

ΑΠΟ ΤΟΝ ΤΟΜΕΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Δ/ντής: Καθηγήτης Ν. Σταθάκης

**ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ
ΜΙΚΡΟΣΩΜΙΩΝ ΗΠΑΤΟΣ-ΝΕΦΡΩΝ (ΑΝΤΙ-LKM)
ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΜΗ-ΟΡΓΑΝΟΕΙΔΙΚΩΝ
ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ
ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C**

Καλλιόπη Β. Ζάχου
Ιατρός Παθολόγος

Διδακτορική Διατριβή που υποβλήθηκε στο Ιατρικό Τμήμα
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Λάρισα 2003



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

Αριθ. Εισ.: 2856/1

Ημερ. Εισ.: 31-07-2009

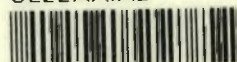
Δωρεά:

Ταξιδετικός Κωδικός: Δ

616.362 3

ZAX


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083643

ΑΠΟ ΤΟΝ ΤΟΜΕΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Δ/ντής: Καθηγητής Ν. Σταθάκης

**ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ
ΜΙΚΡΟΣΩΜΙΩΝ ΗΠΑΤΟΣ-ΝΕΦΡΩΝ (ΑΝΤΙ-LKM)
ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΜΗ-ΟΡΓΑΝΟΕΙΔΙΚΩΝ
ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ
ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C**



Καλλιόπη Β. Ζάχου
Ιατρός Παθολόγος

Διδακτορική Διατριβή που υποβλήθηκε στο Ιατρικό Τμήμα
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Λάρισα 2003

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Σταθάκης Νικόλαος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Νταλέκος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τσικρίκας Θωμάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Σταθάκης Νικόλαος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κουκούλης Γεώργιος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μελέκος Μιχαήλ, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μολυβδάς Πασχάλης Αδάμ, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Νταλέκος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τσικρίκας Θωμάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γουργουλιάνης Κων/νος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

Πρόλογος

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
-------------------	---

ΜΕΡΟΣ Α'

Αυτοανοσία – Αυτοαντισώματα – Αυτοάνοσες παθήσεις του ήπατος	2
1. Ειδική ανοσολογική απόκριση – Ανοσολογική ανοχή.....	2
2. Αυτοανοσία – Αυτοαντισώματα.....	10
2.1. Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA).....	13
2.2. Αντισώματα έναντι δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (αντι-DNA).....	15
2.3. Αντισώματα έναντι καρδιολιπίνης (αντι-CL).....	18
2.4. Αντισώματα κατά του κυτταροπλάσματος των ουδετερόφιλων (ANCA).....	21
2.5. Αντισώματα έναντι τοιχωματικών κυττάρων στομάχου (PCA).....	23
2.6. Αντισώματα έναντι λείων μυικών ινών (SMA).....	25
3. Αυτοαντισώματα στα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος.....	26
3.1. Πρωτοπαθής χολική κίρρωση.....	26
3.2. Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ).....	30
3.3. Αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ).....	31
3.4. Σύνδρομο επικάλυψης.....	39
Βιβλιογραφία 1.....	42

ΜΕΡΟΣ Β'

Ηπατίτιδα C.....	72
1. Επιδημιολογία	
1.1. Τρόποι μετάδοσης.....	74
1.1.1. Μετάδοση με την παρεντερική οδό.....	75
1.1.2. Μετάδοση με μη παρεντερική οδό.....	79
1.1.3. Σποραδική ή κρουσιγενής μετάδοση.....	81
1.2. Η έκταση του προβλήματος.....	81
2. Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV).....	83
2.1. Η δομή του HCV.....	83
2.2. Η γενετική ετερογένεια του HCV.....	89
2.2.1. Γονότυποι του HCV.....	89
2.2.2. Σχεδόν είδη ή παρόμοια γονιδιώματα του HCV (quasispecies).....	91
3. Φυσική ιστορία της ηπατίτιδας C.....	95

4. Εξωηπατικές εκδηλώσεις της χρόνιας λοίμωξης από τον HCV.....	104
4.1. Εξωηπατικές εκδηλώσεις με ισχυρή συσχέτιση με τον HCV.....	107
4.1.1. Μικτή κρουσφαιριναιμία (MC).....	107
4.1.2. Σπειραματονεφρίτιδα.....	109
4.1.3. Αγγειίτιδα.....	110
4.1.4. Σύνδρομο Sicca.....	110
4.2. Άλλες εξωηπατικές εκδηλώσεις με λιγότερο ισχυρή ή αμφισβητήσιμη συσχέτιση με τον HCV.....	112
4.2.1. Non-Hodgkin's λέμφωμα.....	112
4.2.2. Δερματολογικές εκδηλώσεις.....	114
4.2.3. Αυτοάνοσες νόσοι του θυρεοειδούς.....	115
4.2.4. Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APLS).....	116
4.3. Παθήσεις, σπανιότερα αναφερόμενες στη βιβλιογραφία ως εξωηπατικές εκδηλώσεις του HCV.....	120
5. Αυτοαντισώματα και χρόνια λοίμωξη από τον HCV.....	122
Βιβλιογραφία 2.....	132
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	170
Επιπολασμός αντισωμάτων κατά μικροσωμίων ήπατος-νεφρών (αντι-LKM) και άλλων μη-οργανοειδικών αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C.....	171
1. Εισαγωγή.....	172
2. Ασθενείς και μέθοδοι.....	175
2.1.1. Ασθενείς.....	175
2.1.2. Ασθενείς (n = 174).....	181
2.1.3. Ασθενείς (n = 39).....	183
2.2. Ανίχνευση αντι-LKM, ANA, AMA, SMA, PCA, αντι-LC1 με έμμεσο ανοσο- φθορισμό.....	183
2.3. Ανίχνευση ANA, AMA, SMA με έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα κυτταρικές σειρές λαρυγγικού καρκινώματος ανθρώπου (HEp2 κύτταρα).....	184
2.4. Ανίχνευση ANCA με έμμεσο ανοσοφθορισμό.....	185
2.5. Ανίχνευση IgG αντισωμάτων κατά καρδιολιπίνης (αντι-CL).....	185
2.6. Ανίχνευση IgG αντισωμάτων κατά διπλής έλικας DNA (αντι-dsDNA).....	187
2.7. Ανίχνευση αντισωμάτων εναντίον της β2 γλυκοπρωτεΐνης I (αντι-β2-GPI)....	188
2.8. Άλλες μέθοδοι ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων.....	189

2.9. Στατιστική ανάλυση.....	195
3. Αποτελέσματα.....	197
3.1. Συχνότητα ανίχνευσης αντισωμάτων στους ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV.....	197
3.2. Συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων με δημογραφικά και επιδημιολογικά δεδομένα.....	202
3.3. Συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων με κλινικά, εργαστηριακά στοιχεία και λήψη ειδικής αντι-ιικής θεραπείας.....	206
3.4. Συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων με ιστολογικά ευρήματα και ιολογικές παραμέτρους (ιικό φορτίο, γονότυπος).....	213
3.5. Αποτελέσματα στους 174 τυχαία επιλεγμένους ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV.....	215
3.6. Αποτελέσματα στους 39 τυχαία επιλεγμένους ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV.....	223
4. Συζήτηση.....	226
Βιβλιογραφία.....	239
Περίληψη και συμπεράσματα.....	250
Summary and conclusions.....	255

*Με τους μεγάλους
ο μικρός ψηλάνει και ο μεγάλος πάλι
με τη βοήθεια των μικρών γίνεται μεγαλύτερος.
Σοφοκλής (Αίας)*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) αποτελεί μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας, παγκοσμίως. Ο HCV είναι ένας ηπατοτρόπος και λεμφοτρόπος ιός, που προκαλεί μια σιωπηλή και ασυμπτωματική νόσο στο πλείστο των περιπτώσεων, καταλήγοντας σε χρονιότητα σε υψηλό ποσοστό. Επιπλέον, ο HCV χαρακτηρίζεται από επαγωγή αυτοανόσων αντιδράσεων, οι οποίες συνίστανται στον συσχετισμό της λοίμωξης με ποικίλες εξωηπατικές εκδηλώσεις και στην ανίχνευση οργανοειδικών και μη οργανοειδικών αυτοαντισωμάτων στον ορό των ασθενών με χρόνια λοίμωξη. Πολλά από τα αυτοαντισώματα αυτά είναι παρόμοια με εκείνα, που ανιχνεύονται και χαρακτηρίζουν τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος. Τόσο οι εξωηπατικές εκδηλώσεις όσο και η παραγωγή αυτοαντισωμάτων μπορούν να ευοδωθούν από τη χορηγούμενη θεραπευτική αγωγή (α-ιντερφερόνη, α-IFN). Επιπρόσθετα, είναι γνωστό ότι ένα μικρό ποσοστό ασθενών με χρόνια

λοίμωξη από τον HCV και θετικά αντισώματα έναντι μικροσωμίων ήπατος-νεφρών (αντι-LKM) παρουσιάζουν έξαρση της ηπατικής νόσου κατά τη θεραπεία με α-IFN.

Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκαν ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C για την παρουσία στον ορό τους αντι-LKM και διαφόρων άλλων αυτοαντισωμάτων. Πιο αναλυτικά στο γενικό μέρος: (α) γίνεται εισαγωγή σε βασικές γνώσεις ανοσολογίας, (β) αναλύονται τα αυτοαντισώματα που χαρακτηρίζουν τις αυτοάνοσες παθήσεις του ήπατος, (γ) δίδεται αναλυτικά η δομή του HCV, (δ) παρατίθενται τα επιδημιολογικά δεδομένα της λοίμωξης παγκοσμίως και στην Ελλάδα, καθώς και η φυσική ιστορία της νόσου και (ε) αναλύονται οι εξωηπατικές εκδηλώσεις με τις οποίες έχει συσχετιστεί η χρόνια ηπατίτιδα C και τα αυτοαντισώματα, που ανιχνεύονται στους ορούς των ασθενών. Στο ειδικό μέρος παρουσιάζεται: (α) η συχνότητα ανίχνευσης των αντι-LKM και άλλων αυτοαντισωμάτων σε μεγάλο μη επιλεγμένο δείγμα Ελλήνων ασθενών, (β) η αντιδραστικότητα των αντι-LKM αντισωμάτων έναντι των μοριακά προσδιοριζόμενων αντιγόνων τους σε ένα μέρος των ασθενών, (γ) η συσχέτιση των ανιχνευόμενων αυτοαντισωμάτων με την παρουσία εξωηπατικών εκδηλώσεων, με επιδημιολογικά, δημογραφικά, εργαστηριακά, ιστολογικά, ιολογικά δεδομένα καθώς και με το στάδιο της νόσου.

Τα παραπάνω αναμένεται να συμβάλλουν στον προσδιορισμό του πραγματικού επιπολασμού των αντι-LKM και διαφόρων άλλων αυτοαντισωμάτων στους Έλληνες ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C, τη διερεύνηση της συσχέτισής τους με τις εξωηπατικές εκδηλώσεις της λοίμωξης

και την επιδείνωση της ηπατικής νόσου και τέλος τον καθορισμό των παραγόντων, που πιθανώς να συμβάλλουν στην εμφάνισή τους.

Για την εκπόνηση της διατριβής και την ολοκλήρωσή της υπήρξε πολύτιμη βοήθεια από πολλούς στους οποίους εκφράζω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω το δάσκαλό μου Καθηγητή κ. Ν. Σταθάκη για τις πολύτιμες παρατηρήσεις του από το σχεδιασμό μέχρι την ολοκλήρωση της διατριβής, τον επίσης δάσκαλό μου, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γ.Ν. Νταλέκο για τη 'μύησή' μου στις εργαστηριακές τεχνικές της Ανοσολογίας και στα δύσβατα, για μένα, πεδία της Ηπατολογίας και ειδικότερα των Αυτοανόσων Νόσων του Ήπατος, καθώς και τη συνεχή και γεμάτη οξυδέρκεια συμπαράστασή του στην εκπόνηση της διατριβής. Πολύτιμες παρατηρήσεις έγιναν και από το άλλο μέλος της τριμελούς επιτροπής Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Θ. Τσικρίκα, τον οποίο ευχαριστώ. Είμαι επίσης ευγνώμων στον συνάδελφο ιατρό κ. Χ. Λιάσκο και την παρασκευάστρια κ. Ε. Εξάρχου για τη συμπαράστασή τους κατά την εκμάθηση και επιτέλεση διαφόρων τεχνικών στο Εργαστήριο Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, καθώς και στους ιατρούς-συνεργάτες του κ. Γ.Ν. Νταλέκου στο Ηπατολογικό Ιατρείο, για τη σημαντική βοήθειά τους στην ακριβή τήρηση του σχεδιασμού του πρωτοκόλλου σχετικά με τη συλλογή των δειγμάτων.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω και να αφιερώσω το παρόν σύγγραμμα, στα παιδιά μου, στον σύζυγό μου και στους γονείς μου για την ηθική τους συμπαράσταση και την αμέριστη υπομονή τους στη διάρκεια των πειραμάτων, στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων και συγγραφής.

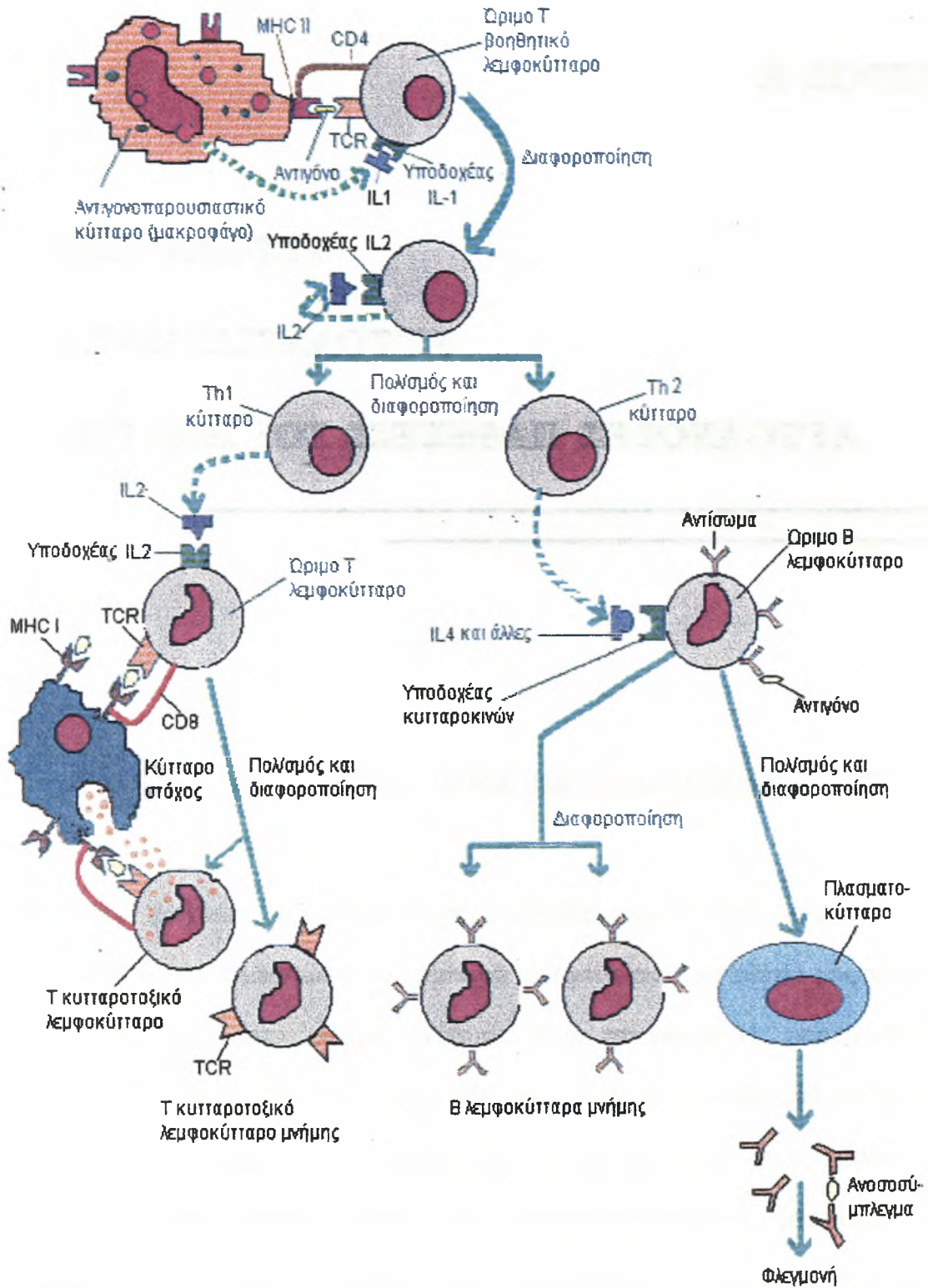
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΡΟΣ Α'

ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ- ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ- ΑΥΤΟΑΝΟΣΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

1. ΕΙΔΙΚΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ – ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΟΧΗ.

Η ειδική ανοσολογική απόκριση δημιουργείται, φυσιολογικά, όταν ο οργανισμός εκτεθεί σε ξένα αντιγόνα, έχοντας σαν πρωταγωνιστές τα Τ και Β λεμφοκύτταρα. Η απόκριση αυτή λαμβάνει χώρα, κατά τεκμήριο, στο δομημένο δευτερογενή λεμφικό ιστό. Οι φάσεις της ειδικής ανοσολογικής απόκρισης είναι τρεις: η φάση αναγνώρισης του αντιγόνου, η φάση ενεργοποίησης (πολλαπλασιασμός του λεμφοκυτταρικού κλώνου και διαφοροποίησή του) των ανοσοδραστικών κυττάρων και η φάση καταστροφής του αντιγόνου μέσω ειδικών ανοσοσφαιρινών (χυμική ανοσία) ή κυττάρων (κυτταρική ανοσία) (1,2). Συνοπτικά, η ειδική ανοσολογική απόκριση φαίνεται στο Σχήμα 1.



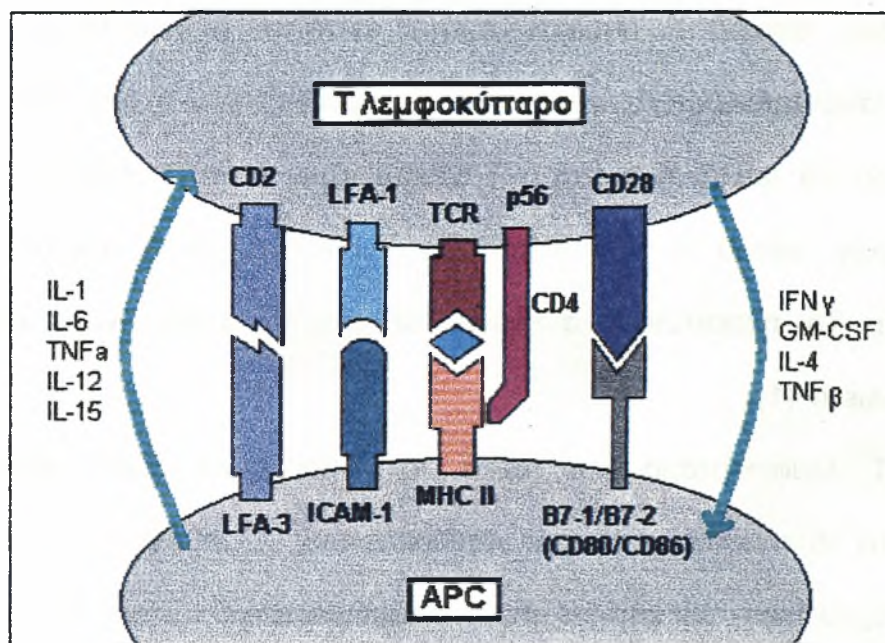
Σχήμα 1. Μοντέλο κυτταρικής αλληλεπίδρασης κατά την ανοσολογική απόκριση.

(Από το: Pathophysiology. The biologic basis of disease in adults and children, 1998, σελ. 199⁽²⁾).

Τα Β λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν το αντιγόνο μέσω της επιφανειακής τους ανοσοσφαιρίνης. Η αναγνώριση του αντιγόνου και στη συνέχεια η ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων χωρίς τη βοήθεια των Τ λεμφοκυττάρων, αφορά τα 'θυμοανεξάρτητα' αντιγόνα (μεγάλα πολυμερή μόρια με επαναλαμβανόμενες πανομοιότυπες ομάδες), ενώ η αναγνώριση του αντιγόνου και τελικά η παραγωγή αντισωμάτων με τη βοήθεια των Τ λεμφοκυττάρων, αφορά τα 'θυμοεξαρτώμενα' αντιγόνα (μικρά πρωτεϊνικά μόρια) (1,3). Τα περισσότερα αντιγόνα και όλα τα αυτοαντιγόνα είναι 'θυμοεξαρτώμενα' (1).

Τα Τ λεμφοκύτταρα και ειδικά τα Τ-βοηθητικά (CD4 θετικά) αναγνωρίζουν το αντιγόνο μέσω του υποδοχέα τους (T-cell receptor, TCR) μετά την παρουσίασή του από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (antigen presenting cells, APCs), που εκπροσωπούνται κυρίως από τα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα και τα Β λεμφοκύτταρα. Η παρουσίαση και αναγνώριση γίνεται μέσω σύνδεσης του TCR με ειδικά αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHC II) των APCs. Για την ενεργοποίηση, όμως, του CD4⁺ Τ λεμφοκυττάρου, εκτός της σύνδεσης MHC II-αντιγόνου-TCR, σημαντικότατο ρόλο παίζουν ειδικά μόρια της επιφάνειας των Τ λεμφοκυττάρων και των APCs, τα λεγόμενα συν-διεγερτικά μόρια (ICAM1-LFA1, CD80/CD86-CD28, LFA3-CD2), που αποτελούν το 'δεύτερο σήμα' (3) (Σχήμα 2). Χωρίς αυτό το σήμα τα Τ λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν, μεν, το αντιγόνο αλλά παραμένουν ανενεργά, δημιουργώντας μία κατάσταση ανοσολογικής "άγνοιας", την κλωνική ανεργία (3,4). Επιπλέον, κυτταροκίνες, που δρουν τοπικά (IL-1, IL-6, INF-γ, TNFα κλπ) συμβάλλουν στην ενεργοποίηση-πολλαπλασιασμό του Τ λεμφοκυττάρου, με τελικό αποτέλεσμα

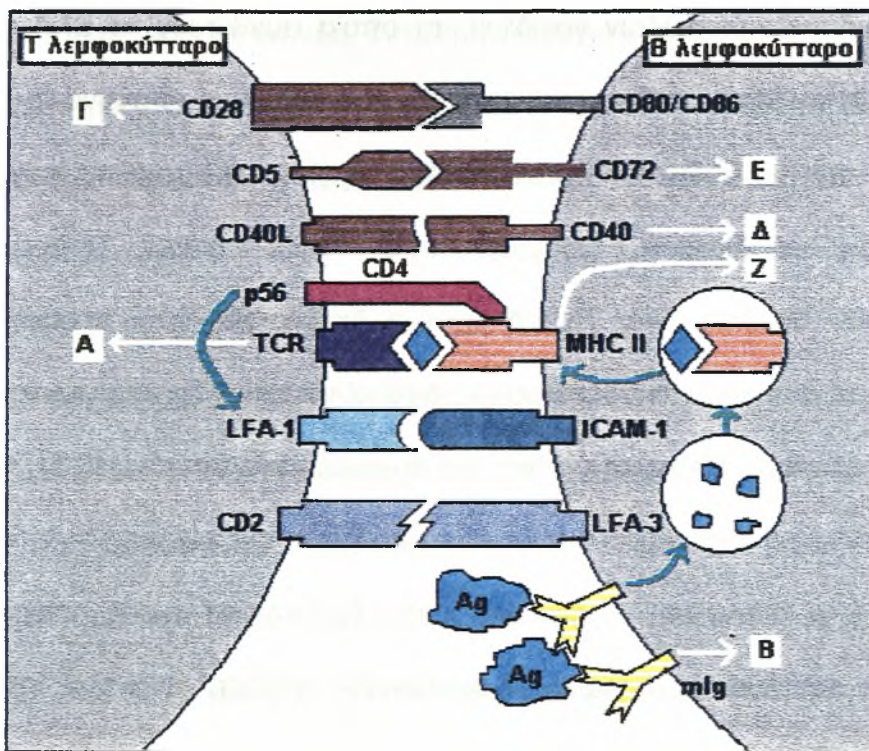
την παραγωγή ιντερλευκίνης 2 (IL-2), ενώ ταυτόχρονα εκφράζονται υποδοχείς της IL-2 στην επιφάνειά τους (1,3,4) (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Κύρια συν-διεγερτικά μόρια και κυτταροκίνες που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση T λεμφοκυττάρου-αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου (APC). (Από το: Roit I (Ed). *Immunology*, 4th edition, Mosby 1996, σελ. 8.3⁽³⁾).

Τα T λεμφοκύτταρα, που δεν παράγουν IL-2, λέγονται ανεργικά (anergic), και μερικά από αυτά παράγουν ιντερλευκίνη 10 (IL-10), η οποία καταστέλλει την ενεργοποίηση όλων των T λεμφοκυττάρων (5,6). Οι κυτταροκίνες, επίσης, που εκκρίνονται αρχικά από διάφορα κύτταρα του λεμφικού ιστού σε απάντηση στο αντιγονικό ερέθισμα καθορίζουν την διαφοροποίηση του T-βοηθητικού λεμφοκυττάρου προς τύπου 1 (T_H1) ή τύπου 2 (T_H2), ώστε να επιλεγεί ο αποτελεσματικός μηχανισμός 'εξόντωσης' του αντιγονικού εισβολέα (3,4). Τα T_H1 λεμφοκύτταρα παράγουν κυρίως IL-2 και ιντερφερόνη- γ (INF- γ) και έτσι ενεργοποιούν τα μακροφάγα και τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CD8 θετικά), ενώ τα T_H2 λεμφοκύτταρα απελευθερώνουν, κυρίως,

ιντερλευκίνες 4,5,6,10 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) και έτσι προάγουν την παραγωγή ηωσινόφιλων, μαστοκυττάρων και αντισωμάτων από τα πλασματοκύτταρα (3,4). Τα T_H2 λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν με τα B λεμφοκύτταρα μέσω σύνδεσης TCR-MHC II, αλλά και με τη βοήθεια άλλων μορίων, κυρίως του συνδέτη του μορίου CD40 (CD40 ligand, που βρίσκεται στο ενεργοποιημένο T λεμφοκύτταρο) και του CD40 (που βρίσκεται στο B λεμφοκύτταρο) (1,2,3) (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Μόρια της κυτταρικής μεμβράνης που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση μεταξύ T_H και B λεμφοκυττάρου. Η ανοσοσφαιρίνη της μεμβράνης (mlg) προσλαμβάνει το αντιγόνο στον ενδοκυττάριο χώρο, όπου διασπάται και τα πεπτίδια συνδέονται με τα μόρια MHC τάξης II. Τα A και B αφορούν οδούς διαβίβασης σήματος (μεταξύ αντιγόνου-υποδοχέα), που σχετίζονται με τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης και τη διάσπαση της φωσφοϊνοσιτόλης. Το CD28 (Γ) και το CD40 (Δ) στέλνουν σημαντικό «σήμα» ενεργοποίησης στο T και το B λεμφοκύτταρο αντίστοιχα, ενώ τα MHC II (Z) και CD72 (E) αποτελούν ξεχωριστά «σήματα». (Από το: *Roit I (Ed). Immunology, 4th edition, Mosby 1996, σελ. 8.4⁽³⁾*).

Η αλληλεπίδραση μεταξύ T και B λεμφοκυττάρου οδηγεί είτε σε ενεργοποίηση του B λεμφοκυττάρου, διαφοροποίηση προς πλασματοκύτταρα και τελικά παραγωγή ειδικών για το αντιγόνο αντισωμάτων είτε σε απενεργοποίησή του (κλωνική ανεργία), όπως συμβαίνει κατά την αλληλεπίδραση T λεμφοκυττάρου και αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου (3).

Η ανοσολογική ειδικότητα των αντιγονικών υποδοχέων τόσο των T (TCR) όσο και των B λεμφοκυττάρων (ανοσοσφαιρίνες), είναι αποτέλεσμα τυχαίου συνδυασμού πολλών γονιδίων, τα οποία συνθέτουν το DNA, που κωδικογραφεί τη θέση σύνδεσης των υποδοχέων αυτών με το αντιγόνο (3,4). Θεωρητικά, αυτή η διαδικασία οδηγεί σε δημιουργία πολύ μεγάλης ποικιλίας διαφορετικών υποδοχέων, ορισμένοι από τους οποίους μπορεί να αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα. Ανοχή είναι η διαδικασία, που περιορίζει ή εξουδετερώνει αυτοδραστικά κύτταρα (auto-reactive cells) δημιουργώντας μία κατάσταση έλλειψης απόκρισης, ειδική για συγκεκριμένο αντιγόνο (3,5). Η πιο σημαντική πλευρά της ανοσολογικής ανοχής είναι η αναγνώριση των 'ίδιων' αντιγόνων (self-tolerance). Η διαταραχή της διαδικασίας αυτής μπορεί να προκαλέσει αυτοανοσία, δηλαδή ανοσολογική 'επίθεση' εναντίον ιστικών στοιχείων του ίδιου του οργανισμού.

Συνοπτικά, υπάρχουν τέσσερις τρόποι, με τους οποίους αποτρέπονται τα αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα να κατευθυνθούν εναντίον 'ίδιων' αντιγόνων (3):

- Κλωνική διαγραφή (clonal deletion): εξουδετέρωση των κυττάρων σε κάποιο στάδιο κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους.
- Κλωνική εκτροπή (clonal abortion): αναστολή της περαιτέρω διαφοροποίησης των ανώριμων κυττάρων.

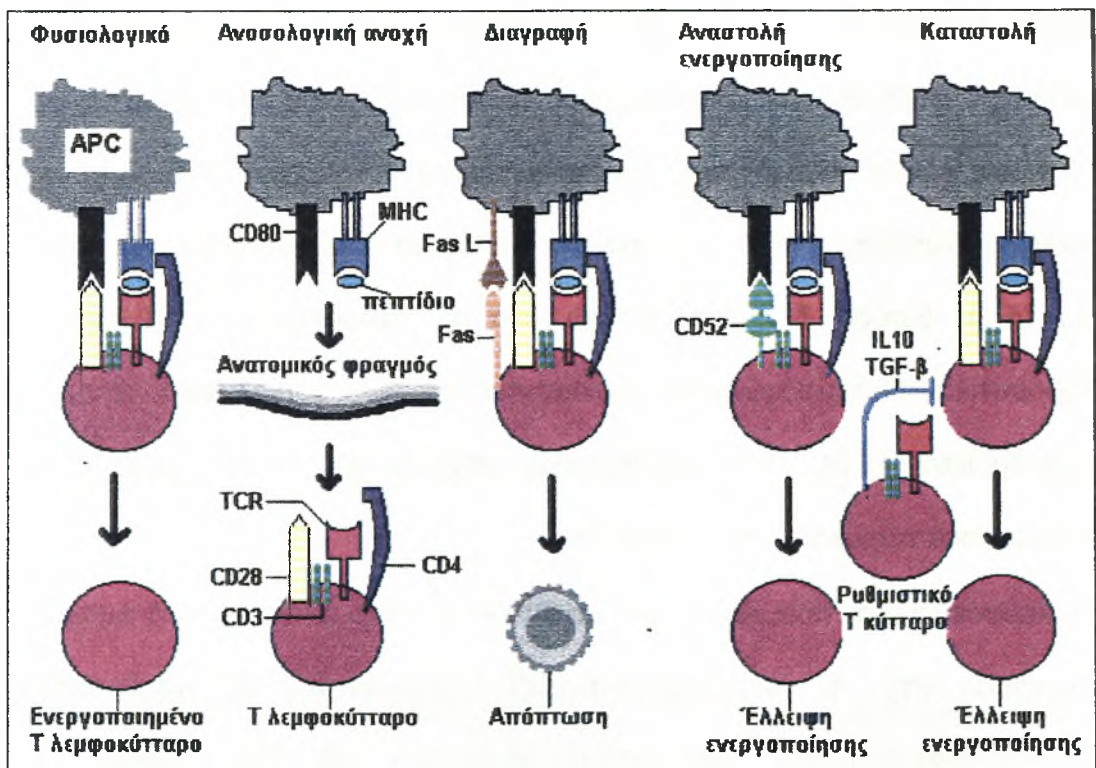
- Κλωνική ανεργία (clonal anergy): καταστολή των μηχανισμών της ανοσολογικής απόκρισης.
- Καταστολή (suppression): αναστολή της κυτταρικής ενεργοποίησης μέσω αλληλεπίδρασης με άλλα κύτταρα, όπως αυτά, που παράγουν ανασταλτικές κυτταροκίνες ή ειδικά αντι-ιδιοτυπικά λεμφοκύτταρα, που αναγνωρίζουν τον αντιγονικό υποδοχέα.

Η ανοχή αφορά την εξουδετέρωση των αυτοδραστικών Τ ή/και Β λεμφοκυττάρων. Αναλυτικότερα, επειδή η παραγωγή αντισωμάτων με υψηλή συγγένεια προς το αντιγόνο (high affinity antibodies) εξαρτάται από τα Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία, επιπλέον, αποκτούν ευκολότερα ανοχή σε σχέση με τα Β λεμφοκύτταρα, η ανοχή των Β λεμφοκυττάρων οφείλεται κυρίως στην έλλειψη 'βοήθειας' από τα Τ λεμφοκύτταρα (3,5).

Οι μηχανισμοί ανοχής των Τ λεμφοκυττάρων είναι δύο: η κεντρική και η περιφερική ανοχή. Η κεντρική ανοχή αφορά την αρνητική επιλογή (negative selection) αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων στο θύμο, που επιτυγχάνεται με απόπτωση των κυττάρων, που συνδέουν ισχυρά το αυτοαντιγόνο (3,5). Η πρόκληση κεντρικής ανοχής απαιτεί την παρουσία των αυτοαντιγόνων στο θύμο (5,7). Επειδή δεν εκφράζονται όλα τα αυτοαντιγόνα στο θύμο, αυτοδραστικά Τ λεμφοκύτταρα, βρίσκονται και σε φυσιολογικά άτομα, εξουδετερώνονται, δε, από περιφερικούς μηχανισμούς όπως αναφέρεται επιγραμματικά παρακάτω (5) (Σχήμα 4):

- Τ λεμφοκύτταρα, που χωρίζονται από το αντίστοιχο αντιγόνο από φυσικό φραγμό (πχ ο αιματοεγκεφαλικός), βρίσκονται σε κατάσταση ανοσολογικής 'άγνοιας' (immunologic ignorance), γιατί δεν μπορούν να ενεργοποιηθούν.

- Τ λεμφοκύτταρα, που εκφράζουν το μόριο Fas (CD95) στην επιφάνειά τους, μπορούν να λαμβάνουν σήματα από κύτταρα, που εκφράζουν τον υποδοχέα του Fas (Fas ligand), οπότε οδηγούνται σε απόπτωση, μία διαδικασία γνωστή ως 'διαγραφή' (deletion) (8,9,10).
- Το μόριο CD152 (CTLA-4, cytotoxic-T-lymphocyte-associated protein 4) των Τ λεμφοκυττάρων συνδέεται με το CD80 (B7-1) και το CD86 (B7-2) των Β λεμφοκυττάρων με υψηλότερη συγγένεια (affinity) σε σχέση με το συν-διεγερτικό μόριο CD28. Έτσι, το CD152 αναστέλλει την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων (11).
- Ανοσορρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα μπορούν να καταστείλουν άλλα Τ λεμφοκύτταρα μέσω της παραγωγής ανασταλτικών κυτταροκινών όπως η IL-10 και ο TGF- β (5,6,12).



Σχήμα 4. Περιφερικοί μηχανισμοί ανάπτυξης ανοσολογικής ανοχής (Από το:

Tolerance and autoimmunity. N Engl J Med 2001; 344, σελ. 657⁽⁵⁾).

2. ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ-ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, οι μηχανισμοί ανοσολογικής ανοχής είναι ποικίλοι και δρουν σε διάφορα επίπεδα της ανοσολογικής απόκρισης. Επομένως, είναι πολύ πιθανό να υπάρχουν πολλαπλοί τρόποι υπερκερασμού της ανοχής, που μπορούν να οδηγήσουν σε ανοσολογική απόκριση έναντι 'ίδιων' αντιγόνων, δηλαδή την εκδήλωση αυτοανόσων φαινομένων ή την πλήρη εκδήλωση αυτοανοσίας. Επιπλέον, η πρόκληση από την αυτοανοσία ιστικών βλαβών ή διαταραχής της λειτουργικότητας οργάνων, οδηγεί σε αυτοάνοση νόσο (1).

Η γενετική προδιάθεση αποτελεί έναν από τους παράγοντες, που μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση αυτοανοσίας, όπως, κυρίως, ο απλότυπος του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (HLA haplotype) (5). Η έκταση της εξουδετέρωσης των αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων στο θύμο ποικίλλει, εξαρτώμενη από το γονότυπο των MHC τάξης II μορίων του κάθε ατόμου: ορισμένοι MHC τάξης II γονότυποι μπορεί να αποτυγχάνουν να οδηγήσουν σε αρνητική επιλογή αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων ή σε θετική επιλογή ανοσορρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων, που καταστέλλουν τα αυτοαντιδραστικά (3). Κάτι ανάλογο μπορεί να συμβεί και στην περιφερική Τ λεμφοκυτταρική ανοχή κατά την παρουσίαση του αντιγόνου στα Τ λεμφοκύτταρα μέσω του MCH II. Επιπρόσθετα, η ανάλυση του ανθρώπινου γενώματος έδειξε ότι κάποια γονίδια κυταροκινών, υποδοχέων κυταροκινών και άλλων ανοσορρυθμιστικών μορίων μπορεί να σχετίζονται με γενετική προδιάθεση σε αυτοανοσία (5,13).

Άλλος μηχανισμός πρόκλησης αυτοανοσίας είναι η ενεργοποίηση ανεργικών, αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων (που υπάρχουν φυσιολογικά στη φαρέτρα του ανοσολογικού συστήματος) από λοιμογόνους παράγοντες (5). Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι οι λοιμώξεις ενέχονται στην παθογένεια αυτοανόσων νόσων, μέσω ποικίλων μηχανισμών όπως: α) η απελευθέρωση στην κυκλοφορία αυτοαντιγόνων, που ήταν περιορισμένα ώστε να μην έρχονται σε επαφή με ανοσοδραστικά κύτταρα, λόγω ιστικής βλάβης από τον λοιμογόνο παράγοντα (14), β) η ενεργοποίηση μεγάλου μέρους του πληθυσμού των Τ λεμφοκυττάρων από υπεραντιγόνα (superantigens), τα οποία είναι μόρια (όπως η σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη και μερικές ιικές πρωτεΐνες), που οδηγούν σε μη ειδική ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων (15), γ) η προαγωγή παραγωγής κυτταροκινών και συνδιεγερτικών μορίων, που αποτελούν το δεύτερο σήμα κατά την ανοσολογική απόκριση (costimulatory molecules), από προϊόντα του εισβάλλοντος μικροοργανισμού (by-stander activation) (16,17), δ) η επαγωγή, από ορισμένα βακτήρια, παραγωγής αντισωμάτων, τα οποία φέρουν παθολογικούς ιδιότυπους αυτοαντισωμάτων, που σε συνδυασμό με την επίδραση επιπρόσθετου λοιμογόνου παράγοντα, οδηγούν σε αυτοάνοση απόκριση (18).

Εναλλακτικά, η μοριακή ομολογία ορισμένης ακολουθίας αμινοξέων μεταξύ λοιμογόνου παράγοντα και αυτοαντιγόνου ('μοριακή μίμηση') μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση αυτοαντιδραστικών Τ λεμφοκυττάρων, που αναγνωρίζουν τόσο το πεπτίδιο του λοιμογόνου παράγοντα όσο και το 'ίδιο' πεπτίδιο (5,19). Εντούτοις, δεν υπάρχουν, προς το παρόν in vivo ισχυρές ενδείξεις ότι η 'μοριακή μίμηση' συμμετέχει στην πρόκληση αυτοανοσίας (19). Στην πραγματικότητα, ο TCR είναι ικανός να

αναγνωρίζει πολλά πεπτιδία, που δεν έχουν ισχυρή μοριακή ομολογία, οπότε η ιδέα της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας μεταξύ λοιμογόνων και αυτόλογων πεπτιδίων πιθανόν να είναι απλοϊκή (20,21).

Τα αυτοαντισώματα αποτελούν σημαντικό τμήμα της αυτοάνοσης απόκρισης και βρίσκονται συχνά σε συνδυασμό με κάποια συγκεκριμένη νόσο. Στην τελευταία περίπτωση υπάρχουν τρεις πιθανές εκδοχές: i) τα αυτοαντισώματα να ευθύνονται για τις βλάβες της νόσου, ii) η νόσος να προηγείται και μέσω πρόκλησης ιστικής βλάβης να παράγονται τα αυτοαντισώματα, iii) υπάρχει κάποιος παράγοντας, που προκαλεί τόσο τις βλάβες όσο και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων (3). Τα αυτοαντισώματα μπορεί να υπάρχουν ως 'φυσικά' αυτοαντισώματα, που συναντώνται σε φυσιολογικά άτομα, είναι συνήθως χαμηλής συγγένειας IgM αντισώματα και αντιδρούν με ποικιλία αυτοαντιγόνων (3,22). Τα 'φυσικά', όμως, αυτά αυτοαντισώματα μπορεί να υποστούν ισοτυπική μετατροπή, με τη βοήθεια ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων και να γίνουν IgG, τα οποία έχουν μεγάλη συγγένεια προς το αυτοαντιγόνο και είναι δυνητικά παθογόνα (3,22). Επιπλέον, σωματικές μεταλλαγές των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή υψηλής συγγένειας IgG αυτοαντισωμάτων (3,22). Τα αυτοαντισώματα αυτά απαντώνται κατά τεκμήριο στα αυτοάνοσα νοσήματα.

Τα αυτοαντισώματα χωρίζονται σε 'οργανοειδικά' και 'μη οργανοειδικά' (non-organ specific autoantibodies, NOSA). Στις 'οργανοειδικές' διαταραχές, υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι τα αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα, που είναι παρόντα στα όργανα στόχους (3). Στη 'μη οργανοειδική' αυτοάνοση λίγα είναι γνωστά για τα αντιγόνα, που

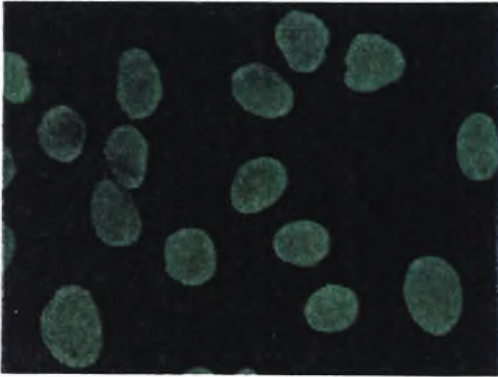
αναγνωρίζονται από τα Τ λεμφοκύτταρα. Πιθανώς, στις τελευταίες περιπτώσεις, τα Τ λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν όχι το αντιγονικό πεπτιδίο, αλλά κάποιον ιδιότυπο του αντισώματος και στη συνέχεια βοηθούν τα Β λεμφοκύτταρα, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αυτοαντισωμάτων, να πολλαπλασιαστούν (3). Επιπλέον, τα αυτοαντισώματα εναντίον ενδοκυττάρων αντιγόνων θεωρούνταν, γενικώς, μη παθογενετικά, καθώς πιστεύονταν ότι αναπτύσσονται δευτερογενώς ως αποτέλεσμα της νόσου (23). Εντούτοις, υπάρχουν πειραματικά δεδομένα, που πείθουν και για το αντίθετο. Για παράδειγμα, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα σε ζώα με αυτοάνοση αρθρίτιδα, υποστηρίζουν ότι μεταφορά IgG (που στρέφονταν εναντίον του ενδοκυττάρου αντιγόνου ισομεράση της γλυκοζο-6-φωσφατάσης) από τα νοσούντα ζώα μπορεί να ευοδώσει την ανάπτυξη αρθρίτιδας στα υγιή ζώα λήπτες (24,25).

Παρακάτω αναφέρονται συνοπτικά ορισμένα από τα αυτοαντισώματα, στο πλείστο τους 'μη οργανοειδικά', καθώς και η κλινική τους σημασία.

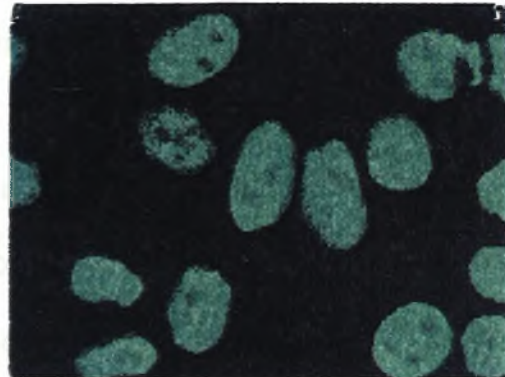
2.1. Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA).

Τα ANA αποτελούν μια ετερογενή ομάδα αυτοαντισωμάτων, που στρέφονται κατά διαφόρων αντιγόνων του πυρήνα. Στην καθημερινή πράξη, ο προσδιορισμός τους γίνεται με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού (ΕΑΦ), που είναι μια απλή κι ευαίσθητη αλλά μη ειδική εξέταση. Αποτελεί την αρχική εξέταση ρουτίνας για κάθε ασθενή με υποψία αυτοάνοσου ρευματικού νοσήματος, αφού η απουσία τους είναι ισχυρότατο στοιχείο κατά της διενέργειας περαιτέρω ανοσολογικού ελέγχου, εκτός αν υπάρχουν ιδιαίτεροι λόγοι (π.χ. ANA αρνητικός συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ),

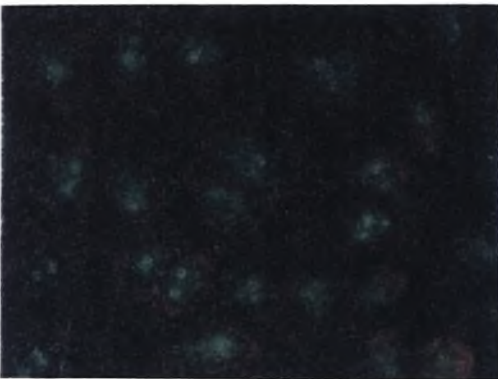
πολυμυοσίτιδα) (26). Στην τεχνική του ΕΑΦ προτιμούνται υποστρώματα από καλλιέργειες ανθρώπινων κυτταρικών σειρών και κυρίως τα HEp2 κύτταρα (ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα λαρυγγικού καρκινώματος), ενώ σαν υπόστρωμα μπορεί να χρησιμοποιηθούν και κατεψυγμένες ιστικές τομές σε κρουστάτη από ήπαρ και νεφρό τρωκτικών (27,28) (Εικόνα 1).



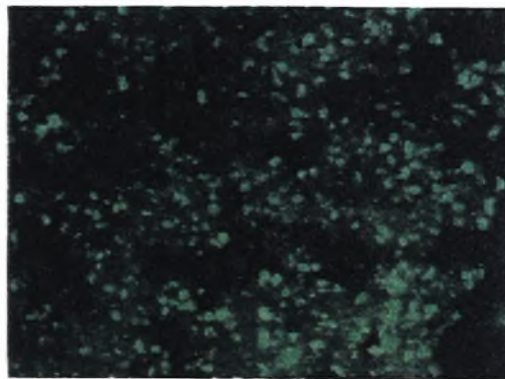
1.1. Ομοιογενής τύπος φθορισμού



1.2. Στικτός τύπος φθορισμού



1.3. Πυρηνισκικός τύπος φθορισμού



1.4. Φθορισμός ANA σε τομή ήπατος αρουραίου.

Εικόνα 1. Τύποι φθορισμού των ANA σε υπόστρωμα κυττάρων HEp 2 και τομής ήπατος αρουραίου.

Τα ANA είναι θετικά στο 95-99% των ασθενών με ΣΕΛ (27), με θετική προγνωστική αξία 15-35% σε υψηλούς τίτλους, μιας και βρίσκονται και σε διάφορα άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (σύνδρομο Sjögren, σκληρόδερμα, πολυμυοσίτιδα, αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1, κλπ) (29). Τα ANA μπορεί να

είναι θετικά και στο 1-2% του γενικού πληθυσμού, συνήθως όμως σε χαμηλούς τίτλους. Η συχνότητα αυτή αυξάνει με την ηλικία φτάνοντας στο 20-25% σε άτομα άνω των 60 ετών, καθώς και σε συγγενείς ασθενών με αυτοάνοση νόσο (30). Επίσης, θετικά ANA ανιχνεύονται συνήθως σε χαμηλούς τίτλους, σε λοιμώξεις, λευχαιμίες και συμπαγείς όγκους, καθώς και χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως η τοξικομανία και οι χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες (30-33).

Με υπόστρωμα τα κύτταρα HEp2 ανιχνεύονται διάφοροι τύποι ανοσοφθορισμού στον πυρήνα (ομοιογενής, λεπτός, αδρός και διακριτός στικτός, πυρηνισκικός, αντικεντρομεριδιακός, δακτυλιοειδής κα.), ενώ συγχρόνως ανιχνεύονται και διάφοροι τύποι κυτταροπλασματικού φθορισμού (30). Καθένας από αυτούς αντιστοιχεί σε διαφορετικά αντιγόνα στόχους των αυτοαντισωμάτων, γεγονός, που σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να έχει διαγνωστική αξία (30-31).

2.2. Αντισώματα έναντι δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (αντι-DNA).

Τα αντι-DNA αντισώματα είναι μια ετερογενής υποομάδα των ANA αυτοαντισωμάτων. Αντιδρούν με 'φυσικό' διπλής έλικας DNA (dsDNA) ή μονής έλικας DNA (ssDNA) ή και με τα δυο (22,34). Μεγάλο μέρος του γενικού πληθυσμού έχει ανιχνεύσιμα IgM τάξης αντι-ssDNA αντισώματα στον ορό, τα οποία έχουν χαμηλή συγγένεια για το DNA, ενώ συνδέουν και άλλα αυτοαντιγόνα (22). IgG αντι-dsDNA αντισώματα ανιχνεύονται σπανιότατα σε φυσιολογικά άτομα και συνήθως είναι υψηλής συγγένειας (22,35). Η ανίχνευση των αντι-dsDNA αντισωμάτων έχει μεγάλη σπουδαιότητα στη διάγνωση, παθογένεια και παρακολούθηση ασθενών με ΣΕΛ (36,37). Τα

αυτοαντισώματα αυτά ανιχνεύονται σε ποσοστό 60-83% των ασθενών με ΣΕΛ ανάλογα με τη φάση της νόσου (36,38). Πολλοί μηχανισμοί οδηγούν στην παραγωγή των αντι-DNA αντισωμάτων (Πίνακας 1) (22). Εντούτοις, δεν είναι

Πίνακας 1. Μηχανισμοί παραγωγής αντι-DNA αντισωμάτων (22).

Φυσικά αυτοαντισώματα
Πολυκλωνική Β λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση
Ειδική αντιγονική διέγερση <ul style="list-style-type: none"> • Βακτήρια (φωσφολιπίδια, DNA, συμπλέγματα DNA-πρωτεϊνών • Ιοί • Χημικές ουσίες • Συμπλέγματα DNA-πρωτεϊνών (χρωματίνη, νουκλεοσώματα) • Συμπλέγματα RNA-πρωτεϊνών
T λεμφοκυτταρική βοήθεια <ul style="list-style-type: none"> • Ενεργοποίηση από νουκλεοσωματικά πεπτίδια • Ενεργοποίηση από πεπτίδια ανοσοσφαιρινών
Επέκταση της διασταυρούμενης αντίδρασης σε εκτεταμένες ανοσολογικές αποκρίσεις <ul style="list-style-type: none"> • Επέκταση του ιδιοτυπικού δικτύου • 'Διάχυση' των επιτόπων στα T και B λεμφοκύτταρα • Εκφύλιση της T λεμφοκυτταρικής δεξαμενής

ξεκάθαρο ποια χαρακτηριστικά διαχωρίζουν τα 'παθογενετικά' από τα 'μη παθογενετικά' αντι-DNA αντισώματα. Πιθανώς η σύνδεση συμπληρώματος, η υψηλή συγγένεια με το DNA και τα αντισώματα εναντίον των νουκλεοσωμάτων να σχετίζονται περισσότερο με τις ιστικές βλάβες (22,39,40).

Η μέθοδος εκλογής για τον προσδιορισμό των αντι-dsDNA αντισωμάτων είναι η τεχνική Farr (22,27,36,38). Η τεχνική αυτή αποτελεί

ραδιοανοσολογική μέθοδο υγρής φάσης, χρησιμοποιώντας dsDNA ραδιοσημασμένο με τρίτιο και καθίζηση με θειϊκό αμμώνιο και έχει το πλεονέκτημα της ανίχνευσης αντισωμάτων υψηλής συγγένειας με τη διπλή έλικα του DNA (34,36,38). Παρόλα αυτά, παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα (υψηλό κόστος, μεγάλος εργαστηριακός εξοπλισμός, μεγάλος χρόνος εκτέλεσης, μη δυνατός ο καθορισμός της τάξης των αυτοαντισωμάτων), που καθιστούν δύσκολη τη χρήση της ως μεθόδου ρουτίνας (34).

Σε αντίθεση με την τεχνική Farr, η μέθοδος του ΕΑΦ, χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα το πρωτόζωο *Crithidia Luciliae*, τα μιτοχόνδρια του οποίου περιέχουν μεγάλη ποσότητα dsDNA, έγινε ιδιαίτερα προσφιλής σε πολλά εργαστήρια, γιατί είναι εύκολη και επαναλήψιμη. Εντούτοις, η ανίχνευση με τη μέθοδο αυτή αντι-dsDNA αντισωμάτων χαμηλής συγγένειας, η έλλειψη προγνωστικής αξίας της μεθόδου σε περιπτώσεις εξάρσεων του ΣΕΛ (σε αντίθεση με τη μέθοδο Farr) και τα ερωτηματικά σχετικά με την ευαισθησία της μεθόδου και με το αν τα μιτοχόνδρια περιέχουν μόνο DNA διπλής έλικας χωρίς συνδυασμό άλλων πυρηνικών αντιγόνων, οδήγησαν στη μείωση της δημοτικότητας της (22,27,34).

Αν και ο έλεγχος για αντι-dsDNA αντισώματα με εμπορικά διαθέσιμες ανοσοενζυμικές μεθόδους (ELISA) δεν είναι γενικά πάρα πολύ αξιόπιστος, καθώς ανιχνεύει τόσο αντισώματα υψηλής συγγένειας όσο και αντισώματα χαμηλής συγγένειας για το dsDNA (41), οι Τζιούφας και συν (42) ανέπτυξαν ευαίσθητη και αυξημένης ειδικότητας ELISA, για την ανίχνευση των αντι-dsDNA αντισωμάτων, που προσδιορίζει IgM και IgG ανοσοσφαιρινικές τάξεις αντισωμάτων. Η ειδικότητα της παραπάνω μεθόδου κατέστη δυνατή μετά από

πειράματα αναστολής του θετικού μάρτυρα χρησιμοποιώντας dsDNA: το dsDNA προκαλούσε αναστολή της ELISA για IgG αντι-dsDNA σε ποσοστό 90% ενώ για IgM αντι-dsDNA σε ποσοστό 76% (42). Η μέθοδος αυτή φαίνεται να έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από τη μέθοδο Farr και τη μέθοδο του EAΦ σε *Crithidia Luciliae*, αν και είναι λιγότερο ειδική (43).

2.3. Αντισώματα κατά καρδιολιπίνης (αντι-CL)

Το 1941 ο Pangborn, απομονώνοντας ένα όξινο φωσφολιπίδιο από αλκοολικά εκχυλίσματα μυοκαρδίου βοδιού -το οποίο στη συνέχεια ονομάστηκε καρδιολιπίνη- έδειξε, ότι αυτό ήταν το υπεύθυνο αντιγόνο που αναγνωριζόταν από τα συφιλιδικά αντισώματα (αντιδρασίνες) μέσω σύνδεσης συμπληρώματος σε ασθενείς με σύφιλη (44). Αργότερα, πρώτοι οι Harris et al (45) ερεύνησαν την παρουσία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων (aPL) σε ασθενείς με ΣΕΛ χρησιμοποιώντας καρδιολιπίνη σαν αντιγόνο. Έτσι, τα αντι-CL αντισώματα αποτέλεσαν τα πρώτα μέλη των aPL. Τα αντισώματα αυτά αποτελούν μία ετερογενή ομάδα ανοσοσφαιρινών, που αντιδρούν με συμπλέγματα φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών του πλάσματος, οι οποίες αποτελούν τους λεγόμενους 'συμπαραγόντες' (cofactors) (46-49).

Τα aPL αντισώματα συσχετίστηκαν, στη συνέχεια, με το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (antiphospholipid syndrome, APS). Το APS είναι μια αυτοάνοση διαταραχή, που χαρακτηρίζεται από αρτηριακές ή/και φλεβικές θρομβώσεις, καθ' ἑξιν αποβολές, και συχνά μέτρια θρομβοπενία σε συνδυασμό με παρουσία aPL αντισωμάτων (46). Νευρολογικές και ψυχιατρικές διαταραχές, δικτυωτή πελίωση, νεφρικές και ηπατικές διαταραχές, αρθραλγίες ή αρθρίτιδα, αιμολυτική αναιμία καθώς και βαλβιδοπάθειες έχουν

επίσης ανακοινωθεί στα πλαίσια του APS (46,50). Το APS διακρίνεται σε πρωτοπαθές, όταν δεν συνδέεται με άλλες υποκείμενες διαταραχές (51) και δευτεροπαθές, όταν αποδεδειγμένα συνυπάρχουν και άλλες καταστάσεις, όπως αυτοάνοσες παθήσεις (κυρίως ΣΕΛ), κακοήθειες και χρήση ορισμένων φαρμάκων (48). Επιπλέον, το 1992 ο όρος καταστροφικό APS προτάθηκε από τους Asherrson et al (52) για να περιγράψει μια σπάνια 'ποικιλία' APS. Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από οξεία ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων και ιστοπαθολογικές ενδείξεις πολλαπλών μικροθρομβώσεων (52). Οι λοιμώξεις θεωρούνται οι κύριοι προδιαθεσικοί παράγοντες για την ανάπτυξη του καταστροφικού APS. Σύμφωνα με τα πρόσφατα κριτήρια διάγνωσης του APS, τα αντι-CL αντισώματα και το αντιπηκτικό του λύκου θεωρούνται οι εργαστηριακές εξετάσεις εκλογής, που σε συνδυασμό με τα κλινικά κριτήρια θα οδηγήσουν στη διάγνωση του συνδρόμου(47).

Τα αντι-CL αντισώματα ανιχνεύονται με ανοσοενζυμικές μεθόδους ELISA (32,48,53-55) όχι μόνο στο πρωτοπαθές και δευτεροπαθές APS, αλλά και σε άτομα προχωρημένης ηλικίας (56) καθώς και σε πληθώρα χρόνιων φλεγμονωδών καταστάσεων της εσωτερικής παθολογίας (48,54,57) συμπεριλαμβανομένων των λοιμώξεων (58).

Όσον αφορά τις λοιμώξεις, τα αντι-CL αντισώματα έχουν ιστορικά συνδεθεί με αυτές, μιας και η VDRL (που χρησιμοποιεί σαν αντιγόνο μίγμα φωσφολιπιδίων) συνδέθηκε με τη σύφιλη. Η παρουσία αντι-CL αντισωμάτων σε οξείες και χρόνιες λοιμώξεις έχει αναφερθεί από τους Harris et al, από το 1985 (59). Έκτοτε, έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς: με HIV [με συχνότητα 12-67% (53,60-64)], με HCV λοίμωξη [με συχνότητα 3.3-46% (32,62,65-80)], με λοίμωξη από παρβοϊό B19 (81), από ιό Epstein-Barr (82), από

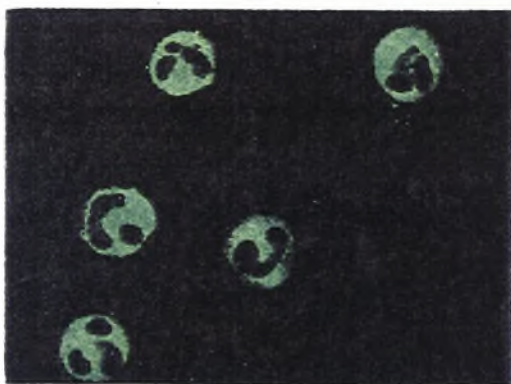
κυτταρομεγαλιό (CMV) (83,84), καθώς και με βακτηριακές λοιμώξεις, όπως λοίμωξη από *mycoplasma penetrans* (85), φυματίωση (86), λοίμωξη από *Klebsiella* (86), από *salmonella typhi* (87), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* και *Escherichia coli* (88).

Παρόλα αυτά, τα αντι-CL αντισώματα, που ανιχνεύονται στις λοιμώξεις, δε συνδυάζονται κατά τεκμήριο με κλινικές εκδηλώσεις του APS. Πράγματι, έχειδειχθεί, ότι συμπαράγοντες όπως για παράδειγμα η β2-γλυκοπρωτεΐνη-I (b2-GPI), η ανεξίνη V, η πρωτεΐνη S και η προθρομβίνη πρέπει να είναι παρόντες, ώστε τα aPL αντισώματα να συνδέονται με τα φωσφολιπίδια και να προκαλούνται οι κλινικές εκδηλώσεις του APS (46,48,53,89-91). Τα αντισώματα αυτά, που εξαρτώνται από τους παραπάνω 'συμπαράγοντες' θεωρούνται 'παθογενετικά' ή 'αυτοάνοσα' ή 'θρομβογενή' (cofactor dependent), ενώ τα aPL αντισώματα, που συνδέονται απευθείας στα φωσφολιπίδια χωρίς να χρειάζονται συμπαράγοντες (cofactor independent) θεωρούνται 'μη παθογενετικά' ή 'μη θρομβογενή'. Τα τελευταία φαίνεται ότι ανιχνεύονται σε όλες τις άλλες καταστάσεις εκτός του APS (48,53,56,57,62-65,68,70-73,77,82). Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί νέες μέθοδοι ELISA που χρησιμοποιούν ως αντιγόνα b2-GPI ή μίγμα φωσφολιπιδίων, ώστε να διακρίνονται τα παθογενετικά από τα μη παθογενετικά αντι-CL αντισώματα (46,48,49). Επιπλέον, οι ασθενείς με APS έχουν συνήθως υψηλότερα επίπεδα αντι-CL αντισωμάτων και επομένως η διάγνωση στον εξατομικευμένο ασθενή με την ύποπτη για APS κλινική συμπτωματολογία, μπορεί να ενισχυθεί χρησιμοποιώντας υψηλότερα όρια θετικότητας (cut-off) στις μεθόδους ELISA για την ανίχνευση των αντι-CL αντισωμάτων (46,47,49).

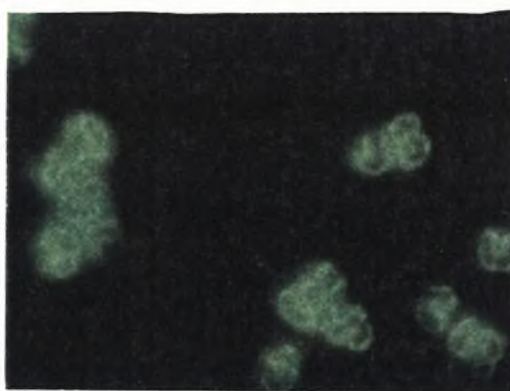
2.4. Αντισώματα κατά του κυτταροπλάσματος των ουδετερόφιλων (ANCA).

Το 1985 οι Van der Woude et al (92) περιέγραψαν, για πρώτη φορά, αυτοαντισώματα κατά του κυτταροπλάσματος ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων ως ευαίσθητους δείκτες για τη διάγνωση της κοκκιωμάτωσης του Wegener (KW). Στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι τα ANCA αποτελούν μια ετερογενή ομάδα αντισωμάτων έναντι ποικίλων αντιγονικών στοιχείων του κυτταροπλάσματος των ουδετερόφιλων (93).

Με την τεχνική του ΕΑΦ, χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα ουδετερόφιλα υγιών μαρτύρων μονιμοποιημένα σε αιθανόλη [που αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για 'screening' των ορών για την ανίχνευση ANCA (94)], δύο κυρίως τύποι ανοσοφθορισμού αναγνωρίζονται. Ο ένας με χαρακτηριστικό κυτταροπλασματικό φθορισμό (cANCA) και ο δεύτερος με χαρακτηριστικό περιπυρηνικό φθορισμό (pANCA) (92-95) (Εικόνα 2).



2.1. Φθορισμός κυτταροπλάσματος ουδετερόφιλων (cANCA)



2.2. Περιπυρηνικός φθορισμός κυτταροπλάσματος ουδετερόφιλων (pANCA).

Εικόνα 2. Τύποι ανοσοφθορισμού των ANCA σε υπόστρωμα ουδετερόφιλων μονιμοποιημένων σε αιθανόλη.

Ο κυτταροπλασματικός φθορισμός διακρίνεται σε δύο τύπους (96,97):

α) στον κοκκιώδη, που χαρακτηρίζει cANCA τα οποία στρέφονται κατ' εξοχήν εναντίον της πρωτεΐνης 3 (Πρ3), μιας πρωτεΐνης της σερίνης (19kd) των αζουρόφιλων κοκκίων (98) [η ειδικότητα του κοκκιώδους φθορισμού για τη διάγνωση KW ανέρχεται στο 86% και η ευαισθησία του κυμαίνεται στο 70-100% (96)] και β) στον διάχυτο (άτυπα cANCA), που οφείλεται σε αντισώματα έναντι ενός ενζυμικού συστατικού των αζουρόφιλων κοκκίων των πολυμορφοπύρηνων, της μυελοϋπεροξειδάσης (ΜΠΟ) (1-2%), έναντι της αυξάνουσας τη διαπερατότητα βακτηριοκτόνου πρωτεΐνης (bactericidal/permeability increasing protein) ή έναντι άλλων μη χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών (97).

Τα pANCA, με περιπυρηνική κατανομή του φθορισμού, όπως έδειξαν και οι αρχικές μελέτες των Falk και Jennette (95), στρέφονται κυρίως κατά της ΜΠΟ, αλλά δευτερευόντως και έναντι ενός πλήθους άλλων πρωτεϊνών, πολλές από τις οποίες δεν έχουν χαρακτηριστεί (97). Εικόνες ανοσοφθορισμού, που δεν μπορούν να καταταγούν σε κάποιον από τους προηγούμενους βασικούς τύπους και συνήθως δίνουν συνδυασμό περιπυρηνικού και κυτταροπλασματικού φθορισμού, αποτελούν τα 'άτυπα' pANCA (atypical pANCA, aANCA, ή xANCA) (97,99).

Τα cANCA και πιο ειδικά τα αντισώματα κατά της Πρ3, είναι πολύ ευαίσθητα για τη διάγνωση ενεργού KW (28,100). Πράγματι, στις περιπτώσεις εκτεταμένης KW (κοκκιωματοώδης φλεγμονή της αναπνευστικής οδού, συστηματική αγγειίτιδα, νεκρωτική σπειραματονεφρίτιδα με μηνοειδείς σχηματισμούς) τα cANCA βρίσκονται στο 90% και πλέον των ασθενών ενώ στην περιορισμένη μορφή, χωρίς νεφρική συμμετοχή ανιχνεύονται στο 67-

86% των ασθενών (31,100-102). Τα cANCA, όμως, έχουν ανιχνευθεί κατά καιρούς και σε ασθενείς με μικροσκοπική πολυαρθριίτιδα, καθώς και σε άλλες καταστάσεις, όπως σε λοιμώξεις (φυματίωση) και περιπτώσεις λεμφώματος (άτυπα cANCA) (102-104). Έτσι, τα cANCA δεν μπορούν να αποτελούν το μοναδικό-βασικό κριτήριο για τη διάγνωση της KW, απλά την υποβοηθούν στο συγκεκριμένο ασθενή με την ύποπτη κλινική σημειολογία (102).

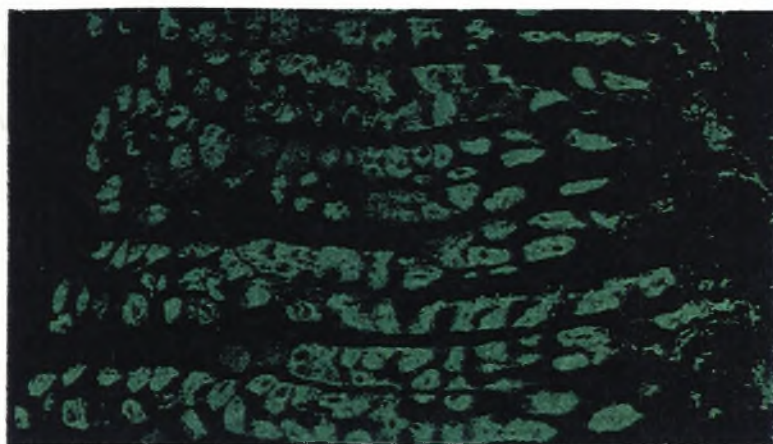
Τα pANCA έχουν βρεθεί σε διάφορους τύπους αγγειίτιδων (μικροσκοπική πολυαρθριίτιδα, σύνδρομο Churg-Stauss, οζώδη πολυαρθριίτιδα). Τα ευρήματα αυτά οφείλονται κύρια στην παρουσία αντισωμάτων κατά ΜΠΟ (99,105-107), που έχουν βρεθεί και σε ασθενείς με ΣΕΛ (96,108,109). Όμως παρουσία pANCA έχει αναφερθεί και σε άλλες χρόνιες φλεγμονώδεις εξεργασίες εκτός των αγγειίτιδων (97), όπως σε ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (110), ρευματοειδή αρθρίτιδα (111), ελκώδη κολίτιδα (112), αυτοάνοση ηπατίτιδα (113) καθώς και σε HIV λοίμωξη (104,114), σε ελονοσία (115) και λοιμώδη ενδοκαρδίτιδα (103,104). Στις περιπτώσεις αυτές τα pANCA δεν έχουν δραστηριότητα κατά της ΜΠΟ, αλλά εναντίον άλλων αντιγόνων όπως η λυσοζύμη, η λακτοφερρίνη, η καθεψίνη G, η BPI, η αζουροσιδίνη, η ακτίνη, η καταλάση, η β-γλυκουρονιδάση κα., και ανήκουν στα 'άτυπα' pANCA (28,97,116). Γι'αυτό η κλινική σημασία ενός θετικού αποτελέσματος pANCA θα πρέπει να αντιμετωπίζεται με προσοχή.

2.5. Αντισώματα έναντι τοιχωματικών κυττάρων στομάχου (PCA).

Τα PCA αντισώματα είναι οργανοειδικά αυτοαντισώματα έναντι της α και της β υπομονάδας της γαστρικής H^+ , K^+ -ATPάσης των τοιχωματικών

κυττάρων του στομάχου (117,118). Τα PCA συνδέονται άμεσα με την αυτοάνοση ατροφική γαστρίτιδα του σώματος του στομάχου (τύπου A) και την κακοήγη αναιμία, καθώς βρίσκονται στο 50-90% των ασθενών (27,119,120). Η ανίχνευσή τους γίνεται με ΕΑΦ σε κατεψυγμένες τομές στομάχου αρουραίου (27) (Εικόνα 3).

