

# Полиморфизм (-670A/G) гена апоптоза *FAS* ассоциирован с клиническими фенотипами системной склеродермии в российской популяции: пилотное исследование

Крылов М.Ю., Ананьева Л.П., Конева О.А., Старовойтова М.Н., Самаркина Е.Ю., Десина О.В., Овсянникова О.Б., Александрова Е.Н., Новиков А.А., Гусева И.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва, Россия  
115522 Москва, Каширское шоссе, 34А

V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia  
34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522

Контакты: Михаил Юрьевич Крылов;  
mekry@yandex.ru

Contact:  
Mikhail Krylov;  
mekry@yandex.ru

Поступила 28.09.16

Антиген *FAS* (Apo-1/CD95) является ключевой молекулой апоптоза большинства типов клеток, включая активированные иммунные клетки и фибробласты. В промоторной области гена *FAS* находится однонуклеотидный (single nucleotide polymorphism) полиморфизм -670A/G, связанный с заменой нуклеотида аргинина на гуанин, который ассоциирован с предрасположенностью к системной красной волчанке, рассеянному склерозу, саркоидозу и аутоиммунному гепатиту.

**Цель** — проверить в российской выборке больных гипотезу о возможной ассоциативной связи полиморфизма -670A/G гена *FAS* с предрасположенностью к системной склеродермии (ССД), ее клиническим и аутоиммунным фенотипами.

**Материал и методы.** В исследование включено 90 пациентов с ССД, которые были классифицированы по клиническим и аутоиммунным фенотипам. Контрольная группа состояла из 152 условно здоровых неродственных лиц, сопоставимых по полу и возрасту. Полиморфизм -670 A/G гена *FAS* был изучен с помощью полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

**Результаты и обсуждение.** На сравнительно небольшой выборке российских больных не установлено статистически значимой ассоциативной взаимосвязи изученного полиморфизма -670A/G с предрасположенностью к ССД в целом и большинством ее клинико-иммунологических фенотипов. Выявлена статистически значимая положительная ассоциативная связь аллели G (генотипы -670GG и GA) с наличием дистальных язвочек и хроническим течением заболевания. У больных с интерстициальным поражением легких (ИПЛ) аллель G (генотипы -670GG и GA) выявлялась реже, чем у больных без ИПЛ.

**Заключение.** Наши данные показывают, что полиморфизм *FAS* -670A>G играет роль в предрасположенности к некоторым клиническим фенотипам ССД у российских больных.

**Ключевые слова:** ген *FAS*; полиморфизм; системная склеродермия; клинические и серологические фенотипы.

**Для ссылки:** Крылов МЮ, Ананьева ЛП, Конева ОА и др. Полиморфизм (-670A/G) гена апоптоза *FAS* ассоциирован с клиническими фенотипами системной склеродермии в российской популяции: пилотное исследование. Научно-практическая ревматология. 2017;55(1):37-40.

## *FAS* APOPTOTIC GENE POLYMORPHISM (-670A/G) IS ASSOCIATED WITH CLINICAL PHENOTYPES OF SYSTEMIC SCLEROSIS IN A RUSSIAN POPULATION: A PILOT STUDY

Krylov M.Yu., Ananyeva L.P., Koneva O.A., Starovoitova M.N., Samarkina E.Yu., Desinova O.V., Ovsyannikova O.B., Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Guseva I.A.

The *FAS* antigen (Apo-1/CD95) is a key molecule of apoptosis in most cell types, including activated immune cells and fibroblasts. The *FAS* gene promoter region contains a single-nucleotide polymorphism (-670A/G) associated with a substitution of the nucleotide arginine for guanine, which is associated with the predisposition to systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis, sarcoidosis, and autoimmune hepatitis.

**Objective:** to test the hypothesis that the *FAS* -670A/G polymorphism may predispose to systemic sclerosis (SS), its clinical and autoimmune phenotypes in a Russian patient sample.

**Subjects and methods.** The instigation enrolled 90 SS patients who were classified according to clinical and autoimmune phenotypes. A control group consisted of 152 apparently healthy unrelated individuals matched for sex and age. The *FAS* -670A/G polymorphism was studied by polymerase chain reaction, followed by restriction fragment length polymorphism analysis.

