



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



Παθολογική Κλινική και Ομώνυμο Ερευνητικό Εργαστήριο
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Διευθυντής: Καθηγητής ΓΕΩΡΓΙΟΣ Ν. ΝΤΑΛΕΚΟΣ

Διδακτορική Διατριβή

**«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ
ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ α-ΑΚΤΙΝΙΝΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ
ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΗΠΑΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ»**

ΚΑΤΕΡΙΝΑ Γ. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ

Ειδικευόμενη Ιατρός Παθολογίας

Λάρισα, 2014

© 2014 Κατερίνα Οικονόμου

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

**Γεώργιος Ν. Νταλέκος, Καθηγητής Παθολογίας Π.Θ.
(Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Επιβλέπων)**

Ειρήνη Ι. Ρηγοπούλου, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογίας Π.Θ.

Δημήτριος Π. Μπόγδανος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Π.Θ.

Γεώργιος Κουκούλης, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Π.Θ.

Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας Π.Θ.

**Ματθαίος Σπελέτας, Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής
Ανοσολογίας Π.Θ.**

Καλλιόπη Ζάχου, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογίας Π.Θ.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση της διατριβής υπήρξε πολύτιμη η βοήθεια από πολλούς στους οποίους εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες.

Η έρευνα αυτή δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την ουσιαστική συμβολή του Καθηγητή Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γεώργιου Ν. Νταλέκου, ο οποίος με περιέβαλε με την εμπιστοσύνη του και με ενέταξε στο ερευνητικό έργο της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τον ευχαριστώ θερμά για την εξαιρετική καθοδήγηση και στήριξή του. Τον ευχαριστώ επιπλέον για όλες τις ευκαιρίες μάθησης, εκπαίδευσης και μύησης στα πεδία της κλινικής ιατρικής και ιατρικής έρευνας που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια που είχα το προνόμιο να είμαι υπό την επίβλεψή του.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Παθολογίας κ. Ειρήνη Ι. Ρηγοπούλου και τον Επίκουρο Καθηγητή Παθολογίας κ. Δημήτριο Π. Μπόγδανο για τη γενικότερη συνδρομή τους, τις άοκνες προσπάθειες, τη συμπαράστασή τους και τις καίριες και γεμάτες οξυδέρκεια υποδείξεις τους στην τελική διαμόρφωση της εργασίας αυτής.

Για την ολοκλήρωσή της παρούσης διατριβής, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Επίκουρο Καθηγήτρια Παθολογίας κ. Καλλιόπη Ζάχου για τη στενή, έμπειρη, υπεύθυνη παρακολούθηση και καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά της σε όλα τα στάδια της έρευνας, από το σχεδιασμό των πειραμάτων ως τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Οφείλω επίσης μεγάλη ευγνωμοσύνη σε όλους τους συνεργάτες της Παθολογικής Κλινικής Π.Θ. και του Ομώνυμου Ερευνητικού Εργαστηρίου και ιδιαίτερα στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Ηλία Σπύρου για την εκμάθηση και επιτέλεση διαφόρων τεχνικών, στους ασθενείς και στους συνεργάτες του Ηπατολογικού Ιατρείου Παθολογικής Κλινικής Π.Θ. για τη συλλογή των δειγμάτων και την ακριβή καταγραφή των δεδομένων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και να αφιερώσω το παρόν σύγγραμμα στο σύζυγό μου και στην οικογένειά μου για την ηθική τους συμπαράσταση και αμέριστη υποστήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

Κατερίνα Οικονόμου

«Η πιο όμορφη θάλασσα είναι αυτή που δεν έχουμε ακόμα ταξιδέψει»

(Ναζίμ Χικμέτ)

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα : Οικονόμου Κατερίνα

Διεύθυνση : Θεοτοκοπούλου 15, 41221, Λάρισα

Τηλέφωνο : 2410550159, 6945998739

Υπηκοότητα : Ελληνική

Ημερομηνία Γέννησης : 21/02/1985

Τόπος Γέννησης : Λάρισα

Οικογενειακή κατάσταση : Έγγαμη

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Μάρτιος 2009-Σήμερα

Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τίτλο «Ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης και κλινική σημασία αντισωμάτων κατά α-ακτινίνης σε ασθενείς με αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα». Ως μέρος της διδακτορικής διατριβής περιλαμβάνονταν και η ανάπτυξη νέων μεθόδων ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων για τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (*in-house* ELISA, *in-house* Western Blot, *in-house* Line Immunoassays), οι οποίες χρησιμοποιούνται πλέον στις διαγνωστικές υπηρεσίες του Ερευνητικού Εργαστηρίου της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δεκέμβριος 2008-Σήμερα

Ερευνητικό Εργαστήριο Παθολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Οκτώβριος 2008

Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας,

Βαθμός Πτυχίου : 7,99 / 10 Λίαν Καλώς

2002-2008

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Οκτώβριος 2002

Εισαγωγή στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

1999-2002

Ελληνικό Λύκειο Bielefeld Γερμανίας

Βαθμός Απολυτηρίου: 20/20

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ-ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑΙανουάριος 2012-Σήμερα

Ειδικευόμενη Ιατρός στην Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας-Εκπαίδευση σε βάθος σε όλα τα νοσήματα της Εσωτερικής Παθολογίας (διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση) και στις επεμβατικές τεχνικές (παρακέντηση πλευριτικής και ασπιτικής συλλογής, ΟΝΠ, οστεομυελική βιοψία-μυελόγραμμα, τοποθέτηση κεντρικών φλεβικών γραμμών, κλπ).

Ιούνιος 2011-Ιανουάριος 2012

Εκπλήρωση υπηρεσίας υπαίθρου: Αγροτική ιατρός στο Κέντρο Υγείας Ελασσόνας, συμμετέχοντας στο πρόγραμμα εφημεριών στο Κέντρο Υγείας αυτό και παράλληλα στο πρόγραμμα των εφημεριών στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (Γ.Ν.Λ.), με εντολή της Ιατρικής Υπηρεσίας του Γ.Ν.Λ.-Εκπαίδευση στην Εντατική Ιατρική (ενδεικτικά στην παρακολούθηση του αιμοδυναμικού προφίλ των ασθενών, στις διαταραχές της οξεοβασικής ισορροπίας, στις αρχές του μηχανικού αερισμού και στις αρχές θεραπείας λοιμώξεων)

Δεκέμβριος 2010-Μάιος 2011

Συμμετοχή στις κλινικές δραστηριότητες της Παθολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δεκέμβριος 2008-Ιούλιος 2010

Συμμετοχή στις εργασίες του Εξωτερικού Ηπατολογικού Ιατρείου της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως άμισθη εκπαιδευόμενη ιατρός

ΑΡΘΡΑ/ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Saratziotis A, Karakousis K, Tzika K, Oikonomou KG, Vlachostergios P.J. Hashimoto's thyroiditis and Kikuchi's disease: Presentation of a case and review of the literature. Case Rep Otolaryngol 2012; 2012: 267595.
- Zachou K*, Oikonomou K*, Renaudineau Y, Chauveau A, Gatselis N, Youinou P, Dalekos GN. Anti- α -actinin antibodies as new predictors of response to

treatment in autoimmune hepatitis type 1. Aliment Pharmacol Ther 2012; 35: 116-125.

*These authors contributed equally

- Oikonomou KG, Zachou K, Dalekos GN. Alpha-actinin: a multidisciplinary protein with important role in B-cell driven autoimmunity. Autoimmun Rev 2011; 10: 389-396.
- Dailiana HZ, Kotsaki D, Varitimidis S, Moka S, Bakarozi M, Oikonomou K, Malizos NK. Injection Injuries: Seemingly minor injuries with major consequences. Hippokratia 2008; 12: 33-36.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

- Παρουσίαση ενδιαφέρουσας περίπτωσης ασθενούς – Άνδρας 36 ετών με εμπύρετο, κεφαλαλγία και μακροσκοπική αιματουρία από τριημέρου, 5^ο Ετήσιο Μετεκπαιδευτικό πρόγραμμα Παθολογικής Κλινικής Π.Θ. και Ομώνυμου Ερευνητικού Εργαστηρίου, Ακ. Έτος 2012-2013
- Βιβλιογραφική Ενημέρωση Μετεκπαιδευτικού Προγράμματος Παθολογικής Κλινικής Π.Θ. και Ομώνυμου Ερευνητικού Εργαστηρίου, Ακ. Έτος 2012-2013, τίτλος άρθρου “Prevention of HIV-Infection with early antiretroviral treatment”, New England Journal of Medicine
- Κ. Οικονόμου, Ε. Μανουλάκας, Μ. Μπούλμπου, Ε. Ρηγοπούλου, Γ.Ν. Νταλέκος, Γυναίκα 43 ετών με αλκοολική ηπατοπάθεια και αυτοάνοση ηπατίτιδα, **Αναρτημένη ανακοίνωση**, 5^ο Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος, 28-30 Μαρτίου 2013 Λάρισα, Ελλάδα

- Σ.Β. Βαλαής, Θ. Νικολοπούλου, Σ. Μανουλάκας, Κ. Οικονόμου, Σ. Γεωργιάδου, Α. Στέφος, Σ. Σκρίμπας, Κ. Ζάχου, Α. Πολύζος, Κ.Π. Μακαρίτσης, Μ. Μπούλμπου, Ν. Γατσέλης, Ε. Πετεινάκη, Γ.Ν. Νταλέκος, Βρουκέλλωση: η εμπειρία της Παθολογικής Κλινικής και του Ομώνυμου Ερευνητικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, **Προφορική ανακοίνωση**, 5^ο Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος, 28-30 Μαρτίου 2013, Λάρισα, Ελλάδα
- Μ. Μπακαρόζη, Σ. Γεωργιάδου, Α. Βελεγράκη, Σ. Ξύτσας, Κ. Πολύζος, Σ. Βαλαής, Π. Σκούρα, Ε. Μανουλάκας, Κ. Οικονόμου, Α. Τσικρίκας, Γ.Ν. Νταλέκος, Ε. Πετεινάκη, Επιδημία λοίμωξης από *Fusarium* σε μη ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς Παθολογικής Κλινικής, **Προφορική ανακοίνωση**, 5^ο Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος, 28-30 Μαρτίου 2013, Λάρισα, Ελλάδα
- Κ. Ζάχου, Σ. Γκαμπέτα, Ν. Γατσέλης, Κ. Οικονόμου, Ε. Εξάρχου, Γ.Ν. Νταλέκος, Κλινική σημασία SLA/LPαντισωμάτων στην αυτοάνοση ηπατίτιδα: απουσία συσχέτισης με δυσμενέστερη πρόγνωση, **Προφορική ανακοίνωση**, 4^ο Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος, 29-31 Μαρτίου 2012, Λάρισα, Ελλάδα
- Μ. Mytilinaïou, L. Komorowski, Κ. Οικονόμου, C. Probst, D. Vergani, DP Bogdanos, Fine specificity of anti-soluble liver antigen autoantibodies raised in rabbits, **Αναρτημένη ανακοίνωση**, Autoimmunity Congress, May 5-9, 2010, Ljubljana, Slovenia
- Κ. Οικονόμου, Η. Σπύρου, Γεωργία Χαχάμη, Ε.Ι. Ρηγοπούλου, Δ.Π. Μπόγδανος, Γ.Ν. Νταλέκος. Ανάπτυξη *in house* μεθόδου ανοσοαποτύπωσης

σε εκχύλισμα κυττάρων Huh7 για την ανίχνευση anti-SLA αντισωμάτων,
Αναρτημένη ανακοίνωση, 2^ο Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος,
Λάρισα, 5-9 Μαΐου, 2009

- Κ.Οικονόμου, Κ.Μαρκοπούλου. «Η συνεισφορά γενετικών παραγόντων στην παθογένεση της Νόσου Parkinson», **Προφορική ανακοίνωση**, 13^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, 20-22 Απριλίου 2007, Αθήνα
- Σ.Μόκα, Κ.Οικονόμου, Μ.Μπακαρόζη, Ζ.Νταϊλιάνα, Κ.Μαλίζος. «Τραυματισμοί άνω άκρου από έγχυση τοξικών ουσιών (Injection Injuries)», **Προφορική ανακοίνωση**, 12^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, 5-7 Μαΐου 2006, Λάρισα

ΒΡΑΒΕΙΑ- ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ- ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- Υπότροφος του ιδρύματος «Α.Γ. Λεβέντης» κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής
- Βραβείο για την Εργασία «Τραυματισμοί άνω άκρου από έγχυση τοξικών ουσιών (Injection Injuries)» στα πλαίσια του 12^ο Επιστημονικού Συνεδρίου Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, 5-7 Μαΐου 2006, Ξενοδοχείο Imperial, Λάρισα
- Πρωτεύσασα σε βαθμολογία στο τέταρτο έτος σπουδών, ακαδημαϊκό έτος 2005-2006 - Υποτροφία και βραβείο για άριστη επίδοση από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.)
- Πρωτεύσασα σε βαθμολογία μεταξύ όλων των υποψηφίων, όλων των σχολών, όλων των κατηγοριών στις Εισαγωγικές Εξετάσεις Ελλήνων του Εξωτερικού, Σεπτέμβριος 2002 (Βαθμολογία 97,3/100)

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ/ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

28-30/03/2013 5^ο Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος, Λάρισα, Ελλάδα

14-15/09/2012 Φθινοπωρινές Ημέρες Παθολογίας «Παθήσεις Αναπνευστικού», Καλαμπάκα Τρικάλων, Ελλάδα

29-31/03//2012 4^ο Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος, Λάρισα, Ελλάδα (15 μόρια συνεχιζόμενης ιατρικής εκπαίδευσης)

23/05/2012 Ημερίδα με θέμα «Πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία της ελονοσίας». Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, ΚΕΛΠΝΟ και Τμήμα Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα

9-11/9/2011 4^ο Συνέδριο Ογκολογίας Κεντρικής Ελλάδας, Διοργάνωση Ογκολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα

23-24/9/2011 Διημερίδα «Αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια: και μετά τι;», Διοργάνωση Παθολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λίμνη Πλαστήρα, Καρδίτσα

15-16/4/2011 4^ο Μετεκπαιδευτικό σεμινάριο λοιμώξεων με θέμα «Λοιμώξεις και αντιμικροβιακή θεραπεία στην πρωτοβάθμια περίθαλψη, Διοργάνωση Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, ΚΕΛΠΝΟ, ΕΟΦ, European Centre for disease and prevention control, Λάρισα, Ελλάδα (15 μόρια συνεχιζόμενης Ιατρικής εκπαίδευσης)

10-12/3/2011 3^ο Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος, Διοργάνωση της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα (15 μόρια συνεχιζόμενης Ιατρικής εκπαίδευσης)

18-20/3/2010 2^ο Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος, Διοργάνωση της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα

4-6/12/2009 Διεθνές συμπόσιο με θέμα «Πρωτοπαθείς ανεπάρκειες και παιδιατρική ανοσολογία, Διοργάνωση Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας και Παιδιατρικής Κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Αμφιθέατρο Ιπποκράτης, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (12 μόρια συνεχιζόμενης Ιατρικής εκπαίδευσης), Λάρισα, Ελλάδα

15-17/5/2009 Πανελλήνιο Συνέδριο Θαλασσαιμίας, Διοργάνωση της Ελληνικής Ομοσπονδίας Θαλασσαιμίας (Ε.Ο.ΘΑ.), Λάρισα, Ελλάδα (11 μόρια Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης)

19-21/3/2009 Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος, Διοργάνωση της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα (14 μόρια Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης)

17-18/10/2008 Συνέδριο με θέμα: «Διαταραχές Οξεοβασικής Ισορροπίας και Ηλεκτρολυτών», Συνδιοργάνωση της Παθολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Β' Παθολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Λάρισα, Ελλάδα (6 μόρια Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης)

14-15/12/2007 5^ο ετήσιο Σεμινάριο του Τμήματος Έρευνας της Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργικής Ορθοπαιδικής και Τραυματιολογίας, Διοργάνωση της Ορθοπαιδικής Κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Αμφιθέατρο Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, Λάρισα, Ελλάδα

13/12/2007 Ημερίδα με θέμα: «Η απόκτηση Ειδικότητας σε Χώρες του Εξωτερικού- Επαγγελματικές Προοπτικές Αποφοίτων Τμήματος Ιατρικής»,

Διοργάνωση του Γραφείου Διασύνδεσης Πανεπιστημίου Θεσσαλίας,
Αμφιθέατρο Ιατρικής Σχολής, Λάρισα, Ελλάδα

10-11/11/2007 Συμπόσιο με θέμα: «Προγεννητικός Έλεγχος», Διοργάνωση
της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας,
Αμφιθέατρο Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, Λάρισα, Ελλάδα

20-22/4/2007 13^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος και 1^ο
Διεθνές Forum Φοιτητών Ιατρικής & Νέων Ιατρών Ελλάδος, Διοργάνωση της
Επιστημονικής Εταιρείας Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος , Αθήνα, Ελλάδα

25-26/11/2006 6^η Δημερίδα Κοινωνικής Παιδιατρικής, Διοργάνωση της
Ελληνικής Εταιρείας Κοινωνικής Παιδιατρικής & Προαγωγής της Υγείας,
Αμφιθέατρο Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, Λάρισα, Ελλάδα (4
μόρια Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης)

5-7/5/2006 12^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος,
Διοργάνωση της Επιστημονικής Εταιρείας Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος ,
Λάρισα, Ελλάδα

25-26/11/2005 Χειρουργικό Συμπόσιο Κεντρικής Ελλάδας, Συνδιοργάνωση
Ελληνικής Χειρουργικής Εταιρείας και Χειρουργικής Κλινικής Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα

3-4/12/2004 Συνέδριο με θέμα : «Κοινωνική Διαχείριση του Θανάτου»,
Συνδιοργάνωση Ιατροδικαστικής Υπηρεσίας Λάρισας και Ιατροδικαστικής
Υπηρεσίας Θεσσαλονίκης, Χατζηγιάννειο Πνευματικό Κέντρο Λάρισας,
Λάρισα, Ελλάδα

14-16/5/2004 12^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, Διοργάνωση της Επιστημονικής Εταιρείας Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος Συνεδριακό Κέντρο Ι.Βελλίδης, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

27-30/11/2003 Διεθνές Συμπόσιο για την Πρόληψη και Αντιμετώπιση των Αθλητικών Κακώσεων, Διοργάνωση της Ορθοπαιδικής Κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Αμφιθέατρο Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, Λάρισα, Ελλάδα

27/2-2/3/2003 First International Symposium on “Integrated Research Approaches For Clinical Applications And Practices”, Διοργάνωση της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Αμφιθέατρο Ιατρικής Σχολής, Λάρισα, Ελλάδα

14-16/11/2002 12^ο Διαπανεπιστημιακό Συνέδριο Ακτινολογίας, Διοργάνωση του Εργαστηρίου Ακτινολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Αμφιθέατρο Ιατρικής Σχολής, Λάρισα, Ελλάδα

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ-ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Ιανουάριος 2014
ECFMG Certificate

Ιούνιος 2012 & Νοέμβριος 2013

United States Medical Licensing Examination (USMLE) Step 2 CK & CS

Educational Commission for Foreign Medical Graduates (ECFMG)

Ιανουάριος 2012

United States Medical Licensing Examination (USMLE) Step 1

Educational Commission for Foreign Medical Graduates (ECFMG)

Ιανουάριος 2012

Παρακολούθηση και επιτυχής εξέταση του ALS Course (Advanced Life Support Course), Διοργάνωση από το European Resuscitation Council (ERC) και την Αναισθησιολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μάϊος 2011

Παρακολούθηση και επιτυχής εξέταση του BLS Course (Basic Life Support Course), Διοργάνωση από το European Resuscitation Council (ERC)

Ιανουάριος 2011

Παρακολούθηση και επιτυχής εξέταση του ATLS Course (Advanced Trauma Life Support Course), Διοργάνωση από το Ελληνικό Τμήμα του Αμερικανικού Κολεγίου Χειρουργών και τη Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Οκτώβριος 2008-Σήμερα

Παρακολούθηση του πρώτου, δεύτερου, τρίτου και τέταρτου κύκλου των μετεκπαιδευτικών μαθημάτων της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΛΟΙΠΑ ΚΑΘΗΚΟΝΤΑ

- Κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής, στα καθήκοντά μου περιλαμβάνονταν επίσης η κωδικοποίηση και διαγνωστική εξέταση

δειγμάτων ασθενών με τις τεχνικές της ELISA και Western Blot για την ανίχνευση αντισωμάτων σχετιζόμενων με τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος.

- Ελεγκτής Ιατρός ΟΓΑ από τον Ιούλιο 2011 έως τον Ιανουάριο 2012
- Ελεγκτής Ιατρός ΟΠΑΔ από τον Ιούλιο 2011 έως τον Ιανουάριο 2012
- Υπεύθυνη συντονισμού και υπεύθυνη εφημεριών των ιατρών υπόχρεων υπηρεσίας υπαίθρου, τόσο στην τρίμηνη άσκηση, όσο και στο Κέντρο Υγείας Ελασσόνας από τον Ιούνιο 2011 έως τον Ιανουάριο 2012

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Εκπαιδύτρια στο ΙΕΚ ΕΚΑΒ για το Α' Ταχύρρυθμο εξάμηνο, Οκτώβριος 2011-Ιανουάριος 2012 για τα μαθήματα :

- Στοιχεία ανατομικής και τοπογραφικής ανατομικής του ανθρώπινου σώματος, Στοιχεία φυσιολογίας
- Το φάσμα των συνηθέστερων επειγόντων περιστατικών, Στοιχεία μικροβιολογίας-Λοιμώξεις

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλική : Άριστο επίπεδο, πτυχίο: Certificate of Proficiency in English, University of Cambridge (Δεκέμβριος 1999)

Γερμανική : Άριστο Επίπεδο, πτυχίο :Kleines Deutsches Sprachdiplom, Goethe Institut, Ludwig-Maximilians-Universität Muenchen (Νοέμβριος 2001)

ΑΛΛΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Γνώσεις Η/Υ : European Computer Driving Licence, ECDL Core Certificate (Σεπτέμβριος 2005)

ΕΙΔΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Άριστη γνώση των τεχνικών του εμμέσου ανοσοφθορισμού, ανοσοαποτύπωσης (Western Blot), ELISA, γραμμικής ανοσοαποτύπωσης (Line Immunoassays), κυτταροκαλλιιεργειών, απομόνωσης μονοπυρήνων κυττάρων περιφερικού αίματος (Peripheral Blood mononuclear Cells Isolation-PBMCs Isolation)

**«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ
ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ Α-ΑΚΤΙΝΙΝΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ
ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΗΠΑΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ»**

ΚΑΤΕΡΙΝΑ ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Γεώργιος Ν. Νταλέκος, Καθηγητής Παθολογίας Π.Θ.
(Επιβλέπων)**

Ειρήνη Ι. Ρηγοπούλου, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογίας Π.Θ.

Δημήτριος Π. Μπόγδανος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Π.Θ.

Πίνακας Περιεχομένων

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ	26
ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ.....	26
ΦΥΣΙΚΗ Ή ΑΡΧΕΓΟΝΗ ΑΝΟΣΙΑ.....	28
ΕΙΔΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ.....	40
ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ (ΜΗΣ).....	52
ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ.....	55
ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΟΧΗ.....	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΗΠΑΤΟΣ	65
ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ.....	65
ΗΠΑΡ ΚΑΙ ΑΡΧΕΓΟΝΗ ΑΝΟΣΙΑ.....	65
ΗΠΑΡ ΚΑΙ ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ.....	69
ΑΝΤΙΓΟΝΟΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΣΤΟ ΗΠΑΡ.....	71
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΙΝΩΣΗΣ ΣΤΟ ΗΠΑΡ.....	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ/ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ	80
ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ/ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ.....	80
ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ.....	80

ΑΝΟΣΟΔΙΑΧΥΣΗ.....	81
ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (WESTERN BLOT).....	82
ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ (ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSAY, ELISA).....	82
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ.....	85
ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ.....	85
ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ (ΑΗ).....	85
ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	86
ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΑΗ.....	87
ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΗ.....	103
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΗ.....	106
ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΑΗ.....	106
ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΑΗ.....	108
ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ (ΠΧΚ).....	111
ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΧΚ.....	111
ΣΥΝΥΠΑΡΧΟΝΤΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	114
ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ.....	114
ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΠΧΚ.....	115
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΧΚ.....	120
ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΠΧΚ.....	121

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΠΧΚ.....	122
ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΧΚ.....	122
ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΤΙΚΗ ΧΟΛΑΓΓΕΙΤΙΔΑ (ΠΣΧ).....	123
ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΣΧ.....	124
ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΠΣΧ.....	125
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΣΧ.....	126
ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΠΣΧ.....	127
ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΣΧ.....	129
ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΕΠΙΚΑΛΥΨΗΣ (OVERLAP SYNDROMES).....	130
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 α-ΑΚΤΙΝΙΝΗ.....	132
α-ΑΚΤΙΝΙΝΗ.....	132
ΔΟΜΗ ΤΗΣ α-ΑΚΤΙΝΙΝΗΣ.....	133
Ο ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ α-ΑΚΤΙΝΙΝΗΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	135
Η α-ΑΚΤΙΝΙΝΗ ΩΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟ-ΣΤΟΧΟΣ ΣΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	143
α-ΑΚΤΙΝΙΝΗ ΚΑΙ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ (ΑΗ).....	147
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	150

ΜΕΡΟΣ Α ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ.....	151
ΜΕΡΟΣ Β ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ α- ΑΚΤΙΝΙΝΗΣ.....	166
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	179
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	191
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	194
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	196
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	235

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ

Το ανοσολογικό σύστημα αποτελεί ένα σύνολο κυττάρων και μορίων με εξειδικευμένους ρόλους στην άμυνα του οργανισμού εναντίον οποιουδήποτε «εισβολέα». Χαρακτηριστικά του ανοσολογικού συστήματος είναι η δυνατότητά του να αναγνωρίζει μια μεγάλη ποικιλία παθογόνων μικροοργανισμών, όπως επίσης και η δυνατότητά του να διακρίνει τα «ξένα» στοιχεία από τα στοιχεία του ίδιου του οργανισμού. Υπάρχουν δύο βασικές λειτουργίες του ανοσολογικού συστήματος: η αναγνώριση και η απάντηση (1, 2). Εκτός από την προστασία κατά λοιμογόνων παραγόντων, κύριοι στόχοι του ανοσολογικού συστήματος είναι επιπλέον η αντίδραση κατά ενδογενών παραγόντων, όπως για παράδειγμα παραγόντων που σχετίζονται με ιστική καταστροφή ή καταστροφή νεοπλασματικών κυττάρων (3).

Οι ανοσολογικοί μηχανισμοί άμυνας διαιρούνται σε δύο κατηγορίες: τους μη ειδικούς και τους ειδικούς μηχανισμούς, οι οποίοι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Οι μη ειδικοί μηχανισμοί άμυνας που αποτελούν το σύστημα της φυσικής ή αρχέγονης ανοσίας (innate immunity) χαρακτηρίζονται από αμεσότητα δράσης, μη ειδική αναγνώριση παθογόνων που εισβάλλουν στον οργανισμό και έλλειψη ανοσολογικής μνήμης (2, 4). Η αρχέγονη ανοσία, αν και γενικά θεωρείται μη ειδική, έχει αρκετή ειδικότητα στο να διακρίνει λοιμώδεις από μη λοιμώδεις παράγοντες (5). Αντίθετα, οι ειδικοί ανοσολογικοί

μηχανισμοί άμυνας που ονομάζονται και επίκτητη ή προσαρμοστική ανοσία (adaptive immunity), χαρακτηρίζονται από την ειδική αναγνώριση των παθογόνων-εισβολέων, καθώς και από ανοσολογική μνήμη. Οι δύο αυτοί μηχανισμοί λειτουργούν αλληλοδιαδόχως (6). Τα συστήματα της φυσικής ανοσίας παρέχουν κατευθύνσεις τις οποίες χρησιμοποιούν οι μηχανισμοί της επίκτητης ανοσίας για αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των εισβολέων (7, 8).

Φυσική ή αρχέγονη ανοσία	Επίκτητη ανοσία
Μη ειδικοί μηχανισμοί άμυνας	Ειδικοί μηχανισμοί άμυνας
Μη ειδική αναγνώριση παθογόνων	Ειδική αναγνώριση παθογόνων
Έλλειψη ανοσολογικής μνήμης	Ανοσολογική μνήμη

Πίνακας 1 : Διαφορές φυσικής και επίκτητης ανοσίας

ΦΥΣΙΚΗ ή ΑΡΧΕΓΟΝΗ ΑΝΟΣΙΑ

Κύτταρα της αρχέγονης ανοσίας

Οι βασικές λειτουργίες των κυττάρων της αρχέγονης ανοσίας είναι η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων, η φαγοκυττάρωση και η παραγωγή διαφόρων ανοσοδραστικών μορίων.

Μονοπύρηννα φαγοκύτταρα/μακροφάγα

Το σύστημα των μονοπυρήνων φαγοκυττάρων αποτελείται από τα μονοκύτταρα και από τα μακροφάγα. Τα μονοκύτταρα κυκλοφορούν στο αίμα και κατόπιν μεταναστεύουν στους ιστούς, όπου διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Κύτταρα προσομοιάζοντα στα μακροφάγα ανευρίσκονται σε διάφορους ιστούς, όπως για παράδειγμα τα κυψελιδικά μακροφάγα στους πνεύμονες, τα ιστιοκύτταρα στο συνδετικό ιστό, τα κύτταρα Kupffer στο ήπαρ, τα μεσαγγειακά κύτταρα στο νεφρό, τα κύτταρα της μικρογλοίας στον εγκέφαλο και οι οστεοκλάστες στα οστά. Η ικανότητα των μακροφάγων να φαγοκυτταρώνουν μικρόβια και μακρομόρια καθιστά αυτό τον πληθυσμό τον κυριότερο κυτταρικό μεσολαβητή της φυσικής ανοσίας. Τα μακροφάγα μπορούν να ενεργοποιηθούν από τη φαγοκυττάρωση συγκεκριμένων αντιγόνων, από κυτταροκίνες εκκρινόμενες από τα βοηθητικά T-κύτταρα, από διαμεσολαβητές της φλεγμονής και από στοιχεία του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (9). Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα είναι αποτελεσματικότερα στην εξάλειψη παθογόνων, δεδομένου ότι εμφανίζουν μεγαλύτερη

φαγοκυτταρική δραστηριότητα, αυξημένη ικανότητα καταστροφής των φαγοκυτταροθέντων μικροοργανισμών, αυξημένη ικανότητα έκκρισης διαμεσολαβητών φλεγμονής και αυξημένη ικανότητα ενεργοποίησης Τ-λεμφοκυττάρων (10).

Κοκκιοκύτταρα

Τα κοκκιοκύτταρα διακρίνονται σε ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα, ανάλογα με τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Τα **ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα** ή αλλιώς **πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα** παράγονται στο μυελό των οστών και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία. Ένα σύνολο στοιχείων της φλεγμονώδους αντίδρασης, όπως ορισμένα στοιχεία του συμπληρώματος, στοιχεία του πηκτικού μηχανισμού και κυτταροκίνες που εκκρίνονται από ενεργοποιημένα Τη κύτταρα και μακροφάγα λειτουργούν ως χημειοτακτικοί παράγοντες και οδηγούν στη συσσώρευση των ουδετεροφίλων στο σημείο της φλεγμονής. Όπως και τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα επιτελούν σημαντικό ρόλο στη φαγοκυττάρωση και στην καταστροφή των μικροοργανισμών (11). Τα ειδικά κυτταροπλασματικά τους κοκκία συμβάλλουν στη λύση των μικροοργανισμών. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: α) Αζουρόφιλα κοκκία που περιέχουν μυελοϋπεροξειδάση, ντιφενσίνες, πρωτεΐνες που αυξάνουν τη βακτηριακή διαπερατότητα και καθεψίνη G, β) Κοκκία που περιέχουν λακτοφερρίνη, λυσοζύμη, αλκαλική φωσφατάση (8, 12-14).

Τα **ηωσινόφιλα**, όπως και τα ουδετερόφιλα, διαθέτουν φαγοκυτταρική ικανότητα. Φέρουν στην επιφάνειά τους υποδοχείς για την IgE ανοσοσφαιρίνη, για το λόγο αυτό είναι ιδιαίτερα δραστικά έναντι αντιγόνων που επάγουν την παραγωγή IgE αντισωμάτων. Σημαντικός είναι ο ρόλος των ηωσινοφίλων στην άμυνα του οργανισμού έναντι των παρασιτικών λοιμώξεων (8, 10, 14).

Τα **βασεόφιλα** δεν έχουν φαγοκυτταρική ικανότητα. Εκφράζουν υποδοχείς IgE ανοσοσφαιρίνης με αποτέλεσμα να συνδέονται ισχυρά με τα IgE αντισώματα. Έτσι, η αλληλεπίδραση των αντιγόνων με IgE αντισώματα διεγείρει τα βασεόφιλα προς παραγωγή δραστικών μεσολαβητών της άμεσης υπερευαισθησίας (8, 10).

Τα **σιτευτικά κύτταρα** προέρχονται από το μυελό των οστών. Τα προγονικά σιτευτικά κύτταρα που παράγονται στο μυελό των οστών απελευθερώνονται στην κυκλοφορία ως αδιαφοροποίητα κύτταρα και δε διαφοροποιούνται παρά μόνο ύστερα από τη μετανάστευσή τους στους ιστούς. Τα κοκκία τους περιέχουν ισταμίνη και άλλες δραστικές ουσίες, οι οποίες αποτελούν μεσολαβητές της αλλεργικής αντίδρασης, ενώ θεωρείται ότι συμμετέχουν και στην απάντηση εναντίον παρασίτων (8, 10, 15).

Τα **δενδριτικά κύτταρα** έλαβαν την ονομασία τους από τις χαρακτηριστικές μακριές μεμβρανικές απολήξεις τους. Έχουν ως κύρια λειτουργία τους την αντιγονοπαρουσίαση. Τα δενδριτικά κύτταρα εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα μόρια τάξης II του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (MHC) και B7 συνδιεγερτικά μόρια. Στα μη λεμφικά δενδριτικά κύτταρα

περιλαμβάνονται τα κύτταρα Langerhans της επιδερμίδας και τα διάμεσα δενδριτικά κύτταρα των διαφόρων οργάνων, όπως η καρδιά, οι πνεύμονες, οι νεφροί, ο γαστρεντερικός σωλήνας. Τα δενδριτικά κύτταρα των βλαστικών κέντρων βρίσκονται στα βλαστικά κέντρα των λεμφαδένων, στο σπλήνα και στους βλεννογονικούς λεμφικούς ιστούς (mucosa associated lymphoma tissues-MALT). Τα κύτταρα αυτά δεν εκφράζουν μόρια τάξης II του MHC, αλλά υψηλά επίπεδα μεμβρανικών υποδοχέων για ανοσοσφαιρίνες, κατακρατώντας τα ανοσοσυμπλέγματα και παρουσιάζοντας το αντιγόνο στα B-λεμφοκύτταρα για μακρά χρονικά διαστήματα, προάγοντας έτσι τη διαφοροποίηση των τελευταίων προς κύτταρα μνήμης (10, 16-18).

Τα **NK-κύτταρα ή φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα ή κύτταρα φυσικοί φονείς** επιτελούν σημαντικό ρόλο στην καταστροφή καρκινικών κυττάρων, στην καταστροφή κυττάρων μολυσμένων από ιούς και ενδοκυττάρους μικροοργανισμούς (π.χ. μυκοβακτηρίδια, *Listeria monocytogenes*) (10, 19-21). Τα NK-κύτταρα δεν εκφράζουν επιφανειακούς δείκτες τυπικούς για B- ή T- λεμφοκύτταρα. Εκφράζουν το μόριο CD2 και έναν υποδοχέα χαμηλής συγγένειας για το Fc τμήμα των IgG ανοσοσφαιρινών, ο οποίος ονομάζεται και FCRIII ή CD16 (22, 23). Τα NK-κύτταρα αναγνωρίζουν τα κύτταρα-στόχους τους μέσω δύο μηχανισμών (24, 25): α) μέσω της μειωμένης έκφρασης των MHC τάξης I μορίων (missing-self hypothesis) και στοιχείων της επιφάνειας που εκφράζονται από καρκινικά κύτταρα ή από κύτταρα μολυσμένα με ιούς και β) μέσω αντιγόνων καρκινικών κυττάρων, καθώς και κυττάρων μολυσμένων από ιούς έναντι των οποίων η ανοσολογική απόκριση παράγει αντισώματα. Τα συνδεδεμένα αντισώματα στην επιφάνεια

αυτών των κυττάρων αναγνωρίζονται από το μεμβρανικό υποδοχέα CD16 που εκφράζεται στα NK-κύτταρα και ο οποίος συνδέεται με το καρβοξυτελικό άκρο του μορίου της IgG. Έτσι, τα NK-κύτταρα μπορούν να προσδεθούν στα προαναφερθέντα κύτταρα-στόχους και να τα καταστρέψουν. Ο μηχανισμός αυτός είναι γνωστός ως κυτταροτοξικότητα επαγόμενη από αντίσωμα (antibody-dependent cell mediated toxicity, ADCC) (3, 10, 12).

Διαλυτοί παράγοντες στην αρχέγονη ανοσία

Σημαντικά στοιχεία στην αρχέγονη ανοσολογική απάντηση αποτελούν το συμπλήρωμα, οι πρωτεΐνες οξείας φάσης και οι κυτταροκίνες.

Το **συμπλήρωμα** αποτελεί σύνολο πρωτεϊνών και ενζύμων, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, αφενός για την οψωνινοποίηση των παθογόνων και αφετέρου για την επαγωγή της φλεγμονώδους αντίδρασης για την αντιμετώπιση της λοίμωξης (8, 26). Χαρακτηριστικό του συστήματος του συμπληρώματος είναι ότι οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος είναι πρωτεάσες, οι οποίες ενεργοποιούνται μόνο μετά από πρωτεόλυση, συνήθως από άλλες ειδικές πρωτεάσες (27). Το συμπλήρωμα παράγει μία ταχεία ενισχυμένη απάντηση με την ενεργοποίηση ενός «καταρράκτη» αντιδράσεων, στις οποίες το προϊόν της μίας αντίδρασης είναι ο ενζυμικός καταλύτης της επόμενης (28). Υπάρχουν τρεις οδοί ενεργοποίησης του συμπληρώματος, η κλασσική, η εναλλακτική οδός και η οδός της λεκτίνης. Η κλασσική οδός ενεργοποιείται από συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος, η εναλλακτική οδός από στοιχεία του μικροβιακού κυτταρικού τοιχώματος και η οδός της λεκτίνης από την

αλληλεπίδραση μικροβιακών υδατανθράκων με πρωτεΐνες που προσδένουν τη μανόζη στο πλάσμα (29-32). Ανεξάρτητα από την οδό ενεργοποίησης, το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή ανοσολογικώς ενεργών συστατικών (33).

Οι κυριότερες βιολογικές λειτουργίες του συμπληρώματος συνοψίζονται στα ακόλουθα (10):

A) *Κυτταρόλυση*: Ο σχηματισμός του συμπλέγματος προσβολής της μεμβράνης (Membrane Attack Complex – MAC), ενός πολυμοριακού λιποδιαλυτού συμπλέγματος που έχει τη μορφή πόρου ικανού να διαπερνά τη λιπιδική διπλοστιβάδα, πάνω στις μεμβράνες των μικροοργανισμών που ενεργοποιούν το συμπλήρωμα, συνεπάγεται την ελεύθερη δίοδο ύδατος και ηλεκτρολυτών, με τελικό αποτέλεσμα την ωσμωτική λύση των κυττάρων των μικροοργανισμών (34).

B) *Οψωνινοποίηση*: Η εναπόθεση προϊόντων διάσπασης των παραγόντων του συμπληρώματος πάνω στη μεμβράνη των μικροοργανισμών ή στα μακρομόρια που προκαλούν ενεργοποίηση του συστήματος, προάγει τη φαγοκυττάρωσή τους, με τη μεσολάβηση των αντίστοιχων υποδοχέων που εκφράζονται στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων (35).

Γ) *Φλεγμονή*: Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος και η παραγωγή αναφυλατοξινών (C4a, C3a και C5a), στο σημείο της ιστικής βλάβης, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα εξέλιξης της φλεγμονής (35, 36).

Δ) *Ανοσοσυμπλέγματα*: Το συμπλήρωμα προφυλάσσει τον οργανισμό από τις βλαπτικές συνέπειες που έχει η καθήλωση αδιάλυτων μεγαλομοριακών συμπλεγμάτων αντιγόνου-αντισώματος στους ιστούς. Η

ενεργοποίηση της κλασσικής οδού αναστέλλει το σχηματισμό και την κατακρήμνιση, ενώ η ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού προκαλεί διάλυση των ανοσοσυμπλεγμάτων. Τέλος, τα προϊόντα της διάσπασης του C3 και του C4 που εναποτίθενται, κατά την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, πάνω στα κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα, εξυπηρετούν την κάθαρση των τελευταίων από το αίμα (10).

Οι **πρωτεΐνες οξείας φάσης (acute phase proteins)** παράγονται στο ήπαρ. Ενισχύουν την αντίσταση στη λοίμωξη, ελαχιστοποιούν την έκταση της ιστικής βλάβης και προάγουν την επανόρθωση των κατεστραμμένων ιστών. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών οξείας φάσης αυξάνονται ταχύτατα ως απάντηση σε λοίμωξη, φλεγμονή και τραυματισμό των ιστών. Μία από τις σημαντικότερες πρωτεΐνες οξείας φάσης είναι η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, C-RP). Αποτελεί σημαντικό δείκτη φλεγμονής και δείκτη ενεργότητας νόσου. Είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών που είναι γνωστές και ως «πεντραξίνες» και ονομάζονται έτσι επειδή αποτελούνται από πέντε πανομοιότυπες υπομονάδες. Η C-RP προσδέεται στη φωσφορυλοχολίνη της μεμβράνης βακτηρίων και μυκήτων. Η πρόσδεση αυτή ενεργοποιεί το σύστημα του συμπληρώματος και οψωνινοποιεί τους μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα λύση της μεμβράνης, είσοδο νερού στο μικροοργανισμό και λύση του λόγω αυξημένης ωσμωτικής πίεσης (37, 38). Άλλες πρωτεΐνες οξείας φάσης είναι το αμυλοειδές Α του ορού (Serum Amyloid A, SAA), η α2-μακροσφαιρίνη, η πρωτεΐνη συνδέουσα μαννόζη, αναστολείς πρωτεϊνών και παράγοντες πήξης, όπως το ινωδογόνο (3, 12, 39, 40).

Οι κυτταροκίνες (cytokines) αποτελούν μία άλλη σημαντική ομάδα διαλυτών μεσολαβητών. Είναι μικρές πρωτεΐνες ~25 kDa, οι οποίες απελευθερώνονται ως απάντηση σε διεγερτικά ερεθίσματα. Δρουν αυτοκρινικά επηρεάζοντας το ίδιο το κύτταρο που κάθε φορά τις εκκρίνει, παρακρινικά επηρεάζοντας γειτονικά κύτταρα (adjacent cells) και ενδοκρινικά, ασκώντας τη δράση τους σε απομακρυσμένα κύτταρα. Λειτουργούν ως μεταβιβαστές μηνυμάτων μεταξύ των στοιχείων του ανοσολογικού συστήματος και μεταξύ των άλλων συστημάτων του οργανισμού, σχηματίζοντας έτσι ένα καλά οργανωμένο δίκτυο που ρυθμίζει την ανοσολογική απάντηση. Οι κυτταροκίνες συμβάλλουν στην ανάπτυξη των κυττάρων του ανοσολογικού, στη διαφοροποίηση και στη μετανάστευσή τους και κατέχουν σημαντική θέση στη φλεγμονώδη αντίδραση και στην επανόρθωση των ιστών. Ειδικότερα στην αρχέγονη ανοσία ενεργοποιούν NK κύτταρα, μακροφάγα, μαστοκύτταρα και ηωσινόφιλα, προκαλούν τοπική φλεγμονή, επάγουν την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης και έχουν αντιική δράση (41). Στην επίκτητη ανοσία αυξάνουν την κυτταροτοξικότητα και την παραγωγή ανοσοσφαιρινών (2, 8, 42, 43).

Φαγοκυττάρωση

Τα φαγοκύτταρα διαθέτουν ένα σύστημα υποδοχέων ικανό να αναγνωρίζει μόρια τα οποία εκφράζονται στην επιφάνεια των παθογόνων (PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns) και είναι διακριτά από τα μόρια των «ιδίων» κυττάρων του οργανισμού (7). Αυτοί οι υποδοχείς

συνδέονται με αξιοσημείωτη ειδικότητα σε μόρια του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων (44). Σημαντικότεροι από αυτούς είναι υποδοχείς λιποπολυσακχαριδών, όπως το CD14, υποδοχείς μαννόζης, καθώς και οι υποδοχείς-ρακοσυλλέκτες (scavenger receptors), οι οποίοι, εκτός από την αναγνώριση των παθογόνων, φαίνεται ότι μεσολαβούν και στην απομάκρυνση των κυττάρων που καταστρέφονται στην περιοχή της βλάβης (45-47). Η σύνδεση αυτή ενεργοποιεί τον Toll-like υποδοχέα, ο οποίος με τη σειρά του προάγει μία σειρά γεγονότων απελευθέρωσης του μεταγραφικού παράγοντα NFκB από τον αναστολέα του. Ο ελεύθερος NFκB μεταφέρεται στον πυρήνα και πυροδοτεί τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης (12, 47-52). Με τη φαγοκυττάρωση εξουδετερώνονται όχι μόνο παθογόνοι μικροοργανισμοί και σωματίδια, αλλά και ενδογενή στοιχεία, όπως τραυματισμένα ή νεκρά κύτταρα του ξενιστή και ενεργοποιημένοι παράγοντες πήξης. Κατά το πρώτο στάδιο της φαγοκυττάρωσης, τα φαγοκύτταρα μετακινούνται προς το σημείο της λοίμωξης, μια διαδικασία, η οποία ονομάζεται χημειοταξία (chemotaxia). Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει την προσκόλληση (adherence) του αντιγόνου στην κυτταρική μεμβράνη των φαγοκυττάρων. Η προσκόλληση επάγει τον σχηματισμό μεμβρανικών προσεκβολών, οι οποίες ονομάζονται ψευδοπόδια. Έτσι το υλικό που έχει προσκολληθεί περικλείεται από τα ψευδοπόδια σε μία μεμβρανική δομή που ονομάζεται φαγόσωμα. Στη συνέχεια, το φαγόσωμα μετακινείται στο εσωτερικό του κυττάρου, όπου συνενώνεται με το λυσόσωμα και σχηματίζεται έτσι το φαγολυσόσωμα. Τα λυσοσώματα περιέχουν λυσοζύμη και μία ποικιλία άλλων υδρολυτικών ενζύμων, τα οποία καταστρέφουν το

εγκυστωμένο υλικό. Το περιεχόμενο του φαγολυσσοσώματος αποβάλλεται κατόπιν με μια διαδικασία που ονομάζεται εξωκυττάρωση. Τα μακροφάγα διαθέτουν μεμβρανικούς υποδοχείς για συγκεκριμένες τάξεις ανοσοσφαιρινών. Εάν ένα παθογόνο καλύπτεται με τα κατάλληλα αντισώματα, το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος προσδένεται στον υποδοχέα του αντισώματος στην επιφάνεια του μακροφάγου και έτσι ενισχύεται η φαγοκυττάρωση. Η διαδικασία αυτή καλείται οψωνινοποίηση (53, 54).

Μηχανισμός της φλεγμονής

Η ιστική καταστροφή, η οποία προκαλείται από τραυματισμό ή από εισβάλλοντες παθογόνους μικροοργανισμούς επάγει μία πολύπλοκη σειρά γεγονότων, γνωστή ως φλεγμονώδη αντίδραση. Παθογενετικά, η φλεγμονή αναπτύσσεται ως αποτέλεσμα της πολύπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ παθογόνων, παρεγχυματικών κυττάρων, ιστικών στοιχείων, αγγειακού δικτύου και συστατικών της υγρής και της κυτταρικής φάσης του αίματος. Μοριακά στοιχεία των μικροοργανισμών, όπως λιποπολυσακχαρίδια (LPS), μπορούν να πυροδοτήσουν τη φλεγμονώδη αντίδραση, μέσω αλληλεπίδρασης με υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου. Το τελικό αποτέλεσμα της φλεγμονής μπορεί να είναι η ενεργοποίηση ενός συγκεκριμένου τύπου ανοσολογικής απάντησης εναντίον του εισβολέα και η κάθαρσή του. Χαρακτηριστικά της φλεγμονής είναι η ερυθρότητα (rubor), το οίδημα (tumor), η θερμότητα (calor), ο πόνος (dolor) και η απώλεια της

λειτουργικότητας (loss of function). Τα βασικά αυτά χαρακτηριστικά αντικατοπτρίζουν τα τρία κύρια γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους αντίδρασης.

A) *Αγγειοδιαστολή - Αύξηση της διαμέτρου των αιμοφόρων αγγείων και των παρακείμενων τριχοειδών*: Η αγγειοδιαστολή είναι υπεύθυνη για την ερυθρότητα και την αύξηση θερμοκρασίας στους ιστούς.

B) *Η αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών* διευκολύνει την εξαγγείωση υγρών και κυττάρων. Το εξαγγειωμένο υγρό διαθέτει υψηλότερη συγκέντρωση πρωτεϊνών από ότι το υγρό, το οποίο φυσιολογικά απελευθερώνεται από τα αγγεία. Η αυξημένη εξαγγείωση υγρού προκαλεί το οίδημα.

Γ) *Η εξαγγείωση των φαγοκυττάρων* διευκολύνεται από την αυξημένη διαπερατότητα των τριχοειδών. Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη και περιλαμβάνει προσκόλληση των κυττάρων στο ενδοθηλιακό τοίχωμα των αγγείων (margination), μετακίνηση των κυττάρων διαμέσου των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών στους ιστούς (διαπίδυση ή εξαγγείωση, extravasation) και τελικά τη μετανάστευσή τους από τους ιστούς στο σημείο της εισβολής (χημειοταξία) (55-57). Καθώς τα φαγοκύτταρα συσσωρεύονται στο σημείο της εισβολής και φαγοκυτταρώνουν βακτήρια, απελευθερώνουν λυτικά ένζυμα, τα οποία μπορούν να καταστρέψουν και παρακείμενα υγιή κύτταρα. Η συσσώρευση νεκρών κυττάρων, αποδομημένου υλικού και υγρών σχηματίζει το πύον. Στα γεγονότα της φλεγμονώδους απάντησης εμπλέκεται μία σειρά χυμικών μεσολαβητών, των οποίων η αλληλεπίδραση δεν είναι

πλήρως κατανοητή. Μερικοί από αυτούς τους μεσολαβητές προέρχονται από τους εισβάλλοντες μικροοργανισμούς, άλλοι απελευθερώνονται από κατεστραμμένα κύτταρα ως απάντηση στον ιστικό τραυματισμό, μερικοί προέρχονται από ενζυμικά συστήματα του πλάσματος και μερικοί παράγονται από κύτταρα συμμετέχοντα στη φλεγμονώδη διεργασία. Παράδειγμα τέτοιων μεσολαβητών είναι οι πρωτεΐνες οξείας φάσης, όπως προαναφέρθηκε, ενώ ένας από τους κύριους μεσολαβητές της φλεγμονής είναι η ισταμίνη, η οποία απελευθερώνεται σε απάντηση στον ιστικό τραυματισμό. Η ισταμίνη προσδένεται σε υποδοχείς παρακειμένων τριχοειδών και φλεβιδίων και προκαλεί αγγειοδιαστολή και αύξηση της διαπερατότητας. Μία άλλη σημαντική ομάδα μεσολαβητών της φλεγμονής αποτελούν οι κινίνες, οι οποίες βρίσκονται φυσιολογικά στο πλάσμα σε ανενεργό μορφή. Ο ιστικός τραυματισμός ενεργοποιεί τα πεπτίδια αυτά, τα οποία στη συνέχεια προκαλούν αγγειοδιαστολή και αυξημένη διαπερατότητα των τριχοειδών.