Η κακοήγη αναιμία και η εύρεση θετικών PCA, συνδυάζεται συχνά και με άλλες αυτοάνοσες διαταραχές (θυρεοειδίτιδα Hashimoto, σακχαρώδη δια-



Εικόνα 3. Φθορισμός των PCA σε τομή στομάχου αρουραίου.

βήτη τύπου 1, λεύκη κλπ) (120). Έτσι, το 50% των ασθενών με κακοήγη αναιμία έχουν αντιθυρεοειδικά αντισώματα και το 30% των ασθενών με αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα έχουν PCA θετικά (27), ενώ PCA ανευρίσκονται στο 30-60% των διαβητικών τύπου 1 (121,122). Επίσης, PCA ανιχνεύονται στο 2-3% του γενικού πληθυσμού (27). Τελευταία, έχει συσχετιστεί η λοίμωξη από *Helicobacter pylori* (το κύριο αίτιο παν-γαστρίτιδας, τύπου B) με γαστρίτιδα του σώματος του στομάχου με παρόμοια ιστομορφολογικά χαρακτηριστικά με την αυτοάνοση γαστρίτιδα τύπου A, αφού βρέθηκε ότι τα 2/3 των ασθενών με ατροφική γαστρίτιδα του σώματος είχαν ενδείξεις λοίμωξης από *Helicobacter pylori* (123,124).

2.6. Αντισώματα έναντι λείων μυικών ινών (SMA).

Τα SMA είναι αυτοαντισώματα, που κατευθύνονται εναντίον αντιγόνων του κυτταροσκελετού (F ακτίνη, G ακτίνη, μυσσίνη, καλδεσμόνη, τουμπουλίνη, βιμεντίνη, δεσμίνη, κερατίνη κα) (125,126). Τα SMA ανιχνεύονται με ΕΑΦ σε κυτταρικές σειρές HEp2 και σε τομές ήπατος, νεφρού αρουραίου λόγω φθορισμού του τοιχώματος των αγγείων και τομές στομάχου αρουραίου λόγω φθορισμού του μυικού χιτώνα. Τα SMA, όπως τα ANA, ανιχνεύονται, σε χαμηλούς συνήθως τίτλους, σε υγιείς [σε σειρά 131 υγιών ατόμων, SMA ανιχνεύτηκαν στο 43% (127)], σε ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες A, B ή C (128-130), καθώς και σε άλλες παθήσεις (131). Στις περισσότερες όμως από τις προαναφερθείσες περιπτώσεις τα SMA δεν έχουν ειδικότητα κατά της F ακτίνης. Αντίθετα, η ανίχνευση SMA εναντίον F ακτίνης, ιδιαίτερα σε υψηλούς τίτλους, συνδέεται, κυρίως, με την αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1 (AH-1) και τη χαρακτηρίζουν (132,133).

3. ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ.

Τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος περιλαμβάνουν την πρωτοπαθή χολική κίρρωση, την πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα, την αυτοάνοση ηπατίτιδα και τα σύνδρομα επικάλυψης. Η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων αποτελεί πολύτιμη βοήθεια στη διάγνωση των αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος, τα οποία χαρακτηρίζονται από μεγάλη κλινική, ορολογική, γενετική και μορφολογική ετερογένεια.

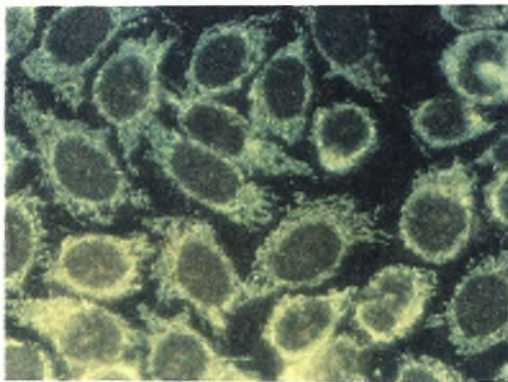
3.1. Πρωτοπαθής χολική κίρρωση (ΠΧΚ)

Η ΠΧΚ είναι μια χρόνια χολοστατική νόσος του ήπατος αγνώστου αιτιολογίας, συχνότερη σε γυναίκες ηλικίας 35-65 ετών, με συνήθη αρχικά συμπτώματα κνησμό και κόπωση, που ιστολογικά χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και καταστροφή των μικρών ενδοηπατικών χολαγγείων (134). Ενενήντα πέντε τις εκατό των ασθενών έχουν θετικά αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA) και συνήθως βρίσκεται αύξηση της IgM ανοσοσφαιρίνης και βιοχημικά σημεία χολόστασης (αύξηση αλκαλικής φωσφατάσης, γ-γλουταμυλικής τρανσφεράσης και χοληστερόλης). Η παρουσία ίκτερου είναι δείκτης προχωρημένης νόσου (134).

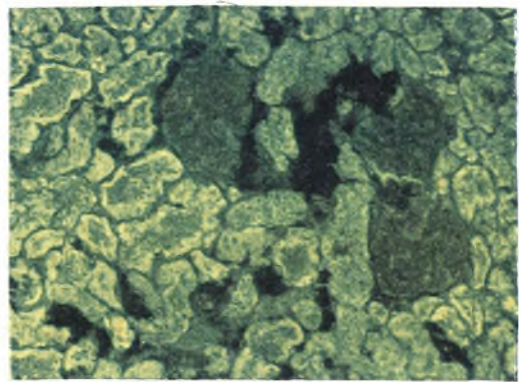
Δεν είναι γνωστό αν τα AMA ή και τα υπόλοιπα αυτοαντισώματα σχετίζονται παθογενετικά με τη νόσο, καθώς δε φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση της έκφρασης και σταδιοποίησης της νόσου με τον τίτλο αυτών των αυτοαντισωμάτων (135).

α) Αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA).

Τα AMA ανιχνεύονται με ΕΑΦ και αποτελούν ισχυρό εργαστηριακό-διαγνωστικό δείκτη της νόσου, καθώς βρίσκονται σε όλους σχεδόν τους ασθενείς με ΠΧΚ. Η ειδικότητά τους για τη διάγνωση της ΠΧΚ φτάνει το 100% όταν οι τίτλοι είναι υψηλοί ($>1:160$) (136-139). Στην τεχνική του ΕΑΦ χρησιμοποιούνται σαν υπόστρωμα ιστικές τομές σε κρουστάτη από ήπαρ, νεφρό και στομάχο αρουραίων (Wistar rats) ή ο κυτταρικός κλώνος HEp2 (θετικός τίτλος $\geq 1:40$). Το χαρακτηριστικό πρότυπο των AMA σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου ποντικού αποτελεί η θετική φθορίζουσα αντίδραση τόσο στα εγγύς όσο και στα άπω εσπειραμένα νεφρικά σωληνάκια, ενώ το σπείραμα είναι αρνητικό (Εικόνα 4).



4.1. Κυτταροπλασματικός φθορισμός AMA σε κύτταρα HEp2



4.2. Φθορισμός των νεφρικών σωληναρίων σε τομή νεφρού αρουραίου

Εικόνα 4. Φθορισμός των AMA σε υπόστρωμα HEp2 και κατεψυγμένη τομή νεφρού αρουραίου.

Στη δεκαετία του '80 έγινε αντιληπτό ότι οι οροί ασθενών με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, διαφορετικές από την ΠΧΚ και τις πιθανές συνοδές της νόσους, είχαν αντιδραστικότητα κατά μιτοχονδριακών συστατικών, με

διαφορετικά πρότυπα από αυτή που σχετίζεται με την ΠΧΚ. Έτσι, το το 1981 οι Baum και Berg (140) αναγνώρισαν το πρώτο μιτοχονδριακό αντιγόνο των AMA, την καρδιολιπίνη, που δεν σχετιζόταν με την ΠΧΚ και ονομάστηκε M1, ενώ το σχετιζόμενο με την ΠΧΚ ονομάστηκε M2 (136-140). Στη συνέχεια, με βάση την εκλεκτική φυγοκέντριση των μιτοχονδριακών αντιγόνων, τα τελευταία διακρίθηκαν σε εννέα ομάδες (fractions) (M1-M9) (141). Εκτός από τα M1 και M2 αντιγόνα, που έχουν ταυτοποιηθεί (καρδιολιπίνη και σύμπλεγμα πυροσταφυλικής δεϋδρογενάσης, αντίστοιχα), η ταυτότητα των υπόλοιπων είναι αμφιλεγόμενη. Τα αυτοαντισώματα αυτά, ανιχνεύονται σε διάφορες παθήσεις (όπως οξεία μυοκαρδίτιδα (M7), φαρμακευτικός λύκος από venocuran (M3), φαρμακευτικός λύκος από iproniacide (M6), διάφορες νόσοι του κολλαγόνου (M5), λοιμώξεις), ενώ υπάρχει διάσταση απόψεων σχετικά με την προγνωστική αξία της M-ταξινόμησης (137).

Το 1987 οι Gershwin et al (142) απομόνωσαν τα μιτοχονδριακά αντιγόνα στόχους των AMA στην ΠΧΚ, τα οποία αποτελούν ενζυμικές υποομάδες του συμπλέγματος της 2-κετοξικής δεϋδρογενάσης της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων των θηλαστικών και περιλαμβάνουν: το σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής δεϋδρογενάσης (ΠΔΓ), το σύμπλεγμα της 2-κετοξικής δεϋδρογενάσης με διακλαδούμενη αλυσίδα (ΚΔΓΔΑ) και το σύμπλεγμα της κετογλουταρικής δεϋδρογενάσης (ΚΓΔΓ) (142-146) (Πίνακας 2). Τα AMA στην ΠΧΚ είναι κυρίως IgG τάξης και κατευθύνονται εναντίον της E2 ενζυμικής υπομονάδας του κάθε συμπλέγματος (ΠΔΓ-E2, ΚΔΓΔΑ-E2, ΚΓΔΓ-E2) (137).

Εκτός της τεχνικής του ΕΑΦ, χρησιμοποιούνται μέθοδοι ELISA (με υπόστρωμα ανασυνδυασμένα ΠΔΓ-E2, ΚΔΓΔΑ-E2, ΚΓΔΓ-E2 αντιγόνα ή

καθάρα αντίστοιχα αυτοαντιγόνα) και ανοσοαποτύπωσης (με υπόστρωμα γενετικά ανασυνδυασμένα αντιγόνα ή εκχύλισμα μιτοχονδρίων αρουραίου ή ανθρώπου), με στόχο την επιπρόσθετη ταυτοποίηση των AMA (137).

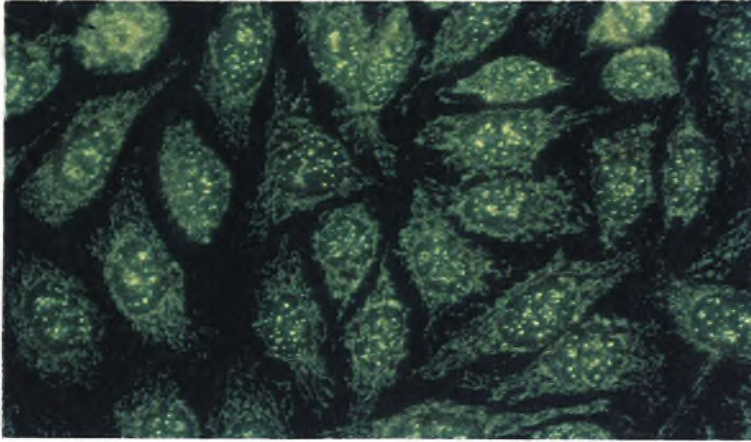
Πίνακας 2. Ταξινόμηση των αυτοαντιγόνων των AMA στην ΠΧΚ (κατά Gershwin και Mackay, 146).

	Μοριακή μάζα	Συχνότητα	M- ταξινόμηση
Πυρουβική δεϋδρογενάση (ΠΔΓ) • ΠΔΓ-E2 αποκαρβοξυλάση • ΠΔΓ-E1 α αποκαρβοξυλάση • ΠΔΓ-E1 β αποκαρβοξυλάση • Πρωτεΐνη X	74 kd 41 kd 36 kd 52 kd	95% 41-66% 2-7% 95%	M2a M2d M2e M2c
2-κετοξικής δεϋδρογενάσης με διακλαδούμενη αλυσσο (ΚΔΓΔΑ) • ΚΔΓΔΑ-E2 (ακυλτρανσφεράση) • ΚΔΓΔΑ-E1 α • ΚΔΓΔΑ-E1 β	50 kd 46 kd 38 kd	53-55% - -	M2c
Κετογλουταρικής δεϋδρογενάσης (ΚΓΔΓ) • ΚΓΔΓ-E2 (σουκινυλτρανσφεράση) • ΚΓΔΓ-E1 • E3	48 kd 110 kd 55 kd	39-88% - 38%	M2c - M2c

β) Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) στην ΠΧΚ.

Τα ANA έχουν αναγνωριστεί σαν ορολογική παράμετρος στο 52% περίπου των ασθενών με ΠΧΚ (137). Τα ANA στην ΠΧΚ περιλαμβάνουν τα αντικεντρομεριδικά αντισώματα (ΑΚΑ), αντισώματα κατά πρωτεϊνών της πυρηνικής μεμβράνης (gp 210, p62, υποδοχέας της Β-λαμίνης) και αντισώματα κατά ρυθμιστικών πρωτεϊνών του πυρήνα (Sp 100, κυκλίνη Α) (147-150). Με την τεχνική του ΕΑΦ, τα ANA κατά πρωτεϊνών της μεμβράνης δίνουν χαρακτηριστικό δακτυλιοειδή φθορισμό (nuclear rim), ενώ το πρότυπο

των ANA εναντίον ρυθμιστικών πρωτεϊνών του πυρήνα χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων (multiple nuclear dots) (137, 147-149) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Φθορισμός των ANA με τη μορφή πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων από ασθενή με ΠΧΚ.

3.2. Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ).

Η ΠΣΧ χαρακτηρίζεται από την προσβολή των ενδοηπατικών ή/και εξωηπατικών χοληφόρων ανεξαρτήτως μεγέθους. Η νόσος οδηγεί σε χρόνια χολόσταση και τελικά σε κίρρωση. Προσβάλλει κυρίως άνδρες και στο 70% περίπου των περιπτώσεων συσχετίζεται με τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (151,152). Η διάγνωσή της βασίζεται στην ενδοσκοπική παλίνδρομη χολαγγειογραφία (ERCP), τη διηπατική χολαγγειογραφία ή τη μαγνητική χολαγγειοπαγκρεατογραφία (MRCP), ενώ δεν φαίνεται να υπάρχουν διαγνωστικά ορολογικά ανοσολογικά χαρακτηριστικά (152). Τα 'άτυπα' pANCA είναι τα αυτοαντισώματα, που περισσότερο σχετίζονται με την ΠΣΧ, ευρισκόμενα στο 85% περίπου των περιπτώσεων (151), αν και το εύρημα αυτό υποδεικνύει μάλλον ταυτόχρονη ύπαρξη ελκώδους κολίτιδας (139,153). Τα αυτοαντιγόνα στόχοι των pANCA στην ΠΣΧ ποικίλλουν, χωρίς όμως να έχει ταυτοποιηθεί μέχρι στιγμής κάποιο από αυτά ως ειδικό της νόσου.

3.3. Αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ).

Το 10-20% περίπου των χρόνιων ηπατιτίδων οφείλονται σε ΑΗ (139,154). Η διάγνωση της νόσου βασίζεται σε ένα σύνολο δημογραφικών, κλινικών και εργαστηριακών κριτηρίων όπως αυτά ορίστηκαν από διεθνή ομάδα ειδικών (International Autoimmune Hepatitis Group, IAIHG), αρχικά το 1993 και στη συνέχεια, μετά από τροποποίηση, το 1999 (155,156). Η νόσος προσβάλλει συχνότερα το γυναικείο φύλο, σε ηλικίες μεγαλύτερες των 50 ετών, αν και παλαιότερα οι συχνότερες ηλικίες εισβολής της νόσου θεωρούνταν μεταξύ 5-20 ετών (156-159). Ακρογωνιαίος λίθος στη διάγνωση της ΑΗ αποτελεί η ανίχνευση κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων. Ορισμένοι ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες αναπτύσσουν αυτοαντισώματα, που είναι παρόμοια με αυτά της ΑΗ (139,154,160). Τα αυτοαντισώματα, που ανιχνεύονται στην ηπατίτιδα C αναφέρονται διεξοδικά στο επόμενο τμήμα (Ηπατίτιδα C) και στο Ειδικό μέρος. Κλινικά, η διάκριση μεταξύ ΑΗ και χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς η θεραπεία με α-ιντερφερόνη, που χορηγείται στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες μπορεί να επάγει έξαρση ή/και επιδείνωση λανθάνουσας ΑΗ σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα (161-165), ενώ αντίθετα η ανοσοκατασταλτική θεραπεία, που βελτιώνει την επιβίωση σε περιπτώσεις ΑΗ μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμό και επιδείνωση της ηπατικής βλάβης στις περιπτώσεις ιογενών λοιμώξεων (160).

Σύμφωνα με τα αυτοαντισώματα, που ανιχνεύονται η ΑΗ υποδιαιρέθηκε αρχικά σε τρεις τύπους (157,166-169): α) την ΑΗ τύπου 1 (ΑΗ-1), που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ANA ή/και αντισωμάτων έναντι λείων μυϊκών ινών (SMA) και ήταν παλιότερα γνωστή ως κλασσική ή

λυκοειδής. Επιπλέον, ανιχνεύονται pANCA και αντισώματα έναντι του υποδοχέα της ασιαλογλυκοπρωτεΐνης (αντι-ASGP-R). β) Την AH τύπου 2 (AH-2), που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ειδικών αυτοαντισωμάτων έναντι μικροσωματικών αντιγόνων ήπατος-νεφρών τύπου 1 (liver-kidney microsomal antibodies, αντι-LKM 1) ή/και αυτοαντισωμάτων κατά κυτοσολίων ήπατος τύπου 1 (antibodies against liver cytosol type 1, αντι-LC 1). γ) Την AH τύπου 3 (AH-3), που χαρακτηρίζεται από την ανίχνευση αντισωμάτων κατά διαλυτών αντιγόνων ήπατος (antibodies against soluble liver antigens, αντι-SLA), τα οποία, πολύ πρόσφατα, βρέθηκε ότι είναι τα ίδια αυτοαντισώματα με τα εκείνα κατά του αντιγόνου ήπατος-παγκρέατος (antibodies against liver-pancreas antigen, αντι-LP) (170). Τα αυτοαντισώματα αυτά αναφέρονται πλέον ως αντι-SLA/LP.

Όμως μετά από πρόσφατα κλινικά, ορολογικά και γενετικά δεδομένα, ασθενείς με AH-3 φαίνεται να παρουσιάζουν παρόμοια χαρακτηριστικά με εκείνα των ασθενών με AH-1. Έτσι, η AH φαίνεται να αποτελείται από δύο κύριες κατηγορίες: την AH-1, με θετικά ANA, SMA, pANCA, αντι-ASGPR ή/και αντι-SLA/LP και την AH-2, με θετικά αντι-LKM ή αντι-LC 1 (156,167,169,171,172). Επιπλέον, πολύ πρόσφατα, έχει αναγνωριστεί μια ειδική μορφή AH στα πλαίσια του συνδρόμου αυτοάνοσης πολυενδοκρινοπάθειας τύπου 1 (ΣΑΠΕ-1, χρόνια καντιντίαση βλεννογόνων και δέρματος, αυτοάνοση προσβολή πολλαπλών ενδοκρινών αδένων και στο 10-18% προσβολή του ήπατος), που χαρακτηρίζεται από αντισώματα κατά μικροσωμίων ήπατος (liver microsomal antibodies, αντι-LM) (173-175).

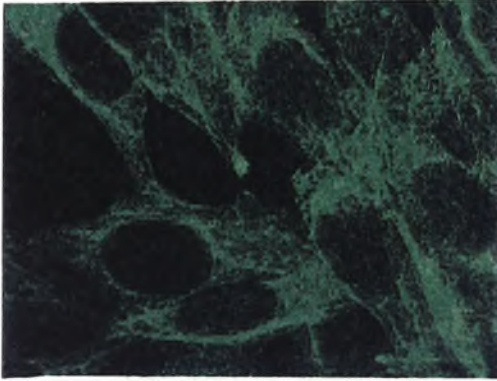
Η AH-1 έχει ισχυρή γενετική προδιάθεση (169). Μεταξύ των Καυκάσιων ασθενών της Βόρειας Ευρώπης και Αμερικής, η προδιάθεση

σχετίζεται με το γονίδιο DRB1: το DRB1*0301 είναι το κυριότερο αλληλίο προδιάθεσης, ενώ το DRB1*0401 είναι δευτερεύον, αλλά ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για AH-1 (176-178). Τα γονίδια αυτά φαίνεται να επηρεάζουν την κλινική έκφραση της νόσου: οι ασθενείς που φέρουν το DRB1*0301 είναι νεότεροι και απαντούν σε χαμηλότερο ποσοστό στη θεραπεία με κορτιζόνη σε σχέση με τους φέροντες το DRB1*0401 (179). Η γενετική βάση της AH-2 δεν έχει τεκμηριωθεί, παρόλα αυτά, η προδιάθεση για AH-2 φαίνεται να σχετίζεται με το DRB1*0701 (180,181) και τα HLA B14, DR3, C4A-QO (182).

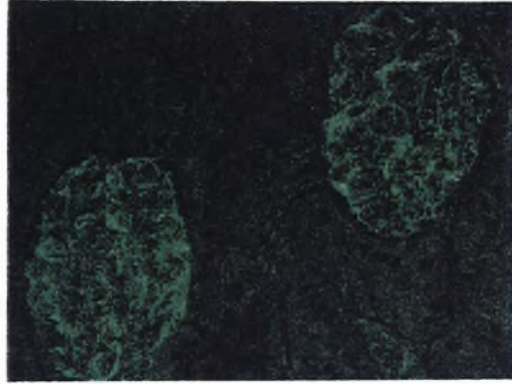
α) Αυτοαντισώματα στην AH-1.

Τα ANA και SMA δεν είναι ούτε ειδικά για την AH-1 ούτε φαίνεται να σχετίζονται παθογενετικά με τη νόσο (183). Όπως προαναφέρθηκε, τα ANA ανιχνεύονται με την τεχνική ΕΑΦ με καλύτερο υπόστρωμα τα HEp2 κύτταρα. Τα SMA ανιχνεύονται με την ίδια τεχνική αλλά καλύτερο υπόστρωμα αποτελούν τομές κρυστάτη ήπατος-νεφρών-στομάχου αρουραίου (θετικός τίτλος > 1:40) (157). Χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τα κύτταρα HEp2, έχουν παρατηρηθεί διάφοροι τύποι φθορισμού των ANA, με συχνότερο τον ομοιογενή (34-58%) και τον στικτό (21-34%) (157,159,184). Τα αυτοαντιγόνα στόχοι των ANA στην AH-1 ποικίλλουν (μονής και διπλής έλικας DNA, tRNA, snRNPs, ιστόνες, κυκλίνη A, λαμινίνη A και C, κεντρομερίδιο), χωρίς το καθένα να αφορά διαφορετικές κλινικές υποομάδες της AH-1 και να έχει κάποια ιδιαίτερη διαγνωστική αξία (150,157,159,184-188).

Τα SMA εμφανίζουν αντιδραστικότητα έναντι της F-ακτίνης, κυρίως, αλλά και άλλων συστατικών (τουμπουλίνη, βιμεντίνη, δεσμίνη, σκελετίνη) (169,188) (Εικόνα 6,7).

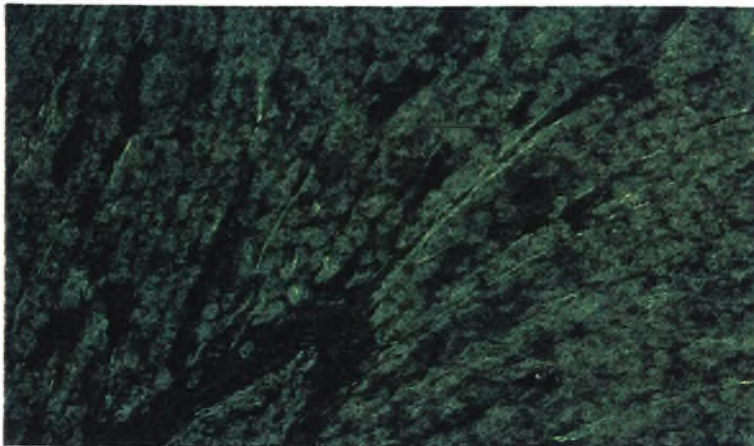


6.1. Κυτταροπλασματικός φθορισμός SMA σε κύτταρα HEp2



6.2. Φθορισμός του νεφρικού σπειράματος σε τομή νεφρού αρουραίου

Εικόνα 6. Φθορισμός των SMA σε υπόστρωμα HEp2 και κατεψυγμένη τομή νεφρού αρουραίου.



Εικόνα 7. SMA κατά F ακτίνης: φθορισμός 'δίκην ινιδίων' σε κατεψυγμένη τομή στομάχου αρουραίου από ασθενή με AH-1.

Σε γενικές γραμμές δεν είναι αποδεκτό ότι οι επιμέρους αντιδραστικότητες των SMA έχουν κάποια διαγνωστική ή προγνωστική αξία

(169,188). Εντούτοις, η παρουσία SMA εναντίον της F-ακτίνης του κυτταροσκελετού χαρακτηρίζει την πορεία και την έκβαση των προσβληθέντων: οι ασθενείς αυτοί είναι νεότεροι, συνήθως HLA-DR3 θετικοί και παρουσιάζουν φτωχή απάντηση στη θεραπεία με τα κορτικοστεροειδή (159,189, 190).

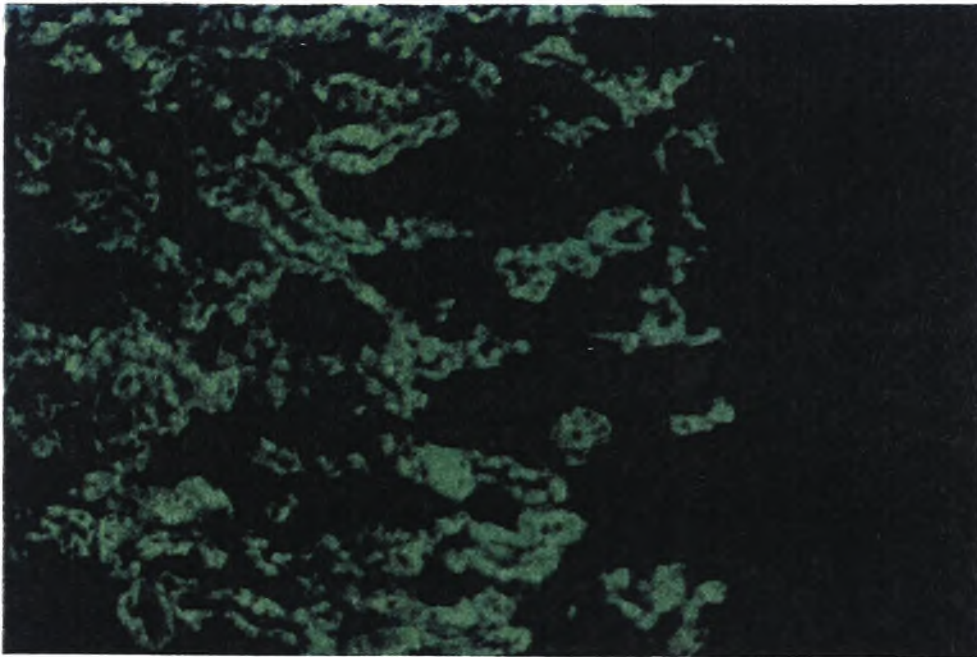
Τα ANCA ανιχνεύονται με ΕΑΦ στο 65-96% των ασθενών με AH-1 (113,156,190-194). Στην πλειονότητα είναι 'άτυπα' pANCA καθώς τα αυτοαντιγόνα στόχοι τους ποικίλλουν [καθεψίνη G, καταλάση, α-ενολάση, λακτοφερίνη, ομάδα χρωμοσωμιακών πρωτεϊνών υψηλής κινητικότητας (HMG1, HMG2), ακτίνη κα] (157,190,192,194-198). Μέχρι στιγμής, δεν έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με AH-2 (113). Οι τίτλοι ανίχνευσης των pANCA στην AH-1 είναι σημαντικά υψηλότεροι σε σχέση με άλλες χρόνιες ηπατικές παθήσεις(110,191,192) αλλά δεν φαίνεται να έχουν κάποια προγνωστική αξία (169).

Τα αντι-ASGP-R αντισώματα ανιχνεύονται στο 75-90% των ασθενών με AH-1 (156,166), σχετίζονται θετικά με την ενεργότητα της νόσου (166,190,199) αλλά ανιχνεύονται και σε άλλες ηπατοπάθειες (ΠΧΚ, οξείες ιογενείς ηπατίτιδες, αλκοολική ηπατίτιδα) (157,199). Η ανίχνευσή τους παρουσιάζει τεχνικές δυσκολίες (169).

Τα αντι-SLA/LP αντισώματα δεν ανιχνεύονται με ΕΑΦ, αλλά με ραδιοενζυμικές μεθόδους, ανταγωνιστικές ELISA και μεθόδους ανοσοαποτύπωσης. Είναι ειδικά αυτοαντισώματα για την AH-1, καθώς μέχρι στιγμής δεν έχουν ανιχνευθεί σε χρόνιες και οξείες ιογενείς ηπατίτιδες (156,157,166,172,190,200). Το αυτοαντιγόνο στόχος τους είναι μια πρωτεΐνη του κυττοσολίου 50kd, που αναγνωρίστηκε πρόσφατα (170).

β) Αυτοαντισώματα στην AH-2.

Τα αντι-LKM αντισώματα διακρίνονται σε τρεις τύπους (139,166,173). Τα χαρακτηριστικά αντι-LKM, που ανιχνεύονται στην AH-2 είναι τα αντι-LKM-1 (στην πλειοψηφία) και τα τύπου 3 αντι-LKM (αντι-LKM-3, στο 5-10% των ασθενών με AH-2) (166,173,190,201). Τα αντισώματα αυτά περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τους Rizzeto και συν (202). Το πρότυπο ανοσοφθορισμού των αντι-LKM με ΕΑΦ σε υπόστρωμα ήπατος-νεφρών αρουραίου χαρακτηρίζεται από διάχυτο θετικό σήμα στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων και αποκλειστική αντιδραστικότητα του P3 τμήματος των εγγύς εσπειραμένων νεφρικών σωληναρίων (188,201) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Αντι-LKM: φθορισμός των εγγύς εσπειραμένων νεφρικών σωληναρίων σε υπόστρωμα τομής νεφρού αρουραίου.

Άλλες μέθοδοι ανίχνευσης των αντι-LKM-1 αποτελούν οι ανταγωνιστικές ELISA και η ανοσοαποτύπωση, καθώς και μια πιο πρόσφατη ευαίσθητη, ποσοτική μέθοδος, που στηρίζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων κατά του αυτοαντιγόνου-στόχου των αντι-LKM-1 (κυτόχρωμα P450 2D6,

ΚΥΤΡ450 2D6), μετά από ανοσοκαθίζηση ανασυνδυασμένου και ραδιοσημασμένου με ³⁵S μεθειονίνη ΚΥΤΡ450 2D6 (163,173).

Το αυτοαντιγόνο στόχος των αντι-LKM-1 αντισωμάτων, το ΚΥΤΡ450 2D6, είναι σημαντικό για το μεταβολισμό φαρμάκων, καθώς καταλύει την οξειδωσή τους με ένα άτομο οξυγόνου (mono-oxidation), ώστε να μετατραπούν σε μη τοξικούς, υδατοδιαλυτούς μεταβολίτες (201,204-206). Στην ΑΗ-2 τα αντι-LKM-1 αντισώματα αναγνωρίζουν μικρούς, επίπεδους κυρίως επιτόπους στο ΚΥΤΡ450 2D6 και πιο συγκεκριμένα πέντε αντιγονικές θέσεις, που βρίσκονται μεταξύ των πεπτιδίων 193-212, 257-269, 321-351, 373-389 και 410-429 (207-209). Η κύρια όμως αντιγονική θέση αναγνώρισης είναι η αλληλουχία πεπτιδίων 257-269 και η δεύτερη συχνότερη, η αλληλουχία 321-351 (207-210). Επιπλέον, πολύ πρόσφατα, με μοριακές τεχνικές βρέθηκε ότι η αντιγονική θέση 316-327 εντοπίζεται στην επιφάνεια του ΚΥΤΡ450 2D6 και μπορεί να αποτελεί κύριο στόχο των αντι-LKM-1 καθώς η αντιδραστικότητα των εν λόγω αυτοαντισωμάτων έναντι της περιοχής αυτής είναι ιδιαίτερα αυξημένη (211). Η αναγνώριση μικρών επίπεδων επιτόπων από τα αντι-LKM-1 στην ΑΗ-2 διαχωρίζει από τα αντι-LKM-1, που ανιχνεύονται σε ασθενείς με ηπατίτιδα C, καθώς τα τελευταία αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους, τόσο επίπεδους όσο και τρισδιάστατους (163,211-216).

Η συμμετοχή των αντι-LKM-1 αντισωμάτων στην παθογένεια της ηπατικής βλάβης της ΑΗ-2 φαίνεται πιθανή είτε μέσω του συμπληρώματος είτε μέσω της εξαρτώμενης από αντίσωμα κυτταροτοξικότητας (163,166,173,217). Απαραίτητη, πάντως, είναι η έκφραση του ΚΥΤΡ450 2D6 στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων, πράγμα που έχει δειχθεί από πρόσφατες

μελέτες, ανεξάρτητα από τη φυσιολογική μικροσωματική του εντόπιση (218-221).

Τα αντι-LKM-3 έχουν ως αυτοαντιγόνο στόχο την οικογένεια 1 των UDP-γλυκουρονικών τρανσφερασών (UGT-1) (211,222,223). Αυτά τα αυτοαντισώματα ανιχνεύονται σε ποσοστό 5-10% των ασθενών με AH-2 και στο 13% των ασθενών με ηπατίτιδα δέλτα (HDV) (213,222,223). Τα τύπου 2 αντι-LKM δεν ανιχνεύονται ποτέ στην AH-2, αλλά μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις φαρμακευτικών ηπατίτιδων (κυρίως αυτή που επάγεται από πιενιλικό οξύ) ενώ το αυτοαντιγόνο στόχος τους είναι το KYTP450 2C9 (173,157).

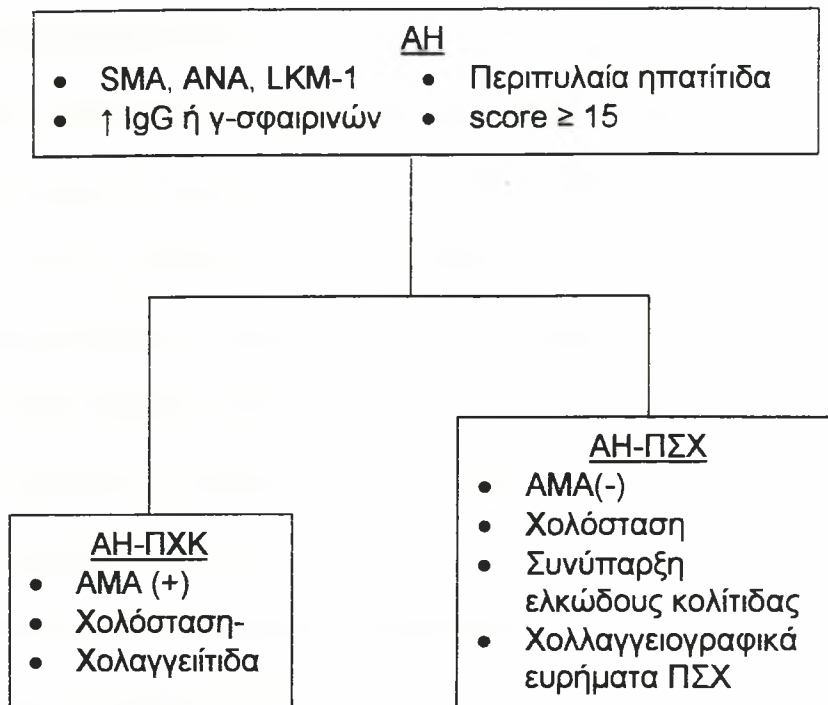
Τα αντι-LC-1 αυτοαντισώματα ανιχνεύονται με ΕΑΦ, με απλή ανοσοδιάχυση, ανάστροφη ανοσοηλεκτροφόρηση ή μεθόδους ανοσοαποτύπωσης (224,225). Με την τεχνική του ΕΑΦ παρατηρείται χαρακτηριστικός φθορισμός του κυτταροπλάσματος των ηπατοκυττάρων, που διακόπτεται στην περιοχή γύρω από την κεντρική φλέβα, ενώ οι νεφροί δεν φθορίζουν. Λόγω της συχνής συνύπαρξής τους με τα αντι-LKM-1 αντισώματα, στο 50% περίπου των περιπτώσεων, το προαναφερθέν πρότυπο δεν είναι συνήθως εμφανές (157,190). Τα αντι-LC-1 ανιχνεύονται και σε περιπτώσεις ασθενών με ηπατίτιδα C (226), οπότε δε μπορούν να θεωρηθούν ειδικά της AH-2. Το αυτοαντιγόνο στόχος των αντι-LC-1 φαίνεται να είναι οργανοειδικό καθώς πρόκειται για το ένζυμο formininotransferase cyclodeaminase, το οποίο εμπλέκεται στο μεταβολισμό του φυλλικού οξέος (227). Τα αντι-LC-1 φαίνεται να σχετίζονται με την ενεργότητα της νόσου, οπότε είναι πιθανός ο παθογενετικός τους ρόλος (228).

Στα πλαίσια του ΣΑΠΕ-1 ανιχνεύονται τα αντι-LM αυτοαντισώματα, τα οποία με τον ΕΑΦ δίνουν φθορισμό στο κυτταρόπλασμα των ηπατικών κυττάρων που βρίσκονται γύρω από φλέβες και όχι στο νεφρό (173,175,229). Τα αντι-LM είναι ειδικά για τη διάγνωση ΑΗ στα πλαίσια του ΣΑΠΕ-1 (173,229,230). Το αυτοαντιγόνο στόχος των αντι-LM είναι το ΚΥΤΡ450 1Α2 (229-232). Στο ΣΑΠΕ-1 έχουν βρεθεί και αντισώματα κατά του ΚΥΤΡ450 2Α6, που ανευρίσκονται και σε ασθενείς με ηπατίτιδα C (233), όμως η παρουσία τους δε σχετίζεται με την εκδήλωση ΑΗ στα πλαίσια του συνδρόμου (230,234).

Τέλος, οι ασθενείς με ΑΗ-2 παρουσιάζουν υψηλή συχνότητα εμφάνισης, συγχρόνως, και άλλων αυτοανόσων νοσημάτων, κυρίως σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, λεύκη και αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, ενώ στον ορό τους μπορεί να ανιχνεύονται οργανοειδικά αυτοαντισώματα, όπως ΡCΑ, αντισώματα κατά των νησιδίων του Langerhans και του θυρεοειδούς (159,169,190).

3.4. Σύνδρομο επικάλυψης.

Ως σύνδρομο επικάλυψης χαρακτηρίζονται οι περιπτώσεις εκείνες ασθενών που πληρούν τα διαγνωστικά κριτήρια δύο από τα τρία κύρια αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (ΠΧΚ, ΑΗ και ΠΣΧ) (210,235-237). Πιο συγκεκριμένα, διακρίνονται δύο οντότητες: i) το σύνδρομο επικάλυψης μεταξύ ΑΗ και ΠΧΚ και ii) το σύνδρομο επικάλυψης μεταξύ ΑΗ και ΠΣΧ, ενώ δε φαίνεται να υπάρχει σύνδρομο επικάλυψης μεταξύ ΠΧΚ και ΠΣΧ (210, 235-237) (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Διαγνωστικός αλγόριθμος συνδρόμων επικάλυψης αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος. Η οροθετικότητα για SMA, ANA ή αντι-LKM-1, υψηλός τίτλος γ-σφαιρινών ή IgG, παρουσία περιπυλαίας ηπατίτιδας στην ιστολογική εξέταση και/ή συνολικό 'score' πάνω από 15 σύμφωνα με το σύστημα βαθμοποίησης του IAHG στηρίζουν τη διάγνωση της ΑΗ. Συνύπαρξη θετικών AMA, κλινικών ή/και εργαστηριακών ευρημάτων χολόστασης και ιστολογικών ευρημάτων χολαγγειίτιδας υποδεικνύουν τη διάγνωση συνδρόμου επικάλυψης ΑΗ και ΠΧΚ. Αντίθετα, απουσία AMA, κλινικών ή/και εργαστηριακών ευρημάτων χολόστασης, συνύπαρξη ελκώδους κολίτιδας και παθολογικά χολαγγειογραφικά ευρήματα στην ERCP ή την MRCP υποδεικνύουν τη διάγνωση συνδρόμου επικάλυψης ΑΗ και ΠΣΧ (Gut 2001;49 σελ. 591).

Η συμπεριφορά του καθενός συνδρόμου επικάλυψης και η απάντηση στη θεραπεία εξαρτώνται κύρια από τη νόσο που κυριαρχεί στην κλινική και/ή εργαστηριακή εικόνα (210,238-241). Η αναγνώριση αυτών των συνδρόμων είναι σημαντική, αφού μπορεί να συνεισφέρει τόσο στην απόφαση για αλλαγή

στρατηγικής στη θεραπεία όσο και στη διευκρίνιση της παθογένεσης των τυπικών των αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος (210,242).

Βιβλιογραφία 1

1. Stephen McPhee, Χαράλαμπος Μουτσόπουλος. Ανοσολογία. Στο: Παθολογική Φυσιολογία. Ιατρ. Εκδ. Λίτσας, Αθήνα 2000, σελ. 43-93.
2. Rote NS. Immunity. In: McCance KL, Huether SE (Ed). Pathophysiology. The biologic basis for disease in adults and children. 3d edition, Mosby 1998, p.174-204.
3. Roit I, Brostoff J, Male D. Cell cooperation in the antibody response- Cell-mediated immune response – Immunological tolerance – Autoimmunity and autoimmune diseases. In: Roit I (Ed). Immunology, 4th edition, Mosby 1996, p. 8.1-9.15, 12.1-12.10, 27.1-27.13.
4. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. N Engl J Med 2000; 343:37-49.
5. Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. N Engl J Med 2001; 344:655-664.
6. Bruer J, Lanoue A, Franzke A, et al. Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo. J Exp Med 1998; 187:177-183.
7. Klein L, Klugmann M, Nave KA, et al. Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a slice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. Nat Med 2000; 6:56-61.
8. Dhein J, Walczak H, Bäuml C, et al. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). Nature 1995; 373:438-441.
9. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. Nature 1995; 373 :441-444.

10. Ju ST, Panka DJ, Cui H, et al. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995; 373:444-448.
11. Chambers CA, Allison JP. Costimulatory regulation of T-cell function. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11:203-210.
12. Shevach EM. Regulatory T-cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:423-449.
13. Becker KG, Simon RM, Bailey-Wilson JE, et al. Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:9979-9984.
14. Miller SD, Vanderlugt CL, Smith-Begolka WS, et al. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat Med* 1997; 3:1133-1136.
15. Perron H, Garson JA, Bedin F, et al. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:7583-7588.
16. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, et al. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 2000; 165:6107-6115.
17. Cella M, Salio M, Sakakibara Y, et al. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* 1999; 189:821-829.
18. Shoenfeld Y. Common infections, idiopathic dysregulation, autoantibody spread and induction of autoimmune diseases. *J Autoimm* 1996; 9:235-239.

19. Albert LJ, Inman RD. Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med* 1999; 341:2068-2074.
20. Hemmer B, Vergelli M, Gran B, et al. Predictable TCR antigen recognition based on peptide scans leads to identification of agonist ligands with no sequence homology. *J Immunol* 1999; 160:3631-3636.
21. Maier B, Molinger M, Cope AP, et al. Multiple cross-reactive self-ligands for *Borrelia burgdoferi*-specific HLA-DR4-restricted T cells. *Eur J Immunol* 2000; 30:448-457.
22. Hahn BH. Antibodies to DNA. *N Engl J Med* 1998; 338:1359-1368.
23. Naparstek Y, Plotz PH. The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:79-104.
24. Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, et al. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 1999; 10:451-461.
25. Matsumoto I, Staub A, Benoist C, et al. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* 1999; 286:1732-1735.
26. Ζέρβα Λ. Ανίχνευση αντιπυρηνικών αντισωμάτων με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Στο: Χ.Μ. Μουτσοπουλος (Εκδ). *Ανοσολογία-Αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα*. Ιατρ. Εκδ. Λίτσας, Αθήνα 1990, σελ. 225-231.
27. Peter JB. Antinuclear antibodies. In: JB Peter (Ed). *Use and interpretation of tests in clinical immunology*. 8th Ed. Specialty Laboratories, Inc. Santa Monica, USA, 1991-92, p. 13,57-58,190-191.

28. Ward MM. Laboratory testing for systemic rheumatic diseases. *Postgrad Med* 1998; 103:93-100.
29. Schur PH. Systemic lupus erythematosus. In: Goldmann L, Bennett JC (Ed). *Cecil, Textbook of medicine*. 21st Ed. W. B. Saunders Company, USA, 2000, p.1509-1517.
30. Casiano CA, Tan EM. Recent developments in the understanding of antinuclear autoantibodies. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 111:308-313.
31. Ike RW, Arnold WJ. Specialized procedures in the management of patients with rheumatic diseases. In: Goldmann L, Bennett JC (Ed). *Cecil, Textbook of medicine*. 21st Ed. W. B. Saunders Company, USA, 2000, p. 1487-1491.
32. Dalekos GN, Manoussakis MN, Zervou E, et al. Immunologic and viral markers in the circulation of anti-HIV negative heroin addicts. *Eur J Clin Invest* 1993; 23:219-225.
33. Dalekos GN, Manoussakis MN, Merkouropoulos MC, et al. Autoimmunity and cellular activation before and after a-interferon administration in patients with chronic viral hepatitis. A preliminary study. *Hel J Gastroenterol* 1993; 6:166-171.
34. Τζιούφας ΑΓ. Αντισώματα κατά δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA). Στο: Χ.Μ. Μουτσοπουλος (Εκδ). *Ανοσολογία-Αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα*. Ιατρ. Εκδ. Λίτσας, Αθήνα 1990, σελ. 285-300.
35. Diamond B, Katz JB, Paul E, et al. The role of somatic mutation in the pathogenic anti-DNA response. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:731-757.

36. ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, et al. Measurements of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus: a long term prospective study. *Arthritis Rheum* 1990; 33:634-643.
37. Bootsma H, Spronk P, Derksen R, et al. Prevention of relapses in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1995; 345:1595-1599.
38. Quismorio FP Jr. Clinical application of serologic abnormalities in systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH (Ed). *Dubois' lupus erythematosus*. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997 :925-942.
39. Mohan C, Datta SK. Lupus: key pathogenic mechanisms and contributing factors. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 77:209-220.
40. Lefkowitz JB, Kiehl M, Rubenstein J, et al. Heterogeneity and clinical significance of glomerular-binding antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1996; 98:1373-1380.
41. Brinkman K, Termaat R, Van den Brink H, et al. The specificity of the anti-dsDNA ELISA. A closer look. *J Immunol Methods* 1991; 139:91-100.
42. Tzioufas AG, Manoussakis MN, Drosos AA, et al. Enzyme immunoassays for the detection of IgG and IgM anti-dsDNA antibodies: clinical significance and specificity. *Clin Exp Rheumatol* 1987; 5:247-253.
43. Tzioufas AG, Terzoglou C, Stavropoulos ED, et al. Determination of anti-dsDNA antibodies by three different methods: comparison of

- sensitivity, specificity and correlation with lupus activity index (LAI). *Clin Rheumatol* 1990; 9:182-185.
44. Μανουσάκης MN. Αντισώματα κατά καρδιολιπίνης. Στο: Χ.Μ. Μουσοπουλος (Εκδ). *Ανοσολογία-Αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα*. Ιατρ. Εκδ. Λίτσας, Αθήνα 1990, σελ. 323-333.
 45. Harris EN, Gharavi AE, Boye ML, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; ii:1211-1214.
 46. Khamashta MA, Hughes GVR. Antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome. *Cur Opin Rheumatol* 1995; 7:389-394.
 47. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al. International Consensus Statement on Preliminary Classification Criteria for Definite Antiphospholipid Syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1309-1311.
 48. McNeil HP, Krilis SA. Antiphospholipid antibodies. *Aust NZ J Med* 1991; 21:463-475.
 49. Harris EN, Pierangeli SS, Gharavi AE. Diagnosis of the antiphospholipid syndrome: A proposal for use of laboratory tests. *Lupus* 1998; 7: 144-148.
 50. Munoz-Rodriguez FJ, Font J, Cervera R, et al. Clinical study and follow-up of 100 patients with the antiphospholipid syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 1999; 29:182-190.
 51. Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, et al. The primary antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine (Baltimore)* 1989; 68:366-374.

52. Asherson RA, Cervera R, Piette JC, et al. The catastrophic antiphospholipid syndrome: clinical and laboratory features of 50 patients. *Medicine* 1998; 77:195-207.
53. Petrovas C, Vlachoyiannopoulos P, Kordosis T, Moutsopoulos HM. Anti-phospholipid antibodies in HIV Infection and SLE with or without antiphospholipid syndrome: comparisons of phospholipid specificity, avidity and reactivity with β 2-GPI. *J Autoimmun* 1999; 13: 347-355.
54. Dalekos GN, Manoussakis MN, Goussia AC, Tsianos EV, Moutsopoulos HM. Soluble interleukin-2 receptors, antineutrophil cytoplasmic antibodies and other autoantibodies in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1993; 34:658-664.
55. Schultz D. Antiphospholipid Antibodies: Basic Immunology and Assays. *Semin Arthritis Rheum* 1997; 26:724-739.
56. Manoussakis MN, Tzioufas AG, Silis MP, et al. High prevalence of anti-cardiolipin and other autoantibodies in a healthy elderly population. *Clin Exp Immunol* 1987; 69:557-565.
57. Yannitsi SG, Manoussakis MN, Mavridis AK, et al. Factors related to the presence of anticardiolipin and other autoantibodies in patients with chronic mental disorders. *Biol Psychiatr* 1990; 27:747-756.
58. Dalekos GN, Zachou K, Liaskos Ch. The antiphospholipid syndrome and infection. *Current Rheumatol Rep* 2001; 3:277-285.
59. Harris EN, Gharavi AE, Hughes GRV. Anti-phospholipid antibodies. *Clin Rheum Dis* 1985; 11:591-609.
60. Silvestris F, Frassanito MA, Cafforio P, et al. Antiphosphatidylserine antibodies in human immunodeficiency virus-1 patients with evidence

- of T-cell apoptosis and mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Blood* 1996, 87(12): 5185-95.
61. Gonzalez C, Leston A, Garcia-Berrocal B, et al. Antiphosphatidylserine antibodies in patients with autoimmune disease and HIV-infected patients: effects of Tween 20 and relationship with antibodies to b2-glycoprotein I. *J Clin Lab Anal* 1999, 13(2): 59-64.
 62. Cacoub P, Renou C, Rosenthal E, et al. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection. *Medicine* 2000; 79:47-56.
 63. de Larranaga GF, Forastiero RR, Carreras LO, et al. Different types of antiphospholipid antibodies in AIDS: comparison with syphilis and the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 1999; 96:19-25.
 64. Abuaf N, Laperche S, Rajoely B, et al. Autoantibodies to phospholipids and to the coagulation protein in AIDS. *Thromb Haemostat* 1997; 77:856-861.
 65. K Zachou, C Liaskos, DK Christodoulou et al. Anti-cardiolipin antibodies (anti-CL) in patients with hepatitis C virus (HCV) infection are independent of beta2-glycoprotein I (β 2-GPI) co-factor or features of antiphospholipid syndrome (APLS). *J Hepatol* 36 (Suppl 1): 139.
 66. Dalekos GN, Kistis KG, Boumba DS, et al. Increased incidence of anti-cardiolipin antibodies in patients with hepatitis C is not associated with aetiopathogenetic link to anti-phospholipid syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000, 12: 67-74.
 67. Leroy V, Arvieux J, Jacob MC, et al. Prevalence and significance of anticardiolipin, anti-b2 glycoprotein I and anti-prothrombin antibodies in chronic hepatitis C. *Br J Haematol* 1998; 101: 468-474.

68. Sthoeger ZM, Fogel M, Smirov A, et al. Anticardiolipin autoantibodies in serum samples and cryoglobulins of patients with chronic hepatitis C infection. *Ann Rheum Dis* 2000, 59: 483-486.
69. Matsuda J, Saitoh N, Gotoh M, et al. High prevalence of anti-phospholipid antibodies and anti-thyroglobulin antibody in patients with hepatitis C virus infection treated with interferon- α . *Am J Gastroenterol* 1995; 90:1138-1141.
70. Ordi-Ros J, Villarreal J, Monegal F, et al. Anticardiolipin antibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection: characterization in relation to antiphospholipid syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7:241-244.
71. Harada M, Fujisawa Y, Sakisaka S, et al. High prevalence of anticardiolipin antibodies in hepatitis C virus infection: lack of effects on thrombocytopenia and thrombotic complications. *J Gastroenterol* 2000; 35: 272-277.
72. Mangia A, Margaglione M, Cascavilla I, et al. Anticardiolipin antibodies in patients with liver disease. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2983-2987.
73. Cacoub P, Musset L, Amoura Z, et al. Anticardiolipin antibodies, anti-b2-glycoprotein I and antinucleosome antibodies in hepatitis C virus infection and mixed cryoglobulinemia. *J Rheumatol* 1997; 24:139-144.
74. Prieto J, Yuste JR, Beloqui O, et al. Anticardiolipin antibodies in chronic hepatitis C: implication of hepatitis C virus as the cause of the antiphospholipid syndrome. *Hepatology* 1996; 23: 199-204.
75. Biron C, Andreani H, Blanc P, et al. Prevalence of antiphospholipid antibodies in patients with chronic liver disease related to alcohol or

- hepatitis C virus: correlation with liver injury. *J Lab Clin Med* 1998; 131(3): 243-50.
76. Baid S, Pascual M, Williams WW, et al. Renal thrombotic microangiopathy associated with anticardiolipin antibodies in hepatitis C-positive renal allograft recipients. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:146-153.
77. Giordano P, Galli M, Del Vecchio GC, et al. Lupus anticoagulant, anticardiolipin antibodies and hepatitis C virus infection in thalassaemia. *Br J Haematol* 1998; 102:903-906.
78. Munoz-Rodriguez F, Tassies D, Font J, et al. Prevalence of hepatitis C virus infection in patients with antiphospholipid syndrome. *J Hepatology* 1999, 30: 770-773.
79. Al-Saeed A, Makris M, Malia RG, et al. The development of antiphospholipid antibodies in haemophilia is linked to infection with hepatitis C. *Br J Haematol* 1994; 88:845-848.
80. Gotoh M, Matsuda J. Human immunodeficiency virus rather than hepatitis C virus infection is related to the development of an anticardiolipin antibody. *Am J Hamatol* 1995; 50:220-222.
81. Louizou S, Cazabon JK, Walport MJ, et al. Similarities of specificity and cofactor dependence in serum antiphospholipid antibodies from patients with human parvovirus B19 infection and from those with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40:103-108.
82. Sorice M, Pittoni V, Griggi T, et al. Specificity of anti-phospholipid antibodies in infectious mononucleosis: a role for anti-cofactor protein antibodies. *Clin Exp Immunol* 2000; 120:301-306.

83. Mengarelli A, Minotti C, Palumbo G, et al. High levels of antiphospholipid antibodies are associated with cytomegalovirus infection in unrelated bone marrow and cord blood allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2000; 108:126-131.
84. Uthman I, Tabbarah Z, Gharavi AE. Hughes syndrome associated with cytomegalovirus infection. *Lupus* 1999; 8:775-7.
85. Yapez A, Cedillo L, Neyrolles O, et al. *Mycoplasma penetrans* bacteremia and primary antiphospholipid syndrome. *Emerg Infect Dis* 1999; 5:164-167.
86. McNally T, Purdy G, Mackie IJ, et al. The use of an anti-b2-glycoprotein-I assay for discrimination between anticardiolipin antibodies associated with infection and increased risk of thrombosis. *Br J Haematol* 1995; 91:471-473.
87. Hayem G, Kassis N, Nicaise P, et al. Systemic lupus erythematosus-associated catastrophic antiphospholipid syndrome occurring after typhoid fever: a possible role of *Salmonella* lipopolysaccharide in the occurrence of diffuse vasculopathy-coagulopathy. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1056-61.
88. Rojas-Rodriguez J, Carrasco MG, Casals MR, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome: clinical description and triggering factors in 8 patients. *J Rheumatol* 2000; 27:238-240.
89. Gharavi AE, Pierangelli SS, Harris EN. New developments in viral peptides and APL induction. *J Autoimmun* 2000; 15:227-230.
90. Gharavi AE, Pierangelli SS. Origin of antiphospholipid antibodies: induction of aPL by viral peptides. *Lupus* 1998; 7:S52-S54.

91. Gharavi AE, Pierangelli SS, Colden-Stanfield M, et al. GDKV-induced antiphospholipid antibodies enhance thrombosis and activate endothelial cells in vivo and in vitro. *J Immunol* 1999; 163:2922-2927.
92. Van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, et al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985; 2:425-429.
93. Rasmussen N, Wiik A, Hoier-Madsen M, et al. Antineutrophil cytoplasm antibodies. *Lancet* 1988; 1:706-707.
94. Savige J, Gillis D, Benson E, et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Am J Pathol* 1999; 111:507-513.
95. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescenting glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988; 318:1651-1657.
96. Γούσια AX, Μανουσάκης MN, Γερμανίδης ΓΣ, και συν. Αντισώματα κατά αντιγόνων κυτταροπλάσματος ουδετερόφιλων σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα. *Ελλ Ρευματολογία* 1991; 3:121-130.
97. Γερμενής ΑΕ. Διαγνωστική Ανοσολογία. Λάρισα 2002.
98. Ludemann J, Utecht B, Gross WL. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme. *J Exp Med* 1990; 171:357-362.
99. Terjung B, Worman HJ, Herzog V, et al. Differentiation of antineutrophil nuclear antibodies in inflammatory bowel and autoimmune liver

- diseases from antineutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) using immunofluorescence microscopy. *Clin Exp Immunol* 2001; 126:37-46.
100. Hoffman GS, Ulrich S. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Arthr Rheum* 1998; 41:1521-37.
 101. Langford CA. The diagnostic utility of cANCA in Wegener's granulomatosis. *Cleve Clin J Med* 1998; 65:135-40.
 102. Allen NB. Wegener's granulomatosis. In: Goldmann L, Bennett JC (Ed). *Cecil, textbook of medicine*. 21st Ed. W. B. Saunders Company, USA, 2000, p.1529-1532.
 103. De Clerck LS, Van Offel JF, Smolders WA, et al. Pitfalls with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Clin Rheumatol* 1989; 8:512-516.
 104. Davenport A. 'False positive' perinuclear and cytoplasmic anti-neutrophil antibody results leading to misdiagnosis of Wegener's granulomatosis and/or microscopic polyarteritis. *Clin Nephrol* 1992; 37:124-130.
 105. Schonermarck U, Lamprecht P, Csernok E, et al. Prevalence and spectrum of rheumatic diseases associated with proteinase 3-antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and myeloperoxidase-ANCA. *Rheumatology* 2001; 40:178-184.
 106. Gallicchio MC, Savige JA. Detection of anti-myeloperoxidase and anti-elastase antibodies in vasculitides and infections. *Clin Exp Immunol* 1991; 84:232-237.

107. Gueirard P, Delpech A, Gilbert D, et al. Anti-myeloperoxidase antibodies: immunological characteristics and clinical associations. *J Immun* 1991; 4:517-527.
108. Nassberger L, Sjöholm AG, Jonsson H, et al. Autoantibodies against neutrophil cytoplasm components in systemic lupus erythematosus and in hydralazine-induced lupus. *Clin Exp Immunol* 1990; 81:380-383.
109. Spronk PE, Bootsma H, Horst G, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1996; 35:625-631.
110. Dalekos GN, Tsianos EV. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in chronic viral hepatitis (CVH). *J Hepatol (letter)* 1994; 20:561.
111. Savige JA, Gallicchio MC, Stockman A, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 1991; 86:92-98.
112. Duerr RH, Targan SR, Landers C, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis: comparison with other colitides/diarrheal illnesses. *Gastroenterology* 1991; 100:1590-1596.
113. K Zachou, Ch Liaskos, E Makri and GN Dalekos. Role and significance of autoantibodies in the diagnosis and differential diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatogastroenterology*, 2003 (in press).
114. Klaassen RJ, Goldschmeding R, Dolman KM, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with symptomatic HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1992; 87:24-30.

115. Yahya TM, Benedict S, Shalabi A, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) in malaria is directed against cathepsin G. *Clin Exp Immunol* 1997; 110:41-44.
116. Lesavre P, Noel LH, Gayno S, et al. Atypical autoantigens targets of perinuclear antineutrophil cytoplasm antibodies (p-ANCA): specificity and clinical associations. *J Autoimmun* 1993; 6:185-195.
117. Gleeson PA, Toh BH. Molecular targets in pernicious anaemia. *Immunol Today* 1991; 12:233-238.
118. Callaphan JM, Khan MA, Alderuccio F, et al. Alpha and beta subunits of the gastric H⁺/K⁺-ATPase are concordantly targeted by parietal cell autoantibodies associated with autoimmune gastritis. *Autoimmunity* 1993; 16:289-295.
119. Burman P, Karlsson FA, Loof L, et al. H⁺/K⁺-ATPase antibodies in autoimmune gastritis: observations on the development of pernicious anemia. *Scand J Gastroenterol* 1991; 26:207-214.
120. Weinstein WM. Gastritis and gastropathies. In: Feldman M, Scharshmidt BF, Sleisenger MH (Ed). *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal disease*, 6th ed, Philadelphia, WB Saunders, 1998, p. 711.
121. De Block CE, De Leeuw IH, Van Gaal LF, et al. High prevalence of manifestations of gastric autoimmunity in parietal cell antibody-positive type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. The Belgian Diabetes Registry. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:4062-4067.
122. De Block CE, De Leeuw IH, Bogers JJ, et al. Helicobacter pylori, parietal cell antibodies and autoimmune gastropathy in type 1 diabetes mellitus. *Aliment Pharmacol Ther* 2002 ; 16:281-289.

123. Rappel S, Muller H, Stolte M. Active pre-atrophic autoimmune gastritis. A practice-oriented concept for diagnosis and treatment. *Pathologie* 2001; 22:19-24.
124. Annibale B, Negrini R, Caruana P, et al. Two-thirds of atrophic body gastritis patients have evidence of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2001; 6:225-233.
125. Czaja AJ. Autoantibodies. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1995; 9:723-744.
126. Zamanou A, Tsirogianni A, Terzoglou C, et al. Anti-smooth muscle antibodies (ASMAs) and anti-cytoskeleton antibodies (ACTAs) in liver diseases : a comparison of classic indirect immunofluorescence with ELISA. *J Clin Lab Anal* 2002; 16(4):194-201.
127. Teubner A, Tillmann HL, Schuppan D, et al. Prevalence of circulating autoantibodies in healthy individuals. *Med Klin* 2002; 97(11):645-9.
128. Lopez SL, Seia J, Roy A, et al. Anti-actin antibodies in acute viral hepatitis A in children. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1998; 26:1-4.
129. Gregorio GV, Choudhuri K, Ma Y, et al. Mimicry between the hepatitis B virus DNA polymerase and antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1999; 162(3):1802-10.
130. Cassani F, Cataleta M, Valentini P, et al. Serum autoantibodies in chronic hepatitis C: comparison with autoimmune hepatitis and impact on disease profile. *Hepatology* 1997; 26:561-6.

131. Peter JB. Antinuclear antibodies. In: JB Peter (Ed). Use and interpretation of tests in clinical immunology. 8th Ed. Specialty Laboratories, Inc. Santa Monica, USA, 1991-92, p. 226.
132. Kurki P. Cytoskeleton antibodies in chronic active hepatitis. In: 'Immunology and liver' (K.H. Meyer zum Buschenfelde, J. Hoofnagle and M. Manns, eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston and London, 1993, pp. 206-14.
133. Whittingham SF, Mackay IR. Smooth muscle antibodies. In: 'Autoantibodies' (J.B. Peter and Y. Schoenfeld, eds), Elsevier, Amsterdam, 1996, pp. 767-73.
134. Jansen PLM. Primary biliary cirrhosis: overview. Eur J Gastroenterol Hepatol 1999; 11:583-586.
135. Kaplan M. Primary biliary cirrhosis. N Engl J Med 1996; 335:1570-1580.
136. Galperin C, Gershwin ME. Immunopathology of primary biliary cirrhosis. Bailliere's Clin Gastroenterol 1996; 10:461-481.
137. Straussburg CP, Jaeckel E, Manns MP. Anti-mitochondrial antibodies and other immunological tests in primary biliary cirrhosis. Eur J Gastroenterol Hepatol 1999; 11:595-601.
138. Migliano CT, Van de Water J, Ansari AA, et al. Anti-mitochondrial antibodies are the signature of primary biliary cirrhosis: deciphering the handwriting. In: Manns MP, Boyer JL, Jansen PLM, Reichen J, Kluwer (Ed). Cholestatic liver diseases, 1998, Dordrecht, The Netherlands, p. 239-247.

139. Manns MP, Lutting B, Obermayer-Straub P. Autoimmune diseases: The liver. In: *The Autoimmune Diseases* (3rd Ed), Academic Press 1998, p. 511-544.
140. Baum H, Berg PA. The complex nature of mitochondrial antibodies and their relation to primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1981; 1:309-321.
141. Berg PA, Klein R. Mitochondrial antigen/antibody systems in primary biliary cirrhosis: revisited. *Liver* 1995; 15:281-292.
142. Gershwin ME, Mackay IR, Sturgess A, et al. Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 1987; 138:3525-3531.
143. Surh CD, Danner DJ, Ahmend A, et al. Reactivity of PBC sera with a human fetal liver cDNA clone of branched chain alpha-keto acid dehydrogenase (BCKD) dihydrolipoamide acyltransferase, the 52 kd mitochondrial autoantigen. *Hepatology* 1989; 9:63-68.
144. Yeaman SJ, Danner J, Mutimer DJ, et al. Primary biliary cirrhosis: identification of two major M2 mitochondrial autoantigens. *Lancet* 1988; 1:1067-1070.
145. Moteki S, Leung P, Dickson ER, et al. Epitope mapping and reactivity of antibodies to the E2 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis using recombinant 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Hepatology* 1996; 23:436-444.
146. Gershwin ME, Mackay IR. Primary biliary cirrhosis: paradigm or paradox of autoimmunity. *Gastroenterology* 1991; 100:822-833.

147. Szostecki C, Guldner HH, Will H. Autoantibodies against "nuclear dots" in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1997; 17:71-78.
148. Courvalin JC, Worman HJ. Nuclear envelope protein autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1997; 17:79-90.
149. Miyachi K, Shibata M, Onozuka Y, et al. Primary biliary cirrhosis sera recognize not only gp210 but also proteins of the p62 complex bearing N-acetylglycosamine residues from rat liver nuclear envelope. *Molec Biol Rep* 1996; 23:227-234.
150. ΓΝ Νταλέκος. Μοριακά ταυτοποιημένα αυτοαντιγόνα-στόχοι στη διάγνωση, διαφοροδιάγνωση και μελέτη της αιτιοπαθογένειας των αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος. *Ιατρική* 1999, 75: 408-418.
151. Chapman RW. Primary sclerosing cholangitis as an autoimmune disease: pros and cons. In: Manns MP, Paumgartner G, Leuschner U (Ed), *Immunology and liver*. 2000, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 279-287.
152. Woodward J, Neuberger J. Autoimmune overlap syndromes. *Hepatology* 2001; 33:994-1002.
153. Hardarson S, La Breque D, Mitros F, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibody in inflammatory bowel and hepatobiliary diseases. *Am J Clin Pathol* 1993; 99:277-281.
154. Manns MP, Obermayer-Straub P. Cytochromes P450 and uridine triphosphate-glucuronosyltransferases: Model autoantigens to study drug-induced, virus-induced, and autoimmune liver disease. *Hepatology* 1997; 26:1054-1066.

155. Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report of the International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993; 18:998-1005.
156. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al. International Autoimmune Hepatitis Group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31:929-938.
157. Λιάσκος Χ, Νταλέκος ΓΝ. Νεότερα επιδημιολογικά και κλινικοεργαστηριακά δεδομένα για τη διάγνωση και τη διαφορική διάγνωση της αυτοάνοσης ηπατίτιδας. *Ιατρική* 2000; 78:233-243.
158. Parker DR, Kingham JGC. Type 1 autoimmune hepatitis is primarily a disease of later life. *Q J Med* 1997; 90:289-296.
159. GN Dalekos, K Zachou, E Makri, et al. Autoimmune hepatitis type-1 (AH-1) in Greece: clinical, laboratory and demographic characteristics. *Hepatogastroenterology* 48 (Suppl 1): P25.
160. Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 1996; 334:897-903.
161. Ruiz-Moreno M, Rua MJ, Carreno V, et al. Autoimmune chronic active hepatitis type 2 manifested during interferon therapy in children. *J Hepatol* 1991; 12:265-266.
162. Todros L, Saracco G, Durazzo M, et al. Efficacy and safety of interferon alpha therapy in chronic hepatitis C with autoantibodies to liver-kidney microsomes. *Hepatology* 1995; 22:1374-1378.
163. Dalekos GN, Wedemeyer H, Obermayer-Straub P, et al. Epitope mapping of cytochrome P450 2D6 autoantigen in patients with chronic hepatitis C under α -interferon treatment. *J Hepatol* 1999; 30:366-375.

164. Garcia-Buey L, Garcia-Monzon C, Rodriguez S et al. Latent autoimmune hepatitis triggered during interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1995; 108:1770-1777.
165. Vergani D. NOSA in HCV infection: markers or markers of disease? *Gut* 1999; 45:328-329.
166. Obermayer-Straub P, Strassburg CP, Manns MP. Autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2000; 32(Suppl 1):181-197.
167. Czaja AJ, Manns MP. The validity and importance of subtypes in autoimmune hepatitis: a point of view. *Am J Gastroenterol* 1995; 90:1206-1211.
168. Desmet V, Gerber MA, Hoofnagle JH, et al. Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994; 19:1513-1520.
169. Al-Khalidi JA, Czaja AJ. Current concepts in the diagnosis, pathogenesis and treatment of autoimmune hepatitis. *Mayo Clin Proc* 2001; 76:1237-1252.
170. Wies I, Brunner S, Henninger J, et al. Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet* 2000; 355:1510-1515.
171. Kanzler S, Weidemann C, Gerken G et al. Clinical significance of autoantibodies to soluble liver antigen in autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31:635-640.
172. Ballot E, Homberg JC, Johanet C. Antibodies to soluble liver antigen: an additional marker in type 1 auto-immune hepatitis. *J Hepatol* 2000; 33:208-215.

