001). Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL6 gene in primary Sjogren's syndrome and correlate with the clinical manifestations of the disease. *Rheumatology (Oxford)* 40(6):656–61

Jara LJ, Navarro C, Brito-Zerón MDP, García-Carrasco M, Escárcega RO, Ramos- Casals M.(2007) Thyroid disease in Sjögren's syndrome. *Clin Rheumatol* 26: 1601e6

Jara L. J., Medina G., Saavedra M. A., Vera-Lastra O., & Navarro C. (2011). Prolactin and autoimmunity. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 40(1), 50–59. doi:10.1007/s12016-009-8185-3

Jin J.-O., Kawai T., Cha S., & Yu Q. (2013). Interleukin-7 enhances the Th1 response to promote the development of Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy in mice. *Arthritis and Rheumatism*, 65(8), 2132–42. doi:10.1002/art.38007

Jonsson R, Moen K, Vesterheim D, Szodoray P.(2002) Current issues in Sjogren's syndrome. *Oral Dis* ;8:130–140

Jonsson R., Vogelsang P., Volchenkov R., Espinosa A., Wahren-Herlenius M., & Appel S. (2011). The complexity of Sjögren's syndrome: Novel aspects on pathogenesis. *Immunology Letters*.

Jonsson MV, Salomonsson S, Oijordsbakken G, Skarstein K (2005). Elevated serum levels of soluble E-cadherin in patients with primary Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* 62:552–9

Jonsson MV, Skarstein K (2008). Follicular dendritic cells confirm lymphoid organization in the minor salivary glands of primary Sjogren's syndrome. *J Oral Pathol Med* 37:515–21.

Kabasakal Y, Kitapcioglu G, Turk T, Oder G, Durusoy R, Mete N, Egrilmez S, Akalin T (2006) : The prevalence of Sjogren's syndrome in adult women. *Scand J Rheumatol*, 35:379-383

Kalk W, Mansour K., Vissink A., Spijkervet F. K., Bootsma H., Kallenberg C. G., et al (2002). Oral and ocular manifestations in Sjogren's syndrome. *The Journal of rheumatology*, 29 (5), 924-930

Kalk W. W. I., Vissink A., Spijkervet F. K. L., Bootsma H., Kallenberg C. G. M., & Amerongen A. V. N. (2001). Sialometry and sialochemistry : diagnostic tools for Sjögren ' s syndrome, 1110–1116.

Kalk WWI, Vissink A, Stegenga B, Bootsma H, Nieuw Amerongen AV, Kallenberg CGM. (2002) Sialometry and sialochemistry: a non-invasive approach for diagnosing Sjögren's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*. ;61(2):137–144.

Kang EH, Lee YJ, Hyon JY, Yun PY, Song YW.(2011) Salivary cytokine profiles in primary sjogren's syndrome differ from those in non-sjogren sicca in terms of tnfr-alpha levels and th-1/th-2 ratios. *Clinical and experimental rheumatology*. 29:970–6.

Kang K. Y., Kim H.-O., Kwok S.-K., Ju J. H., Park K.-S., Sun D.-I., Kim H.-Y. (2011). Impact of interleukin-21 in the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome: increased serum levels of interleukin-21 and its expression in the labial salivary glands. *Arthritis Research & Therapy*, 13(5), R179. doi:10.1186/ar3504

Kang M. H., Kim M. K., Lee H. J., Lee H. Il, Wee W. R., & Lee J. H. (2011). Interleukin-17 in various ocular surface inflammatory diseases. *Journal of Korean Medical Science*, 26(7), 938–44. doi:10.3346/jkms. 26.7.938

Karabulut G, Kitapcioglu G, Inal V, Kalfa M, Yargucu F, Keser G, et al.(2011) Cigarette smoking in primary Sjögren's syndrome: positive association only with ANA positivity. *Mod Rheumatol* 21:602e7

Kassan S, Moutsopoulos H.(2004) Clinical manifestations and early diagnosis of Sjogren's syndrome. *Arch Intern Med* 164: 1275–1284.

Katsifis G. E., Rekka S., Moutsopoulos N. M., Pillemer S., & Wahl S. M. (2009). Systemic and local interleukin-17 and linked cytokines associated with Sjögren's syndrome immunopathogenesis. *The American Journal of Pathology*, 175(3), 1167–77. doi:10.2353/ajpath.2009.090319

Katsifis, G. E., Moutsopoulos, N. M., & Wahl, S. M. (2007). T lymphocytes in Sjögren's syndrome: contributors to and regulators of pathophysiology. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 32(3), 252–64. doi:10.1007/s12016-007-8011-8

Kawayama T., Okamoto M., Imaoka H., Kato S., Young H. a, & Hoshino T. (2012). Interleukin-18 in pulmonary inflammatory diseases. *Journal of Interferon & Cytokine Research : The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 32(10), 443–9. doi:10.1089/jir.2012.0029

Keikp M, Masahiro L, Haruki K, et al (2005). The wide spectrum of clinical manifestations in sjogren's syndrome-associated neuropathy. *Brain* 128(11):2518–34.

