

**ΗΠΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΙΑΤΡΕΙΟ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ  
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Δ/ντής: Καθηγητής Ν. Σταθάκης  
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ-ΑΙΜΟΔΟΣΙΑ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Δ/ντρια: Επίκουρη Καθηγήτρια Δ. Κυριάκου >**

**ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΟΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ, ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ,  
ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΟΝ  
ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ ΤΥΠΟΥ Ι  
ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ**

**Αικατερίνη Ν. Τσικριώνη  
Ιατρός**

**Διδακτορική διατριβή που υποβλήθηκε στο Ιατρικό Τμήμα του  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

**Λαρίσα 2007**



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

Αριθ. Εισ.: 7795/1  
Ημερ. Εισ.: 25-11-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ  
616.36  
ΤΣ1

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083818

**ΗΠΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΙΑΤΡΕΙΟ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ  
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Δ/ντής: Καθηγητής Ν. Σταθάκης**

**ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ-ΑΙΜΟΔΟΣΙΑ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Δ/ντρια: Επίκουρη Καθηγήτρια Δ. Κυριάκου**

**ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΟΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ, ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ,  
ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΟΝ  
ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ ΤΥΠΟΥ Ι  
ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ**

**Αικατερίνη Ν. Τσικρικώνα**

**Ιατρός**

**Διδακτορική διατριβή που υποβλήθηκε στο Ιατρικό Τμήμα του  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

**Λαρισα 2007**

**Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Ιατρικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Νόμος 5343, άρθρο 202, παράγραφος 2).**

## **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

Σταθάκης Νικόλαος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Νταλέκος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κυριάκου Δέσποινα, Επίκουρη Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας  
(επιβλέπουσα)

## **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Σταθάκης Νικόλαος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μολυβδάς Πασχάλης-Αδάμ, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κουκούλης Γεώργιος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αρβανίτης Δημήτριος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Νταλέκος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κυριάκου Δέσποινα, Επίκουρη Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ρηγοπούλου Ειρήνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	7
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
1. ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΑ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (STEM CELLS).....	11
2. ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	21
3. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	31
3.1. ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ.....	31
3.2. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗΣ ΛΥΚΟΣ.....	33
4. ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΣΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	39
4.1. ΑΥΤΟΛΟΓΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΣΤΗ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗ.....	47
4.2. ΑΥΤΟΛΟΓΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΣΤΟ ΣΚΛΗΡΟΔΕΡΜΑ.....	50
4.3. ΑΥΤΟΛΟΓΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗ ΛΥΚΟ.....	53
4.4. ΑΥΤΟΛΟΓΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΣΤΗ ΝΕΑΝΙΚΗ ΙΔΙΟΠΑΘΗ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ.....	57
4.5. ΑΥΤΟΛΟΓΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΣΤΗΝ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ.....	58
5. ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ.....	61
5.1. ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ (ΑΗ).....	61
5.1.1. ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ ΤΥΠΟΥ-1.....	66
5.1.2. ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ ΤΥΠΟΥ-2.....	76
5.1.3. ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΠΟΛΥΕΝΔΟΚΡΙΝΟΠΑΘΕΙΑΣ ΤΥΠΟΥ-1 (ΣΑΠΕ-1).....	80
5.1.4. ΑΛΛΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ ΤΥΠΟΥ-1/2.....	81
5.1.5. ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ.....	82
5.1.6. ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ.....	84
5.1.7. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ.....	85
5.2. ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ (ΠΧΚ).....	90
5.2.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΧΟΛΙΚΗΣ ΚΙΡΡΩΣΗΣ.....	90
5.2.2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΧΟΛΙΚΗΣ ΚΙΡΡΩΣΗΣ.....	92
5.2.3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΧΟΛΙΚΗΣ ΚΙΡΡΩΣΗΣ.....	94
5.2.4. ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΧΟΛΙΚΗΣ ΚΙΡΡΩΣΗΣ.....	95
5.2.5. ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ.....	97
5.2.5.α. ΑΝΤΙΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (AMA).....	97
5.2.5.β. ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	101
5.2.5.γ. ΑΝΤΙΠΥΡΗΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (ANA) ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ.....	106

5.2.5.δ. ΑΛΛΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ .....	109
5.2.6. ΕΚΒΑΣΗ .....	109
5.2.7. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΧΟΛΙΚΗΣ ΚΙΡΡΩΣΗΣ.....	110
6. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ.....	115
B.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	117
7. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	119
8. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	123
8.1. Ασθενείς (Πίνακας 14) .....	123
8.2. Μορφολογικά ευρήματα μυελού .....	126
8.3. Απομόνωση κυττάρων του μυελού των οστών και του περιφερικού αίματος.....	126
8.4. Αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες.....	127
8.5. Καλλιέργειες ανάπτυξης (expansion cultures) .....	127
8.6. Καλλιέργειες μυελού οστών μακράς διάρκειας (Long-term bone marrow cultures) .....	128
8.7. Κλωνογόνα προγονικά κύτταρα (clonogenic progenitor cell assays) ...	128
8.8. Καλλιέργειες ενός κυττάρου .....	129
8.9. Μελέτη λειτουργίας στρωματικών κυττάρων .....	129
8.10. Μελέτη των αποπτωτικών κυττάρων .....	129
8.11. Παραγωγή κυτταροκινών μετά από καλλιέργειες λεμφομονοκυττάρων μυελού των οστών .....	130
8.12. Στατιστική ανάλυση .....	131
9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	133
9.1. Αποτελέσματα μορφολογικών ευρημάτων μυελού.....	133
9.1.1. Αποτελέσματα μορφολογικών ευρημάτων μυελού σε ασθενείς με ΑΗ-1 .....	133
9.1.2. Αποτελέσματα μορφολογικών ευρημάτων σε ασθενείς με ΠΧΚ	135
9.1.3. Αποτελέσματα μορφολογικών ευρημάτων σε κίρρωτικούς μάρτυρες .....	136
9.2. Αποτελέσματα κυτταρομετρικής ανάλυσης των προγονικών κυττάρων ....	139
9.3. Καλλιέργειες ανάπτυξης (expansion cultures).....	141
9.4. Μακράς διάρκειας καλλιέργειες μυελού των οστών (Long-term Bone Marrow cultures) .....	141
9.5. Κλωνογόνα προγονικά κύτταρα (clonogenic progenitor cell assays) ...	143
9.6. Καλλιέργειες ενός κυττάρου .....	146
9.7. Λειτουργία στρωματικών κυττάρων .....	146
9.8. Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής για τους δείκτες απόπτωσης και κυτταρικής ενεργοποίησης .....	148
9.9. Αποτελέσματα κυτταροκινών.....	151
9.10. Δείκτες απόπτωσης, κυτταρικής ενεργοποίησης και παραγωγή κυτταροκινών: συσχέτιση με τα κλωνογόνα προγονικά κύτταρα, εργαστηριακά και κλινικά δεδομένα.....	154
10. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	163
11. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	177
12. SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	181
13. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	185



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η αυτοάνοση ηπατίτιδα και η πρωτοπαθής χολική κίρρωση είναι νοσήματα του ήπατος που σχετίζονται με εξωηπατικές αυτοάνοσες εκδηλώσεις αλλά η πιθανή συμμετοχή του μυελού των οστών δεν έχει μελετηθεί.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου Ι και πρωτοπαθή χολική κίρρωση, για να διαπιστώσουμε αν υπάρχει διαταραχή του αιμοποιητικού συστήματος στους ασθενείς αυτούς και αν υπάρχει δυνατότητα υποστήριξης της αιμοποίησης από το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών σε περίπτωση αυτόλογης μεταμόσχευσης περιφερικών προγονικών κυττάρων μετά από megaθεραπεία με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα.

Στο γενικό μέρος αναλύονται τα χαρακτηριστικά της αυτοάνοσης ηπατίτιδας τύπου Ι και της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης. Επίσης, παρατίθενται τα νεότερα δεδομένα για τα πολυδύναμα εμβρυονικά κύτταρα και η δυνατότητα διαφοροποίησης των αρχέγονων CD34+ κυττάρων σε ηπατοκύτταρα. Στη συνέχεια, περιγράφεται η μεταμόσχευση μυελού των οστών σε αυτοάνοσα νοσήματα και ιδιαίτερα σε ρευματοειδή αρθρίτιδα, σε συστηματικό ερυθματώδη λύκο, σε σκληρόδερμα, σε νεανική ιδιοπαθή αρθρίτιδα και σε σκλήρυνση κατά πλάκας μετά από megaθεραπεία με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Έχει εφαρμοστεί με επιτυχία και ανασκοπείται η υπάρχουσα γνώση. Όμως, σε ορισμένα αυτοάνοσα νοσήματα, πχ ρευματοειδή αρθρίτιδα και συστηματικό ερυθματώδη λύκο, έχουν περιγραφεί διαταραχές της αιμοποίησης στον μυελό των οστών και μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις οι βλάβες αυτές μπορεί να εμποδίζουν την επιτυχή μεταμόσχευση μυελού των οστών ή περιφερικών στελεχιαίων κυττάρων. Αυτή η γνώση επίσης ανασκοπείται στο γενικό μέρος.

Στο ειδικό μέρος μελετήθηκαν ποσοτικά, ποιοτικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των κυττάρων του μυελού των οστών σε πάσχοντες από αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου Ι και πρωτοπαθή χολική κίρρωση. Τα χαρακτηριστικά αυτά αφορούν μορφολογία των μυελικών κυττάρων και αναλογία των αιμοποιητικών κυτταρικών σειρών. Στη συνέχεια μελετήθηκε η

δυνατότητα ανάπτυξης των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων σε μακράς διάρκειας καλλιέργειες καθώς και η ανάπτυξη των κυττάρων του στρώματος, η δυνατότητα επιβίωσης των αιμοποιητικών κυττάρων (με τον προσδιορισμό του βαθμού της απόπτωσης) και η δυνατότητα των στρωματικών κυττάρων να υποστηρίζουν την αιμοποίηση σε μεικτές καλλιέργειες στρωματικών και αιμοποιητικών κυττάρων. Οι δείκτες που αφορούν την ενεργοποίηση των κυττάρων στην διαδικασία της φλεγμονώδους αντίδρασης και η παραγωγή κυτταροκινών μετά από καλλιέργειες λεμφομονοκυττάρων του μυελού των οστών των ασθενών αυτών μελετήθηκαν επίσης, προκειμένου να διαπιστώσουμε ποια κύτταρα και με ποιο μηχανισμό συμμετέχουν στην διαδικασία της φλεγμονώδους αντίδρασης.

Θα ήθελα να αναγνωρίσω την βοήθεια όλων αυτών που είχαν σημαντική συνεισφορά στην εκπόνηση της διατριβής. Ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Ν. Σταθάκη για τις πολύτιμες παρατηρήσεις του. Ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη θα ήθελα να εκφράσω στους δασκάλους μου, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γ. Ν. Νταλέκο και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Δ. Κυριάκου για την αμέριστη συμπαράσταση από τον σχεδιασμό μέχρι την ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής, τόσο σε θεωρητικό όσο και σε εργαστηριακό επίπεδο. Σημαντικοί βοήθεια προσέφεραν οι συνάδελφοί μου ιατροί, κ. Κ. Ζάχου, κ. Σ. Γεωργιάδου, κ. Χ. Λιάσκος στην εκμάθηση και την εκτέλεση των πειραμάτων στο εργαστήριο Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και η Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ε. Ρηγοπούλου και οι ιατροί του Ηπατολογικού Ιατρείου κ. Ε. Μακρή και κ. Γ. Παπαδάμου στην παρακολούθηση και την συλλογή των δειγμάτων των ασθενών. Τελειώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου για την αγάπη και την συμπαράστασή τους καθ'όλη τη διάρκεια της προσπάθειας ολοκλήρωσης αυτού του έργου.

## **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 1. ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΑ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (STEM CELLS)

Τα stem cells είναι ένας μοναδικός κυτταρικός πληθυσμός ικανός για αυτο-ανανέωση και διαφοροποίηση σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι stem cells: τα εμβρυονικά stem cells (πολυδύναμα κύτταρα με δυνατότητα διαφοροποίησης σε όλους τους ιστούς του εξελισσόμενου οργανισμού) και τα σωματικά stem cells (πολυδύναμα κύτταρα που διαφοροποιούνται στους συγκεκριμένους τύπους των ιστών από τους οποίους προέρχονται) (1). Τα μεσεγχευματικά stem cells με την ικανότητα που έχουν να διαφεύγουν την ανίχνευση από το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή και το σχετικά εύκολο πολλαπλασιασμό τους σε καλλιέργειες είναι μια πολλά υποσχόμενη πηγή stem cells (1).

Ο ενθουσιασμός γύρω από τα stem cells οφείλεται στην ανάγκη για θεραπεία κυτταρικής αντικατάστασης σε κάποιες καταστροφικές ασθένειες. Πολλές καταστροφές οργάνων είναι μη αναστρέψιμες και οι μεταμοσχεύσεις οργάνων δεν μπορούν να καλύψουν τις ανάγκες του πληθυσμού. Η αλκοολική ή ιογενής ηπατική ανεπάρκεια, ο διαβήτης τύπου 1 και η νόσος του Parkinson είναι ορισμένα παραδείγματα νοσολογικών καταστάσεων «μονοκυτταρικής» βλάβης που είναι κατάλληλες για θεραπεία κυτταρικής αντικατάστασης αν βρεθεί μια κατάλληλη και μη εξαντλήσιμη κυτταρική πηγή. Τα ανθρώπινα εμβρυονικά stem cells ίσως αντιπροσωπεύουν μια τέτοια πηγή αλλά η πρόκληση είναι να γίνει κατορθωτή η «κατευθυνόμενη» διαφοροποίηση των εμβρυονικών αυτών stem cells σε «θεραπευτικά» κύτταρα.

Τα εμβρυονικά stem cells προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα του προεμφυτευμένου εμβρύου. Όταν τοποθετούνται σε καλλιέργεια τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται και διατηρούν την ικανότητα να σχηματίζουν όλους τους ιστούς του εξελισσόμενου οργανισμού. Τα stem cells ποντικού έχουν μελετηθεί για περισσότερο από 20 χρόνια ενώ η πρώτη παραγωγή εμβρυονικών stem cells από το ανθρώπινο έμβρυο αναφέρθηκε το 1998 (2). Για να διατηρούν την μη διαφοροποιημένη πρωτόγονη κατάστασή τους τα εμβρυονικά stem cells καλλιεργούνται σε κυτταρικά στρώματα από εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικών και οι καλλιέργειες εμπλουτίζονται με μια κυτταροκίνη, τον ανασταλτικό παράγοντα της λευχαιμίας (LIF, leukemia inhibitory factor). Όταν τα εμβρυονικά stem cells αποσύρονται από αυτές τις

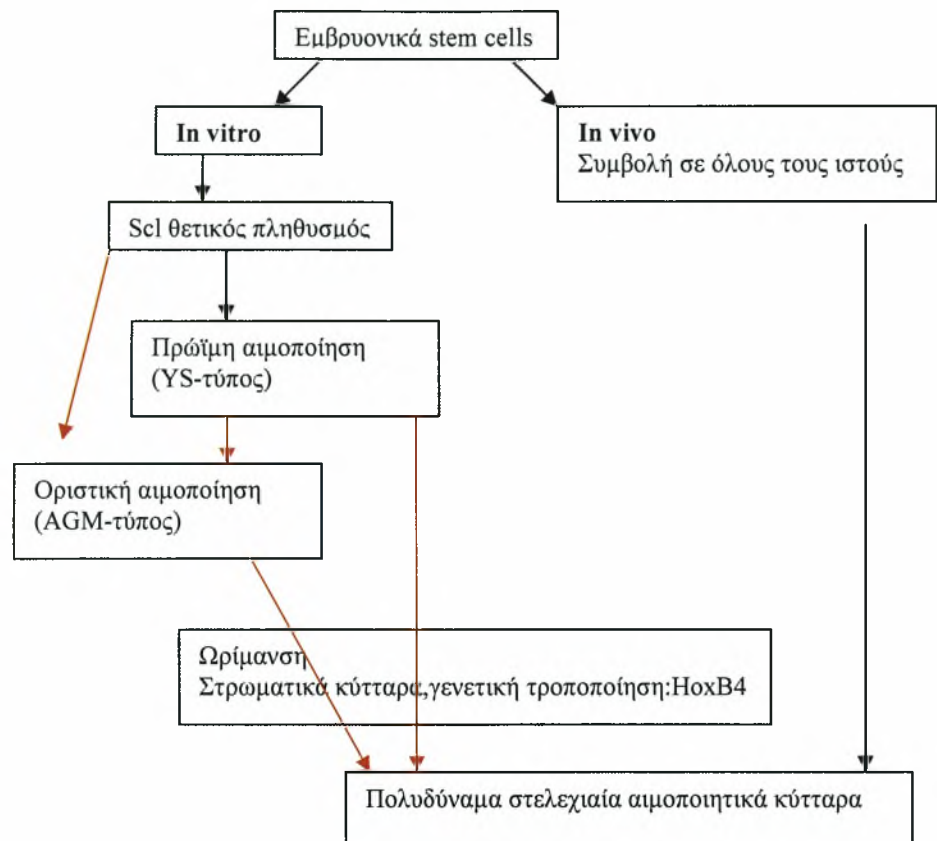
συνθήκες ξεκινάει η διαφοροποίηση με τα ποικίλλα προγράμματα της κυτταρικής και ιστικής εξειδίκευσης (3). Τα εμβρυονικά κύτταρα στις καλλιέργειες παράγουν κύτταρα και από τα τρία κλασσικά εμβρυονικά στρώματα, το εκτόδερμα, μεσόδερμα και το ενδόδερμα. Εντούτοις, ένα σημαντικό ηθικό πρόβλημα είναι η παραγωγή ανθρώπινων εμβρυονικών stem cells από in vitro βλαστοκύστες καθώς και η «κατευθυνόμενη» διαφοροποίησή τους σε σωματικά κύτταρα δεδομένου ότι έχει παρατηρηθεί ογκογενής δυνατότητα.

Οι ιστοί που αναγεννώνται από stem cells διατηρούν τις κατάλληλες συνθήκες στις οποίες μπορούν να ζήσουν τα stem cells παρέχοντας τα σήματα για την κυτταρική ανανέωση, επιβίωση και διαφοροποίησή τους. Το αιμοποιητικό σύστημα, το δέρμα, το έντερο, τα νησίδια του παγκρέατος, το ήπαρ, και τμήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος ανήκουν σε αυτή την κατηγορία. Οι θεραπείες κυτταρικής αντικατάστασης με stem cells είναι ένας δυνητικά βιώσιμος στόχος λαμβάνοντας υπόψη το μικρό ποσοστό των δωρητών οργάνων για να πραγματοποιηθούν μεταμοσχεύσεις.

Εντούτοις, οι ακριβείς παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της κυτταρικής εκφύλισης παραμένουν ασαφείς για τα περισσότερα νοσήματα. Αυτό ισχύει για τα νευροεκφυλιστικά και αυτοάνοσα νοσήματα, κάνοντας δύσκολο να προβλέψουμε αν οι θεραπείες που βασίζονται σε stem cells μπορεί να είναι επιτυχείς χωρίς να διακόψουμε την συστηματική εξέλιξη της νόσου. Στις περιπτώσεις αυτές η θεραπεία αντικατάστασης με stem cells πρέπει να συνοδεύεται από ανοσοκαταστολή, όπως στην περίπτωση του πρωτοκόλλου "Edmonton" για τη θεραπεία του διαβήτη (4). Όταν η νόσος καταστρέφει τις συνθήκες στις οποίες αναπτύσσονται τα stem cells η κυτταρική θεραπεία αντικατάστασης με stem cell μπορεί να μην αρκεί. Αυτό πιθανόν εξηγεί τα φτωχά αποτελέσματα της μεταμόσχευσης μυελού στην μυελοϊνωση και μπορεί να αποτελεί έναν περιορισμό για τις κυτταρικές θεραπείες στην κίρρωση του ήπατος και σε συγκεκριμένες μορφές νευρικής βλάβης (5).

Εφαρμογές της μεταμόσχευσης αιμοποιητικών stem cells που είναι θεραπευτική για πολλές γενετικές και κακοήθεις ασθένειες του μυελού των οστών είναι περιορισμένες εξαιτίας επίσης μικρού αριθμού δωτών. Αυτός ο περιορισμός μπορεί να εξαλειφθεί με παραγωγή των αιμοποιητικών stem cells από ανθρώπινα εμβρυονικά stem cells. Επειδή η μεταμόσχευση

κεκαθαρμένων αιμοποιητικών stem cells μπορεί να προκαλέσει ανοσολογική ανοχή (6) η κατευθυνόμενη διαφοροποίηση των εμβρυονικών stem cells σε αιμοποιητικά stem cells θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει μια στρατηγική για να ξεπεράσουμε τους ανοσολογικούς φραγμούς στην μεταμόσχευση ιστών. Έχει ήδη αναφερθεί δυο δεκαετίες πριν, ο σχηματισμός κυττάρων του αίματος από εμβρυονικά stem cells ποντικών που διαφοροποιήθηκαν σε εμβρυϊκά σωματίδια (embryoid bodies) (3). Σχετικά περιορισμένη μετατροπή των εμβρυονικών κυττάρων σε αιμοποιητικά κύτταρα έχει επίσης αναφερθεί (7-9). Αυτή η αποτυχία οφείλεται πιθανότατα στην ανωριμότητα των αιμοποιητικών κυττάρων που παράγονται από τα εμβρυονικά κύτταρα, τα οποία μοιάζουν περισσότερο με αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα του λεκιθικού ασκού και μπορεί να μη μπορούν να εμφυτευτούν αποτελεσματικά σε ενήλικες. Ίσως βέβαια να οφείλεται και σε αδυναμία να πολλαπλασιαστούν τα ώριμα αιμοποιητικά stem cells σε κυτταρικές καλλιέργειες εμβρυονικών stem cells. Τα λεμφο-μυελικά αιμοποιητικά stem cells όντως προέρχονται από εμβρυονικά stem cells που διαφοροποιήθηκαν in vitro, αφού μπορούν να μεταμορφωθούν από την ογκοπρωτεΐνη BCR/ABL που σχετίζεται με τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία και έχει αποδειχθεί ότι τα εμβρυονικά stem cells μπορούν να παράγουν κυτταρικές σειρές της κοκκιώδους, της λεμφικής και της ερυθράς σειράς σε ακτινοβολημένα ζώα (10). Χρησιμοποιώντας το γονίδιο HoxB4 για να διεγείρουμε τον πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών stem cells, βρέθηκαν αιμοποιητικά κύτταρα όλων των κυτταρικών σειρών που παράγονται από εμβρυονικά κύτταρα αλλά εμφύτευση των κυττάρων αυτών έδειξε περιορισμένο αριθμό «αληθινών» αιμοποιητικών stem cells (8). Επιπλέον, τα υπολειμματικά μη διαφοροποιούμενα εμβρυονικά κύτταρα ενέχουν τον κίνδυνο της ανάπτυξης τερατώματος αν εμφυτευτούν σε ασθενείς (11). Φαίνεται λοιπόν μάλλον ότι απαιτούνται περισσότερο αποτελεσματικές μέθοδοι ώστε να επιτευχθεί «κατευθυνόμενη» διαφοροποίηση των εμβρυονικών κυττάρων σε ώριμα αιμοποιητικά stem cells.



**Εικόνα 1.** Αιμοποίηση στα εμβρυϊκά σώματα. Η δυνατότητα αιμοποίησης συγκεντρώνεται στο Scl<sup>+</sup> τμήμα των εμβρυϊκών σωμάτων. Ένα μοντέλο υποστηρίζει ότι η πρώιμη και η οριστική αιμοποίηση εξελίσσονται διαδοχικά από τα Scl<sup>+</sup> κύτταρα. Ένα εναλλακτικό μοντέλο υποστηρίζει ότι η πρώιμη αιμοποίηση αντιπροσωπεύει ένα παροδικό στάδιο, που καταστρέφεται στην εξέλιξή του από την οριστική αιμοποίηση. Στο μοντέλο αυτό τα τύπου AGM (aorta-gonad-mesonephros) πρόδρομα κύτταρα εξελίσσονται στα εμβρυϊκά σώματα από ένα διάκριτο μεσοδερματικό πληθυσμό (Από το: Patterning definitive hematopoietic stem cells from embryonic stem cells, *Experimental Hematology*, 2005; 33, σελίδα 973).

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ενδιαφέρον στη χρησιμοποίηση σωματικών stem cells ιδιαίτερα αυτών που παράγονται από ενήλικες για κυτταρική και γονιδιακή θεραπεία. Υπάρχει η πιθανότητα ότι μερικά σωματικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μη αυτόχθονες κυτταρικούς τύπους ενώ επίσης ανακαλύφθηκαν πολυδύναμα stem cells στο μυελό των οστών του ενήλικα. Τα stem cells είναι παρόντα στους περισσότερους ιστούς του ενήλικα και είναι υπεύθυνα για την ανανέωση των ιστών κατά τη διάρκεια της ζωής. Τα αιμοποιητικά stem cells πρωταρχικά «κατοικούν» στο μυελό των οστών. Λιγότερο γνωστά αλλά πιθανόν ίσης σημασίας είναι τα stem cells του κεντρικού νευρικού συστήματος, του ήπατος (12), του δέρματος (13) και του



εντέρου (14). Σε αντίθεση με τα εμβρυονικά stem cells, τα σωματικά πιστεύεται ότι έχουν περιορισμένη ικανότητα διαφοροποίησης, και ότι μπορούν να παράγουν κύτταρα μόνο από τον ιστό από τον οποίο προέρχονται. Αυτό είναι από τα καθοριστικά χαρακτηριστικά τους και υποστηρίζεται από την βιολογία. Σύμφωνα με αυτή η δημιουργία των ειδικά διαφοροποιημένων σειρών συμβαίνει κατά την εμβρυονική εξέλιξη. Τα stem cells των ιστών «μεταφέρονται» κατά τη διάρκεια της εξέλιξης στον ιστό που ανήκουν. Και, αν και δεν είναι οριστικά διαφοροποιημένα, είναι προγραμματισμένα να παράγουν τοπικά τα κύτταρα αυτού του ιστού για τον οποίο είναι «προγραμματισμένα». Για παράδειγμα, τα stem cells των μυών κατοικούν κατά μήκος των μυϊκών ινών. Όταν συμβαίνει ένα μυϊκό τραύμα πολλαπλασιάζονται και ενεργοποιούν ένα ειδικό πρόγραμμα διαφοροποίησης, μεταναστεύουν στο σημείο της βλάβης και παράγουν νέο μυϊκό ιστό (15).

Αρχικές έρευνες για τελική διαφοροποίηση σε αιμοποιητικά κύτταρα από μη αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα έδωσαν την ιδέα ότι τα σωματικά stem cells μπορεί να είναι ικανά να παράγουν νέους κυτταρικούς τύπους. Έτσι, έχει ήδη αναφερθεί με έκπληξη, ότι νευρικά stem cells και μυϊκά κύτταρα μπορούν να παράγουν κύτταρα του αίματος (16-19). Οι σκελετικοί μύες φαίνεται να παρέχουν «καταφύγιο» σε stem cells που παράγονται στο μυελό των οστών (20, 21) και μεταφέρονται εκεί μέσω της κυκλοφορίας. Εντούτοις, αν και υπάρχουν κάποιες αναφορές για κύτταρα μη αιμοποιητικής προέλευσης που μπορούν να παράγουν αιμοποιητικά κύτταρα αυτό φαίνεται να συμβαίνει κυρίως μόνο σε συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειών (22, 23). Κάποιες άλλες μελέτες περιγράφουν επίσης παραγωγή μη αιμοποιητικών κυττάρων από αιμοποιητικά stem cells μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών. Όλες αυτές οι αρχικές έρευνες περιλαμβάνουν μεταμόσχευση ολόκληρου του μυελού που ακολουθήθηκε από εξέταση των ιστών στόχων για σπάνια κύτταρα που περιείχαν έναν δείκτη των κυττάρων του δότη. Διάφοροι ιστοί, από τον καρδιακό, το μυϊκό έως τα κύτταρα του νευρικού συστήματος αναφέρθηκαν να παρέχουν «καταφύγιο» σε κύτταρα που προέρχονται από το δότη αν και οι τοπικές συγκεντρώσεις των κυττάρων αυτών φαίνεται να κυμαίνονται σε χαμηλά σχετικά επίπεδα. Η σημασία των ερευνών αυτών είναι προφανής καθώς αν η αποτελεσματικότητα της εμφύτευσης σε μη αιμοποιητικούς ιστούς ήταν ικανοποιητικά υψηλή, η

μεταμόσχευση μυελού των οστών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να θεραπεύσει μια μεγάλη ποικιλία μη αιμοποιητικών νοσημάτων.

Υπάρχουν δεδομένα για διαφοροποίηση των αιμοποιητικών stem cells σε σκελετικούς μύες (24) και ηπατοκύτταρα (25). Σχετικά μικροί αριθμοί αιμοποιητικών stem cells φαίνεται να παράγουν αυτούς τους ιστούς μετά από μεταμόσχευση και τραυματισμό των ιστών. Διάφορες υποθέσεις έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την παραγωγή μη αιμοποιητικών κυττάρων από αιμοποιητικά stem cells. Μια υπόθεση είναι ότι ο μυελός των οστών (και πιθανόν και άλλοι ιστοί) εξακολουθούν να δίνουν «καταφύγιο» σε αρχέγονα stem cells κατά την διάρκεια της ζωής (26). Αυτά τα σπάνια κύτταρα είναι ικανά να παράγουν μια ποικιλία κυτταρικών τύπων, πιθανόν μετά από κυκλοφορία στους τραυματισμένους ιστούς. Αν και η υπόθεση αυτή είναι ελκυστική δεν θεωρείται τόσο πιθανή καθώς τα εμβρυονικά stem cells μπορεί να σχηματίζουν όγκους όταν εμφυτεύονται σε έκτοπες θέσεις στον ενήλικα. Συγκεκριμένα όπως αναφέρθηκε παραπάνω η ανάπτυξη τερατωμάτων έχει ήδη περιγραφεί (11). Διάφοροι μηχανισμοί αναπτυξιακού ελέγχου περιορίζουν την πολλαπλασιαστική δυνατότητα των κυττάρων αυτών στον ενήλικα, προκαλώντας δέσμευση στη διαφοροποίηση και μειώνοντας την ογκογενή μεταμόρφωση. Επιπλέον, οι περισσότεροι ιστοί παρέχουν καταφύγιο σε έναν πληθυσμό stem cells που αποσκοπεί στην ανανέωση του ιστού. Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι η «σύντηξη» των δύο κυτταρικών τύπων. Δύο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η «σύντηξη» διαφοροποιημένων κυττάρων με εμβρυονικά stem cells in vitro μπορεί να οδηγήσει σε λειτουργικά κύτταρα με ιδιότητες stem cells (27, 28). Η υπόθεση αυτή είναι δύσκολο να ελεγχθεί σε μερικούς ιστούς όπως ο μυϊκός όπου η «σύντηξη» είναι ένα φυσιολογικό βήμα κατά την αναγέννηση των ιστών. Στο ήπαρ η «σύντηξη» αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων και ηπατοκυττάρων φαίνεται ότι μπορεί να είναι ένα μέρος του μηχανισμού της παραγωγής ηπατοκυττάρων από κύτταρα του μυελού των οστών (29, 30).

Σε μεταμοσχεύσεις μυελού των οστών από άρρενες δότες σε θήλεα, Y χρωμοσώματα έχουν βρεθεί σε μεγάλη ποικιλία ιστών των δεκτών (οστεοβλάστες, ηπατοκύτταρα, επιθήλιο γαστρεντερικού σωλήνα, στρώμα μυελού) (30-34). Επειδή τα κυκλοφορούντα, παραγόμενα από το δότη αιμοποιητικά κύτταρα είναι επίσης θετικά για το Y χρωμόσωμα, προσπάθειες

έγιναν για να αποδειχθεί ότι μερικά από τα Υ θετικά κύτταρα στους ιστούς του ξενιστή έφεραν δείκτες των νέων ιστών και είχαν χάσει τα χαρακτηριστικά των αιμοποιητικών κυττάρων. Σε μεταμοσχεύσεις καρδιάς από γυναίκες δότες σε άνδρες ασθενείς, οι βιοψίες έδειξαν ότι μερικά καρδιακά μυϊκά κύτταρα καθώς και ενδοθηλιακά κύτταρα ήταν θετικά για το Υ χρωμόσωμα δείχνοντας ότι τα κυκλοφορούντα κύτταρα του άνδρα ξενιστή (πιθανότατα από τον μυελό των οστών) μετανάστευσαν στην μεταμοσχευμένη καρδιά και πήραν μέρος στην αναγέννηση των ιστών.

**Πίνακας 1.** Παραγωγή μη αιμοποιητικών κυττάρων μετά από μεταμόσχευση μυελού και περιφερικού αίματος.\*

<i>Ιστίς που μεταμοσχεύτηκε</i>	<i>Κύτταρα του δότη που ευρέθηκαν</i>	<i>Συχνότητα %</i>
Μυελός οστών (31)	Οστεοβλάστες	1.5-2
Μυελός οστών (32)	Ηπατοκύτταρα	2.2
Μυελός οστών (33)	Επιθήλιο γαστρεντερικού	0-4.6
Μυελός οστών (34)	Στρώμα μυελού	0
Περιφερικό αίμα(35)	Ηπατοκύτταρα, Επιθήλιο γαστρεντερικού και δέρματος	0-7

\*Στη μεταμόσχευση μυελού ή περιφερικού αίματος οι δότες ήταν άρρενες και οι δέκτες γυναίκες.

Η μεταμόσχευση μυελού των οστών για μη αιμοποιητικά νοσήματα είναι ένα θέμα που μελετάται. Έχει ήδη πραγματοποιηθεί μεταμόσχευση μυελού των οστών για την θεραπεία συγκεκριμένων κληρονομικών μεταβολικών ασθενειών, όπως στη νόσο Hurler καθώς και σε άλλες βλεννοπολυσακχαριδώσεις. Σε αυτά τα νοσήματα τα κύτταρα δεν χρησιμοποιούνται για κυτταρική αντικατάσταση αλλά περισσότερο σαν αντλίες για τα λυσοσωμικά ένζυμα. Ως θεραπεία κυτταρικής αντικατάστασης η

μεταμόσχευση μυελού έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τη θεραπεία της ατελούς οστεογένεσης (31). Κλινικές δοκιμές σε διάφορες χώρες γίνονται για να καθορίσουν αν τα stem cells του μυελού μπορούν να αποκαταστήσουν την καρδιακή βλάβη μετά από έμφραγμα μυοκαρδίου είτε με απευθείας έγχυση κυττάρων μυελού στην καρδιά είτε με κινητοποίηση μέσω της κυκλοφορίας. Σε μερικά πειράματα η βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας μετά από τη χρήση μεσεγχυματικών κυττάρων μυελού σε έμφραγμα μυοκαρδίου μπορεί να αποδοθεί όχι σε διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών σε καρδιακά μυϊκά κύτταρα αλλά σε μη καρδιακά κύτταρα που καταλαμβάνουν τους χώρους νέκρωσης οι οποίοι διαφορετικά θα είχαν γίνει ουλωτικοί. Επομένως, η βελτίωση στην καρδιακή λειτουργία γίνεται στις περιπτώσεις αυτές μάλλον μέσω επιδράσεων στο «νόμο» του Starling και όχι μέσω πραγματικής αναγέννησης νέων, φαινοτυπικά και λειτουργικά, μυοκαρδιακών κυττάρων. Στον εγκέφαλο μη νευρικά κύτταρα συμπεριλαμβανομένων και αυτών που παράγονται από τον μυελό των οστών φαίνεται ότι έχουν σημαντική θεραπευτική επίδραση, όχι μέσω κυτταρικής αντικατάστασης αλλά με την παραγωγή ή επαγωγή θεραπευτικών μορίων. Αυτά περιλαμβάνουν παράγοντες που έχουν μια προστατευτική, αναγεννητική ή αντι-αποπτωτική επίδραση, όπως αγγειογενείς παράγοντες, που προάγουν την επαναγγείωση των κατεστραμμένων περιοχών, αντιφλεγμονώδεις παράγοντες, που εμποδίζουν το σχηματισμό ουλών, νατριουρητικούς παράγοντες, που προάγουν τη διούρηση και την ανακούφιση από το εγκεφαλικό οίδημα. Παρομοίως, η μεταμόσχευση μυελού των οστών βρέθηκε ευεργετική και για τον σακχαρώδη διαβήτη (36), ενώ όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ένα εντυπωσιακό παράδειγμα κυτταρικής μετατροπής σε ποντίκια είναι η παραγωγή ηπατοκυττάρων από stem cells του μυελού των οστών (25, 30). Στις μελέτες αυτές ένα σημαντικό τμήμα του ήπατος αναγεννήθηκε από κύτταρα παραγόμενα από τον μυελό των οστών είτε μέσω διαφοροποίησης των κυττάρων είτε μέσω «σύντηξης».

Τέλος, η πιθανότητα ότι μερικά σωματικά stem cells του ενήλικα μπορεί να έχουν ιδιότητες εμβρυονικών stem cells διερευνάται. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, πολυδύναμα stem cells ενήλικα έχουν βρεθεί μετά από καλλιέργεια στρωματικών κυττάρων μυελού των οστών για μακρά περίοδο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (23). Αυτά τα πολυδύναμα προγονικά

κύτταρα βρέθηκε ότι μπορούν να παράγουν τους περισσότερους κυτταρικούς τύπους *in vivo* και *in vitro* μετά από έγχυση σε εμβρυϊκές βλαστοκύστες ποντικών. Τα πολυδύναμα αυτά κύτταρα απομονώθηκαν από μυελό των οστών ανθρώπων και ποντικών και οι συνθήκες για διαφοροποίησή τους σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους ερευνώνονται καθώς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για αντικατάσταση και αναγέννηση πολλών κυτταρικών τύπων. Προς το παρόν όμως, ένας βασικός περιορισμός στην πιθανή «κλινική» χρήση αυτών των κυττάρων είναι οι απόλυτα εξειδικευμένες συνθήκες καλλιέργειας που απαιτούν.



## 2. ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΑ

Όπως αναπτύχθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, τα εμβρυονικά αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα αποτελούν μια μοναδική πηγή για αναγέννηση των ιστών. Τα κύτταρα αυτά αναγνωρίστηκαν πρώτα σε ποντίκια και βρέθηκε ότι μπορούν να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους. Πράγματι, την τελευταία δεκαετία διάφοροι αυξητικοί καθώς και μεταγραφικοί παράγοντες βρέθηκαν ικανοί να κατευθύνουν τη διαφοροποίηση των εμβρυονικών αιμοποιητικών κυττάρων των ποντικών σε διάφορες κυτταρικές σειρές *in vitro*. Έτσι παρατηρήθηκε ότι το ρετινοϊκό οξύ μπορεί να επάγει τη διαφοροποίηση των νευρώνων (37), ορισμένες κυτταροκίνες και ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων (38-40), ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας β (TGFβ) τη μυογένεση (41) και ο ηπατικός πυρηνικός παράγοντα-3 (HNF-3) τη διαφοροποίηση των ενδοδερμικών κυττάρων (42,43). Επιπλέον, τα εκκριτικά κύτταρα της ινσουλίνης του παγκρέατος που ομοιάζουν με τα νησίδια του παγκρέατος και που προέρχονται από τα ενδοδερμικά κύτταρα φαίνεται ότι μπορούν να αναπτυχθούν από εμβρυονικά κύτταρα (44). Αυτή η δυνατότητα των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων υπόσχεται την κλινική χρήση των εμβρυονικών αιμοποιητικών κυττάρων στην αναγέννηση των κατεστραμμένων ιστών. Διαφοροποίηση σε ηπατοκύτταρα από εμβρυονικά κύτταρα έχει ήδη αναφερθεί (32, 45-49). Πράγματι, έχει ήδη βρεθεί ότι εμβρυονικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν αποτελεσματικά σε κύτταρα με μορφολογικά, βιολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των ηπατοκυττάρων. Αυτά τα ηπατοκύτταρα που είναι παραγόμενα από αιμοποιητικά κύτταρα μπορούν να μεταμοσχευθούν σε πειραματόζωα. Εξέφρασαν ηπατικές λειτουργίες και περιόρισαν την έκταση της τραυματικής βλάβης του ήπατος δείχνοντας ότι δυνητικά μπορούν να αποτελέσουν μια πηγή κυττάρων για τη θεραπεία χρόνιων ή οξέων νοσημάτων του ήπατος. Συγκεκριμένα, εμβρυονικά κύτταρα ποντικών εμφυτεύθηκαν σε ήπαρ ποντικών 24 ώρες μετά από χορήγηση τοξικών δόσεων τετραχλωράνθρακα. Τα εμβρυονικά κύτταρα παρήγαγαν κύτταρα με διάφορους δείκτες ηπατοκυττάρων. Ήταν δυνατό να αναπτυχθούν *in vitro* και έδειξαν ομοιότητα

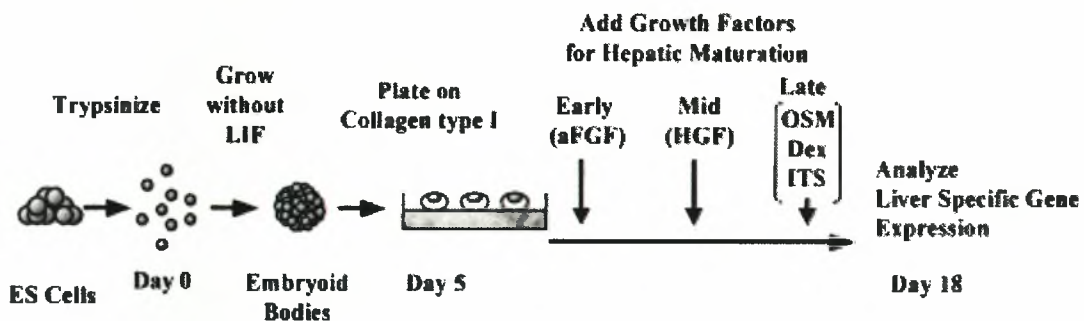
με τυπικά ώριμα ηπατοκύτταρα καθώς εξέφραζαν συγκεκριμένα γονίδια. Μετά από μεταμόσχευση στο τραυματισμένο από τετραχλωράνθρακα ήπαρ ποντικών, τα κύτταρα αυτά παρήγαγαν κύτταρα που ενσωματώθηκαν στον ηπατικό ιστό και επηρέασαν θετικά την έκβαση των ποντικών (50). Τα εμβρυονικά κύτταρα στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν  $2 \times 10^6$  και διαφοροποιήθηκαν μετά από μεταφορά στο πάσχον ήπαρ των ποντικών σε  $3 \times 10^7$  ηπατοκύτταρα. Οι παραγόμενοι αυτοί κλώνοι ηπατοκυττάρων φαίνεται ότι μπορούν να πολλαπλασιαστούν *in vitro* και βρέθηκε ότι διατηρούσαν τη μορφολογία και τις λειτουργίες των ηπατοκυττάρων για μεγάλη χρονική περίοδο.

Υπάρχουν πολλές αναφορές που περιγράφουν ηπατικά προγονικά κύτταρα στο ήπαρ (51, 52). Σύμφωνα με μία αναφορά του Sell (53), 3 τύποι ηπατικών προγονικών κυττάρων ταυτοποιήθηκαν: **τύπος I** αρχέγονα, **τύπος II** χολικά και **τύπος III** ηπατοκυτταρικά. Σε μία ακόμη μελέτη ελέγχθηκε η δυνατότητα των εμβρυονικών κυττάρων να διαφοροποιούνται σε ηπατοκύτταρα *in vitro* (45). Όταν καλλιεργήθηκαν χωρίς επιπρόσθετους αυξητικούς παράγοντες τα διαφοροποιημένα εμβρυονικά κύτταρα εξέφρασαν συγκεκριμένα γονίδια όπως για την α-φετοπρωτεΐνη, α1-αντιθρυψίνη και την αλβουμίνη. Η α-φετοπρωτεΐνη είναι δείκτης ενδοδερμικής διαφοροποίησης καθώς και εμβρυϊκός ηπατικός δείκτης και η έκφρασή της μειώνεται καθώς το ήπαρ του εμβρύου εξελίσσεται σε ήπαρ ενήλικα. Η έκφραση της αλβουμίνης ξεκινά στα εμβρυϊκά ηπατοκύτταρα και φτάνει στα υψηλότερα επίπεδα στα ηπατοκύτταρα του ενήλικα (54). Όταν όμως τα εμβρυονικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν με αυξητικούς παράγοντες κρίσιμους για την τελική διαφοροποίηση των ηπατοκυττάρων, τα εμβρυονικά κύτταρα εξέφρασαν TAT (τυροσινική αμινοτρανσφεράση) και G6P (γλυκόζη-6-φωσφατάση) που είναι δείκτες της τελικής διαφοροποίησης της εξέλιξης των ηπατοκυττάρων και εκφράζονται μόνο σε ώριμα ηπατοκύτταρα.

Η TAT αντιπροσωπεύει έναν εξαιρετικό ενζυματικό δείκτη περι- ή μεταγεννητικής ηπατικής διαφοροποίησης. Αυτά τα ένζυμα δεν συνθέτονται σε σημαντικές ποσότητες πριν από την γέννηση αλλά ενεργοποιούνται γρήγορα στη νεογνική περίοδο. Γι'αυτό το λόγο η ενεργοποίηση της TAT χρησιμοποιείται για παρακολούθηση της κυτταρικής διαφοροποίησης σε *in vitro* πειραματικά μοντέλα ηπατικής εξέλιξης και ωρίμανσης (55, 56). Συνεπώς



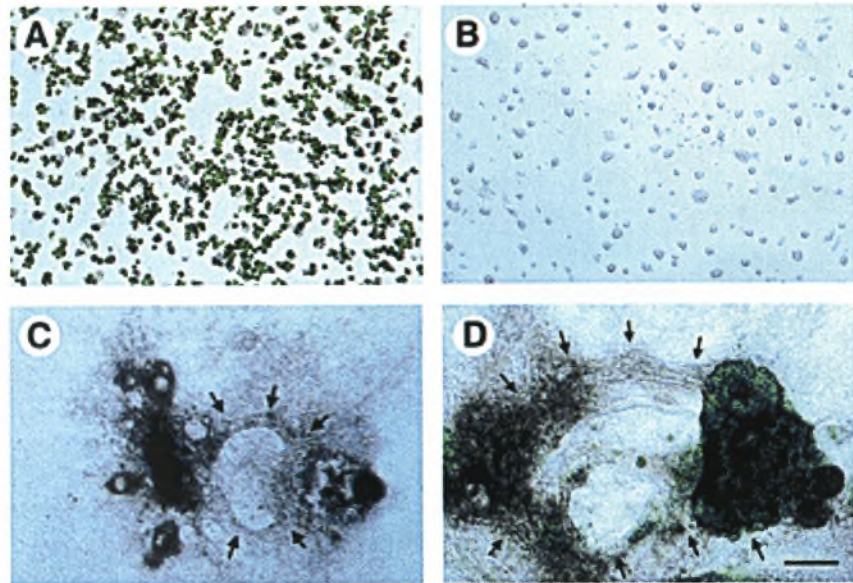
στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι όταν τα εμβρυονικά κύτταρα καλλιεργηθούν χωρίς αυξητικούς παράγοντες μπορούν να διαφοροποιούνται σε ηπατικά κύτταρα αλλά όχι σε ώριμα ηπατοκύτταρα, ενώ όταν καλλιεργηθούν με παράγοντες κρίσιμους για την τελική διαφοροποίηση και ωρίμανση των ηπατοκυττάρων μπορούν να εκφράσουν γονίδια των ώριμων ηπατοκυττάρων δείχνοντας ότι τα εμβρυονικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν και προς ώριμα ηπατοκύτταρα *in vitro*.



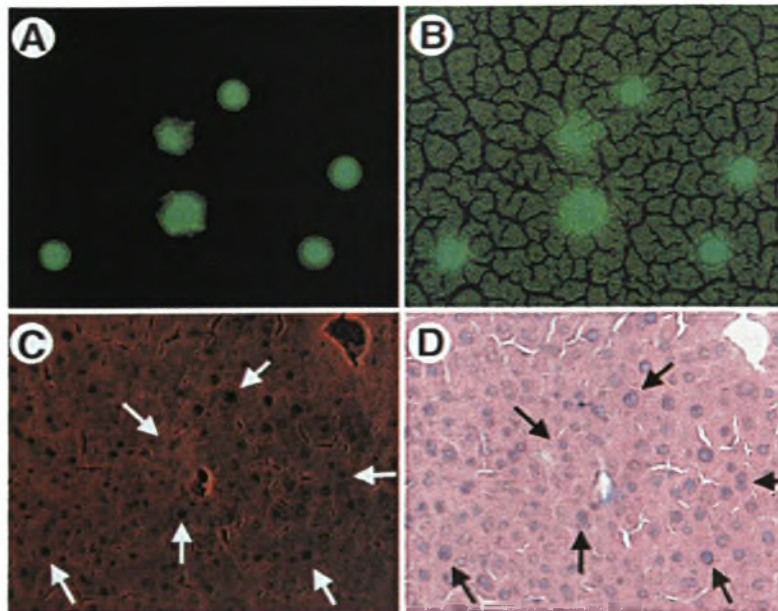
**Εικόνα 2.** *In vitro* ηπατική διαφοροποίηση των εμβρυονικών κυττάρων. Ο παράγοντας Acidic FGF (100ng/ml) προστέθηκε μεταξύ 9<sup>ης</sup> και 12<sup>ης</sup> ημέρας σαν πρώτος παράγοντας της ηπατικής διαφοροποίησης. Ο HGF (20ng/ml) προστέθηκε μεταξύ 12<sup>ης</sup> και 18<sup>ης</sup> ημέρας σαν ενδιάμεσος παράγοντας ηπατικής διαφοροποίησης. Ο OSM (10 ng/ml), Dex (10<sup>-7</sup> M) και ITS (5mg/ml ινσουλίνη, 5 mg/ml τρανσφερίνη, 5mg/ml selenious acid) προστέθηκαν σαν τελικοί παράγοντες ηπατικής διαφοροποίησης μεταξύ 15<sup>ης</sup> και 18<sup>ης</sup> ημέρας (Από το: Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells *in vitro*, FEBS Letters 2001; 497, σελίδα 16).

Το γεγονός ότι τα εμβρυονικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ηπατοκύτταρα *in vivo* και *in vitro* έχει βρεθεί επίσης σε μια άλλη μελέτη στην οποία αποδείχθηκε ότι σε καλλιέργειες εμβρυονικών κυττάρων περιέχονται ηπατοκύτταρα ικανά να παράγουν αλβουμίνη και ουρία. Τα εμβρυονικά αυτά κύτταρα μεταμοσχεύθηκαν μέσω της πυλαίας φλέβας, μετά από μερική ηπατεκτομή (30%), στο ήπαρ θηλυκών ποντικών. Μετά από 4 εβδομάδες βρέθηκαν στο ήπαρ κύτταρα περιέχοντα το Υ χρωμόσωμα θετικά για αλβουμίνη (48). Αλλά και κύτταρα θετικά για το πράσινο του ινδοκυανίου ICG (το πράσινο του ινδοκυανίου είναι ένα οργανικό ανιόν που χρησιμοποιείται κλινικά για την εκτίμηση της ηπατικής λειτουργίας γιατί αποβάλλεται αποκλειστικά από ηπατοκύτταρα και είναι μη τοξικό) που παράχθηκαν από καλλιέργειες εμβρυονικών κυττάρων όταν μεταμοσχεύθηκαν μέσω της πυλαίας φλέβας, ενσωματώθηκαν στο ήπαρ ποντικών μην

ξεχωρίζοντας από τα γειτονικά ηπατοκύτταρα (47). Τα κύτταρα αυτά εξέφραζαν επίσης αλβουμίνη, α-φetoπρωτεΐνη, τρανσθυρετίνη, α1-αντιθρυψίνη, τρυπτοφάνη-2,3-διοξυγενάση, ουρία και ένζυμα που συμμετέχουν στη νεογλυκογένεση.



**Εικόνα 3.** Α) Τα περισσότερα από τα ηπατοκύτταρα που απομονώθηκαν ήταν θετικά για το πράσινο του ινδοκυανίου (ICG). Β) Τα μη διαφοροποιημένα εμβρυονικά κύτταρα ήταν αρνητικά για ICG. Γ) Την 5<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας εμβρυονικών κυττάρων διάφοροι κυτταρικοί τύποι συμπεριλαμβανομένων καρδιακών μυϊκών κυττάρων προέκυψαν από τις καλλιέργειες. Σε αυτό το στάδιο ICG θετικά κύτταρα δεν ανιχνεύτηκαν ανάμεσα στα εμβρυονικά κύτταρα. Δ) Την 14<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας εμβρυονικών κυττάρων εμφανίστηκαν ICG θετικά κύτταρα σαν ομάδα παρακείμενη με τα καρδικά μυϊκά κύτταρα (Από το: *In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green*, *Stem cells* 2002; 20, σελίδα 149).



**Εικόνα 4.** Τα θετικά για το πράσινο του ινδοκυανίου (ICG) κύτταρα που παράχτηκαν από τα εμβρυονικά κύτταρα μεταμοσχεύτηκαν σε ήπαρ ποντικών μέσω της πυλαίας φλέβας. Α) Τα μεταμοσχευμένα ICG θετικά κύτταρα ανιχνεύτηκαν με φθορισμό EGFP (enhanced green fluorescent protein) 4 εβδομάδες μετά την εμφύτευση. Β) EGFP φθορισμός σε αντίθεση με το γύρω ηπατικό παρέγχυμα. Γ) Μη διακριτή ανοσοδραστικότητα της αλβουμίνης στο κυτταρόπλασμα ανάμεσα στα πιθανώς μεταμοσχευμένα ICG θετικά κύτταρα και τα φυσιολογικά ηπατοκύτταρα. Δ) Η χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης αποκάλυψε την ενσωμάτωση των πιθανώς ICG θετικών κυττάρων στο παρέγχυμα του ήπατος. (Από το: *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green, *Stem cells* 2002; 20, σελίδα152).

Τέλος, η διαφοροποίηση των εμβρυονικών κυττάρων σε ηπατοκύτταρα *in vitro* έχει αποδειχθεί και σε μία ακόμη πρόσφατη μελέτη (57). Κύτταρα θετικά για β-γαλακτοσιδάση διαφοροποιήθηκαν από εμβρυονικά κύτταρα. Η αναγνώριση αυτών των κυττάρων επιβεβαιώθηκε από την έκφραση πρωτεϊνών όπως η α-φετοπρωτεΐνη, η αλβουμίνη και η τρανσφερρίνη καθώς και από το γεγονός ότι έχουν μια εμφάνιση σύμφωνη με αυτή των εμβρυονικών ηπατοκυττάρων.

Οι Petersen και συνεργάτες (58) ήταν οι πρώτοι που έδειξαν ότι τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα του μυελού ποντικών μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ηπατοκύτταρα και χολαγγειοκύτταρα. Εξέταση του ανθρώπινου ήπατος μιας γυναίκας μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών από άρρενα δότη έδειξε ότι μερικά ηπατοκύτταρα στο ήπαρ του δέκτη είχαν το Υ χρωμόσωμα στον πυρήνα τους (59). Το Υ χρωμόσωμα στον πυρήνα μερικών ηπατοκυττάρων, περίπου στο 2.2% του συνολικού αριθμού

των ηπατοκυττάρων, ανιχνεύθηκε επίσης σε θηλυκά ποντίκια θανάσιμα ακτινοβολημένα στα οποία πραγματοποιήθηκε μεταμόσχευση μυελού από αρσενικά ποντίκια (60). Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν επίσης υπέρ του γεγονότος ότι ο μυελός των οστών παίζει κάποιο ρόλο στην ηπατική αναγέννηση καθώς κύτταρα του μυελού μπορούν να μετατραπούν σε ώριμα ηπατοκύτταρα που φέρουν το Υ χρωμόσωμα.

Πάντως μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί διαφοροποίηση σε «ακριβή» λειτουργικά ηπατοκύτταρα ή κάποια θεραπευτική εφαρμογή στον άνθρωπο. Εντούτοις, η διαφοροποίηση αυτή των εμβρυονικών κυττάρων *in vitro* παρέχει ένα σημαντικό μοντέλο για τη μελέτη των παραγόντων που είναι απαραίτητοι για ένα κύτταρο ώστε να αποκτήσει ώριμο φαινότυπο (στη συγκεκριμένη περίπτωση ηπατοκυττάρου).

Τελευταία συζητήθηκε το γεγονός ότι ίσως τα ηπατοκύτταρα που παράγονται από τα εμβρυονικά κύτταρα να είναι αποτέλεσμα «σύντηξης» (cell fusion) ανάμεσα σε φυσιολογικά ηπατοκύτταρα και εμβρυονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Εντούτοις, φαίνεται ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα που παράχθηκαν είναι διαφοροποιημένα ηπατοκύτταρα και όχι προϊόν σύντηξης από το γεγονός ότι τα κύτταρα αυτά είχαν περιορισμένη ικανότητα κυτταρικής διαίρεσης, παρουσίαζαν χαρακτηριστικά φυσιολογικών ηπατοκυττάρων κρίνοντάς τα από τη μορφολογία τους και τα ευρήματα στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ενώ δεν οδήγησαν στην ανάπτυξη όγκων ούτε στο ήπαρ ούτε στο δέρμα όταν χορηγήθηκαν υποδόρια σε ποντίκια (50).

Πρόσφατα έρευνες έχουν δείξει ότι ανθρώπινα αιμοποιητικά εμβρυονικά κύτταρα ενηλίκων μπορούν να συντελέσουν στην αναγέννηση των ηπατοκυττάρων σε ηπατικούς ιστούς ασθενών με ενεργό χρόνια νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα (59). Από την άλλη μεριά, όταν το ήπαρ εκτεθεί ακόμα και σε χαμηλή δόση ακτινοβολίας έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει αυξημένες μιτώσεις περίπου ένα χρόνο μετά από την έκθεση χωρίς φανερή νέκρωση ή κυτταρικό πολλαπλασιασμό (61). Βέβαια σε πρόσφατα δεδομένα φαίνεται ότι η κινητοποίηση και ωρίμανση των ηπατικών προγονικών κυττάρων του μυελού των οστών δεν περιορίζεται μόνο με ανταπόκριση σε σοβαρή ηπατική βλάβη αλλά μπορεί να πραγματοποιηθεί και μετά από ήπια ηπατική βλάβη ή ίσως και σε φυσιολογική ανανέωση των ιστών (60). Πράγματι, η αναγέννηση του ήπατος ανταποκρινόμενη σε ελαφριά

βλάβη πραγματοποιείται με διαίρεση των ώριμων ηπατοκυττάρων χωρίς την πρόκληση της διαδικασίας ωρίμανσης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (62).

Έτσι, η μεταμόσχευση ηπατοκυττάρων μπορεί να αποτελέσει στο μέλλον μια εναλλακτική τακτική για τη θεραπεία διάφορων οξέων νοσημάτων του ήπατος καθώς και μεταβολικών ηπατικών νοσημάτων (63, 64). Επιπλέον, η δυνατότητα να αντικαταστήσουμε το ήπαρ με γενετικά τροποποιημένα, ανθεκτικά σε νοσήματα ηπατοκύτταρα, μπορεί να ευοδώσει νέους ορίζοντες στην προσπάθεια διόρθωσης γενετικών διαταραχών και στη θεραπεία χρόνιων νοσημάτων του ήπατος (65, 66). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι τα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών μπορούν να δώσουν γένεση σε ώριμα ηπατοκύτταρα και σε ποντίκια και σε ανθρώπους (58, 59, 67, 68) υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα δείχνουν υψηλό επίπεδο πλαστικότητας. Πράγματι, οι Lagasse και συνεργάτες (25) πραγματοποίησαν ενδοφλέβια χορήγηση κυττάρων μυελού οστού ενήλικα σε ποντίκια με τυροσιναιμία τύπου I με αποτέλεσμα να σωθούν τα ποντίκια και να αποκατασταθεί η βιοχημική λειτουργία του ήπατος. Εντούτοις, η ακριβής ανατομική θέση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων του ήπατος είναι δύσκολο να εξακριβωθεί. Για όλους τους παραπάνω λόγους προτάθηκαν τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού για ηπατική μεταμόσχευση. Όμως η χρήση αυτών των κυττάρων έχει διάφορους περιορισμούς. Αποκτώνται από το περιφερικό αίμα ή από τον μυελό, η απομόνωσή τους απαιτεί σύνθετες διαδικασίες και προς το παρόν δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε καλλιέργειες. Επιπρόσθετα, μέχρι στιγμής οι καλλιέργειες ηπατοκυττάρων *in vitro* δεν είναι επαρκείς για να παραχθεί ο απαραίτητος αριθμός κυττάρων για μεταμόσχευση.

Ο μηχανισμός της εισόδου και διαφοροποίησης των μεταμοσχευμένων κυττάρων στο ήπαρ μπορεί να συμβαίνει με διαφορετικούς τρόπους. Τα κυκλοφορούντα κύτταρα του μυελού μπορεί να εισέρχονται στο ήπαρ άμεσα από την κυκλοφορία των κολποειδών. Ενσωμάτωση των ώριμων ηπατοκυττάρων στο ήπαρ μετά από αγγειακή έγχυση έχει ήδη αναφερθεί (60). Σύμφωνα με τους Petersen και συνεργάτες (58) τα κύτταρα του μυελού εισέρχονται στο ήπαρ μέσω της κυκλοφορίας, πηγαίνουν στα κανάλια του Hering και/ή στους τελικούς κλάδους των χοληφόρων και διαφοροποιούνται

σε θετικά για την κυτταροκερατίνη 19 μικρά χολαγγειοκύτταρα. Ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση σε ηπατοκύτταρα ακολουθεί ανάλογα με την έκταση και τον τύπο της ηπατικής βλάβης. Αυτή η δεύτερη υπόθεση είναι σύμφωνη με διάφορα ευρήματα: η αναγνώριση του c-kit στα κανάλια του Hering σε φυσιολογικό ήπαρ και σε αναγεννούμενα κύτταρα σε μαζική ηπατική νέκρωση (55), ίσως αντιπροσωπεύει συνέχεια του αρχικού φαινοτύπου του μυελού των οστών.

Έχει επίσης αποδειχθεί ότι CD90+ κύτταρα του μυελού των οστών από ποντίκια μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ηπατοκύτταρα (69). Με αρνητικό μαγνητικό διαχωρισμό σε κυτταρομετρία ροής (FACS) απομονώθηκαν CD90+ κύτταρα του μυελού τα οποία περιείχαν αιμοποιητικά κύτταρα καθώς και μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα τα οποία αφαιρέθηκαν στη συνέχεια μαγνητικά (70). Τα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού, που καλλιεργήθηκαν με ηπατοκύτταρα ή με ηπατικό αυξητικό παράγοντα εξέφρασαν συγκεκριμένα ηπατικά γονίδια γεγονός, που επιβεβαιώνει την άποψη, ότι τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε έρευνες ηπατικής κυτταρικής εξέλιξης *in vivo* (70).

Προηγούμενες προσπάθειες για απομόνωση των ηπατικών προγονικών κυττάρων και από το μυελό και από το ήπαρ κατέληξαν σε μείγμα αιμοποιητικών και δυνητικά προγονικών κυττάρων γιατί όλα έχουν κοινούς υποδοχείς και αντιγόνα στην επιφάνεια τους, συμπεριλαμβανομένων δεικτών των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων όπως CD34, Thy-1, c-kit, flt-3 και άλλα (25, 58).

Αλλαγές στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC), το HLA και στην έκφραση της β2 μικροσφαιρίνης έχουν βρεθεί σε πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων καθώς και στο ήπαρ ασθενών όπου πραγματοποιήθηκε αναγέννηση και διαφοροποίηση (71-73). Πρόσφατα, μελέτη της έκφρασης της β2 μικροσφαιρίνης, MCH και HLA αντιγόνων σε κακοήθειες του ήπατος και αναγεννούμενο ήπαρ έδειξε την παρουσία κυττάρων αρνητικών για την β2 μικροσφαιρίνη (69). Αυτό το εύρημα είναι πολύ σημαντικό γιατί η β2 μικροσφαιρίνη είναι το πιο διαδεδομένο ανοσολογικό μόριο στη φύση. Εκφράζεται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα και η εσωτερική κυτταρική μάζα του προεμφυτευμένου εμβρύου όπου βρίσκονται τα εμβρυονικά κύτταρα είναι το μόνο σημείο όπου υπάρχει ένας κυτταρικός πληθυσμός αρνητικών για β2

μικροσφαιρίνη κυττάρων. Όμως τα σπερματοζωάρια του ενήλικα και των ποντικών δεν εκφράζουν β2 μικροσφαιρίνη και η έλλειψη αυτής της έκφρασης σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων θεωρείται σαν έμμεση ένδειξη ότι τα κύτταρα αυτά έχουν προέλευση από αρχέγονα εμβρυονικά κύτταρα (74, 75). Σε πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι στο κλάσμα των κυττάρων του μυελού, που ήταν αρνητικά για την β2 μικροσφαιρίνη υπάρχει ένας πληθυσμός κυττάρων Thy-1 + που εκφράζουν αλβουμίνη και ειδικούς δείκτες ηπατοκυττάρων (α-FP, CK8, CK18, HNF-1, HNF-4) και παρουσιάζουν συγκεκριμένες ηπατικές λειτουργίες. Τα κύτταρα αυτά βρίσκονται τόσο σε φυσιολογικό όσο και σε πάσχον ήπαρ ποντικών και ανθρώπων. Μετά από έγχυση των κυττάρων αυτών σε ήπαρ ποντικών παρατηρήθηκε διαφοροποίησή τους σε ώριμα ηπατοκύτταρα δείχνοντας ότι τα κύτταρα αυτά μπορεί να είναι ηπατικά προγονικά κύτταρα (69).

Σε πρόσφατες μελέτες έχει βρεθεί η παρουσία αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στο ανθρώπινο ήπαρ που ίσως παρέχουν τους απαραίτητους αρχέγονους πληθυσμούς για τοπική αιμοποιητική και λεμφική διαφοροποίηση (76). Ηπατικής προέλευσης λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα πάρθηκαν από φυσιολογικές βιοψίες ήπατος ενηλίκων. Ο δείκτης CD34 βρέθηκε σε 0.81% ως 2.35% των λεμφομονοπύρρηνων κυττάρων με τη χρήση FACS. Αυτός ο δείκτης εκφράζεται επιλεκτικά από τα ανώριμα αιμοποιητικά κύτταρα και επίσης βρίσκεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των ηπατικών ιστών (77). Τα CD34+ κύτταρα επιλέχτηκαν με μαγνητικό διαχωρισμό και ο πληθυσμός αυτός στη συνέχεια εξετάστηκε για δείκτες που εκφράζονται από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα. CD45 εκφράστηκαν στο 49% των CD34+ κυττάρων δείχνοντας την αρχέγονη αιμοποιητική τους προέλευση. Ο CD38, ένας από τους πιο πρώιμους δείκτες που εκφράζεται από τα εξελισσόμενα αιμοποιητικά κύτταρα βρέθηκε σε ποσοστό 50% των CD34+ κυττάρων. Το 90% των CD34+ κυττάρων εξέφραζαν επίσης τον αντιγονικό δείκτη ενεργοποίησης των λευκοκυττάρων DR. Οι περισσότερες έρευνες έχουν βρει ότι η πλειοψηφία των CD34+ κυττάρων του μυελού και εμβρυϊκού ήπατος εκφράζουν DR (78). Η ανίχνευση δεικτών χαρακτηριστικών των ανώριμων αιμοποιητικών κυττάρων παρέχει λοιπόν σημαντικά στοιχεία για την παρουσία αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στο ανθρώπινο ήπαρ. Πρόσθετα δεδομένα για την παρουσία αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στο ήπαρ

ενήλικα υπάρχουν και από έρευνες σε ποντίκια στις οποίες απομονωμένα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από το ήπαρ αποκατέστησαν ικανοποιητικά την αιμοποίηση σε ζώα που είχαν ακτινοβοληθεί με υψηλές/θανατηφόρες δόσεις (79). Αυτό πιθανόν σημαίνει ότι το ανθρώπινο ήπαρ συντελεί στην αιμοποίηση και είναι σημαντικό για την διαφοροποίηση των λεμφοαιμοποιητικών κυττάρων που ευθύνονται για συγκεκριμένα νοσήματα του ήπατος όπως η αυτοάνοση ηπατίτιδα και η απόρριψη ηπατικού μοσχεύματος μετά από μεταμόσχευση ήπατος.

Είναι γνωστό ότι η συμβολή του ήπατος στην αιμοποίηση κατά την ανθρώπινη εμβρυϊκή ζωή είναι πολύ σημαντική. Εκτός από την διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων, η μυελοποίηση, η B και T λεμφοποίηση καθώς και η παραγωγή μεγακαρυοκυττάρων πραγματοποιούνται στο εμβρυϊκό ήπαρ. Η αιμοποιητική ηπατική δραστηριότητα θεωρείται ότι σταματάει μετά την γέννηση και ο μυελός των οστών θεωρείται το κύριο όργανο αιμοποίησης στην ενήλικη ζωή (80). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι το ανθρώπινο ήπαρ ενήλικου περιέχει έναν μεγάλο πληθυσμό ηπατικών λεμφομονοπύρηνων κυττάρων και διάφορους υποπληθυσμούς T-κυττάρων που είναι φαινοτυπικά διαφορετικά από τα κυκλοφορούντα στην περιφέρεια λεμφοκύτταρα (81). Έκφραση από ανασυνδυασμένα ενεργοποιημένα γονίδια 1 και 2 (RAG1, RAG2) που είναι απαραίτητα για την ωρίμανση των T-κυττάρων έχει βρεθεί στα ανθρώπινα ηπατικά λεμφοκύτταρα (82). Τα ευρήματα αυτά πιθανόν αποδεικνύουν ότι το ήπαρ του ενήλικα ίσως συμμετέχει κυρίαρχα στην εξωθυμική διαφοροποίηση των T-κυττάρων. Εάν συμβαίνει αυτό τότε τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα πρέπει να υπάρχουν στο ήπαρ του ενήλικα για να παρέχουν ανανεούμενα κύτταρα για την λεμφοαιματοποίηση.

Συνοψίζοντας, ο ακριβής ρόλος των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στο ανθρώπινο ήπαρ εξακολουθεί να είναι άγνωστος αλλά η παρουσία τους και η αυτοανανεωτική ικανότητά τους είναι πλέον σχεδόν βέβαιη γεγονός που πιθανόν εξηγεί την αυξημένη σε σχέση με άλλα συμπαγή όργανα, ανοχή του ήπατος στην απόρριψη μετά από μεταμοσχεύσεις (83, 84).



### **3. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ**

Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών έχουν ήδη μελετηθεί σε ορισμένα αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος.

#### **3.1. ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ**

Στη ρευματοειδή αρθρίτιδα μελετήθηκαν τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής και με τις αιμοποιητικές αποικίες σε μικρής και μεγάλης διάρκειας καλλιέργειες μυελού των οστών. Η λειτουργία των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών εκτιμήθηκε μελετώντας την ικανότητα ακτινοβολημένων στρωματικών κυττάρων να υποστηρίξουν την ανάπτυξη φυσιολογικών CD34+ κυττάρων. Βρέθηκε ότι οι ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα είχαν μια σημαντική ποσοτική και ποιοτική διαταραχή στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, όπως φάνηκε από το μειωμένο αριθμό και την αυξημένη απόπτωση CD34+ κυττάρων, ελαττωματική κλωνογονική δυνατότητα των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών και των CD34+ κυττάρων και μειωμένες αιμοποιητικές αποικίες σε καλλιέργειες μυελού των οστών μακράς διάρκειας σε σχέση με τους υγιείς που μελετήθηκαν (85, 86). Αυτές οι διαταραχές οφείλονται είτε σε κάποια εγγενή βλάβη των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων είτε πιθανότατα σε δευτεροπαθή βλάβη των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σαν αποτέλεσμα μιας χρόνιας φλεγμονώδους διεργασίας στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. Πράγματι, βρέθηκε ότι τα στρωματικά κύτταρα του μυελού απέτυχαν να υποστηρίξουν φυσιολογικά την αιμοποίηση και παράγαγαν υψηλές ποσότητες παράγοντα νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α) που ίσως επηρεάζει τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα. Τα επίπεδα του TNF-α στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών συσχετιζόνταν αρνητικά με τα CD34+ κύτταρα και τον αριθμό των αιμοποιητικών αποικιών και θετικά με το ποσοστό των αποπτωτικών (Fas+) CD34+ κυττάρων γεγονός

που υποδεικνύει ότι ο TNF-α εμπλέκεται μάλλον στη διεργασία του αποπτωτικού θανάτου των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι η ελαττωματική αιμοποίηση αποκαταστάθηκε μετά από αντι-TNF-α θεραπεία (85, 86).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων ανάμεσα στα CD34+ κύτταρα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα ήταν σημαντικά υψηλό. Μια σημαντική συσχέτιση βρέθηκε ανάμεσα στα Fas+ και στα αποπτωτικά CD34+ κύτταρα δείχνοντας ότι η παθογενετική οδός της απόπτωσης που στηρίζεται στο Fas/FasL εμπλέκεται πιθανότατα στον αποπτωτικό θάνατο των CD34+ κυττάρων (87). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα φυσιολογικά κύτταρα του ανθρώπου δεν εκφράζουν το αντιγόνο Fas ή το εκφράζουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα (88). Η υπερέκφραση (upregulation) του αντιγόνου Fas στα CD34+ λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών έχει αναφερθεί ότι μπορεί να προκαλείται από κυτταροκίνες του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών όπως ο TNF-α και η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) (87). Ο αριθμός των αιμοποιητικών αποικιών ήταν ελαττωμένος τόσο στις μικρές όσο και στις μακράς διάρκειας καλλιέργειες μυελού των οστών. Ο αριθμός αυτός των αποικιών δεν συσχετιζόταν με την αναλογία των CD34+ κυττάρων δείχνοντας ότι υπάρχει μάλλον μια ενδογενής βλάβη στην κλωνογονική δυνατότητα ανάπτυξης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων χωρίς βεβαίως να μπορεί να αποκλειστεί όπως αναφέρθηκε προηγούμενα και η συμμετοχή του κατασταλτικού ρόλου του TNF-α στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα.

Εντούτοις, αναφορικά με μορφολογικές μελέτες του μυελού των οστών ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα καθώς σε ορισμένες από αυτές έχει παρατηρηθεί η παρουσία μειωμένης κυτταροβρίθειας στην πλειονότητα των ασθενών (86), ενώ σε άλλες όχι (89). Πιο αναλυτικά, οι Rosenthal και Farhi (89) μελέτησαν μυελούς ασθενών με ποικίλα νοσήματα του συνδετικού ιστού εκ των οποίων 13 είχαν ρευματοειδή αρθρίτιδα. Μόνο 2 από τους 13 αυτούς ασθενείς είχαν μειωμένη κυτταροβρίθεια στο μυελό. Στη ρευματοειδή αρθρίτιδα η μειωμένη κυτταροβρίθεια αποδόθηκε στις περισσότερες περιπτώσεις στη δράση φαρμάκων. Σε έναν ασθενή με σύνδρομο Felty η μειωμένη κυτταροβρίθεια συνέβαλλε στην απόφαση να πραγματοποιηθεί σπληνεκτομή. Οι Rosenthal

και Farhi (89) βρήκαν επίσης την παρουσία 2 μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων σε αντίστοιχους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, ένας εκ των οποίων ελάμβανε μεθοτρεξάτη. Οι τελευταίες αυτές περιπτώσεις θεωρήθηκαν ως «επίμονες» αναιμίες με πολλούς βλάστες και χαρακτηρες χρόνιας μυελο-μονοκυτταρικής λευχαιμίας. Γενικώς, είναι γνωστό ότι τα μυελοδυσπλαστικά δυσπλαστικά σύνδρομα σε ασθενείς με αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα έχουν συσχετισθεί με τη θεραπεία με αλκυλιούντες παράγοντες (90). Έχει επίσης βρεθεί εδώ και αρκετά χρόνια ότι η πιθανότητα λευχαιμίας είναι κατά πολύ αυξημένη σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (ίσως και οκτώ φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό (91). Σπανιότερα μορφολογικά ευρήματα στο μυελό των οστών ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα αφορούν στην παρουσία κοκκιωμάτων (92) τα οποία στο παρελθόν έχουν αποδοθεί στη χρήση ορισμένων φαρμάκων που χορηγούνται στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας όπως η πενικιλλαμίνη και τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη.

### **3.2. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗΣ ΛΥΚΟΣ**

Ελαττωματική λειτουργία των αρχέγονων αιμοποιητικών και στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών έχει βρεθεί και στον συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Συγκεκριμένα οι ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο παρουσίαζαν χαμηλό αριθμό CD34+ κυττάρων. Ο χαμηλός αριθμός αφορούσε τόσο τα CD34+/CD38+ όσο και τα πιο πρώιμα CD34+/CD38- κύτταρα (93). Για να διερευνηθεί εάν ο χαμηλός αριθμός των CD34+ κυττάρων οφείλεται σε αυξημένο αποπτωτικό θάνατο μελετήθηκε η έκφραση του αντιγόνου Fas στα CD34+ κύτταρα. Βρέθηκε ότι τα CD34+ κύτταρα των ασθενών παρουσίαζαν υψηλότερη έκφραση Fas (Fas+ κύτταρα) σε σχέση με τους υγιείς (93). Αντίθετα καμία διαφορά δε βρέθηκε ανάμεσα σε υγιείς και ασθενείς στην αναλογία των Fas+ κυττάρων που ανιχνεύθηκαν στα CD34- κύτταρα. Τα αποπτωτικά CD34+ κύτταρα συσχετίζονταν θετικά με τον αριθμό των CD34+/Fas+ κυττάρων, γεγονός που δείχνει ότι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος μέσω του μηχανισμού Fas/FasL ίσως ευθύνεται για το χαμηλό αριθμό των CD34+ στους ασθενείς με ερυθματώδη λύκο. Επίσης στους ασθενείς αυτούς παρατηρήθηκε μειωμένη

κλωνογονική δυνατότητα των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και τα κύτταρα αυτά συσχετίζονταν θετικά με τα CD34+ κύτταρα υποδεικνύοντας ότι ο χαμηλός αριθμός αυτών των κυττάρων πιθανόν αντανάκλα το χαμηλό αριθμό των CD34+ κυττάρων του μυελού. Επιπρόσθετα, βρέθηκαν μειωμένες αιμοποιητικές αποικίες σε μακράς διάρκειας καλλιέργειες του μυελού των οστών σε σχέση με τους υγιείς που μελετήθηκαν (93). Τέλος, τα στρωματικά κύτταρα του μυελού ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο απέτυχαν να υποστηρίξουν την αιμοποίηση. Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι σε έναν ασθενή τα CD34+ κύτταρα αυξήθηκαν, τα αποπτωτικά CD34+/Fas+ κύτταρα επανήλθαν σε φυσιολογικά επίπεδα και η ελαττωματική λειτουργία των στρωματικών κυττάρων αποκαταστάθηκε μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών (93).