Η αγγειοδιαστολή και η αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών επιτρέπει επιπλέον ένζυμα του πηκτικού μηχανισμού να εισέλθουν στους ιστούς (58). Τα ένζυμα αυτά οδηγούν σε ενεργοποίηση ενός καταρράκτη αντιδράσεων που οδηγούν στην εναπόθεση ινώδους, το οποίο περιχαρακώνει την περιοχή της φλεγμονής και εμποδίζει τη διασπορά των παθογόνων.

Μετά τη φλεγμονώδη αντίδραση και την κάθαρση των παθογόνων με τη φαγοκυττάρωση, ακολουθεί η επανόρθωση και αναγέννηση των κατεστραμμένων ιστών. Νέα τριχοειδή αναπτύσσονται και ινοβλάστες

αντικαθιστούν το ινώδες. Η συσσώρευση τριχοειδών και ινοβλαστών εν τέλει οδηγεί στο σχηματισμό ουλώδους ιστού (1).

ΕΙΔΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

Η ειδική ή επίκτητη ή προσαρμοστική ανοσία μπορεί να διακριθεί σε χυμική ή κυτταρική ανοσία.

Χυμική ανοσία (humoral immunity): Αυτός ο τύπος της ειδικής ανοσίας μεσολαβείται από τα αντισώματα, δηλαδή μόρια που εξυπηρετούν την ειδική αναγνώριση και εξουδετέρωση των αντιγόνων. Τα αντισώματα παράγονται από έναν ειδικό υποπληθυσμό των λεμφοκυττάρων, τα Β-λεμφοκύτταρα, τα οποία, αφού συναντήσουν και αναγνωρίσουν το αντιγόνο, μετατρέπονται σε κύτταρα που παράγουν αντισώματα (πλασματοκύτταρα). Η χυμική ανοσία είναι ο κατ'εξοχήν προστατευτικός μηχανισμός έναντι των εξωκυττάρων βακτηρίων και των τοξινών τους (10, 59).

Κυτταρική ανοσία (cellular immunity): Μεσολαβητές της κυτταρικής ανοσίας είναι ένας άλλος υποπληθυσμός των λεμφοκυττάρων, τα Τ-λεμφοκύτταρα που συνήθως συνεργάζονται με τα φαγοκύτταρα, προκειμένου να επιτευχθεί η καταστροφή των μικροβίων. Οι ενδοκυττάριοι μικροοργανισμοί, όπως οι ιοί και ορισμένα βακτήρια, πολλαπλασιάζονται μέσα στα κύτταρα του ξενιστή, όπου είναι απροσπέλαστα από τα αντισώματα που κυκλοφορούν στον ορό. Η άμυνα εναντίον αυτών των μικροοργανισμών εξυπηρετείται από την κυτταρική ανοσία, η οποία προκαλεί και προάγει την ενδοκυττάρια καταστροφή τους ή τη λύση των μολυσμένων κυττάρων (10).

Τα βασικά χαρακτηριστικά της ειδικής ανοσολογικής απάντησης είναι:

A) *Ειδικότητα*: Η υψηλή ειδικότητα της ανοσολογικής απάντησης οφείλεται στην ικανότητα των υποδοχέων που εκφράζονται στη μεμβράνη των Β- και Τ-κυττάρων να διακρίνουν τις λεπτές δομικές διαφορές των διαφόρων επιτόπων.

B) *Ετερογένεια*: Οι διάφοροι λεμφοκυτταρικοί κλώνοι διαφέρουν ως προς τη μοριακή δομή των αντιγονικών τους υποδοχέων και κατά συνέπεια ως προς την ειδικότητά τους για τα αντιγόνα, με αποτέλεσμα το σύνολό τους να είναι εξαιρετικά ετερογενές. Η ετερογένεια προσδίδει στο ανοσολογικό σύστημα τη δυνατότητα να αντιμετωπίζει το τεράστιο πλήθος των δυνητικών παθογόνων του περιβάλλοντος.

Γ) *Μνήμη*: Ως ανοσολογική μνήμη ορίζεται η ικανότητα του ανοσολογικού συστήματος να απαντά ταχύτερα και αποτελεσματικότερα σε παθογόνα με τα οποία έχει έλθει σε προηγούμενη επαφή.

Δ) *Αυτορρύθμιση*: Κάθε φυσιολογική ανοσολογική απάντηση εξασθενεί βαθμιαία με την πάροδο του χρόνου από τη στιγμή του αντιγονικού ερεθίσματος.

Ε) *Διάκριση του «ιδίου» από το «ξένο»*: Η ικανότητα των λεμφοκυττάρων να διακρίνουν, να αναγνωρίζουν και να απαντούν στα ξένα αντιγόνα και παράλληλα να μην αντιδρούν στο πλήθος των αντιγονικών ουσιών που απαντώνται στον ίδιο τον οργανισμό, αποτελεί μία από τις σημαντικότερες ιδιότητες του ανοσολογικού συστήματος. Η απουσία

ανοσολογικής απάντησης έναντι «ίδιων» αντιγόνων ονομάζεται ανοσολογική ανοχή (immune tolerance). Η αδυναμία επαγωγής και εγκατάστασης ανοσολογικής ανοχής έναντι «ίδιων» αντιγόνων οδηγεί στην εκδήλωση νοσημάτων που χαρακτηρίζονται ως «αυτοάνοσα νοσήματα» (10).

Φάσεις της ειδικής ανοσολογικής απάντησης

A) *Φάση αναγνώρισης*: Συνίσταται στη σύνδεση των ξένων αντιγόνων με τους ειδικούς υποδοχείς που εκφράζονται στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων πριν από την ενεργοποίησή τους.

B) *Φάση ενεργοποίησης*: Αντιπροσωπεύει την αλληλουχία των φαινομένων που επάγονται στα λεμφοκύτταρα ως επακόλουθο της ειδικής αναγνώρισης του αντιγόνου. Τα φαινόμενα αυτά συνίστανται σε δύο βασικές μεταβολές των λεμφοκυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους.

Γ) *Η δραστική φάση* είναι το στάδιο της ανοσολογικής απάντησης κατά το οποίο τα ειδικά ενεργοποιημένα από το αντιγόνο λεμφοκύτταρα εκδηλώνουν τη δράση τους προς εξουδετέρωση του αντιγόνου. Τα λεμφοκύτταρα που συμμετέχουν σε αυτή τη φάση, φέρονται ως ανοσοδραστικά κύτταρα (effector cells) (10).

Κυτταρικά στοιχεία της επίκτητης ανοσίας

A) T-λεμφοκύτταρα

Ο κύριος πληθυσμός των T-λεμφοκυττάρων χαρακτηρίζεται από την επιφανειακή έκφραση του αβTCR (T-Cell Receptor). Ο υποδοχέας αυτός αναγνωρίζει αντιγόνα που παρουσιάζονται σε σύμπλεγμα με ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα (Human Leucocyte Antigens, HLA) τάξης I ή II του MHC (60). Τα αβ-T-λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε ποικίλους υποτύπους, μερικοί από τους οποίους (CD8+ T-λεμφοκύτταρα) έχουν ως κύρια δράση τους την καταστροφή κυττάρων μολυσμένων με ενδοκυττάριους μικροοργανισμούς και άλλοι (CD4+ T-λεμφοκύτταρα) δρουν κυρίως ως ρυθμιστές της χυμικής και κυτταρικής ανοσολογικής απάντησης. Ένας μικρός πληθυσμός των αβ-T-λεμφοκυττάρων που εκφράζει το CD161 αντιγόνο των NK κυττάρων, τα NK-T-λεμφοκύτταρα, είναι κατά κύριο λόγο CD4 και CD8 διπλά αρνητικά και χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να απελευθερώνουν ταχέως μεγάλα ποσά ιντερφερόνης-γ (Interferon-γ, IFN-γ), ιντερλευκίνης-4 (interleukin-4, IL-4), παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor, GM-CSF) και παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF) (61, 62).

Κάθε T-λεμφοκύτταρο διαθέτει αντιγονικό υποδοχέα μίας και μοναδικής ειδικότητας. Για να είναι δυνατή η αντιμετώπιση του τεράστιου συνόλου των μικροοργανισμών πρέπει να υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων που εκφράζει ένα ευρύ φάσμα διακριτών και ξεχωριστών TCR, κάτι που

επιτυγχάνεται με αναδιάταξη γονιδιακών τμημάτων κατά τη διάρκεια της οντογένεσης του Τ-λεμφοκυττάρου. Περίπου 90-95% των κυκλοφορούντων Τ-λεμφοκυττάρων διαθέτουν τον αβTCR (63). Το υπόλοιπο 5-10% διαθέτει έναν εναλλακτικό ετεροδιμερή TCR, ο οποίος αποτελείται από γ και δ αλυσίδες. Ένα ποσοστό των γδ Τ-λεμφοκυττάρων παράγεται στο θύμο, αλλά το μεγαλύτερο μέρος τους παράγεται σε «εξωθυμικούς» ιστούς, όπως για παράδειγμα στο γαστρεντερικό σωλήνα (61, 64-67).

Ο TCR αντιδρά με πεπτίδια συνδεδεμένα στα μόρια του MHC που εκφράζονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (68). Το σύμπλεγμα CD3 που αποτελείται από 5 διαφορετικές μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι μη ομοιοπολικά συνδεδεμένο με τον TCR και χρησιμεύει τόσο στην έκφραση του υποδοχέα στη μεμβράνη, όσο και στη μετάδοση του μηνύματος στον πυρήνα του Τ-λεμφοκυττάρου. Το αποτέλεσμα από τη σύνδεση του TCR/CD3 με το σύμπλοκο αντιγόνου/αντιγόνου ιστοσυμβατότητας είναι η ενεργοποίηση του Τ-λεμφοκυττάρου (69). Αυτή αρχίζει με διάσπαση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης, με αύξηση της δραστηριότητας της πρωτεϊνικής κινάσης C και με αύξηση του ασβεστίου του κυτταροπλάσματος. Ακολούθως, ενεργοποιούνται ενδοκυτταροπλασματικές πρωτεΐνες με φωσφορυλίωση. Η αλληλουχία αυτή των γεγονότων οδηγεί στην ενεργοποίηση γονιδίων που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αλληλεπίδραση του συμπλέγματος TCR/CD3 με αντιγονικά πεπτίδια που παρουσιάζονται σε μόρια του MHC παρέχουν μόνο μέρος του σήματος για ενεργοποίηση του Τ-λεμφοκυττάρου. Η πλήρης ενεργοποίηση απαιτεί την επιπρόσθετη συμμετοχή

ενός συνδिएγερτικού μορίου, όπως το CD28 στην επιφάνεια του T-λεμφοκυττάρου και του CD80 (αναφέρεται επίσης και ως B7.1) ή του CD86 (B7.2) στο αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο (61, 70, 71). Χωρίς τη συμμετοχή συνδिएγερσης, το T-λεμφοκύτταρο γίνεται αδρανές, δηλαδή δεν διεγείρεται όσες φορές και αν συναντήσει το αντιγόνο. Το φαινόμενο αυτό χαρακτηρίζεται ως «ανεργία» (72). Οι οδοί που καταστέλλουν την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων διαμεσολαβούνται από το CD45, μεμβρανικό μόριο-κλειδί στη διαδικασία απενεργοποίησης και από τα PD-1 (programmed death-1) και PD-L1 (programmed death ligand 1), ο συνδυασμός των οποίων μετάγει σήματα στα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα, εξαλείφοντας την T-κυτταρική απάντηση (3, 61, 73).

Τα αβ T-λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε διακριτούς υποπληθυσμούς, καθένας από τους οποίους διαθέτει ξεχωριστές και καλά καθορισμένες λειτουργίες. Ο βασικός διαχωρισμός γίνεται με βάση την επιφανειακή έκφραση CD4 ή CD8 (74). Τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα, ή αλλιώς «βοηθητικά» T-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούν, όπως προαναφέρθηκε, τις χυμικές (βοήθεια στα B-λεμφοκύτταρα) και τις κυτταρικές ανοσολογικές απαντήσεις (για παράδειγμα, αντιδράσεις επιβραδυνόμενης υπερευαισθησίας) (75). Ο υποπληθυσμός των CD8+ T-λεμφοκυττάρων χαρακτηρίζεται από μείζονα κυτταροτοξική δραστηριότητα εναντίον κυττάρων μολυσμένων με ενδοκυττάρια μικρόβια και εναντίον καρκινικών κυττάρων, ενώ διαθέτει επιπλέον ρυθμιστικά κύτταρα που αναστέλλουν την ανοσολογική απάντηση (κατασταλτικά κύτταρα) (76, 77).

Ποσοστό των κυκλοφορούντων CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων επιτελεί ρυθμιστικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση. Τα ρυθμιστικά αυτά T-λεμφοκύτταρα (Regulatory T-cells, Tregs) διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες: α) Αυτά που αναπτύσσουν τη ρυθμιστική τους ικανότητα στο θύμο και είναι γνωστά ως «φυσικά» Tregs κύτταρα. Τα συγκεκριμένα κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους τα CD4 και CD25. Η βασική ρυθμιστική δράση αυτών των κυττάρων οφείλεται στην έκκριση αυξητικού παράγοντα των όγκων β (Tumor Growth Factor β, TGF-β) και IL-10 (61, 78) και β) τα Tregs που διαφοροποιούνται στην περιφέρεια από «αθώα» (naïve) CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα. Τα τελευταία φαίνεται ότι διαφοροποιούνται ως απάντηση σε διέγερση με συγκεκριμένο αντιγόνο και για το λόγο αυτό καλούνται «προσαρμοστικά» ή «επαγόμενα» T-λεμφοκύτταρα (adaptive or induced Treg cells). Η διαφοροποίησή τους φαίνεται ότι εξαρτάται από την παρουσία IL-10 κατά την αρχική τους ενεργοποίηση.

Τόσο τα CD4⁺, όσο και τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε λειτουργικά διακριτούς πληθυσμούς μετά την έκθεση σε αντιγόνο. Τα ηρεμούντα «αθώα» CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα (T-helper cells, Th) παράγουν πολύ χαμηλά επίπεδα κυτταροκινών. Σύντομα μετά τη διέγερση από το αντιγόνο και το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο, τα Th κύτταρα αρχίζουν να παράγουν IL-2 και χαρακτηρίζονται ως Th0. Καθώς τα Th κύτταρα συνεχίζουν να απαντούν στο ερέθισμα, προχωρούν προς τη διαφοροποίηση σε Th1, Th2 και Th17, ανάλογα με τις κύριες κυτταροκίνες που βρίσκονται στο «μικροπεριβάλλον» ενεργοποίησης (61, 79, 80). Η IL-12 που παράγεται από τα μακροφάγα και τα NK-κύτταρα επάγει τη διαφοροποίηση προς Th1, η IL-4

που παράγεται από από τα NKT κύτταρα, τα T-λεμφοκύτταρα, τα βασεόφιλα ή τα σιτευτικά κύτταρα προάγει τη διαφοροποίηση προς Th2, ενώ ο TGF- β και η IL-6 που παράγονται κυρίως από μονοκύτταρα/μακροφάγα καθώς και από μέχρι στιγμής άλλα αδιευκρίνιστα κύτταρα, επάγουν τη διαφοροποίηση προς Th17.

Με τη σειρά τους, τα Th1 κύτταρα χαρακτηρίζονται κυρίως από την παραγωγή IL-2, IFN- γ , TNF- α και λεμφοτοξίνης (TNF- β). Τα Th2 κύτταρα χαρακτηρίζονται κυρίως από την παραγωγή IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 και GM-CSF και τα Th17 από την παραγωγή IL-6 και IL-17. Σε γενικές γραμμές, τα Th1 κύτταρα κυριαρχούν στην κυτταρική ανοσολογική απάντηση και τα Th2 στη χυμική ανοσολογική απάντηση και στις αλλεργικές αντιδράσεις. Τα Th17 κύτταρα επάγονται νωρίς στην ανοσολογική απάντηση εναντίον εξωκυττάρων βακτηρίων και βοηθούν στη συσσώρευση των ουδετεροφίλων για την εξάλειψη αυτών των παθογόνων. Επιπλέον, τα Th17 κύτταρα κατέχουν θέση στην καταστροφική φλεγμονώδη αντίδραση που αποτελεί μέρος πολλών αυτοανόσων νοσημάτων (61, 81, 82).

B) B-λεμφοκύτταρα

Τα B-λεμφοκύτταρα αποτελούν περίπου το 15% των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Τα ώριμα B-λεμφοκύτταρα προέρχονται από προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών και χαρακτηρίζονται από την παραγωγή ανοσοσφαιρινών. Οι ανοσοσφαιρίνες ή αντισώματα είναι γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούνται από δύο πανομοιότυπες βαριές

πολυπεπτιδικές αλυσίδες και δύο πανομοιότυπες ελαφρές πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Η κάθε βαριά αλυσίδα συνδέεται με μία ελαφριά αλυσίδα με δισουλφιδικούς δεσμούς και επιπλέον, δισουλφιδικοί δεσμοί συγκρατούν μαζί τα δύο ζεύγη ελαφρών-βαρέων αλυσίδων. Ο υποδοχέας των Β-λεμφοκυττάρων είναι ένα μόριο ανοσοσφαιρίνης προσδεμένο στην κυτταρική μεμβράνη (83-85).

Τα αναπτυσσόμενα Β-λεμφοκύτταρα υφίστανται διαφοροποίηση των επιφανειακών αντιγόνων και αναδιάταξη των γονιδίων των βαρέων και ελαφρών αλυσίδων. Τα πρόδρομα Β-λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονται από την παρουσία κυτταροπλασματικής IgM ανοσοσφαιρίνης. Σε μεταγενέστερο στάδιο εκφράζουν στην επιφάνειά τους την IgM ανοσοσφαιρίνη. Το ώριμο Β-λεμφοκύτταρο εκφράζει στην κυτταρική επιφάνεια IgD ανοσοσφαιρίνη (86, 87). Η έκθεση των Β-λεμφοκυττάρων στα αντιγόνα διαφοροποιεί περαιτέρω τα κύτταρα αυτά, ώστε να τροποποιηθούν σε πλασματοκύτταρα. Όταν ένα «αθώο» Β-λεμφοκύτταρο (naïve B-cell) συναντήσει αντιγόνο, η πρόσδεση του αντιγόνου στο μεμβρανικό αντίσωμα προκαλεί γρήγορο πολλαπλασιασμό του Β-λεμφοκυττάρου και διαφοροποίησή του σε πλασματοκύτταρο, το οποίο παράγει διαλυτές ανοσοσφαιρίνες, τα κυριότερα μόρια της χυμικής ανοσίας (1, 88-90).

Κάθε Β-λεμφοκύτταρο παράγει ανοσοσφαιρίνες μίας και αυτής ειδικότητας, παρόλα αυτά το τεράστιο ρεπερτόριο ειδικοτήτων των ανοσοσφαιρινών προέρχεται από σχετικά μικρό αριθμό γονιδίων. Κάθε γονίδιο κωδικογραφεί ένα μέρος του μορίου της ανοσοσφαιρίνης και συνεπώς συνδυασμοί τέτοιων γονιδίων καθ'όλους τους δυνατούς τρόπους, που

επισυμβαίνουν με αναδιάταξη του DNA, δημιουργούν μια μεγάλη ποικιλία μεγαλύτερων γονιδίων, που κωδικογραφούν ολόκληρα μόρια ανοσοσφαιρίνης (91-93).

Όπως προαναφέρθηκε, οι ανοσοσφαιρίνες που παράγονται από τα Β-κύτταρα μπορεί να είναι και μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες λειτουργούν ως υποδοχείς του Β-κυττάρου για τα αντιγόνα. Όπως ο TCR, ο ώριμος υποδοχέας του Β-λεμφοκυττάρου επίσης περιλαμβάνει επιπλέον διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως τις Igα και Igβ, οι οποίες ενεργοποιούν ενδοκυττάρια σήματα, μετά τη σύνδεση του υποδοχέα-αντιγόνου (94, 95). Τα Β-λεμφοκύτταρα επίσης διαθέτουν ένα σύμπλεγμα συνυποδοχέων που αποτελείται από τα CD19, CD81 και CD21 (υποδοχέας συμπληρώματος 2), ο οποίος ενεργοποιείται με την πρόσδεση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C3d του συμπληρώματος (61).

Τα αντιγόνα τα οποία προκαλούν Ig ανοσολογικές απαντήσεις κατά τις οποίες τα Τ-λεμφοκύτταρα παρέχουν «βοήθεια» στην ωρίμανση των Β-λεμφοκυττάρων και στην παραγωγή αντισωμάτων, όπως για παράδειγμα τα πρωτεϊνικά αντιγόνα, ονομάζονται θυμοεξαρτώμενα αντιγόνα (96). Η ωρίμανση αυτή περιλαμβάνει αφενός τη μεταστροφή των υποτύπων, κατά την οποία οι κυτταροκίνες που παράγονται από τα Τ-λεμφοκύτταρα ελέγχουν τον ισότυπο της Ig που παράγεται και εφετέρου την ενεργοποίηση σωματικών υπερμεταλλάξεων (97-99). Οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις που χρειάζονται για τη «βοήθεια» των Τ-λεμφοκυττάρων κατευθύνονται από το ίδιο το αντιγόνο και από την ικανότητα των Β-λεμφοκυττάρων να δρουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Τα Β-λεμφοκύτταρα προσδένουν το

αντιγόνο μέσω της μεμβρανικής Ig, το ενδοκυτταρώνουν και το επεξεργάζονται για παρουσίαση στα τάξης II HLA μόρια. Η πρόσληψη του αντιγόνου επάγει την αυξημένη έκφραση των μορίων τάξης II και των CD80 και CD86. Τα T-λεμφοκύτταρα που ενεργοποιούνται από το συνδυασμό των συνδिएγερτικών μορίων και του συμπλέγματος αντιγόνου-μορίων τάξης II που βρίσκονται στο B-λεμφοκύτταρο με τη σειρά τους στέλνουν σήματα στα B-λεμφοκύτταρα μέσω της αλληλεπίδρασης του CD40 συνδέτη των T-λεμφοκυττάρων (CD40L) με το CD40 των B-λεμφοκυττάρων (100).

Η μεταστροφή των ισοτύπων και οι σωματικές υπερμεταλλάξεις σχετίζονται ισχυρά με την ανάπτυξη ανοσολογικής μνήμης. Η ανοσολογική μνήμη χαρακτηρίζεται από ταχεία παραγωγή υψηλών επιπέδων ανοσοσφαιρινών υψηλής συγγένειας IgG, IgA και IgE και από σωματικές υπερμεταλλάξεις στις περιοχές πρόσδεσης του αντιγόνου των βαρέων και ελαφρών αλυσίδων αυτών των αντισωμάτων (101). Η ανάπτυξη της ανοσολογικής μνήμης είναι καθοριστικής σημασίας στην επιτυχία των εμβολιασμών εναντίον παθογόνων και στην παθογένεια αυτοανόσων και αλλεργικών συνδρόμων.

Τα B-λεμφοκύτταρα μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν επιτυχώς χωρίς τη «βοήθεια» των T-λεμφοκυττάρων. Η ανεξάρτητη από τα T-λεμφοκύτταρα ενεργοποίηση των B-λεμφοκυττάρων επισυμβαίνει χωρίς τη μεσολάβηση συνδिएγερτικών μορίων των T-λεμφοκυττάρων. Επί απουσίας συνδιέγερσης, μονομερή αντιγόνα δε μπορούν να ενεργοποιήσουν τα B-λεμφοκύτταρα. Αντίθετα, πολυμερή αντιγόνα με επαναλαμβανόμενη δομή είναι ικανά να ενεργοποιήσουν B-λεμφοκύτταρα, πιθανότατα επειδή μπορούν

να συνδέσουν και να συγκεντρώσουν Ig μόρια στην επιφάνεια των Β-λεμφοκυττάρων. Τέτοια αντιγόνα είναι το LPS, ορισμένοι άλλοι πολυμερικοί πολυσακχαρίτες, μερικές πολυμερικές πρωτεΐνες και λιπιδικά αντιγόνα. Τα αντιγόνα αυτά χαρακτηρίζονται ως θυμοανεξάρτητα αντιγόνα, επειδή τα Β-λεμφοκύτταρα αποκρίνονται εναντίον αυτών χωρίς τη βοήθεια των Τ-λεμφοκυττάρων (102). Σωματικές υπερμεταλλάξεις δε συμβαίνουν στις περισσότερες ανεξάρτητες από τα Τ-λεμφοκύτταρα απαντήσεις και κατά συνέπεια σε αυτές τις απαντήσεις η ανοσολογική μνήμη είναι ασθενής (61).

Διακρίνονται δύο ομάδες θυμοανεξάρτητων αντιγόνων. Τα TI-1 αντιγόνα είναι πολυκλωνικοί ενεργοποιητές των Β-κυττάρων, διεγείρουν δηλαδή τα Β-λεμφοκύτταρα ανεξάρτητα από την αντιγονική ειδικότητα των δευτέρων. Τα αντισώματα που παράγονται σε μεγάλες ποσότητες είναι στην πλειονότητά τους τάξης IgM, αφού η απουσία κυτταροκινών αποκλείει τη μεταστροφή προς άλλους ιστοτύπους. Τα TI-2 αντιγόνα διαφέρουν από τα TI-1 αντιγόνα στα εξής σημεία : α) δε δρουν ως πολυκλωνικοί ενεργοποιητές των Β-λεμφοκυττάρων, β) ενεργοποιούν ώριμα Β-λεμφοκύτταρα και απενεργοποιούν ανώριμα Β-λεμφοκύτταρα, γ) παρόλο που η απάντηση των Β-λεμφοκυττάρων στα TI-2 αντιγόνα δεν απαιτεί απευθείας εμπλοκή των Th κυττάρων, οι κυτταροκίνες που παράγονται από τα Th κύτταρα απαιτούνται για τον αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό των Β-λεμφοκυττάρων και για τη μεταστροφή των ανοσοσφαιρινών σε άλλες τάξεις εκτός από την IgM (1, 10, 103).

ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ (ΜΗC)

Το ΜΗC είναι ένα σύνολο στενά συνδεδεμένων και εξαιρετικά πολύμορφων γονιδίων, τα οποία βρίσκονται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 και κωδικογραφούν την παραγωγή γλυκοπρωτεϊνών που εκφράζονται με διαφορετική κατανομή στην επιφάνεια όλων σχεδόν των εμπυρήνων κυττάρων (10, 104). Οι γλυκοπρωτεΐνες αυτές αποτελούν τα HLA αντιγόνα. Αυτά κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες, τις τάξεις I, II και III. Τα τάξης I και II HLA αντιγόνα είναι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, ενώ τα τάξης III HLA αντιγόνα αντιπροσωπεύουν τις διαλυτές πρωτεΐνες C2, C4 και BF του συμπληρώματος. Ο βασικός ρόλος των αντιγόνων HLA συνίσταται στο σχηματισμό συμπλέγματος με τα πεπτίδια των επεξεργασμένων πρωτεϊνικών αντιγόνων και στην παρουσίασή τους στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (10, 105).

Τα μόρια των τάξης I HLA-αντιγόνων εκφράζονται από όλα τα εμπύρηνα κύτταρα του οργανισμού. Συνδέονται με θραύσματα ιικών αντιγόνων ή αντιγόνων ενδοκυτταρίων παθογόνων που προέρχονται από το εσωτερικό των κυττάρων και ενεργοποιούν τα CD8+ T-λεμφοκύτταρα. Στη συνέχεια, τα CD8+ T-λεμφοκύτταρα καταστρέφουν τα μολυσμένα από ιούς ή από ενδοκυττάρια παθογόνα κύτταρα-στόχους με δύο τρόπους, είτε με άμεση κυτταρόλυση, είτε με απόπτωση (3, 106). Γενικά, τα πεπτίδια που συνδέονται με τα HLA τάξης I μόρια προέρχονται από πρωτεΐνες που συντίθενται μέσα στο κύτταρο που φέρει τα τάξης I μόρια. Τα αντιγόνα αυτά περιγράφονται ως «ενδογενή αντιγόνα». Η διέγερση με IFN-γ είναι αυτή που ενεργοποιεί τα κύτταρα για την παραγωγή αντιγονικών πεπτιδίων που μπορούν να

παρουσιαστούν από τα HLA τάξης I μόρια. Η συγκεκριμένη οδός παρουσίασης συναντάται στην παρουσίαση αντιγονικών πεπτιδίων σε κύτταρα μολυσμένα με ιούς και στην παρουσίαση ειδικών πρωτεϊνών καρκινικών κυττάρων, κάτι που μπορεί να αποδειχθεί ωφέλιμο στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου (61). Τα γονίδια που κωδικογραφούν τα μόρια τάξης I αναπτύσσονται σε μία περιοχή μεγέθους 1800 κιλοβάσεων DNA που είναι η μεγαλύτερη περιοχή του MHC. Σε αυτή την περιοχή υπάρχουν υποπεριοχές, κάθε μία από τις οποίες παράγει αντίστοιχα μόρια. Καλύτερα κατανοητές είναι οι περιοχές A, B, C που κωδικογραφούν τα HLA-A, HLA-B, και HLA-C (3, 104).

Τα μόρια των τάξης II HLA-αντιγόνων εκφράζονται κατεξοχήν στα Β-λεμφοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, σε όλους δηλαδή τους τύπους κυττάρων που παρουσιάζουν αντιγόνα στα CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα. Η έκφραση των τάξης II πρωτεϊνών του MHC μπορεί ακόμη να επαχθεί μετά από διέγερση με IFN- γ σε επιπλέον κυτταρικούς τύπους, όπως τα επιθηλιακά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, επιτρέποντας σε αυτούς να παρουσιάζουν αντιγόνα στα CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα στις θέσεις της φλεγμονής (61, 107, 108). Ο τύπος των γονιδίων των μορίων τάξης II αποτελείται από τρεις υποπεριοχές, κάθε μία από τις οποίες κωδικογραφεί διαφορετικά αντιγόνα, τα HLA-DP, HLA-DQ, και HLA-DR (104).

Τα αντιγόνα που παρουσιάζονται από τα μόρια των τάξης II HLA αποτελούν συνήθως θραύσματα μεγαλύτερων αντιγόνων που εισέρχονται στο αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο μέσω ενδοκυττάρωσης ή φαγοκυττάρωσης και υφίστανται επεξεργασία στα λυσοσώματα. Τα αντιγόνα αυτά («εξωγενή

αντιγόνα») προέρχονται κυρίως από βακτήρια, παράσιτα, ιικά σωματίδια, τα οποία έχουν απελευθερωθεί από μολυσμένα κύτταρα, καθώς και από πρωτεΐνες του περιβάλλοντος (61, 109).

Συσχέτιση των τύπων HLA με νοσήματα: Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι πάνω από 40 νόσοι είναι συχνότερες σε άτομα που φέρουν συγκεκριμένα HLA τάξης I ή II αλληλία σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (61, 110). Η πλειονότητα των σχέσεων με νοσήματα αφορά τα τάξης II HLA-αντιγόνα, ενώ τα νοσήματα αυτά είναι κυρίως αυτοάνοσα ή έχουν αυτοάνοσα ή ανοσολογικά επαγόμενα χαρακτηριστικά. Παρόλο που οι μηχανισμοί με τους οποίους τα HLA μόρια καθορίζουν την εμφάνιση αυτών των νόσων δεν είναι πλήρως διευκρινισμένοι, φαίνεται ότι πίσω από αυτό το φαινόμενο βρίσκεται η συμμετοχή των HLA μορίων στην εγκατάσταση της ανοσολογικής ανοχής και στην αναγνώριση περιβαλλοντικών αντιγόνων (61, 111, 112)

Ανεξάρτητη από το HLA παρουσίαση του αντιγόνου: Η παρουσίαση του αντιγόνου από τα τάξης I και τάξης II μόρια στα CD8+ και CD4+ T-λεμφοκύτταρα περιορίζεται σε πρωτεϊνικά αντιγόνα. Αρχικά, εθεωρείτο ότι η αντιμετώπιση πολυσακχαριδικών και λιπιδικών αντιγόνων ήταν περιορισμένη σε ανεξάρτητη από τα T-λεμφοκύτταρα ανοσολογική απάντηση που οδηγούσε σε άμεση ενεργοποίηση των B-λεμφοκυττάρων. Εντούτοις, πρόσφατα κατέστη σαφές ότι υπάρχουν πληθυσμοί T-λεμφοκυττάρων, τα οποία αναγνωρίζουν αντιγόνα που παρουσιάζονται από μόρια που δεν ανήκουν στα HLA τάξης I ή II. Ένας από αυτούς τους πληθυσμούς αναγνωρίζει λιπιδικά αντιγόνα, τα οποία παρουσιάζονται από τα μόρια CD1 (61, 113). Τα CD1 μόρια σχετίζονται δομικά με τα HLA τάξης I

μόρια και είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που συνδέονται με τη β2-μικροσφαιρίνη, ενώ μεσολαβούν επίσης στην αντιγονοπαρουσίαση σε T-λεμφοκύτταρα, τα οποία χρησιμοποιούν τον γδ TCR. Παρουσιάζουν λιπιδικά και γλυκολιπιδικά μικροβιακά αντιγόνα, όπως για παράδειγμα αυτά των μυκοβακτηριδίων. Ανεξάρτητα από την αντιγονοπαρουσιαστική τους λειτουργία, τα μη συνδεδεμένα με ξένο αντιγόνο CD1 μόρια αποτελούν στόχο αλληλοαναγνώρισης από τα T-λεμφοκύτταρα. Αυτά τα CD1-περιορισμένα T-κύτταρα εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες IL-4, η οποία προάγει εκλεκτικά τη διαφοροποίηση των Th-2 κυττάρων, ενώ παράλληλα διεγείρει την έκφραση των CD1-μορίων (10, 61).

ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ

Βασικό χαρακτηριστικό του ανοσολογικού συστήματος αποτελεί η ικανότητά του να διακρίνει τα «ίδια» από τα ξένα αντιγόνα (10). Αυτοανοσία είναι η αντίδραση αυτοδραστικών B- ή/και T-λεμφοκυττάρων κατά ιδίων ιστικών στοιχείων. Αυτοάνοση νόσος είναι το φαινόμενο κατά το οποίο η αυτοανοσία προκαλεί ιστικές βλάβες ή διαταραχή της λειτουργικότητας διαφόρων οργάνων. Οι κυτταρικές και οι ιστικές βλάβες που χαρακτηρίζουν τα αυτοάνοσα νοσήματα δημιουργούνται από α) ιστική εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων που σχηματίζονται στην κυκλοφορία μεταξύ των αυτοαντισωμάτων και των «ιδίων» αντιγονικών στοιχείων, β) απευθείας σύνδεση των αυτοαντισωμάτων με τα αντίστοιχα κύτταρα ή ιστούς ή γ)

εξαρτώμενη από τα T-κύτταρα αντίδραση επιβραδυνόμενης υπερευαισθησίας (3, 10).

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΟΧΗ

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους αποτρέπεται η αντίδραση των λεμφοκυττάρων έναντι των αντιγόνων του ίδιου του οργανισμού. Με τον όρο «ανοσολογική ανοχή» περιγράφεται η διαδικασία κατά την οποία εξαλείφονται ή ουδετεροποιούνται τα αυτοδραστικά κύτταρα, δηλαδή κύτταρα, τα οποία στρέφονται εναντίον αυτοαντιγόνων. Διάσπαση των μηχανισμών ανοχής μπορεί να οδηγήσει σε αυτοανοσία (114).

Ανοσολογική Ανοχή και B-λεμφοκύτταρα

Διάφοροι μηχανισμοί συμβάλλουν στην εξάλειψη των αυτοδραστικών B-λεμφοκυττάρων όπως η κλωνική διαγραφή των ανώριμων B-λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών (114, 115), η εξάλειψη των αυτοδραστικών B-λεμφοκυττάρων στο σπλήνα ή στους λεμφαδένες, λειτουργική απενεργοποίηση (ανεργία) (114, 116) καθώς και ο μηχανισμός της «τροποποίησης του υποδοχέα», κατά τον οποίο η ειδικότητα του υποδοχέα του B-λεμφοκυττάρου αλλάζει, όταν το B-λεμφοκύτταρο συναντήσει αυτοαντιγόνο (114, 117). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ανοχή στα B-κύτταρα οφείλεται κατά κύριο λόγο στην έλλειψη βοήθειας από τα T-λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι κάτω από κάποιες συνθήκες, τα B-κύτταρα

μπορούν να ξεπεράσουν τους μηχανισμούς ανοχής παρά την έλλειψη βοήθειας από τα T-λεμφοκύτταρα (114, 118, 119).

Ανοσολογική Ανοχή και T-λεμφοκύτταρα

Κεντρική ανοχή: Ο κύριος μηχανισμός της T-κυτταρικής ανοχής είναι η εξάλειψη των αυτοδραστικών T-λεμφοκυττάρων στο θύμο. Τα ανώριμα T-λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν από το μυελό των οστών στο θύμο, όπου συναντούν πεπτίδια τα οποία προέρχονται από ενδογενείς πρωτεΐνες συνδεδεμένες σε MHC μόρια (2, 114). Τα T-κύτταρα τα οποία διαθέτουν υποδοχείς χαμηλής συγγένειας για τα συμπλέγματα πρωτεϊνών και MHC μορίων, δε λαμβάνουν σήματα, τα οποία θα μπορούσαν να αποτρέψουν την αυτόματη απόπτωση και έτσι πεθαίνουν στο θύμο. Τα T-λεμφοκύτταρα με υποδοχείς υψηλής συγγένειας για αυτά τα συμπλέγματα υφίστανται απόπτωση και πεθαίνουν με μια διαδικασία που ονομάζεται «αρνητική επιλογή». Τα υπόλοιπα T-λεμφοκύτταρα, τα οποία διαθέτουν υποδοχείς με ενδιάμεση συγγένεια, ωριμάζουν στο θύμο και μεταναστεύουν στην περιφέρεια, μία διαδικασία που αναφέρεται ως «θετική επιλογή». Η επαγωγή της κεντρικής ανοχής απαιτεί την παρουσία αυτοαντιγόνων στο θύμο. Επειδή δεν ανευρίσκονται όλα τα αυτοαντιγόνα στο θύμο, υπάρχουν και μηχανισμοί που συμμετέχουν στην περιφερική ανοχή (114, 120-123).

Περιφερική ανοχή: Οι μηχανισμοί περιφερικής ανοχής αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω:

α) *Ανοσολογική άγνοια*: Διάφοροι μηχανισμοί μπορούν να προκαλέσουν ανοσολογική άγνοια. Η συγκέντρωση του αντιγόνου μπορεί να είναι χαμηλότερη από τον ουδό ενεργοποίησης ή διαγραφής των T-κυττάρων (114, 122, 124), τα αντιγόνα μπορεί να διαχωρίζονται από τα T-λεμφοκύτταρα από φυσικούς φραγμούς (π.χ. αιματοεγκεφαλικός) (114, 125), τα αντιγόνα που παρουσιάζονται από MHC μόρια, λόγω απουσίας συνδιέγερσης δε μπορούν να επάγουν T-κυτταρικές αντιδράσεις (114, 126) και τέλος, επί απουσίας βοήθειας από τα CD4+ T-κύτταρα, τα CD8+ T-κύτταρα δε μπορούν να προκαλέσουν ιστική βλάβη (114, 127).

β) *Εξάλειψη/Διαγραφή*: Η παρουσία αντιγόνων σε συνδυασμό με την απουσία συνδιέγερσης, όχι μόνο αποτρέπει τη διέγερση των T-λεμφοκυττάρων, αλλά επάγει και την εξάλειψή τους (114, 122, 124, 128). Ένας άλλος μηχανισμός εξάλειψης των T-λεμφοκυττάρων είναι η απουσία αυξητικών παραγόντων (129). Τέλος, η εξάλειψη των T-λεμφοκυττάρων μεσολαβείται από την οδό που εμπλέκει το μόριο Fas (CD95) και το συνδέτη του (Fas ligand). Από τη στιγμή που τα T-λεμφοκύτταρα εκφράζουν τόσο το μόριο Fas, όσο και το συνδέτη του, η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών μορίων μπορεί να επάγει την απόπτωση (130-132).

γ) *Ανεργία*: Τα T-λεμφοκύτταρα τα οποία δεν παράγουν IL-2, όταν συναντούν το αντιγόνο και για το λόγο αυτό δεν ενεργοποιούνται πλήρως ονομάζονται ανεργικά (anergic). Η ανεργία μπορεί να έχει πολλές συνέπειες, επειδή συγκεκριμένα ανεργικά T-κύτταρα παράγουν IL-10, η οποία καταστέλλει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων (133-137).

δ) *Αναστολή*: Το μόριο CD152 (αναφέρεται επίσης ως κυτταροτοξική-σχετιζόμενη με τα Τ-λεμφοκύτταρα πρωτεΐνη 4, cytotoxic-T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4) στα Τ-λεμφοκύτταρα προσδένει τα μόρια CD80 (B7-1) και CD86 (B7-2) στα Β-λεμφοκύτταρα με υψηλότερη συγγένεια σε σχέση με τον συνδिएγερτικό υποδοχέα CD28. Με αυτό τον τρόπο, το CD152 αναστέλλει την ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων (138).

Διάσπαση της ανοσολογικής ανοχής - Αυτοανοσία

Τα τελευταία χρόνια, έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί για τη διάσπαση της ανοσολογικής ανοχής και την ανάπτυξη αυτοανοσίας.

α) *Ενεργοποίηση των δυνητικά αυτοδραστικών Τ-λεμφοκυττάρων του φυσιολογικού ανοσολογικού συστήματος από λοιμώδεις παράγοντες*: Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι οι λοιμώξεις συμβάλλουν στην παθογένεια αυτοανόσων νόσων. Πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους συμβαίνει αυτό περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση μεγάλου αριθμού Τ-λεμφοκυττάρων από υπεραντιγόνα (139) (αντιγόνα που ενεργοποιούν μαζικά πολλά Τ-λεμφοκύτταρα, ανεξάρτητα από την ειδικότητά τους), όπως και την απελευθέρωση απομονωμένων αυτοαντιγόνων μέσω ιστικής καταστροφής (140) και την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών και συνδिएγερτικών μορίων από μικροβιακά προϊόντα (by-stander activation) (141-145).

β) *Διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ ξένου αντιγόνου και αυτοαντιγόνου για τον ίδιο υποδοχέα αντιγόνου (μοριακή μίμηση)*: Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, παθογόνο μικρόβιο ή ιός εκφράζει πρωτεΐνη, τμήμα της

οποίας μοιάζει στη δομή ή στην αλληλουχία αμινοξέων με ανθρώπινη πρωτεΐνη. Το τμήμα αυτό της πρωτεΐνης του παθογόνου ενεργοποιεί αυτοδραστικά T-λεμφοκύτταρα (146-150).

γ) *Εξάπλωση επιτόπου (epitope spreading)*: Εξάπλωση επιτόπου είναι η διαδικασία κατά την οποία επίτοπος ξεχωριστός και μη παρουσιάζων διασταυρούμενη αντίδραση με τον αρχικό επίτοπο της ανοσολογικής απάντησης, αλλά ευρισκόμενος στο ίδιο αντιγονικό σύμπλεγμα με τον αρχικό επίτοπο, γίνεται ο κύριος στόχος της ανοσολογικής απάντησης. Η αρχική απάντηση μπορεί να είναι έναντι ξένου αντιγόνου (151).

δ) *Τροποποιημένα «ίδια» αντιγόνα - Προσκόλληση ξένης απτίνης σε μακρομόριο κυτταρικής επιφάνειας με αποτέλεσμα τη δημιουργία αντισωμάτων με δράση αυτοαντισώματος*: Η σύνδεση των «ιδίων» αντιγόνων με απτίνες έχει ως αποτέλεσμα να αναγνωρίζονται από τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα ως ξένα. Η αναγνώριση αυτή συνεπάγεται τη διέγερση των B-λεμφοκυττάρων προς παραγωγή αντισωμάτων, τα οποία στρέφονται έναντι των «ιδίων» επιτόπων του συμπλέγματος απτίνης/«ιδίου» αντιγόνου (10,152,153).

ε) *Αναστολή της δράσης των κατασταλτικών T-λεμφοκυττάρων*: Η αναστολή της δράσης των κατασταλτικών T-λεμφοκυττάρων ενδέχεται να αποτελεί αίτιο εκδήλωσης της δραστηριότητας των αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων (10, 154, 155).

στ) *Σωματικές υπερμεταλλάξεις*: Στην εκδήλωση των αυτοάνοσων νοσημάτων, ενδέχεται να συμβάλλει κάποια διαταραχή στη ρύθμιση των σωματικών υπερμεταλλάξεων των B-λεμφοκυττάρων (156, 157).

ζ) *Ο ρόλος της απόπτωσης*: Φαίνεται ότι η απόπτωση κυττάρων κάνει προσιτό στα λεμφοκύτταρα μεγάλο αριθμό ενδοκυτταρικών αντιγόνων και έτσι ευνοεί την αυτοανοσία. Από το άλλο μέρος όμως, η καταστολή της απόπτωσης των λεμφοκυττάρων παρατείνει την επιβίωσή τους, και κατά συνέπεια και την επιβίωση των αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων (158).

Ο ρόλος των γενετικών παραγόντων

Η συμβολή των γενετικών παραγόντων στην παθογένεια των αυτοανόσων νοσημάτων υποδηλώνεται τόσο από την οικογενή εμφανισή τους, όσο και από την αυξημένη επίπτωσή τους στους διδύμους (10, 159). Την επιβεβαίωση, όμως, της γενετικής βάσης των αυτοανόσων νόσων παρέχει η σύνδεσή τους με συγκεκριμένα MHC-γονίδια. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, έχει εστιαστεί στα αντιγόνα HLA, δεδομένης της σχέσης των μορίων αυτών στην αναγνώριση των αντιγόνων. Ειδικότερο ενδιαφέρον έχουν τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης II, δεδομένου ότι αυτά συμμετέχουν τόσο στην επιλογή, όσο και στην ενεργοποίηση των CD-4+ T-λεμφοκυττάρων.

Οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους τα HLA-αντιγόνα συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου δεν είναι σαφείς. Φαίνεται πάντως ότι η συμμετοχή των μορίων αυτών γίνεται με συγκεκριμένους επιτόπους και πάντα σε συνδυασμό με πεπτιδικά αντιγόνα. Έχουν προταθεί τρεις πιθανοί μηχανισμοί: α) Συμμετοχή «ειδικών» HLA απλοτύπων σε θετική επιλογή T-λεμφοκυτταρικών κλώνων κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του T-λεμφοκυττάρου

στο θύμο με ταυτόχρονη κατάργηση της ανοσολογικής ανοχής, β) Αναγνώριση πεπτιδικών αντιγόνων από τον TCR, τα οποία είναι συνδεδεμένα με HLA-αντιγόνα στους περιφερικούς ιστούς και γ) Ανοσολογική απόκριση κατά ενός πεπτιδίου του αντιγόνου HLA, που εμφανίζει μοριακή μίμηση με ιικά ή μικροβιακά αντιγόνα (160). Για την έκφραση της νόσου, σε μερικές περιπτώσεις, αρκεί ένα συγκεκριμένο αλληλίο, ενώ σε άλλες περιπτώσεις, θα πρέπει να συνεκφράζονται δύο ή περισσότερα αλληλία που βρίσκονται μεταξύ τους σε σύνδεση εξαναγκαστικής ισορροπίας. Επιπλέον, ορισμένες φορές, αρκεί η έκφραση μίας ειδικής αλληλουχίας αμινοξέων στο αντιγόνο HLA, η οποία επιτρέπει τη σύνδεση του αντιγόνου και την παρουσίασή του στον TCR. Η αλληλουχία αυτή είναι δυνατόν να βρίσκεται σε διαφορετικά HLA αντιγόνα και ονομάζεται κοινός επίτοπος. Από τη θεωρία του κοινού επιτόπου εξηγείται γιατί στην ίδια νόσο παρατηρούνται πολλές φορές διαφορετικοί απλότυποι HLA (3, 161).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η έκφραση ενός συγκεκριμένου γονιδίου HLA δεν αποτελεί από μόνη της την αιτία εκδήλωσης αυτοανοσίας, αλλά είναι συμπράγοντας, δεδομένου ότι για την εμφάνιση μίας αυτοάνοσης νόσου συμμετέχουν περιβαλλοντικοί, ενδοκρινικοί (π.χ. οιστρογόνα) και λοιποί παράγοντες (162).

Αυτοαντισώματα

Τα αυτοαντισώματα αποτελούν σημαντικούς παράγοντες της αυτοανοσίας καθώς επιτελούν σπουδαίο ρόλο στην εμφάνιση των αυτοανόσων νόσων. Ως φυσικά αυτοαντισώματα περιγράφονται κυκλοφορούντα αντισώματα που ανευρίσκονται σε υγιή άτομα και τα οποία έχουν παραχθεί χωρίς να έχει προηγηθεί εμφανής εξωγενής αντιγονική διέγερση. Γενικά, θεωρείται ότι πρόκειται κυρίως για IgM αντισώματα, τα οποία παρουσιάζουν πολυειδικότητα, αλλά χαμηλή συγγένεια έναντι ενός ευρέος φάσματος «ιδίων» ή και ξένων αντιγόνων (163). Τα φυσικά αυτοαντισώματα αναγνωρίζουν κυρίως φυλογενετικά σταθερά αντιγόνα (όπως για παράδειγμα πυρηνικά οξέα ή πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού), προσδένουν το συμπλήρωμα και αποτελούν σημαντικό μέρος των κυκλοφορούντων αντισωμάτων, με αποτέλεσμα να θεωρούνται υπεύθυνα για τις τιμές οπτικής πυκνότητας που δίνουν οι αρνητικοί μάρτυρες (background) σε όλες τις δοκιμασίες προσδιορισμού των αυτοαντισωμάτων (164, 165).