**Results and discussion.** A relatively small sample of Russian patients showed no statistically significant association of the studied *FAS* -670 A/G polymorphism with the predisposition to SS as a whole and the majority of its clinical and immunological phenotypes. There was a statistically significant positive association of the G allele (the *FAS* -670 GG+GA genotype) with the presence of digital ulcers and the chronic course of the disease. The G allele (the *FAS* -670 GG+ GA) was detected less frequently in patients with interstitial lung disease (ILD) than in those without ILD.

**Conclusion.** The findings show that the *FAS* -670A>G polymorphism plays a role in the predisposition to some clinical phenotypes of SS in Russian patients.

**Key words:** *FAS* gene; polymorphism; systemic sclerosis; clinical and serological phenotypes.

**For reference:** Krylov MYu, Ananyeva LP, Koneva OA, et al. *FAS* apoptotic gene polymorphism (-670A/G) is associated with clinical phenotypes of systemic sclerosis in a Russian population: A pilot study. Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice. 2017;55(1):37-40 (In Russ.).

doi: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2017-37-40>

Системная склеродермия (ССД) — прогрессирующее системное заболевание соединительной ткани, которое характеризуется

склеротическим поражением кожных покровов и внутренних органов, аутоиммунными расстройствами и генерализованной васкуло-

патией. На основании распространенности фиброза кожи заболевание подразделяют на два клинических подтипа: ограниченную (лимитированную) форму (ЛФ) и диффузную кожную форму (ДФ). Последний подтип представляет собой более тяжелый вариант с быстрым прогрессированием фиброза кожи, внутренних органов и плохим прогнозом. ССД характеризуется присутствием особых антиядерных и антинуклеолярных антител, преимущественно к топоизомеразе 1 (АТА), центромерам (АЦА), РНК полимеразе III (АРА), фибрилларину и U3-рибонуклеопротеину, позволяющих отнести ССД к аутоиммунным заболеваниям.

В патогенезе ССД участвует широкий спектр эндогенных и средовых факторов. Около 50–70% вариабельности клинических фенотипов ССД определяется генетическими особенностями. Считается, что наибольший вклад в патогенез заболеваний с аутоиммунными расстройствами вносят генетические компоненты, связанные с главным комплексом гистосовместимости и конкретно — с HLA-антигенами класса II. Помимо HLA-антигенов класса II, ССД ассоциируется с полиморфными вариантами большого числа не-HLA-генов, одним из которых является ген *FAS* [1, 2].

Антиген *FAS* (Аро-1/CD95) является ключевой молекулой апоптоза большинства типов клеток, включая активированные иммунные клетки и фибробласты. У больных ССД показана постоянная активация и клональная экспансия В- и Т-лимфоцитов, а также различных подтипов циркулирующих Т-клеток. Было установлено, что они обладают большей резистентностью к *FAS*-обусловленному апоптозу по сравнению со здоровым контролем [3]. Одним из главных активаторов апоптоза Т-клеток является растворимая форма белка *FAS*. У больных ССД выявляются повышенные уровни этого белка в сыворотке [4]. Ген апоптоза *FAS* считают «аутогеном», потому что нарушение его регуляторной функции обнаруживается при различных аутоиммунных заболеваниях. В промоторной области гена *FAS* находится однонуклеотидный полиморфизм -670A/G, связанный с заменой нуклеотида аргинина на гуанин, который ассоциирован с предрасположенностью к системной красной волчанке, рассеянному склерозу, саркоидозу и аутоиммунному гепатиту [5–8]. Недавний метаанализ этнически разных когорт больных ССД подтвердил связь аллели G и генотипа GG с ЛФ ССД. Помимо этого генотип GG был связан с позитивностью по АЦА у больных с ЛФ [2].

ДФ ССД, как указывалось выше, представляет собой более тяжелую форму заболевания с быстрым прогрессированием фиброза кожи, внутренних органов (печени, сердца, пищевода, легких) и плохим прогнозом.