Η σοβαρή διαταραχή της αιμοποίησης στο συστηματικό ερυθματώδη λύκο μπορεί να οφείλεται σε αυτοδραστικά T-λεμφοκύτταρα ή στη δράση φλεγμονωδών κυτταροκινών (94, 95). Πράγματι, ο χαμηλός αριθμός των CD34+, ο χαμηλός αριθμός αιμοποιητικών αποικιών και η αυξημένη αναλογία αποπτωτικών κυττάρων στα CD34+ κύτταρα μπορούν να αποδοθούν σε μία πρωταρχική βλάβη του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου (96) ή σε βλάβη του αιμοποιητικού κυττάρου που οφείλεται σε μια διαταραχή του ανοσολογικού συστήματος στο συστηματικό ερυθματώδη λύκο (95) ή σε ανώμαλη λειτουργία του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών (94). Η πιθανότητα βέβαια να σχετίζονται τα ευρήματα αυτά με την επίδραση φαρμάκων δεν μπορεί να αποκλεισθεί. Τα κορτικοστεροειδή και η κυκλοσπορίνη μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση σε μονοκύτταρα κύτταρα του περιφερικού αίματος αλλά μέχρι στιγμής δεν φαίνεται να επηρεάζουν τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (97). Αντίθετα, έχει βρεθεί ότι τα κορτικοστεροειδή ασκούν θετική επίδραση στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων (98, 99). Στην παθογένεια του συστηματικού ερυθματώδη λύκου σπουδαίος είναι ο ρόλος των αυτοδραστικών T-λεμφοκυττάρων. Είναι λοιπόν πιθανόν -αν και δεν έχει αποδειχθεί- τα αυτοδραστικά T-λεμφοκύτταρα να σχετίζονται με την αναστολή των αιμοποιητικών αποικιών και τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο στο μυελό των οστών ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Πραγματικά, αφαίρεση των T-λεμφοκυττάρων από τον μυελό των οστών

ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο έχει βρεθεί ότι προκαλεί σημαντική αύξηση στην κλωνογονική δυνατότητα των αρχέγονων αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων (100). Η ενεργοποίηση του μηχανισμού απόπτωσης μέσω της παθογενετικής οδού Fas/FasL είναι σχεδόν βέβαιο ότι εμπλέκεται στην ομοίωση των αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών και στην απόπτωση αυτών (101). Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι βρέθηκε υψηλότερο ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων στα Fas+ κύτταρα σε σχέση με τα Fas- στους ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Η εμπλοκή της οδού Fas (που φαίνεται να είναι εξαρτώμενη από το μικροπεριβάλλον των κυτταροκινών) στην απόπτωση έχει βρεθεί σε πολλές παθήσεις (102) αν και η ενεργοποίηση αυτής της οδού δεν οδηγεί πάντα σε κυτταρικό θάνατο (103). Πράγματι, η οδός Fas στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα είναι πιθανόν να επάγεται από την IFN- $\gamma$  και τον TNF- $\alpha$  (87) καθώς αυξημένη mRNA έκφραση του TNF- $\alpha$  έχει επίσης αναφερθεί στο μυελό των οστών σε ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο (104). Η ανικανότητα των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών να υποστηρίξουν την αιμοποίηση μπορεί να σχετίζεται με την παρουσία αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων μεταξύ των στρωματικών κυττάρων ή με υψηλά ποσά κυτταροκινών που παράγονται από τον μυελό των οστών και καταστέλλουν την αιμοποίηση (95).

Τα μορφολογικά ευρήματα του μυελού σε ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο σχετίστηκαν κυρίως με τις επιπλοκές από τη χορήγηση κυτταροτοξικών φαρμάκων παρά με την ίδια τη νόσο (105, 106). Οι Michael και συνεργάτες εξέτασαν μορφολογικά 32 μυελούς ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο και βρήκαν ότι είναι εντός των φυσιολογικών ορίων στην πλειονότητα των περιπτώσεων (107). Αντίθετα, οι Burkhardt και συνεργάτες βρήκαν σημαντικές αλλοιώσεις στις βιοψίες 21 ασθενών με την ίδια νόσο (108). Στη συνέχεια και άλλες μελέτες έδειξαν την εμφάνιση απλαστικής αναιμίας και μυελοϊνώσεως ως επιπλοκές του συστηματικού ερυθματώδη λύκου (108-114). Ανοσολογικές διαταραχές εμπλέκονται στην παθογένεια της ιδιοπαθούς μυελοϊνώσεως. Οι ασθενείς με πρωτοπαθή μυελοϊνώση έχουν αυξημένα κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα, αντιπυρηνικά αντισώματα και αντιπηκτικό του λύκου (115-117). Οι Gordon και Day (118) μελέτησαν 19 ασθενείς με μυελοϊνώση και μυελική μεταπλασία και βρήκαν 9 με

κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα και 4 με ανεπάρκεια του συμπληρώματος δείχνοντας ότι ανωμαλίες του συμπληρώματος μπορεί να συσχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου (119).

Οι Pereira και συνεργάτες (119) στην προσπάθεια να εκτιμήσουν το ρόλο του μυελού των οστών στις αιματολογικές επιπλοκές που εμφανίζονται στον συστηματικό ερυθματώδη λύκο μελέτησαν μορφολογικά το μυελό 21 ασθενών με περιφερική κυτταροπενία ( $Hb < 10 \text{ g/dl}$  και/ή λευκά  $< 4 \times 10^9/l$  και/ή αιμοπετάλια  $< 150 \times 10^9/l$ ). Κανείς από τους ασθενείς δεν ελάμβανε ανοσοκατασταλτικά φάρμακα τους τελευταίους δύο μήνες πριν τη μελέτη. Οι πιο σημαντικές διαταραχές που βρέθηκαν στις βιοψίες μυελού των ασθενών ήταν: μειωμένη κυτταροβρίθεια (40%), αυξημένη παραγωγή ρετικουλίνης (76,2%) με μυελοϊνωση σε έναν ασθενή και νέκρωση (19%). Η αναρρόφηση του μυελού ήταν δύσκολο να γίνει σε 4 ασθενείς που έδειξαν αυξημένη παραγωγή ρετικουλίνης στην ιστολογική ανάλυση. Πλασματοκυττάρωση βρέθηκε στο 26,7% των περιπτώσεων. Οι αποθήκες σιδήρου ήταν φυσιολογικές ή αυξημένες στο 26,7% και μειωμένες ή κενές στο 73,3%. Το πιο συχνό εύρημα στο περιφερικό αίμα ήταν λευκοπενία στο 90,4%, ενώ υποπλασία της κοκκιώδους σειράς παρατηρήθηκε στο 47,3% των ασθενών.

**Πίνακας 2.** Ευρήματα του περιφερικού αίματος και του μυελού των ασθενών σε ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο στην έρευνα των Pereira και συνεργατών (119).

<i>Ασθενείς</i>	<i>n</i>	<i>Κυτταροβρίθεια μυελού</i>	<i>Ευρήματα Αυξημένη</i>	<i>μυελού Φυσιολογική</i>	<i>(%) Ελαττωμένη</i>
Πανκυτταροπενία	5	Συνολική	20.0	40.0	40.0
$Hb < 10 \text{ g/dl}$	11	Ερυθρά σειρά	27.2	36.3	36.3
Αιμόλυση ή θετικό Coombs τεστ	6	Ερυθρά σειρά	50.0	33.3	16.7
Λευκά $< 4 \times 10^9/l$	19	Κοκκιώδης σειρά	10.5	42.1	47.3
Αιμοπετάλια $< 150 \times 10^9/l$	1	Μεγακαρουκυτταρική σειρά	10.0	60.0	30.0
Συνολικά	21	Συνολική	19.0	33.3	47.6

$n =$  ο αριθμός των ασθενών

Οι Rosenthal και Farhi (89) μελέτησαν 35 βιοψίες μυελών ασθενών με νοσήματα του συνδετικού ιστού (15 ασθενείς με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο, 13 με ρευματοειδή αρθρίτιδα, 2 με μεικτή νόσο του συνδετικού ιστού, 1 με ψωριασική αρθρίτιδα και 1 με πολυμυοσίτιδα) και βρήκαν ότι το 80% των μυελών με μειωμένη κυτταροβρίθεια ανήκαν σε ασθενείς με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο. Επιπλέον, βρήκαν την παρουσία πλασματοκυττάρων γύρω από τα αγγεία σε ποσοστό 60% είτε μεμονωμένα είτε κατά ομάδες (89). Αλλοιώσεις των οστών βρέθηκαν σε ποσοστό 14% συμπεριλαμβανομένης της οστεομαλακίας σε 3 περιπτώσεις με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και της οστεοπόρωσης σε 2 περιπτώσεις με παρατεταμένη θεραπεία με κορτικοστεροειδή. Παρουσία μυελοϊνωσης βρέθηκε σε 2 βιοψίες. Η ανάπτυξη πολλαπλού μυελώματος έχει αναφερθεί τόσο σε ασθενείς με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο όσο και με ρευματοειδή αρθρίτιδα (120), ενώ αντιδραστική πλασματοκυττάρωση ανευρίσκεται συχνά σε ασθενείς με νοσήματα του συνδετικού ιστού πιθανότατα ως απάντηση σε μια χρόνια αντιγονική διέγερση (121). Εν τούτοις, συσχέτιση ανάμεσα στη χρόνια φλεγμονή, την παρουσία πλασματοκυττάρωσης και της ανάπτυξης πολλαπλού μυελώματος δεν έχει αποδειχθεί (120). Αντίθετα, έχει αποδειχθεί η αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης λεμφώματος σε ασθενείς με αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα (122). Η ηωσινοφιλία στο μυελό και το περιφερικό αίμα μερικών ασθενών στη μελέτη των Rosenthal και Farhi (89), φαίνεται να αντανακλά τη σοβαρότητα της νόσου σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, πολυαρθρίτιδα και σύνδρομο Sjogren's αλλά όχι με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο (123).

Το αίτιο της μειωμένης κυτταροβρίθειας του μυελού των οστών στο συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο δεν είναι σαφές. Η παρουσία αντισωμάτων που αναστέλλουν την ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων του μυελού των οστών μπορεί να σχετίζεται με τη μειωμένη κυτταροβρίθεια που παρατηρήθηκε (109-111). Οι Brooks και συνεργάτες (109) ανέφεραν μια περίπτωση απλαστικής αναιμίας σχετιζόμενης με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο στην οποία ένα IgG αντίσωμα, το οποίο βρισκόταν στον ορό του ασθενούς μόνο κατά την έξαρση της νόσου και όχι κατά την ύφεση, κατέστειλε στο εργαστήριο την ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων της κοκκιώδους σειράς σε μυελό των οστών φυσιολογικών δοτών. Οι Bailey και συνεργάτες (110) απέδειξαν επίσης την παρουσία ενός IgG αντισώματος που κατέστειλε

στο εργαστήριο τον πολλαπλασιασμό του μυελού των οστών υγιών δοτών  
(117).



#### 4. ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΣΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική πρόοδος στον τομέα της αυτολόγης μεταμόσχευσης αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων για ανθεκτικές ή σοβαρές περιπτώσεις αυτοάνοσων νοσημάτων. Το σκεπτικό μιας τέτοιας θεραπείας στηρίζεται στο γεγονός ότι εντατική θεραπεία με υψηλές δόσεις ανοσοκατασταλτικών ακολουθούμενη από αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού θα μπορούσε να επαναφέρει φυσιολογική λειτουργία του αρχέγονου πολυδύναμου κυττάρου (stem cell) και επομένως φυσιολογική ανοσολογική δραστηριότητα σε ασθενείς με σοβαρά ή ανθεκτικά στις κλασικές θεραπείες αυτοάνοσα νοσήματα. Υπάρχουν πράγματι αρκετές ενδείξεις για την αλήθεια αυτής της υπόθεσης (96, 124). Η ύφεση που επιτυγχάνεται μετά την μεταμόσχευση μπορεί να είναι παροδική ή μεγάλης διάρκειας. Εντούτοις, η αλλογενής μεταμόσχευση παρουσιάζει σημαντικό ποσοστό νοσηρότητας και θνησιμότητας και τείνει να εφαρμόζεται σε απελπιστικές καταστάσεις. Η θνησιμότητα που σχετίζεται με τη θεραπεία είναι περίπου 10% σε 1 χρόνο και συνδέεται με την ένταση της χημειοθεραπείας πριν τη μεταμόσχευση και το στάδιο της νόσου τη στιγμή της μεταμόσχευσης. Αντίθετα, η αυτόλογη μεταμόσχευση παρουσιάζει πολύ πιο χαμηλό ποσοστό θνησιμότητας σε σχέση με την αλλογενή μεταμόσχευση. Η αυτόλογη μεταμόσχευση για αιματολογικές κακοήθειες συνδέεται με ποσοστό θνησιμότητας 2-5%, ενώ στην αλλογενή μεταμόσχευση το ποσοστό κυμαίνεται από 10-40% (125). Μέχρι στιγμής έχει πραγματοποιηθεί αυτόλογη μεταμόσχευση σε ασθενείς με σκληρόδερμα, συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, ρευματοειδή αρθρίτιδα, νεανική ιδιοπαθή αρθρίτιδα (νόσο Still) και πολλαπλή σκλήρυνση. Εν τούτοις, βασιζόμενοι σε ικανοποιητικό αριθμό ασθενών, ομοφωνία για να ξεκινήσουν εκτεταμένες προσπάθειες μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων υπάρχει για το σκληρόδερμα, την πολλαπλή σκλήρυνση και τη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Η επιλογή των ασθενών είναι πολύ κρίσιμη για την επιτυχία αυτής της μεθόδου θεραπείας. Ασθενείς με προχωρημένη νόσο, με σοβαρά επηρεασμένη λειτουργία οργάνων ή μη αναστρέψιμη βλάβη οργάνων δεν θα πρέπει να υποβάλλονται σε αυτόλογη μεταμόσχευση.

**Πίνακας 3.** Δεδομένα αυτόλογης μεταμόσχευσης μυελού από την έρευνα των Tyndall και Saccardi μέχρι Οκτώβριο 2004.

<b>Ασθένεια</b>	<b>n: αριθμός ασθενών που μεταμοσχεύτηκαν</b>
<b>Νευρολογικές διαταραχές</b>	
Πολλαπλή Σκλήρυνση	183
Μυασθένεια Gravis	2
Πολυνευροπάθεια	3
Πλάγια μυατροφική σκλήρυνση	2
Σύνδρομο Gullain-Barre	1
<b>Ρευματολογικές διαταραχές</b>	
Συστηματική σκληροδερμία	88
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	72
Νεανική Ιδιοπαθής αρθρίτιδα	54
Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος	66
Δερματομυοσίτιδα	7
Μεικτή νόσος συνδετικού ιστού	4
Νόσος Behcet	5
Ψωριασική αρθρίτιδα	2
Αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα	2
Σύνδρομο Sjogren's	1
<b>Αγγειίτιδες</b>	
Wegener's	4
Κρυστογλοβουλιναιμία	4
Μη ταξινομημένες	2
<b>Αυτοάνοσες κυτταροπενίες</b>	
Αυτοάνοση θρομβοπενία	12
Απλασία της ερυθράς σειράς	4
Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία	5
Θρομβωτική Θρομβοπενική πορφύρα	3
Σύνδρομο Evans	2
<b>Γαστρεντερικές παθήσεις</b>	
Εντεροπάθειες	2
Χρόνιες φλεγμονώδεις νόσοι εντέρου	3
<b>Άλλες</b>	3
<b>Σύνολο</b>	<b>536</b>

Η μεταμόσχευση αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων είναι θεραπεία εκλογής για αρκετές αιματολογικές κακοήθειες συμπεριλαμβανομένων μερικών υποκατηγοριών κακοηθειών του λεμφικού συστήματος και του πολλαπλού μυελώματος. Δεν είναι αποδεδειγμένο ότι οι ίδιες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για να εξαλείψουν τους κλώνους των λεμφικών κυττάρων στις αιματολογικές κακοήθειες μπορούν να επαναφέρουν τα διαταραγμένα λεμφοκύτταρα στα σοβαρά αυτοάνοσα νοσήματα. Επίσης, στις περιπτώσεις αιματολογικών κακοηθειών έχει βρεθεί μετά από αλλογενή μεταμόσχευση μυελού ότι στα πλαίσια της αντίδρασης του μοσχεύματος εναντίον του ξενιστή

τα Τ κύτταρα του δότη μπορεί να καταστρέψουν τους παθολογικούς κλώνους. Πιθανόν και στα αυτοάνοσα νοσήματα τα Τ-κύτταρα του δότη να δρουν θετικά καταστρέφοντας τους αυτοδραστικούς κλώνους (124). Πολλοί ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα ανταποκρίθηκαν σε υψηλές δόσεις ανοσοθεραπείας και αυτόλογη μεταμόσχευση. Παραμένει να αποδειχθεί ότι τα γεγονότα αυτά δεν είναι τυχαία, ότι η ύφεση που επιτυγχάνεται είναι μεγάλης διάρκειας και ότι το όφελος είναι μεγαλύτερο σε σχέση με την προκαλούμενη τοξικότητα και θνησιμότητα (96, 124-126).

Αναγνώριση μιας ομοιότητας ανάμεσα στις εκδηλώσεις της χρόνιας απόρριψης του μοσχεύματος εναντίον του ξενιστή και μερικών αυτοάνοσων διαταραχών όπως το σκληρόδερμα, το σύνδρομο Sjogren ή η πρωτοπαθής χολική κίρρωση (ΠΧΚ) ενισχύουν την υπόθεση ότι τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα εμπλέκονται στην παθογένεια σοβαρών αυτοανόσων διαταραχών (127-129). Αυτά τα ευρήματα συνηγορούν στο γεγονός ότι μια νόσος που προκαλείται από διαταραγμένα αιμοποιητικά κύτταρα μπορεί να θεραπευθεί χορηγώντας αρχικά ανοσοκατασταλτικά και στη συνέχεια εκτελώντας μεταμόσχευση αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων.

Εμπειρία από μελέτες με ζώα υπάρχει σχετικά πρόσφατη (130). Τα πειραματικά μοντέλα δείχνουν ότι η μεταμόσχευση αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων μπορεί να θεραπεύσει νοσήματα ή να εμποδίσει την εξέλιξη γενετικά καθορισμένων νόσων. Τα περισσότερα πειραματικά δεδομένα με ζώα βασίζονται στην αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων (131-134). Υπάρχουν όμως και μερικά πειραματικά δεδομένα για την αυτόλογη μεταμόσχευση. Σημαντικής σπουδαιότητας ήταν παρατηρήσεις που έγιναν σε ποντίκια με αρθρίτιδα. Η αυτόλογη μεταμόσχευση βρέθηκε ότι μπορούσε να αναστρέψει την αρθρίτιδα και να προστατέψει από την επανεμφάνισή της (135). Μέχρι στιγμής τα πειραματικά δεδομένα σε ζώα μας βοήθησαν να κατανοήσουμε τους παθογενετικούς μηχανισμούς αλλά η ανάγκη για ολική ακτινοβολία σε μερικά αυτοάνοσα νοσήματα δεν έχει τεκμηριωθεί ακόμη με επαρκή κλινική εμπειρία (137).

**Πίνακας 4.** Ποσοστά υποτροπών μετά από θεραπεία πειραματικά αυτοάνοσων ασθενειών με μεταμόσχευση μυελού σε ποντίκια.

	<i>Υφεση</i>	<i>Υποτροπή</i>	<i>Υποτροπή μετά την επανανοσοποίηση</i>
<b><i>Αρθρίτιδα (135)</i></b>	<b><i>(TBI 9 Gy)</i></b>		
Αυτόλογη μεταμόσχευση	100%	2%	6%
Αλλογενής μεταμόσχευση	100%	0%	Δεν έγινε
<b><i>Πειραματική</i></b>	<b><i>αυτοάνοση</i></b>	<b><i>Εγκεφαλίτιδα (133)</i></b>	<b><i>(TBI 10 Gy)</i></b>
Αυτόλογη μεταμόσχευση	100%	30%	72%
Αλλογενής μεταμόσχευση	100%	5%	11%
<b><i>Πειραματική</i></b>	<b><i>αυτοάνοση</i></b>	<b><i>Μυασθένεια (136)</i></b>	<b><i>Cyclo + TBI 6 Gy</i></b>
Αυτόλογη μεταμόσχευση	100%	Μη προσδιορισθείσα	Μη προσδιορισθείσα

Παράλληλα έχει παρατηρηθεί ότι αυτοάνοσα νοσήματα όπως ψωρίαση, σακχαρώδης διαβήτης τύπου I και κοιλιοκάκη, μπορούν να μεταδοθούν μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων (138-140). Αντίθετα, σε μια άλλη περίπτωση παροδικός συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος με καλή έκβαση παρατηρήθηκε σε έναν δέκτη με λευχαιμία που έλαβε μυελό από τον αδελφό του που έπασχε από συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο (141). Εντούτοις, στην τελευταία αυτή περίπτωση ο δότης ήταν εκείνος που παρουσίασε έξαρση του νοσήματος. Βέβαια το κατά πόσο μια αυτοάνοση νόσος του δότη μπορεί να προκαλέσει αντίστοιχη νόσο στο δέκτη χρειάζεται να μελετηθεί πιο εκτενώς στο μέλλον.

Έχουν αναφερθεί πολλοί ασθενείς στους οποίους έγινε μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων για αιματολογικές κακοήθειες ή απλαστική αναιμία στους οποίους συνυπήρχαν αυτοάνοσα νοσήματα. Οι δημοσιεύσεις περιλαμβάνουν αυτόλογη και πιο συχνά αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων και καλύπτουν ευρύ φάσμα των αυτοάνοσων ασθενειών (Πίνακες 5 και 6). Έχουν παρατηρηθεί μακράς διάρκειας

απαντήσεις αλλά δεν είναι ακόμη σαφές το ποσοστό υποτροπών των αυτοάνοσων νοσημάτων.

**Πίνακας 5.** Εξέλιξη συνυπάρχουσας αυτοάνοσης ασθένειας με αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων.

<i>Ασθένεια για την οποία έγινε μεταμόσχευση</i>	<i>Αυτοάνοση ασθένεια που συνυπήρχε</i>	<i>Εξέλιξη αυτοάνοσου νοσήματος</i>	<i>Εξέλιξη ασθενή</i>	<i>Αναφορά</i>
ΣΑΑ	ΡΑ	Ύφεση	Θάνατος	Baldwin, 1997(157)
ΣΑΑ	ΡΑ	Ύφεση	Θάνατος	Baldwin, 1997(157)
ΣΑΑ	ΡΑ	Ύφεση	Θάνατος	Baldwin, 1997(157)
ΣΑΑ	ΡΑ	Ύφεση	Καλή	Baldwin, 1997(157)
ΣΑΑ	ΡΑ	Μερική ύφεση	Καλή	Jacobs, 1986 (158)
ΣΑΑ	ΡΑ	Ύφεση	Καλή	Lowenthal, 1993(179)
ΣΑΑ	ΡΑ	Ύφεση	Καλή	Lowenthal, 1993(179)
ΟΜΛ	Ψωρίαση	Ύφεση	Καλή	Eedy, 1990 (160)
ΧΜΛ	Ψωρίαση	Ύφεση	Καλή	Yin&Jowit 1992(161)
ΟΜΛ	Ελκώδης κολίτιδα	Ύφεση	Καλή	Yin&Jowit 1992(161)
ΟΛΛ	ΑΗ	Ύφεση	Καλή	Vento 1996 (162)
ΧΜΛ	Πολλαπλή σκλήρυνση	Ύφεση	Καλή	McAllister 1997(163)
Διάφορα	Υπερθυρεοειδισμός, Ινσουλινοεξαρτώμενος ΣΔ, ΣΕΛ, ΡΑ, νόσος Crohn, αγγειίτιδες, δερματίτιδα	Ύφεση	Καλή	Nelson 1997 (164)

ΣΑΑ=σοβαρή απλαστική αναιμία, ΟΜΛ=οξεία μυελογενής λευχαιμία, ΧΜΛ=χρόνια μυελογενής λευχαιμία, ΟΛΛ=οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, ΡΑ=ρευματοειδής αρθρίτιδα, ΣΕΛ=συστηματικός ερυθματώδης λύκος, ΑΗ=αυτοάνοση ηπατίτιδα

**Πίνακας 6.** Εξέλιξη συνυπάρχουσας αυτοάνοσης ασθένειας με αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων.

<i>Ασθένεια για την οποία έγινε μεταμόσχευση</i>	<i>Αυτοάνοση ασθένεια που συνυπήρχε</i>	<i>Εξέλιξη αυτοάνοσου νοσήματος</i>	<i>Εξέλιξη ασθενή</i>	<i>Αναφορά</i>
Non Hodgkin's Λέμφωμα	Μυασθένεια gravis	Ύφεση	Καλή	Salzmann 1994(165)
Καρκίνος ωοθηκών N.Hodgkin's	Μυασθένεια ΣΕΛ	Υποτροπή	Έζησε	Euler 1996(166)
N.Hodgkin's	Ατοπική δερματίτιδα	Υποτροπή	Έζησε	Euler 1996(166)
N.Hodgkin's	ΡΑ	Υποτροπή	Έζησε	Euler 1996(166)
N.Hodgkin's	ΣΕΛ	Ύφεση	Έζησε	Snowden1997(167)
ΧΜΛ	ΣΕΛ	Ύφεση	Έζησε	Meloni 1997(168)
N.Hodgkin's	ΡΑ	Ύφεση	Έζησε	Jondeau 1997(169)
N.Hodgkin's	ΡΑ	Υποτροπή	Έζησε	Cooley 1997(175)
N.Hodgkin's	Ψωρίαση	Υποτροπή	Έζησε	Cooley 1997(175)
ΟΜΛ	Ψωρίαση	Υποτροπή	Έζησε	Cooley 1997(175)
Πλασματοκυτταρική λευχαιμία	Ψωρίαση	Υποτροπή	Έζησε	Cooley 1997(175)

ΟΜΛ=οξεία μυελογενής λευχαιμία, ΧΜΛ=χρόνια μυελογενής λευχαιμία, ΡΑ=ρευματοειδής αρθρίτιδα, ΣΕΛ=συστηματικός ερυθρελάτης

Η εξαφάνιση των αυτοδραστικών κυττάρων έχει βρεθεί ότι είναι η οδηγός ιδέα της χρήσης υψηλών δόσεων ανοσοκατασταλτικών. Υπάρχουν όμως δεδομένα που δείχνουν ότι οι ασθενείς μπορεί να έχουν παρατεταμένη περίοδο λευκοπενίας, ιδιαίτερα CD4-πενίας μετά από μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων με CD34+ κύτταρα. Αυτή η περίοδος συσχετίζεται με υψηλή επιρρέπεια σε λοιμώξεις αλλά και με αντίδραση στη νόσο (142). Η χορήγηση υψηλών δόσεων ανοσοκατασταλτικών μπορεί να είναι αποτελεσματική στην εξαφάνιση κυτταρικών πληθυσμών που μεσολαβούν στην απορρύθμιση του ανοσολογικού συστήματος. Σπάζοντας αυτόν τον φαύλο κύκλο φυσιολογικοί μηχανισμοί του ανοσολογικού συστήματος επανακτούν τον έλεγχο μετά τη μεταμόσχευση (136, 137, 142).

Η εντατική χρήση υψηλών δόσεων ανοσοκατασταλτικών επιτρέπει την ανασυγκρότηση του ανοσολογικού συστήματος από την αρχή και την αποκατάσταση μέσω του θύμου, της ανοσολογικής ανοχής των T-κυττάρων που προέρχονται από τα εγχυόμενα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Η εύρεση μεγάλου αριθμού T-κυττάρων που διατηρούν ένα κυκλικό κομμάτι του DNA (TREC+ κύτταρα) και αντιπροσωπεύουν κύτταρα που πρόσφατα μετανάστευσαν από τον θύμο σε ασθενείς με μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων με CD34+ κύτταρα υποστηρίζει αυτή τη θεωρία (143, 144). Η μέτρηση των TREC+ κυττάρων δίνει μια ένδειξη της λειτουργίας του θύμου που έχει βρεθεί ότι υπολείπεται σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα πριν την μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Εντούτοις, η ανοσολογική ανασυγκρότηση των T-κυττάρων δεν είναι δυνατή ικανοποιητικά ενώ των B-κυττάρων έχει αποδειχθεί ότι πραγματοποιείται (142, 143). Περισσότερες έρευνες χρειάζονται να γίνουν για να βρεθεί εάν ένα διαταραγμένο ανοσολογικό σύστημα μπορεί να ξεκινήσει πάλι από την αρχή και εάν το ανοσολογικό σύστημα μπορεί να αποκατασταθεί.

Για να πραγματοποιηθεί η αυτόλογη μεταμόσχευση πραγματοποιείται κινητοποίηση και συλλογή των stem cells του περιφερικού αίματος με τη χρήση του αυξητικού παράγοντα της διέγερσης των κοκκιοκυττάρων μόνο του ή σε συνδυασμό με κυκλοφωσφαμίδη (145). Χρειάζεται όμως προσοχή καθώς η χρήση του αυξητικού παράγοντα μόνου του μπορεί να προκαλέσει έξαρση των αυτοάνοσων νοσημάτων όπως έχει ήδη αναφερθεί στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, στην πολλαπλή σκλήρυνση και σε μερικές περιπτώσεις συστηματικού ερυθρεματος ή σκληροδέρματος (146, 147). Η προσθήκη της κυκλοφωσφαμίδης είναι ενθαρρυντική γιατί μειώνει την πιθανότητα αυτών των εξάρσεων και μπορεί να οδηγήσει σε κλινική βελτίωση από μόνη της χωρίς να απαιτηθεί μεταμόσχευση μυελού (147-149). Η επιλογή των κυττάρων γίνεται χρησιμοποιώντας CD34+ κύτταρα με ή χωρίς απαλλαγή από τα λεμφοκύτταρα χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα κυρίως αντι-CD52, αντι-CD3, αντι-CD19 και αντι-CD20. Μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί αν η επιλογή των CD34+ κυττάρων υπερέχει σε σχέση με τα μη επιλεγμένα stem cells του μυελού ή του περιφερικού αίματος (150, 151). Η προετοιμασία (χημειοθεραπεία πριν τη μεταμόσχευση) περιλαμβάνει διάφορους συνδυασμούς κυκλοφωσφαμίδης (σε συνολική δόση 150 ή 200 mg/kg) μόνη

της ή σε συνδυασμό με ολική σωματική ακτινοβολία (TBI), ολική λεμφική ακτινοβολία (TLI), αντιθυμικές ανοσοσφαιρίνες ATG, CAMPATH 1, BEAM (carmustine, cytarabine, melphalan and etoposide or fludarabine), fludarabine μόνη της ή carmustine (BCNU) μόνη της (145).

Για τους ασθενείς που χρησιμοποιήθηκαν stem cells από το μυελό δεν χρειάστηκε κινητοποίηση. Η χρήση προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων του περιφερικού αίματος οδηγεί σε πιο γρήγορη αποκατάσταση των αιμοπεταλίων και των ουδετεροφίλων μετά την επανέγχυση κάνοντας την διαδικασία πιο ασφαλή (150-152). Αντιθέτως, η έγχυση αιμοποιητικών κυττάρων του περιφερικού αίματος συσχετίζεται με υψηλότερο αριθμό λεμφοκυττάρων σε σχέση με τα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού (146). Εντούτοις, καθώς τα T-κύτταρα θεωρούνται ότι παίζουν ρόλο στην εξέλιξη της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, η επανέγχυση αυτών των κυττάρων μπορεί να μειώνει το μακροχρόνιο όφελος σε σχέση με την έγχυση αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού. Εναλλακτική πηγή αιμοποιητικών κυττάρων είναι αυτά του μυελού αφού έχουν επεξεργαστεί με τον αυξητικό παράγοντα διέγερσης των κοκκιοκυττάρων, γεγονός που οδηγεί σε μικρότερη περίοδο κυτταροπενίας μετά την μεταμόσχευση (153).

Αποτυχία κινητοποίησης είναι γνωστή στην αυτόλογη μεταμόσχευση ενώ θάνατοι μετά από κινητοποίηση δεν έχουν δημοσιευθεί. Στη μελέτη των Tyndall και συνεργατών (154) υπήρχαν διάφορα προβλήματα που αντιμετωπίστηκαν κατά τη διάρκεια της κινητοποίησης των stem cells όπως: κάποιοι ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση είχαν σημάδια αναζωπύρωσης, κάποιοι ασθενείς με σκληρόδερμα είχαν θανατηφόρες λοιμώδεις επιπλοκές, πιθανόν λόγω ίνωσης των οργάνων και της μειωμένης καρδιακής λειτουργίας, ενώ σε κάποιους ασθενείς με νεανική αρθρίτιδα πραγματοποιήθηκε θανατηφόρος ενεργοποίηση των μακροφάγων (155, 156).

Συνοψίζοντας, μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων έχει γίνει μέχρι τώρα σε πολλούς ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ρευματοειδή αρθρίτιδα, συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, σκληρόδερμα, σύνδρομο Sjogren's, ψωρίαση, ελκώδη κολίτιδα, νόσο Crohn, αυτοάνοση ηπατίτιδα, υπερθυρεοειδισμό, αγγειίτιδα, μυασθένεια Gravis (136, 137, 157-170). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ασθενείς παρουσίαζαν ύφεση μεγάλης διάρκειας ή παροδική μετά από τη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Εντούτοις,



κάποιες υποτροπές εμφανίσθηκαν καθώς επίσης και επανεμφάνιση των χαρακτηριστικών για κάθε νόσο αντισωμάτων χωρίς επανεμφάνιση των αντίστοιχων κλινικών συνδρόμων (166). Παρακάτω αναλύεται διεξοδικότερα η υπάρχουσα γνώση από μεταμόσχευση μυελού των οστών σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, σκληρόδερμα, συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, νόσο Still και πολλαπλή σκλήρυνση.

#### **4.1. ΑΥΤΟΛΟΓΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΣΤΗ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ**

Οι Tyndall και συνεργάτες μελέτησαν 70 ασθενείς με ανθεκτική/σοβαρή ρευματοειδή αρθρίτιδα στους οποίους πραγματοποιήθηκε αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού (154). Ένας μόνο θάνατος αναφέρθηκε ανάμεσα στους 70 ασθενείς (ο ασθενής δεν ανήκε σε αυτούς που χρησιμοποίησαν σαν θεραπεία προετοιμασίας μόνο κυκλοφωσφαμίδη). Οι περισσότεροι ασθενείς ανταποκρίθηκαν με αποτελέσματα παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν μετά από θεραπεία με αντι-TNF-α. Εντούτοις, το 50% των ασθενών υποτροπίασε. Οι περισσότεροι από τους ασθενείς που υποτροπίασαν ανταποκρίθηκαν καλά σε μονοθεραπεία με ένα μόνο ανοσοκατασταλτικό φάρμακο (μεθοτρεξάτη ή κυκλοσπορίνη)-φάρμακα που είχαν αποτύχει πριν την μεταμόσχευση (154). Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών η κυκλοσπορίνη-A φαίνεται να διαδραματίζει ένα αρνητικό ρόλο στην ανασυγκρότηση των T-κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος μετά τη μεταμόσχευση καθώς και στη θυμική λειτουργία. Γι'αυτό το λόγο δεν συστήνεται ως πρώτη εκλογής ανοσοκατασταλτικό φάρμακο συντήρησης μετά τη μεταμόσχευση.

Επιπρόσθετα πρέπει να τονισθεί ότι ορισμένοι ασθενείς δεν προχώρησαν σε μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων αφού βρέθηκε ότι βελτιώθηκαν σημαντικά με τη χορήγηση υψηλών δόσεων (4g) κυκλοφωσφαμίδης σαν θεραπεία προετοιμασίας πριν τη μεταμόσχευση (171). Η θεραπεία μόνο με υψηλές δόσεις κυκλοφωσφαμίδης δεν εμπεριέχει το ρίσκο της επανέγχυσης των αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων στο μόσχευμα που μπορεί να προκαλεί την αποτυχία της αυτόλογης μεταμόσχευσης (171). Παρόλα αυτά, οι υψηλές δόσεις κυκλοφωσφαμίδης προκαλούν πολλές,

άλλοτε μικρής και άλλοτε μεγάλης διάρκειας παρενέργειες όπως για παράδειγμα εμφάνιση αιμορραγικής κυστίτιδας.

Αν και τα Τ λεμφοκύτταρα παίζουν ρόλο στην εξέλιξη της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, η απαλλαγή των Τ κυττάρων από τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα που χρησιμοποιούνται για την μεταμόσχευση μέσω της επιλογής των CD34+ κυττάρων δεν βρέθηκε να έχει περισσότερο ευνοϊκά αποτελέσματα σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 33 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα στην Αυστραλία (151) (Πίνακας 7).

**Πίνακας 7.** Ανεπιθύμητες ενέργειες κατά την διάρκεια της νοσηλείας στην ομάδα 33 ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα των Moore και συνεργατών μετά από μεταμόσχευση μυελού με CD34 επιλεγμένα κύτταρα και με μη επιλεγμένα κύτταρα.

<i>Ανεπιθύμητες ενέργειες</i>	<i>Μεταμόσχευση μυελού με μη επιλεγμένα κύτταρα (n=15)</i>	<i>Μεταμόσχευση μυελού με CD34 επιλεγμένα κύτταρα (n=18)</i>
Πυρετός(ι.ν. αντιβιοτικά)	14(93)	15(83)
Βλεννογονίτιδα	7(47)	7(39)
Διάρροια	8(53)	12(67)
Ναυτία/Εμετοι	7(47)	10(56)
Μυοσκελετικός Πόνος	11(73)	16(89)
Εξάνθημα	11(73)	8(44)
Κεφαλαλγία	10(67)	14(78)
Υπόταση	3(20)	4(22)
Αυξημένα ηπατικά ένζυμα	1(7)	2(11)
Αγχώδεις εκδηλώσεις	0(0)	5(28)

n= ο αριθμός των ασθενών που μελετήθηκαν

Οι Snowden και συνεργάτες (172) μελέτησαν 76 ασθενείς με σοβαρή ρευματοειδή αρθρίτιδα που υπέστησαν αυτόλογη μεταμόσχευση. Το 67% των ασθενών ανταποκρίθηκε σε κάποιο βαθμό μετά τη μεταμόσχευση. Οι περισσότεροι όμως ασθενείς ξανάρχισαν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα μέσα σε χρονικό διάστημα 6 μηνών είτε λόγω μη ανταπόκρισης είτε λόγω υποτροπής της νόσου (50% των αρχικά ανταποκριθέντων). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανταπόκριση συσχετιζονταν με οροαρνητική νόσο. Δεν

υπήρχε θνησιμότητα άμεσα συνδεδεμένη με τη μεταμόσχευση αν και ένας ασθενής πέθανε 5 μήνες μετά τη μεταμόσχευση λόγω λοίμωξης και μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Στον ασθενή αυτό είχε χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία προετοιμασίας busulfan και κυκλοφωσφαμίδη.

Παρόμοια αποτελέσματα με τους Snowden και συνεργάτες βρήκαν και οι Buft και συνεργάτες (173) σε μελέτη 4 ασθενών με σοβαρή ρευματοειδή αρθρίτιδα. Στη μελέτη αυτή μετά από την αυτόλογη μεταμόσχευση προγονικών κυττάρων υπήρξε σπουδαία κλινική ανταπόκριση και διατήρηση του οφέλους σε 2 ασθενείς (9 και 20 μήνες μετά τη θεραπεία, αντίστοιχα). Στη μελέτη των Snowden και συνεργατών (174) βρέθηκε ότι η δόση της κυκλοφωσφαμίδης μπορεί να σχετίζεται με την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Μελετήθηκαν 4 ασθενείς με σοβαρή, ενεργό, επίμονη ρευματοειδή αρθρίτιδα χρησιμοποιώντας 100 ή 200 mg/kg κυκλοφωσφαμίδης ακολουθούμενη από μεταμόσχευση αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων του περιφερικού αίματος. Βρέθηκε ότι με τη χρήση 200 mg/kg κυκλοφωσφαμίδης προκαλούνται ουσιώδεις κλινικές απαντήσεις ενώ με 100 mg/kg μόνο παροδική βελτίωση (174). Το δυνητικά ευεργετικό αποτέλεσμα της αυτόλογης μεταμόσχευσης προγονικών κυττάρων μυελού των οστών στη ρευματοειδή αρθρίτιδα ενισχύεται και από μια άλλη μελέτη όπου αυτόλογη μεταμόσχευση λόγω άλλου νοσήματος (αιματολογική κακοήθεια) σε ασθενή που έπασχε ταυτόχρονα από ρευματοειδή αρθρίτιδα και ψωρίαση οδήγησε σε πλήρη ύφεση των αυτοανόσων νοσημάτων μετά τη μεταμόσχευση (175). Μικρής διάρκειας ύφεση μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού έχει αναφερθεί σε κάποιες ακόμη περιπτώσεις ρευματοειδούς αρθρίτιδας (176-178). Το ίδιο (μικρή διάρκειας ύφεση) παρατηρήθηκε και στη μελέτη των Lowenthal και συνεργατών σε 3 ασθενείς με σοβαρή ρευματοειδή αρθρίτιδα (179). Τα θετικά αποτελέσματα κράτησαν λιγότερο από 4 εβδομάδες σε αντίθεση με 2 περιπτώσεις ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα στις οποίες μετά από ετερόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών τα αποτελέσματα είχαν μεγάλη διάρκεια (180).

**Πίνακας 8.** Δεδομένα αυτόλογης μεταμόσχευσης σε ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα.

Συγγραφέας	Έτος	n	Περιφερικό αίμα/ μυελός	Απαλλαγή από T-κύτταρα	Προετοιμασία	Αρχική βελτίωση	Μακροπρόθεσμα αποτελέσματα
Euler (166)	1996	1	Περιφερικό αίμα	Όχι	Busulfan, Κυκλοφωσφαμίδη, ετοποσιδη	Ναι	Επανεμφάνιση σε 5 εβδ.
Cooley (170)	1997	1	Περιφερικό αίμα	Όχι	BEAM	Ναι	Επανεμφάνιση σε 20 μήνες
Joske (176)	1997	1	Περιφερικό αίμα	Όχι	Κυκλοφωσφαμίδη, στεροειδή	Ναι	Ικανοποιητικά σε 6 μήνες
Burt (148)	1998	2	Περιφερικό αίμα	Ναι	Κυκλοφωσφαμίδη, ATG, στεροειδή	Ναι	1 καλά σε 12 μήνες, 1 άσχημα σε 3 μήνες
Durez (177-178)	1998	1	Περιφερικό αίμα	Ναι	Busulfan, Κυκλοφωσφαμίδη	Ναι	Πλήρης ύφεση σε 8 μήνες
Lowenthal (153)	1999	3	Περιφερικό αίμα/μυελό	Όχι	Κυκλοφωσφαμίδη	Ναι	Επανεμφάνιση σε όλους σε < 4 εβδομάδες

n= ο αριθμός των ασθενών που μελετήθηκαν

#### 4.2 ΑΥΤΟΛΟΓΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΣΤΟ ΣΚΛΗΡΟΔΕΡΜΑ

Οι ασθενείς με σκληρόδερμα ήταν από τους πρώτους στους οποίους πραγματοποιήθηκε μεταμόσχευση μυελού και μάλιστα με επιτυχία (181, 182). Εντούτοις, πολύ σύντομα παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με σκληρόδερμα παρουσίαζαν συγκεκριμένα προβλήματα κατά τη διάρκεια της κινητοποίησης καθώς και κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας πριν τη μεταμόσχευση με υψηλό ποσοστό θνησιμότητας κατά τη διάρκεια της διαδικασίας που μπορεί να υπερβαίνει το 10% (183). Πράγματι, οι Binks και συνεργάτες (183) σε μελέτη 41 ασθενών με σοβαρό σκληρόδερμα που υπέστησαν αυτόλογη μεταμόσχευση και παρακολουθήθηκαν για τουλάχιστον 3 μήνες μετά τη μεταμόσχευση βρήκαν ότι επτά ασθενείς πέθαναν σαν αποτέλεσμα της διαδικασίας (σχετιζόμενη με τη μεταμόσχευση θνησιμότητα: 17%). Η θνησιμότητα μειώθηκε στο 12,5% όταν προστέθηκαν 24 ακόμη ασθενείς γεγονός που υποδεικνύει ότι είναι απαραίτητη μια καλύτερη επιλογή των

ασθενών που είναι υποψήφιοι για μεταμόσχευση. Διάφοροι τύποι τοξικότητας παρατηρήθηκαν όπως παρενέργειες από την καρδιά λόγω των υψηλών δόσεων κυκλοφωσφαμίδης καθώς και πνευμονίτιδα λόγω της ακτινοβολίας. Ασθενείς με μέση πνευμονική αρτηριακή πίεση >50 mm Hg είτε δεν ανταποκρίθηκαν είτε δεν επέζησαν το stress του ουδετεροπενικού πυρετού και το σοκ κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Το 76% των ασθενών είχαν πνευμονική συμμετοχή με <70% FVC στο 50%, 7/41 είχαν πνευμονική υπέρταση, 37/41 είχαν σύνδρομο Raynaud, 21/41 οισοφαγική και 4/41 νεφρική συμμετοχή. Όλοι εκτός από έναν είχαν αιμοποιητικά κύτταρα του περιφερικού αίματος μετά από κινητοποίηση με τον αυξητικό παράγοντα των κοκκιοκυτάρων. Η χημειοθεραπεία που χρησιμοποιήθηκε πριν τη μεταμόσχευση στην πλειοψηφία των ασθενών (86%) ήταν κυκλοφωσφαμίδα ± ATG ± TBI. Παρατεταμένη βελτίωση στην κατάσταση του δέρματος παρατηρήθηκε στο 70% των ασθενών, ενώ η λειτουργία των πνευμόνων καθώς και η πνευμονική υπέρταση σταθεροποιήθηκαν. Επιδείνωση της νόσου αναφέρθηκε στο 19% ενώ 3 ασθενείς πέθαναν λόγω αυτής της επιδείνωσης ανεξάρτητα από τη διαδικασία.

Πρόσφατα οι Farge και συνεργάτες (145) ανέλυσαν τα δεδομένα 57 ασθενών με σκληρόδερμα στους οποίους έγινε αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού (χρόνος παρακολούθησης μετά τη μεταμόσχευση: τουλάχιστον 6 μήνες). Η μελέτη αυτή στην ουσία περιγράφει τη μακροχρόνια έκβαση των ασθενών με σκληρόδερμα που υπέστησαν αυτόλογη μεταμόσχευση και έχουν κατοχυρωθεί στη βάση δεδομένων της EBMT (European Bone Marrow Transplantation) και EULAR (European League Against Rheumatism). Στους περισσότερους ασθενείς χρησιμοποιήθηκαν αιμοποιητικά κύτταρα του περιφερικού αίματος με επιλογή των CD34+ κυτάρων. Σημαντική βελτίωση του δέρματος παρατηρήθηκε στο 73% των ασθενών. Η πνευμονική και η νεφρική λειτουργία σταθεροποιήθηκαν. Η νόσος επιδεινώθηκε σε ένα ποσοστό 14%, ενώ το ποσοστό θνησιμότητας το σχετιζόμενο με την μεταμόσχευση ήταν 8,7%. Αυτή η μακροχρόνια (μέχρι 3 χρόνια μετά) ανάλυση έδειξε για πρώτη φορά μια συνολική ή έστω μερική ύφεση του νοσήματος σχεδόν στα 2/3 των ασθενών με σκληρόδερμα στους οποίους πραγματοποιήθηκε αυτόλογη μεταμόσχευση. Ακόμη και κάποιοι ασθενείς με δραστηριότητα της νόσου μετά τη μεταμόσχευση είχαν κάποια βελτίωση σε σχέση με πριν.

Μια συστηματική ανασκόπηση των δημοσιευμένων περιπτώσεων ασθενών με σοβαρά αυτοάνοσα νοσήματα που υπέστησαν αυτόλογη μεταμόσχευση δημοσιεύθηκε από τους Tyndall και Matucci-Cerinic (184). Στη βάση δεδομένων καταγράφηκαν 650 ασθενείς με σοβαρά αυτοάνοσα νοσήματα διεθνώς, από τους οποίους περισσότεροι από 100 είχαν σκληρόδερμα. Περίπου 70% των ασθενών ανταποκρίθηκαν με σημαντική (>25%) βελτίωση του δέρματος και σταθεροποίηση των οργάνων που ήταν επηρεασμένα. Περίπου στο 1/3 των ασθενών υπήρχε μεγάλης διάρκειας ύφεση της νόσου, ενώ η θνησιμότητα που σχετίστηκε με την θεραπεία ήταν 8.5% (184).

Μικρότερες σε αριθμό ασθενών, μελέτες κατέληξαν σε παρόμοια συμπεράσματα. Για παράδειγμα, οι Οι Mc Sweeney και συνεργάτες (185) ανέλυσαν 19 ασθενείς με σκληρόδερμα. Η χημειοθεραπεία πριν τη μεταμόσχευση περιελάμβανε TBI, κυκλοφωσφαμίδη και ATG. Στους ασθενείς έγινε επιλογή των CD34+ κυττάρων. Η μέση παρακολούθηση μετά τη μεταμόσχευση ήταν 15 μήνες. Το ποσοστό επιβίωσης για τα επόμενα 2 χρόνια ήταν 79%. Τρεις ασθενείς (15.7%) πέθαναν λόγω επιπλοκών της θεραπείας και ένας λόγω προόδου της νόσου. Σημαντικά θετικό αποτέλεσμα παρατηρήθηκε στους 12 ασθενείς όπως εκτιμήθηκε ένα χρόνο μετά τη μεταμόσχευση. Οι Farge και συνεργάτες (186) ανέλυσαν τα αποτελέσματα της αυτόλογης μεταμόσχευσης μυελού σε 11 ασθενείς με ανθεκτικό σκληρόδερμα. Μετά από 18 μήνες παρακολούθησης βρέθηκε ότι οι 8 από τους 11 ασθενείς είχαν ακόμη ολική ή μερική ανταπόκριση στη θεραπεία, ενώ υπήρξε ένας θάνατος κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

Τέλος, οι Martini και συνεργάτες (187) μελέτησαν ένα κορίτσι 12 χρονών με σκληρόδεμα και εξελισσόμενη πνευμονική συμμετοχή. Πραγματοποιήθηκε αυτόλογη μεταμόσχευση και η ασθενής παρουσίασε σημαντική βελτίωση στο δέρμα, στη δύσπνοια και στη γενικότερη κατάσταση που κράτησε 2 χρόνια μετά τη θεραπεία.

### 4.3. ΑΥΤΟΛΟΓΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗ ΛΥΚΟ

Ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος είναι μια πάθηση που προσβάλλει πολλά όργανα και ιδιαίτερα το δέρμα και τα αγγεία (188). Η δραστηριότητα της νόσου συχνά σχετίζεται με αύξηση στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων, κυρίως έναντι διπλής έλικας DNA (αντι-dsDNA) και μείωση των επιπέδων του συμπληρώματος. Η θεραπεία για το συστηματικό ερυθματώδη λύκο εξατομικεύεται αλλά όταν υπάρχει προσβολή σημαντικών οργάνων όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα ή των νεφρών τότε απαιτείται ισχυρή ανοσοκατασταλτική αγωγή (π.χ. κυκλοφωσφαμίδη, κ.α.). Η ανταπόκριση στη μεταμόσχευση μυελού των οστών σε ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο που έγινε λόγω συνυπάρχουσας αιματολογικής κακοήθειας (167, 168, 189) αποτέλεσε τη βάση για περαιτέρω ανάπτυξη της ιδέας αυτόλογης μεταμόσχευσης σαν βασική θεραπεία τουλάχιστον για τις περιπτώσεις ασθενών με ανθεκτική μορφή της νόσου. Στις περιπτώσεις αυτές (167, 168, 189) ένας ασθενής με non-Hodgkin λέμφωμα και συστηματικό ερυθματώδη λύκο είχε υποτροπή του λύκου ένα χρόνο μετά τη μεταμόσχευση παρά την συνεχή ύφεση του λεμφώματος, ενώ ένας με χρόνια μυελογενή λευχαιμία και ένας με λέμφωμα Hodgkin παρέμειναν σε συνεχή ύφεση μετά τη μεταμόσχευση και για τα δύο νοσήματα (συστηματικός ερυθματώδης λύκος και αιματολογική κακοήθεια) μετά από παρακολούθηση 30 και 34 μηνών, αντίστοιχα.

Οι Jayne και συνεργάτες (190) ανέλυσαν τα δεδομένα 53 ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο στους οποίους πραγματοποιήθηκε αυτόλογη μεταμόσχευση σε 12 διαφορετικές χώρες της Ευρώπης και της Ασίας. Τα αιμοποιητικά κύτταρα του περιφερικού αίματος κινητοποιήθηκαν με τον αυξητικό παράγοντα των κοκκιοκυττάρων και στη συνέχεια χορηγήθηκε κυκλοφωσφαμίδη. Στις μισές περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν εκλεκτικά CD34+ κύτταρα. Η θεραπεία σταθεροποίησης περιελάμβανε κυκλοφωσφαμίδη, ATG και λεμφική ακτινοβολία. Η μέση διάρκεια παρακολούθησης μετά από τη μεταμόσχευση ήταν 26 μήνες. Ύφεση στη δραστηριότητα της νόσου παρατηρήθηκε στους 33/50 ασθενείς (66%). Από τους 33 ασθενείς που παρουσίασαν ύφεση το ένα τρίτο υποτροπίασε μέσα σε 6 μήνες. Η υποτροπή

συσχετίστηκε με αρνητικά αντι-dsDNA πριν τη μεταμόσχευση. Υπήρχαν 12 θάνατοι μετά από 1.5 μήνα από τους οποίους οι 7 (12%) σχετίζονταν με τη διαδικασία της μεταμόσχευσης γεγονός που έδειξε ότι αν και επιτεύχθηκε ύφεση στα 2/3 των ασθενών, το ποσοστό θνησιμότητας ήταν υψηλό.

**Πίνακας 9.** Αποτελέσματα αυτόλογης μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων στον συστηματικό ερυθματώδη λύκο.

<i>Συγγραφέας, έτος</i>	<i>n</i>	<i>Προετοιμασία</i>	<i>Αποτέλεσμα</i>
Wulfraat et al, 2001	2	CYC, ATG, TBI	12-15 μήνες follow up: ύφεση, χωρίς IS
Traynor et al, 2000	7	CYC, ATG	12-40 μήνες follow up: ύφεση, χωρίς IS
Rosen et al, 2000	3	CYC, ATG	10-21 μήνες follow up: ύφεση, μείωση στεροειδών
Trysberg et al, 2000	1	CYC, TBI	18 μήνες follow up: βελτίωση
Fouillard et al, 1999	1	BEAM	9 μήνες follow up: ύφεση, μείωση στεροειδών
Burt et al, 1998	2	CYC, ATG	12 μήνες follow up: βελτίωση, 1 χωρίς IS, 1 μείωση στεροειδών
Musso et al, 1998	1	CYC, ATG	8 μήνες follow up: ύφεση, χωρίς IS
Burt et al, 1997	1	CYC, ATG	6 μήνες follow up: ύφεση, μείωση στεροειδών
Marmont et al, 1997	1	CYC, TT	7 μήνες follow up: ύφεση, μείωση στεροειδών

n= ο αριθμός των ασθενών που μελετήθηκαν, CYC=κυκλοφωσφαμίδη, ATG=αντιθυμικές ανοσοσφαιρίνες, TBI=ολική σωματική ακτινοβολία, IS=ανοσοκατασταλτικά, BEAM=χημειοθεραπεία με carmustine, etoposide, cytarabine και melphalan, TT=thiotepa

Παρόμοια αποτελέσματα με τους Jayne και συνεργάτες έδειξαν μικρότερες σειρές ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο οι οποίοι υποβλήθηκαν σε αυτόλογη μεταμόσχευση. Για παράδειγμα, οι Marmont και συνεργάτες (191) ήταν οι πρώτοι που έκαναν αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού σε μια γυναίκα 46 ετών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο η οποία δεν έπασχε από αιματολογική διαταραχή. Η ασθενής παρουσίασε κλινική και ανοσολογική ύφεση με αρνητικοποίηση των αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA). Επιπρόσθετα, οι ίδιοι ερευνητές (192) μελέτησαν 22 ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο που υποβλήθηκαν σε αυτόλογη



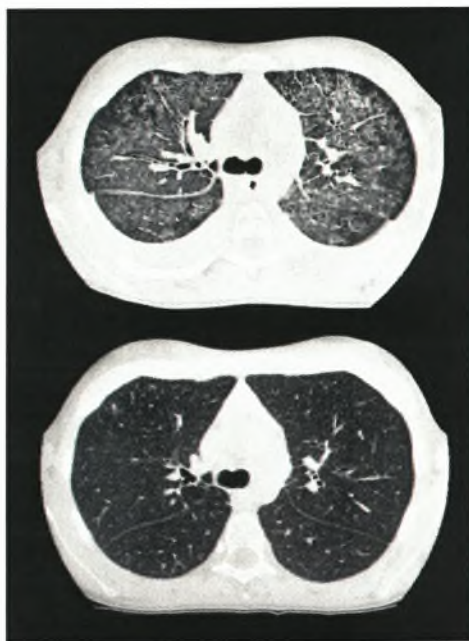
μεταμόσχευση. Ο μυελός των οστών χρησιμοποιήθηκε σαν πηγή αιμοποιητικών κυττάρων στο 27% των ασθενών ενώ το περιφερικό αίμα στο 73%. Η κινητοποίηση έγινε με τη χρήση κυκλοφωσφαμίδης. Η χημειοθεραπεία πριν τη μεταμόσχευση περιελάμβανε κυκλοφωσφαμίδα ± ATG, BEAM, μεθυλπρεδνιζολόνη, VP-melphalan, TBI. Τέσσερις ασθενείς απεβίωσαν λόγω της διαδικασίας της μεταμόσχευσης (18.1%). Δεκαεπτά ασθενείς παρακολουθήθηκαν. Οι 5 από αυτούς είναι τώρα σε ύφεση (30%), οι 4 χρειάζονται την ίδια θεραπεία με πριν (25%), ενώ οι υπόλοιποι (47%) χρειάστηκαν νέα ανοσοκατασταλτικά σε συνδυασμό με κορτικοστεροειδή. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν μια συνολική επιβίωση 82%. Το ποσοστό θνησιμότητας είναι όμως υψηλό δείχνοντας πόσο σημαντική είναι η προσεκτική επιλογή των ασθενών.

Οι Traynor και συνεργάτες (193) σε μελέτη 9 ασθενών με ανθεκτικό συστηματικό ερυθματώδη λύκο, ανέφεραν ένα θάνατο λόγω κινητοποίησης, ένα θάνατο λόγω επιδείνωσης της νόσου 3 μήνες μετά την κινητοποίηση, ενώ οι υπόλοιποι 7 ασθενείς ήταν σε ύφεση μετά από παρακολούθηση 25 μηνών. Το πρωτόκολλο αφορούσε κινητοποίηση με κυκλοφωσφαμίδα και αυξητικό παράγοντα των κοκκιοκυττάρων και χημειοθεραπεία πριν τη μεταμόσχευση με κυκλοφωσφαμίδα, ATG και μεθυλπρεδνιζολόνη. Οι ίδιοι ερευνητές (194) μετά από 5 έτη εμπειρίας στο θέμα ανέλυσαν 15 ασθενείς με σοβαρό/ανθεκτικό συστηματικό ερυθματώδη λύκο στους οποίους έγινε μεταμόσχευση. Τα αιμοποιητικά κύτταρα κινητοποιήθηκαν με κυκλοφωσφαμίδα και αυξητικό παράγοντα των κοκκιοκυττάρων. Έγινε στη συνέχεια επιλογή των CD34+ κυττάρων, ενώ ως χημειοθεραπεία πριν τη μεταμόσχευση χρησιμοποιήθηκε κυκλοφωσφαμίδα, ATG και μεθυλπρεδνιζολόνη.

Δεν παρατηρήθηκαν θάνατοι μετά τη θεραπεία. Ο μέσος χρόνος παρακολούθησης μετά την μεταμόσχευση ήταν 36 μήνες. Όλοι οι ασθενείς έδειξαν βελτίωση. Τα επίπεδα του συμπληρώματος ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων ενώ τα αντι-dsDNA αντισώματα ήταν αρνητικά. Από τους 12 ασθενείς που παρακολουθήθηκαν για περισσότερο από 1 χρόνο μετά τη μεταμόσχευση οι 10 διέκοψαν τη θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά και η δόση της πρεδνιζόνης μειώθηκε. Μόνο 2 έδειξαν επανενεργοποίηση της νόσου από τους οποίους ο ένας ανταποκρίθηκε σε κυκλοφωσφαμίδα που προηγουμένως ήταν αναποτελεσματική και στη συνέχεια δεν χρειάστηκε θεραπεία με

ανοσοκατασταλτικά. Στην τελευταία επίσκεψη κατά την διάρκεια της παρακολούθησης 8 ασθενείς δεν ελάμβαναν ανοσοκατασταλτικά, ένας ελάμβανε ενδοφλέβια κυκλοφωσφαμίδη και 6 ελάμβαναν πρεδνιζόνη.

Ενισχυτικά του σημαντικού ρόλου της μεταμόσχευσης στην αντιμετώπιση σοβαρών/ανθεκτικών μορφών συστηματικού ερυθματώδους λύκου είναι και τα ευρήματα από μεμονωμένες περιπτώσεις ασθενών (93, 195). Η αυτόλογη μεταμόσχευση που πραγματοποιήθηκε στην πρώτη περίπτωση είχε σαν αποτέλεσμα να ανέβουν σε φυσιολογικά επίπεδα τα CD34+ κύτταρα και τα αποπτωτικά CD34+/Fas+ κύτταρα και να αποκατασταθεί η διαταραγμένη λειτουργία των στρωματικών κυττάρων (93), ενώ στη δεύτερη περίπτωση, μια γυναίκα 18 ετών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο που είχε αντιμετωπιστεί με κορτικοστεροειδή, αζαθειοπρίνη, κυκλοφωσφαμίδη για 4 χρόνια κατά τη διάρκεια των οποίων χρειάστηκε επανειλημμένα μηχανική υποστήριξη για πνευμονίτιδα λόγω της νόσου, η αναγέννηση του αιμοποιητικού συστήματος πραγματοποιήθηκε σε 9 ημέρες. Εικοσι ένα μήνες μετά την αυτόλογη μεταμόσχευση η ασθενής εξακολουθεί να βρίσκεται σε πλήρη ύφεση (195).



**Εικόνα 5.** Αξονική τομογραφία θώρακος ασθενούς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο πριν (πάνω) και μετά (κάτω) την αυτόλογη μεταμόσχευση των αιμοποιητικών κυττάρων. Τα σημάδια της πνευμονίτιδος στην απεικόνιση που έγινε πριν την αυτόλογη μεταμόσχευση λείπουν στην απεικόνιση μετά την αυτόλογη μεταμόσχευση (Από το: Autologous blood stem cell transplantation in refractory systemic lupus erythematosus with severe pulmonary impairment: a case report. *Arthritis Rheum*, 2002; 46, σελίδα 1581).

#### 4.4. ΑΥΤΟΛΟΓΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΣΤΗ ΝΕΑΝΙΚΗ ΙΔΙΟΠΑΘΗ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

Η νεανική ιδιοπαθής αρθρίτιδα μπορεί να αποτελέσει ένα βασικό κλινικό πρόβλημα στην σοβαρή ανθεκτική μορφή της νόσου που απαιτεί τότε επιθετική θεραπεία (196). Οι περισσότερες περιπτώσεις αυτόλογης μεταμόσχευσης για νεανική ιδιοπαθή αρθρίτιδα αφορούν την κλασική ή συστηματική πολυαρθρική μορφή της νόσου (νόσος Still) (155). Πράγματι, η πρώτη εμπειρία από μεταμόσχευση σε παιδιά δημοσιεύθηκε από τους Wulffraat και συνεργάτες (155). Μελετήθηκαν 3 παιδιά με συστηματική νεανική χρόνια αρθρίτιδα και 1 με πολυαρθρική νεανική χρόνια αρθρίτιδα. Χρησιμοποιήθηκε ως χημειοθεραπεία πριν τη μεταμόσχευση κυκλοφωσφαμίδη, ATG και μικρές δόσεις TBI. Οι ασθενείς έδειξαν σημαντική βελτίωση χωρίς να χρειάζεται θεραπεία με φάρμακα για 6-18 μήνες μετά την αυτόλογη μεταμόσχευση με σημαντική μείωση στη φλεγμονή των αρθρώσεων και την πρωινή δυσκαμψία. Μέσα σε 6 εβδομάδες η TKE, CRP και η αιμοσφαιρίνη επανήλθαν σε φυσιολογικές τιμές. Δύο ασθενείς εντούτοις, παρουσίασαν έρπη ζωστήρα που αντιμετωπίστηκε με ακυκλοβίρη.

Μετέπειτα, σε μια άλλη μελέτη από την ίδια ερευνητική ομάδα (197) παρακολουθήθηκαν 18 ασθενείς μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση για χρονικό διάστημα 8 έως 58 μηνών (μέσος όρος 24 μήνες). Η χημειοθεραπεία πριν τη μεταμόσχευση περιελάμβανε κυκλοφωσφαμίδη, TBI και ATG. Οι 15 ασθενείς είχαν συστηματική νεανική ιδιοπαθή αρθρίτιδα και οι 3 πολυαρθρική μορφή νεανικής ιδιοπαθούς αρθρίτιδας. Οκτώ από τα παιδιά αυτά (44.4%) δεν χρειάστηκαν καθόλου φάρμακα μετά τη μεταμόσχευση για το χρονικό διάστημα που παρακολουθήθηκαν. Σε 4 παιδιά υπήρχε μερική ανταπόκριση με 30% βελτίωση της νόσου. Τέσσερις ασθενείς (22.2%) παρουσίασαν πλήρη υποτροπή 3-8 μήνες μετά τη μεταμόσχευση και ξεκίνησαν θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Οι υπόλοιποι 7 παρουσίασαν βελτίωση περισσότερο από 50%. Εντούτοις, παρατηρήθηκαν 2 θάνατοι λόγω του συνδρόμου ενεργοποίησης των μακροφάγων (197). Το σύνδρομο αυτό συσχετίστηκε με κάποια λοίμωξη ή με μη ελεγχόμενη συστηματική δραστηριότητα της νόσου τη στιγμή της μεταμόσχευσης, αν και τα πρωτόκολλα λαμβάνουν συνήθως υπόψη τον έλεγχο της συστηματικής

ενεργότητας της νόσου πριν τη μεταμόσχευση με τη χορήγηση μεθυλπρεδνιζολόνης ενδοφλεβίως.

Η ίδια ομάδα δημοσίευσε πρόσφατα τα αποτελέσματα σε 34 παιδιά με ανθεκτική νεανική ιδιοπαθή αρθρίτιδα που υπέστησαν μεταμόσχευση και παρακολούθηθηκαν για 12-48 μήνες. Πλήρη ύφεση χωρίς την ανάγκη χορήγησης φαρμάκων μετά τη μεταμόσχευση παρατηρήθηκε στα 18 από τα 34 παιδιά (53%). Σε επτά από τα παιδιά αυτά είχε προηγουμένως αποτύχει η θεραπεία με χορήγηση αντι-TNFα. Σε 6 από τα 34 παιδιά (17.6%) υπήρχε μερική ύφεση, ενώ 7 (20.6%) δεν ανταποκρίθηκαν. Επιπλοκές με λοιμώξεις παρατηρήθηκαν συχνά. Υπήρχαν 3 θάνατοι σπου σχετίζονταν με τη μεταμόσχευση (9%) (198).

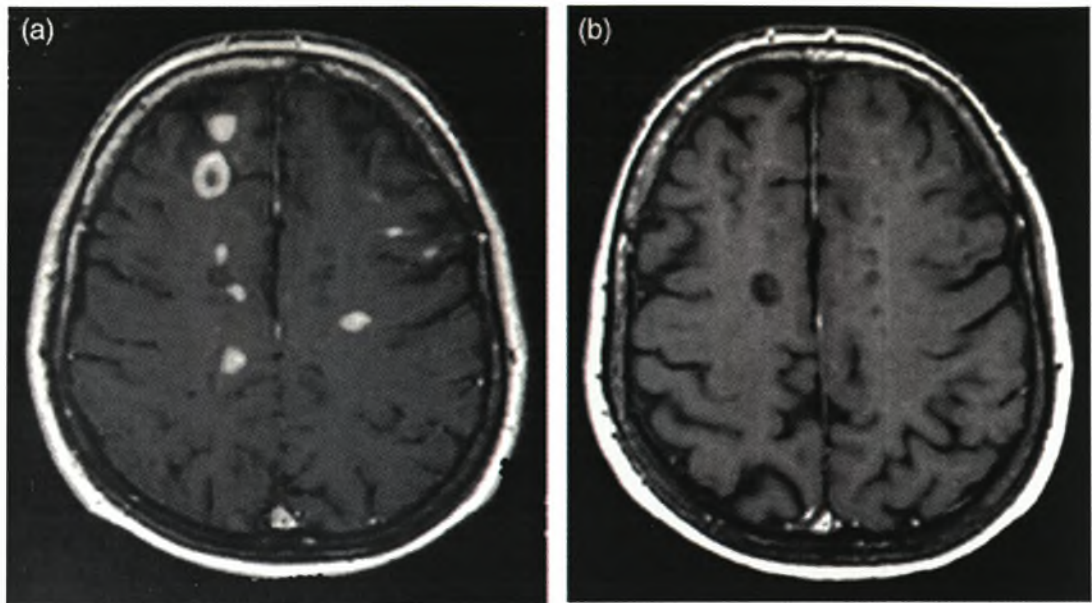
#### **4.5. ΑΥΤΟΛΟΓΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΣΤΗΝ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ**

Η θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά είναι η κύρια θεραπεία για ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση, την πιο συχνή νευρολογική αυτοάνοση νόσο. Στοιχεία της μυελίνης είναι ο στόχος των T-κυττάρων, ενώ τα μακροφάγα και άλλα φλεγμονώδη κύτταρα αποτελούν την παθογενετική βάση για την εκδήλωση της νευρολογικής συνδρομής κλινικά και την απομυελίνωση (199). Η πορεία της νόσου ποικίλλει από καλοήγη (10%) σε σχετικά κακοήγη (1-3%). Η πολλαπλή σκλήρυνση αποτελεί μια υποτροπιάζουσα νόσο (80%) που χαρακτηρίζεται από μία «δευτεροπαθή» προοδευτική φάση λίγα χρόνια αργότερα. Πράγματι περίπου το 1/5 των ασθενών παρουσιάζουν προοδευτικά εξελισσόμενη νόσο (200, 201). Η πολλαπλή σκλήρυνση επηρεάζει την ποιότητα ζωής των ασθενών και σχετίζεται με υψηλό ποσοστό θνησιμότητας (202). Πειραματικά δεδομένα σε ζώα έδειξαν ότι και η ετερόλογη και η αυτόλογη μεταμόσχευση μπορούν να έχουν σαν αποτέλεσμα την ύφεση και/ή θεραπεία του νοσήματος (203, 204).

Διάφορες δημοσιεύσεις έχουν επιβεβαιώσει ότι είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί παρατεταμένη ύφεση της νόσου με αυτόλογη μεταμόσχευση σε επιλεγμένες περιπτώσεις. Δύο αρχικές μελέτες έχουν αναδείξει το ρόλο της αυτόλογης μεταμόσχευσης χρησιμοποιώντας πολυχημειοθεραπεία BEAM ή TBI (205, 206). Σήμερα, δεδομένα σε σημαντικό αριθμό ασθενών δείχνουν ότι

η μεταμόσχευση μυελού μπορεί να «σταθεροποιήσει» την πολλαπλή σκλήρυνση περισσότερο από κάθε άλλη διαθέσιμη θεραπεία (207). Είναι γεγονός ότι υπάρχουν δεδομένα από μια πρόσφατη μελέτη βασισμένη σε 85 ασθενείς ηλικίας 20-58 ετών με προοδευτικά εξελισσόμενη πολλαπλή σκλήρυνση που αντιμετωπίστηκαν σε 20 κέντρα (207). Δεκαενέα ασθενείς υπέφεραν από πρωτοπαθή εξελισσόμενη σκλήρυνση, 13 από υποτροπιάζουσα εξελισσόμενη και 48 από δευτεροπαθή εξελισσόμενη. Η πηγή των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων ήταν ο μυελός των οστών σε 6 και το περιφερικό αίμα σε 79 ασθενείς. Η κινητοποίηση έγινε με κυκλοφωσφαμίδη και αυξητικό παράγοντα των κοκκιοκυττάρων. Η χημειοθεραπεία πριν τη μεταμόσχευση περιελάμβανε BEAM±ATG, κυκλοφωσφαμίδη ± ATG ± TBI και κυκλοφωσφαμίδη ± ATG και busulfan. Επιβεβαιωμένη επιβίωση χωρίς πρόοδο της νόσου παρατηρήθηκε στο 74% των ασθενών σε 3 χρόνια. Νευρολογική επιδείνωση παρατηρήθηκε σε 21 ασθενείς κατά τη διάρκεια της μεταμόσχευσης. Στους περισσότερους ήταν παροδική, αλλά δύο ασθενείς πέθαναν. Συνολικά υπήρχαν επτά θάνατοι, πέντε λόγω τοξικότητας και λοιμωδών επιπλοκών και δύο λόγω προόδου της νόσου. Η θνησιμότητα που σχετίστηκε με τη διαδικασία της μεταμόσχευσης στη διάρκεια 3 χρόνων ήταν 8%. Η νευρολογική επιδείνωση που παρατηρήθηκε σε ορισμένους ασθενείς κατά τη διάρκεια της κινητοποίησης δεν είναι γνωστό αν οφείλεται σε άμεση επίδραση του αυξητικού παράγοντα των κοκκιοκυττάρων ή σε έμμεση επίδραση της απελευθέρωσης κυτταροκινών (147, 208, 209).

Αρκετά σημαντικά είναι επίσης και τα ευρήματα από μελέτες με μικρό αριθμό ασθενών όπως μιας ιταλικής πολυκεντρικής μελέτης στην οποία όλοι εκτός από έναν μεταξύ δέκα ασθενών που μελετήθηκαν, παρουσίασαν βελτίωση (210), ενώ στη σειρά των Buft και συνεργατών (148) και οι 6 από το συνολικό αριθμό 10 ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα που είχαν πολλαπλή σκλήρυνση, βελτιώθηκαν ή σταθεροποιήθηκαν μετά από παρακολούθηση 5-17 μηνών μετά από την αυτόλογη μεταμόσχευση.



**Εικόνα 6.** Πρόκειται για T1 εικόνες εγκεφάλου μαγνητικού συντονισμού σε έναν ασθενή με πολλαπλή σκλήρυνση. Οι φλεγμονώδεις αλλοιώσεις στην εικόνα a που υπήρχαν πριν την μεταμόσχευση των αιμοποιητικών κυττάρων λείπουν από την εικόνα b που αντιστοιχεί σε ένα μήνα μετά την μεταμόσχευση. Εντούτοις η περιοχή της απομυελίνωσης και ατροφίας (“μαύρη τρύπα”) παραμένει (Από το: Haematopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune disease: results from I/II studies, prospective randomized trials and future directions. *Clinical and experimental immunology* 2005; 141, σελίδα 4).

## 5. ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

### 5.1. ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ (ΑΗ)

Η ΑΗ αποτελεί σπάνια χρόνια νεκροφλεγμονώδη ηπατική νόσο αγνώστου αιτιολογίας με επιπολασμό στην Βόρεια Ευρώπη 160-170 ασθενείς/1.000.000 που παρουσιάζει μεγάλη τάση ανόδου τα τελευταία χρόνια (211, 212). Η διάγνωσή της στηρίζεται σε ένα σύνολο κλινικών και εργαστηριακών κριτηρίων όπως αυτά ορίστηκαν το 1993 και τροποποιήθηκαν το 1998 από τη διεθνή ομάδα μελέτης της ΑΗ. Η νόσος χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια, συνδυάζεται με την παρουσία διάφορων αυτοαντισωμάτων και σημαντικού βαθμού υπεργαμμασφαιριναιμία, συσχετίζεται με τα HLA DR3 ή DR4 και ανταποκρίνεται συνήθως στη θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (213-215). Η νόσος προσβάλλει συνήθως κορίτσια (5-20 ετών) αλλά και γυναίκες νεαρής και μέσης (30-50 ετών) ηλικίας (αναλογία ανδρών προς γυναίκες είναι περίπου 1:4) (216). Μπορεί όμως να προσβάλλει και άνδρες και μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία. Σήμερα είναι πλέον σαφές ότι η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών είναι μεταξύ 50 και 70 ετών (217-223).

Κλινικά η ΑΗ μπορεί να εκδηλωθεί στο 60% των περιπτώσεων με μη ειδικά-γενικά συμπτώματα όπως και οι χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες (κακουχία, ανορεξία, απώλεια βάρους, αρθραλγίες, μυαλγίες καθώς και αίσθημα αδυναμίας και εύκολης κόπωσης). Στο 10% υπάρχει μετρίου βαθμού πυρετική κίνηση (μέχρι 38°C). Στην κλινική εξέταση συνήθως διαπιστώνεται υπερτρίχωση, σταγονοειδής ακμή, πολλαπλές τηλεαγγειεκτασίες και ηπατοσπληνομεγαλία. Αμηνόρροια και ίκτερος μπορεί επίσης να συνυπάρχουν. Στο 30% των περιπτώσεων η κλινική εικόνα μοιάζει με αυτή της οξείας ιογενούς ηπατίτιδος. Στο 20% των περιπτώσεων αυτής της μορφής δεν διαπιστώνεται ίκτερος (ανικτερική μορφή). Σπανιότερα μπορεί να εκδηλωθεί με τη μορφή οξείας κεραυνοβόλου ηπατικής ανεπάρκειας. Η πιθανότητα αυτή είναι πιο συχνή σε πολύ μικρή ηλικία (<10 ετών). Σε ένα ποσοστό 10% η διάγνωση τίθεται μετά από τυχαία κλινική (διαπίστωση ηπατοσπληνομεγαλίας) ή εργαστηριακή εξέταση (μεγάλη αύξηση τρανσαμινασών). Η έναρξη της νόσου είναι συνήθως ύπουλη με κόπωση, αρθραλγίες, διαλείποντα ίκτερο, άλγος δεξιού υποχονδρίου αλλά ένα

σημαντικό ποσοστό ασθενών είτε είναι τελείως ασυμπτωματικοί είτε έχουν οξεία προσβολή παρόμοια με αυτή της οξείας ιογενούς ηπατίτιδας (215-223). Η νόσος μπορεί να συνδυάζεται με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα όπως θυρεοειδίτιδα Hashimoto (η πιο συχνή συνυπάρχουσα διαταραχή), νόσο Graves, ελκώδη κολίτιδα, ρευματοειδή αρθρίτιδα, σύνδρομο Sjogren, πολυμυοσίτιδα, αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, μεικτή νόσο του συνδετικού ιστού και άλλα (224, 225). Συχνά υπάρχει ιστορικό αυτοάνοσων διαταραχών σε πρώτου βαθμού συγγενείς των ασθενών.

Εργαστηριακά επηρεάζονται οι ηπατικοί βιοχημικοί δείκτες (κυρίως η χολερυθρίνη και οι αμινοτρανσφεράσες), υπάρχει υπεργαμμασφαιριναιμία με εκλεκτική αύξηση της IgG και ανιχνεύονται διάφορα αυτοαντισώματα που αποτελούν σημαντικούς παθογνωμονικούς εργαστηριακούς δείκτες για τη διάγνωση και την ταξινόμηση της AH (226-228). Η τιμή της χολερυθρίνης και των αμινοτρανσφερασών ποικίλλει από μια μικρή αύξηση πάνω από το φυσιολογικό μέχρι 50 φορές πάνω από το φυσιολογικό, με συνήθως φυσιολογική ή μέτρια αύξηση των χολοστατικών ενζύμων. Οι τιμές των βιοχημικών δεικτών δεν αντικατοπτρίζουν πάντα τη σοβαρότητα της νόσου. Λαμβάνοντας υπόψη τη μεταβαλλόμενη φύση της παθολογικής αυτής κατάστασης, θα πρέπει να γίνει σαφές ότι οι βιοχημικοί δείκτες μπορεί να είναι φυσιολογικοί παρά την ιστολογικά αποδεδειγμένη ενεργότητα της νόσου (229).