173. Obermayer-Straub P, Strassburg CP, Manns MP. Targets proteins in human autoimmunity: cytochromes P450 and UDP-glucuronosyltransferases. *Can J Gastroenterol* 2000; 14:429-439.
174. The Finish-German APECED Consortium. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat Genet* 1997; 17:399-403.
175. Obermayer-Straub P, Manns MP. The autoimmune polygladular syndromes. *Bailliere's Clin Gastroenterol* 1999 ; 12:293-315.
176. Donaldson PT, Doherty DG, Hayllar KM, et al. Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors. *Hepatology* 1991; 13:701-706.
177. Strettell MD, Donaldson PT, Thomson LJ, et al. Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1997; 112:2028-2035.
178. Doherty DG, Donaldson PT, Underhill JA, et al. Allelic sequence variation in the HLA class II genes and proteins in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1994; 19:609-615.
179. Czaja AJ, Strettell MD, Thomson LJ, et al. Associations between alleles of the major histocompatibility complex and type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1997; 25:317-323.
180. Czaja AJ, Kruger M, Santrach PJ, et al. Genetic distinctions between types 1 and 2 autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1997; 92:2197-2200.

181. Bittencourt PL, Goldberg AC, Cancado ELR, et al. Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:1906-1913.
182. Manns MP, Kruger M. Immunogenetics of chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1994; 106:1676-1697.
183. Czaja AJ. Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 30:394-401.
184. Czaja AJ, Nishioka M, Morshed SA, et al. Patterns of nuclear immunofluorescence and reactivities to recombinant nuclear antigens in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1994; 107:200-207.
185. Parveen S, Morshed SA, Arima K, et al. Antibodies to Ro/La, Cenp-B, and snRNPs antigens in autoimmune hepatitis of North America versus Asia: patterns of immunofluorescence, ELISA reactivities and HLA association. *Dig Dis Sci* 1998; 43:1322-1331.
186. Czaja AJ, Morshed SA, Parveen S, et al. Antibodies to single stranded and double stranded-DNA in antinuclear antibody-positive type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1997; 26:567-572.
187. Chen M, Shirai M, Czaja AJ, et al. Characterization of anti-histone antibodies in patients with type 1 autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13:483-489.
188. Czaja AJ, Homburger HA. Autoantibodies in liver disease. *Gastroenterology* 2001; 120:239-249.
189. Czaja AJ, Cassani F, Cataleta M, et al. Frequency and significance of antibodies to actin in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1996; 24:1068-1073.

190. Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C, et al. Autoantibodies and defined autoantigens in autoimmune hepatitis: an overview. *Eur J Intern Med* 2002; 13:293-303.
191. Targan SR, Landers C, Vidrich A, et al. High titer antineutrophil cytoplasmic antibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1995; 108:1159-1166.
192. Roozendaal C, de Jong MA, van den Berg AP, et al. Clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune liver diseases. *J Hepatol* 2000; 32:734-741.
193. Terjung B, Spengler U, Sauerbruch T, et al. 'Atypical pANCA' in IBD and hepatobiliary disorders react with a 50Kd nuclear envelope protein of neutrophils and myeloid cell lines. *Gastroenterology* 2000; 119:310-22.
194. Orth T, Gerken G, Kellner R, Meyer zum Buschenfelde KH, et al. Actin is a target antigen of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune hepatitis type-1. *J Hepatol* 1997; 26(1):37-47.
195. Roozendaal C, Kallenberg CGM. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune liver diseases. *Hepato-gastroenterology* 1999; 46:3034-3040.
196. Lindgren S, Nilsson S, Nassberger L, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with chronic liver diseases: prevalence, antigen specificity and predictive value for diagnosis of autoimmune liver disease. *Swedish Internal Medicine Liver Club. J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15:437-442.

197. Mulder AHL, Horst G, Haagsma EB, et al. Prevalence and characterization of neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune liver diseases. *Hepatology* 1993; 17:411-417.
198. Sobajima J, Ozaki S, Uesugi H, et al. High mobility group (HMG) non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG2 are significant target antigens of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune hepatitis. *Gut* 1999; 44:867-873.
199. Treichel U, McFarlane BM, Seki T, et al. Demographics of anti-asialoglycoprotein receptor autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1994; 107:799-804.
200. Manns MP. Antibodies to soluble liver antigen: specific marker of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2000; 33:326-328.
201. Holberg JH, Abuaf N, Bernard O, et al. Chronic active hepatitis associated with anti-liver/kidney microsome antibody type 1: a second type of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1987; 7:1333-1339.
202. Rizzeto M, Swana G, Doniach D. Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. *Clin Exp Immunol* 1973; 15:331-344.
203. Yamamoto AM, Johanet C, Duclos-Vallee JC, et al. A new approach to cytochrome CYP2D6 antibody detection in autoimmune hepatitis type 2 (AIH-2) and chronic hepatitis C virus (HCV) infection: a sensitive and quantitative radioligand assay. *Clin Exp Immunol* 1997; 108:396-400.
204. Manns MP, Johnson EF, Griffin KJ, et al. The major target antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P450db1. *J Clin Invest* 1989; 83:1066-1072.

205. Gueguen M, Yamamoto AM, Bernard O, et al. Anti-liver kidney microsome antibody type 1 recognize cytochrome P450db1. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159:542-547.
206. Benhamou JP. What should the clinician know about the cytochrome P450 system? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12:415-417.
207. Manns MP, Griffin KJ, Sullivan KF, et al. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450 2D6, a cytochrome P450 monooxygenase. *J Clin Invest* 1991; 88:1370-1378.
208. Yamamoto AM, Cresteil D, Boniface O, et al. Identification and analysis of cytochrome P4502D6 antigenic sites recognized by anti-liver kidney microsome type 1 antibodies (LKM1). *Eur J Immunol* 1993 ; 23 :1105-1111.
209. Kerkar N, Mahmoud A, Muratori L, et al. New viral triggers of autoreactivity to cytochrome P4502D6, the target of liver kidney microsomal autoantibody. *J Hepatol* 1999; 30:58.
210. Ben-Ari, Czaja AJ. Autoimmune hepatitis and its variant syndromes. *Gut* 2001; 49:589-594.
211. Ma Y, Thomas MG, Okamoto M, Bogdanos DP, et al. Key residues of a major cytochrome P4502D6 epitope are located on the surface of the molecule. *J Immunol* 2002; 169:277-285.
212. Kitazawa E, Igarashi T, Kawaguchi N, et al. Differences in anti-LKM-1 autoantibody immunoreactivity to CYP2D6 antigenic sites between hepatitis C virus-negative and positive patients. *J Autoimmun* 2001; 17:243-249.

213. Durazzo M, Philipp T, Van Pelt FNAM, et al. Heterogeneity of microsomal autoantibodies (LKM) in chronic hepatitis C and D virus infection. *Gastroenterology* 1995; 108:455-462.
214. Muratori L, Lenzi M, Ma Y, et al. Heterogeneity of liver/kidney microsomal antibody type 1 in autoimmune hepatitis and hepatitis C virus related liver disease. *Gut* 1995; 37:406-412.
215. Klein R, Zanger UM, Berg T, et al. Overlapping but distinct specificities of anti-liver kidney microsome antibodies in autoimmune hepatitis type II and hepatitis C revealed by recombinant native CYP2D6 and novel peptide epitopes. *Clin Exp Immunol* 1999; 118:290-297.
216. Herzog D, Yamamoto AM, Jara P, et al. Sera of children with hepatitis C infection and anti-liver kidney microsomes 1 antibodies recognize different CYP2D6 epitopes than adults with LKM+/HCV+ sera. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 29:551-555.
217. Czaja AJ. Understanding the pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:1224-1231.
218. Loeper J, Le Berra A, Pompon D. Topology inversion of CYP2D6 in the endoplasmic reticulum is not required for plasma membrane transport. *Mol Pharmacol* 1998; 53:408-414.
219. Loeper J, Louerat-Oriou B, Duport C, et al. Yeast expressed cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) exposed on the external face of plasma membranes is functionally competent. *Mol Pharmacol* 1998; 54:8-13.

220. Muratori L, Parola M, Ripalti A, et al. Liver/kidney microsomal antibody type 1 targets CYP2D6 on hepatocyte plasma membrane. *Gut* 2000; 46:553-561.
221. Vergani D. LKM antibody: getting in some target practice. *Gut* 2000; 46:449-450.
222. Philipp T, Durazzo M, Trautwein C, LKM-3 autoantibodies in chronic hepatitis D recognize the UDP-glucuronosyltransferases. *Lancet* 1994; 344:578-581.
223. Strassburg CP, Obermayer-Straub P, Alex B, et al. Autoantibodies against glucuronosyltransferases differ between viral hepatitis and autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1996; 111:1582-1592.
224. Martini E, Abuaf N, Cavalli F, et al. Antibody to liver cytosol antigen type 1 (anti-LC) in patients with autoimmune hepatitis type 2. *Hepatology* 1988; 8:1662-1666.
225. Abuaf N, Johanet C, Chretien P, et al. Characterization of liver cytosol antigen type 1 reacting with autoantibodies in chronic active hepatitis. *Hepatology* 1992; 16:892-898.
226. Lenzi M, Manotti P, Muratori L, et al. Liver cytosolic 1 antigen-antibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Gut* 1995; 36:749-754.
227. Lapierre P, Hajoui O, Homberg J-C, et al. Forminotransferase cyclodeaminase is organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999; 116:643-649.

228. Muratori L, Cataleta M, Muratori P, et al. Liver/kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2 autoimmune hepatitis. *Gut* 1998; 42:721-726.
229. Clemente MG, Meloni A, Obermayer-Straub P, et al. Two cytochromes P450 are major hepatocellular autoantigens in autoimmune polyglandular syndrome 1. *Gastroenterology* 1998; 114:324-328.
230. Obermayer-Straub P, Perheentupa J, Braun S, et al. Hepatic autoantigens in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *Gastroenterology* 2001; 121:668-677.
231. Gebre-Medhin G, Husebye ES, Gustafson J et al. Cytochrome P450 1A2 and aromatic L-amino acid decarboxylase are hepatic autoantigens in autoimmune polyendocrine syndrome type 1. *FEBS* 1997; 412:439-445.
232. Clemente MG, Obermayer-Straub P, Meloni A, et al. Cytochrome P450 1A2 is a hepatic autoantigen in autoimmune polyglandular syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:1353-1361.
233. Dalekos GN, Obermayer-Straub P, Maeda T, et al. Antibodies against cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) in patients with chronic viral hepatitis (CVH) are mainly linked to hepatitis C virus (HCV) infection. *Digestion* 1998; 59(Suppl 3):36-37.
234. Obermayer-Straub P, Braun S, Loges S, et al. Cytochrome P450 1A2 and P450 2A6 are hepatic autoantigens in the autoimmune polyglandular syndrome type 1 (APS-1). 12th International Symposium

- on Microsomes and Drugs Oxidations, Montpellier, France 1998 (Abstract No 416).
235. Czaja AJ. Frequency and nature of the variant syndromes of autoimmune liver disease. *Hepatology* 1998; 28:360-5.
236. Czaja AJ. Variant forms of autoimmune hepatitis. *Curr Gastroenterol Rep* 1999; 1:63-70.
237. Woodward J, Neuberger J. Autoimmune overlap syndromes. *Hepatology* 2001; 33:994-1002.
238. Lohse AW, Meyer zum Buschenfelde KH, Kanzler FB, et al. Characterization of the overlap syndrome of primary biliary cirrhosis (PBC) and autoimmune hepatitis: evidence for it being a hepatic form of PBC in genetically susceptible individuals. *Hepatology* 1999; 29:1078-84.
239. Chazouilleres O, Wendum D, Serfaty L, et al. Primary biliary cirrhosis-autoimmune hepatitis overlap syndrome: clinical features and response to therapy *Hepatology* 1998; 28:296-301.
240. McNair AN, Moloney M, Portmann BC, et al. Autoimmune hepatitis overlapping primary sclerosing cholangitis in five cases. *Am J Gastroenterol* 1998; 93:777-84.
241. Griga T, Tromm A, Muller KM, et al. Overlap syndrome between autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis in two cases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12:559-64.
242. Czaja AJ, Manns MP, McFarlane IG, et al. Autoimmune hepatitis: the investigational and clinical challenges. *Hepatology* 2000; 31:1194-1200.

ΜΕΡΟΣ Β'

ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C

1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) αποτελεί μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας, παγκοσμίως (1). Σύμφωνα με τα στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), 170 εκατομμύρια άνθρωποι, δηλαδή περίπου 3% του πληθυσμού της υδρογείου, έχουν μολυνθεί από τον HCV, ενώ τα νέα κρούσματα υπολογίζονται σε 3 με 4 εκατομμύρια κάθε χρόνο (1,2). Το πρόβλημα είναι ιδιαίτερα μεγάλο καθώς σημαντικό ποσοστό των μολυνθέντων αναμένεται να αναπτύξει κίρρωση ή/και ηπατοκυτταρικό καρκίνο μετά πάροδο 20-30 ετών από τη μόλυνση. Ο επιπολασμός της λοίμωξης από τον HCV παρουσιάζει ευρεία γεωγραφική κατανομή: στις ΗΠΑ η συχνότητα της ηπατίτιδας C σε αιμοδοτικό πληθυσμό κυμαίνεται στο 0.1-1.8% (3,4), στη Δυτική Ευρώπη φαίνεται ότι το 0.005-1% περίπου του πληθυσμού έχει μολυνθεί (4,5), στη λεκάνη της Μεσογείου το ποσοστό των χρονίως

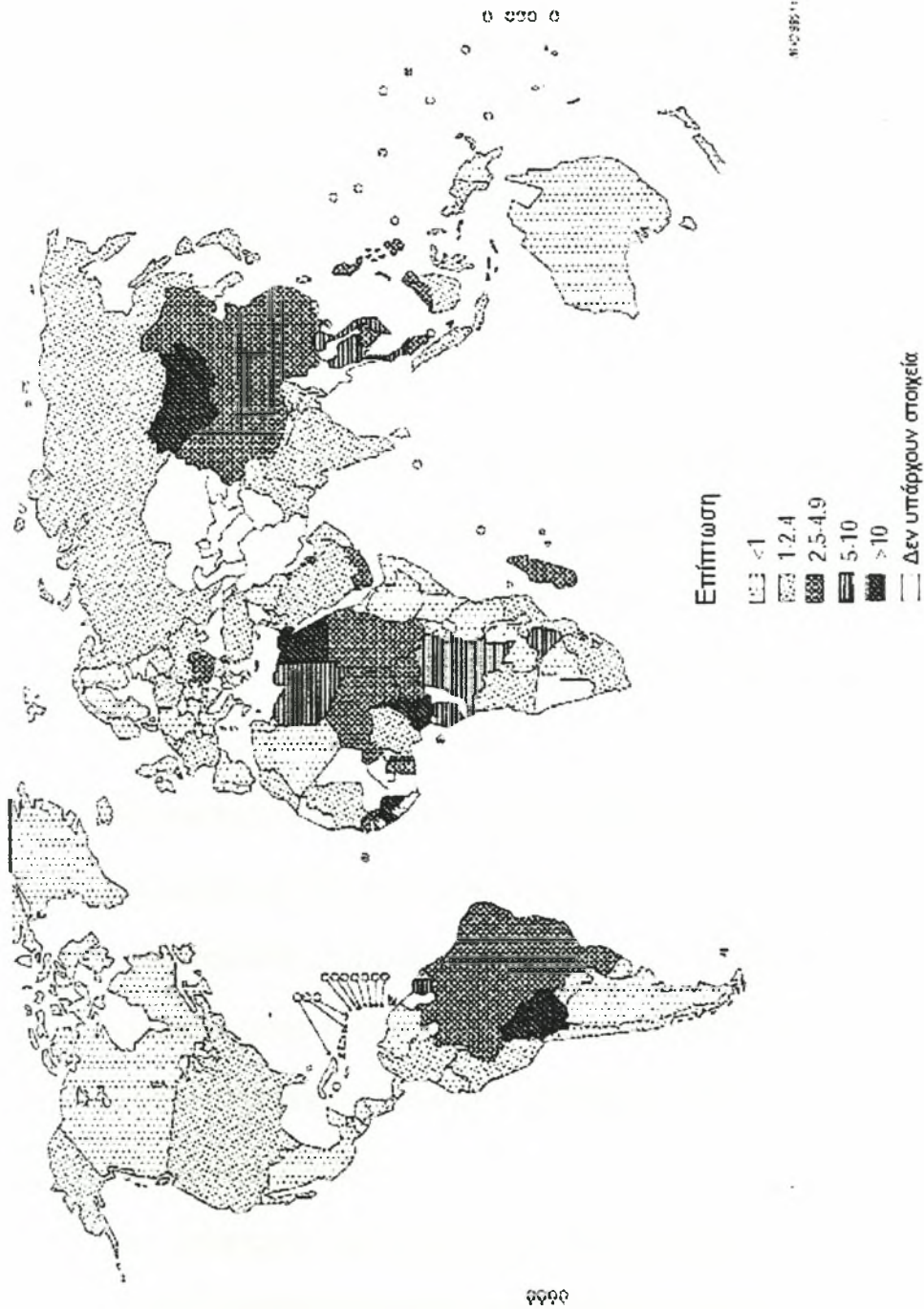
πασχόντων είναι υψηλότερο φτάνοντας στην Αίγυπτο το 13% του πληθυσμού (5,6), ενώ στις χώρες της Ανατολικής Ευρώπης η συχνότητα της λοίμωξης φτάνει περίπου το 5% (7). Στον Πίνακα 1 φαίνεται ο εκτιμώμενος επιπολασμός της ηπατίτιδας C από τον WHO το 1999, ενώ ο χάρτης 1 συνοψίζει τα επιδημιολογικά δεδομένα, που κατατέθηκαν στον WHO 131 χώρες μέχρι τον Ιούνιο 1999.

Πίνακας 1. Εβδομαδιαία επιδημιολογική αναφορά. Νο 49, 10 Δεκεμβρίου 1999, WHO.

WHO Περιοχή	Συνολικός πληθυσμός (εκατομμύρια)	Ηπατίτιδα C Συχνότητα %	Μολυσμένος πληθυσμός (εκατομμύρια)	Αριθμός χωρών της περιοχής, που δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία
Αφρική	602	5.3	31.9	12
Αμερική (Βόρεια+Νότια)	785	1.7	13.1	7
Ανατολική Μεσόγειος	466	4.6	21.3	7
Ευρώπη	858	1.03	8.9	19
Νοτιοανατολική Ασία	1500	2.15	32.3	3
Δυτικός Ειρηνικός	1600	3.9	62.2	11
Σύνολο	5811	3.1	169.7	57

Στην Ελλάδα τα ποσοστά της λοίμωξης στον αιμοδοτικό πληθυσμό κυμαίνονται από 0.14 έως 0.83% (8,9). Στον αιμοδοτικό όμως πληθυσμό, όπως είναι γνωστό, δεν περιλαμβάνονται ομάδες υψηλού κινδύνου για λοίμωξη από τον HCV, όπως αυτές με ιστορικό μεταγγίσεων, τοξικομανίας, οι

Χάρτης 1. Παγκόσμια επίπτωση της ηπατίτιδας C, Ιούνιος 1999



ηλικιωμένοι και επομένως ο επιπολασμός της λοίμωξης αναμένεται να είναι μικρότερος από ότι στο γενικό πληθυσμό. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της διασποράς της λοίμωξης και καθυσχασμό των Υπηρεσιών Υγείας. Σε πρόσφατη μελέτη ο επιπολασμός της λοίμωξης από τον HCV στον γενικό πληθυσμό της χώρας βρέθηκε 1.9% με εύρος 0.6-7.5%, ποσοστό σημαντικά υψηλότερο εκείνου των αιμοδοτών (10), ενώ έχουν βρεθεί και ενδημικές περιοχές [πχ σε μερικά χωριά της Κρήτης ο επιπολασμός ανέρχεται στο 10% (11)].

1.1. Τρόποι μετάδοσης

Η παρεντερική έκθεση στον ιό αποτελεί την κυριότερη οδό μετάδοσής του. Αν και υπάρχουν διαφορές στη συμμετοχή του κάθε τρόπου μετάδοσης στην επιδημιολογία της λοίμωξης από τον HCV μεταξύ των αναπτυγμένων και αναπτυσσόμενων χωρών, οι παρακάτω οδοί θεωρούνται κυρίως υπεύθυνοι για τη μετάδοσή της παγκοσμίως (2):

- Μετάγγιση μη ελεγχμένων μονάδων αίματος και παραγώγων του
- Ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών ουσιών
- Νοσοκομειακή μετάδοση λόγω χρήσης μη επαρκώς αποστειρωμένων εργαλείων κατά τη διενέργεια ιατρικών και οδοντιατρικών χειρισμών και ελλιπών πρακτικών πρόληψης μετάδοσης λοιμωδών νόσων.
- Χρόνια αιμοκάθαρση

Κατ' επέκταση, ως παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη από τον HCV θεωρούνται: η χρήση ενδοφλεβίων ναρκωτικών ουσιών (περιλαμβάνει και τη χρησιμοποίηση μολυσμένων με αίμα εργαλείων κατά τη χρήση κοκαΐνης από τη ρίνα), η χρόνια αιμοκάθαρση, η μετάγγιση παραγώγων αίματος, η

διενέργεια τατουάζ, η συχνή νοσοκομειακή έκθεση και η μεταμόσχευση οργάνων από HCV-θετικούς δότες (4,12). Η σεξουαλική μετάδοση του HCV είναι πολύ σπάνια, ενώ σπάνια είναι και η κάθετη μετάδοση από τη μητέρα στο παιδί (με συχνότητα μετάδοσης κάτω του 6%), οπότε πρακτικά η συμμετοχή των παραγόντων αυτών στη μετάδοση της λοίμωξης από τον HCV είναι πολύ μικρή (13).

Παρακάτω αναπτύσσονται διεξοδικότερα οι τρόποι μετάδοσης της λοίμωξης από τον HCV:

1.1.1. Μετάδοση με την παρεντερική οδό

A) Μετάγγιση αίματος ή παραγώγων του

Οι μεταγγίσεις μη ελεγμένων μονάδων αίματος και παραγώγων του καθώς και η χρήση παραγόντων πήξης, που δεν επεξεργάστηκαν ώστε να απενεργοποιηθούν οι ιοί, είχε σαν αποτέλεσμα τη μετάδοση της HCV λοίμωξης σε μεγάλο αριθμό ατόμων στο παρελθόν. Έτσι η μετά μετάγγιση ηπατίτιδα μη-A, μη-B αποτελούσε τη συχνότερη μετά μετάγγιση ηπατίτιδα στις δεκαετίες του '70 και '80 (14,15). Η συχνότητα της μετά μετάγγιση ηπατίτιδας C σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό και την ποσότητα των παραγώγων αίματος, που μεταγγίστηκαν (4). Κατά συνέπεια μεγάλο ποσοστό πολυμεταγγιζόμενων ατόμων, που έλαβαν μεταγγίσεις πριν το 1990-91 (όταν άρχισε η ευρεία χρήση των ανοσοενζυμικών μεθόδων ανίχνευσης των αντισωμάτων έναντι του HCV τόσο για λόγους διαγνωστικούς όσο και για την επιλογή των αιμοδοτών) εμφανίζει αντισώματα έναντι του HCV. Πράγματι την προηγούμενη δεκαετία φαίνεται ότι μολύνθηκε το 80% των θαλασσαιμικών

ασθενών, το 46-90% των αιμορροφιλικών και το 75% των ασθενών με ιστορικό μεταγγίσεων λόγω κακοήθων αιματολογικών νοσημάτων (4,16,17). Σήμερα, ο συστηματικός έλεγχος των αιμοδοτών με ευαίσθητες και ειδικές ανοσοενζυμικές μεθόδους (ELISA 2^{ης} και 3^{ης} γενεάς, που ανιχνεύουν την ορομετατροπή σε 2-3 εβδομάδες από την έκθεση στον ιό) και η χρήση τεχνικών εξουδετέρωσης των ιών κατά την παρασκευή των παραγώγων αίματος έχει απαλείψει, σχεδόν, τον κίνδυνο της μετάδοσης της νόσου με τις μεταγγίσεις (18). Στις μέρες μας, ο κίνδυνος μετάδοσης της λοίμωξης από τον HCV μετά από μετάγγιση στις ΗΠΑ εκτιμάται ότι είναι 0.004-0.0004% για κάθε μονάδα αίματος, που μεταγγίζεται (2). Παράλληλα, αρχίζουν σε αρκετές χώρες να εφαρμόζονται ακόμα πιο ευαίσθητες τεχνικές ανίχνευσης του ιού στις αιμοδοσίες, όπως η μέθοδος NAT (nucleic acid amplification testing), ώστε να εξαλειφθεί και η σπάνια περίπτωση μη ανίχνευσης των αντι-HCV αντισωμάτων, όταν ο αιμοδότης βρίσκεται στην περίοδο παραθύρου από πολύ πρόσφατη μόλυνση (κάτω των 2-3 εβδομάδων). Δυστυχώς, στις αναπτυσσόμενες χώρες, που δεν εφαρμόζουν αυστηρές πρακτικές ελέγχου του αίματος στις αιμοδοσίες, εξακολουθεί να υφίσταται η μετά μετάγγιση λοίμωξη από τον HCV.

B) Νοσοκομειακή μετάδοση

Η μετάδοση του HCV εντός του νοσοκομείου, είναι καλά τεκμηριωμένη. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, αυτός ο τρόπος μετάδοσης δεν είναι συχνός, με εξαίρεση τους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς: η ομάδα αυτών των ασθενών εμφανίζει θετικά αντι-HCV αντισώματα σε ποσοστό 30-70% (2,19). Στην Ελλάδα, το ποσοστό κυμαίνεται περίπου στο 12-17% (20,21). Το ποσοστό

της λοίμωξης από τον HCV, μεταξύ των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών, είναι πιθανό να είναι ακόμη μεγαλύτερο, καθώς λόγω της ανοσοκαταστολής που εμφανίζουν, υπάρχει η πιθανότητα να μην παράγουν αντι-HCV αντισώματα ή να παράγουν αντισώματα σε χαμηλούς τίτλους, που δεν είναι ανιχνεύσιμα με τις συνήθεις ανοσοενζυμικές μεθόδους. Παρ' όλα αυτά, η πιθανή ύπαρξη ιαιμίας (ανιχνευόμενης με μοριακές τεχνικές) σε αντι-HCV αρνητικούς αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, είναι αμφιλεγόμενη (22,23). Ο υψηλός επιπολασμός της HCV λοίμωξης στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς σχετίζεται με: α) τον αριθμό των μεταγγίσεων (πριν το 1991), β) τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης και γ) τη μετάδοση εντός της μονάδας τεχνητού νεφρού (24).

Η νοσοκομειακή μετάδοση φαίνεται να αποτελεί μια από τις κυριότερες πηγές μόλυνσης από τον HCV σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες, λόγω της πλημμελούς εφαρμογής των κανόνων υγιεινής και πρόληψης της μετάδοσης λοιμώξεων. Η εφαρμογή μη ασφαλών πρακτικών διενέργειας ενέσεων ενέχει σοβαρό κίνδυνο μετάδοσης της λοίμωξης. Στον τρόπο αυτό μετάδοσης υπολογίζεται ότι οφείλονται 2.3 με 4.7 εκατομμύρια νέες λοιμώξεις από τον HCV κατ' έτος (6,25). Τέτοιες πρακτικές αποτελούν: η επαναλαμβανόμενη χρήση βελονών και συριγγών (κανονικά έπρεπε να είναι μιας χρήσης), η μόλυνση των φιαλιδίων πολλαπλών δόσεων, η επιτέλεση ενέσεων εξωνοσοκομειακά, συχνά από άτομα που δεν έχουν σχέση με τις υπηρεσίες παροχής υγείας, η κατάχρηση ενέσιμων φαρμάκων (θα μπορούσαν το ίδιο αποτελεσματικά να χορηγηθούν από το στόμα), η επαναλαμβανόμενη χρήση βελονών κατά την επιτέλεση 'παραδοσιακών' τεχνικών (όπως διενέργεια 'κοφτών' βεντουζών, σκαρφισμού, κλπ). Παρ' όλο, που η νοσοκομειακή

μετάδοση του HCV είναι σπάνια πηγή λοίμωξης στις αναπτυσσόμενες χώρες, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις μετάδοσης του ιού σε νοσηλευόμενους ασθενείς, όπως η περιγραφείσα από Σουηδούς μελετητές μετάδοση του HCV σε 37 ασθενείς με αιματολογικά προβλήματα, που νοσηλεύτηκαν εκ περιτροπής στους ίδιους θαλάμους κατά το διάστημα 1990-93 και αποδόθηκε σε ενδονοσοκομειακή μετάδοση από ασθενή σε ασθενή (26), ή η μετάδοση μετά από ενδοσκόπηση στη Γαλλία, που αποδόθηκε στην πλημμυρή απολύμανση του ενδοσκοπίου (27). Επιπλέον, έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία μεμονωμένα περιστατικά μετάδοσης της λοίμωξης από ιατρό σε ασθενείς (28,29). Παγκοσμίως, οι ασχολούμενοι στο χώρο της υγείας αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου: προοπτικές μελέτες υπολογίζουν ότι μετά από τρύπημα με βελόνα με αίμα από HCV θετικό ασθενή το 2-5% των ατόμων θα αναπτύξει λοίμωξη (30).

Γ) Ενδοφλέβια χρήση τοξικών ουσιών

Μετά το 1991 (χρονολογία ελέγχου των αντι-HCV αντισωμάτων στις φιάλες αίματος), η μετάδοση μέσω της ενδοφλέβιας χρήσης τοξικών ουσιών αποτελεί τη σημαντικότερη οδό μόλυνσης από τον HCV στις αναπτυσσόμενες χώρες. Ο επιπολασμός της λοίμωξης από τον HCV στους χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών, κυμαίνεται στο 31-98% στις διάφορες χώρες (4,31,32). Για τη λοίμωξη στους χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών ευθύνονται, κυρίως, η ανταλλαγή βελονών, η χρήση μη αποστειρωμένων συρίγγων και λιγότερο το τατουάζ ή οι κοινωνικοοικονομικές συνθήκες (31,32). Η μόλυνση με τον ιό επέρχεται χρονικά πολύ νωρίς από την έναρξη της ενδοφλέβιας χρήσης τοξικών ουσιών, με αποτέλεσμα το 20-40% των

χρηστών να έχουν μολυνθεί κατά τον πρώτο χρόνο της χρήσης, ποσοστό, που ανέρχεται στο 92% γι' αυτούς που κάνουν χρήση πάνω από 5 χρόνια (2).

1.1.2. Μετάδοση με μη παρεντερική οδό

A) Σεξουαλική και ενδοοικογενειακή μετάδοση

Ο HCV μπορεί, σπάνια, να μεταδοθεί μεταξύ ερωτικών συντρόφων καθώς και ενδοοικογενειακά. Η συχνότητα της λοίμωξης είναι μεγαλύτερη μεταξύ ατόμων με πολλαπλούς ερωτικούς συντρόφους χωρίς μέτρα προφύλαξης (επαφή στη διάρκεια της εμμηνου ρύσης, βίαιη επαφή, κλπ) ή σε συσχετισμό με σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, ομοφυλόφυλων ανδρών, ερωτικών συντρόφων χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών και κοινών γυναικών (4,13). Αν και ορισμένες μελέτες αναδεικνύουν υψηλότερα ποσοστά λοίμωξης από ότι ο γενικός πληθυσμός σε ερωτικούς συντρόφους ασθενών με χρόνια λοίμωξη από τον HCV (33) οι περισσότερες προοπτικές μελέτες συμφωνούν ότι η ερωτική επαφή δεν αποτελεί παράγοντα κινδύνου μετάδοσης της λοίμωξης από τον HCV (2-5,34). Γενικά, υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι η μετάδοση της ηπατίτιδας C μεταξύ ερωτικών συντρόφων (όταν ιδιαίτερα τηρούνται στοιχειώδεις κανόνες υγιεινής) είναι περιορισμένη, ενώ σε μονογαμικές σχέσεις ο επιδημιολογικός κίνδυνος σεξουαλικής μετάδοσης φαίνεται να είναι πρακτικά μηδενικός (2-5,13,33).

Ενδοοικογενειακή διασπορά του HCV μπορεί να υπάρξει, καθώς η οροθετικότητα για αντι-HCV αντισώματα φαίνεται να είναι 5-10 φορές μεγαλύτερη μεταξύ οικογενειών με ένα αντι-HCV θετικό μέλος, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Πράγματι, η συχνότητα της λοίμωξης από τον HCV κατά την ενδοοικογενειακή (μη σεξουαλική) επαφή κυμαίνεται από 0% ως 11% (4).

Τα παιδιά έχουν μικρότερο κίνδυνο προσβολής από τους συζύγους. Ο πιθανότερος τρόπος ενδοοικογενειακής μετάδοσης της λοίμωξης είναι η αφανής διαδερμική έκθεση στον ιό με την κοινή χρήση μολυσμένων βελονών, αιχμηρών αντικειμένων (πχ ξυραφάκια) ή οδοντοβουρτσών. Το κατά πόσο υπάρχει πραγματικά αυξημένος κίνδυνος διασποράς της λοίμωξης μεταξύ των συζύγων εκ των οποίων ο ένας είναι αντι-HCV θετικός και κατά πόσο η διάρκεια του έγγαμου βίου παίζει κάποιο ρόλο στη μετάδοση, αποτελεί θέμα αντικρουόμενων απόψεων στη βιβλιογραφία (2-5,35,36). Γενικώς όμως, ο κίνδυνος τόσο της σεξουαλικής όσο και της ενδονοσοκομειακής μετάδοσης του HCV είναι σαφώς χαμηλότερος από αυτόν της μετάδοσης του ιού της ηπατίτιδας Β.

B) Περιγεννητική μετάδοση

Ο κίνδυνος μετάδοσης από τη μητέρα στο παιδί υπολογίζεται στο 5% περίπου όταν δεν υπάρχει συνλοίμωξη από τον ιό της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (HIV) (37-39). Σε HIV θετικές μητέρες το ποσοστό μετάδοσης στα νεογνά αυξάνεται σημαντικά (πάνω από 3 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με τις HIV αρνητικές μητέρες) (39-43). Σε HIV αρνητικές μητέρες η μετάδοση του HCV στα νεογνά σχετίζεται με την παρουσία ιαιμίας κατά τον τοκετό. Πράγματι, έχει δειχθεί ότι όσο υψηλότερο είναι το HCV-RNA στον ορό της μητέρας τόσο μεγαλύτερος είναι ο κίνδυνος μετάδοσης της λοίμωξης στο νεογνό, χωρίς όμως να έχει καθοριστεί μέχρι στιγμής ασφαλές, για το νεογνό, επίπεδο του HCV RNA (4,37,42,44). Το είδος του τοκετού δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό μετάδοσης (38,41), αν και μια πρόσφατη μελέτη (37) δείχνει ότι η εκλεκτική καισαρική τομή (πριν τη ρήξη των

μεμβρανών) σχετίζεται με μικρότερο κίνδυνο μετάδοσης. Ανεπαρκή στοιχεία υπάρχουν για τον κίνδυνο κάθετης μετάδοσης κατά την διενέργεια εξωσωματικής γονιμοποίησης σε ασθενείς με ηπατίτιδα C (13). Ο θηλασμός, επίσης, εφόσον η μητέρα είναι HIV αρνητική, δε φαίνεται να αποτελεί παράγοντα κινδύνου, καθώς σχετίζεται πρακτικά με μηδενική πιθανότητα μετάδοσης της λοίμωξης από τη μητέρα στο παιδί (13,37,40).

1.1.3. Σποραδική ή κρυψιγενής μετάδοση

Στις μέρες μας ένα ποσοστό 30-70% των ασθενών με χρόνια ή οξεία ηπατίτιδα C δεν αναφέρει κάποιο γνωστό αιτιολογικό παράγοντα συσχέτισης με μόλυνση από τον HCV. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε άρνηση ή απόκρυψη προσωρινής χρήσης ενδοφλεβίων ναρκωτικών στο παρελθόν ή λοίμωξης από σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα. Επιπλέον, τόσο το άγνωστο φάσμα πιθανής μετάδοσης της λοίμωξης μέσω ιατρικών πρακτικών ρουτίνας (πχ χορήγηση αναισθησίας, αιμοληψίες κλπ), όσο και ο μεγάλος αριθμός υποκλινικών μολύνσεων με μακρά ασυμπτωματική περίοδο (κλασσική πορεία της χρόνιας ηπατίτιδας C), μπορεί να συμβάλλουν στην ύπαρξη του υψηλού ποσοστού κρυψιγενών λοιμώξεων (45).

1.2. Η έκταση του προβλήματος

Στις αναπτυγμένες χώρες, η λοίμωξη από τον HCV αποτελεί την αιτία του 20% των περιπτώσεων οξείας ηπατίτιδας, του 70% των περιπτώσεων χρόνιας ηπατίτιδας, του 40% των περιπτώσεων κίρρωσης τελικού σταδίου, του 60% των περιπτώσεων ηπατοκυτταρικού καρκίνου και του 30% των μεταμοσχεύσεων ήπατος (46). Καθώς ο επιπολασμός της λοίμωξης από τον

HCV είναι σημαντικός στον γενικό πληθυσμό ηλικίας 30-45 ετών σε πολλές χώρες, η σχετιζόμενη με τον HCV νοσηρότητα και θνητότητα αναμένεται να αυξηθεί σημαντικά τις δύο επόμενες δεκαετίες. Πρόσφατοι υπολογισμοί στις ΗΠΑ, τον Καναδά και την Γαλλία προβλέπουν αύξηση κατά 61-92% των περιπτώσεων κίρρωσης, κατά 68-102% των περιπτώσεων ηπατοκυτταρικού καρκίνου, κατά 279% των περιπτώσεων μη αντιρροπούμενης κίρρωσης, κατά 126-223% των θανάτων από ηπατική νόσο και κατά 528% των αναγκών για μεταμόσχευση ήπατος εξ' αιτίας της HCV λοίμωξης ως το έτος 2008, χωρίς αποτελεσματική θεραπευτική παρέμβαση (47-49).

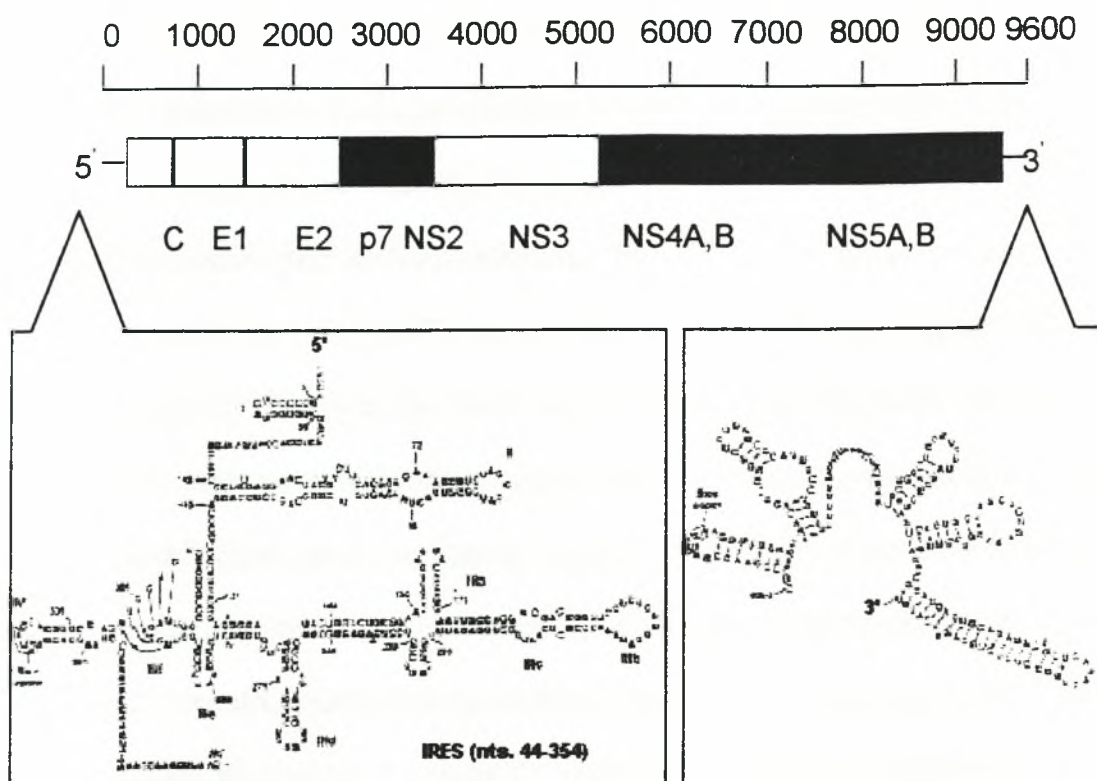
2. Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C (HCV).

2.1. Η δομή του HCV.

Ο HCV αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1975, όταν οι Feinstone et al έδειξαν ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των μετά μετάγγιση ηπατιτίδων δεν οφείλονταν στους γνωστούς μέχρι τότε ιούς της ηπατίτιδας A (HAV) και B (HBV). Το 1989, οι Houghton et al (50) απομόνωσαν και κλωνοποίησαν το γένωμα του HCV και αμέσως μετά αναπτύχθηκαν διαγνωστικές μέθοδοι ανίχνευσης για τη λοίμωξη από τον HCV.

Ο HCV αποτελεί RNA ιό (45nm) της οικογένειας των flaviviridae, στην οποία ανήκουν, επίσης, οι flavi-ιοί (ο ιός του κίτρινου και του δάγγειου πυρετού), οι pesti-ιοί (ιοί που προκαλούν διάρροια στα βοοειδή και χολέρα στους χοίρους) και οι ιοί GB (GBV-A, GBV-B, GBV-C/HGV, οι οποίοι σχετίζονται περισσότερο με τον HCV και προκαλούν λοιμώξεις στους ανθρώπους και τους χιμπατζίδες). Όλοι οι ιοί της οικογένειας αυτής αποτελούνται από RNA μονής αλύσου με θετική κατεύθυνση (51).

Το γονιδίωμα του HCV αποτελείται από 9600 περίπου νουκλεοτίδια (Σχήμα 1) με ένα και μοναδικό ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF), μήκους 9000 νουκλεοτιδίων περίπου (52). Του πλαισίου προηγούνται και έπονται αριθμός σιωπηρών νουκλεοτιδίων, που συνιστούν τις 5' και 3' μη κωδικογραφούσες περιοχές του ιού (μη μεταφραζόμενη περιοχή, untranslated region, UTR), ενώ το ORF κωδικογραφεί μια πολυπρωτεΐνη, που αποτελείται από 3000 περίπου αμινοξέα, η οποία διασπάται, με τη βοήθεια πρωτεασών τόσο του ιού όσο και του ξενιστή, σε 10 τουλάχιστο δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες (Πίνακας 2).



Σχήμα 1. HCV: οργάνωση του γονιδιώματος (από το: The hepatitis C virus, Update on Viral Hepatitis, AASL 1999).

Πίνακας 2. Δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες του HCV και η πιθανή τους λειτουργία (53).

Πρωτεΐνη	Μοριακή μάζα (kDa)	Λειτουργία
C	21	Πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου
E1	31-35	Πρωτεΐνη ιικού φακέλου
E2	68-72	Πρωτεΐνη ιικού φακέλου
P7	7	Άγνωστη
NS2	23	Συστατικό της NS2-3 πρωτεάσης
NS3	70	Συστατικό της NS2-3 πρωτεάσης, πρωτεάσης της σερίνης και της ελικάσης
NS4A	8	Συμπαράγοντας της NS3 πρωτεάσης της σερίνης
NS4B	27	Άγνωστη
NS5A	58	Άγνωστη (πιθανώς να σχετίζεται με την αντίσταση στην ιντερφερόνη)
NS5B	68	RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση

Η **5' UTR περιοχή** του ιικού γονιδιώματος, που αποτελείται από 340 νουκλεοτίδια, χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό συντήρησης της αλληλουχίας των βάσεων του και έχει σημαντική ομολογία αλληλουχίας νουκλεοτιδίων με την αντίστοιχη περιοχή των *pesti-ιών* και του GBV-B. Η 5' UTR παρουσιάζει εκτεταμένη δευτερεύουσα δομή, λόγω του ενδομοριακού ζευγαρώματος νουκλεοτιδίων με αποτέλεσμα το σχηματισμό αγκυλών, που συνιστούν αναγνωριστικά στοιχεία της περιοχής αυτής με ρυθμιστικό ρόλο στην αναγνώριση του πλαισίου ανάγνωσης (54). Συγκεκριμένα, η περιοχή που είναι γνωστή ως εσωτερική περιοχή εισόδου ριβοσωμάτων (*internal ribosome entry site, IRES*), ελέγχει τη μετάφραση (Σχήμα 1), ενώ άλλες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων της 5' UTR χρησιμεύουν ως σήματα πολλαπλασιασμού είτε μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με το άκρο 3' του γονιδιώματος είτε μέσω έμμεσων αλληλεπιδράσεων RNA-πρωτεϊνών. Εξαιτίας αυτών των ιδιοτήτων της, η 5' UTR περιοχή του HCV καθίσταται καλά αναγνωρισμένος στόχος για αντι-ιική θεραπεία κατευθυνόμενη κατά του RNA, με τη χρησιμοποίηση αντικωδόνων ολιγονουκλεοτιδίων κατά του IRES ώστε να εμποδιστεί η μετάφραση του γονιδιώματος (55-57).

Η **περιοχή 3' UTR** του ιικού γονιδιώματος αποτελείται από μια μεταβλητή περιοχή 27 βάσεων, μια πολυπυριμιδική «ουρά» ποικίλου μήκους και στο τέλος ακολουθεί μια καλά συντηρημένη αλληλουχία 98 νουκλεοτιδίων, που θεωρείται απόλυτα αναγκαία για τον πολλαπλασιασμό του ιού. Συγκεκριμένα, οι τρεις σταθερές αγκύλες, που σχηματίζει η συντηρημένη αυτή αλληλουχία της 3' UTR του HCV (Σχήμα 1), παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην αναπαραγωγή του ιού και κυρίως στη σύνθεση του

αρνητικής κατεύθυνσης γονιδιώματος, που αποτελεί τη μήτρα για τη σύνθεση των θετικής κατεύθυνσης γονιδιωμάτων των νέων στελεχών του ιού. Για αυτό το λόγο, η περιοχή αυτή μπορεί να αποτελέσει επίσης στόχο αντι-ϊικής παρέμβασης με 'αντικωδογόνα ολιγονουκλεοτίδια' (58).

Το RNA του HCV συνδέεται με την πρωτεΐνη του πυρηνοκαψιδίου σχηματίζοντας το **νουκλεοκαψίδιο**, το οποίο είναι σφαιρικό, διαμέτρου 30nm περίπου. Το λοιμογόνο ιικό σωματίο αποτελείται από το νουκλεοκαψίδιο και από ένα περίβλημα, που προέρχεται κυρίως από μεμβράνες των κυττάρων του ξενιστή και περιέχει δύο ιικές γλυκοπρωτεΐνες την E1 και την E2 (59,60).

Όλες οι πρωτεΐνες του ιού περιέχονται αρχικά σε μία πρόδρομη πολυπρωτεΐνη. Πεπτιδάσες του ενδοπλασματικού δικτύου του ξενιστή, που είναι γνωστές ως «σηματάσες», αποσπούν από την πολυπρωτεΐνη τις τρεις δομικές πρωτεΐνες του ιού :

- Την **πρωτεΐνη του πυρηνοκαψιδίου**, που είναι μια καλά συντηρημένη, μεταξύ των στελεχών του HCV, πρωτεΐνη με μοριακή μάζα 21kDa. Η πρωτεΐνη αυτή περιέχει στο άκρο της μία υδρόφοβη περιοχή που δρα ως σήμα μεταφοράς στο ενδοπλασματικό δίκτυο και διαμεμβρανικής μεταφοράς του ιικού γονιδιώματος. Καθώς η πρωτεΐνη αυτή απομονώθηκε από τον πυρήνα των κυττάρων του ξενιστή, και η μεταφορά του ιικού RNA στον πυρήνα των κυττάρων αποτελεί πιθανό μηχανισμό μεταμόρφωσής τους σε καρκινικά κύτταρα, θεωρήθηκε ότι η πρωτεΐνη του πυρηνοκαψιδίου αποτελεί σημαντικό παράγοντα ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη από τον HCV (61).

- Τις **πρωτεΐνες E1 και E2**, που είναι N-γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες με μοριακές μάζες 31kDa και 70kDa, αντίστοιχα, παρουσιάζουν μεγάλη γενετική

ετερογένεια μεταξύ των διαφόρων στελεχών του HCV. Το αμινοτελικό άκρο της E2 πρωτεΐνης είναι εξαιρετικά μεταβλητό και χαρακτηρίζεται ως «υπερμεταβλητή περιοχή 1» (hypervariable region 1, HVR1), ενώ στον γονότυπο 1b του ιού ταυτοποιήθηκε και δεύτερη υπερμεταβλητή περιοχή (HVR2), που βρίσκεται αμέσως μετά την HVR1 (53). Η περιοχή HVR1 θεωρείται ότι αποτελεί καθοριστικό στόχο των εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι του HCV (62,63). Επιπλέον, η υπερμεταβλητή αυτή περιοχή αλλάζει ταχέως σε HCV ασθενείς με χρόνια λοίμωξη. Ο ρυθμός δημιουργίας μεταλλαγών αυξάνει σε ασθενείς, που υποβάλλονται σε ανοσοδιέγερση, ενώ οι μεταλλαγές του γονιδιώματος φαίνεται να σχετίζονται με εκλεκτική διαφυγή από προηγούμενη ανοσιακή απάντηση. Επομένως, η περιοχή HVR1 του HCV πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην εμμονή της λοίμωξης και τη μετάπτωσή της σε χρόνια (64).

Επιπρόσθετα, αν και ο μηχανισμός με τον οποίο ο HCV εισέρχεται στα κύτταρα δεν είναι επακριβώς γνωστός, φαίνεται πολύ πιθανό ότι οι πρωτεΐνες E1 και E2 του φακέλου σχετίζονται με τη σύνδεση του ιού με κυτταρικούς υποδοχείς και την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή. Οι Pileri et al (65) έδειξαν ότι το μόριο CD81 αποτελεί πιθανό υποδοχέα του HCV, που συνδέεται με την πρωτεΐνη E2. Σε αντίθεση, όμως, με τα παραπάνω έρχεται μία επίσης πρόσφατη μελέτη των Agnello et al (66), που δείχνει ότι ο HCV, όπως και άλλα μέλη της οικογένειας των flavi-ιών, εισέρχονται στα κύτταρα με ενδοκύτωση μέσω του υποδοχέα των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL).

Το υπόλοιπο της πολυπρωτεΐνης, διασπάται σε έξι ή επτά μη δομικές πρωτεΐνες (Πίνακας 2) (δεν είναι γνωστό αν η p7 είναι δομική ή μη δομική πρωτεΐνη) :

- Η **NS2 πρωτεΐνη** (p23) σε συνεργασία με την NS3, επιφέρει το διαχωρισμό της NS2 από το υπόλοιπο μη δομικό υλικό.

- Η **NS3 πρωτεΐνη** (p70) έχει διπλή ιδιότητα, ενεργώντας ως πρωτεάση σερίνης και ως ελικάση. Η πρώτη ιδιότητά της εντοπίζεται στο αμινικό άκρο της και ευθύνεται για την πρωτεολυτική επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης δρώντας στις NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A και NS5A/NS5B περιοχές. Το καρβοξυλικό άκρο της NS3 πρωτεΐνης περιέχει μία RNA-ελικάση και μία νουκλεοτιδική τριφωσφατάση (NTPase). Η ελικάση ευθύνεται για το ξεδίπλωμα του RNA κατά τον ιικό πολλαπλασιασμό, ενώ η NTPase έχει την ιδιότητα να δεσμεύει RNA. Η τρισδιάστατη μορφή της πρωτεΐνης έχει διαλευκανθεί επαρκώς με κρυσταλλογραφικές μελέτες (67) και αποτελεί καλό στόχο αδρανοποίησης από αναστολείς, οι οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά σαν αναστολείς του ιικού πολλαπλασιασμού (68,69).

- Η **NS4A πρωτεΐνη** ενεργεί ως βοηθητικός συντελεστής της NS3 πρωτεάσης της σερίνης, με την οποία δημιουργεί σταθερό σύμπλοκο και είναι απαραίτητη για τη διάσπαση των περιοχών NS3/NS4A και NS4B/NS5A.

- Οι λειτουργίες των **NS4B και NS5A πρωτεϊνών** είναι προς το παρόν άγνωστες. Μια μικρή περιοχή της NS5A πρωτεΐνης (interferon sensitivity determining region, ISDR) θεωρείται ότι πιθανώς εμπλέκεται στην τροποποίηση της απάντησης του ξενιστή στην ιντερφερόνη (70), αν και το όλο θέμα είναι αμφιλεγόμενο (71). Ειδικότερα, μεταλλαγές στην περιοχή αυτή

φαίνεται να συσχετίζονται με την απάντηση του γονότυπου 1b του HCV στη θεραπεία με α-ιντερφερόνη (α -IFN), καθώς η NS5A πρωτεΐνη χαρακτηρίζεται από την ικανότητα να αναστέλλει τη δράση της επαγόμενης από την ιντερφερόνη πρωτεϊνικής κινάσης PKR και τους επίσης επαγόμενους από την ιντερφερόνη διαβιβαστές Jak-Stat (72-74). Εντούτοις, η απάντηση αυτή φαίνεται ότι δεν επιφέρει παρατεταμένη ιολογική ανταπόκριση αλλά μόνο βιοχημική, όπως έδειξαν πρόσφατα οι Κουρούμαλης και συν (75).

- Η **NS5B πρωτεΐνη**, της οποίας η τριτοταγής δομή έχει πρόσφατα προσδιοριστεί (76), αποτελεί μία RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, που χρησιμεύει για τη σύνθεση νέων RNA αλύσων του ιού. Η σημαντική πιθανότητα σφάλματος της RNA πολυμεράσης (συχνότητα εσφαλμένης ενσωμάτωσης νουκλεοτιδίων 10^{-4} ως 10^{-5} ανά νουκλεοτιδική θέση, ανά κύκλο πολλαπλασιασμού του HCV) ευθύνεται για τη μεγάλη ετερογένεια παρόμοιων ιικών γονιδιωμάτων, που παρουσιάζει ο HCV (77).

2.2. Η γενετική ετερογένεια του HCV.

Η γενετική ετερογένεια του HCV, όπως όλων των RNA ιών, είναι πραγματικά αξιοσημείωτη και πιθανότατα, όπως προειπώθηκε, οφείλεται στην αυξημένη πιθανότητα σφάλματος της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης και στην έλλειψη επιδιορθωτικών μηχανισμών των σφαλμάτων αυτών.

2.2.1. Γονότυποι του HCV

Τα στελέχη του ιού, που έχουν απομονωθεί ως σήμερα παγκοσμίως, ταξινομήθηκαν σε 6 μείζονες γονότυπους και πάνω από 100 υπότυπους (78-80). Με εφαρμογή της μεθόδου της φυλογενετικής ανάλυσης οι γονότυποι,

υπότυποι και στελέχη (isolates) του HCV διακρίνονται με βάση την ποσοστιαία κατά μέσο όρο διαφοροποίηση επί της συνολικής αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων τους κατά περίπου 30%, 20% και 10% αντίστοιχα (78-80).

Ο όρος γονότυπος αναφέρεται στη γενετική ετερογένεια ανάμεσα στα στελέχη του ιού παγκοσμίως και αντανακλά τη συσσώρευση μεταλλαγών κατά την εξέλιξή τους με την πάροδο των ετών. Ο γονότυπος είναι ένα ενδογενές χαρακτηριστικό των μεταδιδόμενων στελεχών του HCV και δεν τροποποιείται κατά τη διάρκεια της φυσικής ιστορίας της λοίμωξης. Έως σήμερα βέβαια δεν είναι γνωστό αν διαφορετικοί γονότυποι μπορούν να ανασυνδυαστούν γενετικά σε έναν συγκεκριμένο ξενιστή. Σύμφωνα με την επικρατούσα ταξινόμηση κατά Simmonds, που στηρίζεται στη μεταβλητότητα του τμήματος 340bp της NS5B περιοχής του γονιδιώματος, οι 6 γονότυποι συμβολίζονται με αραβικούς αριθμούς κατά σειρά ανακαλύψεως (1,2,3 κλπ), ενώ οι υπότυποι με μικρά λατινικά γράμματα, επίσης κατά σειρά ανακαλύψεως (a,b,c κλπ) (51,81). Ο γονότυπος συσχετίζεται με την ανταπόκριση στη θεραπεία (α-IFN ως μονοθεραπεία ή συνδυασμό α-IFN με ριμπαβιρίνη) (82,83). Πράγματι, ασθενείς με λοίμωξη από γονότυπο 1 (κυρίως 1b) ανταποκρίνονται σε σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό στη θεραπεία σε σχέση με ασθενείς με λοίμωξη από γονότυπο 2 ή 3 (82-85), ενώ για τη σημασία του γονότυπου στην φυσική ιστορία της νόσου και την εξέλιξη προς κίρρωση οι απόψεις δίστανται (84-89).

Οι γονότυποι του HCV παρουσιάζουν γεωγραφική κατανομή: οι γονότυποι 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a ευθύνονται για το 90% των λοιμώξεων στην Ευρώπη, Αμερική, Ρωσία, Κίνα, Ιαπωνία και Αυστραλία, ο γονότυπος 4 απαντάται κυρίως στην Κεντρική Αφρική, ο γονότυπος 5a βρίσκεται κυρίως

στην Νότια Αφρική και ο γονότυπος 6 στη Νοτιοανατολική Ασία. Επιπλέον, η κατανομή των γονοτύπων διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ομάδων της ίδιας γεωγραφικής περιοχής. Για παράδειγμα, στις δυτικές χώρες στο μεγαλύτερο ποσοστό των χρηστών ενδοφλεβίων ναρκωτικών με λοίμωξη από τον HCV, στις Δυτικές χώρες, απαντάται ο γονότυπος 3a ή 2 (90).

2.2.2. Σχεδόν είδη ή παρόμοια γονιδιώματα του HCV (quasispecies).

Ο όρος 'σχεδόν είδη' αναφέρεται στην γενετική ετερογένεια του ιού στον ίδιο ασθενή. Ο HCV υπάρχει στους ασθενείς με ηπατίτιδα C όχι σαν ένας ομοιογενής πληθυσμός ομοίων ιικών σωματιδίων, αλλά ως σύνολο γενετικά διακριτών, μεν, λόγω μεταλλαγών, παρομοίων, δε, γονιδιωμάτων (quasispecies), με ομολογία νουκλεοτιδίων 95-99% (91). Η φύση αυτή του HCV του αποδίδει σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης και του επιτρέπει την ταχεία φυσική επιλογή εκείνων των μεταλλαγμένων γονιδιωμάτων, που έχουν την καλύτερη προσαρμογή στις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες (92). Το εύρος της ποικιλίας των παρομοίων γονιδιωμάτων του HCV είναι αποτέλεσμα: α) της συσσώρευσης μεταλλαγών, που εξαρτώνται από την «πιστότητα» της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, η οποία διαφέρει τόσο μεταξύ των στελεχών του ιού όσο και μεταξύ των διαφορετικών ασθενών, β) της κινητικής του ιικού πολλαπλασιασμού (αυξημένος ρυθμός πολλαπλασιασμού σχετίζεται με ταχύτερη συσσώρευση μεταλλαγών), γ) της επιλογής των ανθεκτικών στελεχών, που εξαρτάται από την πίεση επιλογής, η οποία διαφέρει μεταξύ των γονιδιακών περιοχών του ιού (93). Πρέπει να

υπογραμμιστεί ότι η φύση αυτή του HCV, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε όλες τις πτυχές της λοίμωξης όπως:

- τον κυτταρικό τροπισμό
- την εμμένουσα χρόνια λοίμωξη
- τη βαρύτητα και πρόγνωση της χρόνιας ηπατοπάθειας
- την αντίσταση στη θεραπεία με α-IFN ή συνδυασμό α-IFN με ριμπαβιρίνη.

α) Κυτταρικός τροπισμός και διαμερισματοποίηση των 'σχεδών ειδών'.

Ο πολλαπλασιασμός του HCV λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ. Όμως, πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει την παρουσία HCV RNA (αποδεικνύει ενεργό πολλαπλασιασμό του ιού), σε διάφορα εξωηπατικά σημεία (93). Ενδεικτικά αναφέρεται η παρουσία του στα κύτταρα του λεμφικού ιστού, όπως έχουν δείξει πολλές μελέτες είτε σε κυτταροκαλλιέργειες είτε σε πειραματικά μοντέλα (95-100).

Επιπλέον, έχει πρόσφατα δειχθεί, ότι τα παρόμοια γονιδιώματα του HCV, που συναντώνται στο ήπαρ διαφέρουν από αυτά, που ανιχνεύονται στον ορό και στα περιφερικά μονοπύρηνια κύτταρα γεγονός που υποδεικνύει ότι η μόλυνση των κυττάρων του λεμφικού ιστού, πιθανώς, ευνοεί την επιλογή συγκεκριμένων παρομοίων γονιδιωμάτων του ιού (101-104). Επιπλέον, ύπαρξη διαφορετικών, μεταξύ τους, 'σχεδών ειδών' έχει εντοπιστεί σε υποομάδες περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων, όπως στα $CD8^+$ (κυτταροτοξικά) λεμφοκύτταρα, στα μονοκύτταρα και μακροφάγα ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$), αλλά και στα B λεμφοκύτταρα ($CD19^+$), που σχετίζονται με την παραγωγή αντισωμάτων (101). Η πιθανή μόλυνση των κυττάρων αυτών, και

ιδίως των Β λεμφοκυττάρων, που μπορεί να εθίζονται για υπερπαραγωγή αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών του ιού, πολύ πιθανό να αποτελεί έναν από τους κύριους παθογενετικούς μηχανισμούς των εξωηπατικών εκδηλώσεων της λοίμωξης από τον HCV, οι οποίες έχουν, κατά κύριο λόγο, λεμφοϋπερπλαστική (lymphoproliferative) ή/και αυτοάνοση φύση (95,105-108).

β) Εμμένουσα χρόνια λοίμωξη

Μετά την οξεία φάση, ο πολλαπλασιασμός του HCV παραμένει στο 80% περίπου των ασθενών, με τελικό αποτέλεσμα την εξέλιξη σε χρόνια ηπατίτιδα. Η φύση παρομοίων γονιδιωμάτων του HCV φαίνεται να διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο. Η εμμένουσα ιαιμία συσχετίζεται με μεγαλύτερου βαθμού πρώιμη γενετική πολυπλοκότητα σε σύγκριση με την κατάσταση αυτόματης κάθαρσης του ιού (109). Σήμερα, είναι αποδεκτό ότι η εμμένουσα λοίμωξη προκύπτει, τουλάχιστο κατά ένα μέρος, εξαιτίας της συνεχούς παραγωγής νέων μεταλλαγμένων στην HVR1 περιοχή γονιδιωμάτων και της συνεχούς επιλογής εκείνων, που διαφεύγουν την εξουδετέρωση από αδρανοποιητικά αντισώματα (93).

γ) Βαρύτητα και πρόγνωση της χρόνιας λοίμωξης από τον HCV

Αντικρουόμενα αποτελέσματα έχουν ανακοινωθεί σχετικά με την πιθανή συσχέτιση της γενετικής πολυπλοκότητας των παρόμοιων γονιδιωμάτων του HCV και της εξέλιξης της χρόνιας λοίμωξης σε κίρρωση.

Παρ' όλα αυτά, έχει υποστηριχθεί από διάφορους μελετητές, ότι εξάρσεις λοβιακής ηπατίτιδας είναι σημαντικές για την εξέλιξη και παθογένεση

της χρόνιας ηπατίτιδας C (110-113), ενώ η υψηλού βαθμού νεκροφλεγμονώδης δραστηριότητα της νόσου έχει συσχετιστεί με ταχύτερη εξέλιξη προς κίρρωση (114,115). Οι εξάρσεις αυτές της λοβιακής δραστηριότητας, που μοιάζουν με οξεία ηπατίτιδα, και ευνοούν την εξέλιξη της χρόνιας ηπατίτιδας C σε κίρρωση, μπορεί να σχετίζονται με την ανάδυση νέων παρόμοιων γονιδιωμάτων σε ανοσοεπαρκείς ξενιστές (112,113). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από μελέτες σε ασθενείς με μεταμοσχευτική ηπατίτιδα C, όπου η γενετική ετερογένεια του ιού δε σχετιζόταν με βαρύτερη πορεία της νόσου (113,116,117).

δ) Αντίσταση του HCV στην αντι-ιική θεραπεία

Η θεραπεία της χρόνιας λοίμωξης από τον HCV, με α-IFN, φαίνεται να οδηγεί σε μεγάλες 'πιέσεις φυσικής επιλογής' σε διάφορες περιοχές του γενώματος του ιού (93). Η αποτυχία της αντι-ιικής θεραπείας να επιτύχει πλήρη και διαρκή κάθαρση του HCV RNA, σχετίζεται σχεδόν πάντα με σημαντικού βαθμού αλλαγές στη σύσταση των παρόμοιων γονιδιωμάτων του ιού σε διάφορες περιοχές του γενώματος, όπως η HVR1 και η NS5A (118). Επιπλέον, διάφορες ιολογικές παράμετροι, όπως ο γονότυπος του HCV, η γενετική πολυπλοκότητα των παρόμοιων HCV γονιδιωμάτων κατά την έναρξη της θεραπείας με α-IFN, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ιολογική ανταπόκριση και κάθαρση ή μη του ιού (72,119).

3. ΦΥΣΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C.

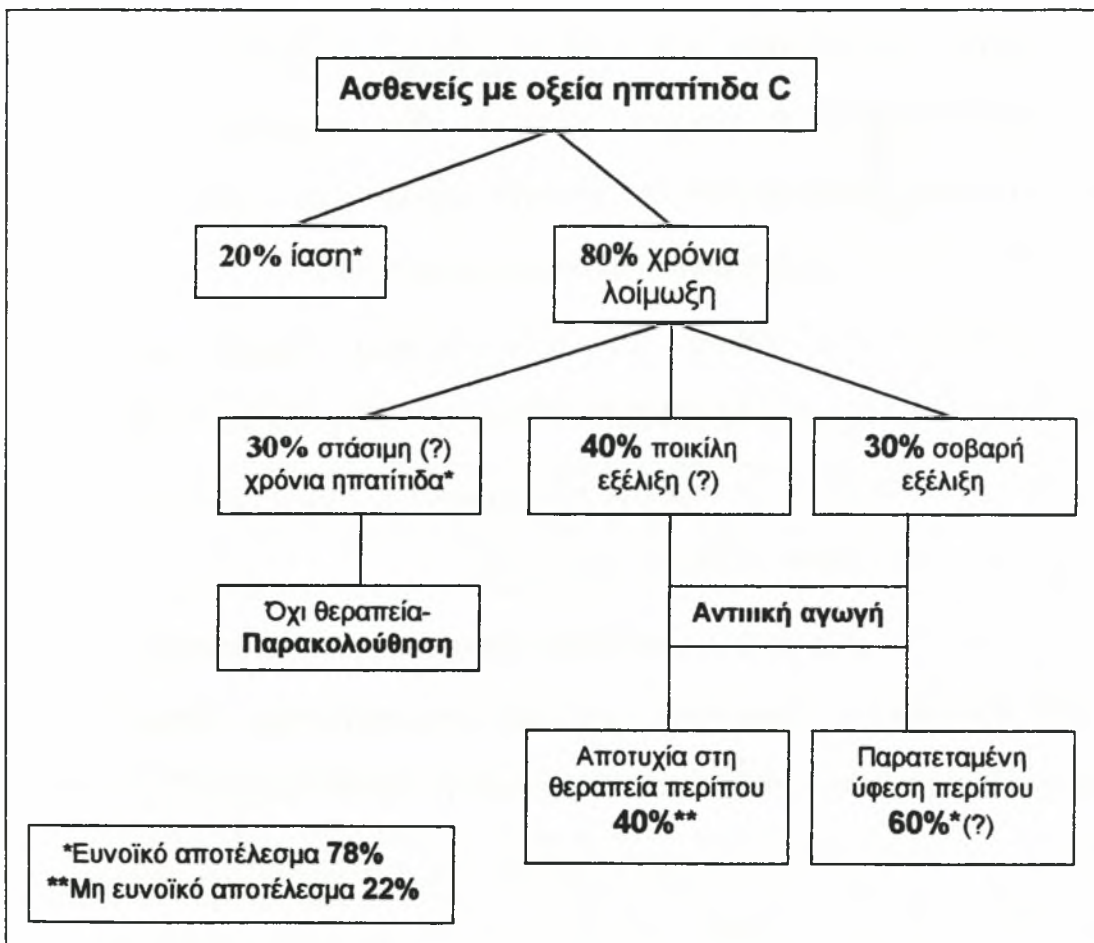
Δεκατρία χρόνια μετά την ανακάλυψη του HCV, η φυσική ιστορία της λοίμωξης παραμένει θέμα διχογνωμιών, με τις απόψεις να κυμαίνονται μεταξύ των δύο άκρων: ότι η χρόνια λοίμωξη από τον HCV είναι μία σαφώς σοβαρή κατάσταση με μεγάλη πιθανότητα μετάπτωσης σε ηπατική νόσο τελικού σταδίου, ως την άποψη ότι η πλειονότητα των HCV ασθενών ακολουθούν καλοήγη πορεία (120).

Η δυσκολία της μελέτης της φυσικής ιστορίας της νόσου έγκειται στην ασυμπτωματική της έναρξη (121), την αργή εξέλιξη της χρόνιας νόσου στο μεγαλύτερο μέρος της διάρκειάς της (121-123) και την ευνόητη δυσκολία επιτέλεσης προοπτικών μελετών με διαδοχικές βιοψίες μεγάλου αριθμού μη θεραπευόμενων ασθενών (113,123,124).

Ο L.B. Seeff (120), κάνοντας πρόσφατα μια ανασκόπηση στις μελέτες, που αφορούν τη φυσική ιστορία της λοίμωξης, κατέληξε στα παρακάτω συμπεράσματα. Ο ρυθμός προόδου και τα ποσοστά μετάπτωσης σε ηπατική νόσο τελικού σταδίου, ποικίλλουν ανάλογα με τον μελετώμενο πληθυσμό (άλλες συμπεριέλαβαν αιμοδοτικό πληθυσμό και άλλες νοσηλευόμενους) καθώς και με το είδος της μελέτης (120,124).

Πάντως, σε γενικές γραμμές, για τη φυσική ιστορία της λοίμωξης από τον HCV, φαίνεται να ισχύουν τα ακόλουθα (Σχήμα 2) (120,121). Ο χρόνος επώασης της οξείας λοίμωξης κυμαίνεται στις 2-26 εβδομάδες (συνήθως 6-12). Στην πλειονότητα των ασθενών (65-75%) η νόσος είναι ασυμπτωματική και ανικτερική. Η μετάπτωση σε οξεία κεραυνοβόλο ηπατίτιδα θεωρείται πολύ σπάνια (<1%). Στο 20% περίπου των ατόμων με οξεία λοίμωξη, η νόσος

αυτοπεριορίζεται και ιάται. Το ποσοστό αυτό είναι πιθανώς μεγαλύτερο (30-50%) σε κάποιες ομάδες πληθυσμού, όπως τα παιδιά και οι νέες γυναίκες (125-127) καθώς και σε περιπτώσεις οξείας ηπατίτιδας C μη σχετιζόμενης με μετάγγιση (228). Στο 80-85% η νόσος θα μεταπέσει σε χρόνια. Από την τελευταία αυτή ομάδα, το 30% θα έχει μάλλον στάσιμη (stable) χρόνια ηπατίτιδα, το 40% θα έχει ποικίλη εξέλιξη, ενώ το υπόλοιπο 30% θα αναπτύξει σοβαρή ηπατοπάθεια. Συνολικά, περίπου το 56% των ασθενών με χρόνια λοίμωξη θα χρειαστεί θεραπεία, από τους οποίους το 60% περίπου θα έχει παρατεταμένη ύφεση (84,85,120).