Kimoto O, Sawada J, Shimoyama K, et al (2011). Activation of the interferon pathway in peripheral blood of patients with Sjogren's syndrome. *Journal of Rheumatology* 38(2):310–6.

Kittridge A., Routhouska, S. B., & Korman, N. J. (2011). Dermatologic manifestations of Sjogren syndrome. *Journal of cutaneous medicine and surgery*, 15(1), 8-14

Kivity S, Agmon-Levin N, Blank M, Shoenfeld Y (2009): Autoimmunity and environment: infections and autoimmunity - friends or foes? *Trends Immunol* 30:409–414

Kolkowski EC, Reth P, Pelusa F, Bosch J, Pujol-Borrell R, Coll J, Jaraquemada D (1999). Th1 predominance and perforin expression in minor salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome. *J Autoimmun.* 13:155–62

Konttinen Y. T., Fuellen G., Bing Y., Porola P., Stegaev V., Trokovic N., Takakubo Y. (2012). Sex steroids in Sjögren's syndrome. *Journal of Autoimmunity*, 39(1-2), 49–56

Korman BD, Alba MI, Le JM, Alevizos I, Smith JA, Nikolov NP, Kastner DL, Remmers EF, Illei (2008) GG: Variant form of STAT4 is associated with primary Sjögren's syndrome. *Genes Immun*, 9:267-270

Kramer J., Holodick N., Vizconde T., & Rothstein T. (2013). Autoantibody Production in Sjögren Syndrome. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 116(6), e493. doi:10.1016/j.oooo.09.018

Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, et al (2002). Multiple immunoregulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 109(1):131e40

Kyriakidis N. C., Kapsogeorgou E. K., & Tzioufas A. G. (2013). A comprehensive review of autoantibodies in primary Sjögren's syndrome: Clinical phenotypes and regulatory mechanisms. *Journal of Autoimmunity*. doi:10.1016/j.jaut.2013.11.001

Lahiri A., Varin M.-M., Le Pottier L., Pochard P., Bendaoud B., Youinou P., & Pers J.-O. (2014). Specific forms of BAFF favor BAFF receptor-mediated epithelial cell survival. *Journal of Autoimmunity*, 1–8. doi:10.1016/j.jaut.2014.02.004

Lan RY, Cheng C, Lian ZX, et al (2006). Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 43: 729–737

Lavoie T. N., Stewart C. M., Berg K. M., Li Y., & Nguyen C. Q. (2011). Expression of Interleukin-22 in Sjögren's Syndrome: Significant Correlation with Disease Parameters. *Scandinavian Journal of Immunology*, 74(4), 377–382. doi:10.1111/j.1365-3083.2011.02583.x

Lee S. Y., Han S. J., Nam S. M., Yoon S. C., Ahn, J. M., Kim, T.-I., ... Seo, K. Y. (2013). Analysis of tear cytokines and clinical correlations in Sjögren syndrome dry eye patients and non-Sjögren syndrome dry eye patients. *American Journal of Ophthalmology*, 156(2), 247–253.e1. doi:10.1016/j.ajo.2013.04.003

- Lemp M. A. (2000). Evaluation and differential diagnosis of keratoconjunctivitis sicca. *The Journal of rheumatology. Supplement*, 61, 11-14
- Levings MK, Roncarolo MG (2005) : Phenotypic and functional differences between human CD4+CD25+ and type 1 regulatory T cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 293:303-326.
- Levy Y, Uziel Y, Zandman G, et al (2003). Intravenous immunoglobulins in peripheral neuropathy associated with vasculitis. *Annals of Rheumatic Diseases* 62(12):1221–3.
- Li J., Wang X., Zhang F., & Yin H. (2013). Toll-like receptors as therapeutic targets for autoimmune connective tissue diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(3), 441–51. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.03.003
- Li J, Ha YM, Ku NY, Choi SY, Lee SJ, Oh SB, et al.(2004) Inhibitory effects of autoantibodies on the muscarinic receptors in Sjögren's syndrome. *Lab Invest* 84:1430e8.
- Li X., Qian L., Wang G., Zhang H., Wang X., Chen K., Harris D. C. (2007). T regulatory cells are markedly diminished in diseased salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *The Journal of Rheumatology*, 34(12), 2438–2445.
- Lieberman S. M. (2013). Childhood Sjögren syndrome: insights from adults and animal models. *Current Opinion in Rheumatology*, 25(5), 651–7. doi:10.1097/BOR.0b013e328363ed23
- Lindvall B, Bengtsson A, Ernerudh J, Eriksson P (2002). Subclinical myositis is common in primary Sjögren's syndrome and is not related to muscle pain. *Journal of Rheumatology* 29(4):717–25.
- Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* 17, 975–982.
- Lisi S., Sisto M., D'Amore M., Lofrumento D. D., & Ribatti D. (2013). Emerging avenues linking inflammation, angiogenesis and Sjögren's syndrome. *Cytokine*, 61(3), 693–703. doi:10.1016/j.cyto.2012.12.021
- Liu M.-F., Lin L.-H., Weng C.-T., & Weng M.-Y. (2008). Decreased CD4+CD25+bright T cells in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome. *Lupus*, 17(1), 34–9. doi:10.1177/0961203307085248
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*, 203:1701-1711).
- Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF and APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 2003;21:231e64
- Maggi E., Cosmi L., Liotta F., Romagnani P., Romagnani S. and Annunziato F (2005). Thymic regulatory T cells. *Autoimmunity Reviews*, (8): 579-586
- Manoussakis MN, Tsinti M, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. (2012) The salivary gland epithelial cells of patients with primary Sjogren's syndrome manifest significantly reduced responsiveness to 17beta-estradiol. *Journal of Autoimmunity*;