Οι Gohar και συνεργάτες (230) και οι Michalska και συνεργάτες (231) έχουν μελετήσει τα κλινικά χαρακτηριστικά, τα εργαστηριακά ευρήματα και τις ιστολογικές αλλοιώσεις ασθενών με AH σε δύο γεωγραφικά διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες. Η νόσος στην Ινδία ήταν παρόμοια με τη νόσο στην Πολωνία και αυτή με τη σειρά της με τη νόσο όπως έχει περιγραφεί στη Βόρεια Αμερική και τη Βόρεια Ευρώπη (216, 226). Και οι δύο μελέτες (230, 231) έδωσαν έμφαση στη συχνότητα της οξείας έναρξης της νόσου (20% και 75% αντίστοιχα), στη συχνή εμφάνιση εξωηπατικών αυτοάνοσων εκδηλώσεων (56% και 26%, αντίστοιχα) και τη χαμηλή συχνότητα θετικών αντισωμάτων έναντι των μικροσωμάτων ήπατος νεφρών (αντι-LKM1, 2% και 4%, αντίστοιχα). Η επικράτηση των γυναικών, το ευρύ εύρος ηλικίας εμφάνισης και η συχνή ανταπόκριση στα κορτικοστεροειδή ήταν κοινά ευρήματα. Η κύρια διαφορά ανάμεσα στα ευρήματα σε αυτές τις περιοχές και



στα ευρήματα των ερευνών σε Βόρεια Αμερική και Ευρώπη ήταν η υψηλή συχνότητα των σχετιζόμενων με τη θεραπεία επιπλοκών στην Ινδία (26%), που είχε σαν αποτέλεσμα το θάνατο δύο ασθενών (4%). Οι θανατηφόρες αυτές επιπλοκές προήλθαν λόγω λοίμωξης με *Nocardia* και *Aspergillus*, αντίστοιχα. Οι ομοιότητες στα κλινικά χαρακτηριστικά ανάμεσα στους Ινδούς ασθενείς και εκείνους από την Πολωνία υποδεικνύουν ότι η έκφραση και η συμπεριφορά της ΑΗ ήταν παρόμοιες σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και ότι τα διεθνή διαγνωστικά κριτήρια μπορούν να εφαρμοσθούν σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Η πιθανότητα της ΑΗ θα πρέπει να υπεισέρχεται πάντα στη διαφορική διάγνωση σε όλες τις περιπτώσεις ανεξήγητης οξείας ή χρόνιας τρανσαμινασαιμίας ανεξαρτήτως ηλικίας ή του φύλου του ασθενούς (215, 217, 227, 228).

Ιστολογικά δεν υπάρχουν μορφολογικά χαρακτηριστικά παθολογικά της ΑΗ αλλά η χαρακτηριστική ιστολογική εικόνα είναι αυτή της περιπυλαίας ηπατίτιδας με κυρίαρχη λεμφοπλασματοκυτταρική νεκροφλεγμονώδη διήθηση με ή χωρίς πυλαιο-πυλαία ή πυλαιο-κεντρική γεφυροποιό νέκρωση. Σε προχωρημένη νόσο (ιδιαίτερα χωρίς θεραπεία), η γεφυροποιός νέκρωση είναι έντονη με αποτέλεσμα την καταστροφή της αρχιτεκτονικής του λοβίου και την εγκατάσταση ίνωσης και/ή κίρρωσης. Άλλα χαρακτηριστικά όπως αθροίσεις λεμφοκυττάρων, στεάτωση, σιδήρωση, πολλαπλασιασμός των χοληφόρων πόρων (τα οποία μπορούν να συμβούν σε ένα βαθμό στην ΑΗ ακόμα και σε απουσία κίρρωσης) θεωρείται ότι δεν έχουν την απαιτούμενη ειδικότητα να αποκλείσουν την ΑΗ αλλά είναι επαρκή για να θέσουν αμφιβολίες για την διάγνωση. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι τα βιοχημικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά της ΑΗ μπορούν να βρεθούν και σε άλλες διαταραχές όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος με απουσία ηπατικής συμμετοχής (232). Για το λόγο αυτό βέβαιη διάγνωση της ΑΗ δεν θα πρέπει να γίνεται χωρίς βιοψία ήπατος.

Αν και η παρουσία αυτοαντισωμάτων είναι ένα από τα χαρακτηριστικά της ΑΗ δεν υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο αυτοαντίσωμα με τη διαγνωστική σημαντικότητα και ειδικότητα που έχουν τα αντιμοτοχονδριακά αντισώματα (AMA) για τη διάγνωση της ΠΧΚ. Για το λόγο αυτό τα αυτοαντισώματα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν μοναδικοί δείκτες για τη διάγνωση της ΑΗ. Είναι μάλλον μια διάγνωση που επιτυγχάνεται με αποκλεισμό όλων των

άλλων παραγόντων που οδηγούν σε χρόνια ηπατίτιδα και περιλαμβάνουν ιογενείς, τοξικούς, γενετικούς και μεταβολικούς παράγοντες (216). Έτσι μερικές φορές η διάγνωση της ΑΗ μπορεί να είναι δύσκολη (217, 218). Στον Πίνακα 10 φαίνεται το διαγνωστικό σύστημα βαθμοποίησης της ΑΗ που εισήγαγε η διεθνής ομάδα μελέτης της ΑΗ το 1998 (216).

**Πίνακας 10.** Τροποποιημένο σύστημα βαθμοποίησης για τη διάγνωση της ΑΗ.

<b>Παράμετροι/Χαρακτηριστικά</b>	<b>Score</b>
<b>Φύλο</b>	
-Γυναίκα/Ανδρας	+2/0
<b>Βαθμός αύξησης πάνω από το φυσιολογικό της ALP vs. αμινοτρανσφερασών</b>	
<1.5	+2
-1.5-3.0	0
>3.0	-2
<b>Ολικές σφαιρίνες ορού, γ-σφαιρίνες, ή IgG πάνω από το φυσιολογικό</b>	
>2.0	+3
-1.5-2.0	+2
-1.0-1.5	+1
<1.0	0
<b>ANA, SMA ή LKM-1 (τίτλοι με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε ποντίκι ή Hep2 κύτταρα)</b>	
>1:80	+3
-1:80	+2
-1:40	+1
<1:40	0
-AMA θετικά	-4
<b>Δείκτες ιογενούς ηπατίτιδας (IgM anti-HAV, HBsAg, IgM anti-HBc, anti-HCV και HCV-RNA)</b>	
-Θετικό/Αρνητικό	-3/+3
<b>Πρόσφατη ή τωρινή χρήση γνωστών ή ύποπτων ηπατοτοξικών φαρμάκων</b>	
-Ναι/Όχι	-4/+1
<b>Μέση χρήση αλκοόλ</b>	
<25 g/ημέρα	+2
>60 g/ημέρα	-2
<b>Άλλες αυτοάνοσες ασθένειες στον ασθενή ή πρώτου βαθμού συγγενείς</b>	
-Ναι/Όχι	+2/0
<b>Επιπρόσθετοι παράμετροι (θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη μόνο αν τα ANA, SMA, LKM-1 είναι αρνητικά)</b>	
-HLA DR3, DR4, ή άλλο HLA με γνωστή συσχέτιση με ΑΗ.	+1
-Οροθετικότητα για οποιοδήποτε ANCA, anti-LC1, anti-SLA/LP, anti-ASGPR.	+2
<b>Ιστολογία ήπατος</b>	
-Interface ηπατίτιδα	+3
-Κυρίαρχη λεμφοπλασματοκυτταρική διήθηση	+1
-Ηπατοκύτταρα σε ροζέτες	+1
-Τίποτα από τα παραπάνω	-5
-Αλλοιώσεις των χοληφόρων	-3
-Άλλες αλλαγές	-3
<b>Ανταπόκριση στην θεραπεία</b>	
-Πλήρης/Υποτροπή	+2/+3

Σίγουρη ΑΗ έχουμε αν το σκορ είναι μεγαλύτερο του 15 πριν τη θεραπεία ή μεγαλύτερο του 17 μετά τη θεραπεία. Πιθανή ΑΗ έχουμε αν το σκορ βρίσκεται μεταξύ 10 και 15 πριν τη θεραπεία ή 12-17 μετά τη θεραπεία. ALP: αλκαλική φωσφατάση, IgM anti-HAV: IgM αντισώματα κατά του ιού της ηπατίτιδας Α, anti-HCV: αντισώματα κατά του ιού της ηπατίτιδας C, HBsAg: επιφανειακό αντιγόνο του ιού της ηπατίτιδας Β, IgM anti-HBc: IgM αντισώματα κατά του πυρηνικού αντιγόνου του ιού της ηπατίτιδας Β.

## Πίνακας 11

<b>Ανταπόκριση</b>	<b>Ορισμός</b>	<b>ή</b>
<b>Πλήρης</b>	Κάποιο ή και τα δύο από τα ακόλουθα: σημαντική βελτίωση των συμπτωμάτων και φυσιολογικοποίηση των τιμών AST ή ALT, χολερυθρίνης και ανοσοσφαιρινών, μέσα σε ένα χρόνο και διατήρηση τουλάχιστον για 6 μήνες με θεραπεία συντήρησης ή βιοψία ήπατος κάποια στιγμή κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής που δείχνει μικρή ή απουσία δραστηριότητας.	Κάποιο ή και τα δύο από τα ακόλουθα: σημαντική βελτίωση των συμπτωμάτων μαζί με τουλάχιστον 50% βελτίωση των ηπατικών δοκιμασιών κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα της θεραπείας, με επίπεδα AST ή ALT που συνεχίζουν να μειώνονται σε λιγότερο από το διπλάσιο του φυσιολογικού μέσα σε 6 μήνες ή βιοψία ήπατος μέσα σε ένα χρόνο που να δείχνει μόνο μικρή δραστηριότητα.
<b>Υποτροπή</b>	Κάποιο ή και τα δύο από τα ακόλουθα: αύξηση στα επίπεδα AST ή ALT μεγαλύτερη από το διπλάσιο του φυσιολογικού ή βιοψία ήπατος που δείχνει ενεργό νόσο με ή χωρίς επανεμφάνιση των συμπτωμάτων	Επανεμφάνιση των συμπτωμάτων σε σημαντικό βαθμό ώστε να απαιτείται αυξημένη ανοσοκαταστολή που συνοδεύεται από αύξηση στα επίπεδα AST ή ALT.

Σύμφωνα με τα αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται στους ασθενείς με AH, η νόσος διαιρείται σε τρεις κύριους τύπους όπως προτάθηκε το 1994 (233). Η AH τύπου 1 (AH-1) χαρακτηρίζεται από την παρουσία ANA και/ή αντισωμάτων έναντι των λείων μυϊκών ινών (SMA) ενώ συχνά ανιχνεύονται αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετερόφιλων με περιπυρηνικό τύπο φθορισμού (p-ANCA/p-ANNA) (227, 228). Η AH τύπου 2 (AH-2) χαρακτηρίζεται από την παρουσία των ειδικών αντι-LKM τύπου 1 ή τύπου 3 αυτοαντισωμάτων (227, 228, 234) και/ή αντισωμάτων έναντι κυτοσολίων ήπατος τύπου 1 (αντι-LC1) (227, 228, 235). Η AH τύπου 3 χαρακτηρίζεται από την παρουσία αντισωμάτων κατά διαλυτού ηπατικού αντιγόνου (αντι-SLA) ή αντισωμάτων κατά ήπατος-παγκρέατος (αντι-LP) (236-238). Εν τούτοις, λόγω πρόσφατων κλινικών, ορολογικών και γενετικών δεδομένων οι αντι-SLA θετικοί ασθενείς δεν φαίνεται να αποτελούν ξεχωριστή ομάδα αλλά να εντάσσονται στην AH-1 (239-241). Για το λόγο αυτό η υποδιαίρεση της AH είναι αποδεκτή μόνο σε AH-1 (ANA, SMA, p-ANCA και/ή αντι-SLA/LP θετική) και σε AH-2 (αντι-LKM1 ή αντι-LKM3 και/ή αντι-LC1 θετική). Πέρα από τις ορολογικές διαφορές η AH-2 φαίνεται να είναι κλινικά και

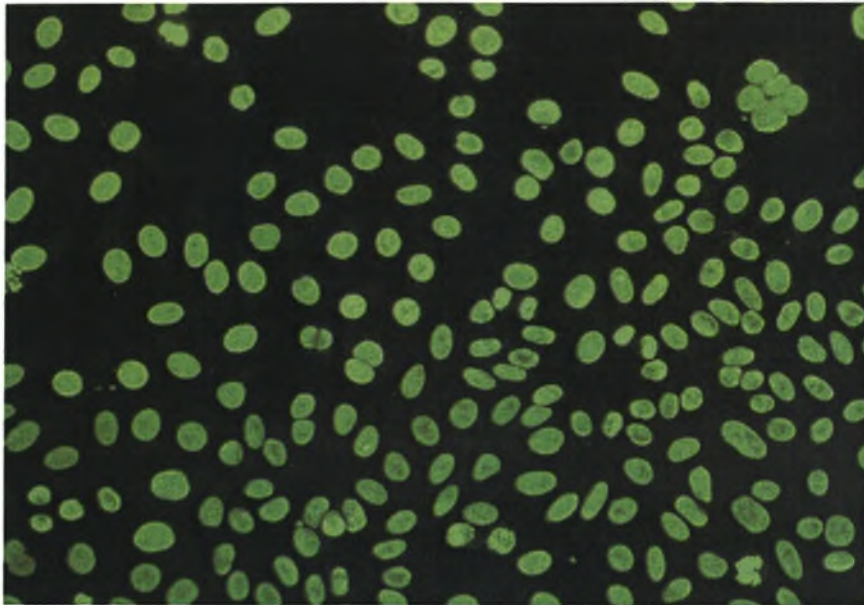
γενετικά διαφορετική από την ΑΙΗ-1 (214-216, 227, 228). Πράγματι, οι ασθενείς με ΑΗ-2 είναι συνήθως νεότεροι τη στιγμή της προσβολής, έχουν υψηλότερα επίπεδα χολερυθρίνης και τρανσαμινασών και χαρακτηρίζονται από περισσότερο σοβαρή ασθένεια σε σχέση με αυτούς με ΑΗ-1 (214-216, 227, 228, 234, 242). Επιπλέον, δεν έχει παρατηρηθεί διατηρούμενη ύφεση μετά τη διακοπή της ανοσοκατασταλτικής θεραπείας σε ασθενείς με ΑΗ-2 (216, 242). Λαμβάνοντας υπόψη τους γενετικούς δείκτες βρέθηκε ότι συσχέτιση ανάμεσα στο HLA DR3 και την ΑΗ-2 δεν είναι τόσο συχνή όσο στην ΑΗ-1 ενώ συσχέτιση ανάμεσα στο HLA DQ2 και την ΑΗ-2 έχει αναφερθεί (227, 228, 234, 242, 243). Πάντως οι ασθενείς με ΑΗ-2 αποτελούν μικρό ποσοστό (10%) του συνόλου των ασθενών με ΑΗ (213-216), ενώ τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα φαίνεται να είναι παρόμοια και στους δύο τύπους της νόσου (216, 242).

Η παρουσία διάφορων αυτοαντισωμάτων ίσως δείχνει ότι η ΑΗ δεν είναι μια απλή νόσος με έναν απλό παθογενετικό μηχανισμό αλλά ίσως να πρόκειται για μια ομάδα νοσημάτων με κοινή κλινική έκφραση (227, 228). Αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ενός ασυνήθιστου τύπου ΑΗ, ενός σπάνιου γενετικού συνδρόμου, του συνδρόμου αυτοάνοσης ενδοκρινολογίας τύπου 1 (ΣΑΠΕ-1). Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από χρόνια καντιντίαση βλενογόννων δέρματος (κυρίως στόματος) και αυτοάνοση προσβολή πολλαπλών ενδοκρινών αδένων (κυρίως επινεφρίδια, παραθυρεοειδείς αδένες) αλλά και του ήπατος σε ποσοστό που κυμαίνεται από 10-18% των περιπτώσεων (244-250).

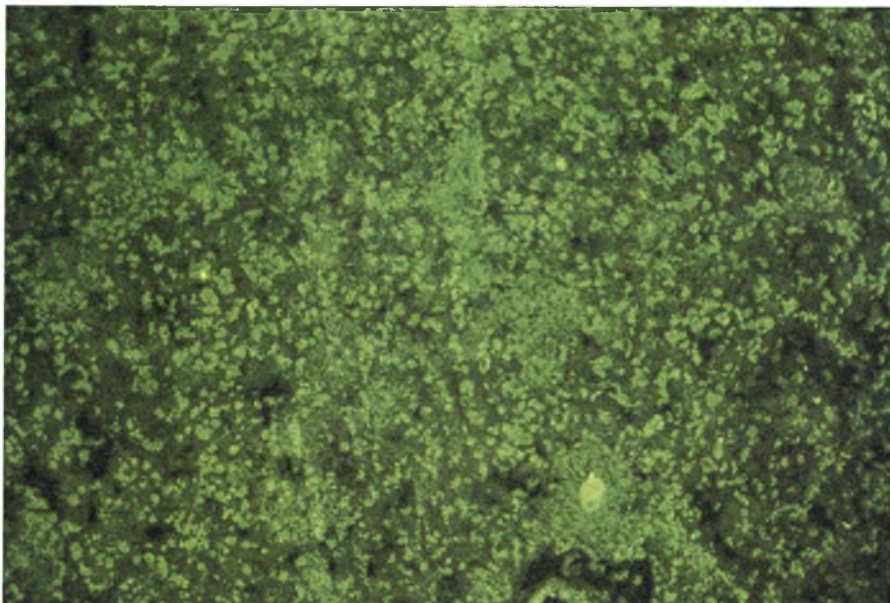
### **5.1.1. ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ ΤΥΠΟΥ-1**

Τα ANA και/ή SMA είναι σχεδόν αποκλειστικά αυτοαντισώματα απαραίτητα για τη διάγνωση της ΑΗ-1 (213-216, 227, 228, 239). Σε τυπικές περιπτώσεις αυτά τα αυτοαντισώματα ανιχνεύονται σε σημαντικούς τίτλους (>1/80 στους ενήλικες και >1/40 στα παιδιά) στο 50% περίπου των Καυκάσιων ασθενών με ΑΗ-1, ενώ τα ANA μόνα τους ανιχνεύονται σε ποσοστό 15% και τα SMA μόνα τους σε ποσοστό 35% (216, 227, 228, 239, 251). Η πιο συχνή μέθοδος ανίχνευσης των ANA είναι ο έμμεσος ανοσοφθορισμός χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ιστικές τομές κρυστάτη

από ήπαρ και νεφρούς αρουραίων, ή κυτταρικό κλώνο Hep2 από ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα λαρυγγικού καρκινώματος (227, 228, 251, 252).



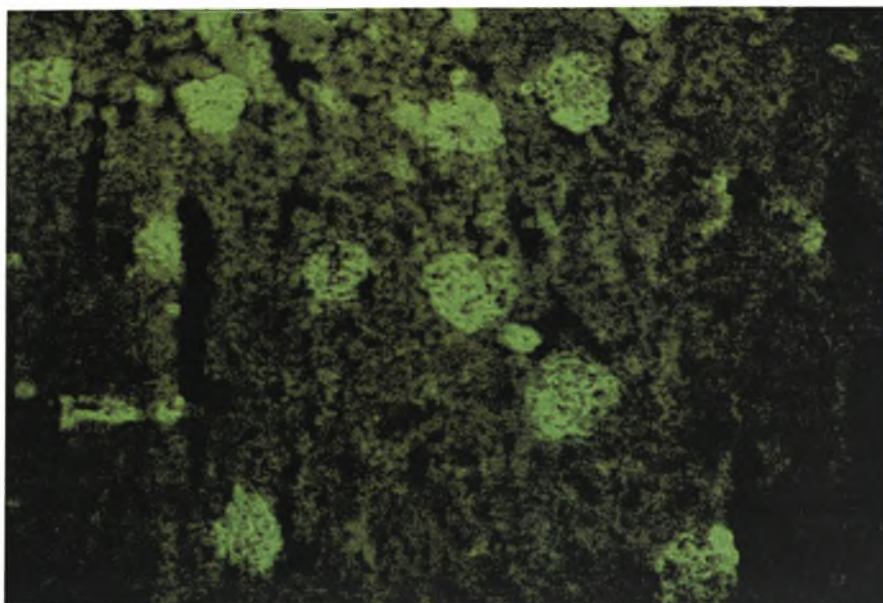
**Εικόνα 7.** Υψηλός τίτλος αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) με ομοιογενή φθορισμό που ανιχνεύτηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε υπόστρωμα κυττάρων Hep-2 σε ασθενή με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου-1 (AH-1) (μεγέθυνση 40<sup>x</sup>).



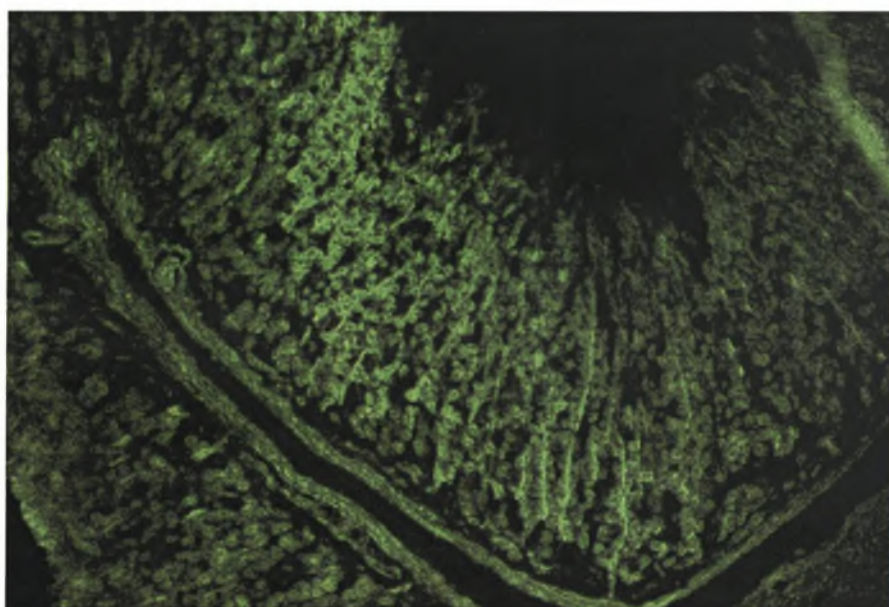
**Εικόνα 8.** Τυπικός φθορισμός αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) στον ορό ασθενούς με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου-1 που ανιχνεύτηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε ιστοικές τομές κρουστάτη από ήπαρ αρουραίου(μεγέθυνση 40<sup>x</sup>).

Διαφορετικοί τύποι φθορισμού βρίσκονται με αυτόν τον τρόπο εξαιτίας της ποικιλίας των στόχων-αυτοαντιγόνων των ANA στον πυρήνα των Hep2 κυττάρων που έχουν αναγνωρισθεί (251-256). Τα αυτοαντιγόνα-στόχος των ANA ποικίλουν (απλής και διπλής έλικας DNA, tRNA, SSA-Ro52, SSA-Ro60, snRNPs, κυκλίνη A, λαμινίνη A και C ή ιστόνες) (251-259). Στις περισσότερες περιπτώσεις βρίσκεται ομοιογενής (34-58%) ή στικτός φθορισμός (21-34%) (227, 228, 251-253). Μέχρι στιγμής κανένα ειδικό ηπατικό πυρηνικό αντιγόνο ή ειδικό ANA δεν έχει ανιχνευθεί να σχετίζεται ειδικά με την AH. Για το λόγο αυτό οι υπότυποι των ANA στις περιπτώσεις AH-1 φαίνεται να έχουν μικρή κλινική και διαγνωστική σημασία στην καθημερινή κλινική πράξη (216, 227, 228, 251-259).

Τα SMA ανιχνεύονται με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε ιστικές τομές κρυστάτη από ήπαρ και νεφρούς αρουραίων (φθορισμός του τοιχώματος των αγγείων και των σωληναρίων) καθώς και σε στομάχι αρουραίων (φθορισμός των μυϊκών τοιχωμάτων). Ο στόχος των SMA είναι δομές του κυτταρικού σκελετού όπως η ακτίνη, η τροπονίνη, η βιμεντίνη και η τροπομυοσίνη. Στην AH-1 τα SMA κατευθύνονται κυρίως έναντι της F-ακτίνης (257, 260-262). Το γεγονός αυτό φαίνεται να είναι ιδιαίτερα χρήσιμο διαγνωστικά σε παιδιατρικούς ασθενείς όπου τα SMA μπορεί να είναι ο μόνος δείκτης AH-1 ακόμη και σε χαμηλούς τίτλους όπως 1/40 (227, 228). Οι Czaja και συνεργάτες (260) αναφέρουν ότι τα αντισώματα έναντι της F-ακτίνης σχετίζονται με νεαρότερη ηλικία έναρξης της νόσου, με την παρουσία του HLA-A1-B8-DR3 απλότυπου, υψηλότερη συχνότητα αποτυχίας της θεραπείας, με θάνατο λόγω ηπατικής νόσου και με ταχύτερη ανάγκη για μεταμόσχευση από ότι οι ασθενείς που είναι αρνητικοί για τα αντισώματα έναντι της F-ακτίνης. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί σε νεότερες μελέτες από τους Granito και συνεργάτες (262).



**Εικόνα 9.** Αντισώματα έναντι των λείων μυϊκών ινών (SMA) που ανιχνεύτηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε ιστικές τομές κρουσάτη από νεφρούς αρουραίων σε ασθενή με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου-1 (μεγέθυνση 40<sup>x</sup>). Ο ανοσοφθορισμός περιλαμβάνει λεία μυϊκά ινίδια στα αιμοφόρα αγγεία.

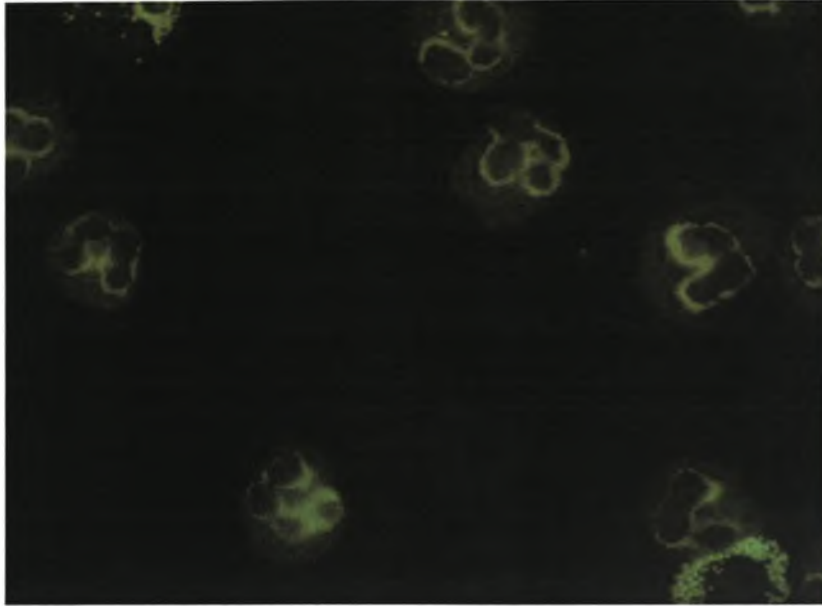


**Εικόνα 10.** Αντισώματα έναντι των λείων μυϊκών ινών (SMA) που ανιχνεύτηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε ιστικές τομές κρουσάτη από στομάχι αρουραίων σε ασθενή με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου-1 (μεγέθυνση 40<sup>x</sup>). Ο ανοσοφθορισμός περιλαμβάνει λεία μυϊκά ινίδια μέσα στον βλεννογόνο μυϊκό χιτώνα.

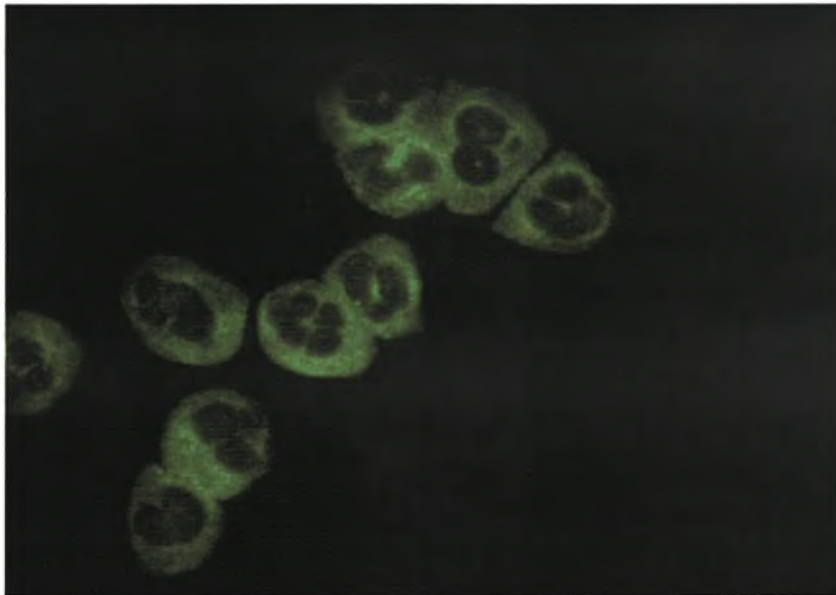
Τα ANA και/ή τα SMA μπορούν να ανιχνευθούν συνήθως σε χαμηλούς τίτλους και σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (HBV) ή C (HCV) αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις τα SMA αυτά δεν έχουν ειδικότητα κατά F-ακτίνης (227, 228, 257, 258, 261, 263-266). Από κλινική άποψη η χρήση ιντερφερόνης-α είναι γενικά ασφαλής στις περισσότερες περιπτώσεις ασθενών με ιογενείς ηπατίτιδες και θετικά ANA και/ή SMA αν και περιστασιακά μπορεί να επάγει ήπιες αυτοάνοσες διαταραχές συνήθως αυτοπεριοριζόμενες σε σχέση με ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες χωρίς ANA ή SMA (265-270). Κατά τη διάρκεια της ανοσοκατασταλτικής θεραπείας εξαφάνιση των ANA και/ή SMA παρατηρείται στην πλειοψηφία των ασθενών με AH-1 (271). Πάντως οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων δεν φαίνεται να έχουν σχέση με το αποτέλεσμα μετά από διακοπή της θεραπείας με κορτικοστεροειδή. Επιπλέον, ούτε οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων στην αρχή της διάγνωσης ούτε η «συμπεριφορά» των αυτοαντισωμάτων κατά τη διάρκεια της θεραπείας θεωρούνται προγνωστικοί δείκτες στην AH-1 (227, 228, 271). Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι τα ANA και SMA δεν εμπλέκονται μάλλον στην παθογένεια της AH-1 και επιπλέον ότι ο καθορισμός τους είναι περισσότερο διαγνωστικής παρά προγνωστικής αξίας (216, 227, 228, 271).

Τα ANCA είναι αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετερόφιλων. Ανιχνεύονται με έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα ουδετερόφιλα μονιμοποιημένα σε απόλυτη αιθανόλη (272). Χρησιμοποιώντας την παραπάνω μέθοδο δύο κύριοι τύποι μπορούν να ανιχνευθούν: τα p-ANCA με περιπυρηνικό τύπο φθορισμού και τα c-ANCA με κυτταροπλασματικό τύπο φθορισμού.





**Εικόνα 11.** Αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετερόφιλων με περιπυρηνικό τύπο φθορισμού (p-ANCA) που ανιχνεύτηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα ουδετερόφιλα μονιμοποιημένα σε αιθανόλη (μεγέθυνση 40<sup>x</sup>).



**Εικόνα 12.** Αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετερόφιλων με κυτταροπλασματικό τύπο φθορισμού (c-ANCA) που ανιχνεύτηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα ουδετερόφιλα μονιμοποιημένα σε αιθανόλη (μεγέθυνση 40<sup>x</sup>).

Και οι δύο τύποι (c-ANCA και p-ANCA) έχουν σημαντική διαγνωστική και προγνωστική αξία ιδιαίτερα στην κοκκιωμάτωση Wegener και την μικροσκοπική πολυαγγειίτιδα, αντίστοιχα (272, 273). Η πρωτεΐνάση 3 έχει βρεθεί ότι είναι το κύριο αυτοαντιγόνο-στόχος των c-ANCA στις περιπτώσεις με κοκκιωμάτωση Wegener ενώ η μυελοϋπεροξειδάση είναι το αυτοαντιγόνο-στόχος των p-ANCA στους περισσότερους ασθενείς με μικροσκοπική πολυαγγειίτιδα (272, 273). Τα ANCA ανιχνεύονται σε υψηλό ποσοστό και σε άλλες φλεγμονώδεις νόσους αγνώστου αιτιολογίας όπως χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους εντέρου (πιο συχνά στην ελκώδη κολίτιδα σε σχέση με την νόσο Crohn) (274, 275) και στην πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ), μια ηπατική νόσο που σχετίζεται συχνά με την ελκώδη κολίτιδα (275, 276). Πολλές μελέτες αναφέρουν την παρουσία υψηλών τίτλων p-ANCA στον ορό ασθενών με AH-1(277-282) και σε μικρότερο ποσοστό σε ασθενείς με ΠΧΚ (278, 282, 283). Περιστασιακά μπορούν να ανιχνευθούν και υψηλοί τίτλοι c-ANCA στην AH-1. Αντίθετα, p-ANCA δεν έχουν βρεθεί στον ορό ασθενών με AH-2 (281). Χαμηλοί τίτλοι ANCA ανιχνεύονται και σε ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια ή χρόνιες ιογενείς νόσους του ήπατος (278, 281, 284). Σε πρόσφατη μελέτη 516 Κινέζων ασθενών με χρόνια HCV λοίμωξη βρέθηκε η παρουσία c-ANCA σε ποσοστό 55.6% των ασθενών (285). Στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι τα c-ANCA σε όλους τους θετικούς ασθενείς είχαν ειδικότητα έναντι της πρωτεΐνάσης 3 χωρίς όμως να πάσχουν από κοκκιωμάτωση Wegener (285). Η κλινική σημασία του γεγονότος αυτού δεν έχει διευκρινισθεί ακόμη. Σε ασθενείς με AH-1, ΠΧΚ ή ΠΣΧ η παρουσία των ANCA φαίνεται να σχετίζεται με σοβαρή νόσο ή παρουσία κίρρωσης (278, 286). Πάντως το γεγονός αυτό δεν επιβεβαιώθηκε σε πιο πρόσφατες μελέτες.

Για την ανίχνευση της αντιγονικής ειδικότητας των ANCA στην AH-1 χρησιμοποιήθηκαν ELISA και μέθοδοι ανοσοαποτύπωσης (227, 228, 287). Χρησιμοποιώντας τις τεχνικές αυτές βρέθηκε ότι τα αυτοαντιγόνα-στόχος που αναγνωρίστηκαν είναι πολλά συμπεριλαμβανομένων της καθεψίνης G, καταλάσης, α-ενολάσης, λακτοφερίνης, ακτίνης και μη ιστονικές χρωμοσωμικές πρωτεΐνες HMG1 και HMG2 (227, 228, 278, 280, 282, 286-289). Εντούτοις, ο καθορισμός των αντιγόνων των ANCA φαίνεται να έχει περιορισμένη κλινική σημασία στους ασθενείς με AH-1 (227, 228, 278, 280). Η ανίχνευση των ANCA μπορεί να είναι όμως ένας χρήσιμος δείκτης για τη

διάγνωση της ΑΗ-1 ιδιαίτερα σε ANA/SMA/αντι-LKM1 αρνητικούς ασθενείς με ΑΗ-1. Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, η ανίχνευση των ANCA είναι μάλλον σπάνια σε ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα με εξαίρεση την πρόσφατη μελέτη των Wu και συνεργατών (285). Το γεγονός αυτό μπορεί να αποβεί χρήσιμο στη διαφορική διάγνωση ανάμεσα στους ασθενείς με ΑΗ και στους ασθενείς με χρόνια ΗΒV ή ΗCV λοίμωξη θετικούς για ANA ή SMA. Επιπλέον, καθώς τα ANCA είναι σχετικά σπάνια στην ΠΧΚ αυτά τα αυτοαντισώματα μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμα για τη διάκριση ανάμεσα σε περιπτώσεις ΑΗ από αυτές με ΠΧΚ (216). Πάντως εξαιτίας της έλλειψης ειδικότητάς τους για τη διάγνωση της ΑΗ ο καθορισμός τους ως μέθοδος ρουτίνας δεν συνιστάται στην εργαστηριακή διερεύνηση της ΑΗ (227, 228).

Τα αυτοαντισώματα έναντι του υποδοχέα της ασιαλογλυκοπρωτεΐνης (αντι-ASGP-R) ανιχνεύονται στο 88% των ασθενών με ΑΗ (290-292). Ο υποδοχέας αυτός είναι ειδικός των ηπατοκυττάρων που η κύρια λειτουργία του αφορά στην σύνδεση και ενδοκύττωση γλυκοπρωτεϊνών που φέρουν τελικές ομάδες γαλακτόζης. Όμως αυτά τα αυτοαντισώματα βρίσκονται και σε ασθενείς με ΠΧΚ, χρόνιες λοιμώξεις από τον ΗΒV ή τον ΗCV και αλκοολική νόσο του ήπατος αν και ανευρίσκονται σε χαμηλή συχνότητα και χαμηλούς τίτλους (227, 228, 290, 291). Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι ο υποδοχέας της ασιαλογλυκοπρωτεΐνης εκφράζεται στην επιφάνεια των περιπυλαίων ηπατοκυττάρων εκεί δηλαδή όπου ανευρίσκεται η κύρια νεκροφλεγμονώδης δραστηριότητα σε ασθενείς με ΑΗ (292). Το εύρημα αυτό δείχνει ότι υπάρχει πιθανή ανοσοπαθογενετική εμπλοκή των αυτοαντισωμάτων αυτών στην ΑΗ (292). Η γενική παραδοχή είναι ότι ο στόχος των αυτοάνοσων αντιδράσεων στην ΑΗ πρέπει να είναι ειδικός για το ήπαρ και διαθέσιμος στο ανοσολογικό σύστημα in vivo. Μέχρι στιγμής ο ASGP-R είναι το μόνο αυτοαντιγόνο-στόχος που εκπληρώνει αυτά τα κριτήρια (292, 293). Τα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων αυτών ποικίλουν ανάλογα με τη φλεγμονώδη δραστηριότητα της νόσου. Επιπλέον, οι τίτλοι των αντι-ASGP-R αντισωμάτων αυτών μειώθηκαν σημαντικά μετά από θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά ενώ επανεμφανίστηκαν όταν η νόσος υποτροπίασε (290, 291, 294). Αυτά τα αυτοαντισώματα μπορεί να είναι χρήσιμα διαγνωστικά «εργαλεία» όταν τα άλλα αυτοαντισώματα δεν ανιχνεύονται και υποπτευόμαστε ΑΗ. Εντούτοις, η χρήση τους ως ρουτίνα γενικά δεν συστήνεται (227, 228).

Τα αντι-SLA αντισώματα περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1987 (236). Δεν μπορούν να ανιχνευθούν με έμμεσο ανοσοφθορισμό παρά μόνο με ανταγωνιστικές μεθόδους ELISA, μεθόδους ανοσοαποτύπωσης και ραδιοανοσοδεσμευτικές μεθόδους (μέθοδοι ανοσοκαθίζησης) (236, 241, 259, 295-300). Τα SLA αντιπροσωπεύουν μια κυτοσολική πρωτεΐνη που δεν είναι οργανοειδική (301). Παρόλα αυτά, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις τους βρίσκονται στους ιστούς ήπατος και νεφρών. Τα αντισώματα αυτά ανιχνεύονται σε ασθενείς με AH είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό με ANA και/ή SMA (239-241, 302). Ομοιότητες ανάμεσα στο κλινικό προφίλ ασθενών με AH-1 (ANA και/ή SMA θετικούς) και ασθενών με AH που ήταν θετικοί μόνο στα αντι-SLA αντισώματα καθώς και η παρουσία ANA και/ή SMA περίπου στο 30% των ασθενών που έχουν αντι-SLA αντισώματα, υποδεικνύουν ότι τα αντισώματα αυτά είναι μάλλον ένας επιπλέον διαγνωστικός ορολογικός δείκτης για τη διάγνωση της AH-1 και όχι ένας δείκτης που χαρακτηρίζει ένα επιπρόσθετο ξεχωριστό τύπο AH (216, 227, 228, 239-241).

Πριν την περιγραφή των αντι-SLA μία άλλη ομάδα από την Γερμανία είχε περιγράψει για πρώτη φορά τα αντι-LP αντισώματα το 1981 (237). Το αντιγόνο αυτό ανιχνεύτηκε στο S100 υπερκείμενο ήπατος και παγκρέατος δείχνοντας ότι πρόκειται για μια διαλυτή πρωτεΐνη. Μέχρι πρόσφατα τα αντι-SLA και αντι-LP αυτοαντισώματα θεωρούνταν διαφορετικά (236-238). Οι Wies και συνεργάτες (296) ήταν οι πρώτοι που έδειξαν ότι τα αντι-SLA και αντι-LP αντισώματα είναι ταυτόσημα. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι το αυτοαντιγόνο-στόχος των αντι-SLA/LP (μια πρωτεΐνη 35-50 KDa) δεν ήταν ούτε οι κυτταροκερατίνες 8 ή 18 (295) ούτε το ισοένζυμο της S τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (303) που είχαν αναφερθεί σε προηγούμενες δημοσιεύσεις. Τα ευρήματα δύο ανεξάρτητων ομάδων (297, 298) επιβεβαίωσαν εκείνα των Wies και συνεργατών (296).

Όσον αφορά στην ειδικότητα για τη νόσο, τα αντι-SLA/LP αυτοαντισώματα φαίνεται να είναι πολύ ειδικά καθώς δεν έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με AH-2, ΠΧΚ, ΠΣΧ, χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες, αλκοολική νόσο του ήπατος και άλλα μη ηπατικά αυτοάνοσα νοσήματα (236, 241, 299, 302, 304). Οι Ballot και συνεργάτες (241) έδειξαν επίσης ότι τα αυτοαντισώματα αυτά είναι διαφορετικά από τα αντι-LC1. Για όλους τους παραπάνω λόγους τα αυτοαντισώματα αυτά θεωρούνται αξιόπιστος και ειδικός διαγνωστικός δείκτης

της ΑΗ (240, 241, 296, 297, 299, 302, 304). Αξίζει να σημειωθεί ότι πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη από Ελλάδα, το Ηνωμένο Βασίλειο και τις Η.Π.Α. έδειξε ότι όλοι οι ασθενείς με ΑΗ-1 που ήταν αντι-SLA/LP θετικοί ήταν ταυτόχρονα και αντι-Ro52 θετικοί χωρίς αυτό το εύρημα να οφείλεται σε διασταυρούμενη αντίδραση ή στην ταυτόχρονη παρουσία αυτοανώσων ρευματολογικών νοσημάτων που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με την παρουσία αντι-Ro αντισωμάτων (259). Η σημασία (κλινική και παθογενετική) αυτού του ευρήματος είναι υπό διερεύνηση από την ερευνητική ομάδα μελέτης των χρονίων νοσημάτων του ήπατος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Εντούτοις, η ειδικότητα των αντι-SLA/LP για την ΑΗ-1, έχει πρόσφατα δεχθεί κριτική καθώς μια μελέτη από το Ηνωμένο Βασίλειο (300) έδειξε ότι τα αντισώματα αυτά μπορούν να ανιχνευθούν σε ασθενείς με ΑΗ-2 και σε παιδιά με επικαλυπτόμενο σύνδρομο ΑΗ/ΠΣΧ. Αυτοί οι ερευνητές χρησιμοποίησαν ευκαρυωτικά εκφραζόμενο tRNP (Ser Sec)/SLA σαν στόχο με μια ραδιοδεσμευτική μέθοδο που είναι γνωστό ότι παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία από ότι η ELISA και η ανοσοαποτύπωση εξαιτίας της ικανότητάς της να ανιχνεύει αντισώματα που κατευθύνονται έναντι στερεοτακτικών (conformational) επιτόπων (305-307). Τα ευρήματά τους χρειάζονται επιβεβαίωση (μέχρι στιγμής δεν έχουν επιβεβαιωθεί) από άλλες ομάδες ιδιαίτερα δε χρήζει διευκρίνησης εάν τα αντι-SLA/LP ανιχνεύονται και σε ενήλικους με ΠΣΧ. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο με τους προηγούμενους ερευνητές, έδειξαν την παρουσία αντι-SLA/LP αντισωμάτων σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη από τον HCV (308) κάτι όμως που δεν επιβεβαιώθηκε σε πρόσφατη δημοσίευση της ερευνητικής ομάδας μελέτης των χρονίων νοσημάτων του ήπατος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (304).

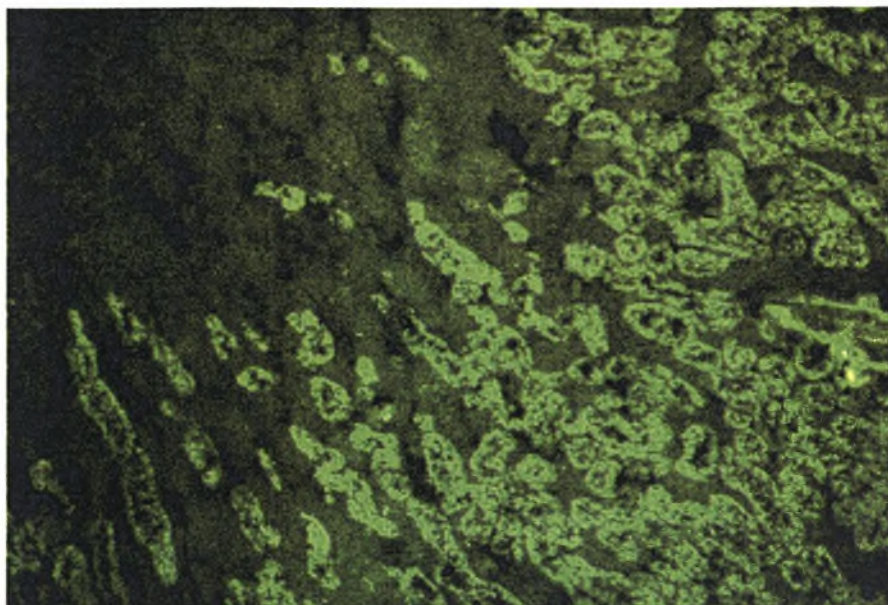
Παρόλα αυτά, πρόσφατα δεδομένα επιβεβαίωσαν προηγούμενα ευρήματα ότι ασθενείς με αντι-SLA/LP αντισώματα παρουσιάζουν σοβαρότερη μορφή ΑΗ (299, 300, 309). Τα αντισώματα αυτά ίσως σχετίζονται με την παθογένεια της αυτοάνοσης διαδικασίας στην ΑΗ-1 αν και η ακριβής λειτουργία τους και ο ακριβής ρόλος τους στην αυτοανοσία δεν είναι μέχρι στιγμής γνωστός (227, 228). Από κλινική άποψη όμως τα αντισώματα αυτά φαίνεται ότι θα βοηθήσουν σημαντικά ώστε να μειωθεί η ομάδα της κρυψιγενούς ηπατίτιδας και/ή κίρρωσης και κάποιοι ασθενείς (αν όχι όλοι) να

τεθούν έγκαιρα σε ανοσοκατασταλτική αγωγή με στόχο τη μη πρόοδο της νόσου.

### **5.1.2. ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ ΤΥΠΟΥ-2**

Η ΑΗ-2 χαρακτηρίζεται από την παρουσία ειδικών αντισωμάτων όπως τα αντι-LKM και τα αντι-LC1. Υπάρχουν 3 τύποι αντι-LKM αντισωμάτων αλλά ο τύπος 1 (αντι-LKM1) είναι ο πιο χαρακτηριστικός ορολογικός δείκτης για τη διάγνωση της ΑΗ-2 (215, 234, 287, 301). Αυτά τα αυτοαντισώματα περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τους Rizzetto και συνεργάτες (310) χρησιμοποιώντας έμμεσο ανοσοφθορισμό σε τομές ήπατος, νεφρών και στομάχου αρουραίων. Το πρότυπο του φθορισμού χαρακτηρίζεται εκτός από το θετικό σήμα στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων, από αποκλειστική αντιδραστικότητα του P3 τμήματος των εγγύς νεφρικών σωληναρίων (234). Αντίθετα τα AMA στην ΠΧΚ δίνουν θετικό φθορισμό τόσο στα εγγύς όσο και στα άπω νεφρικά σωληνάκια. Επιπρόσθετοι μέθοδοι ανίχνευσης των αντι-LKM γίνεται με τη χρήση ELISA και ανοσοαποτύπωσης. Το αυτοαντιγόνο στόχος των αντι-LKM1 στην ΑΗ-2 είναι το KYTP450 2D6 (311-313). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι αντι-LKM1 αντισώματα ανιχνεύονται στο 0-7% των ασθενών με χρόνια ΗCV λοίμωξη, ανάλογα με την γεωγραφική καταγωγή των ασθενών (πιο συχνά στη Νότια Ευρώπη – σπάνια στις ΗΠΑ) αλλά ανεξάρτητα από τον ΗCV-γονότυπο (227, 228, 264, 314, 315). Όμως σχετικά πρόσφατα, οι Bortolotti και συνεργάτες (316) και οι Dalekos συνεργάτες (317) βρήκαν υψηλότερο επιπολασμό (10%) των αντι-LKM αντισωμάτων σε παιδιά και ενήλικες που έπασχαν από χρόνια λοίμωξη από τον ΗCV.

Όπως ταυτοποιήθηκε για την ΑΗ-2, το KYTP450 2D6 φαίνεται να είναι το μείζον αυτοαντιγόνο έναντι του οποίου στρέφονται τα αυτοαντισώματα αυτά και σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη από τον ΗCV (227, 228, 305-307, 311, 313). Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν τις ετερογενείς αυτοάνοσες αντιδράσεις που συμβαίνουν σε αντι-LKM θετικούς ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C.

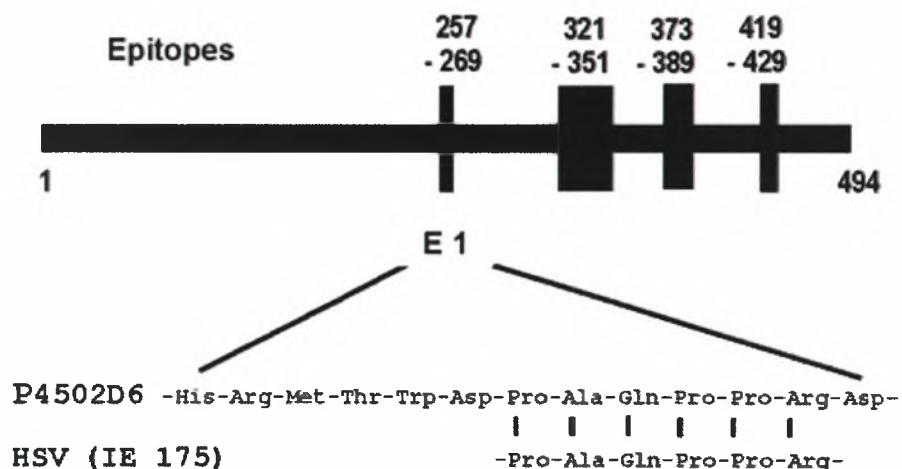


**Εικόνα 13.** Αντισώματα έναντι μικροσωμίων ήπατος-νεφρών τύπου 1 (Αντι-LKM1) (μεγέθυνση 40<sup>x</sup>). Το πρότυπο φθορισμού χαρακτηρίζεται από αποκλειστική αντιδραστικότητα του P3 τμήματος των εγγύς νεφρικών σωληναρίων.

Από κλινική άποψη το screening για αντι-LKM1 αντισώματα συνιστάται πριν από την έναρξη θεραπείας με ιντερφερόνη-α σε ασθενείς με χρόνια HCV λοίμωξη. Αν τα αντισώματα αυτά βρεθούν θετικά χρειάζεται προσεκτική παρακολούθηση γιατί η ιντερφερόνη-α μπορεί να προκαλέσει ήπιες αλλά και σημαντικές ή εμμένουσες αυτοάνοσες ηπατικές αντιδράσεις ακόμη δε και ανάπτυξη αληθούς ΑΗ (216, 264-266, 318-322). Οι Dalekos και συνεργάτες (319) μελέτησαν τους τίτλους αντισωμάτων και τους επιτόπους LKM-1 θετικών ορών ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C. Ένας ασθενής με υψηλό τίτλο LKM και αντισώματα κατά του επιτόπου 257-269 τα οποία αναγνωρίζονται σε ασθενείς με ΑΗ-2, παρουσίασε επιδείνωση της νόσου μετά από θεραπεία με ιντερφερόνη-α. Σε αντίθεση με άλλους ασθενείς με HCV λοίμωξη σε αυτόν τον ασθενή αναγνωρίσθηκε ένας σπάνιος επίτοπος στο καρβοξυλικό άκρο της πρωτεΐνης. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο καθορισμός των τίτλων των αντι-LKM αντισωμάτων μαζί με τον καθορισμό των επιτόπων σε HCV/anti-LKM θετικούς ασθενείς πριν την έναρξη θεραπείας με ιντερφερόνη-α ίσως να είναι χρήσιμος σε μια προσπάθεια να αναγνωρίσουμε τους ασθενείς εκείνους που έχουν υψηλή πιθανότητα εκδήλωσης μη επιθυμητών αυτοάνοσων αντιδράσεων (319).

Οι μηχανισμοί και ο παθογενετικός ρόλος -αν υπάρχει- των αντι-LKM1 αντισωμάτων στην ηπατική βλάβη είναι ακόμα άγνωστοι (227, 228). Έχει βρεθεί ότι οι ιογενείς λοιμώξεις από τον ιό του απλού έρπητα (HSV) ίσως προκαλούν την ανάπτυξη των αντισωμάτων αυτών μέσω μοριακής μίμησης σε γενετικά ευαίσθητα άτομα που αναπτύσσουν AH-2 (323). Οι Manns και συνεργάτες (323) εξέτασαν 26 LKM θετικούς ορούς ασθενών από τους οποίους βρήκαν στους 11 έναν μικρό επίτοπο από 8 αμινοξέα με τη σειρά DPAQPPRD. Η έρευνα των ηλεκτρονικών δεδομένων αποκάλυψε μια ενδιαφέρουσα αντιστοιχία του μικρού αυτού επιτόπου με την πρωτοπαθή δομή της πρωτεΐνης IE 175 του HSV-1, γνωστή σήμερα ως κυτταρική πρωτεΐνη 4 (ICP4) του HSV-1.

## Molecular Mimicry



**Εικόνα 14.** Γραμμικοί Β-κυτταρικοί επίτοποι στο κυτόχρωμα P450 2D6 στην αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 2. Ο κυρίαρχος επίτοπος 257-269 παρουσιάζει αντιστοιχία με τη δομή της πρωτεΐνης IE 175, ένα μεταγραφικό παράγοντα του ιού του απλού έρπη τύπου 1 (HSV-1), γνωστή σήμερα ως κυτταρική πρωτεΐνη 4 (ICP4) του HSV-1 (Από το: Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. Journal of Autoimmune Disease 2004; 1, σελίδα 10).

Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε και σε μια περίπτωση μονοζυγωτικών διδύμων (324). Στην μελέτη αυτή η μία αδελφή υπέφερε από AH-2 αλλά η άλλη ήταν υγιής. Βρέθηκε ότι μόνο η αδελφή που υπέφερε από AH-2 ήταν HSV θετική και στον ορό της αναγνωρίστηκε η ιϊκή πρωτεΐνη ICP4 στα



λυσοσώματα των προσβεβλημένων κυτάρων με HSV. Εκτός όμως από τη μοριακή μίμηση, χημικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών και/ή ανοσολογικές διασταυρούμενες αντιδράσεις σε αυτοαντιγόνα με σημαντική ομολογία στην αλληλουχία νουκλεοτιδίων, ίσως να συμμετέχουν στην ανάπτυξη αυτοάνοσων αντιδράσεων. Δύο μηχανισμοί έχουν προταθεί για τη σχέση των αντι-LKM1 αυτοαντισωμάτων με την παθογένεση της ηπατικής βλάβης. Ο πρώτος μηχανισμός φαίνεται να είναι μια απευθείας δέσμευση των αυτοαντισωμάτων αυτών στα ηπατοκύτταρα οδηγώντας στην λύση των κυτάρων ενώ ο δεύτερος μηχανισμός σχετίζεται με την προκαλούμενη από τα αντι-LKM1, επαγωγή ενεργοποιημένων Τ-λεμφοκυττάρων που δείχνει το συνδυασμό Β και Τ κυτταρικής δραστηριότητας στην αυτοάνοση διαδικασία (325-328).

Τα αντι-LKM τύπου 2 (αντι-LKM2) αυτοαντισώματα έχουν ανιχνευτεί μόνο σε μερικές περιπτώσεις φαρμακευτικών ηπατίτιδων προκαλούμενων από τιελινικό οξύ (227, 228, 287). Το αυτοαντιγόνο-στόχος των αντι-LKM2 αντισωμάτων είναι το KYTP450 2C9 (329). Τα αντι-LKM τύπου 3 (αντι-LKM3) αυτοαντισώματα μόνα τους ή σε συνδυασμό με τα αντι-LKM1 ανιχνεύονται στο 5-10% των ασθενών με ΑΗ-2 (330, 331). Το αυτοαντιγόνο στόχος των αντι-LKM3 είναι οι οικογένειες 1 και 2 των UGT (330-332). Αυτά τα αυτοαντισώματα (αντι-LKM3) περιγράφηκαν πρώτα στο 13% των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα D (333). Μέχρι πρόσφατα δεν είχαν ανιχνευθεί σε ασθενείς με χρόνια ΗΒV ή ΗCV λοίμωξη. Εντούτοις, τρεις σχεδόν ταυτόχρονες πρόσφατες μελέτες έδειξαν την παρουσία αντι-LKM3 σε ορισμένες περιπτώσεις ασθενών με ηπατίτιδα C (317, 334, 335).

Το 1988 αναγνωρίστηκε ένα δεύτερο αντίσωμα δείκτης της ΑΗ-2 (235). Το αντίσωμα αυτό αντιδρά με μια ηπατική κυτοσολική πρωτεΐνη (αντι-LC1). Τα αντι-LC1 ανιχνεύονται με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού όπου φθορίζει μόνο το ηπατικό παρέγχυμα (235, 336). Ωστόσο η ανίχνευση των αντι-LC1 με ανοσοφθορισμό είναι δύσκολη λόγω των συνυπαρχόντων αντι-LKM1 στους περισσότερους ασθενείς (>50%) που είναι αντι-LKM1 θετικοί. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται συνήθως άλλες τεχνικές για την ανίχνευσή τους όπως είναι η κυκλοτερής ανοσοδιάχυση, η ανάστροφη ανοσοηλεκτροφόρηση, μέθοδοι ανοσοαποτύπωσης και ELISA (235, 336, 337). Τα αντισώματα αυτά ανιχνεύονται περίπου στο 30% των ασθενών με ΑΗ-2 (235, 336) και περίπου στο 50% των αντι-LKM1 θετικών ασθενών

(337). Είναι αξιοσημείωτο ότι τα αυτοαντισώματα αυτά μπορεί να είναι ο μόνος ορολογικός δείκτης στο 10% περίπου των ασθενών με ΑΗ (235). Πρόσφατα ο μοριακός στόχος των αντι-LC1 βρέθηκε ότι είναι η φορμμινοτρανσφεράση της κυκλοδεαμινάσης (FTCD) (338), το οποίο είναι ένα πολυμερικό ένζυμο που εμπλέκεται στο μεταβολισμό του φυλλικού οξέος. Τα αυτοαντισώματα αυτά έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο ειδικό δείκτης ΑΗ-2 από ότι τα αντι-LKM1 μια και η παρουσία τους ποτέ δεν συσχετίστηκε με ηπατίτιδα C (235, 336). Πάντως δύο πρόσφατες μελέτες των Lenzi και συνεργατών (337) και Beland και συνεργατών (339) επιβεβαίωσαν το παραπάνω θεώρημα μόνο στους παιδιατρικούς ασθενείς ενώ μια σημαντική αναλογία ενηλίκων με χρόνια ηπατίτιδα C είχαν και αντι-LC1 αντισώματα. Εντούτοις, τα ευρήματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν σε πολύ πρόσφατη μελέτη του Ερευνητικού Εργαστηρίου της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (304).

Η σημασία της συσχέτισης -αν υπάρχει- ανάμεσα στα αντι-LC1 αντισώματα και την ΗCV λοίμωξη δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί επαρκώς (340). Πάντως οι τίτλοι των αντι-LC1 αντισωμάτων φαίνεται να σχετίζονται με τη δραστηριότητα της νόσου (341) σε αντίθεση με τα αντι-LKM1. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι υπάρχει μια πιθανή εμπλοκή των αντι-LC1 στην παθογένεια της ΑΗ-2.

### **5.1.3. ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΠΟΛΥΕΝΔΟΚΡΙΝΟΠΑΘΕΙΑΣ ΤΥΠΟΥ-1 (ΣΑΠΕ-1)**

Στην ΑΗ που παρατηρείται στα πλαίσια του ΣΑΠΕ-1, τα χαρακτηριστικά αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται είναι εκείνα κατά μικροσωμίων ήπατος (αντι-LM) (244). Τα αντισώματα αυτά δίνουν φθορίζουσα αντίδραση με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού μόνο κατά μικροσωμιακών αντιγόνων του ήπατος και όχι των νεφρών (244). Το πρότυπο φθορισμού των αντι-LM είναι διαφορετικό από το πρότυπο φθορισμού των αντι-LKM. Ο φθορισμός είναι κυρίως στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων που βρίσκονται γύρω από φλέβες σε αντίθεση με το διάχυτο ομοιογενή πρότυπο φθορισμού στο ηπατικό παρασκεύασμα αρουραίου των αντι-LKM (244). Πρέπει να σημειωθεί ότι τα αντι-LM μπορεί να ανιχνευθούν

επίσης σε φαρμακευτική ηπατίτιδα επαγόμενη από διϋδραλαζίνη (342). Το αυτοαντιγόνο στόχος των αντι-LM και στις δυο περιπτώσεις είναι το ΚΥΤΡ450 1A2. Στο ΣΑΠΕ-1 έχει βρεθεί επιπρόσθετα δραστηριότητα και έναντι άλλων κυττοχρωμάτων του Ρ450 όπως το ΚΥΤΡ450 1A1, ΚΥΤΡ450 2A6, ΚΥΤΡ450 2B6 (244-246, 342). Στη μεγαλύτερη μελέτη ασθενών με ΣΑΠΕ-1 που έχει δημοσιευθεί μέχρι σήμερα, μεγαλύτερη συχνότητα ανίχνευσης βρέθηκε στα αντισώματα έναντι του ΚΥΤΡ450 2A6 (15,6%) καθώς και στα αντισώματα έναντι του ΚΥΤΡ450 1A2 (6,3%) (244). Όμως στη μελέτη αυτή η ανίχνευση των αντι-ΚΥΤΡ450 2A6 δεν σχετίζονταν με την ανάπτυξη ή την παρουσία ΑΗ, ενώ αντίθετα η ανίχνευση των αντι-ΚΥΤΡ450 1A2 αντισωμάτων (αντι-LM) υπήρχε μόνο σε ασθενείς με ΣΑΠΕ-1 που είχαν ΑΗ (244). Αξίζει να τονιστεί ότι τα αντισώματα κατά του ΚΥΤΡ450 2A6 έχουν ανιχνευθεί και στο 2% των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C, υποδεικνύοντας έτσι ότι έχουν χαμηλή ειδικότητα σαν δείκτης ΑΗ στο ΣΑΠΕ-1(343). Επομένως τα αντι-ΚΥΤΡ450 1A2 αυτοαντισώματα αν και έχουν χαμηλή ευαισθησία φαίνεται να αποτελούν ειδικό δείκτη για ΑΗ στο ΣΑΠΕ-1. Συνιστάται μάλιστα, στα πλαίσια της παρακολούθησης των ασθενών με ΣΑΠΕ-1, ο περιοδικός έλεγχος των ασθενών για αντι-LM καθώς τα αυτοαντισώματα αυτά παρουσιάζουν υψηλή ειδικότητα για τη διάγνωση της ΑΗ στα πλαίσια του συνδρόμου.

#### **5.1.4. ΑΛΛΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ ΤΥΠΟΥ-1/2**

Αντισώματα έναντι του σακχαρομύκητα *Cerevisiae* (ASCA) έχουν περιγραφεί στη νόσο Crohn και την ελκώδη κολίτιδα. Οι Czaja και συνεργάτες (344) ανίχνευσαν τα αυτοαντισώματα αυτά στο 28% από 178 ασθενείς με ΑΗ. Η σημασία -αν υπάρχει- των αυτοαντισωμάτων αυτών στην ΑΗ δεν έχει ακόμη διευκρινισθεί. Άλλα αντισώματα που έχουν ανιχνευθεί στην ΑΗ είναι IgG και IgM αντισώματα έναντι καρδιολιπίνης (anti-CL), IgA αντισώματα έναντι ενδομυΐου και ιστικής διαγλουταμινάσης, IgG αντισώματα έναντι κιτριλιωμένων πεπτιδίων (αντι-CCP), χρωματίνης και έναντι α-ακτινίνης (257, 345-349). Από τα αντισώματα αυτά η διπλή αντιδραστικότητα έναντι α-ακτινίνης και F-ακτινίνης (SMA) φαίνεται να χαρακτηρίζει ασθενείς με σοβαρή, ενεργό νόσο (257), ενώ τα αντι-CL αντισώματα (αντισώματα υψηλής συγγένειας αλλά χωρίς δραστικότητα έναντι b2GPI) που βρέθηκαν στο 39%

των ασθενών με ΑΗ (348) συσχετίζονταν με το στάδιο της νόσου υποδεικνύοντας ίσως ότι τα αυτοαντισώματα αυτά είναι ένας δείκτης της σοβαρότητας και δραστηριότητας της ΑΗ. Ωστόσο τα αντι-CL αντισώματα έχουν ανιχνευθεί επιπρόσθετα σε σημαντικό ποσοστό ασθενών με ιογενείς ηπατίτιδες (263, 268, 270) καθώς και με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα όπως η ΠΧΚ και η ΠΣΧ (350) γεγονός που υποδεικνύει την απουσία ειδικότητας των αντι-CL αντισωμάτων για την ΑΗ. Τέλος, στη μελέτη των Czaja και συνεργατών (349) οι ασθενείς με ΑΗ-1 και θετικά αντισώματα έναντι χρωματίνης και SLA/LP είχαν υψηλά ποσοστά υποτροπής που έφθαναν το 100% των ασθενών μετά από απόσυρση της ανοσοκατασταλτικής αγωγής.

#### 5.1.5. ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ

Όσον αφορά στους παθογενετικούς μηχανισμούς της ΑΗ εκτός από τη μοριακή μίμηση ανάμεσα σε ξένα και αυτοαντιγόνα που οδηγούν σε απώλεια της ανοσολογικής ανοχής όπως περιγράφηκε παραπάνω, γενετικοί παράγοντες έχουν επίσης ενοχοποιηθεί. Οι Vogel και συνεργάτες (351) βρήκαν υψηλότερη συχνότητα μιας μεταλλαγής στη θέση 77 της τυροσινικής φωσφατάσης του γονιδίου CD45 σε 190 ασθενείς με ΑΗ σε σχέση με 210 υγιείς (3.16% vs 0.68%,  $p=0.01$ ). Το CD45 ρυθμίζει τα Β και Τ κύτταρα και μια διαταραχή στο γονίδιο αυτό έχει βρεθεί επίσης στην πολλαπλή σκλήρυνση. Εντούτοις, η χαμηλή συχνότητά του στην ΑΗ δείχνει ότι η μεταλλαγή αυτή δεν είναι βασικός παράγοντας κινδύνου. Παρόλα αυτά, η σπανιότητά του στον υγιή πληθυσμό δείχνει ότι κάποια σημασία πρέπει να έχει το εύρημα αυτό στην ΑΗ και ίσως επηρεάζει τις ανοσολογικές αντιδράσεις.

Ανάμεσα στα Τ-κύτταρα με ρυθμιστική λειτουργία για το ανοσολογικό σύστημα, όπως ΝΚΤ (natural killer T-cells), Th3 (T helper 3), Tr1 (T regulatory 1) και CD8+CD28- Τ-κύτταρα τα CD4+ λεμφοκύτταρα που εκφράζουν την αλυσίδα (CD25) του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2 (IL-2R) έχουν σημαντικό ανοσορυθμιστικό ρόλο, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση των αυτοδραστικών Τ-κυττάρων. Αυτός ο πρόσφατα χαρακτηριζόμενος ανοσορυθμιστικός υποπληθυσμός μπορεί και καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των CD4 και CD8 αυτοδραστικών Τ-κυττάρων πιθανόν και μέσω της απελευθέρωσης ανασταλτικών κυτταροκινών όπως ο TGF- $\beta$  και η IL-10. Όταν διεγείρονται

ειδικά μέσω του T-κυτταρικού τους υποδοχέα, η ρυθμιστική δραστηριότητα των CD4+CD25+ T-κυττάρων δεν είναι ειδική για κάποιο αντιγόνο. Απομάκρυνση των T-κυττάρων αυτών οδηγεί στην εμφάνιση αυτοάνοσων ασθενειών όπως αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, γαστρίτιδα και ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη σε πειράματα που έχουν γίνει σε ζώα.

Τα CD4+CD25+ T-κύτταρα αντιπροσωπεύουν το 5-10% των περιφερικών CD4 T-κυττάρων και βρέθηκαν μειωμένα στην ΑΗ, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με την αιτιοπαθογένεια της νόσου αυτής. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται επίσης από το γεγονός ότι ο αριθμός τους είναι μειωμένος κατά τη στιγμή της διάγνωσης αλλά αυξάνει όταν η νόσος τεθεί σε ύφεση μετά από θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά, χωρίς όμως να είναι ποτέ φυσιολογικός. Επίσης η αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στον αριθμό των κυττάρων αυτών και των τίτλων των αντι-LKM1 αντισωμάτων σε LKM1+ ασθενείς καθώς και των τίτλων των αντι-SLA αντισωμάτων σε ασθενείς ANA/SMA+ και LKM1+ δείχνει ότι η μείωση στα ρυθμιστικά αυτά T-κύτταρα διεγείρει την εμφάνιση ορολογικών εκδηλώσεων της ΑΗ. Μείωση στα κύτταρα αυτά κατά τη διάρκεια ενεργού νόσου έχει παρατηρηθεί και στο συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο με τάση για αύξηση του αριθμού τους κατά τη διάρκεια της ύφεσης.

Επίσης, βρέθηκε ότι στην ΑΗ τα CD4+CD25+ T-κύτταρα έχουν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και είναι επιρρεπή σε απόπτωση αλλά διατηρούν την ανοσορυθμιστική λειτουργία τους (εφόσον μπορούν και εμποδίζουν την παραγωγή της IFN- $\gamma$  από τα CD4+CD25- T-κύτταρα). Ακόμη, στην ΑΗ τα κύτταρα αυτά αδυνατούν να ρυθμίσουν την λειτουργία των CD8 αυτοδραστικών T-κυττάρων κατά τη στιγμή της διάγνωσης, δείχνοντας ότι μπορεί να συσχετίζονται με την αυτοάνοση ηπατική βλάβη. Κατά τη διάρκεια της ανοσοκατασταλτικής θεραπείας υπάρχει φυσιολογική απόκριση των CD8 T-κυττάρων, γεγονός που δείχνει τον σημαντικό ρόλο των ανοσοκατασταλτικών στην αναδόμηση της λειτουργίας των CD4+CD25+ T-κυττάρων (352, 353, 354).

Ο ρόλος των ιών στην παθογένεια της ΑΗ έχει επίσης μελετηθεί. Δύο ιοί, ο ιός της ηπατίτιδας Α και ο Epstein-Barr φαίνεται να σχετίζονται με την ανάπτυξη ΑΗ-1 στις περιπτώσεις εκείνες που υπάρχει μια γενετική προδιάθεση (355). Αντίθετα, ο ιός της ηπατίτιδας G (GBV-C/HGV) δεν φαίνεται να είναι αιτιολογικός παράγοντας για την ανάπτυξη ΑΗ (356). Παρά

τις πληροφορίες που δείχνουν η μοριακή μίμηση ανάμεσα στο KYTP450 2D6 και διάφορους ιούς όπως ο HCV, ο HSV-1, ο κυτταρομεγαλοϊός, ο Τ λεμφοτρόπος ιός τύπου 1 και 2 ή ακόμα και βακτηριακά αντιγόνα (π.χ. σαλμονέλλα) κανένας παράγοντας δεν φαίνεται ξεκάθαρα, να είναι ικανός να οδηγήσει στην εκδήλωση ΑΗ-2 (355, 357).

#### **5.1.6. ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ**

Η διαφορική διάγνωση πρέπει να περιλαμβάνει κύρια τον ιολογικό έλεγχο των ασθενών για αποκλεισμό ιογενούς ηπατίτιδας Α, Β και C, ενώ οι δοκιμασίες ρουτίνας για άλλους ιούς όπως ο κυτταρομεγαλοϊός, ο ιός Epstein-Barr που πολύ σπάνια προκαλούν ηπατίτιδα, θεωρούνται ότι δεν είναι απολύτως απαραίτητες. Η ΑΗ δεν πρέπει επίσης να αποκλείεται σε οροαρνητικούς ασθενείς που έχουν ιστορικό παρεντερικής έκθεσης ή άλλους παράγοντες κινδύνου για ιογενείς ηπατίτιδες. Ιστορικό μέτριας ή μεγάλης χρήσης οινοπνεύματος ή πρόσφατη χρήση γνωστών ηπατοτοξικών φαρμάκων δεν θα πρέπει να αποκλείει ΑΗ εάν υπάρχει ισχυρή ένδειξη συνεχιζόμενης ηπατικής καταστροφής μετά από τη διακοπή του τοξικού παράγοντα (οινόπνευμα, φάρμακο, κλπ). Ένα σύνδρομο που μοιάζει με ΑΗ μπορεί να προκληθεί από πολλά φάρμακα από τα οποία το αντιβιοτικό μινοκυκλίνη αποτελεί τυπικό παράδειγμα (358, 359). Τέλος, αν και μια φτωχή ανταπόκριση στη θεραπεία δεν θα πρέπει απαραίτητα να αποκλείει ΑΗ, συνιστάται χολαγγειογραφικός έλεγχος για τον αποκλεισμό πιθανής ΠΣΧ ή συνδρόμου επικάλυψης ΑΗ/ΠΣΧ.

Η πιθανή διάγνωση της ΑΗ δεν θα πρέπει επίσης να ξεχνιέται στη διαφορική διάγνωση της οξείας κεραυνοβόλου ηπατοκυτταρικής ανεπάρκειας όταν οι υπόλοιποι αιτιολογικοί παράγοντες έχουν αποκλειστεί. Οι Kessler και συνεργάτες (360) μελέτησαν 10 ασθενείς με οξεία έναρξη της νόσου (διάρκεια <8 εβδομάδες) συγκρίνοντας τις εκδηλώσεις τους με ασθενείς με χρόνια νόσο (διάρκεια >3 μηνών). Οκτώ από τους 10 ασθενείς είχαν τα κριτήρια κεραυνοβόλου ηπατικής ανεπάρκειας με μέσο χρόνο ανάμεσα στον ίκτερο και την εμφάνιση ηπατικής εγκεφαλοπάθειας μόνο 2.7 εβδομάδες. Οι ασθενείς με οξεία έναρξη είχαν μικρότερη ηπατική ίνωση σε σχέση με αυτούς με χρόνια νόσο. Η ΑΗ πρέπει λοιπόν να συμπεριλαμβάνεται στη διαφορική διάγνωση της κεραυνοβόλου ηπατικής ανεπάρκειας. Οι Aydogdu και συνεργάτες (361)

περιέγραψαν επίσης μια περίπτωση ΑΗ σε ένα παιδί με θετικά ANA και αντι-LKM1 αντισώματα. Ο ασθενής αυτός αποτελούσε το 3% από τα 34 παιδιά με κεραυνοβόλο ηπατική ανεπάρκεια στη συγκεκριμένη Τουρκική έρευνα. Ήταν ενδιαφέρον, ότι 44% των ασθενών είχαν αγνώστου αιτιολογίας κεραυνοβόλο ηπατική ανεπάρκεια (κρυψιγενής) και είναι αβέβαιο πόσοι ασθενείς αυτής της κατηγορίας είχαν ΑΗ που δεν ανιχνεύθηκε με τις συνηθισμένες εξετάσεις (361).

## Πίνακας 12

### *Διαφορική διάγνωση αυτοάνοσης ηπατίτιδας*

---

Άλλες αυτοάνοσες ηπατοπάθειες

-Σύνδρομο αλληλοεπικάλυψης

-Πρωτοπαθής χολική κίρρωση

-Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα

Οξείες και χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες

-Χρόνια Ηπατίτιδα Β με ή χωρίς Ηπατίτιδα D

-Χρόνια Ηπατίτιδα C

-Οξείες ιογενείς ηπατίτιδες, ιού Α έως G/GB-C, ιός Epstein-Barr, ιός του απλού έρπητος, κυτταρομεγαλοϊός

Χολαγγειοπάθεια εξαιτίας λοίμωξης από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας.

Αλκοολική νόσος του ήπατος

Φαρμακευτική Ηπατίτιδα

Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα

Κοκκιωματώδης ηπατίτιδα

Αιμοχρωμάτωση

Ανεπάρκεια α1-αντιθρυψίνης

Νόσος του Wilson

Συστηματικός ερυθματώδης λύκος

---

### **5.1.7. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ**

Η θεραπεία της ΑΗ συνίσταται στη χορήγηση πρεδνιζολόνης 40-60 mg ημερησίως σαν μονοθεραπεία ή 20-30 mg σε συνδυασμό με αζαθειοπρίνη 50-150 mg την ημέρα. Η πρεδνιζολόνη μειώνεται σταδιακά (5-10 mg /10-15 ημέρες) μέχρι της δόσης των 10-15 mg και διατηρείται σε αυτά τα επίπεδα για 2 περίπου χρόνια. Η χορήγηση της αζαθειοπρίνης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των απαιτούμενων δόσεων των κορτικοστεροειδών και επομένως των σχετιζόμενων με αυτά επιπλοκών (362). Η πιθανότητα εκδήλωσης

μυελοτοξικότητας από την αζαθειοπρίνη θα πρέπει να ελέγχεται ανά εβδομάδα για τις πρώτες οκτώ εβδομάδες θεραπείας και στη συνέχεια κάθε μήνα. Τα επίπεδα της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης και γ-σφαιρινών είναι οι πιο χρήσιμοι δείκτες που πρέπει να ελέγχονται κατά την διάρκεια της θεραπείας (362). Βιοχημική (φυσιολογικές αμινοτρανσφεράσες και γ-σφαιρίνες σε διάστημα 6-12 μηνών) και ιστολογική ανταπόκριση στη θεραπεία (συνήθως εντός 12-24 μηνών) παρατηρείται στο 80-90% των ασθενών. Εντούτοις, το 50% των ανταποκριθέντων υποτροπιάζει 6 μήνες μετά από τη διακοπή της θεραπείας και το 70% 3 χρόνια μετά τη διακοπή της θεραπείας (362). Μόνιμη ανταπόκριση υπάρχει μόνο στο 17% των ασθενών. Έτσι σήμερα μετά την αρχική ανταπόκριση συνιστάται μακροχρόνια θεραπεία συντήρησης με χαμηλές δόσεις πρεδνιζολόνης ή αζαθειοπρίνης σε ασθενείς που έχουν υποτροπιάσει επανειλημμένα (362). Οι ασθενείς που δεν μπαίνουν σε ύφεση μέσα σε 4 χρόνια συνεχούς θεραπείας, θα οδηγηθούν τελικά σε μεταμόσχευση ήπατος. Γενικά προτείνεται ως θεραπεία συντήρησης πρεδνιζολόνη ως μονοθεραπεία 15-20 mg/ημέρα ή σε συνδυασμό πρεδνιζολόνη <10 mg/ημέρα και αζαθειοπρίνη 50 mg/ημέρα ή μονοθεραπεία με αζαθειοπρίνη 75-150 mg/ημέρα.