Ειδικότερα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα φυσικά αυτοαντισώματα είναι πρόδρομοι των αντισωμάτων που παράγονται μετά από την ανοσοποίηση με εξωγενή αντιγόνα, αλλά και των αυτοαντισωμάτων που χαρακτηρίζουν τα αυτοάνοσα νοσήματα (166). Υποστηρίζεται ότι η ανοσοποίηση με εξωγενές αντιγόνο προκαλεί μία σειρά γεγονότων, όπως για παράδειγμα σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια της βλαστικής σειράς που κωδικοποιούν την παραγωγή των φυσικών αυτοαντισωμάτων, με κατ'αρχήν αποτέλεσμα την αναγνώριση του «ιδίου» και με κατάληξη την αναγνώριση και αντίδραση με τα εξωγενή αντιγόνα. Μία σειρά παρατηρήσεων υποδηλώνει ότι

σημαντικό μέρος των αυτοαντισωμάτων που εμφανίζονται σε παθολογικές καταστάσεις δε διαφέρουν ποιοτικά από τα φυσικά αντισώματα. Στα αυτοάνοσα νοσήματα, τόσο η εντόπιση φυσικών αυτοαντισωμάτων στους ιστούς που αποτελούν στόχους της αυτοάνοσης προσβολής, όσο και η δημιουργία από αυτά κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων, συνηγορούν για την παθογένεια αυτών των νόσων, αν και ο ακριβής ρόλος τους παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστος (10, 167-169).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

Ο ρόλος του ήπατος ως ανοσολογικό όργανο καταδεικνύεται με τον καλύτερο δυνατό τρόπο στις αυτοάνοσες και ιογενείς παθήσεις του οργάνου αυτού. Η συνεχής έκθεση στα αντιγόνα που φθάνουν στο ήπαρ μέσω της πλούσιας αιματικής ροής της πυλαίας και συστηματικής κυκλοφορίας και από το έντερο με το μηχανισμό της διαπίδυσης (translocation) απαιτεί οργανωμένη ανοσολογική απάντηση, η οποία ρυθμίζεται τοπικά (170, 171).

ΗΠΑΡ ΚΑΙ ΑΡΧΕΓΟΝΗ ΑΝΟΣΙΑ

Στην ανοσολογία του ήπατος κυρίαρχο ρόλο επιτελούν τα στοιχεία της αρχέγονης ανοσίας. Η εντόπιση μεγάλου αριθμού κυττάρων και παραγόντων της αρχέγονης ανοσολογικής απάντησης στο ήπαρ καθιστούν εμφανή τον κεντρικό ανοσολογικό ρόλο του ήπατος και τονίζουν τη συμμετοχή του στην τοπική και συστηματική άμυνα.

Στοιχεία της αρχέγονης ανοσολογικής, τα οποία είναι ενεργά στο ήπαρ περιλαμβάνουν τα δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα ή κύτταρα Kupffer, τα δενδριτικά κύτταρα, τα NK-κύτταρα, τα NKT-κύτταρα, τις κυτταροκίνες, το συμπλήρωμα και τις πρωτεΐνες οξείας φάσης (172).

Δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα (κύτταρα Kupffer)

Τα κύτταρα Kupffer αντιπροσωπεύουν τον μεγαλύτερο αριθμό ιστικών μακροφάγων στον ανθρώπινο οργανισμό (172, 173). Εκτός από το γεγονός ότι είναι ενεργά φαγοκύτταρα, τα κύτταρα Kupffer εκκρίνουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (inflammatory cytokines), κυρίως ιντερλευκίνη-1 (IL-1), ιντερλευκίνη-6 (IL-6), όπως και TNF- α και GM-CSF. Επιπλέον, συμβάλλουν στην κάθαρση νεκρών βακτηριακών κυττάρων και κυτταρικών στοιχείων του αίματος (174). Τα κύτταρα Kupffer εκφράζουν στην επιφάνειά τους μία ποικιλία υποδοχέων που εμπλέκονται στην ανοσολογική απάντηση (175), όπως υποδοχείς συμπληρώματος, Fc-υποδοχείς, Toll-like υποδοχείς (TLRs), υποδοχείς προσκόλλησης (ICAM-1) και υποδοχείς για πολυσακχαρίδη των εισβολέων (176). Ακόμη, εκφράζουν Fc γ υποδοχείς υψηλής συγγένειας, οι οποίοι διευκολύνουν τη φαγοκυττάρωση μικροοργανισμών επικαλυμμένων με IgG ανοσοσφαιρίνη και υποδοχείς για IgA ανοσοσφαιρίνη (177). Η ικανότητά τους αυτή να προσδένουν μικροοργανισμούς επικαλυμμένους με IgA αποτελεί μια σημαντική «άμυνα δεύτερης γραμμής», σε περίπτωση αποτυχίας των αμυντικών φραγμών του εντερικού βλεννογόνου. Τέλος, τα κύτταρα Kupffer εκφράζουν υποδοχείς γαλακτόζης, μαννόζης (178) και υποδοχείς-ρακοσυλλέκτες (scavenger receptors), οι οποίοι προσδένουν άμεσα μικροβιακά επιφανειακά στοιχεία. Αν και τα κύτταρα Kupffer φαίνεται ότι προέρχονται από μονοκύτταρα του μυελού των οστών, εμφανίζουν και μικρού βαθμού αυτοαναγέννηση (179).

Ηπατικά δενδριτικά κύτταρα

Τα δενδριτικά ηπατικά κύτταρα έχουν τον φαινότυπο ανώριμων δενδριτικών κυττάρων και εκφράζουν σε χαμηλό βαθμό μόρια MHC-II, όπως επίσης και συνδιεγερτικά μόρια CD80 και CD86 (180, 181). Τα ηπατικά δενδριτικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν από τα ηπατικά αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα που εκφράζουν μυελικούς δείκτες αφού οι κυτταροκίνες που απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό των τελευταίων, όπως οι ιντερλευκίνη-7 (IL-7), ιντερλευκίνη-40 (IL-40) και ιντερλευκίνη-15 (IL-15) βρίσκονται και στο ήπαρ (182, 183). Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι ο TGF-β που εκφράζεται από τα ηπατοκύτταρα αναστέλλει την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και την μετατροπή τους σε ενεργά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Γενικά πάντως, φαίνεται ότι ο ρόλος των δενδριτικών κυττάρων στο ήπαρ είναι η επαγωγή της ανοχής και λιγότερο η ενεργοποίηση των CD4 λεμφοκυττάρων (180, 181).

Κύτταρα φυσικοί-φονείς στο ήπαρ (NK κύτταρα)

Τα NK-κύτταρα, κύτταρα «κλειδιά» στην αρχέγονη ανοσολογική απάντηση, είναι ο κυρίαρχος ηπατικός λεμφοκυτταρικός πληθυσμός, αντιπροσωπεύοντας πάνω από το 50% των λεμφοκυττάρων στο υγιές ήπαρ (184). Μάλιστα, σε ηπατικές κακοήθειες, το ποσοστό του συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού ανέρχεται στο 90% των ηπατικών λεμφοκυττάρων (185, 186). Πρωτεύων ρόλος τους είναι η ανοσολογική επιτήρηση για όγκους ή μεταστατικά καρκινικά κύτταρα και κύτταρα που έχουν μολυνθεί με ιούς

(187, 190). Ο υψηλότερος αριθμός NK κυττάρων στο ήπαρ σε σύγκριση με το περιφερικό αίμα αντικατοπτρίζεται από τα υψηλότερα επίπεδα της ηπατικής NK κυτταροτοξικής δραστηριότητας (191).

Έχουν περιγραφεί δύο πληθυσμοί NK-κυττάρων: α) Τα NK-κύτταρα, τα οποία εκφράζουν υψηλά επίπεδα CD56 και χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να παράγουν IFN- γ , αλλά εμφανίζουν μικρή κυτταροτοξική δραστηριότητα και β) Τα NK-κύτταρα, τα οποία εκφράζουν χαμηλά επίπεδα CD56, εμφανίζουν ικανή κυτταροτοξική δράση και χαμηλή παραγωγή IFN- γ (192, 193).

Ηπατικά T-κύτταρα με υποδοχείς NK-κυττάρων

Ορισμένοι πληθυσμοί των ηπατικών λεμφοκυττάρων συνεκφράζουν υποδοχείς NK-κυττάρων (CD56) και T-κυττάρων (CD3) και είναι τα επονομαζόμενα NKT-κύτταρα. Οι πληθυσμοί αυτοί παρουσιάζουν ταχεία, μη περιοριζόμενη από τα MHC μόρια κυτταροτοξική δράση και έκκριση Th1 και Th2 κυτταροκινών και προάγουν την εξέλιξη των δενδριτικών κυττάρων σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (194, 195). Θεραπευτική ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών προάγει την αποτελεσματική καταπολέμηση κυττάρων όγκων, πρόληψη της εκδήλωσης αυτοανοσίας και ενίσχυση της ανοσολογικής απάντησης ενάντια στη λοίμωξη σε πειραματικά μοντέλα ποντικών (195, 196).

ΗΠΑΡ ΚΑΙ ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ

Οι μηχανισμοί της επίκτητης ανοσίας στο ήπαρ συνεισφέρουν στην αποτελεσματική άμυνα έναντι των μικροοργανισμών και επιτελούν καθοριστικό ρόλο στις διάφορες παθολογικές καταστάσεις του οργάνου αυτού.

Οι πληθυσμοί των ηπατικών λεμφοκυττάρων και τα ποσοστά τους στο υγιές ήπαρ διαφέρουν σε σχέση με αυτά στο περιφερικό αίμα (197). Στην κυκλοφορία, κυριαρχούν τα T-λεμφοκύτταρα, τα οποία εκφράζουν τον αβ-TCR. Στο ήπαρ, τα αβ T-λεμφοκύτταρα αποτελούν λιγότερο από το μισό των ηπατικών λεμφοκυττάρων, ενώ σε σχετική αφθονία βρίσκονται τα γδ T-λεμφοκύτταρα. Όσον αφορά στα B-λεμφοκύτταρα, αυτά υπό-αντιπροσωπεύονται στο ήπαρ σε σύγκριση με το περιφερικό αίμα (3-6%). Η βιολογική βάση για τις διαφορές αυτές αποτελεί ακόμη αντικείμενο μελέτης.

Ηπατικά T-λεμφοκύτταρα

Η πλειονότητα των ηπατικών T-λεμφοκυττάρων μπορεί να εκκρίνει φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (198), οι οποίες συμπεριλαμβάνουν IFN- γ , TNF και IL-2 και μπορεί να αποτελούν ανταπόκριση στις επάγουσες τη φλεγμονή κυτταροκίνες που παράγονται από τα ηπατοκύτταρα και τα κύτταρα Kupffer (199, 200). Περίπου το 5% των ανθρώπινων ηπατικών T-λεμφοκυττάρων παράγουν IL-4 (198). Τα περισσότερα T-λεμφοκύτταρα, τα οποία παράγουν IL-4 παράγουν και IFN- γ , γεγονός που υποδεικνύει ότι είναι Th0 κύτταρα και όχι συμβατικά Th2 κύτταρα (198, 201). Τα Th0 κύτταρα είναι είτε

αδιαφοροποίητα, είτε ρυθμιστικά κύτταρα και υπάρχουν ενδείξεις ότι κύτταρα τύπου Th0 και Th2 υπάρχουν στο ήπαρ. Επομένως, τα ηπατικά T-λεμφοκύτταρα αποτελούν έναν ετερογενή πληθυσμό, ο οποίος διαθέτει επιπλέον λειτουργικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τα κλασσικά T-λεμφοκύτταρα.

Στο ήπαρ, η τυπική αναλογία CD4+:CD8+ 3:2, η οποία βρίσκεται στο περιφερικό αίμα, είναι ανεστραμμένη (περίπου 1:2,5). Επίσης, στο ήπαρ η πλειονότητα των T-λεμφοκυττάρων εκφράζει το CD8, ενώ εμφανίζεται ένας σημαντικός αριθμός T-κυττάρων τα οποία δεν εκφράζουν ούτε CD4, ούτε CD8 (διπλά αρνητικά T-λεμφοκύτταρα). Πολλά από τα T-λεμφοκύτταρα στο ήπαρ εκφράζουν δείκτες προηγούμενης ενεργοποίησης, όπως CD44 και CD25 (202). Έτσι, τα T-λεμφοκύτταρα στο ήπαρ αποτελούν συνδυασμό κυττάρων που εδρεύουν στο ήπαρ και T-λεμφοκυττάρων που ενεργοποιούνται εξωηπατικά και μεταναστεύουν στο ήπαρ (203). Τα CD4+ αβ T-λεμφοκύτταρα παράγουν κυτταροκίνες που δρουν ως σηματοδοτικά μόρια και επιτελούν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία αποτελεσματικής ή παθολογικής ανοσολογικής απάντησης. Τα CD8+ T-λεμφοκύτταρα είναι επιφορτισμένα με την εξάλειψη ενδοκυττάρων παθογόνων και ειδικότερα ιών. Η εξάλειψη των ηπατοτρόπων ιών από τα CD8+ με τη συμμετοχή των κυτταροκινών, όπως ο TNF-α και η IFN-γ, στηρίζεται σε μηχανισμούς που αναστέλλουν τον αναδιπλασιασμό του ιού, διατηρώντας όμως το ηπατοκύτταρο (204, 205).

Όσον αφορά στα T-reggs, αλλαγή στον αριθμό ή στη λειτουργία τους φαίνεται ότι σχετίζεται με την εμφάνιση αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος (206-208) και με την καταστολή της ανοσολογικής απάντησης ενάντια σε

καρκινικά κύτταρα (209) και σε ηπατοκύτταρα προσβεβλημένα από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) (210).

B-Λεμφοκύτταρα

Σε αντίθεση με τα T-λεμφοκύτταρα, λίγα είναι γνωστά για το ρόλο των B-λεμφοκυττάρων στο ήπαρ ή στις παθήσεις που εμπλέκονται στην ανοσολογία του ήπατος (211). Τα B-λεμφοκύτταρα βρίσκονται σε μικρούς αριθμούς στο υγιές ήπαρ (212) και βρίσκονται στα πυλαία διαστήματα και στο παρέγχυμα (213). Για παράδειγμα, ενδοηπατικά πλασματοκύτταρα είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της αυτοάνοσης ηπατίτιδας (AH) (214). Παρόλα αυτά, δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρο αν η χυμική ανοσολογική απάντηση συμμετέχει στην παθογένεια φλεγμονωδών διεργασιών σε αυτοάνοσα και ιογενή νοσήματα του ήπατος. Παρόλο που παράγοντες της χυμικής ανοσίας, όπως για παράδειγμα τα αντισώματα, κατέχουν σημαντικό ρόλο στη διάγνωση παθήσεων του ήπατος, η κυτταρική ανοσολογική απάντηση είναι αυτή που τελικά καθορίζει την εμφάνιση και την έκβαση των ηπατικών νοσημάτων.

ΑΝΤΙΓΟΝΟΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΣΤΟ ΗΠΑΡ

Το ήπαρ διαθέτει ένα σύνολο κυττάρων τα οποία έχουν την ικανότητα να επεξεργάζονται και να παρουσιάζουν τα αντιγόνα. Τα ηπατικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα παίζουν καταλυτικό ρόλο στη ρύθμιση της

αρχέγονης και επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης και στην επαγωγή της ανοσολογικής ανοχής.

Το μικροπεριβάλλον στο οποίο τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα αναπτύσσονται ή ενεργοποιούνται επηρεάζει τις λειτουργίες τους και την επίδρασή τους στους T-κυτταρικούς πληθυσμούς (171, 215, 216). Το υγιές ήπαρ διαθέτει τρεις πληθυσμούς αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, των οποίων οι φαινότυποι και οι λειτουργίες διαφέρουν σημαντικά. Και οι τρεις πληθυσμοί ενδοκυττάρων αντιγόνα με τους μηχανισμούς της φαγοκυττάρωσης και διαμεσολαβούμενης από υποδοχείς ενδοκυττάρωσης ή πινοκυττάρωσης (171, 217).

Κύτταρα Kupffer

Έχει δειχθεί ότι τα κύτταρα Kupffer παρουσιάζουν αντιγόνα και ενεργοποιούν CD4+ T-λεμφοκύτταρα *in vitro*, αλλά είναι λιγότερο αποτελεσματικά σε σχέση με τα μακροφάγα που προέρχονται από το σπλήνα και το μυελό των οστών (218-221). Τα κύτταρα Kupffer εκφράζουν μόρια MHC τάξης I και II και επίσης συνδιεγερτικά μόρια σε μικρότερο βαθμό (222) και μπορούν να επάγουν ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Η ικανότητα δράσης των κυττάρων Kupffer ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μπορεί να τροποποιηθεί από ενδογενή σήματα (223, 224), εναλλάσσοντας έτσι τον ρόλο των κυττάρων Kupffer από επάγοντα την ανοσολογική ανοχή αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα σε ανοσογόνα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.

Ενδοθηλιακά κύτταρα των ηπατικών κολποειδών (Liver Sinusoidal Endothelial Cells, LSECs)

Η αντιγονοπαρουσίαση από LSECs δεν είναι νέο φαινόμενο και συμβαίνει επίσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα μεγάλων και μικρών αγγείων διαφόρων οργάνων (225-228). Τα LSECs εκφράζουν υποδοχείς μαννόζης και υποδοχείς «ρακοσυλλέκτες» που εξυπηρετούν την αποτελεσματική πρόσληψη του αντιγόνου με το μηχανισμό της διαμεσολαβούμενης από υποδοχείς ενδοκυττάρωσης. Ακόμη, τα LSECs εκφράζουν επιφανειακά συνδεδεργετικά μόρια (CD40, CD80 και CD86), όπως επίσης και MHC τάξης I και II μόρια, τα οποία είναι απαραίτητα για την παρουσίαση του αντιγόνου στα T-λεμφοκύτταρα. Σε αντίθεση με τα ενδοθηλιακά κύτταρα στα άλλα όργανα, όπως το δέρμα, το έντερο ή οι πνεύμονες, τα LSECs επάγουν τον πολλαπλασιασμό (proliferation) και την παραγωγή κυτταροκινών στα CD4+ και CD8+ T-κυττάρων *in vitro*, χωρίς την ανάγκη για διέγερσή τους με IFN- γ ή TNF- α . Η αντιγονοπαρουσίαση από τα LSECs ελέγχεται αυστηρά από διαμεσολαβητές στο τοπικό μικροπεριβάλλον, όπως η προσταγλανδίνη E2 και η IL-10 (229), τα οποία εκφράζονται από άλλους ηπατικούς πληθυσμούς. Επιπλέον, δεν απαιτείται να ολοκληρωθεί η ωρίμανση των LSECs για να εκδηλώσουν τις αντιγονοπαρουσιαστικές τους λειτουργίες, αλλά μπορούν παράλληλα με τη διαδικασία της ωρίμανσης να ενδοκυτταρώσουν, να επεξεργαστούν και να παρουσιάσουν τα αντιγόνα στα T-λεμφοκύτταρα (186).

Δενδριτικά Κύτταρα

Η μορφολογία και η κινητικότητα των δενδριτικών κυττάρων συμβάλλουν στην αποτελεσματική πρόσληψη, επεξεργασία και παρουσίαση των αντιγόνων στα Τ-λεμφοκύτταρα. Σε μη λεμφικούς ιστούς, τα δενδριτικά κύτταρα λειτουργούν ως «ανώριμα» αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, τα οποία όμως είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην εναπόθεση αντιγονικών κλασμάτων σε τάξης II MHC μόρια για παρουσίαση στα CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα. Για τη δημιουργία κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων, τα δενδριτικά κύτταρα πρέπει να παρουσιάσουν αντιγονικά πεπτίδια συνδεδεμένα με MHC τάξης I μόρια στα CD8+ Τ-λεμφοκύτταρα (222-230).

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΙΝΩΣΗΣ ΣΤΟ ΗΠΑΡ

Βασικό χαρακτηριστικό των χρόνιων ηπατικών νόσων αποτελούν η χρόνια φλεγμονή, η κυτταρική βλάβη, η αναγέννηση και η ίνωση.

Στο ήπαρ, η φλεγμονώδης αντίδραση πυροδοτεί διαφορετικές οδούς συσσώρευσης και μετανάστευσης των λευκοκυττάρων, οι οποίες πιθανότατα σχετίζονται με το είδος της προσβολής του οργάνου. Αυτές οι οδοί εμπλέκουν τα πυλαία διαστήματα, τα κολποειδή και την πυλαία φλέβα. Άλλα στοιχεία που εμπλέκονται στη φλεγμονώδη διεργασία είναι τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα Β-λεμφοκύτταρα, τα πλασματοκύτταρα, τα ιστιοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα ουδετερόφιλα, τα NK-κύτταρα και τα σιτευτικά κύτταρα (231, 232).

Τα λευκοκύτταρα τα οποία συσσωρεύονται στο ήπαρ κατά τη διάρκεια τραυματισμού σε συνδυασμό με τα κύτταρα Kupffer, παράγουν παράγοντες

που τροποποιούν τη συμπεριφορά των αστεροειδών κυττάρων. Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα εμπλέκονται στη φλεγμονή, παράγοντας μεγάλα ποσά νιτρικού οξειδίου (NO) και φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως για παράδειγμα ο TNF- α , οι οποίες έχουν άμεση διεγερτική δράση στην παραγωγή κολλαγόνου από τα αστεροειδή κύτταρα. Τα κύτταρα Kupffer από την άλλη, μπορούν να διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απελευθέρωση ρετινοειδών από τα αστεροειδή κύτταρα, μέσω της δράσης κυτταροκινών, όπως ο TGF- β και δραστικών ενδιάμεσων ενώσεων του οξυγόνου (reactive oxygen intermediates). Ακόμη, τα κύτταρα Kupffer έχουν ενοχοποιηθεί στον ηπατικό τραυματισμό και ιδιαίτερα στον προκαλούμενο από ενδοτοξίνη τραυματισμό, ενώ εκφράζουν παράγοντες που σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο/απόπτωση, όπως TNF- α , το σχετιζόμενο με τον TNF προσδέτη που επάγει την απόπτωση (TNF related apoptosis inducing ligand-TRAIL) και τον Fas ligand (233-237). Νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η επαγόμενη από υποδοχείς απόπτωση συνεισφέρει στην ηπατική φλεγμονή και ίνωση (238-242). Οι Fas αγωνιστές επάγουν έκφραση χημειοκινών στο ήπαρ, προάγουν τη διήθηση ουδετεροφίλων στο ήπαρ και διεγείρουν την ηπατική ινογένεση (243).

Οι μηχανισμοί με τους οποίους η απόπτωση μπορεί να προάγει τη φλεγμονή και την ίνωση μπορεί να σχετίζονται με αρχόμενες από υποδοχείς αντιδράσεις, δευτερογενή νέκρωση των αποπτωτικών κυττάρων ή ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων μετά την εγκύστωση αποπτωτικών σωματίων. Η φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών σωματιδίων διεγείρει την παραγωγή του TGF- β στο ήπαρ, μίας κυτταροκίνης που προκαλεί ίνωση.

Εγκύστωση των αποπτωτικών σωματίων των ουδετεροφίλων από τα μακροφάγα έχει επίσης αναφερθεί ότι επάγει την έκφραση του Fas ligand (244, 245). Επιπλέον, η εγκύστωση των αποπτωτικών σωματιδίων από τα αστεροειδή κύτταρα έχει πρόσφατα δειχθεί ότι ενεργοποιεί την ενεργοποίηση και έκφραση του κολλαγόνου (246).

Η ηπατική διήθηση των ουδετεροφίλων ή η διήθηση του ήπατος από ουδετερόφιλα συμβαίνει συχνά στην αλκοολική νόσο του ήπατος. Η εξαγγείωση και μετανάστευση των ουδετεροφίλων στο ηπατικό παρέγχυμα είναι κριτικής σημασίας για επαγόμενο από ουδετερόφιλα τραυματισμό και κυτταροτοξικότητα (247).

Ο ρόλος των αστεροειδών κυττάρων

Στο ήπαρ, τα αστεροειδή κύτταρα βρίσκονται στο χώρο του Disse σε στενή επαφή με τα ηπατοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και εκφράζουν βιμεντίνη, δεσμίνη και ακτίνη (248). Ως συνέπεια της χρόνιας ιστικής βλάβης, τα αστεροειδή κύτταρα, όπως και οι ινοβλάστες ή οι μυοϊνοβλάστες, υφίστανται μία διαδικασία ενεργοποίησης, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένο πολλαπλασιασμό, κινητικότητα, συσπαστικότητα και αυξημένη σύνθεση στοιχείων της εξωκυττάριας ουσίας. Η ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων ρυθμίζεται από διάφορους διαλυτούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των κυτταροκινών, χημειοκινών, αυξητικών παραγόντων και προϊόντων οξειδωτικού stress, όπως επίσης από εκτεταμένες αλλαγές στη σύνθεση και στην οργάνωση των στοιχείων της

εξωκυττάριας ουσίας. Τα αστεροειδή κύτταρα φαίνεται ακόμη ότι κατέχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της τριχοειδικής αιματικής ροής και του τόνου των τριχοειδών, επηρεάζοντας έτσι την αντίσταση των τελευταίων σε περιπτώσεις ηπατικής βλάβης, ενώ συμβάλλουν στην αλλαγή της δομής των κολποειδών στα αρχικά στάδια της ίνωσης. Επέρχεται, έτσι, συσσώρευση ινώδους εξωκυττάριας ουσίας στο χώρο του Disse, γεγονός που επιφέρει διαταραχές στην ανταλλαγή μεταβολικών στοιχείων μεταξύ του αίματος και των ηπατοκυττάρων. Η τριχοειδοποίηση των κολποειδών πιθανότατα είναι η αρχική αιτία ανάπτυξης πυλαίας υπέρτασης κατά την ανάπτυξη της ηπατικής ίνωσης, συνεισφέροντας στην παρακώλυση της κολποειδικής ροής που με τη σειρά της επιφέρει αντικατάσταση του παρεγχύματος από μεσεγχυματικά στοιχεία (249).

Ο ρόλος των κυτταροκινών

Από τις κυτταροκίνες και τους αυξητικούς παράγοντες, ο TGF-β και η IL-6 είναι οι κυριότεροι παράγοντες της ίνωσης. Ο TGF-β έχει ρόλο-κλειδί στην ίνωση, ενεργοποιώντας τόσο τα φλεγμονώδη κύτταρα, όπως και τα αστεροειδή κύτταρα. Ο TGF-β παράγεται από τα κύτταρα Kupffer και τα αστεροειδή κύτταρα και ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων του κολλαγόνου τύπου 1 και 2 (250, 251). Με τη σειρά της η IL-6 αυξάνει την έκφραση του TGF-β από τα αστεροειδή κύτταρα στο κίρρωτικό ήπαρ και ενισχύει την «*ινοποιητική*» του ικανότητα.

Η ίνωση στο ήπαρ

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η γνώση σχετικά με τους μηχανισμούς ίνωσης του ήπατος. Περίπλοκοι κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί ως αποτέλεσμα της χρόνιας ενεργοποίησης των μηχανισμών της ιστικής επανόρθωσης που ακολουθούν τον ιστικό τραυματισμό ενέχονται στην παθογένεια της ίνωσης. Η ηπατική ίνωση χαρακτηρίζεται από συσσώρευση πρωτεϊνών, ιδιαίτερα κολλαγόνου τύπου 1 και 3, όπως και άλλων στοιχείων της εξωκυττάριας ουσίας και συγκεκριμένα πρωτεογλυκανών, φιμπρονεκτίνης και λαμινίνης ως απάντηση στον ιστικό τραυματισμό (231, 232). Σημαντικός είναι και ο ρόλος των ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων στο ήπαρ, τα οποία υφιστάμενα απόπτωση, αποκαθιστούν τη φυσιολογική ιστική δομή (252). Όταν η ιστική βλάβη είναι χρόνια, η παραγωγή του κολλαγόνου υπερβαίνει την αποδόμησή του και οδηγεί στη δημιουργία ουλής. Καθώς η διεργασία της ίνωσης προχωρά από τη γεφυροποιό ίνωση στο σχηματισμό όζων, επέρχεται διαταραχή της αρχιτεκτονικής και τελικά κίρρωση.

Η ηπατική ίνωση είναι φυσική συνέπεια στην ηπατική βλάβη από αυτοάνοσες παθήσεις του ήπατος, ιογενείς ηπατίτιδες, χρήση οινόπνεύματος, παθήσεις των χοληφόρων, εναπόθεση σιδήρου και χαλκού. Οι διαφορετικές παθήσεις προκαλούν και διαφορετικά σχήματα ίνωσης, καθώς η ασθένεια εξελίσσεται. Έτσι, διακρίνονται δύο είδη ίνωσης: η πυλαία ίνωση και η κεντρική ίνωση. Τα νοσήματα που χαρακτηρίζονται από πυλαία ίνωση περιλαμβάνουν την ΑΗ, την πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΠΧΚ), την πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ), τις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες και την αιμοχρωμάτωση. Τα νοσήματα που χαρακτηρίζονται από κεντρική

ίνωση περιλαμβάνουν την αλκοολική και μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα και τις παθήσεις που προκαλούν χρόνια παρακώλυση της φλεβικής αιματικής ροής (253).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ/ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ/ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

Οι ανοσολογικές τεχνικές αποτελούν σημαντικό κεφάλαιο στη διάγνωση των αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος και βασίζονται κυρίως στην αλληλεπίδραση αυτοαντιγόνου-αυτοαντισώματος. Ποικιλία ανοσολογικών τεχνικών έχει αναπτυχθεί για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση αυτοαντισωμάτων, υποβοηθώντας έτσι τη έγκαιρη διάγνωση των αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος.

ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Ο ανοσοφθορισμός είναι μια συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος με πολλές πρακτικές εφαρμογές στην έρευνα και στην κλινική διαγνωστική. Ο ανοσοφθορισμός μπορεί να εφαρμοστεί σε μονιμοποιημένο ή νωπό υπόστρωμα. Σύμφωνα με τις βασικές αρχές της μεθόδου, αντισώματα είναι συνδεδεμένα με φθοριοχρώματα, όπως η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (fluorescein isothiocyanate, FITC). Τα σεσημασμένα αυτά αντισώματα προσδένονται αμέσως ή εμμέσως στο αντιγόνο, το οποίο ανιχνεύεται με

μικροσκόπηση σε ομοεστιακό μικροσκόπιο. Οι δύο κύριοι τύποι του ανοσοφθορισμού είναι ο έμμεσος και ο άμεσος. Κυρίως χρησιμοποιείται ο έμμεσος ανοσοφθορισμός, όπου το πρώτο αντίσωμα προσδένεται στο αντιγόνο μελέτης και κατόπιν στο σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος προσδένεται ένα δεύτερο αντίσωμα σεσημασμένο με φθοριόχρωμα. Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός παρέχει μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση σημάτων, όμως για το λόγο αυτό μπορεί να εμφανίσει και μεγαλύτερο μη ειδικό σήμα (background) (254-256).

ΑΝΟΣΟΔΙΑΧΥΣΗ

Η αρχή της παραπάνω μεθόδου στηρίζεται στο σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων τα οποία καθίζουν σε μήτρα γέλης, σχηματίζοντας ορατές γραμμές καθίζησης. Ο σχηματισμός ανοσοσυμπλεγμάτων εξαρτάται από το μοριακό βάρος του αντιγόνου, τη συγκέντρωση αντιγόνου-αντισώματος και τη σύσταση της μήτρας γέλης. Στην πράξη, το διάλυμα αντιγόνου τοποθετείται στο κέντρο της μήτρας-γέλης. Δείγματα ορού του ασθενούς σε διαφορετικές αραιώσεις τοποθετούνται περιφερικά. Μετά από επώαση, γραμμές καθίζησης γίνονται ορατές, αναδεικνύοντας έτσι την παρουσία του αντίστοιχου αυτοαντισώματος στον ορό του ασθενούς. Η γραμμές καθίζησης τείνουν να είναι πιο κοντά στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις αντισωμάτων (υψηλότερες αραιώσεις ορού), διότι όσο χαμηλότερη είναι η συγκέντρωση των αυτοαντισωμάτων, τόσο βραδύτερος είναι ο ρυθμός διάχυσης (257). Η παραπάνω μέθοδος είναι απλή και

οικονομική, αλλά στερείται της ταχύτητας και της ευαισθησίας για ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Πλέον στα σύγχρονα εργαστήρια χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους.

ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (WESTERN BLOT)

Η μέθοδος Western Blot ή ανοσοαποτύπωση είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος στην κυτταρική και μοριακή βιολογία για την ανίχνευση και ανάλυση των πρωτεϊνών. Χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για την ανίχνευση μίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε ένα μείγμα. Οι βασικοί άξονες της τεχνικής είναι οι ακόλουθοι: α) ο διαχωρισμός των επιμέρους πρωτεϊνών του μείγματος με βάση το μοριακό τους βάρος με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης γέλης, β) η επιτυχής μεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε στερεή φάση, και γ) η ανίχνευση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος χρησιμοποιώντας ειδικά σεσημασμένα αντισώματα (258-260).

ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ (ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSAY, ELISA)

Η ELISA αποτελεί μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων σχετικών με τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος. Η μέθοδος χρησιμοποιεί ένα σεσημασμένο με ένζυμο αντίσωμα, το οποίο προσδένεται σε ένα συγκεκριμένο αντιγόνο και με την προσθήκη ειδικού για το ένζυμο χρωμογόνου υποστρώματος παράγεται σήμα, το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί και να ποσοτικοποιηθεί. Η ELISA κυρίως χρησιμοποιεί

αντιγόνο προσδεδεμένο σε στερεά φάση, έτσι ώστε να είναι εφικτός ο διαχωρισμός των ανοσοσυμπλεγμάτων που σχηματίζονται από τα ελεύθερα σεσημασμένα αντισώματα. Ο σημαντικότερος παράγοντας στην ανάπτυξη μίας ELISA για τον προσδιορισμό αντισωμάτων είναι η καθαρότητα του αντιγόνου που προσροφάται στη στερεά φάση. Κατά την επίστρωση, το αντιγόνο πρέπει να παραμένει σταθερό και να διατηρεί την αντιγονικότητά του, ενώ ακινητοποιείται στη στερεά φάση παθητικά, μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Η προσρόφηση επηρεάζεται από το pH και την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος, στο οποίο αραιώνεται το αντιγόνο. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες για την άριστη επίστρωση του αντιγόνου είναι η συγκεντρωσή τους και η διάρκεια της επίστρωσης. Οι άριστες συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στην ELISA σχετίζονται άμεσα με τους χρόνους επώασης και τη θερμοκρασία. Για την ανίχνευση αντισωμάτων χρειάζεται να προκαθοριστούν η συγκέντρωση του αντιγόνου που θα προσροφηθεί και η αραιώση στην οποία θα εξετάζονται τα δείγματα. Επίσης προκαθορισμένη πρέπει να είναι και η άριστη αραιώση του συζεύγματος, η οποία αντιστοιχεί στη μεγαλύτερη αραιώση που δίνει την υψηλότερη τιμή απορρόφησης.

Η μη ειδική δέσμευση αποτελεί συχνό φαινόμενο, λόγω της σύνθετης φύσης πολλών δειγμάτων και αντιδραστηρίων και παρατηρείται συνήθως σε ορούς ασθενών με υπεργαμμασφαιριναιμία ή ρευματοειδή παράγοντα. Για την αποφυγή της χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι, όπως η προσθήκη μη ιονικών απορρυπαντικών στο διάλυμα αραιώσης και πλύσης (π.χ. Tween 20), η προσθήκη στο διάλυμα αραιώσης ουδέτερων ουσιών (π.χ. λευκωματίνη

βούς) και ο κορεσμός μετά από επίστρωση με το αντιγόνο των κενών θέσεων των μικροφρεατίων με τις παραπάνω πρωτεΐνες.

Η παραπάνω μέθοδος είναι απλή, αξιόπιστη και οικονομική, ενώ διαθέτει το πλεονέκτημα αυτοματοποίησης και εξαγωγής αποτελεσμάτων πολλών δειγμάτων σε μικρό χρόνο. Για τους λόγους αυτούς χρησιμοποιείται ευρέως για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων στο ορό ασθενών με υψηλή υποψία για αυτοάνοσα νοσήματα ήπατος (261-267).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ (ΑΗ)

Η ΑΗ είναι μία χρόνια αγνώστου αιτιολογίας νεκροφλεγμονώδης νόσος του ήπατος, η οποία υπερέχει μεταξύ των γυναικών και χαρακτηρίζεται από υπεργαμμασφαιριναιμία, περιπυλαία ηπατίτιδα ιστολογικά, συσχέτιση με τα μόρια HLA-DR3 ή DR4, σημαντική ανταπόκριση στην ανοσοκατασταλτική αγωγή και την ύπαρξη χαρακτηριστικών οργανοειδικών και μη οργανοειδικών αυτοαντισωμάτων (268, 269).

Η ΑΗ περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Waldenstrom το 1950. Αργότερα, ο Mackay αναφέρθηκε σε αυτή με τον όρο «*λυκοειδής ηπατίτιδα*», εξαιτίας των αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) που απαντώνται στη νόσο (270, 271). Ο ακριβής επιπολασμός της ΑΗ δεν είναι γνωστός. Ο μέσος υπολογιζόμενος επιπολασμός της νόσου στη βορειοδυτική Ευρώπη υπολογίζεται 160-170 ασθενείς ανά 1.000.000 κατοίκους, ενώ η μέση ετήσια επίπτωση κυμαίνεται μεταξύ 0,7-1,9 νέες περιπτώσεις/100.000 κατοίκους. Η ΑΗ επικρατεί μεταξύ των γυναικών (αναλογία ανδρων :γυναικών 1:4) αν και σήμερα είναι γνωστό ότι μπορεί να προσβάλει και τα δύο φύλα (30% των ασθενών αφορούν άνδρες) οποιασδήποτε ηλικίας και φυλής (272-275).

ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η έναρξη της ΑΗ στις περισσότερες περιπτώσεις (60%) είναι ύπουλη, καθώς υπάρχουν για μεγάλο χρονικό διάστημα πριν από τη διάγνωση γενικά μη ειδικά συμπτώματα, όπως κακουχία, ανορεξία, απώλεια βάρους, άλγος δεξιού υποχονδρίου, αρθραλγίες και μυαλγίες, αίσθημα αδυναμίας και εύκολη κόπωση. Μετρίου βαθμού πυρετική κίνηση έχει παρατηρηθεί. Η κλινική εξέταση είναι συνήθως χωρίς παθολογικά ευρήματα, ενώ μπορεί να διαπιστώνεται υπερτρίχωση, ακμή και σημεία χρόνιας ηπατικής νόσου, όπως πολλαπλές τηλεαγγειεκτασίες και ηπατοσπληνομεγαλία. Επίσης μπορεί να συνυπάρχουν αμηνόρροια και ίκτερος. Τη στιγμή της διάγνωσης το 33% των ασθενών έχουν ήδη αναπτύξει κίρρωση (276-279). Η ΑΗ μπορεί να εμφανιστεί ως οξεία ηπατίτιδα, ιδιαίτερα σε νέους ασθενείς, ενώ σπάνια και ιδιαίτερα σε παιδιά ηλικίας < 10 ετών μπορεί να εκδηλωθεί με τη μορφή της οξείας κεραυνοβόλου ηπατικής ανεπάρκειας (2-8% του συνόλου των περιπτώσεων ΑΗ) (280). Σε πολλούς ασθενείς η ΑΗ είναι ασυμπτωματική και διαγιγνώσκεται μετά από ανεύρεση παθολογικών ηπατικών ενζύμων σε τυχαίο εργαστηριακό έλεγχο. Η ΑΗ μπορεί να συνυπάρχει με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, ο ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης, η λεύκη, η ελκώδης κολίτιδα, η κοιλιοκάκη, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, το σύνδρομο Sjogren ο υποπαραθυρεοειδισμός και η νόσος Addison. Τυπικά η ΑΗ απαντά στην ανοσοκατασταλτική αγωγή, η οποία πρέπει να ξεκινά όσο το δυνατόν πιο σύντομα (268).

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΑΗ

Βασικές αρχές του εμμέσου ανοσοφθορισμού

Η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων (μη οργανοειδικών αλλά και σχετιζόμενων με το ήπαρ) αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο για τη διάγνωση της ΑΗ. Η πρώτη σε σειρά και βασικότερη μέθοδος ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων σχετικών με την ΑΗ είναι ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (indirect immunofluorescence - IIF), μία απλή και ευαίσθητη, αλλά μη ειδική εξέταση. Μειονέκτημα του εμμέσου ανοσοφθορισμού αποτελεί το γεγονός ότι είναι εξέταση εξαρτώμενη από τον παρατηρητή, οδηγώντας ορισμένες φορές σε σφάλματα κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων και εξηγώντας τις διαφορές μεταξύ των εργαστηρίων στη συχνότητα των διαφόρων αντισωμάτων που σχετίζονται με τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος. Προβλήματα ακόμη υπάρχουν και μεταξύ συσχέτισης των εργαστηριακών ευρημάτων και κλινικών στοιχείων, τα οποία οφείλονται αφενός στην ανεπαρκή προτυποποίηση των εργαστηριακών μεθόδων και αφετέρου στην αδυναμία των κλινικών ιατρών να αναγνωρίσουν το φάσμα των κλινικών εκδηλώσεων ή στοιχείων της ΑΗ αλλά και των εργαστηριακών ιατρών που αγνοούν πάρα πολύ συχνά τις διεθνείς οδηγίες για τα επίπεδα των cut-offs που πρέπει να χρησιμοποιούν κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού ελέγχου στα νοσήματα αυτά με αποτέλεσμα χαμηλοί ή μέτριοι τίτλοι να μη αναγράφονται αρκετές φορές καθώς θεωρούνται λανθασμένα ως «αρνητικό» αποτέλεσμα.

Προβλήματα επίσης προκύπτουν και από τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντιδραστηρίων ανοσοφθορισμού (kits) για την ανίχνευση

αυτοαντισωμάτων σχετικών με τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, δεδομένου ότι για μακρόχρονη διατήρηση, χρησιμοποιούνται μονιμοποιητικά μέσα (αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη), τα οποία αυξάνουν τον μη ειδικό φθορισμό (background), δυσχεραίνοντας έτσι την αναγνώριση των χαρακτηριστικών προτύπων των αυτοαντισωμάτων, ιδιαίτερα όταν αυτά ανευρίσκονται σε χαμηλούς τίτλους.

Ως υποστρώματα στον έμμεσο ανοσοφθορισμό πρέπει να χρησιμοποιούνται φρέσκες κατεψυγμένες τομές κρυστάτη από ήπαρ, στόμαχο και νεφρό αρουραίου πάχους περίπου 4-5 μm. Ιδιαίτερα μεγάλη σημασία έχει ο προσανατολισμός των μικροτομών του νεφρού, οι οποίες πρέπει να περιλαμβάνουν και το φλοιό και το μυελό, δεδομένου ότι τόσο τα αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA) όσο και τα αντισώματα κατά μικροσωμίων ήπατος-νεφρών (anti-LKM) ανιχνεύονται ως φθορισμός στα νεφρικά σωληνάρια, αλλά για τη διάκριση μεταξύ των δύο είναι απαραίτητη η παρουσία στην τομή τόσο των εγγύς, όσο και των άπω νεφρικών σωληναρίων. Οι ιστοί ψύχονται σταδιακά, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός κρυστάλλων και κατόπιν κόβονται τομές πάχους περίπου 4-5μm, στις οποίες δεν προστίθεται κανένα μονιμοποιητικό μέσο (281).

Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA)

Τα ANA περιγράφηκαν πρώτη φορά από τον Miescher το 1954, ακολουθώντας την ανακάλυψη των κυτάρων του λύκου από τον Hargraves

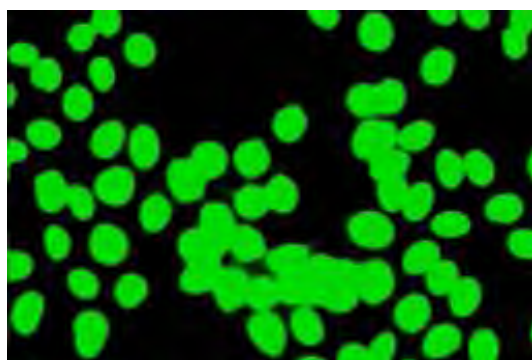
(282). Τα ANA στρέφονται εναντίον δομικών και λειτουργικών στοιχείων του πυρήνα, της πυρηνικής μεμβράνης ή του DNA (279).

Τα ANA αποτελούν πλέον τα πιο μη ειδικά αντισώματα της ΑΗ-τύπου 1 (ΑΗ-1), καθώς ανιχνεύονται επιπλέον στην ΠΧΚ, την ΠΣΧ, τις φαρμακευτικές ηπατίτιδες, τις ιογενείς ηπατίτιδες, καθώς και στην αλκοολική νόσο του ήπατος και τη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα. Τα ANA ανιχνεύονται κατά κύριο λόγο ως πυρηνικός φθορισμός στο νεφρό, το στόμαχο και το ήπαρ αρουραίου (Εικόνα 1). Για την καλύτερη ανίχνευσή τους χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά HEp-2, η οποία αποτελείται από κύτταρα ανθρώπινου λαρυγγικού επιθηλιώματος, μεγάλος πληθυσμός των οποίων βρίσκεται σε φάση μίτωσης και τα οποία διαθέτουν ευμεγέθη πυρήνα (283). Εντούτοις, η ανίχνευση ANA χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα κύτταρα HEp-2 **δε θα πρέπει** να χρησιμοποιείται στο στάδιο της διαλογής (screening) για την ΑΗ, καθώς αντιδραστικότητα σε χαμηλούς τίτλους μπορεί να είναι ανιχνεύσιμη και σε φυσιολογικούς ενήλικες ή ηλικιωμένους. Τα ANA ανιχνεύονται σε σημαντικούς τίτλους στο 50% των ασθενών με ΑΗ-1 ενώ περίπου στο 15% των ασθενών τα ANA αποτελούν τα μοναδικά ανιχνεύσιμα αντισώματα (269). Είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστική η ετερογένεια των προτύπων ανοσοφθορισμού (patterns) στα HEp-2, η οποία οφείλεται στη μεγάλη ποικιλία των αυτοαντιγόνων-στόχων των ANA. Φαίνεται ότι τα ANA στρέφονται εναντίον του DNA μονής ή διπλής έλικας, των tRNA, SSA-Ro, της λαμινίνης A και C, της κυκλίνης A ή των ιστονών. Οι νέες μοριακές και ανοσολογικές τεχνικές που χρησιμοποιούν ανασυνδυασμένα πυρηνικά αντιγόνα επιτρέπουν καλύτερο προσδιορισμό των επιμέρους αυτοαντιγόνων-στόχων, αλλά ο προσδιορισμός τους δε φαίνεται να

συνεισφέρει διαγνωστικά ή προγνωστικά και επομένως η περαιτέρω ταυτοποίηση των ANA στην ΑΗ δε συνιστάται. Στα ΗΕρ-2, συχνότερα ανιχνεύεται ομοιογενής ή διάχυτος φθορισμός ή ένας λεπτός στικτός τύπος φθορισμού (Εικόνα 2). Παρόλα αυτά δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί ένα ηπατο-ειδικό πυρηνικό αντιγόνο σε ασθενείς με ΑΗ-1 (268).



Εικόνα 1: ANA-Φθορισμός
σε τομή ήπατος αρουραίου



Εικόνα 2: ANA - Ομοιογενής
τύπος φθορισμού σε υπόστρωμα
κυτάρων ΗΕρ-2

Αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ινών

Τα αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ινών (anti-smooth muscle antibodies, SMA) στρέφονται εναντίον στοιχείων του κυτταροσκελετού, όπως η f-ακτίνη, η τροπονίνη, η τροπομυοσίνη, η βιμεντίνη και η τουμπουλίνη. Συχνά ανευρίσκονται σε υψηλούς τίτλους μαζί με τα ANA (αν και στο 35% των

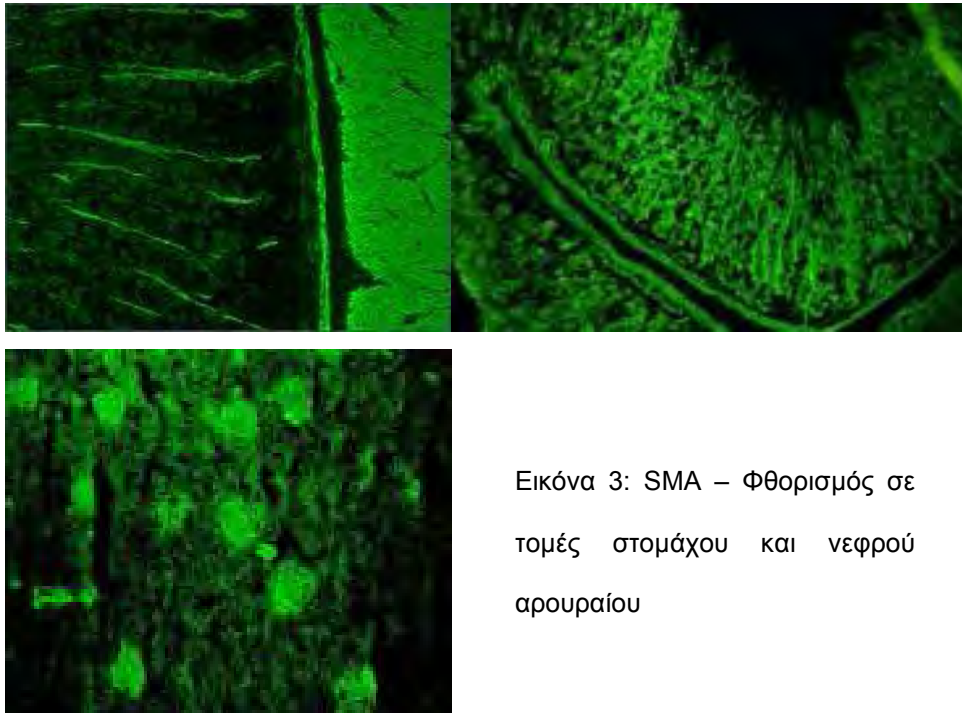
ασθενών αποτελούν τα μόνα ανιχνεύσιμα αντισώματα). Παρόλα αυτά, τα SMA είναι μη ειδικά αντισώματα, καθώς ανευρίσκονται σε άλλης αιτιολογίας νοσήματα του ήπατος, αλλά και σε λοιμώδη και συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα, συνήθως σε χαμηλότερους τίτλους από 1:80. Σύμφωνα με τους Czaja και συν (284), η παρουσία των SMA έναντι της f-ακτίνης του κυτταροσκελετού σε ασθενείς με AH-1 έχει μάλλον προγνωστική σημασία για την έκβαση των προσβληθέντων.