Maripuri S., Grande J. P., Osborn T. G., Fervenza F. C., Matteson E. L., Donadio J. V., & Hogan M. C. (2009). Renal involvement in primary Sjögren's syndrome: a clinicopathologic study. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 4(9), 1423–31. doi:10.2215/CJN.00980209

Marshall NA, Christie LE, Munro LR, Culligan DJ, Johnston PW, Barker RN, et al (2004). Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* 103(5):1755e62.

Mason G I, Hamburger J (2003) Salivary gland expression of transforming growth factor isoforms in Sjogren's syndrome and benign lymphoepithelial lesions. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 56:52–59

Mavragani C. P., & Moutsopoulos H. M. (2010). The geoepidemiology of Sjögren's syndrome. *Autoimmunity Reviews*, 9(5), A305–10. doi:10.1016/j.autrev.2009.11.004

Mavragani C. P., Fragoulis G. E., & Moutsopoulos H. M. (2012). Endocrine alterations in primary Sjogren's syndrome: an overview. *Journal of Autoimmunity*, 39(4), 354–8. doi:10.1016/j.jaut.2012.05.011

Mavragani C. P., & Crow M. K. (2010). Activation of the type I interferon pathway in primary Sjogren's syndrome. *Journal of Autoimmunity*, 35(3), 225–31. doi:10.1016/j.jaut.2010.06.012

Maehara T., Moriyama M., Hayashida J.-N., Tanaka a, Shinozaki S., Kubo Y., ... Nakamura S. (2012). Selective localization of T helper subsets in labial salivary glands from primary Sjögren's syndrome patients. *Clinical and Experimental Immunology*, 169(2), 89–99. doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04606.x

Mandapathil M, Lang S, Gorelik E, Whiteside TL (2009). Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J Immunol Methods* 346:55_63.

McDonagh, J. E., & Isenberg, D. A. (2000). Development of additional autoimmune diseases in a population of patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 59(3), 230–2.

McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA et al (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16: 311_23

Meiners P. M., Vissink A., Kallenberg C. G. M., Kroese F. G. M., & Bootsma H. (2011). Treatment of primary Sjögren's syndrome with anti-CD20 therapy (rituximab). A feasible approach or just a starting point? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11(10), 1381–94. doi:10.1517/14712598.2011.605352

Miceli-Richard C, Comets E, Loiseau P, Puechal X, Hachulla E, Mariette X.(2007) Association of an IRF5 gene functional polymorphism with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 56:3989e94

Miller B. E., Deutsch O., Redlich M., Kontinen Y. T., Benoliel R., Zaks, B., ... Aframian, D. J. (2012). Sialochemistry and cortisol levels in patients with Sjogren's syndrome. *Oral Diseases*, 18(3), 255–9. doi:10.1111/j.1601-0825.2011.01866.x

- Milojevic, D., Nguyen, K. D., Wara, D., & Mellins, E. D. (2008). Regulatory T cells and their role in rheumatic diseases: a potential target for novel therapeutic development. *Pediatric Rheumatology Online Journal*, 6, 20. doi:10.1186/1546-0096-6-20
- Miossec P, Korn T, Kuchroo VK (2009) Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009, 361:888-898
- Miró J, Peña-Sagredo JL, Berciano J, Insúa S, Leno C, Velarde R.(1990) Prevalence of primary Sjögren's syndrome in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 27:582e4
- Miyara M., Gorochov G., Ehrenstein M., Musset L., Sakaguchi S., & Amoura Z. (2011). Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 10(12), 744–55. doi:10.1016/j.autrev.2011.05.004
- Miyara M, Amoura Z, Parizot C, et al (2005). Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 175: 8392–8400
- Mori K, Iijima M, Koike H, et al (2005). The wide spectrum of clinical manifestations in Sjogren's syndrome-associated neuropathy. *Brain* 128:2518e34
- Moriyama M., Hayashida J.-N., Toyoshima T., Ohyama Y., Shinozaki S., Tanaka a , Nakamura S. (2012). Cytokine/chemokine profiles contribute to understanding the pathogenesis and diagnosis of primary Sjögren's syndrome. *Clinical and Experimental Immunology*, 169(1), 17–26. doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04587.x
- Moriyama M, et al., T Miyara, M., Gorochov, G., Ehrenstein, M., Musset, L., Sakaguchi, S., & Amoura, Z. (2011). Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 10(12), 744–55. doi:10.1016/j.autrev.2011.05.004
- Moriyama M, Tanaka A, Maehara T, Furukawa S, Nakashima H, Nakamura S (2013). T helper subsets in Sjögren's syndrome and IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis: a critical review. *J Autoimmun*
- Morreale M., Marchione P., Giacomini P., Pontecorvo S., Marianetti M., Vento C., Francia A. (2014). Neurological involvement in primary sjögren syndrome: a focus on central nervous system. *PloS One*, 9(1), e84605. doi:10.1371/journal.pone.0084605
- Moutsopoulos H. M. (2007). Sjögren's syndrome or autoimmune epithelitis? *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 32(3), 199–200. doi:10.1007/s12016-007-8042-1
- Moustakas A, Pardali K, Gaal A, et al (2002). Mechanisms of TGF- β signalling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett* 82:85–91
- Muraki Y., Tsutsumi A., Takahashi R., Suzuki E., Hayashi T., Chino Y., ... Sumida T. (2004). Polymorphisms of IL-1 beta gene in Japanese patients with Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 31(4), 720–5.
- Naito Y, Matsumoto I, Wakamatsu E, et al. Muscarinic acetylcholine receptor autoantibodies in patients with Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2005;64:510e11.
- Nardi N., Brito-Zerón P., Ramos-Casals M., Aguiló S., Cervera R., Ingelmo M., & Font J. (2006). Circulating auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens in primary Sjögren's syndrome: prevalence and clinical significance in 335 patients. *Clinical Rheumatology*, 25(3), 341–346. doi:10.1007/s10067-005-0059-3