Πράγματι, η πρεδνιζολόνη είναι το πρώτο φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της ΑΗ και σε μια μελέτη που έγινε στην Ιαπωνία μεταξύ 1975 και 1984 από την Ιαπωνική Ομάδα Μελέτης της ΑΗ βρέθηκε ότι ήταν αποτελεσματική στο 86% των περιπτώσεων (363). Χορήγηση υψηλότερων από τις συνηθισμένες δόσεις πρεδνιζολόνης είναι η πιο κοινή τακτική για ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στην συνηθισμένη θεραπεία. Αν και η χορήγηση υψηλότερων δόσεων πρεδνιζολόνης μπορεί να οδηγήσει σε μακροχρόνια ύφεση της νόσου, συνήθως επιπλέκονται από τοξικότητα. Έτσι άρχισε να χρησιμοποιείται και η αζαθειοπρίνη σε συνδυασμό με την πρεδνιζολόνη καθώς χρησιμοποιούμενοι μαζί οι δύο παράγοντες δουλεύουν συνεργικά και επεμβαίνουν σε διαφορετικά στάδια του ανοσολογικού μηχανισμού. Η πρεδνιζολόνη έχει αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες (καταστέλλει κυρίως την παραγωγή IL-1 και IL-2 από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και επεμβαίνει στην αντιγονοπαρουσιαστική λειτουργία εμποδίζοντας την ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων) (364). Η αζαθειοπρίνη που μετατρέπεται στην ενεργή της μορφή



(6-μερκαπτοπουρίνη) είναι ένα φάρμακο που σχετίζεται με την σύνθεση του νουκλεϊνικού οξέος εμποδίζοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των Β και Τ λεμφοκυττάρων (365). Αυτές οι δύο διαφορετικές ανοσοκατασταλτικές δραστηριότητες των δύο παραγόντων μπορούν να εξηγήσουν την αποτελεσματικότητα της συνδυασμένης θεραπείας στους περισσότερους ασθενείς με ΑΗ που έχουν μη ολοκληρωμένη ανταπόκριση στην παραδοσιακή θεραπεία με πρεδνιζολόνη ή που υποτροπίασαν κατά τη διάρκεια της θεραπείας κατά την προσπάθεια μείωσης της πρεδνιζολόνης (tapering). Ωστόσο η αζαθειοπρίνη από μόνη της δεν ήταν αρκετή για την επίτευξη ύφεσης σε ασθενείς με ΑΗ όταν χορηγούνταν σαν αρχική θεραπεία (366, 367). Επιπλοκές του φαρμάκου αυτού περιλαμβάνουν την εμφάνιση ναυτίας, εμέτων, μυελοτοξικότητας, εξανθήματος καθώς και εκδήλωση παγκρεατίτιδας (367). Επίσης η χρήση αζαθειοπρίνης έχει συσχετιστεί με τερατογένεση και ογκογένεση (368, 369). Συνολικά 15-20% των ασθενών παρουσιάζουν δυσανεξία στη θεραπεία, ενώ ένα άλλο μειονέκτημα στη χρήση της αποτελεί η σημαντική/επικίνδυνη μυελοτοξικότητα που μπορεί να προκαλέσει όταν υπάρχει ανεπάρκεια του ενζύμου μεταβολισμού της (thiouridine methyl-transferase) γεγονός που πρόσφατα φαίνεται να είναι αρκετά συχνό στους ασθενείς με ΑΗ (370).

Η διαθεσιμότητα νέων ανοσοκατασταλτικών παραγόντων έχει οδηγήσει στη χρήση τους ιδιαίτερα για ανθεκτικές περιπτώσεις ασθενών με ΑΗ. Για παράδειγμα, η μυκοφαινολάτη-μοφετίλη έχει θεωρηθεί ως αρκετά υποσχόμενη θεραπεία (371, 372). Άλλα φάρμακα που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι η βουδεσονίδη (373), η 6-μερκαπτοπουρίνη (374), η κυκλοσπορίνη (375), το Tacrolimus (376) και η μεθοτρεξάτη (377).

Οι Devlin και συνεργάτες (378) χρησιμοποίησαν τη μυκοφαινολάτη-μοφετίλη σε δόση 1500-2000 mg ημερησίως, σε πέντε ασθενείς με ΑΗ που δεν είχαν ανταποκριθεί στα συνηθισμένα αγωγή. Όλοι οι ασθενείς παρουσίασαν εργαστηριακή βελτίωση και η πρεδνιζολόνη αποσύρθηκε από τους δύο ασθενείς. Σε έναν ασθενή στον οποίο έγινε βιοψία ήπατος μετά τη θεραπεία υπήρχε βελτίωση στο βαθμό και το στάδιο της νόσου. Σε μια άλλη μελέτη των Richardson και συνεργατών (371), βρέθηκε επίσης ότι η μυκοφαινολάτη-μοφετίλη είναι καλά ανεκτή σε ασθενείς με ΑΗ-1 που δεν ανέχονται ή δεν ανταποκρίνονται στη χορήγηση αζαθειοπρίνης. Και εδώ η

δόση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 2000 mg ημερησίως. Δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες ανεπιθύμητες ενέργειες, ούτε γαστρεντερικές επιπλοκές, εκτός από έναν μόνο ασθενή στον οποίο παρατηρήθηκε πτώση των λευκών αιμοσφαιρίων. Τέλος, οι Brunt και Di Bisceglie (379) έδειξαν ιστολογική βελτίωση σε έναν ασθενή με ΑΗ στον οποίο χορηγήθηκε αυτό το φάρμακο.

Η μοφετίλη είναι ένα προφάρμακο που υδρολύεται από τις εστεράσες του ήπατος και παράγεται ένας ενεργός μεταβολίτης το μυκοφαινολικό οξύ το οποίο είναι ένας αναστολέας της ινοσινικής μονοφωσφατικής δεϋδρογονάσης. Η δεϋδρογονάση αυτή είναι απαραίτητο ένζυμο για τη σύνθεση των πουρινών και εμποδίζοντας τη δράση της η μοφετίλη, εμποδίζει εκλεκτικά την απάντηση των Β και Τ κυττάρων στα μιτογόνα ή αντιγόνα. Η ισχυρή ανοσοκατασταλτική του δράση, η χαμηλή συχνότητα επιπλοκών (κυρίως λευκοπενία), και η ανεξαρτησία του από την οδό μεταβολισμού της θειοπουρινικής μεθυλτρανσφεράσης (οδός μεταβολισμού της αζαθειοπρίνης) δείχνουν ότι μάλλον πρέπει να αποτελεί ένα καλύτερα ανεκτό φάρμακο από την αζαθειοπρίνη. Ωστόσο χρειάζονται περισσότερες μελέτες και εμπειρία για τη χρήση του φαρμάκου αυτού στην ΑΗ. Το φάρμακο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη θεραπεία και άλλων αυτοάνοσων διαταραχών όπως η ψωρίαση (380), η νεφρίτιδα του συστηματικού ερυθηματώδη λύκου (381), η ρευματοειδής αρθρίτιδα (382), καθώς και ως η κύρια ανοσοκατασταλτική θεραπεία στις μεταμοσχεύσεις συμπαγών οργάνων (383). Τα περισσότερα κλινικά δεδομένα για τη χρήση της μυκοφαινολάτης-μοφετίλης προέρχονται από τις μεταμοσχεύσεις οργάνων όπου το φάρμακο αυτό βρέθηκε να πλεονεκτεί έναντι της αζαθειοπρίνης και να μειώνει την οξεία απόρριψη (384). Οι παρενέργειές του είναι κυρίως γαστρεντερικές και μοιάζουν με αυτές της αζαθειοπρίνης. Ο κίνδυνος λευκοπενίας και αναιμίας με τη χρήση 2 g μυκοφαινολάτης την ημέρα είναι παρόμοιος με τη χρήση αζαθειοπρίνης 100-300 mg την ημέρα (385). Η χρήση όμως μυκοφαινολάτης 3 g/ημέρα έχει περισσότερες παρενέργειες και αυξάνει τον κίνδυνο ευκαιριακών λοιμώξεων (386).

Το UDCA (ουρσοδεοξυχολικό οξύ) έχει επίσης χρησιμοποιηθεί περιστασιακά και βρέθηκε να έχει θετική επίδραση σε ασθενείς με ΑΗ-1. Οι Czaja και συνεργάτες (387) μελέτησαν την επίδραση του UDCA σε 37 ασθενείς με ΑΗ-1. Χρησιμοποιήθηκαν 13-15 mg/kg βάρους σώματος

/ημερησίως σε συνδυασμό με τις συνηθισμένες δόσεις κορτικοστεροειδών που ελάμβαναν. Το φάρμακο αυτό βρέθηκε ότι μπορεί να βελτιώσει τους εργαστηριακούς δείκτες χωρίς όμως να επιτρέπει μείωση στη δόση των κορτικοστεροειδών ή τη διακοπή τους. Σε μια άλλη μελέτη χορηγήθηκαν 600 mg/ημερησίως UDCA για δύο χρόνια σε Ιάπωνες ασθενείς με AH-1 (388) και βρέθηκε ότι υπήρχε θετικό θεραπευτικό αποτέλεσμα, ενώ σε μια περίπτωση, η χρήση του UDCA ως μονοθεραπεία για οκτώ χρόνια σε ασθενή με AH-1 που δεν μπορούσε να ανεχθεί θεραπεία με κορτικοστεροειδή και αζαθειοπρίνη συσχετίστηκε με βιοχημική και ιστολογική ύφεση (389).

Έχει βρεθεί ότι υπάρχει και μια ομάδα ασθενών με AH-1 που διατηρεί την ύφεση με χαμηλές δόσεις πρεδνιζολόνης μόνο (2.5-10 mg/ημέρα). Επιπλέον ανοσοκατασταλτικά φάρμακα δεν χρειάζονται για διατήρηση της ύφεσης σε αυτή την ομάδα των ασθενών (390).

Όσον αφορά στην ανταπόκριση στη θεραπεία εκτός από ορισμένους ορολογικούς (αντι-SLA/LP, αντι-LKM1 και αντι-LC1 αντισώματα) και γενετικούς παράγοντες (HLA DR3, DR13) ρόλο παίζουν και οι φυλετικές διαφορές. Σε μελέτη στην οποία ελέγχθηκαν μη Ευρωπαίοι ασθενείς με AH βρέθηκε ότι οι ασθενείς αυτοί ήταν νεαρότεροι σε ηλικία όταν νόσησαν και είχαν μικρότερη ανταπόκριση στη συνηθισμένη ανοσοκατασταλτική θεραπεία από ότι οι Ευρωπαίοι ασθενείς (391). Φαίνεται ότι μερικές από αυτές τις διαφορές μπορεί να σχετίζονται με γενετικές διαφορές στον μεταβολισμό των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται. Για παράδειγμα, διαφορές στη φαρμακοκινητική της μεθυλπρεδνιζολόνης έχουν αναφερθεί όπως ότι οι μαύροι ασθενείς είναι περισσότερο ανθεκτικοί στις συνηθισμένες δόσεις από ότι οι λευκοί (392), ενώ οι Κορεάτες έδειξαν υψηλότερο όγκο κατανομής του φαρμάκου από ότι οι μαύροι, χαμηλότερη κάθαρση από ότι οι λευκοί και μακρύτερο χρόνο ημίσειας ζωής από ότι και οι λευκοί και οι μαύροι (393). Διαφορές στη φαρμακοκινητική βρέθηκαν και σε άλλα ανοσοκατασταλτικά όπως η αζαθειοπρίνη (394), το Tacrolimus (395) και η κυκλοσπορίνη (396).

Γνωρίζουμε ότι η ανταπόκριση στην ανοσοκατασταλτική θεραπεία είναι χαρακτηριστικό της AH (397). Πάντως έχει αναγνωρισθεί ότι η ανταπόκριση σε μεγάλο βαθμό εξαρτάται από τη συμμόρφωση του ασθενούς και ότι περιστασιακά μόνο, ασθενείς με κλασική AH δεν ανταποκρίνονται καλά στη

συνηθισμένη θεραπεία με κορτικοστεροειδή και αζαθειοπρίνη. Οι ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή και ανοσοκατασταλτικά θα χρειαστούν σε άλλοτε άλλο χρόνο μεταμόσχευση ήπατος. Όμως μετά από τη μεταμόσχευση μπορεί να υπάρξει υποτροπή στο μόσχευμα της ΑΗ όπως άλλωστε μπορεί να παρατηρηθεί και σε άλλες αυτοάνοσες διαταραχές (398). Το ποσοστό επανεμφάνισης της ΑΗ μετά τη μεταμόσχευση ήπατος ποικίλλει ανάμεσα σε 10 και 35% στις πιο πρόσφατες μελέτες (399, 400) αν και μετά από 5 χρόνια έχει βρεθεί ότι μπορεί η νόσος να υποτροπιάσει στο μόσχευμα στο 60% των μεταμοσχευθέντων (401).

## 5.2. ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ (ΠΧΚ)

### 5.2.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΧΟΛΙΚΗΣ ΚΙΡΡΩΣΗΣ

Η ΠΧΚ αποτελεί χρόνια χολοστατική νόσο του ήπατος που χαρακτηρίζεται από προοδευτική καταστροφή των μικρών ενδοηπατικών χοληφόρων με ανοσολογικούς μηχανισμούς (402). Έχει ύπουλη έναρξη και προσβάλλει κυρίως γυναίκες ηλικίας 40-60 ετών (80% των ασθενών) (403). Περιστασιακές περιπτώσεις ΠΧΚ έχουν αναφερθεί επίσης στην μετεμμηνοπαυσιακή περίοδο. Ο Πίνακας 13 περιγράφει τη μέση ηλικία εμφάνισης της ΠΧΚ.

**Πίνακας 13.** Ηλικία έναρξης Πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης

Μελέτη	Χρόνος	Σύμπτωμα	N	Μέση ηλικία	Εύρος ηλικίας	Χώρα
Long et al (415)	1997	Όχι	20	47	23-62	Αγγλία
Christensen et al (416)	1980	Ναι	236	55	24-78	Ευρώπη ΗΠΑ
Sasaki et al (417)	1985	Όχι	120	51.8	28-78	Ιαπωνία
Sasaki et al (417)	1985	Ναι	160	48	22-76	Ιαπωνία
Mitchison et al (418)	1986	Όχι	29		27-74	Αγγλία
Balasubramaniam et al (419)	1990	Όχι	73	54	35-75	ΗΠΑ
Brenard et al (405)	1990	Ναι		49.3	19-83	Γαλλία
Brenard et al (405)	1990	Όχι		51.5	29-90	Γαλλία
Uddenfeldt et al (420)	2000	Όχι ή ναι	86	56	31-78	Σουηδία
Howel et al (421)	2000	Όχι ή ναι	100	62.5	34-82	Αγγλία

N=αριθμός ασθενών της μελέτης

Η νεαρότερη ηλικία στην οποία έχει εμφανιστεί η νόσος περιγράφεται στη δημοσίευση των Dahlan και συνεργατών (404) όπου αναφέρονται 2 περιπτώσεις ασθενών με ηλικία 16 και 15 ετών, αντίστοιχα. Και οι δύο ασθενείς είχαν εμφανίσει χολολιθίαση και στάδιο 2 ΠΧΚ στη βιοψία ήπατος. Η νόσος έχει αναφερθεί επίσης σε ηλικία 19 ετών στη Γαλλία (405) και 17 ετών στην Ιταλία (406). Η ΠΧΚ δεν αναφέρεται στα παιδιά, με αποτέλεσμα να μην είναι γνωστή η νεαρότερη ηλικία στην οποία ανιχνεύονται AMA αν και υπάρχει μια ασθενής με σύνδρομο επικάλυψης ΑΗ/ΠΧΚ στην οποία τα AMA ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά σε ηλικία 14 ετών (Γ.Ν. Νταλέκος, αδημοσίευτες παρατηρήσεις).

Η επίπτωση και ο επιπολασμός της ΠΧΚ φαίνεται να έχουν αυξηθεί τα τελευταία χρόνια κυρίως γιατί πολύ περισσότεροι ασθενείς διαγιγνώσκονται τώρα στην πρώιμη ασυμπτωματική φάση της νόσου (407). Ο επιπολασμός της νόσου υπολογίζεται σε 150-200 περιπτώσεις/10<sup>6</sup> πληθυσμό. Εντούτοις, πρόσφατες έρευνες από την Αγγλία και την Αμερική δείχνουν ότι η ΠΧΚ προσβάλλει μέχρι και 1:2500 ανθρώπους (408) και 1:1000 γυναίκες πάνω από την ηλικία των 40 ετών (403). Πράγματι, φαίνεται να υπάρχουν σημαντικές διαφορές στον επιπολασμό της νόσου στις διάφορες χώρες. Για παράδειγμα, επιπολασμός 1:7000 έχει βρεθεί στη Νορβηγία (409), ενώ 1:50000 αναφέρεται στην Ιαπωνία και τον Καναδά (410, 411). Η ΠΧΚ είναι πολύ σπάνια αιτία χρόνιας ηπατικής νόσου στην Ινδία (412), αλλά όταν η νόσος διαπιστωθεί, είναι ήδη προχωρημένη με χαρακτηριστικά κίρρωσης (413). Σε πιο βαθμό αυτά τα γεγονότα αντικατοπτρίζουν γεωγραφικές διαφορές ή διαφορές στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση είναι αβέβαιο. Σε μια πρόσφατη μελέτη (414) που έγινε με τη χρήση εξονυχιστικών μεθόδων για την ανίχνευση της ΠΧΚ στη Βικτώρια της Αυστραλίας ώστε να εκτιμηθεί αν υπήρχε διαφορά στον επιπολασμό ανάμεσα στις διάφορες ομάδες μεταναστών αλλά και με το σύνολο του πληθυσμού, βρέθηκε ότι ο επιπολασμός της νόσου στις τρεις μεγαλύτερες ομάδες μεταναστών (Βρετανοί, Ιταλοί και Έλληνες, επιπολασμός: 1:7000, 1:5000 και 1:4800, αντίστοιχα) ήταν σημαντικά υψηλότερος από ότι αυτός στη Βικτώρια στο σύνολο (1:20000). Πιο αναλυτικά, στις γυναίκες ηλικίας μεγαλύτερης των 40 ετών ο επιπολασμός της ΠΧΚ ήταν περίπου 1:3000 στις Αγγλίδες μετανάστριες σε σχέση με 1:6000 στις Αυστραλέζες (414). Τα ευρήματα αυτά

δείχνουν ότι οι γηγενείς κάτοικοι της Βικτώρια είναι σχετικά προστατευμένοι από το αναπτύξουν ΠΧΚ, γεγονός που δείχνει μάλλον ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι σημαντικοί για την κλινική εμφάνιση της νόσου.

### **5.2.2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΧΟΛΙΚΗΣ ΚΙΡΡΩΣΗΣ**

Η έναρξη της νόσου συνήθως δεν είναι αιφνίδια αν και έχουν περιγραφεί περιπτώσεις που παρατηρείται οξεία είσοδος των συμπτωμάτων που μοιάζει με φαρμακευτική, ιογενή ή ΑΗ (422). Περίπου το 80% των ασθενών είναι συμπτωματικοί (423, 424) ακολουθώντας μια εξελικτική πορεία χωρίς αυτόματες υφέσεις που οδηγεί σε ηπατοκυτταρική βλάβη (πιθανόν από τη δράση των χολικών οξέων) και στη χαρακτηριστική χολικού τύπου διαβρωτική νέκρωση, πυλαία ίνωση και κίρρωση. Η προοδευτική εξέλιξη της νόσου σε κίρρωση με τις επιπλοκές που αυτή περιλαμβάνει έχει σαν αποτέλεσμα την υψηλή θνησιμότητα (423, 426). Πράγματι, χωρίς μεταμόσχευση η μέση επιβίωση ασθενών με προχωρημένο στάδιο (3 ή 4) είναι 6-8 χρόνια. Αντίθετα η πορεία είναι πολύ καλύτερη στους ασυμπτωματικούς ασθενείς (μέση επιβίωση 16 χρόνια). Εντούτοις, μια πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ένα σχετικά μεγάλο αριθμό ασυμπτωματικών ασθενών που παρακολουθήθηκαν για 28 χρόνια έδειξε ότι και αυτή η μορφή της νόσου χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά νοσηρότητας (426).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω αρκετοί ασθενείς (εως και το 40% σε αντίθεση με το 4% που αναφερόταν πριν 30 χρόνια) μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί για πολλά χρόνια πριν από τη διάγνωση (416, 427-431). Η διάγνωση ενός ασυμπτωματικού ασθενή με ΠΧΚ τίθεται συνήθως από την τυχαία ανεύρεση ηπατομεγαλίας ή από αυξημένες τιμές των χολοστατικών ενζύμων (αλκαλική φωσφατάση και γ-GT) σε τυχαίο εργαστηριακό έλεγχο. Πράγματι, τα κλασικά κλινικά χαρακτηριστικά όπως ο ίκτερος, ο γενικευμένος κνησμός και το αίσθημα κόπωσης ή οι βιοχημικοί δείκτες χολόστασης μπορεί να μην είναι παρόντα τη στιγμή της διάγνωσης. Τέλος, μια μικρή μειοψηφία ασθενών μπορεί να προσέλθουν με ήδη εγκατεστημένη τελικού σταδίου ηπατική ανεπάρκεια.

Έντονος γενικευμένος κνησμός αποτελεί συνήθως το πρώτο σύμπτωμα. Ο κνησμός μπορεί να προηγείται μέχρι και δύο χρόνια από την

εμφάνιση του ικτέρου. Παραδοσιακά πιστευόταν ότι ο κνησμός οφείλεται στην αυξημένη συσσώρευση των χολικών οξέων στο διάμεσο ιστό του δέρματος (περιφερική αιπιολογία κνησμού). Σήμερα έχει αποδειχθεί σε πειραματικά μοντέλα αλλά και στην κλινική πράξη ότι ο κνησμός οφείλεται στα ενδογενή οπιοειδή λόγω του αυξημένου τόνου που παρουσιάζουν οι υποδοχείς τους στο ΚΝΣ σε παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από χολόσταση (κεντρική αιπιολογία κνησμού). Επιπλέον, έχει ενοχοποιηθεί και διαταραχή της λειτουργίας του τόνου των σεροτονινεργικών υποδοχέων στο ΚΝΣ (5-HT<sub>3</sub> υποδοχείς σεροτονίνης). Ένα άλλο κυρίαρχο σύμπτωμα της νόσου (πολλές φορές μπορεί να είναι και το μοναδικό) αποτελεί το αίσθημα κόπωσης που είναι σημαντικού βαθμού, παρατηρείται σε 60-80% των ασθενών, δεν αποδίδεται στα πλαίσια της χρόνιας νόσου (419, 432, 433) και δεν οφείλεται σε άσκηση ούτε βελτιώνεται με την ξεκούραση (434). Αντίθετα, πιστεύεται ότι είναι αποτέλεσμα του αυξημένου τόνου των σεροτονινεργικών υποδοχέων στο ΚΝΣ λόγω της παρατεταμένης χολόστασης (5-HT<sub>2</sub> υποδοχείς σεροτονίνης) (435-440).

Συχνά κατά την διάγνωση υπάρχει ηπατοσπληνομεγαλία. Λόγω της επακόλουθης από τη χολόσταση υπερχοληστερολαιμίας (441), είναι δυνατόν να παρατηρηθούν ξανθώματα (δέρμα, τένοντες) και ξανθελάσματα (βλέφαρα). Η παρουσία ικτέρου και σημείων πυλαίας υπέρτασης αποτελούν όψιμα ευρήματα. Όχι σπάνια η νόσος επιπλέκεται από στεατόρροια, οστεοπόρωση, οστεομαλακία ασυμπτωματική βακτηριουρία (442) η οποία πρέπει μάλλον να θεραπεύεται και συχνά επεισόδια κολπίτιδων. Οι δερματολογικές εκδηλώσεις της ΠΧΚ όπως αυτές μελετήθηκαν από τους Koulemtaki και συνεργάτες (443) περιλαμβάνουν τις μυκητιάσεις (ονυχομυκητιάσεις, μυκητιάσεις δακτύλων) που αποτελούν το 31.5% όλων των αλλοιώσεων, κνησμό (69.3% των ασθενών έναντι 22.2% της ομάδας των υγιών), ξηροδερμία (69.3% έναντι 2.2%), δερμογραφισμό (57.1% έναντι 4.4%), και υπέρχρωση του δέρματος (46.9% έναντι 0% στους υγιείς). Στο 38.7% των ασθενών, η δερματολογική βλάβη ήταν η πρωταρχική εκδήλωση της νόσου (443).

Τέλος, η ΠΧΚ μπορεί να συνοδεύεται από άλλα αυτοάνοσα νοσήματα όπως το σύνδρομο Sicca (ξηροφθαλμία, ξηροστομία), το σύνδρομο Sjogren (ξηροφθαλμία, ξηροστομία, διόγκωση παρωτίδων), ρευματοειδή αρθρίτιδα, αυτοάνοσα νοσήματα θυρεοειδούς, μεικτή νόσο του συνδετικού ιστού,

πολυμυοσίτιδα, ρευματική πολυμυαλγία, σκληρόδερμα, σύνδρομο Crest, συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, φαινόμενο Raynaud, μασθένεια Gravis, ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, ελκώδη κολίτιδα, νόσο Crohn, λεύκη, κακοήθη αναιμία Biermer, αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία και σπειραματονεφρίτιδα (444-449).

### 5.2.3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΧΟΛΙΚΗΣ ΚΙΡΡΩΣΗΣ

Εργαστηριακά, παρατηρείται αύξηση των χολοστατικών ενζύμων και της χοληστερόλης ενώ σε προχωρημένα στάδια υπάρχει και αύξηση της χολερυθρίνης (κυρίως άμεση ή συζευγμένη). Η χολερυθρίνη αποτελεί τον καλύτερο προγνωστικό εργαστηριακό δείκτη σχετικά με την αναγκαιότητα ή όχι μεταμόσχευσης ήπατος (απόλυτη ένδειξη όταν είναι >10 mg/dl). Η αύξηση της αλκαλικής φωσφατάσης σε επίπεδα μεγαλύτερα από το τριπλάσιο του φυσιολογικού είναι αρκετά ειδική για την ΠΧΚ (μικρότερες αυξήσεις μπορεί να οφείλονται και σε άλλες διαταραχές όπως είναι χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες, κίρρωση, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια). Η αύξηση της γ-GT δεν είναι ειδική καθώς η γ-GT βρίσκεται και σε πολλούς εξωηπατικούς ιστούς όπως νεφρούς, σπλήνα, πάγκρεας, καρδιά, πνεύμονες, εγκέφαλο. Στην ΠΧΚ υπάρχει επίσης υπεργαμμασφαιριναιμία στις περισσότερες περιπτώσεις οφειλόμενη σε μεγάλη αύξηση της IgM ανοσοσφαιρίνης. Όπως βρέθηκε σε μια μελέτη των Mahl και συνεργατών (450), οι οποίοι συνέκριναν κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά κατά την στιγμή της διάγνωσης σε 243 ασθενείς με συμπτωματική νόσο και σε 36 ασυμπτωματικούς ασθενείς με ΠΧΚ, η συχνότητα εμφάνισης ικτέρου ήταν 59%, μελάγχρωσης 42%, ηπατομεγαλίας 74% και σπληνομεγαλίας 47% στους συμπτωματικούς ασθενείς, ενώ στην ομάδα των ασυμπτωματικών ασθενών ήταν 6%, 13%, 50% και 12% αντίστοιχα. Οι εργαστηριακοί δείκτες της χολόστασης συμπεριλαμβανομένων των επιπέδων της χολερυθρίνης και της χοληστερόλης ήταν επίσης σημαντικά υψηλότεροι στους συμπτωματικούς ασθενείς ενώ η αλβουμίνη του ορού σημαντικά χαμηλότερη υποδηλώνοντας προχωρημένη νόσο.



#### 5.2.4. ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΧΟΛΙΚΗΣ ΚΙΡΡΩΣΗΣ

Ο ρόλος των οιστρογόνων που πιθανά εξηγεί και την κυριαρχία των γυναικών στην νόσο αυτή έχει μελετηθεί, αν και τα δεδομένα που υποστηρίζουν την αυτή την υπόθεση είναι περιορισμένα (451). Επειδή ως αποτέλεσμα της χρόνιας χολόστασης μπορεί να παρατηρηθεί απώλεια οστικής μάζας και χρησιμοποιείται θεραπεία με οιστρογόνα (452, 453), είναι δύσκολο να εκτιμηθεί αν η ορμονική θεραπεία προκαλεί τη νόσο ή είναι η συνέπιά της. Πάντως μια διαταραγμένη κατανομή των υποδοχέων των οιστρογόνων έχει πρόσφατα βρεθεί σε ήπαρ ασθενών με διαφορετικά στάδια ΠΧΚ (454). Επίσης έχει παρατηρηθεί υψηλή συχνότητα διαταραχών της εμμήνου ρύσεως σε γυναίκες με ΠΧΚ (455). Ο ρόλος αυτών των οιστρογόνων ενισχύεται και από την αυξημένη συσχέτιση της ΠΧΚ με καρκίνο του μαστού (456) αν και το εύρημα αυτό δεν επιβεβαιώθηκε σε άλλες μελέτες (457).

Γενετικοί παράγοντες φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο καθορίζοντας την «ευαισθησία» για την εκδήλωση της νόσου όπως διαπιστώνεται από το υψηλό ποσοστό της ανάμεσα σε μονοζυγωτικά δίδυμα (458) καθώς και την αυξημένη επίπτωση σε πρώτου βαθμού συγγενείς ατόμων που έχουν ήδη προσβληθεί από τη νόσο (459). Μια πιθανή επίσης σχέση της ΠΧΚ με το κάπνισμα μπορεί να εξηγηθεί από την μέσω του καπνού T-helper-1 (Th1) επαγόμενη παραγωγή κυτταροκινών (460) η οποία φαίνεται να είναι η κυρίαρχη απόκριση τουλάχιστον στα προχωρημένα στάδια (2-4) της νόσου (461).

Σύγχρονες θεωρίες για την παθογένεια της ΠΧΚ είναι υπέρ της υπόθεσης ότι η νόσος εξελίσσεται σαν αποτέλεσμα διαταραγμένης ανοσολογικής απάντησης που ακολουθεί τη διέγερση από έναν περιβαλλοντικό ή λοιμώδη παράγοντα. Όπως και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα φαίνεται ότι υπάρχει μια γενετικά καθοριζόμενη «ευαισθησία» και κάποιο εναρκτήριο (triggering) γεγονός διεγείρει την ανοσολογική επίθεση στα ενδοηπατικά χοληφόρα η οποία στη συνέχεια διαιωνίζεται (ανεπάρκεια ανοσορύθμισης). Ο παθογενετικός μηχανισμός πιστεύεται ότι προκαλείται από μια διαταραχή στην ανοσολογική ανοχή που έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό των ειδικών T- και B-λεμφοκυτταρικών κλώνων και την παραγωγή κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων παράλληλα με κυτταροκίνες και άλλους φλεγμονώδεις μεσολαβητές (462). Τα τελευταία

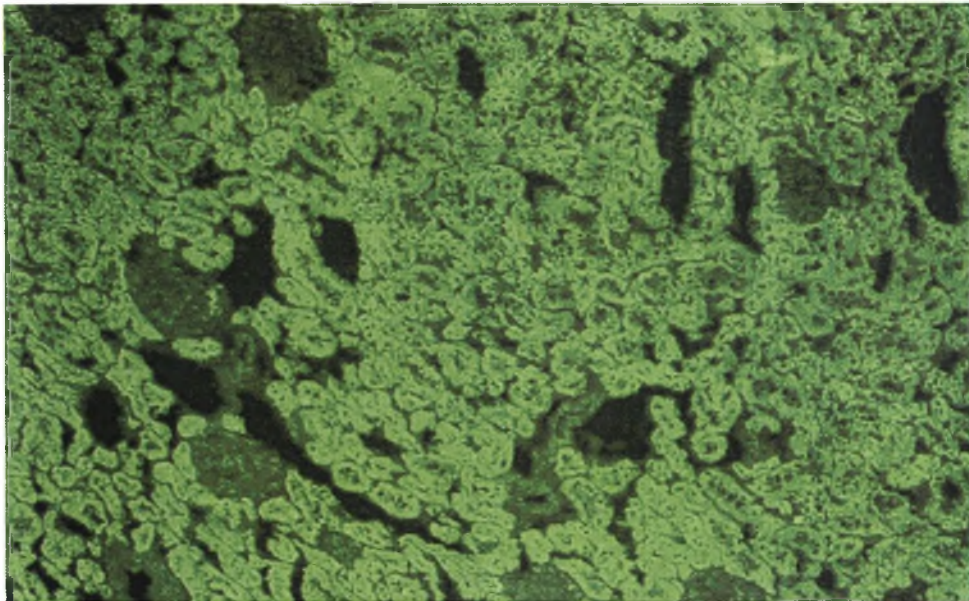
χρόνια η μελέτη των μηχανισμών που οδηγούν σε διαταραχή της ανοσολογικής ανοχής έναντι της E2 υπομονάδας του συμπλέγματος της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης επικεντρώθηκε σε διάφορους λοιμώδεις παράγοντες που διεγείρουν την εμφάνιση της νόσου. Πράγματι, έχουν ενοχοποιηθεί διάφορα βακτήρια και ιοί (442, 463, 464). Μοριακή μίμηση ανάμεσα στα ενδογενή αντιγόνα και εξωγενείς πρωτεΐνες (παθογόνα) είναι μια από τις υποθέσεις που εξηγεί πώς αυτοαντισώματα και εξωγενείς πρωτεΐνες μπορεί να διαταράξουν την ανοσολογική ανοχή και να οδηγήσουν σε αυτοάνοσα νοσήματα. Την υπόθεση της μοριακής μίμησης στην αιτιοπαθογένεια της ΠΧΚ υποστηρίζουν διάφορα μοντέλα που περιλαμβάνουν την *E. coli* (463, 465), την *Pseudomonas aeruginosa* (466), το *Mycobacterium gordonae* (467, 468), το *Novosfingobium aromaticivorans* (469), το *Chlamydia pneumoniae* (470, 471) και πρόσφατα τη *B. Burgdorferi* (472). Παρόλα αυτά, μέχρι στιγμής επίσημα δεν έχει επιβεβαιωθεί ο ρόλος κάποιου ειδικού μικροβιολογικού παράγοντα στην ΠΧΚ αν και η πιθανότητα του παθοφυσιολογικού ρόλου κάποιων δεν μπορεί να αποκλεισθεί.

Σχετικά τώρα με τη συμμετοχή διαφόρων μεσολαβητών φλεγμονής φαίνεται ότι τα ηωσινόφιλα κατέχουν κεντρικό ρόλο τουλάχιστον στα αρχικά στάδια της νόσου (473). Έκφραση της ιντερλευκίνης-5 (IL-5) που παίζει σημαντικό ρόλο στην προαγωγή της διαφοροποίησης των ηωσινοφίλων καθώς και αυξημένα επίπεδα ηωσινοφιλικής κατιονικής πρωτεΐνης έχουν αναφερθεί στο ήπαρ και τον ορό ασθενών με ΠΧΚ (474, 475). Έχουν αναφερθεί επίσης από την ομάδα μας, τέσσερις ασθενείς με ασυμπτωματική ΠΧΚ που παρουσίαζαν περιφερική ηωσινοφιλία σε τυχαίο έλεγχο (476). Η ενεργοποίηση των ηωσινοφίλων που προκαλείται από τις κυτταροκίνες IL-3, και IL-5 σχετίζεται με την T-helper-2 (Th2) κυτταρική απόκριση. Εντούτοις, στο ήπαρ ασθενών με ΠΧΚ έχουν παρατηρηθεί τόσο Th1 όσο και Th2 αυτοδραστικά κύτταρα (477). Φαίνεται ότι μια και τα ηωσινόφιλα βρίσκονται στα αρχικά στάδια της νόσου, στην αρχή της νόσου υπάρχει Th2 κυτταρική απόκριση που μετά ακολουθείται άγνωστο πότε και για ποιο λόγο από Th1 απόκριση (473, 478).

## 5.2.5. ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ

### 5.2.5.α. ΑΝΤΙΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (AMA)

Ακρογωνιαίος λίθος στη διάγνωση της ΠΧΚ είναι η ανίχνευση των AMA (479, 480). Τα AMA ανιχνεύονται με έμμεσο ανοσοφθορισμό στο 95% των περιπτώσεων ΠΧΚ γι' αυτό και θεωρούνται παθογνωμονικά της νόσου (η ειδικότητά τους αγγίζει το 100% όταν οι τίτλοι είναι >1:160). Στην τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα ιστικές τομές κρυστάτη από ήπαρ και νεφρούς αρουραίων. Το χαρακτηριστικό πρότυπο των AMA αποτελεί η θετική φθορίζουσα αντίδραση τόσο στα εγγύς όσο και στα άπω νεφρικά σωληνάρια, ενώ το σπείραμα είναι αρνητικό.



**Εικόνα 15.** Αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA) που ανιχνεύτηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε ιστικές τομές κρυστάτη από νεφρό αρουραίου (μεγέθυνση 40<sup>x</sup>). Το πρότυπο φθορισμού των AMA είναι η θετική φθορίζουσα αντίδραση στα εγγύς και άπω νεφρικά σωληνάρια.

Το μιτοχονδριακό αντιγόνο των AMA που σχετιζόταν με την ΠΧΚ ονομάστηκε M2. Υπάρχουν και άλλα μιτοχονδριακά αντιγόνα που δίνουν το χαρακτηριστικό φθορισμό των AMA με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Αυτά ονομάστηκαν M1 (καρδιολιπίνη) και M3-M9. Μετά την ταυτοποίηση όμως των αυτοαντιγόνων στόχων των AMA στην ΠΧΚ καθώς και μετά από τη χρήση επιπλέον μεθόδων ανίχνευσής τους

(ανοσοαποτύπωση και ELISA) έγινε αντιληπτό ότι τα άλλα (πλην αντι-M2) AMA ελάχιστα σχετίζονταν με τη νόσο.

Τα μιτοχονδιακά αυτοαντιγόνα-στόχοι των AMA στην ΠΧΚ αποτελούν συστατικά (ενζυμικές υπομονάδες) του συμπλέγματος της 2-κετοξικής δεϋδρογονάσης(2-OADC) που εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων των θηλαστικών (481, 482). Σχεδόν σε κάθε περίπτωση η αντιδραστικότητα του αντισώματος κατά του ενζυμικού συμπλέγματος αφορά κυρίως την E2 ενζυμική υπομονάδα (483, 484). Περιλαμβάνονται η E2 υπομονάδα του συμπλέγματος της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης (PDC-E2), η E2 υπομονάδα του συμπλέγματος της κετοξικής δεϋδρογονάσης με διασταυρούμενη αλυσίδα (BCOADC-E2) και η E2 υπομονάδα του συμπλέγματος της 2 κετογλουταρικής δεϋδρογονάσης (OGDC-E2).

Ο προσδιορισμός των AMA με ELISA φαίνεται να έχει μεγαλύτερη ευαισθησία (98%) για τη διάγνωση της ΠΧΚ από τον έμμεσο ανοσοφθορισμό γεγονός που την καθιστά χρήσιμη σε αμφισβητούμενες περιπτώσεις ιδιαίτερα μάλιστα όταν το εργαστήριο εκτέλεσης του έμμεσου ανοσοφθορισμού δεν είναι «οικείο» με το πρότυπο των AMA ή χρησιμοποιεί εμπορικά διαθέσιμους ιστούς (485). Πράγματι, έχει βρεθεί με ELISA ότι αντισώματα που αντιδρούν με το E2 στοιχείο του συμπλέγματος της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης βρίσκονται στο 90-95% των ασθενών με ΠΧΚ (483).

Ανοσοαποτύπωση ορών ασθενών με ΠΧΚ έδειξε ότι 95% των ασθενών που ήταν AMA θετικοί με ανοσοφθορισμό είχαν αντισώματα με δραστικότητα έναντι PDC-E2 (483). Ανοσοαποτύπωση και ELISA των ορών ασθενών με ΠΧΚ έναντι PDC ανθρώπινης προέλευσης επιβεβαιώνουν την υπόθεση ότι αυτά τα αντισώματα αντιδρούν με αυτοαντιγόνα (486). Αντισώματα που αντιδρούν με το E3BP (πρωτύτερα γνωστό ως πρωτεΐνη X) είναι παρόντα σε όλους τους ασθενείς που δείχνουν αντιδραστικότητα κατά PDC-E2 (483). Οι αντι-PDC-E3BP και αντι-PDC-E2 ανοσολογικές απαντήσεις φαίνεται να παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντίδραση, αν και υπάρχει μια πιο εκτενής κατανομή των αυτό-επιτόπων των B κυττάρων στο PDC-E2 σε σχέση με το E3BP. Ο βαθμός διασταυρούμενης αντίδρασης στο επίπεδο των B κυττάρων ανάμεσα σε PDC-E2 και E3BP έχει δείξει ότι ορολογικές προσεγγίσεις δεν μπορούν να τεκμηριώσουν σε πιο από αυτά τα αντιγόνα συμβαίνει η αρχική διαταραχή της ανοσολογικής ανοχής (η υψηλότερη

κατανομή των Β κυτταρικών επιτόπων ανάμεσα στα PDC-E2 σε σχέση με τα E3BP δείχνει ότι πιθανόν το «σπάσιμο» της ανοσολογικής ανοχής συμβαίνει σε έναν επίτοπο του PDC-E2 που παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με το E3BP). Μια πρόσφατη μελέτη σε ασθενείς με ΠΧΚ που δείχνει την πλήρη απουσία των Τ κυττάρων που αντιδρούν με την ανθρώπινη ανασυνδυασμένη E3BP πρωτεΐνη (σε αντίθεση με τις απαντήσεις που βρέθηκαν στο ανασυνδυασμένο PDC-E2 σε περισσότερους από 90% από τους ίδιους ασθενείς) δείχνει μάλλον ότι η διαταραχή της ανοσολογικής ανοχής οφείλεται κυρίως -αν όχι πλήρως- στο PDC-E2 (487).

Αντισώματα που αντιδρούν με τις E1α και E1β υπομονάδες του PDC (που δεν έχουν διασταυρούμενη αντίδραση με το PDC-E2 και το PDC-E3BP) βρίσκονται σε μικρότερη συχνότητα (40% και 10% των ασθενών με ΠΧΚ αντίστοιχα) (488, 489). Αντισώματα έναντι στα E2 στοιχεία του OGDC (κετογλουταρική δεϋδρογονάση) και BCOADC (2-κετοξική δεϋδρογονάση με διασταυρούμενη αλυσίδα) ανευρίσκονται σε 90% και 50% των ασθενών με ΠΧΚ αντίστοιχα (490-492). Αντισώματα δεν ανευρίσκονται έναντι της E3 υπομονάδας του PDC, OGDC και BCOADC και κατά των E1 υπομονάδων του OGDC και BCOADC. Το OGDC και BCOADC δεν έχουν E3BP.

Σημαντικές ερωτήσεις που δεν έχουν ακόμη απαντηθεί αφορούν τον μηχανισμό μέσω του οποίου διαταράσσεται η ανοσολογική ανοχή σε αντιγόνα όπως το PDC, OGDC και BCOADC και τους λόγους για τους οποίους η διαταραχή της ανοσολογικής ανοχής προκαλεί μια νόσο με τόσο περιορισμένη ιστική καταστροφή, που αφορά μόνο στα ενδοηπατικά χοληφόρα. Ένα ακόμη ερώτημα που πρέπει να απαντηθεί είναι ο ακριβής ρόλος των αντι-PDC αντισωμάτων στην παθογένεια της κυτταρικής βλάβης στην ΠΧΚ (493). Η παρατήρηση ότι η διαπλακουντιακή μεταφορά IgG αντι-PDC αντισωμάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί και συσχετίζεται σε τουλάχιστον δύο περιπτώσεις με ηπατική καταστροφή στο νεογνό αυξάνει την πιθανότητα τα αντι-PDC αντισώματα (AMA) να παίζουν κάποιο ρόλο στην παθογένεια της νόσου (494).

Μια άλλη πιθανότητα είναι τα AMA να παίζουν μικρό ρόλο στην κυτταρική καταστροφή στην ΠΧΚ και η κυτταρική βλάβη να είναι αποτέλεσμα της Τ κυτταρικής απάντησης (495-500). Εάν η Τ κυτταρική απόκριση παίζει πράγματι κυρίαρχο ρόλο στην παθογένεια της ΠΧΚ είναι ίσως περίεργο που η

συσχέτιση με το αντιγόνα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) είναι σχετικά ασθενής (501). Πρόσφατη πειραματική μελέτη σε SJL/J ποντίκια έδειξε ότι η ευαισθητοποίηση των ποντικών με PDC μπορεί να οδηγήσει σε ανοσολογικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά ΠΧΚ μέσω ειδικής T-κυτταρικής απόκρισης (η παραγωγή αυτοδραστικών αντι-PDC T-κυττάρων σχετίζονταν απόλυτα με την παρουσία και την κινητική της ιστικής καταστροφής) (502-505).

Σε αντίθεση με την αβέβαιη παθολογική τους συσχέτιση, η σημασία των αντι-M2 AMA σαν διαγνωστικούς δείκτες της ΠΧΚ δεν μπορεί να αγνοηθεί. Τα αντι-M2 AMA είναι ανάμεσα στους πιο ευαίσθητους και ειδικούς ορολογικούς δείκτες για τη νόσο. Περισσότεροι από 95% των ασθενών με χολοστατικού τύπου βλάβη στη βιοψία ήπατος και αύξηση των χολοστατικών ενζύμων είναι θετικοί για τα AMA με ανοσοφθορισμό και έχουν αντι-PDC αντισώματα με ανοσοαποτύπωση ή ELISA. Η βιοψία ήπατος συστήνεται για να επιβεβαιώσει τη διάγνωση και για να επιτρέψει τη σταδιοποίηση αν και η ανάγκη για σταδιοποίηση αμφισβητείται έντονα καθώς δεν είναι αντιπροσωπευτική της συνολικής έκτασης της βλάβης τόσο από πλευράς δραστηριότητας όσο και ίνωσης.

Εντούτοις, φαίνεται ότι η παρουσία των AMA σχετίζεται ισχυρά με την παρουσία ιστολογικών βλαβών ΠΧΚ στο ήπαρ. Το 1986 δημοσιεύθηκαν τα αποτελέσματα μιας μελέτης που πραγματοποιήθηκε σε μια σειρά ασθενών που ήταν AMA θετικοί αλλά δεν είχαν κανένα σύμπτωμα ΠΧΚ και είχαν φυσιολογική ηπατική βιοχημεία (418). Εικοσιτέσσερις από τους 29 ασθενείς βρέθηκαν να έχουν ιστολογικά χαρακτηριστικά διαγνωστικά ή συμβατά με ΠΧΚ (418). Το 1996 δημοσιεύθηκαν τα αποτελέσματα από τη μακροχρόνια παρακολούθηση αυτών των ασθενών (διάμεση παρακολούθηση 17.8 χρόνια) (506). Από τους αρχικούς 29 ασθενείς, οι 22 (76%) είχαν αναπτύξει τυπικά συμπτώματα ΠΧΚ και οι 24 (83%) παρουσίασαν διαταραγμένη ηπατική βιοχημεία με διαταραχή των χολοστατικών ενζύμων. Αν και κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης 5 ασθενείς πέθαναν κανείς από τους θανάτους δεν ήταν σχετιζόμενος με την ηπατική βλάβη και από τους 10 που έκαναν βιοψία ήπατος για κλινικούς λόγους κανείς δεν ανέπτυξε κίρρωση (506). Η αναλογία των αρχικά ασυμπτωματικών ασθενών (AMA θετικοί) που τελικά θα αναπτύξουν συμπτώματα ΠΧΚ μελετήθηκε και σε μια σειρά από ασθενείς σε

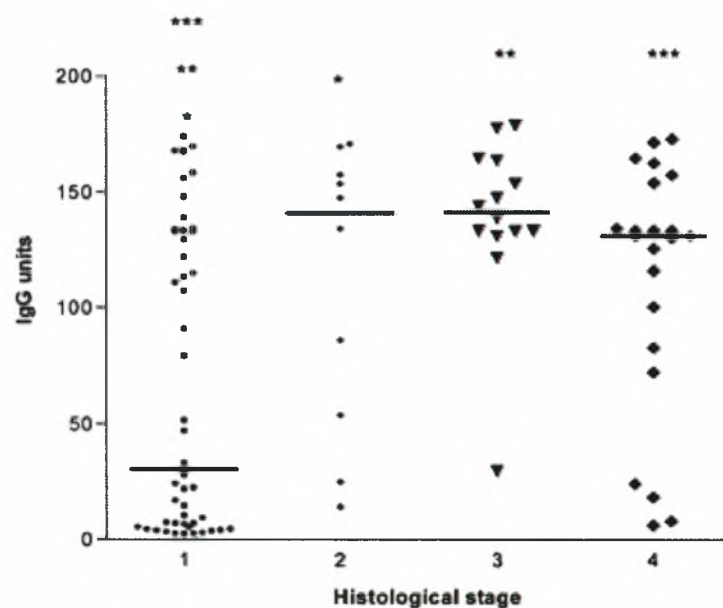
διάφορα άλλα κέντρα όπως στην Αγγλία, Σουηδία και Αμερική (415, 430, 450, 506, 507). Συμπερασματικά από αυτές τις μελέτες φαίνεται ότι η παρουσία των AMA υποδεικνύει σε μεγάλο βαθμό την ύπαρξη ιστολογικών βλαβών ΠΧΚ, ακόμη και σε απουσία συμπτωμάτων ή διαταραγμένης ηπατικής βιοχημείας. Οι ασθενείς αυτοί μακροχρόνια, φαίνεται ότι θα αναπτύξουν κλασσική κλινική εικόνα ΠΧΚ αν και η νόσος είναι μάλλον λιγότερο εξελικτική από την κλασσική εικόνα. Συνεπώς όλοι οι AMA θετικοί ασθενείς ανεξαρτήτως συμπτωμάτων ή βιοχημικής δραστηριότητας θα πρέπει να παρακολουθούνται.

#### 5.2.5.β. ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Δεν είναι ακόμη διευκρινισμένο αν ο τίτλος των AMA που παρατηρείται σε ασθενείς με ΠΧΚ έχει κάποια προγνωστική σημασία για τη σοβαρότητα και την εξέλιξη της νόσου. Μια μελέτη με τη χρήση ELISA έδειξε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στο στάδιο της νόσου και τον τίτλο των IgG AMA αντισωμάτων (485). Αυτή η παρατήρηση φαίνεται να συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποίησαν έμμεσο ανοσοφθορισμό για την ανίχνευση των AMA, και έδειξαν αυξανόμενο τίτλο AMA όσο εξελίσσεται η νόσος (416, 508). Σε μια πρόσφατη μελέτη, στην οποία χρησιμοποιήθηκε MIT3-ELISA για την ανίχνευση IgG και IgA ισοτύπων των AMA, βρέθηκε ότι τα IgG AMA χαρακτηρίζουν ασθενείς με ΠΧΚ με περισσότερο σοβαρή νόσο όπως αποδείχτηκε από την ιστολογία ήπατος αλλά και τα υψηλότερα επίπεδα της ALP, ουρίας, IgG και IgM (509). Η μέση τιμή των IgG AMA που ανιχνεύτηκαν με MIT3-ELISA διέφερε σημαντικά μεταξύ των ασθενών με ΠΧΚ όταν αυτοί διαιρέθηκαν σε τέσσερις ομάδες σύμφωνα με το ιστολογικό τους στάδιο I-IV. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι η μέση τιμή των IgG AMA ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους ασθενείς με ΠΧΚ με στάδιο I [30.5 (2.4-173.5)] σε σχέση με το στάδιο II [140.5 (14.2-170.6)  $p < 0.02$ ], III 140.9 (29.6-178.4)  $p < 0.001$ ] και IV [130.7 (6.1-172.4)  $p = 0.006$ ] (εικόνα 16). Ωστόσο, οι ισοτύποι IgG των AMA δεν ήταν προγνωστικοί δείκτες της εξέλιξης της νόσου (509).

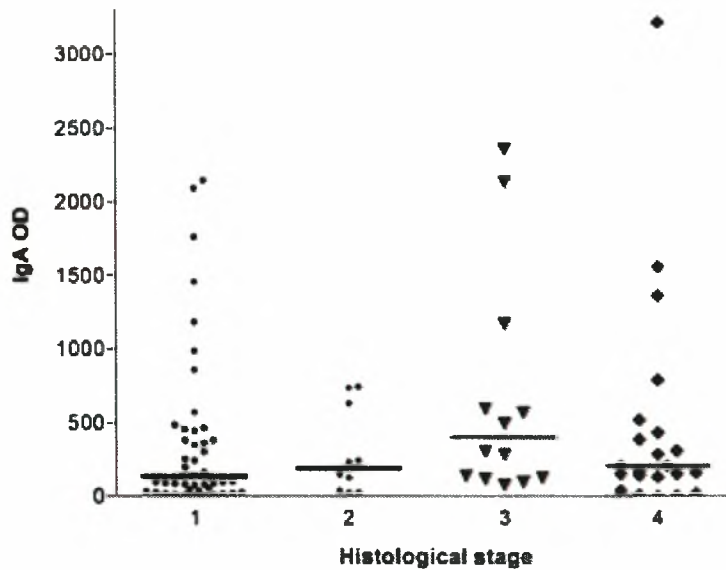
Πρόσφατα παρατηρήθηκε συσχέτιση ανάμεσα στον τίτλο των IgA AMA του ορού και την ηπατική φλεγμονώδη δραστηριότητα τόσο σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με UDCA όσο και σε ασθενείς χωρίς θεραπεία (510).

Αντίθετα, μια άλλη μελέτη που έγινε αργότερα δεν έδειξε συσχέτιση ανάμεσα στον τίτλο των AMA (με ανοσοφθορισμό ή με ELISA) και τη σοβαρότητα της νόσου όπως εκτιμήθηκε από το Mayo score, ένα έγκυρο προγνωστικό διαγνωστικό μοντέλο (511). Η έρευνα των Gabetta και συνεργατών (509) έδειξε ότι η μέση τιμή των IgA με MIT3-ELISA δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των τεσσάρων ιστολογικών ομάδων των ασθενών με ΠΧΚ (εικόνα 17). Όπως και οι ισότυποι IgG των AMA έτσι και οι ισότυποι IgA των AMA δεν προδικάζουν την έκβαση της νόσου.



**Εικόνα 16.** Κατανομή των τιμών IgG AMA με MIT3-ELISA σύμφωνα με το ιστολογικό στάδιο της Πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης. Η μέση τιμή φαίνεται στις οριζόντιες γραμμές. Συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων: \* $p < 0.02$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p = 0.006$  (Από το: Diagnostic Relevance and Clinical Significance of the New Enhanced Performance M2 [MIT3] ELISA for the Detection of IgA and IgG Antimitochondrial Antibodies in Primary Biliary Cirrhosis. *J Clin Immunol* 2007; 27).





**Εικόνα 17.** Κατανομή των τιμών των IgA AMA με MIT3-ELISA σύμφωνα με το ιστολογικό στάδιο της Πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης. Η μέση τιμή απεικονίζεται στις οριζόντιες γραμμές. (Από το: Diagnostic Relevance and Clinical Significance of the New Enhanced Performance M2 [MIT3] ELISA for the Detection of IgA and IgG Antimitochondrial Antibodies in Primary Biliary Cirrhosis. *J Clin Immunol* 2007; 27).

Η εξελισσόμενη ΠΧΚ μπορεί να προβλεφθεί ακόμη και στα αρχικά της στάδια όταν βρίσκονται στον ορό αντισώματα αντι-M2 και αντι-M4 (512). Οι Corpechot και συνεργάτες (513) έδειξαν ότι υψηλές τιμές χολερυθρίνης και χαμηλές τιμές αλβουμίνης είναι προγνωστικοί παράγοντες εξέλιξης σε κίρρωση κάτω από θεραπεία με UDCA. Ωστόσο, ο πιο σημαντικός παράγοντας για ταχέως εξελισσόμενη ΠΧΚ είναι τα υψηλά επίπεδα αντι-M2 και αντι-M4 αντισωμάτων στον ορό ασυμπτωματικών ασθενών. Με αυτή την παρατήρηση συμφωνούν και οι Kisand και συνεργάτες (514) και οι Flisiak και συνεργάτες (515). Σε πρόσφατη μελέτη των Rigoroulou και συνεργατών βρέθηκε ότι οι ισότυποι IgG3 των AMA συσχετίστηκαν με ιστολογικά προχωρημένη νόσο και κίρρωση (516). Υπήρχε επίσης θετική συσχέτιση ανάμεσα στον τίτλο των IgG3 AMA και του Mayo σκορ.

Σχετικά με την «καλύτερη» μέθοδο προσδιορισμού των AMA πρέπει να σημειωθεί ότι ο έμμεσος ανοσοφθορισμός εξακολουθεί να αποτελεί την κυριότερη μέθοδο ρουτίνας (τουλάχιστον στην Ευρώπη) έχοντας περίπου 100% ειδικότητα σε τίτλους μεγαλύτερους από 1:80 (517) αλλά είναι μέθοδος χρονοβόρος που εξαρτάται από τον παρατηρητή. Εναλλακτικές μέθοδοι όπως

η ELISA και μέθοδοι που βασίζονται στην ικανότητα των AMA να αναστέλλουν την ενζυματική λειτουργία της PDC (509, 518-523) καθώς και οι μέθοδοι ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιούνται σε μεγάλη έκταση.

Η χρήση μεθόδου ELISA που χρησιμοποιεί βιολογικά κεκαθαρισμένο σύμπλεγμα PDC-E2/E3BP έχει αποδειχθεί ότι έχει 93% ευαισθησία και 96% ειδικότητα για τη διάγνωση της ΠΧΚ. Η χρήση του PDC-E2/E3BP συμπλέγματος έχει το πλεονέκτημα ότι περιέχει και τις δύο κύριες αντιγονικές πρωτεΐνες. Το μειονέκτημα είναι ότι απαιτεί αντιγόνο που παράγεται από ιστό και συνεπώς δεν είναι πρακτικό για ευρεία εργαστηριακή χρήση. Η χρήση ELISA βασιζόμενης σε ανασυνδυασμένα αντιγόνα είναι θεωρητικά ελκυστική. Φαίνεται πάντως ότι αν και η ειδικότητα των μεθόδων ELISA που χρησιμοποιούν ανασυνδυασμένα αντιγόνα είναι πραγματικά εντυπωσιακή, η ευαισθησία είναι μάλλον μικρότερη από τον ανοσοφθορισμό ή ELISA που χρησιμοποιεί ολόκληρο το αντιγόνο (518, 522). Οι λόγοι για τη χαμηλή ευαισθησία είναι αφενός μεν το θέμα της διαμόρφωσης των επιτόπων, που μειώνονται ή χάνονται στα ανασυνδυασμένα μόρια αφετέρου δε η ύπαρξη μιας μικρής ομάδας ασθενών με ΠΧΚ που έχουν AMA που αντιδρούν αποκλειστικά με μη-PDC-E2 μιτοχονδριακά αντιγόνα (PDC-E1, PDC-E3BP, OGDC-E2, BCOADC-E2). Πράγματι, αν και τα ανασυνδυασμένα μόρια περιέχουν OGDC-E2 και BCOADC-E2 επιπρόσθετα με την PDC-E2, δεν είναι αποτελεσματικά για τη διάγνωση ασθενών με μονοειδική αντιδραστικότητα έναντι PDC-E1 (2% των ασθενών). Συνεπώς για τους περισσότερους ασθενείς οι ELISAs που βασίζονται σε ανασυνδυασμένα αντιγόνα θα ανιχνεύσουν την παρουσία των AMA ικανοποιητικά. Είναι σημαντικό ωστόσο να θυμόμαστε την πιθανότητα ψευδώς αρνητικών ευρημάτων από μη-PDC-E2 απαντήσεις ή απαντήσεις σε αποκλειστικά διαμορφωμένα αντιγόνα. Συνεπώς εάν η κλινική υποψία για ΠΧΚ είναι υψηλή αλλά ο ασθενής είναι αντι-M2 αρνητικός με ELISA, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός θα έπρεπε να χρησιμοποιείται. Πρόσφατα περισσότερο ευαίσθητες ELISAs που χρησιμοποιούν PDC-E2, BCOADC-E2, OGDC-E2 σαν αντιγόνα έχουν εξελιχθεί και χρησιμοποιούνται (509, 522, 524-526). Τελευταία χρησιμοποιείται με επιτυχία και η νέα EP M2 ELISA (MIT3) για την ανίχνευση των IgG και IgA ειδικών ισοτύπων των AMA σε ασθενείς με ΠΧΚ συμπεριλαμβανομένων και ασθενών με αρνητικά AMA στον έμμεσο ανοσοφθορισμό. Η ELISA αυτή

χρησιμοποιεί το ανασυνδυασμένο MIT3 αντιγόνο που περιέχει τους τρεις κυρίαρχους επιτόπους PDC-E2, BCOADC-E2 και OGDC-E2 (509).

Η ELISA αυτή είχε υψηλότερη ειδικότητα και ευαισθησία για την ανίχνευση των AMA σε σχέση με τον έμμεσο ανοσοφθορισμό και την παραδοσιακή αντι-M2 ELISA καθώς ανίχνευσε την παρουσία AMA στους μισούς από τους AMA αρνητικούς ασθενείς (στον έμμεσο ανοσοφθορισμό) (509).

Η ανοσοαποτύπωση έχει βρεθεί ότι έχει 100% ευαισθησία και μπορεί να ανιχνεύσει ανεξάρτητη δραστηριότητα στα 2-OADC ένζυμα (527, 528). Σε συγκεκριμένη μελέτη (529) που χρησιμοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση η ευαισθησία, ειδικότητα, θετική προγνωστική αξία, αρνητική προγνωστική αξία και ακρίβεια ήταν αντίστοιχα 99%, 86%, 89%, 99% και 93%. Εν τούτοις, η ειδικότητά της δεν είναι καλά τεκμηριωμένη (530) ενώ από πλευράς κόστους φαίνεται ότι είναι περισσότερο ακριβή μέθοδος. Πρόσφατα βρέθηκε ότι οι τίτλοι των αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων στον ανοσοφθορισμό σχετίζονται με τον αριθμό και την ένταση των μιτοχονδριακών ταινιών στην ανοσοαποτύπωση σε ασθενείς με ΠΧΚ (523). Συγκεκριμένα βρέθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στην 74kDa ταινία που αντιστοιχεί στο κύριο PDC-E2 μιτοχονδριακό αντιγόνο και στον τίτλο των AMA στον έμμεσο ανοσοφθορισμό. Μόνο ένας μικρός αριθμός PDC-E2 αρνητικών ασθενών με ΠΧΚ έχουν ανιχνεύσιμα AMA με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Έτσι όταν ορός από ασθενή με ΠΧΚ είναι αρνητικός για AMA στον έμμεσο ανοσοφθορισμό πιθανότατα δεν θα μπορεί να αναγνωρίσει την τυπική 74kDa ταινία που αντιστοιχεί στο PDC-E2 (523).

Μια σημαντική ιδιότητα των AMA είναι η ικανότητά τους να αδρανοποιούν την καταλυτική λειτουργία του 2-OADC συμπλέγματος *in vitro* (531). Η μέθοδος αυτή μετρά την ικανότητα των AMA να αναστέλλουν την καταλυτική δραστηριότητα της PDC, είναι μη υποκειμενική σε σχέση με τον έμμεσο ανοσοφθορισμό, περισσότερο γρήγορη και τεχνικά πιο απλή σε σχέση με την ELISA, έχει περίπου 100% ειδικότητα (524, 530-535) αλλά η ευαισθησία της κυμαίνεται περίπου στο 80% (524, 530-534). Αυτή η χαμηλή ευαισθησία εξηγείται από το γεγονός ότι η μέθοδος αυτή δεν ανιχνεύει την ανασταλτική δραστηριότητα των AMA στα υπόλοιπα ένζυμα της οικογένειας 2-OADC όπως η BCOADC και η OGDC. Έτσι η μέθοδος αυτή αν και έχει

χαμηλό κόστος δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συγκεκριμένες περιοχές όπως η Ιαπωνία, λόγω του ότι στην χώρα αυτή έχουμε χαμηλότερη συχνότητα αυτοαντισωμάτων έναντι της PDC-E2 σε σχέση με τους Καυκάσιους με ΠΧΚ ενώ έχουμε υψηλότερη συχνότητα αντισωμάτων στις E2 υπομονάδες των άλλων 2-OADC ενζύμων (536).

#### 5.2.5.γ. ΑΝΤΙΠΥΡΗΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (ANA) ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ.

Μελέτες σε ορούς ασθενών με ΠΧΚ έδειξαν ότι το ένα τρίτο αυτών έχουν ANA με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού (537). Μια σημαντική παλαιότερη παρατήρηση ήταν ότι η μικρή ομάδα των ΠΧΚ ασθενών που ήταν AMA αρνητικοί είχαν ANA (538, 539). Νεότερες μελέτες έχουν δείξει ότι αυτό δεν ισχύει (540-544). Δύο τύποι πυρηνικού ανοσοφθορισμού (που περιγράφηκαν καλύτερα χρησιμοποιώντας Hep2 κύτταρα) έχουν περιγραφεί στην ΠΧΚ. Ο ένας τύπος δίνει χαρακτηριστικό περιφερικό δακτυλιοειδή φθορισμό (RLM-ANA) και ο άλλος τύπος φθορισμό από πολλαπλές πυρηνικές κηλίδες (MND-ANA)

Τα περισσότερα αυτοαντισώματα ασθενών με ΠΧΚ αναγνωρίζουν μια πρωτεΐνη 200 kDa (545, 546). Αυτή η πρωτεΐνη έχει αναγνωριστεί ως γλυκοπρωτεΐνη της πυρηνικής μεμβράνης gp210 (547), ένα εύρημα που επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι τα RLM-ANA αναγνωρίζουν ανασυνδυασμένη gp210 σε ELISA (548). Η ευαισθησία και η ειδικότητα των αντι-gp210 αντισωμάτων για τη διάγνωση της ΠΧΚ κυμαίνεται στο 10-25% και 95-100%, αντίστοιχα (548, 549) αν και χρησιμοποιώντας ειδικούς αντιορούς IgG υποτάξης (IgG1, IgG2, IgG3 και IgG4) η ευαισθησία αυξάνεται σημαντικά (540).

Αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αναγνώριση των επιτόπων του gp210 που αναγνωρίζονται από τα RLM-ANA. Η gp-210 αποτελείται από μια σειρά 1808 αμινοξέων που εντοπίζονται στον περιπυρηνικό χώρο και είναι σε συνέχεια με το ενδοπλασματικό δίκτυο, ένα μονό διαμεμβρανικό τμήμα και μια καρβοξυ-τελική ουρά από 58 αμινοξέα που αντικρύζει το σύμπλεγμα των πόρων της πυρηνικής μεμβράνης (550, 551). Οι Wersieska-Gadek και συνεργάτες (552) έχουν δείξει ότι τα αντι-gp210 ANA της ΠΧΚ αντιδρούν με μια αλυσίδα 15 αμινοξέων στο κυτταροπλασματικό C-τελικό άκρο που

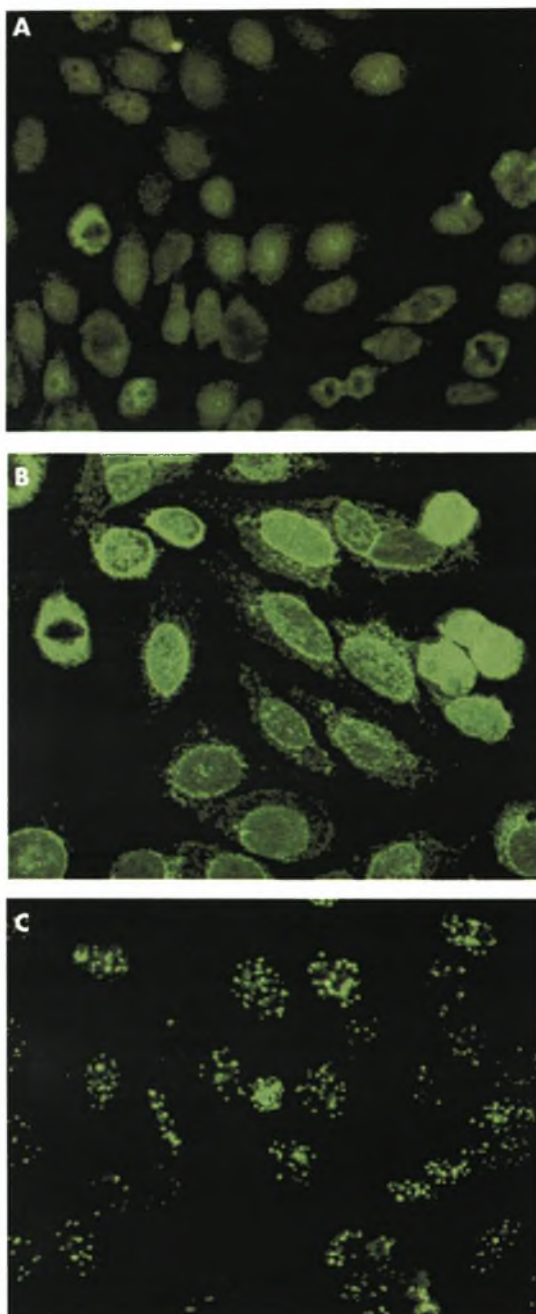
αντικρύζουν το σύμπλεγμα των πυρηνικών πόρων. Αντίθετα, οι Tartakovski και Worman χρησιμοποιώντας βιοχημικά κεκαθαρισμένο gp210, έδειξαν ότι τα αντι-gp210 αντισώματα αναγνωρίζουν τουλάχιστον δύο διαφορετικούς επιτόπους (553).

Η παρουσία των αντισωμάτων αυτών έχει συσχετιστεί στις περισσότερες μελέτες με βαρεία προχωρημένη νόσο και δυνητικά χειρότερη έκβαση (540, 543, 544, 554-556). Είναι ενδιαφέρον επίσης ότι τα αντι-gp210 αντισώματα ανιχνεύονται συνήθως και μετά από μεταμόσχευση ήπατος παρά το γεγονός ότι ιστολογικά ευρήματα ΠΧΚ δεν είναι παρόντα στο μόσχευμα (557, 558).

Μια ακόμη πρωτεΐνη του συμπλέγματος της πυρηνικής μεμβράνης, η p62 έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι είναι ένα αυτοαντιγόνο στο ένα τρίτο περίπου των ασθενών με ΠΧΚ (541, 543). Μια πολύ μικρή υποομάδα ασθενών με ΠΧΚ (περίπου 2%) έχουν ANA που αντιδρούν με μια πρωτεΐνη της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, του υποδοχέα της β-λαμινίνης (559, 560). Τα αντισώματα αυτά φαίνεται να είναι ειδικά για την ΠΧΚ.

Ο MND-ANA τύπος φθορισμού αφορά αντιδραστικότητα έναντι αντιγόνων 95kDa, 78-92 και 96-100kDa. Δύο κύριες πυρηνικές πρωτεΐνες έχουν αποδειχθεί ότι αντιδρούν με αυτά τα MND-ANA. Η πρώτη είναι η ρυθμιστική πυρηνική πρωτεΐνη Sp100 (561). Είναι μια πρωτεΐνη με άγνωστη λειτουργία που έχει ομοιότητες στην αλληλουχία με διάφορες μεταγραφικές πρωτεΐνες, περιλαμβανομένης και της πρωτεΐνης του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1). Τα αντι-Sp100 αντισώματα ανιχνεύονται στο 18-44% των ασθενών με ΠΧΚ (562-565), αν και η χρήση ειδικών αντιορών IgG υποτάξης (IgG1, IgG2, IgG3 και IgG4) στον ανοσοφθορισμό οδήγησε στην ανίχνευση πολύ μεγαλύτερου ποσοστού θετικών ασθενών (έως κι 65%) (540). Όπως και τα αντι-gp210, τα αντι-Sp100 αντισώματα εκτός της μεγάλης ειδικότητάς τους για τη διάγνωση της ΠΧΚ, φαίνεται να σχετίζονται με πιο σοβαρή μορφή της νόσου (540, 541, 565). Επίσης τα αντισώματα αυτά συνήθως επιμένουν μετά από μεταμόσχευση ήπατος ακόμη και χωρίς ιστολογικά ευρήματα PBC στο μόσχευμα (557, 558). Η πρωτεΐνη της προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (PML) φαίνεται να σχετίζεται με το sp100 (566) καθώς αντισώματα εναντίον της πρωτεΐνης αυτής βρίσκονται συχνά σε ασθενείς με ΠΧΚ και αντι-sp100 αντισώματα (563, 567). Μια ακόμη πυρηνική

πρωτεΐνη που ονομάζεται sp140 έχει επίσης ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί χρησιμοποιώντας αντισώματα από έναν ασθενή με PBC (568). Δεν έχει ωστόσο ακόμη μελετηθεί καλά.



**Εικόνα 18.** Σύγκριση των εικόνων που δημιουργούνται με συνολικό αντι-IgG και ειδικούς αντιπορούς IgG (IgG1, 2, 3, 4) με έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα Hep2 κύτταρα. Η χρήση συνολικού αντι-IgG έδωσε αρνητικό αποτέλεσμα (A), η χρήση αντι-IgG1 περιφερικό δακτυλιοειδή φθορισμό (RLM-ANA) (B) και η χρήση αντι-IgG3 τύπο φθορισμού με πολλαπλές πυρηνικές κηλίδες (MND-ANA) (C) (Από το: Prevalence and clinical significance of isotype specific antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis, Gut 2005; 54, σελίδα 530).

#### 5.2.5.δ. ΑΛΛΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ

Εκτός από τα AMA και τα ειδικά για την ΠΧΚ ANA, έχουν επίσης βρεθεί αντισταμοπεταλιακά αντισώματα σε ποσοστό 40%. Πράγματι η αντιστρόφως ανάλογη συσχέτιση ανάμεσα στον τίτλο των αντισταμοπεταλιακών αντισωμάτων και του αριθμού των αιμοπεταλίων δείχνει ότι τα αυτοαντισώματα αυτά μαζί με μη αυτοάνοσες διαδικασίες όπως ο υπερσπληνισμός σε ασθενείς με πυλαία υπέρταση, συντελούν στην θρομβοκυτταροπενία που παρατηρείται στην ΠΧΚ (569). Έχει βρεθεί πρόσφατα ότι τα αντιγόνα έναντι των οποίων στρέφονται τα αντισταμοπεταλιακά αντισώματα στην ΠΧΚ είναι συμπλέγματα γλυκοπρωτεϊνών των αιμοπεταλίων (IIb-IIIa και Ib-IX) (570, 571). Ίσως τα αντισώματα αυτά πρέπει να αναζητούνται σε όλους τους ασθενείς με ΠΧΚ που παρουσιάζουν ανεξήγητη θρομβοπενία. Άλλα αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται στην ΠΧΚ είναι τα p-ANCA (έως και 35.7% των ασθενών), αντισώματα κατά καρβονικής ανυδράσης (σε ποσοστό 8.3%) καθώς και τα αντιφωσφολιπιδιακά αντισώματα (APAs) που αντιπροσωπεύουν μια σημαντική ομάδα αυτοαντισωμάτων που αναγνωρίζονται σε ασθενείς με ΠΧΚ. Οροί ασθενών με ΠΧΚ ελέγχθηκαν για την παρουσία αντισωμάτων έναντι της καρδιολιπίνης (CL), έναντι της φωσφατιδιλοσερίνης (PS), και της β2-γλυκοπρωτεΐνης I (b2-GPI) και βρέθηκαν θετικά σε ποσοστό 45-75%, 75% και 2-59% αντίστοιχα χωρίς όμως να σχετίζονται με εκδηλώσεις του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου (350, 572). Φαίνεται ότι τα αντιφωσφολιπιδιακά αντισώματα είναι παρόντα σε ασθενείς με σοβαρή ηπατική βλάβη και προχωρημένη νόσο από ότι οι ασθενείς στους οποίους τα αντισώματα αυτά είναι αρνητικά (350).

#### 5.2.6. ΕΚΒΑΣΗ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΧΟΛΙΚΗΣ ΚΙΡΡΩΣΗΣ

Όσον αφορά στη μέση επιβίωση σε σχετικά μικρές ομάδες συμπτωματικών ασθενών που αναφέρθηκαν το 1950 και 1960 (573, 574) ήταν 5-6 χρόνια. Το 1983 οι Roll και συνεργάτες (575) αναφέραν ότι η δεκάχρονη επιβίωση σε 243 συμπτωματικούς ασθενείς ήταν 50% ενώ σε 36 ασυμπτωματικούς ασθενείς ήταν >90%. Αργότερα, οι Springer και συνεργάτες (507) ανέφεραν 10χρονη επιβίωση περίπου στο 70% σε 91 ασυμπτωματικούς ασθενείς στο Τορόντο, ενώ σε μια άλλη μελέτη από τη Mayo Clinic που

περιελάμβανε 46 ασθενείς, 80% εκ των οποίων ήταν ασυμπτωματικοί κατά την διάγνωση βρέθηκε 10χρονη επιβίωση περίπου στο 57% των ασθενών (576).

Η ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος στην ΠΧΚ δεν έχει ακόμη καθοριστεί εξαιτίας περιορισμένων επιδημιολογικών μελετών και αντικρουόμενων συμπερασμάτων. Μερικές μελέτες έδειξαν ότι στην ΠΧΚ, το ανδρικό φύλο, η κίρρωση, η συνύπαρξη ηπατίτιδας C και το ιστορικό μετάγγισης αίματος σχετίζονται με την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, αν και η εμφάνισή του στα αρχικά στάδια ΠΧΚ είναι σπάνια (577, 578).

### **5.2.7. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΧΟΛΙΚΗΣ ΚΙΡΡΩΣΗΣ**

Η θεραπεία είναι κυρίως συμπτωματική. Ιοντοανταλλακτικές ρητίνες που δεσμεύουν τα χολικά άλατα όπως η χολεστυραμίνη και η κολεστιπόλη (4 ή 5 gr αντίστοιχα 3 φορές ημερησίως) χορηγούνται για την αντιμετώπιση του κνησμού (579, 580). Η χολεστυραμίνη έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τη φωτοθεραπεία για την ανακούφιση από τον κνησμό όταν από μόνη της δεν είναι καλά ανεκτή ή είναι αναποτελεσματική (581). Σε μη επιτυχή ανταπόκριση γεγονός που δεν είναι σπάνιο χρησιμοποιούνται φάρμακα τα οποία επάγουν ηπατικά ένζυμα του μεταβολισμού όπως η ριφαμπικίνη (150-300 mg δύο φορές ημερησίως από το στόμα) (582). Τα αποτελέσματα είναι επίσης αμφιλεγόμενα αν και η ριφαμπικίνη φαίνεται να είναι ένα ασφαλές φάρμακο. Η εντατική πλασμαφαίρεση είναι μια εναλλακτική λύση πριν τη μεταμόσχευση για ασθενείς με ανθεκτικό κνησμό, καθώς βρέθηκε ότι παρατηρείται προσωρινή αλλά σημαντική μείωση του κνησμού και βελτίωση της μελάγχρωσης του δέρματος (583).