Τα SMA σχετίζονται με τα HLA A1-B8-DR3 και εμφανίζονται κυρίως σε νεότερους ασθενείς, ενώ σχετίζονται με πτωχότερη πρόγνωση, μη ανταπόκριση στην ανοσοκατασταλτική αγωγή, θάνατο ή ανάγκη μεταμόσχευσης σε πρωιμότερη ηλικία (284, 285). Τα SMA ανιχνεύονται με την τεχνική του εμμέσου ανοσοφθορισμού σε υπόστρωμα ήπατος και νεφρών αρουραίου, λόγω του φθορισμού του τοιχώματος των αγγείων και σε υπόστρωμα στομάχου λόγω του φθορισμού τύπου ινιδίων της μυϊκής στιβάδας (Εικόνα 3). Χαρακτηριστικό είναι το πρότυπο VGT (vessels, glomeruli, tubules) στο νεφρό, όπου φθορίζει το τοίχωμα των αγγείων, τα σπειράματα και τα σωληνάρια. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα SMA έχουν ειδικότητα έναντι της f-ακτίνης (285). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, τόσο τα ANA όσο και τα SMA συνήθως εξαφανίζονται κατά τη διάρκεια της ανοσοκατασταλτικής αγωγής. Εντούτοις, η εξαφάνιση των αυτοαντισωμάτων αυτών δεν αποτελεί προγνωστικό παράγοντα παρατεταμένης ύφεσης μετά τη διακοπή της θεραπείας. Επιπλέον, ο τίτλος των ANA και SMA κατά τη διάγνωση ή η μείωσή τους στη διάρκεια της θεραπείας δεν αποτελεί αξιόπιστο

προγνωστικό δείκτη για την εκτίμηση της βαρύτητας και της έκβασης της νόσου (286).

ANA ή SMA συνήθως σε χαμηλούς τίτλους ανιχνεύονται συχνά σε ασθενείς με οξείες ή χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες A, B ή C, αλλά στις περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις τα SMA δεν παρουσιάζουν ειδικότητα κατά f-ακτίνης (287-289). Ο εναρκτήριο μηχανισμός παραγωγής αυτών των αντισωμάτων στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες φαίνεται να είναι η διαρκής ηπατοκυτταρική καταστροφή που υπάρχει στις περιπτώσεις αυτές λόγω της χρονιότητας και η οποία οδηγεί ενδεχομένως στην ανάδειξη «ίδιων» νέο-αντιγόνων (290-292). Εναλλακτικά, η επαγωγή των ANA και SMA σε ασθενείς με χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα της χορήγησης θεραπείας με α -ιντερφερόνη, καθώς η χορήγηση α -ιντερφερόνης μπορεί περιστασιακά να σχετίζεται με αυτοάνοσες αντιδράσεις (293).

Πρόσφατα προτάθηκε ότι ο κυρίαρχος μηχανισμός για την ανεύρεση των αντισωμάτων αυτών σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη από τον HCV είναι η μοριακή μίμηση μεταξύ της πολυπρωτεΐνης του ιού και αντιγονικών στόχων των ANA και των SMA του ξενιστή (294).

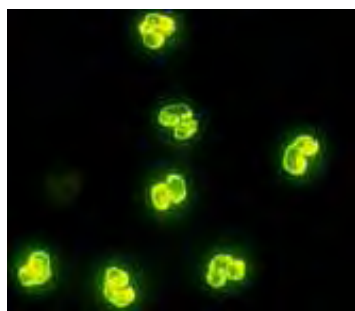


Εικόνα 3: SMA – Φθορισμός σε τομές στομάχου και νεφρού αρουραίου

Αντισώματα κατά του κυτταροπλάσματος των ουδετεροφίλων

Αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετεροφίλων ανιχνεύονται περίπου στο 65-95% των ασθενών με ΑΗ-1, όπως επίσης και σε ασθενείς με ΠΣΧ και σε ποσοστό 0-39% σε ασθενείς με ΠΧΚ. Κλασικά τα ANCA ανιχνεύονται με έμμεσο ανοσοφθορισμό, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα απομονωμένα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα, μονιμοποιημένα σε απόλυτη αιθανόλη (295). Διακρίνονται δύο βασικοί υπότυποι ANCA: εκείνα που δίνουν τη χαρακτηριστική εικόνα διάχυτου ή κοκκιώδους φθορισμού στο κυτταρόπλασμα (c-ANCA) και εκείνα με χαρακτηριστικό περιπυρηνικό φθορισμό (p-ANCA) (Εικόνα 4). Για τον προσδιορισμό της αντιγονοειδικότητας αυτών των αυτοαντισωμάτων χρησιμοποιούνται αντιγονοειδικές ανοσοενζυμικές μέθοδοι (ELISA), καθώς

και μέθοδοι ανοσοαποτύπωσης (296). Η πρωτεΐνωση-3 έχει ταυτοποιηθεί ως το μείζον αυτοαντιγόνο-στόχος των cANCA, ενώ η μυελοϋπεροξειδάση είναι το κύριο αυτοαντιγόνο-στόχος των pANCA. Στην AH-1 πολλές μελέτες αναφέρουν την παρουσία υψηλών τίτλων pANCA και μάλιστα υψηλότερων σε σχέση με άλλες χρόνιες ηπατικές παθήσεις (297). Παρά την παρουσία υψηλών τίτλων και υψηλού επιπολασμού pANCA στην AH, δε φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση με τα επίπεδα της AST, των γ-σφαιρινών, της IgG και με την παρουσία συνοδών αυτοανόσων νοσημάτων (298). Σπάνια έχουν αναφερθεί περιπτώσεις AH-1 με υψηλούς τίτλους cANCA (268). Η ανίχνευση των pANCA σε ασθενείς με AH-1, ΠΧΚ ή ΠΣΧ σχετίζεται με πιο σοβαρή πορεία ή την παρουσία κίρρωσης (299). Η διεθνής ομάδα μελέτης της AH (International Autoimmune Hepatitis Group, IAHG) έχει προτείνει αντί του όρου pANCA, τον όρο pANNA (peripheral antineutrophil nuclear antibodies), καθώς τα αυτοαντιγόνα-στόχοι φαίνεται να αποτελούν τμήματα της περιφέρειας του πυρήνα, παρά του κυτταροπλάσματος. Χαμηλοί τίτλοι ANCA ανιχνεύονται πιο σπάνια σε ασθενείς με αλκοολική ή χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια (300). Γενικά, ο ρόλος των ANCA στην AH-1 δεν είναι σαφής, αλλά φαίνεται ότι η ανίχνευσή τους μπορεί να είναι χρήσιμη στην διερεύνηση ασθενών με κρυψιγενή κίρρωση (298).



Εικόνα 4: Φθορισμός pANCA

Αντισώματα έναντι του υποδοχέα της ασιαλογλυκοπρωτεΐνης (anti-asialoglycoprotein receptor antibodies, anti-ASGPR)

Ο υποδοχέας της ασιαλογλυκοπρωτεΐνης (ASGPR) είναι μία ηπατοειδική γλυκοπρωτεΐνη της μεμβράνης των κυττάρων. Η κύρια λειτουργία του αφορά στη σύνδεση και ενδοκυττάρωση γλυκοπρωτεϊνών που φέρουν τελικές ομάδες γαλακτόζης.

Τα anti-ASGPR έχουν παρατηρηθεί σε περίπου 88% όλων των ασθενών με ΑΗ και μπορεί να συνυπάρχουν με ANA, SMA και anti-LKM-1. Παρόλα αυτά, είναι μη ειδικά και μπορούν να ανευρεθούν και σε ιογενείς ηπατίτιδες, φαρμακευτική ηπατίτιδα, αλκοολική ηπατοπάθεια ή στην ΠΧΚ, με αποτέλεσμα η ειδικότητα του αντισώματος αυτού για τη διάγνωση της ΑΗ να μειώνεται αισθητά (301). Τα επίπεδα των anti-ASGPR σχετίζονται με την ενεργότητα της νόσου και μάλιστα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως επιπλέον δείκτες ανταπόκρισης στη θεραπεία (302).

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ASGPR εκφράζεται κυρίως στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων που βρίσκονται στις περιπυλαίες περιοχές των ηπατικών λοβίων, εκεί δηλαδή όπου παρατηρούνται οι κύριες ιστολογικές βλάβες της ΑΗ (διαβρωτική νέκρωση ή περιπυλαία ηπατίτιδα) (303). Το εύρημα αυτό πιθανόν να υποδεικνύει τη συμμετοχή των anti-ASGPR στην αιτιοπαθογένεια της ΑΗ. Εάν η εξαρτώμενη από αυτοαντίσωμα κυτταροτοξικότητα είναι ο κύριος παθογενετικός μηχανισμός στην ΑΗ, τότε το αυτοαντιγόνο-στόχος θα πρέπει να είναι ορατό από το ανοσολογικό σύστημα (έκφραση στην επιφάνεια του ηπατοκυττάρου) και να είναι οργανοειδικό, ώστε να εξηγεί την

οργανοειδικότητα της ΑΗ. Μέχρι τώρα, ο ASGPR αποτελεί ίσως από τα ελάχιστα αυτοαντιγόνα που σχετίζονται με την ΑΗ που πληροί τα παραπάνω κριτήρια (304,305). Εντούτοις, λόγω της παραδοχής ότι τα anti-ASGPR αντιπροσωπεύουν ένα γενικό δείκτη ηπατικής αυτοανοσίας και λόγω περιορισμών και δυσκολιών στην ανίχνευσή τους, καθόσον απαιτείται χημικά κεκαθαρισμένο αντιγόνο που δεν είναι ευρέως διαθέσιμο, δε συνιστάται η ανίχνευσή τους στην καθημερινή κλινική πρακτική διερεύνησης υπόπτων περιπτώσεων ΑΗ (268).

Αντισώματα έναντι του διαλυτού αντιγόνου ήπατος-παγκρέατος (anti-soluble liver antigen/liver-pancreas antibodies, anti-SLA/LP)

Τα anti-SLA ανιχνεύθηκαν σε ασθενείς με ANA αρνητική ΑΗ. Περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1987. Σήμερα είναι γνωστό ότι το anti-SLA και το anti-LP αναγνωρίζουν ως στόχο την ίδια πρωτεϊνική δομή, με αποτέλεσμα να αναφέρονται ως anti-SLA/LP (306). Τα anti-SLA/LP φαίνεται ότι είναι σε μεγάλο βαθμό ειδικά για την ΑΗ και μάλιστα ανιχνεύονται σε ποσοστό 10-30%. Το αυτοαντιγόνο-στόχος των anti-SLA/LP δεν ανήκει ούτε στις κυτταροκερατίνες 8 ή 18 (52/45 kDa) (307), ούτε στις πρωτεϊνικές υπομονάδες της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST υπομονάδες Υα, Υb1, Υc), ούτε είναι το μόριο α-ενολάση όπως είχαν δείξει προηγούμενες μελέτες (308, 309) αλλά ένα UGA-κατασταλτικό t-RNA πρωτεϊνικό σύμπλεγμα 50 kDa, το οποίο εμπλέκεται στη συν-μετάφραση και στην ενσωμάτωση της σελινοκυστεΐνης στα ανθρώπινα κύτταρα (SLA/LP tRNP^{(Ser)^{Sec}}) (310, 311).

Από κλινικής σκοπιάς, από τις μέχρι τώρα μελέτες φαίνεται ότι τα anti-SLA/LP σχετίζονται με προχωρημένη νόσο και κακή πρόγνωση της ΑΗ (312, 313) αν και πρόσφατες μελέτες υποδεινύουν ότι αυτή η χειρότερη πρόγνωση σχετίζεται περισσότερο με την ταυτόχρονη παρουσία anti-Ro52 (ανιχνεύονται στο 95-98% των ασθενών με anti-SLA/LP) και όχι στην παρουσία των anti-SLA/LP (275). Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι τα αντισώματα αυτά μπορεί να έχουν παθογενετική σημασία, αν και η ακριβής τους λειτουργία και ο ρόλος τους στην αυτοανοσία του ήπατος είναι μέχρι τώρα αδιευκρίνιστα.

Τα anti-SLA/LP δεν ανιχνεύονται με την τεχνική του εμμέσου ανοσοφθορισμού, αλλά συνήθως με ανταγωνιστικές μεθόδους ELISA ή ραδιοανοσοενζυμικές μεθόδους, ενώ τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται ELISA ή τεχνικές ανοσοαποτύπωσης βασισμένες σε ανασυνδυασμένο SLA/LP tRNP^{(Ser)Sec} (314). Το SLA/LP tRNP^{(Ser)Sec} ανευρίσκεται στο υπερκείμενο μετά από υπερφυγοκέντρηση (100.000 g) ηπατικού ομογενοποιημάτος (S-100 fraction) και αντιπροσωπεύει πρωτεΐνη κυτοσολίων, η οποία δεν είναι ούτε οργανοειδική, ούτε ειδική του είδους. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του συγκεκριμένου αντιγόνου παρατηρούνται στο ήπαρ και τους νεφρούς (315).

Αρχικά, προτάθηκε η κατηγοριοποίηση της ΑΗ σε τρεις διακριτούς υποτύπους ανάλογα με τα αντισώματα που ανιχνεύονται. Έτσι στην ΑΗ-1 ανιχνεύονται κυρίως ANA και SMA. Η ΑΗ-τύπου 2 (ΑΗ-2) σχετίζεται με τα anti-LKM τύπου 1 (anti-LKM1) και λιγότερο με τα anti-LKM τύπου 3 (anti-LKM3) και τα αντισώματα κατά κυτοσολίων ήπατος τύπου 1 (anti-LC1), ενώ η ΑΗ-τύπου 3 (ΑΗ-3) περιελάμβανε τα anti-SLA/LP. Η παραπάνω ταξινόμηση

αποτέλεσε αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών και νεότερες μελέτες και θέσεις ομοφωνίας κατέληξαν ότι οι ασθενείς με AH-1 και AH-3 εμφανίζουν κοινά κλινικά, εργαστηριακά, ιστολογικά, γενετικά και προγνωστικά χαρακτηριστικά και ως εκ τούτου οι anti-SLA/LP θετικοί ασθενείς δεν πρέπει να αποτελούν ξεχωριστή κατηγορία, αλλά να εντάσσονται στην AH-1.

Αντισώματα έναντι μικροσωμίων ήπατος-νεφρών (anti-Liver Kidney Microsomal antibodies, anti-LKM)

Τα anti-LKM διακρίνονται σε τρεις τύπους (τύποι 1-3) (316) και είναι τα χαρακτηριστικά αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται στην πλειονότητα των περιπτώσεων στην AH-2. Τα αντισώματα αυτά περιγράφησαν για πρώτη φορά από τους Rizzeto et al με την τεχνική του εμμέσου ανοσοφθορισμού, χρησιμοποιώντας κατεψυγμένες τομές ήπατος-νεφρών αρουραίων (317).

Τα anti-LKM ανιχνεύονται ως έντονος φθορισμός του κυτταροπλάσματος των ηπατοκυττάρων και του P3 τμήματος των εγγύς νεφρικών σωληναρίων (Εικόνες 5 και 6). Συχνά, η διάκριση των anti-LKM και των AMA καθίσταται δυσχερής, δεδομένου ότι και οι δύο τύποι αυτοαντισωμάτων ανιχνεύονται ως φθορισμός στο ήπαρ και στο νεφρό. Σε σύγκριση με τα anti-LKM, τα AMA εμφανίζουν λιγότερο έντονο φθορισμό στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων, ενώ στο νεφρό παρουσιάζουν φθορισμό, τόσο στα εγγύς όσο και στα άπω νεφρικά σωληνάκια. Επιπλέον, σε αντίθεση με τα anti-LKM, τα AMA εμφανίζονται ως φθορισμός στα τοιχωματικά κύτταρα του στομάχου. Το κύριο αυτοαντιγόνο-στόχος των anti-

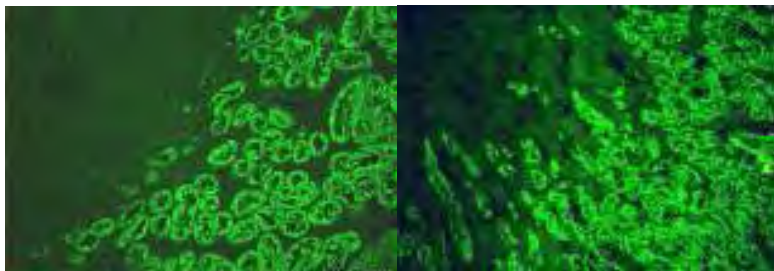
LKM1 είναι το κυτόχρωμα P4502D6 (CYP2D6). Η ταυτοποίηση των αυτοαντιγόνων-στόχων των anti-LKM οδήγησε στην ανάπτυξη νέων μοριακών μεθόδων ανίχνευσης των anti-LKM, όπως η ELISA και η ανοσοαποτύπωση, καθώς και στη χρήση ανασυνδυασμένων αντιγόνων. Με την ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιώντας εκχύλισμα ηπατικών και νεφρικών μικροσωμίων, ανιχνεύεται πρωτεϊνική ζώνη στα 50 kDa (anti-LKM1), ενώ σπανιότερα ανιχνεύονται ζώνες στα 55kDa (anti-LKM3) καθώς και στα 64 kDa (318, 319).

Από κλινικής σκοπιάς, συνιστάται ο έλεγχος ρουτίνας για την παρουσία των anti-LKM σε HCV θετικούς ασθενείς πριν, αλλά και κατά τη διάρκεια αντιικής θεραπείας, αφού η χορήγηση α-ιντερφερόνης μπορεί να επάγει την εκδήλωση AH (320-322).

Τα anti-LKM2 έχουν ανιχνευθεί μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις φαρμακευτικών ηπατιτίδων (ιδιαίτερα στην επαγόμενη από τιενλικό οξύ) και ποτέ στην AH. Το αυτοαντιγόνο-στόχος των anti-LKM2 είναι το CYP4502C9. Η δέσμευση ενός ενεργού μεταβολίτη του φαρμάκου με το CYP4502C9, το οποίο γίνεται έτσι αντιγονικός στόχος, θεωρείται ως ο επικρατέστερος μηχανισμός επαγωγής αυτών των αντισωμάτων (323).

Τα anti-LKM3 ανιχνεύονται μόνα ή σε συνδυασμό με τα anti-LKM1 στο 5-10% των ασθενών με AH-2. Σε αντίθεση με τα anti-LKM1 και τα anti-LKM2, τα οποία στον ανοσοφθορισμό δίνουν θετικό σήμα μόνο σε ηπατικό και νεφρικό ιστό, τα anti-LKM3 μπορεί να δώσουν θετικό σήμα φθορισμού σε ιστό παγκρέατος, επινεφριδίων, θυρεοειδούς και στομάχου. Το αυτοαντιγόνο-

στόχος των anti-LKM3 έχει ταυτοποιηθεί ως η οικογένεια 1 των UDP-γλυκουρονικών τρανσφερασών (UGT1, MB=55kDa). Τα παραραπάνω αυτοαντισώματα ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά στο 13% των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα D, αλλά όχι σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B ή C (324-326).



Εικόνα 5: Φθορισμός anti-LKM σε τομές νεφρού αρουραίου. Παρατηρείται φθορισμός στα εγγύς και όχι στα άπω



Εικόνα 6: Φθορισμός anti-LKM σε τομή ήπατος αρουραίου

Ένας υπότυπος της AH, ο οποίος προσομοιάζει στην AH-2, ανευρίσκεται στο 20% περίπου των ασθενών με αυτοάνοσο πολυενδοκρινικό σύνδρομο τύπου 1 (APECED). Το APECED αποτελεί μία διαταραχή που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο και η οποία οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο AIRE1. Χαρακτηρίζεται από χρόνια καντιντίαση βλεννογόνων-δέρματος και αυτοάνοση προσβολή πολλαπλών ενδοκρινών αδένων (κυρίως επινεφρίδια και παραθυρεοειδείς), αλλά και του ήπατος. Τα χαρακτηριστικά αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται στην περίπτωση αυτή

είναι εκείνα κατά μικροσωμίων ήπατος (liver microsomal antibodies, anti-LM). Τα αντισώματα αυτά δίνουν φθορίζουσα αντίδραση με την τεχνική του εμμέσου ανοσοφθορισμού μόνο κατά μικροσωμιακών αντιγόνων ήπατος και όχι των νεφρών. Το πρότυπο φθορισμού των anti-LM είναι διαφορετικό από αυτό των anti-LKM (φθορισμός κυρίως στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων που βρίσκονται γύρω από φλέβες σε αντίθεση με το διάχυτο ομοιογενή πρότυπο φθορισμού στο ηπατικό παρασκεύασμα αρουραίων των anti-LKM). Το αυτοαντιγόνο-στόχος των anti-LM είναι το κυτόχρωμα P4501A2 (268).

Αντισώματα έναντι κυτοσολίου ήπατος τύπου 1 (anti-Liver Cytosol type 1 antibodies, anti-LC1)

Το 1988 ένα νέο αυτοαντίσωμα ανιχνεύθηκε σε ασθενείς με AH-2. Το αυτοαντίσωμα αυτό βρέθηκε να αντιδρά με μία πρωτεΐνη των κυτοσολίων του ήπατος και είναι οργανοειδικό, αλλά όχι ειδικό του είδους. Το αυτοαντιγόνο-στόχος των anti-LC1 φαίνεται να είναι το ένζυμο φορμιμινοτρανσφεράση της κυκλοδεαμινάσης (formiminotransferase cyclodeaminase, FTCD), το οποίο εμπλέκεται στο μεταβολισμό του φυλικού οξέος και στη μετατροπή της ιστιδίνης σε γλουταμινικό οξύ (327). Anti-LC1 ανιχνεύονται σε περισσότερους από το 50% των ασθενών με AH-2, ενώ συχνά συνυπάρχουν με τα anti-LKM1 (328). Λιγότερο συχνά, τα anti-LC1 συνυπάρχουν με ANA ή SMA σε ασθενείς με AH-1 και χρόνια λοίμωξη από τον HCV (329). Σε ένα ποσοστό περίπου 10% τα anti-LC1 αποτελούν το μοναδικό δείκτη σε ασθενείς με AH-2, ενώ η

παρουσία και ο τίτλος των anti-LC1 φαίνεται ότι σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου (281).

Τα anti-LC1 ανιχνεύονται με τη μέθοδο του εμμέσου ανοσοφθορισμού, χρησιμοποιώντας την κλασική τριάδα ιστών (ήπαρ, νεφρός, στόμαχος) αρουραίου (Εικόνα 7). Ο φθορισμός εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων, φείδεται όμως της κεντρολοβιδιακής περιοχής. Η ανίχνευση των anti-LC1 συχνά δυσχεραίνεται από τη συνύπαρξη των anti-LKM1. Στην περίπτωση αυτή συνύπαρξης των δύο τύπων αυτοαντισωμάτων, τα anti-LC1 μπορούν να ανιχνευθούν με τη χρήση εκχυλίσματος κυτοσολίου ήπατος με τις τεχνικές της ανοσοδιάχυσης και της ανάστροφης ηλεκτροφόρησης. Με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Western Blot), τα anti-LC1 αντιδρούν με μια πρωτεΐνη 58-60 kDa, όταν χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα εκχύλιση κυτοσολίου ανθρώπινου ήπατος (268).



Εικόνα 7: Φθορισμός anti-LC1 σε τομή ήπατος αρουραίου

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΗ

Η διάγνωση της ΑΗ βασίζεται κυρίως στην παρουσία αυτοαντισωμάτων, αυξημένων τρανσαμινασών και επιπέδων IgG και στην παρουσία περιπυλαίας ηπατίτιδας (interface hepatitis) στη βιοψία ήπατος. Τα επίπεδα των τρανσαμινασών και της IgG δε σχετίζονται με το βαθμό της φλεγμονώδους δραστηριότητας και ούτε είναι ενδεικτικά για την παρουσία ή απουσία κίρρωσης. Επειδή, πολλές ηπατικές παθήσεις μπορεί να περιλαμβάνουν τα παραπάνω χαρακτηριστικά, η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει τις ιογενείς ηπατίτιδες (HBV-HCV λοίμωξη), λοιμώξεις από άλλους ηπατοτρόπους ιούς, τη νόσο Wilson, την αλκοολική και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, την οικογενή ή δευτερογενή αιμοχρωμάτωση καθώς και τη φαρμακευτική ηπατίτιδα. Η ΑΗ εμφανίζεται συχνότερα σε γυναίκες (αν και 30% των ασθενών αφορούν άνδρες), ενώ στο 40% των περιπτώσεων υπάρχει θετικό οικογενειακό ιστορικό αυτοανόσου νοσήματος (268).

Τα κριτήρια για τη διάγνωση της ΑΗ έχουν καθοριστεί από την IAIHG. Το διαγνωστικό αυτό σύστημα περιλαμβάνει θετικά και αρνητικά scores και θεσπίστηκε κατά κύριο λόγο για διαγνωστικούς και ερευνητικούς σκοπούς (279,330), δεδομένου ότι στις περισσότερες περιπτώσεις κλινικά, εργαστηριακά και ιστολογικά χαρακτηριστικά τεκμηριώνουν τη διάγνωση της ΑΗ, χωρίς την ανάγκη χρησιμοποίησης συστήματος βαθμοποίησης. Τελευταίες μελέτες έδειξαν την κλινική σημασία του παραπάνω συστήματος στην αξιολόγηση ασθενών με άτυπα χαρακτηριστικά της νόσου. Η βέβαιη διάγνωση της ΑΗ πριν την έναρξη αγωγής με κορτικοστεροειδή απαιτεί score

>15, ενώ η βέβαιη διάγνωση μετά την έναρξη αγωγής με κορτικοστεροειδή απαιτεί score >17 (Πίνακας 2) (279).

IAIHG Scoring System for the Diagnosis of Autoimmune Hepatitis

<i>Parameter</i>	<i>Feature</i>	<i>Score</i>	
Principal parameters			
Sex	Female	+2	
ALP-AST (or ALT) ratio	>3	-2	
	1.5-3	0	
Serum globulins or IgG (times above normal)	<1.5	+2	
	>2.0	+3	
	1.5-2.0	+2	
ANA, SMA, or anti-LKM-1 titers	1.0-1.5	+1	
	<1.0	0	
	>1:80	+3	
	1:80	+2	
AMA	1:40	+1	
	<1:40	0	
	Positive	-4	
Viral markers of active infection	Positive	-3	
	Negative	+3	
Hepatotoxic drug history	Yes	-4	
	No	+1	
Average alcohol	<25 g/d	+2	
	>60 g/d	-2	
Histological features	Interface hepatitis	+3	
	Plasma cells	+1	
	Rosettes	+1	
	None of above	-5	
	Biliary changes ^d	-3	
	Atypical changes ^b	-3	
Optional additional parameters			
Seropositivity for other defined autoantibodies	Anti-SLA/LP, actin, LC-1, ASGPR, p-ANCA	+2	
	HLA	DR3 or DR4	+1
	Response to therapy	Remission	+2
Relapse		+3	
Interpretation of aggregate scores			
<i>Pretreatment</i>			
	Definite AIH	>15	
	Probable AIH	10-15	
<i>Posttreatment</i>			
	Definite AIH	>17	
	Probable AIH	12-17	

Πίνακας 2: Τροποποιημένο σύστημα βαθμοποίησης του IAIHG για τη διάγνωση της ΑΗ²⁷⁹

Πρόσφατα, έχει προταθεί από την IAIHG ένα απλοποιημένο σύστημα βαθμοποίησης (331), προκειμένου να χρησιμοποιείται με ευχέρεια στην καθημερινή κλινική πρακτική (Πίνακας 3). Το παραπάνω σύστημα περιλαμβάνει μόνο τέσσερις παραμέτρους: τα αυτοαντισώματα, την IgG, την ιστολογική εικόνα και τον αποκλεισμό των ιογενών ηπατιτίδων (Πίνακας 2). Τελευταίες μελέτες έχουν δείξει ότι το απλοποιημένο σύστημα εμφανίζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για τη διάγνωση της ΑΗ (332). Τα διαγνωστικά κριτήρια για τα παιδιά διαφέρουν ελάχιστα σε σχέση με αυτά των ενηλίκων. Με βάση το γεγονός ότι η παρουσία αυτοαντισωμάτων είναι εξαιρετικά σπάνια σε υγιή παιδιά, τίτλοι 1:20 για τα ANA και τα SMA και 1:10 για τα antiLKM1 είναι συμβατοί με τη διάγνωση της ΑΗ (333, 334).

Variable	Cutoff	Points
ANA or SMA	$\geq 1:40$	1
ANA or SMA	$\geq 1:80$	2*
or LKM	$\geq 1:40$	
or SLA	Positive	2
IgG	>Upper normal limit	
	>1.10 times upper normal limit	2
Liver histology (evidence of hepatitis is a necessary condition)	Compatible with AIH	1
	Typical AIH	2
Absence of viral hepatitis	Yes	2
		≥ 6 : probable AIH
		≥ 7 : definite AIH

Πίνακας 3: Απλοποιημένο σύστημα βαθμοποίησης του IAIHG για τη διάγνωση της ΑΗ³³¹

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΗ

Η διενέργεια βιοψίας ήπατος στην ΑΗ είναι υποχρεωτική, όχι μόνο προς επιβεβαίωση της διάγνωσης, αλλά και προς εκτίμηση της βαρύτητας της ηπατικής βλάβης. Παρόλα αυτά, η ύπαρξη αντενδείξεων για βιοψία ήπατος σε ασθενείς με οξεία εμφάνιση της νόσου και διαταραχές του πηκτικού μηχανισμού δεν πρέπει να καθυστερεί την έγκαιρη έναρξη της θεραπείας. Βασικά ιστολογικά χαρακτηριστικά της ΑΗ αποτελούν η μονοκυτταρική περιπυλαία ηπατίτιδα (piecemeal necrosis or interface hepatitis) και η λεμφοπλασματο-κυτταρική διήθηση, ενώ ίνωση και λοβιακή ηπατίτιδα, σχετιζόμενη με γεφυροποιό νέκρωση είναι συχνά ευρήματα(335).

ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΑΗ

Η μελέτη της παθογένειας της ΑΗ δυσχεραίνεται από το γεγονός ότι δεν υπάρχουν αξιόπιστα πειραματικά μοντέλα (experimental animal models) που να μπορούν να αναπαράγουν με ακρίβεια την αλληλουχία των γεγονότων που συμβαίνουν στον ανθρώπινο οργανισμό.

Σε ασθενείς με γενετική προδιάθεση, η αυτοάνοση απόκριση στα ηπατικά αυτοαντιγόνα πυροδοτείται από το μηχανισμό της μοριακής μίμησης. Σε αυτό το μηχανισμό, η ανοσολογική απόκριση εναντίον εξωγενούς παθογόνου εμφανίζει διασταυρούμενη αντίδραση με δομικά όμοια στοιχεία του ίδιου του οργανισμού. Πιθανοί μικροοργανισμοί που πυροδοτούν την εκδήλωση της ΑΗ είναι οι ιοί HCV και HBV, ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV) και ο ιός του απλού έρπητα (HSV) (336). Επίσης περιβαλλοντικοί παράγοντες

φαίνεται ότι σχετίζονται με την εκδήλωση της ΑΗ, όπως η μινοκυκλίνη και η νιτροφουραντοΐνη, οι στατίνες και οι anti-TNF παράγοντες, όπως οι adalimumab και infliximab (337). Υπό μελέτη βρίσκονται ακόμη και οι μηχανισμοί της εξάπλωσης επιτόπου (epitope spreading) και της εμφάνισης κρυπτικών ηπατικών αυτοαντιγόνων κατά τον τραυματισμό των ηπατοκυττάρων. Όποιος όμως και να είναι ο εκλυτικός παράγοντας, φαίνεται ότι η εκδήλωση αυτοανοσίας εμπλέκει πολλαπλούς κυτταρικούς πληθυσμούς και ελαττωματικούς μηχανισμούς ανοσορρύθμισης (275, 338).

Η αυτοάνοση απόκριση στην ΑΗ φαίνεται ότι ξεκινά με την παρουσίαση αυτοαντιγονικών πεπτιδίων στον TCR από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Όπως προαναφέρθηκε στο ήπαρ υπάρχει ποικιλία αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και φαίνεται ότι η αντιγονοπαρουσίαση στα CD4 και CD8 συμβαίνει *in situ* (339). Κατά την αντιγονοπαρουσίαση, παρουσία συνδιεγερτικών μορίων, τα Th0 κύτταρα ενεργοποιούνται και διαφοροποιούνται σε διακριτούς υποπληθυσμούς βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων, ανάλογα με το «μικροπεριβάλλον» των κυτταροκινών στο οποίο εκτίθενται. Παρουσία IL-12, IL-4, τα Th0 λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε Th1, Th2 κύτταρα, ενώ η επικράτηση της IL-1β και IL-6 προάγει τη διαφοροποίηση σε Th17. Η διαφοροποίηση σε Th1 οδηγεί στην παραγωγή IL-2 και IFN-γ και σε ενεργοποίηση των CD8 T-λεμφοκυττάρων που εμφανίζουν κυτταροτοξική δραστηριότητα (340). Η έκθεση των ηπατοκυττάρων στην IFN-γ οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και ενίσχυση της ηπατικής βλάβης (341, 342). Η διαφοροποίηση σε Th2 κύτταρα οδηγεί σε παραγωγή IL-10, IL-4 και IL-13, κυτταροκίνες-κλειδιά για την ωρίμανση των B-

λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα και στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Τα Th17 κύτταρα συνεισφέρουν στην αυτοάνοση απόκριση εκκρίνοντας κυτταροκίνες που επάγουν τη φλεγμονή. Παρόλο που ο ρόλος των Th17 είναι καλύτερα μελετημένος στην ΠΧΚ, φαίνεται ότι ο αριθμός των Th17 κυττάρων είναι αυξημένος σε ασθενείς με ΑΗ (275, 343, 344). Υπό μελέτη είναι ακόμη και ο ρόλος των γδ Τ-λεμφοκυττάρων (345, 346).

Διάφορες μελέτες σχετίζουν την ΑΗ με διαταραχή των μηχανισμών ανοσορρύθμισης. Σε παιδιά και σε ενήλικες με ΑΗ φαίνεται ότι στην παθογένεια συμμετέχουν διαταραγμένα Tregs κύτταρα (τόσο αριθμητικά όσο και ποιοτικά). Το ανοσολογικό αυτό έλλειμμα είναι περισσότερο εμφανές τη στιγμή της διάγνωσης και λιγότερο εμφανές κατά τις περιόδους ύφεσης της νόσου (347-349). Η διαταραχή των Tregs εντοπίζεται κυρίως στην ικανότητά τους να ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των CD4 και CD8 Τ-λεμφοκυττάρων. Εντούτοις, υπάρχουν μελέτες που αμφισβητούν το ρόλο των Tregs στην ΑΗ (350).

ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΑΗ

Η ανοσοκατασταλτική αγωγή αποτελεί το κλειδί για την αντιμετώπιση της ΑΗ και πρέπει να ξεκινά όσο το δυνατόν πιο γρήγορα. Ο κύριος στόχος της θεραπείας στην ΑΗ είναι η επίτευξη ύφεσης και η πρόληψη της εξέλιξης της νόσου σε κίρρωση (351). Γενικά, η ΑΗ ανταποκρίνεται στην ανοσοκατασταλτική αγωγή με αναφερόμενα ποσοστά ύφεσης περίπου 80% (352). Η προτεινόμενη θεραπεία είναι η χορήγηση κορτικοστεροειδών

(πρεδνιζολόνη ή πρεδνιζόνη) (353-355). Η έναρξη αγωγής με πρεδνιζολόνη πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν πιο άμεσα για την πρόληψη των απώτερων επιπλοκών της ΑΗ. Ανεπιθύμητες επιπτώσεις της αγωγής με κορτικοστεροειδή αποτελούν η οστεοπενία, ο δευτεροπαθής σακχαρώδης διαβήτης, η δευτεροπαθής υπέρταση και η εμφάνιση λοιμώξεων και κοσμητικών διαταραχών (356).

Εναλλακτική θεραπευτική επιλογή που χρησιμοποιείται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις ΑΗ σήμερα είναι η αζαθειοπρίνη, η οποία όπως φαίνεται από μελέτες δεν είναι ικανή να επιφέρει ύφεση, όταν χορηγείται από την αρχή («φάση επαγωγής») ως μονοθεραπεία αλλά μόνο σε συνδυασμό με κορτικοστεροειδή (357). Μελέτες έχουν προτείνει εναλλακτικές θεραπευτικές επιλογές με tacrolimus, κυκλοσπορίνη, μεθοτρεξάτη, κυκλοφωσφαμίδη, rituximab και βουδεσονίδη (358-362). Αν και υπάρχουν κάποια ενθαρρυντικά αποτελέσματα, κανένα από τα ανωτέρω σχήματα δεν έχει ενσωματωθεί στο θεραπευτικό αλγόριθμο της ΑΗ.

Η μυκοφαινολάτη μοφετίλ (mycophenolate mofetil – MMF) είναι ανταγωνιστής των πουρινών, ο οποίος επιλεκτικά αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων. Σε συνδυασμό με πρεδνιζολόνη, το MMF αποτελεί τα τελευταία χρόνια σημαντική εναλλακτική θεραπεία ακόμα και ως θεραπεία πρώτης γραμμής (363).

Παρόλο που μερικοί ασθενείς μπορεί να παραμένουν σε πλήρη ύφεση μετά τη διακοπή της ανοσοκατασταλτικής αγωγής, οι περισσότεροι χρειάζονται μακροπρόθεσμη θεραπεία συντήρησης (3-5 έτη). Απαραίτητος

είναι ο τακτικός εργαστηριακός έλεγχος και η στενή παρακολούθηση των ασθενών με ΑΗ για την πρόληψη του ενδεχομένου υποτροπής, η οποία μπορεί να είναι βαρεία. Η πιθανότητα διακοπής της αγωγής πρέπει να εξετάζεται σε όλους τους ασθενείς που βρίσκονται σε πλήρη ύφεση (φυσιολογικές τρανσαμινάσες και IgG ανοσοφαιρίνη) για τουλάχιστον 2 έτη και πάντα μετά από νέα βιοψία ήπατος όπου πρέπει να υπάρχει ελάχιστη ή καθόλου νεκροφλεγμονώδης δραστηριότητα (275).

Σε ασθενείς που αναπτύσσουν νόσο τελικού σταδίου, τελική θεραπευτική επιλογή αποτελεί η μεταμόσχευση ήπατος, αν και υπάρχει υποτροπή στο μόσχευμα σε ποσοστό περίπου 30% των ασθενών (364).

Πίνακας 4 : Βασικά χαρακτηριστικά της ΑΗ ²⁷⁵

Variable	
Geoepidemiology	Worldwide in any race
Female: Male ratio	4-6:1
Age at presentation	Any age (bimodal distribution usual with peaks around puberty and between 4th and 6th decades, although a considerable number of patients are even older)
Clinical presentation	Broad range from asymptomatic ('en passant' diagnosis) to acute severe or even fulminant hepatic failure Most common clinical phenotype (almost two-thirds of patients) is characterised by one or more of nonspecific symptoms like fatigue, mild pain in the right upper quadrant, lethargy, malaise, anorexia, nausea, pruritus, jaundice and arthralgia involving the small joints Acute presentation of AIH contains two different clinical entities (the acute exacerbation of chronic AIH and the true acute AIH without histological findings of chronic disease) One-third of patients at diagnosis have developed cirrhosis irrespective of the presence of symptoms or not suggesting a delay in diagnosis due to unfamiliar doctors and laboratories
Physical examination	Depends on the clinical stage of the disease ranging from completely normal to signs and symptoms of chronic liver disease and/or portal hypertension (hepatomegaly, splenomegaly, ascites, varices or hepatic encephalopathy)
Presentation in special conditions	During pregnancy or in the early postpartum period After liver transplantation for other diseases (<i>de novo AIH</i>) After administration of drugs or herbals (drug-induced AIH; nitrofurantoin and minocycline implicated in 90% of cases)
Specific features	Frequent presence of a wide variety of other autoimmune or immune-mediated diseases (most common: autoimmune thyroiditis, vitiligo, alopecia, rheumatoid arthritis, diabetes mellitus type-1, ulcerative colitis and coeliac disease)
Complications	HCC development in AIH, although is less common than other liver diseases, does exist and is associated with cirrhosis, suggesting surveillance in all cirrhotic AIH patients

ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ (ΠΧΚ)

Η ΠΧΚ αποτελεί μια χρόνια χολοστατική νόσο του ήπατος, αγνώστου αιτιολογίας, η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία AMA και καταστροφή των μικρών και μεσαίου μεγέθους ενδοηπατικών χοληφόρων. Προσβάλλει κυρίως γυναίκες και ο μέσος όρος ηλικίας κατά τη διάγνωση βρίσκεται μεταξύ της πέμπτης και έκτης δεκαετίας της ζωής αν και στις μέρες μας η διάγνωση γίνεται ολοένα και πρωιμότερα σε νεότερες ηλικίες με τη χρήση των βελτιωμένων τεχνικών ανίχνευσης των AMA. Ο επιπολασμός της ΠΧΚ ποικίλει και φαίνεται ότι σε γενικές γραμμές είναι 402 ασθενείς/εκατομμύριο πληθυσμού. Στις ΗΠΑ ο επιπολασμός της ΠΧΚ ανέρχεται σε 4/10.000 (365). Όπως και τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα, η ΠΧΚ εμφανίζεται κυρίως σε γυναίκες (αναλογία γυναίκες : άνδρες = 9 : 1). Σε μια προσπάθεια εξήγησης της γυναικείας επικράτησης φαίνεται ότι οι ορμόνες του φύλου επηρεάζουν την ανοσολογική απάντηση, επιδρώντας στην έναρξη και την εξέλιξη των αυτοανόσων νοσημάτων, ρυθμίζοντας τη λειτουργία των λεμφοκυττάρων. Τελευταίες μελέτες επίσης έχουν δείξει τη συσχέτιση της ΠΧΚ με ανωμαλίες του Χ χρωμοσώματος (Χ μονοσωμία) (366).

ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΧΚ

Κόπωση: Η χρόνια κόπωση αποτελεί μη ειδικό σύμπτωμα, το οποίο φαίνεται ότι παρουσιάζεται στο 70% των ασθενών με ΠΧΚ και το οποίο συχνά παραβλέπεται από τον ασθενή και τους ιατρούς. Η κόπωση που εμφανίζεται στην ΠΧΚ δεν σχετίζεται με το στάδιο της νόσου, την ύπαρξη κνησμού και

ικτέρου, ούτε είναι ψυχογενής. Ως πιθανό αίτιο της κόπωσης έχει ενοχοποιηθεί η εναπόθεση μαγγανίου στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), ενώ μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κάποια ειδική θεραπεία για το συγκεκριμένο σύμπτωμα (367).

Κνησμός: Ο κνησμός αποτελεί το δεύτερο πιο συχνό σύμπτωμα της ΠΧΚ. Μπορεί να είναι εντοπισμένος ή διάχυτος και συνήθως χειρότερος κατά τη νύχτα. Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός του ικτέρου στην ΠΧΚ δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, δύο όμως είναι οι κύριες υποθέσεις: α) η εναπόθεση χολικών οξέων λόγω της χρόνιας χολόστασης και β) η αυξημένη απελευθέρωση ενδογενών οπιοειδών. Πολλές φαρμακευτικές ουσίες, όπως η φαινοβαρβιτάλη, αντιισταμινικά σκευάσματα, η ριφαμπικίνη, η χολεστυραμίνη, έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση του κνησμού στην ΠΧΚ, χωρίς όμως ιδιαίτερα αποτελέσματα, ενώ ο ρόλος της χορήγησης ανταγωνιστών των οπιοειδών είναι ακόμη υπό διερεύνηση (368, 369).

Μείωση της οστικής πυκνότητας: Σε περίπου 30% των ασθενών εμφανίζεται μικρή μείωση της οστικής πυκνότητας (οστεοπενία), ενώ αληθής οστεοπόρωση παρουσιάζεται σε περίπου 10% των ασθενών. Οι μηχανισμοί που ευθύνονται στις μεταβολικές αυτές αλλαγές των οστών δεν είναι κατανοητοί, δεδομένου ότι στους ασθενείς με ΠΧΚ δεν εμφανίζονται αλλαγές στο μεταβολισμό του ασβεστίου και της βιταμίνης D. Η τρέχουσα θεραπεία της οστικής απώλειας σε ασθενείς με ΠΧΚ είναι ίδια με αυτή του γενικού πληθυσμού και περιλαμβάνει από του στόματος χορήγηση ασβεστίου και βιταμίνης D και συστηματική άσκηση, ενώ τελευταίες μελέτες έχουν δείξει ότι αποτελεσματική είναι και η χορήγηση διφωσφονικών (370).

Υπερλιπιδαιμία: Η υπερλιπιδαιμία εμφανίζεται σε περίπου 85% των ασθενών με ΠΧΚ και συχνά η εμφάνισή της προηγείται της διάγνωσης. Τα επίπεδα της χοληστερόλης αλλά και των τριγλυκεριδίων μπορεί να είναι αυξημένα ως αποτέλεσμα της χρόνιας χολόστασης, αλλά φαίνεται ότι οι ασθενείς αυτοί δεν εμφανίζουν πιο αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο. Στην πραγματικότητα η αύξηση των λιπιδίων δεν σχετίζεται με αύξηση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων ή πρώιμες αθηρωματικές αλλοιώσεις. Η αγωγή με ουρσοδεοξυχολικό οξύ (UDCA) μπορεί να μειώσει τα επίπεδα των λιπιδίων με άγνωστο μηχανισμό και ο ρόλος των στατινών είναι ακόμη υπό συζήτηση (371).

Στεατόρροια και δυσαπορρόφηση: Η μακροχρόνια χολόσταση οδηγεί σε στεατόρροια, επάγωντας τη βακτηριακή υπερανάπτυξη στο έντερο. Ο μηχανισμός διαμεσολαβείται από την ελαττωμένη ροή των χολικών οξέων στο λεπτό έντερο και ανευρίσκεται συχνά σε προχωρημένο στάδιο της νόσου (372). Η δυσαπορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών ανευρίσκεται επίσης σε προχωρημένο στάδιο της ΠΧΚ (373). Η πιο κοινή είναι η ανεπάρκεια της βιταμίνης Α, η οποία παρουσιάζεται στο 20% των περιπτώσεων. Η αναπλήρωση από του στόματος μπορεί να αντirroπήσει τη δυσαπορρόφηση, ενώ απαιτείται παρακολούθηση των επιπέδων στον ορό προς αποφυγή ενδεχόμενης ηπατοτοξικότητας. Από του στόματος αναπλήρωση είναι επίσης αποτελεσματική και σε έλλειψη των βιταμινών Ε (οδηγεί σε αταξία), Κ (προκαλεί διαταραχές πήξεως), D (οδηγεί σε μείωση οστικής πυκνότητας).

Κλινικές εκδηλώσεις από την ανάπτυξη πυλαίας υπέρτασης: Η πυλαία υπέρταση είναι κοινό χαρακτηριστικό σε ασθενείς με ΠΧΚ, αλλά τα τελευταία

χρόνια έχει μειωθεί σημαντικά ο αριθμός των ασθενών που παρουσιάζονται με οξεία αιμορραγία από το γαστρεντερικό. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η πυλαία υπέρταση στην ΠΧΚ δεν υποδηλώνει την ύπαρξη κίρρωσης. Μακροχρόνιες μελέτες αποδεικνύουν ότι περίπου το 58% των ασθενών χωρίς αγωγή, θα αναπτύξει ενδοσκοπικά σημεία πυλαίας υπέρτασης μέσα σε μία περίοδο παρακολούθησης 4 ετών (374). Η αντιμετώπιση της πυλαίας υπέρτασης σε ασθενείς με ΠΧΚ δεν είναι διαφορετική από τις άλλες ηπατοπάθειες και βασίζεται κυρίως στη χορήγηση β-αναστολέων.

ΣΥΝΥΠΑΡΧΟΝΤΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Πολλά άλλα αυτοάνοσα νοσήματα σχετίζονται με την ΠΧΚ, σε ένα ποσοστό περίπου 33% των ασθενών. Μεταξύ των αυτοανόσων εκδηλώσεων που σχετίζονται με την ΠΧΚ, το σύνδρομο Sjögren (10%) και το φαινόμενο Raynaud (12%) είναι τα πιο συχνά παρατηρούμενα (375).

ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ

Όπως και σε άλλες ηπατοπάθειες, η κίρρωση ήπατος σε ασθενείς με ΠΧΚ μπορεί να επιπλακεί από ηπατοκυτταρικό καρκίνο (ΗΚΚ) αν και η ετήσια επίπτωση ΗΚΚ στους ασθενείς αυτούς είναι αισθητά χαμηλότερη από την αντίστοιχη των κίρρωτικών ασθενών με χρόνιες ιογενείς λοιμώξεις ή αλκοολική ηπατοπάθεια. Ως εκ τούτου, οι κίρρωτικοί ασθενείς με ΠΧΚ πρέπει να παρακολουθούνται προσεκτικά προς την κατεύθυνση της διάγνωσης

πρώιμου ΗΚΚ με υπερηχοτομογραφία και αξονική τομογραφία σε επιλεγμένες περιπτώσεις περίπου δις ετησίως, προκειμένου να εκτιμηθεί η πρόγνωση και να καθοριστούν οι θεραπευτικές επιλογές, ιδιαίτερα όταν υπάρχει προοπτική για ορθοτοπική μεταμόσχευση ήπατος. Η αντιμετώπιση του ΗΚΚ σε ασθενείς με ΠΧΚ ακολουθεί τις ίδιες στρατηγικές αντιμετώπισης με τον ΗΚΚ οποιασδήποτε άλλης αιτιολογίας (376).

ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΠΧΚ

Αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (antimitochondrial antibodies-AMA)

Τα AMA είναι ειδικά αυτοαντισώματα για την ΠΧΚ και ανιχνεύονται περίπου στο 95% των περιπτώσεων με ΠΧΚ. Στην καθημερινή πρακτική ο έμμεσος ανοσοφθορισμός χρησιμοποιείται ως μέθοδος διαλογής (screening test), όπου τα AMA εμφανίζονται ως φθορισμός στα ηπατοκύτταρα (Εικόνα 8), στα εγγύς και άπω νεφρικά σωληνάκια, καθώς και στα τοιχωματικά κύτταρα του στομάχου (Εικόνα 9). Τα AMA δείχνουν χαρακτηριστικό κυτταροπλασματικό φθορισμό και σε άλλα υποστρώματα όπως τα HEp2 κύτταρα (Εικόνα 10) αλλά ο φθορισμός αυτός δεν θεωρείται ειδικός καθώς πολλές φορές υπάρχουν τόσο ψευδώς θετικά όσο και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Το βασικότερο πρόβλημα που αφορά στην ανίχνευση των AMA με την τεχνική του εμμέσου ανοσοφθορισμού είναι η ενίοτε δυσχερής διάκρισή τους από τα anti-LKM (Πίνακας 5). Ως εκ τούτου απαιτείται ερμηνεία των αποτελεσμάτων του εμμέσου ανοσοφθορισμού από έμπειρους

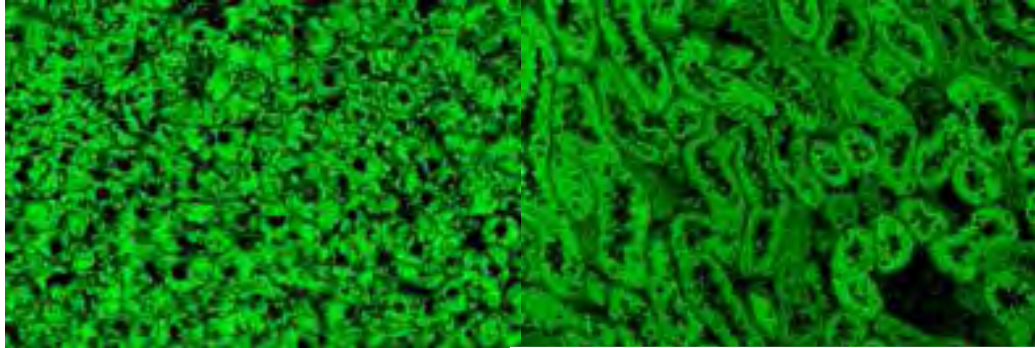
παρατηρητές, ενώ όπως προαναφέρθηκε ζωτικής σημασίας είναι και η κατάλληλη προετοιμασία των τομών ήπατος-νεφρών και στομάχου αρουραίου που χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για τον έμμεσο ανοσοφθορισμό. Όταν για την ανίχνευση των AMA χρησιμοποιούνται νεότερες τεχνικές (ELISA, ανοσοαποτύπωση, γραμμική ανοσοαποτύπωση) που χρησιμοποιούν ανασυνδυσμένα μιτοχονδριακά αυτοαντιγόνα, η ευαισθησία και η ειδικότητα είναι σημαντικά υψηλότερες (377-379). Οι παραπάνω μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια είναι διαθέσιμες ως προτυποποιημένα και αυτοματοποιημένα εμπορικά διαθέσιμα kits και χρησιμοποιούνται ευρέως στην καθημερινή διαγνωστική πρακτική. Ως αντιγόνα χρησιμοποιούνται μιτοχονδριακά εκχυλίσματα βόειων ή χοίρειων ιστών καθώς και ανασυνδυσμένα αυτοαντιγόνα. Για την ανίχνευση των AMA χρησιμοποιούνται από ειδικά εργαστήρια και *in-house* τεχνικές για ερευνητικούς ή διαγνωστικούς σκοπούς. Αν και οι *in-house* μέθοδοι είναι περισσότερο κοπιώδεις και απαιτούν περισσότερο χρόνο στην προτυποποίηση, μπορούν να αποτελέσουν πιο αξιόπιστα εργαλεία στην καθημερινή διαγνωστική πρακτική. Οι συνθήκες στις οποίες εκτελούνται είναι περισσότερο ελεγχόμενες και επιπλέον οι μέθοδοι προτυποποιούνται με βάση ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του πληθυσμού υγιών και ασθενών της εκάστοτε περιοχής (275).

Τα AMA στρέφονται έναντι στοιχείων του συμπλέγματος της 2-κετοξικής-δεϋδρογενάσης (2-oxo-acid dehydrogenase complex, OADC), οικογένειας ενζύμων που συμμετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων. Οι πιο συχνοί αντιγονικοί στόχοι είναι η E2 υπομονάδα της

πυρουβικής δεϋδρογενάσης (Pyruvate Dehydrogenase Complex E2, PDC-E2) με μοριακό βάρος 74 kDa, η οποία αποτελεί το κυριότερο αυτοαντιγόνο-στόχο των AMA, η E2 υπομονάδα της 2-οξικής γλουταρικής δεϋδρογενάσης (oxoglutarate dehydrogenase complex, OGDC-E2) και η E2 υπομονάδα του συμπλέγματος οξοοξεικής δεϋδρογενάσης διακλαδιζόμενης αλύσου (Branched-chain oxo-acid dehydrogenase complex E2, BCOADC-E2). Περίπου το 90% των AMA στρέφονται εναντίον του PDC-E2, ενώ περίπου το 50% αντιδρούν με τα OGDC-E2 και BCOADC-E2 (380).

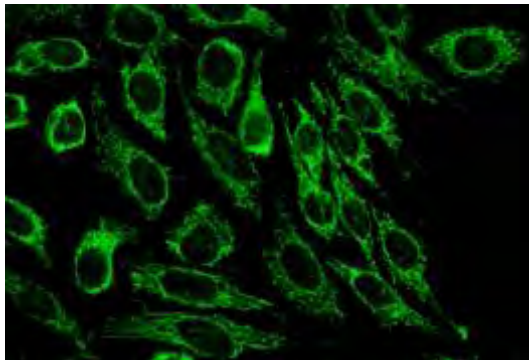
AMA	Anti-LKM
Ανιχνεύονται στην ΠΧΚ	Ανιχνεύονται στην ΑΗ
Φθορισμός στα εγγύς και άπω νεφρικά σωληνάρια	Φθορισμός μόνο στα εγγύς νεφρικά σωληνάρια
Φθορισμός στα τοιχωματικά κύτταρα του στομάχου	Δεν παρουσιάζουν φθορισμό στα τοιχωματικά κύτταρα του στομάχου
Λιγότερο έντονος ο φθορισμός των ηπατοκυττάρων	Έντονος φθορισμός των ηπατοκυττάρων
Αυτοαντιγόνα-στόχοι : Στοιχεία του συμπλέγματος της 2-κετοξικής-δεϋδρογενάσης	Αυτοαντιγόνα-στόχοι : Στοιχεία του κυτοχρώματος και UGT1

Πίνακας 5: Διαφορές AMA και anti-LKM



Εικόνα 8: Φθορισμός AMA σε τομή ήπατος αρουραίου

Εικόνα 9. Φθορισμός AMA σε τομή νεφρού αρουραίου. Παρατηρείται φθορισμός στα εγγύς και άπω νεφρικά σωληνάκια



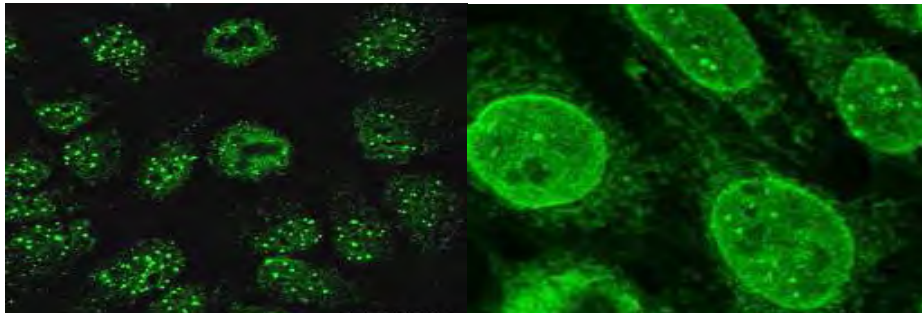
Εικόνα 10: Χαρακτηριστικός κυτταροπλασματικός φθορισμός AMA σε HEp-2

Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA)

Περίπου το 50% των ασθενών με ΠΧΚ εμφανίζει ειδικά ANA (PBC-specific ANA). Με την τεχνική του εμμέσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα κύτταρα HEp-2, γίνονται εμφανή δύο βασικά πρότυπα (patterns) (Εικόνα 11): Το πρότυπο “nuclear rim ή rim like membranous”, το οποίο αντιστοιχεί κυρίως στο αυτοαντιγόνο gp210 και στη νουκλεοπορίνη 62 (πρωτεΐνες του συμπλέγματος των πυρηνικών πόρων) και το πρότυπο “multiple nuclear dots” (MND) που αντιστοιχεί κυρίως σε

αντιδραστικότητα έναντι της πυρηνικής πρωτεΐνης sp100 και sp140 και λιγότερο συχνά σε αντιδραστικότητα έναντι της πυρηνικής πρωτεΐνης PML, η οποία βρίσκεται σε αφθονία σε κύτταρα της προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (promyelotic leukaemia cells) και έναντι των μικρών τροποποιητών ομοιαζόντων στην ουβικουιτίνη (small ubiquitin-like modifiers, SUMO) (381, 382). Η gp210 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 210 kDa, η οποία βοηθά στην πρόσδεση των πρωτεϊνών του συμπλέγματος πυρηνικών πόρων στην πυρηνική μεμβράνη. Ο ρόλος της sp100 (μοριακό βάρος 100 kDa) δεν είναι σαφής, αλλά πιθανολογείται ότι εμπλέκεται στην κυτταρική ρύθμιση (383).

Τα ANA έναντι της πρωτεΐνης gp210 ανιχνεύονται σε περίπου 25% των ασθενών με ΠΧΚ, ενώ αντισώματα έναντι του sp100 ανιχνεύονται στο 20-30% (384). Εντούτοις, αν για την ανίχνευσή τους χρησιμοποιηθούν αντιοροί IgG1, 2, 3 και 4 υποτάξης και όχι μόνο IgG τάξης τότε το 60-70% των ασθενών είναι θετικοί για τα anti-gp210 και/ή anti-sp100 (337, 385). Ο ακριβής ρόλος των ANA στην ΠΧΚ δεν είναι γνωστός, αλλά πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η ύπαρξη ANA σχετίζεται με προχωρημένη νόσο καθώς και με χειρότερη πρόγνωση και έκβαση της ΠΧΚ (386-388). Είναι σαφές ότι τα ειδικά για την ΠΧΚ ANA δεν πρέπει να θεωρούνται όπως συμβαίνει δυστυχώς εσφαλμένα ως δείκτες πιθανολογούμενου συνδρόμου επικάλυψης, αλλά ως ειδικοί δείκτες της ΠΧΚ (337). Τέλος, σε ασθενείς με PBC (με ή χωρίς συνοδό σκληρόδερμα) ανιχνεύονται αντικεντρομεριδιακά αντισώματα στο 10-15% των περιπτώσεων (389).



Εικόνα 11: Πρότυπα φθορισμού multiple nuclear dots (sp100) αριστερά και nuclear rim (gp210) δεξιά.

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΧΚ

Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Ludwig υπάρχουν τέσσερα ιστολογικά στάδια της ΠΧΚ. Το στάδιο I χαρακτηρίζεται από πυλαία φλεγμονή με κυρίως λεμφοκυτταρικές διηθήσεις, οι οποίες συνεπάγονται την καταστροφή των διαφραγματικών και ενδολοβιακών χοληφόρων (διάμετρος μικρότερη από 100μm). Στο στάδιο αυτό, η εξάλειψη των χοληφόρων και ο σχηματισμός κοκκιωμάτων αποτελούν ισχυρά στοιχεία για τη διάγνωση της ΠΧΚ. Στο στάδιο II παρατηρείται περιπυλαία φλεγμονή, σημεία χολαγγειίτιδας και κοκκιώματα. Το στάδιο III χαρακτηρίζεται από διαφραγματική ή γεφυροποιό ίνωση με εξαφάνιση >50% των ενδοηπατικών χοληφόρων. Το στάδιο IV αντιστοιχεί σε αληθή κίρρωση του ήπατος. Εντούτοις, χρειάζεται προσοχή στην εκτίμηση από τους κλινικούς γιατρούς του ιστολογικού σταδίου της νόσου καθώς οι βλάβες στο νόσημα αυτό δεν είναι πάντα διάχυτες στο παρέγχυμα αλλά συνήθως τμηματικές και επομένως μπορεί να υπάρχει τόσο υπερεκτίμηση όσο και υποεκτίμηση του σταδίου. Βασικό ιστολογικό

χαρακτηριστικό της ΠΧΚ σε οποιοδήποτε στάδιο είναι η ύπαρξη επιθηλιοειδών κοκκιωμάτων, χωρίς ευρήματα τυροειδούς νέκρωσης. Οι μηχανισμοί σχηματισμού κοκκιωμάτων στην ΠΧΚ παραμένουν ακόμη άγνωστοι, αλλά πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η διαδικασία πιθανόν να άρχεται από Gram (+) μικροοργανισμούς μέσω του λιποτειχοϊκού οξέως (390), ενώ η οστεοποντίνη συμβάλλει στη συσσώρευση των μονοπυρήνων κυττάρων (391). Η παρουσία ηωσινοφίλων στα πυλαία διαστήματα είναι πολύ ειδικό εύρημα στην ιστολογία της ΠΧΚ (392) παρόλο που η σημασία της σε συνδυασμό και με την περιφερική ηωσινοφιλία δεν είναι πλήρως κατανοητή (393). Τέλος, πάντα υπόψιν θα πρέπει να λαμβάνεται και το σφάλμα δειγματοληψίας. Σε περίπτωση ύπαρξης χαρακτηριστικών πολλών σταδίων σε ένα ιστολογικό δείγμα, το υψηλότερο στάδιο είναι αυτό που τελικά χαρακτηρίζει τη νόσο στο συγκεκριμένο ασθενή.

ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΠΧΚ

Διάφορες θεωρίες έχουν προταθεί σχετικά με την παθογένεια της ΠΧΚ και την ανοσολογικώς επαγόμενη ιστική καταστροφή που επιφέρει. Η καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων υποδεικνύει ότι το κυριότερο αυτοαντιγόνο-στόχος της PBC, η PDC-E2, η οποία φυσιολογικά βρίσκεται στην έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη, εκφράζεται παραδόξως στην επιφάνεια των χαλαγγειοκυττάρων και αναγνωρίζεται από ειδικά αυτοαντισώματα. Μία άλλη θεωρία υποστηρίζει ότι το λανθασμένο splicing του mRNA που κωδικογραφεί την PDC-E2, οδηγεί στην έκφραση της

πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συσκευή Golgi και κατόπιν μεταφορά της στην επιφάνεια των χολαγγειοκυττάρων, όπου εκεί γίνεται στόχος της ανοσολογικής απόκρισης (394). Υπο μελέτη βρίσκεται ακόμη ο ρόλος της IgA ανοσοσφαιρίνης που εκφράζεται στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων των χολαγγείων (395). Τέλος, στην παθογένεια της ΠΧΚ έχει μελετηθεί και ο μηχανισμός της μοριακής μίμησης, με κυριότερους ενοχοποιούμενους μικροοργανισμούς τους E.coli και το gram (-) βακτηρίδιο *Novosphingobium aromaticivorans* (396-399), ενώ υπό μελέτη βρίσκεται ο ρόλος των Tregs (400).

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΠΧΚ

Η διάγνωση της ΠΧΚ γίνεται με βάση τρία κριτήρια: την ύπαρξη χολόστασης/αύξησης των χολοστατικών ενζύμων, την παρουσία ειδικών για τη νόσο αντισωμάτων και κυρίως των AMA και την παρουσία χαρακτηριστικών για τη νόσο ιστολογικών ευρημάτων (401, 402). Συνήθως αρκούν δύο από τα τρία παραπάνω κριτήρια για την ασφαλή διάγνωση.

ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΧΚ

Η τρέχουσα κοινώς αποδεκτή θεραπεία για την PBC είναι το UDCA. Το UDCA αποτελεί το 4% των χολικών οξέων στην ανθρώπινη χολή. Σε σχέση με τα υπόλοιπα χολικά οξέα, το UDCA είναι περισσότερο υδρόφιλο. Απορροφάται κυρίως στο λεπτό έντερο και μειώνει την έκκριση χοληστερόλης στη χολή, μειώνοντας τη μετατροπή της χοληστερόλης σε χολικά οξέα. Ο

μηχανισμός δράσης του UDCA στην ΠΧΚ δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά φαίνεται ότι τροποποιεί τη δεξαμενή των χολικών οξέων, μειώνει τις κυτταροκίνες που επάγουν τη φλεγμονή, ενώ επιπλέον φαίνεται ότι επιδρά στην απόπτωση και έχει ανοσοτροποποιητική λειτουργία (με μέχρι σήμερα άγνωστους μηχανισμούς) (403-405). Ως εναλλακτικές θεραπευτικές επιλογές έχουν προταθεί τα κορτικοστεροειδή, η αζαθειοπρίνη, η κυκλοσπορίνη, η μεθοτρεξάτη, η πενικιλαμίνη και η κολχικίνη με πτωχά αποτελέσματα, ενώ υπό μελέτη βρίσκεται ο ρόλος του MMF, της βουδεσονίδης και της ταμοξιφαίνης. Η μεταμόσχευση ήπατος αποτελεί μέχρι σήμερα τη θεραπεία τελικού σταδίου για την ΠΧΚ, με ποσοστά επιβίωσης 92% και 85% για το ένα και πέντε έτη μετά τη μεταμόσχευση αντίστοιχα (406-411).

ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΤΙΚΗ ΧΟΛΑΓΓΕΙΙΤΙΔΑ (ΠΣΧ)

Η ΠΣΧ είναι μία σπάνια χρόνια χολοστατική νόσος του ήπατος αγνώστου αιτιολογίας που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή, ίνωση και καταστροφή των ενδοηπατικών και εξωηπατικών χοληφόρων (412-415). Με την πάροδο του χρόνου, τα χοληφόρα εμφανίζουν στενώσεις και αποφράσσονται πλήρως, ενώ οι μικροί ενδοηπατικοί πόροι εξαφανίζονται. Οι εστιακές διατάσεις των χοληφόρων πλησίον στενωμένων περιοχών παράγουν τα χαρακτηριστικά απεικονιστικά ευρήματα στη χολαγγειογραφία (416,417). Η ΠΧΚ αποτελεί την τέταρτη κατά σειρά ένδειξη για μεταμόσχευση ήπατος στις Η.Π.Α. και την πρώτη στις Σκανδιναβικές χώρες. Η νόσος ακολουθεί αργή,

αλλά καταστροφική πορεία, οδηγώντας σε κίρρωση, πυλαία υπέρταση και ηπατική ανεπάρκεια (418,419).

Το 70% των ασθενών με ΠΣΧ είναι άνδρες με μέσο όρο ηλικίας κατά τη διάγνωση της νόσου τα 39 έτη (418, 419). Η νόσος στην πλειονότητα των περιπτώσεων εμφανίζεται σε συνδυασμό με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (75-80%), ενώ μπορεί να συνυπάρχει με οπισθοπεριτοναϊκή ή μεσοθωρακική ίνωση. Από το 75% των ασθενών που εμφανίζουν ΠΣΧ σε συνδυασμό με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, το 87% εμφανίζει ελκώδη κολίτιδα και το 13% νόσο Crohn (420).

ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΣΧ

Στα αρχικά στάδια της νόσου, οι περισσότεροι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί και παρουσιάζουν μόνο αύξηση των χολοστατικών ενζύμων. Εντούτοις, πολλοί ασθενείς, αν και ασυμπτωματικοί, μπορεί να εμφανίζουν προχωρημένη νόσο, όπως φαίνεται ιστολογικά και απεικονιστικά. Σε προχωρημένο στάδιο της νόσου εμφανίζεται κλινικά ίκτερος, κνησμός, απώλεια βάρους και χρόνια κόπωση. Σε 10-15% των ασθενών κατά τη στιγμή της διάγνωσης συνυπάρχουν νυκτερινοί ιδρώτες, πυρετός, άλγος στο δεξιό υποχόνδριο, ίκτερος και κνησμός (421).

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΠΣΧ

Τα τρέχοντα κριτήρια για τη διάγνωση της ΠΣΧ βασίζονται στις κλασσικές αλλαγές των χοληφόρων όπως αυτά φαίνονται από την ενδοσκοπική παλίνδρομη χολλαγειοπαγκρεατογραφία (ERCP), τη μαγνητική χολαγειοπαγκρεατογραφία (MRCP) ή τη διηπατική χολαγγειογραφία. Πριν να τεθεί η διάγνωση της ΠΣΧ πρέπει να αποκλειστούν άλλες αιτίες δευτεροπαθούς σκληρυντικής χολαγγειίτιδας. Αυτές περιλαμβάνουν χρόνια βακτηριακή χολαγγειίτιδα, ισχαιμική βλάβη των χοληφόρων, προηγούμενες χειρουργικές επεμβάσεις, νεοπλάσματα και συγγενείς διαμαρτίες των χοληφόρων. Η παρουσία αυτών των αιτιών διερευνάται με το ιστορικό του ασθενούς, τα εργαστηριακά ευρήματα, τα ευρήματα από τον απεικονιστικό έλεγχο με υπερηχογράφημα και με χολαγγειογραφία ή ακόμη και με τη διενέργεια βιοψίας και ιστολογικής εξέτασης.

Στην ΠΣΧ ο εργαστηριακός έλεγχος κατά βάση αναδεικνύει αύξηση των χολοστατικών ενζύμων, όμως μεμονωμένα δεν είναι διαγνωστικός. Οι περισσότεροι ασθενείς εμφανίζουν επιπλέον και μικρή αύξηση των τρανσαμινασών, ενώ στα αρχικά στάδια της νόσου τα επίπεδα της χολερυθρίνης είναι φυσιολογικά, αλλά αυξάνονται κατά την πρόοδο της νόσου. Υπεργαμμασφαιριναιμία ανευρίσκεται στο 30% των ασθενών και αύξηση της IgM στο 40-50%. Στο 65% περίπου των ασθενών με ΠΣΧ ιδιαίτερα αυτών με συνυπάρχουσα φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, ανευρίσκονται pANCA. SMA και ANA ανευρίσκονται σε ποσοστά 11% και 6-35% αντίστοιχα, ενώ AMA δεν παρατηρούνται σχεδόν ποτέ (422, 423).

Η απεικόνιση των χοληφόρων είναι βασική εξέταση για τη διάγνωση της ΠΣΧ. Η μέθοδος εκλογής είναι πλέον η MRCP καθώς παρουσιάζει ίδια ευαισθησία και ειδικότητα με την ERCP και επιπλέον είναι μη επεμβατική. Η ERCP απαιτείται όπου η MRCP δεν θέτει τη διάγνωση παρά την ισχυρή κλινική και εργαστηριακή υποψία. Η διαδερμική χολαγγειογραφία είναι εξέταση που εμφανίζει μεγαλύτερο αριθμό τεχνικών δυσκολιών και πρακτικά διενεργείται σε εξαιρετικά σπάνιες και ιδιαίτερες περιπτώσεις ασθενών. Τα χαρακτηριστικά ευρήματα της ΠΣΧ περιλαμβάνουν πολυεστιακές στενώσεις και διατάσεις ενδοηπατικών και εξωηπατικών χοληφόρων, οι οποίες προκαλούν και το χαρακτηριστικό σημείο του κομβολογίου (416, 417).

Υπάρχει μία ειδική υποκατηγορία της ΠΣΧ, η επονομαζόμενη ΠΣΧ των μικρών χοληφόρων (small duct ΠΣΧ), στην οποία τα προσβεβλημένα χοληφόρα είναι τόσο μικρά που δεν μπορούν να απεικονιστούν με χολαγγειογραφία. Η οντότητα αυτή διαγιγνώσκεται σε ασθενείς με αύξηση των χολοστατικών ενζύμων από τον εργαστηριακό έλεγχο και χαρακτηριστικά ευρήματα στη βιοψία, αλλά με φυσιολογικά ευρήματα από τον απεικονιστικό έλεγχο των χοληφόρων (424).

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΣΧ

Η πάχυνση και η σκλήρυνση του κοινού χοληδόχου πόρου είναι χαρακτηριστικά της ΠΣΧ. Στα αρχικά στάδια της νόσου, το ήπαρ φαίνεται μακροσκοπικά φυσιολογικό, κατά την πορεία όμως της νόσου το ήπαρ αποκτά οζώδη μορφολογία και χρωματίζεται από τη χολή.

Έχουν αναγνωρισθεί τέσσερα ιστολογικά στάδια της νόσου. Το πρώτο στάδιο χαρακτηρίζεται από εκφύλιση του επιθηλίου των χοληφόρων και διήθηση από λεμφοκύτταρα και περιστασιακά ουδετερόφιλα. Εμφανίζεται φλεγμονή, ουλοποίηση και οίδημα στα πυλαία διαστήματα. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να εμφανισθεί επιπλέον κενотоπιώδης εκφύλιση του επιθηλίου των χοληφόρων και συγκεντρική εναπόθεση συνδετικού ιστού γύρω από τα χοληφόρα ως μορφή κρεμμυδιού (onionskin lesions), εύρημα παθογνωμονικό για τη νόσο. Στο στάδιο 2 οι αλλοιώσεις αυτές είναι περισσότερο εκτεταμένες. Η ίνωση και η φλεγμονή επεκτείνονται στο περιπυλαίο ηπατικό παρέγχυμα και καταστρέφονται τα ηπατοκύτταρα. Χαρακτηριστικό εύρημα είναι η μεγάλη μείωση των χοληφόρων. Καθώς η νόσος προχωρά, εμφανίζονται πυλαιο-πυλαία διαφραγμάτια και τα χοληφόρα είτε εξαφανίζονται, είτε εμφανίζουν μεγάλες εκφυλιστικές αλλοιώσεις. Το στάδιο 4 αποτελεί το στάδιο της κίρρωσης και εμφανίζονται βλάβες και σε μεγάλα χολαγγεία (412, 425).

ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΠΣΧ

Η ακριβής αιτιολογία της ΠΣΧ παραμένει άγνωστη. Παρόλα αυτά πλήθος παραγόντων έχει ενοχοποιηθεί για την πρόκληση βλάβης στα χοληφόρα και την εμφάνιση της νόσου. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν τη χρόνια πυλαία βακτηριαιμία, την παραγωγή τοξικών μεταβολιτών της χολής, χρόνιες ιογενείς λοιμώξεις και ισχαιμική βλάβη.

Γενετικοί και ανοσολογικοί παράγοντες φαίνεται ότι κατέχουν θέση στην παθογένεια της ΠΣΧ, παρόλο που η νόσος δε φαίνεται να κληρονομείται με κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο. Υπάρχει βέβαια και συσχέτιση της νόσου με αντιγόνα του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας και με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο συστηματικός ερυθρεματώδης λύκος (ΣΕΛ), η μυασθένεια gravis και η νόσος Grave's. Το HLA-DRw52a εμφανίζεται σε αρκετά υψηλό ποσοστό ασθενών με ΠΣΧ (426,427), ενώ σε ασθενείς με HLA-DR4 η πορεία της νόσου φαίνεται ότι επιταχύνεται (428).

Οι ασθενείς με ΠΣΧ εμφανίζουν στοιχεία δυσλειτουργίας της ρύθμισης της ανοσολογικής απόκρισης, μεταξύ των οποίων όπως προαναφέρθηκε, διήθηση των χοληφόρων από λεμφοκύτταρα, υπεργαμμασφαιριναιμία με αύξηση της IgM, pANCA, αυξημένη κατανάλωση του C3 κλάσματος του συμπληρώματος και συνυπάρχει συχνά με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I (426).

Η κυτταρική ανοσία φαίνεται επίσης ότι έχει κάποιο ρόλο στην ΠΣΧ. Ενώ ο συνολικός αριθμός των κυκλοφορούντων T-λεμφοκυττάρων εμφανίζεται μειωμένος, ο αριθμός των αυτοδραστικών T-λεμφοκυττάρων στα πυλαία διαστήματα είναι αυξημένος. Ο λόγος CD4:CD8 στην κυκλοφορία είναι αυξημένος, όπως αυξημένος είναι και ο αριθμός των B-λεμφοκυττάρων (429-431) και η αυτοαντιδραστικότητα των πυλαίων T-λεμφοκυττάρων (432).

ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΣΧ

Η αποτελεσματική θεραπεία της ΠΣΧ δυσχεραίνεται από το γεγονός ότι δεν είναι πλήρως κατανοητή η παθογένεια και οι προγνωστικοί παράγοντες της νόσου. Το UDCA έχει μελετηθεί στη θεραπεία της ΠΣΧ και έχει συσχετιστεί με ομαλοποίηση των χολοστατικών ενζύμων και βελτίωση της συμπτωματολογίας, ενώ φαίνεται ότι εμφανίζει και ανοσοτροποποιητική δράση (433-436).

Σχετικά με τη θεραπεία με κορτικοστεροειδή και άλλους ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες δεν έχει αποδειχθεί βελτίωση της δραστηριότητας της νόσου. Έχουν μελετηθεί παράγοντες όπως η πρεδνιζολόνη, η βουδεσονίδη, η αζαθειοπρίνη, η κυκλοσπορίνη, η μεθοτρεξάτη, anti-TNF παράγοντες, το MMF και άλλα. Εντούτοις, δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι οι παραπάνω παράγοντες είναι αποτελεσματικοί και κανένας δεν συστήνεται για τη θεραπεία της κλασικής ΠΣΧ. Σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο, κίρρωση ήπατος και ηπατοκυτταρική ανεπάρκεια, τελική θεραπεία αποτελεί η μεταμόσχευση ήπατος.

Έμφαση επιπλέον πρέπει να δοθεί στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων λόγω της χρόνιας χολόστασης. Προς αυτές τις κατευθύνσεις συμβάλλει η χορήγηση ρητινών που δεσμεύουν τα χολικά οξέα για την αντιμετώπιση του κνησμού και η θεραπεία υποκατάστασης των λιποδιαλυτών βιταμινών, λόγω δυσαπορρόφησής τους (437, 438).

ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΕΠΙΚΑΛΥΨΗΣ (OVERLAP SYNDROMES)

Με τον όρο «σύνδρομα επικάλυψης» περιγράφονται σπάνιες μορφές της ΑΗ, οι οποίες μπορούν να εμφανιστούν με συνυπάρχοντα χαρακτηριστικά της ΠΧΚ ή της ΠΣΧ. Μεχρι στιγμής δεν έχουν καθοριστεί τα ακριβή διαγνωστικά κριτήρια των συνδρόμων επικάλυψης, όπως επίσης ακόμη δεν έχει καταστεί σαφές, εάν τα σύνδρομα επικάλυψης αποτελούν διακριτές οντότητες ή εάν αποτελούν παραλλαγές των κυρίων αυτοανόσων νοσημάτων ήπατος (439). Γι'αυτούς τους λόγους το IAIHG στη θέση ομοφωνίας δεν θεωρεί τα σύνδρομα επικάλυψης ως ξεχωριστές κλινικές οντότητες αλλά ως «παραλλαγές» (variants) του κυρίαρχου αυτοανόσου νοσήματος (ΑΗ, ΠΧΚ, ΠΣΧ) καθώς είναι εξαιρετικά σπάνια και συνήθως υπάρχει υπερεκτίμηση στην ταξινόμηση που βασίζεται σε μη αντικειμενικά κριτήρια. Ως εκ τούτου πρέπει να αντιμετωπίζονται όπως ακριβώς γίνεται στο αντίστοιχο κυρίαρχο αυτοάνοσο νόσημα (439).

Από κλινικής σκοπιάς, τα κυριότερα σύνδρομα επικάλυψης που έχουν περιγραφεί είναι το σύνδρομο επικάλυψης ΠΧΚ-ΑΗ και το σύνδρομο επικάλυψης ΠΣΧ-ΑΗ. Συνήθως οι επιμέρους παθήσεις των συνδρόμων επικάλυψης εμφανίζονται ταυτόχρονα, όμως μπορεί ασθενείς με χαρακτηριστικά της μίας νόσου να εμφανίσουν στην πορεία του χρόνου και χαρακτηριστικά της άλλης νόσου (440).

Το σύνδρομο επικάλυψης ΑΗ-ΠΧΚ αποτελεί το πλέον σύνηθες. Μελέτες έχουν περιγράψει σύνδρομο επικάλυψης σε ποσοστό περίπου 8-9% των ασθενών με ΠΧΚ ή ΑΗ αν και όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα ποσοστά

αυτά θεωρούνται υπερεκτιμημένα. Υπάρχει η υπόθεση ότι στην ΠΧΚ, η εμφάνιση συνδρόμου επικάλυψης αποτελεί την επέκταση της ανοσολογικώς επαγόμενης βλάβης, όπου πλέον εμφανίζεται καταστροφή και των ηπατοκυττάρων (441).

Το σύνδρομο επικάλυψης της ΑΗ-ΠΣΧ χαρακτηρίζεται από την παρουσία ANA ή SMA, υπεργαμμασφαιριναιμία, αύξηση των χολοστατικών ενζύμων, παρουσία περιπυλαίας ηπατίτιδας, καταστροφή των χοληφόρων και χολόσταση. Η διάγνωση υποστηρίζεται από τις χαρακτηριστικές αλλοιώσεις των χοληφόρων στη χολαγγειοπαγκρεατογραφία (442, 443).

Στα παιδιά, η επικάλυψη ΑΗ-ΠΣΧ είναι συχνότερη από τους ενήλικες και έχει καθιερωθεί ο όρος αυτοάνοση σκληρυντική χολαγγειίτιδα (autoimmune sclerosing cholangitis – ASC) (444).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

α-AKTININH

α-AKTININH

Η α-ακτινίνη αποτελεί πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού, η οποία ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών που προσδένονται στην f-ακτίνη, μαζί με τη σπεκτρίνη, τη δυστροφίνη, τα ανάλογα και τις ισομορφές τους (445, 446). Είναι παρούσα στα μυϊκά και μη μυϊκά κύτταρα και εντοπίζεται κυρίως στις περιοχές επαφής μεταξύ των κυττάρων και στις κυτταρικές προσεκβολές (447). Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερις ισομορφές της α-ακτινίνης στον άνθρωπο: η «μη μυϊκή» α-ακτινίνη-1 (448), η «μυϊκή» α-ακτινίνη-2, η «μυϊκή» α-ακτινίνη-3 (449) και η πιο πρόσφατα ταυτοποιημένη «μη μυϊκή» α-ακτινίνη-4 (450). Η ισομορφές 2 και 3 της α-ακτινίνης αποτελούν μέρος του μηχανισμού σύσπασης του κυττάρου προσδένοντας τα ινίδια της f-ακτίνης στη γραμμή Z στους γραμμωτούς μύες και στα πυκνά σωμάτια στα λεία μυϊκά κύτταρα (447). Τα γονίδια που κωδικογραφούν τις «μη μυϊκές» ισομορφές της α-ακτινίνης εκφράζονται σε ποικιλία ειδών κυττάρων. Οι «μη μυϊκές» ισομορφές της α-ακτινίνης αλληλεπιδρούν με την f-ακτίνη και με έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταροσκελετού, συμμετέχοντας έτσι στο σχηματισμό του κυτταροσκελετού και των συνδέσεων προσκόλλησης. Έτσι, γίνεται εμφανές ότι ο ρόλος της α-ακτινίνης είναι πολυδιάστατος, καθώς συνδέει τον κυτταροσκελετό σε πολλές διαφορετικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και σε μόρια προσκόλλησης, ρυθμίζοντας τη

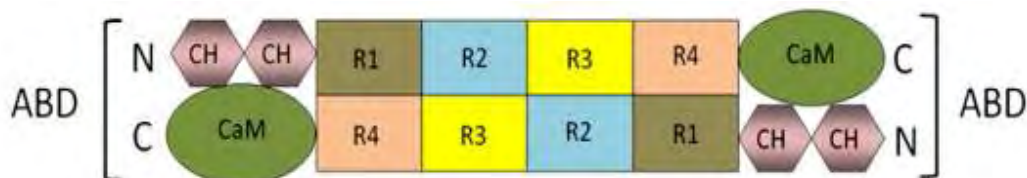
δραστηριότητα πολλών υποδοχέων και ενεργοποιώντας πολλαπλές οδούς κυτταρικής σηματοδότησης (446, 447, 451-454).

Τα τελευταία χρόνια, η α-ακτινίνη έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας ως πιθανό αυτοαντιγόνο-στόχος σε αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο ΣΕΛ και η ΑΗ-1. Πράγματι έχειδειχθεί ότι τα αντισώματα έναντι διπλής έλικας DNA (anti-dsDNA antibodies) συνεισφέρουν στην παθογένεια της σπειραματονεφρίτιδας του ΣΕΛ, εμφανίζοντας διασταυρούμενη αντίδραση με την α-ακτινίνη σε μοντέλα τρωκτικών και στον άνθρωπο (455-466). Επιπλέον, αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης εμφανίζονται στον ορό 40% των ασθενών με ΑΗ-1, χαρακτηρίζοντας σε συνδυασμό με τα αντισώματα έναντι της f-ακτίνης, μία υποομάδα ασθενών που εμφανίζουν σοβαρότερη μορφή της νόσου κλινικά και ιστολογικά (467, 468).

ΔΟΜΗ ΤΗΣ α-AKTININΗΣ

Η α-ακτινίνη είναι ένα πεπτίδιο μοριακού βάρους 100 kDa, το οποίο αποτελείται από ένα αμινοτελικό άκρο, το οποίο διαθέτει δύο περιοχές ομολογίας με την καλπονίνη, έναν κεντρικό κορμό, ο οποίος διαθέτει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες σπεκτρίνης και ένα καρβοξυτελικό άκρο, το οποίο διαθέτει περιοχές ομολογίας με την καλμοδουλίνη (469, 470). Η δομή κάθε περιοχής έχει αναλυθεί με κρυσταλλογραφία (471, 472), αλλά η πλήρης δομή του μορίου δεν έχει ακόμη μελετηθεί με αναλύσεις υψηλής ευκρίνειας. Η λειτουργική μονάδα της α-ακτινίνης είναι ένα αντιπαράλληλο ομοδιμερές μήκους περίπου 40nm, στο οποίο, το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο

σχηματίζουν την περιοχή πρόσδεσης της ακτίνης στα δύο άκρα του μορίου, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με τις αλληλουχίες σπεκτρίνης (Εικόνα 12) (469, 470, 473). Η περιοχή πρόσδεσης της ακτίνης στα άκρα του μορίου δίνει στην α-ακτινίνη τη δυνατότητα πρόσδεσης με τα ινίδια της ακτίνης. Η κεντρική περιοχή του μορίου περιλαμβάνει τέσσερις ακολουθίες σπεκτρίνης (Εικόνα 12). Οι αλληλουχίες σπεκτρίνης δίνουν στο μόριο σημαντική ελαστικότητα και του προσδίδουν ανθεκτικότητα στη μηχανική καταπόνηση (469-471). Επιπλέον, η κεντρική περιοχή στρέφεται από το ένα άκρο στο άλλο κατά περίπου 90 μοίρες. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά φαίνεται ότι διατηρούνται σε όλες τις ισομορφές της α-ακτινίνης και προσδίδουν σταθερότητα στο μόριο, ενώ σχηματίζουν θέσεις πρόσδεσης υψηλής συγγένειας (469, 471, 473). Επιπλέον, η κεντρική περιοχή καθορίζει την απόσταση και τον προσανατολισμό της σύνδεσης των ινιδίων ακτίνης (473, 474) και χρησιμεύει ως θέση πρόσδεσης για πολλούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς και μόρια σηματοδότησης, διευκολύνοντας έτσι τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις των ισομορφών (Εικόνα 12) (469, 470). Τέλος, το μόριο της α-ακτινίνης διαθέτει όξινη επιφάνεια και έτσι αλληλεπιδρά με μόρια του κυτταροπλάσματος και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (469).



Εικόνα 12: Σχηματική δομή της α-ακτινίνης. Η α-ακτινίνη αποτελείται από ένα αμινοτελικό άκρο, το οποίο διαθέτει δύο περιοχές ομολογίας με την καλπονίνη και ένα καρβοξυτελικό άκρο, το οποίο διαθέτει περιοχές ομολογίας με την καλμοδουλίνη, τα οποία σχηματίζουν την περιοχή πρόσδεσης της ακτίνης στα δύο άκρα του μορίου. Ο κεντρικός κορμός διαθέτει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες σπεκτρίνης.

Ο ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ α-AKTININΗΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Υπάρχουν συνολικά τέσσερα γονίδια που κωδικογραφούν την α-ακτινίνη, τα οποία εμφανίζουν μεγάλη ομολογία και είναι καλώς διατηρημένα μεταξύ των ειδών (475, 476). Εντούτοις, παρά την εκτενή έρευνα, η ακριβής λειτουργία των τεσσάρων ισομορφών της α-ακτινίνης, ο ακριβής τους ρόλος και η σημασία της πρόσδεσης τους με την f-ακτίνη *in-vivo* παραμένουν ασαφή (Πίνακας 6). Η αλληλεπίδραση των ισομορφών της α-ακτινίνης και της f-ακτίνης αποτελεί θεμελιώδες στοιχείο για τη διατήρηση του σχήματος και της κινητικότητας του κυττάρου και στην πρόσδεση των δομών του κυτταροσκελετού στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (474). Επιπλέον, η α-ακτινίνη εντοπίζεται στις περιοχές επαφής των κυττάρων και στις κυτταρικές προσεκβολές και για το λόγο αυτό φαίνεται ότι επιτελεί σημαντικό ρόλο στο κύτταρο ρυθμίζοντας τη λειτουργία πολλών υποδοχέων και συνδέοντας τον κυτταροσκελετό με διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και σηματοδοτικά μονοπάτια. Συνδέοντας τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με την f-ακτίνη του κυτταροσκελετού, η α-ακτινίνη παρέχει στο κύτταρο δομική σταθερότητα και συμβάλλει στη διατήρηση του σχήματος του κυττάρου και συμμετέχει στην πρόσδεση σηματοδοτικών μορίων και μορίων προσκόλλησης (447).

Πίνακας 6: Βασικά δομικά χαρακτηριστικά και λειτουργίες της α-ακτινίνης.

Μοριακό βάρος και βιολογικά χαρακτηριστικά	100 kDa κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, ανήκει στις πρωτεΐνες προσδένουσες την f-ακτίνη
Ισομορφές της α-ακτινίνης	«Μυϊκές» α-ακτινίνη -2 και- 3 «Μη μυϊκές» α-ακτινίνη -1 και -4
Λειτουργίες	Βασικές λειτουργίες η διατήρηση του κυτταρικού σχήματος και η σύνδεση του κυτταροσκελετού με πολλές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες

«Μυϊκή» α-ακτινίνη-2 και -3 (Πίνακας 7)

Στον άνθρωπο, τα γονίδια της α-ακτινίνης-2 εκφράζονται σε όλες τις σκελετικές μυϊκές ίνες, ενώ τα γονίδια για την α-ακτινίνη-3 περιορίζονται στις ίνες τύπου-2 (477). Παρόλα αυτά, έχει δειχθεί με ανοσοαποτύπωση σε ανθρώπινους ιστούς ότι η α-ακτινίνη-2 εντοπίζεται στους σκελετικούς μύες, στον καρδιακό μυ, στους οφθαλμοκινητικούς μύες και στη φαιά ουσία του εγκεφάλου. Η α-ακτινίνη-3 εντοπίζεται στους μύες των άκρων και σε πολύ χαμηλά επίπεδα στον εγκέφαλο. Καμία από τις δύο αυτές ισομορφές δεν

εκφράζεται στους λείους μύες σε αντίθεση με τις άλλες δύο ισομορφές (α-ακτινίνη-1 και -4) (475).

Η α-ακτινίνη-2 και η α-ακτινίνη-3 εμφανίζουν 80% ομολογία και η έκφραση της α-ακτινίνης-2 στους ανθρώπιους σκελετικούς μύες επικαλύπτει την α-ακτινίνη-3 (475, 449). Επιπλέον, η α-ακτινίνη-2 και η α-ακτινίνη-3 σχηματίζουν ετεροδιμερή *in-vitro* και *in-vivo*, γεγονός το οποίο υποδεικνύει δομικές και λειτουργικές ομοιότητες μεταξύ των δύο «μυϊκών» ισομορφών της α-ακτινίνης (478).

Η α-ακτινίνη-2 και -3 αποτελούν μείζονα στοιχεία του Z-δίσκου, ο οποίος συνδέει τα σαρκομερίδια στο σημείο που αυτά προσδένονται στα ινίδια της f-ακτίνης (449). Αυτές οι ισομορφές της α-ακτινίνης αλληλεπιδρούν επιπλέον με τις πρωτεΐνες της Z-ζώνης και συγκεκριμένα με τη μιοτιλίνη, τη νεμπουλίνη και την τιτίνη, την πρωτεΐνη FATZ (filamin actinin telethonin binding protein) και την πρωτεΐνη CapZ (Capping Protein Muscle Z-Line), στοιχεία τα οποία είναι ζωτικά για τη δομή και τη λειτουργία του γραμμωτού μυϊκού κυττάρου (476, 479, 480). Από τα παραπάνω καθίσταται εμφανές ότι οι δύο αυτές ισομορφές της α-ακτινίνης επιτελούν σημαντικό ρόλο στο σαρκομερίδιο και στην οργάνωση των λεπτών ινιδίων της f-ακτίνης, όπως επίσης και στην αλληλεπίδραση μεταξύ του σαρκομερικού κυτταροσκελετού και της μεμβράνης του μυϊκού κυττάρου. Η α-ακτινίνη φαίνεται ότι εμπλέκεται σε μυοπάθειες (481) και στην υπερτροφική και διατακτική μυοκαρδιοπάθεια (482, 483), ενώ ο πιθανός ρόλος του μορίου στην καρδιακή ανεπάρκεια είναι υπό έρευνα (484). Η έλλειψη της α-ακτινίνης-3, παρόλο που ανευρίσκεται στο

18% του γενικού πληθυσμού, δε σχετίζεται με κάποιο παθολογικό φαινότυπο (485).

Στις νευρωνικές συνάψεις, η α-ακτινίνη φαίνεται ότι παίζει ρόλο στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού και στην απενεργοποίηση του υποδοχέα του N-μέθυλο-D-ασπαρτικού οξέως (NMDAR) για το γλουταμικό οξύ (447, 486). Είναι ακόμη πιθανό ότι η α-ακτινίνη-2 οργανώνει τα πολυάριθμα σηματοδοτικά μόρια που σχετίζονται με αυτόν τον υποδοχέα (447, 487, 488). Για παράδειγμα, το ασβέστιο που εισέρχεται στα κύτταρα μέσω του NMDAR μπορεί να σχετίζεται με τις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης (489). Ο NMDAR σχετίζεται ακόμη με τη σχιζοφρένεια, την επιληψία, τις ισχαιμικές βλάβες του εγκεφάλου και τις νευροεκφυλιστικές διαταραχές (488). Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον, ότι τα αντισώματα έναντι του NMDAR συμμετέχουν στην προσβολή του ΚΝΣ στο ΣΕΛ, δεδομένου ότι ανευρίσκονται στον εγκεφαλικό ιστό ασθενών με ΣΕΛ με προσβολή του ΚΝΣ (490).

«Μη μυϊκή» α-ακτινίνη-1 και -4 (Πίνακας 7)

Τα γονίδια που κωδικογραφούν την α-ακτινίνη-1 και -4 έχουν ευρεία κατανομή. Η α-ακτινίνη-1 και -4 έχουν 80% ομολογία (450). Σε κυτταρικό επίπεδο, η α-ακτινίνη-1 βρίσκεται κυρίως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις συνδέσεις προσκόλλησης και στο πέρασ των ινιδίων ακτίνης (491, 492). Η α-ακτινίνη-4 εντοπίζεται επίσης στο πέρασ τον ινιδίων ακτίνης, αλλά κατανέμεται κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα

και στον πυρήνα. Η διαφορετική εντόπιση των δύο αυτών «μη μυϊκών» ισομορφών της α-ακτινίνης υποδεικνύει ότι επιτελούν διαφορετικές διακριτές λειτουργίες (450). Υπάρχουν πολλές μελέτες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις των «μη μυϊκών» ισομορφών της α-ακτινίνης στις θέσεις προσκόλλησης και την επίδρασή τους στην κινητικότητα του κυττάρου, προτείνοντας έτσι ότι ο ρόλος τους στην παθογένεια διαφόρων νοσημάτων σχετίζεται άμεσα με τη λειτουργία τους.

Παρά την ευρύτερη κατανομή της, η α-ακτινίνη-4 ανευρίσκεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με την α-ακτινίνη-1 στα «μη μυϊκά κύτταρα» και φαίνεται ότι επιτελεί ποικίλους ρόλους. Εντούτοις, στον ανθρώπινο νεφρό, η α-ακτινίνη-4 εντοπίζεται σε σημαντικές συγκεντρώσεις σε αντίθεση με την α-ακτινίνη-1 (493). Στο νεφρό, η α-ακτινίνη εντοπίζεται κυρίως στα ποδοκύτταρα και ιδιαίτερα στις ποδοειδείς προσεκβολές, στα τριχοειδή και μεγαλύτερα αγγεία και στα μεσαγγειακά κύτταρα (493,494). Η έκφραση της α-ακτινίνης στο νεφρό είναι γνωστή με βάση μελέτες για το νεφρωσικό σύνδρομο σε ζωικά μοντέλα (494). Τρωκτικά που δεν εξέφραζαν την α-ακτινίνη παρουσίαζαν μη φυσιολογική μορφολογία των ποδοκυττάρων και βαρείας μορφής βλάβη των σπειραμάτων (βαρείας μορφής σπειραματοπάθεια) (495, 496). Στον άνθρωπο, μεταλλάξεις στο γονίδιο της α-ακτινίνης-4 προκαλούν τον οικογενή τύπο της εστιακής τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης, καθιστώντας τα ποδοκύτταρα επιρρεπή στη βλάβη (493), ενώ αλλαγές στην έκφραση της α-ακτινίνης, σε συνδυασμό με αλλαγή στην έκφραση άλλων πρωτεϊνών, όπως η νεφρίνη και η ποδοσίνη, έχει παρατηρηθεί σε παιδιά με νεφρωσικό σύνδρομο (497). Πρόσφατα,

αποκλειστική κατανομή της α-ακτινίνης-1 στα μεσαγγειακά κύτταρα ανιχνεύθηκε σε ασθενείς με IgA νεφροπάθεια, εστιακή και τμηματική σπειραματοσκλήρυνση, νόσο των ελαχίστων αλλοιώσεων και σε ασθενείς με λέπτυνση της βασικής μεμβράνης (498). Από τα παραπάνω, συνάγεται ότι ο ρόλος των «μη μυϊκών» ισομορφών της α-ακτινίνης στο νεφρό είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση του σπειραματικού διηθητικού φραγμού. Επιπλέον μελέτες προτείνουν άλλους πιθανούς τρόπους συμμετοχής των «μη μυϊκών» ισομορφών της α-ακτινίνης στην παθογένεια νεφρικών νόσων, αποδεικνύοντας ότι η α-ακτινίνη μπορεί να τροποποιήσει το μόριο της πολυκυστίνης-2 (προϊόντος του γονιδίου PKD2) και να αυξήσει τη δραστηριότητά του ως διαύλου (499).

Όσον αφορά στο ήπαρ, δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με την κατανομή των ισομορφών της α-ακτινίνης και της ακριβούς λειτουργίας τους. Έτσι, ο ρόλος της α-ακτινίνης στο ήπαρ παραμένει ασαφής. Εντούτοις, έχει αποδειχθεί (σε ενήλικες) ότι η α-ακτινίνη εκφράζεται στη μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων και των κυττάρων των πόρων (ductal cells) (500-502). Επιπλέον, φαίνεται ότι η α-ακτινίνη αλληλεπιδρά με τον HCV (503) και συγκεκριμένα με τον αναδιπλασιασμό του ιού (504), γεγονός που υποδεικνύει πιθανή συμμετοχή της α-ακτινίνης στην παθογένεια ηπατικών νοσημάτων.