Σχήμα 2. Φυσική ιστορία της λοίμωξης από τον HCV τροποποιημένο από παραπομπές 84,85,121.

ΧΡΟΝΙΑ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ ΤΟΝ HCV

1. Μηχανισμοί μετάπτωσης σε χρόνια λοίμωξη

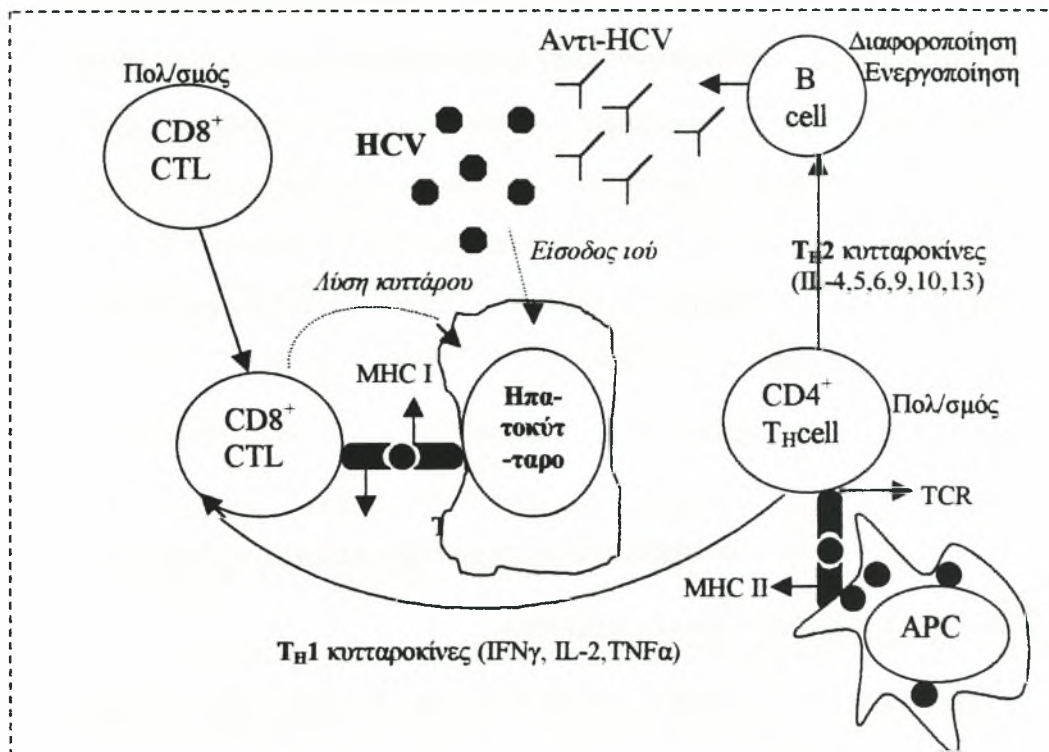
Μετά την οξεία νόσο, όπως προαναφέρθηκε, ο HCV παραμένει στο 80-85% περίπου των ασθενών, παρά τις σαφείς ενδείξεις ενεργοποίησης τόσο της χυμικής όσο και της κυτταρικής ανοσίας (129,130) (Σχήμα 3). Η εξέλιξη της λοίμωξης από τον HCV σε χρόνια, είναι μία πολυπαραγοντική διαδικασία, που εξαρτάται από πολλαπλές αλληλεπιδράσεις ιού-ξενιστή και αποτελεί ενεργό πεδίο έρευνας. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται επιγραμματικά παρακάτω:

- Είναι γενικά αποδεκτό ότι η αποτυχία κάθαρσης του ιού, τουλάχιστο εν μέρει, προκύπτει από τη συνεχή δημιουργία νέων μεταλλαγμένων, στην HVR1 περιοχή, στελεχών και την επιλογή αυτών, που διαφεύγουν την αναγνώριση από τα εξουδετερωτικά αντισώματα (64,93,109).

- Φαίνεται πολύ πιθανό, ότι έναν δεύτερο βασικό μηχανισμό μετάπτωσης της λοίμωξης σε χρονιότητα αποτελεί η δημιουργία και επιλογή στελεχών μεταλλαγμένων σε περιοχές του γενώματος, που αποτελούν στόχο T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων (93,131,132).

- Τέλος, άλλο μηχανισμό χρονιότητας αποτελεί η πολύπλοκη φύση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών του ιού με τις πρωτεΐνες των κυττάρων του ξενιστή. Συγκεκριμένα, όπως προαναφέρθηκε, η NS5A πρωτεΐνη του HCV σχετίζεται με αναστολή της αντι-ιικής δράσης της γ-ιντερφερόνης μέσω της PKR (71), ενώ και η HVR1 περιοχή της E2 πρωτεΐνης βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με την PKR (133). Η χρονιότητα της λοίμωξης μπορεί, επομένως, να σχετίζεται με την επιλογή μεταλλαγμένων στις NS5A και HVR1

περιοχές στελεχών, τα οποία αναστέλλουν αποτελεσματικότερα την αντι-ιική δράση της γ -ιντερφερόνης, που παράγεται φυσιολογικά από τα T_H1 -λεμφοκύτταρα κατά την ανοσολογική απάντηση στην οξεία λοίμωξη (93).



Σχήμα 3. Ειδική ανοσολογική απάντηση στον HCV (Από το: 'Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of hepatitis C' Ann Intern Med 2000; 132 σελ 297). **CD8⁺ CTL:** κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα. **CD4⁺ T_Hcell:** βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα. **B cell:** B λεμφοκύτταρο. **TCR:** υποδοχέας των T-λεμφοκυττάρων. **MHC I, MHC II:** μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I και II. **APC:** αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα.

Ο ιός ενδοκυττάρωνεται από τα APC (δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα κλπ) τα οποία επεξεργάζονται τις ιικές πρωτεΐνες και τις παρουσιάζουν συνδεδεμένες με τα μόρια MHC II. Τα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα σε συνδυασμό με τα MHC II και ελευθερώνουν T_H1 -σχετιζόμενες κυτταροκίνες (IFN γ , TNF α , IL-2), που ρυθμίζουν τη δράση των CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων και T_H2 -σχετιζόμενες κυτταροκίνες (IL-4,5,6,9,10,11), που ρυθμίζουν την παραγωγή αντισωμάτων από τα B λεμφοκύτταρα. Τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα ιικά αντιγόνα της επιφάνειας των μολυσμένων ηπατοκυττάρων, που είναι

συνδεδεμένα με μόρια του MHC I και τελικά είτε λύουν τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα είτε απελευθερώνουν αδρανοποιητικές για τον ιό κυτταροκίνες. Τα Β λεμφοκύτταρα παράγουν αντισώματα εναντίον επιτόπων όλων των πρωτεϊνών του HCV, που είναι σημαντικά για την αδρανοποίηση των ελεύθερων σωματιδίων και όχι αυτών, που έχουν εισέλθει στα ηπατοκύτταρα. Η κάθαρση του ιού, γενικά, συνδέεται με ανίχνευση εξουδετερωτικών αντισωμάτων και υψηλά επίπεδα κυκλοφορούντων HCV-ειδικών Τ-λεμφοκυττάρων, που παράγουν κυρίως T_H1 κυτταροκίνες. Όταν η οξεία λοίμωξη μεταπίπτει σε χρόνια, η Τ-κυτταρική απόκριση είναι συνήθως μη ανιχνεύσιμη στο περιφερικό αίμα και είναι προσανατολισμένη προς παραγωγή T_H2 κυτταροκινών (132,134). Παρόδοξο και αντικείμενο έρευνας αποτελεί το γεγονός ότι τα ειδικά για τον HCV Τ-λεμφοκύτταρα είναι τα κυρίως υπεύθυνα τόσο για την κάθαρση του ιού από τον οργανισμό όσο και για την ηπατική βλάβη κατά την χρόνια λοίμωξη.

2. Διάγνωση και εξέλιξη της χρόνιας λοίμωξης από τον HCV - κίρρωση - ηπατοκυτταρικός καρκίνος.

Σύμφωνα με τις θέσεις ομοφωνίας για την ηπατίτιδα C (EASL 1999, Paris) (13), η διάγνωση της χρόνιας ηπατίτιδας C βασίζεται στην: α) ανίχνευση, με ανοσοενζυμική μέθοδο (EIA) δεύτερης ή τρίτης γενιάς, των αντισωμάτων έναντι του ιού (αντι-HCV), β) επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, προς αποφυγή των ψευδώς θετικών, με την ίδια μέθοδο σε δεύτερο δείγμα και γ) τελικά, ιδίως επί κλινικών ενδείξεων ή σε υψηλού κινδύνου πληθυσμούς, επιβεβαίωση των θετικών αντι-HCV με ποιοτική ανίχνευση του HCV RNA.

Η συχνότερη πορεία της νόσου είναι προϊούσα, συνήθως ασυμπτωματική ή με ελάχιστα μη ειδικά συμπτώματα (με την κόπωση να αποτελεί το συχνότερο σύμπτωμα) και η εξέλιξη είναι συνήθως βραδεία, γεγονός, που οδηγεί τους ασθενείς στο γιατρό όταν ήδη παρουσιάζουν είτε

βαριά ηπατική νόσο είτε κάποια από τις εξωηπατικές εκδηλώσεις (124,135). Κατ' αυτόν τον τρόπο, όπως αναφέρθηκε, το 30% περίπου των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C, παρουσιάζει στάσιμη πορεία, με φυσιολογικές τρανσαμινάσες, ιστολογικά ήπια δραστηριότητα για έτη και εξέλιξη προς κίρρωση είτε ανύπαρκτη είτε πολύ μακροχρόνια (σε 5-10 έτη <2%) (136).

Από τους παράγοντες, που φαίνεται να παίζουν ρόλο στην εξέλιξη της χρόνιας ηπατίτιδας C, η ίνωση, στη βιοψία ήπατος, φαίνεται ότι αποτελεί όχι μόνο μέτρο αλλά και βασικό προγνωστικό παράγοντα εξέλιξης της χρόνιας λοίμωξης (113). Στην κλασική μελέτη της φυσικής ιστορίας της νόσου, των Rougnard et al (137), που περιέλαβε 2235 ασθενείς, ο ρυθμός προόδου της ίνωσης βρέθηκε ότι συσχετίζεται με την διάρκεια της λοίμωξης, αναδεικνύοντας τρεις πληθυσμούς ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C, που ο καθένας αντιπροσωπεύει περίπου το ένα τρίτο του συνόλου: στον πρώτο ανήκουν οι ασθενείς, στους οποίους η ίνωση προχωρά γρήγορα (rapid fibrosers) και μεταπίπτουν σε κίρρωση σε 20 περίπου χρόνια, στο δεύτερο, αυτοί στους οποίους η ίνωση προχωρά με πιο αργό ρυθμό (intermediate fibrosers) και στον τρίτο πληθυσμό ανήκουν αυτοί, που είτε δεν θα αναπτύξουν ποτέ κίρρωση, είτε χρειάζονται πάνω από 50 χρόνια για να μεταπέσουν σε κίρρωση (slow fibrosers). Τα ευρήματα αυτής της μελέτης συμβαδίζουν με τα ευρήματα κι άλλων παρόμοιων μελετών(121,138).

Παράγοντες, που επηρεάζουν την πρόοδο της ινωτικής εξεργασίας κατά τη χρόνια λοίμωξη από τον HCV, αποτελούν:

- Η ηλικία κατά την οποία μολύνθηκε το άτομο με τον HCV: η μόλυνση σε ηλικία μεγαλύτερη των 40 ετών συσχετίζεται με ταχύτερη εξέλιξη προς κίρρωση (137,139-142). Διαφοροποίηση της ανοσολογικής απόκρισης του

οργανισμού με την πάροδο της ηλικίας (121), επαύξηση των μηχανισμών του 'αναδιπλασιαστικού γηρασμού' (replicative senescence) των ηπατοκυττάρων από τον HCV (113,143), ή ακόμη σύμπτωση της μεγάλης ηλικίας με μεγαλύτερη διάρκεια της λοίμωξης (121,124), είναι οι πιθανολογούμενοι μηχανισμοί επίδρασης της ηλικίας στην εξέλιξη της ίνωσης.

- Το ανδρικό φύλο (137,140).
- Η χρόνια κατανάλωση οινοπνεύματος συσχετίζεται, στις διάφορες μελέτες, σίγουρα, με την ταχύτερη εξέλιξη της ίνωσης και την ανάπτυξη κίρρωσης. Εντούτοις, η συσχέτιση είναι ασθενής και οι παθογενετικοί μηχανισμοί δεν είναι επαρκώς διευκρινισμένοι (137,142,144,145).
- Η ανοσοκαταστολή των ασθενών με χρόνια λοίμωξη από τον HCV, συσχετίζεται με ταχύτερη ανάπτυξη κίρρωσης (113). Αυτό δείχθηκε από μελέτες τόσο σε ασθενείς με HIV συν-λοίμωξη (146), όσο και μετά από μεταμόσχευση (147): ο αναμενόμενος μέσος χρόνος της ανάπτυξης HCV-σχετιζόμενης κίρρωσης στο μόσχευμα, είναι περίπου 10 χρόνια.
- Ιολογικοί παράγοντες και κατά κύριο λόγο ο γονότυπος 1b, έχουν συσχετιστεί κατά καιρούς με την εξέλιξη της νόσου και την ταχύτερη μετάπτωση σε κίρρωση, αλλά τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών είναι αντικρουόμενα (116,124). Τα επίπεδα του HCV-RNA τόσο κατά τη μόλυνση όσο και κατά τη διάρκεια της χρόνιας λοίμωξης δε φαίνεται να επηρεάζουν την εξέλιξή της (124).

Επιπλέον, παράγοντας σημαντικός της εξέλιξης της χρόνιας ηπατίτιδας C προς κίρρωση φαίνεται να είναι η νεκροφλεγμονώδης δραστηριότητα: επαναλαμβανόμενα επεισόδια αυξημένης νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας της νόσου (που, όπως προαναφέρθηκε, μπορεί να

συσχετίζονται με την ανάδειξη καινούργιων 'σχεδών ειδών'), πιθανόν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ταχύτερη ανάπτυξη της κίρρωσης (113-115).

Παραταύτα, η ανάπτυξη κίρρωσης δεν είναι άμεσα θανατηφόρο γεγονός. Σε αναδρομική μελέτη των Fattovich et al (148), που περιέλαβε 384 ασθενείς με ΗCV αντιρροπούμενη κίρρωση, η πιθανότητα επιβίωσης ήταν 96% στα τρία χρόνια, 91% στα 5 χρόνια και 79% στα 10 χρόνια, εκτός και αν συνέβαινε ρήξη της αντιρρόπησης, οπότε η 5ετής επιβίωση μειωνόταν στο 50%.

Από μια πρόσφατη, μελέτη των Khan et al (149), που ανέλυσε 455 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (μέση παρακολούθηση 4.7 έτη), ηπατικές επιπλοκές σχετιζόμενες με τη χρόνια λοίμωξη (ηπατική ανεπάρκεια, ηπατοκυτταρικός καρκίνος, μεταμόσχευση ή θάνατος από την ηπατική νόσο) εμφάνισε το 10% των ασθενών. Αυτές, φαίνεται να σχετίζονται κατά κύριο λόγο με την ίνωση, τη λειτουργική σοβαρότητα της ηπατικής νόσου κατά την είσοδο στη μελέτη (όπως αυτή διαφαίνεται από τους εργαστηριακούς δείκτες της ηπατικής λειτουργίας) και τη σποραδική (αφανής) μετάδοση της λοίμωξης, ενώ παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο και ο γονότυπος (1b και 4) συσχετίζονται με μερικές επιπλοκές, χωρίς να αποτελούν όμως ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες της κλινικής έκβασης της χρόνιας ηπατίτιδας C. Η κατανάλωση οινοπνεύματος και οι ορολογικοί δείκτες της ηπατίτιδας B δε φαίνεται να επηρεάζουν την εμφάνιση επιπλοκών, τουλάχιστο σ' αυτή τη μελέτη.

Τέλος, η εξέλιξη της χρόνιας λοίμωξης από τον ΗCV προς ηπατοκυτταρικό καρκίνο, που αποτελεί τη σοβαρότερη επιπλοκή, εξαρτάται άμεσα από την ανάπτυξη κίρρωσης και αναπτύσσεται σε κίρρωτικό ήπαρ με

ετήσια συχνότητα 1.5-3% και πενταετή συχνότητα 3-13% (148-150). Σπάνια, αναγνωρίζεται ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου σε μη κίρρωτικό ήπαρ ασθενών με χρόνια λοίμωξη από τον HCV (151). Πιθανολογείται η κατασταλτική δράση της πρωτεΐνης του πυρηνοκαψιδίου του HCV στην ογκοκατασταλτική δράση του p53 ή/και στην επίδρασή της στη ρύθμιση της απόπτωσης (152,153).

4. ΕΞΩΗΠΑΤΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΗCV.

Παράλληλα με τη συνεχή φλεγμονή και βλάβη του ηπατικού ιστού, η χρόνια ηπατίτιδα C έχει συσχετιστεί, με ευρύ πεδίο εξωηπατικών εκδηλώσεων (Πίνακας 2). Εντούτοις, η μειονότητα μόνο των ασθενών παρουσιάζει κλινικώς σημαντικά ευρήματα εξωηπατικής νόσου (154,155). Γεγονός είναι, ότι κανένας άλλος ηπατοτρόπος ιός δεν φαίνεται να προκαλεί τόσο ποικίλες και σημαντικές αλληλεπιδράσεις με το ανοσολογικό σύστημα (155).

Πίνακας 2. Εξωηπατικές αυτοάνοσες εκδηλώσεις της χρόνιας ηπατίτιδας C (156).

Ισχυρή συσχέτιση	Πιθανή συσχέτιση
Μικτή κρουοσφαιριναιμία Μεμβρανουπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα Οζώδης παναρτηρίτιδα Σύνδρομο Sicca	Αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα Σποραδική όψιμη δερματική πορφυρία Απλαστική αναιμία Αυτοάνοση θρομβοπενία B-κυτταρικό λέμφωμα Αρθρίτιδα Περιφερική νευροπάθεια Σακχαρώδης διαβήτης Ομαλός λειχήνας Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση Έλκος κερατοειδούς Moogen Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο

Σημαντικές προσπάθειες έχουν γίνει ώστε να διευκρινιστεί αν αυτές οι αυτοάνοσες διαταραχές, που σχετίζονται με την χρόνια λοίμωξη από τον ΗCV, είναι διεργασίες κατευθυνόμενες από αντιγόνα του ιού και επομένως άμεσα σχετιζόμενες με τη λοίμωξη (32), ή κατευθυνόμενες από αυτοαντιγόνα

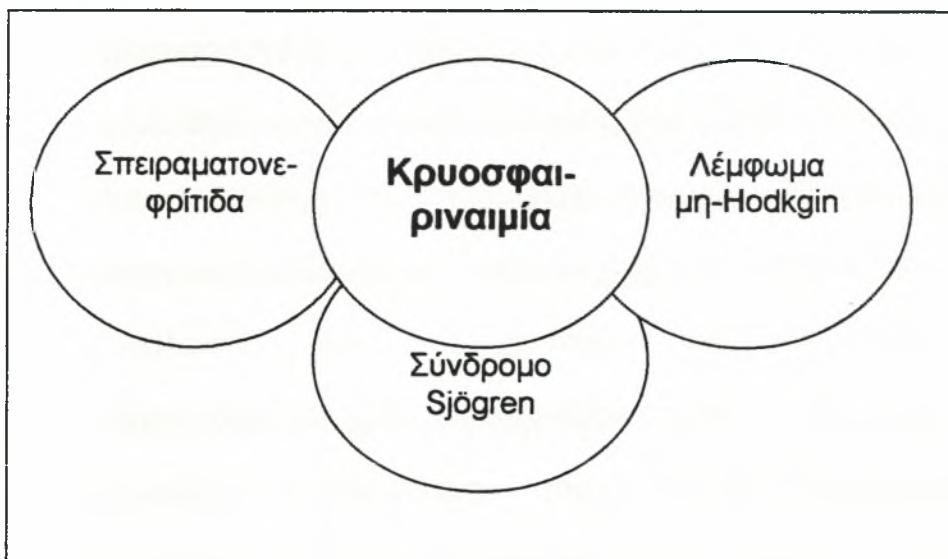
και επομένως αποτελούν αληθείς, μάλλον, αυτοάνοσες διαταραχές, πιθανώς τυχαία συνυπάρχουσες (157,158). Η διάκριση αυτή θα είχε ενδεχομένως και πρακτικό-κλινικό ενδιαφέρον καθώς η θεραπεία θα μπορούσε να κατευθύνεται ανάλογα με την προέχουσα εκδήλωση της νόσου.

Τη βάση της θεραπείας της χρόνιας ηπατίτιδας C, αποτελεί η α -IFN, η οποία είναι μια κυτταροκίνη, που ασκεί την αντι-ιική δράση της, είτε μέσω διαφόρων κυτταρικών ενζυμικών οδών (πχ η πρωτεΐνη Mx, η πρωτεϊνική κινάση PKR κλπ), είτε μέσω ανοσοτροποποιητικών μηχανισμών, που ενισχύουν την χυμική και κυτταρική ανοσολογική απάντηση (93). Πρέπει, κατά συνέπεια, να τονιστεί, ότι οι HCV-θετικοί ασθενείς με προεξάρχουσες αυτοάνοσες εκδηλώσεις χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής, όσον αφορά στην απόφαση έναρξης αντι-ιικής θεραπείας με α -IFN, λόγω πιθανών καταστροφικών συνεπειών από την έξαρση των αυτοάνοσων εκδηλώσεων (158).

Τα ειδικά χαρακτηριστικά του ιού και του ξενιστή, που προδιαθέτουν στην εμφάνιση εξωηπατικών εκδηλώσεων δεν έχουν διαλευκανθεί. Φαίνεται, όμως, ότι οι εξωηπατικές εκδηλώσεις του HCV, δε συσχετίζονται με το γονότυπο του ιού, αλλά πιθανόν με τη γενετική προδιάθεση του ξενιστή (159,160). Η πιο συχνή αλλά και καλύτερα τεκμηριωμένη εξωηπατική εκδήλωση της χρόνιας λοίμωξης από τον HCV είναι η μικτή κρουσφαιριναιμία: φυγοκέντριση ορών και διαχωρισμός ανοσοσυμπλεγμάτων από το υπερκείμενο υγρό, έχει δείξει την παρουσία όχι μόνο HCV RNA στο κρουσίζημα, αλλά και την ύπαρξη διαφορετικών σχεδών ειδών από εκείνα που ήταν ελεύθερα στο υπόλοιπο μέρος του ορού (106,107). Κατά συνέπεια, η μόλυνση των αιμοποιητικών κυττάρων από τον HCV μπορεί να αποτελεί

κοινό παθογενετικό μηχανισμό των εξωηπατικών εκδηλώσεων της λοίμωξης, με διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις, εξαιτίας επίδρασης διαφορετικών ατομικών (του ασθενούς) ή/και περιβαλλοντικών παραγόντων (105). Επιπλέον, η άμεση μόλυνση οργανοειδικών κυτταρικών πληθυσμών από τον HCV, μπορεί να σχετίζεται με μερικές εξωηπατικές εκδηλώσεις, όπως αυτές από το νεφρό και τους σιελογόνους αδένες (108).

Υποομάδες των ασθενών με μικτή κρουσφαιριναιμία αναπτύσσουν νεφρική προσβολή, ήπιο σύνδρομο Sjogren και μη-Hodgkin λέμφωμα. Παρ' όλα αυτά μερικοί ασθενείς αναπτύσσουν τις προαναφερθείσες εκδηλώσεις χωρίς να συνυπάρχει κρουσφαιριναιμία, υποδεικνύοντας μια ατελή αλληλοεπικάλυψη των εξωηπατικών εκδηλώσεων της HCV λοίμωξης (161) (Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Ατελής αλληλοεπικάλυψη των εξωηπατικών εκδηλώσεων της χρόνιας ηπατίτιδας C (Από το: 'Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection' Update of viral hepatitis Postgraduate course AASLD 2000).

4.1. Εξωηπατικές εκδηλώσεις με ισχυρή συσχέτιση με τον HCV

4.1.1. Μικτή κρουσφαιριναιμία (MC)

Όπως προαναφέρθηκε, την πιο καλά τεκμηριωμένη εξωηπατική εκδήλωση της χρόνιας λοίμωξης από τον HCV αποτελεί η μικτή κρουσφαιριναιμία, που προσβάλλει 36-56% των ασθενών (154,162-164).

Η κρουσφαιριναιμία χαρακτηρίζεται από την παρουσία στον ορό κυκλοφορούντων ανοσοσφαιρινών, που καθιζάνουν σε χαμηλές θερμοκρασίες αλλά επαναδιαλύονται με θέρμανση στους 37°C. Σύμφωνα με την ταξινόμηση των Brouet et al (165), η κρουσφαιριναιμία κατατάσσεται σε τρεις τύπους: στον τύπο I, οι κρουσφαιρίνες αποτελούνται από μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες (συνήθως βρίσκονται σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα ή νόσο Waldenstrom), στον τύπο II, οι κρουσφαιρίνες αποτελούνται από ανοσοσυμπλέγματα, που περιέχουν μια μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη (IgM) με δράση ρευματοειδούς παράγοντα κατά πολυκλωνικών IgG ανοσοσφαιρινών και στον τύπο III, οι κρουσφαιρίνες αποτελούν συμπλέγματα πολυκλωνικών IgG ανοσοσφαιρινών με πολυκλωνικούς ρευματοειδείς παράγοντες (συνήθως IgM τάξης). Οι δύο τελευταίοι τύποι μαζί, αποτελούν τη μικτή κρουσφαιριναιμία (mixed cryoglobulinemia, MC), με κοινό χαρακτηριστικό ότι οι κρουσφαιρίνες έχουν δράση ρευματοειδούς παράγοντα. Η μικτή κρουσφαιριναιμία έχει συσχετιστεί με ποικιλία καταστάσεων όπως διάφορες λεμφοϋπερπλαστικές παθήσεις, αυτοάνοσα νοσήματα καθώς και οξείες ή χρόνιες λοιμώξεις (161).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών καταδείχτηκε η σαφής ύπαρξη αιτιοπαθογενετικής σχέσης μεταξύ της λοίμωξης από τον HCV και της MC (164,166-170):

- Ένδειξη υπέρ της σχέσης αυτής αποτελεί, πρώτα απ' όλα, η εύρεση, σε μεγάλη συχνότητα (μέχρι 90%), δεικτών της λοίμωξης σε ασθενείς με MC (167-171), όπως για παράδειγμα η ανίχνευση αλληλουχιών του HCV σε περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα και μονοπύρρηνα του μυελού των οστών, ακόμα και σε απουσία ιαιμίας (172).
- Το HCV-RNA του ιού βρέθηκε ότι αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα του κρουοϊζήματος και απομονώθηκε σε συγκεντρώσεις 10-1000 φορές εκείνων του HCV-RNA του ορού (167).
- Η απάντηση τόσο της χρόνιας ηπατίτιδας C όσο και της MC στη θεραπεία με α -IFN αποτελεί έμμεσο αλλά ισχυρό δείκτη της αιτιοπαθογενετικής τους συσχέτισης (171). Μάλιστα οι παλαιότερα προτεινόμενες θεραπείες της MC με ανοσοκαταστολή, αντικαθίστανται, πλέον, με αντι-ιική θεραπεία (155,157), καθώς η χορήγησή της σχετίζεται με βελτίωση των κλινικών εκδηλώσεων της MC και των επιπέδων του κρουοκρίτη (173).
- Ο HCV είναι, όπως προαναφέρθηκε, ένας λεμφοτρόπος ιός. Παρατεταμένη διέγερση του ανοσολογικού συστήματος από τον ιό φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση κρουοσφαιριναιμίας στους ασθενείς με χρόνια λοίμωξη από τον HCV (155). Το γεγονός αυτό εξηγεί πιθανά γιατί όσο μακρύτερη είναι η διάρκεια της λοίμωξης ή/και μεγαλύτερη η ηλικία του ασθενούς τόσο συχνότερα παρατηρείται η εμφάνιση της κρουοσφαιριναιμίας (160,171,174). Επίσης, η κρουοσφαιριναιμία βρέθηκε ότι σχετίζεται με τον

απλότυπο HLA-B8-DR3 (175), ενώ δε φαίνεται να σχετίζεται, στις περισσότερες μελέτες, με τον γονότυπο του HCV (164,170,174).

Οι κλινικές εκδηλώσεις της μικτής κρουσφαιριναιμίας περιλαμβάνουν την παρουσία αρθραλγιών, ψηλαφητής πορφύρας, αδυναμίας, καταβολής, συστηματικής αγγειίτιδας με ή χωρίς την εμφάνιση σπειραματονεφρίτιδας (161). Η ύπαρξη κρουσφαιριναιμίας σε ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV, σχετίζεται με κλινική συμπτωματολογία σε ποσοστό 10-66% (157,164). Σε γενικές, όμως, γραμμές τα συμπτώματα είναι ήπια και δε φαίνεται να αποτελούν μείζον πρόβλημα στην κλινική πράξη (164). Πιθανόν, οι ιστολογικές βλάβες να προκαλούνται από την εναπόθεση στα αγγεία, ανοσοσυμπλεγμάτων και κρουσφαιρινών, που περιέχουν HCV-RNA, αντι-HCV και ρευματοειδείς παράγοντες εναντίον των αντι-HCV αντισωμάτων (157,161,176). Ο έλεγχος για την πιθανή παρουσία κρουσφαιριναιμίας σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C πρέπει να γίνεται μόνο σ' εκείνους με ύποπτη συμπτωματολογία καθώς ενδεχόμενη θεραπευτική παρέμβαση επηρεάζει θετικά την κλινική εικόνα του ασθενούς (164). Ο έλεγχος για την παρουσία ρευματοειδούς παράγοντα μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά πριν τον έλεγχο για κρουσφαιρίνες σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη από τον HCV (164).

4.1.2. Σπειραματονεφρίτιδα

Η πιο συχνή νεφρική εκδήλωση της χρόνιας λοίμωξης από τον HCV είναι η μεμβρανομβρανοϋπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα (MPGN). Η λοίμωξη από τον HCV φαίνεται να ευθύνεται για το 10-20% των περιπτώσεων MPGN (161,177). Η MPGN στους ασθενείς με ηπατίτιδα C, σχετίζεται συνήθως με την ύπαρξη κρουσφαιριναιμίας, την εναπόθεση κρουοϊζήματος και

ενεργοποίηση του συμπληρώματος, του οποίου τα επίπεδα βρίσκονται χαμηλά στην πλειονότητα των ασθενών (161,156). Οι κύριες κλινικές εκδηλώσεις της MPGN είναι η μικροσκοπική αιματοουρία και η πρωτεϊνουρία. Οι περισσότεροι ασθενείς έχουν ήπια νεφρική ανεπάρκεια, που σε λίγους εξελίσσεται σε τελικού σταδίου νόσο (161,177).

Όταν σχετίζεται με κρουσφαιριναιμία, η MPGN φαίνεται να απαντά στη θεραπεία με α-IFN, με ελάττωση του HCV-RNA του ορού, του επιπέδου των κρουσφαιρινών και βελτίωση της νεφρικής λειτουργίας. Εντούτοις, συνήθως, παρατηρείται υψηλό ποσοστό υποτροπής με τη διακοπή της θεραπείας (157,156,177).

4.1.3. Αγγειίτιδα

Η χρόνια ηπατίτιδα C μπορεί να συσχετίζεται με διάφορους τύπους αγγειίτιδας, όπως αγγειίτιδα αγγείων μικρού μεγέθους (που συναντάται σε ασθενείς με συνυπάρχουσα κρουσφαιριναιμία) ή αγγείων μεγαλύτερου μεγέθους (που βρίσκεται σε ασθενείς με οζώδη πολυαρτηρίτιδα). Αντι-HCV αντισώματα έχουν βρεθεί σε ποσοστό 5-12% των ασθενών με οζώδη πολυαρτηρίτιδα (157). Σε πρόσφατη μελέτη των Cacoub et al (178), η χορήγηση κορτιζόνης σε συνδυασμό με α-IFN είχε πολύ καλά αποτελέσματα στις νευρολογικές εκδηλώσεις ασθενών με HCV-σχετιζόμενη οζώδη πολυαρτηρίτιδα.

4.1.4. Σύνδρομο Sicca

Ήπια μορφή λεμφοκυτταρικής σιελαδενίτιδας και σύνδρομο sicca (με ξηροστομία ή κερατοεπιπεφυκίτιδα) φαίνεται να είναι συχνή στη χρόνια

ηπατίτιδα C (14-57%), αλλά κλινικές εκδηλώσεις και σοβαρές ιστολογικές διαταραχές όμοιες με εκείνες του συνδρόμου Sjögren φαίνεται ότι είναι σπάνιες (157,156,162). Οι Pawlotsky et al (162) έδειξαν ότι οι ιστολογικές αλλοιώσεις είναι, κατά κύριο λόγο, περιτριχοειδικές διηθήσεις με λεμφοκύτταρα, ενώ οι σιελογόνοι πόροι είναι άθικτοι και τα αντισώματα αντι-Ro/SS-A, διαγνωστικά του Sjögren, συνήθως, απουσιάζουν (162,179). Ωστόσο, τόσο παρατηρήσεις σε HCV θετικούς ασθενείς, που εμφάνιζαν τυπική αυτοάνοση σιελαδενίτιδα όμοια με του πρωτοπαθούς συνδρόμου Sjögren (180,181), όσο και πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια, που έφεραν γονίδια του φακέλου του HCV στο γενετικό τους υλικό και εμφάνισαν αδενίτιδα σιελογόνων και δακρυικών αδένων παρόμοια με του συνδρόμου Sjögren (182), υποδεικνύουν πιθανό ρόλο του HCV στην παθογένεση της αυτοάνοσης σιελαδενίτιδας. Πρόσφατα, από μελέτες με *in situ* υβριδισμό και ανοσοϊστοχημία βιοψιών σιελογόνων αδένων HCV θετικών ασθενών με σύνδρομο Sjögren ή σιελαδενίτιδα, δείχθηκε ότι ο HCV μολύνει και πολλαπλασιάζεται στα κύτταρα των σιελογόνων αδένων (183).

Επιπλέον, η αυτοάνοση σιελαδενίτιδα φαίνεται να σχετίζεται, όπως και οι προαναφερθείσες εξωηπατικές εκδηλώσεις, πολύ συχνά με κρυσφαριναιμία στους ασθενείς με ηπατίτιδα C (105,157).

4.2. Άλλες εξωηπατικές εκδηλώσεις με λιγότερο ισχυρή ή αμφισβητήσιμη συσχέτιση με τον HCV

4.2.1. *Non-Hodgkin's* λέμφωμα (NHL)

Η παραγωγή κρυοσφαιρινών, όπως δεικνύεται από τα παραπάνω, οφείλεται σε μονο- ή πολυκλωνική επέκταση/πολλαπλασιασμό των Β-λεμφοκυττάρων και επομένως θεωρείται ως «οριακή» (καλοήθης/κακοήθης) λεμφοϋπερπλαστική διαταραχή (105,156). Η κρυοσφαιριναιμία σχετίζεται με την ανάπτυξη Β-κυτταρικού λεμφώματος σε ποσοστό 5-8% (105,156). Συσχέτιση, όμως, της λοίμωξης από τον HCV με Β-κυτταρικό NHL έχει αναφερθεί και χωρίς συνύπαρξη μικτής κρυοσφαιριναιμίας (108,171,184-187). Η συχνότητα της ηπατίτιδας C μεταξύ των ασθενών με Β-κυτταρικό NHL ποικίλλει από 2% (161,188) ως 40% (161,186), με μεγάλες διαφορές γεωγραφικής κατανομής: στη νότια Ευρώπη οι περισσότερες αναφορές βρίσκουν σημαντική συσχέτιση του HCV με τα Β-NHL, ενώ στη βόρεια το αντίθετο. Παρ' όλα αυτά, υπάρχει μέχρι στιγμής, ομοφωνία στο ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της λοίμωξης με μη-Β-κυτταρικής αρχής λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα (πχ T-NHL, Hodgkin's lymphoma), ενώ η συσχέτιση του HCV με άλλες Β-κυτταρικές λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές (πχ χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, μονοκλωνικές γαμμαπάθειες κλπ) βρίσκεται υπό έρευνα (105).

Μια σταθερή γενετική μεταλλαγή, που βρίσκεται στα οζώδη αλλά και σε μερικά διάχυτα λεμφώματα είναι η μετάθεση t(14;18). Η μεταλλαγή αυτή, φαίνεται να αποτελεί βασικό βήμα της καρκινογένεσης, καθώς οδηγεί σε υπερέκφραση της πρωτεΐνης bcl-2, η οποία εμποδίζει την απόπτωση των

κυττάρων. Αυξημένη έκφραση της bcl-2 πρωτεΐνης (105) και αυξημένη συχνότητα ανίχνευσης της προαναφερθείσας μεταλλαγής (105,189) βρέθηκε σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C με ή χωρίς κρουσφαιριναιμία ή/και λέμφωμα. Η χρόνια διέγερση του ανοσολογικού συστήματος από τον HCV, πολλαπλασιαζόμενη από την μόλυνση των αιμοποιητικών κυττάρων από τον ιό και τη μεγάλη γενετική ποικιλότητα του ιού, πιθανόν να εξηγεί τα τελευταία αυτά ευρήματα και να οδηγεί σε ανάδειξη κλώνου λεμφοκυττάρων προστατευμένου από την απόπτωση, που με τη συσσώρευση κι άλλων μεταλλαγών, μπορεί να εξελιχθεί σε αληθή κακοήθεια (105).

Επιπλέον, έχει ανακοινωθεί, πολύ πρόσφατα ύφεση σπληνικού λεμφώματος από λαχνωτά λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV, που εμφάνισαν ιολογική απάντηση μετά από θεραπεία με α-IFN σε συνδυασμό ή όχι με ριμπαβιρίνη (191). Το αποτέλεσμα δεν σχετιζόταν με την παρουσία ή όχι κρουσφαιριναιμίας (191). Η περίοδος παρακολούθησης στη μελέτη αυτή ήταν περίπου 2 έτη (191). Αν και αυτό αποτελεί έμμεσο δείκτη πιθανής συσχέτισης της λοίμωξης με λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής, οι περισσότεροι ασθενείς, μάλλον, χρειάζονται, σε προχωρημένα στάδια, συστηματική χημειοθεραπεία ή συνδυασμό της με αντι-ιική (161). Από την άλλη μεριά, μια επίσης πολύ πρόσφατη μελέτη (191), εξετάζοντας προοπτικά με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για ανίχνευση HCV RNA, τους ορούς 95 ασθενών με λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα, βρήκε ότι η λοίμωξη από τον HCV δεν είχε προηγηθεί της λεμφοϋπερπλαστικής νόσου. Επομένως, ο ρόλος της ηπατίτιδας C στην αιτιολογία των νεοπλασιών των Β λεμφοκυττάρων και η εμφάνιση των τελευταίων ως εξωηπατικών εκδηλώσεών της φαίνεται να παραμένει υπό αμφισβήτηση.

4.2.2. Δερματολογικές εκδηλώσεις

Εκτός από την ψηλαφητή πορφύρα, που παρατηρείται στα πλαίσια αγγειίτιδας ή/και μικτής κρουσφαιριναιμίας, η λοίμωξη από τον HCV έχει συσχετιστεί με διάφορες δερματολογικές διαταραχές και κυρίως τη σποραδική όψιμη δερματική πορφυρία (*porphyria cutanea tarda*) και τον ομαλό λειχήνα (*lichen planus*).

Η όψιμη δερματική πορφυρία χαρακτηρίζεται από ευθρυπτότητα δέρματος, βλατίδες και φυσσαλίδες, υπέρχρωση και υπερτρίχωση. Το αίτιο είναι η ελάττωση της δραστηριότητας της δεκαρβοξυλάσης του ουροπορφυρινογόνου, που μπορεί να είναι υποκλινική για χρόνια, έως ότου γίνεται κλινικά εμφανής (156). Οι απόψεις διίστανται στο κατά πόσο η λοίμωξη από τον HCV αποτελεί εκλυτικό παράγοντα εμφάνισης των κλινικών εκδηλώσεων της όψιμης δερματικής πορφυρίας. Σε κάποιες μελέτες, ο μεταβολισμός της πορφυρίνης δείχθηκε ότι δεν επηρεάζεται σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C χωρίς όψιμη δερματική πορφυρία (192). Η λοίμωξη από τον HCV φαίνεται, επίσης, να έχει μικρή επίδραση στη δράση της ηπατικής δεκαρβοξυλάσης του ουροπορφυρινογόνου (193) και τα χαρακτηριστικά ευρήματα της πορφυρίας μάλλον βρίσκονται σπάνια σε ασθενείς με ηπατίτιδα C, αν και η πορφυρίνη στα ούρα και το ήπαρ είναι συχνά αυξημένη (194). Επιπλέον, μερικές μελέτες βρίσκουν χαμηλή συχνότητα όψιμης δερματικής πορφυρίας σε ασθενείς με ηπατίτιδα C (3-8%) (163,195). Ωστόσο, πολλές μελέτες έχουν δείξει ισχυρή συσχέτιση της όψιμης δερματικής πορφυρίας με την λοίμωξη από τον HCV, βρίσκοντας υψηλή συχνότητα (50-90%) θετικών αντι-HCV αντισωμάτων ανάμεσα στους ασθενείς με όψιμη δερματική πορφυρία (196-199). Αν και δεν υπάρχουν τυχαίοποιημένες μελέτες για την

αποτελεσματικότητα της α -IFN σε ασθενείς HCV θετικούς με όψιμη δερματική πορφυρία, έχουν ανακοινωθεί δύο περιπτώσεις εξαφάνισης των δερματικών αλλοιώσεων μετά από θεραπεία με α -IFN (200,201).

Ο ομαλός λειχήνας είναι άλλη μια δερματική εκδήλωση, που συνδέθηκε σε μερικές μελέτες από την Ιταλία και την Ιαπωνία με την ηπατίτιδα C, δεν επιβεβαιώθηκε όμως από μελέτες στη χώρα μας (202) και άλλες γεωγραφικές περιοχές, γι' αυτό η συσχέτιση του ομαλού λειχήνα με την λοίμωξη από τον HCV είναι αμφιλεγόμενη (105). Η α -IFN, που χορηγείται για τη θεραπεία της ηπατίτιδας C και όχι η λοίμωξη από τον HCV, μπορεί να σχετίζεται, σπάνια, με την εμφάνιση ομαλού λειχήνα σε μερικούς HCV θετικούς ασθενείς, αλλά κι εδώ φαίνεται ότι κύριο ρόλο παίζει η γενετική προδιάθεση (202).

4.2.3. Αυτοάνοσες νόσοι του θυρεοειδούς

Διαταραχές της θυρεοειδικής λειτουργίας παρατηρούνται στο 5-10% των ασθενών με ηπατίτιδα C, ποσοστό, που δε διαφέρει σημαντικά από το ανευρισκόμενο στον γενικό πληθυσμό (157,203). Τα αποτελέσματα διάφορων μελετών υποδεικνύουν, ότι η αυξημένη συχνότητα θυρεοειδικών διαταραχών, που βρίσκεται στους ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV, περιορίζεται, συνήθως, στην εύρεση υψηλών τίτλων αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων (συχνότητα 3-36%), κυρίως σε γυναίκες ασθενείς (157,161,156). Αντιθυρεοειδικά αντισώματα βρίσκονται με υψηλότερη συχνότητα σε HCV θετικούς ασθενείς σε σχέση με ασθενείς με ηπατίτιδα B ή υγιείς μάρτυρες (204). Υψηλοί τίτλοι αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων πριν από θεραπεία με α -IFN συσχετίζονται σημαντικά με ανάπτυξη διαταραχών της θυρεοειδικής λειτουργίας κατά τη διάρκεια της θεραπείας (157). Επιπλέον, η συχνότητα

ανίχνευσής τους φαίνεται ότι αυξάνει κατά τη διάρκεια της θεραπείας (156,205). Επομένως, από κλινικής σκοπιάς κρίνεται σκόπιμη η εξέταση της θυρεοειδικής λειτουργίας και η ανίχνευση αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων προ και κατά τη διάρκεια της θεραπείας με α -IFN σε HCV θετικούς ασθενείς, ώστε να διαγνωσθεί εγκαίρως η όποια θυρεοειδική δυσλειτουργία προκύψει (156,157). Ο έλεγχος για την πιθανή εμφάνιση των ανωτέρω διαταραχών πρέπει να γίνεται έως και 6 μήνες μετά το τέλος της αγωγής (206).

4.2.4. Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APLS)

Το APLS όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, αποτελεί μια αυτοάνοση διαταραχή, που χαρακτηρίζεται από αρτηριακές ή φλεβικές θρομβώσεις, καθ' έξιν αποβολές, και συχνά μέτρια θρομβοπενία σε συνδυασμό με παρουσία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων (aPL) μεταξύ των οποίων τα αντικαρδιολιπινικά αντισώματα (αντι-CL) και το αντιπηκτικό του λύκου να είναι τα σημαντικότερα (207,208). Από τις διάφορες λοιμώξεις, με τις οποίες έχουν συσχετιστεί τα aPL αντισώματα, κυρίαρχη στη βιβλιογραφία είναι η λοίμωξη από τον HCV.

Η συχνότητα ανίχνευσης των αντι-CL αντισωμάτων στην ηπατίτιδα C κυμαίνεται στη βιβλιογραφία από 3.3% ως 46% (Πίνακας 3), (209). Οι διαφορές αυτές στη συχνότητα μπορεί να οφείλονται στις χρησιμοποιούμενες μεθόδους ανίχνευσης των αντι-CL αντισωμάτων και το σχεδιασμό των μελετών. Συγκεκριμένα, έχει σημασία το αν χρησιμοποιήθηκε εμπορική ELISA ή ανεπτυγμένη μέθοδος σε ερευνητικά εργαστήρια, που όμως να έχει γίνει διεθνώς αποδεκτή για τον προσδιορισμό των αντι-CL αντισωμάτων. Μια πολυκεντρική ανάλυση αξιολόγησης εννέα εμπορικών ELISA για ποσοτικό

προσδιορισμό αντι-CL αντισωμάτων, έδειξε αποκλίσεις 31-60% και 6-50% στον προσδιορισμό των IgG και των IgM αντι-CL αντισωμάτων, αντίστοιχα (210). Οι διαφορές αυτές των αποτελεσμάτων είναι πιο συχνές σε δείγματα με χαμηλό τίτλο αντι-CL αντισωμάτων, όπως εκείνα των ασθενών με λοίμωξη από τον HCV. Οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν στο ότι οι τίτλοι των αντι-CL αντισωμάτων στους ορούς των ασθενών με ηπατίτιδα C είναι χαμηλοί έως μέτριοι και πάντα σημαντικά χαμηλότεροι από αυτούς που βρίσκονται σε ασθενείς με APLS (32,211-215). Επιπλέον, τα αποτελέσματα μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με το αν συνυπολογίζεται ή όχι η μη ειδική δέσμευση των αντισωμάτων στο πλακίδιο της ELISA. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να υπερκεραστεί είτε αφαιρώντας από τις τιμές των δειγμάτων, τις τιμές των κελιών (wells), που δεν έχουν καλυφθεί με το αντιγόνο (καρδιολιπίνη) κατά την εκτέλεση της ELISA και αντιπροσωπεύουν την μη ειδική δέσμευση, είτε υιοθετώντας πιο αυστηρά σημεία 'cut-off' για τη θετικότητα των αντι-CL αντισωμάτων (πχ: η μέση τιμή των υγιών συν 4 ή 5 σταθερές αποκλίσεις, SD) (209).

Όπως φαίνεται από πρόσφατη ανασκόπηση των Dalekos et al (209), οι περισσότερες μελέτες δε βρίσκουν αιτιοπαθογενετική συσχέτιση του APLS με τον HCV, καθώς η ύπαρξη θετικών aPL αντισωμάτων στους HCV θετικούς ασθενείς δε σχετίζεται με κλινικές εκδηλώσεις του APLS ούτε πριν ούτε μετά τη διάγνωση της λοίμωξης (Πίνακας 3) (32,163,211-219). Επιπλέον, στις περισσότερες μελέτες, τα αντι-CL αντισώματα, που ανιχνεύονται σε ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV, είναι 'μη θρομβογενή', δηλαδή ανεξάρτητα από συμπαράγοντες (163,212-216,218,219).

Πίνακας 3. Συχνότητα ανίχνευσης των αντι-CL αντισωμάτων σε ασθενείς με ηπατίτιδα C (209).

Μελέτη	No ασθενών	Αντι-CL (+), %	Εκδηλώσεις APS
Dalekos et al (32)	82	21.9	Απουσίες
Al-Saeed et al (224)	44	27.3	
Matsuda et al (217)	56	12.5	Απουσίες
Prieto et al (220)	100	22	10/22 (45.4%)
Giordano et al (219)	50	12/46 (δύο συχνότητες ανάλογα με την τεχνική)	Απουσίες
Leroy et al (212)	115	20.8/30.4 (δύο συχνότητες προ και μετά θεραπείας με α-IFN)	6/37 (16.2%)
Cacoub et al (215)	46	19.5	Απουσίες
Biron et al (221)	124	33	1/41 (2.4%)
Mangia et al (218)	136	8.1	Απουσίες
Baid et al (225)	18	33.3	5/6 (83.3%)
Dalekos et al (211)	75	37.3	3/28 (12%)
Ordi-Ros et al (222)	243	3.3	Απουσίες
Cacoub et al (163)	298	26.5	3/79 (3.8%)
Sthoeger et al (216)	48	44	Απουσίες
Harada et al (214)	40	40	2/16 (12.5%)
Σύνολο	1475	20.9	30/308 (9.7%)

Εντούτοις, οι Prieto et al (220), βρήκαν ότι η ανίχνευση αντι-CL αντισωμάτων σε 100 ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV, συσχετιζόταν σημαντικά με την εμφάνιση θρομβοπενίας και προηγούμενα θρομβωτικά επεισόδια. Παράλληλα, ανίχνευσαν δείκτες της λοίμωξης στο 16.7% των ασθενών με πρωτοπαθές APLS. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, θα μπορούσαν να εξηγηθούν από το σχεδιασμό της μελέτης καθώς το 25% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε βιοψία ήπατος είχαν κίρρωση, που σχετίζεται συχνά, ανεξάρτητα από την αιτιολογία της, με την παρουσία αντι-CL αντισωμάτων (212,221). Ένα άλλο αδύνατο σημείο της μελέτης ήταν η μέθοδος προσδιορισμού των αντισωμάτων. Πιο αναλυτικά, η μη ειδική δέσμευση συνυπολογίστηκε στις μετρήσεις αυξάνοντας τους τίτλους, ενώ δεν προσδιορίστηκε η εξάρτηση των ανιχνευόμενων αντι-CL αντισωμάτων από

συμπαράγοντες, ώστε να αποδειχθεί αν ανήκουν στα 'αυτοάνοσα' ή 'παθογενετικά' aPL αντισώματα (220). Από την άλλη μεριά η ανεύρεση δεικτών της λοίμωξης από τον HCV σε μερικούς ασθενείς με APLS, μπορεί να σχετίζεται με την αυξημένη πιθανότητα μετάδοσης της λοίμωξης στους ασθενείς αυτούς, λόγω των πολλαπλών εισαγωγών τους στα νοσοκομεία για θεραπεία ή στην εκτέλεση επεμβατικών πράξεων (209). Εξάλλου, πιο πρόσφατη μελέτη των Munoz-Rodriguez et al (222) στην ίδια χώρα, έδειξε αντίθετα αποτελέσματα από αυτή των Prieto et al, βρίσκοντας την ίδια συχνότητα δεικτών λοίμωξης από τον HCV σε 88 ασθενείς με APLS και σε υγιείς μάρτυρες της ίδιας γεωγραφικής περιοχής, ενώ απουσία αιτιοπαθογενετικής συσχέτισης του HCV με το APLS έδειξε και πρόσφατη μελέτη της ομάδας μας (223).

Ο μηχανισμός παραγωγής των αντι-CL αντισωμάτων κατά τη χρόνια ηπατίτιδα C δεν είναι γνωστός, αλλά υπάρχουν διάφορες υποθέσεις. Είναι πιθανό ότι T βοηθητικά λεμφοκύτταρα εναντίον ιικών αντιγόνων, που εκφράζονται στην επιφάνεια των μολυσμένων ηπατοκυττάρων να υποβοηθούν την αυτοδραστικότητα των B λεμφοκυττάρων, οδηγώντας στην χρόνια B λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση. Παρόλα αυτά οι Cacoub et al (163,215) και οι Sthoeger et al (216) έδειξαν ότι η πολυκλωνική B λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση από τον HCV μάλλον δε σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα αντι-CL αντισωμάτων. Άλλος πιθανός μηχανισμός είναι η παραγωγή των αντι-CL αντισωμάτων λόγω της αυξημένης έκφρασης στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων φωσφολιπιδίων, εξαιτίας της HCV-προκαλούμενης ηπατικής βλάβης και ηπατοκυτταρικής απόπτωσης (111,112,215,216,218). Επιπρόσθετα, η μοριακή μίμηση ως προτεινόμενος

μηχανισμός παραγωγής των αντισωμάτων αυτών δε φαίνεται να ευσταθεί καθώς οι Ordi-Ros et al (213) απέτυχαν να βρουν οποιαδήποτε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των αντι-CL αντισωμάτων και πρωτεϊνών του HCV. Τέλος, πρόσφατα οι Cacoub et al (163) και οι Al-Saeed et al (224) έδειξαν ότι η συχνότητα ανίχνευσης των αντι-CL αντισωμάτων ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε ασθενείς με συνλοίμωξη από τον HIV και τον HCV παρά στους ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV, υποδεικνύοντας ότι ο HIV σχετίζεται περισσότερο με την παραγωγή των αντισωμάτων αυτών παρά ο HCV.

4.3. Παθήσεις, σπανιότερα αναφερόμενες στη βιβλιογραφία ως εξωηπατικές εκδηλώσεις του HCV

Ο κατάλογος των παθήσεων, που έχουν αναφερθεί ότι σχετίζονται με την ηπατίτιδα C, είναι μακρύς, και βρίσκεται συνεχώς υπό αναθεώρηση και διερεύνηση (204). Οι περισσότερες από τις υπόλοιπες παθήσεις του Πίνακα 2, έχουν συσχετιστεί με τον HCV σε μικρές μελέτες, πολλές από τις οποίες θεωρούνται μη καλά σχεδιασμένες.

Ο σακχαρώδης διαβήτης και η διαταραγμένη ανοχή της γλυκόζης έχουν συσχετιστεί με την λοίμωξη από τον HCV (226-228). Φαίνεται όμως, ότι η HCV-σχετιζόμενη κίρρωση παρά ο HCV ευθύνεται για την παθολογική σακχαραιμική καμπύλη, καθώς είναι γνωστό ότι το 70% των ασθενών με κίρρωση παρουσιάζουν αυτή τη διαταραχή (161,229).

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση σε άλλες μελέτες σχετίζεται με τον HCV (230) και σε άλλες όχι (231). Το γεγονός, πάντως, ότι η MC μπορεί να επιπλέκεται με διάμεση πνευμονοπάθεια, υποδεικνύει ότι, σε μερικές

τουλάχιστον περιπτώσεις, μπορεί να υπάρχει έμμεση συσχέτιση, που πιθανώς οφείλεται στην HCV-σχετιζόμενη MC (105,232).

Τέλος, ενώ οι αρθραλγίες και μυαλγίες βρίσκονται στο 9-60% των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C (233-235), αρθρίτιδα ανευρίσκεται σπάνια (179,233). Επιπλέον, η κλινική εικόνα της αρθρίτιδας στους HCV θετικούς ασθενείς φαίνεται ότι είναι ποικίλη (179,236). Εξαίρεση αποτελεί η σχετιζόμενη με MC αρθρίτιδα που είναι σαφώς ορισμένη, αποτελώντας μια διαλείπουσα, μη διαβρωτική μονο- ή ολιγοαρθρίτιδα των μεγάλων ή μέσου μεγέθους αρθρώσεων (179).

5. ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ ΤΟΝ ΗCV.

Εκτός από τις προαναφερθείσες εξηπατικές εκδηλώσεις, η χρόνια ηπατίτιδα C έχει συσχετιστεί και με την ανίχνευση πληθώρας οργανοειδικών και μη οργανοειδικών αυτοαντισωμάτων, συνήθως σε χαμηλούς τίτλους (156,237,238).

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η ανεύρεση διαφόρων αυτοαντισωμάτων είναι συχνή στους ορούς ασθενών με ηπατίτιδα C. Πράγματι, η παρουσία ενός τουλάχιστον αυτοαντισώματος ανιχνεύεται στο 20% έως 90% των ασθενών (Πίνακας 4) (32,239-250). Το μεγάλο εύρος των συχνοτήτων ανεύρεσης αυτοαντισωμάτων στη βιβλιογραφία, μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στους μελετώμενους πληθυσμούς, γεωγραφικές αλλά και ηλικιακές (ενήλικες ή παιδιατρικοί ασθενείς). Επίσης, μπορεί να οφείλεται και σε διαφορές στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται ή και στα οριζόμενα σε κάθε μελέτη κατώτερα όρια θετικού αποτελέσματος (cut off), ιδίως όταν πρόκειται για χαμηλούς τίτλους (209,239,251).

Παρόμοια με την AH-1, αυτοαντισώματα, όπως τα ANA, SMA, ANCA, αντι-ASGP-R, έχουν ανιχνευθεί και στα πλαίσια χρόνιας λοίμωξης από τον ΗCV, σε τίτλους και συχνότητες χαμηλότερες από την AH-1 (156,163,240,252-254). Η συχνότητα ανίχνευσης των ANA σε ΗCV θετικούς ασθενείς, κυμαίνεται από 3% έως 89% (32,159,163,239-250,254-258) και των SMA από 4% έως 75% (159,163, 239-250, 255-258), στις περισσότερες όμως μελέτες η συχνότητα ανίχνευσης των ANA και των SMA βρίσκεται στο 10%-40% (Πίνακας 4). Οι διαφορές της ανευρισκόμενης συχνότητας, εν μέρει

Πίνακας 4. Συχνότητα ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς με χρόνια HCV λοίμωξη.

Μελέτη	No α-σθε-νών	% θετικότητα								
		ANA	SMA	AMA	ANCA	Anti-LKM	Anti-CL	Anti-DNA	PCA	% (+) για τουλάχιστο 1 Ab
Abuaf et al (246)	217	5.5%	14.7%	ΔΥ	ΔΥ	5.1%	ΔΥ	ΔΥ	ΔΥ	46%
Fried et al (241)	62	21%	55%	ΔΥ	ΔΥ	0%	ΔΥ	ΔΥ	ΔΥ	ΔΥ
Czaja et al (243)	29	23% (7/31)	26%	ΔΥ	ΔΥ	3%	ΔΥ	ΔΥ	ΔΥ	ΔΥ
Reddy et al (244)	204	10%	19%	ΔΥ	ΔΥ	0%	ΔΥ	ΔΥ	ΔΥ	ΔΥ
Dalekos et al (32)	28	89%	ΔΥ	ΔΥ	ΔΥ	ΔΥ	28%	28%	ΔΥ	92.8%
Clifford et al (240)	117	14% (13/92)	66% (43/65)	2% (1/48)	ΔΥ	2.4% (1/41)	ΔΥ	ΔΥ	ΔΥ	ΔΥ
Bortolotti et al (250)	40	7.5%	17.5%	ΔΥ	ΔΥ	10%	ΔΥ	ΔΥ	ΔΥ	33%
Cassani et al (245)	290	9%	20%	ΔΥ	ΔΥ	6%	ΔΥ	ΔΥ	ΔΥ	30%
Bayraktar et al (242)	91	4%	65%	ΔΥ	ΔΥ	0%	ΔΥ	ΔΥ	ΔΥ	ΔΥ
Sachithanandan et al (257)	98	8%	ΔΥ	ΔΥ	ΔΥ	0%	ΔΥ	ΔΥ	5%	ΔΥ
Gregorio et al (249)	51	6%	51%	ΔΥ	ΔΥ	8%	ΔΥ	ΔΥ	29%	65%
Valentini et al (256)	55	22%	74.5%	3%	ΔΥ	0%	ΔΥ	9%	7%	94%
Lenzi et al (239)	226	16%	10%	0.6%	ΔΥ	1.3%	ΔΥ	0%	ΔΥ	24%
Cacoub et al (163)	321	41% (123/302)	9% (27/288)	<1% (1/288)	3% (9/278)	4% (11/302)	27% (79/278)	3% (8/299)	ΔΥ	70%
Betterle et al (255)	70	2.8%	3.7%	0%	ΔΥ	0%	ΔΥ	ΔΥ	7%	ΔΥ
Dalekos et al (258)	39	5.1%	17.9%	ΔΥ	ΔΥ	10.3%	ΔΥ	ΔΥ	2.5%	ΔΥ
Wu et al (254)	516	15.8%	ΔΥ	ΔΥ	55.6%	ΔΥ	5%	8.5%	ΔΥ	ΔΥ

ΔΥ: δεν υπάρχουν στοιχεία

τουλάχιστο, οφείλονται, όπως προαναφέρθηκε, στις διαφορετικές αραιώσεις, που χρησιμοποιούν οι μελέτες για να ορίσουν το θετικό δείγμα. Έτσι, οι Gregorio et al (249) ερευνώντας τη συχνότητα ανίχνευσης NOSA σε μια σειρά νοσοκομειακών παιδιατρικών ασθενών με χρόνια λοίμωξη από τον HCV, βρήκαν ότι η συχνότητα των αυτοαντισωμάτων υπερδιπλασιάζονταν (από 27% σε 65%) αν τα δείγματα εξετάζονταν σε αρχική αραιώση 1:10 αντι για 1:20. Επιπλέον, τα ANA που ανιχνεύονται στην ηπατίτιδα C σε αντίθεση με εκείνα που παρατηρούνται στην AH-1, δίνουν, συνήθως, στικτό φθορισμό με EAΦ και πολύ πιο σπάνια ομοιογενή, ενώ τα SMA δίνουν, ως επί το πλείστον, τύπους φθορισμού διαφορετικούς από τα SMA έναντι F-ακτίνης (χαρακτηριστικά της AH-1), καθώς φαίνεται ότι κατευθύνονται εναντίον άλλων πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού (239,245,250). Τα ANCA ανιχνεύονται σε ποσοστό 3% έως 55% των ασθενών (163,254,259, Πίνακας 4) και σύμφωνα με τους Wu et al (254), σε μελέτη μιας σειράς 516 ασθενών με HCV λοίμωξη, ο συχνότερα ευρισκόμενος τύπος φθορισμού ήταν ο κυτταροπλασματικός (cANCA). Επιπρόσθετα, οι Ohira et al (253), βρήκαν αυξημένη συχνότητα ANCA στους ANA θετικούς ασθενείς σε σχέση με τους ANA αρνητικούς με χρόνια λοίμωξη από τον HCV.

Ειδικά για τα ANA και SMA, οι τίτλοι ανίχνευσής τους έχουν προταθεί σαν δείκτες διαφοροποίησης της κυρίως-αυτοάνοσης από την κυρίως-ιογενή νόσο σε ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV και ευρήματα αυτοανοσίας (157,260,261). Η διάκριση μεταξύ των δύο αυτών καταστάσεων θεωρείται σημαντική, γιατί η θεραπεία με α-IFN σε μικρό ποσοστό ασθενών με κυρίως-αυτοάνοση νόσο μπορεί να προκαλέσει σοβαρή επιδείνωση (262-265), ενώ η

θεραπεία με κορτικοστεροειδή της κυρίως-ιογενούς νόσου μπορεί να αυξήσει το ιικό φορτίο (266,267).

Κατά συνέπεια, οι ασθενείς με ηπατίτιδα C και ANA ή/και SMA θετικά, μετά την επιβεβαίωση της λοίμωξης με ανίχνευση του HCV-RNA [μιας και σε ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και υπεργαμμασφαιριναιμία, η εύρεση θετικών αντι-HCV αντισωμάτων αποδεικνύεται πολλές φορές ψευδώς θετική αντίδραση (162,246,268)], μπορούν να διακριθούν σε αυτούς με 'χρόνια ηπατίτιδα C με αυτοάνοσα ευρήματα' και σε εκείνους με 'επικάλυψη αυτοάνοσης και χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας' (261). Οι πρώτοι έχουν συνήθως χαμηλούς τίτλους αυτοαντισωμάτων (<1:320), δεν έχουν ιστορικό αυτοανόσων εκδηλώσεων και είναι, πιο ξεκάθαρα, υποψήφιοι για θεραπεία με α-IFN (157,240). Οι δεύτεροι αποτελούν σπανίως απαντώμενη ομάδα, έχουν υψηλούς τίτλους αυτοαντισωμάτων (>1:320) και υπεργαμμασφαιριναιμία, είναι συνήθως HLA DR3 ή HLA DR4 θετικοί (157,261,262), η ηπατική ιστολογία δείχνει περιπυλαία ηπατίτιδα (157,261) και είναι, πιθανώς, υποψήφιοι για θεραπεία με κορτικοστεροειδή, στα οποία μπορεί να απαντήσουν (269-271).

Τα αντι-LKM αυτοαντισώματα ανιχνεύονται σε ποσοστό 0% έως 10% των ασθενών με χρόνια λοίμωξη από τον HCV, αναλόγως της γεωγραφικής θέσης, (Πίνακας 4) (163,239-246,249,250,256-258,272). Τα αντισώματα αυτά δίνουν τον ίδιο τύπο φθορισμού με την τεχνική του ΕΑΦ, με τα αντι-LKM 1, που βρίσκονται στην ΑΗ-2 (239,240,273). Και στις δύο νοσολογικές οντότητες το κύριο αυτοαντιγόνο στόχο των αντι-LKM 1 αποτελεί το KYTP450 2D6. Περαιτέρω χαρακτηρισμός των αντι-LKM 1 αντισωμάτων με ανταγωνιστικές ELISA και μεθόδους ανοσοαποτύπωσης ανέδειξε διαφορές μεταξύ αυτών, που ανιχνεύονται στην λοίμωξη από τον HCV και των αντι-

LKM 1 αντισωμάτων, που ανιχνεύονται στην AH-2. Έτσι, η συχνότητα ανίχνευσης των αντι-KYTP450 2D6 σε HCV/αντι-LKM θετικούς ορούς ήταν διαφορετική από τη συχνότητα του αυτοαντισώματος αυτού στην AH-2 (274-278). Οι διαφορές αυτές αποδόθηκαν σε διαφορές στη δομή των επιτόπων του αυτοαντιγόνου KYTP450 2D6: στην χρόνια λοίμωξη από τον HCV τα αντι-LKM αυτοαντισώματα στρέφονται κυρίως κατά 'μη επίπεδων' (conformational) επιτόπων του KYTP450 2D6, ενώ αυτοαντισώματα κατά μικρών, επίπεδων επιτόπων του KYTP450 2D6 ανευρίσκονται πιο συχνά στην AH-2 (275-277). Η αυτοάνοση αντίδραση των HCV θετικών ορών είναι πιο ετερογενής, ενώ όλοι οι γνωστοί επίπεδοι επίτοποι αναγνωρίζονται από λιγότερους από 25% των ορών ασθενών με ηπατίτιδα C (156,272). Πράγματι, ο επίτοπος 257-269aa, ο επίτοπος 196-218aa και η καρβοξυτελική περιοχή του επιτόπου 350-494aa του KYTP450 2D6, έχειδειχθεί ότι ανιχνεύονται πολύ σπανιότερα στους HCV/αντι-LKM θετικούς ορούς σε σχέση με τους ορούς ασθενών με AH-2 (278,279,280). Το ίδιο βρέθηκε, πολύ πρόσφατα, ότι συμβαίνει και με την αμινοτελική περιοχή του KYTP450 2D6, από τους Kitazawa et al (281): ο επίτοπος 181-245aa αντιδρά πολύ συχνότερα με ορούς ασθενών με AH-2, παρά με ορούς ασθενών με λοίμωξη από τον HCV.

Εντούτοις, όταν χρησιμοποιήθηκε η πιο ευαίσθητη, ποσοτική μέθοδος, που στηρίζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων κατά του αυτοαντιγόνου-στόχου των αντι-LKM-1 (KYTP450 2D6), μετά από ανοσοκαθίζηση ανασυνδυασμένου και ραδιοσημασμένου με ^{35}S μεθειονίνη KYTP450 2D6 (που ανιχνεύει επιπλέον τα αντι-LKM 1 αντισώματα κατά μη-επίπεδων επιτόπων), το 100%, περίπου, των ορών με αντι-LKM 1 αντισώματα εμφάνιζαν αντι-KYTP450 2D6 αντιδραστικότητα, ανεξάρτητα από το αν ήταν HCV θετικοί ή όχι (282,283).

Οι τίτλοι των αντι-LKM αντισωμάτων, όταν ανιχνεύονται με τη συνήθη τεχνική του ΕΑΦ, δε διακρίνουν τους ασθενείς με ή χωρίς χρόνια ηπατίτιδα C (261,276,284) και επομένως η ανίχνευση αντι-LKM αντισωμάτων οποιουδήποτε τίτλου σε ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV μπορεί να υποκρύπτει σύνδρομο επικάλυψης AH-2/ιογενούς ηπατίτιδας (261). Στην περίπτωση αυτή η διάκριση μπορεί να γίνει με βάση την ηπατική ιστολογία (157,257) και τη χαρτογράφηση των επιτόπων του KYTP450 2D6 έναντι των οποίων στρέφονται τα αντι-LKM/αντι-KYTP450 2D6 αντισώματα (279). Η επισήμανση των ασθενών με σύνδρομο επικάλυψης AH-2/HCV έχει μεγάλη σημασία, γιατί υπάρχει κίνδυνος επιδείνωσης της ηπατικής βλάβης κατά τη διάρκεια θεραπείας με α-IFN αν υποκρύπτεται AH-2 (250,279,285,286). Δεν υπάρχουν γενικώς αποδεκτά πρωτόκολα για το διαχωρισμό των HCV/αντι-LKM θετικών ασθενών, που κινδυνεύουν να επιδεινωθούν κατά τη διάρκεια θεραπείας με α-IFN, από εκείνους που θα ωφεληθούν (156). Οι ασθενείς της δεύτερης ομάδας (HCV/αντι-LKM θετικοί, που οφελούνται από τη θεραπεία με α-IFN) αποτελούν το 90% των ασθενών με ηπατίτιδα C και θετικά αντι-LKM αντισώματα (279,285-287). Πάντως οι ασθενείς με ηπατίτιδα C και δείκτες αυτοανοσίας και κυρίως αυτοί που έχουν αντι-LKM αντισώματα, πρέπει να παρακολουθούνται στενά κατά τη διάρκεια θεραπείας με α-IFN για τυχόν έξαρση της ηπατικής νόσου (157,251,261).