Известно, что интерстициальное поражение легких (ИПЛ) при ССД ассоциируется с неблагоприятным прогнозом и высокой смертностью. В доступной литературе нам не встретилось исследований, связанных с изучением связи полиморфизма гена *FAS* с предрасположенностью к ИПЛ при ССД.

**Цель** настоящего исследования заключалась в проверке гипотезы о возможной ассоциативной связи полиморфизма (-670A/G) гена *FAS* с ССД, ее клиническими и аутоиммунными фенотипами в российской выборке больных.

#### Материал и методы

В исследование включено 90 пациентов с ССД, прошедших лечение в клинике ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой в период с 2011 по 2014 г. Все пациенты отвечали клас-

сификационным критериям ССД Американской коллегии ревматологов (ACR) 1980 г. [9]. На основании медицинской документации (диагноз при выписке) все пациенты были классифицированы по характеру течения ССД — острое (О), подострое (ПО) или хроническое (ХТ); по клиническому кожному субтипу — ЛФ и ДФ; длительности заболевания — <3 лет и >3 лет. Кроме того, пациенты были стратифицированы по следующим клиническим фенотипам: наличию или отсутствию дигитальных язвочек (ДЯ+ и ДЯ- соответственно), ИПЛ (ИПЛ+ и ИПЛ-), склеродактилии (СДЛ+ и СДЛ-), поражения сердца (ПС+ и ПС-), поражения пищевода (ПП+ и ПП-). Диагноз ИПЛ был установлен на основании характерной картины по данным мультиспиральной компьютерной томографии грудной клетки. Поражение сердца диагностировалось на основании данных клинического исследования, электрокардиографии (ЭКГ), эхокардиографии (ЭхоКГ) и холтеровского мониторинга ЭКГ. Поражение пищевода выявлялось по клиническим данным и результатам эндоскопии желудочно-кишечного тракта.

Аутоиммунные фенотипы включали пациентов, в сыворотке которых выявлялось повышение содержания АТА или АЦА. Повышенный и нормальный уровень этих антител обозначали соответственно как (АТА+ и АТА-, АЦА+ и АЦА-). Антинуклеарный фактор (АНФ) и АЦА определяли методом непрямой иммунофлюоресценции на HEp-2 клетках с помощью набора реагентов IMMCO Diagnostics (США), АТА исследовались с помощью иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов Orgentec.

Уровень С-реактивного белка (СРБ) определяли высокочувствительным иммунонефелометрическим методом (верхняя граница нормы — 5 мг/л).

Иммунологические исследования были выполнены в лаборатории иммунологии и молекулярной биологии ревматических заболеваний ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой.

Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой, письменное информированное согласие получено от всех пациентов.

Контрольная группа состояла из 152 условно здоровых не родственных лиц, сопоставимых по полу и возрасту.

**Генотипирование.** У всех участников взяты образцы венозной крови. ДНК выделена из свежих или замороженных образцов крови солевым методом [10]. Полиморфизм (-670 A/G) гена *FAS* изучен с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом полиморфизма длин рестриктажных фрагментов [11]. Праймеры (прямой: 5'-СТАССТААГАГСТАТСТАССГТТС-3' и обратный: 5'-GGCTGTCCATGTTGTGGCTGC-3') были синтезированы в компании «Синтол» (Москва). ПЦР была проведена с использованием следующих температурных циклов: 94 °С — 2 мин, 94 °С — 30 с, 58 °С — 58 с, 72 °С — 30 с, общее количество циклов — 35, финальная достройка ампликона: 72 °С — 10 мин. Продукт амплификации был подвергнут гидролизу с помощью эндонуклеазы *Bst2UI* производства компании «СибЭнзим» (Новосибирск). Продукты рестрикции подвергали электрофорезу в 2% агарозном геле с последующей визуализацией фрагментов ДНК в трансиллюминаторе.