Όπως προαναφέρθηκε, η ακτίνη του κυτταροσκελετού παίζει εξέχοντα ρόλο στην κινητικότητα του κυττάρου και η α-ακτινίνη, ως κύριο συνδετικό μόριο μεταξύ της ακτίνης και των συνδέσεων προσκόλλησης, είναι ο κύριος ρυθμιστής αυτής της λειτουργίας (505,506). Φαίνεται ότι η α-ακτινίνη κατέχει

κύριο ρόλο στην «αποπροσκόλληση» των κυττάρων, από τη στιγμή που αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες-ρυθμιστές της «αποπροσκόλλησης», όπως η καλπαΐνη, η MEKK1 και η κινάση PI-3 (447). Με βάση το παραπάνω χαρακτηριστικό, η α-ακτινίνη και πιο συγκεκριμένα η ισομορφή -4 φαίνεται ότι συμμετέχει στη μετάσταση και στη διασπορά των καρκινικών κυττάρων (507-511), όπως επίσης και στη μετανάστευση των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος (512, 513). Έχει δειχθεί ότι το ICAM-1 αλληλεπιδρά απευθείας με τις κυτταροπλασματικές ισομορφές -1 και -4 και ότι η αλληλεπίδραση αυτή βοηθά στην εξαγγείωση των λευκοκυττάρων (514). Επιπροσθέτως, οι Stanley και συν, χρησιμοποιώντας siRNA σε σειρές T-λεμφοκυττάρων που δεν εξέφραζαν α-ακτινίνη, έδειξαν, με συναγωνιστική αναστολή με τη βοήθεια ενός μεταλλαγμένου μορίου της α-ακτινίνης, ότι η ικανότητα της α-ακτινίνης να προσδένεται στην f-ακτίνη είναι ζωτικής σημασίας για τη μετανάστευση των T-λευκοκυττάρων. Η α-ακτινίνη κατέχει επιπλέον θέση και στην ενεργοποίηση των T-λευκοκυττάρων από τη στιγμή που αλληλεπιδρά με το μόριο SPA-1, μια βασική πρωτεΐνη ενεργοποίησης της GTP-άσης, η οποία κατέχει ρυθμιστικό ρόλο για τα T-λεμφοκύτταρα, ελέγχοντας την κυτταρική σηματοδότηση. Η α-ακτινίνη και το μόριο SPA-1 φαίνεται ότι συνυπάρχουν στις ανοσολογικές συνάψεις (515, 516). Τέλος, λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από τρωκτικά που δεν εξέφραζαν τις α-ακτινίνη-1 και -4, παρουσίασαν αυξημένη χημειοταξία στο νεφρό σε συνδυασμό με αλλαγμένη δομή των ποδοκυττάρων, υποστηρίζοντας έτσι τον καθοριστικό ρόλο της α-ακτινίνης στην ανοσολογική απόκριση.

Πίνακας 7: Ρόλος της α-ακτινίνης σε υγιείς και ασθενείς

α-ακτινίνη -2 και -3	α-ακτινίνη -1 και -4
Στοιχείο των ινών των σκελετικών μυών και του καρδιακού μυός	-Ρόλος στην ενεργοποίηση και μετανάστευση των T-λεμφοκυττάρων
Στοιχείο της φαιάς ουσίας του εγκεφάλου	Στοιχείο των δομών του νεφρού
Ρόλος στις νευρωνικές συνάψεις	Πιθανή αλληλεπίδραση με τον HCV
Συσχέτιση με μυοπάθειες και υπερτροφική διατακτική μυοκαρδιοπάθεια	Ρόλος στην παθογένεια του νεφρωσικού συνδρόμου
Παθογενετικός ρόλος σε ασθενείς του Κ.Ν.Σ., όπως επιληψία, σχιζοφρένεια, νευροεκφυλιστικά νοσήματα	Ρόλος στη μετάσταση του καρκίνου

Η α-AKTINΙΝΗ ΩΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟ-ΣΤΟΧΟΣ ΣΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Η α-ακτινίνη στο Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ)

Ο ΣΕΛ χαρακτηρίζεται από ποικιλία αυτοαντισωμάτων, τα οποία στρέφονται εναντίον πυρηνικών αυτοαντιγόνων-στόχων, όπως τα ANA και τα αντισώματα έναντι της διπλής έλικας DNA (anti-dsDNA Abs) (517). Τα anti-dsDNA Abs φαίνεται ότι κατέχουν πρωταρχικό ρόλο στην παθογένεση της νεφρίτιδας του ΣΕΛ (518-520). Μέχρι στιγμής, τρεις κύριοι μηχανισμοί έχουν προταθεί για την πρόκληση νεφρίτιδας του ΣΕΛ από τα anti-dsDNA Abs. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά στην εναπόθεση κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων από anti-dsDNA Abs και νουκλεοσώματα, ο δεύτερος μηχανισμός αφορά στον *in situ* σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων μεταξύ των anti-dsDNA Abs και των νουκλεοσωμάτων που βρίσκονται στη βασική μεμβράνη, ενώ ο τρίτος μηχανισμός σχετίζεται με τη διασταυρούμενη αντίδραση/αντιδραστικότητα μεταξύ των anti-dsDNA Abs και νεφρικών αντιγόνων (465). Την τελευταία δεκαετία, η α-ακτινίνη έχει προταθεί ως ένα από τα κύρια αυτοαντιγόνα στόχοι, τα οποία εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση με τα anti-dsDNA Abs (457, 458, 521), ενώ μελέτες σε ζωικά μοντέλα και σε ανθρώπους έχουν δείξει παθογενετικό ρόλο των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης στη νεφρίτιδα του λύκου.

Σε ζωικά μοντέλα τρωκτικών αποδείχθη ότι η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα των anti-dsDNA Abs με την α-ακτινίνη, τα καθιστά παθογόνα, υποκρύπτωντας έτσι αντιγονική μίμηση μεταξύ της πρωτεΐνης και

του νουκλεϊκού οξέως (455). Οι Deocharan και συν χρησιμοποιώντας εκχύλισμα μεσαγγειακών κυττάρων από τρωκτικά επιρρεπή σε ανάπτυξη ΣΕΛ (MRL-lpr/lpr) και σε τρωκτικά που δεν εμφάνιζαν στοιχεία αυτοανοσίας (BALB/c), επιβεβαίωσαν ότι τα παθογόνα anti-dsDNA Abs R4A, αλλά όχι τα μη παθογόνα αντισώματα, προσδένονται απευθείας στην α-ακτινίνη, ενώ υψηλοί τίτλοι των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης ήταν παρόντες στον ορό και σε εκχυλίσματα νεφρού τρωκτικών με ΣΕΛ και ενεργό νεφρίτιδα (456).

Είναι γνωστό ότι η αυτοάνοση βλάβη των ιστών δεν προκαλείται μόνο από αυτοδραστικά T-λεμφοκύτταρα, αλλά και από την έκφραση των αυτοαντιγόνων στα όργανα-στόχους. Πρόσφατα αποδείχθη ότι η α-ακτινίνη υπερεκφράζεται στα μεσαγγειακά κύτταρα των επιρρεπών στο ΣΕΛ τρωκτικών MRL/lpr, προτείνοντας την πιθανή συνεισφορά των αντιγόνων αυτών στην ανάπτυξη βαρείας διαμεσολαβούμενης από αντισώματα νεφρίτιδας του ΣΕΛ (460). Πράγματι, η αυξημένη έκφραση της α-ακτινίνης σε τρωκτικά επιρρεπή στο ΣΕΛ μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση υψηλών τίτλων κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων που εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση με την α-ακτινίνη (456), σε IgG εναπόθεση και κατόπιν σε νεφρική βλάβη επαγόμενη από αυτοαντισώματα. Επιπλέον, ανοσοποίηση τρωκτικών χωρίς στοιχεία αυτοανοσίας με α-ακτινίνη παράγει μία έντονη αυτοάνοση απόκριση με εμφάνιση ANA και εμφάνιση IgG εναποθέσεων και πρωτεϊνουρίας στα τρωκτικά (464). Το τελευταίο αυτό εύρημα ενισχύει σημαντικά το ρόλο της α-ακτινίνης ως αυτοαντιγόνο-στόχος, το οποίο επάγει παθογενετικά αντισώματα σε νοσήματα που αποτελούν μοντέλα αυτοανοσίας, όπως ο ΣΕΛ.

Τα παραπάνω ευρήματα από ζωικά μοντέλα επιβεβαιώθηκαν από μελέτες στον άνθρωπο. Για την ακρίβεια, anti-dsDNA Abs που απομονώθηκαν από ασθενείς με νεφρίτιδα του ΣΕΛ εμφάνισαν ισχυρή πρόσδεση με την α-ακτινίνη, ενώ τα αντισώματα που απομονώθηκαν από ασθενείς με ΣΕΛ χωρίς νεφρική προσβολή εμφάνιζαν ασθενέστερη πρόσληψη, αποδεικνύοντας έτσι ότι η α-ακτινίνη αποτελεί στόχο για τα παθογενετικά anti-dsDNA Abs στη νεφρίτιδα του ΣΕΛ (459). Επιπλέον, μονοκλωνικά anti-dsDNA Abs από ασθενείς με ΣΕΛ με και χωρίς νεφρίτιδα του λύκου εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση με την α-ακτινίνη και προσδένονταν απευθείας στα μεσαγγειακά κύτταρα *in vitro* και σε απομονωμένα σπειράματα *ex vivo*, υποστηρίζοντας ότι τα αντισώματα αυτά είναι παθογενετικά. Σε συμφωνία με τις ανωτέρω μελέτες, οι Renaudineau και συν (461) έδειξαν ότι τα αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης μάλλον παρά τα anti-dsDNA σχετίζονται με σπειραματονεφρίτιδα του ΣΕΛ. Ακόμη, το ποσοστό των anti-dsDNA Abs που εμφάνιζαν διασταυρούμενη αντίδραση με την α-ακτινίνη εμφάνισαν υψηλή συγγένεια για το dsDNA. Παρότι δεν έχει ακόμη αποδειχθεί, είναι πιθανό ότι λόγω του συνεχούς αντιγονικού ερεθισμού από το dsDNA και την α-ακτινίνη, προκύπτει ένας νέος πληθυσμός αντισωμάτων, τα οποία στρέφονται έναντι της α-ακτινίνης, αλλά πλέον όχι έναντι του dsDNA (522).

Η παθογενετική σχέση μεταξύ των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης και της νεφρίτιδας του ΣΕΛ ερευνήθηκε και σε μελέτες πασχόντων-μαρτύρων. Οι Becker-Merok και συν (463) και ο Zhang και συν (466) μελέτησαν τη σχέση των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης, τις κλινικές και ανοσολογικές

εκδηλώσεις που σχετίζονται με αυτά σε ασθενείς με ΣΕΛ και των επιπολασμών των αντισωμάτων αυτών σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα και στον υγιή πληθυσμό. Από τις μελέτες αυτές προέκυψε ότι τα αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης εμφανίζονταν σε σημαντικά υψηλότερους τίτλους σε ασθενείς με ΣΕΛ και πιο συγκεκριμένα σε εκείνους με νεφρίτιδα του λύκου, σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες και ότι σχετίζονταν με στοιχεία ενεργού νόσου, όπως για παράδειγμα, όπως για παράδειγμα η παρουσία κυλίνδρων στα ούρα/ενεργού ιζήματος στα ούρα (463, 466). Παρόλα αυτά, τα αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης δεν είναι απόλυτα ειδικά για το ΣΕΛ, δεδομένου ότι εμφανίζονται σε σημαντικό αριθμό άλλων νοσημάτων ή ακόμη και σε υγιείς μάρτυρες. Στη μελέτη των Becker-Merok και συν (463), το 12% των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και το 4% των ασθενών με σύνδρομο Sjögren εμφάνισαν θετικά αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης, ενώ στη μελέτη των Zhang και συνεργατών (466) θετικά αντισώματα ανιχνεύθηκαν στο 3,8 % των υγιών μαρτύρων. Επιπλέον, ο Kalraji και συν (523) και ο Manson και συν (524) δεν κατέφεραν σε μελέτες τους να αποδείξουν τη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα των anti-dsDNA Abs και των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης σε ασθενείς με νεφρίτιδα του ΣΕΛ (523), όπως δεν απέδειξαν και καμία σχέση μεταξύ των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης και των επιπέδων λευκώματος και κρεατινίνης ούρων, των επιπέδων λευκωματίνης ορού και της ενεργού νόσου/ύφεσης της νόσου (524). Αυτές οι διαφορές μεταξύ των μελετών μπορούν να αποδοθούν στον αριθμό των ασθενών που μελετήθηκαν, στα κριτήρια επιλογής που χρησιμοποιήθηκαν και την

παρελθούσα ή παρούσα χρήση κορτικοστεροειδών και γενικότερα ανοσοκαταστολής/ ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων.

α-ΑΚΤΙΝΙΝΗ ΚΑΙ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ (ΑΗ)

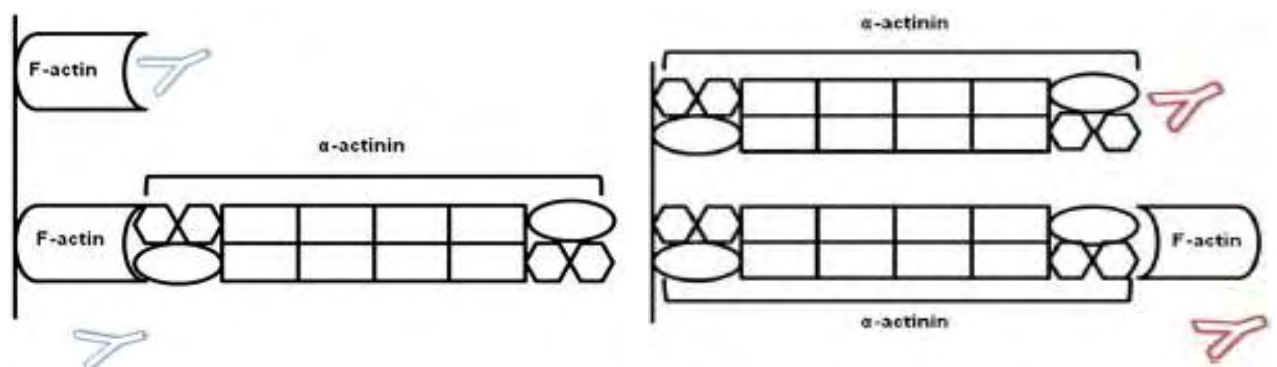
Εκτός από το ρόλο των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης στο ΣΕΛ, μελετήθηκε και ο ρόλος της α-ακτινίνης στην ΑΗ και συγκεκριμένα η σχέση τους με τα αντισώματα έναντι της f-ακτίνης. Έχει δειχθεί ότι τα αντισώματα έναντι της f-ακτίνης έχουν ως κύριο στόχο έναν επίτοπο στην περιοχή της f-ακτίνης που προσδένεται με την α-ακτινίνη και συγκεκριμένα στις θέσεις 350-375 του καρβοξυτελικού άκρου της f-ακτίνης (525-527). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι περίπου 40% των ασθενών με ΑΗ-1 εμφάνιζαν θετικά αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης, ενώ περίπου το 1/3 των ασθενών με ΑΗ-1 εμφάνιζαν διπλή αντιδραστικότητα έναντι και της f-ακτίνης και της α-ακτινίνης (467). Το εύρημα αυτό της διπλής αντιδραστικότητας έναντι της f-ακτίνης και της α-ακτινίνης δεν οφείλεται σε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα και ήταν ειδικό αποκλειστικά για τους ασθενείς με ΑΗ-1 (ειδικότητα σχεδόν 99%), όπως προέκυψε και από τον έλεγχο 600 υγιών και παθολογικών μαρτύρων με άλλα ηπατικά νοσήματα (χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες Β και C, αλκοολική ηπατοπάθεια, μη αλκοολική λιπώδης διήθηση του ήπατος, ΠΧΚ και ΠΣΧ) (467). Επιπλέον, η υπο-ομάδα των ασθενών με ΑΗ-1 που εμφάνιζαν διπλή αντιδραστικότητα χαρακτηριζόταν από ενεργό νόσο, κλινικά και ιστολογικά, ενώ ο συνδυασμός για θετικότητα και των δύο κατηγοριών αυτοαντισωμάτων εμφανιζόταν κυρίως σε ασθενείς που δεν ελάμβαναν ανοσοκατασταλτική

αγωγή (467). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι σε ασθενείς με AH-1, τα αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης σχετίζονται με υψηλής συγγένειας αντισώματα έναντι μονής έλικας DNA (anti-single stranded DNA-anti-ssDNA), προτείνοντας ως πιθανό μηχανισμό κλωνική έκπτυξη και σωματικές υπερμεταλλάξεις (468). Η τελευταία συσχέτιση μεταξύ των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης και των anti-ssDNA οφείλεται σε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα, η οποία επίσης σχετίζεται με ενεργότητα της νόσου (468). Αξίζει να σημειωθεί ότι, ενώ σε ασθενείς με ΣΕΛ τα αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση με τα anti-dsDNA, στην AH-1 τα αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση με τα anti-ssDNA και όχι με τα anti-dsDNA, όπως αποδείχθηκε από εκτεταμένα πειράματα αναστολής (467, 468).

Ακολούθως μελετήθηκε εάν υπάρχει κάποια διαγνωστική αξία της παρουσίας των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης μαζί με την παρουσία των αντισωμάτων έναντι της f-ακτίνης και των anti-ssDNA και αν ο συνδυασμός των παραπάνω αυτοαντισωμάτων σχετίζεται με ανταπόκριση στην ανοσοκατασταλτική αγωγή, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν σχετικές μελέτες. Στο ειδικό μέρος της παρούσας διατριβής υποδεικνύεται ότι τα αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με τα αντισώματα έναντι της f-ακτίνης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της ενεργότητας και βαρύτητας της νόσου. Επιπλέον, η παρούσα διατριβή απέδειξε ότι τα αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης μπορεί να αποτελέσουν μοναδικό ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα ανταπόκρισης στη θεραπεία και ως εκ τούτου τα αντισώματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την

παρακολούθηση του θεραπευτικού αποτελέσματος στους ασθενείς με AH-1 (528).

Μέχρι σήμερα, ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός της ηπατικής βλάβης στην AH δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος. Έχουν ενοχοποιηθεί αντισώματα έναντι ηπατοειδικών αυτοαντιγόνων, μέσω του μηχανισμού της της διαμεσολαβούμενης από κύτταρα κυτταροτοξικότητας (529). Από τα πολλαπλά αυτοαντιγόνα-στόχους που έχουν ταυτοποιηθεί, δύο φαίνεται ότι συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου: ο ASGPR και το SLA/LP tRNP^{(Ser)^{Sec}}, αυτοαντιγόνο-στόχος των anti-SLA/LP αντισωμάτων (530, 531). Τα αντισώματα έναντι της f-ακτίνης και έναντι της α-ακτινίνης, τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένους επιτόπους μπορούν επίσης να συνεισφέρουν στην παθογένεια της AH. Οι επιτόποι αυτοί εντοπίζονται κυρίως στην περιοχή σύνδεσης μεταξύ των μορίων της f-ακτίνης και της α-ακτινίνης (Εικόνα 13). Η ανάδειξη των επιτόπων αυτών πιθανά οφείλεται σε διάσπαση του συμπλέγματος f-ακτίνης και α-ακτινίνης, μία υπόθεση η οποία χρήζει περαιτέρω μελέτης και επιβεβαίωσης.



Εικόνα 13: Οι επιτόποι των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης και της f-ακτίνης βρίσκονται στο σημείο σύνδεσης των πρωτεϊνών, υποδεικνύοντας έτσι διάσπαση της σύνδεσης και πιθανή συμμετοχή στην παθογένεια της AH.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης αντισωμάτων κατά της α-ακτινίνης και η μελέτη της διαγνωστικής τους σημασίας σε συνδυασμό με τα αντισώματα έναντι της f-ακτίνης. Συγκεκριμένα μελετήθηκε ο συνδυασμός των ανωτέρω αναφερόμενων αντισωμάτων ως δείκτης ανταπόκρισης στην ανοσοκατασταλτική αγωγή και ως προγνωστικός παράγοντας σε 86 ασθενείς με καλά τεκμηριωμένη AH-1. Παράλληλα, μελετήθηκε η κλινική σημασία της διακύμανσης των τίτλων αντισωμάτων αυτών κατά την πορεία της νόσου καθώς δεν υπήρχε συναφής πληροφορία στη διεθνή βιβλιογραφία.

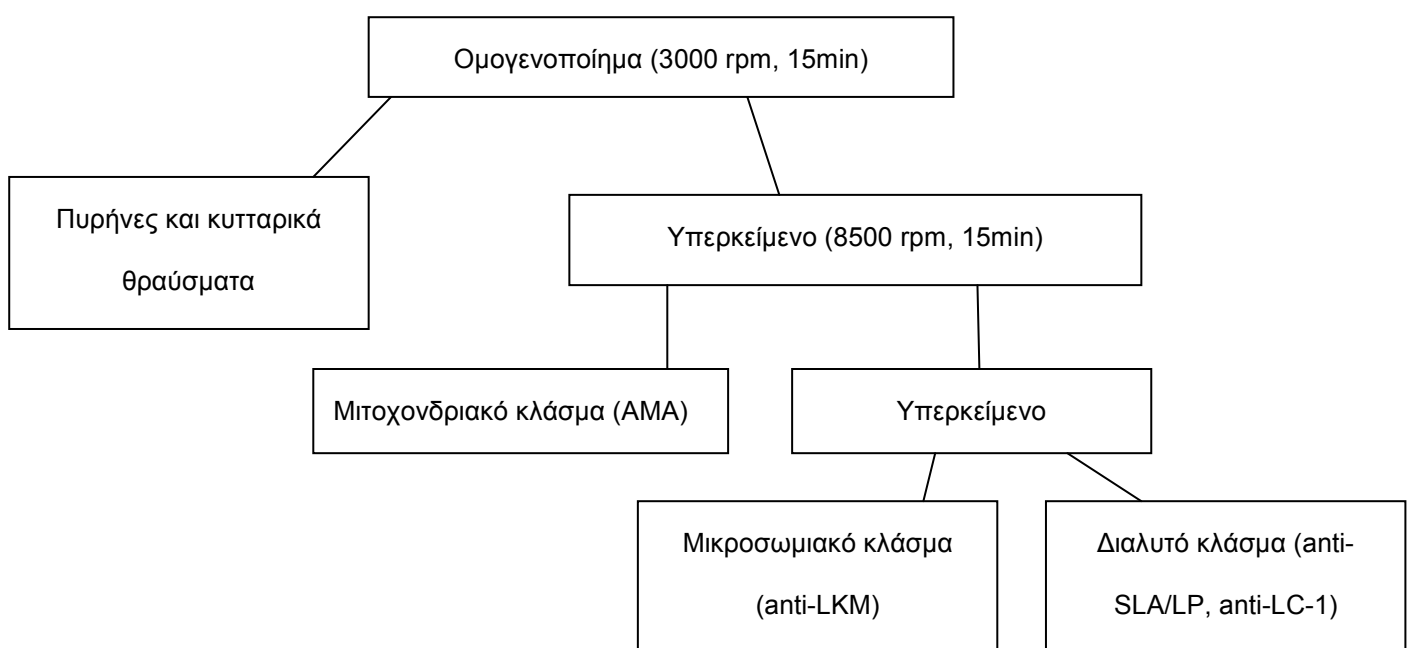
ΜΕΡΟΣ Α

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

Ανάπτυξη μεθόδου ανοσοαποτύπωσης για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων σχετιζόμενων με τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος

Αρχικά αναπτύχθηκε μία μέθοδος ανοσοαποτύπωσης για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων σχετιζόμενων με τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα εκχύλισμα μιτοχονδρίων, μικροσωμίων και κυτοσολίου ήπατος αρουραίου.

Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί αρουραίοι Wistar rats. Το ήπαρ του τρωκτικού αφαιρέθη και πλήθυκε με ψυχρό διάλυμα NaCl 0,9% τρεις φορές για για 2-3 λεπτά. Ακολούθως, ο ιστός τεμαχίστηκε και ομογενοποιήθηκε. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση του ομογενοποιημένου με βαθμίδωση πυκνότητας (density gradient centrifugation) σε ψυχρό διάλυμα σουκρόζης 0,25 M για 15 λεπτά στις 3000 rpm, 4°C. Το ίζημα που προέκυψε αντιστοιχούσε σε πυρηνικά στοιχεία και απορρίφθηκε. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε προσεκτικά και φυγοκεντρήθηκε εκ νέου για 15 λεπτά στις 8500 rpm. Το ίζημα που προέκυψε μετά τη νέα φυγοκέντρηση αποτελούσε το μιτοχονδριακό εκχύλισμα. Το υπερκείμενο της δεύτερης φυγοκέντρησης συλλέχθηκε προσεκτικά και φυγοκεντρήθηκε εκ νέου σε υπερφυγόκεντρο στις 30.000 rpm (100.000 g) για 1,5 ώρα. Από την τελική φυγοκέντρηση, το ίζημα που προέκυψε αποτελούσε το μικροσωματικό εκχύλισμα, ενώ το υπερκείμενο το κυτοσολικό εκχύλισμα (διαλυτό κλάσμα). Σχηματικά, όλη η διαδικασία που ακολουθήθηκε φαίνεται ακολούθως στην Εικόνα 14:

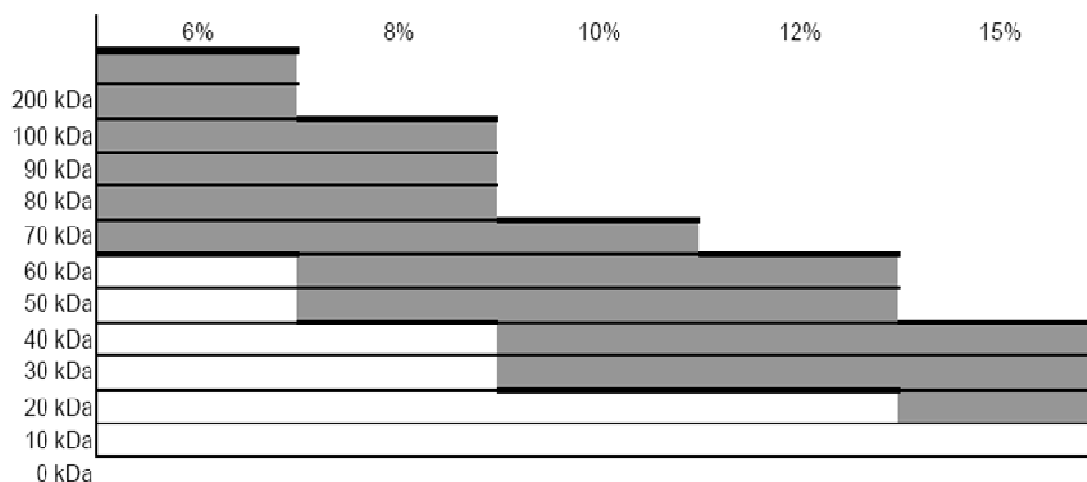


Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση διαχωρισμού των αντιγόνων.

Το μιτοχονδριακό και μικροσωμιακό κλάσμα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε διάλυμα σουκρόζης 0,25M και προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή τους με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή, στηρίζεται στη χρωματική αλλαγή που προκαλεί η πρόσδεση μίας χρωστικής, του Coomassie Brilliant Blue, σε μία άγνωστη πρωτεΐνη και στην ποσοτικοποίηση αυτής με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης διαφορετικών συγκεντρώσεων και οπτικών απορροφήσεων μίας πρωτεΐνης αναφοράς. Η πρωτεΐνη αναφοράς που χρησιμοποιείται συνήθως για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης είναι η αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine Serum Albumin – BSA). Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης τοποθετήθηκαν σε 10 erpendorfs αυξανόμενοι όγκοι BSA 1mg/ml (1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 μl αντίστοιχα). Στους παραπάνω όγκους προσετέθη απεσταγμένο νερό, μέχρι τον τελικό όγκο των 800 μl. Ως «τυφλά δείγματα» χρησιμοποιήθηκαν 2 erpendorfs με 800 μl απεσταγμένο νερό. Σε όλα τα δείγματα προσετέθησαν 200 μl διαλύματος Coomassie Brilliant Blue (Biorad Protein Assay Dye Reagent). Ακολούθησε ανάδευση και επώαση των δειγμάτων για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων στα 595 nm και κατασκευάστηκε μία πρότυπη καμπύλη, όπου στον ένα άξονα τοποθετήθηκαν οι συγκεντρώσεις του BSA που χρησιμοποιήθηκαν και στον άλλο άξονα, οι τιμές απορρόφησης στα 595 nm. Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων του μιτοχονδριακού, μικροσωμιακού και κυτοσολικού εκχυλίσματος έγινε με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης.

Στη συνέχεια, το μιτοχονδριακό, το μικροσωμιακό και το κυτοσολικό εκχύλισμα αποθηκεύθηκαν σε aliquots στους -20°C και χρησιμοποιήθηκαν ως

υπόστρωμα για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων σχετιζόμενων με τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Αρχικά, οι επιμέρους πρωτεΐνες των εκχυλισμάτων διαχωρίστηκαν με βάση το μοριακό τους βάρος με ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου (Polyacrylamide Gel electrophoresis), χρησιμοποιώντας ως αποδιατακτικό παράγοντα θειούχο δωδεκαϋλικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate - SDS). Αναλυτικότερα, για το διαχωρισμό των επιμέρους πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε γέλη διαχωρισμού περιεκτικότητας 10% σε ακρυλαμίδιο, σύμφωνα με το μοριακό βάρος των επιθυμητών πρωτεϊνών προς ανίχνευση (πρωτεΐνες 20-70 kDa) (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Διάγραμμα συσχέτισης μοριακού βάρους πρωτεΐνης με περιεκτικότητα γέλης διαχωρισμού σε ακρυλαμίδιο.

Η γέλη διαχωρισμού παρασκευάστηκε με την ανάμειξη 9,9 ml απεσταγμένου νερού, 8,3 ml ακρυλαμιδίου 30%, 6,3 ml Tris-HCl 2M pH=8,8,

250 μl 20% SDS, 250 μl 10% APS και 10 μl TEMED. Το μείγμα αναδεύτηκε με περιστροφικές κινήσεις και εγχύθηκε προσεκτικά, ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες, στη φόρμα κατασκευής γέλης που αποτελείται από δύο γυάλινες πλάκες (short and long plate), από τις οποίες η μία διαθέτει ειδική εγκοπή για την τοποθέτηση των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση. Πάνω από το μείγμα της γέλης διαχωρισμού εγχύθηκε απεσταγμένο νερό. Το μείγμα της γέλης διαχωρισμού στερεοποιήθηκε σε 30 λεπτά και αμέσως μετά ξεκίνησε η διαδικασία παρασκευής της γέλης επιστοιβάξης (stacking gel) με την ανάμειξη 6,8 ml απεσταγμένου νερού, 1,7 ml ακρυλαμιδίου 30%, 1,25 ml Tris-HCl 1M, pH=6,8, 100 μl 20% SDS, 100 μl 10% APS και 10μl TEMED. Το μείγμα της γέλης επιστοιβάξης εγχύθηκε προσεκτικά, ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες, πάνω στη γέλη διαχωρισμού και στερεοποιήθηκε σε 30 λεπτά. Κατά το χρόνο στερεοποίησης της γέλης επιστοιβάξης παρασκευάστηκε το δείγμα προς ηλεκτροφόρηση. Δείγμα του μιτοχονδριακού, μικροσωματικού και κυτοσολικού εκχυλίσματος ήπατος αρουραίου αναμείχθηκε με διάλυμα ανηγμένου SDS και το μείγμα θερμάνθηκε σε υδατόλουτρο στους 100°C για 5 λεπτά. Ακολούθως, η φόρμα κατασκευής γέλης προσαρμόστηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και στο σύστημα προσετέθη ηλεκτροφορητικό διάλυμα (electrophoretic buffer 1x) με προσεκτικό έλεγχο για ύπαρξη διαρροής από τη συσκευή. Στη φόρμα κατασκευής γέλης προσετέθησαν οι μάρτυρες μοριακού βάρους (protein ladders) και τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 60 Volt σε ολονύκτια επώαση (overnight).

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά των επιμέρους διαχωρισθέντων στοιχείων σε μεμβράνη πολυβινιλιδενοφθορίου (Polyvinylidene Fluoride – PVDF). Στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς τοποθετήθηκαν με την ακόλουθη σειρά σπόγγος εμποτισμένος με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer), φίλτρο ηλεκτρομεταφοράς εμποτισμένο με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς, η γέλη που έφερε τα διαχωρισμένα με ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικά στοιχεία των εκχυλισμάτων ήπατος αρουραίου, μεμβράνη PVDF εμποτισμένη αρχικά με μεθανόλη και κατόπιν με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και ξανά φίλτρο ηλεκτρομεταφοράς εμποτισμένο με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και σπόγγος εμποτισμένος με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer). Οι φυσαλίδες αέρα που δημιουργήθηκαν μεταξύ γέλης και μεμβράνης PVDF αφαιρέθηκαν με τη βοήθεια ειδικού ρολό επίστρωσης, έτσι ώστε να μην δημιουργηθούν ελλείματα στη μεταφορά των πρωτεϊνικών στοιχείων από τη γέλη στη μεμβράνη. Λόγω υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της ηλεκτρομεταφοράς, στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς προσετέθησαν παγοκύστες. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιήθηκε στα 50 Volt για 2,5 ώρες. Να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης και η αναλογία πρωτεΐνης-SDS, όπως και οι βέλτιστες συνθήκες ηλεκτροφόρησης και ηλεκτρομεταφοράς καθορίστηκαν από προκαταρκτικά πειράματα προτυποποίησης της μεθόδου.

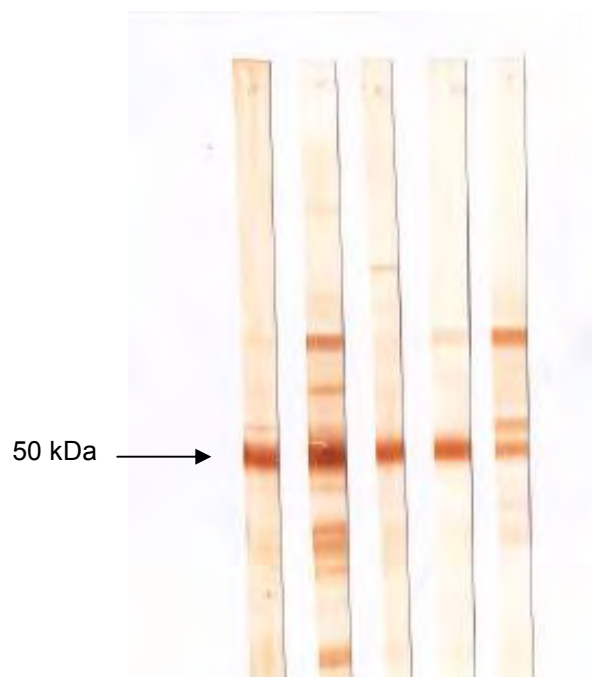
Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη PVDF ενεργοποιήθηκε με μεθανόλη και πλύθηκε με αλατούχο φωσφορικό διάλυμα (Phosphate Buffer Saline – PBS). Οι μεταφερθείσες στη μεμβράνη πρωτεΐνες

έγιναν ορατές με χρώση Ponceau S και στη συνέχεια οι μεμβράνες κόπηκαν σε λωρίδες (strips) για εξέταση των επιμέρους δειγμάτων.

Ακολούθησε ενεργοποίηση των λωρίδων της μεμβράνης με μεθανόλη και PBS και στη συνέχεια επώαση των λωρίδων της μεμβράνης σε διάλυμα 5% αποβουτυρωμένου γάλακτος- PBS/Tween 20 0,1% για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης (blocking step). Στη συνέχεια οι λωρίδες των μεμβρανών του μιτοχονδριακού, μικροσωμιακού και κυτοσολικού εκχυλίσματος επώαστηκαν με θετικούς ορούς για AMA, anti-LKM1 και anti-LKM3, anti-LC1 και anti-SLA αντίστοιχα σε αραιώση 1:100 (πρώτο αντίσωμα – primary antibody) με διάλυμα 5% αποβουτυρωμένου γάλακτος- PBS/Tween 20 0,1% για 1,5 ώρα. Ακολούθως έγινε πλύσιμο των λωρίδων με PBS/Tween 20 0,1% για 5 λεπτά τρεις φορές για απομάκρυνση των μη-συνεζευγμένων αντισωμάτων των ορών. Κατόπιν, προσετέθη αντιανθρώπειο αντίσωμα IgG συνεζευγμένο με horseradish peroxidase αραιωμένο 1:2000 σε διάλυμα 5% αποβουτυρωμένου γάλακτος- PBS/Tween 20 0,1% και ακολούθησε πλύσιμο των λωρίδων με PBS/Tween 20 0,1% για 5 λεπτά τρεις φορές για απομάκρυνση των μη-συνεζευγμένων αντισωμάτων. Το επόμενο στάδιο περιελάμβανε την προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος, που αποτελείτο από DAB/H₂O₂. Οι λωρίδες επώαστηκαν για 20 λεπτά με το χρωμογόνο υπόστρωμα και ακολούθως η αντίδραση ενζύμου υποστρώματος διεκόπη με προθήκη απεσταγμένου νερού.

Οι πρωτεϊνικές μπάντες που ανεδείχθησαν στις λωρίδες των μεμβρανών αξιολογήθηκαν με τη βοήθεια των μοριακών βαρών μαρτύρων (protein ladders). Σε λωρίδες μεμβράνης του μιτοχονδριακού εκχυλίσματος

που επωάστηκαν με ορούς AMA (+) ασθενών ανεδείχθησαν μπάντες μοριακού βάρους ~50 kDa και ~74 kDa που αντιστοιχούν στα αυτοαντιγόνα BCOADC-E2 και PDC-E2, τα κυριότερα αυτοαντιγόνα-στόχους των AMA. Σε λωρίδες μεμβράνης του μικροσωμιακού εκχυλίσματος που επωάστηκαν με ορούς anti-LKM (+) ασθενών ανεδείχθησαν μπάντες ~50 kDa (Εικόνα 16) και ~55kDa που αντιστοιχούν στα αυτοαντιγόνα CYP2D6 και UGT1, αντίστοιχα, τα κύρια αυτοαντιγόνα-στόχους των anti-LKM1 και anti-LKM3, αντίστοιχα. Σε λωρίδες μεμβράνης του κυτοσολικού εκχυλίσματος που επωάστηκαν με ορούς anti-LC1 (+) και anti-SLA/LP (+) ανεδείχθησαν μπάντες ~58 kDa και ~50 kDa αντίστοιχα που αντιστοιχούν στα αυτοαντιγόνα FTCD και tRNP^{(Ser)^{Sec}}, αυτοαντιγόνα-στόχους των anti-LC1 και anti-SLA/LP, αντίστοιχα.



Εικόνα 16: Ανοσοαποτύπωση με εκχύλισμα μικροσωμιακού κλάσματος ήπατος αρουραίου. Η μπάντα στα 50 kDa αντιστοιχεί στο CYP2D6, κύριο αυτοαντιγόνο-στόχο των anti-LKM1.

Ανάπτυξη *in-house* μεθόδου ανοσοαποτύπωσης σε εκχύλισμα κυττάρων Huh7 για την ανίχνευση anti-SLA/LP αντισωμάτων

Η ανοσοαποτύπωση με ολικό εκχύλισμα ανθρώπινου ήπατος αποτελεί μία ευαίσθητη μέθοδο για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων σχετιζόμενων με τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος. Παρά τα πλεονεκτήματά της, η μέθοδος αυτή υστερεί στην ανίχνευση του πιο ειδικού δείκτη της AH-1, των anti-SLA/LP, καθώς το αυτοαντιγόνο-στόχος tRNP^{(Ser)Sec} (~50 kDa) δεν εκφράζεται στο συγκεκριμένο εκχύλισμα. Στόχος ήταν η αξιοποίηση της ιδιότητας του tRNP^{(Ser)Sec} να εκφράζεται σε εκχύλισμα καρκινικών κυτταρικών σειρών για την ανάπτυξη και αξιολόγηση μίας *in-house* μεθόδου ανοσοαποτύπωσης για την ανίχνευση των anti-SLA/LP αντισωμάτων.

Κυτταρικό εκχύλισμα Huh7, κυτταρικής σειράς που προέρχεται από καλώς διαφοροποιημένα κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος, χρησιμοποιήθηκε με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης για την ανίχνευση anti-SLA/LP αντισωμάτων. Συγκεκριμένα, κύτταρα Huh 7 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium –DMEM), στο οποίο προσετέθησαν επιπλέον 10% ορός εμβρύου βοός (Fetal Calf Serum) και πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Κάθε 48 ώρες, τα κύτταρα μοιράζονταν σε καλλιεργητικά τρυβλία για περαιτέρω πολλαπλασιασμό με την παρακάτω διαδικασία. Αρχικά, τα κύτταρα πλένονταν με αποστειρωμένο PBS και ακολουθούσε η προσθήκη τρυψίνης. Τα κύτταρα επωάζονταν για πέντε λεπτά σε κλίβανο CO₂ στους 37°C. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα συλλέγονταν προσεκτικά και διαλύονταν σε νέο θρεπτικό υλικό. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 800 rpm για 5 λεπτά και

επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος των κυττάρων σε αποστειρωμένο PBS. Η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνονταν για άλλη μία φορά και κατόπιν ακολουθούσε η επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος των κυττάρων σε καλλιεργητικό υλικό και η προσθήκη τους σε νέα καλλιεργητικά τρυβλία σε κλίβανο CO₂, επώαση στους 37°C. Μετά τον επιτυχή πολλαπλασιασμό των κυττάρων, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό από τα καλλιεργητικά τρυβλία, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με κρύο αποστειρωμένο PBS και ακολούθησε η διαδικασία λύσης τους. Σε κάθε καλλιεργητικό τρυβλίο προσετέθησαν 200 μl διαλύματος λύσης (500 μl 25mM Tris/HCl, pH=7,5, 600μl NaCl 100mM, 200μl Triton X-100 1%, 20μl MgCl₂ 1mM, 200μl PMSF 1mM, 6μl DTT 1mM, 33μl NaVO₄ 1mM, 200μl Glycerolphosphate 10mM) και τα κύτταρα αποκολλήθηκαν μηχανικά με τη βοήθεια ειδικής σπάτουλας (scrape). Το εκχύλισμα των κυττάρων που προέκυψε συλλέχθηκε προσεκτικά και τοποθετήθηκε σε eppendorfs στον πάγο για 10 λεπτά. Τα eppendorfs φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000 rpm για 20 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο κυτταρικό εκχύλισμα συλλέχθηκε και προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή του με τη μέθοδο Bradford. Κατόπιν το εκχύλισμα αναμείχθηκε με διάλυμα ανηγμένου SDS και φυλάχθηκε στους -20°C.

Για το διαχωρισμό των επιμέρους πρωτεϊνών του εκχυλίσματος Huh 7 χρησιμοποιήθηκε γέλη διαχωρισμού περιεκτικότητας 10% σε ακρυλαμίδιο, σύμφωνα με το μοριακό βάρος του tRNP^{(Ser)^{Sec}} (~50 kDa). Η γέλη διαχωρισμού παρασκευάστηκε με την ανάμειξη 9,9 ml απεσταγμένου νερού, 8,3 ml ακρυλαμιδίου 30%, 6,3 ml Tris-HCl 2M pH=8,8, 250 μl 20% SDS, 250 μl 10% APS και 10 μl TEMED. Το μείγμα αναδεύτηκε με περιστροφικές

κινήσεις και εγχύθηκε προσεκτικά, ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες, στη φόρμα κατασκευής γέλης που αποτελείται από δύο γυάλινες πλάκες (short and long plate), από τις οποίες η μία διαθέτει ειδική εγκοπή για την τοποθέτηση των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση. Πάνω από το μείγμα της γέλης διαχωρισμού εγχύθηκε απεσταγμένο νερό. Το μείγμα της γέλης διαχωρισμού στερεοποιήθηκε σε 30 λεπτά και αμέσως μετά ξεκίνησε η διαδικασία παρασκευής της γέλης επιστοιβάξης (stacking gel) με την ανάμειξη 6,8 ml απεσταγμένου νερού, 1,7 ml ακρυλαμιδίου 30%, 1,25 ml Tris-HCl 1M, pH=6,8, 100 μl 20% SDS, 100 μl 10% APS και 10μl TEMED. Το μείγμα της γέλης επιστοιβάξης εγχύθηκε προσεκτικά, ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες, πάνω στη γέλη διαχωρισμού και στερεοποιήθηκε σε 30 λεπτά. Κατά το χρόνο στερεοποίησης της γέλης επιστοιβάξης παρασκευάστηκε το δείγμα προς ηλεκτροφόρηση. Το μείγμα του εκχυλίσματος Huh7 και του ανηγμένου SDS θερμάνθηκε σε υδατόλουτρο στους 100°C για 5 λεπτά. Ακολούθως, η φόρμα κατασκευής γέλης προσαρμόστηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και στο σύστημα προσετέθη ηλεκτροφορητικό διάλυμα (electrophoretic buffer 1x) με προσεκτικό έλεγχο για ύπαρξη διαρροής από τη συσκευή. Στη φόρμα κατασκευής γέλης προσετέθησαν οι μάρτυρες γνωστού μοριακού βάρους (protein ladders) και τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 60 Volt σε ολονύκτια επώαση (overnight).

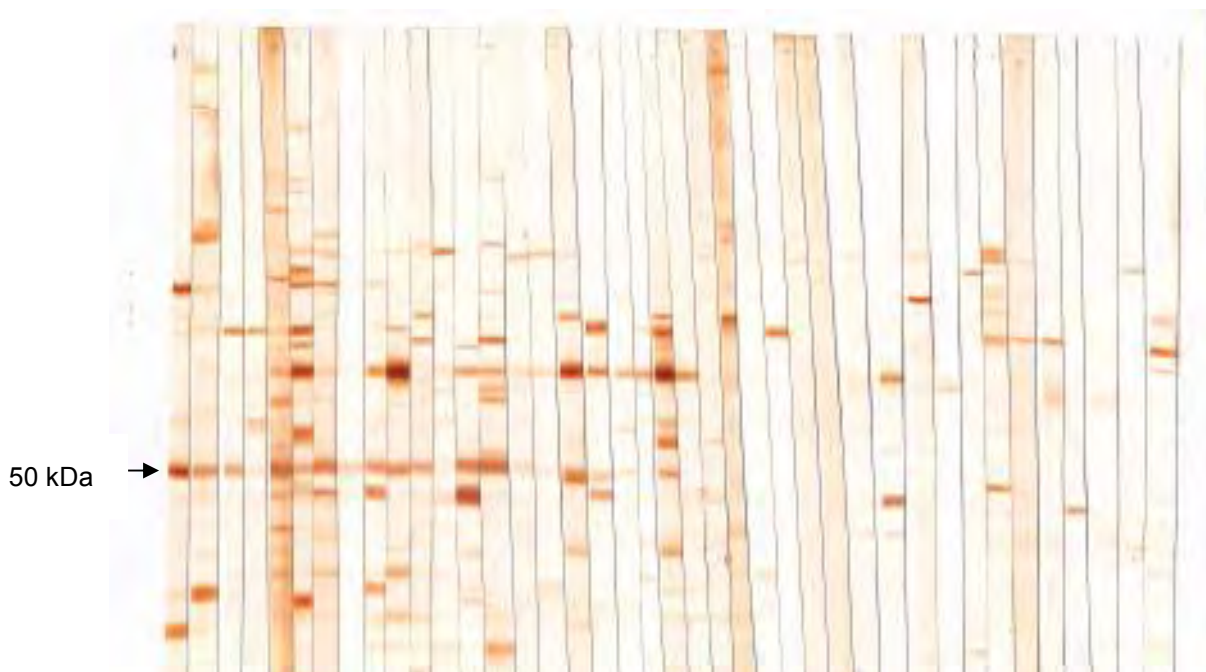
Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά των επιμέρους διαχωρισθέντων στοιχείων σε μεμβράνη PVDF. Στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς τοποθετήθηκαν με την ακόλουθη σειρά σπόγγος

εμποτισμένος με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer), φίλτρο ηλεκτρομεταφοράς εμποτισμένο με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς, η γέλη που έφερε τα διαχωρισμένα με ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικά στοιχεία των εκχυλισμάτων ήπατος αρουραίου, μεμβράνη PVDF εμποτισμένη αρχικά με μεθανόλη και κατόπιν με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και ξανά φίλτρο ηλεκτρομεταφοράς εμποτισμένο με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και σπόγγος εμποτισμένος με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer). Οι φυσαλίδες αέρα που δημιουργήθηκαν μεταξύ γέλης και μεμβράνης PVDF αφαιρέθηκαν με τη βοήθεια ειδικού ρολό επίστρωσης, έτσι ώστε να μην δημιουργηθούν ελλείματα στη μεταφορά των πρωτεϊνικών στοιχείων από τη γέλη στη μεμβράνη. Λόγω υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της ηλεκτρομεταφοράς, στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς προσετέθησαν παγοκύστεις. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιήθηκε στα 50 Volt για 2,5 ώρες. Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη PVDF ενεργοποιήθηκε με μεθανόλη και πλύθηκε με PBS. Οι μεταφερθείσες στη μεμβράνη πρωτεΐνες έγιναν ορατές με χρώση Ponceau S και στη συνέχεια οι μεμβράνες κόπηκαν σε λωρίδες (strips) για εξέταση των επιμέρους δειγμάτων.

Εξετάστηκαν οροί 16 ασθενών με AH-1, οι οποίοι ήταν anti-SLA/LP (+) με εμπορικά διαθέσιμη ELISA που χρησιμοποιεί το ανασυνδυασμένο αντιγόνο tRNP^{(Ser)Sec} (INOVA Diagnostics). Επιπλέον, εξετάστηκαν οροί 4 υγιών μαρτύρων, ενώ ως παθολογικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν 5 ασθενείς με AH-1 anti-SLA/LP (-), 2 ασθενείς με AH-2, 6 ασθενείς με PBC, 3 ασθενείς με PSC, 4 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β, και 3 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C.

Ακολούθησε ενεργοποίηση των λωρίδων της μεμβράνης με μεθανόλη και PBS και στη συνέχεια επώαση των λωρίδων της μεμβράνης σε διάλυμα 5% αποβουτυρωμένου γάλακτος- PBS/Tween 20 0,1% για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμησης (blocking step). Στη συνέχεια οι λωρίδες της μεμβράνης του εκχυλίσματος Huh7 επωάστηκαν με τους ορούς των ασθενών, καθώς και των υγιών και παθολογικών μαρτύρων σε αραιώση 1:100 (πρώτο αντίσωμα – primary antibody) σε διάλυμα 5% αποβουτυρωμένου γάλακτος- PBS/Tween 20 0,1% για 1,5 ώρα. Ακολούθως έγινε πλύσιμο των λωρίδων με PBS/Tween 20 0,1% για 5 λεπτά τρεις φορές για απομάκρυνση των μη-συνεζευγμένων αντισωμάτων των ορών. Κατόπιν, προσετέθη αντιανθρώπινο αντίσωμα IgG συνεζευγμένο με horseradish peroxidase αραιωμένο 1:2000 σε διάλυμα 5% αποβουτυρωμένου γάλακτος- PBS/Tween 20 0,1% και ακολούθησε πλύσιμο των λωρίδων με PBS/Tween 20 0,1% για 5 λεπτά τρεις φορές για απομάκρυνση των μη-συνεζευγμένων αντισωμάτων. Το επόμενο στάδιο περιελάμβανε την προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος, που αποτελείται από DAB/H₂O₂. Οι λωρίδες επωάστηκαν για 20 λεπτά με το χρωμογόνο υπόστρωμα και ακολούθως η αντίδραση ενζύμου υποστρώματος διεκόπη με προθήκη απεσταγμένου νερού.