Επιπλέον δείγματα της HCV-προκαλούμενης αυτοανοσίας αποτελούν τα αντι-LKM 3, τα αντι-LC 1 και τα αντι-KYTP450 2A6 αντισώματα. Τα αντι-LKM 3 αντισώματα ανιχνεύονται, όπως προαναφέρθηκε, στο 5-10% των ασθενών με AH-2 και στο 13% των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα δ (HDV) (288,289). Πολύ πρόσφατα, αντι-LKM 3 αυτοαντισώματα, έχουν ανιχνευτεί και

σε ασθενείς με HCV λοίμωξη (256,258,290,291), επιβεβαιώνοντας την ετερογένεια, που παρουσιάζουν τα αυτοαντισώματα έναντι των μικροσωμίων του ήπατος στους ασθενείς με HCV-σχετιζόμενη χρόνια ηπατική νόσο.

Τα αντι-LC 1 αυτοαντισώματα, που αρχικά θεωρήθηκαν πιο ειδικοί δείκτες της AH-2, ανιχνεύονται και στην χρόνια ηπατίτιδα C, όπως έδειξε η μελέτη των Lenzi et al (292), στην οποία βρέθηκε ότι το 52% (13/25) των ασθενών με θετικά αντι-LC 1 αντισώματα είχαν θετικά αντι-HCV αντισώματα και ανιχνεύσιμο HCV-RNA στον ορό τους. Τέλος τα αντισώματα έναντι του KYTP450 2A6, που ανιχνεύονται στα πλαίσια του ΣΑΠΕ 1, πρόσφατα ανιχνεύτηκαν, από τους Dalekos et al (293), και σε HCV/αντι-LKM 1 θετικούς ασθενείς. Το γεγονός αυτό μαζί με την πρόσφατη ταυτοποίηση των KYTP450 2E1 και KYTP450 3A4 σαν αυτοαντιγόνα στόχους των αντι-LKM αντισωμάτων σε δύο ασθενείς HCV/αντι-LKM θετικούς από τους Miyakawa et al (294), υποδεκνύει ότι τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 στο σύνολό τους, αποτελούν 'εξέχοντα' αυτοαντιγόνα στόχους κατά τις αυτοάνοσες αντιδράσεις, που προκαλούνται στα πλαίσια της χρόνιας αυτής ιογενούς λοίμωξης.

Ο μηχανισμός παραγωγής των αυτοαντισωμάτων στη χρόνια λοίμωξη από τον HCV δεν είναι γνωστός. Ο λεμφοτροπισμός του ιού, όπως προαναφέρθηκε, αποδείχθηκε από πολλές μελέτες η ικανότητα του HCV να πολλαπλασιάζεται μέσα στα αιμοποιητικά κύτταρα μπορεί να αποτελεί έναν κοινό παθογενετικό μηχανισμό για τις αυτοάνοσες αντιδράσεις με τις οποίες συσχετίζεται (105,295). Επιπλέον, η αναγνώριση της πρωτεΐνης CD81 σαν υποψήφιο υποδοχέα του HCV (65), έχει μεγάλη σημασία για τον πιθανό μηχανισμό παραγωγής αυτοαντισωμάτων κατά την χρόνια λοίμωξη. Το 'δεύτερο συνδιεγερτικό σήμα' (costimulatory signal) κατά την αυτοάνοση

αντίδραση, μπορεί να μεταφέρεται στα Β λεμφοκύτταρα μέσω αυτού του μορίου, καθώς αποτελεί συστατικό ενός μοριακού συμπλέγματος με το CD21 και το CD19 (296), που συμμετέχει στην ενεργοποίηση του Β λεμφοκυττάρου. Δέσμευση του συμπλέγματος αυτού από τον HCV μπορεί να κατεβάζει το 'κατώφλι' ενεργοποίησης των Β λεμφοκυττάρων (297), διευκολύνοντας την παραγωγή αυτοαντισωμάτων, παρόμοια με τον ιό Epstein-Barr (EBV), ο οποίος έχει βρεθεί ότι συνδέεται με το CD21 (298).

Η μοριακή μίμηση, που μπορεί να οδηγήσει σε διασταυρούμενες αυτοάνοσες αντιδράσεις έχει ερευνηθεί πολύ κατά την προηγούμενη δεκαετία σαν μηχανισμός πρόκλησης αυτοανοσίας και υποστηρίζεται ότι πιθανόν αποτελεί ένας από τους βασικούς μηχανισμούς πρόκλησης ΑΗ (299). Έτσι, ανάμεσα στους παράγοντες, που ενοχοποιούνται ως επαγωγείς της αυτοάνοσης ηπατίτιδας είναι και οι ιογενείς ηπατίτιδες και πιο ειδικά ο HCV (300). Πρόσφατα οι Kammer et al (301) έδειξαν τη δυνατότητα του HCV να επάγει αυτοδραστικά CD8⁺ κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα μέσω μοριακής μίμησης, λόγω ομολογίας του HLA-A*0201-περιοριζόμενου πεπτιδίου του νουκλεοκασιδίου του HCV 178-187 (HCV core 178-187) με το KYTP450 2A6 (το οποίο όμως δεν είναι αυτοαντιγόνο στόχος στην ΑΗ-2). Επιπρόσθετα, οι Michitaka et al (302) απέτυχαν να βρουν σημαντική ομολογία αλληλουχιών μεταξύ των περιοχών του πυρήνα, του φακέλου και της NS5 περιοχής του γονιδιώματος διαφόρων γονοτύπων του HCV και του KYTP450 2D6, ώστε να δικαιολογείται η πρόκληση παραγωγής αντι-LKM1 αντισωμάτων μέσω μοριακής μίμησης.

Δεν είναι γνωστό αν η παρουσία των αντι-LKM αυτοαντισωμάτων αποτελεί ειδικό φαινόμενο της λοίμωξης από τον HCV ή αν είναι αποτέλεσμα

μιας γενικευμένης, μη ειδικής Β-λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης, που οδηγεί στην ανίχνευση διαφόρων αυτοαντισωμάτων σε χαμηλούς τίτλους. Στοιχεία υπέρ μιας ειδικής απόκρισης κατά του ΚΥΤΡ450 στη χρόνια ηπατίτιδα C πηγάζουν από το γεγονός της απουσίας αυτών των αυτοαντισωμάτων σε άλλες χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες, την ανάπτυξη αντι-LKM 1 μετά από μεταμόσχευση ήπατος, που ήταν μολυσμένο από τον ΗCV, σε ασθενή αρνητικό για τον ιό και τέλος από την επαγωγή ηπατικών αυτοάνοσων φαινομένων, με επακόλουθο επιδείνωση της ηπατικής νόσου σε ορισμένους ΗCV/αντι-LKM 1 θετικούς ασθενείς, μετά από θεραπεία με α-IFN (279,285,286,288,303).

Η γενετική προδιάθεση του ατόμου φαίνεται να παίζει πολύ πιο σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση αυτοανόσων εκδηλώσεων σχετιζόμενων με τα αυτοαντισώματα κατά την χρόνια λοίμωξη από τον ΗCV, από ότι ο ίδιος ο ιός (302,304). Έτσι, συγκεκριμένα αντιγόνα του MHC, όπως τα τάξης II MHC αντιγόνα DR3 και DR4, που έχουν την ιδιότητα να καθορίζουν πιο αποτελεσματικά την αναγνώριση των αυτοαντιγόνων σε σχέση με άλλα (305-307), έχουν συσχετιστεί τόσο με την ΑΗ (308) όσο και με αυτοάνοσες αντιδράσεις-εκδηλώσεις σε ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (305,307). Κατά συνέπεια, η δομή του ΗCV, που σχετίζεται με τον εκάστοτε γονότυπο του ιού, δε φαίνεται να επηρεάζει την παραγωγή αυτοαντισωμάτων, την παρουσία αυτοανόσων εκδηλώσεων, ή και των δύο (160,255,305,309). Επιπλέον, ενώ η απάντηση στην α-IFN σχετίζεται άμεσα με τον γονότυπο του ιού (13,310,311), η παρουσία αυτοαντισωμάτων δε φαίνεται να την επηρεάζει, τουλάχιστο, στους περισσότερους ασθενείς (157,163,255,312).

Η ετερογενής αυτή αυτοάνοση απάντηση, που παρατηρείται στην χρόνια ηπατίτιδα C, με την παραγωγή πληθώρας αυτοαντισωμάτων, γεννά το ερώτημα αν τα τελευταία παίζουν κάποιο παθογενετικό ρόλο στη σχετιζόμενη με τον HCV ηπατοπάθεια. Παρά την χρησιμότητά τους στη διάγνωση και την έρευνα ο ακριβής ρόλος τους δεν είναι σαφής. Δεν είναι γνωστό αν τα αυτοαντισώματα συμβάλλουν στην πρόοδο της ιστικής βλάβης. Στη μελέτη των Lenzi et al (239), που συμπεριέλαβε μη επιλεγμένους HCV θετικούς ασθενείς από το γενικό πληθυσμό, η παρουσία NOSA βρέθηκε ότι συσχετίζεται με τις κλινικές εκδηλώσεις της χρόνιας ηπατικής νόσου και με αυξημένες τιμές αμινοτρανσφερασών χωρίς όμως να σημαίνει ότι σχετίζονται και αιτιοπαθογενετικά με την ιστική βλάβη. Επιπλέον, οι Cassani et al (245) βρήκαν ότι η παρουσία αντι-LKM1 αντισωμάτων σε ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV σχετίζεται με πιο σοβαρή ιστολογικά νόσο. Πιθανόν, ο παθογενετικός ρόλος των αντι-LKM 1 αντισωμάτων στην πρόκληση ηπατικής βλάβης σε ορισμένους ασθενείς HCV/αντι-LKM 1 θετικούς, να σχετίζεται, όπως και στην AH-2, με την άμεση σύνδεση των αντισωμάτων αυτών στα ηπατοκύτταρα, οδηγώντας στη λύση τους, ή τη διήθηση του ήπατος από KYTP450 2D6-ειδικά T λεμφοκύτταρα. Απαραίτητη προϋπόθεση για την παραπάνω πιθανή εξήγηση αποτελεί η έκφραση του κυτοχρώματος στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων, που έχει πειστικά αποδειχθεί από πρόσφατες μελέτες (313-316).

Βιβλιογραφία 2

1. WHO. Hepatitis C. Weekly Epidemiol Record 2000; Fact Sheet 164.
2. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. J Viral Hepat, 1999; 6:35-47.
3. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. N Engl J Med 1999; 341(8):556-562.
4. Memon MI, Memon MA. Hepatitis C: an epidemiological review. J Viral Hepat 2002; 9:84-100.
5. Trepo C, Pradat P. Hepatitis C virus infection in Western Europe. J Hepatol 1999 ; 31(Suppl 1) :80-83.
6. WHO. Press Release/14. Unsafe injection practices have serious, large scale consequences. Studies point to injection associated hepatitis C in Egypt. 14 March 2000.
7. Naoumov NV. Hepatitis C virus infection in Eastern Europe. J Hepatol 1999; 31(Suppl 1):84-87.
8. Πολίτη Κ, Καβαλλιέρου Λ, Τσιρογιάννη Π, et al. Στόχοι της επαγρύπνησης και σχεδιασμός έργου. Αποτελέσματα επιδημιολογικής έρευνας για τις λοιμώξεις που μεταδίδονται με το αίμα κατά το 1997. Ελληνικά Αρχεία AIDS 1999; 7(4):282-294.
9. Zervou E, Boumba DS, Liaskos Ch, et al. Low prevalence of HCV, HIV and HTLV-I/II infection markers in northwestern Greece: Results of a three year prospective donor study. Eur J Intern Med 2003; 14(1):39-44.

10. Παπαδημητρόπουλος Β, Γκιουστόζι Α, Παπαντωνίου Χ, et al. Επιπολασμός της HCV λοίμωξης στο γενικό πληθυσμό διαφόρων περιοχών της Ελλάδας. Στο Ηπατίτιδα C, Σ. Χατζηγιάννη, 1998.
11. Lionis C, Koutelaki M, Biziagos E, et al. Current prevalence of hepatitis A, B and C in a well defined area in rural Crete, Greece. *J Viral Hepat* 1997; 4(1):55-61.
12. Conry-Cantilena C et al. Routes of infection, viremia and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1996; 334:1691-1696.
13. EASL International Consensus Conference on hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31(Suppl 1):3-8.
14. Esteban JI, Gonzalez A, Hernandez JM, et al. Evaluation of antibodies to hepatitis C virus infection in a study of transfusion associated hepatitis. *N Engl J Med* 1990; 323(16):1107-1112.
15. Τασσόπουλος ΝΚ, Χατζάκης Α, Δελλαδέτσιμα Ι, et al. Ο ρόλος του ιού της ηπατίτιδας C στην οξεία μετά μετάγγιση μη-A, μη-B ηπατίτιδα. *Ιατρική* 1992; 61:54-59.
16. Locasciulli A, Gornati G, Tagger A, et al. Hepatitis C virus infection and chronic disease in children with leukemia in long term remission. *Blood* 1991; 6:1619-1622.
17. Hatzakis A, Polychronaki H, Miriagou V, et al. Antibody responses to hepatitis C virus by second generation immunoassays in a cohort of patients with bleeding disorders. *Vox Sang* 1992; 63:204-209.
18. Vander Poel C. Hepatitis C virus and blood transfusion: past and present risks. *J Hepatol* 1999; 31(Suppl 1):101-106.

19. Quer J, Esteban JI. Epidemiology. In: Viral hepatitis. Zuckerman AJ, Thomas HC (Ed), 2nd edition, 1998.
20. Tsianos EV, Dalekos GN, Elisaf M, et al. High frequency of antibodies to Hantaan virus and hepatitis C virus in chronic haemodialysis patients. Coincidence or cross reaction? *J Intern Med* 1993; 234:607-610.
21. Elisaf M, Tsianos EV, Mavridis A, et al. Antibodies against hepatitis C virus (anti-HCV) in haemodialysis patients: association with hepatitis B serologic markers. *Nephrol Dial Transpl* 1991 ; 6:476-9.
22. Fernandez JL, del Pino N, Lef L, et al. Serum hepatitis C virus RNA in anti-HCV negative haemodialysis patients. *Dial Transplant* 1996; 25:14-18.
23. Dalekos GN, Boumba D, Katopodis K, et al. Absence of HCV viraemia in anti-HCV negative haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:1804-1806.
24. Huang CC. Hepatitis in patients with end-stage renal disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12:236-241.
25. Simonsen L, Kane A, Lloyd J, et al. Unsafe injections in the developing world and transmission of bloodborne pathogens : a review. *Bulletin of World Health Organization*. 1999; 77:789-800.
26. Allander T, Gruber A, Naghani M, et al. Frequent transmission of hepatitis C virus in a haematology ward. *Lancet* 1995; 345:603-607.
27. Bronowicki JP, Venard V, Botte C, et al. Patient to patient transmission of hepatitis C virus during colonoscopy. *N Engl J Med* 1997; 337:237-240.

28. Esteban JI, Gomez J, Martell M, et al. Transmission of hepatitis C virus by a cardiac surgeon. *N Engl J Med* 1996; 334:555-560.
29. Ross RS, Viazov S, Gross T, et al. Transmission of hepatitis C virus from a patient to an anesthesiology assistant to five patients. *N Engl J Med* 2000; 343:1851-1854.
30. Arai Y, Noda K, Enomoto N, et al. A prospective study of hepatitis C virus infection after needlestick accidents. *Liver* 1996; 16:331-334.
31. Sulkowski MS, Thomas DL. Viral hepatitis among injection drug users. *Viral Hepat* 1998; 4:229-244.
32. Dalekos GN, Manoussakis MN, Zervou E, et al. Immunologic and viral markers in the circulation of anti-HIV negative addicts. *Eur J Clin Invest* 1993; 23:219-225.
33. Wejstal R. Sexual transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999; 31(Suppl 1):92-95.
34. Meisel H, Relp A, Faltus B, et al. Transmission of hepatitis C virus to children and husbands by women infected with contaminated anti-D immunoglobulin. *Lancet* 1995; 345:1209-1211.
35. Caporaso N et al. Spread of hepatitis C virus infection within families. Investigators of an Italian multicenter group. *J Viral Hepat* 1998; 5:67-72.
36. Guadagnino V, et al. Hepatitis C virus infection in family setting. *Eur J Epidemiol* 1998; 14:229-232.
37. Gibb DM, Goodall RL, Dunn DT, et al. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus : evidence for preventable peripartum transmission. *Lancet* 2000; 356:904-907.

38. Resti M, Azzari C, Mannelli F, et al. Mother to child transmission of hepatitis C virus: prospective study of risk factors and timing of infection in children born to women seronegative for HIV-1. *BMJ* 1998; 317:437-41.
39. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious diseases. Hepatitis C virus infection. *Pediatrics* 1998; 101:481-85.
40. Thomas SL, Newell ML, Peckham CS, et al. A review of hepatitis C virus (HCV) vertical transmission to infants born to mothers with and without HCV viraemia or human immunodeficiency virus infection. *Int J Epidemiol* 1998; 27:108-17.
41. Thomas DL, Villano SA, Riester KA, et al. Perinatal transmission and manifestation of hepatitis C virus from human immunodeficiency virus type1-infected mothers: Women and Infants Transmission as a study. *J Infect Dis* 1998; 177:1480-88.
42. Zanetti AR, Tanzi E, Paccagnini S, et al. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus. Lombardy Study Group on Vertical HCV Transmission. *Lancet* 1995; 345:289-91.
43. Bonacini M, Puoti M. Hepatitis C in patients with human immunodeficiency virus infection: diagnosis, natural history, meta-analysis of sexual and vertical transmission and therapeutic issues. *Arch Intern Med* 2000; 160(22):3365-73.
44. Conte D, Fraquelli M, Prati D, et al. Prevalence and clinical course of chronic hepatitis C virus infection and rate of HCV vertical transmission in a cohort of 15540 pregnant women. *Hepatology* 2000; 31(3):751-755.

45. Widell A. The transmission of HBV and HCV by unsafe therapeutic injection practices and contaminated equipment used in healthcare settings. In "Prevention and interpretation in liver disease" IASL-EASL Postgraduate course, April 17-18, 2002, Madrid-Spain.
46. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C in the West. *Semin Liver Dis* 1995; 15:5-14.
47. Davis GL, Albright GE, Cook S, et al. Projecting the future health care burden from hepatitis C in the United States. *Hepatology* 1998; 28:390A (Abst).
48. Zou S, Martin T, El Saadany S. Prediction of hepatitis C burden in Canada. *Can J Gastroenterol* 2000; 14:575-580.
49. Deuffic D, Buffat L, Poynard T, et al. Modeling the hepatitis C virus epidemic in France. *Hepatology* 1999; 29:1596-1601.
50. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244(4902):359-62.
51. Robertson B, Myers G, Howard C, et al. Classification, nomenclature and database development for hepatitis C virus and related viruses: proposals for standardization. *Arch Virol* 1998; 143:2493-2503.
52. Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 25:1527-1538.
53. Bukh J. Hepatitis C virus. In *Update of viral hepatitis Postgraduate Course AASLD 2000*, p:102-111.
54. Honda M, Beard MR, Ping LH, et al. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site

- of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol* 1999; 73:1165-1174.
55. Wakita T, Wands JR. Specific inhibition of hepatitis C virus expression by antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* 1994; 269:14205-14210.
56. Hanecak R, Brown-Driver V, Fox MC, et al. Antisense inhibition of hepatitis C virus gene expression in transformed hepatocytes. *J Virol* 1996; 70:5203-5212.
57. Wu CH, Wu GY. Targeted inhibition of hepatitis C virus-directed gene expression in human hepatoma cell lines. *Gastroenterology* 1998; 114:1304-1312.
58. Tanaka T, Kato N, Cho MJ, et al. A novel sequence found at the 3 terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215:740-744.
59. Baumert TF, Ito S, Wong DT, et al. Hepatitis C virus structural proteins assemble into virus-like particles in insect cells. *J Virol* 1998; 72: 3827-3836.
60. Baumert TF, Vergalla J, Satoi J, et al. Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. *Gastroenterology* 1999; 117:1397-1407.
61. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature Med* 1998; 4:1065-1067.
62. Shimizu YK, Igarashi H, Kiohara T, et al. A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1

- of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures. *Virology* 1996; 223:409-412.
63. Farci P, Shimoda A, Wong DC, et al. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:15394-15399.
 64. Farci P, Shimoda A, Coiana A, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000; 288:339-344.
 65. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282:938-941.
 66. Agnello V, Abel G, Elfahal M, et al. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:12766-12771.
 67. Yao N, Reichert P, Taremi SS, et al. Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure Fold Des* 1999; 7:1353-1363.
 68. Kumar PKR, Machida K, Urvill PT, et al. Isolation of RNA aptamers specific to the NS3 protein of hepatitis C virus from a pool of completely random RNA. *Virology* 1997; 238:642-647.
 69. Martin F, Dimasi N, Volpari C, et al. Design of selective eglin inhibitors of HCV NS3 proteinase. *Biochemistry* 1998; 37:11459-11468.

70. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996; 334:77-81.
71. Pawlotsky JM, Germanidis G. The non structural 5A protein of hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 1999; 6(5):343-56.
72. Pawlotsky JM, Germanidis G, Neumann AU, et al. Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship with non structural 5A (NS5A) gene quasispecies mutations. *J Virol* 1998; 72:2795-2805.
73. Gale M, Korth MJ, Tang NM, et al. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the non structural 5A protein. *Virology* 1997; 230:217-227.
74. Heim MH, Moradpour D, Blum HE. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits signal transduction through the Jak-Stat pathway. *Hepatology* 1998; 28:321A.
75. Stratidaki I, Skoulika E, Kelefiotis D, et al. NS5A mutations predict biochemical but not virological response to interferon-alpha treatment of sporadic hepatitis C virus infection in European patients. *J Viral Hepat* 2001; 8(4):243-8.
76. Ago H, Adachi T, Yoshida A, et al. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Structure Fold Des* 1999; 7:1417-1426.
77. Γερμανίδης Γ, Pawlotsky JM. Προσδιορισμός γονότυπων και παρόμοιων γονιδιωμάτων του ιού της ηπατίτιδας C (HCV). Βασικές

έννοιες, μέθοδοι και κλινική σημασία. Στο: Ηπατίτιδα C. Σ. Χατζηγιάννης 1999.

78. Simmonds P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999; 31(Suppl 1):54-60.
79. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liv Dis* 1995; 15:41-63.
80. Maertens G, Stuyver L. Genotypes and genetic variation of hepatitis C virus. In: *The molecular medicine of viral hepatitis*. TJ Harrison, AJ Zuckerman (Ed), 1997, pp. 183-233. John Wiley & Sons Ltd, New York.
81. Simmonds P, Holmes EC, Cha T-A, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS5 region. *J Gen Virol* 1993; 74:2391.
82. Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V, et al. Interferon alpha-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998; 339:1493-1499.
83. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, et al. Randomised trial of interferon alpha-2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha-2b plus placebo for 48 weeks for the treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1998; 352:1426-1432.
84. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358(9286):958-65.

85. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347:975-82.
86. Heathcote EJ, Keeffe EB, Lee SS, et al. Re-treatment of chronic hepatitis C with consensus interferon. *Hepatology* 1998; 27:1136-1143.
87. Zeuzem S, Franke A, Lee JH, et al. Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates and their correlation to viremia, liver function tests and histology. *Hepatology* 1996; 24:1003-1009.
88. Silini E, Bono F, Cividini A, et al. Differential distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with and without liver function abnormalities. *Hepatology* 1995; 21: 285-290.
89. Mihm S, Fayyazi A, Hartmann H, et al. Analysis of histopathologic manifestations of chronic hepatitis C virus infection with respect to virus genotype. *Hepatology* 1997; 25:735-739.
90. Mondelli M, Silini E. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J Hepatol* 1999; 31(Suppl 1):65-70.
91. Martell M, Esteban JI, Quer J, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; 66:3225-3229.
92. Domingo E. Biological significance of viral quasispecies. *Viral Hepatitis Rev* 1996; 2:247-261.
93. Pawlotsky JM. Hepatitis C virus infection: virus/host interactions. *J Viral Hepatitis*, 1998; 5(Suppl 1):3-8.
94. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, et al. Search for hepatitis C virus extrahepatic replication sites in patients with acquired

- immunodeficiency virus syndrome: specific detection of negative-strand viral RNA in various tissues. *Hepatology* 1998; 28:1398-1401.
95. Zignego AL, Macchia D, Monti m, et al. Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus. *J Hepatol* 1992; 15:382-386.
96. Moldvay J, Deny P, Pol S, et al. Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of infected patients by in situ hybridization. *Blood* 1994; 83:269-273.
97. Shimizu YK, Igarashi H, Kiyohara T, et al. Infection of a himpanzee with hepatitis C virus grown in cell culture. *J Gen Virol* 1998; 79:1383-1386.
98. Zignego AL, De Cardi M, Monti M, et al. Hepatitis C virus infection of mononuclear cells from peripheral blood and liver infiltrates in chronically infected patients. *J Med Virol* 1995; 47:58-64.
99. Bronowicki JP, Loriot MA, Thiers V, et al. Hepatitis C virus persistence in human hematopoietic cells injected into SCID mice. *Hepatology* 1998; 28:211-218.
100. Lerat H, Rumin S, Habersetzer F, et al. In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype and cell phenotype. *Blood* 1998; 91:3841-3849.
101. Afonso AM, Jiang J, Penin F, et al. Non-random distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear subsets. *J Virol* 1999; 73:9213-9221.

102. Okuda M, Hino K, Korenaga M, et al. Differences in hypervariable region 1 quasispecies of hepatitis C virus in human serum, peripheral blood mononuclear cells and liver. *Hepatology* 1999; 29:217-222.
103. Sakai A, Kaneko S, Honda M, et al. Quasispecies of hepatitis C virus in serum and in three different parts of the liver of patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 1999; 30:556-561.
104. Navas S, Martin J, Quiroga JA, et al. Genetic diversity and tissue compartmentalization of the hepatitis C virus genome in blood mononuclear cells, liver and serum from chronic hepatitis C patients. *J Virol* 1998; 72:1640-1646.
105. Zignego AL, Brechot C. Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies. *J Hepatol* 1999; 31:369-376.
106. Aiyama T, Yoshioka K, Okumura A, et al. Hypervariable region sequence in cryoglobulin associated hepatitis C virus in sera of patients with chronic hepatitis C: relationship to antibody response against hypervariable region genome. *Hepatology* 1996; 24:1346-1350.
107. Korenaga M, Hino K, Okazaki M, et al. Differences in hypervariable region 1 quasispecies between immune complexed and non-immune complexed hepatitis C virus particles. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 240:677-682.
108. De Vita S, Sacco C, Sansonno D, et al. Characterization of overt B-cell lymphomas in patients with hepatitis C virus infection. *Blood* 1997; 90:776-782.

109. Ray SC, Wang YM, Laeyendecker O, et al. Acute hepatitis C virus structural gene sequences as predictors of persistent viremia: hypervariable region 1 as a decoy. *J Virol* 1999; 73:2938-2946.
110. Hubscher SG. Histological grading and staging of chronic hepatitis: clinical applications and problems. *J Hepatol* 1998; 29:1015-1022.
111. Paradis V, Mathurin P, Laurent A, et al. Histological features predictive of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *J Clin Pathol* 1996; 49:998-1004.
112. Dhillon AP, Dusheiko GM. Pathology of hepatitis C virus infection. *Histopathology* 1995; 26:297-309.
113. Koukoulis G. Chronic hepatitis C: grading, staging, and searching for reliable predictors of outcome. *Human Pathology* 2001; 32:899-903. (editorial)
114. Yano M, Kumada H, Kage M, et al. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 23:1334-1340.
115. Fontaine H, Nalpas B, Poult B, et al. Hepatitis activity index is a key factor determining the natural history of chronic hepatitis C. *Hum Pathol* 2001; 32:904-909.
116. Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus: genotypes and quasispecies. *Sem Liver Dis* 2000; 20:103-126.
117. Soguero C, Campo E, Ribalta T, et al. Assessment of genotype and molecular evolution of hepatitis C virus in formalin-fixed paraffin-embedded liver tissue from patients with chronic hepatitis C infection. *Lab Invest* 2000; 80:851-856.

118. Pawlotsky JM, Germanidis G, Frainais PO, et al. Evolution of the hepatitis C virus second envelope hypervariable region in chronically infected patients receiving interferon- α therapy. *J Virol* 1999; 73:6490-6499.
119. Pawlotsky JM, Pellerin M, Bouvier M, et al. Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus: influence on the characteristics of the infection and responses to interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1998; 54:256-264.
120. Seef LB. Natural history of hepatitis C. *Am J Med* 1999; 107:10-15S.
121. Alter HJ, Seef LB. Recovery, persistence and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Sem Liv Dis* 2000; 20:17-35.
122. Marcellin P. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *J Hepatol* 1999; 31(Suppl 1):9-16.
123. Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y, et al. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Sem Liv Dis* 2000; 20:47-55.
124. Dusheiko GM. The natural course of chronic hepatitis C: implications for clinical practice. *J Viral Hepatitis* 1998; 5(Suppl 1): 9-12.
125. Vogt M, Lang T, Frosner G, et al. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood donor screening. *N Engl J Med* 1999; 341:866-870.

126. Kenny-Walsh E for the Irish Hepatology Research Group. Clinical outcomes after hepatitis infection from contaminated anti-globulin. *N Engl J Med* 1999;340:1228-1233.
127. Wiese B, Berr F, Lafrenz M, et al. Low frequency of cirrhosis in hepatitis C (genotype 1b) single source outbreak in Germany: a 20 year multicenter study. *Hepatology* 2000; 32:91-96.
128. Alberti A, Chemello L, Benvegna L. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31(Suppl 1):17-24.
129. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, et al. Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 2000; 132:296-305.
130. Cerny A, Chisari EV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999; 30:595-601.
131. Chang KM, Rehermann B, McHutchison JG, et al. Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by the hepatitis C virus. *J Clin Invest* 1997; 100:2376-2385.
132. Tsai SL, et al. Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity. *Gastroenterology* 1998; 115:954-965.
133. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, et al. Inhibition of the interferon inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999; 285:107-110.

134. Ferrari C, Urbani S, Penna A, et al. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1999; 31(Suppl 1):31-38.
135. Petruff Cheney C, Chopra S, Graham C. Hepatitis C. *Infect Dis Clin North America* 2000; 14:633-667.
136. Persico M, Persico E, Suozzo R, et al. Natural history of hepatitis C virus carriers with persistently normal aminotransferase levels. *Gastroenterology* 2000; 118:760-764.
137. Poynard T, Bedossa P, Opolon P for the OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR and DOSVIRC groups. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis. *Lancet* 1997; 349:825-832.
138. Tong MJ, El-Farra NS, Reikes AR, et al. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med* 1995; 332:1463-1466.
139. Delladetsima JK, Rassidakis G, Tassopoulos NC, et al. Histology of chronic hepatitis C in relation to epidemiological factors. *J Hepatol* 1996; 24:27-32.
140. Simmonds P, Mellor J, Craxi A et al. Epidemiological, clinical and therapeutic associations of hepatitis C types in western European patients. *J Hepatol* 1996; 24:517-524.
141. Pessione F, Degos F, Macellin P, et al. Effects of alcohol consumption on serum hepatitis C virus RNA and histological lesions in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998; 27:1717-1722.

142. Khan MH, Thomas L, Byth K et al. How much does alcohol contribute to the variability of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C? *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13:419-426.
143. Paradis V, Youssef N, Dargere D, et al. Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C and hepatocellular carcinomas. *Hum Pathol* 2001; 32:327-332.
144. Wiley TE, McCarthy M, Breidi L, et al. Impact of alcohol on histological and clinical progression of hepatitis C infection. *Hepatology* 1998; 28:805-809.
145. Schiff ER. Hepatitis C and alcohol. *Hepatology* 1997; 26(Suppl 1):39S-42S.
146. Spengler U, Rocksroh JK. Hepatitis C in the patient with human immunodeficiency virus infection. *J Hepatol* 1998; 29:1023-1030.
147. Berenguer M, Ferrel L, Watson J, et al. HCV related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *J Hepatol* 2000; 32:673-684.
148. Fattovich G, et al. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997; 112:463-472.
149. Khan MH, Farrel GC, Byth K, et al. Which patients with hepatitis C develop liver complications? *Hepatology* 2000; 31:513-520.
150. Degos F, et al. Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death. *Gut* 2000; 47:131-136.
151. De Mitri MS, et al. HCV associated liver cancer without cirrhosis. *Lancet* 1995; 345:413-415.

152. Ray RB et al. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997; 272:10983-10986.
153. Ray RB, et al. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1996; 226:176-182.
154. Rambusch EG, Manns MP. Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies. *J Hepatol* 1999; 31:369-376.
155. Manns MP, Rambusch EG. Autoimmunity and extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1999; 31(Suppl 1):39-42.
156. Obermayer-Sraub P, Manns MP. Hepatitis C and D, retroviruses and autoimmune manifestations. *J Autoimmunity* 2001; 16:275-285.
157. Lunel F, Cacoub P. Treatment of autoimmune and extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1999; 31(Suppl 1):210-216.
158. Czaja AL. Extrahepatic immunologic features of chronic viral hepatitis. *Dig Dis Sci* 1997; 15:125-144.
159. Zein NN, Persing DH, Czaja AJ. Viral genotypes as determinants of autoimmune expression in chronic hepatitis C. *Mayo Clin Proc* 1999; 74:454-460.
160. Pawlotsky JM, Roudot-Thoraval F, Simmonds P, et al. Extrahepatic immunologic manifestations in chronic hepatitis C and hepatitis C virus serotypes. *Ann Intern Med* 1995; 122:169-173.
161. Carithers RL. Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. In *Update of viral hepatitis Postgraduate Course AASLD 2000*.

162. Pawlotsky JM, Ben Yahia M, Andre C, et al. Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis: a retrospective case-control study. *Hepatology* 1994; 19:841-848.
163. Cacoub P, Renou C, Rosenthal E, et al. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection. A prospective multicenter study of 321 patients. *Medicine* 2000; 79:47-56.
164. Christodoulou DK, Dalekos GN, Merkouropoulos MH, et al. Cryoglobulinemia due to chronic hepatitis infections is not a major problem in clinical practice. *Eur J Intern Med* 2001; 12:435-441.
165. Brouet JC, Clauvel JP, Danon F, et al. Biologic and clinical significance of cryoglobulins: a report of 86 cases. *Am J Med* 1974; 57:755-88.
166. Abel G, Zhang Q-X, Agnello V. Hepatitis C virus infection in type II mixed cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum* 1993; 36:1341-1349.
167. Agnello V, Chung RT, Kaplan LM. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N Engl J Med* 1992; 327:1490-1495.
168. Marcellin P, Descamps V, Martinot-Peignoux M et al. Cryoglobulinemia with vasculitis associated with hepatitis C infection. *Gastroenterology* 1993; 104:272-277.
169. Cacoub P, Fabriani FL, Musset L, et al. Mixed cryoglobulinemia and hepatitis C virus. *Am J Med* 1994; 96:124-132.
170. Lunel F, Musset L. Hepatitis C virus infection and cryoglobulinemia. *J Hepatol* 1998; 29:848-855.
171. Zignego AL, Ferri C, Giannini C, et al. Analysis of HCV infection in mixed cryoglobulinemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma: evidence for a pathogenetic role. *Arch Virol* 1997; 142:545-555.

172. Ferri C, Monti M, La Civita L, et al. Infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1993; 82:3701-3704.
173. Casato M, Agnello V, Pucillo LP, et al. Predictors of long-term response to high-dose interferon therapy in type II cryoglobulinemia associated with hepatitis C virus infection. *Blood* 1997; 90:3865-3873.
174. Zignego AL, Ferri C, Giannini C, et al. Hepatitis C genotype analysis in patients with type II mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med* 1996; 124:31-34.
175. Lenzi M, Frisoni M, Mantovani V, et al. Haplotype HLA-B8-DR3 susceptibility to hepatitis C virus related mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1998; 91:2062-2066.
176. Agnello V. The etiology and pathophysiology of mixed cryoglobulinemia secondary to hepatitis C virus infection. *Springer Sem Immunopathol* 1997; 19:111-129.
177. Johnson RJ, Gretch DR, Yamade H et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1993; 328:465-470.
178. Cacoub P. Virus de l' h epatite C et atteintes neurologiques. *Gastroenterol Clin Biol* 1998 ; 22:889-890.
179. Buskila D. Hepatitis C-associated arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12:295-299.
180. Coll J, Gambus G, Corominas J, et al. Immunohistochemistry of minor salivary gland biopsy specimens from patients with Sjogren's syndrome

- with and without hepatitis C infection. *Ann Rheum Dis* 1997; 56:390-392.
181. Scott CA, Avellini C, Desinan L, et al. Chronic lymphocytic sialadenitis in HCV related chronic liver disease: comparison of Sjögren's syndrome. *Histopathology* 1997; 30:41-48.
182. Koike K, Moriya K, Ishibashi K, et al. Sialadenitis histologically resembling Sjögren syndrome in mice transgenic for hepatitis C virus envelope genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:233-236.
183. Arrieta JJ, Rodriguez-Inigo E, Ortiz-Movilla N, et al. In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands. *Am J Pathol* 2001; 158(1):259-264.
184. Izumi T, Sasaki R, Tsunoda S, et al. B cell malignancy and hepatitis C virus infection. *Leukemia* 1997; S3:516-518.
185. Satoh T, Yamada T, Nakano S, et al. The relationship between primary splenic malignant lymphoma and chronic liver disease associated with hepatitis C virus infection. *Cancer* 1997; 80:1981-1988.
186. Zuckerman E, Zuckerman T, Levine AM, et al. Hepatitis C virus infection in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Ann Intern Med* 1997; 127:423-428.
187. De Rosa G, Gobbo ML, De Renzo A, et al. High prevalence of hepatitis C virus infection in patients with B-cell lymphoproliferative disorders in Italy. *Am J Hematol* 1997; 55:77-82.
188. Germanidis G, Haioun C, Dhumeaux D, et al. Hepatitis C virus infection, mixed cryoglobulinemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Hepatology* 1999; 30:822-823.

189. Zignego AL, Giannelli F, Marrocchi ME, et al. Frequency of bcl-2 rearrangement in patients with mixed cryoglobulinemia and HCV-positive liver diseases. *Clin Exp Rheumatol* 1997; 15:711-712.
190. Hemine O, Lefrere F, Bronowicki JP, et al. Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347:89-94.
191. Rabkin CS, Tess BH, Christianson RE, et al. Prospective study of hepatitis C viral infection as a risk factor for subsequent B-cell neoplasia. *Blood* 2002; 99:4240-4242.
192. Hussain I, Hepburn NC, Jones A, et al. The association of hepatitis C viral infection with porphyria cutanea tarda in the Lothian region of Scotland. *Clin Exp Dermatol* 1996; 21:283-285.
193. Moran MJ, Fontanellas A, Brudieux E, et al. Hepatic uroporphyrinogen decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda patients: the influence of virus C infection. *Hepatology* 1998; 27:584-589.
194. Elder GH. Porphyria cutanea tarda. *Semin Liver Dis* 1998 ; 18:67-75.
195. Stolzel U, Kostler E, Koszka C, et al. Low prevalence of hepatitis C virus infection in porphyria tarda in Germany. *Hepatology* 1995; 21:1500-1502.
196. Ferri C, Baicchi U, La Civita L, et al. Hepatitis C virus-related autoimmunity in patients with porphyria cutanea tarda. *Eur J Clin Invest* 1993; 23:851-855.
197. Navas S, Bosch O, Castillo I, et al. Porphyria cutanea tarda and hepatitis C and B infections: a retrospective study. *Hepatology* 1995; 21:279-284.

198. Bonkowsky HL, Poh-Fitzpatrick M, Pimstone N, et al. Porphyria cutanea tarda, hepatitis C, and HFE gene mutations in North America. *Hepatology* 1998; 27:1661-1669.
199. Tsukazaki N, Watanabe M, Irifune H. Porphyria cutanea tarda and hepatitis C infection. *Br J Dermatol* 1998; 138:1015-1017.
200. Sheikh MY, Wright RA, Burruss JB. Dramatic resolution of skin lesions associated with porphyria cutanea tarda after interferon therapy in a case of chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1998; 43:529-533.
201. Okano J, Horie Y, Kawasaki H, et al. Interferon treatment of porphyria cutanea tarda associated with hepatitis C. *Hepatogastroenterology* 1997; 44:525-528.
202. Dalekos GN, Christodoulou D, Kistis KG, et al. A prospective evaluation of dermatological side effects during alpha-interferon therapy for chronic viral hepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10:933-939.
203. Tsianos EV, Dalekos GN, Merkouropoulos MH, et al. Frequency of thyroid dysfunction after recombinant alpha-interferon therapy in Greek patients with chronic active hepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; 6:547-51.
204. Marcellin P, Pouteau M, Benhamou JP. Hepatitis C virus infection, alpha interferon therapy and thyroid dysfunction. *J Hepatol* 1995; 22:360-364.
205. Hadziyannis SJ. Nonhepatic manifestations and combined diseases in HCV infection. *Dig Dis Sci* 1996; 41:63S-74S.

206. Deutsch M, Dourakis S, Manesis FK, et al. Thyroid abnormalities in chronic viral hepatitis and their relationship to interferon alfa therapy. *Hepatology* 1997; 26(1):206-10.
207. Khamashta MA, Hughes GVR. Antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome. *Cur Opin Rheumatol* 1995; 7:389-394.
208. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al. International Consensus Statement on Preliminary Classification Criteria for Definite Antiphospholipid Syndrome. *Arthritis and Rheumatism* 1999; 42:1309-1311.
209. Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C. The antiphospholipid syndrome and infection. *Curr Rheum Rep* 2001; 3:277-285.
210. Reber G, Arvieux J, Comby E, et al. Multicenter evaluation of nine commercial kits for quantification of anticardiolipin antibodies. The Working Group on Methodologies in Haemostasis from the GEHT (Group d' Etudes sur l' Hemostase et la Thrombose). *Thromb Haemost* 1995; 73:444-452.
211. Dalekos GN, Kistis KG, Boumba DS, et al. Increased incidence of anti-cardiolipin antibodies in patients with hepatitis C is not associated with aetiopathogenetic link to anti-phospholipid syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000, 12: 67-74.
212. Leroy V, Arvieux J, Jacob MC, et al. Prevalence and significance of anticardiolipin, anti-b2 glycoprotein I and anti-prothrombin antibodies in chronic hepatitis C. *Br J Haematol* 1998; 101: 468-474.
213. Ordi-Ros J, Villarreal J, Monegal F, et al. Anticardiolipin antibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection: characterization in

- relation to antiphospholipid syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7:241-244.
214. Harada M, Fujisawa Y, Sakisaka S, et al. High prevalence of anticardiolipin antibodies in hepatitis C virus infection: lack of effects on thrombocytopenia and thrombotic complications. *J Gastroenterol* 2000; 35: 272-277.
215. Cacoub P, Musset L, Amoura Z, et al. Anticardiolipin antibodies, anti-b2-glycoprotein I and antinucleosome antibodies in hepatitis C virus infection and mixed cryoglobulinemia. *J Rheumatol* 1997; 24:139-144.
216. Sthoeger ZM, Fogel M, Smirov A, et al. Anticardiolipin autoantibodies in serum samples and cryoglobulins of patients with chronic hepatitis C infection. *Ann Rheum Dis* 2000, 59: 483-486.
217. Matsuda J, Saitoh N, Gotoh M, et al. High prevalence of anti-phospholipid antibodies and anti-thyroglobulin antibody in patients with hepatitis C virus infection treated with interferon- α . *Am J Gastroenterol* 1995; 90:1138-1141.
218. Mangia A, Margaglione M, Cascavilla I, et al. Anticardiolipin antibodies in patients with liver disease. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2983-2987.
219. Giordano P, Galli M, Del Vecchio GC, et al. Lupus anticoagulant, anticardiolipin antibodies and hepatitis C virus infection in thalassaemia. *Br J Haematol* 1998; 102:903-906.
220. Prieto J, Yuste JR, Beloqui O, et al. Anticardiolipin antibodies in chronic hepatitis C: implication of hepatitis C virus as the cause of the antiphospholipid syndrome. *Hepatology* 1996; 23: 199-204.

221. Biron C, Andreani H, Blanc P, et al. Prevalence of antiphospholipid antibodies in patients with chronic liver disease related to alcohol or hepatitis C virus: correlation with liver injury. *J Lab Clin Med* 1998; 131(3): 243-50.
222. Munoz-Rodriguez F, Tassies D, Font J, et al. Prevalence of hepatitis C virus infection in patients with antiphospholipid syndrome. *J Hepatol* 1999; 30:770-773.
223. Zachou K, Liaskos C, Christodoulou DK. Anti-cardiolipin antibodies (anti-CL) in patients with hepatitis C virus infection are independent of beta2-glycoprotein I (β 2-GPI) co-factor or features of antiphospholipid syndrome (APLS). *J Hepatol* 2002; 36(Suppl 1):139.
224. Al-Saeed A, Makris M, Malia RG, et al. The development of antiphospholipid antibodies in haemophilia is linked to infection with hepatitis C. *Br J Haematol* 1994; 88:845-848.
225. Baid S, Pascual M, Williams WW, et al. Renal thrombotic microangiopathy associated with anticardiolipin antibodies in hepatitis C-positive renal allograft recipients. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:146-153.
226. Allison MED, Wreghitt T, Plmer CR, et al. Evidence for a link between hepatitis virus infection and diabetes mellitus in a cirrhotic population. *J Hepatol* 1994; 21:1135-1139.
227. Caronia S, Taylor K, Pagliaro L, et al. Further evidence for an association between non-insulin-dependent diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999; 30:1059-1063.

228. Mason AL, Lau JYN, Hoang N, et al. Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999; 29:328-333.
229. Hadziyannis S, Karamanos B. Diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999; 29:604-605.
230. Yamagushi S, Kubo K, Fujimoto K, et al. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in patients with chronic hepatitis C before and after treatment with interferon alpha. *Thorax* 1997; 52: 33-37.
231. Irving WL, Day S, Johnston ID. Idiopathic pulmonary fibrosis and hepatitis C virus infection. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:1683-1684.
232. Ferri C, La Civita L, Fazzi P, et al. Interstitial lung fibrosis and rheumatic disorders in patients with hepatitis C virus infection. *Br J Rheumatol* 1997; 36:360-365.
233. Buskila D, Shnaider A, Neumann L, et al. Musculoskeletal manifestations and autoantibody profile in 90 hepatitis C virus infected Israeli patients. *Semin Arthritis Rheum* 1998; 28:107-113.
234. Moder KG, Lindor K. Musculoskeletal symptoms associated with hepatitis C [abstract]. *Arthritis Rheum* 1995; 38(Suppl):S200.
235. Garcia-Monforte A, Romero M, De Diego A, et al. Rheumatic and autoimmune manifestations in chronic hepatitis C virus infection [abstract]. *Arthritis Rheum* 1995; 38(Suppl):S200.
236. Rivera J, Garcia-Monforte A, Pineda A, et al. Arthritis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Rheumatol* 1999; 26:420-424.
237. Buskila D, Sikuler E, Shoefeld Y. Hepatitis C virus and autoimmunity. In: *The Decade of Autoimmunity*. Shoefeld Y (Ed). Amsterdam: Elsevier, 1999, p. 355-363.

238. Buskila D, Sikuler E, Shoefeld Y. Hepatitis C virus, autoimmunity and rheumatic disease. *Lupus* 1997; 6:685-689.
239. Lenzi M, Bellentani S, Saccoccio G, et al. Prevalence of non-organ-specific autoantibodies and chronic liver disease in the general population: a nested case-control study of the Dionysos cohort. *Gut* 1999; 45:435-441.
240. Clifford BD, Donahue D, Smith S, et al. High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995; 231:613-619.
241. Fried MW, Draguesku JO, Shindo M, et al. Clinical and serological differentiation of autoimmune and hepatitis C virus related chronic hepatitis. *Dig Dis Sci* 1993; 38:631-636.
242. Bayraktar Y, Bayraktar M, Gurakar A, et al. A comparison of the prevalence of autoantibodies in individuals with chronic hepatitis C and those with autoimmune hepatitis: the role of interferon in the development of autoimmune diseases. *Hepatogastroenterology* 1997; 44:417-425.
243. Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, et al. Evidence against hepatitis viruses as important causes of severe autoimmune hepatitis in the United States. *J Hepatol* 1993; 18:342-352.
244. Reddy KR, Krawitt EL, Homberg JC et al. Absence of LKM 1 antibody in hepatitis C viral infection in the United States. *J Viral Hepatol* 1995; 2:175-179.

245. Cassani F, Cataleta M, Valentini P, et al. Serum autoantibodies in chronic hepatitis C: comparison with autoimmune hepatitis and impact on the disease profile. *Hepatology* 1997; 26:561-566.
246. Abuaf N, Lunel F, Giral P, et al. Non-organ specific autoantibodies associated with chronic C virus hepatitis. *J Hepatol* 1993; 18:359-364.
247. Meyer zum Buschenfelde KH, Lohse AW, Gerken G, et al. The role of autoimmunity in hepatitis C infection. *J Hepatol* 1995; 22:93-96.
248. McFarlane BM, Bridger C, Tibbs CJ, et al. Virus induced autoimmunity in hepatitis C virus infection: a rare event. *J Med Virol* 1994; 42:66-72.
249. Gregorio GV, Pensati P, Iorio R, et al. Autoantibody prevalence in children with liver disease due to chronic hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 1998; 112:471-476.
250. Bortolotti F, Vajro P, Balli F, et al. Non-organ specific autoantibodies in children with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1996; 25:614-620.
251. Vergani D. NOSA in HCV infection: markers or markers of disease? *Gut* 1999; 45:328-329.
252. Treichel U, Gerken G, Rossol S, et al. Autoantibodies against the human asialoglycoprotein receptor: effects of therapy in autoimmune and virus-induced chronic active hepatitis. *J Hepatol* 1993; 19:55-63.
253. Ohira H, Tojo J, Shinzawa J, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibody in patients with antinuclear, antibody-positive chronic hepatitis C. *Fukushima J Med Sci* 1998; 44:83-92.
254. Wu YY, Hsu TC, Chen TY, et al. Proteinase 3 and dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) are major autoantigens in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 2002 ; 128 :347-352.

255. Betterle C, Fabris P, Zanchetta R, et al. Autoimmunity against pancreatic islets and other tissues before and after interferon-alpha therapy in patients with hepatitis C virus chronic infection. *Diabetes Care* 2000; 23:1177-1181.
256. Valentini G, Mantelli A, Persico M, et al. Serological and clinical markers of autoimmune disease in HCV-infected subjects with different disease conditions. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17:75-79.
257. Sachithanandan S, Fielding JF. Autoimmune disease is not a feature of hepatitis C infection in Ireland. *J Clin Gastroenterol* 1997; 25:522-524.
258. Dalekos GN, Makri E, Loges S, et al. Increased incidence of anti-LKM in a consecutive sample of HCV patients from central Greece: a preliminary study. *J Hepatol* 2000; 32(Suppl 2):174.
259. Dalekos GN, Tsianos EV. Anti-neutrophil antibodies in chronic viral hepatitis. *J Hepatol* 1994; 20(4):561.
260. Czaja AJ. Autoimmune hepatitis and viral infection. *Gastroenterol Clin North Am* 1994; 23:547-566.
261. Ben-Ari, Czaja AJ. Autoimmune hepatitis and its variant syndromes. *Gut* 2001; 49:589-594.
262. Garcia-Buey L, Garcia-Monzon C, Rodriguez S et al. Latent autoimmune hepatitis triggered during interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1995; 108:1770-1777.
263. Shindo M, Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. Acute exacerbation of liver disease during interferon alpha therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1992; 102:1406-1408.

264. Papo T, Marcellin P, Bernuau J, et al. Autoimmune chronic hepatitis exacerbated by alpha-interferon. *Ann Intern Med* 1992; 116:51-53.
265. Farhat BA, Johnson PJ, Williams R. Hazards of interferon treatment in patients with autoimmune chronic active hepatitis [letter]. *J Hepatol* 1994; 20:560-561.
266. Magrin S, Craxi A, Fabiano C, et al. Hepatitis C viremia in chronic liver disease: relationship to interferon-alpha or corticosteroid treatment. *Hepatology* 1994; 19:273-279.
267. Czaja AJ, Carpenter HA. Histological findings in chronic hepatitis C with autoimmune features. *Hepatology* 1997; 26:459-466.
268. Borotto E, Lunel F, Valla D, et al. Prévalence et interprétation des anticorps anti-organites non spécifiques du foie au cours des hépatites chroniques virales C. *Gastroenterol Clin Biol* 1994; 18 :813-818.
269. Czaja AJ, Magrin S, Fabiano C, et al. Hepatitis C virus infection as a determinant of behavior in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1995; 40:33-40.
270. Tran A, Benzaken S, Yang G, et al. Chronic hepatitis C and autoimmunity: good response to immunosuppressive therapy. *Dig Dis Sci* 1997; 42:778-780.
271. Yoshikawa M, Toyohara M, Yamane Y, et al. Disappearance of serum HCV-RNA after short term prednisolone therapy in a patient with chronic hepatitis C associated with autoimmune hepatitis-like serological manifestations. *J Gastroenterol* 1999; 34:269-274.

272. Nishioka M, Morshed SA, Kono K, et al. Frequency and significance of antibodies to P450IID6 protein in Japanese patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1997; 26:992-1000.
273. Manns MP, Obermayer-Straub P. Cytochromes P450 and uridine triphosphate-glucuronosyltransferases: model autoantigens to study drug induced, virus induced and autoimmune liver disease. *Hepatology* 1997; 26:1054-1066.
274. Seelig R, Renz M, Bunger G, et al. Anti-LKM1 antibodies determined by use of recombinant P450 2D6 in ELISA and Western blot and their association with anti-HCV and HCV-RNA. *Clin Exp Immunol* 1993; 92:373-380.
275. Manns MP, Griffin KJ, Sullivan KF, et al. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450 2D6, a cytochrome P450 monooxygenase. *J Clin Invest* 1991; 88:1370-1378.
276. Ma Y, Peakman M, Lobo-Yeo A, et al. Differences in immune recognition of cytochrome P4502D6 by liver/kidney microsomal (LKM) antibody in autoimmune hepatitis and chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 1994; 97:94-99.
277. Yamamoto AM, Cresteil D, Homberg JC, et al. Characterization of anti-liver-kidney microsome antibody (anti-LKM1) from hepatitis C virus positive and negative sera. *Gastroenterology* 1993; 104:1762-1767.
278. Muratori L, Lenzi M, Ma Y, et al. Heterogeneity of liver/kidney microsomal antibody type 1 in autoimmune hepatitis and hepatitis C virus related liver disease. *Gut* 1995; 37:406-412.

279. Dalekos GN, Wedemeyer H, Obermayer-Straub P, et al. Epitope mapping of cytochrome P450 2D6 autoantigen in patients with chronic hepatitis C under α -interferon treatment. *J Hepatol* 1999; 30:366-375.
280. Obermayer-Straub P, Sugimura T, Braun S, et al. Definition of a novel CYP2D6 epitope in autoimmune hepatitis type 2 and in chronic hepatitis C [abstract]. *J Hepatol* 1998; 28 (Suppl 1):139.
281. Kitazawa E, Igarashi T, Kawaguchi N, et al. Differences in anti-LKM-1 autoantibody immunoreactivity to CYP2D6 antigenic sites between hepatitis C virus-negative and positive patients. *J Autoimmun* 2001; 17:243-249.
282. Yamamoto AM, Johanet C, Duclos-Vallee JC, et al. A new approach to cytochrome CYP2D6 antibody detection in autoimmune hepatitis type 2 (AIH-2) and chronic hepatitis C virus (HCV) infection: a sensitive and quantitative radioligand assay. *Clin Exp Immunol* 1997; 108:396-400.
283. Ma Y, Gregorio G, Gaken J, et al. Establishment of a novel radioligand assay using eukariotically expressed cytochrome P4502D6 for the measurement of liver kidney microsomal type 1 antibody in patients with autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1997; 26:1396-1402.
284. Vento S, Cainelli F, Concia E, et al. Steroid and interferon therapy in liver/kidney microsomal positive patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1997; 26:955-956.
285. Todros L, Saracco G, Durazzo M, et al. Efficacy and safety of interferon alpha therapy in chronic hepatitis C with autoantibodies to liver-kidney microsomes. *Hepatology* 1995; 22:1374-1378.

286. Muratori L, Lenzi M, Cataleta M, et al. Interferon therapy in liver/kidney microsomal antibody type 1-positive patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1994; 21:199-203.
287. Duclos-Vallee JC, Nishioka M, Hosomi N, et al. Interferon therapy in LKM-1 positive patients with chronic hepatitis C: follow up by a quantitative radioligand assay for CYP2D6 antibody detection. *J Hepatol* 1998; 28:965-970.
288. Obermayer-Straub P, Manns MP. Target proteins in human autoimmunity: cytochromes P450 and UDP-glucuronosyltransferases. *Can J Gastroenterol* 2000; 14:429-439.
289. Manns MP, Obermayer-Straub P. Viral induction of autoimmunity: mechanisms and examples in hepatology. *J Viral Hepat* 1997; 4(Suppl 2): 42-47.
290. Csepregi A, Nemesánsky E, Luettig B, et al. LKM3 autoantibodies in hepatitis C cirrhosis: a further phenomenon of the HCV-induced autoimmunity. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:910-911.
291. Bachrich T, Thalhammer T, Jager W, et al. Characterization of autoantibodies against uridine-diphosphate glucuronosyltransferase in patients with inflammatory liver diseases. *Hepatology* 2001; 33:1053-1059.
292. Lenzi M, Manotti P, Muratori L, et al. Liver cytosolic 1 antigen-antibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Gut* 1995; 36:749-754.
293. Dalekos GN, Obermayer-Straub P, Maeda T, et al. Antibodies against cytochrome P4502A6 (CYP2A6) in patients with chronic viral hepatitis

- (CVH) are mainly linked to hepatitis C virus (HCV) infection. *Digestion* 1998; 59(Suppl 3):36-37.
294. Miyakawa H, Kitazawa E, Kikuchi K, et al. Immunoreactivity to various human cytochrome P450 proteins of sera from patients with autoimmune hepatitis, chronic hepatitis B and chronic hepatitis C. *Autoimmunity* 2001; 33:23-32.
295. Lenzi M, Frisoni M, Mantovari V, et al. Haplotype HLA-B8-DR3 confers susceptibility to hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinaemia. *Blood* 1998; 91:2062-2066.
296. Bradbury LE, Kansas GS, Levy S, et al. The CD19/21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu13 molecules. *J Immunol* 1992; 149:2841-2850.
297. Fearon DT, Carter RH. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Ann Rev Immunol* 1995; 13:127-149.
298. Cooper NR, Moore MD, Nemerow GR. Immunobiology of CR2, the B lymphocyte receptor for Epstein-Barr virus and the C3d complement fragment. *Ann Rev Immunol* 1988; 6:85-113.
299. Bogdanos DP, Choudhuri K, Vergani D. Molecular mimicry and autoimmune liver disease: virtuous intentions, malign consequences. *Liver* 2001; 21:225-232.
300. Vento S, Cainelli F, Renzini C et al. Autoimmune hepatitis type 2 induced by HCV and persisting after viral clearance. *Lancet* 1997; 350:1298-1299.

301. Kammer AR, van der Burg SH, Grabscheid B, et al. Molecular mimicry of human cytochrome P450 by hepatitis C virus at the level of cytotoxic T cell recognition. *J Exp Med* 1999; 190:169-176.
302. Michitaka K, Durazzo M, Tillmann HL, et al. Analysis of hepatitis C virus genome in patients with autoimmune hepatitis type 2. *Gastroenterology* 1994; 106:1603-1610.
303. Mackie FD, Peakman M, Ma Y, et al. Primary and secondary liver/kidney response following infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology* 1994; 21:1672-1675.
304. Gerroto M, Pontisso P, Giostra F, et al. Analysis of the hepatitis C virus genome in patients with anti-LKM-1 autoantibodies. *J Hepatol* 1994; 21:273-276.
305. Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, Moore SB. Significance of human leukocyte antigens DR3 and DR4 in chronic viral hepatitis. *Dig Dis Sci* 1995; 40:2098-2106.
306. Donaldson P, Doherty D, Underhill J, Williams R. The molecular genetics of autoimmune liver disease. *Hepatology* 1994; 20:225-239.
307. Czaja AJ, dos Santos RM, Porto A, et al. Immune phenotype of chronic liver disease. *Dig Dis Sci* 1998; 43:2149-2155.
308. Doherty DG, Donaldson PT, Underhill JA et al. Allelic sequence variation in the HLA class II genes and proteins in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1994; 19:609-615.
309. Rostaing L, Modesto A, Cistern JM, et al. Serological markers of autoimmunity in renal transplant patients with chronic hepatitis C. *Am J Nephrol* 1998; 18:50-56.

310. Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, et al. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994; 19:13-18.
311. Zein NN, Rakela J, Krawitt EL, et al (Collaborative Study Group). Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. *Ann Intern Med* 1996; 125:634-639.
312. Wada M, Kang KB, Kinugasa A, et al. Does the presence of serum autoantibodies influence the responsiveness to interferon-alpha 2a treatment in chronic hepatitis C? *Intern Med* 1997; 36:248-254.
313. Loeper J, Louerat-Oriou B, Duport C, et al. Yeast expressed cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) exposed on the external face of plasma membranes is functionally competent. *Mol Pharmacol* 1998; 54:8-13.
314. Muratori L, Parola M, Ripalti A, et al. Liver/kidney microsomal antibody type 1 targets CYP2D6 on hepatocyte plasma membrane. *Gut* 2000; 46:553-561.
315. Löhr HF, Schlaak JF, Lohse AW, et al. Autoreactive CD4+ LKM specific and anticolonotypic T-cell responses in LKM-1 antibody-positive autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1996; 24:1416-1421.
316. Arenz M, Pngel S, Schirmacher P, et al. T cell reseptor Vbeta chain restriction and preferred CDR3 motifs of liver-kidney microsomal antigen (LKM-1)-reactive T cells from autoimmune hepatitis patients. *Liver* 2001; 21:18-25.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

**ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ ΜΙΚΡΟ-
ΣΩΜΙΩΝ ΗΠΑΤΟΣ-ΝΕΦΡΩΝ (ΑΝΤΙ-LKM) ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ
ΜΗ-ΟΡΓΑΝΟΕΙΔΙΚΩΝ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕ-
ΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C.**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) είναι ένας ηπατοτρόπος και λεμφοτρόπος ιός, που προκαλεί μια σιωπηλή και ασυμπτωματική νόσο στο 80-90% των περιπτώσεων, καταλήγει σε χρονιότητα σε ποσοστό 80-85% των κρουσμάτων και χαρακτηρίζεται από επαγωγή αυτοανόσων αντιδράσεων (1,2). Οι αντιδράσεις αυτές μπορούν να ευοδωθούν μετά από τη χορηγούμενη θεραπευτική αγωγή (α-ιντερφερόνη, α-IFN) (3-6).

Ο κατάλογος των εξωηπατικών εκδηλώσεων με τις οποίες έχει συσχετιστεί η χρόνια ηπατίτιδα C είναι μακρύς, αλλά για λίγες από αυτές έχει βρεθεί ισχυρή, αιτιοπαθογενετική συσχέτιση με τον HCV (6). Επιπλέον, έχουν ανιχνευτεί χαμηλοί τίτλοι ποικίλων οργανοειδικών και μη οργανοειδικών αυτοαντισωμάτων, στο 50-70% των ασθενών (7-19). Πολλά από τα αυτοαντισώματα αυτά είναι παρόμοια με εκείνα που χαρακτηρίζουν τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (20).

Στην αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1 (AH-1) ανευρίσκονται αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA), αντισώματα έναντι λείων μυικών ινών (SMA), αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος ουδετερόφιλων (ANCA), ή/και αντισώματα κατά διαλυτών ηπατικών αντιγόνων ή κατά αντιγόνου ήπατος-παγκρέατος (αντι-SLA/LP) (21,22). Η αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 2 (AH-2) χαρακτηρίζεται από την παρουσία ειδικών αυτοαντισωμάτων κατά μικροσωμιακών αντιγόνων ήπατος-νεφρών (αντι-LKM) ή κατά κυτοσολίων ήπατος τύπου 1 (αντι-LC 1) (21,22). Η πρωτοπαθής χολική κίρρωση χαρακτηρίζεται από την ανίχνευση αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων (AMA) στο 90% των ασθενών. Επιπρόσθετα, μπορεί να ανιχνεύονται σε διάφορους τίτλους ANA και pANCA

(20,23). Τέλος η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα χαρακτηρίζεται από την απουσία των AMA και συχνή ανίχνευση pANCA και ANA (20,24).

Η αναφερόμενη στη βιβλιογραφία συχνότητα ανίχνευσης των παραπάνω αυτοαντισωμάτων στη χρόνια ηπατίτιδα C ποικίλλει, αλλά συνολικά ANA και/ή SMA ανιχνεύονται περίπου στο 10-40% των ασθενών, ενώ αντι-LKM στο 0-10% (3,7-19,25). Ειδικά όσον αφορά τα αντι-LKM αυτοαντισώματα, χρησιμοποιώντας σύγχρονες ποσοτικές τεχνικές ανοσοκαθίζησης ραδιοσημασμένου με ^{35}S KYTP450 2D6, βρέθηκε ότι οι τίτλοι τους δε διαφέρουν στην χρόνια ηπατίτιδα C και την AH-2. Τα αυτοαντισώματα αυτά μπορεί να επαχθούν κατά τη διάρκεια θεραπείας με α -IFN (25-27).

Η σύγχρονη χρήση του προσδιορισμού των αυτοαντισωμάτων έγκειται στην πιθανή υποβοήθηση της διάγνωσης, της παρακολούθησης και τη μελέτη της παθογένειας της ηπατικής βλάβης καθώς και στην πιθανή αναγνώριση υποομάδων HCV θετικών ασθενών με διαφορετική ανταπόκριση στη θεραπεία ή διαφορετική έκβαση. Παρ'όλα αυτά, δεν είναι γνωστό μέχρι στιγμής, αν τα αυτοαντισώματα, που ανιχνεύονται στη χρόνια λοίμωξη από τον HCV, σχετίζονται παθογενετικά είτε με τις εξηπατικές εκδηλώσεις της λοίμωξης είτε με επιδείνωση της ηπατικής νόσου (3,7,28,29). Επί του παρόντος, είναι γνωστό ότι ένα μικρό ποσοστό ασθενών HCV/αντι-LKM θετικών παρουσιάζουν έξαρση της ηπατικής νόσου κατά τη θεραπεία με α -IFN (30,31) και επομένως η χορήγηση θεραπείας στην υποομάδα αυτή των ασθενών θα πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή και στενή παρακολούθηση για τυχόν επαγωγή λανθάνουσας AH (25,32,33). Αντίθετα, η ανοσοκατασταλτική θεραπεία, που χορηγείται στις περιπτώσεις AH μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο ιϊκό πολλαπλασιασμό και επιδείνωση της ηπατικής

βλάβης στην περίπτωση ιογενούς ηπατίτιδας (4,34). Επιπλέον, καθώς ο μηχανισμός παραγωγής των αυτοαντισωμάτων κατά τη διάρκεια της χρόνιας ηπατίτιδας C δεν είναι γνωστός, δεν είναι διευκρινισμένο αν ο γονότυπος του ιού παίζει κάποιο ρόλο στην εμφάνιση των αυτοαντισωμάτων ή/και των αυτοανόσων εκδηλώσεων (18,35).

Σκοπός της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της συχνότητας της παρουσίας των αντι-LKM και διαφόρων άλλων αυτοαντισωμάτων [ANA, AMA, SMA, ANCA, αντισωμάτων έναντι τοιχωματικών κυττάρων στομάχου (PCA), αντισωμάτων έναντι καρδιολιπίνης (αντι-CL), αντι-LC 1, αντισωμάτων κατά διπλής έλικας DNA (αντι-dsDNA)] σε ένα μεγάλο μη επιλεγμένο δείγμα Ελλήνων ασθενών, που πάσχουν από χρόνια ηπατίτιδα C, ανεξάρτητα αν βρίσκονται ή όχι υπό θεραπεία, καθώς παρόμοια πληροφορία δεν υπάρχει για τον Ελλαδικό χώρο. Επιπρόσθετα, έγινε προσπάθεια εκτίμησης του 'πραγματικού' επιπολασμού των ειδικών αντι-LKM αντισωμάτων και των διαφόρων οργανοειδικών και μη αυτοαντισωμάτων στη χρόνια ηπατίτιδα C καθώς διεθνώς δεν έχουν ελεγχθεί μεγάλες μη επιλεγμένες σειρές ασθενών. Η παρουσία των αυτοαντισωμάτων συσχετίστηκε με δημογραφικά, επιδημιολογικά, κλινικά (κυρίως εξωηπατικές εκδηλώσεις της HCV λοίμωξης), εργαστηριακά, ιστολογικά και ιολογικά (ϊικό φορτίο, γονότυπος) χαρακτηριστικά των HCV θετικών ασθενών, καθώς και με τη λήψη ή μη θεραπείας με α-IFN (μονοθεραπεία ή συνδυασμός με ριμπαβιρίνη). Τέλος, σε μέρος μη επιλεγμένων ασθενών, έγινε προσπάθεια ανεύρεσης του αυτοαντιγόνου-στόχου των αντι-LKM αντισωμάτων.

2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1. Ασθενείς

Τριακόσιοι τρεις διαδοχικοί ασθενείς (150 άντρες και 153 γυναίκες, με μέση ηλικία 49 έτη, εύρος 17-83 έτη) με καλά τεκμηριωμένη χρόνια λοίμωξη από τον HCV εξετάστηκαν για την παρουσία στον ορό τους διαφόρων αυτοαντισωμάτων (ANA, SMA, AMA, ANCA, αντι-LKM, αντι-LC1, PCA, αντι-CL και αντι-dsDNA), ανεξάρτητα από το αν βρίσκονταν υπό αντι-ιική θεραπεία ή όχι. Η μέση διάρκεια της λοίμωξης ήταν 4.2 ± 3.6 έτη (μέση τιμή \pm σταθερή απόκλιση, mean \pm SD).

Οι ασθενείς με ηπατίτιδα C, που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, κατατάχθηκαν σε τρεις ομάδες: I) ασθενείς με φυσιολογικές τιμές αμινοτρανσφερασών τουλάχιστο για έξι μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη (n = 37), II) ασθενείς με παθολογική ηπατική βιοχημεία τουλάχιστο έξι μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη, με ιστολογικά, ιολογικά και βιοχημικά αποδεδειγμένη χρόνια HCV λοίμωξη (n = 181) και III) ασθενείς με HCV σχετιζόμενη κίρρωση με ή χωρίς ανάπτυξη πυλαίας υπέρταση (n = 85).

Η διάγνωση της χρόνιας λοίμωξης από τον HCV έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια του EASL (EASL International Consensus criteria) (36). Εν συντομία, οι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη πληρούσαν τα παρακάτω κριτήρια: α) ορολογική απόδειξη χρόνιας λοίμωξης από τον HCV όπως αυτή ορίζεται από την ανίχνευση αντισωμάτων εναντίον του ιού (αντι-HCV) με ανοσοενζυμική μέθοδο δεύτερης ή τρίτης γενεάς (Murex Diagnostics, Temple Hill, Dartford, UK), τουλάχιστο δύο φορές μέσα σε έξι μήνες πριν την είσοδο στη μελέτη, β) ενεργό πολλαπλασιασμό του ιού όπως ορίζεται από την

ανίχνευση HCV RNA με τη χρήση της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, Cobas Amplicor HCV Monitore test, Roche) ή με τη μέθοδο τροποποιημένης ενίσχυσης του προϊόντος μεταγραφής (transcription mediated amplification, TMA, Bayer). Όλοι οι ασθενείς ήταν αρνητικοί για αντισώματα έναντι του HIV (αντι-HIV) (Abbot Laboratories, Wiesbaden, Germany), το VDRL test, και την άμεση αντίδραση Coombs.