Nguyen C. Q., & Peck A. B. (2009). Unraveling the Pathophysiology of Sjogren Syndrome-Associated Dry Eye Disease. *The Ocular Surface*, 7(1), 11–27. doi:10.1016/S1542-0124(12)70289-6

Nikolov N. P., & Illei G. G. (2009). Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Current Opinion in Rheumatology*, 21(5), 465–70. doi:10.1097/BOR.0b013e32832eba21

Nordmark G, Kristjansdottir G, Theander E, Eriksson P, Brun JG, Wang C, et al. (2009). Additive effects of the major risk alleles of IRF5 and STAT4 in primary Sjogren's syndrome. *Genes Immun* 10:68–76

O'Garra A., & Arai N. (2000). The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends in Cell Biology*, 10(12), 542–550. doi:10.1016/S0962-8924(00)01856-0

Ogawa N, Dang H, Lazaridis K, McGuff HS, Aufdemorte TB, Talal N (1995). Analysis of transforming growth factor beta and other cytokines in autoimmune exocrinopathy (Sjogren's syndrome) J Interferon Cytokine Res. 15:759–67.

Ohkura N., Hamaguchi M., & Sakaguchi S. (2011). FOXP3+ regulatory T cells: control of FOXP3 expression by pharmacological agents. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(3), 158–66. doi:10.1016/j.tips.2010.12.004

Oke V., & Wahren-Herlenius M. (2012). The immunobiology of Ro52 (TRIM21) in autoimmunity: a critical review. *Journal of Autoimmunity*, 39(1-2), 77–82. doi:10.1016/j.jaut.2012.01.014

Osnes L. T., Nakken B., Bodolay E., & Szodoray P. (2013). Assessment of intracellular cytokines and regulatory cells in patients with autoimmune diseases and primary immunodeficiencies - novel tool for diagnostics and patient follow-up. *Autoimmunity Reviews*, 12(10), 967–71. doi:10.1016/j.autrev.2013.02.003

Parambil J. G., Myers J. L., & Ryu J. H. (2006). Diffuse alveolar damage: uncommon manifestation of pulmonary involvement in patients with connective tissue diseases. *Chest*, 130(2), 553-558 Pan H.-F., Li X.-P., Zheng S. G., & Ye D.-Q. (2013). Emerging role of interleukin-22 in autoimmune diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 24(1), 51–7. doi:10.1016/j.cytogfr.2012.07.002

Park K., Park S., & Jackson M. W. (2013). The inhibitory effects of antimuscarinic autoantibodies in the sera of primary Sjogren syndrome patients on the gastrointestinal motility. *Molecular Immunology*, 56(4), 583–587.

Paul W. E., & Zhu J. (2010). How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nature Reviews. Immunology*, 10(4), 225–235. doi:10.1038/nri2735

Pavakis P. P., Alexopoulos H., Kosmidis M. L., Stamboulis E., Routsias J. G., Tzartos S. J., Dalakas M. C. (2011). Peripheral neuropathies in Sjogren syndrome: a new reappraisal. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 82(7), 798–802. doi:10.1136/jnnp.2010.222109

Peri Y., Agmon-Levin N., Theodor E., & Shoenfeld Y. (2012). Sjögren's syndrome, the old and the new. *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*, 26(1), 105–17. doi:10.1016/j.berh.2012.01.012

Perrier S., Serre, A. F., Dubost J. J., Beaujon G., Plazonnet M. P., Albuissou E., & Sauvezie B. (2000). Increased serum levels of interleukin 10 in Sjögren's syndrome; correlation with increased IgG1. *The Journal of Rheumatology*, 27(4), 935–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10782819>

Pertovaara M, Korpela M, Pasternack A (2001). Factors predictive of renal involvement in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clinical Nephrology* 56:8–10

Pflugfelder S. C. et al. (1993) Epstein–Barr virus and the lacrimal gland pathology of Sjögren's syndrome. *Am. J. Pathol.* 143, 49–64

Pot C., Apetoh L., & Kuchroo V. K. (2011). Type 1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity. *Seminars in Immunology*.