**Статистический анализ.** Различия в распределении частот аллелей и генотипов между больными и контролем были проанализированы с использованием таблицы сопряженности 2×2 ( $\chi^2$ ). Клинические фенотипы представлены как дихотомические вариабельности. Возраст и длительность заболевания представлены как среднее  $\pm$  стан-

дартное отклонение ( $M \pm \delta$ ). Дисперсионный анализ связи между дихотомическими переменными и изученным полиморфизмом гена *FAS* был проведен с помощью ANOVA post-hoc-теста с поправкой на множественные сравнения. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . Анализ данных был выполнен с использованием пакета программ Statistica 6.0 (Stat Soft Inc, США).

### Результаты

Демографическая и клинико-лабораторная характеристика больных ССД представлена в табл. 1.

Распределение частот генотипов и аллелей гена *FAS* в группе больных ССД и контроле представлено в табл. 2.

Распределение частот генотипов в группах контроля и пациентов находилось в согласии с законом Харди–Вайнберга при использовании  $\chi^2$ -теста. Сравнение частот генотипов и аллелей не выявило значимых различий между больными и лицами контрольной группы.

Сравнительный анализ распределения частот генотипов полиморфизма (-670A/G) в выборке больных ССД с разными клиническими фенотипами выявил статистически значимые различия, связанные с характером течения, наличием ДЯ и ИПЛ (табл. 3).

Анализ полученных данных показал, что частота генотипа GA в группе больных с ХТ была достоверно выше, чем у пациентов с О/ПО (72,0 и 47,5% соответственно;  $p=0,029$ ). Суммарная частота GA и GG при ХТ также была выше, чем при О/ОП (86,0 и 57,4% соответственно;  $p=0,005$ ).

При наличии ИПЛ генотипы GA и GG встречались достоверно реже чем у пациентов без ИПЛ (58,0 и 85,7%;  $p=0,039$  и 88,4 и 100%;  $p=0,002$  соответственно).

Частота генотипа GA у больных с ДЯ была несколько выше, чем при их отсутствии (соответственно 85,7 и 57,1%), но эти различия не достигали статистической достоверности. Однако суммарная частота GA- и GG-генотипов при наличии ДЯ была достоверно выше, чем у пациентов без ДЯ (90,9 и 60,3%;  $p=0,017$ ).

Выявлена тенденция к более высокой частоте GA-генотипа у пациентов, серопозитивных по АТА, по сравнению с серонегативными ( $p=0,068$ ). В то же время генотип GG у серопозитивных больных встречался достоверно реже, чем у серонегативных (6,1 и 21,6%;  $p=0,049$ ).

Не выявлено статистически значимых ассоциаций изученного полиморфизма гена *FAS* с длительностью ССД, кожной формой, ПС, ПП, СДЛ, повышением уровня АНФ, АЦА и СРБ.

Таким образом, в настоящем исследовании на сравнительно небольшой выборке российских больных не установлено статистически значимой ассоциативной взаимосвязи изученного полиморфизма -670A/G с предрасположенностью к ССД в целом и большинством ее клинико-иммунологических фенотипов. Выявлена статистически значимая положительная ассоциативная связь аллели G (генотипы GG и GA) с наличием ДЯ. В то же время у больных с ИПЛ аллель G (генотипы GG и GA) выявляется реже, чем у больных при отсутствии ИПЛ.

### Обсуждение

В данном пилотном исследовании мы впервые изучили ассоциативную взаимосвязь полиморфизма (-670) A/G промоторной области гена *FAS* с предрасположенностью к ССД и некоторыми ее клиническими фенотипами в российской выборке больных. В настоящее время роль

факторов внутренней и внешней среды в развитии ССД и ее клинико-иммунологических субтипов окончательно не выяснена, однако семейные, эпидемиологические и популяционные исследования подтверждают важную роль генетических факторов в ее патогенезе. По сравнению с популяцией распространенность ССД повышена в семьях со вторичными случаями заболевания (0,026 и 1,6%) [12]. Установлена более высокая конкордантность уровней антинуклеарных антител у монозиготных близнецов с ССД по сравнению с dizиготными [13]. Выявлена высокая частота ССД в некоторых генетически изолированных популяциях, таких как индейцы племени Choktaw [14].