Η πιθανή πηγή λοίμωξης φαίνεται στον Πίνακα 1. Αναλυτικότερα, ογδόντα έξι ασθενείς είχαν ιστορικό τουλάχιστο μίας μετάγγισης πριν το 1990, ενώ από αυτούς, πολλαπλές μεταγγίσεις είχαν λάβει: ένας ασθενής λόγω νόσου von Willebrand, ένας ασθενής λόγω θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας, ένας ασθενής λόγω ιδιοπαθούς θρομβοπενικής πορφύρας, ένας ασθενής λόγω οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (για την οποία είχε κάνει μεταμόσχευση μυελού των οστών το 1989) και 17 ασθενείς, γιατί έπασχαν από αιμολυτική αιμοσφαιρινοπάθεια. Εξήντα επτά ασθενείς ήταν χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών ουσιών στο παρελθόν. Τρεις ασθενείς βρισκόταν υπό χρόνια αιμοκάθαρση. Έξι ασθενείς είχαν ιστορικό πολλαπλών εισαγωγών σε νοσοκομεία χωρίς ιστορικό μετάγγισης. Ένας ασθενής είχε ιστορικό πολλαπλών επισκέψεων σε οδοντίατρο στο παρελθόν (περισσοτέρων από 15 φορές το χρόνο). Δέκα ασθενείς ανέφεραν ετεροφυλοφιλικές σχέσεις με πολλαπλούς ερωτικούς συντρόφους, ενώ τρεις από αυτούς ανέφεραν ότι είχαν και ομοφυλοφιλικές σχέσεις στο παρελθόν. Τριάντα οκτώ ασθενείς ανέφεραν ότι και άλλο μέλος της οικογένειας είχε γνωστή χρόνια λοίμωξη από τον HCV. Δύο ασθενείς είχαν ιστορικό μετάγγισης πριν το 1990 και ετεροφυλοφιλικών σχέσεων με πολλαπλούς ερωτικούς συντρόφους. Επτά ασθενείς εργάζονταν σε χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας και ανέφεραν

τρύπημα από βελόνα στο παρελθόν. Οι υπόλοιποι 86 ασθενείς δεν ανέφεραν προφανή αιτία μόλυνσης από τον HCV (άγνωστη πηγή μόλυνσης). Για λόγους στατιστικής ανάλυσης, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο κύριες ομάδες ως προς την πηγή μόλυνσης: α) εκείνοι με βέβαιη πηγή μόλυνσης (158 από τους 303 ασθενείς) (ως βέβαιες πηγές λοίμωξης θεωρήθηκαν: η μετάγγιση/μεταγγίσεις, η χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών και η αιμοκάθαρση) και β) εκείνοι με αβέβαιη πηγή μόλυνσης (145 από τους 303 ασθενείς). Επιπλέον, επειδή οι χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών αποτελούν ιδιαίτερη ομάδα, οι ασθενείς χωρίστηκαν ανάλογα με τη χρήση ή όχι ναρκωτικών ουσιών α) στους χρήστες (67 από τους 303 ασθενείς) και β) τους μη χρήστες (236 από τους 303 ασθενείς).

Επιπρόσθετα, στη στατιστική ανάλυση συμπεριλήφθηκαν ορισμένοι επιδημιολογικοί και δημογραφικοί παράγοντες όπως: ιστορικό εγχειρήσεων, τατουάζ, ενέσεις με κοινόχρηστες σύριγγες, παραδοσιακές πρακτικές (όπως βελονισμός ή βεντούζες), ή κατάχρηση αλκοόλ. Από το ιατρικό ιστορικό κάθε ασθενούς δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην παρουσία ή όχι μη ειδικών συμπτωμάτων (καταβολή, μυαλγίες, αρθραλγίες) κατά τη διάγνωση της λοίμωξης, καθώς και εξωηπατικών εκδηλώσεων σχετιζόμενων με την ηπατίτιδα C. Έτσι, καταγράφηκε η ύπαρξη εξωηπατικών εκδηλώσεων, όπως: δερματικές εκδηλώσεις (Raynaud φαινόμενο, αγγειίτιδα, πορφύρα, ομαλός λειχήνας, ψωρίαση, όψιμη δερματική πορφυρία), ρευματολογικές εκδηλώσεις (αρθρίτιδα, μυοσίτιδα), νευρολογικές εκδηλώσεις (περιφερική αισθητική ή/και κινητική νευροπάθεια, εκδηλώσεις από το κεντρικό νευρικό σύστημα, ημικρανίες), νεφρική συμμετοχή (σπειραματονεφρίτιδα), σύνδρομο sicca (οφθαλμών ή/και στόματος), σύνδρομο Sjögren, ιστορικό Β-κυτταρικού μη-

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των 303 ασθενών με λοίμωξη από τον HCV.

HCV (+) ασθενείς (n = 303)	
Φύλο (άνδρας/ γυναίκα)	150/153
Μέση ηλικία	49
Διάρκεια λοίμωξης	4.2 ± 3.6
Πηγή λοίμωξης	
Βέβαιη	
μεταγγίσεις	88
in χρήση ναρκωτικών	67
αιμοκάθαρση	3
Αβέβαιη	
πολλαπλοί ερωτικοί σύντροφοι	10
πολλαπλές νοσηλείες	6
πολλαπλές οδοντιατρικές εργασίες	1
επάγγελμα υπηρεσιών υγείας	7
μέλος οικογένειας με λοίμωξη από τον HCV	38
άγνωστη	83
Ιστορικό εγχειρήσεων (ναι/ όχι)	171/70
Τατουάζ (ναι/όχι)	28/211
Ιστορικό ενέσεων με κοινόχρηστες σύριγγες (ναι/όχι)	132/105
Ιστορικό παραδοσιακών τεχνικών (ναι/όχι)	77/159
Κατάχρηση αλκοόλ (ναι/όχι)	53/188
Λήψη άλλων φαρμάκων (ναι/όχι)	108/132
Συμπτώματα κατά τη διάγνωση (ναι/όχι)	68/173
Εξωηπατικές εκδηλώσεις	
Sjogren	4
Sicca	1
κρουοσφαιριναιμία	2
σπειραματονεφρίτιδα	2
μυοσίτιδα	1
Hashimoto	8
πνευμονική ίνωση	1
ψωρίαση	3
όψιμη δερματική πορφυρία	1
πολυαρθρικό σύνδρομο	1
ομαλός λειχήνας	1
ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα	1
Θρομβοεμβολικά επεισόδια	
έμφραγμα μυοκαρδίου	3
ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο	3
πνευμονική εμβολή	1
εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση άκρου	1
θρόμβωση κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδούς	1
θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα	1
Αποβολές (ναι/όχι)	10/121

Hodgkin λεμφώματος, ιστορικό θρομβωτικών επεισοδίων αρτηριών ή/και φλεβών (οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, πνευμονική εμβολή, εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση των κάτω, των άνω άκρων ή εσωτερικών οργάνων), καθ'έξιν αποβολές (δύο ή περισσότερες). Έτσι (Πίνακας 1), τέσσερις ασθενείς έπασχαν από σύνδρομο Sjögren εκ των οποίων ο ένας έπασχε και από κλινικώς εμφανή κρουοσφαιριναιμία. Ένας ασθενής έπασχε από σύνδρομο sicca (ξηροστομία). Δύο ασθενείς έπασχαν από σπειραματονεφρίτιδα, δύο από κλινικώς έκδηλη κρουοσφαιριναιμία, ένας από μυοσίτιδα, οκτώ από θυρεοειδίτιδα Hashimoto, ένας από ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, τρεις από ψωρίαση, ένας από όψιμη δερματική πορφυρία, ένας από πολυαρθριτικό σύνδρομο, ένας από ομαλό λειχήνα και ένας από ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα. Ως σαφείς εξωηπατικές εκδηλώσεις σχετιζόμενες με την λοίμωξη από τον HCV θεωρήθηκαν οι εκδηλώσεις της μικτής κρουοσφαιριναιμίας, η σπειραματονεφρίτιδα, το σύνδρομο sicca και Sjögren, καθώς και η οξώδης πολυαρθριίτιδα (6). Για στατιστικούς και πάλι λόγους οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: α) HCV θετικοί ασθενείς με εξωηπατικές εκδηλώσεις σαφώς σχετιζόμενες με τη λοίμωξη (9 από τους 243 για τους οποίους υπήρχε καταγραφή της παρουσίας ή όχι εξωηπατικών εκδηλώσεων) και β) HCV θετικοί ασθενείς χωρίς εξωηπατικές εκδηλώσεις ή με εκδηλώσεις που δε φαίνεται ότι σχετίζονται άμεσα με τον HCV (234 από τους 243). Όσον αφορά στο ιστορικό θρομβοεμβολικών επεισοδίων, τρεις ασθενείς είχαν ιστορικό οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου, τρεις ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού, ένας πνευμονικής εμβολής, ένας εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης δεξιού κάτω άκρου, ένας θρόμβωσης κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδούς και ένας

θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας (ιστορικό θρομβοεμβολικών επεισοδίων 10 από τους 243 HCV ασθενείς για τους οποίους υπήρχε καταγραφή της ύπαρξης ή όχι ιστορικού θρομβοεμβολικών επεισοδίων). Από τις 131 γυναίκες (για τις οποίες υπήρχε καταγραφή της ύπαρξης ή όχι ιστορικού καθ' ἑξίν αποβολών), 10 ανέφεραν στο ιστορικό τους δύο ή περισσότερες αποβολές. Τέλος, 233 ασθενείς δεν έπαιρναν κατά την είσοδό τους στη μελέτη ειδική αντι-ϊική θεραπεία, ενώ οι υπόλοιποι 70 βρισκόταν υπό αγωγή (α-IFN ή συνδυασμό α-IFN με ριμπαβιρίνη).

Τα επίπεδα της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST), της αλανινοαμινοτρανσφεράσης (ALT), της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP), της γ-γλουταμυλικής-τρανσπεπτιδάσης (γGT), και των γ-σφαιρινών και αλβουμίνης προσδιορίστηκαν σε αυτόματους αναλυτές. Η παρουσία θρομβοπενίας ορίστηκε ως τιμή αιμοπεταλίων κάτω των $140000/\text{mm}^3$. Δείκτες ηπατίτιδας Β υπήρχαν στους 268 από τους 303 ασθενείς [οι υπόλοιποι 35 είχαν αρνητικό αντιγόνο επιφανείας του ιού της ηπατίτιδας Β (HBsAg), αλλά δεν υπήρχαν στοιχεία για τους υπόλοιπους δείκτες]. Από τους 268 αυτούς ασθενείς οι 10 είχαν θετικό HBsAg. Έτσι, οι ασθενείς χωρίστηκαν για λόγους στατιστικής ανάλυσης σε δύο κατηγορίες α) HCV(+)/HBsAg(+) (10 από τους 303 HCV ασθενείς) και β) HCV(+)/HBsAg(-) (οι υπόλοιποι 293). Επιπλέον, οι 258 ασθενείς, με αρνητικό HBsAg και γνωστούς τους υπόλοιπους δείκτες λοίμωξης από τον ιο της ηπατίτιδας Β (HBV), χωρίστηκαν σε: α) HCV ασθενείς με αρνητικούς όλους τους δείκτες (163 από τους 258 ασθενείς) και β) HCV ασθενείς με διάφορους συνδυασμούς δεικτών (95 από τους 258 ασθενείς: 35 ήταν αντι-HBc και αντι-HBs θετικοί, 23 ήταν μόνο αντι-HBc θετικοί, 9 ήταν αντι-HBc, αντι-HBs και αντι-HBe θετικοί, 7 ήταν αντι-HBc και

αντι-HBe θετικοί, ένας ήταν αντι-HBs και αντι-HBe θετικός και 20 είχαν θετικά μόνο τα αντι-HBs αντισώματα). Ο γονότυπος προσδιορίστηκε σε 167 από τους 303 ασθενείς μετά από υβριδισμό του προϊόντος PCR σε λωρίδες νιτροκυτταρίνης (Innolipa, HCV III InnoGenetics), ενώ ποσοτικός προσδιορισμός του HCV RNA έγινε στους 55 από τους 303 HCV ασθενείς (PCR, Cobas Amplicor HCV Monitore test, Roche).

Ιστολογικά δεδομένα υπήρχαν για τους 165 από τους 303 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C. Η ιστολογική εκτίμηση της φλεγμονής και ίνωσης έγινε σύμφωνα με το δείκτη ιστολογικής δραστηριότητας Knodell (37,38). Η φλεγμονώδης δραστηριότητα κατά Knodell βαθμοποιείται από 0 έως 18 με βάση το βαθμό της πυλαίας, περιπυλαίας, και λοβιακής φλεγμονής, ενώ η ίνωση βαθμοποιείται ως: 0 (χωρίς ίνωση), 1 (πυλαία ίνωση), 2 (πυλαία ίνωση με σχηματισμό λίγων ινωδών διαφραγμάτων), 3 (γεφυροποιός ίνωση), 4 (κίρρωση) (37,38). Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες α) σύμφωνα με την φλεγμονή: ελάχιστη ή ήπια (0-8) (87 ασθενείς) και μέτρια ή σοβαρή (9-18) (78 ασθενείς) β) σύμφωνα με την ίνωση: καθόλου ή ήπια (0-1) (87 ασθενείς) και μέτρια ή σοβαρή (2-4) (78 ασθενείς).

2.1.2. Ασθενείς (n = 174)

Από τους 303 ασθενείς οι 174, με τυχαία επιλογή, ελέγχθηκαν για αντι-CL αντισώματα και επιπλέον για αντισώματα έναντι του συμπαραγόντα β2-γλυκοπρωτεΐνη I (αντι-β2-GPI), ώστε να διερευνηθεί αν τα αντι-CL αντισώματα, που ανιχνεύονται στους ασθενείς με ηπατίτιδα C είναι ή όχι 'παθογενετικά' (εξαρτώμενα από τη β2-GPI). Ως μάρτυρες ελέγχθηκαν 50

ασθενείς με ηπατίτιδα Β και 267 υγιείς αιμοδότες. Όλοι οι 174 ασθενείς με ηπατίτιδα C ήταν αρνητικοί για το HBsAg, οι ασθενείς με ηπατίτιδα Β ήταν αρνητικοί για αντι-HCV αντισώματα, ενώ οι υγιείς ήταν αρνητικοί για το HBsAg και για αντι-HCV αντισώματα. Ασθενείς και υγιείς ήταν αρνητικοί για αντισώματα έναντι του HIV. Τα χαρακτηριστικά των 174 HCV ασθενών, των 50 HBV ασθενών και των 267 υγιών αιμοδοτών φαίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά 174 HCV ασθενών, 50 HBV ασθενών και 267 υγιών αιμοδοτών.

	HCV ασθενείς (n=174)	HBV ασθενείς (n=50)	Υγιείς αιμοδότες (n=267)
Ανδρες/γυναίκες	82/92	30/20	150/117
Μέση ηλικία (χρόνια)	51	47	48
Εύρος ηλικίας (χρόνια)	17-83	18-71	18-60
Πηγή λοίμωξης			
Βέβαιη			
μεταγγίσεις	51	3	
in χρήση ναρκωτικών ουσιών	38	-	
αιμοκάθαρση	3	-	
Αβέβαιη			
Πολλαπλές νοσηλίες	6	-	
Πολλαπλοί ερωτικοί σύντροφοι	5	-	
Πολλαπλές οδοντιατρικές εργασίες	1	-	
Λοίμωξη μέλους της οικογένειας	11	25	
Επάγγελμα Υγείας	2	-	
Άγνωστη	57	22	
Θεραπεία (όχι/ναι)*	122/52	40/10	
Δείκτες προηγούμενης HBV λοίμωξης**			
Όλοι αρνητικοί	119		
Αντι-HBcore (+)	49		
Γονότυπος HCV***			
1b/non 1b	39/45		

*Θεραπεία: α-IFN 3MU t.i.w ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με ριμπαβιρίνη (ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV) και α-IFN 5MU t.i.w (ασθενείς με λοίμωξη από τον HBV).

**Διαθέσιμα δεδομένα για 168 ασθενείς. Οι υπόλοιποι 6 ασθενείς ήταν αρνητικοί για το HBsAg, ενώ οι υπόλοιποι δείκτες λοίμωξης από τον HBV δεν ήταν διαθέσιμοι.

***Γονότυπος προσδιορίστηκε στους 84 ασθενείς με ηπατίτιδα C.

Επιπλέον, εξωηπατικές εκδηλώσεις είχαν 7 από τους 174 ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV (3 είχαν σύνδρομο Sjögren, 2 κλινικά έκδηλη κρουσφαιριναιμία, 1 σύνδρομο Sjögren και κρουσφαιριναιμία και 1 σπειραματονεφρίτιδα) και 1 από τους 50 ασθενείς με λοίμωξη από τον HBV (κλινικά έκδηλη κρουσφαιριναιμία). Ιστολογικά δεδομένα ήταν διαθέσιμα για τους 113 ασθενείς με ηπατίτιδα C και για τους 30 ασθενείς με ηπατίτιδα B.

2.1.3. Ασθενείς (n = 39)

Από τους 303 HCV ασθενείς, που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, οι 39 (10 άνδρες, 29 γυναίκες, εύρος ηλικίας 20-70 ετών), με τυχαία επιλογή, ελέγχθηκαν περαιτέρω για την παρουσία αντι-LKM και άλλων αυτοαντισωμάτων με τη χρήση μοριακών τεχνικών. Κανείς από τους 39 αυτούς ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV δεν είχε αλκοολική νόσο του ήπατος ή άλλη αιτία ηπατικής νόσου εκτός της ηπατίτιδας C. Επιπλέον, κανείς από αυτούς δεν είχε κλινικά ή εργαστηριακά ευρήματα αυτοάνοσης ηπατίτιδας (σύμφωνα με την τροποποιημένη βαθμολόγηση για τη διάγνωση της AH, και οι 39 ασθενείς είχαν βαθμολογία κάτω του 15) (39) ή ήταν θετικός για το HBsAg. Η πηγή μόλυνσης ήταν: ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών (30 ασθενείς), μετάγγιση (3 ασθενείς), άγνωστη (υπόλοιποι 6 ασθενείς).

2.2. Ανίχνευση αντι-LKM, ANA, AMA, SMA, PCA, αντι-LC1 με έμμεσο ανοσοφθορισμό

Η ανίχνευση των αντι-LKM αντισωμάτων, καθώς και των ANA, SMA, AMA PCA και αντι-LC1, έγινε χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα κατεψυγμένες τομές ήπατος, νεφρού και στομάχου αρουραίων (Wistar rats).

Αναλυτικότερα, μετά από αφαίρεση του ήπατος, των νεφρών και του στομάχου των αρουραίων, κόβονταν τομές πάχους 7 μ m σε κρουτόμο (Leica CM 1850), που στη συνέχεια τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και φυλάσσονταν στους -20°C . Αρχικά, για το πείραμα γινόταν τοποθέτηση σε κάθε block ήπατος-νεφρού-στομάχου 200 μ l των δειγμάτων θετικών και αρνητικών μαρτύρων και των υπό εξέταση ορών σε αραιώση σε αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.15 mol/l, PH 7.4 (PBS), 1:40, 1:80, 1:160 και 1:320. Μετά από επώαση 40min σε υγρό περιβάλλον με θερμοκρασία περιβάλλοντος στο σκοτάδι, γινόταν πλύσιμο των πλακών με PBS (τρεις φορές) και κατόπιν, τοποθέτηση 200 μ l της αντι-ανθρώπινης IgG σε αραιώση 1:50, που ήταν συνδεδεμένη με φλουοροσκεΐνη (FITC conjugate, DAKO). Μετά από νέα επώαση 40min στις προαναφερθείσες συνθήκες, γινόταν πλύσιμο (τρεις φορές) και μετά από τοποθέτηση γλυκερόλης (1%), παρατήρηση των αποτελεσμάτων σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού (τύπος μικροσκοπίου: Axiolab, 35mm SLR Cameras, Zeiss). Θετικό θεωρήθηκε κάθε δείγμα με ανιχνεύσιμο φθορισμό σε αραιώση $\geq 1:40$.

2.3. Ανίχνευση ANA, AMA, SMA με έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα κυτταρικές σειρές λαρυγγικού καρκινώματος ανθρώπου (HEp2 κύτταρα).

Η ανίχνευση των ANA, AMA, SMA έγινε εκτός από τις τομές σε ιστούς τρωκτικών (βλέπε 2.2.) και μετά από χρήση εμπορικά διαθέσιμων πλακιδίων μονιμοποιημένων κυττάρων λαρυγγικού καρκινώματος ανθρώπου (NOVA Lite, HEp2 ANA kit, INOVA Diagnostics). Αρχικά τοποθετούνται στις θέσεις του πλακιδίου τα δείγματα των θετικών και αρνητικών μαρτύρων και των υπό

εξέταση ορών σε αραιώσεις 1:80, 1:160 και 1:320 και επωάζονται για 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στο σκοτάδι με ικανοποιητική υγρασία. Στη συνέχεια γίνεται πλύσιμο των πλακιδίων με PBS (δύο φορές για 10 min) και τοποθέτηση, μίας σταγόνας ανά θέση (=50μl), αντι-ανθρώπινης IgG συνδεδεμένης με φλουοροσκεΐνη (FITC conjugate). Μετά από νέα επώαση, στις προαναφερθείσες συνθήκες, για 30min και επανάληψη του πλυσίματος, γινόταν εκτίμηση των αποτελεσμάτων σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού (τύπος: AxioLab, 35mm SLR Cameras, Zeiss). Θετικό θεωρήθηκε κάθε δείγμα με ανιχνεύσιμο φθορισμό σε αραιώση $\geq 1:40$.

2.4. Ανίχνευση ANCA με έμμεσο ανοσοφθορισμό

Η ανίχνευση των ANCA, έγινε χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα πλακίδια, που φέρουν σε θέσεις μονιμοποιημένα σε αιθανόλη ουδετερόφιλα (NOVA Lite, ANCA kit, INOVA Diagnostics). Σε κάθε πείραμα τοποθετήθηκαν στις θέσεις των πλακιδίων τα δείγματα των θετικών και αρνητικών μαρτύρων καθώς και οι προς εξέταση οροί σε αραιώσεις 1:20, 1:40 και 1:80 και στη συνέχεια ακολουθείται η ίδια διαδικασία, που περιγράφηκε για την ανίχνευση των ANA, AMA, SMA σε υπόστρωμα HEp2. Θετικό θεωρήθηκε κάθε δείγμα με ανιχνεύσιμο φθορισμό σε αραιώση $\geq 1:20$.

2.5. Ανίχνευση IgG αντισωμάτων κατά καρδιολιπίνης (αντι-CL)

Οι τίτλοι των IgG αντι-CL αντισωμάτων προσδιορίστηκαν με μία ποσοτική στερεάς φάσης ανοσοενζυμική μέθοδο που αναπτύχθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Παθολογίας (8). Εν συντομία, έγινε στρώση πλακιδίων με επίπεδο πυθμένα (microtitre flat bottom plates) (Nunc, Roskilde

Denmark) με 25μl διαλύματος βοείου καρδιολιπίνης (Sigma, St Louis, MO, USA) σε απόλυτη αιθανόλη (50μg/ml). Τα πλακίδια αφέθηκαν να στεγνώσουν στους 0-4°C για 16-18 ώρες στο σκοτάδι. Στη συνέχεια μετά από τρεις φορές πλύσιμο με PBS γινόταν προσθήκη 100 μl/πηγάδι βοείου ορού (BS) 10% σε PBS και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά από μία φορά πλύσιμο με PBS, γινόταν προσθήκη 50 μl/πηγάδι των δειγμάτων (ασθενών, θετικών μαρτύρων και 10 υγιών ανά πλακίδιο) σε αραιώση 1:50 σε 10% BS, εις διπλούν και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από πλύσιμο του κάθε πλακιδίου πέντε φορές με PBS, γινόταν προσθήκη σε κάθε πηγάδι 50μl αντι-ανθρώπινης IgG αιγός συνδεδεμένης με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (alkaline phosphatase conjugated goat anti-human IgG, Seralab), σε αραιώση 1:2000 σε 10% BS. Μετά από νέα επώαση για 90min σε θερμοκρασία δωματίου το κάθε πλακίδιο πλενόταν με PBS (πέντε φορές). Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη του υποστρώματος [50 μl/πηγάδι p-nitrophenyl phosphate (Sigma) σε συγκέντρωση 1 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα διεθανολαμίνης, PH 9.8]. Μετά από επώαση 30 min στους 37°C στο σκοτάδι, γινόταν διακοπή της αντίδρασης με προσθήκη 50 μl/πηγάδι διαλύματος NaOH 3N. Τα αποτελέσματα (οπτική πυκνότητα, OD) διαβάζονταν σε 'ανιχνευτή' (Stat 2100) στα 405 nm με μήκος κύματος αναφοράς τα 630 nm. Η ειδικότητα και αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου έχουν καθοριστεί από εκτενή προκαταρκτικά πειράματα όπως έχει περιγραφεί σε παλαιότερες μελέτες (28,29,40-43). Σε κάθε πείραμα, οι πιθανές καθημερινές διακυμάνσεις των τιμών της OD ελαχιστοποιήθηκαν 'τρέχοντας' σειρά αραιώσεων του δείγματος ενός θετικού μάρτυρα (σταθερή καμπύλη) σε κάθε πλακίδιο όπως έχει ήδη περιγραφεί (7,28,29,40-43). Εν συντομία, η καμπύλη κατασκευάστηκε με

επαναλαμβανόμενες εξετάσεις δειγμάτων θετικών μαρτύρων για IgG αντι-CL αντισώματα σε σειρά αραιώσεων από 1:50 ως 1:6400. Η OD της αραιώσης 1:6400 επιλέχθηκε αυθαίρετα να αντιπροσωπεύει 1 μονάδα δέσμησης (BU, binding unit). Οι τιμές BU των υπό εξέταση δειγμάτων υπολογίστηκαν σύμφωνα με την καμπύλη του εκάστοτε πλακιδίου, διαιρώντας την OD κάθε υπό εξέταση δείγματος με την OD, που αντιστοιχούσε σε 1 BU του συγκεκριμένου πλακιδίου. Τελικά, η έκφραση των αποτελεσμάτων γινόταν ως δείκτης δέσμησης (BI, binding index), που υπολογιζόταν διαιρώντας την BU κάθε δείγματος με τη μέση τιμή των BU τιμών της ομάδας των υγιών μαρτύρων συν 4SD, πολλαπλασιαζόμενο επί 100. Σύμφωνα με αυτόν τον τύπο, το BI με τιμή 100 ορίστηκε ως το cut-off της μεθόδου. Η υιοθέτηση αυτού του υψηλού cut-off ελαχιστοποιεί την πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (7,28,29,40-43). Επιπλέον, με βάση παλαιότερες μελέτες (28,29,40), τιμές BI>200 ορίστηκαν ως πολύ θετικό αποτέλεσμα για IgG αντι-CL αντισώματα, ενώ τιμές BI μεταξύ 100 και 200 ορίστηκαν ως χαμηλά-μέτρια θετικές.

2.6. Ανίχνευση IgG αντισωμάτων κατά διπλής έλικας DNA (anti-dsDNA)

Αρχικά γινόταν στρώση των πλακιδίων με επίπεδο πυθμένα (Nunc, Roskilde Denmark), με L-πολυλυσίνη (συγκέντρωση 50μg/ml σε PBS) 50μl ανά πηγάδι του πλακιδίου και επώαση στους 37°C για 2 ώρες. Μετά από πλύσιμο του πλακιδίου με 100μl/πηγάδι PBS μία φορά, γινόταν προσθήκη 50μl/πηγάδι του αντιγόνου (φυσικό DNA 50μg/ml σε απιονισμένο H₂O). Μετά από επώαση για 1 ώρα στους 37°C γινόταν επώαση στο σκοτάδι στους 4°C

για 16-18 ώρες. Στη συνέχεια, μετά από πλύσιμο του πλακιδίου με 100μl/πηγάδι PBS (τρεις φορές), γινόταν προσθήκη S1-νουκλεάσης (100μl/πηγάδι, συγκέντρωση 50U/ml σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα, S1-nuclease buffer: 0.3M CH₃COONa, 0.05M NaCl, 0.01M ZnSO₄·H₂O, γλυκερόλη 5% και απεσταγμένο νερό, PH=4.6). Μετά από επώαση 1 ώρας στους 37⁰C γινόταν νέο πλύσιμο με 100μl/πηγάδι PBS (δύο φορές) και στη συνέχεια προσθήκη 100μl/πηγάδι BS 10% σε PBS. Μετά από νέα επώαση 1 ώρας σε θερμοκρασία περιβάλλοντος η διαδικασία συνεχιζόταν μέχρι τέλους όπως ακριβώς γινόταν στον προσδιορισμό των IgG αντι-CL αντισωμάτων, που περιγράφηκε παραπάνω (βλέπε 2.5.).

2.7. Ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της β2-γλυκοπρωτεΐνης I (αντι-β2-GPI)

Τα αντι-β2-GPI αντισώματα ανιχνεύθηκαν με εμπορικά διαθέσιμο kit ανοσοενζυμικής μεθόδου (ELISA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (QUANTA Lite™ β2 GPI IgG, INOVA Diagnostics). Εν συντομία, γινόταν προσθήκη (100μl/πηγάδι) των δειγμάτων (μαρτύρων, και ασθενών) στα πηγάδια των πλακιδίων πολυστερίνης του kit (στον πυθμένα των οποίων ήταν ήδη συνδεδεμένο το αντιγόνο, δηλαδή κεκαθαρμένη β2-GPI), εις διπλούν: οι μάρτυρες είχαν γνωστούς τίτλους αντι-β2-GPI αντισωμάτων, ενώ τα δείγματα προσθέτονταν σε αραιώση 1:101. Μετά από επώαση 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, γινόταν πλύσιμο των πλακιδίων 3 φορές με 200μl/πηγάδι HRP Wash buffer (που περιείχε: Tween 20, tris-buffered saline διαλυμένα σε απιονισμένο νερό). Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 100μl/πηγάδι αντι-ανθρώπινης IgG αιγός (HRP IgG conjugate), επώαση για 30min και πλύσιμο 3

φορές με το προαναφερθέν διάλυμα (HRP Wash buffer). Μετά από προσθήκη 100μl/πηγάδι χρωμογόνου (TMB Chromogen) και επώαση στο σκοτάδι για 30min σε θερμοκρασία δωματίου, γινόταν διακοπή της ενζυμικής αντίδρασης, προσθέτοντας 100μl/πηγάδι διάλυμα θειικού οξέος 0.344M (HRP Stop solution). Τα αποτελέσματα (οπτική πυκνότητα, OD) διαβάζονταν σε 'ανιχνευτή' (Stat 2100) στα 450 nm με μήκος κύματος αναφοράς τα 630nm. Η παρουσία ή απουσία αντι-β2-GPI αντισωμάτων προσδιορίζονταν συγκρίνοντας τη μέση τιμή της OD του κάθε δείγματος με αυτές της καμπύλης των πέντε μαρτύρων της μεθόδου. Τα αποτελέσματα εκφράζονταν ημιποσοτικά σε IgG αντι-β2-GPI μονάδες (SGU; θετικός τίτλος > 20 SGU, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή).

2.8. Άλλες μέθοδοι ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων

Οι 39 τυχαία επιλεγμένοι ασθενείς με ηπατίτιδα C [όπως περιγράφηκε στο εδάφιο 2.1.3.], ελέγχθηκαν περαιτέρω για παρουσία αντι-LKM αντισωμάτων με μεθόδους ανοσοαποτύπωσης (western blotting) σε ανθρώπινα μικροσώματα όπως έχει ήδη περιγραφεί (44-46). Οι ζώνες, που αντιστοιχούν στα 50 kDa θεωρήθηκαν τυπικές για την παρουσία αντι-LKM 1 αντισωμάτων, ενώ τα αντι-LKM 3 αντισώματα χαρακτηρίζονται από σχηματισμό ζώνης στα 55 kDa. Επιπλέον, οι 39 οροί ελέγχθηκαν με ανταγωνιστική ανοσοενζυμική μέθοδο για αντι-LKM 1 αντισώματα (αντι-KYT 2D6) χρησιμοποιώντας αυτοαντίσωμα αναφοράς, σύμφωνα με δημοσιευμένα πρωτόκολλα (25,47).

Από τους 39 ορούς εκείνοι που ήταν θετικοί για αντι-LKM αντισώματα τουλάχιστο με μία από τις χρησιμοποιηθείσες μεθόδους (ΕΑΦ σε τομές

ήπατος, νεφρού, στομάχου αρουραίου, ανοσοαποτύπωση και ανταγωνιστική ELISA) ελέγχθηκαν περαιτέρω με μεθόδους ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένο KYT 2D6 και ανασυνδυασμένο P450 2C9 (KYT 2C9, που αποτελεί στόχο των αντι-LKM 2 αντισωμάτων) ως αντιγόνα. Επιπλέον, οι οροί που στην ανοσοαποτύπωση σε ανθρώπινα μικροσώματα έδιναν 'μπάντα' στα 55 kDa ελέγχθηκαν και με μέθοδο ανοσοαποτύπωσης με τη χρήση ανασυνδυασμένης UGT (αυτοαντιγόνου στόχου των αντι-LKM 3 αντισωμάτων).

Τέλος, οι 39 αυτοί οροί ελέγχθηκαν για την παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι διαλυτών αντιγόνων ήπατος (αντι-SLA) με ανταγωνιστική ELISA χρησιμοποιώντας αυτοαντίσωμα αναφοράς, όπως έχει περιγραφεί παλαιότερα (48). Επιπρόσθετα, όσοι από τους ορούς ήταν θετικοί για AMA με ΕΑΦ σε τομές αρουραίου ελέγχθηκαν περαιτέρω με ανταγωνιστική ELISA χρησιμοποιώντας αντίσωμα αναφοράς έναντι της E2 υποομάδας της πυρουβικής δεϋδρογενάσης ή έναντι της E2 υποομάδας της δεϋδρογενάσης με κετοξέα με διακλαδιζόμενη αλυσό καθώς και με ανοσοαποτύπωση σε εκχύλισμα ηπατικών μιτοχονδρίων αρουραίου, όπως περιγράφεται σε δημοσιευμένα πρωτόκολλα (49).

Κατασκευή 'φορέων' που εκφράζουν τα αντιγόνα KYT 2A6, KYT 1A2 και KYT 2D6 (pCITE expression vectors).

Κατασκευή pCITE- KYT 2A6

Δημοσιευμένες αλληλουχίες του KYT 2A6 χρησιμοποιήθηκαν ώστε να κατασκευαστεί ένας 'φορέας' έκφρασης του KYT 2A6, pCITE- KYT 2A6 (GenEMBL, M33316 και M33318) (50). Δύο επικαλυπτόμενα τμήματα του

KYT 2A6 cDNA πολλαπλασιάστηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με ανάστροφη μεταγραφή (RT-PCR). Για τον πολλαπλασιασμό του 5' άκρου του 820 bp εκκινητή (primer) οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: 5'GACTGAATTC-CTGGCCTCAGGATGCTTC3' (τέσσερα επιπλέον νουκλεοτίδια – EcoR1 θέση – θέσεις νουκλεοτιδίων 4-22) και 5'ATGCGGATGAGAAAGGAGTC3' (νουκλεοτίδια θέσεων 805-824). Το άκρο 3' των θέσεων 726-1485 πολλαπλασιάστηκε με τη χρήση ζεύγους εκκινητών που αποτελούνταν από τις εξής ακολουθίες: 5'AGGGCTGGAGGACTT CATA3' (θέσεις 726-744) και 5'GATC-CTCGAGCGGCACAGCCCTCGCT CAGC3' (τέσσερα επιπλέον νουκλεοτίδια - *XhoI* θέση – θέσεις νουκλεοτιδίων 1481-1500). Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής έγινε με 500 ng RNA ολικού ανθρώπινου ήπατος, τους αντίστροφους εκκινητές και την ανάστροφη μεταγραφάση του ιού MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή (Life Technologies, Eggenstein, Germany). Ο πολλαπλασιασμός των μεταγραφέντων cDNAs έγινε με PCR χρησιμοποιώντας το ένζυμο Taq DNA πολυμεράση (Life Technologies, Eggenstein, Germany) και τους παραπάνω περιγραφέντες εκκινητές. Το cDNA πολλαπλασιάστηκε με 30 κύκλους PCR: στάδιο αποδιάταξης της διπλής έλικας (denaturation) για 1 min στους 94 °C, στάδιο πρόσδεσης εκκινητών (annealing) 2 min στους 50 °C, και στάδιο επιμήκυνσης (extension) για 3 min στους 72 °C. Ένα επιπλέον στάδιο επιμήκυνσης στους 72 °C για 7 min προστέθηκε στον τελευταίο κύκλο. Για να γίνει η σύνδεση των δύο προϊόντων της PCR, χρησιμοποιήθηκε μια κοινή *BamH1* θέση, εντοπισμένη στη θέση 777-782 και των δύο προϊόντων PCR. *BamH1* πέψη έγινε και στα δύο προϊόντα PCR και οι θέσεις περιορισμού της *BamH1* συνδέθηκαν με μία

T4 λιγκάση (New England Biolabs, Schwalbach, Germany). Το παραχθέν cDNA του KYT 2A6 περιορίστηκε από την EcoR1 και τη XhoI και κλωνοποιήθηκε μέσα στις αντίστοιχες θέσεις περιορισμού της περιοχής pCITE4a (Novagen, Heidelberg, Germany) του 'φορέα' έκφρασης. Η κλωνοποιημένη αλληλουχία του KYT 2A6 επιβεβαιώθηκε με ανάλυσή της (sequencing).

Κατασκευή του pCITE-KYT 1A2

Το αρχικό cDNA pBS/1A2, που χρησιμοποιήθηκε ως 'μήτρα' για την κλωνοποίηση του KYT 1A2 cDNA, ήταν ευγενική προσφορά του καθηγητού R.H. Tukey (UC San Diego). Το cDNA πολλαπλασιάστηκε χρησιμοποιώντας έναν 'προς τα εμπρός' εκκινητή με αλληλουχία: 5'CATT-GGATTCGCA TTGTCCAGTCTGTTCC3' (τέσσερα επιπλέον νουκλεοτίδια – BamH1 θέση – θέσεις: 4-23) και έναν 'ανάστροφο' εκκινητή με αλληλουχία 5'CTGACTCGAGTCTTCAATTGATGGAGAACG3' (τέσσερα επιπλέον νουκλεοτίδια – Xho1 θέση – θέσεις: 1534-1555). Ο πολλαπλασιασμός του cDNA έγινε με PCR χρησιμοποιώντας το ένζυμο Taq DNA πολυμεράση (Life Technologies, Eggenstein, Germany). Οι συνθήκες της PCR για τον πολλαπλασιασμό αυτό ήταν οι εξής: στάδιο αποδιάταξης για 1 min στους 94 °C, στάδιο πρόσδεσης εκκινητών για 2 min στους 50 °C και στάδιο επιμήκυνσης για 3 min στους 72 °C (σύνολο 30 κύκλοι PCR) και τέλος επιμήκυνση στους 72 °C για 10 min. Ένα μg του προϊόντος της PCR και 0.1 μg pCITE 4a 'φορέος' αναμίχθηκαν, διασπάστηκαν με τα BamH1 και Xho1 και στη συνέχεια συνδέθηκαν με μία T4 λιγκάση (New England Biolabs, Schwalbach, Germany). Και πάλι η κλωνοποιημένη αλληλουχία του KYT 2A6 επιβεβαιώθηκε με ανάλυσή της.

Κατασκευή του pCITE-KYT 2D6

Το cDNA για το KYT 2D6 πολλαπλασιάστηκε από ένα πλασμίδιο που το 'εξέφραζε', το pCW/DB11, το οποίο ήταν ευγενική χορηγία του καθηγητού Guengerich (Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA). Η έκφραση του cDNA για το KYT 2D6 στο πλασμίδιο βελτιώθηκε εισάγοντάς το σε *E. coli*, ενώ ο κλώνος περιείχε αλλαγές στα 96 N-τελικά ζεύγη βάσεων (51). Εφόσον ο σκοπός ήταν η *in vitro* έκφραση της 'φυσικής' πρωτεΐνης KYT 2D6, έγινε αλλαγή της N-τελικής αλληλουχίας σύμφωνα με εκείνη που αντιστοιχεί στο 'φυσικό' KYT 2D6. Για το σκοπό αυτό, πολλαπλασιάστηκαν τα πρώτα 255 ζεύγη βάσεων του KYT 2D6 με nested RT-PCR από ανθρώπινο ηπατικό RNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθοι: GTG CCA GGT GTG TCC AGA G (EMBL, M 33388, θέση 1576-1584) και GAG GGT CGT CGT ACT CGA AGC (EMBL, M 33388, θέση 3541-3562) ως πρώτη σειρά εκκινητών και οι GCA TGG ATC CGG GCT AGA AGC ACT GGT G (EMBL, M 33388, θέση 1623-1640 και στη θέση 5' 10 ζεύγη βάσεων επιπλέον συμπεριλαμβανομένου του BamH1) και CAG GAT CTG GGT GAT GGG CAC AG (EMBL, M 33388, θέση 2629-2652) ως δεύτερη σειρά εκκινητών πολλαπλασιασμού. Η C-τελική περιοχή των θέσεων 255-1485 πολλαπλασιάστηκε από το πλασμίδιο pCW/DB11 χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τους: GCC GGT GGT CGT GCT CAA TGG (EMBL, M 33388, θέση 2551-2571) και GAC TCT CGA GCT AGC GGG GCA CAG CAC AAA GCT C (EMBL, M 33388, θέση 5813-5836). Μία Eag1 θέση εντοπίζονταν στις θέσεις 254-259 και χρησιμοποιήθηκε για τη συγχώνευση του N-τελικού τμήματος του cDNA με το C-τελικό τμήμα. Και τα δύο τμήματα διασπάστηκαν από την Eag1. Το N-τελικό τμήμα περιορίστηκε περαιτέρω

από την BamH1 και το C-τελικό από την Xho1. Και τα δύο (N-τελικό και C-τελικό) παράγωγα της PCR συνδέθηκαν μεταξύ τους στο Eag1 τέλος τους, με αποτέλεσμα την κατασκευή ολόκληρου του μήκους του cDNA, το οποίο κλωνοποιήθηκε στις BamH1 και Xho1 περιοριζόμενες θέσεις του pCITE 4a. Η κλωνοποιημένη αλληλουχία του KYT 2A6 επιβεβαιώθηκε με ανάλυσή της.

Ανίχνευση των αντι-KYT 2A6, αντι-KYT 1A2 και αντι-KYT 2D6 αντισωμάτων με ραδιοδεσμευτική τεχνική (radioligand assay, RLA)

Οι 39 οροί ελέγχθηκαν για την παρουσία αντι-KYT 2A6, αντι-KYT 1A2 και αντι-KYT 2D6 αντισωμάτων με τη χρήση RLA. Η έκφραση του ανασυνδυασμένου KYT 2A6 έγινε με τη χρήση του συστήματος TNT T7 γρήγορης συνδυασμένης μεταγραφής-μετάφρασης (Quick Coupled Transcription Translation System, Promega, Madison, USA). Ένα μg cDNA και 1.85 MBq (50 μCi) [³⁵S]-μεθειονίνη (Amersham, UK) προστέθηκαν σε 40 μl TNT διάλυμα 'λύσης'. Νερό προστέθηκε σε τελικό όγκο 50 μl και έγινε in vitro μεταγραφή/ in vitro μετάφραση στους 30 °C για 90 min. Το in vitro μεταφρασθέν [³⁵S]-KYT 2A6 διαχωρίστηκε από την ελεύθερη [³⁵S]-μεθειονίνη με διήθηση σε γέλη σε μια στήλη Sephadex G10 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Η ποσότητα [³⁵S]-KYT 2A6 που ελήφθει ποσοτικοποιήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε γέλη SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) με τη χρήση αναλυτή Fujix Bas 1000 (Raytest, Straubenhardt, Germany). Η ποσοτική RLA έγινε όπως έχει ήδη αναλυτικά περιγραφεί (5). Σε όλες τις μεθόδους χρησιμοποιήθηκε 200000 cpm ³⁵S σημασμένη πρωτεΐνη στόχος για ανοσοκαθίζηση από 0.6 μl ορού ασθενούς και 50 μl πρωτεΐνης A σε σεφαρόζη (sepharose, BioRad, Munich, Germany). Οι ποσότητες της ³⁵S

σημασμένης πρωτεΐνης μετά την ανοσοκαθίζηση ποσοτικοποιήθηκαν με 'μέτρηση των σπινθηρισμών' (5). Τα δείγματα με τιμές πάνω από τη μέση τιμή των υγιών μαρτύρων συν 4 σταθερές αποκλίσεις (λόγω της ανωμαλίας της κατανομής) θεωρήθηκαν θετικά. Οι τιμές του cut-off ήταν τα 650 cpm για την ανίχνευση του KYT 2A6, τα 700 cpm για την ανίχνευση του KYT 1A2 και τα 897 cpm για την ανίχνευση του KYT 2D6. Η υιοθέτηση τόσο αυστηρών cut-off για ορισμό των θετικών δειγμάτων έγινε ώστε να αποφεύχθουν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Όλα τα θετικά δείγματα ελέγχθηκαν με τρία ανεξάρτητα πειράματα. Σε κάθε πείραμα, συμπεριλαμβάνονταν ένα ισχυρά θετικό και μερικά αρνητικά δείγματα. Ο μεταξύ των πειραμάτων συντελεστής μεταβλητότητας της μεθόδου ήταν 14.6% για την ανίχνευση του KYT 2A6, 5% για την ανίχνευση του KYT 1A2 και 9% για την ανίχνευση του KYT 2D6. Ο εσωτερικός συντελεστής μεταβλητότητας της μεθόδου ήταν 3.5% για την ανίχνευση του KYT 2A6, 6.5% για την ανίχνευση του KYT 1A2 και 11.8% για την ανίχνευση του KYT 2D6.

2.9. Στατιστική ανάλυση

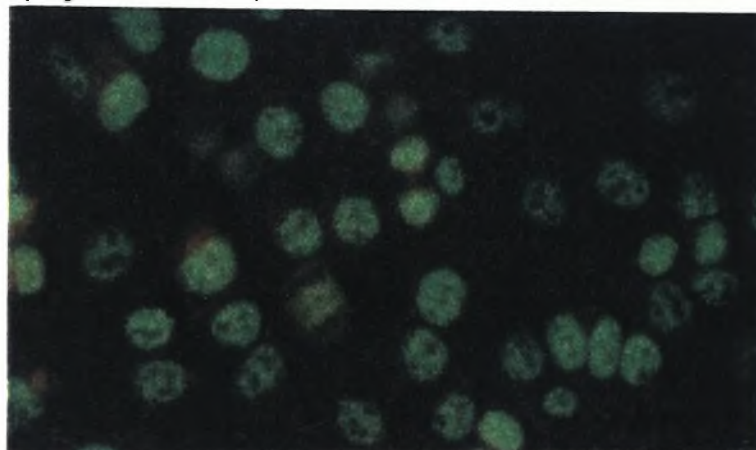
Όλοι οι στατιστικοί υπολογισμοί έγιναν σε Microsoft computer με τη χρήση του προγράμματος SPSS, 10^η έκδοση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm σταθερά απόκλιση. Τα ευρήματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τις παρακάτω στατιστικές μεθόδους: unpaired t-test, Mann-Whitney U test (MWU), χ^2 (2 x 2 μετά από διόρθωση κατά Yates), Fisher's exact test, Pearson χ^2 , Spearman's correlation coefficient, όπου ήταν εφαρμόσιμα. Στατιστικά σημαντική διαφορά θεωρήθηκε εκείνη όπου η διπλής κατεύθυνσης τιμή του P ήταν μικρότερη του 0.05 ($P < 0.05$). Τα όρια

αξιοπιστίας (95% CI) προσδιορίστηκαν βάση του τύπου $P = p \pm 1.96 (pq/n)^{1/2}$ (όπου p είναι η συχνότητα, q είναι το $1-p$ και n είναι ο αριθμός των ατόμων που ελέγχθηκαν από κάθε ομάδα).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Συχνότητα ανίχνευσης αντισωμάτων στους ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV (Πίνακας 3).

Εκατόν ενενήντα από τους 303 HCV ασθενείς είχαν θετικά ANA με την τεχνική του ΕΑΦ σε κύτταρα HEp2 (Εικόνα 1) (62.7%; 95% CI, 57.2-68.1%) (Πίνακας 3). Εκατόν δώδεκα από τους 190 ορούς παρουσίαζαν λεπτό στικτό φθορισμό (58.9%; 95% CI, 51.9-65.9%), 27 από τους 190 ομοιογενή (14.2%; 95% CI, 9.2-19.1%), και οι υπόλοιποι 51 είχαν: 30 πυρηνισκικό, 2 ομοιογενή και πυρηνισκικό μαζί, 7 λεπτό στικτό και πυρηνισκικό μαζί, 8 αδρό στικτό, 1 διακριτό στικτό, 1 πολλαπλές πυρηνικές κηλίδες και 2 οροί είχαν φθορισμό συμβατό με αντικεντρομεριδιακά αντισώματα (ΑΚΑ). Ο μέσος τίτλος των ANA ήταν 1:237(εύρος 1:40-1:1280).



Εικόνα 1. Φθορισμός ANA από ασθενή με λοίμωξη από τον HCV σε HEp2 (λεπτός στικτός φθορισμός).

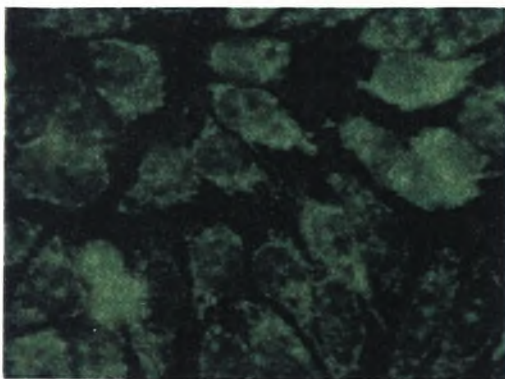
Με την τεχνική του ΕΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου ANA ανιχνεύτηκαν μόνο σε 12 από τους 303 HCV ασθενείς (Εικόνα 1) (4%; 95% CI, 1.8-6.2%, μέσος τίτλος 1:122). Από τους 12 αυτούς ασθενείς οι 11 είχαν θετικά ANA και στα HEp2, ενώ ένας είχε ανιχνεύσιμα ANA μόνο σε

τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου. Έτσι, συνολικά (και με τις δύο τεχνικές) ANA θετικά είχαν 191 από τους 303 ασθενείς (63%; 95% CI, 57.5-68.4%).

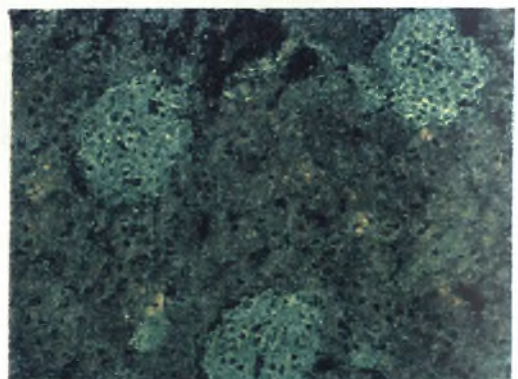
Πίνακας 3. Συχνότητα ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων στους 303 HCV θετικούς ασθενείς.

ΑΥΤΟ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	Μέθοδος προσδιορισμού αντισωμάτων	HCV ασθενείς (n = 228)	
		Θετικοί	Αρνητικοί
ANA	ΕΑΦ, ΗEr2 κύτταρα	190 (62.7%)	113 (37.3%)
SMA	ΕΑΦ, ΗEr2 κύτταρα	86 (28.4%)	217 (71.6%)
AMA	ΕΑΦ, ΗEr2 κύτταρα	19(6.3%)	284 (93.7%)
ANA	ΕΑΦ, τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίων	12 (4%)	191 (96%)
SMA	ΕΑΦ, τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίων	200 (66%)	103 (34%)
AMA	ΕΑΦ, τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίων	5 (1.7%)	298 (98.3%)
ANA	Σύνολο	191 (63%)	112 (37%)
SMA	Σύνολο	217 (71.6%)	86 (28.4%)
AMA	Σύνολο	23 (7.6%)	280 (92.4%)
Αντι-LKM	ΕΑΦ, τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίων	14 (4.6%)	289 (95.4%)
Αντι-LC1	ΕΑΦ, τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίων	9 (3%)	294 (97%)
PCA	ΕΑΦ, τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίων	26 (8.6%)	277 (91.4%)
ANCA	ΕΑΦ, ουδετερόφιλα	160 (52.8%)	143 (47.2%)
Αντι-CL	ELISA	62 (20.4%)	241 (79.6%)
Αντι-dsDNA	ELISA	79 (26.1%)	224 (73.9%)
Τουλάχιστο ένα θετικό αυτοαντίσωμα		273 (90.1%)	30 (9.9%)

Διακόσιοι ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV είχαν θετικά SMA με την τεχνική του ΕΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου (Εικόνα 2) (66%; 95% CI, 60.6-71.3%) (Πίνακας 3) με μέσο τίτλο 1:113 (εύρος 1:40-1:640). Από τα 200 θετικά δείγματα 38 (19%; 95% CI, 13.5-24.4%) παρουσίαζαν φθορισμό συμβατό με ειδικότητα κατά F-ακτίνης. Επιπλέον, με την ίδια τεχνική, 5 δείγματα ήταν θετικά για AMA (1.7%; 95% CI, 0.2-3.1%) (Πίνακας 3) με μέσο τίτλο 1:272 (εύρος 1:80-1:640). Με την τεχνική του ΕΑΦ σε κύτταρα HEp2, 10 οροί παρουσίαζαν μη ειδικό κυτταροπλασματικό φθορισμό (3.3%; 95% CI, 1.3-5.3%), 86 είχαν φθορισμό συμβατό με SMA (Εικόνα 2) (28.4%; 95% CI, 23.3-33.4%, μέσος τίτλος 1:134, εύρος 1:40-1:640) και 19 δείγματα είχαν φθορισμό συμβατό με AMA (6.3%; 95% CI, 3.5-9%, μέσος τίτλος 1:370, εύρος 1:80-1:1280). Συνολικά (με την τεχνική του ΕΑΦ σε κύτταρα HEp2 και σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου), θετικοί για SMA ήταν 217 ασθενείς (71.6%; 95% CI, 66.5-76.6%) και για AMA 23 ασθενείς (7.6%; 95% CI, 4.6-10.5%). Επιπλέον, θετικοί για ANA και SMA συγχρόνως ήταν 139 ασθενείς (45.9%; 95% CI, 40.3-51.5%).



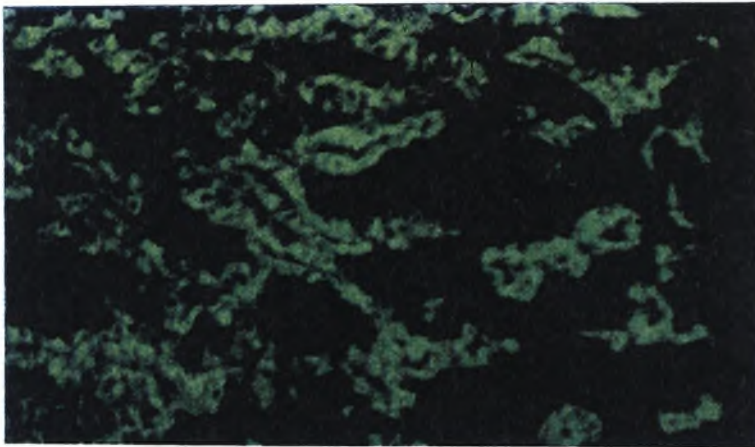
2.1. Φθορισμός SMA σε HEp2 κύτταρα



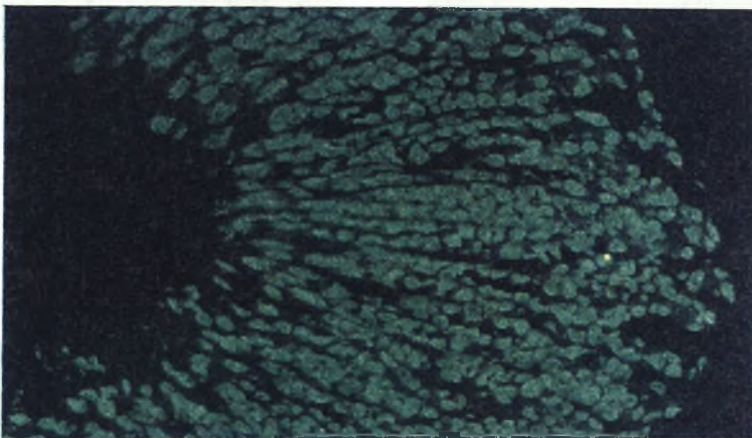
2.2. Φθορισμός SMA σε τομή νεφρού αρουραίου

Εικόνα 2. Φθορισμός SMA ασθενούς με λοίμωξη από τον HCV σε κύτταρα HEp2 (φθορισμός κυτταροπλάσματος) και σε τομή νεφρού αρουραίου (φθορισμός των νεφρικών σπειραμάτων).

Δεκατέσσερις από τους 303 HCV ασθενείς είχαν θετικά αντι-LKM αντισώματα (Εικόνα 3) [4.6%; 95% CI, 2.2-6.9%, δεκατρείς ασθενείς είχαν τυπικό αντι-LKM πρότυπο φθορισμού με ΕΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου (μέσος τίτλος 1:174, εύρος 1:40-1:640), ενώ ένας ήταν αρνητικός με την προαναφερθείσα τεχνική αλλά ήταν αντι-KYT 2D6 θετικός με μοριακές τεχνικές] (Πίνακας 3). Θετικά αντι-LC1 αντισώματα ανιχνεύτηκαν σε 9 από τους 303 ασθενείς (3%; 95% CI, 0.9-5.6%), ενώ θετικά PCA βρέθηκαν σε 26 ασθενείς (Εικόνα 4) (8.6%; 95% CI, 5.4-11.7%, με μέσο τίτλο 1:195 και εύρος 1:40-1:1280) (Πίνακας 3).

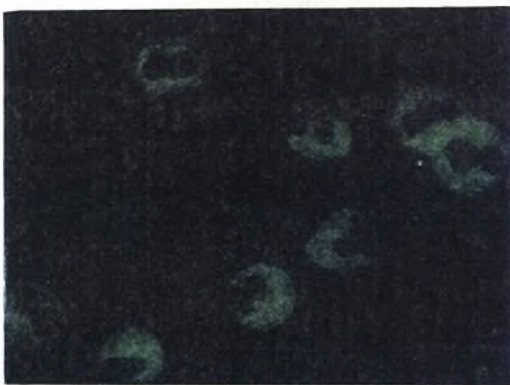


Εικόνα 3. Χαρακτηριστικός φθορισμός των αντι-LKM ασθενούς με λοίμωξη από τον HCV σε τομή νεφρού αρουραίου (φθορισμός των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων του νεφρού).

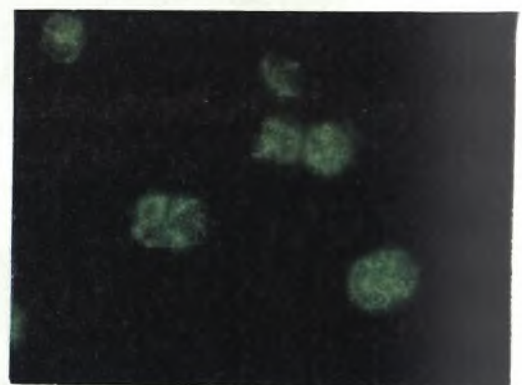


Εικόνα 4. Φθορισμός των PCA ασθενούς με λοίμωξη από τον HCV σε τομή στομάχου αρουραίου (φθορισμός των τοιχωματικών κυττάρων).

Επιπλέον, 160 από τους 303 ασθενείς είχαν θετικά ANCA (52.8%; 95% CI, 47.2-58.4%) (Πίνακας 3). Από αυτούς σε 131 ανιχνεύτηκαν 'άτυπα' cANCA (Εικόνα 5.1.) (81.8%; 95% CI, 75.8-87.7%, μέσος τίτλος 1:25, εύρος 1:20-1:160), 'άτυπα' pANCA ανιχνεύτηκαν σε 19 από τους 160 ANCA θετικούς ασθενείς (Εικόνα 5.2.) (11.8%; 95% CI, 6.8-16.8%, μέσος τίτλος 1:35, εύρος 1:20-1:160) και 'άτυπα' c+pANCA ανιχνεύτηκαν σε 10 από τους 160 ANCA θετικούς HCV ασθενείς (6.2%; 95% CI, 2.4-9.9%, μέσος τίτλος 1:26, εύρος 1:20-1:40). Ο ένας από τους δύο ορούς των ασθενών, που είχαν θετικά ΑΚΑ στα κύτταρα HEp2, εμφάνιζε φθορισμό παρόμοιο με ΑΚΑ στον πυρήνα των ουδετερόφιλων των μονιμοποιημένων με αιθανόλη, που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των ANCA, ενώ 19 οροί ασθενών με θετικά ANA στα Hep2 κύτταρα, εμφάνιζαν επίσης ομοιογενή φθορισμό του πυρήνα των ουδετερόφιλων (anti-neutrophil-nuclear antibodies, ANNA).



5.1. Κυτταροπλασματικός φθορισμός
(cANCA)



5.2. Περιπυρηνικός φθορισμός
(pANCA)

Εικόνα 5. Φθορισμός ANCA ασθενών με λοίμωξη από τον HCV σε ουδετερόφιλα μονιμοποιημένα σε αιθανόλη.

Εξήντα δύο από τους 303 ασθενείς είχαν θετικά αντι-CL αντισώματα (20.4%; 95% CI, 15.8-24.9%) (Πίνακας 3) με τίτλο 157.6 ± 90.5 BI (μέση τιμή, mean \pm σταθερή απόκλιση, SD), εύρος 100-660 BI, ενώ θετικά αντι-dsDNA ανιχνεύτηκαν σε 79 από τους 303 ασθενείς (26.1%; 95% CI, 21.1-31%) (Πίνακας 3) με τίτλο 149.3 ± 68.7 BI (mean \pm SD), εύρος 101-531 BI.

Συνολικά, 273 από τους 303 ασθενείς με HCV λοίμωξη ήταν θετικοί για ένα τουλάχιστο αυτοαντίσωμα (90.1%; 95% CI, 86.7-93.4%) (Πίνακας 3).

3.2. Συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων με δημογραφικά και επιδημιολογικά δεδομένα.

Η παρουσία κανενός από τα ελεγχθέντα αυτοαντισώματα δε σχετιζόταν με το φύλο και τη διάρκεια της λοίμωξης από τον HCV. Η παρουσία ή απουσία των ANA, όταν αυτά προσδιορίστηκαν με την τεχνική του ΕΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου βρέθηκε ότι συσχετιζόταν στατιστικά σημαντικά με την ηλικία (60 ± 12.6 έτη έναντι 48.5 ± 16.3 έτη αντίστοιχα, $p=0.021$, MWU test) (Πίνακας 5). Ωστόσο, η παρουσία ANA, όταν ανιχνεύτηκαν με ΕΑΦ σε κύτταρα HEP2 και των συνολικών ANA (και με τις δύο τεχνικές ανίχνευσης) δε συσχετιζόνταν με την ηλικία (Πίνακες 4,6). Επίσης, με την ηλικία σχετιζόνταν η παρουσία ή απουσία AMA (συνολικά, προσδιοριζόμενα με ΕΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου και σε κύτταρα HEP2) (55.5 ± 14.9 έτη έναντι 48.5 ± 16.3 έτη αντίστοιχα, $p=0.046$, t-test) και η παρουσία ή απουσία αντι-CL αντισωμάτων (52.9 ± 15.2 έτη έναντι 48.2 ± 16.5 έτη αντίστοιχα, $p=0.044$, t-test) (Πίνακες 6,8).

Πίνακας 4. Συσχέτιση των ANA, SMA και AMA (ανίχνευση σε κύτταρα HEp2) με δημογραφικά, επιδημιολογικά, κλινικά, ιστολογικά, ιολογικά δεδομένα.

	Αυτοαντισώματα					
	ANA (HEp2)		SMA (HEp2)		AMA (HEp2)	
	(+) n=190	(-) n=113	(+) n=86	(-) n=217	(+) n=19	(-) n=284
Ηλικία (έτη)	49±16	49±16.8	47.5±15.6	49.8±16.6	54.2±15.2	48.6±16.4
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	99/91	51/62	48/38	102/115	9/10	141/143
Διάρκεια λοίμωξης (έτη)	4.3±3.7	4±3.5	3.5±3.8	4.4±3.5	3.8±5.3	4.2±3.5
Πηγή μόλυνσης (βέβαιη/αβέβαιη)	96/94	60/53	46/40	110/107	9/10	147/137
Χρήση αλκοόλ (ναι/όχι)	33/105	20/83	11/36	42/152	3/9	50/179
Συμπτώματα (ναι/όχι)	45/94	23/79	10/38	58/135	6/5	62/168
Εξωηπατικές εκδηλώσεις (ναι/όχι)	5/134	4/100	1/47	8/187	0/12	9/222
HBsAg (+)/(-)	8/182	2/111	2/84	8/209	1/18	9/275
Δείκτες HBV (όλοι αρνητικοί/κάποιοι θετικοί)	104/50	59/45	41/22	122/73	9/4	154/91
AST (U/l)	55.3±40.7	50.4±52	62.9±31.2	50.7±48.8	52±33.3	53.2±46.6
ALT (U/l)	76.9±52.9	69.6±80	93.2±52.4*	66.3±67.2*	70.2±45.7	74.4±65.4
γGT (U/l)	46.8±55.3	49±80.7	58.7±75.4	45±65	51.9±53.5	47.6±68
ALP (U/l)	138.5±92.6	138±85.3	146.4±76	136.4±92.5	139.6±82.3	138.3±89.9
γ-σφαιρίνες (g/dl)	1.7±0.6	1.6±0.4	1.8±0.7	1.6±0.5	1.6±0.5	1.7±0.5
Θρομβοπενία (ναι/όχι)	40/147	15/93	16/70	39/170	3/15	52/225
Κίρρωση (ναι/όχι)	68/122*	17/96*	36/51	49/167	6/13	79/205
Χρ.ηπατίτιδα (ναι/όχι)	104/85	74/37	45/41	136/81	13/6	168/116
Κ.φ. τρανσαμινάσες (ναι/όχι)	17/173**	20/93**	5/81***	32/185***	0/19	37/247
Θεραπεία (ναι/όχι)	44/146	26/87	13/73 ^b	57/160 ^b	4/15	66/218
Φλεγμονή (ελάχιστη-ήπια/ μέτρια-έντονη)	57/49	30/29	27/16	60/62	5/7	82/71
Ίνωση (καθόλου-ήπια/ μέτρια-έντονη)	54/52	33/26	25/18	62/60	3/9	84/69
Γονότυπος (1b/μη1b)	52/62	25/28	22/35	55/55	8/5	69/85
Ίικό φορτίο (U/ml)	537410 ±334296	482369 ±334893	378658 ±339022	560741 ±321407	154900 ±79337	527958 ±331017

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση. P>0.05 (χ² διόρθωση κατά Yates, Fisher's exact test, t-test, Mann-Whitney U test). *P=0.001 (t-test). #P=0.000 (χ² διόρθωση κατά Yates). **P=0.035 (χ² διόρθωση κατά Yates). ***P=0.047 (χ² διόρθωση κατά Yates). ^bP=0.047 (χ² διόρθωση κατά Yates).

Επιπλέον, όταν οι ασθενείς χωρίστηκαν σε χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών και μη, η παρουσία αντι-dsDNA αντισωμάτων βρέθηκε να σχετίζεται με τη χρήση των ουσιών αυτών (26 από τους 67 χρήστες, 38.8%, και 53 από τους 236 λοιπούς ασθενείς, 22.5%, είχαν θετικά αντι-dsDNA

αντισώματα, $p=0.011$, χ^2). Επιπρόσθετα, η μέση τιμή των αντι-dsDNA αντισωμάτων διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των χρηστών και των υπόλοιπων ασθενών (101.3 ± 71.6 BI έναντι 79.4 ± 49.6 BI αντίστοιχα, $p=0.018$, MWU test). Αντίθετα, όταν οι ασθενείς χωρίστηκαν ανάλογα με το αν η πηγή μόλυνσης ήταν βέβαιη και αβέβαιη δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για κανένα από τα αυτοαντισώματα (Πίνακες 4,5,6,7,8,9).

Κανένα αυτοαντίσωμα δε συσχετιζόταν στατιστικά σημαντικά με διάφορους επιδημιολογικούς παράγοντες (ιστορικό εγχειρήσεων στο παρελθόν, τατουάζ, ενέσεις με κοινόχρηστες σύριγγες, παραδοσιακές πρακτικές, σεξουαλική συμπεριφορά), την κατάχρηση αλκοόλ και τη λήψη φαρμάκων. Εξαίρεση, βρέθηκε να αποτελούν τα αντι-CL αντισώματα και τα ANCA: η παρουσία των πρώτων σχετιζόταν με την κατάχρηση αλκοόλ (θετικά αντι-CL ανιχνεύτηκαν σε 17 από τους 53 HCV ασθενείς με γνωστό ιστορικό κατάχρησης αλκοόλ (32.1%) και σε 34 από τους 188 ασθενείς με αρνητικό ιστορικό κατάχρησης αλκοόλ (18.1%), $p=0.044$, χ^2) (Πίνακας 8) και των δεύτερων με το ιστορικό διενέργειας παραδοσιακών πρακτικών (θετικά ANCA ανιχνεύτηκαν σε 43 από τους 77 HCV ασθενείς με γνωστό ιστορικό διενέργειας παραδοσιακών πρακτικών (55.8%) και σε 64 από τους 159 ασθενείς με αρνητικό ιστορικό (40.3%), $p=0.034$, χ^2). Παρ' όλα αυτά, όταν συγκρίθηκαν οι μέσες τιμές των αντι-CL αντισωμάτων των ασθενών με ιστορικό κατάχρησης αλκοόλ και αυτών με αρνητικό ιστορικό κατάχρησης, δε βρέθηκε να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (78.9 ± 39.5 BI έναντι 74.9 ± 70.8 BI αντίστοιχα, $p=0.695$, t-test).

Πίνακας 5. Συσχέτιση των ANA, SMA και AMA (ανίχνευση σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου) με δημογραφικά, επιδημιολογικά, κλινικά, ιστολογικά, ιολογικά δεδομένα.