Λαμβάνοντας υπόψη την τρέχουσα αιτιοπαθογενετική άποψη για την ανάπτυξη του κνησμού, η χορήγηση ανταγωνιστών των οπιοειδών (πχ. ναλοξόνη 0.2 μg/Kg/min ενδοφλεβίως ή ναλτρεξόνη 50 mg/ημέρα από το στόμα) φαίνεται να αποτελεί σήμερα την πιο καλή και ελπιδοφόρο θεραπευτική προσέγγιση στην αντιμετώπιση του βασανιστικού αυτού συμπτώματος (584-587). Οι ασθενείς με ηπατική νόσο έχουν στο πλάσμα αυξημένες συγκεντρώσεις ενδογενών οπιοειδών πεπτιδίων. Το μπλοκάρισμα των υποδοχέων των οπιοειδών έχει δείξει ότι βελτιώνει σημαντικά το αίσθημα



της κόπωσης και του κνησμού (585). Επιπλέον, τα πρώτα αποτελέσματα από την ενδοφλέβια χορήγηση ανταγωνιστών των 5-HT<sub>3</sub> υποδοχέων σεροτονίνης (ονδανσετρόνη) είναι πολύ ενθαρρυντικά (588). Βρέθηκε ότι 30-60 min μετά την ενδοφλέβια χορήγηση ονδανσετρόνης μειώνεται ή εξαφανίζεται το αίσθημα του κνησμού ενώ μια κατά 50% μείωση στην ένταση του κνησμού παρατηρείται 6 ώρες μετά από ένεση 8 mg.

Για την αντιμετώπιση του αισθήματος της κόπωσης έχει δοκιμαστεί μέχρι σήμερα σε πειραματόζωα με πολύ καλά αποτελέσματα η χορήγηση ανταγωνιστών των 5-HT<sub>2</sub> υποδοχέων σεροτονίνης. Ανεπάρκεια λιποδιαλυτών βιταμινών (A, D, E και K) παρατηρείται όταν συνυπάρχει στεατόρροια. Το πρόβλημα επιδεινώνεται ακόμη περισσότερο μετά την χορήγηση ιοντοανταλλακτικών ρητινών (589). Προσθήκη ασβεστίου (500 mg 3 φορές ημερησίως) και βιταμίνης D (400 IU ημερησίως) βοηθά στην αποφυγή της οστεομαλακίας αλλά είναι αβέβαιο αν ωφελούν στην πρόληψη της οστεοπόρωσης. Η θεραπεία της οστεοπόρωσης δεν διαφέρει από αυτή της μετεμμηνοπαυσιακής εκτός ίσως της χορήγησης οιστρογόνων που μάλλον πρέπει να αποφεύγονται στην ΠΧΚ αφού υπάρχει αυξημένος κίνδυνος επίτασης της χολόστασης (590). Τα διφωσφονικά φαίνεται να έχουν τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τη χορήγηση καλσιτονίνης ή νατριούχων αλάτων φθορίου γιατί εμποδίζουν την απώλεια οστικής μάζας κατά τη διάρκεια θεραπείας με κορτικοστεροειδή και μετά από μεταμόσχευση ήπατος (590, 591).

Για τη βασική νόσο έχουν χρησιμοποιηθεί η D-πενικιλλαμίνη, τα κορτικοστεροειδή, η χλωραμβουκίλη, η αζαθειοπρίνη και η κυκλοσπορίνη χωρίς κάποιο σημαντικό όφελος (592). Πρόδρομες μελέτες όπου χορηγήθηκε κολχικίνη (0.6 mg 2 φορές ημερησίως) ή μεθοτρεξάτη (15 mg μία φορά την εβδομάδα) έδειξαν κάποια βελτίωση των χολοστατικών ενζύμων (593-595). Η βελτίωση των βιοχημικών δεικτών και των συμπτωμάτων ήταν λίγο μεγαλύτερη στη θεραπεία με μεθοτρεξάτη (594). Άλλα φάρμακα που έχουν χρησιμοποιηθεί περιλαμβάνουν φιμπράτες, NSAIDs και ανταγωνιστές λευκοτριενίων (596, 597). Η χρήση UDCA μαζί με βεζαφιμπράτη ή φαινοφιμπράτη έχει αποδειχθεί περισσότερο αποτελεσματική από ότι το UDCA μόνο του (598, 599). Επίσης έχει δοκιμασθεί η μυκοφαινολάτη μοφετίλη σε δόση 1-3 g καθημερινά με UDCA (13-15 mg/kg/ημέρα) χωρίς να

έχει ιδιαίτερα σημαντικά κλινικά αποτελέσματα (600). Ένας άλλος συνδυασμός φαρμάκων που έχει δοκιμαστεί είναι UDCA με πρεδνιζόνη και αζαθειοπρίνη που φαίνεται να έχει καλύτερα αποτελέσματα από το UDCA ως μονοθεραπεία (601).

Λόγω της χαμηλής τοξικότητάς του προτιμάται σήμερα η χορήγηση του UDCA (13-15 mg/kg/ημέρα) (602). Το UDCA βελτιώνει σαφώς τους βιοχημικούς δείκτες, μειώνει την ιστολογική πρόοδο της νόσου και επομένως καθυστερεί μάλλον την ανάγκη για μεταμόσχευση. Επίσης προκαλεί βελτίωση στην ανοσολογική διαταραχή μειώνοντας τον τίτλο των AMA. Δεν βελτιώνει όμως σημαντικά την συνολική επιβίωση. Το 1987 οι Ρουρον και συνεργάτες (603) ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν όφελος από το UDCA. Διάφορες κλινικές μελέτες έχουν γίνει από τότε. Οι περισσότερες έδειξαν μια παρατεταμένη βελτίωση στους βιοχημικούς δείκτες -κυρίως της χολερυθρίνης- που έχει χρησιμοποιηθεί σαν προγνωστικός δείκτης στην ΠΧΚ (604). Μια συνδυασμένη ανάλυση από τρεις τυχαίοποιημένες μελέτες έδειξε ότι η επιβίωση χωρίς μεταμόσχευση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στους ασθενείς με ΠΧΚ που έλαβαν θεραπεία με UDCA για 4 χρόνια σε σχέση με αυτούς που έλαβαν placebo για 2 χρόνια ακολουθούμενα από UDCA για τα επόμενα δύο (605). Η εκτεταμένη παρακολούθηση ασθενών σε δύο άλλες κλινικές δοκιμές (606, 607) με τον ίδιο τρόπο σχεδίασης της θεραπείας δεν έδειξε κάποια ευνοϊκή επίδραση του UDCA στην επίπτωση των θανάτων ή στην μεταμόσχευση ήπατος. Σε μια μετα-ανάλυση που συμπεριέλαβε 1250 ασθενείς δεν βρέθηκε όφελος στην επιβίωση, αριθμό μη μεταμοσχευμένων ή στην επιβίωση χωρίς μεταμόσχευση από τη χρήση του UDCA (608).

Επιπλέον, διάφορες έρευνες έγιναν με σκοπό να μελετηθεί αν το UDCA θα είχε ευνοϊκή επίδραση στη νόσο σε υψηλή δόση (13-15 mg/kg/d) (609), με μεγάλη διάρκεια θεραπείας (>4 χρόνια), σε πιο πρώιμα στάδια της νόσου (χολερυθρίνη<26 μmol/L) (605, 610). Καμία από τις μελέτες αυτές δεν έδειξε ευνοϊκό όφελος από το UDCA. Εντούτοις, οι Lindor και συνεργάτες (611) βρήκαν ότι το UDCA μπορεί να καθυστερήσει την εμφάνιση των κιστών. Σχετικά με την πιθανή επίδραση του UDCA στα διάφορα συμπτώματα της νόσου μόνο 2 από 11 μελέτες (612, 613) αναφέρουν ευεργετική επίδραση του UDCA στον κνησμό που σχετίζεται με την ΠΧΚ, ενώ καμία δεν ανέφερε ευεργετική επίδραση στην κόπωση που παρατηρείται στην ΠΧΚ.

Τα αποτελέσματα του UDCA στην ηπατική βιοχημεία είναι ενδιαφέροντα. Αν και η θεραπεία με το φάρμακο αυτό προκαλεί σημαντική μείωση στις τρανσαμινάσες, την αλκαλική φωσφατάση, τη γ-GT και τη χολερυθρίνη στις περισσότερες μελέτες δεν υπήρχε σημαντική αλλαγή στους άλλους προγνωστικούς παράγοντες όπως η αλβουμίνη και ο χρόνος προθρομβίνης. Η αλβουμίνη και ο χρόνος προθρομβίνης μαζί με την ηλικία, τη χολερυθρίνη και την παρουσία ασκίτη ή οιδήματος είναι οι μεταβλητές που συνδέονται περισσότερο με την επιβίωση στην ΠΧΚ και χρησιμοποιούνται ως προγνωστικοί δείκτες για την επιβίωση (σύμφωνα με το προγνωστικό μοντέλο Mayo και Royal Free Hospital) (614, 615). Υπάρχουν περιπτώσεις στην Ιατρική που μια σημαντική θετική επίδραση από ένα φάρμακο σε ένα βιοχημικό δείκτη μεταφράστηκε ως αποτελεσματικότητα του φαρμάκου, π.χ. η επίδραση της ζιδοβουδίνης για την λοίμωξη από τον HIV στα CD-4 κύτταρα, ενώ στην πραγματικότητα το φάρμακο δε βελτίωσε την επιβίωση (616). Η πιθανή εξήγηση για αυτό το παράδοξο γεγονός είναι ότι η διαδικασία και ο μηχανισμός της νόσου επηρεάζουν το κλινικό αποτέλεσμα μέσω διάφορων οδών που μάλλον δεν έχουν σχέση με τους βιοχημικούς δείκτες. Η επίδραση του UDCA στην μείωση της χολερυθρίνης δεν είναι κάτι καθησυχαστικό, γιατί έχει αποδειχθεί ότι το φάρμακο αυτό προκαλεί σημαντική μείωση των επιπέδων της χολερυθρίνης και σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C, χωρίς όμως να είναι πραγματικά αποτελεσματικό για τη νόσο αυτή (617). Εντούτοις, η φυσιολογικοποίηση των τιμών της χολερυθρίνης μέσα σε 6 μήνες μετά από θεραπεία με UDCA σε μια ομάδα ασθενών με ΠΧΚ έχει πρόσφατα θεωρηθεί ως προγνωστικός δείκτης για επιβίωση χωρίς μεταμόσχευση (618).

Η επίδραση του UDCA στην ιστολογία του ήπατος είναι περισσότερο περίπλοκη γιατί διάφορα ιστολογικά χαρακτηριστικά χρησιμοποιήθηκαν για να εκτιμήσουν τις ιστολογικές αλλαγές με τη θεραπεία. Είναι σημαντικό ότι καμία μελέτη δεν έδειξε σημαντική επίδραση του UDCA στην ηπατική ίνωση και μόνο μια έδειξε ότι το φάρμακο μπορεί να εμποδίσει την εξέλιξη του ιστολογικού σταδίου (619). Έχει προταθεί ότι διάφορα ιστολογικά χαρακτηριστικά (π.χ. χολόσταση, φλεγμονή των χοληφόρων, πυλαία φλεγμονή, νέκρωση) μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων της θεραπείας (602) και μερικές έρευνες έχουν αναφέρει ευεργετική επίδραση του UDCA σε κάποια από αυτά τα χαρακτηριστικά (610,

613, 620-622). Ωστόσο αυτή η ιστολογική προσέγγιση χρειάζεται να επανεκτιμηθεί για να είναι αξιόπιστη. Σε δυο μακρόχρονες ιστολογικές μελέτες (623, 624) που επίσης έδειξαν ότι το UDCA είχε θετική επίδραση σε διάφορα στοιχεία της ηπατικής ιστολογίας δεν παρατηρήθηκε επίδραση στην εξέλιξη του σταδίου της νόσου και της ίνωσης.

Το UDCA είναι ασφαλές και καλά ανεκτό φάρμακο με ελάχιστες ανεπιθύμητες ενέργειες. Ωστόσο το φάρμακο αυτό είναι μάλλον περισσότερο αποτελεσματικό όταν ξεκινάει στα αρχικά στάδια της νόσου κυρίως στο στάδιο I και όχι αργότερα από το στάδιο II. Φαίνεται ότι η επίδραση του UDCA μειώνεται με την πρόοδο του ιστολογικού σταδίου και ελαχιστοποιείται όσο η ίνωση προοδεύει προς την ανάπτυξη του κίρρωτικού σταδίου (στάδιο IV) (625, 626). Συνδυασμοί UDCA με κολχικίνη, κορτικοστεροειδή ή μεθοτρεξάτη δεν είχαν καλύτερα αποτελέσματα από τη χορήγηση μόνου του UDCA.

Στο τελικό στάδιο της νόσου οριστική θεραπεία αποτελεί η μεταμόσχευση ήπατος (85-90% επιβίωση τον πρώτο χρόνο). Η μεταμόσχευση μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμη και λόγω έντονου, βασανιστικού κνησμού που δεν μπορεί να ελεγχθεί με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ποιότητα ζωής του ασθενούς (627).

Πρέπει να σημειωθεί ότι η νόσος μπορεί να επανεμφανιστεί στο μόσχευμα (συχνότητα 10% τα πρώτα 10 χρόνια μετά τη μεταμόσχευση) (628, 629). Τα AMA παραμένουν θετικά για άλλοτε άλλο χρονικό διάστημα και μετά τη μεταμόσχευση οπότε δυσκολεύουν τη διάγνωση της υποτροπής της ΠΧΚ καθώς άλλες καταστάσεις που σχετίζονται με τη μεταμόσχευση και τη χορήγηση ανοσοκαταστολής όπως ισχαιμικές βλάβες των χοληφόρων, απόρριψη μοσχεύματος, ιογενής λοίμωξη του μοσχεύματος δίνουν παρόμοια ιστολογική εικόνα με την ΠΧΚ.

## 6. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ

Διαταραχή του μυελού των οστών στην ΑΗ έχει παρατηρηθεί κυρίως ως παρενέργεια των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων όπως η αζαθειοπρίνη (630). Η αζαθειοπρίνη είναι βασικός κυτταροτοξικός παράγοντας που χρησιμοποιείται για ανοσοκαταστολή σε αυτοάνοσα νοσήματα και για να ελέγξει την ετερόλογη απόρριψη στη χειρουργική των μεταμοσχεύσεων. Η αζαθειοπρίνη μπορεί να προκαλέσει μακροκυττάρωση, αναιμία, θρομβοκυτταροπενία, λευκοπενία και πανκυτταροπενία. Υπάρχουν αρκετές δημοσιεύσεις με απλασία του μυελού των οστών ή σοβαρή πανκυτταροπενία προκαλούμενη από την αζαθειοπρίνη (631, 632). Η σοβαρότητα της καταστολής του μυελού ποικίλλει και μέχρι πρόσφατα δεν ήταν ξεκάθαρο αν ήταν δόσοεξαρτώμενη. Πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι η επιρρέπεια σε βαριά καταστολή του μυελού είναι γενετικά βασισμένη οφειλόμενη σε μεταλλαγές του γονιδίου της θειοπυρινικής μεθυλτρανσφεράσης (ένζυμο μεταβολισμού της αζαθειοπρίνης) (370). Στην ΠΧΚ ο μυελός των οστών βρέθηκε σε παλαιότερες μελέτες ότι μπορεί να επηρεάζεται σαν συνέπεια της χρόνιας χορήγησης χαμηλών δόσεων κολχικίνης. Η κολχικίνη μπορεί να προκαλέσει παροδική αλλά σοβαρή ουδετεροπενία ενώ στο μυελό βρέθηκε μέτρια μείωση της κυτταροβρίθειας όλων των κυτταρικών σειρών και σοβαρές δυσπλαστικές αλλοιώσεις στις ώριμες μορφές της κοκκιδώδους και της ερυθράς σειράς (633).

Διάφορες μελέτες επίσης έχουν αναφέρει διάφορες συσχετίσεις μυελοπαθειών σε ασθενείς με ΑΗ και ΠΧΚ. Συγκεκριμένα η ΑΗ έχει συσχετιστεί με επίκτητη ερυθροβλαστοπενία. Η κυκλοφωσφαμίδη ήταν αποτελεσματική κατά της απλασίας των κυττάρων της ερυθράς σειράς υποδεικνύοντας έτσι την αυτοάνοση προέλευση αυτής της νόσου καθώς και την υπόθεση ότι τόσο το ήπαρ όσο και η ερυθρά σειρά του μυελού των οστών είναι πιθανοί στόχοι μιας διαταραχής του ανοσολογικού συστήματος (634). Το πολλαπλούν μυέλωμα έχει συσχετιστεί με την ΠΧΚ και συγκεκριμένα με τα αρχικά στάδια της νόσου αυτής. Η συσχέτιση αυτή δείχνει ότι ανοσορρυθμιστικές ανωμαλίες μπορεί να παίζουν ρόλο στην εξέλιξη του πολλαπλού μυελώματος (635). Επίσης η ιδιοπαθής μυελοϊνωση έχει συσχετιστεί με την ΠΧΚ (636). Σε ασθενή με ΠΧΚ που ανταποκρίνονταν σε

θεραπεία με πρεδνιζολόνη βρέθηκε ενάμιση χρόνο αργότερα αναιμία με ανισοκυττάρωση και ποικιλοκυττάρωση, δακρυοκύτταρα και λευκοερυθροβλαστική εικόνα. Η ιδιοπαθής μυελοϊνώση διαγνώσθηκε με βιοψία του μυελού των οστών. Η συσχέτιση αυτή υποστηρίζει την υπόθεση ενός αυτοάνοσου μηχανισμού της μυελοϊνώσης τουλάχιστον σε μερικές περιπτώσεις.

Εντούτοις, άμεση συμμετοχή (και με ποια χαρακτηριστικά) του μυελού των οστών σε ασθενείς με ΑΗ ή ΠΧΚ όπως έχει μελετηθεί για παράδειγμα σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (π.χ. ρευματοειδής αρθρίτιδα, συστηματικός ερυθρεμάτης λύκος-βλέπε Κεφάλαια 3.1 και 3.2) δεν έχει διερευνηθεί συστηματικά. Η παρούσα διατριβή έρχεται να καλύψει το βιβλιογραφικό αυτό κενό με την ενδελεχή μελέτη του μυελού των οστών ασθενών με ΑΗ και ΠΧΚ.

## **Β.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΟΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ, ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΑ  
ΚΥΤΤΑΡΑ, ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ  
ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΟΝ ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ  
ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ ΤΥΠΟΥ Ι ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΧΟΛΙΚΗ  
ΚΙΡΡΩΣΗ





## 7. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### Γενικά

Η αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου-1 είναι μια χρόνια νεκροφλεγμονώδης νόσος του ήπατος, αγνώστου αιτιολογίας. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια, συνδυάζεται με την παρουσία διάφορων αυτοαντισωμάτων και σημαντικού βαθμού υπεργαμμασφαιριναιμία, συσχετίζεται με το HLA DR3 ή HLA DR4 και με ανταπόκριση στη θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (213, 227). Ανταπόκριση στην ανοσοκαταστολή παρατηρείται σε 85% των ασθενών κατά την διάρκεια θεραπείας τριών χρόνων. Οι ασθενείς που δεν έχουν ύφεση μετά από θεραπεία 4 χρόνων έχουν αυξημένο κίνδυνο να υποστούν μεταμόσχευση ήπατος (637-638).

Η πρωτοπαθής χολική κίρρωση αποτελεί χρόνια χολοστατική νόσο του ήπατος, χαρακτηρίζεται από καταστροφή των μικρών ενδοηπατικών χοληφόρων με ανοσολογικούς μηχανισμούς, που οδηγεί σε προοδευτική χολόσταση και τελικώς σε κίρρωση και ηπατοκυτταρική ανεπάρκεια. Ανοσοκατασταλτικά και αντιφλεγμονώδη φάρμακα έχουν χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία της αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά (603, 608). Σε προχωρημένες περιπτώσεις η μεταμόσχευση ήπατος φαίνεται να βελτιώνει την φυσική ιστορία της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης. Ωστόσο επανεμφάνιση τόσο της αυτοάνοσης ηπατίτιδας τύπου-1 όσο και της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης μετά την μεταμόσχευση ήπατος έχει αναφερθεί (639).

Σε ασθενείς με σοβαρές ή/και ανθεκτικές μορφές αυτοανοσίας υψηλές δόσεις ανοσοκατασταλτικών ακολουθούμενες από αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων έχουν χρησιμοποιηθεί με αρκετά μεγάλη αποτελεσματικότητα (96, 170,195). Έχει αναφερθεί η περίπτωση ασθενούς με ΑΗ στον οποίο πραγματοποιήθηκε μεταμόσχευση μυελού για άλλη αιτία και παρατηρήθηκε ύφεση της ΑΗ (162).

Έχει ήδη βρεθεί διαταραχή του μυελού των οστών σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα όπως στην ρευματοειδή αρθρίτιδα και τον συστηματικό ερυθρεμάτωδη λύκο (86, 93). Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα βρέθηκαν ποιοτικά και ποσοτικά επηρεασμένα αρνητικά, η κλωνογονική δυνατότητα του μυελού και οι αιμοποιητικές αποικίες ήταν μειωμένες ενώ και η δυνατότητα

των στρωματικών κυττάρων του μυελού να υποστηρίξουν την αιμοποίηση ήταν μειωμένη (86,93). Στους ασθενείς αυτούς βρέθηκε αυξημένη παραγωγή TNF-α από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών και αυξημένος αριθμός αποπτωτικών κυττάρων στα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα. Τα επίπεδα αυτής της κυτταροκίνης συσχετίστηκαν θετικά με τα αποπτωτικά κύτταρα δείχνοντας ότι ο TNF-α εμπλέκεται στον αποπτωτικό θάνατο των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Στους ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο βρέθηκε αυξημένη έκφραση TNF-α mRNA στον μυελό των οστών (104). Όσον αφορά τα μορφολογικά ευρήματα του μυελού βρέθηκε μειωμένη κυτταροβρίθεια στην πλειονότητα των ασθενών (119), αυξημένη πιθανότητα λευχαιμίας σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (91), αυξημένη πιθανότητα απλαστικής αναιμίας και μυελοϊνωσης στον συστηματικό ερυθματώδη λύκο (119), αυξημένη παραγωγή ρετικουλίνης στον συστηματικό ερυθματώδη λύκο (119), αυξημένα πλασματοκύτταρα σε κάποιους ασθενείς και πολλαπλούν μύελωμα τόσο σε ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο όσο και με ρευματοειδή αρθρίτιδα (89, 120).

Για πρώτη φορά μελετήσαμε τα μορφολογικά ευρήματα του μυελού των οστών, τα αιμοποιητικά προγονικά και στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών, τους δείκτες απόπτωσης και κυτταρικής ενεργοποίησης και τις κυτταροκίνες του μυελού σε ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου-1 και πρωτοπαθή χολική κίρρωση.

### **Σκοπός**

Σκοπός της έρευνας μας ήταν η μελέτη των διαταραχών του αιμοποιητικού συστήματος σε ασθενείς με ΑΗ-1 και ΠΧΚ καθώς και η διερεύνηση της δυνατότητας υποστήριξης της αιμοποίησης από το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών σε περίπτωση αυτόλογης μεταμόσχευσης περιφερικών προγονικών κυττάρων.

Στην προσπάθεια αυτή μελετήθηκαν ποσοτικές και ποιοτικές διαταραχές των αιμοποιητικών κυττάρων και των προβαθμίδων τους στο μυελό των οστών. Για τον λόγο αυτό καταγράφηκαν με ακρίβεια τα μορφολογικά ευρήματα και οι μορφολογικές ανωμαλίες των αιμοποιητικών κυττάρων σε επίχρισμα μυελού, σε οστεομυελική βιοψία και στο περιφερικό

αίμα. Επίσης μελετήθηκε η ανάπτυξη και η μορφολογία των αιμοποιητικών αποικιών σε υγρό καλλιεργητικό υλικό και άγαρ.

Για την μελέτη των λειτουργικών διαταραχών των αιμοποιητικών κυττάρων και των κυττάρων του στρώματος του μυελού των οστών μελετήθηκε η ανάπτυξη των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων (stem cells) σε αποικίες σε μακράς διάρκειας καλλιέργειες καθώς και η ανάπτυξη των κυττάρων του στρώματος. Επίσης για το λόγο αυτό μετρήθηκαν ποσοτικά ο TNF- $\alpha$ , ο TGF- $\beta$ , η IFN- $\gamma$ , η IL-4 και η IL-10 σε υπερκείμενα μακράς διάρκειας κυτταροκαλλιεργείων. Οι παράγοντες αυτοί επηρεάζουν την ανάπτυξη των αιμοποιητικών αποικιών και εκκρίνονται από τα αιμοποιητικά κύτταρα και τα κύτταρα του στρώματος (αυτοκρινής και παρακρινής λειτουργία). Επίσης μελετήθηκε η επιβίωση των αιμοποιητικών (με τον προσδιορισμό του βαθμού της απόπτωσης) και στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών καθώς και οι δείκτες που αφορούν την ενεργοποίηση των κυττάρων στην διαδικασία της φλεγμονώδους αντίδρασης.

Έχει βρεθεί ότι τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα μπορούν να μεταναστεύσουν στο ήπαρ και να διαφοροποιηθούν σε ηπατοκύτταρα και επιθηλιακά χοληφόρα κύτταρα δείχνοντας τον πιθανό ρόλο των κυττάρων αυτών στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων του ήπατος (32,58-59). Η ανίχνευση του δείκτη των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων CD34 σε 0.8-2.35% των απομονωμένων ηπατικών μονοπύρηνων κυττάρων ενισχύει την υπόθεση αυτή (76).

Δεν είναι γνωστό αν επηρεάζονται ποιοτικά και ποσοτικά τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα σε αυτές τις ηπατικές ασθένειες. Η ανεύρεση ποσοτικής και ποιοτικής ακεραιότητας αυτών ίσως καθιστά τους ασθενείς που είναι ανθεκτικοί στις συνηθισμένες θεραπείες κατάλληλους υποψήφιους για αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών.

Επιχειρήσαμε να ερευνήσουμε εάν η ενεργοποίηση των μακροφάγων και η αποπτωτική διαδικασία στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών είναι υπεύθυνες για τις ποιοτικές και ποσοτικές διαταραχές των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων στις παθήσεις αυτές. Επίσης, ερευνήσαμε εάν το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών είναι διαφορετικό στις δύο αυτές παθήσεις του ήπατος και εάν οι διαφορές που παρατηρούνται στην αιμοποίηση μεταξύ των δύο ομάδων των ασθενών θα μπορούσαν να

οφείλονται στις παραγόμενες κυτταροκίνες, δεδομένου ότι διάφορες κυτταροκίνες μπορούν να επηρεάσουν την επιβίωση, πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων και καθιστούν επιρρεπή τα αιμοποιητικά κύτταρα στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης Fas (87).

Επειδή δεν υπάρχουν δεδομένα φυσιολογικών τιμών στις παραμέτρους που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου δείγματα μυελού των οστών από 10 υγιείς αιμοδότες και 12 κίρρωτικούς της αντίστοιχης ηλικίας και φύλου μη αυτοανόσου αιτιολογίας (7 λόγω ηπατίτιδας Β, 2 λόγω ηπατίτιδας C και 3 λόγω αλκοόλ) ώστε να διερευνηθεί εάν τα ευρήματά μας είναι χαρακτηριστικά των αυτοάνοσων νοσημάτων ήπατος ή της συνυπάρχουσας πολλές φορές κίρρωσης.

## 8. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 8.1. Ασθενείς (Πίνακας 14)

Δείγματα μυελού των οστών και περιφερικού αίματος συγκεντρώθηκαν από 13 ασθενείς με ΑΗ-1, 13 ασθενείς με ΠΧΚ και 10 υγιείς αιμοδότες της αντίστοιχης ηλικίας και φύλου. Επίσης πάρθηκαν δείγματα μυελού από 12 κίρρωτικούς της αντίστοιχης ηλικίας και φύλου μη αυτοανόσου αιτιολογίας (7 λόγω Ηπατίτιδος Β, 2 λόγω ηπατίτιδας C και 3 λόγω αλκοόλ). Όλοι οι δότες ήταν αρνητικοί για δείκτες ιογενούς ηπατίτιδας Β και C και ορολογικούς δείκτες αυτοανοσίας. Επιπλέον κανείς από τους δότες δεν είχε κάποιο κλινικό ή βιοχημικό χαρακτηριστικό συμβατό με ΑΗ-1 ή ΠΧΚ. Οι ασθενείς επιλέχτηκαν από έναν συνολικό αριθμό 40 ασθενών με ΑΗ-1 και 45 με ΠΧΚ που παρακολουθούνται στην Πανεπιστημιακή μονάδα ήπατος, στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Η διάγνωση της ΑΗ-1 βασίζεται σε διεθνώς παραδεκτά κριτήρια που έχουν τεθεί από τη Διεθνή Ομάδα Μελέτης Αυτοάνοσης Ηπατίτιδας (216), ενώ όλοι οι ασθενείς με ΠΧΚ είχαν τα ακόλουθα κριτήρια: αυξημένα επίπεδα IgM, ιστολογία ήπατος με χαρακτηριστικά ευρήματα ΠΧΚ και υψηλό τίτλο αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων που ανιχνεύτηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε ιστικές τομές κρυστάτη από ήπαρ και νεφρό αρουραίου και επιβεβαιώθηκαν με ELISA με αντίσωμα έναντι της E2 υπομονάδας του συμπλέγματος της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης ή έναντι της E2 υπομονάδας του συμπλέγματος της κετοξικής δεϋδρογονάσης με διασταυρούμενη αλυσίδα και με ανοσοαποτύπωση (317, 319). Τα δημογραφικά, κλινικά, ορολογικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον πίνακα 14. Εργαστηριακή εκτίμηση έγινε την ημέρα λήψης δείγματος μυελού των οστών για εξέταση ενώ βιοψία ήπατος 3-12 μήνες πριν τη λήψη του μυελού.

Επτά από τους ασθενείς με ΑΗ-1 έπαιρναν ανοσοκατασταλτικά (μέση διάρκεια της θεραπείας 11 μήνες, εύρος 6-108, ένας έπαιρνε πρεδνιζολόνη, τέσσερις πρεδνιζολόνη και αζαθειοπρίνη, δύο συνδυασμό πρεδνιζολόνης, μυκοφαινολάτης μοφετίλης και UDCA, δύο μόνο UDCA και τέσσερις δεν έπαιρναν καθόλου θεραπεία). Και οι επτά ασθενείς που έπαιρναν ανοσοκαταστολή είχαν πλήρη ανταπόκριση στη θεραπεία τη στιγμή της αναρρόφησης μυελού όπως ορίστηκε από τη Διεθνή Ομάδα Μελέτης της

Αυτοάνοσης Ηπατίτιδας (216). Συγκεκριμένα τα επίπεδα του IgG (μέση τιμή: 2950, εύρος: 1534-6327), ήταν υψηλότερα πριν τη θεραπεία σε σχέση με τα επίπεδα του IgG τη στιγμή της αναρρόφησης του μυελού (μέση τιμή: 1110, εύρος: 938-1841,  $p=0.08$ ). Παρομοίως τα επίπεδα ALT και AST ήταν σημαντικά υψηλότερα πριν τη θεραπεία σε σχέση με αυτά τη στιγμή της αναρρόφησης του μυελού (μέση τιμή: 244, εύρος: 58-1129 έναντι μέσης τιμής: 33, εύρους: 22-62,  $p=0.004$  και μέση τιμή: 176, εύρος: 50-1243 έναντι μέσης τιμής: 31, εύρους: 21-73,  $p=0.009$ , αντίστοιχα). Όλοι εκτός από έναν ασθενή με ΠΧΚ έπαιρναν μόνο UDCA που δεν θεωρείται κλασσική ανοσοκατασταλτική θεραπεία (η μέση διάρκεια της θεραπείας τη στιγμή της αναρρόφησης του μυελού ήταν 20 μήνες, εύρος 6-36).

Τα δείγματα του αίματος τη στιγμή της αναρρόφησης μυελού ελέγχθηκαν για την παρουσία αυτοαντισωμάτων (263, 265, 268, 270, 274, 317, 319, 343). Τα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) και αντισώματα έναντι των λείων μυϊκών ινών (SMA) ανιχνεύτηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε κυτταρικό κλώνο Hep-2 από ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα λαρυγγικού καρκινώματος (INOVA Diagnostics, San Diego CA, USA) (θετικός τίτλος  $\geq 1:80$ ), ενώ τα SMA, τα αυτοαντισώματα έναντι μικροσωμίων ήπατος νεφρών (αντι-LKM), τα AMA και τα αντισώματα έναντι κυτοσολίων ήπατος (αντι-LC) ανιχνεύτηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ιστικές τομές κρουστάτη από ήπαρ, νεφρό και στομάχι αρουραίου. Σημαντικοί τίτλοι θεωρούνται  $\geq 1:80$  για τα SMA και  $\geq 1:40$  για τα αντι-LKM, αντι-LC και τα AMA. Τα αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετερόφιλων (ANCA) ανιχνεύτηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ουδετερόφιλα (INOVA Diagnostics, θετικός τίτλος  $\geq 1:20$ ). Όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν επίσης για την παρουσία IgG αντισωμάτων έναντι της διπλής έλικας του DNA (anti-dsDNA) και για την παρουσία IgG αντισωμάτων έναντι της καρδιολιπίνης (anti-CL) χρησιμοποιώντας ELISA (263, 265, 268, 270, 274).

Έγγραφο συγκατάθεση πάρθηκε από όλους τους ασθενείς και μάρτυρες που συμμετείχαν στην μελέτη.

**Πίνακας 14.** Χαρακτηριστικά των ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1 (ΑΗ-1), πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΠΧΚ), κίρρωτικών και υγιών.

	ΑΗ-1 (n=13)	ΠΧΚ (n=13)	Κίρρωτικοί (n=12)*	Υγιείς (n=10)
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	3/10	1/12	3/9	3/7
Μέση ηλικία (εύρος χρόνων)	62 (27-79)	60.5 (17-74)	55 (38-70)	60 (27-75)
Διάρκεια της ασθένειας (μήνες)	56 ± 44.8	29.5 ± 20.9	87.8 ± 65.4	0
Ανοσοκαταστολή (Ναι/Όχι)**	7/6	1/12	0/12	0
Κίρρωση (Ναι/Όχι)	7/6	3/10***	12/0	0
Αιμοσφαιρίνη (g/dL)	12.9 ± 0.97	12.8 ± 1.6	14.0 ± 2.1	14.8 ± 1.55
Λευκοκύτταρα (x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	5.9 ± 1.6	6.5 ± 2.2	5.5 ± 1.3	6.7 ± 1.13
Αιμοπετάλια (x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	195 ± 59.5	252 ± 114.1	174 ± 61.9	334 ± 79.5
ALT (U/L)	31.7 ± 13.2	34.1 ± 23	50.6 ± 36.4	24.1 ± 6.47
ALP (U/L)	98.8 ± 31.3	149.9 ± 80.8	94.3 ± 70.2	62.9 ± 27.2
Ανοσοφαιρίνη G (g/dL)	1.57 ± 0.35	1.51 ± 0.35	1.56 ± 0.49	0.98 ± 0.1
ΑνοσοφαιρίνηM (g/dL)	0.18 ± 0.04	0.4 ± 0.13	0.11 ± 0.05	0.11 ± 0.03
ANA (%)/ Τίτλος	100/ 1:80-1:5120	38.5/ 1:640-1:5120	0	0
SMA (%)/ Τίτλος	92.3/ 1:80-1:1280	15.4/1640-1:5120	0	0
AMA (%)/ Τίτλος	0	100/ 1:640-1:5120	0	0

ALT: αλανινοαμινοτρανσφεράση, ALP: αλκαλική φωσφατάση, ANA: αντιπυρηνικά αντισώματα, SMA: αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ινών, AMA: αντιμυτοχονδριακά αντισώματα \*Όλοι οι κίρρωτικοί μάρτυρες και οι κίρρωτικοί με ΑΗ-1 είχαν Child A κίρρωση χωρίς ένδειξη υπερασπληνισμού. \*\*Προσθήκη ανοσοκαταστολής τουλάχιστον 6 μήνες πριν και κατά την διάρκεια της μελέτης. 2 ΑΗ-1 ασθενείς έπαιρναν μόνο UDCA, 4 δεν έπαιρναν καθόλου θεραπεία, 1 έπαιρνε πρεδνιζολόνη, 4 συνδυαστική θεραπεία με πρεδνιζολόνη και αζαθειοπρίνη και 2 έπαιρναν πρεδνιζολόνη, μυκοφαινολάτη μοφετίλ και UDCA. Μόνο 2 ασθενείς με ΑΗ-1 είχαν ενεργό νόσο τη στιγμή της αναρρόφησης του μυελού. Όλοι εκτός από έναν ΠΧΚ έπαιρναν μόνο UDCA που δεν θεωρείται ως κλασσικό ανοσοκατασταλτικό. \*\*\*4 with στάδιο I, 4 στάδιο II και 2 στάδιο III

## 8.2. Μορφολογικά ευρήματα μυελού

Αναρρόφηση μυελού των οστών έγινε από την οπίσθια λαγόνια άκανθα με τη χρήση της βελόνας Jamishidi's. Χρησιμοποιήθηκαν χρώσεις αιματοξυλίνης-ηωσίνης και May-Grawnwald/Giemsa για να μελετηθεί η συνολική κυτταροβρίθεια και η κυτταροβρίθεια των κυτταρικών σειρών ξεχωριστά καθώς και άλλες μορφολογικές ανωμαλίες. Επίσης χρησιμοποιήθηκε χρώση Perls's για εκτίμηση μορφολογικών ανωμαλιών και των αποθηκών του σιδήρου (119).

## 8.3 Απομόνωση κυττάρων του μυελού των οστών και του περιφερικού αίματος

Αμέσως μετά την αναρρόφηση μυελού των οστών τα κύτταρα διαλύθηκαν σε υλικό Iscove's Modified Dulbecco's (GIBCO-BRL, USA) χωρίς συντηρητικά και με 10 IU ηπαρίνη (Leo, Denmark) και εμπλουτισμένο με 100 U/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (GIBCO-BRL, USA). Τα λεμφομονοκύτταρα του μυελού των οστών (BMMC) και του περιφερικού αίματος (PBMC) απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση σε Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway) σύμφωνα με την γνωστή μέθοδο. Για απομόνωση των CD34+ κυττάρων χρησιμοποιήθηκε μαγνητική μέθοδος διαχωρισμού όπως και για την απομόνωση των CD34+/CD38+ και των CD34+/CD38- κυττάρων (MACS, Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany). Για την ανάλυση και την μέτρηση των υποπληθυσμών αυτών χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρητής EPICS ELITE (Beckman-Coulter, Luton, UK). Για την σήμανση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα μονοκλωνικά του οίκου Immunotech, Marseilles, France σεσημασμένα με FITCH ή PE κατά περίπτωση. Η καθαρότητα που λαμβάνεται με την τεχνική αυτή στο εργαστήριό μας είναι για τα CD34+ 75-98%, ενώ για τα CD34+/CD38+ και τα CD34+/CD38- είναι >98% (640).



#### 8.4. Αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες

Για τις ανάγκες των κυτταροκαλλιεργειών χρησιμοποιήθηκαν οι κάτωθι αυξητικοί παράγοντες: ανασυνδυσασμένος ανθρώπινος παράγοντας αύξησης και διαφοροποίησης των μεγακαρυοκυττάρων (rhMGDF), ανασυνδυσασμένος ανθρώπινος αυξητικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων (rhG-CSF), ανασυνδυσασμένος ανθρώπινος παράγοντας των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων (rhSCF), ανασυνδυσασμένη ανθρώπινη ιντερλευκίνη-3 (rhIL-3) και ανασυνδυσασμένος ανθρώπινος αυξητικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (rhGM-CSF) από την εταιρεία R and D (Minneapolis, MN, USA) όλα σε συγκέντρωση 25 ng/ml. Η ανασυνδυσασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη (rhEPO) ήταν από την εταιρεία Janssen-Cilag (UK) σε συγκέντρωση 5 IU/ml και η ανασυνδυσασμένη ανθρώπινη θρομβοποιητίνη (rhFL) από την Immunex (Seattle, WA, USA) σε συγκέντρωση 25 ng/ml.

#### 8.5. Καλλιέργειες ανάπτυξης (expansion cultures)

Για την αύξηση του αριθμού των προγονικών κυττάρων έγιναν καλλιέργειες ανάπτυξης κάτω από τη δράση αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων σε άριστη συγκέντρωση που είναι η ανωτέρω αναφερθείσα. Καθαροί υποπληθυσμοί των ανωτέρω κυττάρων (CD34+, CD34+/CD38+, CD34+/CD38-) εμβολιάστηκαν σε τρυβλία κυτταροκαλλιεργιών σε πυκνότητα 3000-10000 κύτταρα ανά ml σε υλικό Iscove's Modified Dubelco's εμπλουτισμένο με 20% εμβρυϊκό ορό βοός (fetal calf serum) (GIBCO-BRL) και  $10^{-4}$  mol/l 2-mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO) και αιμοποιητικούς αυξητικούς παράγοντες. Μετά από 10-12 ημέρες καταμετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων και υπολογίστηκε το ποσοστό αύξησης του αριθμού των αρχικά εμβολιασθέντων κυττάρων ενώ τα κύτταρα εξετάστηκαν μορφολογικά μετά από χρώση May-Grawwald/Giemsa (Merk, Germany) (640). Μελετήθηκε έτσι η ικανότητα ομαλής ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού των προγονικών κυττάρων. Η δυνατότητα ανάπτυξης των προγονικών κυττάρων διαφέρει στα διάφορα νοσήματα.

## **8.6. Καλλιέργειες μυελού οστών μακράς διάρκειας (Long-term bone marrow cultures)**

Με τις καλλιέργειες μακράς διάρκειας μελετάμε την ικανότητα των προγονικών κυττάρων να δώσουν γένεση σε αιμοποιητικές αποικίες. Καλλιέργειες μακράς διάρκειας των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων του μυελού γίνονται με την χρήση ομόλογων στρωματικών κυττάρων τα οποία προηγουμένως ακτινοβολήθηκαν ώστε να είναι νεκρά (641-642). Με τη χρήση αλλογενών στρωματικών κυττάρων ακτινοβολημένων μπορεί να μελετηθεί ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων στην καλλιέργεια μετά από 5 περίπου εβδομάδες. Με τη μέθοδο αυτή μελετάται η δυνατότητα ανάπτυξης των CD34+ κυττάρων παρουσία αλλογενών φυσιολογικών κυττάρων του στρώματος (εδώ μελετάται η ενδογενής βλάβη των CD34+ κυττάρων). Επίσης μελετάται η ανάπτυξη φυσιολογικών CD34+ κυττάρων σε κύτταρα του στρώματος των ασθενών (εδώ μελετάται παθολογική συμπεριφορά των κυττάρων του στρώματος).

Λεμφομονοπύρηννα κύτταρα του μυελού των οστών ( $10^7$  κύτταρα/τρυβλίο), CD34+ ( $5 \times 10^4$  κύτταρα/τρυβλίο), CD34+/CD38+ (500-5000 κύτταρα/τρυβλίο), CD34+/CD38- (100-500 κύτταρα/τρυβλίο) από τους ασθενείς και τους μάρτυρες τοποθετήθηκαν σε φυσιολογικά κύτταρα του στρώματος και οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν για 5 εβδομάδες με εβδομαδιαία αλλαγή του καλλιεργητικού υλικού (Myelocult H5100, Stem Cell Technologies). Οι αιμοποιητικές αποικίες μετρήθηκαν μετά από 12-14 επιπλέον ημέρες καλλιέργειας σε μεθυλοσελουλόζη (methylcellulose) (641). Έτσι εκτιμήθηκε η δυνατότητα των παραπάνω κυττάρων να δώσουν γένεση σε αιμοποιητικές αποικίες.

## **8.7. Κλωνογόνα προγονικά κύτταρα (clonogenic progenitor cell assays)**

Ο αριθμός των προγονικών κυττάρων που είναι ικανά να παράγουν αιμοποιητικές αποικίες (clonogenic progenitor cells) υπολογίζεται μετρώντας τον αριθμό και το είδος των αποικιών (ερυθροκυτταρικές, κοκκιοκυτταρικές, μεγακαρυοκυτταρικές), που αναπτύσσονται σε μεθυλοσελουλόζη (methyl

cellulose) μετά καλλιέργεια 12-14 ημερών. Τα λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού, CD34+, CD34+/CD38+, CD34+/CD38- τοποθετήθηκαν σε μεθυλοσελουλόζη (methylcellulose) (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, Canada) (640-643) και μετά από 12-14 ημέρες μετρήθηκαν οι αιμοποιητικές αποικίες.

### **8.8. Καλλιέργειες ενός κυττάρου**

Προκειμένου να μελετήσουμε την αντίδραση των προγονικών κυττάρων σε αιμοποιητικούς παράγοντες που δρουν στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης οι ανωτέρω πληθυσμοί CD34+, CD34+/CD38+, CD34+/CD38- εμβολιάζονται σε πλάκες Terassaki σε πυκνότητα ενός κυττάρου ανά τρυβλίο (Nunk, Kamstrup, Denmark) με προσθήκη 20μl υλικού χωρίς ορό (serum depleted medium) (GIBCO-BRL) και 1% λευκωματίνη βοός (bovine serum albumin) (Stem Cell Technologies Inc),  $10^{-4}$  mol/l 2-mercaptoethanol και 3 διαφορετικούς συνδυασμούς κυτταροκινών 1.rhSCF+rhFL 2.rhSCF+ rhFL+ rhMGDF 3. συνδυασμός όλων. Η κυτταρική ανάπτυξη ελέγχθηκε μετά από 11-13 ημέρες επώασης (640-647).

### **8.9. Μελέτη λειτουργίας στρωματικών κυττάρων**

Για να μελετηθεί η ικανότητα των στρωματικών κυττάρων να υποστηρίζουν την φυσιολογική αιμοποίηση ακτινοβολημένα στρωματικά κύτταρα των ασθενών επωάστηκαν και συνκαλλιεργήθηκαν με φυσιολογικά  $5 \times 10^4$  CD34+ κύτταρα του μυελού των οστών από φυσιολογικούς δότες (643-644). Κάθε βδομάδα μετρήθηκε ο αριθμός των ελεύθερων κυττάρων και των σχηματιζόμενων αιμοποιητικών αποικιών.

### **8.10. Μελέτη των αποπτωτικών κυττάρων**

Η απόπτωση στα λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών μελετάται μετά σήμανση με 7-AAD. Το 7-AAD είναι ένα φθορίζον μόριο που προσκολλάται στο DNA και διαχωρίζει τα κύτταρα σε ζώντα, αποπτωτικά και νεκρά με κυτταρομετρία ροής (648).

Αριθμός  $10^6$  λεμφομονοπύρρηνων κυττάρων του μυελού των οστών σημάνθηκε με 20 μl FITCH αντι-ανθρώπινου Fas (CD95) μονοκλωνικού

αντισώματος (R&D Systems, USA) και στη συνέχεια με 7-AAD (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, USA). Το 7-AAD πρώτα διαλύθηκε σε ακετόνη και αραιώθηκε σε PBS σε συγκέντρωση 200μg/ml. Συνολικά 100μl διαλύματος 7-AAD προστέθηκαν σε 1 ml του κυτταρικού εναιωρήματος και επωάστηκαν για 20 λεπτά σε 4° C. Μετά από 3 πλυσίματα τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε παραφορμαλδεΐδη. Μη σημειώμενα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν σαν αρνητικοί μάρτυρες σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιεύσεις (648). Τα δείγματα αναλύθηκαν με κυτταρόμετρο EPICS ELITE (Beckman-Coulter, Luton, UK).

Τα CD34+ κύτταρα απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας το 581 μονοκλωνικό αντίσωμα PE (Becton-Dickinson). Τα αντιγόνα Fas και FasL στα λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών καθορίστηκαν με τη χρήση αντι-CD95-FITC και αντι-FasL μονοκλωνικού αντισώματος (αντι-CD178) αντίστοιχα (R&D Systems, USA). Το Fmcv που είναι δείκτης της πυκνότητας του αντιγόνου στην κυτταρική επιφάνεια μετρήθηκε αυτόματα. Η ενεργοποίηση των μακροφάγων στα μονοκύτταρα του μυελού των οστών εκτιμήθηκε με τον καθορισμό της έκφρασης του CD14 χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής με την παράμετρο RFI (relative fluorescence intensity) (Coulter-Beckman).

### **8.11. Παραγωγή κυτταροκινών μετά από καλλιέργειες λεμφομονοκυττάρων μυελού των οστών**

Την 3<sup>η</sup>-4<sup>η</sup> εβδομάδα καλλιέργειών λεμφομονοκυττάρων μυελού των οστών τα υπερκείμενα διαλύματα μαζεύτηκαν και φυλάχτηκαν στους -80° C και προσδιορίστηκαν ο TNF-α, ο TGF-β, η IFN-γ, η IL-4 και η IL-10 με τη χρήση ανοσοενζυμικών μεθόδων (ELISAs R&D Systems, Minneapolis, USA). Η ευαισθησία για την παραπάνω μέθοδο είναι <4.4 pg/ml για τον TNF-α, <7pg/ml για το TGF-β, <8 pg/ml για την IFN-γ, <10 pg/ml για την IL-4 και 0.5 pg/ml για την IL-10.

## 8.12. Στατιστική ανάλυση

Όλοι οι στατιστικοί υπολογισμοί έγιναν σε Ηλεκτρονικό Υπολογιστή με τη χρήση του προγράμματος SPSS, 10<sup>η</sup> έκδοση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση (SD). Τα ευρήματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τις παρακάτω στατιστικές μεθόδους όπου ήταν εφαρμόσιμα: unpaired t-test, Mann-Whitney U-test (MWU), Kruskal Wallis, ανάλυση ANOVA και το Fisher PLSD test για πολλαπλές συγκρίσεις ανάλογα με την περίπτωση. Οι συσχετίσεις Pearson's (r) και Spearman's ( $r_s$ ) χρησιμοποιήθηκαν ανάλογα με την περίπτωση. Στατιστικά σημαντική διαφορά θεωρήθηκε εκείνη όπου η τιμή του  $p$  ήταν μικρότερη του 0.05 ( $p < 0.05$ ).



## 9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 9.1. Αποτελέσματα μορφολογικών ευρημάτων μυελού

#### 9.1.1. Αποτελέσματα μορφολογικών ευρημάτων μυελού σε ασθενείς με AH-1

Ο αριθμός των ασθενών με AH-1 που είχαν αναιμία ( $Hb < 10 \text{ g/dl}$ ), λευκοπενία ( $WBC < 4 \times 10^9/l$ ), ουδετεροπενία (ουδετερόφιλα  $< 2.5 \times 10^9/l$ ) και θρομβοκυτταροπενία (αιμοπετάλια  $< 140 \times 10^9/l$ ) φαίνεται στον πίνακα 15. Η κυτταροβρίθεια του μυελού των οστών ήταν φυσιολογική σε 7/13 ασθενείς (53.8%), αυξημένη σε 5/13 (38.5%) και μειωμένη σε 1/13 (7.7%) (Πίνακας 15). Ο ασθενής που είχε μειωμένη κυτταροβρίθεια στον μυελό των οστών δεν είχε παρά όλα αυτά ανωμαλίες στο περιφερικό αίμα. Η κυτταροβρίθεια ήταν σημαντικά αυξημένη ( $p=0.007$ ) στους ασθενείς με AH-1 με θετικά Anti-dsDNA αντισώματα ( $3.33 \pm 0.58$ ) σε σχέση με αυτούς με αρνητικά αντισώματα ( $2.1 \pm 0.57$ ) και συσχετίστηκε θετικά με τους τίτλους των Anti-dsDNA αντισωμάτων ( $r=0.749$ ,  $p=0.005$ ).

Υπερπλασία της ερυθράς σειράς παρατηρήθηκε σε σχεδόν μισούς από τους ασθενείς (6/13, 46.2%) ενώ η κυτταροβρίθεια της ερυθράς σειράς ήταν φυσιολογική σε όλους τους υπόλοιπους (6/13, 46.2%) εκτός από έναν υποπλαστικό ασθενή (7,7%) (πίνακας 15). Οι πολυχρωματόφιλοι ερυθροβλάστες ήταν σημαντικά αυξημένοι στους ασθενείς με AH-1 ( $11.9 \pm 2.9$ ) σε σχέση με τους κίρρωτικούς μάρτυρες ( $7 \pm 2$ ) και τους υγιείς ( $7.9 \pm 1.6$ ;  $p=0.0001$  και  $p=0.002$ , αντίστοιχα). Τα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς ήταν διάφορα στον αριθμό και δεν συσχετίστηκαν με τον αιματοκρίτη ή την αιμοσφαιρίνη. Μερικά δυσπλαστικά στοιχεία παρατηρήθηκαν σε δύο ασθενείς (μεγαλοβλαστοειδείς ερυθροβλάστες). Σε έναν ασθενή βρέθηκαν επίσης μικροερυθροβλάστες.

Η κοκκίωδης σειρά είχε φυσιολογική κυτταροβρίθεια σε 7/13 (53.8%), υπερπλασία παρατηρήθηκε σε 4/13 (30.8%) των ασθενών με AH-1, ενώ 2/13 (15.4%) των ασθενών με AH-1 είχαν υποπλασία (πίνακας 15). Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων δεν παρουσίασε συσχέτιση με τα κύτταρα της κοκκίωδους σειράς. Τα μυελοκύτταρα ήταν σημαντικά αυξημένα ( $p < 0.05$ ) σε ασθενείς με θετικά SMA αντισώματα που ανιχνεύτηκαν με ανοσοφθορισμό στα Her2 κύτταρα ( $8.94 \pm 4.26$ ) σε σχέση με αυτούς που είχαν αρνητικά

(5.45±1.39). Επιπλέον, τα μυελοκύτταρα συσχετίστηκαν θετικά με τους τίτλους των SMA αντισωμάτων στα Her2 κύτταρα ( $r=0.944$ ,  $p=0.016$ ). Τα μεταμυελοκύτταρα συσχετίστηκαν επίσης θετικά με με τους τίτλους των SMA αντισωμάτων στα Her2 κύτταρα ( $r=0.904$ ,  $p=0.035$ ). Τα ραβδοπύρρηνα ήταν σημαντικά αυξημένα ( $p<0.05$ ) σε ασθενείς με AH-1 με θετικά SMA στα Her2 κύτταρα (11.28±3.53) σε σχέση με αυτούς με αρνητικά SMA (7.65±2.30). Επίσης, τα ραβδοπύρρηνα συσχετίστηκαν θετικά με τους τίτλους των ANA στα Her2 κύτταρα ( $r=0.634$ ,  $p=0.02$ ), με τους τίτλους των SMA στα Her2 κύτταρα ( $r=0.960$ ,  $p=0.01$ ) και ήταν σημαντικά μειωμένα στους ασθενείς με AH-1 σε σχέση με τους υγιείς ( $p=0.003$ ).

Τα ευρήματα του μυελού έδειξαν επίσης αυξημένο αριθμό μεγακαρυοκυττάρων στα 2/3 των ασθενών συνοδευόμενα από την παρουσία ανώριμων μεγακαρυοκυττάρων σε 69.2% αυτών (πίνακας 15). Τα ανώριμα μεγακαρυοκύτταρα βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με AH-1 (16.2±16.9) σε σχέση με κίρρωτικούς (2.3±6) και υγιείς (0±0,  $p=0.006$  και  $p=0.004$  αντίστοιχα) και σημαντικά αυξημένα ( $p<0.02$ ) σε ασθενείς που έπαιρναν θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά (25.71±17.66) σε σχέση με αυτούς που δεν έπαιρναν ανοσοκατασταλτικά (5.0±5.48). Επίσης τα μεγακαρυοκύτταρα του μυελού συσχετίστηκαν αρνητικά με τα επίπεδα της IgG ( $r=-0.609$ ,  $p=0.027$ ) και της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST) ( $r=-0.570$ ,  $p=0.042$ ).

Αυξημένος αριθμός μονοκυττάρων (>0.2% του συνολικού αριθμού των κυττάρων) παρατηρήθηκε σε όλους.

Αυξημένος αριθμός λεμφοκυττάρων (>20% του συνολικού αριθμού των κυττάρων) παρατηρήθηκε στους μισούς ασθενείς (στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τους υγιείς  $p<0.05$ ). Τα λεμφοκύτταρα του μυελού των οστών ήταν αυξημένα ( $p=0.026$ ) σε κίρρωτικούς ασθενείς με AH-1 (28.33±9.6) σε σχέση με μη κίρρωτικούς ασθενείς με AH-1 (16.47±6.47).

Αυξημένα πλασματοκύτταρα (>3.5% του συνολικού αριθμού των κυττάρων του μυελού) παρατηρήθηκαν σε 4/13 (30.8%) των ασθενών ενώ αυξημένος αριθμός μαστοκυττάρων βρέθηκε σε δύο ασθενείς (πίνακας 15).

Οι αποθήκες σιδήρου ήταν μειωμένες σε 45.5% των ασθενών φυσιολογικές σε 36.4% και αυξημένες στο 18.2% των ασθενών (πίνακας 15). Δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες βρέθηκαν σε έναν ασθενή.



Δεν βρέθηκαν άλλες συσχετίσεις ανάμεσα στις παραμέτρους του μυελού των οστών και τα δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΑΗ-1.

### **9.1.2. Αποτελέσματα μορφολογικών ευρημάτων σε ασθενείς με ΠΧΚ**

Ο αριθμός των ασθενών με ΠΧΚ με αναιμία, λευκοπενία, ουδετεροπενία και θρομβοκυτταροπενία φαίνεται στον πίνακα 15. Η κυτταροβρίθεια του μυελού των οστών ήταν αυξημένη σε 6/13 (46.2%) φυσιολογική σε 4/13 ασθενείς (30.8%) και μειωμένη σε 3/13 (23,1%) (Πίνακας 15). Μόνο ένας από τους τρεις ασθενείς με μειωμένη κυτταροβρίθεια του μυελού είχε λευκοπενία, ουδετεροπενία, και θρομβοκυτταροπενία. Η περιφερική κυτταροπενία δεν συσχετίστηκε με καμία από τις εργαστηριακές ή κλινικές παραμέτρους που μελετήθηκαν. Η κυτταροβρίθεια του μυελού ήταν σημαντικά αυξημένη ( $p=0.038$ ) σε μη κιρρωτικούς με ΠΧΚ ασθενείς ( $2.55\pm 0.84$ ) σε σχέση με κιρρωτικούς ασθενείς ( $1.0\pm 0$ ).

Υπερπλασία της ερυθράς σειράς παρατηρήθηκε σε 5/13 (38.5%) των ασθενών, η κυτταροβρίθεια της ερυθράς σειράς ήταν φυσιολογική σε 5/13 (38.5%), ενώ υποπλασία παρατηρήθηκε σε 3 ασθενείς (23.1%) (πίνακας 15). Όπως και στους ασθενείς με ΑΗ-1, οι πολυχρωματόφιλοι ερυθροβλάστες ήταν σημαντικά αυξημένοι στους ασθενείς με ΠΧΚ ( $10.2\pm 3.6$ ) σε σχέση με τους κιρρωτικούς μάρτυρες ( $7\pm 2$ ,  $p=0.006$ ). Τα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς δεν συσχετίστηκαν με τον αιματοκρίτη ή την αιμοσφαιρίνη. Σε έναν ασθενή παρατηρήθηκαν δυσπλαστικά στοιχεία (μεγαλοβλαστοειδείς ερυθροβλάστες).

Υπερπλασία της κοκκιώδους σειράς παρατηρήθηκε σε 6/13 (46.2%) των ασθενών, φυσιολογική κυτταροβρίθεια της κοκκιώδους σε 4/13 (30.8%) ενώ 3/13 (23.1%) των ασθενών είχαν υποπλασία (πίνακας 15). Τα ηωσινόφιλα ήταν σημαντικά μειωμένα στους ασθενείς με ΠΧΚ ( $0.8\pm 0.6$ ) σε σχέση με τους υγιείς ( $1.3\pm 1$ ,  $p<0.05$ ). Τα προμυελοκύτταρα συσχετίστηκαν θετικά με την ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AST) ( $r=0.761$ ,  $p=0.002$ ) ενώ τα μεταμυελοκύτταρα και τα ραβδοκύτταρα του μυελού των οστών συσχετίστηκαν θετικά με τα επίπεδα της γ-γλουταμυλικής-τρανσπεπτιδάσης γ-

GT ( $r=0.641$ ,  $p=0.018$  και  $r=0.615$ ,  $p=0.025$  αντίστοιχα). Όπως και στους ασθενείς με AH-1, τα ραβδοκύτταρα του μυελού των οστών ήταν σημαντικά μειωμένα στους ασθενείς με ΠΧΚ σε σχέση με τους υγιείς ( $p=0.004$ ).

Τα ευρήματα του μυελού έδειξαν επίσης αυξημένο αριθμό μεγακαρυοκυττάρων στην μεγαλύτερη πλειοψηφία των ασθενών (77%) συνοδευόμενων από την παρουσία ανώριμων μεγακαρυοκυττάρων σε 69.2% αυτών (πίνακας 15). Όπως και στους ασθενείς με AH-1 τα ανώριμα μεγακαρυοκύτταρα ήταν σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με ΠΧΚ ( $17.3\pm 20.2$ ) σε σχέση με τους κίρρωτικούς μάρτυρες ( $2.3\pm 6$ ) και τους υγιείς ( $0\pm 0$ ,  $p=0.008$  και  $p=0.004$  αντίστοιχα).

Αυξημένος αριθμός μονοκυττάρων του μυελού παρατηρήθηκε σε όλους.

Αυξημένος αριθμός λεμφοκυττάρων του μυελού παρατηρήθηκε στους μισούς ασθενείς (στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τους υγιείς,  $p<0.05$ ).

Αυξημένα πλασματόκυτταρα παρατηρήθηκαν σε έναν ασθενή ( $p=0.16$  σε σχέση με τους ασθενείς με AH-1) ενώ αυξημένος αριθμός μαστοκυττάρων βρέθηκε σε ακόμη έναν ασθενή (πίνακας 15).

Οι αποθήκες σιδήρου ήταν ελαττωμένες σε 63.6% των ασθενών, φυσιολογικές σε 27,3% και αυξημένες σε έναν ασθενή (πίνακας 15).

Δεν βρέθηκαν άλλες συσχετίσεις ανάμεσα στις παραμέτρους του μυελού των οστών που μελετήσαμε και τα δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΠΧΚ.

### **9.1.3. Αποτελέσματα μορφολογικών ευρημάτων σε κίρρωτικούς μάρτυρες**

Ο αριθμός των ασθενών με κίρρωση μη αυτοανόσου αιτιολογίας και συνοδευόμενη αναιμία, λευκοπενία, ουδετεροπενία, ή θρομβοκυταροπενία φαίνεται στον πίνακα 15. Η κυτταροβρίθεια του μυελού των οστών ήταν φυσιολογική σε 7/12 ασθενείς (58.3%), μειωμένη στο 1/3 (33.3%) και αυξημένη σε μόνο έναν ασθενή (8.3%).

Η κυτταροβρίθεια της ερυθράς σειράς ήταν φυσιολογική σε 7/12 ασθενείς (58.3%), ελαττωμένη σε 4/12 (33.3%) και αυξημένη σε έναν μόνο ασθενή (8.3%) (πίνακας 15).

Η κυτταροβρίθεια της κοκκιώδους σειράς ήταν φυσιολογική σε 7/12 (58.3%), ελαττωμένη στο ένα τρίτο των ασθενών (33.3%) ενώ υπερπλασία της κοκκιώδους σειράς παρατηρήθηκε μόνο σε έναν ασθενή (8.3%) (πίνακας 15). Τα ραβδοκύτταρα του μυελού των οστών ήταν σημαντικά μειωμένα στους κίρρωτικούς σε σχέση με τους υγιείς ( $p=0.01$ ).

Τα ευρήματα του μυελού έδειξαν επίσης αυξημένο αριθμό μεγακαρυοκυττάρων στους μισούς κίρρωτικούς μάρτυρες συνοδευόμενα από την παρουσία ανώριμων μεγακαρυοκυττάρων σε μόνο δύο ασθενείς (πίνακας 15).

Αυξημένος αριθμός μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων παρατηρήθηκε σε όλους τους κίρρωτικούς μάρτυρες (για τα λεμφοκύτταρα μόνο υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την AH-1,  $p<0.02$ , με την ΠΧΚ  $p<0.02$  και τους υγιείς μάρτυρες  $p=0.0001$ ).

Αυξημένος αριθμός πλασματοκυττάρων παρατηρήθηκε σε έναν μόνο ασθενή ( $p<0.10$  σε σχέση με την AH-1, πίνακας 15).

Οι αποθήκες σιδήρου ήταν φυσιολογικές στους μισούς ασθενείς και μειωμένες σε όλους τους υπόλοιπους (πίνακας 15).

Δεν βρέθηκαν άλλες συσχετίσεις ανάμεσα στις παραμέτρους του μυελού των οστών που μελετήθηκαν και τα δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των κίρρωτικών μαρτύρων.

**Πίνακας 15.** Ευρήματα του μυελού και του περιφερικού αίματος σε ασθενείς με ΑΗ-1 (αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1), ΠΧΚ (πρωτοπαθή χολική κίρρωση) και στους κίρρωτικούς μάρτυρες.

	<i>ΑΗ-1(n=13)</i>	<i>ΠΧΚ(n=13)</i>	<i>Κίρρωτικοί(n=12)</i>
<b>Περιφερικό αίμα</b>			
-αιμοσφαιρίνη<10g/dl	0	0	1
-WBC<4x10 <sup>9</sup> /L	2	2	0
-πολυμορφ<2.5x10 <sup>9</sup> /L	6	2	2
-Αιμοπετάλια<140x10 <sup>9</sup>	2	3	3
<b>Κυτταροβρίθεια</b>			
<b>μυελού</b>			
<b>Συνολική</b>			
Αυξημένη	5 (38.5%)	6 (46.2%)	1 (8.3%)
Φυσιολογική	7 (53.8%)	4 (30.8%)	7 (58.3%)
Ελαττωμένη	1 (7.7%)	3 (23.1%)	4 (33.3%)
<b>Ερυθρά σειρά</b>			
Αυξημένη	6 (46.2%)	5 (38.5%)	1 (8.3%)
Φυσιολογική	6 (46.2%)	5 (38.5%)	7 (58.3%)
Ελαττωμένη	1 (7.7%)	3 (23.1%)	4 (33.3%)
<b>Κοκκιώδης σειρά</b>			
Αυξημένη	4 (30.8%)	6 (46.2%)	1 (8.3%)
Φυσιολογική	7 (53.8%)	4 (30.8%)	7 (58.3%)
Ελαττωμένη	2 (15.4%)	3 (23.1%)	4 (33.3%)
<b>Μεγακαρουκυτταρική</b>			
Αυξημένη	9 (69.2%)	10 (77%)	6 (50%)
Φυσιολογική	4 (30.8%)	3 (23%)	6 (50%)
Ελαττωμένη	0	0	0
<b>Ανώριμα μεγακαρ.</b>			
Αυξημένα	9 (69.2%)	9 (69.2%)	2 (16.7%)
Φυσιολογικά	4 (30.8)	4 (30.8%)	10(83.3%)
Ελαττωμένα	0	0	0
<b>Μονοκύτταρα</b>			
Αυξημένα	13 (100%)	13 (100%)	12 (100%)
Φυσιολογικά	0	0	0
Ελαττωμένα	0	0	0
<b>Λεμφοκύτταρα</b>			
Αυξημένα	7 (53.8%)	7 (53.8%)	12 (100%)
Φυσιολογικά	6 (46.2%)	6 (46.2%)	0
Ελαττωμένα	0	0	0
<b>Πλασματοκύτταρα</b>			
Αυξημένα	4 (30.8%)	1 (7.7%)	1(8.3%)
Φυσιολογικά	9 (69.2%)	12(92.3%)	11(91.7%)
Ελαττωμένα	0	0	0
<b>Αποθήκες σιδήρου</b>			
Αυξημένες	2 (18.2%)	1(9.1%)	0
Φυσιολογικές	4 (36.4%)	3 (27.3%)	6 (50%)
Ελαττωμένες	5 (45.5%)	7 (63.6%)	6 (50%)

## 9.2. Αποτελέσματα κυτταρομετρικής ανάλυσης των προγονικών κυττάρων

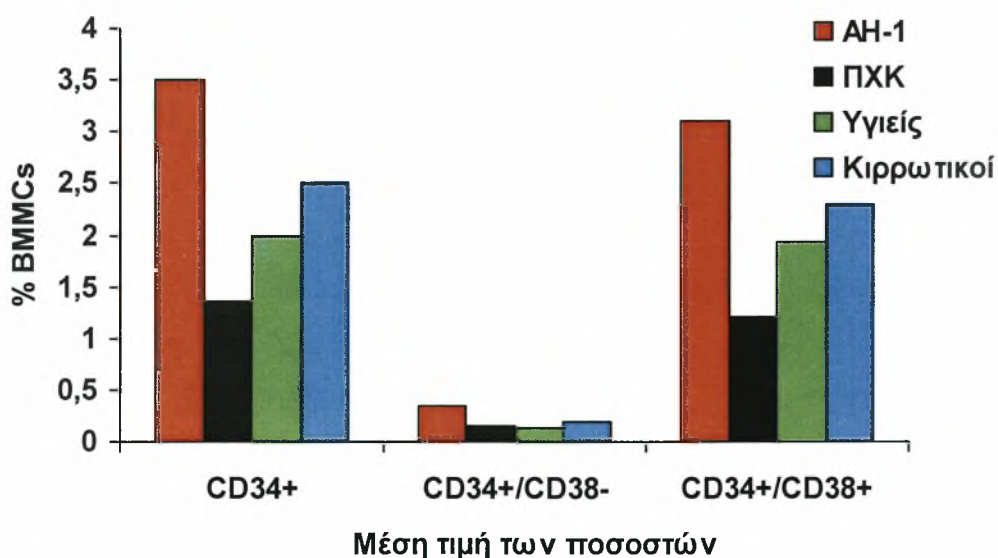
Το ποσοστό των CD34+ κυττάρων και των υποπληθυσμών τους σε ασθενείς και μάρτυρες φαίνεται στον πίνακα 16 και εικόνα 19. Η μέση τιμή των ποσοστών των CD34+, CD34+/CD38+ και CD34+/CD38- ήταν σημαντικά διαφορετική (ANOVA,  $p < 0.05$ ) στις τέσσερις ομάδες που μελετήθηκαν (AH-1, ΠΧΚ, κίρρωτικοί, υγιείς, πίνακας 16). Συγκεκριμένα μετά από σύγκριση μεταξύ των ομάδων με το Fisher PLSD τεστ, οι ασθενείς με AH-1 είχαν σημαντικά υψηλότερη αναλογία CD34+ κυττάρων στο κυτταρικό κλάσμα των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων σε σχέση με τους ΠΧΚ, κίρρωτικούς και τους υγιείς μάρτυρες ( $p < 0.001$ ). Οι ασθενείς με ΠΧΚ είχαν σημαντικά χαμηλότερη αναλογία CD34+ στο κυτταρικό κλάσμα σε σχέση με τους κίρρωτικούς και τους υγιείς ( $p < 0.005$ ) (πίνακας 16). Τα CD34+/CD38+ καθώς και τα πιο πρώιμα CD34+/CD38- κύτταρα ήταν παρόμοια επηρεασμένα στην AH-1 και ΠΧΚ (πίνακας 16). Δεν βρέθηκαν διαφορές ανάμεσα σε κίρρωτικούς και υγιείς όσον αφορά τα CD34+ κύτταρα και τους υποπληθυσμούς τους. Οι κίρρωτικοί ασθενείς με AH-1 ( $n=7$ ) είχαν επίσης σημαντικά αυξημένα CD34+ κύτταρα και τους υποπληθυσμούς τους σε σχέση με τους κίρρωτικούς μάρτυρες ( $n=12$ ) (CD34+ (%):  $3.41 \pm 0.69$  σε σχέση με  $2.51 \pm 0.63$ ,  $p=0.01$ , CD34+/CD38+ (%) :  $3.05 \pm 0.61$  σε σχέση με  $2.33 \pm 0.56$ ,  $p < 0.02$ , CD34+/CD38- (%):  $0.35 \pm 9.75 \times 10^{-2}$  σε σχέση με  $0.19 \pm 9.96 \times 10^{-2}$ ,  $p < 0.005$ ).

Και στις δύο ομάδες ασθενών και στους κίρρωτικούς η αναλογία των CD34+ κυττάρων και των υποπληθυσμών τους δεν συσχετιζόταν με την ηλικία, το φύλο, τη διάρκεια της ασθένειας, τη θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά και την παρουσία κίρρωσης ή εξωηπατικών εκδηλώσεων αυτοανοσίας. Όσον αφορά τις εργαστηριακές παραμέτρους τα CD34+ κύτταρα και τα CD34+/CD38+ κύτταρα στους ασθενείς με AH-1 συσχετιζόταν αρνητικά με την ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AST) ( $r=-0.58$ ,  $p < 0.05$ , και  $r=-0.61$ ,  $p < 0.05$  αντίστοιχα). Στους ασθενείς με ΠΧΚ και τους κίρρωτικούς τα CD34+ κύτταρα και οι υποπληθυσμοί τους δεν συσχετιζόταν με κανένα εργαστηριακό δείκτη.

**Πίνακας 16.** Συχνότητα (%) των CD34+, CD34+/CD38+ και CD34+/CD38- κυττάρων καθώς και των αιμοποιητικών αποικιών ανά  $10^7$  λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών (μετά από 5 εβδομάδες καλλιέργειας) στις τέσσερις ομάδες που μελετήθηκαν.

	<i>ΑΗ-1</i>	<i>ΠΧΚ</i>	<i>Κιρρωτικοί</i>	<i>Υγιείς</i>
CD34+	3.5±0.7 <sup>*,**,***</sup>	1.35±0.32 <sup>*,#,~</sup>	2.5±0.62 <sup>***,~</sup>	2±0.42 <sup>**,#</sup>
CD34+/CD38+	3.1±0.6 <sup>*,**,***</sup>	1.2±0.35 <sup>*,#,~</sup>	2.3±0.56 <sup>***,~</sup>	1.94±0.43 <sup>**,#</sup>
CD34+/CD38-	0.34±9.67x10 <sup>-2*</sup> , <sup>**,***</sup>	0.16±7.78x10 <sup>-2*</sup>	0.19±9.96x10 <sup>-2***</sup>	0.14±5.16x10 <sup>-2**</sup>
BFU-E/10 <sup>7</sup>	3291.5±568.8 <sup>*,†</sup>	1720±491.36 <sup>*,#,**</sup>	2803±895.4 <sup>**</sup>	2583±493.85 <sup>†,#</sup>
CFU-GM/10 <sup>7</sup>	10542.7±1710 <sup>*,**,***</sup>	4517.5±1495.9 <sup>*,#,~</sup>	7519.5±941.4 <sup>***,#</sup>	7094±1062.3 <sup>**,~</sup>
CFU-Meg/10 <sup>7</sup>	2810.4±659.5 <sup>*</sup>	1601.6±539.4 <sup>*,#,**</sup>	2980±668 <sup>**</sup>	2580±592 <sup>#</sup>

ΑΗ-1: Αυτοάνοση Ηπατίτιδα τύπου 1, ΠΧΚ: Πρωτοπαθής χολική κίρρωση, BFU-E: αποικίες των ερυθροκυττάρων, CFU-GM: αποικίες των κοκκιοκυττάρων, CFU-Meg: αποικίες των μεγακαρυοκυττάρων. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή±SD. \* p<0.001, \*\* p<0.001, \*\*\* p<0.001, ~ p<0.005, # p<0.005, † p<0.01 (ANOVA, Fisher PLSD).



**Εικόνα 19.** Μέση τιμή των ποσοστών των προγονικών κυττάρων στα λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών (% BMMCs) με κυτταρομετρική ανάλυση.

### 9.3. Καλλιέργειες ανάπτυξης (expansion cultures)

Η ανάπτυξη των CD34+/CD38+ κυττάρων στην ομάδα των υγιών ήταν από 580-980 φορές και των CD34+/CD38- ήταν από 64-500 φορές (πίνακας 17). Στους ασθενείς με ΑΗ-1 η ανάπτυξη των CD34+/CD38+ κυττάρων ήταν από 580-980 φορές και των CD34+/CD38- ήταν 64-500 ενώ στους ασθενείς με ΠΧΚ ήταν από 585-980 και 68-423 φορές αντίστοιχα. Στους κίρρωτικούς η ανάπτυξη των CD34+/CD38+ ήταν 570-985 φορές και των CD34+/CD38- ήταν 68-485 φορές. Η δυνατότητα εξάπλωσης των κεκαθαρμένων CD34+/CD38+ και CD34+/CD38- καθοριζόμενη από τον αριθμό των κυττάρων μετά από 10-12 ημέρες καλλιέργειας δεν είχε διαφορά στις ομάδες που μελετήθηκαν. Η μορφολογία των κυττάρων σε αυτές τις καλλιέργειες ήταν φυσιολογική.

**Πίνακας 17.** Δυνατότητα εξάπλωσης (αριθμός κυττάρων μετά από 12-14 ημέρες καλλιέργειας) των CD34+/CD38+ και CD34+/CD38- κυττάρων στις τέσσερις ομάδες που μελετήθηκαν.