Таблица 1 Характеристика пациентов с ССД (n=90)

Показатели	Значение
Пол, м./ж., n	8/82
Возраст, годы, $M \pm \delta$	49,4 $\pm$ 12,2
Длительность, годы, $M \pm \delta$	11,1 $\pm$ 9,5
ЛФ, n	42
ДФ, n	48
О/ПО, n	40
ХТ, n	50
ИПЛ+, n	75
ПС+, n	32
ПП+, n	78
ДЯ+, n	22
СДЛ+, n	49
СРБ $\geq$ 5 мг/мл, n	39
АТА+, n	52
АЦА+, n	16
АНФ+, n	68

Таблица 2 Распределение частот генотипов и аллелей гена *FAS*, n (%)

Генотип/аллель	ССД (n=90)	Контроль (n=152)
AA	21 (23,3)	48 (31,6)
GA	58 (64,4)	78 (51,3)
GG	11 (12,2)	26 (17,1)
	2n (%)	2n (%)
A	100 (55,5)	174 (57,2)
G	80 (44,5)	130 (42,8)

Таблица 3 Ассоциативная взаимосвязь генотипов гена *FAS* и некоторых клинических фенотипов ССД, n (%)

Клинические фенотипы	Генотипы		
	AA	GA	GG
О/ПО	17 (42,5)	19 (47,5)	4 (10,0)
ХТ	7 (14,0)	36 (72,0)*	7 (14,0)
ИПЛ+	21 (30,4)	40 (58,0)	8 (11,6)
ИПЛ-	0	18 (85,7)*	3 (14,3)
ДЯ+	2 (9,1)	18 (81,8)*	2 (9,1)
ДЯ-	25 (39,7)	36 (57,1)	2 (3,2)

Примечание. \* –  $p < 0,05$ .

В настоящем исследовании в российской выборке больных мы изучили полиморфизм -670A/G гена *FAS*, который, согласно недавним исследованиям, связан с предрасположенностью к ССД. Анализ распределения частот генотипов и аллелей не выявил достоверной связи данного генетического маркера с предрасположенностью к ССД. Наши данные отличаются от исследований, проведенных ранее в других популяциях. В когорте итальянских пациентов с ССД была выявлена достоверно более высокая частота аллели А по сравнению с контрольной группой. Генотип АА был ассоциирован с предрасположенностью к ССД как в общей группе больных, так и у пациентов с ЛФ и ДФ [1]. Несколько иные данные были получены в большом многоцентровом исследовании при изучении 9 этнически разных когорт. В британской, итальянской и белой американской когортах различалась ассоциация аллели G с ЛФ ССД [отношение шансов (ОШ) – 1,25; 1,43 и 1,18 соответственно]. В метаанализе была показана ассоциация аллели G (ОШ – 1,10) и генотипа GG (ОШ – 1,13) с ЛФ ССД [2]. Кроме того, в рецессивной генетической модели авторы установили сильную ассоциацию генотипа GG с ЛФ и позитивностью по АТА у больных с этой формой ССД. Мы не смогли подтвердить указанные выше данные, что можно объяснить небольшой по численности выборкой пациентов и генетическими особенностями российской популяции. Кроме того, нельзя исключить влияния генетических вариантов главного активатора апоптоза Т-клеток – растворимой формы FAS-белка.

Нами впервые была выявлена ассоциативная связь некоторых клинических фенотипов ССД с аллелью G. Промоторный полиморфизм (-670) A/G влияет на экспрессию гена *FAS*. Замена аллели А на аллель G приводит к разрушению интерферон- $\gamma$ -связывающего сайта для транскрипционного фактора STAT1. Было показано, что здоровые индивидуумы, гомозиготные по основной аллели

А («дикий тип»), имеют более высокие уровни экспрессии гена *FAS*, чем лица, гомозиготные по аллели G («мутантная» аллель) [15]. В связи с этим была выдвинута гипотеза, согласно которой повышенная экспрессия растворимого FAS-белка, наблюдаемая у больных ССД, является попыткой иммунной системы отменить аутореактивные, иммунные процессы, наблюдаемые при ССД. Исходя из этого, уровень FAS у индивидуумов, несущих генотип GG, будет в меньшей степени повышаться через STAT1-сигнальный каскад экспрессии этого белка, в результате чего эти лица в большей степени будут подвергаться действию аутореактивных Т-клеточных клонов.