	Αυτοαντισώματα					
	ANA (αρουραίος)		SMA (αρουραίος)		AMA (αρουραίος)	
	(+) n=12	(-) n=291	(+) n=200	(-) n=103	(+) n=5	(-) n=298
Ηλικία (έτη)	60±12.6 [#]	48.5±16.3 [#]	49.1±15.8	48.7±17.4	56.6±16.3	48.9±16.3
Φύλο (άνδρες / γυναίκες)	6/6	144/147	102/98	48/55	1/4	149/149
Διάρκεια λοίμωξης (έτη)	4.6±3.6	4.2±3.6	4.1±3.6	4.4±3.6	3.3±3.8	4.2±3.6
Πηγή μόλυνσης (βέβαιη / αβέβαιη)	3/9	155/136	101/99	57/46	3/2	155/143
Χρήση αλκοόλ (ναι / όχι)	2/8	51/180	36/109	17/79	0/5	53/183
Συμπτώματα (ναι / όχι)	2/8	66/165	46/98	22/75	1/4	87/169
Εξωηπατικές εκδηλώσεις (ναι/όχι)	1/9	8/225	5/141	4/93	0/5	9/229
HBsAg (+) /(-)	0/12	10/281	5/195	5/98	2/3*	8/290*
Δείκτες HBV (αρνητικοί/ κάποιοι θετικοί)	12/0 ^{###}	151/95 ^{###}	101/64	62/31	1/1	162/94
AST (U/l)	56.8±27.5	53±46.6	55±50.5	50.3±38	114.6±91.8 [§]	51.9±44 [§]
ALT (U/l)	69.5±36.2	74.4±65.2	77.5±62.4	67.4±67.9	91.2±51.5	73.9±64.5
γGT (U/l)	80.8±77.4	46.4±66.7	50.4±63.7	43.7±72.5	82±44.2	47±67.5
ALP (U/l)	173.2±85.6	136.7±88.6	140.7±92	135±85.5	203±70	137±89.3
γ-σφαιρίνες (g/dl)	1.6±0.5	1.7±0.5	1.7±0.5	1.7±0.5	1.9±0.5	1.7±0.5
Θρομβοπενία (ναι / όχι)	4/8	51/232	33/164	22/76	2/3	53/237
Κίρρωση (ναι / όχι)	5/7	80/211	66/134 ^{**}	19/84 ^{**}	1/4	84/214
Χρ.ηπατίτιδα (ναι / όχι)	6/6	175/116	111/89	70/33	4/1	177/121
Κ.φ. τρανσαμινάσες (ναι / όχι)	1/11	36/252	23/177	14/89	0/5	37/261
Θεραπεία (ναι / όχι)	3/9	67/224	37/163 [†]	33/70 [†]	2/3	68/230
Φλεγμονή (ελάχιστη-ήπια / μέτρια-έντονη)	3/2	84/76	59/45	28/33	1/1	86/77
Ίνωση (καθόλου-ήπια / μέτρια-έντονη)	3/2	84/76	54/50	33/28	0/2	87/76
Γονότυπος (1b / μη1b)	4/2	73/88	52/63	25/27	1/0	76/90
Ιικό φορτίο (U/ml)	427310 ±597773	517679 ±328142	497724 ±326297	532984 ±344911		514393 ±332563

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση. P>0.05 (χ² διόρθωση κατά Yates, Fisher's exact test, t-test, Mann-Whitney U test). [#]P=0.021 (MWU test). ^{###}P=0.005 (Fisher's exact test). *P=0.009 (Fisher's exact test). **P=0.016 (χ² διόρθωση κατά Yates). [†]P=0.012 (χ² διόρθωση κατά Yates). [§]P=0.049 (MWU test)

Όσον αφορά στους δείκτες ηπατίτιδας Β, η παρουσία θετικού HBsAg σχετιζόταν με την ανίχνευση AMA σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου (θετικά AMA ανιχνεύτηκαν σε 2 από τους 10 HCV ασθενείς με θετικό HBsAg (20%) και σε 3 από τους 293 με αρνητικό HBsAg (1%),

$p=0.009$, Fisher exact test), ενώ δε σχετιζόταν με την ανίχνευση των AMA σε κύτταρα HEp2 και τα συνολικά AMA (και με τις δύο τεχνικές) (Πίνακες 4,5,6). Επιπλέον, η ύπαρξη αρνητικών δεικτών ηπατίτιδας Β σχετιζόταν με την ανίχνευση ANA τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου (θετικά ANA ανιχνεύτηκαν σε 12 από τους 163 HCV ασθενείς με αρνητικούς δείκτες (7.4%) και σε κανένα από τους υπόλοιπους ασθενείς (0%), $p=0.005$, Fisher exact test) (Πίνακας 5). Εντούτοις, κανένας από τους δείκτες, όπως και η παρουσία ή όχι αρνητικών δεικτών, δε σχετιζόταν με την ανίχνευση ANA σε κύτταρα HEp2 ή την παρουσία ANA συνολικά (και με τις δύο τεχνικές) (Πίνακες 4,6).

3.3. Συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων με κλινικά, εργαστηριακά στοιχεία και λήψη ειδικής αντι-ιικής θεραπείας.

Η θετικότητα κανενός αυτοαντισώματος δε σχετίζονταν με την παρουσία ή απουσία συμπτωμάτων κατά τη διάγνωση της λοίμωξης από τον HCV και την παρουσία ή απουσία εξηπατικών εκδηλώσεων σαφώς σχετιζόμενων με την ηπατίτιδα C (Πίνακες 4,5,6,7,8,9). Παρ' όλα αυτά, εξετάζοντας τους ασθενείς με θετικά ANCA, η παρουσία συμπτωμάτων κατά τη διάγνωση της λοίμωξης ήταν συχνότερη στους ασθενείς με θετικά άτυπα pANCA σε σχέση με εκείνους με θετικά άτυπα cANCA (10 από τους 18 ασθενείς με θετικά άτυπα pANCA (55.6%) ανέφεραν συμπτώματα κατά τη διάγνωση της λοίμωξης έναντι 22 από τους 83 με θετικά άτυπα cANCA (26.5%), $p=0.034$, χ^2). Όσον αφορά τα αντι-CL αντισώματα, τόσο η παρουσία τους όσο και ο μέσος τίτλος τους δε βρέθηκε να σχετίζεται με την ύπαρξη ή όχι ιστορικού φλεβικής ή/και αρτηριακής θρόμβωσης και καθ' ἑξιν αποβολών (στις γυναίκες) (Πίνακας 8).

Πίνακας 6. Συσχέτιση των ANA, SMA, AMA (συνολικά, ανιχνευόμενων με ΕΑΦ σε κύτταρα ΗΕρ2 και σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου) με δημογραφικά, επιδημιολογικά κλινικά, ιστολογικά, ιολογικά δεδομένα.

	Αυτοαντισώματα					
	ANA (σύνολο)		SMA (σύνολο)		AMA (σύνολο)	
	(+) n=191	(-) n=112	(+) n=217	(-) n=86	(+) n=23	(-) n=280
Ηλικία (έτη)	49±16	48.9±16.9	49.2±15.9	48.5±17.5	55.5±14.9 ^b	48.5±16.3 ^b
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	99/92	51/61	109/108	41/45	10/13	140/140
Διάρκεια λοίμωξης (έτη)	4.3±3.7	4±3.5	4±3.6	4.6±3.6	3.7±4.9	4.2±3.5
Πηγή μόλυνσης (βέβαιη/ αβέβαιη)	96/95	62/50	112/105	46/40	11/12	147/133
Χρήση αλκοόλ (ναι/όχι)	33/106	20/82	36/122	17/66	3/13	50/175
Συμπτώματα (ναι/όχι)	45/95	23/78	47/111	21/62	7/8	61/165
Εξωηπατικές εκδηλώσεις (ναι/όχι)	5/135	4/99	6/154	3/80	0/16	9/218
HBsAg (+) / (-)	8/183	2/110	6/211	4/82	2/21	8/272
Δείκτες HBV (αρνητικοί/ κάποιοι θετικοί)	105/50	58/45	113/67	50/28	10/5	153/90
AST (U/l)	55±40.6	50.6±52.6	55.6±48.7	48.4±40	73.6±63.9	51.8±44.4
ALT (U/l)	76.7±52.8	69.9±80.5	77.7±61	64.7±72	76.2±47.2	74±65.5
γGT (U/l)	46.6±55.2	49.3±81	49.3±61.5	44.7±77.7	55.6±47.7	47.2±68.4
ALP (U/l)	138.7±92.3	138±85.7	140.9±90.5	133.6±87.5	153.2±81	137.4±90
γ-σφαιρίνες (g/dl)	1.7±0.6	1.5±0.4	1.7±0.5	1.7±0.5	1.7±0.5	1.7±0.5
Θρομβοπενία (ναι/όχι)	40/148	15/92	40/174	15/66	5/17	50/223
Κίρρωση (ναι/όχι)	68/123*	17/95*	72/145 [#]	13/73 [#]	7/16	78/202
Χρ.ηπατίτιδα (ναι/όχι)	105/86**	76/36**	122/95	59/27	16/7	165/115
Κ.φ. τρανσαμινάσες (ναι/όχι)	18/173	19/93	23/194	14/72	0/23	37/243
Θεραπεία (ναι/όχι)	44/147	26/86	43/174 ^{###}	27/59 ^{###}	6/17	64/216
Φλεγμονή (ελάχιστη-ήπια/ μέτρια-έντονη)	58/49	29/29	64/51	23/27	5/8	82/70
Ίνωση (καθόλου-ήπια/ με-τρια-έντονη)	55/52	32/26	59/56	28/22	3/10	84/68
Γονότυπος (1b/μη 1b)	53/62	24/28	56/69	21/21	9/5	68/85
Ιικό φορτίο (U/ml)	546882 ±333501	465659 ±332814	448200 ±334563	613681 ±310835	154900 ±79337	527958 ±331017

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση. P>0.05 (χ² διόρθωση κατά Yates, Fisher's exact test, t-test, Mann-Whitney U test). *P=0.000 (χ² διόρθωση κατά Yates). **P=0.045 (χ² διόρθωση κατά Yates). #P=0.004 (χ² διόρθωση κατά Yates). ###P=0.045 (χ² διόρθωση κατά Yates). ^bP=0.046 (t-test).

Από τους 26 ασθενείς με θετικά PCA κανείς δεν είχε ενδείξεις μακροκυττάρωσης, τα επίπεδα της B₁₂ ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια και η

ενδοσκόπηση του ανωτέρου πεπτικού είχε ενδείξεις γαστρικής ατροφίας σε έναν μόνο ασθενή (ο οποίος είχε τίτλο PCA 1:1280).

Επιπρόσθετα, η θετικότητα για τα ANA [ανιχνευόμενα με ΕΑΦ σε κύτταρα HEP2 καθώς και τα συνολικά, ανιχνευόμενα και με τις δύο τεχνικές (ΕΑΦ σε κύτταρα HEP2 και σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου)], τα SMA (ανιχνευόμενα με ΕΑΦ σε κύτταρα HEP2, σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου, καθώς και συνολικά, ανιχνευόμενα και με τις δύο τεχνικές), τα ANCA και τέλος η θετικότητα ενός τουλάχιστο αντισώματος συσχετιζόνταν στατιστικά σημαντικά με την παρουσία κίρρωσης (Πίνακες 4,5,6,8,9).

Συγκεκριμένα, θετικά ANA, συνολικά (και με τις δύο χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανίχνευσης), είχαν οι 68 από τους 85 ασθενείς με HCV-σχετιζόμενη κίρρωση (80%), έναντι 123 από τους 218 μη κίρρωτικούς (56.4%) ($p=0.000$, χ^2) (Πίνακας 6). Θετικά SMA σε κύτταρα HEP2, σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου και συνολικά είχαν αντίστοιχα οι 36 (42.4%), οι 66 (77.6%) και οι 72 (84.7%) από τους 85 κίρρωτικούς, έναντι 51 (23.4%), 134 (61.4%) και 146 (66.9%) από τους 218 ασθενείς χωρίς κίρρωση αντίστοιχα ($p=0.002$, $p=0.016$ και $p=0.004$ αντίστοιχα) (Πίνακες 4,5,6). Θετικά ANCA και ένα τουλάχιστο θετικό αυτοαντίσωμα είχαν 64 (75.3%) και 83 (97.6%) από τους 85 κίρρωτικούς ασθενείς αντίστοιχα, έναντι 96 (44%) και 190 (87%) από τους 218 ασθενείς χωρίς κλινικά στοιχεία κίρρωσης αντίστοιχα ($p=0.000$ και $p=0.01$ αντίστοιχα, χ^2) (Πίνακες 8,9). Επιπλέον, ενώ η παρουσία ή απουσία αντι-CL αντισωμάτων δε σχετιζόνταν με την παρουσία ή απουσία κίρρωσης, η μέση τιμή των αντι-CL αντισωμάτων ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στους ασθενείς με HCV-κίρρωση σε σχέση με τους ασθενείς

χωρίς κλινικά στοιχεία κίρρωσης (89.8 ± 67.5 BI έναντι 70.3 ± 58.1 BI, αντίστοιχα, $p=0.013$, t-test). Επιπρόσθετα, η θετικότητα για ANA (συνολικά,

Πίνακας 7. Συσχέτιση των αντι-LKM, αντι-LC1, PCA με δημογραφικά, επιδημιολογικά, κλινικά ιστολογικά, ιολογικά δεδομένα.

	Αυτοαντισώματα					
	Αντι-LKM		Αντι-LC1		PCA	
	(+) n=14	(-) n=289	(+) n=9	(-) n=294	(+) n=26	(-) n=277
Ηλικία (έτη)	49.1±14.3	49±16.4	48.8±16.3	55.4±17.9	53±14.3	48.6±16.5
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	6/8	144/145	4/5	146/148	11/15	139/138
Διάρκεια λοίμωξης (έτη)	3.1±3.2	4.2±3.6	4.2±3.6	3.8±3.3	4.9±3.5	4.1±3.6
Πηγή μόλυνσης (βέβαιη/αβέβαιη)	6/8	152/137	4/5	154/140	10/16	148/129
Χρήση αλκοόλ (ναι/όχι)	2/6	51/182	2/6	51/182	3/14	50/174
Συμπτώματα (ναι/όχι)	1/7	67/166	2/6	66/167	4/13	64/160
Εξωηπατικές εκδηλώσεις (ναι/όχι)	0/8	9/226	1/7	8/227	1/16	8/218
HBsAg (+) / (-)	0/14	10/279	0/9	10/284	0/26	10/267
Δείκτες HBV (αρνητικοί/κάποιοι θετικοί)	3/6	160/89	4/3	159/92	17/4	146/91
AST (U/l)	52±33.6	53.2±46.4	53±44.9	57.7±76	38±17.7	54.4±47.3
ALT (U/l)	67±39	74.5±65	74.6±64.2	62.3±69	63.3±48.1	75.2±65.6
γGT (U/l)	23.2±13.6	48.6±68.2	47.7±67.9	48±49.5	25±16.2	49.5±69.4
ALP (U/l)	125.7±62.3	138.8±90.2	138.7±89.8	130.3±80.8	145.9±77	137.8±90.4
γ-σφαιρίνες (g/dl)	1.8±0.3	1.7±0.5	1.7±0.5	1.6±0.5	1.5±0.4	1.7±0.5
Θρομβοπενία (ναι/όχι)	2/9	53/231	2/7	53/233	3/23	52/217
Κίρρωση (ναι/όχι)	6/8	82/207	3/6	82/212	8/18	77/200
Χρ.ηπατίτιδα (ναι/όχι)	9/5	172/117	5/4	176/118	18/8	163/114
Κ.φ. τρανσαμινάσες (ναι/όχι)	2/12	35/254	1/8	36/258	0/26	37/240
Θεραπεία (ναι/όχι)	2/12	68/221	0/9	70/224	11/15*	59/218*
Φλεγμονή (ελάχιστη-ήπια/μέτρια-έντονη)	3/3	84/75	3/3	84/75	10/6	77/72
Ίνωση (καθόλου-ήπια/μέτρια-έντονη)	3/3	84/75	3/3	84/75	7/9	80/69
Γονότυπος (1b/μη 1b)	4/4	73/86	2/3	75/87	13/4 [#]	64/86 [#]
Ιικό φορτίο (U/ml)	515500 ±473054	514351 ±332488	514455 ±335685	511000	515500 ±473054	514351 ±332488

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση. $P>0.05$ (χ^2 διόρθωση κατά Yates, Fisher's exact test, t-test, Mann-Whitney U test). * $P=0.029$ (χ^2 διόρθωση κατά Yates). [#] $P=0.017$ (χ^2 διόρθωση κατά Yates)

και με τις δύο χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανίχνευσης) και ANCA σχετίζονταν αρνητικά με την παρουσία χρόνιας ηπατίτιδας με βιοχημική δραστηριότητα

(θετικά ANA και ANCA είχαν οι 105 (58%) και οι 80 (44.2%) από τους 181 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα αντίστοιχα, έναντι 86 (70.5%) και 80 (65.6%) από τους 122 ασθενείς χωρίς χρόνια ηπατίτιδα με βιοχημική δραστηριότητα αντίστοιχα ($p=0.045$ και $p=0.000$ αντίστοιχα, χ^2) (Πίνακας 6,8). Τέλος, με την παρουσία χρόνιας λοίμωξη από τον HCV με φυσιολογικές τρανσαμινάσες σχετιζόνταν αρνητικά η παρουσία ANA και SMA ανιχνευόμενα με ΕΑΦ σε κύτταρα HEp2 (θετικά ANA και SMA είχαν οι 17 (45.9%) και οι 5 (13.5%) από τους 37 ασθενείς με χρόνια λοίμωξη από τον HCV με φυσιολογικές τρανσαμινάσες, έναντι 173 (65%) και 81 (30.4%) από τους υπόλοιπους ασθενείς, $p=0.035$ και $p=0.047$ αντίστοιχα, χ^2) (Πίνακας 4).

Όσον αφορά στη συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων με τα εργαστηριακά στοιχεία, η θετικότητα κανενός από αυτά δε βρέθηκε να σχετίζεται με τις τιμές της γGT και της ALP. Η παρουσία AMA (ανιχνευόμενων με ΕΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου) σχετιζόνταν με υψηλότερη μέση τιμή της AST σε σχέση με τη μέση τιμή της AST των ασθενών με αρνητικά AMA (114.6 ± 91.8 έναντι 51.9 ± 44 αντίστοιχα, $p=0.049$, MWU test) (Πίνακας 5). Η παρουσία SMA (ανιχνευόμενων με ΕΑΦ σε κύτταρα HEp2) σχετιζόνταν με υψηλότερη μέση τιμή της ALT σε σχέση με τη μέση τιμή της ALT των ασθενών με αρνητικά SMA (93.3 ± 52.4 έναντι 66.4 ± 67.2 αντίστοιχα, $p=0.001$, t-test) (Πίνακας 4), ενώ η παρουσία ή απουσία ανίχνευσης SMA με ΕΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου και συνολικά (και με τις δύο τεχνικές) δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές της ALT (Πίνακες 5,6). Επίσης, η θετικότητα για τα ANCA σχετιζόνταν τόσο με υψηλότερη μέση τιμή AST όσο και ALT σε σχέση με τη μέση τιμή της AST και ALT των ασθενών με αρνητικά ANCA (AST: 62.2 ± 57.1 έναντι 45.7 ± 32.5 ,

αντίστοιχα, $p=0.014$, MWU test και ALT: 84.5 ± 74.1 έναντι 62.7 ± 49.1 , αντίστοιχα, $p=0.004$, t-test) (Πίνακας 8). Επιπλέον, η παρουσία θετικών αντι-CL και αντι-dsDNA αντισωμάτων συσχετιζόνταν με υψηλότερες μέσες τιμές γ-σφαιρινών (1.9 ± 0.6 έναντι 1.6 ± 0.5 αντίστοιχα για τους ασθενείς με θετικά και αρνητικά αντι-CL, $p=0.011$, t-test και 1.9 ± 0.5 έναντι 1.6 ± 0.5 αντίστοιχα για τους ασθενείς με θετικά και αρνητικά αντι-dsDNA, $p=0.001$, t-test) (Πίνακας 8). Ήταν ενδιαφέρον ότι, ενώ η παρουσία αντι-CL αντισωμάτων δε συσχετιζόνταν με την ύπαρξη θρομβοπενίας (Πίνακας 8), η μέση τιμή του τίτλου των αντι-CL αντισωμάτων μεταξύ των ασθενών με και χωρίς θρομβοπενία διέφερε στατιστικά σημαντικά (92.4 ± 77.7 BI έναντι 72.1 ± 56.6 BI αντίστοιχα, $p=0.027$, t-test). Επιπλέον, η μέση τιμή των αιμοπεταλίων των ασθενών με θετικά αντι-CL αντισώματα ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση εκείνη των ασθενών με αρνητικά αντι-CL αντισώματα (178164 ± 78020 έναντι 205209 ± 82538 αντίστοιχα, $p=0.02$, t-test).

Η λήψη θεραπείας για την λοίμωξη από τον HCV βρέθηκε να σχετίζεται με την παρουσία θετικών PCA (θετικά PCA ανιχνεύτηκαν σε 11 από τους 70 ασθενείς που βρίσκονταν σε θεραπεία με α-IFN (15.7%), έναντι 15 ασθενών από τους 233 που δεν έπαιρναν αντι-ηική αγωγή (6.4%), $p=0.029$, χ^2) (πίνακας 7). Επίσης, η παρουσία SMA ανεξαρτήτως της τεχνικής ανίχνευσής τους και συνολικά (και με τις δύο χρησιμοποιούμενες τεχνικές) σχετιζόνταν αρνητικά με τη λήψη αντι-ηικής αγωγής (θετικά τα SMA συνολικά και με τις δύο τεχνικές είχαν οι 43 από τους 70 ασθενείς που ελάμβαναν αντι-ηική θεραπεία (61.4%) έναντι 174 από τους 233 ασθενείς που δεν ελάμβαναν αντι-ηική θεραπεία (74.7%), $p=0.045$, χ^2) (Πίνακες 4,5,6).

Πίνακας 8. Συσχέτιση των ANCA, αντι-CL, αντι-dsDNA αντισωμάτων με δημογραφικά, επιδημιολογικά, κλινικά, ιστολογικά, ιολογικά δεδομένα.

	Αυτοαντισώματα					
	ANCA		Αντι-CL		Αντι-dsDNA	
	(+) n=160	(-) n=143	(+) n=62	(-) n=241	(+) n=79	(-) n=224
Ηλικία (έτη)	48.8±16.1	49±16.6	52.9±15.1 ^⓪	48.2±16.5 ^⓪	49.3±16.2	48.2±16.8
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	84/76	66/77	35/27	115/126	41/38	109/115
Διάρκεια λοίμωξης (έτη)	4.2±3.8	4.2±3.4	4.5±3.8	4.1±3.5	4±3.7	4.6±3.4
Πηγή μόλυνσης (βέβαιη/ αβέβαιη)	79/81	79/64	35/27	123/118	43/36	115/109
Χρήση αλκοόλ (ναι/όχι)	29/82	24/106	17/34 [Ⓢ]	36/154 [Ⓢ]	17/48	36/140
Συμπτώματα (ναι/όχι)	34/77	34/96	15/35	53/138	19/47	49/126
Εξωηπατικές εκδηλώσεις (ναι/όχι)	4/108	5/126	4/47	5/187	1/65	8/169
HBsAg (+) / (-)	6/154	4/139	5/57	5/236	3/76	7/217
Δείκτες HBV (αρνη- τικοί/κάποιοι θετικοί)	80/49	83/46	36/15	127/80	44/25	119/70
AST (U/l)	62.2±57.2*	45.9±32.5*	60.2±45.5	51.4±46.1	53±48.9	53.6±37.6
ALT (U/l)	84.5±74.1**	62.7±49.1**	69.7±50.2	75.3±67.5	75.9±69.7	69.4±46.4
γGT (U/l)	57±91	40±35.9	53.8±48.7	45.3±71.7	50.4±74.9	40.7±40.3
ALP (U/l)	139.9±99.8	137.1±79.9	142.5±76.7	134.3±92	140.7±94.5	132.2±74.5
γ-σφαιρίνες (g/dl)	1.6±0.5	1.7±0.5	1.9±0.6***	1.6±0.5***	1.6±0.5 [†]	1.9±0.5 [†]
Αιμοπετάλια (x10 ³ /mm)	192.5±80.3	207.5±83.8	178±78 ^{ⓈⓈ}	205.2±82.5 ^{ⓈⓈ}	200.8±79.5	196±89.7
Θρομβοπενία (ναι/όχι)	33/123	22/117	17/44	38/196	19/59	36/181
Θρόμβωση (ναι/όχι)			3/48	7/185		
Αποβολές (ναι/όχι)			1/21	9/100		
Κίρρωση (ναι/όχι)	64/96 [#]	21/122 [#]	24/38	61/180	29/50	56/168
Χρ.ηπατίτιδα (ναι/όχι)	80/80 ^{###}	101/42 ^{###}	31/31	149/91	41/38	140/84
Κ.φ. τρανσαμινάσες (ναι/όχι)	16/144	21/122	7/55	30/211	9/70	28/196
Θεραπεία (ναι/όχι)	30/130	40/103	12/50	58/183	18/61	52/172
Φλεγμονή (ελάχιστη- ήπια/μέτρια-έντονη)	49/37	38/41	14/15	73/63	21/20	66/58
Ίνωση (καθόλου- ήπια/μέτρια-έντονη)	47/39	40/39	10/19	77/59	17/24	70/54
Γονότυπος (1b/μη 1b)	47/52	30/38	7/9	13/15	22/21	55/69
λικό φορτίο (U/ml)	484631 ±337683	541075 ±331548	361533 ±382085	533110 ±325480	528258 ±336569	483400 ±331410

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση. P>0.05 (χ² διόρθωση κατά Yates, Fisher's exact test, t-test, Mann-Whitney U test). *P=0.014 (MWU test) **P=0.004 (t-test). #P=0.000 (χ² διόρθωση κατά Yates). ###P=0.000 (χ² διόρθωση κατά Yates). ⓪P=0.044 (t-test). ⓈP=0.044 (χ² διόρθωση κατά Yates). ***P=0.011 (t-test). ⓈⓈP=0.022 (t-test). †P=0.001 (t-test).

3.4. Συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων με ιστολογικά ευρήματα και ιολογικές παραμέτρους (ηικό φορτίο, γονότυπος).

Κανένα από τα εξετασθέντα αυτοαντισώματα δεν συσχετιζόνταν με το βαθμό της ιστολογικής δραστηριότητας και της ίνωσης (πίνακες 4,5,6,7,8,9). Παρ'όλα αυτά, τάση συσχέτισης με το βαθμό ίνωσης παρουσίαζε η παρουσία AMA (συνολικά, ανιχνευόμενα και με τις δύο χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανίχνευσης) (θετικά AMA είχαν 3 από τους 87 HCV ασθενείς χωρίς ή με ήπια ίνωση (3.4%) και 10 από τους 78 ασθενείς με μέτρια ή έντονη ίνωση (12.8%), $\rho=0.052$, χ^2) (Πίνακας 6) καθώς και η παρουσία αντι-CL αντισωμάτων (θετικά αντι-CL αντισώματα είχαν 10 από τους 87 HCV ασθενείς χωρίς ή με ήπια ίνωση (11.5%) και 19 από τους 78 ασθενείς με μέτρια ή έντονη ίνωση (24.4%), $\rho=0.05$, χ^2) (Πίνακας 8).

Το ηικό φορτίο δε συσχετιζόνταν με κανένα από τα εξετασθέντα αυτοαντισώματα (Πίνακες 4,5,6,7,8,9). Οι γονότυποι των 167 HCV ασθενών (στους οποίους έγινε προσδιορισμός) κατανέμονταν ως εξής: 91 ασθενείς είχαν γονότυπο 1 (1, 1a, 1b, 1a/1b), από τους οποίους οι 67 είχαν γονότυπο 1b, 13 είχαν γονότυπο 2 (2, 2a, 2c, 2a/c), 39 είχαν γονότυπο 3, 14 είχαν γονότυπο 4, 6 είχαν συνδυασμούς γονοτύπων (1b+2a+2b, 1b+3, 3+4, 4/5a) και 4 είχαν απροσδιόριστο γονότυπο. Κανένα από τα αυτοαντισώματα δε βρέθηκε να σχετίζεται με συγκεκριμένο γονότυπο (Pearson χ^2). Όταν οι ασθενείς χωρίστηκαν σε εκείνους με γονότυπο 1b ($n=77$) και σε εκείνους με γονότυπο μη 1b ($n=90$) τα αντισώματα, που βρέθηκαν να συσχετίζονται με το γονότυπο 1b ήταν τα PCA (θετικά PCA ανιχνεύτηκαν σε 13 από τους 77 ασθενείς με γονότυπο 1b (16.9%) έναντι 4 από τους 90 ασθενείς με γονότυπο μη 1b (4.4%), $\rho=0.017$, χ^2) (Πίνακας 7). Επίσης, μεταξύ των ασθενών που

ήταν θετικοί για SMA με ΕΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου, οι οροί με φθορισμό συμβατό με αντισώματα SMA εναντίον αντιγόνων άλλων εκτός της F ακτίνης σχετίζονταν με την παρουσία γονοτύπου 1b (44 από τους 86 ασθενείς, 51.2%, είχαν γονότυπο 1b), ενώ οι οροί με φθορισμό συμβατό με αντισώματα SMA εναντίον F ακτίνης σχετίζονταν με την παρουσία γονοτύπου άλλου εκτός του 1b (8 από τους 29 ασθενείς, 27.6%, είχαν γονότυπο 1b) ($p=0.047$, χ^2). Επιπρόσθετα, αρνητική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της παρουσίας μικτού γονοτύπου και της ανίχνευσης SMA (συνολικά και με τις δύο χρησιμοποιούμενες τεχνικές) (θετικά SMA είχαν οι 2 από τους 6 ασθενείς με μικτό γονότυπο (33.3%) έναντι 123 από τους υπόλοιπους 161 ασθενείς με άλλους γονοτύπους (76.4%), $p=0.036$, Fisher's exact test), καθώς και της παρουσίας γονοτύπου 4 και της θετικότητας για αντι-dsDNA (θετικά αντι-dsDNA είχαν οι 0 από τους 14 ασθενείς με γονότυπο 4 (0%) έναντι 43 από τους υπόλοιπους 153 ασθενείς με άλλους γονοτύπους (28.3%), $p=0.013$, Fisher's exact test).

Τέλος, η ανίχνευση αντι-LKM στους 303 HCV ασθενείς, που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, δε βρέθηκε να συσχετίζεται με κανέναν από τους προαναφερθέντες παράγοντες (δημογραφικούς, επιδημιολογικούς, κλινικούς, ιστολογικούς και ιολογικούς) (Πίνακας 7).

Πίνακας 9. Συσχέτιση της εύρεσης τουλάχιστο ενός αυτοαντισώματος θετικού με δημογραφικά, επιδημιολογικά, κλινικά, ιστολογικά, ιολογικά δεδομένα.

	Τουλάχιστο ένα αυτοαντίσωμα θετικό	
	ΝΑΙ (n=273)	ΟΧΙ (n=30)
Ηλικία (έτη)	49.4±16	45.3±19
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	134/139	16/14
Διάρκεια λοίμωξης (έτη)	4.2±3.7	3.8±3
Πηγή μόλυνσης (βέβαιη/ αβέβαιη)	138/135	18/12
Χρήση αλκοόλ (ναι/όχι)	47/164	6/24
Συμπτώματα (ναι/όχι)	81/150	7/23
Εξωηπατικές εκδηλώσεις (ναι/όχι)	8/205	1/29
HBsAg (+) / (-)	10/283	0/30
Δείκτες HBV (αρνητικοί/κάποιοι θετικοί)	144/84	19/11
AST (U/l)	54.3±47.5	45.5±33.1
ALT (U/l)	74.7±64.3	69.6±65.3
γGT (U/l)	49±71	39.1±29.7
ALP (U/l)	136.3±86	152.9±110.5
γ-σφαιρίνες (g/dl)	1.7±0.5	1.6±0.4
Θρομβοπενία (ναι/όχι)	50/215	5/25
Θρόμβωση (ναι/όχι)	9/204	1/29
Αποβολές (ναι/όχι)	8/109	2/12
Κίρρωση (ναι/όχι)	83/190*	2/28*
Χρ.ηπατίτιδα (ναι/όχι)	158/115	23/7
Κ.φ. τρανσαμινάσες (ναι/όχι)	32/241	5/25
Θεραπεία (ναι/όχι)	60/213	10/20
Φλεγμονή (ελάχιστη-ήπια/μέτρια-έντονη)	77/68	10/10
Ίνωση (καθόλου-ήπια/μέτρια-έντονη)	75/70	12/8
Γονότυπος (1b/μη 1b)	72/81	5/9
Ιικό φορτίο (U/ml)	507438 ± 331980	555250 ± 355961

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση. P>0.05 (χ^2 διόρθωση κατά Yates, Fisher's exact test, t-test, Mann-Whitney U test). *P=0.010 (χ^2 διόρθωση κατά Yates).

3.5. Αποτελέσματα στους 174 τυχαία επιλεγμένους ασθενείς με

Λοίμωξη από τον HCV

3.5.1. Ασθενείς με ηπατίτιδα C

Σε ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών με ηπατίτιδα C ανιχνεύθηκαν IgG αντι-CL αντισώματα (21.3%, 95% CI: 15.1-27.2%). Η αντίστοιχη συχνότητα αντι-CL αντισωμάτων σύμφωνα με το φύλο ήταν 26.8% (95% CI: 17.4-36%) στους άνδρες και 16.3% (95% CI: 8.8-23.8%) στις γυναίκες. Μόνο

τρεις υγιείς (1.12%, 95% CI: 0.13-2.37%) είχαν θετικά αντι-CL αντισώματα ($p < 0.0001$). Ο μέσος τίτλος των αντι-CL αντισωμάτων διέφερε στατιστικώς σημαντικά (ANOVA, $p < 0.05$) στις τρεις ομάδες που ελέγχθηκαν (HCV ασθενείς θετικοί ή αρνητικοί για αντι-CL αντισώματα και υγιείς μάρτυρες) (Πίνακας 10).

Πίνακας 10. Εργαστηριακά και ιστολογικά χαρακτηριστικά 174 ασθενών με ηπατίτιδα C και 50 με ηπατίτιδα B σε σχέση με την παρουσία θετικών ή αρνητικών αντι-CL αντισωμάτων.

	Λοίμωξη από τον HCV		Λοίμωξη από τον HBV	
	Αντι-CL (+) (n = 37)	Αντι-CL (-) (n = 137)	Αντι-CL (+) (n = 7)	Αντι-CL (-) (n = 43)
AST (U/l)	54.3 ± 39.2	48.9 ± 40.5	223.1 ± 369.8	67.8 ± 82.4
ALT (U/l)	59.6 ± 45.6	63.5 ± 66.5	310.3 ± 490.6	117.6 ± 157
γGT (U/l)	47.6 ± 44.8	39.8 ± 65	85.7 ± 148.8	32.4 ± 26.4
ALP (U/l)	130.6 ± 77.2 [#]	126.5 ± 78.2 [*]	127.7 ± 81.9	93.9 ± 57.3 ^{**}
γ-σφαιρίνες (g/dl)	1.76 ± 0.55	1.7 ± 0.48	1.8 ± 0.49	1.9 ± 0.56
Αιμοπετάλια (x10 ³ /mm)	173.8 ± 73.5	201.9 ± 82.6	162.3 ± 70.5 [†]	215 ± 61.3 [†]
Γονότυπος (1b / non 1b)	7/9	32/36		
Δείκτες HBV				
Αρνητικοί/antiHBc (+)	22/12	97/37		
IgG αντι-CL (BI)	139.8 ± 40.4 [*]	53.6 ± 22.8 [*]	133.1 ± 25.7 ^{**}	58.3 ± 22 ^{**}
Δραστηριότητα ιστολογική (ελάχιστη ή ήπια / μέτρια ή έντονη)	9/44	12/48	2/2	17/9
Ίνωση (καθόλου ή ήπια/ μέτρια ή έντονη)	7/14	49/43	1/3	11/15
Κίρρωση (ναι/όχι)	12/25	24/113	1/6	7/36
Θεραπεία (ναι/όχι)	10/30	42/92	3/4	7/36

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (SD). [#]P=0.033 και ^{*}P=0.014 (ANOVA-PLSD ανάλυση). [†]P=0.044 (unpaired t-test). ^{*}P=0.0001 και ^{**}P=0.0001 (Mann-Whitney U test).

Τα εξετασθέντα δημογραφικά δεδομένα, όπως φαίνονται στον Πίνακα 11 και επιδημιολογικοί παράγοντες, όπως ιστορικό χειρουργικών επεμβάσεων, τατουάζ, ενέσεων με κοινόχρηστες σύριγγες, παραδοσιακών

πρακτικών και η σεξουαλική συμπεριφορά δε συσχετιζόνταν με την ανίχνευση αντι-CL αντισωμάτων.

Πίνακας 11. Δημογραφικά χαρακτηριστικά 174 ασθενών με ηπατίτιδα C και 50 με ηπατίτιδα B σε σχέση με την παρουσία θετικών ή αρνητικών αντι-CL αντισωμάτων.

	Λοίμωξη από τον HCV		Λοίμωξη από τον HBV	
	Αντι-CL (+) (n=37)	Αντι-CL (-) (n=137)	Αντι-CL (+) (n=7)	Αντι-CL (-) (n=43)
Ηλικία (χρόνια)	54.5 ± 15.1	50.9 ± 16.4	54.3 ± 12.1	43.7 ± 13.9
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	22/15	60/77	4/3	26/17
Διάρκεια νόσου (χρόνια)	4.3 ± 3.5 [†]	4.1 ± 3 [#]	6 ± 6.6	7.5 ± 4.8 ^{†#}
Πηγή λοίμωξης (βέβαιη/αβέβαιη)	18/19	74/63	3/4	26/17
Κατάχρηση αλκοόλ (ναι/όχι)	14/23	29/106	2/5	9/33
Συμπτώματα (ναι/όχι)	12/25	45/92	2/5	7/35
Εξωηπατικές εκδηλώσεις (ναι/όχι)	3/34	4/133	0/7	1/42

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD. [#]P=0.0001, [†]P=0.0001 (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U test).

Επιπλέον, δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας θετικών αντι-CL αντισωμάτων και εργαστηριακών (AST, ALT, γGT, ALP, γ-σφαιρίνες, αιμοπετάλια), ιολογικών (γονότυπος), ιστολογικών δεδομένων, δεικτών παρελθούσας λοίμωξης από τον HBV, του κλινικού σταδίου της νόσου και της λήψης ή όχι αντι-ιικής αγωγής (Πίνακας 10). Παρόλα αυτά, η μέση τιμή του τίτλου των αντι-CL αντισωμάτων διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ασθενών με κίρρωση και των ασθενών χωρίς ενδείξεις κίρρωσης (89 ± 40.3 έναντι 66.8 ± 44.4 , αντίστοιχα, $p=0.007$, unpaired t-test).

Αντι-β2-GPI αντισώματα ανιχνεύθηκαν μόνο σε 4 ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV (2.3%, 95% CI: 0.07-4.5%, Πίνακας 12). Εντούτοις, αντι-β2-GPI αντισώματα δεν ανιχνεύθηκαν σε κανέναν από τους υγιείς ($p<0.05$). Η μέση τιμή των αντι-CL αντισωμάτων δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των ασθενών με θετικά και αρνητικά αντι-β2-GPI αντισώματα, ενώ η παρουσία αντι-β2-GPI

αντισωμάτων δε συσχετιζόταν με την ανίχνευση αντι-CL αντισωμάτων (Πίνακας 12).

Πίνακας 12. Συχνότητα και μέσος δείκτης δέσμευσης των αντι-CL αντισωμάτων ασθενών με ηπατίτιδα C και ηπατίτιδα B σε σχέση με την παρουσία θετικών ή αρνητικών αντι-β2-GPI αντισωμάτων.

	Αντι-β2-GPI			
	HCV ασθενείς (n = 174)		HBV ασθενείς (n = 50)	
	Θετικοί (n=4)	Αρνητικοί (n=170)	Θετικοί (n=1)	Αρνητικοί (n=49)
Αντι-CL (+) (%)	2/4 (50)	35/170 (20.6)	1/1 (100)	6/49 (12.2)
Αντι-CL (-) (%)	2/4 (50)	135/170 (79.4)	0/1 (0)	43/49 (87.8)
Αντι-CL (BI)	105.7 ± 72.5	70.6 ± 43.5	104	68 ± 34.4

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD. Δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ θετικών και αρνητικών για αντι-CL αντισώματα ασθενών με λοίμωξη από τον HCV, μεταξύ θετικών και αρνητικών για αντι-CL αντισώματα ασθενών με λοίμωξη από τον HBV ή μεταξύ των τεσσάρων ομάδων HCV και HBV ασθενών μαζί (χ^2 μετά από διόρθωση κατά Yates, Pearson's χ^2 , Mann-Whitney U test, unpaired t-test, Kruskal-Wallis).

Πίνακας 13. Συχνότητα και μέσος δείκτης δέσμευσης των αντι-CL αντισωμάτων και συχνότητα αντι-β2-GPI αντισωμάτων 174 ασθενών με ηπατίτιδα C και 50 με B σε σχέση με το ιστορικό θρομβωτικών επεισοδίων.

	Θρομβωτικά επεισόδια			
	HCV ασθενείς (n = 174)		HBV ασθενείς (n = 50)	
	Ναι (n = 7)	Όχι (n = 167)	Ναι (n = 1)	Όχι (n = 49)
Αντι-CL (+) (%)	2/7 (28.5)	35/167 (21)	1/1 (100)	6/49 (12.2)
Αντι-CL (-)(%)	5/7 (71.4)	132/167 (79)	0/1(0)	42/49 (85.7)
Αντι-CL (BI)	77.3 ± 31.5	71.2 ± 44.9	124	68.2 ± 33.9
Αντι-β2-GPI (+) (%)	1/7 (14.3)	3/167 (1.8)	0/1(0)	1/49 (2)
Αντι-β2-GPI (-) (%)	6/7 (85.7)	164/167 (96.5)	1/1 (100)	48/49 (98)

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD. Δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ θετικών και αρνητικών για αντι-CL αντισώματα ασθενών με λοίμωξη από τον HCV, μεταξύ θετικών και αρνητικών για αντι-CL αντισώματα ασθενών με λοίμωξη από τον HBV ή μεταξύ των τεσσάρων ομάδων HCV και HBV ασθενών μαζί (χ^2 μετά από διόρθωση κατά Yates, Fisher's exact test, Pearson's χ^2 , Mann-Whitney U test, unpaired t-test, Kruskal-Wallis).

Επτά ασθενείς ανέφεραν ιστορικό θρομβωτικών επεισοδίων στο παρελθόν (4%, 95% CI: 1.1-6.9%, Πίνακας 13). Εντούτοις, μόνο δύο από αυτούς είχαν θετικά αντι-CL αντισώματα (μη στατιστικώς σημαντική διαφορά). Επιπρόσθετα, μόνο ένας ασθενής με ιστορικό θρομβωτικού επεισοδίου είχε θετικά αντι-β2-GPI αντισώματα, ενώ ήταν αρνητικός για αντι-CL αντισώματα (Πίνακας 13). Τριάντα έξι ασθενείς (20.7%, 95% CI: 14.6-26.6%, Πίνακας σ) είχαν θρομβοπενία, ενώ 12 από αυτούς είχαν θετικά αντι-CL αντισώματα (μη στατιστικώς σημαντική διαφορά). Κανένας από τους ασθενείς με θετικά αντι-β2-GPI αντισώματα δεν είχε θρομβοπενία (Πίνακας 14). Πέντε από τις 92 γυναίκες ανέφεραν τουλάχιστο δύο αποβολές στο παρελθόν (5.4%, 95% CI: 0.8-10%, Πίνακας 15). Παρόλα αυτά, καμία από τις 5 δεν είχε θετικά αντι-CL και/ή αντι-β2-GPI αντισώματα (Πίνακας 15).

Πίνακας 14. Συχνότητα και μέσος δείκτης δέσμευσης των αντι-CL αντισωμάτων και συχνότητα αντι-β2-GPI αντισωμάτων 174 ασθενών με ηπατίτιδα C και 50 με B σε σχέση με την παρουσία ή όχι θρομβοπενίας.

	Θρομβοπενία			
	HCV ασθενείς (n = 174)		HBV ασθενείς (n = 50)	
	Ναι (n = 36)	Όχι (n = 138)	Ναι (n = 8)	Όχι (n = 42)
ΑΝΤΙ-CL (+) (%)	12/36 (33.3)	25/138 (18.1)	3/8 (37.5)	4/42 (9.5)
ΑΝΤΙ-CL (-) (%)	24/36 (66.7)	113/138 (81.5)	5/8 (62.5)	38/42 (90.5)
ΑΝΤΙ-CL (BI)	83.4 ± 46.7	68.3 ± 43.4	92.2 ± 34.7*	64.3 ± 32.9*
ΑΝΤΙ-β2-GPI (+) (%)	0/36 (0)	4/138 (2.9)	1/8 (12.5)	0/42 (0)
ΑΝΤΙ-β2-GPI (-) (%)	36/36 (100)	134/138 (97.1)	7/8 (87.5)	42/42 (100)

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD. Δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ θετικών και αρνητικών για αντι-CL αντισώματα ασθενών με λοίμωξη από τον HCV, μεταξύ θετικών και αρνητικών για αντι-CL αντισώματα ασθενών με λοίμωξη από τον HBV ή μεταξύ των τεσσάρων ομάδων HCV και HBV ασθενών μαζί (Fisher's exact test, Pearson's χ^2 , unpaired t-test). *P=0.034 (unpaired t-test).

Επιπλέον, οι μέσοι τίτλοι των αντι-CL αντισωμάτων των ασθενών με ηπατίτιδα C δε συσχετίζονταν με το ιστορικό θρομβωτικών επεισοδίων (Πίνακας 13), την παρουσία θρομβοπενίας (Πίνακας 14) ή το ιστορικό υποτροπιάζουσών αποβολών, όσον αφορά στις γυναίκες ασθενείς (Πίνακας 15). Κατά τη διάρκεια παρακολούθησης 30 μηνών, κανείς από τους ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV και θετικά αντι-CL αντισώματα δεν ανέπτυξε κλινική ή εργαστηριακή διαταραχή που να υποδηλώνει την πιθανή διάγνωση APLS.

Πίνακας 15. Συχνότητα και μέσος δείκτης δέσμευσης των αντι-CL αντισωμάτων και συχνότητα αντι-β2-GPI αντισωμάτων σε γυναίκες ασθενείς με ηπατίτιδα C και B σε σχέση με το ιστορικό υποτροπιάζουσών αποβολών.

	Υποτροπιάζουσες αποβολές			
	HCV ασθενείς (n = 92)		HBV ασθενείς (n = 20)	
	Ναι (n = 5)	Όχι (n = 87)	Ναι (n = 2)	Όχι (n = 18)
Αντι-CL (+) (%)	0/5 (0)	16/87 (18.4)	1/2 (50)	2/18 (11.1)
Αντι-CL (-) (%)	5/5 (100)	71/87 (81.6)	1/2 (50)	16/18 (88.9)
Αντι-CL (BI)	66.7 ± 23.6	72.1 ± 45.6	99.5 ± 6.3	62.5 ± 30.3
Αντι-β2-GPI (+) (%)	0/5 (0)	2/87 (2.3)	1/2 (50)	0/18 (0)
Αντι-β2-GPI (-) (%)	5/5 (100)	85/87 (97.7)	1/2 (50)	18/18 (100)

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD. Δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ θετικών και αρνητικών για αντι-CL αντισώματα ασθενών με λοίμωξη από τον HCV, μεταξύ θετικών και αρνητικών για αντι-CL αντισώματα ασθενών με λοίμωξη από τον HBV ή μεταξύ των τεσσάρων ομάδων HCV και HBV ασθενών μαζί (Fisher's exact test, Pearson's χ^2 , unpaired t-test, ANOVA-PLSD analysis).

3.5.2. Ασθενείς με ηπατίτιδα B

IgG αντι-CL αντισώματα ανιχνεύθηκαν στο 14% των ασθενών με ηπατίτιδα B (95% CI: 4.4-23.6%, $p=0.0001$ σε σχέση με τους υγιείς αιμοδότες). Ο μέσος τίτλος των αντι-CL αντισωμάτων διέφερε σημαντικά (ANOVA, $p<0.05$) μεταξύ των τριών ομάδων (των ασθενών με λοίμωξη από

τον HBV θετικών ή αρνητικών για αντι-CL αντισώματα και των υγιών). Εντούτοις, η συχνότητα ανίχνευσης αντι-CL αντισωμάτων στους ασθενείς με ηπατίτιδα Β δε διέφερε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με αυτή των ασθενών με ηπατίτιδα C. Ο μέσος τίτλος των αντι-CL αντισωμάτων δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των ασθενών με ηπατίτιδα C και Β.

Όσον αφορά στους ασθενείς με ηπατίτιδα Β, τα εξετασθέντα δημογραφικά δεδομένα, όπως φαίνονται στον Πίνακα 11 και διάφοροι επιδημιολογικοί παράγοντες (αντίστοιχοι με εκείνους που προαναφέρθηκαν για τους ασθενείς με ηπατίτιδα C), η παρουσία ή όχι συμπτωμάτων κατά τη διάγνωση της λοίμωξης και η παρουσία εξωηπατικών εκδηλώσεων δε συσχετιζόνταν με την ανίχνευση αντι-CL αντισωμάτων (Πίνακας 11). Επιπλέον, όλες οι παραπάνω παράμετροι δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ασθενών με ηπατίτιδα Β και ηπατίτιδα C, που ήταν θετικοί για αντι-CL αντισώματα ή μεταξύ των HCV και HBV ασθενών, που ήταν αρνητικοί για τα αντισώματα αυτά (Πίνακας 11). Εξάιρεση αποτελούσε η διάρκεια λοίμωξης, που ήταν σημαντικά μακρύτερη στους HBV/αντι-CL αρνητικούς ασθενείς σε σχέση με τους HCV ασθενείς, που είχαν είτε θετικά είτε αρνητικά αντι-CL αντισώματα (Πίνακας 11).

Επιπρόσθετα, ούτε τα εργαστηριακά δεδομένα (AST, ALT, γGT, ALP, γ-σφαιρίνες) αλλά ούτε και η ιστολογία (δραστηριότητα και ίνωση) σχετιζόνταν με τη θετικότητα για αντι-CL αντισώματα (Πίνακας 10). Η μέση τιμή των αιμοπεταλίων ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους HBV/αντι-CL θετικούς ασθενείς σε σχέση με τους HBV/αντι-CL αρνητικούς (Πίνακας 10). Παρόλα αυτά, η μέση τιμή των αιμοπεταλίων δε διέφερε σημαντικά μεταξύ HCV και HBV ασθενών, που είχαν θετικά αντι-CL αντισώματα (Πίνακας 10). Επιπλέον

η θετικότητα για τα αντισώματα αυτά και ο μέσος τίτλος τους ήταν ανεξάρτητος από το κλινικό στάδιο (κίρρωση ή όχι) και τη λήψη ή όχι θεραπειάς για την λοίμωξη από τον HBV (Πίνακας 10).

Αντι-β2-GPI αντισώματα ανιχνεύθηκαν μόνο σε έναν ασθενή με ηπατίτιδα Β (2%, 95% CI: 0-5.8%, μη στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τους υγιείς), ο οποίος είχε επίσης θετικά αντι-CL αντισώματα. Ο μέσος τίτλος των αντι-CL αντισωμάτων δε διέφερε μεταξύ των HCV και HBV ασθενών με θετικά ή αρνητικά αντι-β2-GPI αντισώματα (Πίνακας 12).

Μόνο ένας άνδρας (2%, 95% CI: 0-5.8%) με λοίμωξη από τον HBV είχε ιστορικό θρομβωτικού επεισοδίου (Πίνακας 13), ο οποίος είχε θετικά αντι-CL αλλά αρνητικά αντι-β2-GPI αντισώματα. Οκτώ ασθενείς ήταν θρομβοπενικοί (16%, 95% CI: 5.9-26.2%) εκ των οποίων τρεις είχαν θετικά αντι-CL αντισώματα. Αν και οι μέσες τιμές των αντι-CL αντισωμάτων των HBV ασθενών με και χωρίς θρομβοπενία διέφεραν σημαντικά ($p=0.034$), η θετικότητα για τα αντισώματα αυτά δε σχετιζόταν με την παρουσία ή απουσία θρομβοπενίας (Πίνακας 14). Ο ασθενής που είχε θετικά αντι-β2-GPI αντισώματα είχε και θρομβοπενία (μη στατιστικά σημαντική διαφορά). Επιπλέον, οι μέσες τιμές των αντι-CL αντισωμάτων δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των HCV και των HBV ασθενών με και χωρίς θρομβοπενία (Πίνακας 14).

Δύο από τις 20 γυναίκες με λοίμωξη από τον HBV (10%, 95% CI: 1.23-31.7%, η μία ήταν θετική τόσο για αντι-CL όσο και για αντι-β2-GPI αντισώματα) είχαν ιστορικό υποτροπιάζουσών αποβολών. Εντούτοις, οι μέσοι τίτλοι των αντι-CL αντισωμάτων των γυναικών με και χωρίς υποτροπιάζουσες αποβολές δε διέφεραν σημαντικά (Πίνακας 15). Επιπρόσθετα, οι μέσοι τίτλοι

των αντι-CL αντισωμάτων δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των HCV και των HBV ασθενών με και χωρίς ιστορικό καθ'έξιν αποβολών (Πίνακας 15).

3.6. Αποτελέσματα στους 39 τυχαία επιλεγμένους ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV

3.6.1. Επιπολασμός των αυτοαντισωμάτων στους 39 μη επιλεγμένους ασθενείς

Δύο από τους 39 ασθενείς (5.1%, 95% CI: 0.6-17.3%) είχε θετικά ANA (τίτλος 1:80 και στις δυο περιπτώσεις), 7 ασθενείς είχαν θετικά SMA (17.9%, 95% CI: 7.5-33.5%, μέσος τίτλος 1:125) και 1 ασθενής είχε θετικά PCA (2.5%, 95% CI: 0.06-13.5%, τίτλος 1:160). Και οι 39 οροί είχαν αρνητικά AMA, αντι-SLA, αντι-KYT 2A6 και αντι-KYT 1A2 αντισώματα. Τέσσερις από τους 39 ασθενείς (10.3%, 95% CI: 2.9-24.2%) είχαν θετικά αντι-LKM αντισώματα. Η ανίχνευση αντι-LKM αντισωμάτων δε σχετιζονταν με το φύλο [θετικοί: 3 από τους 10 άνδρες (30%) έναντι 1 από τις 29 γυναίκες (3.4%)], την πηγή λοίμωξης [2 από τους 30 χρήστες ενδοφλεβίων ουσιών (6.67%) έναντι 2 από τους υπόλοιπους 9 ασθενείς (22.2%)] ή το γονότυπο του HCV (2 από τους 25 με γονότυπο 3a (8%) έναντι 2 από τους 10 με γονότυπο 1b (20%)).

3.6.2. Χαρακτηριστικά των αντι-LKM αντισωμάτων των τεσσάρων αντι-LKM θετικών ορών

Τρία από τα 4 αντι-LKM θετικά δείγματα είχαν τυπικό πρότυπο φθορισμού με ΕΑΦ (εύρος τίτλου 1:80-1:160). Εντούτοις, κανένα από αυτά δεν ήταν θετικό για αντι-KYT 2D6 αντισώματα με ανταγωνιστική αντι-LKM 1 ELISA, ειδική αντι-KYT 2D6 RLA και ανοσοαποτύπωση (με τη χρήση είτε

ηπατικών μικροσωμάτων ανθρώπου είτε ανασυνδυασμένου ΚΥΤ 2D6 (Πίνακας 16). Η ανοσοαποτύπωση με τη χρήση ηπατικών μικροσωμάτων ανθρώπου ανέδειξε πρωτεϊνικές ζώνες 80 kDa και >80 kDa στους ορούς δύο ανδρών ασθενών, ενώ ο τρίτος ορός, που ανήκε στη γυναίκα ασθενή δεν ανέδειξε καμία αντιδραστικότητα (Πίνακας 16). Επιπλέον, κανένας από τους ορούς δε βρέθηκε θετικός για αντι-ΚΥΤ 2C9 αντισώματα με ανοσοαποτύπωση με τη χρήση ανασυνδυασμένης ΚΥΤ 2C9 πρωτεΐνης.

Πίνακας 16. Χαρακτηριστικά των αντι-LKM αντισωμάτων των τεσσάρων αντι-LKM θετικών ορών ασθενών με λοίμωξη από τον HCV

No.	Φύλο	Αντι-LKM (ΕΑΦ)	Τίτλος	ELISA ΚΥΤ 2D6
1	Άνδρας	+	1:80	-
2	Άνδρας	+	1:80	-
3	Γυναίκα	+	1:160	-
4	Άνδρας	-	-	-

No.	Ανοσοαποτύπωση (ανθρώπινα μικροσώματα)	Ανοσοαποτύπωση (ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες)			Αντι-ΚΥΤ 2D6 (RLA)
		ΚΥΤ 2D6	ΚΥΤ 2C9	UGT	
1	80 kDa	-	-	ΔΕ	-
2	>80 kDa	-	-	ΔΕ	-
3	-	-	-	ΔΕ	-
4	50 + 55 kDa	50 kDa	-	55 kDa	+

ΔΕ: δεν έγινε

Ο τέταρτος ασθενής είχε αρνητικά αντι-LKM αντισώματα με τη μέθοδο ΕΑΦ ή την ανταγωνιστική αντι-LKM 1 ELISA. Εντούτοις, βρέθηκε τρεις φορές θετικός για αντι-ΚΥΤ 2D6 αντισώματα με την ευαίσθητη και ειδική μέθοδο RLA (μέσος τίτλος 2150 cpm, εύρος 1865-2627 cpm). Τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης με τη χρήση ηπατικών μικροσωμάτων ανθρώπου στον ορό του ασθενούς αυτού, ανέδειξαν δύο ζώνες στα 50 kDa και στα 55 kDa, που

φάνηκε να αντιστοιχούν σε αντι-KYT 2D6 και αντι-UGT αυτοαντισώματα, όταν για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένα KYT 2D6 και UGT αντιγόνα, αντίστοιχα (Πίνακας 16). Όπως και οι άλλοι τρεις οροί, και αυτό το δείγμα ήταν αρνητικό για αντι-KYT 2C9 αυτοαντισώματα.

4. Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη έδειξε, σε μεγάλη σειρά διαδοχικών, Ελλήνων ασθενών με χρόνια λοίμωξη από τον HCV, την ανίχνευση ενός τουλάχιστο αυτοαντισώματος σε σημαντικότατο ποσοστό των ασθενών (90%). Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες (3,7,15,17) και επιβεβαιώνουν τη γενική διαπίστωση ότι η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων είναι πολύ συχνή στους ορούς ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C. Τα περισσότερα, όμως, από τα εξετασθέντα αυτοαντισώματα δε συσχετιζόνταν με δημογραφικά, επιδημιολογικά, ιστολογικά, ιολογικά δεδομένα ή την παρουσία εξωηπατικών εκδηλώσεων της λοίμωξης. Εντούτοις, ορισμένα (ANA, SMA, ANCA ή η παρουσία ενός τουλάχιστο αυτοαντισώματος) σχετιζόνταν με προχωρημένη νόσο (κίρρωση) και ενεργό βιοχημική δραστηριότητα (αυξημένες τιμές αμινοτρανσφερασών), γεγονός, που τα υποδεικνύει ως επιπρόσθετους εργαστηριακούς δείκτες επιβαρυσμένης νόσου. Παρ' όλα αυτά, ο παθογενετικός τους ρόλος στην πρόοδο της ηπατικής νόσου παραμένει αβέβαιος. Η παρουσία τους φαίνεται μάλλον να είναι αποτέλεσμα χρόνιας Β λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης από τον HCV ή εμφάνισης 'νέο-αντιγόνων' στα πλαίσια της ηπατοκυτταρικής καταστροφής.

Αναλυτικότερα, η υψηλή συχνότητα ανίχνευσης των ANA (63%) και SMA (71.6%) σε ασθενείς με ηπατίτιδα C συμβαδίζει με την συχνότητα εύρεσης των αυτοαντισωμάτων αυτών και σε άλλες μελέτες από την Ευρώπη και την Αμερική (3,7,10-12,15,17,52). Τα SMA φαίνεται να αποτελούν, αν και με μικρή διαφορά από τα ANA, τα πιο συχνά ανιχνευόμενα αυτοαντίσωματα (10-17,19,52). Επιπλέον, ο τίτλος τόσο των ANA (μέση τιμή 1:237,

υπόστρωμα κυττάρων HEp2) όσο και των SMA (1:113, υπόστρωμα τομών ήπατος-νεφρού στομάχου αρουραίου) βρέθηκε χαμηλός, όπως αναμένεται συνήθως σε ασθενείς με χρόνιες ιογενείς λοιμώξεις (3,7-10,14). Η ανάλυση των 'υποκατηγοριών' των ANA και SMA έδειξε ότι ο πιο συχνά ευρισκόμενος τύπος φθορισμού των ANA είναι ο λεπτός σπικτός (58.9%), ενώ τα SMA κατευθύνονται, ως επί το πλείστον, εναντίον άλλων πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού εκτός της F ακτίνης (SMA εναντίον F ακτίνης ανιχνεύτηκαν στο 19% των SMA θετικών ορών με ΕΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου), σε αντίθεση με ότι συμβαίνει συνήθως στην AH-1, όπου ο συχνότερος τύπος φθορισμού των ANA είναι ο ομοιογενής και η ειδικότητα των SMA είναι κυρίως εναντίον της F ακτίνης (52,54,55). Τα ευρήματα αυτά βοηθούν σημαντικά στην ασφαλέστερη χορήγηση θεραπείας με α-IFN καθώς ο κίνδυνος 'λανθάνουσας' AH-1 σε HCV θετικούς ασθενείς φαίνεται να είναι πολύ χαμηλός. Πράγματι, η αλληλοεπικάλυψη μεταξύ AH-1 και ιογενούς ηπατίτιδας, όσον αφορά στην ειδικότητα και τον τίτλο των αυτοαντισωμάτων φαίνεται ότι είναι, στη μελέτη αυτή, χαμηλή.

Επιπρόσθετα, η ανίχνευση αντι-dsDNA αντισωμάτων σε υψηλό ποσοστό (26%), παρόμοιο με τη μελέτη των Dalekos et al (7), υποδεικνύει το διπλής έλικας DNA ως ένα από τα συχνά αντιγόνα στόχους των HCV/ANA θετικών ασθενών, σε αντίθεση με τις μελέτες των Cacoub et al (3) και Lenzi et al (9), στις οποίες αντι-dsDNA αντισώματα ανιχνεύτηκαν στο 3% και 0% των HCV ασθενών αντίστοιχα. Η διαφορά αυτές πιθανότατα οφείλονται στις τεχνικές ανίχνευσης των εν λόγω αντισωμάτων (μέθοδος Farr στη μελέτη των Cacoub et al και ΕΑΦ σε *Crithidia luciliae* στη μελέτη των Lenzi et al) και επιβεβαιώνουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης των αντι-dsDNA

αντισωμάτων με τη χρήση προτυποποιημένης ELISA (56,57). Επιπλέον, η συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων αυτών με τη χρήση ενδοφλεβίων ναρκωτικών ουσιών ως πηγή μόλυνσης από τον HCV, συμφωνεί με τη μελέτη των Dalekos et al (7), που ανίχνευσαν τα αυτοαντισώματα αυτά σε 30 από τους 60 χρήστες (50%), που συμπεριέλαβαν στη μελέτη τους. Η αυξημένη συχνότητα ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων στα άτομα αυτά πιθανότατα σχετίζεται με το αυξημένο αντιγονικό φορτίο με το οποίο έρχονται σε επαφή, εξαιτίας της ενδοφλέβιας έγχυσης μαζί με τις ναρκωτικές και διάφορες προσθετικές ουσίες.

Η υψηλή συχνότητα ανίχνευσης των ANCA (53%), στην παρούσα μελέτη, συμφωνεί με τις μελέτες των Dalekos et al (58), Wu et al (59) και Ohira et al (60). Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τη γενική πεποίθηση ότι τα ANCA ανιχνεύονται σχετικά σπάνια σε ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες και ότι μπορούν, για το λόγο αυτό, να αποτελέσουν χρήσιμους δείκτες στη διαφοροδιάγνωση των ασθενών με AH-1 και αυτών με λοίμωξη από τον HCV και θετικά ANA ή/και SMA (58,61,62). Παρ' όλα αυτά, όπως δείχνει η παρούσα μελέτη, οι τίτλοι ανίχνευσής τους σε ασθενείς με ηπατίτιδα C είναι πολύ χαμηλοί (μέσος τίτλος 1:25), ενώ συχνότερα ανιχνεύονται 'άτυπα' cANCA, σε αντίθεση με την AH-1, στην οποία ανιχνεύονται συνήθως υψηλοί τίτλοι pANCA (61,62,63).

Ένα επιπλέον αυτοαντίσωμα, που ανιχνεύτηκε στην παρούσα μελέτη σε υψηλό σχετικά ποσοστό HCV θετικών ασθενών (20%) είναι το αντι-CL αντίσωμα. Το εύρημα αυτό είναι παρόμοιο με άλλων μελετών (3,7,28,29,64-68). Εντούτοις, η συχνότητα ανίχνευσης του αυτοαντισώματος αυτού σε ασθενείς HCV θετικούς ποικίλλει πολύ στη βιβλιογραφία (3.3-46%) (8). Οι

μεγάλες αυτές διαφορές οφείλονται στις χρησιμοποιούμενες μεθόδους ανίχνευσης και το σχεδιασμό των μελετών (8). Παρ' όλα αυτά, η παρουσία του στην λοίμωξη από τον HCV δε βρέθηκε να συνδέεται με εκδηλώσεις APLS (θρομβώσεις, καθ'έξιν αποβολές, θρομβοπενία), όπως και στην πλεονότητα των προηγούμενων μελετών (3,7,28,29,64-66,69), οπότε ο ισχυρισμός των Prieto et al (67) της πιθανής αιτοπαθογενετικής σχέσης του APLS με τον HCV δε φαίνεται να επιβεβαιώνεται. Επιπλέον, IgG αντι-CL αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε υψηλό, σχετικά, ποσοστό (14%) στους 50 ασθενείς με ηπατίτιδα Β, που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, γεγονός, που υποδεικνύει ότι τα αυτοαντισώματα αυτά μπορεί να ανιχνεύονται σε διάφορες ηπατικές νόσους (7,28,69,70). Έτσι, η συσχέτιση των αντισωμάτων αυτών με το ιστορικό κατάχρησης αλκοόλ, που βρέθηκε στην παρούσα μελέτη, συμφωνεί με τους Mangia et al (69) και Biron et al (70), που ανίχνευσαν αντι-CL αντισώματα σε ασθενείς με αλκοολική νόσο του ήπατος σε ποσοστά υψηλότερα αυτών των HCV θετικών ασθενών. Επιπρόσθετα, τα αντισώματα αυτά βρέθηκαν να συσχετίζονται με μεγαλύτερη ηλικία των ασθενών, γεγονός, που έχει ήδη δημοσιευθεί από τους Manoussakis et al (41).

Μείζονος σημασίας, είναι η διευκρίνιση της κλινικής σημασίας των αντι-CL αντισωμάτων, εάν δηλαδή είναι 'παθογενετικά' ή όχι. Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι τα αντι-CL αντισώματα, που ανιχνεύθηκαν σε Έλληνες ασθενείς με ηπατίτιδα C αλλά και Β, είναι μη παθογενετικά καθώς είναι ανεξάρτητα από τον συμπαράγοντα β2-GPI, που αποτελεί τον σημαντικότερο συμπαράγοντα των αντι-CL αντισωμάτων. Η προτυποποιημένη ELISA, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για την ανίχνευση των αντι-CL αντισωμάτων, χρησιμοποιεί βόειο ορό ως παράγοντα δέσμησης και διάλυσης των ορών

(βλέπε 2.1.5.), ο οποίος περιέχει β2-GPI. Έτσι, ελαττώνεται η μη ειδική δέσμευση των αντι-CL αντισωμάτων μέσω ανταγωνιστικού μηχανισμού. Ωστόσο, μια μέθοδος που χρησιμοποιεί ως αντιγόνο β2-GPI, όπως αυτή που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των 174 HCV θετικών ασθενών και των 50 HBV θετικών ασθενών, είναι πιο άμεση. Με τη μέθοδο αυτή μόνο το 2,3% των HCV ασθενών και το 2% των HBV ασθενών ήταν θετικοί για τα 'παθογενετικά' αντι-β2-GPI αντισώματα, γεγονός που συμφωνεί με την απουσία συσχέτισης των αντι-CL αντισωμάτων με κλινικά ευρήματα APLS, είτε στο παρελθόν είτε κατά την περίοδο παρακολούθησης των HCV και HBV ασθενών. Επιπλέον, ένας ακόμη δείκτης της μικρής κλινικής σημασίας των αντι-CL αντισωμάτων στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες είναι ο χαμηλός τίτλος ανίχνευσής τους. Υψηλοί τίτλοι αντι-CL αντισωμάτων (κυρίως IgG υποτύπου) είναι γνωστό ότι ανιχνεύονται σε ασθενείς είτε με πρωτοπαθές είτε με δευτεροπαθές APLS (71), ενώ χαμηλοί ή μέτριοι τίτλοι έχουν βρεθεί σε διάφορες χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους (7,8,40,43). Επομένως, φαίνεται λογικό ότι η υψηλή συχνότητα ανίχνευσης των αντι-CL αντισωμάτων στις δύο χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες είναι ένα μη ειδικό επφαινόμενο της ηπατοκυτταρικής βλάβης. Εντούτοις, η τάση συσχέτισης που εμφάνιζαν τα αντισώματα αυτά με την ίνωση, πιθανότατα υποδεικνύει την ανάγκη εκτέλεσης προοπτικών μελετών μεγάλης διάρκειας, ώστε να διευκρινιστεί η κλινική τους σημασία. Το ίδιο, ίσως, απαιτείται για την εκτίμηση της σημασίας των αντι-CL αντισωμάτων σχετικά με την ανάπτυξη APLS σε βάθος χρόνου.

Τα ANA, SMA, ANCA και η ανίχνευση ενός τουλάχιστον αυτοαντισώματος, συνδυαζόταν με την παρουσία HCV-σχετιζόμενης κίρρωσης. Επιπρόσθετα, η παρουσία των SMA βρέθηκε να σχετίζεται με

υψηλότερες τιμές AST και των ANCA με υψηλότερες τιμές AST και ALT. Αντίθετα, τα αντισώματα αυτά δε βρέθηκε να σχετίζονται με την ιστολογική δραστηριότητα της νόσου, ούτε με το βαθμό ίνωσης, ευρήματα, που έρχονται σε αντίθεση με τις μελέτες των Lenzi et al (9) και Cassani et al (14), αλλά συμφωνούν με τη μελέτη των Valentini et al (17). Εντούτοις, η συσχέτισή τους με την παρουσία κίρρωσης και δεικτών βιοχημικής δραστηριότητας της νόσου υποδεικνύει, πιθανά, τη χρήση τους ως επιπρόσθετους εργαστηριακούς δείκτες προχωρημένης ηπατικής νόσου, χωρίς όμως, μάλλον, να έχουν κάποιο ενεργό παθογενετικό ρόλο σ' αυτή. Με την τελευταία αυτή άποψη φαίνεται να συμφωνούν και οι προαναφερθείσες μελέτες (9,14,17).

Η ανίχνευση για πρώτη φορά των αντι-LKM αντισωμάτων σε Έλληνες HCV θετικούς ασθενείς, σε ποσοστό 4.6%, συμβαδίζει με τη συχνότητα ανίχνευσης (0-7%), που έχει ανακοινωθεί από την πλειονότητα των διεθνών μελετών (3,9-14,17,52,72,73). Η παρούσα μελέτη δε φαίνεται να συμφωνεί με την εξαιρετικά χαμηλή συχνότητα (0.7%), που αναφέρεται από την Κρήτη (74). Στην τελευταία μελέτη η ανίχνευση έγινε με τη χρήση ΕΑΦ και υπόστρωμα τομών ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου εμπορικού kit. Ωστόσο, στην ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων αυτών με ΕΑΦ, σημαντικό ρόλο παίζει το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται. Πράγματι, οι 'in house' κατεψυγμένες τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου σε κρουστάτη και η αραιώση 1:40 των ορών αποτελούν την ενδεδειγμένη μέθοδο προσδιορισμού των αντι-LKM σύμφωνα με την Διεθνή Ομάδα Αυτοανόσου Ηπατίτιδας (IAHG) (75).