	<i>CD34+/CD38+ κύτταρα</i>	<i>CD34+/CD38- κύτταρα</i>
ΑΗ-1	580-980 φορές	64-500
ΠΧΚ	585-980	68-423
Κίρρωτικοί μάρτυρες	570-985	68-485
Υγιείς μάρτυρες	580-980	64-500

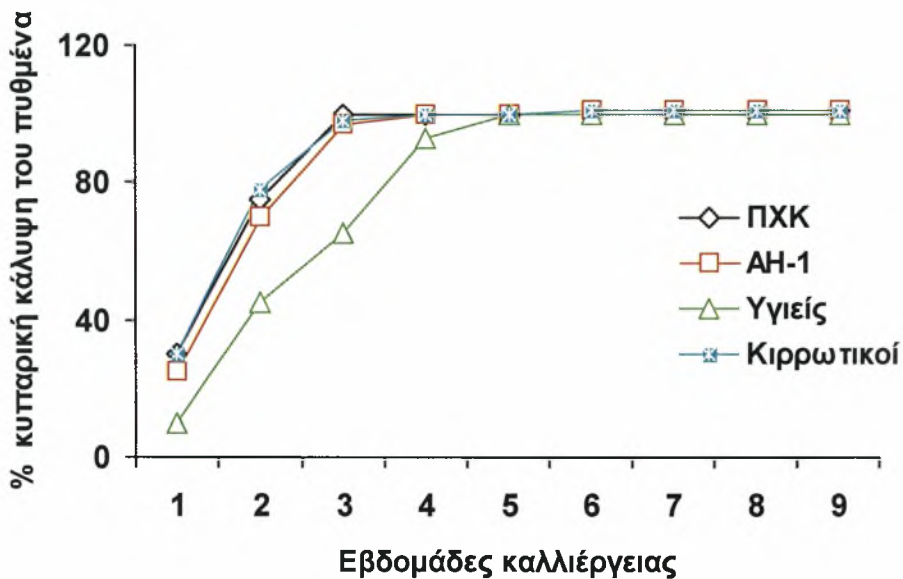
ΑΗ-1: Αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1, ΠΧΚ: Πρωτοπαθής χολική κίρρωση

### 9.4. Μακράς διάρκειας καλλιέργειες μυελού των οστών (Long-term Bone Marrow cultures)

Τα στρωματικά κύτταρα έφτασαν σε ανάπτυξη στο 100% της επιφάνειας του πυθμένα (confluency) νωρίτερα στους ασθενείς με ΑΗ-1, ΠΧΚ και τους κίρρωτικούς σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες ( $p < 0.05$ ) (εικόνα 20). Δεν υπήρχε αξιόλογη διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς με ΑΗ-1 και ΠΧΚ και

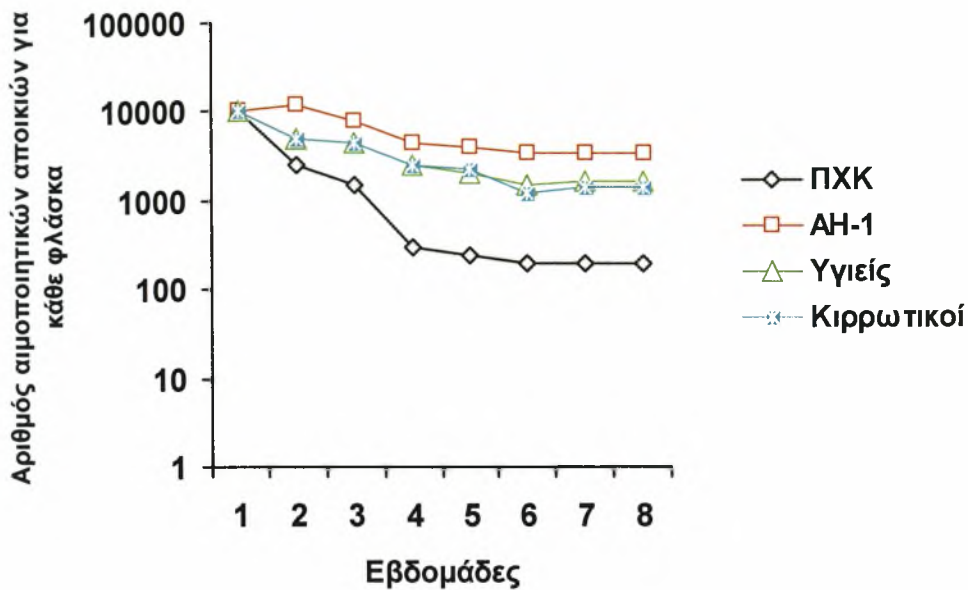
τους κίρρωτικούς. Η μέση διάρκεια της παραγωγής αιμοποιητικών αποικιών από τα εναιωρούμενα κύτταρα ήταν παρόμοια σε ασθενείς και μάρτυρες (9 εβδομάδες για την ΑΗ-1, 8.5 εβδομάδες για την ΠΧΚ και 9 εβδομάδες για τους κίρρωτικούς και υγιείς μάρτυρες).

Η συχνότητα των συνολικών αιμοποιητικών αποικιών στο εναιωρούμενο κυτταρικό κλάσμα από τα κλωνογόνα προγονικά κύτταρα ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με ΑΗ-1 σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΚ και τους μάρτυρες ( $p < 0.05$ ) και σημαντικά χαμηλότερη στους ασθενείς με ΠΧΚ σε σχέση με τους μάρτυρες ( $p < 0.05$ ) (εικόνα 21). Δεν παρουσιάστηκε συσχέτιση των αιμοποιητικών αποικιών στο εναιωρούμενο κυτταρικό κλάσμα με τα δημογραφικά δεδομένα των ασθενών.



**Εικόνα 20.** Μέση τιμή της κυτταρικής κάλυψης του πυθμένα (% confluency) κάθε εβδομάδα καλλιέργειας σε μακράς διάρκειας καλλιέργειες.





**Εικόνα 21.** Αριθμός των αιμοποιητικών αποικιών (CFCs) για κάθε φλάσκα κάθε εβδομάδα στο εναιωρούμενο κυτταρικό κλάσμα σε μακράς διάρκειας καλλιέργειες.

### 9.5. Κλωνογόνα προγονικά κύτταρα (clonogenic progenitor cell assays)

Η συχνότητα των αιμοποιητικών αποικιών ανά  $10^7$  λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών σε ασθενείς με ΑΗ-1, ΠΧΚ και μάρτυρες φαίνεται στην εικόνα 22Α. Η μέση τιμή των αιμοποιητικών αποικιών (ερυθροκυτταρικές, κοκκιοκυτταρικές, μεγακαρυοκυτταρικές) όπως καθορίστηκε από τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν μετά από καλλιέργεια σε μεθυλοσελουλόζη (methylcellulose) ήταν σημαντικά διαφορετική (ANOVA  $p < 0.05$ ) στις ομάδες που μελετήθηκαν (πίνακας 16, εικόνα 22Α).

**ΑΗ-1:** Μετά από σύγκριση μεταξύ των ομάδων με το Fisher PLSD τεστ οι ασθενείς με ΑΗ-1 είχαν υψηλότερα επίπεδα όλων των αιμοποιητικών αποικιών σε σχέση με αυτά των ασθενών με ΠΧΚ ( $p < 0.001$  για όλα τα κλωνογόνα προγονικά κύτταρα, πίνακας 16, εικόνα 22Α). Οι κοκκιοκυτταρικές αιμοποιητικές αποικίες ήταν σημαντικά υψηλότερες στους ασθενείς με ΑΗ-1 σε σχέση με τους μάρτυρες ( $p < 0.001$ ). Οι ερυθροκυτταρικές αποικίες ήταν

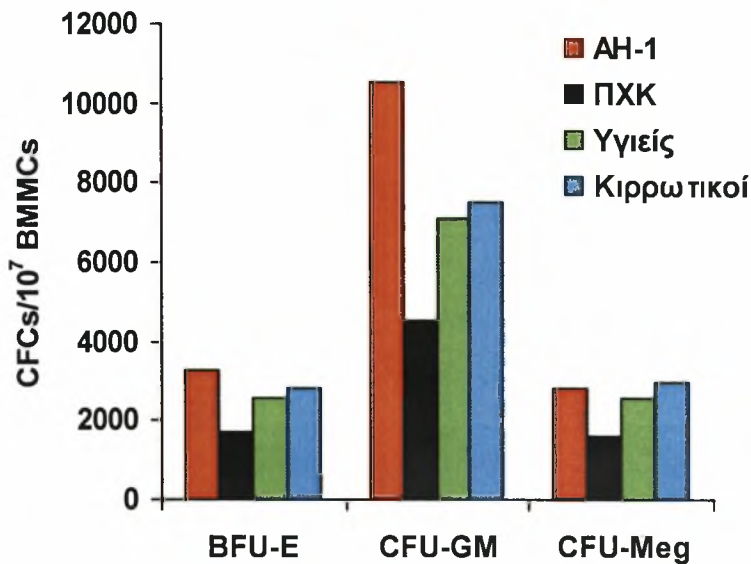
σημαντικά αυξημένες στην AH-1 σε σχέση με τους υγιείς ( $p < 0.01$ ) και αυξημένες αλλά όχι στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τους κίρρωτικούς ( $p < 0.10$ ), ενώ οι μεγακαρουκυτταρικές δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα σε ασθενείς με AH-1 και τους μάρτυρες (πίνακας 16, εικόνα 22A). Συσχέτιση της μέσης τιμής των αποικιών ανάμεσα στους κίρρωτικούς με AH-1 και τους κίρρωτικούς μάρτυρες έδειξε παρόμοιες τάσεις ( $p =$ μη στατιστικά σημαντικό,  $p < 0.005$ ,  $p =$ μη στατιστικά σημαντικό για BFU-E, CFU-GM, CFU-Meg αντίστοιχα).

**ΠΧΚ:** Στους ασθενείς με ΠΧΚ η συχνότητα των αιμοποιητικών αποικιών ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τους υγιείς και τους κίρρωτικούς (πίνακας 16, εικόνα 22A).

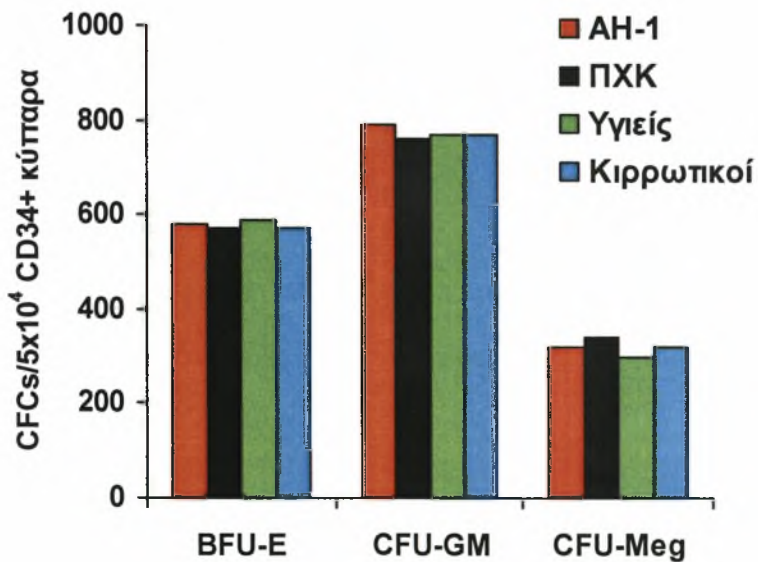
**ΚΙΡΡΩΣΗ:** Οι κίρρωτικοί είχαν παρόμοια ευρήματα με τους υγιείς μάρτυρες.

Αντιθέτως η συχνότητα των αιμοποιητικών αποικιών στα κεκαθαρμένα CD34+ κύτταρα δεν διέφερε ανάμεσα στις τέσσερις ομάδες που μελετήθηκαν (εικόνα 22B).

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ:** Και στις δυο ομάδες των ασθενών η αναλογία των αιμοποιητικών αποικιών δεν συσχετιζόταν με την ηλικία, το φύλο, ανοσοκατασταλτική θεραπεία ή την παρουσία κίρρωσης. Η διάρκεια της ασθένειας συσχετίστηκε θετικά με την συχνότητα των αιμοποιητικών αποικιών των μεγακαρουκυττάρων ( $r = 0.77$ ,  $p < 0.005$ ) στους ασθενείς με AH-1. Επιπλέον η μέση τιμή των αιμοποιητικών αποικιών των κοκκιοκυττάρων ήταν σημαντικά ( $p < 0.05$ ) χαμηλότερη μόνο στους ασθενείς με AH-1 με εξωηπατικές εκδηλώσεις αυτοανοσίας ( $9546.7 \pm 1114.2$ ) σε σχέση με αυτούς που δεν είχαν εξωηπατικές εκδηλώσεις ( $11396.4 \pm 1707.4$ ). Όσον αφορά τα εργαστηριακά δεδομένα οι αιμοποιητικές αποικίες των κοκκιοκυττάρων και μεγακαρουκυττάρων δεν συσχετιζόταν με κανέναν εργαστηριακό δείκτη και στις δυο ομάδες των ασθενών. Μόνο στους ασθενείς με AH-1 οι αιμοποιητικές αποικίες των ερυθροκυττάρων/ $10^7$  συσχετιζόταν θετικά με τις τιμές της IgG ( $r = 0.6$ ,  $p < 0.05$ ) και αρνητικά με τις τιμές AST και ALT ( $r = -0.82$ ,  $p = 0.001$  και  $r = -0.62$ ,  $p = 0.02$  αντίστοιχα).



**Εικόνα 22Α.** Μέση τιμή των αιμοποιητικών αποικιών (CFCs) ανά  $10^7$  λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών (BMMCs) την 5<sup>η</sup> εβδομάδα καλλιέργειας μυελού των οστών.



**Εικόνα 22Β.** Μέση τιμή των αιμοποιητικών αποικιών (CFCs) ανά  $5 \times 10^4$  καθαρά CD34+ κύτταρα την 5<sup>η</sup> εβδομάδα καλλιέργειας μυελού των οστών.

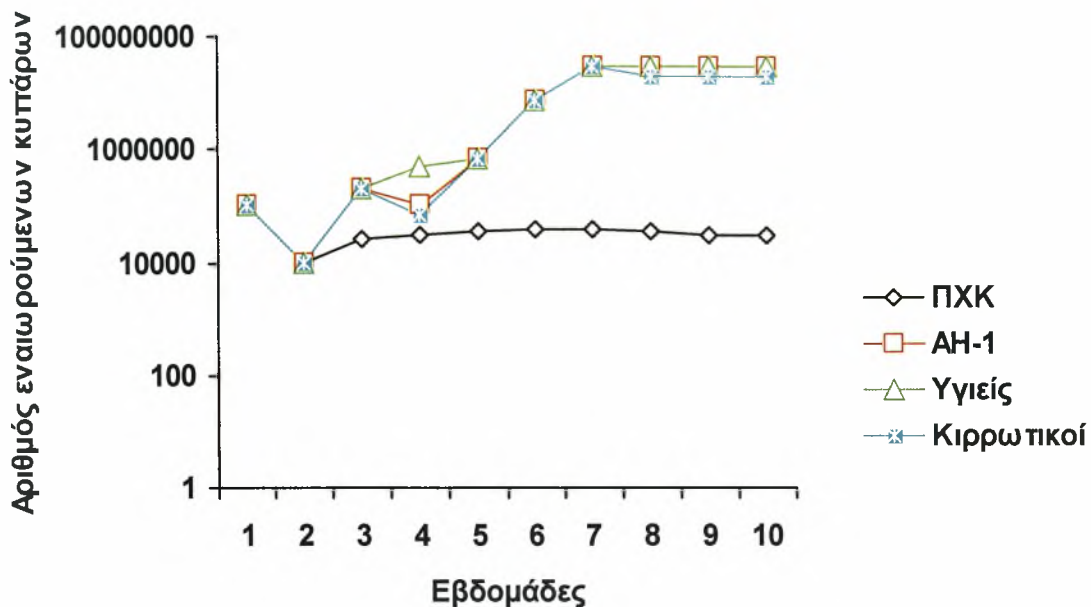
## 9.6. Καλλιέργειες ενός κυττάρου

Τα φυσιολογικά CD34+/CD38- κύτταρα δείχνουν μια μοναδική ανταπόκριση σε rhSCF, rhFL και rhMDGF και ο συνδυασμός αυτών των αναπτυξιακών παραγόντων προκαλεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών ενώ ο συνδυασμός rhSCF και rhFL έχει μικρή ή καθόλου επίδραση (646). Τα CD34+/CD38- κύτταρα από ασθενείς με ΑΗ-1 και ΠΧΚ είχαν παρόμοια με τη φυσιολογική απόκριση στους τρεις αναπτυξιακούς παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν. Τα CD34+/CD38+ κύτταρα από ασθενείς με ΑΗ-1 και ΠΧΚ έδειξαν υψηλότερη ανταπόκριση (όπως και τα αντίστοιχα των υγιών μαρτύρων και κίρρωτικών) στο συνδυασμό rhSCF και rhFL σε σχέση με τα CD34+/CD38- κύτταρα.

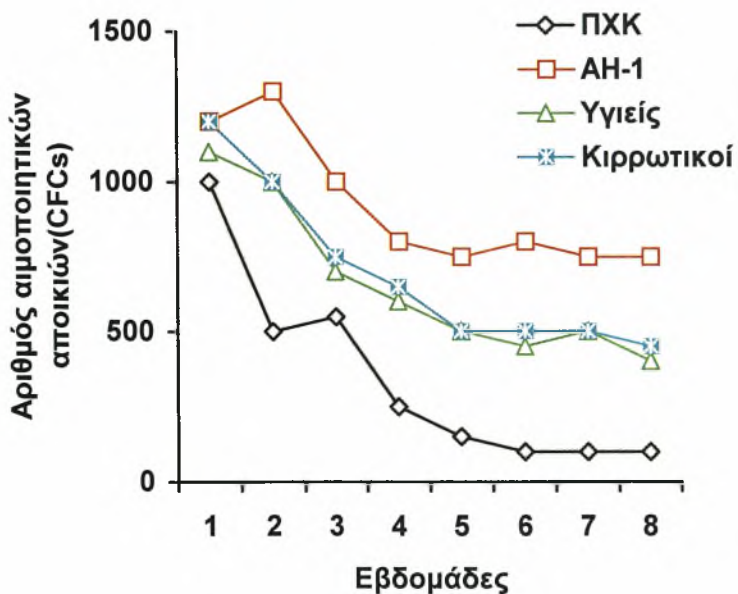
## 9.7. Λειτουργία στρωματικών κυττάρων

(υποστήριξη ανάπτυξης αιμοποιητικών αποικιών)

Τόσο ο αριθμός των εναιωρούμενων κυττάρων όσο και οι αιμοποιητικές κυτταρικές αποικίες σε μακράς διάρκειας καλλιέργειες διέφεραν σημαντικά στις ομάδες που μελετήσαμε ( $p < 0.05$ ) (εικόνα 23Α και 23Β). Συγκεκριμένα ο αριθμός των κυττάρων στο εναιωρούμενο κυτταρικό κλάσμα δεν διέφερε ανάμεσα στους ασθενείς με ΑΗ-1 και τους μάρτυρες αλλά ήταν σημαντικά χαμηλότερος στους ασθενείς με ΠΧΚ σε σχέση με τους μάρτυρες και τους ασθενείς με ΑΗ-1 ( $p < 0.05$ , εικόνα 23Α). Οι ασθενείς με ΑΗ-1 είχαν υψηλότερη συχνότητα αιμοποιητικών αποικιών σε κάθε τρυβλίο σε σχέση με τους υγιείς, τους κίρρωτικούς και τους ασθενείς με ΠΧΚ ( $p < 0.05$ ) (εικόνα 23Β). Οι ασθενείς με ΠΧΚ είχαν χαμηλότερη συχνότητα αιμοποιητικών αποικιών σε κάθε τρυβλίο σε σχέση με τους μάρτυρες ( $p < 0.05$  εικόνα 23Β).



Εικόνα 23Α. Αριθμός των εναιωρούμενων κυττάρων κάθε εβδομάδα στις μακράς διάρκειας καλλιέργειες.



Εικόνα 23Β. Αριθμός των αιμοποιητικών αποικιών (CFCs) κάθε εβδομάδα σε μακράς διάρκειας καλλιέργειες.

### 9.8. Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής για τους δείκτες απόπτωσης και κυτταρικής ενεργοποίησης

Η μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση των 7-AAD+ κυττάρων, Fas+ κυττάρων, Fas-fmcv, FasL+ κυττάρων, FasL-fmcv, CD34+/FasL+ κυττάρων και CD14-fmcv ασθενών και μαρτύρων φαίνεται στον Πίνακα 18, Εικόνες 24-25. Κάθε μια από τις παραπάνω παραμέτρους ήταν σημαντικά διαφορετική στις τέσσερις ομάδες που μελετήθηκαν (ANOVA για όλες τις παραμέτρους εκτός από τα CD34+/FasL+ για τα οποία εφαρμόστηκε Kruskal-Wallis,  $p=0.0001$  για όλα). Τα ακόλουθα αποτελέσματα προέκυψαν μετά τη χρήση Fisher PLSD test για τα 7-AAD+ κύτταρα, Fas+ κύτταρα, Fas-fmcv, FasL+ κύτταρα, FasL-fmcv, CD14-fmcv και MWU test για τα CD34+/FasL+ κύτταρα (Πίνακας 18).

- Τα 7-AAD+ κύτταρα, τα Fas+ κύτταρα και τα CD34+/FasL+ κύτταρα ήταν αυξημένα στους ασθενείς με AH-1 και ΠΧΚ σε σχέση με τους κίρρωτικούς και τους υγιείς ( $p=0.0001$  για όλα). Δεν βρέθηκαν σημαντικά στατιστικές διαφορές ανάμεσα σε AH-1 και ΠΧΚ.
- Η Fas-fmcv ήταν αυξημένη στην AH-1 και ΠΧΚ σε σχέση με υγιείς και κίρρωτικούς ( $p=0.0001$ ). Η Fas-fmcv ήταν αυξημένη στην AH-1 σε σχέση με την ΠΧΚ ( $p=0.001$ ).
- Τα FasL+ κύτταρα και η FasL-fmcv ήταν αυξημένα στην AH-1 και την ΠΧΚ σε σχέση με τους μάρτυρες ( $p=0.0001$  για όλα). Και οι δυο δείκτες ήταν αυξημένοι στην ΠΧΚ σε σχέση με την AH-1 ( $p=0.0001$  και  $p=0.001$ ).
- Το CD14-fmcv ήταν αυξημένο στην AH-1 και την ΠΧΚ σε σχέση με τους κίρρωτικούς ( $p=0.002$  και  $p=0.0001$ ) και τους υγιείς ( $p=0.002$  και  $p=0.0001$ ) ενώ ήταν αυξημένο στην ΠΧΚ σε σχέση με την AH-1 ( $p=0.0001$ ).
- Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για κάθε μια από τις παραπάνω παραμέτρους ανάμεσα σε υγιείς και κίρρωτικούς.

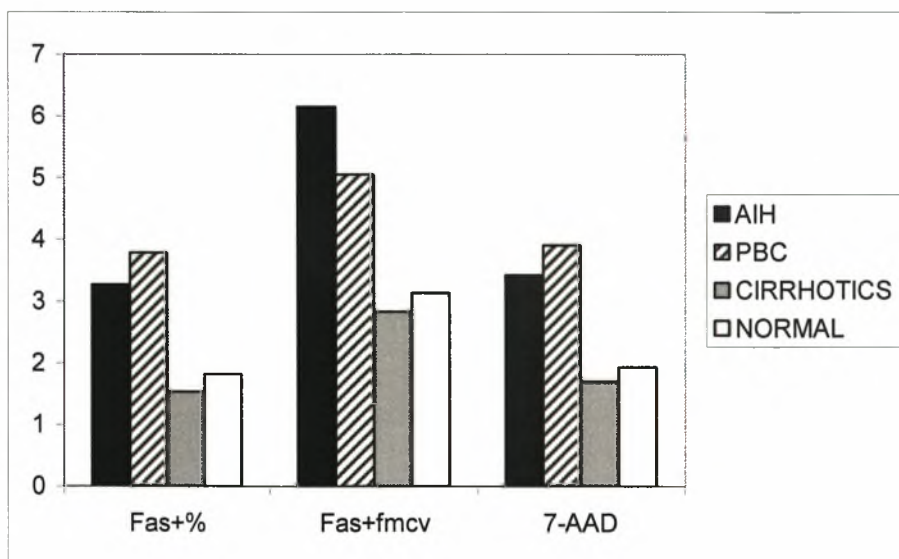
Μια ισχυρά θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε ανάμεσα στα Fas+ κύτταρα και τα αποπτωτικά κύτταρα του μυελού των οστών στην AH-1

( $r=0.98$ ,  $p=0.0001$ , εικόνα 26) και την ΠΧΚ ( $r=0.97$ ,  $p=0.0001$ , εικόνα 27) αλλά όχι στους μάρτυρες.

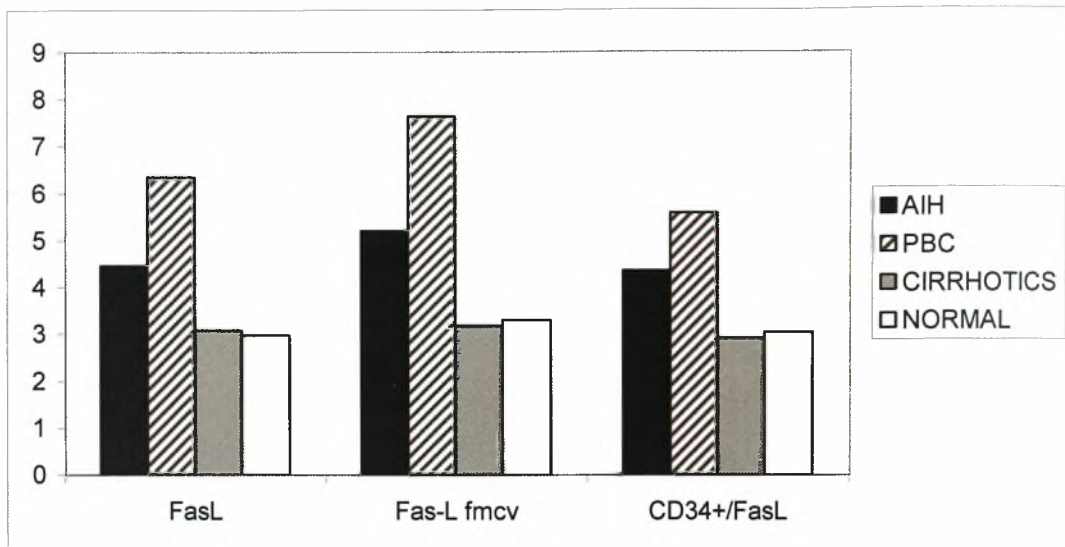
**Πίνακας 18.** Μέση τιμή των δεικτών της απόπτωσης και κυτταρικής ενεργοποίησης των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων του μυελού σε ασθενείς και μάρτυρες.

	<i>AH-1</i> (n=13)	<i>ΠΧΚ</i> (n=13)	<i>κίρρωτικοί</i> (n=12)	<i>Υγιείς</i> (n=10)
<i>Fas+ %</i>	$3.27 \pm 0.67$	$3.79 \pm 0.86$	$1.53 \pm 0.77$	$1.82 \pm 0.77$
<i>Fas-fmcv</i>	$6.16 \pm 0.76$	$5.05 \pm 0.9$	$2.83 \pm 0.89$	$3.14 \pm 0.69$
<i>7-AAD+</i> <i>αποπτωτικά</i>	$3.43 \pm 0.62$	$3.91 \pm 0.84$	$1.70 \pm 0.75$	$1.94 \pm 0.66$
<i>FasL+%</i>	$4.46 \pm 1.67$	$6.35 \pm 1.19$	$3.09 \pm 0.67$	$2.98 \pm 0.71$
<i>FasL-fmcv</i>	$5.25 \pm 2.15$	$7.64 \pm 1.07$	$3.18 \pm 0.68$	$3.3 \pm 0.97$
<i>CD34+/FasL+%</i>	$4.35 \pm 1.53$	$5.58 \pm 1.22$	$2.93 \pm 0.58$	$3.05 \pm 0.56$
<i>CD14-fmcv</i>	$23.15 \pm 7.38$	$34.46 \pm 8.46$	$14.58 \pm 4.36$	$14.1 \pm 4.63$

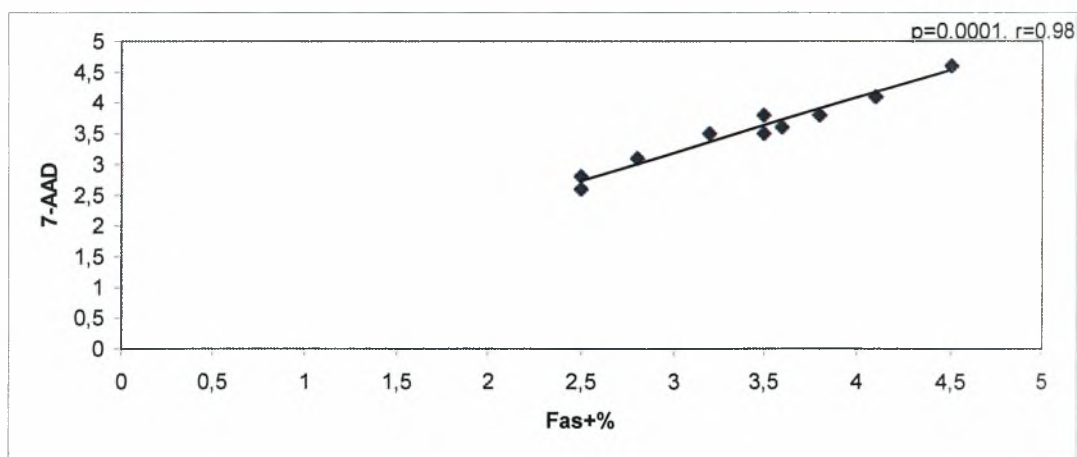
Τα δεδομένα δίνονται σαν μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση.



**Εικόνα 24:** Μέση τιμή των Fas+ κυττάρων, Fas-fmcv, 7-AAD+ κυττάρων στα λεμφομονοπύρηνια κύτταρα του μυελού ασθενών και μαρτύρων.

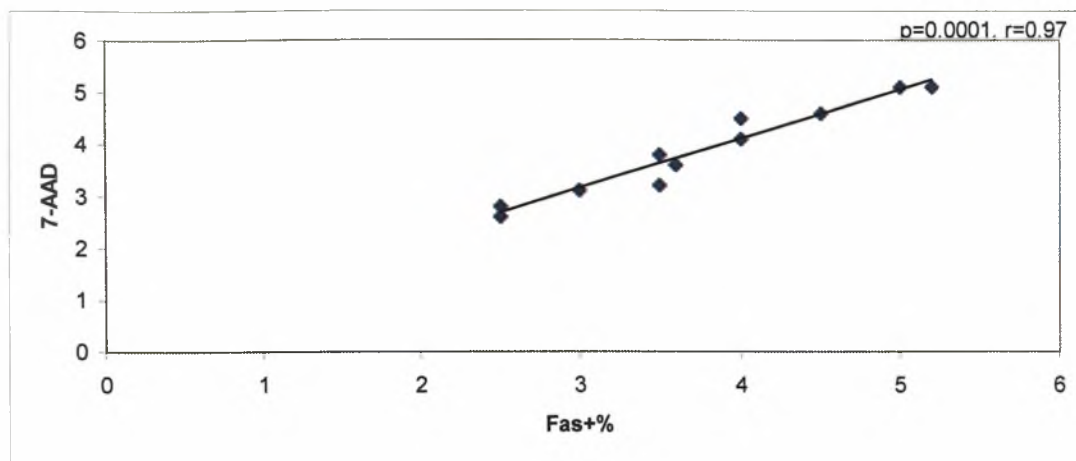


**Εικόνα 25:** Μέση τιμή των FasL+ κυττάρων, FasL-fmcv, CD34+/FasL+κυττάρων στα λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού ασθενών και μαρτύρων.



**Εικόνα 26:** Συσχέτιση ανάμεσα στα Fas+% κύτταρα και τα 7-AAD+ κύτταρα σε ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1.





**Εικόνα 27:** Συσχέτιση ανάμεσα στα Fas+% κύτταρα και τα 7-AAD+ κύτταρα στους ασθενείς με πρωτοπαθή χολική κίρρωση.

### 9.9. Αποτελέσματα κυτταροκινών

Η μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση του TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 στα υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργειών λεμφομονοκυττάρων του μυελού των οστών φαίνονται στον Πίνακα 19, Εικόνες 28 και 29. Κάθε μια από τις παραπάνω κυτταροκίνες ήταν σημαντικά διαφορετική στις τέσσερις ομάδες που μελετήθηκαν ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis για IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  και  $p < 0.05$  ANOVA για IL-10, Πίνακας 19). Τα ακόλουθα αποτελέσματα προέκυψαν μετά την εφαρμογή του MWU test και Fisher PLSD test. Δεν βρέθηκαν σημαντικές στατιστικά διαφορές όσον αφορά τις κυτταροκίνες ανάμεσα σε υγιείς και κίρρωτικούς (Πίνακας 19).

- Οι τιμές του TNF- $\alpha$  ήταν υψηλότερες στην ΑΗ-1 ( $p=0.003$ ) και την ΠΧΚ ( $p=0.0001$ ) σε σχέση με κίρρωτικούς και υγιείς. Οι τιμές του TNF- $\alpha$  ήταν αυξημένες στην ΠΧΚ σε σχέση με την ΑΗ-1 ( $p < 0.03$ ).
- Οι τιμές του TGF- $\beta$  ήταν αυξημένες στην ΠΧΚ σε σχέση με την ΑΗ-1, τους κίρρωτικούς και τους υγιείς ( $p=0.0001$  για κάθε

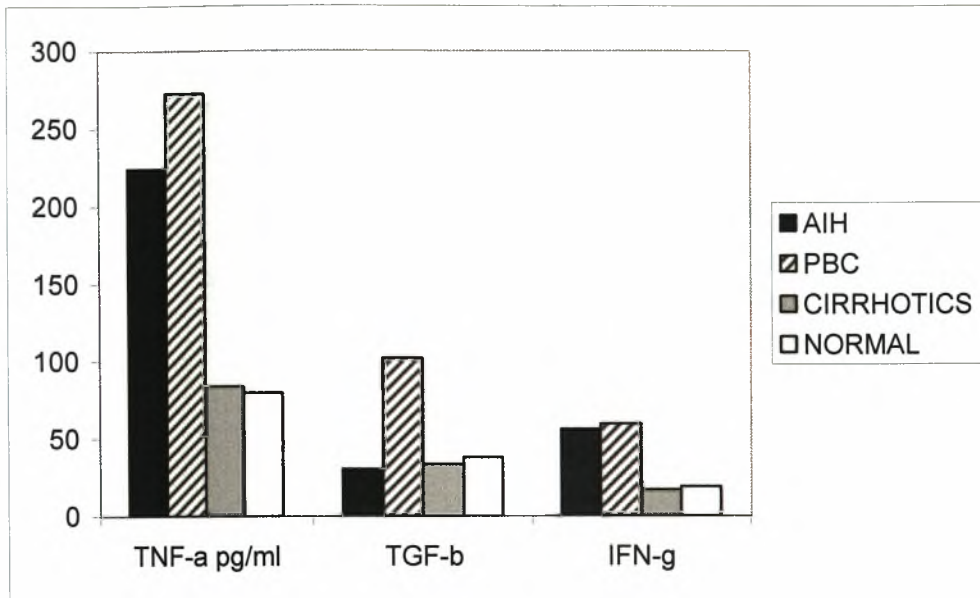
περίπτωση). Οι τιμές του TGF-β δεν διέφεραν ανάμεσα σε ασθενείς με AH-1 και μάρτυρες.

- Οι τιμές της IFN-γ ήταν υψηλότερες στους ασθενείς με AH-1 και ΠΧΚ σε σχέση με τους κίρρωτικούς ( $p=0.001$  και  $p=0.0001$ ) και τους υγιείς ( $p=0.002$  και  $p=0.0001$ ) ενώ δεν διέφεραν ανάμεσα σε ασθενείς με AH-1 και ΠΧΚ.
- Οι τιμές της IL-10 ήταν σημαντικά αυξημένες στους ασθενείς με AH-1 σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΚ( $p=0.001$ ). Τα επίπεδα της IL-10 ήταν σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με AH-1 σε σχέση με τους κίρρωτικούς ( $p<0.001$ ) και τους υγιείς ( $p<0.001$ ). Επίσης η IL-10 ήταν σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς με ΠΧΚ σε σχέση με κίρρωτικούς και υγιείς ( $p<0.001$ ).
- Οι τιμές της IL-4 ήταν σημαντικά αυξημένες στους ασθενείς με ΠΧΚ σε σχέση με τους ασθενείς με AH-1 ( $p<0.02$ ). Τα επίπεδα της IL-4 ήταν σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με AH-1 σε σχέση με τους κίρρωτικούς ( $p<0.05$ ) και τους υγιείς ( $p<0.001$ ). Επίσης η IL-4 ήταν σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς με ΠΧΚ σε σχέση με κίρρωτικούς και υγιείς ( $p<0.001$ ).
- Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για καθεμιά από τις παραπάνω κυτταροκίνες ανάμεσα σε υγιείς και κίρρωτικούς.

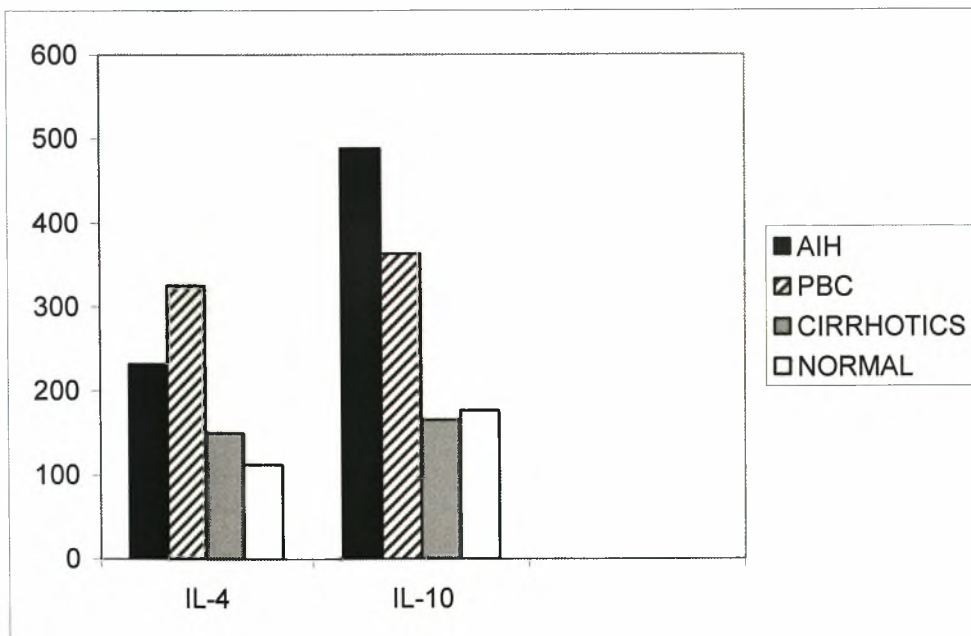
**Πίνακας 19.** Μέση τιμή των κυτταροκινών (σε pg/ml) που παράγονται σε υπερκείμενα μακράς διάρκειας καλλιέργειών των λεμφομονοκυττάρων του μυελού των οστών σε ασθενείς και μάρτυρες

	AH-1(n=13)	ΠΧΚ(n=13)	Κίρρωτικοί(n=12)	Υγιείς(n=10)
TNF-α	224.4±199.8	272.8±88.4	83.8±32.6	79.8±35.8
TGF-β	30.58±14.32	102.23±31.48	33.67±12.95	38.2±14.24
IFN-γ	56.40±27.54	59.54±14.24	16.83±5.77	18.95±6.88
IL-4	232.3±83	325.4±87.8	150.4±63.5	112.5±24.8
IL-10	489.2±99.5	363.8±112.1	165.3±54.4	177±46

Τα δεδομένα εκφράζονται σαν μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση.



**Εικόνα 28:** Μέση τιμή των TNF-α, TGF-β, IFN-γ στα υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργείων των λεμφομονοπύρηνων του μυελού των οστών σε ασθενείς και μάρτυρες.



**Εικόνα 29:** Μέση τιμή της IL-4 και της IL-10 στα υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργείων των λεμφομονοπύρηνων του μυελού των οστών σε ασθενείς και μάρτυρες.

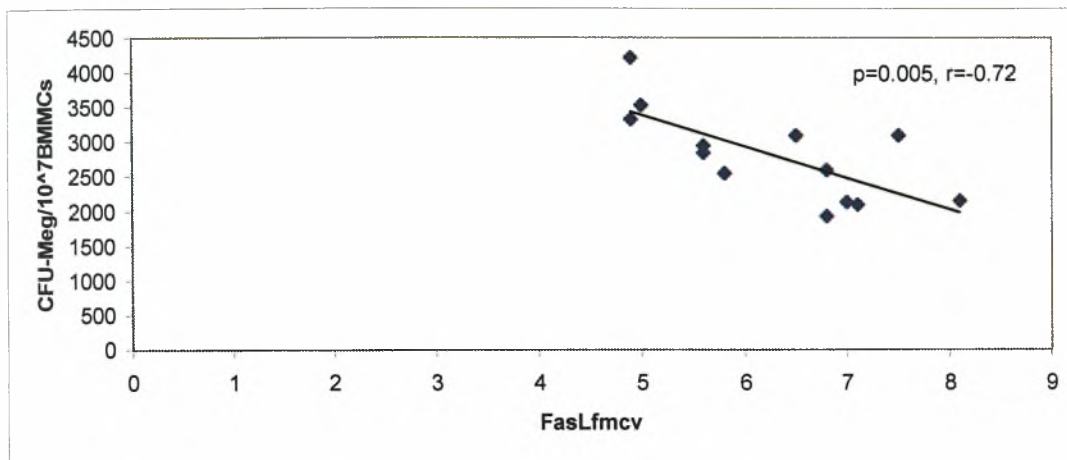
Η IFN- $\gamma$  συσχετίστηκε θετικά με τα CD34+/FasL+ κύτταρα στους ασθενείς με AH-1 ( $r=0.60$ ,  $p<0.05$ ) και αρνητικά στην ΠΧΚ ( $r=-0.76$ ,  $p=0.003$ ).

Οι κίρρωτικοί ασθενείς με AH-1 ( $n=7$ ) είχαν υψηλότερα επίπεδα IL-4 σε σχέση με τους κίρρωτικούς μάρτυρες ( $235.7\pm 68.3$  pg/ml έναντι  $150\pm 63.5$  pg/ml,  $p=0.03$ , t-test). Παρόμοια ευρήματα βρέθηκαν και για την IL-10 ( $451.4\pm 98.5$  pg/ml στους κίρρωτικούς με AH-1 σε σχέση με  $160.7\pm 50.2$  pg/ml στους κίρρωτικούς μάρτυρες,  $p<0.001$ , t-test) και για τον TNF- $\alpha$  [ $158$  ( $95-800$ ) pg/ml] στους κίρρωτικούς με AH-1 σε σχέση με τους κίρρωτικούς μάρτυρες  $93$  ( $40-160$ ) pg/ml,  $p<0.02$ , MWU. Επιπλέον τα επίπεδα της IFN- $\gamma$  είχαν την τάση να είναι υψηλότερα στους κίρρωτικούς με AH-1 [ $57$  ( $11.2-67$ ) pg/ml έναντι  $15$  ( $9-24$ ) pg/ml,  $p=0.053$ , MWU]. Αντιθέτως, τα επίπεδα του TGF- $\beta$  δεν ήταν σημαντικά διαφορετικά στις προαναφερθείσες ομάδες ( $35.14\pm 15$  pg/ml έναντι  $29.4\pm 10.2$  pg/ml). Οι κίρρωτικοί ασθενείς με ΠΧΚ ( $n=3$ ) είχαν υψηλότερα επίπεδα όλων των κυτταροκινών σε σχέση με τους κίρρωτικούς μάρτυρες αν και ο αριθμός είναι μικρός για να επιτρέψει στατιστικές συσχετίσεις.

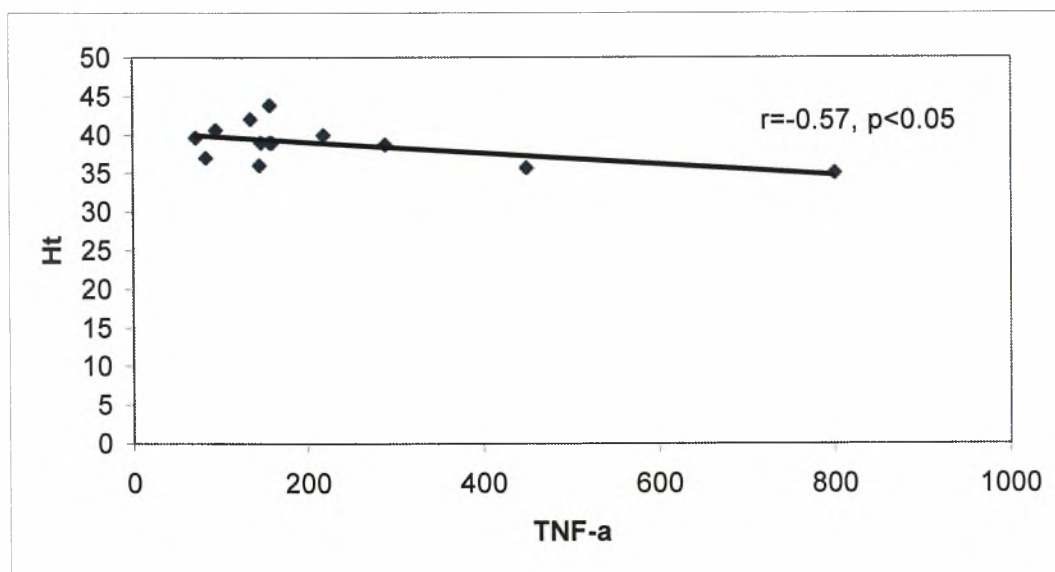
#### **9.10. Δείκτες απόπτωσης, κυτταρικής ενεργοποίησης και παραγωγή κυτταροκινών: συσχέτιση με τα κλωνογόνα προγονικά κύτταρα, εργαστηριακά και κλινικά δεδομένα.**

Στους ασθενείς με AH-1 οι αποπτωτικοί δείκτες, η ενεργοποίηση των μακροφάγων και η παραγωγή κυτταροκινών δεν συσχετίστηκαν με το φύλο, την ηλικία, την ενεργότητα της νόσου, την διάρκεια της νόσου, εξωηπατικές εκδηλώσεις και την παρουσία ειδικών αυτοαντισωμάτων. Η FasL $^{fmcv}$  ήταν υψηλότερη στους ασθενείς που έπαιρναν τώρα ή στο παρελθόν ανοσοκατασταλτικά ( $6.81\pm 1.0$ ,  $n=7$ ) σε σχέση με αυτούς που δεν έπαιρναν θεραπεία ( $5.65\pm 0.75$ ,  $n=6$ ,  $p<0.05$ ) και υψηλότερη στους ασθενείς χωρίς κίρρωση ( $6.88\pm 0.86$ ,  $n=6$ ) σε σχέση με τους κίρρωτικούς ασθενείς με AH-1 ( $5.76\pm 0.95$ ,  $n=7$ ,  $p<0.05$ ). Η FasL $^{fmcv}$  συσχετιζόταν αρνητικά με τις αιμοποιητικές αποικίες των μεγακαρυοκυττάρων/ $10^7$  λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα μυελού ( $r=-0.72$ ,  $p=0.005$ , εικόνα 30). Ο TNF- $\alpha$  συσχετίστηκε αρνητικά με τον αιματοκρίτη και την αιμοσφαιρίνη ( $r=-0.57$ ,  $p<0.05$  και  $r=-0.60$ ,  $p<0.05$ ) (Εικόνες 31-32). Ο TGF- $\beta$  συσχετίστηκε αρνητικά με τα αιμοπετάλια

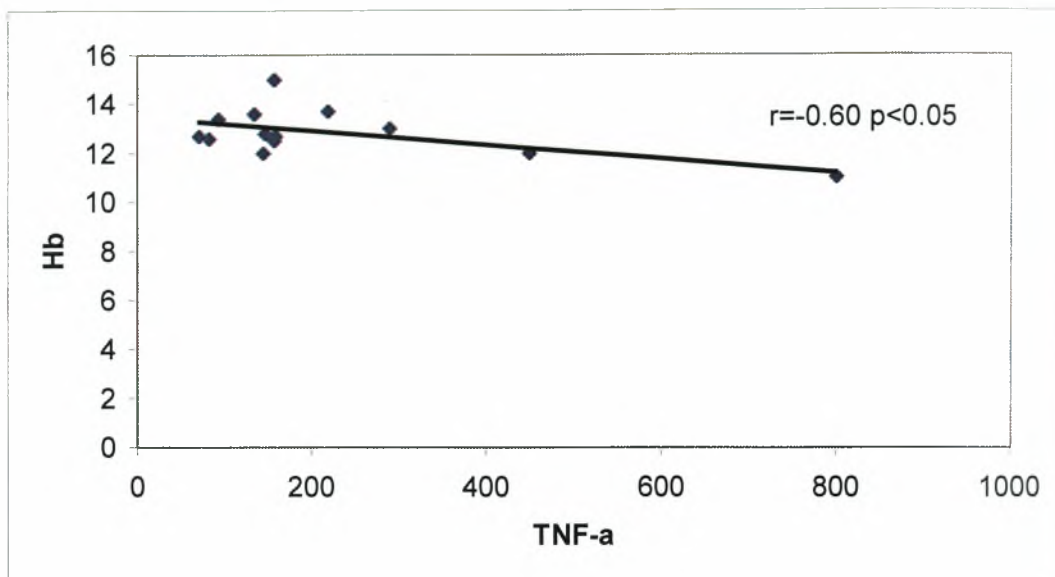
( $r=-0.56$ ,  $p<0.05$ ). Η IFN- $\gamma$  συσχετίστηκε θετικά με τα λεμφοκύτταρα ( $r=0.70$ ,  $p=0.008$ ) και τα αιμοπετάλια ( $r=0.64$ ,  $p<0.02$ ).



**Εικόνα 30:** Συσχέτιση ανάμεσα στην FasL-fmcv και τα CFU-Meg/10<sup>7</sup> BMMCs στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1.

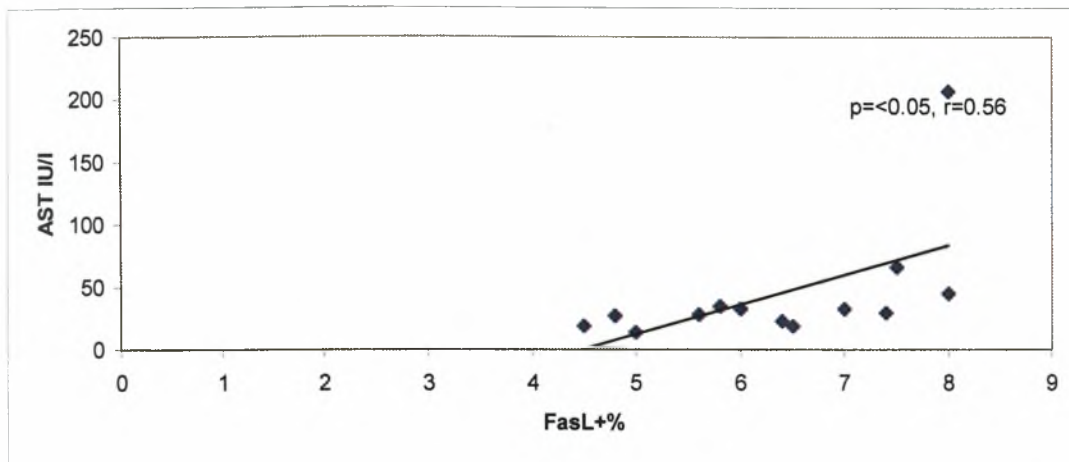


**Εικόνα 31:** Συσχέτιση ανάμεσα στον TNF- $\alpha$  και τον αιματοκρίτη στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1.

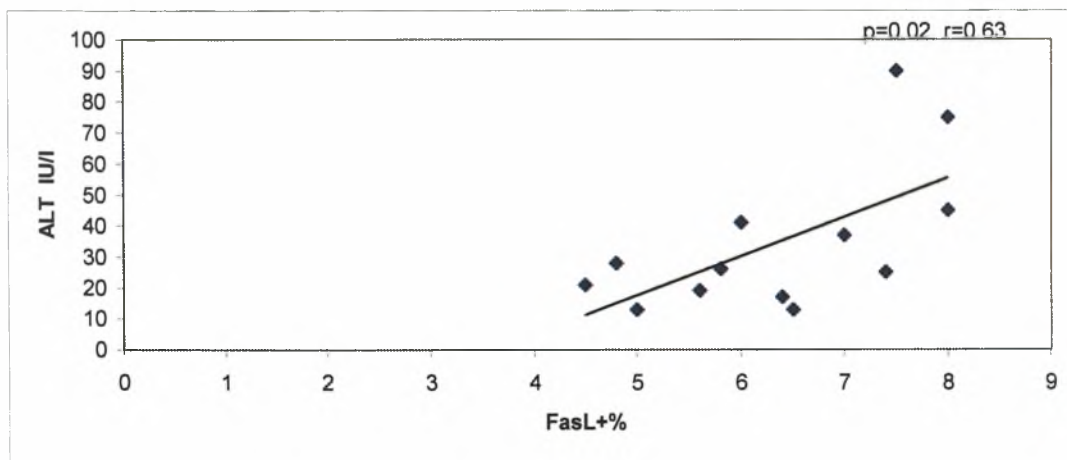


**Εικόνα 32:** Συσχέτιση ανάμεσα στον TNF-α και την αιμοσφαιρίνη στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1.

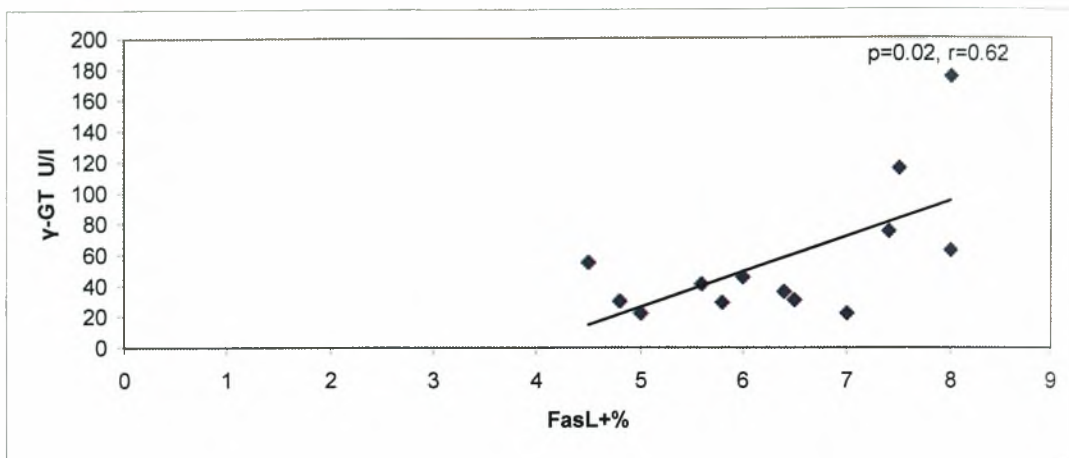
Στους ασθενείς με ΠΧΚ οι δείκτες της απόπτωσης, η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων, και οι κυτταροκίνες δεν συσχετίστηκαν με την ηλικία, το φύλο, τη διάρκεια της νόσου, εξηπατικές εκδηλώσεις, προηγούμενη ή τωρινή χρήση UDCA και την παρουσία ειδικών αυτοαντισωμάτων. Η FasL ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με βιοχημική δραστηριότητα ( $7.4 \pm 0.82$ ,  $n=7$ ) σε σχέση με αυτούς με φυσιολογικά ηπατικά ένζυμα ( $5.7 \pm 0.89$ ,  $n=6$ ,  $p=0.006$ ). Η FasL συσχετίστηκε θετικά με την ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AST) ( $r=0.56$ ,  $p<0.05$ ) την αλανινο-αμινοτρανσφεράση (ALT) ( $r=0.63$ ,  $p=0.02$ ) και την γ-γλουταμυλική τρανσπεπτιδάση (γ-GT) ( $r=0.62$ ,  $p=0.02$ ) (Εικόνες 33-35). Η FasL-fmcv συσχετίστηκε αρνητικά με τον αιματοκρίτη ( $r=-0.61$ ,  $p=0.02$ ) και την αιμοσφαιρίνη ( $r=-0.57$ ,  $p<0.05$ ). Τα 7-AAD+ κύτταρα και τα Fas+ κύτταρα συσχετίστηκαν αρνητικά με τα αιμοπετάλια ( $r=-0.62$ ,  $p=0.02$  και  $r=-0.60$ ,  $p=0.03$ ) (Εικόνες 36-37). Ο TNF-α συσχετίστηκε αρνητικά με τις αιμοποιητικές αποικίες των κοκκιοκυττάρων ( $r=-0.61$ ,  $p<0.05$ ) (Εικόνα 38). Ο TGF-β συσχετίστηκε αρνητικά με τις αιμοποιητικές αποικίες των μεγακαρουκυττάρων ( $r=-0.60$ ,  $p<0.05$ ) και θετικά με τα ηωσινόφιλα ( $r=0.63$ ,  $p=0.02$ ).



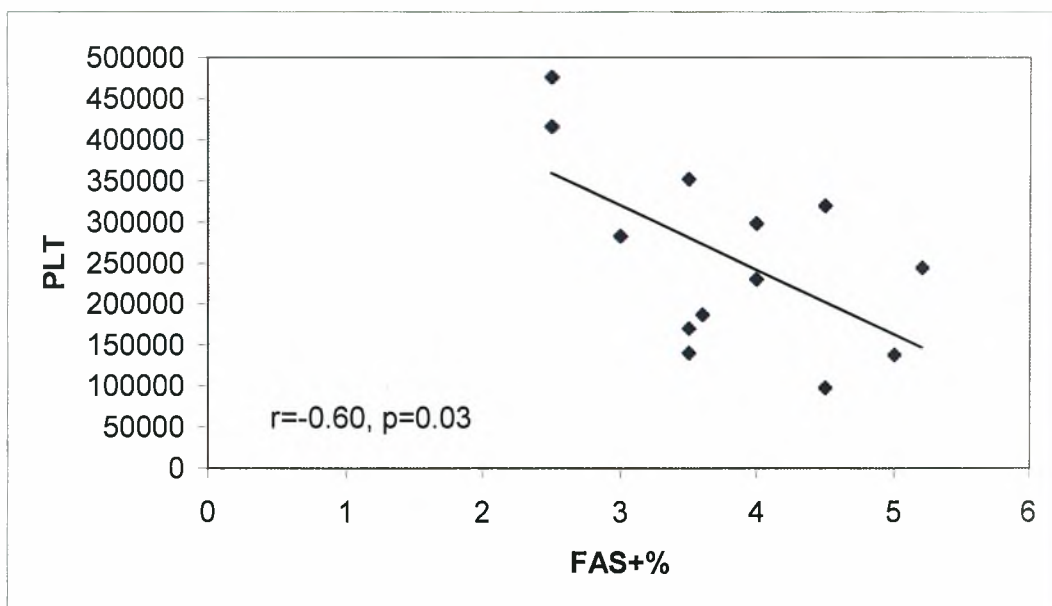
**Εικόνα 33:** Συσχέτιση ανάμεσα στα FasL+% κύτταρα και την ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AST), στους ασθενείς με πρωτοπαθή χολική κίρρωση.



**Εικόνα 34:** Συσχέτιση ανάμεσα στα FasL+% κύτταρα και την αλανινοαμινοτρανσφεράση (ALT), στους ασθενείς με πρωτοπαθή χολική κίρρωση.

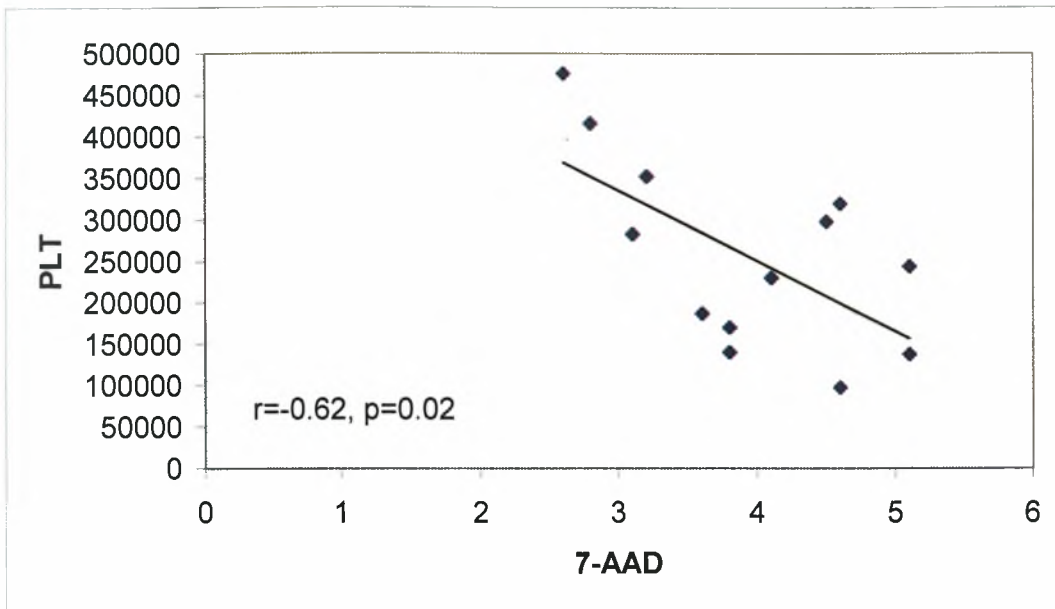


**Εικόνα 35:** Συσχέτιση ανάμεσα στα FasL+% κύτταρα και την γ-γλουταμυλική τρανσπεπτιδάση (γ- GT) στους ασθενείς με πρωτοπαθή χολική κίρρωση.

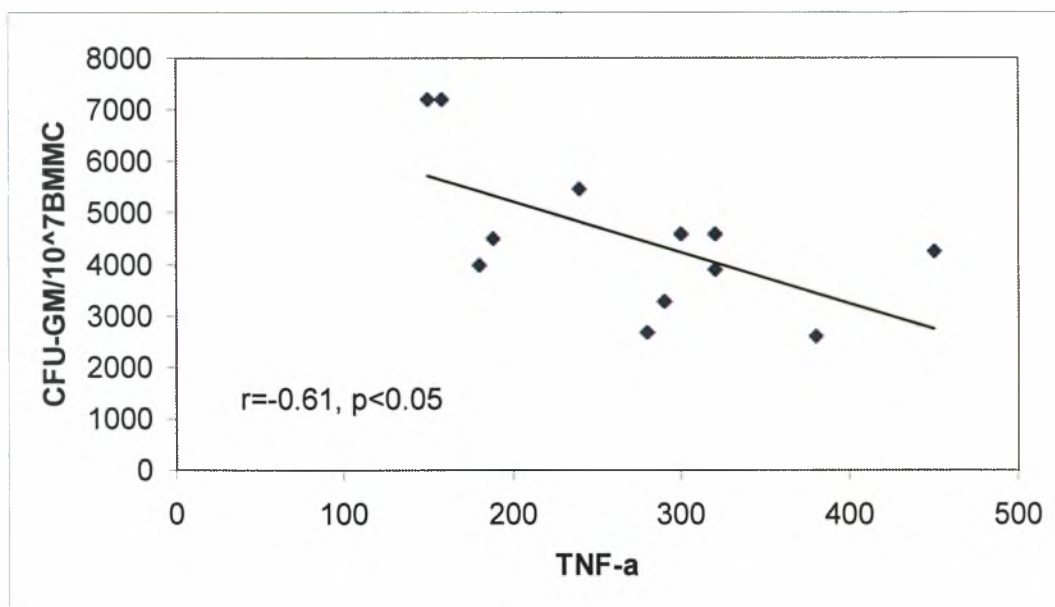


**Εικόνα 36:** Συσχέτιση ανάμεσα στα Fas+ κύτταρα και τα αιμοπετάλια στους ασθενείς με πρωτοπαθή χολική κίρρωση.





**Εικόνα 37:** Συσχέτιση ανάμεσα στα 7-AAD+ κύτταρα και τα αιμοπετάλια στους ασθενείς με πρωτοπαθή χολική κίρρωση.



**Εικόνα 38:** Συσχέτιση ανάμεσα στον TNF-a και τα CFU-GM/10<sup>7</sup> BMMCs στους ασθενείς με πρωτοπαθή χολική κίρρωση.

Και στις δυο ομάδες ασθενών ΑΗ-1 και ΠΧΚ το CD14-fmcv ήταν υψηλότερο ( $p < 0.05$  και  $p = 0.03$  αντίστοιχα) στους μη κίρρωτικούς ασθενείς ( $27.8 \pm 7$ ,  $n=6$  και  $35.6 \pm 7$ ,  $n=10$ ) σε σχέση με τους κίρρωτικούς ΑΗ-1 και ασθενείς με ΠΧΚ ( $19.1 \pm 5.2$ ,  $n=7$  και  $23 \pm 7.1$ ,  $n=3$ ).

Δεν υπήρχε συσχέτιση ανάμεσα την IL-4 ή την IL-10 και και τα δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΑΗ-1 και ΠΧΚ (Πίνακες 20, 21). Τα επίπεδα της IL-4 ήταν σημαντικά αυξημένα ( $p = 0.02$ ) στους ασθενείς με ΑΗ-1 που δεν έπαιρναν ανοσοκατασταλτική θεραπεία ( $286 \pm 85$ ) σε σχέση με αυτούς που έπαιρναν ανοσοκατασταλτικά ( $185 \pm 46$ ) (Πίνακας 20). Τα επίπεδα της IL-10 συσχετίστηκαν θετικά με τα CD34+ κύτταρα ( $r = +0.573$ ,  $p = 0.04$ ), τα CD34+/CD38- ( $r = +0.627$ ,  $p = 0.022$ ) και είχαν την τάση να συσχετιστούν θετικά και με τα CD34+/CD38+ κύτταρα ( $r = +0.539$ ,  $p = 0.057$ ).

**Πίνακας 20.** Αποτελέσματα κυτταροκινών στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου-1 (ΑΗ-1)

	IL-4(pg/ml)	IL-10(pg/ml)	TNF- α(pg/ml)	TGF- β(pg/ml)	IFN- γ(pg/ml)
<b>Φύλο</b>					
Άνδρες (n=3)	233±92	500±171	255±168	22.6±5	40±26
Γυναίκες(n=10)	232±85	486±81.6	215±215.6	33±15	61±27
<b>Ανοσοκαταστολή</b>					
Ναι (n=7)	185±46*	522.8±97	159.5±74	35±17.7	63.7±32
Όχι (n=6)	286±85*	450±95	300±276	25±7.4	47.8±20
<b>UDCA</b>					
Ναι (n=5)	222±55.8	532±102	284±292	30±15	59±8
Όχι (n=8)	238±99.5	462±94	187±125	30.7±15	54.5±35
<b>Εξωηπατικές εκδηλώσεις</b>					
Ναι (n=6)	216±101	516.6±73	163±78	31±16	58±35.8
Όχι (n=7)	245.7±69	465.7±118	276±260	30±13.7	54.8±21
<b>Βιοχημική δραστηριότητα</b>					
Ναι (n=2)	225±78	500±113	104±45	25±11	68.5±23
Όχι (n=11)	233±87	487±103	246±210	31.6±15	54±28.6
<b>Κίρρωση</b>					
Ναι (n=7)	235±68	451±98.5	279±257	35±15	45±22
Όχι (n=6)	228±104	533±88	160±83	25±12.5	69±29

Τα δεδομένα προκύπτουν σαν μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση. Οι παραπάνω κυτταροκίνες δεν συσχετίστηκαν με το φύλο, τη θεραπεία με UDCA, την παρουσία ή απουσία εξωηπατικών εκδηλώσεων, τη βιοχημική δραστηριότητα και το κλινικό στάδιο (κίρρωση ή όχι). ( $p > 0.05$ , t-test). \* $p = 0.02$  (t-test).

**Πίνακας 21.** Αποτελέσματα κυτταροκινών στους ασθενείς με πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΠΧΚ).

	<i>IL-4</i> (pg/ml)	<i>IL-10</i> (pg/ml)	<i>TNF-<math>\alpha</math></i> (pg/ml)	<i>TGF-<math>\beta</math></i> (pg/ml)	<i>IFN-<math>\gamma</math></i> (pg/ml)
<b>Φύλο</b>					
Ανδρες (n=1)	420	420	290	56	87
Γυναίκες(n=12)	317±86.7	359±115.7	271±92	106±29.5	57±12
<b>Ανοσοκαταστολή</b>					
Ναι (n=1)	320	380	450	110	62
Όχι (n=12)	325±91.7	362±117	258±73.7	101±32.7	59±14.8
<b>Εξωηπατικές εκδηλώσεις</b>					
Ναι (n=7)	315±103	350±98	276±97	99±25	58±16
Όχι (n=6)	336±74	380±133.8	268±85	105±39	61±12.8
<b>Βιοχημική δραστηριότητα</b>					
Ναι (n=7)	352±58	358±97	236±67	95±35	65±15
Όχι (n=6)	293±110	370±136	315±96	109±27	52±9.7
<b>Κίρρωση</b>					
Ναι (n=3)	363±37	326±80.8	239±51	92±24	55±7
Όχι (n=10)	314±96	375±121	282±96.7	105±34	60±15

Τα δεδομένα προκύπτουν ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση.



## 10. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μελετήσαμε για πρώτη φορά τις ποσοτικές, ποιοτικές και λειτουργικές διαταραχές των κυττάρων του μυελού των οστών σε πάσχοντες από ΑΗ-1 και ΠΧΚ. Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να διαπιστώσουμε αν υπάρχει δυνατότητα αυτόλογης μεταμόσχευσης μυελού των οστών ή περιφερικών στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων σε ανθεκτικές περιπτώσεις ΑΗ-1 ή ΠΧΚ. Η σκέψη γεννήθηκε μετά την δημοσίευση περίπτωσης ΑΗ-1 που εμφάνισε ύφεση της νόσου μετά από μεταμόσχευση μυελού για άλλη αιτία (162) και μετά την δημοσίευση ικανοποιητικών αποτελεσμάτων σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα με την εφαρμογή υψηλών δόσεων ανοσοκατασταλτικών ακολουθούμενη από αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών (86, 93, 96, 170, 195).

Αρχικά ερευνήσαμε για παρουσία ποσοτικών διαταραχών των κυττάρων του μυελού των οστών και του περιφερικού αίματος.

Διαπιστώθηκε ότι στην ΑΗ-1 στους περισσότερους ασθενείς (53.8%), η κυτταροβρίθεια του μυελού ήταν φυσιολογική ενώ στους περισσότερους ασθενείς με ΠΧΚ (46.2%) ήταν αυξημένη. Αυτό πιθανόν ερμηνεύεται από το γεγονός ότι στην ομάδα των ασθενών με ΑΗ-1 υπήρχαν περισσότεροι ασθενείς με ηπιότερη νόσο, δεδομένου ότι υπάρχει συσχέτιση της κυτταροβρίθειας με την θετικότητα των anti-dsDNA αντισωμάτων, που πιθανόν αποτελεί δείκτη παρουσίας συστηματικής συμμετοχής. Αντίθετα στην ΠΧΚ η κυτταροβρίθεια ήταν αυξημένη στους περισσότερους και ειδικότερα σε όσους δεν είχαν ευρήματα κίρρωσης. Αυτό συνηγορεί υπέρ συμμετοχής του μυελού σε συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση.

Η αύξηση της κυτταροβρίθειας στους ασθενείς με ΠΧΚ συνοδευόταν κυρίως από αυξημένη κυτταροβρίθεια της κοκκιώδους σειράς, όπως έχει περιγραφεί και σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής (106) και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (89, 119).

Η ερυθρά σειρά ήταν αυξημένης ή φυσιολογικής κυτταροβρίθειας στους πάσχοντες από ΑΗ-1 ή ΠΧΚ.

Η μεγακαρυοκυτταρική σειρά είχε ευρήματα που συνηγορούν υπέρ περιφερικής καταστροφής αιμοπεταλίων, πράγμα το οποίο είναι συμβατό τόσο με χρόνια φλεγμονή, όσο και με αυξημένη φαγοκυττάρωση από τα

μακροφάγα του ήπατος-σπληνός όπως συμβαίνει σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (89,119) ή στην κίρρωση (649).

Όλες οι σειρές αποτελούνταν από αυξημένη παρουσία άωρων προβαθμίδων (με φυσιολογική όμως ωρίμανση), όπως συμβαίνει στις περιπτώσεις περιφερικής καταστροφής κυττάρων του αίματος (89, 119). Σημαντικά αυξημένος αριθμός πολυχρωματόφιλων ερυθροβλαστών βρέθηκε τόσο στους ασθενείς με ΑΗ-1 όσο και στους ασθενείς με ΠΧΚ σε σχέση με τους κίρρωτικούς μάρτυρες. Επίσης τόσο στους ασθενείς με ΑΗ-1 όσο και στους ασθενείς με ΠΧΚ υπήρχε σημαντικά αυξημένος αριθμός άωρων μεγακαρυοκυττάρων στον μυελό σε σχέση με τους κίρρωτικούς και τους υγείς. Συγκεκριμένα τα άωρα μεγακαρυοκύτταρα σε ασθενείς με ΑΗ-1 ήταν σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς που έπαιρναν ανοσοκατασταλτικά και συσχετίστηκαν αρνητικά με τους εργαστηριακούς δείκτες της δραστηριότητας της νόσου (IgG και AST).

Στους περισσότερους ασθενείς δεν υπήρχαν κυτταροπενίες στο περιφερικό αίμα. Αυτό σημαίνει ότι πιθανότατα στην ομάδα που μελετήσαμε υπήρχε αντιρροπούμενη περιφερική καταστροφή κυττάρων (105).

Εν τούτοις το 38.5% (5/13) των ασθενών με ΑΗ-1 είχαν αυξημένη κυτταροβρίθεια στον μυελό των οστών, που συνοδευόταν από κυτταροπενίες στην περιφέρεια ( $WBC < 4 \times 10^9/L$ ,  $PLT < 140 \times 10^9/L$ ), ενώ μόνο το 7.7% (1/13) είχε μειωμένη κυτταροβρίθεια στον μυελό. Στην πρώτη περίπτωση η εικόνα έμοιαζε με εικόνα χρόνιας φλεγμονής ενώ στην δεύτερη πιθανότατα η ανοσολογική βλάβη επεκτείνονταν στον μυελό των οστών προκαλώντας καταστολή της αιμοποίησης (αντι-stem cell αντίσωμα;) (110). Ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός. Η παρουσία αντισωμάτων που εμποδίζουν την ανάπτυξη των αρχέγονων κυττάρων του μυελού έχει αναφερθεί σε άλλες αυτοάνοσες ασθένειες όπως ο συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος (110), αλλά αυτό δεν είναι ακόμη γνωστό αν ισχύει στις αυτοάνοσες παθήσεις του ήπατος. Επίσης υπερπαραγωγή κυτταροκινών που καταστέλλουν την αιμοποίηση είναι πιθανή (πχ. TGF- $\beta$ ) (650-652).

Στην ομάδα της ΠΧΚ, οι ασθενείς με φυσιολογική κυτταροβρίθεια πιθανότερα είχαν ηπιότερη νόσο, ενώ σε αυτούς με μειωμένη κυτταροβρίθεια μπορούμε να υποθέσουμε ότι υπήρχε καταστολή του μυελού των οστών ανοσολογικής αρχής (110). Παρόμοια ευρήματα έχουν περιγραφεί και σε άλλα

αυτοάνοσα νοσήματα όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και το σύνδρομο Sjogren's (653-655).

Αυτό που προκαλεί εντύπωση είναι η αυξημένη παρουσία μονοκυττάρων σε όλους τους ασθενείς με AH-1 και ΠΧΚ και σε όλους τους κίρρωτικούς μάρτυρες. Αυτό πιθανόν να υποδηλώνει συμμετοχή των μονοκυττάρων στην φλεγμονώδη αντίδραση σε όλες τις κατηγορίες ασθενών (αυξημένη φαγοκυττάρωση;) (656-657). Επίσης, παρατηρήθηκαν αυξημένα λεμφοκύτταρα στους μισούς περίπου ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος και σε όλους τους κίρρωτικούς μάρτυρες. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι μονοκυττάρωση και λεμφοκυττάρωση στον μυελό μπορούν να βρεθούν στα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος ακόμα και σε απουσία κίρρωσης (στην έρευνά μας 6 από τους 13 ασθενείς με AH-1 και 10 από τους 13 ΠΧΚ ασθενείς δεν είχαν κίρρωση). Αυξημένα μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα έχουν περιγραφεί και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα όπως νεανική ρευματοειδή αρθρίτιδα, νόσο του Still, σύνδρομο Sjogren's και συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (658).

Επίσης διαπιστώθηκε μειωμένη παρουσία ηωσινόφιλων στον μυελό των οστών στους ασθενείς με ΠΧΚ σε σχέση με τους μάρτυρες. Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντίθεση με αναφορές στις οποίες ηωσινοφιλία στο περιφερικό αίμα βρίσκεται περίπου σε 40% των ασθενών με ΠΧΚ (659). Αυτό πιθανόν να αποτελεί ασταθές εύρημα στα διάφορα στάδια της νόσου.

Το γεγονός ότι τα πλασματοκύτταρα ήταν φυσιολογικά στους περισσότερους ασθενείς πιθανόν υποδηλώνει όχι μεγάλου βαθμού ανοσολογική αντίδραση στον μυελό των οστών (121, 660). Αυξημένα πλασματοκύτταρα διαπιστώθηκαν στο 30.8% (4/13) των ασθενών με AH-1 και σε 7.7% (1/13) των ασθενών με ΠΧΚ. Στους ασθενείς με AH-1 τα πλασματοκύτταρα δεν συσχετίστηκαν με το φύλο, την ηλικία, την διάρκεια της νόσου, προηγούμενη ή τωρινή θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά, την παρουσία κίρρωσης, τη δραστηριότητα της νόσου, εξωηπατικές εκδηλώσεις της ασθένειας, και την παρουσία μη ειδικών αυτοαντισωμάτων.

Αυξημένα πλασματοκύτταρα βρίσκονται συχνά σε ασθενείς με νοσήματα συνδετικού ιστού κυρίως ως απόκριση στην χρόνια αντιγονική διέγερση (121, 660). Στον ενεργό συστηματικό ερυθηματώδη λύκο και την κίρρωση του ήπατος τα πλασματοκύτταρα ήταν σημαντικά αυξημένα στο

περιφερικό αίμα και μετά από υποχώρηση της φλεγμονής (ανενεργό στάδιο) τα κύτταρα αυτά επανέρχονταν σε φυσιολογικά επίπεδα. Μια αύξηση ακολουθούμενη από μείωση των κυττάρων αυτών στο περιφερικό αίμα ίσως αντανακλά διαφοροποίηση και καταστολή αντίστοιχα των ενεργοποιημένων Β-κυττάρων προς πλασματοκύτταρα του μυελού (661).

Η αζαθειοπρίνη έχει επίσης βρεθεί ότι προκαλεί πλασματοκυττάρωση (662). Τα πλασματοκύτταρα δεν σχετίστηκαν με την χρήση αζαθειοπρίνης στην έρευνά μας. Ένας ασθενής με ΑΗ-1 και ένας ασθενής με ΠΧΚ έπαιρναν αυτό το κυτταροτοξικό φάρμακο. Ο ασθενής με ΑΗ-1 που έπαιρνε το φάρμακο αυτό είχε πλασματοκυττάρωση, έτσι η επίδραση του φαρμάκου αυτού δεν μπορεί να αποκλεισθεί πλήρως.

Το γεγονός ότι υπάρχει συνεχής ανοσολογική διέγερση στους ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα ερμηνεύει την αυξημένη επίπτωση λεμφώματος και πολλαπλού μυελώματος στους ασθενείς αυτούς (122). Υπάρχουν αναφορές εμφάνισης πολλαπλού μυελώματος και λεμφώματος για την ΑΗ-1 και την ΠΧΚ (663-670). Περισσότερες έρευνες χρειάζονται για να δούμε εάν το εύρημά μας που αφορά την πλασματοκυττάρωση στους ασθενείς με ΑΗ-1 έχει κλινική σημασία στην μελλοντική ανάπτυξη λεμφοϋπερπλαστικών διαταραχών όπως το πολλαπλούν μυέλωμα και/ή το λέμφωμα.

Το γεγονός ότι τα μαστοκύτταρα ήταν φυσιολογικά στους περισσότερους ασθενείς επίσης υποδηλώνει όχι μεγάλο βαθμού ανοσολογική αντίδραση στον μυελό των οστών (671). Αυξημένος αριθμός μαστοκυττάρων στον μυελό παρατηρήθηκε σε δύο ασθενείς με ΑΗ-1 και έναν με ΠΧΚ (11.5% του συνολικού αριθμού των ασθενών). Αυξημένος αριθμός μαστοκυττάρων έχει ήδη αναφερθεί σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η νόσος του Still και το σύνδρομο Sjogren's (671). Η μαστοκύττωση του μυελού των οστών έχει ήδη συσχετιστεί με την ηπατική κίρρωση σε μία έρευνα (672), ενώ διήθηση του ήπατος από μαστοκύτταρα έχει ήδη αναφερθεί σε ασθενείς με χρόνια ηπατικά νοσήματα (673). Η παρουσία αυξημένου αριθμού μαστοκυττάρων δεν συσχετίστηκε με την παρουσία κίρρωσης στην έρευνά μας. Ωστόσο ο ρόλος της κίρρωσης του ήπατος στην μαστοκύττωση δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.