Δεκατέσσερις από τους 16 ορούς anti-SLA/LP (+) ασθενών ανοσοκαθίλωσαν μπάντα ~50 kDa (ευαισθησία μεθόδου 87.5%, Εικόνα 17). Όλοι οι οροί των anti-SLA/LP (-) ασθενών, καθώς και των παθολογικών ή υγιών μαρτύρων ήταν αρνητικοί στην ανοσοαποτύπωση για τη συγκεκριμένη μπάντα (ειδικότητα μεθόδου 100%).



Εικόνα 17: Αντιδραστικότητα anti-SLA/LP (+) ορών και ορών παθολογικών και υγιών μαρτύρων σε ανοσοαποτύπωση με εκχύλισμα κυττάρων Huh7

Προκειμένου να διευκρινιστεί εάν η ~ 50 kDa μπάντα που ανοσοκαθίλωσαν οι anti-SLA/LP (+) ασθενείς αντιστοιχεί σε αντιδραστικότητα έναντι $\text{tRNP}^{(\text{Ser})\text{Sec}}$, διενεργήθηκαν μελέτες αναστολής. Χρησιμοποιήθηκε ορός anti-SLA/LP (+) ασθενούς σε αραιώση 1:1000 για ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνη από εκχύλισμα κυττάρων Huh7. Στη συνέχεια, ο ίδιος ορός επώαστηκε με ανασυνδρασμένο $\text{tRNP}^{(\text{Ser})\text{Sec}}$ καθηλωμένο σε στερεά φάση (INOVA Diagnostics). Ακολούθως, ο ορός χρησιμοποιήθηκε εκ νέου για ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνη από εκχύλισμα κυττάρων Huh7. Μετά την επώαση με ανασυνδρασμένο $\text{tRNP}^{(\text{Ser})\text{Sec}}$ η ~ 50 kDa μπάντα που ανοσοκαθιλώθηκε αρχικά από τον anti-SLA/LP (+) ορό εξαφανίστηκε. Συμπερασματικά, η ~ 50 kDa μπάντα που ανοσοκαθίλωσαν οι anti-SLA/LP

(+) ορός σε ανοσοαποτύπωση με εκχύλισμα κυττάρων Huh7 αντιστοιχεί σε αντιδραστικότητα έναντι tRNP^{(Ser)^{Sec}} (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Η μπάντα ~50 kDa που ανοσοκαθήλωσε anti-SLA/LP (+) ορός σε ανοσοαποτύπωση σε εκχύλισμα κυττάρων Huh7 εξαφανίστηκε μετά από μελέτες αναστολής με ανασυνδυασμένο αντιγόνο tRNP^{(Ser)^{Sec}}, αποδεικνύοντας έτσι ότι η μπάντα αυτή αντιστοιχεί σε αντιδραστικότητα έναντι tRNP^{(Ser)^{Sec}}

Η παραπάνω μέθοδος που αναπτύχθηκε επιτρέπει την ανίχνευση anti-SLA/LP αντισωμάτων σε εκχύλισμα κυτταρικής σειράς ανθρώπινου προέλευσης, επιλύοντας έτσι το πρόβλημα της μη έκφρασης του tRNP^{(Ser)^{Sec}} σε ολικό εκχύλισμα ανθρώπινου ήπατος. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής μπορεί να προστεθεί το γεγονός ότι το εκχύλισμα κυττάρων Huh 7 μπορεί εύκολα να απομονωθεί.

ΜΕΡΟΣ Β**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ α-ΑΚΤΙΝΙΝΗΣ****Ασθενείς και μέθοδοι**

764 διαδοχικοί οροί ασθενών από 86 ασθενείς (65 γυναίκες) με καλώς τεκμηριωμένη διάγνωση ΑΗ-1, που παρακολουθούνται στο Εξωτερικό Ηπατολογικό Ιατρείο της Παθολογικής Κλινικής και του Ομώνυμου Ερευνητικού Εργαστηρίου του Π.Θ. εξετάστηκαν για την παρουσία αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης και έναντι της f-ακτίνης (ΑFA). Η διάμεσος (median) ηλικία των ασθενών κατά τη λήψη του πρώτου δείγματος ορού ήταν τα 52 έτη (εύρος 17-77 έτη). Η διάγνωση της ΑΗ βασίστηκε σε κλινικά, εργαστηριακά και ιστολογικά δεδομένα, σύμφωνα με τα κριτήρια του IAHG (329,330). Τα χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα 8.

Πίνακας 8: Βασικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΑΗ (n=86)

Διάρκεια νόσου (median, εύρος, τελευταίο δείγμα, μήνες)	78 (6-336)
Περίοδος παρακολούθησης (median, εύρος, μήνες)	44 (6-116)
Κίρρωση (ναι/όχι)	22/64

Πίνακας 8: Βασικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΑΗ (n=86) (συνέχεια)

Ανοσοκαταστολή (ναι/όχι)	77/9
Ομάδα baseline	86
Ομάδα A - responders	40
Ομάδα B – relapsers/incomplete responders	37
Ομάδα Γ- ασθενείς άνευ αγωγής	9
Διάρκεια θεραπείας (median, εύρος, μήνες)	51 (6-324)
Θάνατος από την ηπατική νόσο (ναι/όχι)	5/81
PLT (median, εύρος, $\times 10^3/\text{mm}^3$)	200 (29-720)
Χολερυθρίνη (median, εύρος, mg/dl)	0,73 (0,1-39)
Λευκωματίνη (median, εύρος, g/dl)	4,8 (2,1-6,5)
γ-σφαιρίνες (median, εύρος, g/dl)	3,3 (1,7-6,7)
IgG (median, εύρος, mg/dl)	1406 (717-6410)
IgM (median, εύρος, mg/dl)	127 (11,6-939)
IgA (median, εύρος, mg/dl)	243 (67-948)
AST (median, εύρος, U/L)	30 (7-2252)
ALT (median, εύρος, U/L)	32 (6-2681)
γ-GT (median, εύρος, U/L)	27 (5-867)
ALP (median, εύρος, U/L)	66 (19-391)
anti-SLA/LP (ναι/όχι)	12/74

Οι ασθενείς έλαβαν MMF ως θεραπεία πρώτης γραμμής σύμφωνα με την πρακτική της κλινικής βάσει πρωτοκόλου που πρόσφατα δημοσιεύθηκε σε διεθνές περιοδικό (362). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς ελάμβαναν αγωγή με MMF σε δόση 1,5-2 g ημερησίως. Η αρχική δόση του MMF καθορίστηκε στο 1 g ημερησίως και μετά από 20 ημέρες, η δόση αυξανόταν στο 1,5-2 g ημερησίως. Στην αγωγή χορηγείτο παράλληλα και πρεδνιζολόνη σε μία ημερήσια δόση (0,5-1 mg/kg ημερησίως) με σταδιακή μείωση της δόσης (tapering 5mg/εβδομάδα και όταν η δόση έφτανε στα 15mg ημερησίως, ο ρυθμός μείωσης ήταν 2,5 mg/εβδομάδα), σύμφωνα με τη βιοχημική και κλινική ανταπόκριση μέχρι την πλήρη διακοπή. Μετά τη διακοπή της κορτιζόνης, την ομαλοποίηση των βιοχημικών παραμέτρων για τουλάχιστον 6 μήνες και την απουσία κλινικών σημείων υποτροπής/έξαρσης, η δόση του MMF μειωνόταν στο 1 g ημερησίως. Η ανταπόκριση στην αγωγή ορίστηκε σύμφωνα με τα αναθεωρημένα κριτήρια για τη διάγνωση της AH που θεσπίστηκαν από το IAHG (279,532). Η ανταπόκριση στη θεραπεία θεωρήθηκε πλήρης, όταν οι τιμές της AST, ALT, των γ-σφαιρινών και της ανοσοσφαιρίνης G ομαλοποιήθηκαν, η συμπτωματολογία εξαφανίστηκε και η βιοψία ήπατος, εφόσον αυτή πραγματοποιήθηκε, ανέδειξε ελάχιστη ή καθόλου φλεγμονή. Ως μερική ανταπόκριση στην αγωγή ορίστηκε η μερική μείωση των AST, ALT σε επίπεδα κάτω από 2 x UNL , χωρίς να υπάρχει όμως πλήρης ομαλοποίηση των αμινοτρανσφερασών και χωρίς να είναι εφικτή η σταδιακή μείωση ή η διακοπή των κορτικοστεροειδών. Η μη ανταπόκριση στην αγωγή ορίστηκε ως η συνεχής παραμονή των αυξημένων

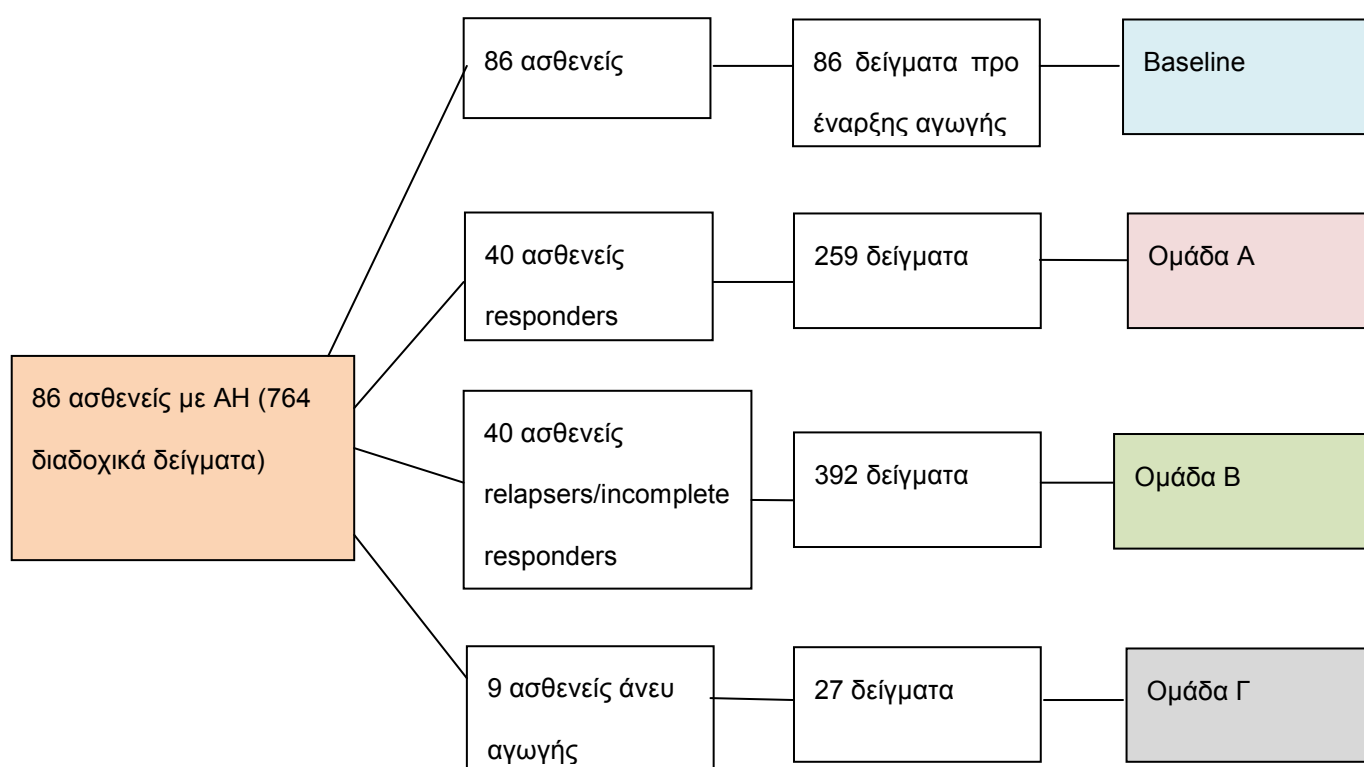
τιμών αμινοτρανσφερασών σε επίπεδα μεγαλύτερα από 2 x UNL, παρά τη χορήγηση εντατικών σχημάτων ανοσοκαταστολής και τη συμμόρφωση στη θεραπεία. Η αρχική κλινική και βιοχημική ανταπόκριση στην αγωγή με ομαλοποίηση των τιμών AST, ALT και γ-σφαιρινών, η οποία ακολουθήθηκε από αύξηση των AST, ALT μεγαλύτερη από 2 x UNL και επανεμφάνιση της συμπτωματολογίας οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της θεραπείας, ορίστηκε ως υποτροπή (363).

Με βάση τους ανωτέρω ορισμούς δημιουργήθηκαν οι ακόλουθες υποομάδες. Η πρώτη υποομάδα (baseline) αποτελείτο από τους πρώτους ορούς των ασθενών πριν από την έναρξη θεραπείας ή από τους πρώτους ορούς των ασθενών που ποτέ δεν έλαβαν θεραπεία (baseline υποομάδα με ενεργό νόσο, n=86 ασθενείς). Ακολούθως, δημιουργήθηκαν υποομάδες ανάλογα με την ανταπόκριση στη θεραπεία ως εξής (Εικόνα 19):

- Ομάδα A = Responders – ασθενείς που εμφάνισαν πλήρη ανταπόκριση στην ανοσοκατασταλτική αγωγή (n = 40 ασθενείς, 259 οροί, μέσος όρος ορών ανά ασθενή = 6,5).
- Ομάδα B = Relapsers/incomplete responders – ασθενείς που εμφάνισαν είτε τουλάχιστον μία υποτροπή μετά από πλήρη ανταπόκριση στη θεραπεία (relapsers, n=23 ασθενείς) ή εμφάνισαν υποτροπή μετά τη διακοπή της θεραπείας (n=5) ή εμφάνισαν μερική ανταπόκριση (n=9 ασθενείς που δεν πληρούσαν τα κριτήρια πλήρους ανταπόκρισης, αλλά πληρούσαν κριτήρια μερικής ανταπόκρισης) (279)

(συνολικά $n = 37$ ασθενείς, 392 οροί, μέσος όρος ορών ανά ασθενή =10,6).

- Ομάδα Γ = ασθενείς που δεν έλαβαν θεραπεία λόγω μη αντιρροπούμενης κίρρωσης ήπατος ($n=9$ ασθενείς, 27 οροί, μέσος όρος ορών ανά ασθενή = 3).



Εικόνα 19: Σχεδιασμός μελέτης, ομάδες ασθενών που συμπεριελήφθησαν.

Έξι από τους 86 ασθενείς απεβίωσαν κατά το χρονικό διάστημα της παρακολούθησης λόγω επιπλοκών σχετιζομένων με την κύρια νόσο. Τριάντα δύο ασθενείς εμφάνιζαν άλλες αυτοάνοσες διαταραχές, όπως θυρεοειδίτιδα Hashimoto, νόσο Grave's, ΣΕΛ. Κατά την περίοδο της μελέτης, οι 32 αυτοί

ασθενείς δεν ελάμβαναν άλλη ανοσοκατασταλτική αγωγή εκτός από MMF και κορτικοστεροειδή. Η τυποποίηση HLA ήταν διαθέσιμη σε 75 από τους 86 ασθενείς (24 HLADR3+, 12 HLADR4+, 14 HLADR13+, 16 HLAB8+, 8 HLA A1 B8 DR3 απλότυποι).

Ιστολογική εξέταση ήταν διαθέσιμη σε 73 ασθενείς. Στους υπόλοιπους 13 ασθενείς, η διενέργεια βιοψίας ήπατος θεωρήθηκε μη ασφαλής λόγω παράτασης του χρόνου προθρομβίνης, εμφάνισης εκδηλώσεων υπερσπληνισμού (θρομβοπενία) και λόγω της εμφάνισης ασκίτη. Στους ασθενείς αυτούς, η διάγνωση της ΑΗ βασίστηκε σε κλινικοεργαστηριακά κριτήρια και σύμφωνα με τα περιγραφικά κριτήρια για τη διάγνωση της ΑΗ του IAHG (279). Σε 17 ασθενείς υπήρχαν ιστολογικά δεδομένα και από δεύτερη βιοψία ήπατος (συνολικά 90 βιοψίες ήπατος συμπεριελήφθησαν στη μελέτη). Οι βιοψίες εκτιμήθηκαν με βάση το δείκτη ιστολογικής δραστηριότητας και ίνωσης. Σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιεύσεις της κλινικής και για στατιστικούς λόγους, οι ασθενείς διαχωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τη φλεγμονή = ελάχιστη/ήπια (0-8) και μέτρια/βαρεία (9-18) και ανάλογα με την ίνωση = απουσία/ήπια/μέτρια (0-2) και βαρεία ίνωση/κίρρωση (3-4). Επιπλέον, σύμφωνα με κλινικά κριτήρια (παρουσία εκδηλώσεων πυλαίας υπέρτασης σε ασθενείς με χρόνια ηπατικό νόσημα) και ιστολογικά δεδομένα (όπου υπήρχαν διαθέσιμα), οι ασθενείς χωρίστηκαν σε ασθενείς με κίρρωση και σε μη κίρρωτικούς ασθενείς.

Οροί 110 υγιών μαρτύρων χρησιμοποιήθηκαν για την προτυποποίηση της *in-house* ELISA για την ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης. Επιπλέον, οροί 509 παθολογικών μαρτύρων [76 ασθενείς με ΠΧΚ,

51 ασθενείς με ΠΣΧ, 10 ασθενείς με ΑΗ-2, 188 με χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες Β και C, 75 με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, 50 με αλκοολική νόσο του ήπατος, 18 με ΗΚΚ και 41 με άλλα ηπατικά νοσήματα (νόσος Wilson, αιμοχρωμάτωση, καλοήθεις όγκοι ήπατος και άλλα)] εξετάστηκαν για αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης και ΑFA προς μελέτη της μη ειδικής αντιδραστικότητας.

Ανίχνευση αυτοαντισωμάτων κατά της α-ακτινίνης

Για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων κατά της α-ακτινίνης αναπτύχθηκε μία *in-house* ELISA βάσει προηγουμένως αναφερθέντων πρωτοκόλλων (461). Αρχικά, με προκαταρκτικά πειράματα προσδιορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση αντιγόνου και αντισώματος, καθώς και οι βέλτιστες συνθήκες εκτέλεσης του πειράματος (θερμοκρασία και χρόνοι επώασης). Στη συνέχεια, μη ακτινοβολημένες μικροπλάκες πολυστυρενίου 96 θέσεων επιστρώθηκαν με α-ακτινίνη 100μl/θέση (α-actinin from chicken gizzard) σε συγκέντρωση 10μg/ml σε carbonate-bicarbonate buffer pH=9,6. Οι μικροπλάκες παρέμειναν ακάλυπτες σε ολονύκτια επώαση (overnight) στους 37°C. Την επομένη, μετά από πολύ καλό πλύσιμο των μικροπλακών με PBS 200μl/θέση τρεις φορές, προσετέθησαν 200μl/θέση PBS-BSA 2% σε επώαση 1 ώρας στους 37°C για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης (Blocking Step). Οι υπό εξέταση οροί και υψηλώς θετικοί και αρνητικοί οροί αραιώθηκαν σε αναλογία 1:200 σε PBS-BSA 1%, 100 μl ορού προσετέθησαν εις διπλούν και ακολούθησε επώαση 90 λεπτών στους 37°C. Μετά από πολύ καλό πλύσιμο των

μικροπλακών με PBS, 200μl/θέση πέντε φορές, ως δεύτερο αντίσωμα προσετέθη αντιανθρώπινη IgG αιγός συνδεδεμένη με horseradish peroxidase σε αραιώση 1:5000 σε PBS-BSA 1%, 100μl/θέση (Jackson) σε επώαση μίας ώρας στους 37°C. Μετά από πολύ καλό πλύσιμο των μικροπλακών με PBS, 200μl/θέση πέντε φορές προσετέθησαν 100μl/θέση του χρωμογόνου υποστρώματος τετραμεθυλβενζιδίνη (tetramethylbenzidine – TMB). Η αντίδραση τερματίστηκε με 100μl/θέση 4N θειικού οξέος και ακολούθως οι οπτικές πυκνότητες των δειγμάτων μετρήθηκαν στα 450 nm με φίλτρο αναφοράς τα 620 nm. Για μείωση των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, οι οπτικές πυκνότητες των θέσεων που δεν περιείχαν ορό (blank) αφαιρέθηκαν από τις οπτικές πυκνότητες του κάθε δείγματος προς εξέταση. Ως κατώτερο όριο θετικών αποτελεσμάτων (cut-off level) ορίστηκε η τιμή οπτικής πυκνότητας (optical density – OD) 0,298, τιμή η οποία αποτελείται από το μέσο όρο των οπτικών πυκνοτήτων 110 υγιών μαρτύρων συν 3 σταθερές αποκλίσεις (Standard Deviations – SD).

Ανάπτυξη *in-house* μεθόδου ανοσοαποτύπωσης για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων κατά της α-ακτινίνης

Η παρουσία αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης στους θετικούς επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Αναλυτικότερα, για την ανοσοαποτύπωση της α-ακτινίνης χρησιμοποιήθηκε γέλη διαχωρισμού περιεκτικότητας 10% σε ακρυλαμίδιο. Η γέλη διαχωρισμού παρασκευάστηκε με την ανάμειξη 4,16 ml απεσταγμένου νερού, 2,9 ml ακρυλαμιδίου 30%, 1,65 ml

Tris-HCl 2M pH=8,8, 44 μl 20% SDS, 39,6μl 10% APS και 6,6 μl TEMED. Το μείγμα αναδεύτηκε με περιστροφικές κινήσεις και εγχύθηκε προσεκτικά, ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες, στη φόρμα κατασκευής γέλης που αποτελείται από δύο γυάλινες πλάκες (short and long plate), από τις οποίες η μία διαθέτει ειδική εγκοπή για την τοποθέτηση των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση. Πάνω από το μείγμα της γέλης διαχωρισμού εγχύθηκε απεσταγμένο νερό. Το μείγμα της γέλης διαχωρισμού στερεοποιήθηκε σε 30 λεπτά και αμέσως μετά ξεκίνησε η διαδικασία παρασκευής της γέλης επιστοίβαξης (stacking gel) με την ανάμειξη 3,054 ml απεσταγμένου νερού, 640μl ακρυλαμιδίου 30%, 600 μl Tris-HCl 1M, pH=6,8, 24 μl 20% SDS, 4,8 μl 10% APS και 24 μl TEMED. Το μείγμα της γέλης επιστοίβαξης εγχύθηκε προσεκτικά, ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες, πάνω στη γέλη διαχωρισμού και στερεοποιήθηκε σε 30 λεπτά. Κατά το χρόνο στερεοποίησης της γέλης επιστοίβαξης παρασκευάστηκε το δείγμα προς ηλεκτροφόρηση. Δείγμα της α-ακτινίνης (10,3 μl) αναμείχθηκε με διάλυμα ανηγμένου SDS (110μl) και απεσταγμένο νερό (99,7μl), έτσι ώστε η επιθυμητή συγκέντρωση α-ακτινίνης να υπολογίζεται στα 4 μg/λωρίδα. Το μείγμα θερμάνθηκε σε υδατόλουτρο στους 100°C για 5 λεπτά. Ακολούθως, η φόρμα κατασκευής γέλης προσαρμόστηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και στο σύστημα προσετέθη ηλεκτροφορητικό διάλυμα (electrophoretic buffer 1x) με προσεκτικό έλεγχο για ύπαρξη διαρροής από τη συσκευή. Στη φόρμα κατασκευής γέλης προσετέθησαν οι μάρτυρες μοριακού βάρους (protein ladders) και το μείγμα α-ακτινίνης-διαλύματος ανηγμένου SDS προς ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 125 Volt για 1 ώρα.

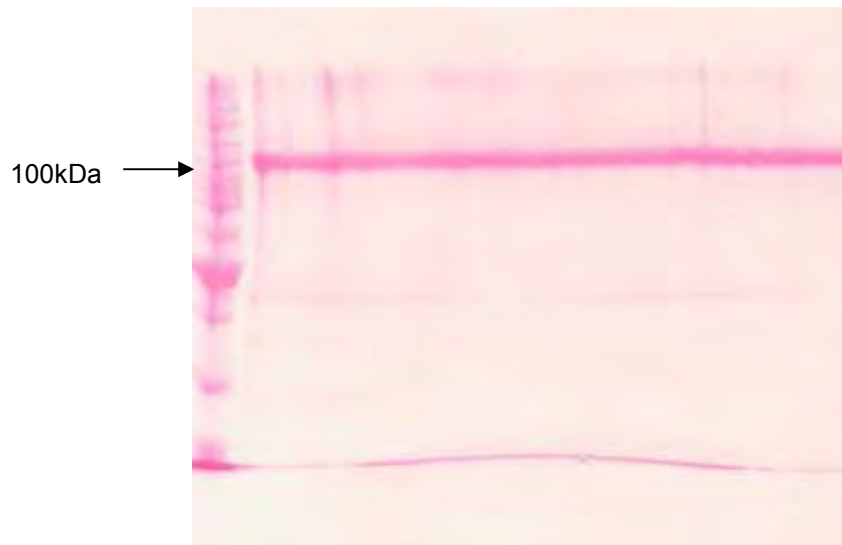
Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά της α-ακτινίνης σε μεμβράνη PVDF. Στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς τοποθετήθηκαν με την ακόλουθη σειρά σπόγγος εμποτισμένος με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer), φίλτρο ηλεκτρομεταφοράς εμποτισμένο με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς, η γέλη που έφερε την α-ακτινίνη, μεμβράνη PVDF εμποτισμένη αρχικά με μεθανόλη και κατόπιν με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και ξανά φίλτρο ηλεκτρομεταφοράς εμποτισμένο με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και σπόγγος εμποτισμένος με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer). Οι φυσαλίδες αέρα που δημιουργήθηκαν μεταξύ γέλης και μεμβράνης PVDF αφαιρέθηκαν με τη βοήθεια ειδικού ρολό επίστρωσης, έτσι ώστε να μην δημιουργηθούν ελλείματα στη μεταφορά της α-ακτινίνης από τη γέλη στη μεμβράνη. Λόγω υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της ηλεκτρομεταφοράς, στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς προσετέθησαν παγοκύστες. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιήθηκε στα 25 Volt για 2 ώρες. Να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις της α-ακτινίνης και η αναλογία α-ακτινίνης-SDS, όπως και οι βέλτιστες συνθήκες ηλεκτροφόρησης και ηλεκτρομεταφοράς καθορίστηκαν από προκαταρκτικά πειράματα προτυποποίησης της μεθόδου.

Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη PVDF ενεργοποιήθηκε με μεθανόλη και πλύθηκε με PBS. Οι μεταφερθείσα στη μεμβράνη α-ακτινίνη έγινε ορατή με χρώση Ponceau S και στη συνέχεια η μεμβράνη κόπηκε σε λωρίδες (strips) για εξέταση των επιμέρους ορών.

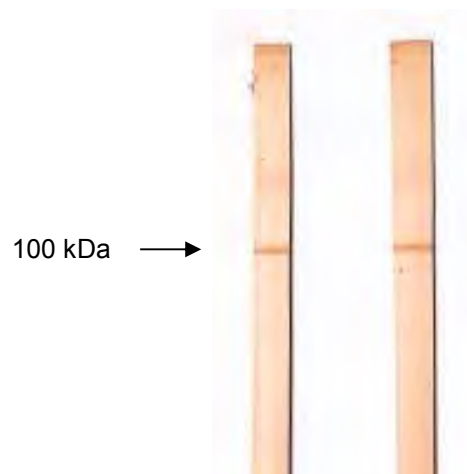
Ακολούθησε ενεργοποίηση των λωρίδων της μεμβράνης με μεθανόλη και PBS και στη συνέχεια επώαση των λωρίδων της μεμβράνης σε διάλυμα 5% αποβουτυρωμένου γάλακτος- PBS/Tween 20 0,1% για κάλυψη των μη ειδικών

θέσεων δέσμευσης (blocking step). Στη συνέχεια οι λωρίδες της μεμβράνης επωάστηκαν με θετικούς ορούς για αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης σύμφωνα με την *in-house* ELISA και με ορούς παθολογικών και υγιών μαρτύρων σε αραιώση 1:100 (πρώτο αντίσωμα – primary antibody) σε διάλυμα 5% αποβουτυρωμένου γάλακτος- PBS/Tween 20 0,1% σε για 1,5 ώρα. Αφού ακολούθησε πλύσιμο των λωρίδων με PBS/Tween 20 0,1% για 5 λεπτά τρεις φορές για απομάκρυνση των μη-συνεζευγμένων αντισωμάτων των ορών. Κατόπιν, προσετέθη αντιανθρώπειο αντίσωμα IgG συνεζευγμένο με horseradish peroxidase αραιωμένο 1:2000 σε διάλυμα 5% αποβουτυρωμένου γάλακτος- PBS/Tween 20 0,1% και ακολούθησε πλύσιμο των λωρίδων με PBS/Tween 20 0,1% για 5 λεπτά τρεις φορές για απομάκρυνση των μη-συνεζευγμένων αντισωμάτων. Το επόμενο στάδιο περιελάμβανε την προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος, που αποτελείτο από DAB/H₂O₂. Οι λωρίδες επωάστηκαν για 20 λεπτά με το χρωμογόνο υπόστρωμα και ακολούθως η αντίδραση ενζύμου υποστρώματος διεκόπη με προθήκη απεσταγμένου νερού (Εικόνα 20).

Οι πρωτεϊνικές μπάντες που ανεδείχθησαν στις λωρίδες της μεμβράνης αξιολογήθηκαν με τη βοήθεια του μάρτυρα μοριακού βάρους (protein ladder). Η α-ακτινίνη απεικονίστηκε ως μπάντα MB ~ 100 kDa (Εικόνα 21).



Εικόνα 20: Μembrάνη έχουσα ως αντιγόνο α-ακτινίνη σε χρώση Ponceau S (MB 100 kDa)



Εικόνα 21: Οροί θετικοί για αντισώματα έναντι α-ακτινίνης (μπάντα 100 kDa αντιστοιχεί σε αντιδραστικότητα έναντι της α-ακτινίνης)

ELISA ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι της f-ακτίνης (AFA)

Για την ανίχνευση των AFA χρησιμοποιήθηκε μία εμπορικά διαθέσιμη ELISA (Quanta Lite Actin IgG ELISA, INOVA Diagnostics) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μικροπλάκες πολυστυρενίου των 96 θέσεων με προσδεσμένη f-ακτίνη ως αντιγόνο επωάστηκαν με προαραιωμένα αρνητικά, μετρίως θετικά και υψηλώς θετικά δείγματα για αντισώματα έναντι της f-ακτίνης και με ορούς των ασθενών σε αραιώση 1:100 σε Tris αλατούχο διάλυμα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από καλό πλύσιμο των μικροπλακών με Tris αλατούχο διάλυμα και Tween 20, 200 μl/θέση, τρεις φορές, προσετέθη αντιανθρώπινη IgG αιγός συνδεσμένη με horseradish peroxidase 100μl/θέση, σε επώαση 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από καλό πλύσιμο των μικροπλακών με Tris αλατούχο διάλυμα και Tween 20, 200 μl/θέση, τρεις φορές, ως χρωμογόνο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε TMB 100μl/θέση. Η αντίδραση τερματίστηκε με 100μl/θέση 0,344 M θειικό οξύ. Οι οπτικές πυκνότητες των δειγμάτων μετρήθηκαν στα 450 nm με φίλτρο αναφοράς τα 620 nm. Οι τιμές της οπτικής απορρόφησης μετατράπηκαν σε μονάδες σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

Μονάδες = (οπτική πυκνότητα δείγματος/οπτική πυκνότητα χαμηλώς θετικού μάρτυρα) * μονάδες χαμηλώς θετικού μάρτυρα (=25 units όπως ορίζεται από τον κατασκευαστή)

Ως κατώτερο όριο θετικών αποτελεσμάτων (cut-off level) ορίστηκε από τον κατασκευαστή η τιμή των 20 μονάδων.

Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα περιγράφησαν ως διάμεση τιμή (εύρος). Τα δεδομένα αναλύθηκαν με Mann-Whitney U-test (MWU), paired t-test, χ^2 (δύο προς δύο μετά από διόρθωση κατά Yate's), Fischer's exact test, τον συντελεστή συσχέτισης Pearson χ^2 , τον μη παραμετρικό συντελεστή συσχέτισης σειράς Spearman (Spearman's rank correlation), την ανάλυση Kruskal-Wallis και με δυαδική λογιστική παλινδρόμηση (binary logistic regression). Ως στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα θεωρήθηκε όταν $p \leq 0,05$, ενώ τα διαστήματα εμπιστοσύνης υπολογίστηκαν με τη διαδικασία κατά Wilson με διόρθωση συνεχείας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης και AFA σε ασθενείς με AH-1 και σε παθολογικούς μάρτυρες

Αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης ανιχνεύθηκαν σε 33 από τους 86 ασθενείς με AH-1 (38,4%, Πίνακας 9), και μόνο στους 71 από τους 509 παθολογικούς μάρτυρες (13,9%, $p < 0,001$). Τα AFA ανιχνεύθηκαν σε 65 από 86 ασθενείς με AH-1 (75,6%, Πίνακας 9) σε σύγκριση με την ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων αυτών σε 113/509 παθολογικούς μάρτυρες (22,2%, $p < 0,001$). Διπλή αντιδραστικότητα έναντι της α-ακτινίνης και της f-ακτινίνης ανευρέθη σε 27/86 ασθενείς με AH-1 (31,4%, Πίνακας 9) σε σύγκριση με την ανίχνευση διπλής αντιδραστικότητας σε μόλις 17/509 παθολογικούς μάρτυρες (3,3%, $p < 0,001$).

	Ομάδα Baseline (n=86)	Ομάδα A – Responders (n=40)	Ομάδα B – Relapsers/incomplete responders (n=37)	Ομάδα Γ- Ασθενείς άνευ αγωγής (n=9)	p
	86 δείγματα	259 δείγματα	392 δείγματα	27 δείγματα	
Αντισώματα κατά α-ακτινίνης (+/- %)	33/53 (38,4)	27/232 (10,4)	92/300 (23,5)	0/27 (0)	<0,001
AFA (+/- %)	65/21 (75,6)	124/135 (48)	308/84 (78,5)	22/5 (81,5)	<0,001
Ταυτόχρονη ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης και AFA	27/59 (31,4)	13/246 (5)	78/314 (20)	0/27 (0)	<0,001

Πίνακας 9: Αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης, AFA και οι συνδυασμοί τους για την ομάδα Baseline και τις υπόλοιπες ομάδες

Επιπλέον, οι οπτικές πυκνότητες για αντισώματα κατά της α-ακτινίνης σε ασθενείς με AH-1 ήταν υψηλότερες σε σχέση με τις οπτικές πυκνότητες των παθολογικών μαρτύρων [0,206 (0,036-0,627) σε ασθενείς με AH-1 έναντι 0,170 (0,046-0,360) σε παθολογικούς μάρτυρες, $p < 0,05$]. Από τα συνολικά 764 σειριακά δείγματα των ασθενών με AH-1 που εξετάστηκαν, τα αντισώματα

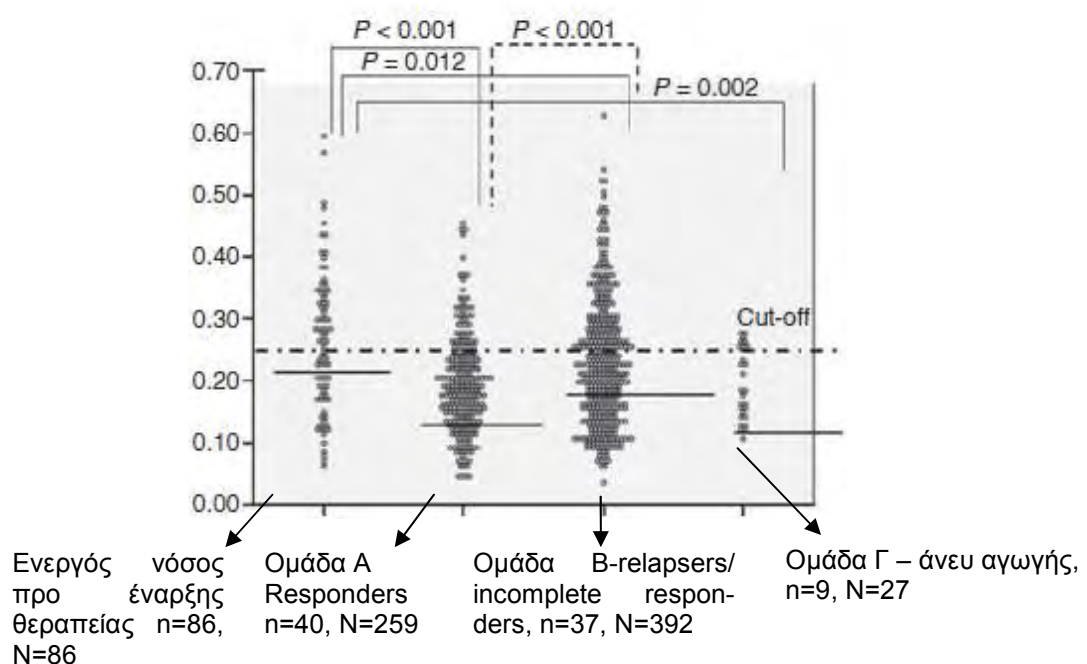
έναντι της α-ακτινίνης ανιχνεύθηκαν σε 152 δείγματα (20% σε σύγκριση με 13,9% σε παθολογικούς μάρτυρες, $p=0,007$). AFA ανιχνεύθηκαν σε 519 δείγματα ασθενών με AH-1 (68% σε σχέση με 22,2% των παθολογικών μαρτύρων, $p<0,001$). Τέλος, διπλή αντιδραστικότητα έναντι της α-ακτινίνης και της f-ακτίνης ανιχνεύθηκε σε 118/764 δείγματα ασθενών με AH-1 (15,4% σε σύγκριση με μόλις 3,3% στους παθολογικούς μάρτυρες, $p<0,001$).

Συσχέτιση των αντισωμάτων κατά της α-ακτινίνης και της f-ακτίνης με την ανταπόκριση στη θεραπεία

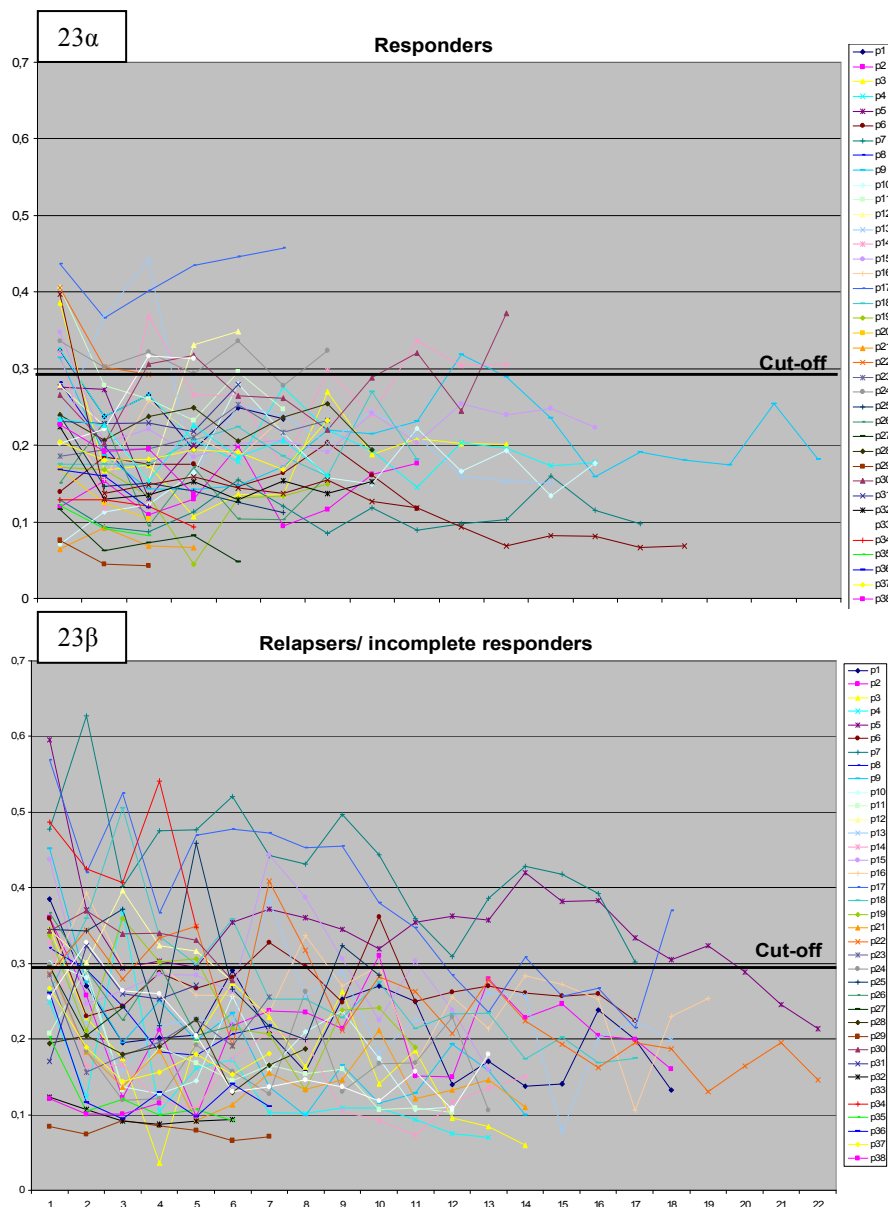
Αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης : Οι τιμές οπτικής πυκνότητας των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης ήταν σημαντικά διαφορετικές μεταξύ των τεσσάρων υποομάδων που μελετήθηκαν (ομάδα baseline και ομάδα A-responders, ομάδα B-relapsers/incomplete responders, ομάδα Γ-ασθενείς χωρίς θεραπεία, $p<0,001$, Kruskal-Wallis test) (Εικόνα 22). Στην πραγματικότητα, οι τιμές των οπτικών πυκνοτήτων των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης ήταν σημαντικά υψηλότερες στους ασθενείς με AH-1 πριν την έναρξη θεραπείας [baseline ομάδα 0,262 (0,060-0,590)] σε σχέση με τις τιμές οπτικής πυκνότητας της ομάδας A-responders [0,185 (0,040-0,450), $p<0,001$], της ομάδας B-relapsers/incomplete responders [0,218 (0,040-0,627), $p=0,01$] και ομάδα Γ-ασθενείς χωρίς θεραπεία [0,180 (0,100-0,280), $p=0,002$]. Παράλληλα, οι τιμές οπτικής πυκνότητας των αντισωμάτων έναντι της α-

ακτινίνης ήταν σημαντικά χαμηλότερες στην ομάδα A – responders σε σύγκριση με την ομάδα B - relapsers/incomplete responders ($p < 0,001$).

Εικόνα 22: Οπτικές πυκνότητες των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης των ορών προ έναρξης θεραπείας και των ορών των διαφόρων υποομάδων. Οι οπτικές πυκνότητες ήταν σημαντικά υψηλότερες πριν την έναρξη θεραπείας σε σχέση με αυτές των υπόλοιπων υποομάδων. Επίσης, οι τιμές των οπτικών πυκνοτήτων της ομάδας A ήταν σημαντικά χαμηλότερες σε σχέση με αυτές της ομάδας B. Η οριζόντια μπάρα σε κάθε υποομάδα δηλώνει τη διάμεση τιμή (median). N=αριθμός ορών σε κάθε ομάδα, n=αριθμός ασθενών σε κάθε ομάδα.



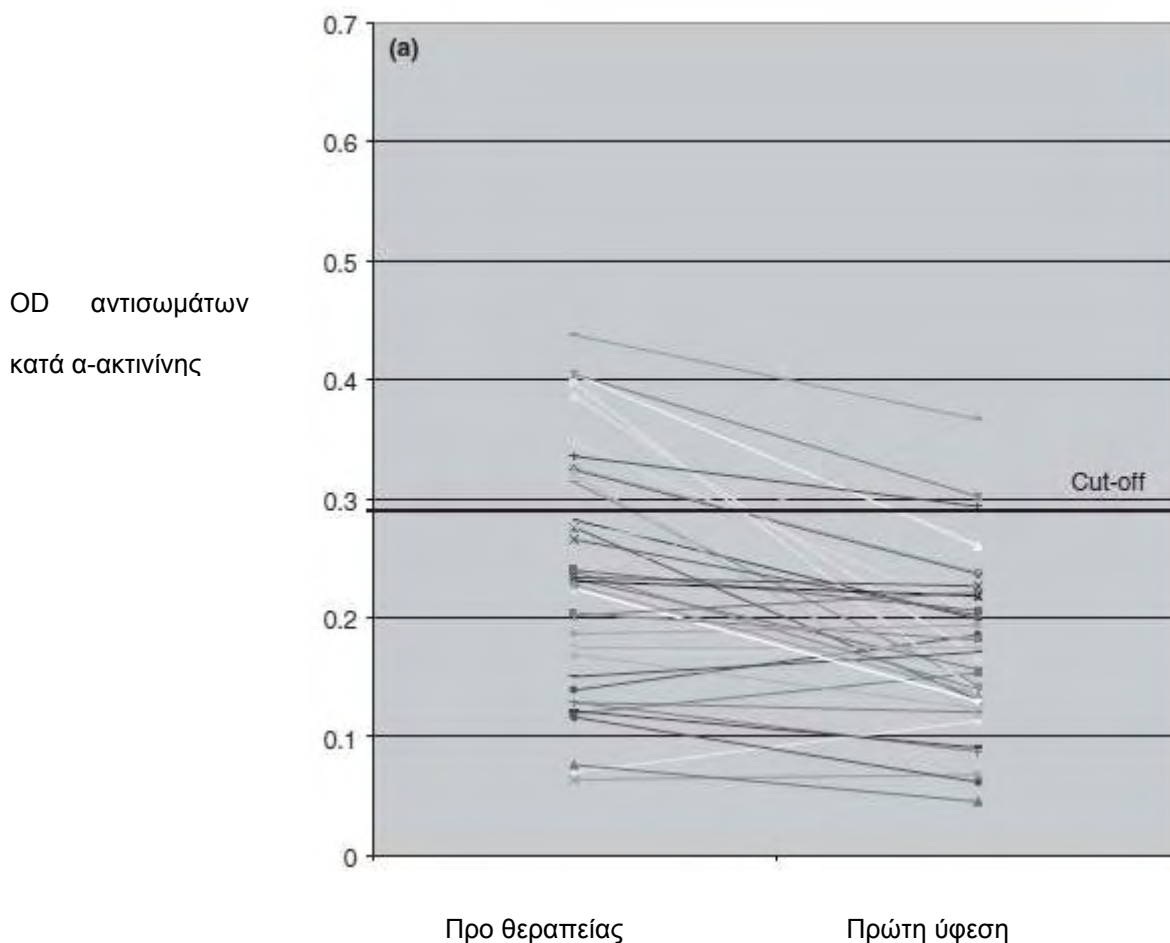
Οι τιμές των οπτικών πυκνοτήτων των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης παρουσίαζαν σημαντική διακύμανση κατά την περίοδο παρακολούθησης στην ομάδα A- responders (n=40 ασθενείς, Εικόνα 23α) και στην ομάδα B-relapsers / incomplete responders (με n=37 ασθενείς, Εικόνα 23β).



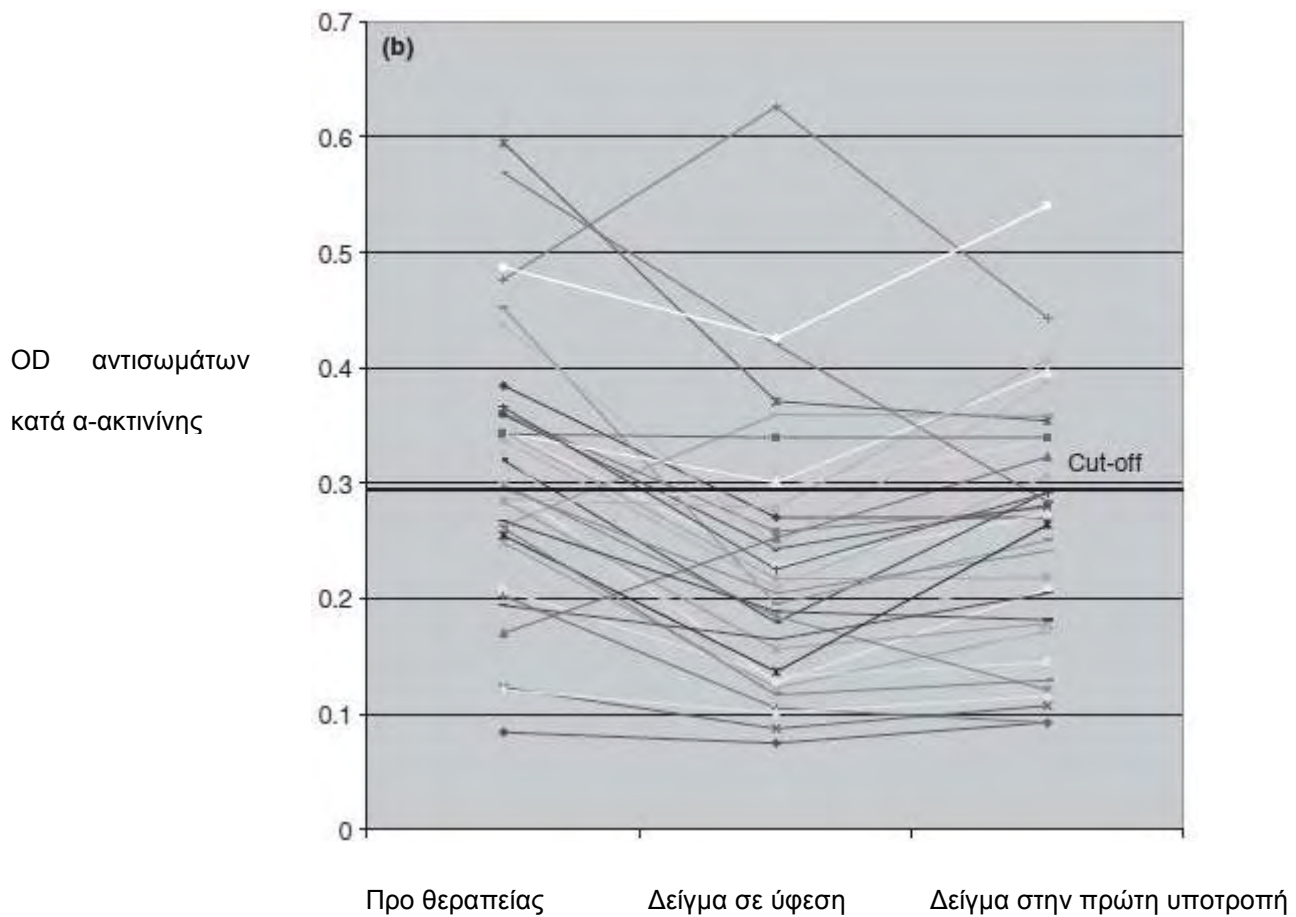
Εικόνα 23: Διακύμανση των οπτικών πυκνοτήτων των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης κατά την περίοδο παρακολούθησης στην ομάδα A-responders (n=40, 23α) και ομάδα B-relapsers/incomplete responders (n=37, 23β)

Στην ανάλυση paired t-test παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των πρώτων δειγμάτων προ έναρξης θεραπείας και των υπόλοιπων δειγμάτων της περιόδου παρακολούθησης κατά τη διάρκεια της θεραπείας και στις δύο

ομάδες A- responders και B-relapsers/incomplete responders ($p < 0,05$ για κάθε σύγκριση) (Εικόνες 24, 25). Επιπλέον, στην ομάδα B - relapsers/incomplete responders, η ανάλυση paired t-test έδειξε σημαντική διαφορά στις τιμές των οπτικών πυκνοτήτων των αντισωμάτων έναντι της α -ακτινίνης μεταξύ των δειγμάτων σε περίοδο ύφεσης και των δειγμάτων πρώτης υποτροπής (Εικόνα 25, $p = 0,006$). Επίσης, η απουσία αντισωμάτων κατά της α -ακτινίνης σχετίστηκε με ανταπόκριση στη θεραπεία (Πίνακας 9, $p < 0,001$).