Επιπλέον, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η συχνότητα ανίχνευσης των αντι-LKM αυτοαντισωμάτων σε HCV θετικούς ασθενείς μπορεί να είναι ακόμη

μεγαλύτερη όταν χρησιμοποιούνται και άλλες τεχνικές εκτός του ΕΑΦ. Έτσι, στους 39 τυχαίους HCV ασθενείς, που εξετάστηκαν εκτεταμένα για την παρουσία αντι-LKM αντισωμάτων (με ΕΑΦ, ανοσοαποτύπωση, ανταγωνιστική αντι-KYT 2D6 ELISA και RLA), η συχνότητα ανίχνευσης των αντι-LKM αντισωμάτων βρέθηκε ακόμα πιο υψηλή (10%). Αν και ο αριθμός των HCV ασθενών που ελέγχθηκαν με τις προαναφερθείσες μεθόδους ήταν μικρός, το υψηλό αυτό ποσοστό ανίχνευσης των αντι-LKM αντισωμάτων συμφωνεί με τα ποσοστά ανίχνευσης των αυτοαντισωμάτων αυτών σε παιδιατρικούς ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (15,16).

Το αυτοαντιγόνο στόχος των αντι-LKM 1 αντισωμάτων στην AH-2 είναι το KYT 2D6 (47). Το ίδιο είναι και το αυτοαντιγόνο στόχος των αντι-LKM 1 αντισωμάτων των HCV θετικών ασθενών (76,77). Η διαφορά έγκειται στο ότι τα μεν αντι-LKM 1 στην AH-2 στρέφονται κατά μικρών 'επίπεδων' επιτόπων του KYT 2D6, ενώ τα αντι-LKM 1 στην λοίμωξη από τον HCV στρέφονται κυρίως, κατά 'μη επίπεδων' επιτόπων. Γι' αυτό το λόγο, υπήρχαν αντιφάσεις στη βιβλιογραφία σχετικά με την ανίχνευση αντι-KYT 2D6 στους HCV θετικούς ασθενείς (47,76,77). Παρ'όλα αυτά, πιο πρόσφατα ανακοινώθηκε η ανίχνευση αντι-KYT 2D6 αυτοαντισωμάτων στο 100%, σχεδόν, των αντι-LKM 1 θετικών ορών ανεξαρτήτως αν προέρχονται από HCV θετικούς ή αρνητικούς ασθενείς, όταν χρησιμοποιήθηκε η εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική μέθοδος RLA (26,27). Στην παρούσα μελέτη, αν και στους 39 HCV ασθενείς χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές, δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση του KYT 2D6 ως αυτοαντιγόνου στόχου στους τρεις από τους τέσσερις HCV/αντι-LKM θετικούς ορούς. Η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στον μικρό αριθμό ασθενών που ελέγχθηκαν, στην αντιπροσωπευτικότητα του ελεγχθέντος πληθυσμού (30/39

ήταν πρώην χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών ουσιών) ή σε ιδιαιτερότητες του Ελληνικού πληθυσμού γενικά (28,30). Παρ' όλα αυτά, τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με εκείνα των Bortolotti et al (16). Τα παραπάνω, καθώς και η αναγνώριση από τους Miyakawa et al (78) του KYT 2E1 και του KYT 3A4 ως επιπρόσθετων αυτοαντιγόνων στόχων των αντι-LKM αντισωμάτων σε δύο ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV, δείχνουν ότι η αυτοάνοση αντίδραση στους HCV/αντι-LKM θετικούς ασθενείς είναι μάλλον ετερογενής.

Ενδιαφέρον ήταν ότι ένας από τους 39 ορούς που εξετάστηκαν για την παρουσία αντι-LKM με διάφορες μεθόδους, ήταν αρνητικός με ΕΑΦ, αλλά κατ' επανάληψη θετικός με RLA. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα της RLA (26,27). Επιπλέον, ο ορός αυτός με ανοσοαποτύπωση, δείχθηκε ότι είχε αντιδραστικότητα τόσο εναντίον του KYT 2D6 όσο και εναντίον της UGT-1, που αποτελεί αυτοαντιγόνο στόχο των αντι-LKM 3 (44,45,46). Τα τελευταία αυτά αυτοαντισώματα ανιχνεύονται στο 13% των ασθενών με λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας δέλτα (HDV) και στο 5-10% των ασθενών με AH-2 (44,45,46,79). Η ανίχνευση συγχρόνως αντι-LKM 1 και αντι-LKM 3 σε ασθενή HCV θετικό/HDV αρνητικό ανακοινώνεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία. Πρόσφατα οι Csepregi et al (80) ανακοίνωσαν την ανίχνευση αντι-LKM 3 αντισωμάτων σε ασθενή με HCV-σχετιζόμενη κίρρωση, χωρίς όμως τη σύγχρονη ανίχνευση αντι-KYT 2D6. Τα παραπάνω ευρήματα ενισχύουν την άποψη της ετερογένειας της αυτοάνοσης αντίδρασης με την παραγωγή πληθώρας αυτοαντισωμάτων στην λοίμωξη από τον HCV. Εντούτοις, και οι 39 εξετασθέντες οροί ήταν αρνητικοί για αντι-KYT 2C9 (αυτοαντιγόνο στόχο των αντι-LKM 2 αυτοαντισωμάτων) και για αντι-KYT 2A6

αυτοαντισώματα παρά τη χρησιμοποίηση της RLA ως μεθόδου ανίχνευσής τους.

Επιπλέον, οι δύο ασθενείς με θετικά αντι-LKM, που βρίσκονταν σε θεραπεία με α-IFN δεν παρουσίασαν επιδείνωση της ηπατικής νόσου κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Παρ' όλα αυτά, είναι σημαντικό να αναζητούνται τα αντι-LKM αντισώματα προ της έναρξης θεραπείας με α-IFN στους ασθενείς με HCV λοίμωξη, ώστε να υπάρχει η ανάλογη εγρήγορση έγκαιρης αντιμετώπισης της σπάνιας, μεν, υπαρκτής, δε, πιθανότητας ραγδαίας και καταστροφικής επιδείνωσης της ηπατικής νόσου (25,32,33).

Η απουσία αντι-SLA και αντι-KYT 1A2 αντισωμάτων (στους 39 HCV θετικούς ορούς που ελέγχθηκαν για τα αυτοαντισώματα αυτά) δείχνει την υψηλή ειδικότητα των αντισωμάτων αυτών για την AH-1 και την AH στα πλαίσια του συνδρόμου αυτοάνοσης πολυενδοκρινοπάθειας τύπου 1 (APS-1), αντίστοιχα.

Όσον αφορά την ανίχνευση των αντι-LC1 αντισωμάτων, η εύρεσή τους στο 3% των HCV θετικών ασθενών, επιβεβαιώνει την έλλειψη ειδικότητας των αυτοαντισωμάτων αυτών για την AH-2 (81). Ωστόσο, η σημασία ανεύρεσής τους στην λοίμωξη από τον HCV παραμένει αβέβαιη καθώς, στην παρούσα μελέτη, δε βρέθηκε να συσχετίζονται με κλινικά και ιστολογικά βαρύτερη νόσο.

Η ανίχνευση AMA (με ΕΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου ποντικού) στο (1.7%) των ασθενών με χρόνια λοίμωξη από τον HCV (σε χαμηλούς τίτλους), συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες (3,9,10,17,72). Ο υψηλός τίτλος (1:640) των AMA, που ανιχνεύτηκε σε έναν από τους 5 θετικούς HCV ασθενείς της μελέτης, μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία εντόνως θετικών αντι-CL αντισωμάτων (660 BI) στον ίδιο ασθενή, καθώς είναι

γνωστό ότι η καρδιολιπίνη αποτελεί ένα από τα αντιγόνα-στόχους των AMA (82). Αν και τα AMA βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη να σχετίζονται με υψηλότερες τιμές AST, δε φάνηκε να σχετίζονται με κανένα άλλο από τα ηπατικά ένζυμα, ούτε με την ιστολογική δραστηριότητα της νόσου, οπότε η παρουσία τους στην χρόνια λοίμωξη είναι μάλλον αποτέλεσμα μη ειδικής χρόνιας B λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης.

Τα PCA ανιχνεύτηκαν σε ποσοστό 8.6% των HCV ασθενών, που συμφωνεί με τις περισσότερες μελέτες (17,19,72,73), φαίνεται, δε, ότι ανιχνεύονται με χαμηλότερη συχνότητα στους ενήλικες ασθενείς με ηπατίτιδα C σε σχέση με τους παιδιατρικούς HCV ασθενείς καθώς οι Gregorio et al (15) τα ανίχνευσαν σε ποσοστό 29% των 51 HCV θετικών παιδιών, που συμπεριέλαβαν στη μελέτη τους. Η σημασία της ανίχνευσης PCA στην χρόνια ηπατίτιδα C δεν είναι γνωστή, καθώς σε κανέναν ασθενή δε διαγνώστηκε μεγαλοβλαστική αναιμία, τουλάχιστον κατά το διάστημα παρακολούθησής τους (4.3 ± 3 χρόνια). Πιθανότατα, χρειάζεται μεγαλύτερος χρόνος παρακολούθησης των HCV/PCA θετικών ασθενών, για την εκτίμηση της σημασίας ανίχνευσης αυτών των αυτοαντισωμάτων. Επιπλέον, τα PCA ήταν τα μόνα από τα εξετασθέντα αυτοαντισώματα, που βρέθηκαν, στη παρούσα μελέτη, να σχετίζονται με τη λήψη αντι-ηικής αγωγής με α -IFN, γεγονός, που μπορεί σημαίνει ότι επάγονται από αυτή, όπως έχει δειχθεί ότι συμβαίνει με τα επίσης οργανοειδικά αντιθυροειδικά αυτοαντισώματα (5). Ενδιαφέρον, επίσης, ήταν ότι μόνο τα PCA και τα SMA εναντίον αντιγόνων άλλων εκτός της F ακτίνης, σχετίζονταν με τον γονότυπο 1b, ο οποίος είναι γνωστό ότι σχετίζεται με χαμηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης στη θεραπεία με α -IFN (36). Τα ευρήματα αυτά χρήζουν περαιτέρω εκτίμησης με προοπτικές μελέτες,

ώστε να διευκρινιστεί αν η παραγωγή αυτοαντισωμάτων παίζει ρόλο στην ανταπόκριση στη θεραπεία.

Τέλος, κανένα από τα εξετασθέντα μη οργανοειδικά αυτοαντισώματα δε βρέθηκε να σχετίζεται με συγκεκριμένο γονότυπο του HCV, ούτε με το ιικό φορτίο, γεγονός, που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες (18,73,83, 84). Επιπλέον, η έλλειψη συσχετισμού των μη οργανοειδικών αυτοαντισωμάτων με ιολογικούς και τους περισσότερους από τους εξετασθέντες επιδημιολογικούς και δημογραφικούς παράγοντες, συνηγορεί υπέρ της πιθανότητας παράγοντες του ξενιστή ή μη ειδικές αλληλεπιδράσεις ιού-ξενιστή, να παίζουν σημαντικότερο ρόλο στην επαγωγή αυτοαντισωμάτων στους ασθενείς με HCV λοίμωξη.

Συμπερασματικά:

Η μελέτη αυτή μεγάλου δείγματος Ελλήνων ασθενών με χρόνια λοίμωξη από τον HCV έδειξε την παρουσία σε μεγάλη συχνότητα διαφόρων, κυρίως μη οργανοειδικών αυτοαντισωμάτων. Τα περισσότερα, όμως, από τα αυτοαντισώματα αυτά, δε σχετίζονταν με δημογραφικά, επιδημιολογικά, ιστολογικά, ιολογικά δεδομένα ή την παρουσία εξωηπατικών εκδηλώσεων της λοίμωξης. Εντούτοις, ορισμένα (ANA, SMA, ANCA ή η παρουσία ενός τουλάχιστο αυτοαντισώματος) σχετίζονταν με προχωρημένη νόσο (κίρρωση) και ενεργό βιοχημική δραστηριότητα (αυξημένες τιμές αμινοτρανσφερασών), γεγονός, που τα υποδεικνύει ως επιπρόσθετους εργαστηριακούς δείκτες επιβαρυσμένης νόσου. Παρ' όλα αυτά, ο παθογενετικός τους ρόλος στην πρόοδο της ηπατικής νόσου παραμένει αβέβαιος. Η παρουσία τους φαίνεται μάλλον να είναι αποτέλεσμα χρόνιας Β λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης από

τον HCV ή εμφάνισης 'νέο-αντιγόνων' στα πλαίσια της ηπατοκυτταρικής καταστροφής.

- Η ανίχνευση αντι-LKM αντισωμάτων στο 4.6% μεγάλης σειράς Ελλήνων HCV θετικών ασθενών, αποδεικνύει ότι η συχνότητα των αντισωμάτων αυτών σε Έλληνες HCV θετικούς ασθενείς δεν είναι σπάνια, όταν χρησιμοποιηθούν κατάλληλες μέθοδοι αναφοράς. Αξίζει να σημειωθεί ότι, παρά την εφαρμογή εκτεταμένων μεθόδων ελέγχου ενός μέρους των HCV/αντι-LKM θετικών ασθενών, το αυτοαντιγόνο στόχος, στις περισσότερες περιπτώσεις, αποδείχθηκε ότι ήταν άλλο από το KYT 2D6. Επιπλέον, παρουσιάζεται για πρώτη φορά η σύγχρονη ανίχνευση αντι-KYT 2D6 (αντι-LKM 1) και αντι-UGT (αντι-LKM 3) σε ασθενή HCV θετικό/HDV αρνητικό.

- Όσον αφορά στα αντι-CL αντισώματα, ανιχνεύθηκαν σε σημαντικό ποσοστό των ασθενών τόσο με ηπατίτιδα C όσο και με ηπατίτιδα B χωρίς, όμως, να βρεθεί συσχέτιση με τα 'παθογενετικά' αντι-β2-GPI αντισώματα ή με εκδηλώσεις APLS. Παρ' όλα αυτά πολυκεντρικές, προοπτικές μελέτες με μακρύ χρόνο παρακολούθησης (πάνω από 10 χρόνια) των αντι-CL θετικών/HCV ή HBV θετικών ασθενών θα ήταν χρήσιμες, ώστε να διευκρινίσουν οριστικά, αν τα αυτοαντισώματα αυτά στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες έχουν ή όχι κλινική σημασία.

- Προοπτική παρακολούθηση χρειάζονται επίσης και οι PCA θετικοί/HCV θετικοί ασθενείς, για την διευκρίνιση τόσο της κλινικής σημασίας των οργανοειδικών αυτών αυτοαντισωμάτων, κυρίως κατά τη θεραπεία με α-IFN, όσο και του πιθανού ρόλου τους στην ανταπόκριση της λοίμωξης στη θεραπεία.

- Όσον αφορά στην ειδικότητα και τον τίτλο των ANA και SMA η αλληλοεπικάλυψη μεταξύ AH-1 και ιογενούς ηπατίτιδας, φαίνεται ότι είναι, στη μελέτη αυτή, χαμηλή, γεγονός που βοηθά στην ασφαλέστερη χορήγηση θεραπείας με α-IFN, καθώς ο κίνδυνος 'λανθάνουσας' AH-1 σε HCV θετικούς ασθενείς φαίνεται να είναι πολύ χαμηλός.

- Η απουσία συσχέτισης ιολογικών παραγόντων με την παραγωγή αυτοαντισωμάτων κατά την HCV λοίμωξη, ενισχύει την άποψη ότι η παρατηρούμενη αυτοάνοση απόκριση είναι, μάλλον, αποτέλεσμα μη ειδικής B λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης από τον λεμφοτρόπο αυτό ιό, πιθανόν σε συνδυασμό με γενετικούς παράγοντες του ξενιστή.

Βιβλιογραφία

1. Seef LB. Natural history of hepatitis C. *Am J Med* 1999; 107:10-15S.
2. Alter HJ, Seef LB. Recovery, persistence and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Sem Liv Dis* 2000; 20:17-35.
3. Cacoub P, Renou C, Rosenthal E, et al. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection. A prospective multicenter study of 321 patients. *Medicine* 2000; 79:47-56.
4. Lunel F, Cacoub P. Treatment of autoimmune and extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1999; 31(Suppl 1):210-216.
5. Zignego AL, Brechot C. Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies. *J Hepatol* 1999; 31:369-376.
6. Obermayer-Sraub P, Manns MP. Hepatitis C and D, retroviruses and autoimmune manifestations. *J Autoimmunity* 2001; 16:275-285.
7. Dalekos GN, Manoussakis MN, Zervou E, et al. Immunologic and viral markers in the circulation of anti-HIV negative addicts. *Eur J Clin Invest* 1993; 23:219-225.
8. Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C. The antiphospholipid syndrome and infection. *Curr Rheum Rep* 2001; 3:277-285.
9. Lenzi M, Bellentani S, Saccoccio G, et al. Prevalence of non-organ-specific autoantibodies and chronic liver disease in the general population: a nested case-control study of the Dionysos cohort. *Gut* 1999; 45:435-441.

10. Clifford BD, Donahue D, Smith S, et al. High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995; 231:613-619.
11. Bayraktar Y, Bayraktar M, Gurakar A, et al. A comparison of the prevalence of autoantibodies in individuals with chronic hepatitis C and those with autoimmune hepatitis: the role of interferon in the development of autoimmune diseases. *Hepatogastroenterology* 1997; 44:417-425.
12. Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, et al. Evidence against hepatitis viruses as important causes of severe autoimmune hepatitis in the United States. *J Hepatol* 1993; 18:342-352.
13. Reddy KR, Krawitt EL, Homberg JC et al. Absence of LKM 1 antibody in hepatitis C viral infection in the United States. *J Viral Hepatol* 1995; 2:175-179.
14. Cassani F, Cataleta M, Valentini P, et al. Serum autoantibodies in chronic hepatitis C: comparison with autoimmune hepatitis and impact on the disease profile. *Hepatology* 1997; 26:561-566.
15. Gregorio GV, Pensati P, Iorio R, et al. Autoantibody prevalence in children with liver disease due to chronic hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 1998; 112:471-476.
16. Bortolotti F, Vajro P, Balli F, et al. Non-organ specific autoantibodies in children with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1996; 25:614-620.
17. Valentini G, Mantelli A, Persico M, et al. Serological and clinical markers of autoimmune disease in HCV-infected subjects with different disease conditions. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17:75-79.

18. Zein NN, Persing DH, Czaja AJ. Viral genotypes as determinants of autoimmune expression in chronic hepatitis C. *Mayo Clin Proc* 1999; 74:454-460.
19. Dalekos GN, Makri E, Loges S, et al. Increased incidence of anti-LKM in a consecutive sample of HCV patients from central Greece: a preliminary study. *J Hepatol* 2000; 32(Suppl 2):174.
20. Νταλέκος ΓΝ. Μοριακά ταυτοποιημένα αυτοαντιγόνα-στόχοι στη διάγνωση, διαφορική διάγνωση και μελέτη της αιτιοπαθογένειας των αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος. *Ιατρική* 1999, 75: 408-418.
21. Λιάσκος Χ, Νταλέκος ΓΝ. Νεότερα επιδημιολογικά και κλινικοεργαστηριακά δεδομένα για τη διάγνωση και τη διαφορική διάγνωση της αυτοάνοσης ηπατίτιδας. *Ιατρική* 2000; 78:233-243.
22. Zachou K, Liaskos C, Makri E, Dalekos GN. Role and significance of autoantibodies in the diagnosis and differential diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatogastroenterology* 2003 (In press).
23. Straussburg CP, Jaeckel E, Manns MP. Anti-mitochondrial antibodies and other immunological tests in primary biliary cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11:595-601.
24. Chapman RW. Primary sclerosing cholangitis as an autoimmune disease: pros and cons. In: Manns MP, Paumgartner G, Leuschner U (Ed), *Immunology and liver*. 2000, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 279-287.
25. Dalekos GN, Wedemeyer H, Obermayer-Straub P, et al. Epitope mapping of cytochrome P450 2D6 autoantigen in patients with chronic hepatitis C under α -interferon treatment. *J Hepatol* 1999; 30:366-375.

26. Yamamoto AM, Johanet C, Duclos-Vallee JC, et al. A new approach to cytochrome CYP2D6 antibody detection in autoimmune hepatitis type 2 (AIH-2) and chronic hepatitis C virus (HCV) infection: a sensitive and quantitative radioligand assay. *Clin Exp Immunol* 1997; 108:396-400.
27. Ma Y, Gregorio G, Gaken J, et al. Establishment of a novel radioligand assay using eukariotically expressed cytochrome P4502D6 for the measurement of liver kidney microsomal type 1 antibody in patients with autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1997; 26:1396-1402.
28. Dalekos GN, Kistis K, Boumba D, et al. Increased incidence of anticardiolipin antibodies in patients with hepatitis C is not associated with aetiopathogenetic link to antiphospholipid syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12:67-74.
29. Zachou K, Liaskos C, Christodoulou DK. Anti-cardiolipin antibodies (anti-CL) in patients with hepatitis C virus infection are independent of beta2-glycoprotein I (β 2-GPI) co-factor or features of antiphospholipid syndrome (APLS). *J Hepatol* 2002; 36(Suppl 1):139.
30. Dalekos GN, Christodoulou D, Kistis KG, et al. A prospective evaluation of dermatological side-effects during alpha-interferon therapy for chronic viral hepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10:933-939.
31. Fattovich G, Giustina G, Favarato S, and Investigators of the Italian Association for the Study of the Liver. A survey of adverse events in 11241 patients with chronic viral hepatitis treated with alpha interferon. *J Hepatol* 1996; 24:38-47.

32. Todros L, Saracco G, Durazzo M, et al. Efficacy and safety of interferon alpha therapy in chronic hepatitis C with autoantibodies to liver-kidney microsomes. *Hepatology* 1995; 22:1374-1378.
33. Muratori L, Lenzi M, Cataleta M, et al. Interferon therapy in liver/kidney microsomal antibody type 1-positive patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1994; 21:199-203.
34. Ben-Ari, Czaja AJ. Autoimmune hepatitis and its variant syndromes. *Gut* 2001; 49:589-594.
35. Zignego AL, Ferri C, Giannini C, et al. Hepatitis C virus genotype analysis in patients with type II mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med* 1996; 124:31-34.
36. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. *J Hepatol* 1999; 30: 956-961.
37. Knodell KG, Ishak KG, Black WC, et al. Formulation and application of a numeric scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1:431-435.
38. Goodman ZD, Ishak KG. Histopathology of hepatitis C virus infection. *Semin Liv Dis* 1995; 15:70-81.
39. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al. International Autoimmune Hepatitis Group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31:929-938.
40. Dalekos GN, Manoussakis MN, Goussia AC, Tsianos EV, Moutsopoulos HM. Soluble interleukin-2 receptors, antineutrophil cytoplasmic antibodies and other autoantibodies in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1993; 34:658-664.

41. Manoussakis MN, Tzioufas AG, Silis MP, Pange PJ, Goudevenos J, Moutsopoulos HM. High prevalence of anti-cardiolipin and other autoantibodies in a healthy elderly population. *Clin Exp Immunol* 1987; 69: 557-565.
42. Manoussakis MN, Charavi AE, Drosos AA, Kitridou RC, Moutsopoulos HM. Anticardiolipin antibodies in unselected autoimmune rheumatic disease patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; 44:297-307.
43. Dalekos GN, Ringstad J, Savaidis J, Seferiadis KI, Tsianos EV. Zinc, copper and immunologic markers in the circulation of well-nourished patients with ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10: 331-337.
44. Strassburg CP, Obermayer-Straub P, Alex B, et al. Autoantibodies against glucuronosyltransferases differ between viral hepatitis and autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1996; 111:1582-1592.
45. Philipp T, Durazzo M, Trautwein C, et al. Recognition of uridine diphosphate glucuronosyl transferases by LKM 3 antibodies in chronic hepatitis D. *Lancet* 1994; 344:578-581.
46. Durazzo M, Philipp T, Van Pelt FNAM, et al. Heterogeneity of microsomal autoantibodies (LKM) in chronic hepatitis C and D virus infection. *Gastroenterology* 1995; 108:455-462.
47. Manns MP, Griffin KJ, Sullivan KF, et al. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P450 monooxygenase. *J Clin Invest* 1991; 88:1370-1378.

48. Manns MP, Gerken G, Kyriatsoulis A, et al. Characterization of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen. *Lancet* 1987; i:292-294.
49. Manns MP, Gerken G, Kyriatsoulis A, et al. Two different subtypes of antimitochondrial antibodies are associated with primary biliary cirrhosis: identification and characterization by radioimmunoassay and immunoblotting. *Hepatology* 1987; 5:893-899.
50. Yamano S, Tatsuno J, Gonzalez FJ. The CYP2A3 gene product catalyses coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes. *Biochemistry* 1990; 29:1322-1329.
51. Gillam EMJ, Guo Z, Martin MV, et al. Expression of cytochrome P450 2D6 in *E. coli*, purification, and spectral and catalytic characterization. *Arch Biochem Biophys* 1995; 319:540-50.
52. Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C, et al. Autoantibodies and defined autoantigens in autoimmune hepatitis: an overview. *Eur J Intern Med* 2002; 13:293-303.
53. Fried MW, Draguesku JO, Shindo M, et al. Clinical and serological differentiation of autoimmune and hepatitis C virus related chronic hepatitis. *Dig Dis Sci* 1993; 38:631-636.
54. Czaja AJ, Cassani F, Cataleta M, et al. Frequency and significance of antibodies to actin in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1996; 24:1068-1073.
55. Czaja AJ, Nishioka M, Morshed SA, et al. Patterns of nuclear immunofluorescence and reactivities to recombinant nuclear antigens in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1994; 107:200-207.

56. Tzioufas AG, Manoussakis MN, Drosos AA, et al. Enzyme immunoassays for the detection of IgG and IgM anti-dsDNA antibodies: clinical significance and specificity. *Clin Exp Rheumatol* 1987; 5:247-253.
57. Tzioufas AG, Terzoglou C, Stavropoulos ED, et al. Determination of anti-dsDNA antibodies by three different methods: comparison of sensitivity, specificity and correlation with lupus activity index (LAI). *Clin Rheumatol* 1990; 9:182-185.
58. Dalekos GN, Tsianos EV. Anti-neutrophil antibodies in chronic viral hepatitis. *J Hepatol* 1994; 20:561.
59. Wu YY, Hsu TC, Chen TY, et al. Proteinase 3 and dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) are major autoantigens in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 2002 ; 128 :347-352.
60. Ohira H, Tojo J, Shinzawa J, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibody in patients with antinuclear, antibody-positive chronic hepatitis C. *Fukushima J Med Sci* 1998; 44:83-92.
61. Roozendaal C, de Jong MA, van den Berg AP, et al. Clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune liver diseases. *J Hepatol* 2000; 32:734-741.
62. Zauli D, Ghetti S, Grassi A, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in type 1 and 2 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1997; 25:1105-1107.
63. Targan SR, Landers C, Vidrich A, et al. High titer antineutrophil cytoplasmic antibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1995; 108:1159-1166.

64. Leroy V, Arvieux J, Jacob MC, et al. Prevalence and significance of anticardiolipin, anti-b2 glycoprotein I and anti-prothrombin antibodies in chronic hepatitis C. *Br J Haematol* 1998; 101: 468-474.
65. Harada M, Fujisawa Y, Sakisaka S, et al. High prevalence of anticardiolipin antibodies in hepatitis C virus infection: lack of effects on thrombocytopenia and thrombotic complications. *J Gastroenterol* 2000; 35: 272-277.
66. Stoeber ZM, Fogel M, Smirov A, et al. Anticardiolipin autoantibodies in serum samples and cryoglobulins of patients with chronic hepatitis C infection. *Ann Rheum Dis* 2000, 59: 483-486.
67. Prieto J, Yuste JR, Belouqui O, et al. Anticardiolipin antibodies in chronic hepatitis C: implication of hepatitis C virus as the cause of the antiphospholipid syndrome. *Hepatology* 1996; 23: 199-204.
68. Al-Saeed A, Makris M, Malia RG, et al. The development of antiphospholipid antibodies in haemophilia is linked to infection with hepatitis C. *Br J Haematol* 1994; 88:845-848.
69. Mangia A, Margaglione M, Cascavilla I, et al. Anticardiolipin antibodies in patients with liver disease. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2983-7.
70. Biron C, Andreani H, Blanc P, et al. Prevalence of antiphospholipid antibodies in patients with chronic liver disease related to alcohol or hepatitis C virus: correlation with liver injury. *J Lab Clin Med* 1998; 131:243-50.
71. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al. International Consensus Statement on Preliminary Classification Criteria for Definite

- Antiphospholipid Syndrome. *Arthritis and Rheumatism* 1999; 42:1309-1311.
72. Sachithanandan S, Fielding JF. Autoimmune disease is not a feature of hepatitis C infection in Ireland. *J Clin Gastroenterol* 1997; 25:522-524.
73. Betterle C, Fabris P, Zanchetta R, et al. Autoimmunity against pancreatic islets and other tissues before and after interferon-alpha therapy in patients with hepatitis C virus chronic infection. *Diabetes Care* 2000; 23:1177-1181.
74. Drygiannakis D, Lionis Ch, Drygiannakis I, et al. Low prevalence of liver-kidney microsomal autoantibodies of type 1 (LKM 1) in hepatitis C seropositive subjects on Crete, Greece. *BMC Gastroenterology* 2001; 1:4.
75. Johnson PJ, McFarlane IG (convenors on behalf of the panel). Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993; 18:998-1005.
76. Ma Y, Peakman M, Lobo-Yeo A, et al. Differences in immune recognition of cytochrome P4502D6 by liver/kidney microsomal (LKM) antibody in autoimmune hepatitis and chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 1994; 97:94-99.
77. Yamamoto AM, Cresteil D, Homberg JC, et al. characterization of anti-liver-kidney microsome antibody (anti-LKM-1) from hepatitis C virus positive and negative sera. *Gastroenterology* 1993; 104:1762-1767.
78. Miyakawa H, Kitazawa E, Kikuchi K, et al. Immunoreactivity to various human cytochrome P450 proteins of sera from patients with autoimmune hepatitis, chronic hepatitis B and chronic hepatitis C. *Autoimmunity* 2001; 33:23-32.

79. Obermayer-Straub P, Strassburg CP, Manns MP. Target proteins in human autoimmunity: cytochromes P450 and UDP-glucuronyltransferases. *Can J Gastroenterol* 2000; 14:429-439.
80. Csepregi A, Nemesanszky E, Luettig B, et al. LKM3 autoantibodies in hepatitis C cirrhosis: a further phenomenon of the HCV-induced autoimmunity. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:910-911.
81. Lenzi M, Manotti P, Muratori L, et al. Liver cytosolic 1 antifen-antibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Gut* 1995; 36:749-754.
82. Baum H, Berg PA. The complex nature of mitochondrial antibodies and their relation to primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1981; 1:309-321.
83. Pawlotsky JM, Roudot-Thoraval F, Simmonds P, et al. Extrahepatic immunologic manifestations in chronic hepatitis C and hepatitis C virus serotypes. *Ann Intern Med* 1995; 122:169-173.
84. Zein NN, Persing DH, Czaja AJ. Viral genotypes as determinants of autoimmune expression in chronic hepatitis C. *Mayo Clin Proc* 1999; 74:454-460.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) είναι ένας ηπατοτρόπος και λεμφοτρόπος ιός, που προκαλεί μια χρόνια, σιωπηλή και ασυμπτωματική νόσο στο πλείστο των ασθενών, αποτελώντας μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας, παγκοσμίως. Επιπλέον, ο HCV χαρακτηρίζεται από επαγωγή αυτοανόσων αντιδράσεων, όπως διαπιστώνεται από την παρουσία εξωηπατικών εκδηλώσεων και οργανοειδικών και μη οργανοειδικών αυτοαντισωμάτων. Πολλά από τα αυτοαντισώματα αυτά είναι παρόμοια με εκείνα, που χαρακτηρίζουν τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος. Τόσο οι εξωηπατικές εκδηλώσεις όσο και η παραγωγή αυτοαντισωμάτων μπορούν να ευοδωθούν από τη χορηγούμενη θεραπευτική αγωγή (α-ιντερφερόνη, α-IFN).

Στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν:

- Ο προσδιορισμός της συχνότητας της παρουσίας των αντισωμάτων έναντι μικροσωμίων ήπατος-νεφρών (αντι-LKM) και διαφόρων άλλων αυτοαντισωμάτων [αντιπυρηνικών (ANA), αντιμιτοχονδριακών (AMA), έναντι λείων μυικών ινών (SMA), έναντι κυτταροπλάσματος ουδετερόφιλων (ANCA), έναντι τοιχωματικών κυττάρων στομάχου (PCA), έναντι καρδιολιπίνης (αντι-

CL), έναντι κυτοσολίων ήπατος 1 (αντι-LC1), κατά διπλής έλικας DNA (αντι-dsDNA)] σε ένα μεγάλο μη επιλεγμένο δείγμα Ελλήνων HCV θετικών ασθενών (n=303), ανεξάρτητα αν βρίσκονται ή όχι υπό θεραπεία καθώς παρόμοια πληροφορία δεν υπάρχει στη χώρα μας.

➤ Η διερεύνηση των παραγόντων, που πιθανόν να σχετίζονται με την παρουσία των προαναφερθέντων αντισωμάτων και αν τα αυτοαντισώματα αυτά έχουν ή όχι κάποια κλινική σημασία. Γι'αυτό, εκτιμήθηκε η παρουσία των αυτοαντισωμάτων σε σχέση με δημογραφικά, επιδημιολογικά, κλινικά, εργαστηριακά, ιστολογικά και ιολογικά χαρακτηριστικά των HCV θετικών ασθενών καθώς και με τη λήψη ή όχι θεραπείας με α-IFN.

➤ Η διερεύνηση των αυτοαντιγόνων-στόχων των αντι-LKM αντισωμάτων σε μη επιλεγμένο δείγμα του συνόλου των ασθενών (n=39), με τη χρήση μοριακών τεχνικών.

Βρέθηκε ότι η επίπτωση των εξετασθέντων αυτοαντισωμάτων στους Έλληνες ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV ήταν ιδιαίτερα υψηλή (90% παρουσία αυτοαντισωμάτων τουλάχιστον μιας ειδικότητας). Πιο συγκεκριμένα, η ανίχνευση αντι-LKM αντισωμάτων δεν ήταν σπάνια στους Έλληνες HCV θετικούς ασθενείς, καθώς ανευρέθησαν στο 4.6% αυτών. Ωστόσο, στους μη επιλεγμένους ασθενείς που εξετάστηκαν, το αυτοαντιγόνο-στόχος των αντι-LKM αντισωμάτων βρέθηκε, στο πλείστο των περιπτώσεων, να είναι άλλο από το κυτόχρωμα P4502D6 (KYT 2D6). Επιπλέον, για πρώτη φορά, ανιχνεύθηκαν σε HCV θετικό/HDV αρνητικό ασθενή συγχρόνως αντι-KYT 2D6 και αντισώματα έναντι της UDP γλυκουρονικής τρανσφεράσης (αντι-UGT).

Τα συχνότερα ανιχνευόμενα αυτοαντισώματα ήταν τα SMA (71.6%) και τα ANA (63%), με ειδικότητα όμως διαφορετική από εκείνη, που συνήθως

απαντάται στα αντίστοιχα αυτοαντισώματα, που ανιχνεύονται στην αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1 (AH-1). Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε ότι τα ANCA και τα αντι-LC1 αντισώματα δεν ανιχνεύονται αποκλειστικά στην AH-1 και την αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 2 (AH-2) αντίστοιχα, καθώς βρέθηκαν στο 52.8% και στο 3% των ασθενών με χρόνια λοίμωξη από τον HCV, αντίστοιχα. Επίσης, ανιχνεύθηκαν AMA (7.6%), PCA (5.4%), αντι-CL (20.4%) και αντι-dsDNA (26.1%) αντισώματα.

Τα περισσότερα, όμως, από τα εξετασθέντα αυτοαντισώματα δε σχετίζονταν με δημογραφικά, επιδημιολογικά, ιστολογικά, ιολογικά δεδομένα ή την παρουσία εξωηπατικών εκδηλώσεων της λοίμωξης. Εντούτοις, ορισμένα (ANA, SMA, ANCA ή η παρουσία ενός τουλάχιστο αυτοαντισώματος) σχετίζονταν με προχωρημένη νόσο (κίρρωση) και ενεργό βιοχημική δραστηριότητα (αυξημένες τιμές αμινοτρανσφερασών), γεγονός, που τα υποδεικνύει ως επιπρόσθετους εργαστηριακούς δείκτες επιβαρυσμένης νόσου. Παρ' όλα αυτά, ο παθογενετικός τους ρόλος στην πρόοδο της ηπατικής νόσου παραμένει αβέβαιος. Η παρουσία τους φαίνεται μάλλον να είναι αποτέλεσμα χρόνιας Β λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης από τον HCV ή εμφάνισης 'νέο-αντιγόνων' στα πλαίσια της ηπατοκυτταρικής καταστροφής.

Από τα επιδημιολογικά και δημογραφικά στοιχεία, που εξετάστηκαν, συσχέτιση στατιστικώς σημαντική βρέθηκε α) μεταξύ της ηλικίας και της θετικότητας για αντι-CL αντισώματα ($p < 0.05$) β) της χρήσης ενδοφλεβίως ναρκωτικών ουσιών και της θετικότητας για αντι-dsDNA αντισώματα ($p = 0.011$) και γ) της κατάχρησης αλκοόλ και της θετικότητας για αντι-CL αντισώματα ($p < 0.05$).

Κανείς από τους HCV θετικούς/αντι-CL θετικούς ασθενείς δεν παρουσίαζε ούτε ανέπτυξε στη διάρκεια της παρακολούθησης εκδηλώσεις συμβατές με το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APLS) (θρομβώσεις, καθ' ἕξιν αποβολές, θρομβοπενία). Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν από το γεγονός ότι τα αντι-CL αντισώματα, σε μη επιλεγμένο δείγμα HCV θετικών ασθενών (n=174) της μελέτης, βρέθηκαν να είναι ανεξάρτητα από τον συμπαραγοντα β2-γλυκοπρωτεΐνη I (β2-GPI) και επομένως 'μη παθογενετικά', ενώ 'μη παθογενετικά' αντι-CL αντισώματα ανιχνεύτηκαν και σε υψηλό ποσοστό (14%) των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β, που εξετάστηκαν (ομάδα ελέγχου ασθενών). Παρ' όλα αυτά, προοπτικές μελέτες με μακρύ χρόνο παρακολούθησης (>10 ετών) των HCV θετικών/αντι-CL θετικών ασθενών χρειάζονται, ώστε να αποσαφηνιστεί η κλινική σημασία των αντι-CL αντισωμάτων στις χρόνιες ιογενείς λοιμώξεις.

Επιπρόσθετα, το ιικό φορτίο δε βρέθηκε να σχετίζεται με κανένα από τα αυτοαντισώματα, ενώ η παρουσία γονοτύπου 1b σχετίζονταν μόνο με την παρουσία PCA (p=0.017). Τα PCA ήταν, επίσης, τα μόνα αυτοαντισώματα που βρέθηκε να σχετίζονται με τη λήψη αντι-ιικής θεραπείας (p=0.029). Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν την ανάγκη προοπτικών μελετών για τη διερεύνηση της πιθανής επαγωγής των αυτοαντισωμάτων αυτών από την αντι-ιική αγωγή και του πιθανού ρόλου τους στην ανταπόκριση σ' αυτή.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε, ότι η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων είναι πολύ συχνή στους Έλληνες ασθενείς με χρόνια λοίμωξη από τον HCV, η παρουσία τους, όμως, φαίνεται να είναι αποτέλεσμα χρόνιας Β λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης από τον λεμφοτρόπο αυτό ιό, πιθανόν σε συνδυασμό με γενετική προδιάθεση του ξενιστή ή εμφάνισης 'νέο-

αντιγόνων' στα πλαίσια της ηπατοκυτταρικής καταστροφής. Από κλινική σκοπιά, φαίνεται ότι ορισμένα μη οργανοειδικά αυτοαντισώματα (π.χ. ANA, SMA, ANCA) που ανιχνεύονται κατά τη χρόνια λοίμωξη από τον HCV μπορούν να αποτελέσουν επιπρόσθετους εργαστηριακούς δείκτες προχωρημένης ηπατικής νόσου. Μακροχρόνιες προοπτικές μελέτες απαιτούνται για να αποσαφηνιστεί η κλινική σημασία και ο ακριβής ρόλος των αυτοαντισωμάτων αυτών, όπως και των αντι-CL και PCA, στη χρόνια ηπατίτιδα C.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Hepatitis C virus (HCV) is an hepatotropic and lymphotropic virus, who provokes a chronic, 'silent' and non symptomatic disease, in the majority of patients, being a major problem of public health, world while. In addition, HCV is characterized by the induction of autoimmune reactions, as can be demonstrated by the presence of extrahepatic manifestations and organ specific and non-organ specific autoantibodies. A lot of these autoantibodies are similar with those that characterize the autoimmune liver diseases. The extahepatic manifestations and autoantibody production can be promoted by the administration of antiviral treatment (α -interferon, α -IFN).

The aims of the present study were:

- To evaluate the prevalence of liver-kidney microsomal antibodies (anti-LKM) and of several other autoantibodies [antinuclear (ANA), antimitochondrial (AMA), smooth muscle autoantibodies (SMA), antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), parietal cells antibodies (PCA), anticardiolipin antibodies (anti-CL), autoantibodies against liver cytosol 1 antigen (anti-LC1),

antibodies against double stranded DNA (anti-dsDNA)] in a large non selected sample of Greek HCV positive patients (n=303), independently of being under treatment or not, since there is no such information for our country.

- To evaluate the parameters, that are possibly correlated with the presence of the autoantibodies mentioned above and if these autoantibodies are of any clinical significance or not. For these reasons, the presence of the autoantibodies was associated with certain demographic, epidemiologic, clinical, laboratory, histologic and virologic characteristics of HCV positive patients, as well as with the administration of antiviral treatment.
- To investigate the target autoantigens of anti-LKM antibodies in a non-selected part of the patients (n=39), with the use of molecular methods.

It was found, that the prevalence of the autoantibodies studied, in Greek HCV positive patients was very high (90% presence of autoantibodies of at least one specificity). More precisely, the detection of anti-LKM antibodies in Greek HCV positive patients was not rare at all, since they were found in 4.6% of them. However, in the group of non-selected patients who were tested, the target autoantigen of anti-LKM antibodies was proved to be, in the majority of cases, other than cytochrome P4502D6 (CYP 2D6). In addition, for the first time, anti-CYP 2D6 and antibodies against UDP glucuronyl transferase (anti-UGT) were detected simultaneously, in a HCV positive/HDV negative patient.

The more frequently detected autoantibodies were SMA (71.6%) and ANA (63%). However, their specificity was different than that of the respective autoantibodies detected in autoimmune hepatitis 1 (AH-1). In addition, it was confirmed that ANCA and anti-LC1 antibodies are not exclusively detected in

AH-1 and autoimmune hepatitis 2 (AH-2) respectively, since they were found in 52.8% and 3% of patients suffering from chronic hepatitis C, respectively. Furthermore, AMA (7.6%), PCA (5.4%), anti-CL (20.4%) and anti-dsDNA (26.1%) antibodies, were also detected.

The majority of the autoantibodies tested were not associated with demographic, epidemiologic, histologic, virologic data or the presence of extrahepatic manifestations. However, some of them (for example ANA, SMA, ANCA or the presence of one autoantibody at least) were associated with advanced disease (cirrhosis) and biochemical activity (elevated values of aminotranferases), which points them out as additional laboratory markers of progressive disease. Nevertheless, their pathogenetic role in progression of liver disease is uncertain. Their presence seems rather to be the result of a chronic B lymphocytic activation caused by HCV or neo-antigen formation in the context of hepatocellular destruction.

Among the epidemiologic and demographic parameters studied, statistically significant association was found between a) age and anti-CL antibody positivity ($p < 0.05$) b) iv drug abuse and anti-dsDNA antibody positivity ($p = 0.011$) and c) alcohol abuse and anti-CL antibody positivity ($p < 0.05$).

None of the HCV positive/anti-CL positive patients presented or developed during the follow up period manifestations suggestive of antiphospholipid syndrome (APLS) (thrombosis, recurrent fetal losses, thrombocytopenia). The above findings were confirmed by the fact that, in a non selected sample of HCV positive patients ($n = 174$) of the study, anti-CL antibodies were found to be independent from the 'co-factor' beta 2-

glucoprotein I (β 2-GPI) and therefore, 'non-pathogenic', while, 'non-pathogenic anti-CL antibodies were found in a high percentage (14%) of the patients with chronic hepatitis B, who were studied (disease control group). However, prospective studies with long-term follow up (>10 years) of HCV positive/anti-CL positive patients are needed, in order to determine the clinical significance of anti-CL antibodies in chronic viral infections.

In addition, there was found no correlation between the viral load and any of the autoantibodies, while the presence of genotype 1b was associated only with the presence of PCA ($p=0.017$). PCA was, also, the only autoantibody marker associated with the administration of antiviral treatment ($p=0.029$). The above findings suggest the need of prospective studies in order to investigate the possible induction of these autoantibodies by the antiviral treatment and their role in the response to such a treatment.

Conclusively, the present study showed that the detection of autoantibodies is very frequent in Greek patients with chronic HCV infection, but their presence is rather a result of a chronic B lymphocytic activation from this lymphotropic virus, possibly in combination with the genetic predisposition of the host or neo-antigen formation in the context of hepatocellular destruction. From the clinical point of view, it seems that some non-organ specific autoantibodies detected during chronic HCV infection (for example ANA, SMA, ANCA) can be used as additional laboratory markers of progressive liver disease. Long-lasting, prospective studies are needed in order to determine the clinical significance and the precise role of those autoantibodies, as well as that of anti-CL and PCA, in chronic hepatitis C.

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑ: Καλλιόπη
ΕΠΩΝΥΜΟ: Ζάχου
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΕΡΑ: Βασίλειος
ΟΝΟΜΑ ΜΗΤΕΡΑΣ: Βασιλική
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: Λάρισα
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 25-5-1969
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: Έγγαμη, μητέρα δύο παιδιών
ΥΠΗΚΟΟΤΗΤΑ: Ελληνική
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ: Ροΐδου 8, 41222 Λάρισα
ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ: Αγγλική, Γαλλική

ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ

Ιούνιος 1987 Απολυτήριο Λυκείου από το 4^ο Λύκειο Λάρισας.

Σεπτέμβριος 1987 Εισαγωγή στην Ιατρική Σχολή Παν/μίου Θεσσαλονίκης.

Δεκέμβριος 1993 Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Θεσσαλονίκης.

Απρίλιος 1994 - Οκτώβριος 1995 Ιατρός υπόχρεος υπηρεσίας υπαίθρου στο Κέντρο Υγείας Γόννων, Λάρισας.

Οκτώβριος 1995 - Φεβρουάριος 1998 Ειδικευόμενη ιατρός στην Παθολογική Κλινική του Α' Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης "Άγιος Παύλος" (Δ/ντης: Δρ. Ν. Στίγγας).

Μάρτιος 1998 - Μάρτιος 1999 Παρακολούθηση μεταπτυχιακού προγράμματος του ΕΚΑΒ με θέμα Επείγουσα Προνοσοκομειακή Ιατρική (Ε.Π.Ι) και απόκτηση πιστοποιητικού επάρκειας μετά από εξετάσεις.

Νοέμβριος 1999 - Ιούνιος 2000 Ειδικευόμενη ιατρός στον Ογκολογικό σταθμό του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (Δ/ντης: κ. Ν. Αρχοντώνης).

Ιούνιος 2000 - Νοέμβριος 2002

Ειδικευόμενη ιατρός στην Παθολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (Δ/ντης: κ. Κ. Καραμήτσος).

Δεκέμβριος 2002

Τίτλος Ειδικότητας Παθολογίας (Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Ιωαννίνων)

Νοέμβριος 1998 - σήμερα

Υποψήφια διδάκτωρ της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΤΙΤΛΟΙ ΣΠΟΥΔΩΝ

1. Απολυτήριο Λυκείου (4^ο Λύκειο Λάρισας), (1987).
2. Πτυχίο Ιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (1993).
3. Certificat pratique de langue Francaise (1er degre) (Université de Sorbonne) (1991).
4. Certificate of Proficiency in English (University of Cambridge) (1995).
5. Τίτλος Ιατρικής Ειδικότητας Παθολογίας (2002).

ΑΔΕΙΑ ΑΣΚΗΣΗΣ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ

Άδεια άσκησης Ιατρικού Επαγγέλματος, 13 Δεκεμβρίου 1993.

ΤΙΤΛΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ

Τίτλος Ιατρικής Ειδικότητας Παθολογίας, 15 Ιανουαρίου 2003.

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

Ελληνική Εταιρεία Μελέτης Ήπατος, 2002.

ΟΜΙΛΙΕΣ, ΔΙΑΛΕΞΕΙΣ

1. Ομιλία με θέμα: "Εργαστηριακή διάγνωση της οξείας και χρόνιας ηπατίτιδας Β". Στρογγυλό τραπέζι με θέμα: Ηπατίτιδα Β τρέχουσες απόψεις για τη διάσταση του προβλήματος και τους τρόπους προφύλαξης. Ιατρική Σχολή Λάρισας, 14 Οκτωβρίου 2000.
2. Ομιλία με θέμα: "Η σημασία του εργαστηρίου στη σύγχρονη διάγνωση των χρόνιων ηπατοπαθειών". Εκπαιδευτική ημερίδα υπό την αιγίδα της Ελληνικής Εταιρίας Μελέτης Ήπατος και του Κ.Ε.Ε.Λ.: Ηπατικές παθήσεις στην πρωτοβάθμια φροντίδα υγείας. Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, 15 Σεπτεμβρίου 2001.

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΩΝ Ή/ΚΑΙ ΕΠΙΜΟΡΦΩΤΙΚΩΝ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ

1. Ετήσια Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα στο Σακχαρώδη Διαβήτη (19ο έτος), Αθήνα, 24-28 Νοεμβρίου 1997 (διάρκειας 25 ωρών).
2. Σεμινάριο Ανοσολογίας (15ος κύκλος), Θεσσαλονίκη, 5-6 Ιουνίου 1997.
3. Postgraduate course of the International Association for the Study of the liver (IASL) and the European Association for the Study of the Liver (EASL) entitled: 'Prevention and intervention in liver diseases', Madrid, April 17-18, 2002 (διάρκειας 14 ωρών).
4. Πολυθεματική Εκπαιδευτική Ημερίδα της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης του Ήπατος, Αθήνα, 27 Απριλίου 2002 (διάρκειας 9 ωρών).
5. Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο "Διαγνωστική Ανοσολογία και Ιστοσυμβατότητα", Λάρισα, 15-18 Ιανουαρίου 2003 (διάρκειας 48 ωρών).

ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ

Χρηματοδότηση από την Επιτροπή Ερευνών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του ερευνητικού έργου με τίτλο: **«Ανίχνευση αντισωμάτων κατά μικροσωμιακών αντιγόνων ήπατος-νεφρών (αντι-LKM) και κατά κυτοσολίων ήπατος (αντι-LC) σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C: Επιδημιολογικά και κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά»**. (Επιστημονικός υπεύθυνος του έργου: Γ.Ν. Νταλέκος). Το παραπάνω έργο αποτελεί μέρος της Διδακτορικής μου Διατριβής.

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ- ΒΡΑΒΕΙΑ

1. Υποτροφία του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (σειρά εισαγωγής 9^η στην Ιατρική Σχολή Θεσσαλονίκης, 1987).
2. Β' βραβείο για την εργασία με τίτλο: " Τα αντικαρδιολιπινικά αντισώματα (α-CL) στην HCV λοίμωξη είναι «ανεξάρτητα» από τη β2-γλυκοπρωτεΐνη-I (β2-GPI) («μη θρομβωτικά» α-CL αντισώματα): προκαταρκτικά ευρήματα σε 107 HCV ασθενείς της κεντρικής Ελλάδας" (παρουσιάστηκε στην 8^η Ημερίδα για την ηπατίτιδα C Αθήνα, 27 Ιανουαρίου 2001).
3. Α' βραβείο για την εργασία με τίτλο: "Αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα (ΑΠΚ) και στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών (ΜΟ) στην αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1 (ΑΗ-1) και την πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΠΧΚ)" (παρουσιάστηκε ως αναρτημένη ανακοίνωση στο 8^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, 8-11 Μαΐου 2003).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΑΡΘΡΩΝ

Α) Στον Διεθνή Ιατρικό Τύπο

1. G.N. Dalekos, **K. Zachou**, C. Liaskos. The antiphospholipid syndrome and infection (invited review). Curr Rheumatol Rep 2001 Aug; 3(4):277-85. **(Invited review)**.
2. D.K. Christodoulou, G.N. Dalekos, M. Merkouropoulos, K.G. Kistis, G. Georgitsi, E. Zervou, **K. Zachou**, E.V. Tsianos. Cryoglobulinemia due to

chronic viral hepatitis infections is not a major clinical problem. Eur J Intern Med 2001; 12:435-441.

3. G.N. Dalekos, **K. Zachou**, C. Liaskos, N. Gatselis. Autoantibodies and defined target-autoantigens in autoimmune hepatitis: an overview. Eur J Intern Med 2002; 13:293-303.
4. G.N. Dalekos, E. Makri, S. Loges, P. Obermayer-Straub, **K. Zachou**, Th. Tsirikas, G. Papadamou, M.P. Manns. Increased incidence of anti-LKM autoantibodies in a consecutive cohort of HCV patients from Central Greece. Eur J Gastroenterol and Hepatol 2002; 14:1-8.
5. **K. Zachou**, Ch. Liaskos, E. Makri, G.N. Dalekos. Role and significance of autoantibodies in the diagnosis and differential diagnosis of autoimmune hepatitis. Hepato-Gastroenterology, 2002 (in press).
6. **K. Zachou**, C. Liaskos, D.K. Christodoulou, M. Kardasi, G. Papadamou, N. Gatselis, S.P. Georgiadou, E.V. Tsianos, G.N. Dalekos. Anti-cardiolipin antibodies (anti-CL) in patients with chronic viral hepatitis infections are independent of beta2-glycoprotein I (β 2-GPI) co-factor or features of antiphospholipid syndrome (APLS). Eur J Intern Med 2003; 33, 161-168.
7. D.S. Kyriakou, M.G. Alexandrakis, **K. Zachou**, F. Passam, N.E. Stathakis, G.N. Dalekos. Hematopoietic progenitor cells and bone marrow stromal cells in patients with autoimmune hepatitis type 1 and primary biliary cirrhosis. 2002 (submitted).
8. G.N. Dalekos, K. Patsiaoura, **K. Zachou**, E. Makri Ch. Liaskos, , N. Stathakis. Primary biliary cirrhosis presented as eosinophilia in asymptomatic women with or without elevated alkaline phosphatase. 2002 (submitted).

B) Στον Ελληνικό Ιατρικό Τύπο

1. Ε.Γ. Βλαχογιάννης, Π. Κράχτης, **Π. Ζάχου**, Ι. Χατζηγιάννης, Ε. Δασκαλοπούλου, Ν. Στίγγας, Κ. Βουδούρης. Η συχνότητα του συνδρόμου απνοιών στον ύπνο και η επίδρασή του στους προδιαθεσικούς παράγοντες αθηροσκλήρωσης σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Ελληνική Ρευματολογία 1999, 10(2): 105-111.
2. **Κ. Ζάχου**, Χ. Λιάσκος, Ε.Δ. Μακρή, Γ. Παπαδάμου, Μ. Καρδάση, Α. Πλιάκα, Φ. Γεροβασίλης, Γ.Ν. Νταλέκος. Τα αντικαρδιολιπινικά αντισώματα (α -CL) στην HCV λοίμωξη είναι «ανεξάρτητα» από τη β 2-γλυκοπρωτεΐνη-I (β 2-GPI) («μη θρομβωτικά» α -CL αντισώματα): προκαταρκτικά ευρήματα σε 107 HCV ασθενείς της κεντρικής Ελλάδας. Στο: Χατζηγιάννης Σ.Ι. (εκδ), Ιογενής Ηπατίτιδα Β και C (Πρακτικά δύο ημερίδων του 2001 και ανασκόπηση των εξελίξεων του 2002), Ιατρικές Εκδ. Πασχαλίδης, 2003, σελ: 392-402.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

A) ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΙΑΤΡΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. E. Daskalopoulou, E. Vlachogiannis, E. Kosmidou, A. Dougalis, S. Katanidis, **K. Zachou**, N. Stigas. Insulin, IGF-1 and glycemic control in

- patients with obstructive sleep apnea syndrome. ERS Annual Congress, Geneva, Switzerland, September 19-23, 1998. Eur. Resp. J. vol 12, supp. 28, 1998.
2. E. Daskalopoulou, E. Vlachogiannis, A. Dougalis, M. Balogianni, **K. Zachou**, K. Sotiriadi, K. Mahaira, N. Stigas. Hypertension and renin-aldosterone alterations in patients with sleep apnea syndrome. ERS Annual Congress, Geneva, Switzerland, September 19-23, 1998. Eur. Resp. J., vol 12, supp. 28, 1998.
 3. G.N. Dalekos, E. Makri, S. Loges, P. Obermayer-Staub, Th. Tsirikas, **K. Zachou**, G. Papadamou, M.P. Manns. Increased incidence of anti-LKM in a consecutive sample of HCV patients from central Greece: A preliminary study. 35th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Rotterdam, The Netherlands, April 29-May 3, 2000. J Hepatol 32 (Suppl No2): 174, 2000.
 4. A. Athanasiadis, G. Roussos, **K. Zachou**, Th. Papakostoulis, D. Athanasiadou, N. Arhontonis. Biweekly paclitaxel (T) and gemcitabine (G) in non-resectable non-small cell lung cancer (NSCLC). 25th ESMO Congress, Harburg, Germany, October 2000. Annals of Oncology 11 (Suppl 4): P507,2000.
 5. G.N. Dalekos, **K. Zachou**, E.D. Makri, C. Liaskos, A. Pliaka, G. Papadamou, K. Patsiaoura. Autoimmune hepatitis type 1 (AIH-1) in Greece: clinical, laboratory and demographic characteristics. 11th World Congress of the International Association of Surgeons and Gastroenterologists, Heraklion, Crete, Greece, November 1-4, 2001. Hepatogastroenterology 48 (Suppl I): P25, 2001.
 6. G.N. Dalekos, K. Patsiaoura, **K. Zachou**, E.D. Makri, C. Liaskos, N. Stathakis. Primary biliary cirrhosis presented as eosinophilia in asymptomatic women with or without elevated alkaline phosphatase. 52th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Diseases, Dallas, Texas, USA, November 9-13, 2001. Hepatology 34 (Part 2): 526A, 2001.
 7. G.N. Dalekos, E.D. Makri, **K. Zachou**, C. Liaskos, A. Pliaka, G. Papadamou, K. Patsiaoura. Clinical, laboratory and demographic characteristics of autoimmune hepatitis type 1 (AH-1) in Central Greece. 52th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Diseases, Dallas, Texas, USA, November 9-13, 2001. Hepatology 34 (Part 2): 528A, 2001.
 8. **K. Zachou**, C. Liaskos, D. Christodoulou, M. Kardasi, G. Papadamou, N. Gatselis, F. Gerovasilis, E. Tsianos, G.N. Dalekos. Anti-cardiolipin antibodies (anti-CL) in patients with hepatitis C virus (HCV) infection are independent of beta2-glycoprotein I (b2GPI) co-factor or features of antiphospholipid syndrome (APS). 37th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Madrid, April 18-21, 2002. J Hepatol 36 (Suppl 1): 139, 2002.
 9. **K. Zachou**, C. Liaskos, E. Makri, G.N. Dalekos. Occult hepatitis B virus (HBV) infection in Greek patients with chronic hepatitis C (HCV): a pilot study. Biennial Meeting of the International Association for the Study of the Liver, Madrid, April 15-16, 2002. J Hepatol 36 (Suppl 1): 250, 2002.

B) ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΙΑΤΡΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. **K. Ζάχου**, Ε. Βλαχογιάννης, Ν. Στίγγας. Παρουσίαση περιστατικού με σύνδρομο Churg-Strauss. 16ο Ιατρικό Συνέδριο Ενόπλων Δυνάμεων, Θεσσαλονίκη, 1996.
2. Π. Κράχτης, **K. Ζάχου**, Κ. Βουδούρης, Ε. Βλαχογιάννης. Συσχέτιση ρευματοειδούς αρθρίτιδας και συνδρόμου απνοιών στον ύπνο. 14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ρευματολογίας, Αθήνα, 1996.
3. Χ. Λιάσκος, Α. Γκαραγκούνης, Θ. Ζωγράφος, Π. Μανδαλου, Ν. Κανελλόπουλος, Γ. Καρυστιανού, Σ. Παπακώστα, **K. Ζάχου**, Γ.Ν. Νταλέκος. Εργαστηριακή διάγνωση της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης (ΠΧΚ) και της Αυτοάνοσης ηπατίτιδας (ΑΗ). 6^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας, Θεσσαλονίκη, Μάιος 12-14, 2000.
3. **K. Ζάχου**, Χ. Λιάσκος, Ε.Δ. Μακρή, Γ. Παπαδάμου, Μ. Καρδάση, Α. Πλιάκα, Φ. Γεροβασίλης, Γ.Ν. Νταλέκος. Τα αντικαρδιολιπινικά αντισώματα (α-CL) στην HCV λοίμωξη είναι «ανεξάρτητα» από τη β2-γλυκοπρωτεΐνη-I (β2-GPI) («μη θρομβωτικά» α-CL αντισώματα): προκαταρκτικά ευρήματα σε 107 HCV ασθενείς της κεντρικής Ελλάδας. 7^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2001 και στην 8^η ημερίδα για την ηπατίτιδα C Αθήνα, 27 Ιανουαρίου 2001. Στο: Χατζηγιάννης Σ.Ι. (εκδ), Ιογενής Ηπατίτιδα Β και C (Πρακτικά δύο ημερίδων του 2001 και ανασκόπηση των εξελίξεων του 2002), Ιατρικές Εκδ. Πασχαλίδης, 2003, σελ: 392-402.
4. Ε.Δ. Μακρή, **K. Ζάχου**, Χ. Λιάσκος, Κ. Πατσιαούρα, Α. Πλιάκα, Γ. Παπαδάμου, Γ.Ν. Νταλέκος. Κλινικο-εργαστηριακά ευρήματα ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1 (ΑΗ-1) στην Κεντρική Ελλάδα. 7^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2001.
5. Ε.Δ. Μακρή, **K. Ζάχου**, Ι. Δελλαδέτσιμα, Γ. Παπαδάμου, Κ. Πατσιαούρα, Α. Καραντάνας, Α. Βάσιου, Ν. Κελέκης, Γ.Ν. Νταλέκος. Περίπτωση συνύπαρξης αυτοανόσου ηπατίτιδας τύπου 1 (ΑΗ-1) και σαρκοείδωσης σε γυναίκα μέσης ηλικίας. 7^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2001.
6. Ε.Δ. Μακρή, Χ. Λιάσκος, Θ. Τσικρίκας, **K. Ζάχου**, Α. Πλιάκα, Γ. Παπαδάμου, Α. Καραντάνας, Γ.Ν. Νταλέκος. Συνδυασμός πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης (ΠΧΚ) και αυτοάνοσης αιμολυτικής αναιμίας (ΑΑΑ). 7^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2001.
7. Γ.Ν. Νταλέκος, **K. Ζάχου**, Ε.Δ. Μακρή, Ε. Μπακράση, Κ. Πατσιαούρα, Χ. Λιάσκος, Α. Πλιάκα, Α. Καραντάνας, Ν. Κελέκης. Περίπτωση εστιακής οζώδους υπερπλασίας (ΕΟΥ) εμφανιζόμενη με χαρακτηρες αυτοανόσου ηπατίτιδας τύπου 1 (ΑΗ-1). 7^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2001.
8. Μ. Βενιζέλος, Π. Τσούτσου, Α. Πλιάκα, **K. Ζάχου**, Χ. Λιάσκος, Ε.Δ. Μακρή, Κ. Γουργουλιάνης, Γ.Ν. Νταλέκος. Επιπολασμός HBsAg σε γενικό και νοσοκομειακό πληθυσμό της κεντρικής Ελλάδας: πρόδρομα αποτελέσματα με τη χρήση της ταχείας μεθόδου ανοσοαποτυπώματος. 7^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2001.
9. Γ.Ν. Νταλέκος, Χ. Λιάσκος, Ε.Δ. Μακρή, **K. Ζάχου**, Κ. Πατσιαούρα, Α. Πλιάκα, Ν. Σταθάκης. Ηωσινοφιλία: νέο χαρακτηριστικό εύρημα σε ασθενείς με πρωτοπαθή χολική κίρρωση. 7^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2001.

10. Β. Παπαλιμναίου, Λ. Ζωγάνας, Α. Ανδρονάδη, **Κ. Ζάχου**, Κ. Κράπης, Σ. Καρκαμπούνας, Α.Κ. Χαραλαμπόπουλος, Κ. Χαραλαμπόπουλος. Ο ρόλος ως δεικτών του καρκινοεμβρυικού αντιγόνου, της β2-μικροσφαιρίνης και της καλσιτονίνης σε ασθενείς με βρογχογενές καρκίνωμα του πνεύμονος. 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου, 29 Νοεμβρίου-1 Δεκεμβρίου 2002. Στο: Ν. Αγναντή, Κ. Χαραλαμπόπουλος (εκδ), Καρκινικοί Δείκτες: αξιοποίηση στην βασική και εφηρμοσμένη κλινική έρευνα, Σύνοδρον Δημιουργικές Εκδ., 2002, σελ: 101-102.
11. Σ. Γεωργιάδου, **Κ. Ζάχου**, Χ. Λιάσκος, Ν. Γατσέλης, Α. Τσικρικώνη, Φ. Γεροβασίλης, Μ. Καρδάση, Ε. Μακρή, Γ. Παπαδάμου, και Γ.Ν. Νταλέκος. Αυξημένη συχνότητα «λανθάνουσας» λοίμωξης από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (HCV) από την Κεντρική Ελλάδα. Διημερίδα για την ηπατίτιδα Β και C, Αθήνα, 15-16 Φεβρουαρίου 2003.
12. **Κ. Ζάχου**, Δ.Σ. Κυριάκου, Μ.Γ. Αλεξανδράκης, Α. Τσικρικώνη, F. Passam, Ν.Ε. Σταθάκης, Γ.Ν. Νταλέκος. Αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα (ΑΠΚ) και στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών (ΜΟ) στην αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1 (ΑΗ-1) και την πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΠΧΚ). 8^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.
13. Α. Στέφος, Χ. Λιάσκος, **Κ. Ζάχου**, Ε. Μακρή, Γ. Παπαδάμου, Σ. Γεωργιάδου, Ν. Γατσέλης, Χ. Χατζηχριστοδούλου, Γ.Ν. Νταλέκος. Δημογραφικά χαρακτηριστικά ασθενών με χρόνια ΗΒV λοίμωξη στην περιοχή της κεντρικής Ελλάδας (ΚΕ): Παρουσία ενδείξεων παράτασης του προβλήματος. 8^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.
14. Α. Τσέζου, Μ. Σιάτρα, Π. Κόλλια, Γ. Παπαδάμου, **Κ. Ζάχου**, Ε. Μακρή, Ν. Βαμβακόπουλος, Γ.Ν. Νταλέκος. Ανίχνευση των μεταγραφών της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) σε περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες Β και C. 8^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.
15. **Κ. Ζάχου**, Δ.Σ. Κυριάκου, Μ.Γ. Αλεξανδράκης, F. Passam, Χ. Λιάσκος, Α. Τσικρικώνη, Ν.Ε. Σταθάκης, Γ.Ν. Νταλέκος. Παραγωγή κυτταροκινών μετά από καλλιέργειες λεμφομονοκυττάρων μυελού των οστών (ΜΟ) ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1 (ΑΗ-1) και πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΠΧΚ). 8^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.
16. **Κ. Ζάχου**, Χ. Λιάσκος, Δ.Κ. Χριστοδούλου, Μ. Καρδάση, Γ. Παπαδάμου, Ν. Γατσέλης, Σ. Γεωργιάδου, Ε.Β. Τσιάνος, Γ.Ν. Νταλέκος. Τα αντικαρδιολιπινικά αντισώματα (α-CLAbs) στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες είναι ανεξάρτητα από τη β2-γλυκοπρωτεΐνη Ι (β2-GPI) ή τις εκδηλώσεις του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου. 8^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.
17. Χ. Λιάσκος, **Κ. Ζάχου**, Σ. Γεωργιάδου, Ν. Γατσέλης, Γ.Ν. Νταλέκος. Αντικαρδιολιπινικά αντισώματα (α-CLAbs) σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (ΑΝΗ). 8^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.
18. **Κ. Ζάχου**, Δ.Σ. Κυριάκου, Μ.Γ. Αλεξανδράκης, F. Passam, Α. Τσικρικώνη, Χ. Λιάσκος, Ν.Ε. Σταθάκης, Γ.Ν. Νταλέκος. Δείκτες απόπτωσης και διέγερσης λεμφομονοκυττάρων/μονοκυττάρων του μυελού των οστών (ΜΟ) ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1 (ΑΗ-1) και πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΠΧΚ). 8^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.

19. **Κ. Ζάχου**, Χ. Λιάσκος, Ν. Γατσέλης, Σ. Γεωργιάδου, Γ. Παπαδάμου, Ε. Μακρή, Μ. Καρδάση, Δ.Κ. Χριστοδούλου, Ε.Β. Τσιάνος, Γ.Ν. Νταλέκος. Αντισώματα κατά μικροσωμίων ήπατος/νεφρών και άλλα αυτοαντισώματα (ΑΑ) σε HCV ασθενείς της Κεντρικής Ελλάδας. 8^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.
20. Σ. Γεωργιάδου, **Κ. Ζάχου**, Χ. Λιάσκος, Ν. Γατσέλης, Α. Τσικρικώνα, Φ. Γεροβασίλης, Μ. Καρδάση, Ε. Μακρή, Γ. Παπαδάμου, Γ.Ν. Νταλέκος. Αυξημένη συχνότητα λανθάνουσας HBV λοίμωξης σε HCV ασθενείς της Κεντρικής Ελλάδας: απουσία συσχέτισης με βαρύτερη ηπατική νόσο. 8^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.

ΔΙΔΑΚΤΙΚΑ ΕΓΧΕΙΡΙΔΙΑ-ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

1. **Κ. Ζάχου**. «Σημειώσεις Κλινικής Φαρμακολογίας», Λάρισα 1999 (Διανεμήθηκε στους σπουδαστές του τμήματος Διαιτολογίας του 2^{ου} Ι.Ε.Κ. Λάρισας).
2. Γ.Ν. Νταλέκος, Χ. Λιάσκος, **Κ. Ζάχου**, Ε. Μακρή, και Μ. Βενιζέλος. Αντιμετώπιση ασυμπτωματικών ασθενών με διαταραχές των ηπατικών ενζύμων. Ενημερωτικό δοκίμιο στα πλαίσια της Εκπαιδευτικής Ημερίδας με θέμα: «Ηπατικές Παθήσεις στην Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας», Κ.Ε.Ε.Λ. και Γ.Ν. Νταλέκος (εκδ.), Λάρισα, 2001.