Ο σίδηρος στον μυελό των οστών σε όλες τις ομάδες των ασθενών βρέθηκε μειωμένος, πράγμα το οποίο δεν είναι συμβατό με αυτά που



περιγράφησαν σε χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα (674). Πιθανότατα οφείλεται σε αυξημένη απώλεια αίματος από το γαστρεντερικό (675) ή ίσως σπανιότερα σε δυσαπορρόφηση σιδήρου (676).

Στους ασθενείς μας με κίρρωση άλλης αιτιολογίας τα ευρήματά μας ήταν σε συμφωνία με τα διεθνή δεδομένα και διέφεραν από αυτά των ασθενών με ΑΗ-1 και ΠΧΚ, πράγμα που σημαίνει ότι τα ανωτέρω περιγραφέντα ευρήματα δεν οφείλονται στο αν οι ασθενείς με ΑΗ-1 και ΠΧΚ βρίσκονται ή όχι σε κίρρωτικό στάδιο. Επομένως τα ευρήματά μας είναι χαρακτηριστικά των αυτοάνοσων νοσημάτων του ήπατος και όχι της συνυπάρχουσας κίρρωσης.

Στην προσπάθεια ερμηνείας των ποσοτικών διαταραχών μελετήθηκε ο βαθμός απόπτωσης των αιμοποιητικών κυττάρων. Βρέθηκε ότι υπάρχει αυξημένος βαθμός απόπτωσης των κυττάρων του μυελού των οστών στην ΑΗ-1 και την ΠΧΚ. Αυτό ενισχύει σημαντικά την υπόθεση ότι υπάρχει αυξημένη καταστροφή των κυττάρων του μυελού των οστών πιθανότατα λόγω ανοσολογικού μηχανισμού.

Ο βαθμός απόπτωσης εκτιμήθηκε με τη χρήση του 7-AAD και τον υπολογισμό των 7-AAD+ κυττάρων. Η αυξημένη έκφραση του Fas και FasL στα κύτταρα του μυελού και η θετική συσχέτιση των Fas+ κυττάρων με τα 7-AAD+ κύτταρα τόσο στην ΑΗ-1 όσο και στην ΠΧΚ, δείχνει ότι ο κυριότερος μηχανισμός απόπτωσης είναι μέσω της οδού Fas/FasL. Επίσης, παρατηρήθηκε αυξημένος βαθμός απόπτωσης και στα CD34+ κύτταρα (αρχέγονα αιμοποιητικά), τα οποία φαίνεται ότι βλάπτονται επίσης από το ανοσολογικό ερέθισμα.

Αυξημένη έκφραση του αντιγόνου Fas και αυξημένη απόπτωση των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών έχει αναφερθεί σε ασθενείς με απλαστική αναιμία (88), συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (93), και ρευματοειδή αρθρίτιδα (86), δείχνοντας την εμπλοκή του μηχανισμού Fas-FasL στην αποπτωτική διαδικασία των προγονικών κυττάρων του μυελού των οστών σε αυτές τις συνθήκες. Αν και ίσως επιπρόσθετοι παράγοντες απαιτούνται για τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (103), αυτές οι αναφορές σε συνδυασμό με τη θετική συσχέτιση ανάμεσα στα Fas+ κύτταρα και τα αποπτωτικά κύτταρα των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών των ασθενών με ΑΗ-1 και ΠΧΚ υποστηρίζουν τον σημαντικό ρόλο της

οδού Fas στην απόπτωση των προγονικών κυττάρων του μυελού ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος.

Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την αυξημένη Fas-FasL έκφραση και απόπτωση των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών των ασθενών με AH-1 και ΠΧΚ δεν έχουν μελετηθεί ακόμη πλήρως. Τα φυσιολογικά λεμφομονοπύρηννα κύτταρα του μυελού των οστών δεν εκφράζουν το αντιγόνο Fas ή το εκφράζουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα (677). Αρνητικοί ρυθμιστές της αιμοποίησης όπως η IFN- $\gamma$  και/ή ο TNF- $\alpha$  έχουν αναφερθεί να προάγουν την απόπτωση Fas σε καλλιέργειες φυσιολογικών προγονικών κυττάρων (87,101) και έχουν συσχετιστεί με σύνδρομα ανεπάρκειας του μυελού των οστών εξαιτίας της απόπτωσης των αιμοποιητικών κυττάρων (88,678). Ο TGF- $\beta$  έχει επίσης συσχετιστεί με την απόπτωση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων (679). Επομένως τα αυξημένα επίπεδα των κυτταροκινών που καταστέλλουν την αιμοποίηση στους ασθενείς μας ίσως συντελούν στην διέγερση της οδού Fas-FasL.

Όταν διαπιστώθηκε αυξημένος αριθμός μονοκυττάρων στον μυελό των οστών των ασθενών με AH-1 και ΠΧΚ ερευνήσαμε την πιθανότητα συμμετοχής τους στην φλεγμονώδη αντίδραση και διαπιστώθηκε ότι το CD14-*fmcv* ήταν σημαντικά υψηλότερο στα μονοπύρηννα κύτταρα του μυελού των οστών με AH-1 και ΠΧΚ σε σχέση με τους μάρτυρες. Αυτό σημαίνει ότι τα μονοκύτταρα είναι διεγερμένα και συμμετέχουν στην διαταραχή του μυελού των οστών. Μη κίρρωτικοί ασθενείς με AH-1 και ΠΧΚ είχαν αυξημένα επίπεδα CD14-*fmcv* σε σχέση με κίρρωτικούς ασθενείς με AH-1 και ΠΧΚ, εύρημα που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Αυξημένη παραγωγή CD14+ κυττάρων από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα δείχνοντας έναν ρόλο των κυττάρων αυτών στην παθογένεση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (680-682). Επίσης ο TNF- $\alpha$  διεγείρει την έκφραση του CD14 στα μονοπύρηννα κύτταρα του μυελού ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και προήγαγε την διαφοροποίηση των μυελομονοκυττάρων (683). Η αυξημένη έκφραση του CD14 στα μονοπύρηννα κύτταρα του μυελού στις αυτοάνοσες ασθένειες του ήπατος είναι σε συμφωνία με την αυξημένη έκφραση των αποπτωτικών δεικτών καθώς είναι γνωστό ότι τα CD14+ κύτταρα εμπλέκονται στο ξεκαθάρισμα των αποπτωτικών κυττάρων (684).

Όλα τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι η ανοσολογική αντίδραση σε ασθενείς με ΑΗ-1 και ΠΧΚ δεν περιορίζεται μόνο στο ήπαρ. Ο μυελός των οστών συμμετέχει στην αντίδραση αλλά και πολλές φορές βλάπτεται και από την ανοσολογική προσβολή.

Μετά την δημοσίευση περίπτωσης ασθενούς με ΑΗ-1 στον οποίο πραγματοποιήθηκε αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού για άλλη αιτία και παρατηρήθηκε ύφεση της ΑΗ-1 (162), θεωρήσαμε ότι έπρεπε να ερευνήσουμε κατά πόσον οι ασθενείς με ΑΗ-1 και ΠΧΚ που είναι ανθεκτικοί στη συνήθη ανοσοκατασταλτική θεραπεία, θα μπορούσαν να υποβληθούν σε μεγαθεραπείες με συνοδό αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού. Για τον λόγο αυτό έπρεπε να διαπιστώσουμε αν διαθέτουν ικανό αριθμό CD34+ κυττάρων προκειμένου να ληφθεί μόσχευμα (643) και να ερευνήσουμε αν το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών μπορεί να υποστηρίξει την αιμοποίηση μετά την μεταμόσχευση (94,130).

Για πρώτη φορά βρέθηκε στην έρευνά μας ότι σε ασθενείς με ΑΗ-1 τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα είναι αυξημένα σε σχέση με τους υγιείς ενώ τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών υποστηρίζουν φυσιολογικά την αιμοποίηση. Αντιθέτως στους ασθενείς με ΠΧΚ τόσο τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα όσο και το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών ήταν σημαντικά επηρεασμένα

Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με ΠΧΚ έδειξαν σημαντική ποσοτική και ποιοτική διαταραχή στην αιμοποίηση. Τα CD34+ κύτταρα και οι υποπληθυσμοί τους (CD34+/CD38+, CD34+/CD38-) στον μυελό των οστών ήταν σημαντικά μειωμένα σε σχέση με τους ασθενείς με ΑΗ-1 και τους μάρτυρες, ενώ ήταν αυξημένα στους ασθενείς με ΑΗ-1 σε σχέση με τους μάρτυρες. Η δυνατότητα εξάπλωσης των ανωτέρω κυττάρων *in vitro* ήταν φυσιολογική και στους ασθενείς με ΑΗ-1 και στους ασθενείς με ΠΧΚ. Ο χαμηλός αριθμός των CD34+ κυττάρων που έχει βρεθεί στους ασθενείς με ΠΧΚ ίσως οφείλεται στη διέγερση του μηχανισμού Fas-FasL καθώς τα CD34+/FasL+ κύτταρα ήταν περισσότερα στους ασθενείς με ΑΗ-1 και ΠΧΚ σε σχέση με τους μάρτυρες. Στην ΑΗ-1 ίσως άλλοι παράγοντες παίζουν ρόλο και διεγείρουν την παραγωγή των CD34+ κυττάρων παρά την αυξημένη απόπτωση.

Η δυνατότητα παραγωγής αιμοποιητικών αποικιών των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους ασθενείς με ΠΧΚ σε σχέση με τους ασθενείς με ΑΗ-1 και τους μάρτυρες και υψηλότερη στους ασθενείς με ΑΗ-1 σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΚ και τους μάρτυρες.

Η δυνατότητα παραγωγής αιμοποιητικών αποικιών των κεκαθαρμένων CD34+ κυττάρων ήταν φυσιολογική και στις δυο ομάδες των ασθενών δείχνοντας ότι πιθανόν βοηθητικά κύτταρα μπορεί να επηρεάζουν την ανάπτυξη των αποικιών στα λεμφομονοπύρηννα κύτταρα του μυελού των οστών σε ασθενείς με ΠΧΚ.

Ο μειωμένος σχηματισμός αποικιών στους ασθενείς με ΠΧΚ θα μπορούσε να αποδοθεί στη χαμηλή αναλογία των CD34+ στα λεμφομονοπύρηννα κύτταρα του μυελού των οστών. Ωστόσο, αυτή η υπόθεση δεν μπορεί να υποστηριχτεί από την συγκεκριμένη έρευνα αφού τα CD34+ κύτταρα δεν συσχετίζονταν σημαντικά με τα κύτταρα των αιμοποιητικών αποικιών στους ασθενείς με ΠΧΚ ( $r=0.21$   $p=0.256$ ).

Ο αυξημένος σχηματισμός αποικιών στους ασθενείς με ΑΗ-1 οφείλεται είτε σε βοηθητικά κύτταρα που επηρέασαν την ανάπτυξη των αποικιών είτε στην αυξημένη αναλογία των CD34+ κυττάρων ανάμεσα στα λεμφομονοπύρηννα κύτταρα του μυελού των οστών. Εντούτοις η δεύτερη υπόθεση δεν μπορεί να υποστηριχτεί από τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας, αφού τα CD34+ κύτταρα δεν συσχετίζονταν με τα κύτταρα των αιμοποιητικών αποικιών στους ασθενείς με ΑΗ-1.

Επίσης οι ασθενείς με ΠΧΚ παρουσίασαν ελαττωματική στρωματική λειτουργία όπως φάνηκε από την μειωμένη ικανότητα των στρωματικών κυττάρων να υποστηρίξουν φυσιολογικά αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα σε μακράς διάρκειας καλλιέργειες μυελού των οστών και την μειωμένη συχνότητα των αιμοποιητικών αποικιών στο εναιωρούμενο κυτταρικό κλάσμα. Το τελευταίο εύρημα θα μπορούσε να αποδοθεί σε ένα ενδογενές ελάττωμα των προγονικών κυττάρων των ασθενών με ΠΧΚ όσον αφορά την δημιουργία αιμοποιητικών αποικιών αλλά αυτό δεν φαίνεται και τόσο πιθανό αφού οι αιμοποιητικές αποικίες δεν διέφεραν σε υποπληθυσμό καθαρών CD34+ κυττάρων. Οι ακριβείς μηχανισμοί αυτού του ευρήματος μένουν ασαφείς και χρειάζεται να μελετηθούν περαιτέρω. Αντιθέτως, τα στρωματικά κύτταρα των

ασθενών με AH-1 υποστήριξαν φυσιολογικά τα προγονικά κύτταρα στις καλλιέργειες μυελού των οστών μακράς διάρκειας *in vitro*.

Επιπλέον τα στρωματικά κύτταρα τόσο σε ασθενείς με ΠΧΚ όσο και σε ασθενείς με AH-1 κάλυψαν το 100% της κυτταρικής επιφάνειας του πυθμένα γρηγορότερα σε σχέση με τους υγιείς δείχνοντας την παρουσία αυξημένου ποσοστού και μεγάλης ικανότητας πολλαπλασιασμού των μονοκύτταρων μακροφάγων ανάμεσα στα μονοκύτταρα του μυελού των οστών (683). Αυξημένα μονοκύτταρα μακροφάγα στα μονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών έχουν ήδη παρατηρηθεί και σε άλλες χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους (683).

Η απόκριση των CD34+/CD38- και CD34+/CD38+ κυττάρων στους αιμοποιητικούς αναπτυξιακούς παράγοντες ήταν φυσιολογική και στους ασθενείς με AH-1 και στους ασθενείς με ΠΧΚ δείχνοντας την απουσία δυσπλαστικών χαρακτηριστικών σε αυτή την λειτουργία.

Όπως αναφέραμε, οι αυξημένες κυτταροκίνες του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών μπορεί να είναι υπεύθυνες για την βλάβη των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων του μυελού των οστών καθώς αυτό έχει παρατηρηθεί και σε άλλες αυτοάνοσες ασθένειες όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (86,93). Οι ασθενείς με AH-1 και ΠΧΚ παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 σε σχέση με τους μάρτυρες δείχνοντας ότι αυτές οι κυτταροκίνες μπορεί να εμπλέκονται στην αυξημένη απόπτωση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων.

Αυτές οι κυτταροκίνες έχει βρεθεί να υπερεκφράζονται στο ήπαρ και τον ορό ασθενών με AH-1 και ΠΧΚ (474, 477, 685-688). Τόσο οι Th1 όσο και οι Th2 κυτταροκίνες ήταν απορρυθμισμένες στο μυελό των οστών ασθενών με AH-1 και ΠΧΚ. Οι ασθενείς με ΠΧΚ και AH-1 χαρακτηρίστηκαν από υπερπαραγωγή IFN- $\gamma$ , μια Th1 κυτταροκίνη. Η απορρύθμιση της IFN- $\gamma$  είναι το πιο συχνό εύρημα στο ήπαρ των ασθενών με ΠΧΚ (477).

Τα επίπεδα της IL-10, μιας Th2 κυτταροκίνης, ήταν υψηλότερα στον μυελό των οστών των ασθενών με AH-1 σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΚ.

Σημαντικά αυξημένα επίπεδα IL-4 ανιχνεύτηκαν στους ασθενείς με ΠΧΚ σε σχέση με τους ασθενείς με AH-1 και τους μάρτυρες. Η IL-4 καταστέλλει τη δημιουργία του στρώματος του μυελού των οστών και

αναστέλλει την αιμοποίηση σε συνεργασία με άλλες κυτταροκίνες ή μέσω του ελέγχου των βοηθητικών κυττάρων στην παραγωγή κυτταροκινών (689). Θα μπορούσε λοιπόν η κυτταροκίνη αυτή να είναι υπεύθυνη για την βλάβη των αιμοποιητικών κυττάρων στους ασθενείς με ΠΧΚ.

Παρατηρήθηκε ότι ασθενείς με ΑΗ-1 που έπαιρναν ανοσοκατασταλτικά είχαν χαμηλά επίπεδα IL-4 σε σχέση με αυτούς που δεν έπαιρναν ανοσοκατασταλτική θεραπεία. Τα στεροειδή αναστέλλουν την έκφραση του υποδοχέα της IL-4 στα ανθρώπινα μονοκύτταρα (690). Επιπλέον κάποιοι ασθενείς με ΑΗ-1 έπαιρναν μυκοφαινόλη που καταστέλλει τις αυτοάνοσες αντιδράσεις ενώ σε πειραματικά μοντέλα έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλει την παραγωγή της IL-4 (691). Το γεγονός ότι οι ασθενείς με ΑΗ-1 που δεν έπαιρναν ανοσοκατασταλτικά είχαν παρόμοια επίπεδα IL-4 με τους ασθενείς με ΠΧΚ δείχνει ότι τα ανοσοκατασταλτικά μπορεί να ευθύνονται για την διαφορά στα επίπεδα της IL-4 ανάμεσα σε ασθενείς με ΠΧΚ και ΑΗ-1.

Τα επίπεδα του TGF- $\beta$  και TNF- $\alpha$  ήταν υψηλότερα στον μυελό των οστών των ασθενών με ΠΧΚ σε σχέση με τους ασθενείς με ΑΗ-1. Ο TGF- $\beta$  είναι γνωστό ότι έχει ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη του πολυδύναμου αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου του μυελού των οστών (650). Αυτή η επίδραση είναι σε συμφωνία με το εύρημα του μειωμένου αριθμού CD34+ κυττάρων και των υποπληθυσμών τους στον μυελό των οστών των ασθενών με ΠΧΚ. Η IFN- $\gamma$  και ο TNF- $\alpha$  είναι δυο κυτταροκίνες που εμπλέκονται στην παθογένεση πολλών συνδρόμων ανεπάρκειας μυελού των οστών (651-652). Και οι δυο αυτές κυτταροκίνες ρυθμίζουν αρνητικά την αυτοανανέωση και πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών κυττάρων είτε προκαλώντας την απόπτωση (87, 692), είτε ενεργοποιώντας άλλες ενδοκυτταρικές οδούς (693-694). Επίσης έχει βρεθεί ένας συνεργικός ρόλος του TNF- $\alpha$  και της IFN- $\gamma$  στην καταστολή των πρώιμων και τελικών σταδίων της αιμοποίησης (692). Επιπλέον η αυξημένη παραγωγή του TNF- $\alpha$  καταστρέφει την ικανότητα των στρωματικών κυττάρων να διατηρούν φυσιολογική αιμοποίηση σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (85). Επαρκής μαρτυρία για το ρόλο του TNF- $\alpha$  σε αυτούς τους ασθενείς παρέχεται από την σημαντική βελτίωση της διαταραγμένης αιμοποίησης μετά την προσθήκη αντι-TNF- $\alpha$  θεραπείας (85). Σε αντίθεση με την IL-4, τα ανοσοκατασταλτικά δεν άλλαξαν την παραγωγή TGF- $\beta$  ή TNF- $\alpha$ , αφού οι ασθενείς με ΑΗ-1 είχαν σημαντικά χαμηλότερα

επίπεδα κυτταροκινών σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΚ ανεξάρτητα ή όχι από το αν έπαιρναν ανοσοκατασταλτική θεραπεία.

Είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος το γεγονός ότι όλοι οι παράμετροι που μελετήσαμε δεν διέφεραν ανάμεσα σε υγιείς και κίρρωτικούς γεγονός που σημαίνει ότι η κίρρωση δεν ευθύνεται για τα παρατηρούμενα ευρήματα στην ΑΗ-1 και την ΠΧΚ. Το γεγονός αυτό ενισχύεται περαιτέρω από την απουσία διαφορών ανάμεσα σε κίρρωτικούς και μη κίρρωτικούς ασθενείς με ΑΗ-1 και ΠΧΚ.

Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι στην ΑΗ-1 τα CD34+ κύτταρα και οι υποπληθυσμοί τους και οι αιμοποιητικές αποικίες δεν συσχετίστηκαν με δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Αυτό ίσως οφείλεται στον χαμηλό αριθμό των ασθενών με ΑΗ-1 που είχαν ενεργό νόσο τη στιγμή της έρευνας αλλά ένας πιθανός ρόλος των ανοσοκατασταλτικών στην αύξηση των προγονικών κυττάρων δεν μπορεί να υποστηριχτεί αφού δεν υπήρχε διαφορά ανάμεσα σε αυτούς τους ασθενείς που έπαιρναν και αυτούς που δεν έπαιρναν ανοσοκατασταλτικά.

Τα CD34+ κύτταρα συσχετίστηκαν αρνητικά με τις τιμές AST δείχνοντας ότι παράγοντες που σχετίζονται με την βιοχημική δραστηριότητα της νόσου μπορεί να αλληλεπιδρούν αρνητικά με τον μυελό των οστών αλλά αυτό πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω.

Όσον αφορά τον αριθμό των αιμοποιητικών αποικιών ανά  $10^7$  λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών δεν βρήκαμε συσχέτιση ανάμεσα σε αυτόν και την ηλικία, το φύλο, ανοσοκατασταλτική θεραπεία ή την παρουσία κίρρωσης. Ωστόσο, οι αιμοποιητικές αποικίες των μεγακαρυοκυττάρων συσχετίζονταν θετικά με την διάρκεια της ΑΗ-1 και οι αιμοποιητικές αποικίες των κοκκιοκυττάρων ήταν σημαντικά λιγότερες σε ασθενείς με ΑΗ-1 που είχαν εξωηπατικές εκδηλώσεις αυτοανοσίας. Μια και ο IgG είναι εργαστηριακός δείκτης της δραστηριότητας μιας ανοσολογικής διαδικασίας, η θετική συσχέτιση του με τις αιμοποιητικές αποικίες των ερυθροκυττάρων στους ασθενείς με ΑΗ-1, δείχνει έναν πιθανό ρόλο της ανοσολογικής προσβολής στον σχηματισμό αιμοποιητικών αποικιών των ερυθροκυττάρων. Η βιοχημική δραστηριότητα της ΑΗ-1 όπως φαίνεται από τις τιμές της AST και ALT φαίνεται να απορρυθμίζει τον σχηματισμό αιμοποιητικών αποικιών των ερυθροκυττάρων.

Στους ασθενείς με ΑΗ-1 και ΠΧΚ οι δείκτες της απόπτωσης, ο TNF-α και ο TGF-β συσχετίστηκαν αρνητικά με τον αιματοκρίτη, την αιμοσφαιρίνη, τα αιμοπετάλια και με τις αιμοποιητικές αποικίες των κοκκιοκυττάρων και των μεγακαρυοκυττάρων. Αυτά τα ευρήματα είναι σε συμφωνία με την γενικότερη υπόθεση ότι τόσο οι αποπτωτικοί δείκτες όσο και οι κυτταροκίνες που αναφέρθηκαν είναι αρνητικοί ρυθμιστές της αιμοποίησης (695). Από την άλλη μεριά ο TGF-β συσχετίστηκε θετικά με τα ηωσινόφιλα στην ΠΧΚ. Η ηωσινοφιλία έχει θεωρηθεί ως ένα ξεκάθαρο χαρακτηριστικό στην πρώιμη ΠΧΚ (476), και αυτή η έρευνα υποστηρίζει το γεγονός ότι αυτό το φαινόμενο μπορεί να προκαλείται από τον TGF-β. Αντιθέτως η IFN-γ συσχετίστηκε θετικά με τα αιμοπετάλια και τα λεμφοκύτταρα μόνο στην ΑΗ-1. Η IFN-γ έχει διεγερτική επίδραση στην παραγωγή μεγακαρυοκυττάρων (696) και έχει βρεθεί να συσχετίζεται θετικά με τα λεμφοκύτταρα στους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (697).

Στους ασθενείς με ΠΧΚ οι βιοχημικοί δείκτες συσχετίστηκαν με μερικούς αποπτωτικούς δείκτες υπονοώντας την εμπλοκή της αποπτωτικής διαδικασίας στο βιοχημικό προφίλ των ασθενών με ΠΧΚ. Η πιθανότητα μιας αρνητικής επίδρασης της χολόστασης στο μυελό των οστών δεν μπορεί να αποκλειστεί αν και δεν βρέθηκαν συσχετίσεις ανάμεσα στους αποπτωτικούς δείκτες και την διάρκεια της ΠΧΚ. Περισσότερες έρευνες που θα μελετούν τους δείκτες της απόπτωσης στο μυελό τη στιγμή της διάγνωσης και κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου θα μπορούσαν να δώσουν φως στην παθογένεση αυτών των ευρημάτων.

Επιπλέον, τα επίπεδα της IL-10 συσχετίστηκαν θετικά με τα CD34+, CD34+/CD38+, CD34-/CD38- κύτταρα στους ασθενείς με ΑΗ-1. Εάν τα CD34+ κύτταρα συντελούν στην υπερπαραγωγή της IL-10 ή αυτή η κυτταροκίνη παίζει ρόλο στην διατήρηση αυτών των κυττάρων παραμένει ασαφές στους ασθενείς με ΑΗ-1. Η τελευταία παρατήρηση ενισχύεται από το γεγονός ότι η IL-10 διεγείρει την έκφραση του Bcl-2 στα CD34+ προγονικά κύτταρα το οποίο είναι σύμφωνο με το διπλό της ρόλο σαν κυτταροκίνη που διευκολύνει την βιωσιμότητα αυτών των κυττάρων (698-699) και σαν αναπτυξιακός παράγοντας (700) στα κύτταρα αυτά.

Όσον αφορά την συσχέτιση των ανοσοκατασταλτικών με την απόπτωση, ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες συμπεριλαμβανομένων



κορτικοστεροειδών έχουν αναφερθεί να επάγουν την απόπτωση σε ανθρώπινα μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (97). Δεν υπάρχει όμως μαρτυρία ότι μπορούν να επηρεάσουν την απόπτωση των λεμφομονοπύρηννων κυττάρων του μυελού των οστών. Αντιθέτως έχει βρεθεί ότι τα κορτικοστεροειδή έχουν μια θετική επίδραση στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων του μυελού των οστών (98-99). Στην έρευνά μας 6 ασθενείς με ΑΗ-1 (46.2%) και 12 με ΠΧΚ (92.3%) δεν είχαν ποτέ εκτεθεί σε ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες δείχνοντας ότι μάλλον μια επίδραση φαρμάκων δεν είναι πολύ πιθανή. Ο ρόλος του UDCA στην απόπτωση αποκλείεται μάλλον από το γεγονός ότι 5 ασθενείς με ΑΗ-1 και 12 με ΠΧΚ έπαιρναν UDCA αλλά δεν βρέθηκε καμιά συσχέτιση με τους αποπτωτικούς δείκτες. Σε αντίθεση πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι το UDCA εμποδίζει την απόπτωση μέσω του TNF-α μειώνοντας την δραστηριότητα των κασπασών σε ασθενείς με ΠΧΚ και πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (701). Αν και η συμβολή του UDCA στην απόπτωση των κυττάρων του μυελού των οστών μοιάζει απόμακρη περισσότερες έρευνες χρειάζονται για να επιβεβαιώσουν αυτή την υπόθεση.

Συμπερασματικά, δείξαμε για πρώτη φορά ότι στους ασθενείς με ΑΗ-1 η δυνατότητα παραγωγής αιμοποιητικών αποικιών των μονοπύρηννων κυττάρων του μυελού των οστών ήταν σημαντικά υψηλότερη από ότι στους υγιείς ενώ τα στρωματικά κύτταρα του μυελού υποστήριζαν φυσιολογικά την αιμοποίηση. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να υποστηρίξουν την υπόθεση ότι ασθενείς με ΑΗ-1 με σοβαρές ή ανθεκτικές μορφές ασθένειας στην συνηθισμένη ανοσοκατασταλτική θεραπεία ίσως είναι κατάλληλοι υποψήφιοι για αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών. Η υπόθεση αυτή θα πρέπει βέβαια να εδραιωθεί με περισσότερες έρευνες στο μέλλον. Αντίθετα στους ασθενείς με ΠΧΚ τόσο τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα όσο και το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών βρέθηκαν σημαντικά επηρεασμένα αρνητικά. Το εύρημα αυτό δείχνει πιθανές δυσκολίες στην διαδικασία της αυτόλογης μεταμόσχευσης μυελού και πιθανόν σχετίζεται με αυξημένη απόπτωση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων στην ΠΧΚ και την αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών που καταστέλλουν την αιμοποίηση. Επίσης η αποπτωτική διαδικασία, η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και η παραγωγή κυτταροκινών που καταστέλλουν την αιμοποίηση στις μακράς

διάρκειας καλλιέργειας των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων μυελού των οστών σε ασθενείς με ΑΗ-1 και ΠΧΚ είναι σημαντικά μεγαλύτερες από ότι στους μάρτυρες. Ο μηχανισμός απόπτωσης Fas-FasL φαίνεται ότι εμπλέκεται στην αποπτωτική διαδικασία ενώ τα αυξημένα επίπεδα συγκεκριμένων κυτταροκινών φαίνεται ότι διεγείρουν την οδό Fas-FasL. Επίσης η αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών που καταστέλλουν την αιμοποίηση ίσως ευθύνεται και για την μειωμένη κυτταροβρίθεια μέσω του μηχανισμού Fas-FasL που παρατηρείται σε μερικούς ασθενείς με ΑΗ-1 και ΠΧΚ. Τα ευρήματά μας δεν φαίνεται να συσχετίζονται με την κίρρωση καθώς δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα σε κίρρωτικούς και υγιείς.

Ο ρόλος των αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων και οι αλλαγές στις κυτταροκίνες στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος πρέπει να μελετηθούν περισσότερο. Το διαταραγμένο περιβάλλον του μυελού των οστών στους ασθενείς αυτούς οφείλεται είτε σε πρωτοπαθή βλάβη των προγονικών κυττάρων είτε σε δευτεροπαθή βλάβη των προγονικών κυττάρων που συνδέεται με την βλάβη του ανοσολογικού μηχανισμού που παρατηρείται και στις δυο αυτές ασθένειες. Τα στοιχεία μας ίσως βοηθήσουν στην μελέτη της παθογένεσης των ανωμαλιών που παρατηρούνται στην ΑΗ-1 και την ΠΧΚ και στη διερεύνηση εάν η εντατική θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά ώστε να εξαλειφθούν οι αυτοδραστικοί λεμφοκυτταρικοί κλώνοι ακολουθούμενη από αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών θα μπορούσε να είναι μια θεραπευτική επιλογή σε ασθενείς με ανθεκτικά αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (162). Ωστόσο οι παρατηρήσεις μας αυτές πρέπει να μελετηθούν σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών για να καθορίσουν εάν οι διαφορές αυτές ανάμεσα σε ΑΗ-1 και ΠΧΚ έχουν παθοφυσιολογική ή κλινική σημασία.

## 11. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων μετά από υψηλές δόσεις ανοσοκατασταλτικών είναι μια εναλλακτική θεραπευτική δυνατότητα ιδιαίτερου ενδιαφέροντος σε ασθενείς με σοβαρές ή και ανθεκτικές μορφές αυτοανοσίας. Η αυτοάνοση ηπατίτιδα και η πρωτοπαθής χολική κίρρωση σχετίζονται με εξωηπατικές αυτοάνοσες εκδηλώσεις αλλά οι διαταραχές του αιμοποιητικού συστήματος δεν έχουν μελετηθεί.

Στόχοι της παρούσης εργασίας ήταν η μελέτη των διαταραχών του αιμοποιητικού συστήματος σε πάσχοντες από ΑΗ-1 και ΠΧΚ και η διερεύνηση της δυνατότητας υποστήριξης της αιμοποίησης από το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών σε περίπτωση αυτόλογης μεταμόσχευσης αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων. Στην προσπάθεια αυτή έγινε:

- Μελέτη των ποσοτικών και ποιοτικών διαταραχών των αιμοποιητικών κυττάρων και των προβαθμίδων τους στον μυελό των οστών. Για το λόγο αυτό καταγράφηκαν με ακρίβεια τα μορφολογικά ευρήματα και οι μορφολογικές ανωμαλίες των αιμοποιητικών κυττάρων σε επίχρισμα μυελού σε οστεομυελική βιοψία και στο περιφερικό αίμα. Επίσης μελετήθηκε η ανάπτυξη και η μορφολογία των αιμοποιητικών αποικιών σε υγρό καλλιεργητικό υλικό και σε άγαρ.
- Μελέτη των λειτουργικών διαταραχών των αιμοποιητικών κυττάρων και των κυττάρων του στρώματος του μυελού των οστών. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η ανάπτυξη των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων σε αποικίες σε μακράς διάρκειας καλλιέργειες καθώς και η ανάπτυξη των κυττάρων του στρώματος. Επίσης, για το λόγο αυτό μετρήθηκαν ποσοτικά οι κυτταροκίνες μετά από καλλιέργειες λεμφομονοκυττάρων μυελού των οστών. Οι παράγοντες αυτοί επηρεάζουν την ανάπτυξη των αιμοποιητικών αποικιών. Επίσης, μελετήθηκαν οι δείκτες απόπτωσης στα αιμοποιητικά και στρωματικά κύτταρα του μυελού και οι δείκτες κυτταρικής ενεργοποίησης στη διαδικασία της φλεγμονώδους αντίδρασης.

Μελετήσαμε 13 ασθενείς με ΑΗ-1 και 13 ασθενείς με ΠΧΚ. Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 12 κίρρωτικοί με μη αυτοάνοσης αιτιολογίας κίρρωση και 10 υγιείς.

Οι μορφολογικές ανωμαλίες του μυελού μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας αιματοξυλίνη/ηωσίνη, χρώση May-Grawnwald /Giemsa και χρώση Perl. Τα CD34+ κύτταρα μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής, καλλιέργειες ανάπτυξης, καλλιέργειες μυελού των οστών μακράς διάρκειας, έγινε μελέτη των κλωνογόνων προγονικών κυττάρων και καλλιέργειες ενός κυττάρου. Επίσης μελετήθηκε η λειτουργία των στρωματικών κυττάρων, οι δείκτες απόπτωσης, η έκφραση του CD14 και οι κυτταροκίνες TNF-α, TGF-β και IFN-γ, IL-4, IL-10 σε υπερκείμενα μακράς διάρκειας καλλιιεργειών των λεμφομονοκυττάρων του μυελού των οστών.

Όσον αφορά τα μορφολογικά ευρήματα η κυτταροβρίθεια δεν ήταν φυσιολογική σε μεγάλο αριθμό ασθενών και κίρρωτικών μαρτύρων. Μερικά δυσπλαστικά στοιχεία (μεγαλοβλαστοειδείς ερυθροβλάστες) εμφανίστηκαν σε δύο ασθενείς με ΑΗ-1 και έναν ασθενή με ΠΧΚ. Αυξημένα μεγακαρυοκύτταρα βρέθηκαν στους περισσότερους ασθενείς με ΑΗ-1 και ΠΧΚ και στους μισούς κίρρωτικούς μάρτυρες. Άωρα μεγακαρυοκύτταρα βρέθηκαν στους περισσότερους ασθενείς με ΑΗ-1 και ΠΧΚ. Οι αποθήκες σιδήρου ήταν φυσιολογικές σε περίπου 1/3 ασθενών με ΑΗ-1 και ΠΧΚ και στους μισούς από τους κίρρωτικούς μάρτυρες και μειωμένες στους περισσότερους από τους υπόλοιπους ασθενείς και μάρτυρες. Αυξημένα μονοκύτταρα μυελού βρέθηκαν σε όλους τους ασθενείς με ΑΗ-1 και ΠΧΚ και στους κίρρωτικούς μάρτυρες ενώ οι μισοί από τους αυτοάνοσους ασθενείς και όλοι οι κίρρωτικοί μάρτυρες είχαν αυξημένα λεμφοκύτταρα στο μυελό. Αυξημένα πλασματοκύτταρα μυελού παρατηρήθηκαν στο 1/3 ασθενών με ΑΗ-1, σε έναν ασθενή με ΠΧΚ και σε έναν κίρρωτικό μάρτυρα.

Οι ασθενείς με ΑΗ-1 είχαν σημαντικά αυξημένο αριθμό CD34+, CD34+/CD38+ και CD34+/CD38- κυττάρων σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΚ και τους μάρτυρες (κίρρωτικούς και υγιείς). Οι ασθενείς με ΠΧΚ είχαν σημαντικά λιγότερα CD34+ και CD34+/CD38+ καθώς και CD34+/CD38- κύτταρα σε σχέση με τους μάρτυρες. Δεν βρέθηκαν διαφορές ανάμεσα σε κίρρωτικούς και υγιείς. Στις μακράς διάρκειας καλλιέργειες του μυελού των οστών ο αριθμός των αιμοποιητικών αποικιών στο εναιωρούμενο κυτταρικό κλάσμα ήταν σημαντικά υψηλότερος στην ΑΗ-1 και σημαντικά χαμηλότερος στην ΠΧΚ σε σχέση με τους μάρτυρες. Οι αιμοποιητικές αποικίες της κοκκιώδους και της ερυθράς σειράς ήταν σημαντικά αυξημένες στην ΑΗ-1 σε

σχέση με όλες τις άλλες ομάδες. Οι ασθενείς με ΠΧΚ είχαν σημαντικά λιγότερες αποικίες σε σχέση με τους μάρτυρες. Τα στρωματικά κύτταρα δεν υποστήριξαν την αιμοποίηση μόνο στους ασθενείς με ΠΧΚ.

Όλοι οι αποπτωτικοί δείκτες και τα CD14 ήταν αυξημένα στους ασθενείς με AH-1 και ΠΧΚ σε σχέση με τους υγιείς και τους κίρρωτικούς. Τα Fas+ κύτταρα συσχετίστηκαν θετικά με τα αποπτωτικά κύτταρα στους ασθενείς με AH-1 και ΠΧΚ. Ο TNF-α και η IFN-γ ήταν υψηλότερα στην AH-1 και στην ΠΧΚ σε σχέση με τους μάρτυρες. Δεν βρέθηκαν διαφορές ανάμεσα σε υγιείς και κίρρωτικούς. Η IL-4 και ο TGF-β βρέθηκαν σημαντικά αυξημένοι στο μυελό των οστών με ΠΧΚ σε σχέση με τους ασθενείς με AH-1 και τους υγιείς μάρτυρες και κίρρωτικούς. Οι ασθενείς με AH-1 είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα IL-10 στον μυελό των οστών σε σχέση με τους ασθενείς με ΠΧΚ και υψηλότερα επίπεδα IL-10, IL-4 και TNF-α σε σχέση με τους μάρτυρες. Στους ασθενείς με AH-1 η IL-10 συσχετίστηκε θετικά με τα CD34+ κύτταρα, CD34+/CD38- και τα CD34+/CD38+ κύτταρα.

Συμπερασματικά, δείξαμε για πρώτη φορά ότι στην AH-1 τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα είναι σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τους υγιείς και τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών υποστηρίζουν την αιμοποίηση. Αντιθέτως στους ασθενείς με ΠΧΚ και τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα και το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών βρέθηκαν σημαντικά επηρεασμένα αρνητικά. Από κλινικής απόψεως τα δεδομένα αυτά μπορούν να υποστηρίξουν την υπόθεση ότι οι ασθενείς με σοβαρές μορφές AH-1 ή ανθεκτικές μορφές στα ανοσοκατασταλτικά θα μπορούσαν να είναι κατάλληλοι υποψήφιοι για αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού. Η υπόθεση βέβαια αυτή πρέπει να εδραιωθεί με περισσότερες έρευνες στο μέλλον. Επίσης, η αποπτωτική διαδικασία, η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και η παραγωγή κυτταροκινών που καταστέλλουν την αιμοποίηση στα λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών ασθενών με AH-1 και ΠΧΚ είναι υψηλότερες σε σχέση με τους μάρτυρες. Ο μηχανισμός Fas-FasL πιθανόν εμπλέκεται στην αποπτωτική διαδικασία. Τα αυξημένα επίπεδα κάποιων κυτταροκινών πιθανόν να οδηγούν στην διέγερση του μηχανισμού Fas-FasL. Επίσης, η αυξημένη συγκέντρωση των κυτταροκινών που καταστέλλουν την αιμοποίηση πιθανόν να ευθύνεται για την μειωμένη κυτταροβρίθεια που παρατηρείται σε κάποιους ασθενείς μέσω της οδού Fas-FasL. Τα ευρήματα αυτά δεν φαίνεται

να σχετίζονται με την κίρρωση, αφού δεν υπήρχαν διαφορές ανάμεσα σε κίρρωτικούς και υγιείς μάρτυρες. Τα στοιχεία μας ίσως βοηθήσουν στην μελέτη της παθογένεσης των ανωμαλιών που παρατηρούνται στα αυτοάνοσα αυτά νοσήματα του ήπατος και στη διερεύνηση εάν εντατική ανοσοκατασταλτική θεραπεία έτσι ώστε να εξαιρεθούν οι αυτοδραστικοί λεμφοκυτταρικοί κλώνοι ακολουθούμενη από αυτόλογη μεταμόσχευση είναι μια εναλλακτική επιλογή σε ανθεκτικές μορφές αυτοανοσίας του ήπατος. Επίσης, περισσότερες έρευνες χρειάζονται για να δούμε εάν τα ευρήματά μας που αφορούν την πλασματοκυττάρωση στην AH-1 έχουν κλινική σημασία στην μελλοντική ανάπτυξη λεμφοϋπερπλαστικών διαταραχών όπως το πολλαπλούν μυέλωμα και/ή τα λεμφώματα στους ασθενείς αυτούς.

## 12. SUMMARY AND CONCLUSIONS

In patients with severe and/or refractory forms of autoimmunity high dose immunosuppression followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation (ASCT) has been used effectively. Specific features of both AIH-1 and PBC are their associations with extrahepatic immune-mediated syndroms but the possible involvement of bone marrow has not been reported yet.

The aims of the present study were:

- To determine the morphological abnormalities of bone marrow aspirates by investigating bone marrow smears from these patients.
- To investigate whether hemopoietic progenitor cells and bone marrow stromal cells are affected in patients with AIH-1 and PBC.
- To investigate the markers of apoptosis and cell activation in bone marrow mononuclear cells of these patients.
- To investigate the bone marrow microenvironment in these autoimmune liver diseases by studying bone marrow cytokine production in long-term cultures of bone marrow mononuclear cells.

We studied 13 AIH-1 patients and 13 PBC patients. As control groups we investigated 12 cirrhotic patients with histologically proven cirrhosis of non-autoimmune etiology (disease control group) and ten healthy controls (healthy control group).

Morphological abnormalities were evaluated with hematoxylin and eosin and May-Grawnwald/Giemsa stain, as well as Perls's stains. Flow cytometry, expansion cultures, long-term bone marrow cultures and clonogenic progenitor cell assays were used. Stromal cell function was assessed in long term bone marrow cultures recharged with normal CD34+ cells. Apoptotic markers and CD14 expression were also evaluated while TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10 were determined using ELISAs.

Regarding bone marrow findings, bone marrow cellularity was abnormal in many patients and cirrhotic controls. Some dysplastic changes were observed in two patients with AIH-1 and one PBC patient. Increased megakaryocytes were observed in most of the patients with AIH-1 and PBC and in the half of the cirrhotic patients. Immature megakaryocytes were

observed in most of the patients with AIH-1 and PBC. Iron stores were normal in one third of the patients with AIH-1 and PBC and in the half of the cirrhotic controls. They were decreased in the majority of the rest of the patients and controls. Increased bone marrow monocytes were found in all the patients with AIH-1 and PBC and the cirrhotic controls. Half of the patients with autoimmune liver disease and all the cirrhotic patients had bone marrow lymphocytosis. Bone marrow plasmacytosis was observed more frequently in AIH-1 compared to PBC and cirrhotic controls.

AIH-1 patients had increased CD34+, CD34+/CD38+ and CD34+/CD38- cells compared to all groups. PBC patients had lower progenitor cells compared to controls. No differences were found between cirrhotic controls and healthy controls. Committed progenitor cells in non-adherent cell fraction were increased in AIH-1 patients but decreased in PBC compared to controls. Granulocyte-macrophage colony forming units (CFU) and erythroid-burst CFU were increased in AIH-1 patients compared to all groups. PBC had these CFUs decreased compared to controls. Stromal cells failed to support normal hemopoiesis in PBC.

All apoptotic markers and CD14 were increased in AIH-1 and PBC patients compared to controls. Fas+ cells were positively correlated with apoptotic cells in AIH-1 and PBC. TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were higher in AIH-1 and PBC compared to controls. No differences were found between the control group. IL-4 and TGF- $\beta$  were found significantly increased in the bone marrow of PBC patients compared to AIH-1 patients and both control groups. AIH-1 patients had significantly higher bone marrow IL-10 compared to PBC patients and higher IL-10, IL-4 and TNF- $\alpha$  compared to controls. In AIH-1 patients, IL-10 was positively correlated with CD34+, CD34+/CD38- and CD34+/CD38+ cell proportions.

In conclusion, bone marrow plasmacytosis appears to be a distinct finding in AIH-1 as similar finding observed in only one PBC patient and one cirrhotic control but prospective studies are needed in order to address whether our findings in AIH-1 patients may have a clinical impact on the future development of lymphoproliferative disorders such as multiple myeloma and/or lymphomas in these patients.



We demonstrated for the first time that AIH-1 patients had increased hemopoietic progenitor cells and normal stromal function while in PBC patients progenitor cells and the bone marrow microenvironment were defective. Our data could support the concept that AIH-1 patients with severe and/or refractory disease to conventional immunosuppression might be appropriate candidates for autologous stem cell transplantation while in PBC we may have difficulties in the procedure since bone marrow progenitor and stromal cell abnormalities might impact on the harvesting and engraftment potential of stem cells. Extensive studies are needed in order to confirm our novel findings and to determine whether these differences between AIH-1 and PBC have pathophysiological or clinical significance.

We also showed for the first time that the apoptotic process, macrophage activation and the production of cytokines suppressors of hematopoiesis in bone marrow mononuclear cells from AIH-1 and PBC patients are higher compared to controls. The Fas-FasL pathway is likely to be involved in the apoptotic process. The production of cytokines suppressors of hemopoiesis in bone marrow mononuclear cells may contribute to the increased apoptotic process via the stimulation of Fas-FasL pathway leading to the decreased bone marrow cellularity in the one fifth of the whole number of patients with autoimmune liver diseases. These findings seem unlikely to be attributed to the cirrhotic process, as cirrhotic controls did not differ from healthy controls. The disturbed bone marrow microenvironment in AIH-1 and PBC patients and the consequent alteration in hematopoiesis could be attributed either to intrinsic progenitor cell defect or secondary progenitor cell damage associated with the defective immunoregulation present in both diseases. The exact pathogenetic link between autoreactive lymphocyte populations and cytokine alterations within the bone marrow microenvironment deserves further investigation. The implication of the bone marrow in the pathogenesis of autoimmune liver diseases is possible and needs further studies in order to elucidate whether intensive immunosuppression to eradicate autoreactive lymphocytic clones, followed by autologous stem cell transplantation could be a treatment option in refractory cases of liver autoimmunity.



### 13. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Grudeva-Popova JG. Cellular therapy-the possible future of regenerative medicine. *Folia Med (Plovdiv)* 2005; 47:5-10.
2. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-1147.
3. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, et al. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985; 87:27-45.
4. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type I diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343:230-238.
5. Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, et al. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat Med* 2002; 8:955-962.
6. Shizuru JA, Weissman IL, Kernoff R, et al. Purified hematopoietic stem cell grafts induce tolerance to alloantigens and can mediate positive and negative T cell selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:9555-9560.
7. Hole N, Graham GJ, Menzel U, et al. A limited temporal window for the derivation of multilineage repopulating hematopoietic progenitors during embryonal stem cell differentiation in vitro. *Blood* 1996; 88:1266-1276.
8. Kyba M, Perlingeiro RC, Daley GQ. HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell* 2002; 109:29-37.
9. Muller AM, Dzierzak EA. ES cells have only a limited lymphopoietic potential after adoptive transfer into mouse recipients. *Development* 1993; 118:1343-1351.
10. Perlingeiro RC, Kyba M, Daley GQ. Clonal analysis of differentiating embryonic stem cells reveals a hematopoietic progenitor with primitive erythroid and adult lymphoid-myeloid potential. *Development* 2001; 128:4597-4604.

11. Schuldiner M, Itskovitz-Eldor J, Benvenisty N. Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a "Suicide" gene. *Stem Cells* 2003; 21:257-265.
12. Alison M, Sarraf C. Hepatic stem cells. *J Hepatol* 1998; 29:676-682.
13. Watt FM. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998; 353:831-837.
14. Gordon JI, Schmidt GH, Roth KA. Studies of intestinal stem cells using normal, chimeric and transgenic mice. *FASEB J* 1992; 6:3039-3050.
15. Goldring K, Partridge T, Watt D. Muscle stem cells. *J Pathol* 2002; 197:457-467.
16. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401:390-394.
17. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, et al. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999; 283:534-537.
18. Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle (see comments). *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:14482-14486.
19. Pang W. Role of muscle derived cells in hematopoietic reconstitution of irradiated mice. *Blood* 2000; 95:1106-1108.
20. Mc Kinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, et al. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 1341-1346.
21. Kawada H, Ogawa M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood* 2001; 98:2008-13.
22. Jay KE, Gallacher L, Bhatia M. Emergence of muscle and neural hematopoiesis in humans. *Blood* 2002; 100: 3193-3202.
23. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418:41-49.
24. Ferrari G, Cussela-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279:1528-1530.

25. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6:1229-1234.
26. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 2001; 105:829-841.
27. Ying QL, Nichols J, Evans EP, et al. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416:545-548.
28. Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416:542-545.
29. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422:897-901.
30. Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422:901-904.
31. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999; 5(3):309-313.
32. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32:11-16.
33. Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, et al. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 2002; 8:1011-1017.
34. Awaya N, Rupert k, Bryant E, et al. Failure of adult marrow-derived stem cells to generate marrow stroma after successful hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2002; 30:937-942.
35. Korbiling M, Katz RL, Khanna A, et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; 346: 738-746.
36. Ianus A, Holz GG, Theise ND, et al. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003; 111:843-850.
37. Gottlieb DI, Huettner JE. An in vitro pathway from embryonic stem cells to neurons and glia. *Cells Tissues Organs* 1999; 165:165-172.

38. Wiles MV, Keller G. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* 1991; 111:259-267.
39. Gutierrez-Ramos JC, Palacios R. In vitro differentiation of embryonic stem cells into lymphocyte precursors able to generate T and B lymphocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:9171-9175.
40. Faloon P, Arentson E, Kazarov A, et al. Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development* 2000; 127:1931-1941.
41. Slager HG, Van Inzen W, Freund E, et al. Transforming growth factor-beta in the early mouse embryo: Implications from the regulation of muscle formation and implantation. *Dev Genet* 1993; 14:212-224.
42. Nakano T, Kodama H, Honjo T. In vitro development of primitive and definitive erythrocytes from different precursors. *Science* 1996; 272:722-724.
43. Palacios R, Golunski E, Samaridis J. In vitro generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7530-7534.
44. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, et al. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001; 292:1389-1394.
45. Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, et al. Hepatic maturation in differentiation embryonic stem cell in vitro. *FEBS Lett* 2001; 497:15-19.
46. Jones EA, Tosh D, Wilson DI, et al. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp Cell Res* 2002; 272:15-22.
47. Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, et al. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells* 2002; 20:146-154.
48. Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, et al. Embryoid-Body Cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology* 2002; 36:22-29.
49. Choi D, Oh HJ, Chang UJ, et al. In vivo differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Cell Transplant* 2002; 11:359-368.

50. Yamamoto H, Quinn G, Asari A, et al. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application. *Hepatology* 2003; 37:983-993.
51. Mitaka T. Hepatic stem cells: from bone marrow cells to hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281:1-5.
52. Vessey CJ, de la Hall PM. Hepatic stem cells: a review. *Pathology* 2001; 33:130-141.
53. Sell S. Comparison of liver progenitor cells in human atypical ductular reactions with those seen in experimental models of liver injury. *Hepatology* 1998; 27:317-331.
54. Pan CJ, Lei KJ, Chen H, et al. Ontogeny of the murine glucose-6-phosphatase system. *Arch Biochem Biophys* 1998; 358:17-24.
55. Theise ND, Saxena R, Portmann BC, et al. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 1999; 30:1425-1433.
56. Shelly LL, Tynan W, Schmid W, et al. Hepatocyte differentiation in vitro: initiation of tyrosine aminotransferase expression in cultured fetal rat hepatocytes. *J Cell Biol* 1989; 109:3403-3410.
57. Jones E, Tosh D, Wilson DI, et al. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp Cell Res* 2002; 272:15-22.
58. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284:1165-1170.
59. Alison MR, Poulson R, Jeffery R, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406:257.
60. Theise ND, Badve S, Saxena R, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31:235-240.
61. Travis EL, Peters LJ, McNeill J, et al. Effect of dose-rate on total body irradiation: lethality and pathologic findings. *Radiother Oncol* 1985; 4:341-351.
62. Sell S, Illic Z. *Liver Stem Cells*. Austin: Landis Publications, 1997.
63. Malhi H, Gupta S. Hepatocyte transplantation: new horizons and challenges. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8:40-50.

64. Kobayashi N, Miyazaki M, Fukaya K, et al. Treatment of surgically induced acute liver failure with transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes. *Cell Transplant* 2000; 9:733-735.
65. Gagandeep S, Sokhi R, Slehria S, et al. Hepatocyte transplantation improves survival in mice with liver toxicity induced by hepatic overexpression of Mad 1 transcription factor. *Mol Ther* 2000; 1:358-365.
66. Gupta S, Malhi H, Gagandeep S, et al. Liver repopulation with hepatocyte transplantation: new avenues for gene and cell therapy. *J Gene Med* 1999; 1:386-392.
67. Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB* 1996; 10:1249-1256.
68. Gupta S, Bhargava KK, Novikoff PM. Mechanisms of cell engraftment during liver repopulation with hepatocyte transplantation. *Semin Liver Dis* 1999; 19:15-26.
69. Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, et al. Isolation, characterization and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288:156-164.
70. Okumoto K, Saito T, Hattori E, et al. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes in vitro: implication of the Notch signals in differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304:691-695.
71. Novikoff PM, Yam A, Oikawa I. Blast-like cell compartment in carcinogen-induced proliferating bile ductules. *Am J Pathol* 1996; 148:1473-1492.
72. Lowens KN, Brennan BA, Yeoh GC, et al. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am J Pathol* 1999; 154:537-541.
73. Cecere A, Caiazzo R, Romano C, et al. Primary biliary cirrhosis. *Clin Ter* 1998; 149:143-150.
74. Jaffe L, Rodertson EJ, Bikoff EK. Developmental failure of chimeric embryos expressing high levels of H-2Dd transplantation antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:5927-5931.



75. Feltner DE, Cooper M, Weber J, et al. Expression of class I histocompatibility antigens in neuroectodermal tumors is independent of the expression of a transfected neuroblastoma myc gene. *J Immunol* 1989; 143:4292-4299.
76. Crosbie O, Reynolds M, Mc Entef G, et al. In vitro evidence for the presence of hematopoietic stem cells in the adult human liver. *Hepatology* 1999; 29:1193-1198.
77. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990; 75:2417-2426.
78. Muench MO, Cupp J, Polakoff J, et al. Expression of CD33, CD38 and HLA-DR on CD34+ human fetal liver progenitors with a high proliferative potential. *Blood* 1994; 83:3170-3181.
79. Tamiguchi H, Toyoshima T, Fukao K, et al. Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver. *Nat Med* 1996; 2:198-203.
80. Hann IM, Bolger MP, Hoffbrand AV. Development of pluripotent hematopoietic progenitor cells in the human fetus. *Blood* 1983; 62:118-123.
81. Norris S, Collins C, Doherty D, et al. Resident hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J Hepatol* 1998; 28:84-90.
82. Collins C, Norris S, Mc Entee G, et al. RAG1, RAG2 and pre-T cell receptor  $\alpha$  chain expression by adult human hepatic T cells: evidence for extrathymic T cell maturation. *Eur J Immunol* 1996; 26:3114-3118.
83. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, et al. Cell migration, chimerism and graft acceptance. *Lancet* 1992; 339:1579-1582.
84. Starzl TE, Demetris AJ, Masimo T, et al. Systemic himerism in human female recipients of male livers. *Lancet* 1992; 340:876-877.
85. Papadaki HA, Kritikos HD, Gemetsi C, et al. Bone marrow progenitor cell reserve and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis: evidence for a tumor necrosis factor  $\alpha$ -mediated effect. *Blood* 2002; 99:1610-1619.
86. Porta C, Caporali R, Epis O, et al. Impaired bone marrow hematopoietic progenitor cell function in rheumatoid arthritis patients

- candidated to autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33:1-8.
87. Maciejewski J, Selleri C, Anderson S, et al. Fas antigen expression on CD34+ human marrow cells is induced by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. *Blood* 1995; 85:3183-3190.
  88. Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, et al. Increased expression of Fas antigen on bone marrow CD34+ cells of patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 1995; 91:245-252.
  89. Rosenthal NS, Farhi DC. Bone marrow findings in connective tissue disease. *Am J Clin Pathol* 1989; 92:650-654.
  90. Anderson RL, Bagby GC, Richert-Boe KF, et al. Therapy-related preleukemic syndrome. *Cancer* 1981; 47:1867-1871.
  91. Prior P, Symmons DOM, Hawkins CF, et al. Cancer morbidity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1984; 43:128-131.
  92. Bodem CR, Hamory BH, Taylor HM, et al. Granulomatous bone marrow disease: a review of the literature and clinicopathologic analysis of 58 cases. *Medicine (Baltimore)* 1983; 62:372-379.
  93. Papadaki HE, Boumpas DT, Gibson FM, et al. Increased apoptosis of bone marrow CD34+ cells and impaired function of bone marrow stromal cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Haematol* 2001; 115:167-174.
  94. Otsuka T, Nagasawa K, Harada M, et al. Bone marrow microenvironment of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1993; 20:967-971.
  95. Tsokos GC. Lymphocytes, cytokines, inflammation and immune trafficking. *Curr Opin Rheumatol* 1994; 6:461-467.
  96. Ikehara S. Autoimmune diseases as stem cell disorders: normal stem cell transplant for their treatment. *Intern J Mol Med* 1998; 1:5-16.
  97. Horigome A, Hirano T, Oka K, et al. Glucocorticoids and cyclosporine induce apoptosis in mitogen-activated human peripheral mononuclear cells. *Immunopharmacology* 1997; 37:87-94.
  98. Clausen J, Stockschlader M, Fehse N, et al. Blood derived macrophage layers in the presense of hydrocortisone support myeloid

- progenitors in long-term cultures of CD34+ cord blood and bone marrow cells. *Ann Hematol* 2000; 79:59-65.
99. Rinehart J, Keville L, Clayton S, et al. Corticosteroids alter hematopoiesis in vitro by enhancing human monocyte secretion of granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 1997; 25:405-412.
  100. Kiely PD, McGuckin CP, Collins DA, et al. Erythrocyte aplasia and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1995; 4:407-411.
  101. Nagafuji K, Shibuya T, Harada M, et al. Functional expression of Fas antigen (CD95) on haemopoietic progenitor cells. *Blood* 1995; 86:883-889.
  102. Saheki K, Fujimori Y, Takemoto Y, et al. Increase expression of Fas (APO-1, CD95) on CD34+ haematopoietic progenitor cells after allogenic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 2000; 109:447-452.
  103. Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, et al. Differential expression of apoptosis related Fas antigen on lymphocytes subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol* 1992; 149:3753-3758.
  104. Richaud-Patin Y, Alarcon-Segovia D, Liorente L. Differential oncogene and TNF-alpha mRNA expression in bone marrow cells from systemic lupus erythematosus patients. *Scand J Immunol* 1998; 48:551-556.
  105. Richert-Boe KE. Hematological complications of rheumatic disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 1987; 1:301-320.
  106. Nichols CR, Akard LP. Hematologic problems in patients with cancer and chronic inflammatory disorders. In: Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, editors. *Hematologic basic principles and practice*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1984; 1733-1746.
  107. Michael SR, Vural IL, Bassen FA, et al. The hematologic aspects of disseminated (systemic) lupus erythematosus. *Blood* 1951; 6:1059-1072.
  108. Burkhardt R. The bone marrow in systemic lupus erythematosus. *Semin Hematol* 1965; 2:29-46.
  109. Brooks BJ Jr, Broxmeyer HE, Bryan CF, et al. Serum inhibitor in systemic lupus erythematosus associated with aplastic anemia. *Arch Intern Med* 1984; 144:1474-1477.

110. Bailey FA, Lilly M, Bertoli LF, et al. An antibody that inhibits in vitro bone marrow proliferation in a patient with systemic lupus erythematosus and aplastic anemia. *Arthritis Rheum* 1989; 32:901-905.
111. Roffe C, Cahill MR, Samanta A, et al. Aplastic anemia in systemic lupus erythematosus: a cellular immune mechanism? *Br J Rheumatol* 1991; 30:301-304.
112. Daly HM, Scott GL. Myelofibrosis as cause of pancytopenia in systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 1983; 36:1219-1222.
113. Kaelin WG, Spivak JK. Systemic lupus erythematosus and myelofibrosis. *Am J Med* 1986; 81:935-938.
114. Borba EF, Pereira RMR, Velloso EDRP, et al. Neutropenia associated with myelofibrosis in systemic lupus erythematosus. *Acta Haematol* 1993; 89:82-85.
115. Cappio FG, Gavosto F. Idiopathic myelofibrosis: a possible role for immune complexes in the pathogenesis of bone marrow fibrosis. *Br J Hematol* 1981; 49:17-21.
116. Lang JM, Heid E. Auto-immunity in primary myelofibrosis. *Biomedicine* 1976; 25:39.
117. Bernhardt B, Valleta M. Lupus anticoagulant in myelofibrosis. *Am J Med Sci* 1976; 272:229-231.
118. Gordon BR, Day NK. Immunologic abnormalities in myelofibrosis with activation of the complement system. *Blood* 1981; 58:904-910.
119. Pereira RM, Velloso ER, Menezes Y, et al. Bone marrow findings in systemic lupus erythematosus patients with peripheral cytopenias. *Clin Rheumatol* 1998; 17(3): 219-222.
120. Jordan E, Burnstein SL, Calabro JJ, et al. Multiple myeloma complicating the course of seronegative systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1978; 21:260-263.
121. Hyun BM, Kwa D, Gabaldon H, et al. Reactive plasmacytic lesions of the bone marrow. *Am J Clin Pathol* 1976; 65:921-928.
122. Zintzaras E, Voulgarelis M, Moutsopoulos HM. The risk of lymphoma development in autoimmune diseases: a meta-analysis. *Arch Intern Med* 2005; 165:2337-2344.

123. Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, et al. Hematology. New York: McGraw-Hill, 1983: 825-827.
124. Marmont AM. Stem cell transplantation for severe autoimmune disorders, with special reference to rheumatic diseases. *J Rheumatol* 1997; 24:13-18.
125. Atkinson K, Nivison-Smith K, Hawkins T. Haemopoietic stem cell transplantation in Australia, 1992-1995: A report from the Australian Bone Marrow Transplant Registry. *Aust NZ J Med* 1997; 27:408-419.
126. Gratwohl A, Passweg J, Gerber I, et al. Stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Clin Hematol* 2001; 14:755-776.
127. Gratwohl AA, Moutsopoulos HM, Chused TM et al. Sjögren-type syndrome after allogeneic bone-marrow transplantation. *Ann Intern Med* 1977; 87:703–706.
128. Lawley TJ, Peck JL, Moutsopoulos HM, et al. Scleroderma, Sjögren-like syndrome, and chronic graft-versus-host disease. *Ann Intern Med* 1977; 87:707-709.
129. Murphy WJ. Revisiting graft-versus-host disease models of autoimmunity: new insights in immune regulatory processes. *J Clin Invest* 2000; 106:39–47..
130. Van Bekkum DW, Stem cell transplantation in experimental models of autoimmune disease. *J Clin Immunol* 2000; 20:10–16.
131. Kushida T, Inaba M, Hisha H, et al. Intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice. *Blood* 2001; 97:3292–3299.
132. Ikehara S, Good RA, Nakamura T, et al. Rationale for bone marrow transplantation in the treatment of autoimmune diseases. *Proc Nat Acad Sci USA* 1985; 82:2483–2487.
133. van Gelder M, van Bekkum DW. Treatment of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in rats with allogeneic bone marrow transplantation from a resistant strain. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 343-351.

134. Van Bekkum DW. New opportunities for the treatment of severe autoimmune diseases: bone marrow transplantation. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 89:1–10.
135. Knaan-Shanzer S, Houben P, Kinwell-Bohre E, et al. Remission induction of adjuvant arthritis in rats by total body irradiation and autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1991; 8:333–338.
136. Pestronk A, Drachman DD, Teoh R et al. Combined short-term immunotherapy for experimental autoimmune myasthenia gravis. *Ann Neurol* 1983; 14: 235-241.
137. Snowden JA, Kearney P, Kaerney A, et al. Longterm outcome of autoimmune disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Arthritis Rheum* 1998; 41:453–459.
138. Snowden JA, Heaton DC. Development of psoriasis after syngeneic bone marrow transplant from psoriatic donor: further evidence of adoptive autoimmunity. *Br J Dermatol* 1997; 137:130–132.
139. Lampeter EF, McCann SR, Kolb HJ. Transfer of diabetes type 1 by bone marrow transplantation. *Lancet* 1998; 351:568–569.
140. Bargetzi MJ, Schonenberger A, Tichelli A et al. Celiac disease transmitted by allogeneic non-T cell-depleted bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20:607–609.
141. Sturfelt G, Lenhoff S, Sallerfors B, et al. Transplantation with allogeneic bone marrow from a donor with systemic lupus erythematosus (SLE): successful outcome in the recipient and induction of a SLE flare in the donor. *Ann Rheum Dis* 1996; 55:638–641.
142. Van Laar JM. Immunological reconstitution following immune ablation and stem cell therapy. *Arthritis Res* 2000; 4:270–275.
143. Guillaume T, Rubinstein DB, Symann M. Review: Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1998; 92:1471–1490.
144. Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE, et al. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001; 97:1458–1466.

145. Farge D, Passweg J, van Laar JM, et al. Autologous stem cell transplantation in the treatment of systemic sclerosis: a report from the EBMT/EULAR Registry. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:974-981.
146. Snowden JA, Nink V, Cooley M, et al. Composition and function of peripheral blood stem and progenitor cell harvests from patients with severe active rheumatoid arthritis. *Br J Haematol* 1998; 103:601-609.
147. Openshaw H, Stuve O, Antel JP. Multiple sclerosis flares associated with recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Neurology* 2000; 54:2147-2150.
148. Burt RK, Traynor AE, Pope R, et al. Treatment of autoimmune disease by intense immunosuppressive conditioning and autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1998; 92:3505-3514.
149. Verburg RJ, Kruize AA, van den Hoogen FH, et al. High dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with rheumatoid arthritis: results of an open study to assess feasibility, safety and efficacy. *Arthritis Rheum* 2001; 44:754-760.
150. Lowdell MW, Theocharous P. "Less is More": the role of purging in hematopoietic stem cell transplantation. *Oncologist* 1997; 2:268-274.
151. Moore J, Brooks P, Milliken S, et al. A pilot randomized trial comparing CD34-selected versus unmanipulated hemopoietic stem cell transplantation for severe, refractory rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46(9):2301-2309.
152. Smith TJ, Hillner BE, Schmitz N, et al. Economic analysis of a randomized clinical trial to compare filgrastim-mobilized peripheral-blood progenitor cell transplantation and autologous bone marrow transplantation in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1997; 15:5-10.
153. Lowenthal RM, Tuck D, Tegg E, et al. Hemopoietic stem cell harvesting and transplantation using G-CSF-primed bone marrow: comparison with unprimed bone marrow and G-CSF-primed peripheral blood cells. *Cytotherapy* 1999; 1:409-416.
154. Tyndall A, Passweg J, Gratwohl A. Haematopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune disease 2000. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(7): 702-7.

155. Wulffraat N, van Royen A, Bierings M, et al. Autologous haemopoietic stem-cell transplantation in four patients with refractory juvenile chronic arthritis. *Lancet* 1999; 353:550–553.
156. Rosen O, Massenkeil G, Hiepe F, et al. Cardiac death after autologous stem cell transplantation (ASCT) for treatment of systemic sclerosis (SSc): no evidence for cyclophosphamide-induced cardiomyopathy. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27:657–658.
157. Baldwin JL, Storb R, Thomas ED, et al. Bone marrow transplantation in patients with gold-induced marrow aplasia. *Arthritis Rheum* 1977; 20:1043–1048.
158. Jacobs P, Vincent MD, Martell RW. Prolonged remission of severe refractory rheumatoid arthritis following allogeneic bone marrow transplantation for drug-induced aplastic anaemia. *Bone Marrow Transplant* 1986; 1:237–239.
159. Mc Kendry RJ, Huebsch L, Leclair B. Progression of rheumatoid arthritis following bone marrow transplantation. A case report with a 13-year followup. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1246-1253.
160. Eedy DJ, Burrows D, Bridges JM, et al. Clearance of severe psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation. *Br Med J* 1990; 300:908.
161. Yin JA, Jowitt SN. Resolution of immune-mediated diseases following allogeneic bone marrow transplantation for leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9:31–33.
162. Vento S, Cainelli F, Renzini C et al. Resolution of autoimmune hepatitis after bone-marrow transplantation. *Lancet* 1996; 348:544–545.
163. McAllister LD, Beatty PG, Rose J. Allogeneic bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia in a patient with multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19:395–397.
164. Nelson JL, Torrez R, Louie FM, et al. Pre-existing autoimmune disease in patients with long-term survival after allogeneic bone marrow transplantation. *J Rheumatol* 1997; 48:23–29.
165. Salzman D, Tam J, Jackson C. Clinical remission of myasthenia gravis in a patient after high dose therapy and autologous stem cell transplantation with CD 34+ stem cells. *Blood* 1994; 94:206a.



166. Euler HH, Marmont AM, Bacigalupo A. Early recurrence or persistence of autoimmune diseases after unmanipulated autologous stem cell transplantation. *Blood* 1996; 88:3621–3625.
167. Snowden JA, Patton WN, O'Donnell JL, et al. Prolonged remission of longstanding systemic lupus erythematosus after autologous bone marrow transplant for non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19:1247–1250.
168. Meloni G, Capria S, Vignetti M, et al. Blast crisis of chronic myelogenous leukemia in long-lasting systemic lupus erythematosus: regression of both diseases after autologous bone marrow transplantation. *Blood* 1997; 89:4659.
169. Jondeau K, Job-Deslandre C, Bouscary D, et al. Remission of nonerosive polyarthritis associated with Sjögren's syndrome after autologous hematopoietic stem cell transplantation for lymphoma. *J Rheumatol* 1997; 24:2466–2468.
170. Emmons RVB, Queesenberry PJ. Stem cell transplantation for re-induction of self-tolerance in autoimmune diseases. *Curr Opin Organ Transpl* 1999; 4: 197-201.
171. Brodsky RA, Petri M, Smith BD, et al. Immuno-ablative high-dose cyclophosphamide without stem-cell rescue for refractory, severe autoimmune disease. *Ann Intern Med* 1998; 129:1031-1035.
172. Snowden JA, Passweg J, Moore JJ, et al. Autologous hemopoetic stem cell transplantation in severe rheumatoid arthritis: a report from the EBMT and ABMTR. *J Rheumatol* 2004; 31:482-488.
173. Burt RK, Georganas C, Schroeder J. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in refractory rheumatoid arthritis: sustained response in two of four patients. *Arthritis Rheum* 1999; 42:2281–2285.
174. Snowden JA, Biggs JC, Milliken ST. A phase I/II dose escalation study of intensified cyclophosphamide and autologous blood stem cell rescue in severe, active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42:2286–2292.
175. Cooley HM, Snowden JA, Grigg AP, et al. Outcome of rheumatoid arthritis and psoriasis following autologous stem cell transplantation for hematologic malignancy. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1712-1715.

176. Joske DJ, Ma DTS, Langlands DR, et al. Autologous bone-marrow transplantation for rheumatoid arthritis. *Lancet* 1997; 350:337-338.
177. Durez P, Toungouz M, Kentos A, et al. T-cell-depleted stem cell transplantation for rheumatoid arthritis. *Lancet* 1998; 352: 1628-1629.
178. Durez P, Toungouz M, Schandene L, et al. Remission and immune reconstitution after T-cell-depleted stem cell transplantation for rheumatoid arthritis (letter). *Lancet* 1998; 352:881.
179. Lowenthal RM, Cohen ML, Atkinson K, et al. Apparent cure of rheumatoid arthritis by bone marrow transplantation. *J Rheumatol* 1993; 20:137-140.
180. Snowden JA, Kearney P, Kearney A, et al. Long term outcome of autoimmune disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Arthritis Rheum* 1998; 41:453-459.
181. Tamm M, Gratwohl A, Tichelli A. Autologous haemopoietic stem cell transplantation in a patient with severe pulmonary hypertension complicating connective tissue disease. *Ann Rheum Dis* 1996; 55:779-780.
182. Tyndall A, Black C, Finke J. Treatment of systemic sclerosis with autologous haemopoietic stem cell transplantation. *Lancet* 1997; 349:254.
183. Binks M, Passweg J, Furst D, et al. Phase I/II of autologous stem cell transplantation in systemic sclerosis: procedure related mortality and impact on skin disease. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:577-584.
184. Tyndall A, Matucci-Cerinic M. Haemopoietic stem cell transplantation for the treatment of systemic sclerosis and other autoimmune disorders. *Exp Opin Biol Ther* 2003; 3:1041-1049.
185. Mc Sweeney PA, Nash RA, Sullivan KM, et al. High dose immunosuppressive therapy for severe systemic sclerosis: initial outcomes. *Blood* 2002; 100:1602-1610.
186. Farge D, Marolleau JP, Zohar S, et al. Autologous bone marrow transplantation in the treatment of refractory systemic sclerosis: early results from a French multicentre phase I-II study. *Br J Haematol* 2002; 119:726-739.

187. Martini A, Maccario R, Ravelli A, et al. Marked and sustained improvement two years after autologous stem cell transplantation in a girl with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999; 42:807-811.
188. Mills JA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1994; 330:1871-1879.
189. Schachna L, Ryan PF, Schwarzer AP. Malignancy associated remission of systemic lupus erythematosus maintained by autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Arthritis Rheum* 1998; 41:2271-2272.
190. Jayne D, Passweg J, Marmont A, et al. Autologous stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004; 13:168-176.
191. Marmont AM, van Lint MT, Gualandi F, et al. Autologous marrow stem cell transplantation for severe systemic lupus erythematosus of long duration. *Lupus* 1997; 6:545-548.
192. Marmont AM. Immune ablation with stem-cell rescue: a possible cure for systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1993; 2:151-156.
193. Traynor AE, Schroeder J, Rosa RM, et al. Treatment of severe systemic lupus erythematosus with high dose chemotherapy and haemopoietic stem cell transplantation: a phase I study. *Lancet* 2000; 356:7017.
194. Traynor AE, Barr WG, Rosa RM, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for severe and refractory lupus. Analysis after five years and fifteen patients. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2917-2923.
195. Brunner M, Greinix HT, Redlich K, et al. Autologous blood stem cell transplantation in refractory systemic lupus erythematosus with severe pulmonary impairment: a case report. *Arthritis Rheum* 2002; 46:1580-1584.
196. Ansell BM. Prognosis in juvenile arthritis. *Adv Exp Med Biol* 1999; 455:27-33.
197. Wulffraat M, de Kleer I, Brinkman D, et al. Autologous stem cell transplantation for refractory juvenile idiopathic arthritis: current results and perspectives. *Transplant Proc* 2002; 34:2925-2926.

198. Wulffraat NM, de Kleer IM, Prakken BJ, et al. Stem cell transplantation for autoimmune disorders. Refractory juvenile idiopathic arthritis. *Best Pract Res Clin Haematol* 2004; 17:277-289.
199. Poser CM. Notes on the pathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Neurosci* 1994; 2:258-265.
200. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, et al. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000; 343:938-952.
201. Compston A, Ebers GC and Lassmann H. *McAlpine's Multiple Sclerosis*, Churchill Livingstone, Edinburgh (1999).
202. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 2. Predictive value of the early clinical course. *Brain* 1989; 112:1419-1428.
203. Karussis DM, Vourka-Karoussis U, Lehmann D. Prevention and reversal of adoptively transferred, chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with a single high dose cytoreductive treatment followed by syngeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1993; 92(2):765-772.
204. van Gelder M, van Bakkum DW. Effective treatment of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with pseudoautologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18:1029-1034.
205. Burt RK, Traynor AE, Cohen B. T-cell depleted autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: report on the first three patients. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21:537-541.
206. Fassas A, Anagnostopoulos A, Kazis A. Autologous stem cell transplantation in progressive multiple sclerosis – an interim analysis of efficacy. *J Clin Immunol* 2000; 20(1): 24-30.
207. Fassas A, Passweg J, Anagnostopoulos A. Hemopoetic stem cell transplantation for multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27:S4.
208. Openshaw H. Peripheral neuropathy after bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 1997; 3:202-209.

209. Openshaw H, Hinton DR, Slatkin NE. Exacerbation of inflammatory demyelinating polyneuropathy after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7:411–414.
210. Mancardi GL, Saccardi R, Fillipi M, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation suppresses Gadolinium-enhanced MRI activity in multiple sclerosis. *Neurology* 2001; 57(1):62-8.
211. Berdal JE, Ebbesen J, Rydning A. Incidence and prevalence of autoimmune liver disease. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1998; 118:4517-4519.
212. Boberg KM, Aadland E, Jahnsen J, et al. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33:99-103.
213. Manns MP, Strassburg CP. Autoimmune hepatitis: clinical challenges. *Gastroenterology* 2001; 120:1502-1517.
214. Manns MP, Vogel A. Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy. *Hepatology* 2006; 43: S132-44. Review.
215. Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 2006; 354(1): 54-66.
216. 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.
217. Krawitt EL. Can you recognize autoimmune hepatitis? *Postgrad Med* 1998; 104:145-149 and 152.
218. McFarlane IG. Definition and classification of autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2002; 22:317-324.
219. Toda G, Zeniya M, Watanabe F, et al. Present status of autoimmune hepatitis in Japan-correlating the characteristics with international criteria in an area with a high rate of HCV infection. Japanese National Study Group of Autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1997; 26:1207-1212.
220. Parker DR, Kingham JGC. Type I autoimmune hepatitis is primarily a disease of later life. *Q J Med* 1997; 90:289-296.
221. Schramm C, Kanzler S, Buschenfelde KH, et al. Autoimmune hepatitis in the elderly. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:1587-1591.