Priori R., Gattamelata A., Modesti M., Colafrancesco S., Frisenda S., Minniti A., Valesini G. (2013). Outcome of Pregnancy in Italian Patients with Primary Sjogren Syndrome. *J Rheum*, 40(7). doi:10.3899/jrheum.121518

Radfar L, Kleiner DE, Fox PC, Pillemer SR (2002). Prevalence and clinical significance of lymphocytic foci in minor salivary glands of healthy volunteers. *Arthritis Rheum.* ;47(5):520-4.

Ramos-Casals M., Anaya J. M., Garcia-Carrasco M., Rosas J., Bove A., Claver G., et al. (2004). Cutaneous vasculitis in primary Sjogren syndrome: classification and clinical significance of 52 patients. *Medicine*, 83(2), 96-106.

Ramos-Casals M, Font J. Primary Sjögren syndrome (2007). In: Imboden J, Hellman D, Stone JH, eds. *Current Diagnosis and Treatment in Rheumatology*. New York, NY: McGraw-Hill; 237-245.

Ramos-Casals M., Tzioufas G., Stone H., Siso A., Bosch X. (2010) **Treatment of Primary Sjögren Syndrome** A Systematic Review. *JAMA*, Vol 304, No. 4

Ramos-Casals M, García-Hernández FJ, De Ramon E, et al (2010). Off-label use of rituximab in 196 patients with severe, refractory systemic autoimmune diseases *Clin Exp Rheumatol*.

Ramos-Casals M., Brito-Zerón P., Sisó-Almirall A., Bosch X., & Tzioufas A. G. (2012). Topical and systemic medications for the treatment of primary Sjögren's syndrome. *Nature Reviews. Rheumatology*, 8(7), 399–411. doi:10.1038/nrrheum.2012.53

Rojas-Villarraga A., Amaya-Amaya J., Rodriguez-Rodriguez A., Mantilla R. D., & Anaya J.-M. (2012). Introducing polyautoimmunity: secondary autoimmune diseases no longer exist. *Autoimmune Diseases*, 2012, 254319. doi:10.1155/2012/254319

Roescher N, Tak PP, Illei GG (2010). Cytokines in sjogren's syndrome: Potential therapeutic targets. *Ann Rheum Dis.* 69:945–8

Roitberg-Tambur A, Friedmann A, Safirman C, et al. Molecular analysis of HLA class II genes in primary Sjögren's syndrome. A study of Israeli Jewish and Greek non-Jewish patients. *Human Immunology* 1993;36(4):235–42

Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10- secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev.* 2006 Aug.212:28–50.

Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T (2006): Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 212:8-27

Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., & Toda M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(3), 1151–1164. doi:10.1093/immk/155/3/1151 [pii]

Sakaguchi S. et al. (2007) Regulatory T cells—a brief history and perspective. *Eur. J. Immunol.* 37 (Suppl. 1), S116–S123

Sakaguchi S, Powrie F (2007). Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science*. 317(5838):627–629. [PubMed: 17673654]

Sall K, Stevenson OD, Mundorf TK, Reis BL (2000). Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease: CsA Phase 3 Study Group. *Ophthalmology*. 107(4):631-639.

Sarigul M, Yazisiz V, Bassorgun CI, Ulker M, Avci AB, Erbasan F, et al (2010). The numbers of Foxp3⁺ Treg cells are positively correlated with higher grade of infiltration at the salivary glands in primary Sjogren's syndrome. *Lupus* 19:138–45.

Scardina G. A., Ruggieri A., & Messina P. (2010). Periodontal disease and sjogren syndrome: a possible correlation? *Angiology*, 61(3), 289–93. doi:10.1177/0003319709344576

Scofield RH, Farris AD, Horsfall AC, Harley JB (1999). Fine specificity of the autoimmune response to the Ro/SSA and La/SSB ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum.* 42, 99-105.

Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J et al (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203:1693_700.

Selmi C., Meroni P. L., & Gershwin M. E. (2012). Primary biliary cirrhosis and Sjögren's syndrome: Autoimmune epithelitis. *Journal of Autoimmunity*

Sène D, Jallouli M, Lefaucheur JP, et al (2011). Peripheral neuropathies associated with primary Sjögren syndrome: immunologic profiles of nonataxic sensory neuropathy and sensorimotor neuropathy. *Medicine (Baltimore)* 90(2):133–8)

Shalev, I., Schmelzle, M., Robson, S. C., & Levy, G. (2011). Seminars in Immunology Making sense of regulatory T cell suppressive function. *Seminars in Immunology*, 23(4), 282–292. doi:10.1016/j.smim.2011.04.003

Shahi E., Donati C., Gattinara M., Pontikaki I., & Gerloni V. (2011). Primary Sjögren syndrome: report of a 10 years old girl with local edema and positivity of anti SS-A and anti SS-B autoantibodies. *Reumatismo*, 63(2), 97–100.