Наши данные имеют ряд ограничений, обусловленных, во-первых, небольшим размером выборки больных ССД, а во-вторых, преобладанием среди них пациентов с ИПЛ (75 из 90). Найденные нами ассоциации с некоторыми клиническими фенотипами ССД нуждаются в верификации на больших по численности выборках в различных популяционных группах. Необходимо также изучение других функциональных генетических вариантов гена *FAS* и растворимой формы белка FAS одновременно, чтобы проверить значение оси FAS/FAS-лиганд, играющей значительную роль в аутореактивных, иммунных процессах при ССД.

#### Прозрачность исследования

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

#### Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции и дизайна исследования и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за исследование.

## ЛИТЕРАТУРА

- Liakouli V, Manetti M, Pacini A, et al. The -670G>A polymorphism in the FAS gene promoter region influences the susceptibility to systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(4):584-90. doi: 10.1136/ard.2008.088989
- Broen J, Gourh P, Rueda B, et al. The FAS - 670A>G polymorphism influences susceptibility to systemic sclerosis phenotypes. *Arthritis Rheum.* 2009;60(12):3815-20. doi: 10.1002/art.24964
- Cipriani P, Fulminis A, Pingiotti E, et al. Resistance to apoptosis in circulating  $\alpha/\beta$  and  $\gamma/\delta$  T lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2006;33:2003-14.
- Wetzig T, Petri JB, Mittag M, Hausteil UF. Serum levels of soluble FAS/APO-1 receptor are increased in systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res.* 1998;290(4):187-90. doi: 10.1007/s004030050288
- Kamenitsu S, Ihara K, Saifiddin A, et al. A functional polymorphism in fas (CD95/APO-1) gene promoter associated with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2002;29(6):1183-8.
- Wasfi YS, Silveria LJ, Jonth A, et al. Fas promoter polymorphisms: genetic predisposition to sarcoidosis in African-Americans. *Tissue Antigens.* 2008;72(1):39-48. doi: 10.1111/j.1399-0039.2008.01060.x
- Agarwal K, Czaja AJ, Donaldson PT. A functional Fas promoter polymorphism is associated with a severe phenotype in type 1 autoimmune hepatitis characterized by early development of cirrhosis. *Tissue Antigens.* 2007;Mar;69(3):227-35. doi: 10.1111/j.1399-0039.2006.00794.x
- Van Veen T, Kalkers NF, Crusius JB, et al. The FAS-670 polymorphism influences susceptibility to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2002 Jul;128(1-2):95-100. doi: 10.1016/S0165-5728(02)00163-7
- Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 1980;23:581-90. doi: 10.1002/art.1780230510
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;Feb 11;16(3):1215. doi: 10.1093/nar/16.3.1215
- Huang QR, Morris D, Manolios N. Identification and characterization of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. *Mol Immunol.* 1997 Jun;34(8-9):577-82. doi: 10.1016/S0161-5890(97)00081-3
- Meier FM, Frommer KW, Dinser R, et al. Update on the profile of the EUSTAR cohort: an analysis of the EUSTAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann Rheum Dis.* 2012 Aug;71(8):1355-60. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200742
- Ferri C, Valentini G, Cozzi F, et al. Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1012 Italian patients. *Medicine (Baltimore).* 2002;81:139-53. doi: 10.1097/00005792-200203000-00004
- Scussel-Lonzetti L, Joyal F, Raynauld JP, et al. Predicting mortality in systemic sclerosis: analysis of cohort of 309 French Canadian patients with emphasis on features at diagnosis as predictive factors for survival. *Medicine (Baltimore).* 2002;81:154-67. doi: 10.1097/00005792-200203000-00005
- Mahfoudh W, Bel H Jr, Romdhane A, Chouchane L. A polymorphism in FAS gene promoter correlated with circulating soluble FAS levels. *Int J Immunogenet.* 2007 Jun;34(3):209-12. doi: 10.1111/j.1744-313X.2007.00676.x