222. Omagari K, Kinoshita H, Kato Y, et al. Clinical features of 89 patients with autoimmune hepatitis in Nagasaki Prefecture, Japan. *J Gastroenterol* 1999; 34:221-226.
223. Dalekos GN, Zachou K, Makri E, et al. Autoimmune hepatitis type 1 (AIH-1) in Greece: clinical, laboratory and demographic characteristics. *Hepatogastroenterology* 2001; 48(Suppl I): P25.
224. Singri N, Gleason B, Flamm SL, et al. Secondary IgA nephropathy presenting as nephrotic syndrome with glomerular crescentic changes and acute renal failure in a patient with autoimmune hepatitis. *J Nephrol* 2004; 17:125-129.
225. Biecker E, Stieger M, Zimmerman A, et al. Autoimmune hepatitis, cryoglobulinaemia and untreated celiac disease: a case report. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15:423-427.
226. Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report of the International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993 18:998-1005.
227. Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C, et al. Autoantibodies and defined target autoantigens in autoimmune hepatitis: an overview. *Eur J Intern Med* 2002; 13:293-303.
228. Zachou K, Rigopoulou E, Dalekos GN. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. *J Autoimmune Dis* 2004; 1(1): 2.
229. Gordon SC. Diagnostic criteria, clinical manifestations and natural history of autoimmune hepatitis. In Krawitt EL, Wiesner RH, Nishioka M, editors. *Autoimmune Liver diseases*. 2<sup>nd</sup> ed. Amstrdam: Elsevier; 1998: p.343-60.
230. Gohar S, Desai D, Joshi A, et al. Autoimmune hepatitis: a study of 50 patients. *Indian J Gastroenterol* 2003; 22:140-142.
231. Michalska Z, Radowska D, Stalke P, et al. Autoimmune hepatitis in the material of department and regional hospital of infectious diseases in Gdansk. *Med Sci Mon* 2003; 9 (suppl 3):49-54.
232. Kooy A, de Heide LJM, Engelkens HJH, et al. How to diagnose autoimmune hepatitis in systemic lupus erythematosus. *Hepatology* 1996; 23:937-938.

233. Desmet V, Gerber MA, Hoofnagle JH, et al. Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994; 19:1513-1520.
234. Homberg JC, Abuaf N, Bernard O, et al. Chronic active hepatitis associated with anti-liver kidney microsome antibody type I: A second type of "autoimmune hepatitis". *Hepatology* 1987; 7:1333-1339.
235. Martini E, Abuaf N, Cavalli F, et al. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune hepatitis type 2. *Hepatology* 1988; 8:1662-1666.
236. Manns M, Gerken G, Kyriatsoulis A, et al. Characterization of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against soluble liver antigen. *Lancet* 1987; i:292-294.
237. Berg PA, Stechemesser E, Strenz J. Hypergammaglobulinämische chronisch aktive Hepatitis mit Nachweis von Leber-Pancreas-spezifischen kplementbindenden Antikörpern. *Verh Dtsch Ges Inn Med* 1981; 87:921-927.
238. Stechemesser E, Klein R, Berg PA. Characterization and clinical relevance of liver-pancreas antibodies in autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1993; 18:1-9.
239. Czaja AJ, Manns MP. The validity and importance of subtypes in autoimmune hepatitis: A point of view. *Am J Gastroenterol* 1995; 90:1206-1211.
240. 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.
241. Ballot E, Homberg JC, Johanet C. Antibodies to soluble liver antigen: an additional marker in type 1 autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2000; 33:208-215.
242. Gregorio GV, Portman B, Reid F, et al. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20 year experience. *Hepatology* 1997; 25:541-547.
243. Jurado A, Cardaba B, Jara P, et al. Autoimmune hepatitis type 2 and hepatitis C virus infection: study of HLA antigens. *J Hepatol* 1997; 26:983-991.

244. Obermayer-Straub P, Perheentupa J, Braun S, et al. Hepatic autoantigens in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectoderm dystrophy. *Gastroenterology* 2001; 121:668-677.
245. 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.
246. Clemente MG, Meloni A, Obermayer-Straub P, et al. Two cytochromes P450 are major hepatocellular autoantigens in autoimmune polyglandular syndrome type 1. *Gastroenterology* 1998; 114:324-328.
247. 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.
248. Nagamine K, Peterson P, Scott HS, et al. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 1997; 17:393-398.
249. Perheentupa J. Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *Horm Metab Res* 1996; 28:353-356.
250. Obermayer-Straub P, Strassburg CP, Manns MP. Autoimmune polyglandular syndrome type 1. *Clin Rev Allergy Immunol* 2000; 18:167- 183.
251. 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.
252. Strassburg CP, Manns MP. Antinuclear antibody (ANA) patterns in hepatic and extrahepatic autoimmune disease. *J Hepatol* 1999; 31(4):751.
253. Czaja AJ, Cassani F, Cataleta M, et al. Antinuclear antibodies and patterns of nuclear immunofluorescence in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1997; 42:1688-1696.
254. Strassburg C, Alex B, Zindy F, et al. Identification of Cyclin A as a molecular target of antinuclear antibodies (ANA) in hepatic and non-hepatic diseases. *J Hepatol* 1996; 25:859-866.



255. 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.
256. 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.
257. Guéguen P, Dalekos G, Nousbaum J-B, et al. Double reactivity against actin and  $\alpha$ -actinin defines a severe form of autoimmune hepatitis type 1. *J Clin Immunol* 2006; 26:495-505.
258. Renaudineau Y, Dalekos GN, Guéguen P, et al. Anti- $\alpha$ -actinin antibodies cross-react with anti-ssDNA antibodies in active autoimmune hepatitis. *Ann NY Acad Sci* 2007 (In press).
259. Liaskos C, Bogdanos DP, Rigopoulou EI, et al. Antibody responses specific for soluble liver antigen co-occur with Ro-52 autoantibodies in patients with autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2007; 46(Suppl 1):S250.
260. 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.
261. Liaskos C, Bogdanos DP, Davies ET, et al. Diagnostic relevance of anti-filamentous actin antibodies in autoimmune hepatitis. *J Clin Pathol* 2007; 60:107-108.
262. Granito A, Muratori L, Muratori P, et al. Antibodies to filamentous actin (F-actin) in type 1 autoimmune hepatitis. *J Clin Pathol* 2006; 59:280-284.
263. Dalekos GN, Manoussakis MN, Zervou E, et al. Immunologic and viral markers in anti-HIV negative heroin addicts. *Eur J Clin Invest* 1993; 23:219-225.
264. 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; 26:561-566.
265. Gatselis NK, Georgiadou SP, Tassopoulos N, et al. Impact of parietal cell autoantibodies (PCA) and non-organ specific autoantibodies

- (NOSA) on the treatment outcome of patients with HCV infection: a pilot study. *World J Gastroenterol* 2005; 11:482-487.
266. Gatselis NK, Georgiadou SP, Koukoulis GK, et al. Clinical significance of organ and non-organ specific autoantibodies on the response to antiviral treatment of patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24:1563-1573.
267. Dalekos GN, Hatzis J, Tsianos EV. Dermatologic disease during interferon-alpha therapy for chronic viral hepatitis. *Ann Intern Med* 1998; 128: 409-410.
268. 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.
269. Gregorio GV, Jones H, Chouldhuri K, et al. Autoantibody prevalence in chronic hepatitis B virus infection: effect of interferon alpha. *Hepatology* 1996; 24:308-312.
270. Zachou K, Liaskos C, Christodoulou DK. Anti-cardiolipin antibodies in patients with chronic viral hepatitis are independent of beta2-glycoprotein I cofactor or features of antiphospholipid syndrome. *Eur J Clin Invest* 2003; 33(2): 161-8.
271. Czaja AJ. Behaviour and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999 30:394-401.
272. 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; i:425-429.
273. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988; 318:1651-1657.
274. Dalekos GN, Manoussakis MN, Goussia AC, et al. Soluble interleukin-2 receptors, antineutrophil cytoplasmic antibodies and other autoantibodies in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1993; 34:658-664.

275. Duerr RH, Targan SR, Landers CJ, et al. Neutrophil cytoplasmic antibodies: a link between primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1991; 100:1385-1391.
276. Pokorny CS, Norton ID, McCaughan GW, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody: a prognostic indicator in primary sclerosing cholangitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1994; 9:40-44.
277. Targan SR, Landers C, Vidrich A, et al. High titer antineutrophil cytoplasmic antibodies in type-1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1995; 108:1159-1166.
278. Roozendaal C, de Jong MA, van den Berg AP, et al. Clinical significance of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune liver diseases. *J Hepatol* 2000; 32:734-741.
279. Terjung B, Herzog V, Worman HJ, et al. Atypical antineutrophil cytoplasmic antibodies with perinuclear fluorescence in chronic inflammatory bowel diseases and hepatobiliary disorders colocalize with nuclear lamina proteins. *Hepatology* 1998; 28:332-340.
280. Roozendaal C, Kallenberg CGM. Anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies (ANCA) in autoimmune liver diseases. *Hepatogastroenterology* 1999; 46:3034-3040.
281. Zauli D, Ghetti S, Grassi A, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in type 1 and 2 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1997; 25:1105-1107.
282. Lindgren S, Nilsson S, Nassberger L, et al. Anti-neutrophil 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.
283. Claise C, Johanet C, Bouhnik Y, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in autoimmune liver and inflammatory bowel diseases. *Liver* 1996; 16:1095-1100.
284. Dalekos GN, Tsianos EV. Antineutrophil antibodies in chronic viral hepatitis. *J Hepatol (Letter)* 1994; 20:561.
285. Wu Y-Y, Hsu T-C, Chen T-Y, et al. Proteinase 3 and dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) are major autoantigens in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 2002; 128:347-352.

286. Mulder AHL, Horst G, Haagsma EB, et al. Prevalence and characterization of neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune liver diseases. *Hepatology* 1993; 17:411-417.
287. Czaja AJ, Homburger HA. Autoantibodies in liver disease. *Gastroenterology* 2001; 120:239-249.
288. 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 anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune hepatitis. *Gut* 1999; 44:867-873.
289. Orth T, Gerken G, Kellner R, et al. Actin is a target antigen of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune hepatitis type-1. *J Hepatol* 1997; 26:37-47.
290. Treichel U, McFarlane BM, Seki T, et al. Demographic of anti-asialoglycoprotein receptor autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1994; 107:799-804.
291. Czaja AJ, Pfeifer KD, Decker RH, et al. Frequency and significance of antibodies to asialoglycoprotein receptor in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1996; 41:1733-1740.
292. McFarlane BM, Sipos J, Gove CD, et al. Antibodies against the hepatic asialoglycoprotein receptor perfused in situ preferentially attach to periportal liver cells in the rat. *Hepatology* 1990; 11:408-415.
293. McFarlane IG. Pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Biomed Pharmacother* 1999; 53:255-263.
294. 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.
295. Wachter B, Kyriatsoulis A, Lohse AW, et al. Characterization of liver cytokeratin as a major target antigen of anti-SLA antibodies. *J Hepatol* 1990; 11:232-239.
296. Wies I, Brunner S, Henninger J, et al. Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet* 2000; 355:1510-1515.
297. Volkmann M, Martin L, Baurle A, et al. Soluble liver antigen: isolation of a 35 kD recombinant protein (SLA-P35) specifically recognizing sera

- from patients with autoimmune hepatitis type 3. *Hepatology* 2001; 33(3):591-596.
298. Costa M, Rodriguez-Sanchez JL, Czaja AJ, et al. Isolation and characterization of cDNA encoding the antigenic protein of the human tRNP(Ser)Sec complex recognized by autoantibodies from patients with type-1 autoimmune hepatitis. *Clin Exp Immunol* 2000; 121:364-374.
299. Baeres M, Herkel J, Czaja AJ, et al. Establishment of standardised SLA/LP immunoassays: specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence, and clinical characteristics. *Gut* 2002; 51:259-264.
300. Ma Y, Okamoto M, Thomas MG, et al. Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease. *Hepatology* 2002; 36:658-664.
301. Manns MP. Cytoplasmic autoantigens in autoimmune hepatitis: Molecular analysis and clinical relevance. *Semin Liver Dis* 1991; 11(3):205-14.
302. Manns MP. Antibodies to soluble liver antigen: specific marker of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2000; 33:326-328.
303. Wesierska-Gadek J, Grimm R, Hitchman E, et al. Members of the glutathione S-transferase gene family are antigens in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1998; 114:329-335.
304. Rigopoulou EI, Mytilinaiou M, Romanidou O, et al. Autoimmune hepatitis-specific antibodies against soluble liver antigen and liver cytosol type 1 in patients with chronic viral hepatitis. *J Autoimmune Dis* 2007; 4 : 2.
305. Yamamoto AM, Johanet C, Duclos-Vallee J-C, 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.
306. Ma Y, Gregorio G, Gaken J, et al. Establishment of a novel radioligand assay using eukaryotically 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.

307. Sugimura T, Obermayer-Straub P, Kayser A, et al. A major CYP2D6 autoepitope in autoimmune hepatitis type 2 and chronic hepatitis C is a three-dimensional structure homologous to other cytochrome P450 autoantigens. *Autoimmunity* 2002; 35:501-513.
308. Vitozzi S, Lapierre P, Djilali-Saiah I, et al. Anti-soluble liver antigen (SLA) antibodies in chronic HCV infection. *Autoimmunity* 2004; 37:217-222.
309. Czaja AJ, Donaldson PT, Lohse AW. Antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas and HLA risk factors for type 1 autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:413-419.
310. Rizzetto M, Swana G, Doniach D. Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. *Clin Exp Immunol* 1973; 15:331-344.
311. Manns M, Johnson EF, Griffin KJ, et al. The major target antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P450 db1. *J Clin Invest* 1989; 83:1066-1072.
312. Gueguen M, Yamamoto AM, Bernard O, et al. Anti-liver kidney microsome antibody type 1 recognizes cytochrome P450 db1. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159:542-547.
313. Zanger UM, Hauri HP, Loeper J, et al. Antibodies against human cytochrome P450 db 1 in autoimmune hepatitis type 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:8256-8260.
314. 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.
315. Clifford BD, Donahue D, Smith L, et al. High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995; 21:613-619.
316. Bortolotti F, Vajro P, Balli F, et al. Non-organ specific autoantibodies in children with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1996; 25:614-620.
317. Dalekos GN, Makri E, Loges S, et al. Increased incidence of anti-LKM autoantibodies in a consecutive cohort of HCV patients from central Greece. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14:35-42.

318. 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* 2000; 33:23-32.
319. Dalekos GN, Wedemeyer H, Obermayer-Straub P, et al. Epitope mapping of cytochrome P450 2D6 autoantigen in patients with chronic hepatitis C under  $\alpha$ -interferon treatment. *J Hepatol* 1999; 30:366-375.
320. 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.
321. 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.
322. 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.
323. 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.
324. Manns MP, Jentsch M, Mergener K. Discordant manifestation of LKM-1 antibody positive autoimmune hepatitis in identical twins [abstract]. *Hepatology* 1990; 12:840.
325. Loeper J, Louerat-Oriou B, Duport C, et al. Yeast expressed cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) exposed on the external face of plasma membrane is functionally competent. *Mol Pharmacol* 1998; 54:8-13.
326. 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.
327. Lohr 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.
328. Arenz M, Pingel S, Schirmacher P, et al. T cell receptor 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.
329. Beaune P, Dansette PM, Mansuy D, et al. Human antiendoplasmic reticulum autoantibodies appearing in a drug-induced hepatitis directed against a human liver cytochrome P450 that hydroxylates the drug. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:551-555.
330. Fabien N, Desbos A, Bienvenu J, et al. Autoantibodies directed against the UDP-glucuronotransferases in human autoimmune hepatitis. *Autoimmun Rev* 2004; 3:1-9.
331. Strassburg CP, Obermayer-Straub P, Alex B, et al. Autoantibodies against glucuronosyltransferases differ between viral hepatitis and autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1996; 111:1582-1592.
332. Philipp T, Durazzo M, Trautwein C, et al. LKM-3 autoantibodies in chronic hepatitis D recognize the UDP-glucuronosyl-transferases. *Lancet* 1994; 344:578-581.
333. Crivelli O, Lavarini C, Chiaberge E, et al. Microsomal autoantibodies in chronic infection with HBsAg associated delta (d) agent. *Clin Exp Immunol* 1983; 54:232-238.
334. 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.
335. 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.
336. 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.
337. 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.
338. Lapierre P, Hajoui O, Homberg J-C, et al. Formininotransferase cyclodeaminase is organ-specific autoantigen recognized by sera of



- patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999; 116:643-649.
339. Beland K, Lapierre P, Marceau G, et al. Anti-LC1 autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Autoimmun* 2004; 22:159-166.
340. Obermayer-Straub P, Manns MP. Hepatitis C and D, retroviruses and autoimmune manifestations. *J Autoimmun* 2001; 16:275-285.
341. 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.
342. Bourdi M, Larrey D, Nataf J, et al. Anti-liver endoplasmic reticulum autoantibodies are directed against human cytochrome P450 IA2: A specific marker of dihydralazine-induced hepatitis. *J Clin Invest* 1990; 85:1967-1973.
343. Dalekos GN, Obermayer-Straub P, Bartels M, et al. Cytochrome P450 2A6: A new hepatic autoantigen in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2003; 39:800-806.
344. Czaja AJ, Shums Z, Donaldson PT, et al. Frequency and significance of antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 2004; 49:611-618.
345. Yiannaki EE, Zintzaras E, Analatos A, et al. Evaluation of a microsphere-based flow cytometric assay for diagnosis of celiac disease. *J Immunoassay Immunochem* 2004; 25(4): 345-57.
346. Germenis A, Yiannaki EE, Zachou K, et al. Prevalence and clinical significance of immunoglobulin A antibodies against tissue transglutaminase in patients with diverse chronic liver diseases. *Clin Diag Lab Immunol* 2005; 12(8): 941-8.
347. Fusconi M, Vannini A, Dall'Aglio AC, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22(10): 951-5.
348. Liaskos C, Rigopoulou E, Zachou K, et al. Prevalence and clinical significance of anticardiolipin antibodies in patients with type 1 autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2005; 24:251-260.

349. Czaja AJ, Shums Z, Norman GL. Nonstandard antibodies as prognostic markers in autoimmune hepatitis. *Autoimmunity* 2004; 37:195-201.
350. Zachou K, Liaskos C, Rigopoulou E, et al. Presence of high avidity anticardiolipin antibodies in patients with autoimmune cholestatic liver diseases. *Clin Immunol* 2006 ; 119(2) : 203-12.
351. Vogel A, Strassburg CP, Manns MP. 77 C/G mutation in the tyrosine phosphatase CD45 gene and autoimmune hepatitis: evidence of a genetic link. *Genes Immun* 2003; 4:79-81.
352. Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, et al. Impairment of CD4(+) CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol* 2004; 41(1): 31-7.
353. Longhi MS, Ma Y, Mitry RR, et al. Effect of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells on CD8 T-cell function in patients with autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2005; 25(1): 63-71.
354. Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, et al. Functional study of CD4+CD25+ regulatory T-cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2006; 176(7): 4484-91.
355. Vento S, Cainelli F. Is there a role for viruses in triggering hepatitis? *Autoimmune Rev* 2004; 3:61-69.
356. Heringlake S, Tillman HL, Cordes-Temme P, et al. GBV-C/HGV is not the major cause of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1996; 25:980-984.
357. Bogdanos DP, Lenzi M, Okamoto M, et al. Multiple viral/self immunological cross-reactivity in liver kidney microsomal antibody positive hepatitis C virus infected patients is associated with the possession of HLA B51. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004; 17(1): 83-92.
358. Malcolm A, Heap TR, Eckstein RP, et al. Minocycline induced liver injury. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:1641-1643.
359. Goldstein PE, Devier J, Cremer M. Acute hepatitis and drug-related lupus induced by minocycline treatment. *Am J Gastroenterol* 1997; 91:143-146.
360. Kessler WR, Cummings OW, Eckert G, et al. Fulminant hepatic failure as the initial presentation of acute autoimmune hepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2:625-631.

361. Aydogdu S, Ozgenc F, Yurtsever S, et al. Our experience with fulminant hepatic failure in Turkish children: etiology and outcome. *J Trop Pediatr* 2003; 49:367-370.
362. Czaja AJ. Drug therapy in the management of type 1 autoimmune hepatitis. *Drugs* 1999; 57:49-68.
363. Monna T, Kuroki T, Yamamoto S. Autoimmune hepatitis: The present status in Japan. *Gastroenterology Jpn* 1985; 20:260-271.
364. Claman HN. Corticosteroids as immunomodulators. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 685:288-292.
365. Elion GB. The George Hitchings and Gertrude Elion Lecture. The pharmacology of azathioprine. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 685:400-407.
366. Soloway RD, Summerskill WH, Bagenstoss AH, et al. Clinical, biochemical and histological remission of severe chronic active liver disease. A controlled study of treatments and early prognosis. *Gastroenterology* 1972; 68:820-833.
367. Summerskill WH, Korman MG, Ammon HV, et al. Prednisone for chronic active liver disease: Dose titration, standard dose, and combination with azathioprine compared. *Gut* 1975; 16:876-883.
368. Silman AJ, Petrie J, Hazleman B et al. Lymphoproliferative cancer and other malignancy in patients with rheumatoid arthritis treated with azathioprine. A 20-year follow up study. *Ann Rheum Dis* 1988; 47:988-992.
369. Wang KK, Czaja AJ, Beaver SJ, et al. Extrahepatic malignancy following long term immunosuppressive therapy of severe hepatitis surface antigen-negative chronic active hepatitis. *Hepatology* 1989; 10:39-43.
370. Tamori A, Shinzaki M, Kosaka S, et al. Thiopurine S-methyltransferase gene polymorphism in Japanese patients with autoimmune liver diseases. *Liver Intern* 2007 ; 27(1) : 95-100.
371. Richardson P, James P, Ryder S. Mycophenolate mofetil formaintenance of remission in autoimmune hepatitis in patients resistant to or intolerant of azathioprine. *J Hepatol* 2000; 33(3): 371-5.
372. Chatur N, Ramji A, Bain VG, et al. Transplant immunosuppressive agents in non-transplant chronic autoimmune hepatitis: the Canadian

- association for the study of liver (CASL) experience with mycophenolate mofetil and tacrolimus. *Liver Intern* 2005; 25(4): 723-7.
373. Danielsson A, Prytz H. Oral budesonide for treatment of autoimmune chronic active hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1994; 8:585-590.
374. Pratt DS, Flavin DP, Kaplan MM. The successful treatment of autoimmune hepatitis with 6-mercaptopurine after failure with azathioprine. *Gastroenterology* 1996; 110:271-274.
375. Sherman KE, Narkewicz M, Pinto PC. Cyclosporin in the management of corticosteroid resistant type 1 autoimmune chronic active hepatitis. *J Hepatol* 1994; 21:1040-1047.
376. van Thiel DH, Wright H, Carroll P, et al. Tacrolimus: a potential new treatment for autoimmune chronic active hepatitis: results of an open label preliminary trial. *Am J Gastroenterol* 1995; 90:771-776.
377. Burak KW, Urbanski SJ, Swain MG. Successful treatment of refractory type 1 autoimmune hepatitis with methotrexate. *J Hepatol* 1998; 29:990-993.
378. Devlin SM, Swain MG, Urbanski SJ, et al. Mycophenolate mofetil for the treatment of autoimmune hepatitis in patients refractory to standard therapy. *Can J Gastroenterol* 2004; 18:321-326.
379. Brunt EM, Di Bisceglie AM. Histological changes after the use of mycophenolate mofetil in autoimmune hepatitis. *Hum Pathol* 2004; 35:509-512.
380. Epinette WW, Parker CM, Jones EL, et al. Mycophenoloic acid for psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17:962-971.
381. Glicklich D, Acharya A. Mycophenolate mofetil therapy for lupus nephritis refractory to intravenous cyclophosphamide. *Am J Kidney Dis* 1998; 32:318-322.
382. Goldblum R. Therapy of rheumatoid arthritis with mycophenolate mofetil. *Clin Exp Rheumatol* 1993; 11:117-119.
383. Ross DJ, Waters PF, Levine M, et al. Mycophenolate mofetil vs azathioprine immunosuppressive regimens after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17:768-774.

384. Mathew TH. A blinded, long term randomised multicentre study of mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation: result at 3 years. *Transplantation* 1998; 65:1450-1454.
385. Moreso F, Seron D, Morales JM, et al. Incidence of leukopenia and CMV disease in kidney transplants treated with mycophenolate mofetil combined with low dose cyclosporin and steroid dose. *Clin Transplant* 1998; 12:198-205.
386. Paterson DL, Singh N, Panebianco A, et al. Infectious complications occurring in liver transplant recipients receiving mycophenolate mofetil. *Transplantation* 1998; 66:593-598.
387. Czaja AJ, Carpenter HA, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid as adjunctive therapy for problematic type 1 autoimmune hepatitis: a randomized placebo-controlled treatment trial. *Hepatology* 1999; 30:1381-1386.
388. Nakamura K, Yoneda M, Yokohama S, et al. Efficacy of ursodeoxycholic acid in Japanese patients with type 1 autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13:490-495.
389. Duclos-Vallec JC, Di Martino V, Cazier A, et al. Remission with ursodeoxycholic acid of type 1 autoimmune hepatitis resistant to azathioprine and steroids. *Gastroenterol Clin Biol* 2005; 29:1173-1176.
390. Ohana M, Hajiro K, Okazaki K, et al. Clinical subgroup of autoimmune hepatitis type 1 sustaining remission without additional drugs. *Hepatology* 1998; 45:1667-1672.
391. Zolfino T, Heneghan MA, Norris S, et al. Characteristics of autoimmune hepatitis in patients who are not of European Caucasoid ethnic origin. *Gut* 2002; 50:713-717.
392. Ward M, Lazda VA, Gaddis PJ, et al. In vitro response to immunosuppressive agents in blacks. *Transplant Proc* 1993; 25:2470-2471.
393. Kang CM, Ahn JH, Khang KW, et al. Pharmacokinetic characteristics of methylprednisolone in Korean renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1999; 31:2759-2760.

394. McLeod HL, Lin JS, Scott EP, et al. Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1994; 55:15-20.
395. Fitzimmons WE, Berkersky I, Dressler D, et al. Demographic considerations in tacrolimus pharmacokinetics. *Transplant Proc* 1998; 30:1359-1364.
396. Lindholm A, Welsh M, Alton C, et al. Demographic factors influencing cyclosporine pharmacokinetic parameters in patients with uremia. Racial differences in bioavailability. *Clin Pharmacol Ther* 1992; 52:359-371.
397. Ludwig J, McFarlane IG, Rakela J, et al. Terminology of Chronic Hepatitis: International working party. *Am J Gastroenterol* 1995; 90:181-189.
398. Jaeckel E, Tillmann HL, Manns MP. Liver transplantation and autoimmunity. *Acta Gastroenterol Belg* 1999; 62:323-329.
399. Reich DJ, Fiel I, Guarrera JV, et al. Liver transplantation for autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2000; 32:693-700.
400. Ahmed M, Mutimer D, Hathaway M, et al. Liver transplantation for autoimmune hepatitis: a 12-year experience. *Transplant Proc* 1997; 29:496.
401. Prados E, Cuervas-Mons V, de la Mata M, et al. Outcome of autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Transplantation* 1998; 66:1645-1650.
402. Neuberger JM. Primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1997; 350:875-879.
403. Metcalf JV, Bhopal RS, Gray J, et al. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis in the city of Newcastle-upon-Tyne, England. *Int Epidemiol* 1997; 26:830-836.
404. Dahlan Y, Smith L, Simmonds D, et al. Pediatric-onset primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2003; 125:1476-1479.
405. Brenard R, Degos F, Degott C, et al. La cirrhose biliaire primitive: modes actuels de presentation. *Gastroenterol Clin Biol* 1990; 14:307-312.
406. Floreani A, Ostuni PA, Ferrara F, et al. Primary biliary cirrhosis: When and why does the disease develop? *Dig Liver Dis* 2006; 38:272-275.

407. Prince MI, James OFW. The epidemiology of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2003; 7:795-819.
408. Kim WR, Lindor KD, Lockr GR, et al. Epidemiology and natural history of primary biliary cirrhosis in a US community. *Gastroenterology* 2000; 119:1631-1636.
409. Boberg KM, Aadland E, Jahnsen J, et al. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosis cholangitis and autoimmune hepatitis in a Norwegian population. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33:99-103.
410. Inoue K, Hirohara J, Nakano T, et al. Prediction of prognosis of primary biliary cirrhosis in Japan. *Liver* 1995; 15:70-77.
411. Witt-Sullivan H, Heathcote J, Cauch K, et al. The demography of primary biliary cirrhosis in Ontario. *Can Hepatol* 1990; 12:98-105.
412. Puri AS, Kumar N, Gondal R, et al. Primary biliary cirrhosis: an Indian experience. *Indian J Gastroenterol* 2001; 20:28-29.
413. Sarin SK, Monga R, Sandhu BS, et al. Primary biliary cirrhosis in India. *Hepatobil Pancreat Dis Int* 2006; 5:105-109.
414. Sood S, Gow PJ, Christie JM, et al. Epidemiology of primary biliary cirrhosis in Victoria, Australia: high prevalence in migrant populations. *Gastroenterology* 2004; 127:4705.
415. Long RG, Scheuer PJ, Sherlock S. Presentation and course of asymptomatic primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1977; 72:1204-1207.
416. Christensen E, Crowe J, Doniach D, et al. Clinical pattern and course of disease in primary biliary cirrhosis based on an analysis of 236 patients. *Gastroenterology* 1980; 78:236-246.
417. Sasaki H, Inoue K, Higuchi K, et al. Primary biliary cirrhosis in Japan: national survey by the subcommittee on autoimmune hepatitis. *Gastroenterol Jpn* 1983; 20:476-485.
418. Mitchison HC, Bassendine MF, Hendrick A, et al. Positive antimitochondrial antibody but normal alkaline phosphatase: is this primary biliary cirrhosis? *Hepatology* 1986;6:1279-1284.

419. Balasubramaniam K, Grambsch PM, Wiesner RH, et al. Diminished survival in asymptomatic primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1990; 98:1567-1571.
420. Uddenfeldt P, Danielsson A. Primary biliary cirrhosis: survival of a cohort followed for 10 years. *J Int Med* 2000; 248:292-298.
421. Howel D, Fischbacher CM, Bhopal RS, et al. An exploratory population-based case-control study of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2000; 31:1055-1060.
422. Sohda T, Shiga H, Nakane H, et al. Rapid-onset primary biliary cirrhosis resembling drug-induced liver injury. *Intern Med* 2005; 44:1051-1054.
423. Jones DEJ, James OFW, Bassendine MF. Primary biliary cirrhosis: clinical and associated autoimmune features and natural history. *Clin Liver Dis* 1998; 2:265-282.
424. Cauch-Dudek K, Abbey S, Stewart DE, et al. Fatigue in primary biliary cirrhosis. *Gut* 1998; 43:705-710.
425. James OFW, Bhopal R, Howel D, et al. Primary biliary cirrhosis once rare, now common in the UK? *Hepatology* 1999; 30:390-394.
426. Prince M, Chetwynd A, Newman W, et al. Asymptomatic biliary cirrhosis: clinical features, prognosis and symptom progression in a large population base cohort. *Gut* 2004; 53:865-870.
427. Prince M, Chetwynd A, Newman W, et al. Survival and symptom progression in a geographically based cohort of patients with primary biliary cirrhosis: follow-up for up to 28 years. *Gastroenterology* 2002; 123:1044-1051.
428. Sherlock S, Scheuer PJ. The presentation and diagnosis of 100 patients with primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 1973; 289:674-678.
429. Crowe J, Christensen E, Doniach D, et al. Early features of primary biliary cirrhosis: an analysis of 85 patients. *Am J Gastroenterol* 1985; 80:466-468.
430. Nyberg A, Loof L. Primary biliary cirrhosis: clinical features and outcome with special reference to asymptomatic disease. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24:57-64.



431. James O, Macklon AF, Watson AJ. Primary biliary cirrhosis-a revised clinical spectrum. *Lancet* 1981; 1:1278-1281.
432. Witt-Sullivan H, Heathcote J, Cauch K, et al. The demography of primary biliary cirrhosis in Ontario, Canada. *Hepatology* 1990; 12:98-105.
433. Huet PM, Deslauriers J, Tran A, et al. Impact of fatigue on the quality of life of patients with primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:760-767.
434. Milkiewicz P, Heathcote EJ. Fatigue in chronic cholestasis. *Gut* 2004; 53:475-477.
435. Demitrack MA, Dale JK, Straus SE, et al. Evidence for impaired activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in patients with chronic fatigue syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73:1224-1234.
436. Swain MG, Maric M. Defective corticotropin-releasing hormone mediated neuroendocrine and behavioral responses in cholestatic rats: Implications for cholestatic liver disease-related sickness behaviors. *Hepatology* 1995; 22:1560-1564.
437. Swain MG. Alterations in hypothalamic mu-opiate receptor-mediated responses but not methionine enkephalin or proenkephalin messenger RNA levels in rats with acute cholestasis. *Hepatology* 1994; 20:700-705.
438. Jones EA, Yurdaydin C. Is fatigue associated with cholestasis mediated by altered central neurotransmission? *Hepatology* 1997; 25:492-494.
439. Jones EA. Relief from profound fatigue associated with chronic liver disease by long-term ondansetron therapy. *Lancet* 1999; 354(9176): 397.
440. Forton DM, Patel N, Prince M, et al. Fatigue and primary biliary cirrhosis: Association of globus pallidus magnetisation transfer ratio measurements with fatigue severity and blood manganese levels. *Gut* 2004; 53:587-592.
441. Longo M, Crosignani A, Batrezzari PM, et al. Hyperlipidaemic state and cardiovascular risk in primary biliary cirrhosis. *Gut* 2002; 51:265-269.

442. Butler P, Valle F, Hamilton-Miller JM, et al. M2 mitochondrial antibodies and urinary rough mutant bacteria in patients with primary biliary cirrhosis and in patients with recurrent bacteriuria. *J Hepatol* 1993; 17:408-414.
443. Koulentaki M, Ioannidou D, Stefanidou M, et al. Dermatological manifestations in primary biliary cirrhosis patients: a case control study. *Am J Gastroenterol* 2006; 101:541-546.
444. Cantalapiedra A, Penarrubia MJ, Gutierrez O, et al. Primary biliary cirrhosis, sicca syndrome and autoimmune hemolytic anemia. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97:678-679.
445. Masaki N, Hayashi S. Autoimmune liver disease complicating Sjogren's syndrome. *Nippon Rinsho* 1995; 53:2530-2535.
446. Islam S, Riordan JW, McDonald JA. Case report: a rare association of primary biliary cirrhosis and systemic lupus erythematosus and review of the literature. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14:431-435.
447. Marasini B, Gagetra M, Rossi V, et al. Rheumatic disorders and primary biliary cirrhosis: an appraisal of 170 Italian patients. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:1046-1049.
448. Jang HJ, Kim GS, Eun CS, et al. Development of primary biliary cirrhosis in a patient with Crohn's disease: a case report and review of the literature. *Dig Dis Sci* 2005; 50:2335-2337.
449. Nakamura T, Kawagoe Y, Ueda Y, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated rapidly progressive glomerulonephritis in a patient with primary biliary cirrhosis. *Am J Med Sci* 2004; 328:176-179.
450. Mahl TC, Shockcor W, Boyer JL. Primary biliary cirrhosis: survival of a large cohort of symptomatic and asymptomatic patients followed for 24 years. *J Hepatol* 1994; 20:707-713.
451. Guartery JM, Faloon WW. Effect of estradiol upon serum enzymes in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1987; 7:737-742.
452. Menon KV, Angulo P, Weston S, et al. Bone disease in primary biliary cirrhosis: independent indicators and rate of progression. *J Hepatol* 2001; 35:316-323.

453. Menon KV, Angulo P, Boe GM, et al. Safety and efficacy of estrogen therapy in preventing bone loss in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:889-892.
454. Alvaro D, Invernizzi P, Onori P, et al. Estrogen receptors in cholangiocytes and the progression of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2004; 41:905-912.
455. Srellon AJ, Williams R. Increased incidence of menstrual abnormalities and hysterectomy preceding primary biliary cirrhosis. *Br Med J* 1986; 293:297-298.
456. Mills PR, Boyle P, Quigley EM, et al. Primary biliary cirrhosis: an increase incidence of extrahepatic malignancies. *J Clin Pathol* 1982; 35:541-543.
457. Floreani A, Biagini MR, Chiaramonte M, et al. Incidence of hepatic and extrahepatic malignancies in primary biliary cirrhosis. *Ital J Gastroenterol* 1993; 25:473-476.
458. Selmi C, Mayo MJ, Bach N, et al. Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology* 2004; 127:485-492.
459. Invernizzi P, Selmi C, Mackay IR, et al. From bases to basis: linking genetics to causation in primary biliary cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3:401-410.
460. Majori M, Corradi M, Caminati A, et al. Predominant TH1 cytokine pattern in peripheral blood from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:458-462.
461. Harada K, van de Water J, Leung PS, et al. In situ nucleic acid hybridization of cytokines in primary biliary cirrhosis: predominance of the Th1 subset. *Hepatology* 1997; 25:791-796.
462. Charatcharoenwittaya P, Lindor KD. Current concepts in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Ann Hepatol* 2005; 4:161-175.
463. Mayo I, Arizti P, Pares A, et al. Antibodies against the COOH-terminal region of E.coli ClpP protease in patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33:528-536.

464. Xu L, Shen Z, Guo L, et al. Does a betaretrovirus infection trigger primary biliary cirrhosis? *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:8454-8459.
465. Bogdanos D-P, Baum H, Grasso A, et al. Microbial mimics are major targets of crossreactivity with human pyruvate dehydrogenase in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2004; 40:31-39.
466. Kita H, Matsumura S, He XS, et al. Analysis of TCR antagonism and molecular mimicry of an HLA-Ao201-restricted CTL epitope in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2002; 36:918-926.
467. Vilagut L, Pares A, Vinas O, et al. Antibodies to mycobacterial 65KD heat shock protein cross-react with the main mitochondrial antigens with primary biliary cirrhosis. *Eur J Clin Invest* 1997; 27:667-672.
468. Bogdanos DP, Pares A, Baum H, et al. Disease-specific cross-reactivity between mimicking peptides of heat shock protein of *Mycobacterium gordonae* and dominant epitope of E2 subunit of pyruvate dehydrogenase is common in Spanish but not British patients with primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2004; 22:353-362.
469. Selmi C, Balkwill DL, Invernizzi P, et al. Patients with primary biliary cirrhosis react against a ubiquitous xenobiotic-metabolizing bacterium. *Hepatology* 2003; 38:1250-1257.
470. Abdulkarim AS, Petrovic LM, Kim WR, et al. Primary biliary cirrhosis: an infectious disease caused by *Chlamydia pneumoniae*? *J Hepatol* 2004; 40:380-384.
471. Liu H-Y, Deng A-M, Zhang J, et al. Correlation of *Chlamydia pneumoniae* infection with primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11:4108-4110.
472. Trollmo C, Meter AL, Steere AC, et al. Molecular mimicry in Lyme arthritis demonstrated at the single cell level: LFA-1 alpha L is a partial agonist for outer surface protein A-reactive T cells. *J Immunol* 2001; 166:5286-5291.
473. Neuberger J. Eosinophils and primary biliary cirrhosis-stoking the fire? *Hepatology* 1999; 30:335-337.

474. Martinez OM, Villanueva JC, Gershwin GE, et al. Cytokine patterns and cytotoxic mediators in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1995; 21:113-119.
475. Miyaguchi S, Oda M, Tamano M, et al. Elevation of serum eosinophil cationic protein in primary biliary cirrhosis. *Int Hepatol Commun* 1994; 2:285-288.
476. Zachou K, Rigopoulou EI, Liaskos C, et al. Primary biliary cirrhosis presented as peripheral eosinophilia in asymptomatic women with or without elevated alkaline phosphatase. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16:425-428.
477. Nagano T, Yamamoto K, Matsumoto S et al. Cytokine profile in the liver of primary biliary cirrhosis. *J Clin Immunol* 1999; 19: 422-7.
478. Berg PA, Klein R, Rocken M. Cytokines in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1997; 17:115-123.
479. Mackay IR. Primary biliary cirrhosis showing a high titre of autoantibody: report of a case. *N Engl J Med* 1958; 258:185-188.
480. Walker JG, Doniach D, Roitt IM, et al. Serological tests in the diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1965; i:827-831.
481. Berg PA, Klein R, Lindenborn-Fotinos J, et al. ATPase-associated antigen (M2): marker antigen for serological diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1982; ii:1423-1426.
482. Berg PA, Klein R, Lindenborn-Fotinos J. Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1986; 2:123-131.
483. Yeaman SJ, Fussey SP, Danner DJ, et al. Primary biliary cirrhosis: identification of two major M2 mitochondrial autoantigens. *Lancet* 1988; i:1067-1070.
484. van de Water J, Gershwin ME, Leung P, et al. The autoepitope of the 74-kD mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis corresponds to the functional site of dihydrolipoamide acetyltransferase. *J Exp Med* 1988; 167:1791-1799.
485. Heseltine L, Turner IB, Fussey SP, et al. Primary biliary cirrhosis: quantitation of autoantibodies to purified mitochondrial enzymes and correlation with disease progression. *Gastroenterology* 1990; 99:1786-1792.

486. Palmer JM, Bassendine MF, James OFW, et al. Human pyruvate dehydrogenase complex as an autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Clin Sci* 1993; 85:289–293.
487. Robe AJ, Palmer JM, Yeaman SJ, et al. The E3BP (protein X) component of pyruvate dehydrogenase complex (PDC) is not a T-cell autoantigen in primary biliary cirrhosis (PBC) [abstract]. *J Hepatol* 2000; 32:29.
488. Fussey SPM, Bassendine MF, Fittes D, et al. The E1 $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the pyruvate dehydrogenase complex are M2"d" and M2"e" autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Clin Sci* 1989; 77:365–368.
489. Fussey SP, West SM, Lindsay JG, et al. Clarification of the identity of the major autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Clin Sci* 1991; 80:451–455.
490. Fussey SPM, Guest JR, James OFW, et al. Identification and analysis of the major M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:8654–8658.
491. Surh CD, Danner DJ, Ahmed A, et al. Reactivity of primary biliary cirrhosis sera with a human fetal liver cDNA clone of branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase dihydrolipoamide acyltransferase, the 52 kDa mitochondrial autoantigen. *Hepatology* 1989; 9:63–68.
492. Mutimer DJ, Fussey SP, Yeaman SJ, et al. Frequency of IgG and IgM autoantibodies to four specific M2 mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1989; 10:403–407.
493. Neuberger JM, Thomson R. PBC and AMA—what is the connection? *Hepatology* 1999; 29:271–276.
494. Hannan S, Davies ET, Hussain MJ, et al. Placental transfer of antimitochondrial antibody is associated with liver pathology. *Hepatology* 1999; 30:472A.
495. van de Water J, Ansari A, Surh CD, et al. Evidence for the targeting by 2-oxo-dehydrogenase enzymes in the T-cell response of primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 1991; 146:89–94.
496. Löhner H, Fleischer B, Gerken G, et al. Autoreactive liver-infiltrating T cells in primary biliary cirrhosis recognise inner mitochondrial epitopes

- and the pyruvate dehydrogenase complex. *J Hepatol* 1993; 18:322-327.
497. Jones DEJ, Palmer JM, Yeaman SJ, et al. T-cell responses to the components of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1995; 21:995–1002.
498. van de Water J, Ansari A, Prindiville T, et al. Heterogeneity of autoreactive T-cell clones specific for the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis. *J Exp Med* 1995; 181:723–733.
499. Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, et al. HLA DRB4 0101-restricted immunodominant T-cell autoepitope of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: evidence of molecular mimicry in human autoimmune disease. *J Exp Med* 1995; 181:1835–1845.
500. Jones DEJ, Palmer JM, Yeaman SJ, et al. T-cell responses to native human proteins in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 1997; 107:562–568.
501. Agarwal K, Jones DEJ, Bassendine MF. Genetic susceptibility to primary biliary cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11:603–606.
502. Yeaman SJ, Kirby JA, Jones DEJ. Autoreactive responses to pyruvate dehydrogenase complex in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Immunol Rev* 2000; 174:238–249.
503. Jones DEJ, Palmer JM, Yeaman SJ, et al. The time-course of bile duct lesion development in experimental autoimmune cholangitis (a mouse model of primary biliary cirrhosis). *Hepatology* 1999; 30:318A.
504. Jones DEJ, Palmer JM, Yeaman SJ, et al. Breakdown of tolerance to pyruvate dehydrogenase complex in experimental autoimmune cholangitis a murine model of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1999; 30:65–70.
505. Jones DEJ, Palmer JM, Yeaman SJ, et al. Co-sensitisation with self- and homologous foreign-antigen as a mechanism of breakdown of self-tolerance in primary biliary cirrhosis. *Gut* 1999; 44:A61.
506. Metcalf JV, Mitchison HC, Palmer JM, et al. Natural history of early primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1996; 348:1399–1402.

507. Springer J, Cauch-Dudek K, O' Rourke K, Wanless IR, Heathcote EJ. Asymptomatic primary biliary cirrhosis: a study of its natural history and prognosis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:47-53.
508. Roll J, Boyer JL, Barry D, et al. The prognostic importance of clinical and histological features in asymptomatic and symptomatic primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 1983; 308:1-7.
509. Gabeta S, Norman GL, Liaskos C, et al. Diagnostic Relevance and Clinical Significance of the New Enhanced Performance M2 (MIT3) ELISA for the Detection of IgA and IgG Antimitochondrial Antibodies in Primary Biliary Cirrhosis. *J Clin Immunol* 2007; 27(4) : 378-87.
510. Kisand KE, Kisand KV, Karvonen AL, et al. Antibodies to pyruvate dehydrogenase in primary biliary cirrhosis: correlation with histology. *APMIS* 1998; 106:884-892.
511. van Norstrand MD, Malnchoc M, Lindor KD, et al. Quantitative measurement of autoantibodies to recombinant mitochondrial antigens in patients with primary biliary cirrhosis: relationship of levels of autoantibodies to disease progression. *Hepatology* 1997; 25:6-11.
512. Berg PA, Klein R. Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis and other disorders: definition and clinical relevance. *Dig Dis* 1992; 10:85-101.
513. Corpechot C, Carrat F, Poupon R, Popon RE. Primary biliary cirrhosis: incidence and predictive factors of cirrhosis development in ursodiol-treated patients. *Gastroenterology* 2002; 122:652-658.
514. Kisand KE, Metskula K, Kisand KV, et al. The follow-up of asymptomatic persons with antibodies to pyruvate dehydrogenase in adult population samples. *J Gastroenterol* 2001; 36:248-254.
515. Flisiak R, Pelszynska M, Prokopowicz D, et al. High concentration of mitochondrial antibodies predicts progressive primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11:5706-5709.
516. Rigopoulou EI, Davies ET, Bogdanos D-P, et al. Anti-mitochondrial antibodies of immunoglobulin G3 subclass are associated with a more severe disease course in primary biliary cirrhosis. *Liver International* 2007 (In press).



517. Omagari K, Rowley MJ, Whittingham S, et al. Autoantibodies to M2 mitochondrial autoantigens in normal human sera by immunofluorescence and novel assays. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11:610–616.
518. Van de Water J, Fregeau D, Davis P, et al. Autoantibodies of primary biliary cirrhosis recognize dihydrolipoamide acetyltransferase and inhibit enzyme function. *J Immunol* 1988; 141:2321–2324.
519. Fregeau DR, Davis PA, Danner DJ, et al. Antimitochondrial antibodies of primary biliary cirrhosis recognize dihydrolipoamide acyltransferase and inhibit enzyme function of the branched chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase complex. *J Immunol* 1989; 142:3815–3819.
520. Fregeau DR, Prindiville T, Coppel RL, et al. Inhibition of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase activity by a distinct population of autoantibodies recognising dihydrolipoamide succinyltransferase in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1990; 11:975–979.
521. Teoh KL, Mackay IR, Rowley MJ, et al. Enzyme inhibitory autoantibodies to pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis differ for mammalian, yeast and bacterial enzymes: implications for molecular mimicry. *Hepatology* 1994; 19:1029–1033.
522. Moteki S, Leung PS, Coppel R, L., et al. Use of a designer triple expression hybrid clone for three different lipoyl domains for the detection of antimitochondrial autoantibodies. *Hepatology* 1996; 24:970-973.
523. Rigopoulou EI, Bogdanos DP, Liaskos C, et al. Anti-mitochondrial antibody immunofluorescent titres correlate with the number and intensity of immunoblot-detected mitochondrial bands in patients with primary biliary cirrhosis. *Clin Chim Acta* 2007; 380(1-2): 118-21.
524. Jensen WA, Jois JA, Murphy P, et al. Automated enzymatic mitochondrial antibody assay for the diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38:753-758.
525. Miyakawa H, Tanaka A, Kikuchi K, et al. Detection of antimitochondrial autoantibodies in immunofluorescent AMA-negative patients with primary biliary cirrhosis using recombinant autoantigens. *Hepatology* 2001; 34:243-248.

526. Kadokawa Y, Omagari K, Hazama H, et al. Evaluation of newly developed ELISA using MESACUP-2 Test Mitochondrial M2 kit for the diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Clin Biochem* 2003; 36:203-210.
527. Kitami N, Komada T, Ishii H, et al. Immunological study of anti-M2 in antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis. *Intern Med* 1995; 34:496-501.
528. Kinoshita H, Omagari K, Matsuo I, et al. Frequency of IgG, IgM and IgA class autoantibodies against 2-oxo-acid dehydrogenase complex in 102 Japanese patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 1999; 15:163-171.
529. Omagari K, Hazama H, Kohno S. Enzyme inhibition assay for pyruvate dehydrogenase complex: Clinical utility for the diagnosis of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11:6735-6739.
530. Masuda J, Omagari K, Miyakawa H, et al. Clinical significance of positive immunoblotting but negative immunofluorescence for antimitochondrial antibodies in patients with liver diseases other than primary biliary cirrhosis. *Autoimmunity* 2002; 35:135-141.
531. Bassendine MF, Jones DEJ. Antimitochondrial and other autoantibodies in primary biliary cirrhosis. In: Krawitt EL, Wiesner RH, Nishioka M. *Autoimmune Liver Diseases*. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1998;287-304.
532. Teoh K-L, Rowley MJ, Zafirakis H, et al. Enzyme inhibitory autotibodies to pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: Applications of a semiautomated assay. *Hepatology* 1994; 20:1220-1224.
533. Schmit P, Gilson G, Humbel RL. Evaluation of an automated enzyme inhibition assay for the detection of anti-mitochondrial M2 autoantibodies. *Clin Chem* 1999; 45:2287-2289.
534. Jois J, Omagari K, Rowley MJ, et al. Enzyme inhibitory antibody to pyruvate dehydrogenase: diagnostic utility in primary biliary cirrhosis. *Ann Clin Biochem* 2000; 37:67-73.
535. Hazama H, Omagari K, Masuda J, et al. Automated enzymatic mitochondrial antibody assay for the diagnosis of primary biliary cirrhosis: applications of a routine diagnostic tool for the detection of

- antimitochondrial antibodies. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:316-323.
536. Omagari K, Rowley MJ, Jois JA, et al. Immunoreactivity of antimitochondrial autoantibodies in patients with primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol* 1996; 31:61-68.
537. Doniach D, Roitt IM, Walker JG, et al. Tissue antibodies in primary biliary cirrhosis, active chronic (lupoid) hepatitis, cryptogenic cirrhosis and other liver diseases and their clinical implications. *Clin Exp Immunol* 1966; 1:237-262.
538. Michieletti P, Wanless IR, Katz A, et al. Antimitochondrial antibody negative primary biliary cirrhosis: a distinct syndrome of autoimmune cholangitis. *Gut* 1994; 35:260-265.
539. Lacerda MA, Ludwig J, Dickson ER, et al. Antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1995; 90:247-249.
540. Rigopoulou EI, Davies ET, Pares A, et al. Prevalence and clinical significance of isotype specific antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Gut* 2005; 54(4) : 528-32.
541. Invernizzi P, Podda M, Battezzati PM, et al. Autoantibodies against nuclear pore complexes are associated with more active and severe liver disease in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2001; 34(3): 366-72.
542. Muratori P, Muratori L, Ferrari R, et al. Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(2): 431-7.
543. Wiesierska-Gadek J, Penner E, Battezzati PM, et al. Correlation of initial autoantibody profile and clinical outcome in primary biliary cirrhosis *Hepatology* 2006; 43(5): 1135-44.
544. Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y. Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2005; 42(3): 386-92.
545. Lozano F, Pares A, Borche L, et al. Autoantibodies against nuclear envelope-associated proteins in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1988; 8:930-938.

546. Lassoued K, Guilly MN, Andre C, et al. Autoantibodies to 200 kD polypeptide(s) of the nuclear envelope: a new serologic marker of primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 1988; 74:283-288.
547. Courvalin JC, Lassoued K, Bartnik E, et al. The 210-kD nuclear envelope polypeptide recognized by human autoantibodies in primary biliary cirrhosis is the major glycoprotein of the nuclear pore. *J Clin Invest* 1990; 86:279-285.
548. Nickowitz RE, Wozniak RW, Schaffner F, et al. Autoantibodies against integral membrane proteins of the nuclear envelope in patients with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1994; 106:193-199.
549. Lassoued K, Brenard R, Degos F, et al. Antinuclear antibodies directed to a 200-kilodalton polypeptide of the nuclear envelope in primary biliary cirrhosis. A clinical and immunological study of a series of 150 patients with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1990; 99:181-186.
550. Wozniak RW, Bartnik E, Blobel G. Primary structure analysis of an integral membrane glycoprotein of the nuclear pore. *J Cell Biol* 1989; 108:2083-2092.
551. Greber UL, Senior A, Gerace L. A major glycoprotein of the nuclear pore complex is a membrane spanning polypeptide with a large luminal domain and a small cytoplasmic tail. *EMBO J* 1990; 9:1495-1502.
552. Wesierska-Gadek J, Hohenauer H, Hitchman E, et al. Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis preferentially react with the amino-terminal domain of the nuclear pore complex glycoprotein gp210. *J Exp Med* 1995; 182:1159-1162.
553. Tartakovsky F, Worman HJ. Detection of gp210 autoantibodies in primary biliary cirrhosis using a recombinant protein containing the predominant autoepitope. *Hepatology* 1995; 21:495-500.
554. Itoh S, Ichida T, Yoshida T, et al. Autoantibodies against a 210 kDa glycoprotein of the nuclear pore complex as a prognostic marker in patients with primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13:257-265.

555. Nakamura M, Nagano H, Sakon M. Role of the Fas/FasL pathway in combination therapy with interferon-alpha and fluorouracil against hepatocellular carcinoma in vitro. *J Hepatol* 2007; 46(1): 77-88.
556. Longhi MS, Hussain MJ, Bogdanos DP et al. Cytochrome P450IID6-specific CD8 T cell immune responses mirror disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Hepatology* 2007; 46(2): 472-84.
557. Dubel L, Farges O, Courvalin J-C, et al. Persistence of gp210 and multiple nuclear dots antibodies does not correlate with recurrence of primary biliary cirrhosis 6 years after liver transplantation. *J Hepatol* 1998; 28:169-170.
558. Luettig B, Boecker KH, Schoessler W et al. The antinuclear autoantibodies Sp100 kai gp210 persist after orthotopic liver transplantation in patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1998; 28:824-828.
559. Courvalin JC, Lassoued K, Worman HJ, et al. Identification and characterisation of autoantibodies against the nuclear envelope lamin B receptor from patients with primary biliary cirrhosis. *J Exp Med* 1990; 172:961-967.
560. Lin F, Noyer CM, Ye Q, et al. Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis recognize a region within the nucleoplasmic domain of inner nuclear membrane protein LBR. *Hepatology* 1996; 23:57-61.
561. Szostecki C, Guldner HH, Netter HJ, et al. Isolation and characterisation of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognised by autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 1990; 145:4338-4347.
562. Evans J, Reuben A, Craft J. PBC 95K, a 95-kilodalton nuclear autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Arthritis Rheum* 1991; 34:731-736.
563. Zuchner D, Sternsdorf T, Szostecki C, Heathcote EJ, Cauch-Dudek K, Will H. Prevalence, kinetics, and therapeutic modulation of autoantibodies against Sp100 and promyelocytic leukemia protein in a large cohort of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1997; 26:1123-1130.

564. Orth T, Gerken G, Meyer Zum Buschenfelde KH, et al. Antineutrophil nuclear antibodies in primary biliary cirrhosis: their prevalence and antigen specificity. *Z Gastroenterol* 1997; 35:113-121.
565. Rigopoulou E, Dalekos GN. Anti-sp100 antibodies in primary biliary cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39(4): 406-7.
566. Borden KL. Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol* 2002; 22:5259-5269.
567. Sternsdorf T, Guldner HH, Szostecki C, et al. Two nuclear dot-associated proteins, PML and Sp100, are often co-autoimmunogenic in patients with primary biliary cirrhosis. *Scand J Immunol* 1995; 42:257-268.
568. Bloch DB, de la Monte SM, Guigaouri P, et al. Identification and characterization of a leukocyte-specific component of the nuclear body. *J Biol Chem* 1996; 271(46): 29198-29204.
569. Basseendine MF, Collins JD, Stephenson, J, et al. Platelet associated immuno-globulins in primary biliary cirrhosis: a cause of thrombocytopenia. *Gut* 1985; 26:1074-1079.
570. Panzer S, Penner E, Nelson PJ, et al. Identification of the platelet glycoprotein IIb/IIIa as a target antigen in primary biliary cirrhosis-associated autoimmune thrombocytopenia. Evidence that platelet-reactive autoantibodies can also bind to the mitochondrial antigen M2. *J Autoimmun* 1990; 3:473-83.
571. Feistauer SM, Penner E, Mayr WR, et al. Target platelet antigens of autoantibodies in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1997; 25:1343-1345.
572. von Landenberg P, Baumgartner M, Schoelmerich J, et al. Clinical relevance of antiphospholipid antibodies in primary biliary cirrhosis. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1051:20-28.
573. Foulk WT, Bagginstoss AH, Butt HR. Primary biliary cirrhosis: reevaluation by clinical and histological study of 49 cases. *Gastroenterology* 1964; 47:354-374.
574. Sherlock S. Primary biliary cirrhosis (chronic intrahepatic obstructive jaundice). *Gastroenterology* 1959; 37:574-586.

575. Roll J, Boyer JL, Barry D, et al. The prognostic importance of clinical and histological features in asymptomatic and symptomatic primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 1984; 308:1-7.
576. Kim WR, Lindor KD, Locke GR, et al. Epidemiology and natural history of primary biliary cirrhosis in a US community. Berg PA, Klein R, Lindenborn-Fotinos J. Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2000; 119:1631-1636.
577. Kadokawa Y, Omagakari K, Ohba K, et al. Hepatocellular carcinoma in a male patient with early stage (stage I) primary biliary cirrhosis. *Intern Med* 2005; 44:207-211.
578. Nakanuma Y. Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis at an early histologic stage: coincidental or causally related? *Intern Med* 2005; 44:169-170.
579. Schaffner F, Klion FM, Latuff AJ. The long term use of cholestyramine in the treatment of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1965; 48:293-298.
580. Funayama A, Hara T, Kusakabe A, et al. A case of primary biliary cirrhosis observed as the improvement of the clinical symptom due to cholestyramine treatment. *Nippon Schokakibyō Gakkai Zasshi* 1975; 72:1538-1541.
581. Cerio R, Murphy GM, Sladen GE, et al. A combination of phototherapy and cholestyramine for the relief of pruritus in primary biliary cirrhosis. *Br J Dermatol* 1987; 116:265-267.
582. Podesta A, Lopez P, Terg R, et al. Treatment of pruritus of primary biliary cirrhosis with rifampin. *Dig Dis Sci* 1991; 36:216-220.
583. Kohan AI, Findor JA, Igartua EB, et al. Intensive plasmapheresis as an alternative therapy for intractable pruritus of primary biliary cirrhosis. *Transfus Sci* 1991; 12:197-200.
584. Bernstein JE, Swift R. Relief of intractable pruritus with naloxone. *Arch Dermatol* 1979; 115:1366-1367.
585. Thornton JR, Losowsky MS. Opioid peptides and primary biliary cirrhosis. *BMJ* 1988; 297:1501-1504.

586. Bergas NV, Talbot TL, Alling DW, et al. A controlled trial of naloxone infusions for the pruritus of chronic cholestasis. *Gastroenterology* 1992; 102:544-549.
587. Wolfhagen FH, Sternieri E, Hop WC, et al. Oral naltrexone treatment for cholestatic pruritus: a double-blind, placebo-controlled study. *Gastroenterology* 1997; 113:1264-1269.
588. Schworer H, Hartmann H, Ramadori G. Relief of cholestatic pruritus by a novel class of drugs: 5-hydroxytryptamine type 3 (5-HT<sub>3</sub>) receptor antagonists: effectiveness of ondansetron. *Pain* 1995; 61:33-37.
589. Danielsson A, Lorentzon R, Larsson SE. Normal hepatic vitamin-D metabolism in icteric primary biliary cirrhosis associated with pronounced vitamin-D deficiency symptoms. *Hepatogastroenterology* 1982; 29:6-8.
590. Wolfhagen FH, van Buuren HR, Vleggaar FP, et al. Management of osteoporosis in primary biliary cirrhosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000; 14:629-641.
591. Zein CO, Jorgensen RA, Clarke B, et al. Alendronate improves bone mineral density in primary biliary cirrhosis: a randomized placebo-controlled trial. *Hepatology* 2005; 42:762-771.
592. Pares A, Rodes J. Treatment of primary biliary cirrhosis. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2000; 46:165-174.
593. Gong Y, Gluud C. Colchicine for primary biliary cirrhosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; (2):CD004481.
594. Kaplan MM, Schmid C, Provenzale D, et al. A prospective trial of colchicine and methotrexate in the treatment of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1999; 117:1173-1180.
595. Weber P, Scheurlen M, Wiedmann KH. Methotrexate in the therapy of primary biliary cirrhosis. *Dtsch Med Wochenschr* 1991; 116:1347-1352.
596. Oo YH, Neuberger J. Options for treatment of primary biliary cirrhosis. *Drugs* 2004; 64:2261-2271.
597. Nakamuta M, Enjoji M, Kotoh K, et al. Long-term fibrate treatment for PBC. *J Gastroenterol* 2005; 40:546-547.
598. Kanda T, Yokosuka O, Imazeki F, et al. Bezafibrate treatment: a new medical approach for PBC patients? *J Gastroenterol* 2003; 38:573-578.



599. Dohmen K, Mizuta T, Nakamuta M, et al. Fenofibrate for patients with asymptomatic primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10:894-898.
600. Talwalker JA, Angulo P, Keach JC, et al. Mycophenolate mofetil for the treatment of primary biliary cirrhosis in patients with an incomplete response to ursodeoxycholic acid. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39:168-171.
601. Wolfhagen FH, van Hoogstraten HJ, van Buuren HR, et al. Triple therapy with ursodeoxycholic acid, prednisone and azathioprine in primary biliary cirrhosis: a 1-year randomized, placebo-controlled study. *J Hepatol* 1998; 29:736-742.
602. Lindor KD. Primary biliary cirrhosis: questions and promises. *Ann Intern Med* 1997; 126:733-735.
603. Poupon R, Chrétien Y, Poupon RE, et al. Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1987; i:834-836.
604. Shapiro JM, Smith H, Schaffner F. Serum bilirubin: a prognostic factor in primary biliary cirrhosis. *Gut* 1979; 20:137-140.
605. Poupon RE, Lindor KD, Cauch-Dudek K, et al. Combined analysis of randomised controlled trials of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1997; 113:884-890.
606. Combes B, Luketic VA, Peters MG, et al. Prolonged follow-up of patients in the U.S. multicenter trial of ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(2):264-8.
607. Kilmurry MR, Heathcote JE, Cauch-Dudek, et al. Is the Mayo model for predicting survival useful after the introduction of ursodeoxycholic acid treatment for primary biliary cirrhosis?, *Hepatology* 1996; 23:1148-1153.
608. Goulis J, Leandro G, Burroughs AK. Randomised controlled trials of ursodeoxycholic-acid therapy for primary biliary cirrhosis: a meta-analysis. *Lancet* 1999; 354:1053-1060.
609. Angulo P, Dickson ER, Therneau TM, et al. Comparison of three different doses of ursodeoxycholic acid in the treatment of primary biliary cirrhosis: a randomised trial. *J Hepatol* 1999; 30(5): 830-5.

610. Combes B, Carithers RL, Maddrey WC, et al. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1995; 22:759–766.
611. Lindor KD, Jorgensen RA, Therneau TM, et al. Ursodeoxycholic acid delays the onset of esophageal varices in primary biliary cirrhosis. *Mayo Clinic Proc* 1997; 72:1137–1140.
612. Battezzati PM, Podda M, Bianchi FB, et al. Ursodeoxycholic acid for symptomatic primary biliary cirrhosis: preliminary analysis of a double-blind multicenter trial. *J Hepatol* 1993; 17:332–338.
613. Vuoristo M, Farkilla M, Karnonen AL, et al. A placebo-controlled trial of primary biliary cirrhosis treatment with colchicine and ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 1995; 108:1470–1478.
614. Dickson ER, Grambsch PM, Fleming TR, et al. Prognosis in primary biliary cirrhosis: model for decision making. *Hepatology* 1989; 10:1–7.
615. Hughes MD, Raskino CL, Pocock SJ, et al. Prediction of short-term survival with an application in primary biliary cirrhosis. *Stat Med* 1992; 11:1731–1745.
616. Fleming TR and DeMets DL. Surrogate end points in clinical trials: are we being misled? *Ann Intern Med* 1996; 125:605–613.
617. Simko V, Shoukry M, Prego V. Ursodeoxycholic therapy in chronic liver disease: a meta-analysis in primary billiard cirrhosis and in chronic heaptitis. *Am J Gastroenterol* 1994; 89:392–398.
618. Bonnard AM, Heathcote JE, Lindor K, et al. Clinical significance of serum bilirubin levels under ursodeoxycholic acid therapy in patients with primary billiary cirrhosis. *Hepatology* 1999; 29:39–43.
619. Parés A, Caballeria L, Rodes J, et al. Long-term effects of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a double-blind controlled multicentric trial. UDCA-Cooperative Group from the Spanish Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 2000; 32(4): 561-6.
620. Leuschner U, Fischer H, Kurtz W, et al. Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a controlled double-blind trial. *Gastroenterology* 1989; 97:1268–1274.

621. Poupon RE, Balkau B, Eschwège E, et al. A multicenter controlled trial of ursodeoxycholic acid for the treatment of primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 1991; 324:1548–1554.
622. Heathcote JE, Cauch-Dudek K, Walker V, et al. The Canadian multicenter double-blind randomised controlled trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1994; 19: 1149–1156.
623. Angulo P, Batts KP, Therneau TM, et al. Long-term ursodeoxycholic acid delays histological progression in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1999; 29: 644–647.
624. Degott C, Zafrani ES, Callard P, et al. Histopathological study of primary biliary cirrhosis and the effect of ursodexoycholic progression. *Hepatology* 1999; 29:1007–1012.
625. Leuschner U, Manns MP, Eisebitt R. Ursodeoxycholic acid in the therapy for primary biliary cirrhosis: effects on progression and prognosis. *Z Gastroenterol* 2005; 43:1051-1059.
626. Tromm A, May B, Klein CG, et al. Long-term response of primary biliary cirrhosis (stage I) to therapy with ursodeoxycholic acid. *Hepatogastroenterology* 2005; 52:753-756.
627. Loehe F, Schauer RJ. Surgical treatment of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005; 28: 167-174.
628. Duclos-Vallee JC. Recurrence of autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis after liver transplantation. *Acta Gastroenterol Belg* 2005; 68: 331-336.
629. Colombato LA, Alvarez F, Cote J, et al. Autoimmune cholangiopathy: the result of consecutive primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1994; 107:1839-1843.
630. Ari ZB, Mehta A, Lennard L et al. Azathioprine-induced myelosuppression due to thiopurine methyltransferase deficiency in a patient with autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1995; 23:351-354.
631. Anstey A, Lennard L, Mayou SC, et al. Pancytopenia related to azathioprine – an enzyme deficiency caused by a common genetic polymorphism: a review. *J R Soc Med* 1992; 85:752-756.

632. Schutz E, Gummert J, Mohr F, et al. Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant patient (letter). *Lancet* 1993; 341(8842): 436.
633. Finklestein M, Goldman L, Grace ND, et al. Granulocytopenia complicating colchicine therapy for primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1987; 93:1231-1235.
634. Trinchet JC, Lacombe C, Islam S, et al. Association of autoimmune chronic active hepatitis and acquired erythroblastopenia cured by cyclophosphamide. *Gastroenterol Clin Biol* 1986; 10:841-844.
635. Amakasu H, Kanno A, Abe M. Multiple myeloma occurring in early stage primary biliary cirrhosis. *Tohoku J Exp Med* 1993; 169:197-203.
636. Hernandez-Boluda JC, Jimenez M, Rosinol L, et al. Idiopathic myelofibrosis associated with primary biliary cirrhosis. *Leuk Lymphoma* 2002; 43:673-674.
637. Czaja AJ. *Therapy of autoimmune diseases: state of the art*. Boston: Kluwer Academic, 2000.
638. Tillmann HL, Jackel E, Manns MP. Liver transplantation in autoimmune liver disease: selection of patients. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 3053-3059.
639. Manns MP, Bahr MJ. Recurrent autoimmune hepatitis after liver transplantation: when non-self becomes self. *Hepatology* 2000; 32: 868-870.
640. Ramsfjell V, Bryder D, Bjorgvinsdottir H et al. Distinct requirements for optimal growth and in vitro expansion of human CD34+/CD38- long-term culture-initiating cells, extended LTC-IC, and murine in vivo long-term reconstituting stem cells. *Blood* 1999; 94: 4093-4102.
641. Gibson FM, Gordon-Smith EC. Long-term culture of aplastic anemia bone marrow. *Br J Hematol* 1990; 75: 421-427.
642. Issaad C, Croisille L, Katz A et al. A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34+/CD38- progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays. *Blood* 1993; 81: 2916-2924.
643. Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH et al. Functional characterization of individual human hemopoietic stem cells cultured at

- limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl acad Sci USA* 1990; 87: 3584-3588.
644. Weaver A, Ryder WDJ, Testa NG. Measurement of long-term culture initiating cells (LTC-ICs) using limiting dilution: comparison of endpoints and stromal support. *Exp Hematol* 1997; 25: 1333-1338.
645. March JC, Chang J, Testa NG et al. In vitro assessment of marrow 'stem cell' and stromal cell function in aplastic anemia. *Br J Hematol* 1991; 78: 258-267.
646. Borge OJ, Ramsfjell V, Cui L et al. Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34+/CD38- bone marrow cells with multilineage potential at single cell level: key role of thrombopoietin. *Blood* 1997; 90: 2282-2292.
647. Ramsfjell V, Borge OJ, Cui L et al. Thrombopoietin directly and potently stimulates multilineage growth and progenitor cell expansion from primitive CD34+/CD38- human bone marrow progenitor cells: distinct and key interactions with the ligand for c-kit and flt3, and inhibitory effects of TGF-beta and TNF-alpha. *J Immunol* 1997; 158: 5169-5177.
648. Philpott NJ, Turner AJ, Scopes J et al. The use of 7-amino-actinomycin D in identifying apoptosis: Simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood* 1996; 87: 2244-2251.
649. Panasiuk A, Prokopowicz D, Zak J et al. Reticulated platelets as a marker of megakaryopoiesis in liver cirrhosis; relation to thrombopoietin and hepatocyte growth factor serum concentration. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1124-8.
650. Fan X, Valdimarsdottir G, Larsson J et al. Transient disruption of autocrine TGF- $\beta$  signaling leads to enhanced survival and proliferation potential in single primitive human hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 2002; 168: 755-62.
651. Jongen-Lavrencic M, Peeters HR, Wognum A et al. Elevated levels of inflammatory cytokines in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis and anemia of chronic disease. *J Rheumatol* 1997; 24: 1504-9.
652. Young NS. Hematopoietic cell destruction by immune mechanisms in acquired aplastic anemia. *Semin Hematol* 2000; 37: 3-14.

653. Garcia Tello A, Villegas Martinez -A, Gonzalez Fernandez AF. Hematological abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Med Interna* 2002; 19: 539-543.
654. Wenzel J, Gerdson R, Uerlich M et al. Lymphocytopenia in lupus erythematosus: close in vivo association to autoantibodies targeting nuclear antigens. *Br J Dermatol* 2004; 150: 994-998.
655. Bowman SJ. Hematological manifestations of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2002; 31: 251-259.
656. Fujiwara N, Koba , Yashi K et al. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 281-6.
657. Douglas SD, Musson RA. Phagocytic defects-monocytes /macrophages. *Clin Immunol Immunopathol* 1986; 40: 62-8.
658. Gahler A, Cogliatti S, Korte W. Differential diagnosis of absolute lymphocytosis. *Ther Umsch* 2004; 61: 157-160.
659. Yamazaki K, Nakadate I, Suzuki K et al. Eosinophilia in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:516-522.
660. Tanretyanon T, Leighton JC. Severe anemia and marrow plasmacytosis as presentation of Sjogren's syndrome. *Am J Hematol* 2002; 69: 233.
661. Harada Y, Kawano MM, Huang N et al. Identification of early plasma cells in peripheral blood and their clinical significance. *Br J Haematol* 1996; 92: 184-191.
662. Kathol RC, Hamilton HE. Azathioprine-induced plasmacytosis. *JAMA* 1981; 246: 2193.
663. Tsuji H, Osato S, Nishimura Y et al. A case of autoimmune hepatitis associated with multiple myeloma demonstrating smooth muscle antibody activity in M component. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1987; 84: 113-7.
664. Lazzaro A, Bernuzzi P, Arcari A et al. A singular case of multiple myeloma and primary biliary cirrhosis strictly associated in pathogenesis and response to alkylating therapy. *Am J Haematol* 2006; 81: 557.

665. Akashi Y, Yoshizarra N, Kubota J et al. Primary biliary cirrhosis complicated with Sjogren syndrome and multiple myeloma. A case report. *Nephron* 1996; 73: 730-2.
666. Blade J, Montserrat E, Bruguera M et al. Multiple myeloma in primary biliary cirrhosis. *Scand J Haematol* 1981; 26: 14-8.
667. Tchienbou J, de Muret A, Dumont P et al. Hodgkin's disease during azathioprine therapy in a patient with autoimmune hepatitis. *Gastroenterol Clin Biol* 2004; 28: 316-8.
668. Sato S, Masuda T, Oikawa H et al. Primary hepatic lymphoma associated with primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1669-73.
669. Hahn JS, Kim C, Min YH et al. Non-Hodgkin's lymphoma and primary biliary cirrhosis with Sjogren's syndrome. *Yonsei Med J* 2001; 42: 258-63.
670. Panjala C, Talwalkar JA, Lindor KD et al. Risk of lymphoma in primary biliary cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 761-4.
671. Pal B. Systemic mastocytosis and Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 1183.
672. Inouke K, Yoshioka K, Kasamatsu Y et al. Bone marrow mast cell disease associated with Felty's syndrome and liver cirrhosis. *Am J Hematol* 1998; 59: 179.
673. Farrell DJ, Hines JE, Walls AF et al. Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. *Hepatology* 1995; 22: 1175.
674. Bertero MT, Caligaris-Cappio F. Anemia of chronic disorders in systemic autoimmune diseases. *Haematologica* 1997; 82: 375-381.
675. Loffeld RJ. Primary biliary cirrhosis associated with recurrent angiodysplastic lesions in the gastrointestinal tract, the lupus anticoagulant and eosinophilic colitis. *Neth J Med* 1991; 39: 101-4.
676. Volta U, Rodrigo L, Granito A et al. Celiac disease in autoimmune cholestatic liver disorders. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2609-13.
677. Niho Y, Asano Y. Fas/Fas-ligand and hematopoietic progenitor cells. *Curr Opin Hematol* 1998; 5: 163-165.
678. Keller JR, Ruscetti FW, Grzegorzewski KJ. Transforming growth factor- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  and macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  are

- bidirectional regulators of hematopoietic cell growth. In Garland JM, Quesenberry PJ, Hilton DJ (eds). *Colony-Stimulating-Factors. Molecular and Cellular Biology*. New York, NY: Marcel Dekker 1997; 445-466.
679. Jacobsen FW, Stokke T, Jacobsen SW. Transforming growth factor- $\beta$  potently inhibits the viability-promoting activity of stem cell factor and other cytokines and induces apoptosis of primitive murine hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995; 86: 2957-2966.
680. Hirohata S, Yanagida T, Koda M et al. Selective induction of IgM rheumatoid factors by CD14<sup>+</sup> monocyte-lineage cells generated from bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 384-388.
681. Hirohata S, Yanagida T, Itoh K et al. Accelerated generation of CD14<sup>+</sup> monocyte-lineage cells from the bone marrow of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 836-843.
682. Tomita T, Shimaoka Y, Kashiwagi N et al. Enhanced expression of CD14 antigen on myeloid lineage cells derived from the bone marrow of patients with severe rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1997; 24: 465-469.
683. Seitz M, Zwicker M, Pichler W et al. Activation and differentiation of myelomonocytic cells in rheumatoid arthritis and healthy individuals: evidence for antagonistic in vitro regulation by interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha, granulocyte-monocyte colony stimulating factor and interleukin 1. *J Rheumatol* 1992; 19: 1038-1044.
684. Pittoni V, Valesini G. The clearance of apoptotic cells: implications for autoimmunity. *Autoimm Reviews* 2002; 1: 154-161.
685. Neuman M, Angulo P, Malkiewicz I et al. Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta reflect severity of liver damage in primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 196-202.
686. Al-Wabel A, Al-Janadi M, Razziuddin S. Cytokine profile of viral and autoimmune chronic active hepatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 902-8.
687. Lohr HF, Schlaak JF, Gerken G et al. Phenotypical analysis and cytokine release of liver-infiltrating and peripheral blood T lymphocytes



- from patients with chronic hepatitis of different etiology. *Liver* 1994; 14: 161-6.
688. Bayer EM, Herr W, Kanzler S et al. Transforming growth factor beta 1 in autoimmune hepatitis: correlation of liver tissue expression and serum levels with disease activity. *J Hepatol* 1998; 28: 803-11.
689. Sawada K, Sato N, Koike T. Inhibition of GM-CSF production by recombinant human human interleukin-4; negative regulator of hematopoiesis. *Leuk Lymphoma* 1995; 19: 33-42.
690. So EY, Kim SH, Park HH et al. Corticosteroid inhibits IL-4 signaling through down-regulation of IL-4 receptor and STAT6 activity. *FEBS Lett* 2002; 518: 53-9.
691. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 2000; 47: 85-118.
692. Selleri C, Sato T, Anderson S et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha suppress early and late stages of hematopoiesis and induce programmed cell death. *J Cell Physiol* 1995; 165: 538-46.
693. Kato K, Kamezaki K, Shimoda K et al. Intracellular signal transduction of interferon on the suppression of hematopoietic progenitor cell growth. *Br J Hematol* 2003; 123: 528-35.
694. Dybedal I, Bryder D, Fossum A et al. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated activation of the p55 TNF receptor negatively regulates maintenance of cycling reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood* 2001; 98: 1782-91.
695. Deeg HJ, Beckham C, Loken MR et al. Negative regulators of hemopoiesis and stroma function in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* 2000; 37: 405-414.
696. Tsuji K, Muraoka K, Nakahata T et al. Interferon-gamma and human megakaryopoiesis. *Leuk Lymphoma*. 1998; 31: 107-113.
697. Sakito S, Ueki Y, Eguchi K et al. Serum cytokines in patients with rheumatoid arthritis. Correlation of interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha with the characteristics of peripheral blood mononuclear cells. *Rheumatol Int* 1995; 15: 31-37.
698. Ho AS, Wei SH, Mui AL et al. Functional regions of the mouse IL-10 receptor cytoplasmic domain. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 5043-53.

699. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765.
700. Weber-Nordt RM, Henschler R, Schott E et al. Interleukin-10 increases Bcl-2 expression and survival in primary human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996; 88: 2549-58.
701. Neuman MG, Angulo P, Katz G et al. Ursodeoxycholic acid inhibits signalling for apoptosis in patients with primary biliary cirrhosis and primary sclerosis cholangitis. Falk Symposium No 142, Autoimmune Liver Disease, October 12-13, 2004, Freiburg, Germany 2004 (Abstract book No.67).