Shiboski S. C., Shiboski C. H., Criswell L. a., Baer a. N., Challacombe S., Lanfranchi H., Daniels T. E. (2012). American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: A data-driven, expert consensus approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance Cohort. *Arthritis Care & Research*, 64(4), 475–487. doi:10.1002/acr.21591

Singh N., Cohen L (2012). The T cell in Sjogren's syndrome: Force majeure, not spectateur. *J Autoimmun.* 39(3):229-33.

Sjogren H (1933). Zur kenntnis der keratoconjunctivitis sicca. *Acta Ophthalmol* 11 (Suppl.II): 1–151

Skalli S, Muller M, Pradines S, Halimi S, Wion-Barbot N: Vitamin D deficiency and peripheral diabetic neuropathy. *Eur J Intern Med* 2012, 23:e67–e68.

Skopouli F. N., Dafni U., Ioannidis J. P., & Moutsopoulos H. M. (2000). Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjögren's syndrome. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 29(5), 296–304.

Solans-Laquer R., Lopez-Hernandez A., Angel Bosch-Gil J., Palacios A., Campillo M., & Vilardell-Tarres M. (2011). Risk, Predictors, and Clinical Characteristics of Lymphoma Development in Primary Sjogren's Syndrome. *Seminars in arthritis and rheumatism*

Sonnenberg G. F., Fouser L. A., & Artis D. (2011). Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nature Immunology*, 12(5), 383–390. doi:10.1038/ni.2025

Song X., & Qian Y. (2013). The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine*, 62(2), 175–82. doi:10.1016/j.cyto.2013.03.014

Soto-Rojas AE, Kraus A (2002). The oral side of Sjögren syndrome. Diagnosis and treatment. A review. *Arch Med Res.* 33(2):95-106. Review. [Medline: 11886706] [doi: 10.1016/S0188-4409(01)00371-X]

Souza TR, Albuquerque Tavares Carvalho A., Duarte AP., Porter SR., Leao JC., Gueiros LA (2014) Th1 and Th2 polymorphisms in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. *J Oral Pathol Med.*, Jul;43(6):418-26. doi: 10.1111/jop.12149

Soyfoo M. S., & Cogan E. (2011). Diagnostic and Prognostic Features of Sjögren ' s Syndrome.

St Clair E. W., Levesque M. C., Prak E. T. L., Vivino F. B., Alappatt C. J., Spsychala M. E., Cohen P. (2013). Rituximab therapy for primary Sjögren's syndrome: an open-label clinical trial and mechanistic analysis. *Arthritis and Rheumatism*, 65(4), 1097–106. doi:10.1002/art.37850

Stevenson D, Tauber J, Reis BL (2000). Efficacy and safety of cyclosporin A ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease: a doseranging, randomized trial: the Cyclosporin A Phase 2 Study Group. *Ophthalmology*. 107(5):967- 974.

Steinfeld, S.D., Tant, L., Burmester, G.R., Teoh, N.K., Wegener, W.A., Goldenberg, D.M. et al. (2006) Epratuzumab (humanised anti-CD22 antibody) in primary Sjögren's syndrome: an open-label phase I/II study. *Arthritis Res Ther* 8: 129

Steinman L.(2007) A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T-cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13:139–45.

Steinman RM, Hawiger D, Liu K, Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, et al (2003). Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 987:15–25.

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685–711

Stone J. H. (2010). Treatment of Primary Sjögren Syndrome, *CLINICIAN 'S CORNER* 304(4).

Strietzel FP, Lafaurie GI, Bautista Mendoza GR, et al (2011). Efficacy and safety of an intraoral electrostimulation device for xerostomia relief: A multicenter, randomized trial. *Arthritis and Rheumatism* 63:180–90.

Sumida T., Tsuboi H., Iizuka M., Nakamura Y., & Matsumoto I. (2010). Functional role of M3 muscarinic acetylcholine receptor (M3R) reactive T cells and anti-M3R autoantibodies in patients with Sjögren's syndrome. *Autoimmunity Reviews*, 9(9), 615–7. doi:10.1016/j.autrev.2010.05.008

Sumida T., Tsuboi H., Iizuka M., Hirota T., Asashima H., & Matsumoto I. (2014). The role of M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells in Sjögren's syndrome: A critical review. *Journal of Autoimmunity*, 1–7. doi:10.1016/j.jaut.2013.12.012

Sumida T, Tsuboi H, Iizuka M, Asashima H, Matsumoto I.(2013) Anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjögren's syndrome. *Mod Rheumatol* 23:841e5.

Sundrud M. S., & Trivigno C. (2013). Identity crisis of Th17 cells: many forms, many functions, many questions. *Seminars in Immunology*, 25(4), 263–72. doi:10.1016/j.smim.2013.10.021

Szodoray P, Barta Z, Lakos G, et al (2004). Coeliac disease in Sjögren's syndrome—a study of 111 Hungarian patients. *Rheumatology International* 24(5):278–82

Szodoray P, Gal I, Barath S, Aleksza M, Horvath IF, Gergely Jr P, et al.(2008) Immunological alterations in newly diagnosed primary Sjögren's syndrome characterized by skewed peripheral T-cell subsets and inflammatory cytokines. *Scand J Rheumatol* 37:205–12.

Szodoray P., Papp G., Horvath I. F., Barath S., Sipka S., Nakken B., & Zeher M. (2009). Cells with regulatory function of the innate and adaptive immune system in primary Sjögren's syndrome. *Clinical and Experimental Immunology*, 157(3), 343–9. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03966.x

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S et al (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192:303_10

Tarella C., Gueli a, Ruella M., & Cignetti a. (2013). Lymphocyte transformation and autoimmune disorders. *Autoimmunity Reviews*, 12(8), 802–13. doi:10.1016/j.autrev.2012.11.004

Theander E., Manthorpe R., & Jacobsson L. T. H. (2004). Mortality and causes of death in primary Sjögren's syndrome: a prospective cohort study. *Arthritis and Rheumatism*, 50(4), 1262–9. doi:10.1002/art.20176

Theander E., Vasaitis L., Baecklund E., Nordmark G., Warfvinge G., Liedholm R., Jonsson M. V. (2011). Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor

for the development of malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(8), 1363–8. doi:10.1136/ard.2010.144782

Theander E., Henriksson G., Ljungberg O., Mandl T., Manthorpe R., & Jacobsson L. T. (2006). Lymphoma and other malignancies in primary Sjogren's syndrome: a cohort study on cancer incidence and lymphoma predictors. *Annals of the rheumatic diseases*, 65(6), 796-803

Tincani A., Andreoli L., Cavazzana I., Doria A., Favero M., Fenini M.-G., Shoenfeld Y. (2013). Novel aspects of Sjögren's syndrome in 2012. *BMC Medicine*, 11, 93. doi:10.1186/1741-7015-11-93

Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory cells. *J Leukoc Biol* 2006;80:458–70.

Toussiro E, Roudier J (2008). Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology* 22(5):883–96.

Tran DQ, Andersson J, Hardwick D, Bebris L, Illei GG, Shevach EM (2009). Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3+ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood* 113: 5125_33.

Triantafyllopoulou A, Moutsopoulos H.(2007) Persistent viral infection in primary Sjogren's syndrome: review and perspectives. *Clin Rev Allergy Immunol* 32:210e4.

Triantafyllopoulou A., Tapinos N. & Moutsopoulos H. M. (2004) Evidence for coxsackievirus infection in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 50, 2897–2902

Tumati B, Casoli P, Parmeggiani A (1997). Hearing loss in the Sjogren syndrome. *Ann Intern Med.* 126:450-453

Turner MK, Hooten WM, Schmidt JE, Kerkvliet JL, Townsend CO, Bruce BK (2008): Prevalence and clinical correlates of vitamin D inadequacy among patients with chronic pain. *Pain Med*, 9:979–984.

Tzioufas AG, Voulgarelis M (2007). Update on Sjögren's syndrome autoimmune epithelitis: from classification to increased neoplasias. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology* 21(6):989–1010

Van Amelsfort J, Bijlsma J, Lafeber F, Taams L (2004). CD4CCD25C regulator T cells in rheumatoid arthritis. Differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 50(9):2775e85.

Van Bijsterveld OP (1969) . Diagnostic tests in the sicca syndrome. *Arch Ophthalmol* 82 10-14

Van Woerkom J. M., Kruize A. A., Wenting-van Wijk M. J., Knol E., Bihari I. C., Jacobs J. W., Van Roon J. A. (2005). Salivary gland and peripheral blood T helper 1 and 2 cell activity in Sjogren's syndrome compared with non-Sjogren's sicca syndrome. *Ann.Rheum.Dis.*, 64(0003-4967 (Print)), 1474–1479.

Varela-Centelles, P., Seoane-Romero, J., Sanchez-Sanchez, M., Gonzalez-Mosquera, a., Diz-Dios, P., & Seoane, J. (2014). Minor salivary gland biopsy in Sjogren's syndrome: A review

and introduction of a new tool to ease the procedure. *Medicina Oral Patología Oral Y Cirugia Bucal*, 19(1), e20–e23. doi:10.4317/medoral.19131

Váróczy L., Páyer E., Kádár Z., Gergely L., Miltényi Z., Magyar F., Illés A. (2012). Malignant lymphomas and autoimmunity-a single center experience from Hungary. *Clinical Rheumatology*, 31(2), 219–24. doi:10.1007/s10067-011-1807-1

Vieira PL, Christensen JR, Minaee S et al (2004). IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 172: 5986_93.

Vignali, D. A. A., & Kuchroo, V. K. (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Immunology*, 13(8), 722–8. doi:10.1038/ni.2366

Vitali C., Bombardieri S., Moutsopoulos H. M., Balestrieri G., Bencivelli W., Bernstein R. M., et al. (1993). Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum*, 36(3), 340–347.

Vitali C., Bombardieri S., Jonsson R., Moutsopoulos H. M., Alexander E. L., Carsons S. E., Weisman M. H. (2002). Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. In *Annals of the rheumatic diseases* (Vol. 61, pp. 554–558).

Vitali C, Tavoni A, Simi U, Marchetti G, Vigorito P, d'Ascanio A, Neri R, Cristofani R Bombardieri S (1988). Parotid sialography and minor salivary gland biopsy in the diagnosis of Sjögren's syndrome. A comparative study of 84 patients. *JRheumatol*. (2):262-7.

Vivino FB, Al-Hashimi I, Khan Z, et al (1999). Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjögren syndrome. *Archives of Internal Medicine* 159:174–81

Vogelsang P, Brun JG, Oijordsbakken G, Skarstein K, Jonsson R, Appel S. Levels of plasmacytoid dendritic cells and type-2 myeloid dendritic cells are reduced in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1235–8.

Voulgarelis M., Ziakas P. D., Papageorgiou A., Baimpa E., Tzioufas A. G., & Moutsopoulos H. M. (2012). Prognosis and outcome of non-Hodgkin lymphoma in primary Sjögren syndrome. *Medicine*, 91(1), 1–9. doi:10.1097/MD.0b013e31824125e4

Voulgarelis M., Dafni U. G., Isenberg D. A., & Moutsopoulos H. M. (1999). *Malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome: a multicenter, retrospective, clinical study by the European Concerted Action on Sjögren's Syndrome*. *Arthritis and rheumatism* (Vol. 42, pp. 1765–1772). doi:10.1002/1529-0131(199908)42:8<1765::AID-ANR28>3.0.CO;2-V

Voulgarelis M., & Tzioufas A. G. (2010). Pathogenetic mechanisms in the initiation and perpetuation of Sjögren's syndrome. *Nature Reviews. Rheumatology*, 6(9), 529–37. doi:10.1038/nrrheum.2010.118

Wahren-Herlenius M. & Dörner T. (2013). Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *Lancet*, 382(9894), 819–31. doi:10.1016/S0140-6736(13)60954-X

Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE (2007). Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 37: 129_38.

Waterhouse JP, Doniach I.(1966) Post-mortem prevalence of focal lymphocytic adenitis of the submandibular salivary gland. *J Pathol Bacteriol* 91:53e 64.

Wildenberg ME, van Helden-Meeuwsen CG, van de Merwe JP, Drexhage HA, Versnel MA (2008). Systemic increase in type I interferon activity in Sjogren's syndrome: a putative role for plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 38:2024–33.

Woerkom JM, Kruize AA, Wenting-van Wijk MJ, Knol E, Bihari IC, Jacobs JW, Bijlsma JW, Lafeber FP, van Roon JA (2005). Salivary gland and peripheral blood T helper 1 and 2 cell activity in Sjogren's syndrome compared with non-Sjogren's sicca syndrome. *Ann Rheum Dis*. 64:1474–9.

Xu D, Tian X, Zhang W, Zhang X, Liu B, Zhang F. (2010) Sjogren's syndrome-onset lupus patients have distinctive clinical manifestations and benign prognosis: a case-control study. *Lupus* 19:197e200

Yamaguchi T., Wing J. B., & Sakaguchi S. (2011). Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Seminars in Immunology*, 23(6), 424–30. doi:10.1016/j.smim.2011.10.002

Yan SM, Zhao Y, Zeng XF, et al (2008). Lung involvement of primary Sjögren's syndrome. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 31(7):513–6.

Youinou P., & Pers J.-O. (2011). Disturbance of cytokine networks in Sjögren's syndrome. *Arthritis Research & Therapy*, 13(4), 227. doi:10.1186/ar3348

Yoon KC, Park CS, You IC, Choi HJ, Lee KH, et al. Expression of cxcl9, -10, -11, and cxcr3 in the tear film and ocular surface of patients with dry eye syndrome. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010; 51:643–50.

Yu QT, Saruta M, Avanesyan A, Fleshner PR, Banham AH, Papadakis KA (2007). Expression and functional characterization of FOXP3⁺ CD4⁺ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 13: 191–199

Zhao, J., Zhao, J., & Perlman, S. (2012). Differential Effects of IL-12 on Tregs and Non-Treg T Cells: Roles of IFN- γ , IL-2 and IL-2R. *PLoS ONE*, 7(9).

Zhao R., Zhou H., & Su, S. B. (2013). A critical role for interleukin-1 β in the progression of autoimmune diseases. *International Immunopharmacology*, 17(3), 658–69. doi:10.1016/j.intimp.2013.08.012

Zheng L., Zhang Z., Yu C., & Yang C. (2010). Expression of Toll-like receptors 7, 8, and 9 in primary Sjogren's syndrome. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.*, 109(1528-395X (Electronic)), 844–850.