Εικόνα 24: Διακύμανση οπτικών πυκνοτήτων (OD) αντισωμάτων κατά α -ακτινίνης στην ομάδα A-responders πριν την έναρξη θεραπείας και κατά την πρώτη ύφεση.



Εικόνα 25: Διακύμανση των τιμών οπτικής πυκνότητας (OD) στην ομάδα Β των ασθενών (relapsers/incomplete responders), προ έναρξης θεραπείας, σε ύφεση και στην πρώτη υποτροπή. Υπήρχε σημαντική διαφορά των τίτλων των αντισωμάτων κατά της α-ακτινίνης πριν τη θεραπεία και είτε στην ύφεση, είτε στην πρώτη υποτροπή. Επιπλέον, οι τιμές οπτικής πυκνότητας της α-ακτινίνης στην ύφεση διέφεραν σημαντικά σε σχέση με εκείνες στην πρώτη υποτροπή.

Αντισώματα έναντι της f-ακτίνης (AFA)

Οι τίτλοι των AFA ήταν επίσης σημαντικά διαφορετικοί μεταξύ των τεσσάρων υποομάδων μελέτης (ομάδα baseline και ομάδα A-responders, ομάδα B-relapsers/incomplete responders, ομάδα Γ-ασθενείς χωρίς θεραπεία, $p < 0,001$, Kruskal-Wallis test). Αναλυτικότερα, οι τίτλοι των AFA στην ομάδα A-responders [18 (1,7-319)] ήταν σημαντικά χαμηλότεροι σε σύγκριση με αυτούς της ομάδας baseline προ έναρξης θεραπείας [41,3 (4,6-389), $p < 0,001$], της ομάδας B-relapsers/incomplete responders [40,3 (3-385); $P < 0,001$] και της ομάδας Γ-ασθενείς χωρίς θεραπεία [47 (9,4-207), $p < 0,001$]. Η απουσία των AFA συσχετίστηκε με ανταπόκριση στη θεραπεία ($p < 0,001$, Πίνακας 9).

Συνδυασμός των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης και AFA

Η συσχέτιση του συνδυασμού των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης και AFA με την ανταπόκριση στη θεραπεία φαίνεται στον πίνακα 9. Η ευαισθησία, ειδικότητα, η θετική (Positive Predictive Value – PPV) και η αρνητική (Negative Predictive Value – NPV) προγνωστική αξία της κάθε κατηγορίας αυτοαντισωμάτων και του συνδυασμού τους στη διαφοροποίηση ασθενών με ενεργό ή προχωρημένη νόσο (ομάδα B-relapsers/incomplete responders, ομάδα Γ-ασθενείς χωρίς θεραπεία) και των ασθενών που εμφάνισαν ανταπόκριση στη θεραπεία (ομάδα A-responders) φαίνεται ακολούθως στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Ευαισθησία, ειδικότητα, θετική προγνωστική αξία (PPV) και αρνητική προγνωστική αξία (NPV) της ανίχνευσης αντισωμάτων κατά α-ακτινίνης, f-ακτινίνης (AFA) και του συνδυασμού τους για το διαχωρισμό ασθενών με ενεργό ή προχωρημένη νόσο (ομάδα baseline, ομάδα B-relapsers/incomplete responders και ομάδα Γ-ασθενείς χωρίς θεραπεία) από τους ασθενείς που εμφανίζουν πλήρη ανταπόκριση στη θεραπεία (ομάδα A-responders).

	Ευαισθησία %	Ειδικότητα %	PPV %	NPV %
Αντισώματα έναντι της α- ακτινίνης (+)	25 (21-29%)	90 (85-93%)	82 (75-88%)	38 (34-42%)
AFA (+)	78 (74-82%)	52 (46-58%)	76 (72-79%)	55 (49-61%)
Ταυτόχρονη ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της α- ακτινίνης και AFA	21 (17-25%)	95 (91-97%)	89 (82-94%)	38 (34-42%)

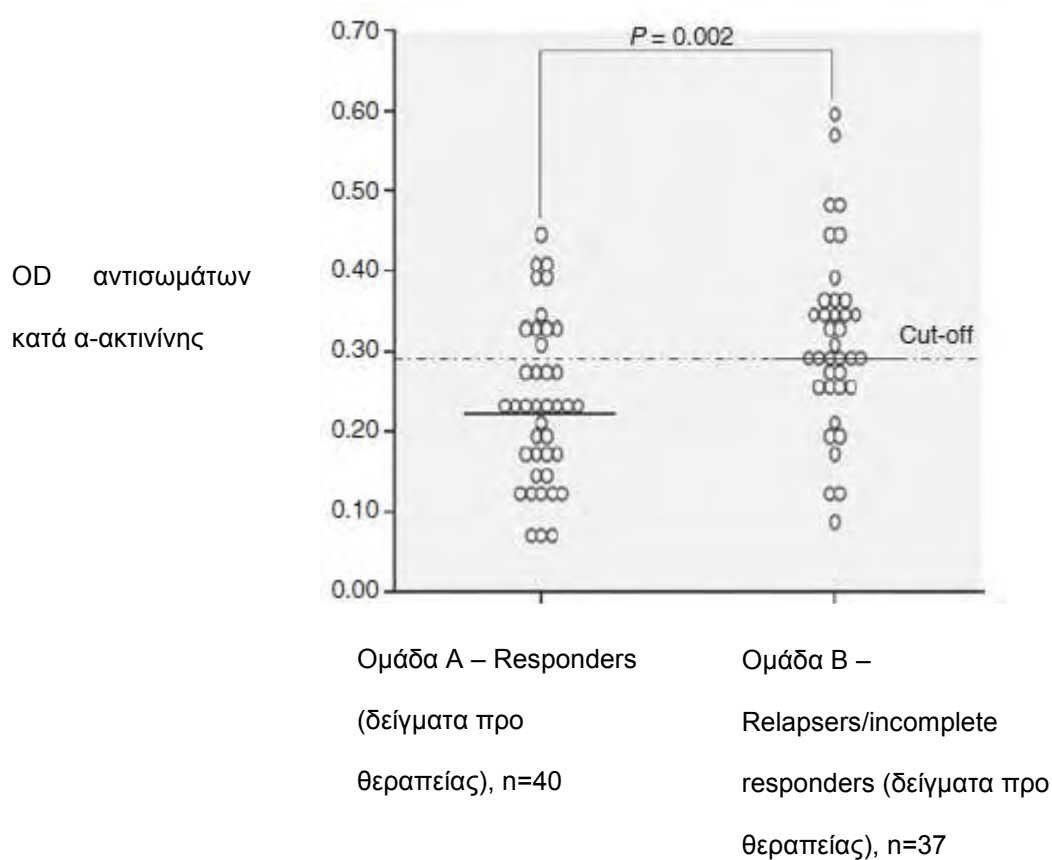
Οι τιμές σε παρενθέσεις αντιπροσωπεύουν τα διαστήματα αξιοπιστίας 95%.

Συνοπτικά, όσον αφορά στην ευαισθησία, φαίνεται ότι τα AFA εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση ασθενών με ενεργό ή προχωρημένη νόσο (ευαισθησία 78%, 95% CI 74-82%, Πίνακας 10). Η υψηλή ειδικότητα σε συνδυασμό με την υψηλή PPV των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης (90%, 95% CI 85-93% και 82%, 95% CI 75-88%, αντίστοιχα) και της διπλής αντιδραστικότητας έναντι α-ακτινίνης και f-ακτίνης (95%, 95% CI 91-97% και 89%, 95% CI 82%-94%, αντίστοιχα) αναδεικνύουν ότι τα αντισώματα έναντι α-ακτινίνης μόνα είτε σε συνδυασμό με τα AFA (διπλή αντιδραστικότητα) αποτελούν καλύτερους δείκτες ενεργότητας της νόσου σε σχέση με την ανίχνευση μόνο των AFA (Πίνακας 10).

Προγνωστικοί παράγοντες ανταπόκρισης στη θεραπεία

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν τα αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης, τα AFA ή ο συνδυασμός τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί παράγοντες στη θεραπεία, μελετήθηκε η κατάσταση των αντισωμάτων στους ασθενείς των ομάδων ομάδα A-responders (n=40 ασθενείς) και ομάδα B-relapsers/incomplete responders (n=37 ασθενείς). Βρέθηκε ότι η ανταπόκριση στη θεραπεία σχετίζεται με την απουσία αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης πριν από την έναρξη αγωγής (OR 3,4, 95% CI 1,3-8,9) καθώς και απουσία διπλής αντιδραστικότητας έναντι α-ακτινίνης και f-ακτίνης προ της έναρξης αγωγής (OR 3,8, 95% CI 1,4-10,4). Αντίθετα, μόνο η απουσία των AFA πριν την αγωγή δεν μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Οι ασθενείς της ομάδας A-responders εμφάνιζαν πριν από την έναρξη θεραπείας σημαντικά χαμηλότερες τιμές οπτικής πυκνότητας των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης σε σχέση με τους ασθενείς της ομάδος B-relapsers/incomplete responders [0,229 (0,060-0,430) σε σχέση με 0,299 (0,08-0,590), $p=0,002$] (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Τιμές οπτικής πυκνότητας (OD) προ έναρξης θεραπείας (baseline) στην ομάδα A ασθενών (responders) και στην ομάδα B των ασθενών (relapsers/incomplete responders). Οι τιμές προ έναρξης θεραπείας ήταν σημαντικά χαμηλότερες στην ομάδα A σε σχέση με την ομάδα B. Οι οριζόντιες μπάρες αντιπροσωπεύουν τις διάμεσες τιμές (median).

Επιπλέον, η ανταπόκριση στη θεραπεία σχετιζόταν με την απουσία κίρρωσης τη στιγμή της διάγνωσης (OR 4,3 95% CI 1,2-14,9) και υψηλότερες baseline τιμές AST και ALT ($p < 0,03$ και $p = 0,005$ αντίστοιχα). Εντούτοις, όταν οι παράγοντες αυτοί μαζί με την παρουσία του απλοτύπου HLA-DR3 και των anti-SLA/LP αντισωμάτων (γνωστοί αρνητικοί προγνωστικοί παράγοντες για την πορεία και έκβαση της ΑΗ) (313, 533, 534) μελετήθηκαν με δυαδική λογιστική παλινδρόμηση (binary logistic regression), μόνο τα αντισώματα έναντι της α -ακτινίνης ταυτοποιήθηκαν ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας ανταπόκρισης στη θεραπεία (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Δυαδική λογιστική παλινδρόμηση παραγόντων που μπορούν δυνητικά να προβλέψουν την ανταπόκριση στη θεραπεία ασθενών με ΑΗ πριν την έναρξη της αγωγής.

Coefficients	B	S.E.	Wald	Sig.
Αντισώματα κατά α -ακτινίνης (θετικά/αρνητικά)	-,006	1,161	,000	,996
Οπτικές πυκνότητες α -ακτινίνης	9,074	5,165	4,087	,050

Διπλή αντιδραστικότητα έναντι α-ακτινίνης και f- ακτινίνης (ναι/όχι)	-,118	1,095	,012	,914
AST U/L	,000	,001	,005	,944
ALT U/L	-,001	,001	1,313	,252
HLA DR3 (ναι/όχι)	,427	,675	,400	,527
SLA/ LP (ναι/όχι)	-1,052	,851	1,529	,216
Παρουσία κίρρωσης (ναι/όχι)	,732	,748	,958	,328
Constant	-1,500	1,155	1,686	,019

Εξαρτημένες μεταβλητές: responders vs relapsers/incomplete responders;

S.E.=standard error, Sig=στατιστική σημαντικότητα

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διατριβή εξετάστηκε ένα πολύ μεγάλο δείγμα διαδοχικών ορών (n=764) 86 ασθενών με AH-1, προκειμένου να μελετηθεί εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης και των AFA με την ανταπόκριση στη θεραπεία, όπως επίσης και να διευκρινιστεί η κλινική σημασία των αντισωμάτων αυτών κατά την πορεία της νόσου. Τα

παρακάτω ευρήματα προκύπτουν από την παρούσα μελέτη: α) τα αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης προ της έναρξης αγωγής μπορούν να προβλέψουν την ανταπόκριση στη θεραπεία και β) όσον αφορά στην ειδικότητα, τα αντισώματα κατά της α-ακτινίνης, είτε μόνα είτε σε συνδυασμό με τα AFA (διπλή αντιδραστικότητα), φαίνεται ότι διακρίνουν καλύτερα ασθενείς με ενεργό ή προχωρημένη νόσο (ομάδα A-baseline, ομάδα B-relapsers/incomplete responders, ομάδα Γ-ασθενείς χωρίς θεραπεία) σε σχέση με τα AFA μόνα τους.

Σε μία πρόσφατη μελέτη (467) ανεδείχθη ότι τα αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ένας επιπλέον διαγνωστικός δείκτης για την AH-1, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με τα AFA. Επιπλέον, ανεδείχθη στην παρούσα διατριβή ότι η απουσία αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης προ έναρξης θεραπείας υποδεικνύει ευνοϊκότερη ανταπόκριση στην αγωγή, ενώ η διπλή αντιδραστικότητα έναντι α-ακτινίνης και f-ακτίνης προ έναρξης αγωγής μπορεί καλύτερα (OR 3,4 έναντι 3,8) να προβλέψει τις υποτροπές είτε κατά τη διάρκεια της θεραπείας, είτε μετά τη διακοπή της αγωγής. Πιο σημαντικά όμως, βρέθηκε ότι οι τιμές οπτικής πυκνότητας των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης πριν την έναρξη ανοσοκατασταλτικής αγωγής (τιμές baseline) ήταν σημαντικά χαμηλότερες σε ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στην αγωγή (ομάδα A – responders) σε σχέση με τις τιμές οπτικής πυκνότητας των ασθενών που κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης εμφάνισαν υποτροπές ή ανταποκρίθηκαν μερικώς στη θεραπεία (ομάδα B-relapsers/incomplete responders). Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι τα αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης μόνα ή σε συνδυασμό με τα AFA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αξιόπιστοι προγνωστικοί παράγοντες ανταπόκρισης στην

ανοσοκατασταλτική αγωγή σε ασθενείς με AH-1. Μέχρι σήμερα έχει δειχθεί ότι μόνο τα anti-ASGPR αντισώματα και οι τίτλοι τους σχετίζονται με την ανταπόκριση στη θεραπεία, ενώ τα anti-LC1 φαίνεται ότι σχετίζονται με την ενεργότητα της νόσου (535, 536).

Παράλληλα, έχει δειχθεί ότι η διπλή αντιδραστικότητα έναντι της α-ακτινίνης και της f-ακτινίνης μπορεί να διακρίνει την AH-1 από τις άλλες ηπατοπάθειες, καθώς παρουσίαζε (η διπλή αντιδραστικότητα) υψηλή ειδικότητα και PPV (467). Στην παρούσα διατριβή επιβεβαιώθηκε η υψηλή ειδικότητα για τη διάγνωση της AH-1 των αντισωμάτων κατά της α-ακτινίνης και/ή της διπλής αντιδραστικότητας κατά α-ακτινίνης και f-ακτινίνης σε ασθενείς με AH-1 σε σχέση με άλλες ηπατοπάθειες, δεδομένου ότι η συχνότητα ανίχνευσης των παραπάνω αντισωμάτων σε ορούς ασθενών με AH-1 ήταν στατιστικά σημαντικά πολύ υψηλότερη από αυτή σε παθολογικούς μάρτυρες. Ο προσδιορισμός των AFA μαζί με των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης κατά τη διάρκεια της θεραπείας μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στην κλινική πρακτική για τη στενή παρακολούθηση του αποτελέσματος της θεραπείας σε ασθενείς με AH-1.

Τα αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης αποτελούν επιπλέον δείκτες ενεργότητας της νόσου, όπως αποδεικνύεται από τη σημαντική μείωσή τους όταν επιτυγχάνεται ύφεση (Εικόνα 24) ή τη σημαντική αύξησή τους επί υποτροπής (Εικόνα 25). Επιπροσθέτως, η παρουσία των αντισωμάτων κατά της α-ακτινίνης ή η διπλή αντιδραστικότητα για την α-ακτινίνη και f-ακτινίνη βρέθηκε πιο συχνά σε ασθενείς που δεν ελάμβαναν θεραπεία. Ιδιαίτερα, τα AFA και η διπλή αντιδραστικότητα για την α-ακτινίνη και f-ακτινίνη υποδείκνυαν

βαρύτερη νόσο, δεδομένου ότι συσχετίζονταν με κίρρωση, προσομοιάζοντας έτσι στα χαρακτηριστικά των anti-SLA/LP (312,313). Τα παραπάνω συμβαδίζουν με ευρήματα από προηγούμενες μελέτες (467), σύμφωνα με τις οποίες η συνδυασμένη αντιδραστικότητα έναντι α-ακτινίνης και f-ακτινίνης συσχετιζόταν με κλινικά ενεργό νόσο και απουσία αγωγής.

Τέλος, η παρούσα μελέτη περιέλαβε και ανοσογενετικές παραμέτρους (HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-B8, HLA-DR13), οι οποίες έχουν συσχετιστεί με τη γενετική προδιάθεση στην ΑΗ, όπως και με την πρόοδο της νόσου και την ανταπόκριση στην αγωγή (285, 533, 534). Πράγματι, οι απλότυποι HLA-DR4 και HLA-DR3 φαίνεται ότι επιτελούν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή αυτών των αντισωμάτων, δεδομένου ότι βρέθηκαν να αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες της θετικότητάς τους.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, η παρούσα διατριβή έδειξε για πρώτη φορά ότι σε ασθενείς με ΑΗ-1, η παρουσία αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης προ της έναρξης αγωγής αποτελεί προγνωστικό παράγοντα ανταπόκρισης στη θεραπεία. Οι τιμές των αντισωμάτων αυτών παρουσιάζουν σημαντικές διακυμάνσεις κατά τη θεραπεία ανάλογα με την ανταπόκριση (στατιστικά σημαντική μείωση στην ύφεση και στατιστικά σημαντική αύξηση επί υποτροπής). Επομένως, τα αντισώματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως νέοι υποψήφιοι βιοδείκτες παρακολούθησης του αποτελέσματος της ανοσοκατασταλτικής θεραπείας σε ασθενείς με ΑΗ-1. Φαίνεται ότι τα

αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης στην AH-1 παρουσιάζουν ομοιότητες με αυτά που ανιχνεύονται στο ΣΕΛ, όπου εκεί τα αντισώματα κατά της α-ακτινίνης σχετίζονται με ενεργό νεφρίτιδα και απουσία θεραπείας, ενώ οι τίτλοι τους μειώνονται όταν υπάρξει ανταπόκριση στην ανοσοκατασταλτική αγωγή (456). Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι στο ΣΕΛ τα νεφριτιδογόνα αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης εκφράζονται στην επιφάνεια των μεσαγγειακών κυττάρων σε πειραματόζωα με ΣΕΛ (457, 459). Αντίστοιχα, η μελέτη της σημασίας των αντισωμάτων κατά της α-ακτινίνης στην παθογένεια της AH-1 φαίνεται ιδιαίτερα ελκυστική, δεδομένου ότι εκφράζονται δύο ισομορφές της α-ακτινίνης στα ηπατοκύτταρα: η α-ακτινίνη-1, η οποία ανευρίσκεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα και αλληλεπιδρά με τον HCV και η α-ακτινίνη-4, η οποία εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα και την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται προκειμένου να διευκρινιστούν οι μηχανισμοί παραγωγής των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης στην AH-1 και ο ακριβής παθογενετικός τους ρόλος σε αυτό το γεμάτο προκλήσεις αυτοάνοσο ηπατικό νόσημα.

Βιβλιογραφία

1. Goldsby RA, Kindt TJ, Kuby J, Osborne BA, Kuby Immunology, 5th edition, 2006.
2. Delves PJ, Roitt IM, The immune system. First of two parts. N Engl J Med 2000; 343: 37-49.
3. McPhee S, Μουτσόπουλος Χ, Παθολογική Φυσιολογία, 2^η έκδοση, 2000.
4. Medzhitov R, Janeway CA, Innate Immunity. N Engl J Med 2000; 343: 338-344.
5. Kimbrell DA, Beutler B, The evolution and genetics of innate immunity. Nature Rev Genet 2001; 2: 256-267.
6. Fearon DT, Locksley RM, The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. Science 1996; 272: 50-53.
7. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O, Pathogen recognition and innate immunity. Cell 2006; 124: 783-801.
8. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway's Immunobiology, 7th edition, 2008.
9. Aderem A, Underhill DM, Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol 1999; 17: 593-623.
10. Γερμενής ΑΕ, Ιατρική Ανοσολογία, 2000.
11. Dahlgren C, Karlsson A, Respiratory burst in human neutrophils. Immunol Methods 1999; 232: 3-14.
12. Roitt IM, Delves PJ, Roitt's Essential Immunology, 10th edition, 2001.
13. Chertov O, Yang D, Howard OM, Oppenheim JJ, Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. Immunol Rev 2000; 177: 68-78.
14. Gompertz S, Stockley RA, Inflammation-role of the neutrophil and the eosinophil. Semin Respir Infect 2000; 15: 14-23.
15. Mekori YA, Metcalfe DD, Mast cells in innate immunity. Immunol Rev 2000; 173: 131-140.
16. Banchereau J, Sternman RM, Dendritic cells and the control of immunity. Nature 1998; 392: 245-252.
17. Liu Y-J, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M, Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. Nat Immunol 2001; 2: 585-589.
18. Kapsenberg ML, Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nat Rev Immunol 2003; 3: 984-993.
19. Kawai T, Akira S, Innate immune recognition of viral infection. Nat Immunol 2006; 7: 131-137.

20. Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC, Moretta A, Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol* 2006; 18: 151-158.
21. Orange JS, Fassett MS, Koopman LA, Boyson JE, Strominger JL, Viral evasion of natural killer cells. *Nat Immunol* 2002; 3: 1006-1012.
22. Brown MG, Dokun AO, Heusel JW, Smith HR, Beckman DL, Blattenberger EA, Dubbelde CE, Stone LR, Scalzo AA, Yokoyama WM, Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 2001; 292: 934-937.
23. Robbins SH, Brossay L, NK cell receptors : emerging roles in host defense against infectious agents. *Microbes Infect* 2002; 4: 1523-1530.
24. McQueen KL, Parham P, Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 615-621.
25. Lanier LL, NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 225-274.
26. Tomlinson S, Complement defense mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 83-89.
27. Liszewski MK, Farries TC, Lublin DM, Rooney IA, Atkinson JP, Control of the complement system. *Adv Immunol* 1996; 61: 201-283.
28. Schraufstatter IU, Trieu K, Sikora L, Sriramarao P, DiScipio R, Complement c3a and c5a induce different signal transduction cascades in endothelial cells. *J Immunol* 2002; 169: 2102-2110.
29. Cooper NR, The classical complement pathway. Activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol* 1985; 37: 151-216.
30. Dodds AW, Which came first, the lectin/classical pathway or the alternative pathway of complement? . *Immunobiology* 2002; 205: 340-354.
31. Jack DJ, Klein NJ, Turner MW, Mannose-binding lectin : targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev* 2001; 180: 86-99.
32. Xu Y, Narayana SV, Volanakis JE, Structural biology of the alternative pathway convertase. *Immunol Rev* 2001; 180: 123-135.
33. Carroll MC, The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 545-568.
34. Bhakdi S, Trantum-Jensen J, Complement lysis : a hole is a hole. *Immunol Today* 1991; 12: 318-320.
35. Frank MM, Fries LF, The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today* 1991; 12: 322-326.

36. Kirschfink M, Controlling the complement system in inflammation. *Immunopharmacology* 1997; 38: 51-62.
37. Mold C, Rodriguez W, Rodic-Polic B, Du Clos TW, C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with Fc γ R. *J Immunol* 2002; 169: 7019-7025.
38. Volanakis JE, Human C-reactive protein : expression, structure and function. *Mol Immunol* 2001; 38: 189-197.
39. Cecilliani F, Giordano A, Spagnolo V, The systemic reaction during inflammation : the acute-phase proteins. *Protein Pept Lett* 2002; 9: 211-223.
40. He R, Sang H, Ye RD, Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. *Blood* 2003; 101: 1572-1581.
41. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP, Natural killer cells in antiviral defense : function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 189-220.
42. Svanborg C, Godaly G, Hedlund M, Cytokine responses during mucosal infections : role in disease pathogenesis and host defense. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 99-105.
43. Pietras EM, Saha SK, Cheng G, The interferon response to bacterial and viral infections. *J Endotoxin Res* 2006; 12: 246-250.
44. Janeway CA, Medzhitov R, Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.
45. Apostolopoulos V, McKenzie IF, Role of the mannose receptor in the immune response. *Curr Mol Med* 2001; 1: 469-474.
46. Gough PJ, Gordon S, The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect* 2000; 2: 305-311.
47. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science* 1999; 285: 732-736.
48. Takeda K, Kaisho T, Akira S, Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-376.
49. Heine H, Lien E, Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 130: 180-192.
50. Kaisho T, Akira S, Critical roles of toll-like receptors in host defense. *Crit Rev Immunol* 2000; 20: 393-405.
51. Barton GM, Medzhitov R, Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270: 81-92.

52. Medzhitov R, Janeway CA, The toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 2000; 8: 452-456.
53. Underhill DM, Ozinsky A, Phagocytosis of microbes : complexity in action. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 825-852.
54. Segal AW, How neutrophils kill microbes, *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 197-223.
55. Alon R, Feigelson S, From rolling to arrest on blood vessels : leucocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Semin Immunol* 2002; 14: 93-104.
56. Ley K, Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol Rev* 2002; 186: 8-18.
57. Vestweber D, Lymphocyte trafficking through blood and lymphatic vessels: more than just selectins, chemokines and integrins. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1361-1364.
58. Van der Poll T, Coagulation and inflammation. *J Endotoxin Res* 2001; 7: 301-304.
59. Davies DR, Cohen GH, Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1996; 93: 7-12.
60. Hennecke J, Wiley DC, T-cell receptor-MHC interactions up close. *Cell* 2001; 104: 1-4.
61. Chaplin DD, Overview of the Immune Response. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 3–23.
62. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L, NKT cells: what's in a name?. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 231–237.
63. Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Andren B, Chien Y, Ligand recognition by $\alpha\beta$ T-cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 523-544.
64. Ishikawa H, Naito T, Iwanaga T, Takahashi-Iwanaga H, Suematsu M, Hibi T, et al, Curriculum vitae of intestinal intraepithelial T cells: their developmental and behavioral characteristics. *Immunol Rev* 2007; 215: 154–165.
65. Carding SR, Egan PJ, $\gamma\delta$ T-cells : functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 336-345.
66. Allison TJ, Garboczi DN, Structure of $\gamma\delta$ T-cell receptors and their recognition of non-peptide antigens. *Mol Immunol* 2002; 38: 1051-1061.
67. Tonegawa S, Berns A, Bonneville M, Farr AG, Ishida I, Ito K, Itohara S, Janeway CA, Kanagawa O, Kubo R, et al, Diversity, development, ligands and probable functions of gamma delta T cells. *Adv Exp Med Biol* 1991; 292: 53-61.

68. Friedl P, Brocker EB, TCR triggering on the move : diversity of T-cell interactions with antigen-presenting cells. *Immunol Rev* 2002; 186: 83-89.
69. Davis MM, Bjorkman PJ, T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988; 334: 395-402.
70. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH, The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 515-548.
71. Nurieva RI, Liu X, Dong C, Yin-Yang of costimulation: crucial controls of immune tolerance and function. *Immunol Rev* 2009; 229: 88–100.
72. Schwarz RH, T-cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 305-334.
73. Riley JL, PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev* 2009; 229: 114–125.
74. Zamoyska R, CD4 and CD8 : modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses?. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 82-86.
75. Abbas AK, Murphy KM, Sher A, Functional diversity of helper T-lymphocytes. *Nature* 1996; 383: 787-793.
76. Barry M, Bleackley RC, Cytotoxic T-lymphocyte : all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 401-409.
77. Wong P, Pamer EG, CD8 T-cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 29-70.
78. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al, Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006; 212: 8–27.
79. Sallusto F, Lanzavecchia A, Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol* 2009; 39: 2076–2082.
80. Constant SL, Bottomly K, Induction of Th1 and Th2 CD4+ T-cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol*, 1997; 15: 297-322.
81. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH, Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 713-758.
82. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrielli M, Murphy KM, Th17: an effector CD4 lineage with regulatory T-cell ties. *Immunity* 2006; 24: 677-688.
83. Edelman GM, Antibody structure and molecular immunology, *Scand J Immunol*, 1991; 34: 4-22.
84. Porter RR, Structural studies of immunoglobulins. *Scand J Immunol* 1991; 34: 382-389.

85. Padlan EA, Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 1994; 31: 169-217.
86. Blattner FR, Tucker PW, The molecular biology of immunoglobulin D. *Nature* 1984; 307: 417-422
87. Goding JW, Scott DW, Layton JE, Genetics, cellular expression and function of IgD and IgM receptors. *Immunol Rev* 1977; 37: 152-186.
88. Okada T, Cyster JG, B-cell migration and interactions in the early phase of antibody responses. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 278-285.
89. Shapiro-Shelef M, Calame K, Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 230-242.
90. Wilson IA, Stanfield RL, Antibody-antigen interactions : new structures and new conformational changes. *Curr Opin Struct Biol* 1994; 4: 857-867.
91. Stanfield RL, Wilson IA, Antigen-induced conformational changes in antibodies: a problem for structural prediction and design. *Trends Biotechnol* 1994; 12: 275-279.
92. Fanning LJ, Connor AM, Wu GE, Development of the immunoglobulin repertoire. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 79: 1-14.
93. Weigert M, Gattmaitan L, Loh E, Schilling J, Hood L, Rearrangement of genetic information may produce immunoglobulin diversity. *Nature* 1978; 276: 785-790.
94. Khan WN, B cell receptor and BAFF receptor signaling regulation of B cell homeostasis. *J Immunol* 2009; 183: 3561–3567.
95. Kurosaki T, Hikida M, Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes. *Immunol Rev* 2009; 228: 132–148.
96. Parker DC, T-cell-dependent B-cell activation. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 331-340.
97. Papavasiliou FN, Schatz DG, Somatic hypermutation of immunoglobulin genes:merging mechanisms for genetic diversity. *Cell* 2002; 109: 35-44.
98. Odegard VH, Schatz DG, Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 573-583.
99. Stavnezer J, Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 199-205.
100. Jumper M, Splawski J, Lipsky P, Meek K, Ligation of CD40 induces sterile transcripts of multiple Ig H chain isotypes in human B-cells. *J Immunol* 1994; 152: 438-445.
101. Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur J Immunol* 2009; 39: 2065–2075.
102. Fagarasan S, Honjo T, T-independent immune response : new aspects of B-cell biology, *Science*, 2000; 290: 89-92.

103. Mond JJ, Lees A, Snapper CM, T-cell independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 655-692.
104. Kumnovics A, Takada T, Lindahl KF, Genomic organization of the mammalian MHC. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 629-657.
105. Germain RN, MHC-dependent antigen processing and peptide presentation : providing ligands for T-lymphocyte activation. *Cell* 1994; 76: 287-299.
106. Gromme M, Neefjes J, Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol* 2002; 39: 181-202.
107. Villadangos JA, Presentation of antigens by MHC class II molecules : getting the most out of them. *Mol Immunol* 2001; 38: 329-346.
108. Wang JH, Reinherz EL, Structural basis of T-cell recognition of peptides bound to MHC molecules. *Mol Immunol* 2002; 38: 1039-1049.
109. Turley SJ, Inaba K, Garrett WS, Ebersold M, Unternaehrer J, Steinman RM, et al, Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 2000; 288: 522–527.
110. Ghodke Y, Joshi K, Chopra A, Patwardhan B, HLA and disease. *Eur J Epidemiol* 2005; 20: 475–488.
111. Caillat-Zucman S, Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases. *Tissue Antigens* 2009; 73: 1–8.
112. Sonderstrup G, McDevitt HO, DR, DQ, and you:MHC alleles and autoimmunity. *J Clin Invest* 2001; 107: 795–796.
113. Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA, Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 1628–1642.
114. Kamradt T, Mitchison NA, Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 2001; 344: 655-664.
115. Nemazee DA, Burki K, Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 1989; 337: 562-566.
116. Rathmell JC, Townsend SE, Xu JC, Flavell RA, Goodnow CC, Expansion or elimination of B cells in vivo:dual roles for CD40- and Fas(CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* 1996; 87: 319-329.
117. Nemazee D, Receptor selection in B and T lymphocytes, *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 19-51.
118. Kouskoff V, Lacaud G, Nemazee D, T cell-independent rescue of B lymphocytes from peripheral immune tolerance. *Science* 2000; 287: 2501-2503.

119. Fagarasan S, Honjo T, T-independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science* 2000; 290: 89-92.
120. Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, et al, Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nat Genet* 1997; 15: 289-292.
121. Pugliese A, Zeller M, Fernandez A Jr, et al, The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes, *Nat Genet* 1997; 15: 293-297.
122. Akkaraju S, Ho WY, Leong D, Canaan K, Davis MM, Goodnow CC, A range of CD4 T cell tolerance: partial inactivation to organ-specific antigen allows nondestructive thyroiditis or insulinitis. *Immunity* 1997; 7: 255-271.
123. Klein L, Klugmann M, Nave KA, Tuohy VK, Kyewski B, Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat Med* 2000; 6: 56-61.
124. Ferber I, Schonrich G, Schenkel J, Mellor AL, Hammerling GJ, Arnold B, Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of Tolerogen. *Science* 1994; 263: 674-676.
125. Barker CF, Billingham RE, Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 1977; 25: 1-54.
126. Janeway CA Jr, The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self, *Immunol Today*, 1992;13:11-16.
127. Kurts C, Carbone FR, Barnden M, et al, CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *J Exp Med* 1997; 186: 2057-2062.
128. Critchfield JM, Racke MK, Zuniga-Pflucker JC, et al, T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 263: 1139-1143.
129. Forster I, Hirose R, Arbeit JM, Clausen BE, Hanahan D, Limited capacity for tolerization of CD4+ T cells specific for a pancreatic beta cell neo-antigen. *Immunity* 1995; 2: 573-585.
130. Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin K-M, Krammer PH, Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995; 373: 438-441.
131. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, et al, Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 1995; 373: 441-444.
132. Ju ST, Panka DJ, Cui H, et al, Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995; 373: 444-448.

133. Lamb JR, Skidmore BJ, Green N, Chiller JM, Feldmann M, Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocyte clones with synthetic peptides of influenza hemagglutinin. *J Exp Med* 1983; 157: 1434-1447.
134. Jenkins MK, Schwartz RH, Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1987; 165: 302-319.
135. Falb D, Briner TJ, Sunshine GH, et al, Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: evidence for T cell anergy. *Eur J Immunol* 1996; 26: 130-135.
136. Lee PP, Yee C, Savage PA, et al, Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* 1999; 5: 677-685.
137. Buer J, Lanoue A, Franzke A, Garcia C, von Boehmer H, Sarukhan, Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo. *J Exp Med* 1998; 187: 177-183.
138. Chambers CA, Allison JP, Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 203-210.
139. Perron H, Garson JA, Bedin F, et al, Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 7583-7588.
140. Miller SD, Vanderlugt CL, Smith-Begolka WS, et al, Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat Med* 1997; 3: 1133-1136.
141. Tough DF, Sun S, Sprent J, T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS). *J Exp Med* 1997; 185: 2089-2094.
142. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T, Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 2000; 165: 6107-6115.
143. Kamradt T, Soloway PD, Perkins DL, Geffer ML, Pertussis toxin prevents the induction of peripheral T cell anergy and enhances the T cell response to an encephalitogenic peptide of myelin basic protein. *J Immunol* 1991; 147: 3296-3302.
144. Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM, CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2879-2883.
145. Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A, Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* 1999; 189: 821-829.
146. Fujinami RS, Oldstone MBA, Wroblewska Z, Frankel ME, Koprowski H, Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus

- phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 2346-2350.
147. Albert LJ, Inman RD, Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med* 1999; 341: 2068-2074.
 148. Jahnke U, Fischer EH, Alvord EC Jr, Sequence homology between certain viral proteins and proteins related to encephalomyelitis and neuritis. *Science* 1985; 229: 282-284.
 149. Fujinami RS, Oldstone MB, Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 1985; 230: 1043-1045.
 150. van Eden W, Holoshitz J, Nevo Z, Frenkel A, Klajman A, Cohen IR, Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to *Mycobacterium tuberculosis* and to cartilage proteoglycans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 5117-5120.
 151. Tuohy VK, Kinkel RP, Epitope spreading: a mechanism for progression of autoimmune disease. *Arch Immunol Ther Exp* 2000; 48: 347-351.
 152. Weltzien HU, Moulon C, Martin S, Padovan E, Hartmann U, Kohler J, T cell immune responses to haptens, Structural models for allergic and autoimmune reactions. *Toxicology* 1996; 107: 141-151.
 153. Martin SF, T lymphocyte-mediated immune responses to chemical haptens and metal ions: implications for allergic and autoimmune disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 134: 186-198.
 154. Shevach EM, Regulatory T-cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 423-449.
 155. Dejaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstien B, Schirmer M, Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 2006; 117: 289-300.
 156. Zuckerman NS, Hazanov H, Barak M, Edelman H, Hess S, Shcolnik H, Dunn-Walters D, Mehr R, Somatic hypermutation and antigen driven selection of B cells are altered in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2010; 35: 325-335.
 157. Schroeder K, Herrmann M, Winkler TH, The role of somatic hypermutation in the generation of pathogenic antibodies in SLE. *Autoimmunity* 2013; 46: 121-127.
 158. Mahoney JA, Rosen A, Apoptosis and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 583-588.
 159. Cooper GS, Miller FW, Pandey JP, The role of genetic factors in autoimmune disease: implications for environmental research. *Environ Health Perspect*, 1999; 107: 693-700.

160. Gough SCL, Simmonds MJ, The HLA Region and Autoimmune Disease: Associations and Mechanisms of Action. *Curr Genomics* 2007; 8: 453–465.
161. Wucherpfennig KW, HLA and Autoimmunity, Immunogenetics of Autoimmune Disease. Medical Intelligence Unit, 2006; pp 1-12.
162. Shoenfeld Y, Zandman-Goddard G, Stojanovich L, Cutolo M, Amital H, Levy Y, Abu-Shakra M, Barzilai O, Berkun Y, Blank M, de Carvalho JF, Doria A, Gilburd B, Katz U, Krause I, Langevitz P, Orbach H, Pordeus V, Ram M, Toubi E, Sherer Y, The mosaic of autoimmunity : hormonal and environmental factors involved in autoimmune diseases. *Isr Med Assoc J* 2008; 10: 8-12.
163. Vollmers HP, Brändlein S, Natural IgM antibodies: from parias to parvenus. *Histol Histopathol* 2006; 21: 1355-1366.
164. Ochsenbein AF, Zinkernagel RM, Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today* 2000; 21: 624-630.
165. Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Mouthon L, Ayoub A, Malanchere E, Coutinho A, Kazatchkine MD, Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *Journal of Immunological Methods* 1998; 216: 117-137.
166. Grönwall C, Vas J, Silverman GJ, Protective Roles of Natural IgM Antibodies. *Front Immunol* 2012; 3:66.
167. Varela F, Andersson A, Dietrich G, Sundblad A, Holmberg D, Kazatchkine M, Coutinho A, Population dynamics of natural antibodies in normal and autoimmune individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 13: 5917-5921.
168. Hentati B, Ternynck T, Avrameas S, Payelle-Brogard B, Comparison of natural antibodies to autoantibodies arising during lupus in (NZB x NZW)F1 mice, *J Autoimmun*, 1991 Apr;4(2):341-356.
169. Quintana FJ , Cohen IR, The natural autoantibody repertoire and autoimmune disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2004; 58: 276–281.
170. Sheth K, Bankey P, The liver as an immune organ, *Curr Opin Crit Care*, 2001;Apr;7(2):99-104.
171. Knolle PA, Gerken G, Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 2000; 174: 21-34.
172. Gershwin EM, Vierling JM, Manns MP, *Liver Immunology, Principles and Practice*, 2007, Humana Press.
173. Wisse E, Observations on the fine structure and peroxidase cytochemistry of normal rat liver Kupffer cells. *J Ultrastruct Res* 1974; 46: 393-426.
174. Wardle EN, Kupffer cells and their function. *Liver* 1987; 7: 63-75.

175. Hinglais N, Kazatchkine MD, Mandet C, Appay MD, Bariety J, Human liver Kupffer cells express CR1, CR3 and CR4 complement receptor antigens : an immunohistochemical study. *Lab Invest* 1989; 61: 509-514.
176. Ross GD, Vetvicka V, CR3 (CD11b, CD18) : a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clin Exp Immunol* 1993; 92: 181-184.
177. Van Egmond M, van Garderen E, van Spriel AB, et al, FcαRI-positive liver Kupffer cells : reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nat Med* 2000; 6: 680-685.
178. Lentini A, Falasca L, Autuori F, Dini L, The simultaneous exposition of galactose and mannose-specific receptors on rat liver macrophages is developmentally regulated. *Biosci Rep* 1992; 12: 453-461.
179. Naito M, Hasegawa G, Takahashi K, Development, differentiation and maturation of Kupffer cells. *Microsc Res Tech* 1997; 39: 350-364.
180. Matsuno K, Kudo S, Ezaki T, Miyakawa K, Isolation of dendritic cells in the rat liver lymph. *Transplantation* 1995; 60: 765–768.
181. Matsuno K, Ezaki T, Kudo S, Uehara Y, A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis and translocation from the liver to the draining lymph. *J Exp Med* 1996; 183: 1865–1878.
182. O’Connell PJ, Morelli AE, Logar AJ, Thomson AW, Phenotypic and functional characterization of mouse hepatic CD8 alpha+lymphoid-related dendritic cells. *J Immunol* 2000; 165: 795–803.
183. Lian ZX, Okada T, He XS, et al, Heterogeneity of dendritic cells in the mouse liver: identification and characterization of four distinct populations. *J Immunol* 2003; 170: 2323–2330.
184. Austyn JM, New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 1996; 183: 1287–1292.
185. Sun H, Sun C, Tian Z, Xiao W, NK cells in immunotolerant organs. *Cell Mol Immunol* 2013; 10: 202-212.
186. Tian Z, Chen Y, Gao B, Natural killer cells in liver disease. *Hepatology* 2013; 57: 1654-62.
187. Uwatoku R, Suematsu M, Ezaki T, et al, Kupffer cell-mediated recruitment of rat dendritic cells to the liver: roles of N-acetylgalactosamine-specific sugar receptors, *Gastroenterology*. 2001; 121: 1460–1472.
188. Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, et al, Regulation by chemokines of circulating dendritic cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue in a granulomatous liver disease. *J Exp Med* 2001; 193: 35–49.

189. Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, et al, Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol* 2004; 16: 915–928.
190. Drakes ML, Zahorchak AF, Takayama T, Lu L, Thomson AW, Chemokine and chemokine receptor expression by liver-derived dendritic cells: MIP-1alpha production is induced by bacterial lipopolysaccharide and interaction with allogeneic T cells. *Transpl Immunol* 2000; 8: 17–29.
191. Austyn JM, New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 1996; 183: 1287–1292.
192. Demetris AJ, Sever C, Kakizoe S, Oguma S, Starzl TE, Jaffe R, S100 protein positive dendritic cells in primary biliary cirrhosis and other chronic inflammatory liver diseases - Relevance to pathogenesis, *Am J Pathol* 1989; 134: 741–747.
193. Tanimoto K, Akbar SM, Michitaka K, Onji M, Immunohistochemical localization of antigen presenting cells in liver from patients with primary biliary cirrhosis; highly restricted distribution of CD83-positive activated dendritic cells. *Pathol Res Pract* 1999; 195: 157–162.
194. Yamamoto K, Akbar SM, Masumoto T, Onji M, Increased nitric oxide (NO) production by antigen-presenting dendritic cells is responsible for low allogeneic mixed leucocyte reaction (MLR) in primary biliary cirrhosis (PBC). *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 94–101.
195. Hiasa Y, Akbar SM, Abe M, Michitaka K, Horiike N, Onji M, Dendritic cell subtypes in autoimmune liver diseases; decreased expression of HLA DR and CD123 on type 2 dendritic cells. *Hepatol Res* 2002; 22: 241–249.
196. Galle MB, DeFranco RM, Kerjaschki D, et al, Ordered array of dendritic cells and CD8+ lymphocytes in portal infiltrates in chronic hepatitis C. *Histopathology* 2001; 39: 373–381.
197. Doherty DG, O'Farrelly C, Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev* 2000; 174: 5–20.
198. Doherty D, et al, The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2 and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol* 1999; 163: 2314–2321.
199. Takahashi M, et al, LPS induces NK1.1+ T cells with potent cytotoxicity in the liver of mice via production of IL-12 from Kupffer cells, *J Immunol* 1996; 156: 2436–2442.
200. Rowell DL, et al, Human hepatocytes express an array of proinflammatory cytokines after agonist stimulation or bacterial invasion. *Am J Physiol* 1997; 273: 322–332.

201. Nuti S, et al, Dynamics of intra-hepatic lymphocytes in chronic hepatitis C : enrichment for V 24+ T cells and rapid elimination of effector cells by apoptosis. *Eur J Immunol* 1998; 28: 3448–3455.
202. Huang L, T cells expressing alpha beta antigen receptors in the liver, In: Crispe IN, ed. *T Lymphocytes in the Liver: Immunobiology, Pathology and Host Defense* New York: Wiley-Liss; 1999: 15–39.
203. Mehal WZ, Juedes AE, Crispe IN, Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver. *J Immunol* 1999; 163: 3202–3210.
204. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, et al, Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:15: 661–668.
205. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV, Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996; 4: 25–36.
206. Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D, Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol* 2004; 41: 31–37.
207. Lan RY, Cheng C, Lian ZX, et al, Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, 2006; 43: 729–737.
208. 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: 4484–4491.
209. Yang XH, Yamagiwa S, Ichida T, et al, Increase of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in the liver of patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2006; 45: 254–262.
210. Bolacchi F, Sinistro A, Ciaprini C, et al, Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol* 2006; 144: 188–196.
211. Racanelli V, Rehermann B, The liver as an immunological organ. *Hepatology* 2006 ;43: 54–62.
212. Hata K, Zhang XR, Iwatsuki S, Van Thiel DH, Herberman RB, Whiteside TL, Isolation, phenotyping, and functional analysis of lymphocytes from human liver. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 56: 401–419.
213. Smith F, Golden-Mason L, Deignan T, et al, Localization of T and B lymphocytes in histologically normal adult human donor liver. *Hepatology* 2003; 50: 1311–1315.
214. Krawitt EL, Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 2006; 354: 54–66.

215. Crispe IN, Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 51–62.
216. Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ, Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver, Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 1995; 96: 447–455.
217. Lau AH, Thomson AW, Dendritic cells and immune regulation in the liver. *Gut* 2003; 52: 307–314.
218. Knolle P, Schlaak J, Uhrig A, Kempf P, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G, Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol* 1995; 22: 226–229.
219. Rubinstein D, Roska AK, Lipsky PE, Liver sinusoidal lining cells express class II major histocompatibility antigens but are poor stimulators of fresh allogeneic T lymphocytes. *J Immunol* 1986; 137: 1803–1810.
220. Rubinstein D, Roska AK, Lipsky PE, Antigen presentation by liver sinusoidal lining cells after antigen exposure *in vivo*. *J Immunol* 1987; 138: 1377–1382.
221. Lohse AW, et al, Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* 1996; 110: 1175–1181.
222. Crispe IN, Liver antigen-presenting cells. *J Hepatol* 2011; 54: 357–365.
223. Maemura K, Zheng Q, Wada T, Ozaki M, Takao S, Aikou T, et al, Reactive oxygen species are essential mediators in antigen presentation by Kupffer cells. *Immunol Cell Biol* 2005; 83: 336–343.
224. You Q, Cheng L, Kedl RM, Ju C, Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology* 2008; 48: 978–990.
225. Briscoe DM, Henault LE, Geehan C, Alexander SI, Lichtman AH, Human endothelial cell costimulation of T cell IFN-production. *J Immunol* 1997; 159: 3247–3256.
226. Johnson DR, Hauser IA, Voll RE, Emmrich F, Arterial and venular endothelial cell costimulation of cytokine secretion by human T cell clones. *J Leukoc Biol* 1998; 63: 612–619.
227. Ma W, Pober JS, Human endothelial cells effectively costimulate cytokine production by, but not differentiation of, naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1998; 161: 2158–2167.
228. Perez VL, Henault L, Lichtman AH, Endothelial antigen presentation: stimulation of previously activated but not naïve TCR-transgenic mouse T cells. *Cell Immunol* 1998; 189: 31–40.
229. Knolle PA, Uhrig A, Hegenbarth S, et al, IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered

- surface expression of accessory molecules. *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 427–433.
230. Bosma BM, Metselaar HJ, Mancham S, et al, Characterization of human liver dendritic cells in liver grafts and perfusates. *Liver Transplant* 2006; 12: 384-393.
231. Kershenobich Stalnikowitz D, Weissbrod AB, Liver fibrosis and inflammation. A review. *Ann Hepatol* 2003; 2: 159-163.
232. Gutierrez-Ruiz C, Robles-Diaz G, Kershenobich D, Emerging concepts in inflammation and fibrosis. *Archives of medical research* 2002; 33: 595–599.
233. Canbay A, Feldstein A, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk S, Gores G, Kupffer Cell Engulfment of Apoptotic Bodies Stimulates Death Ligand and Cytokine Expression. *Hepatology* 2003; 35: 1188-1198.
234. Kojima Y, Suzuki S, Tsuchiya Y, Konno H, Baba S, Nakamura S, Regulation of pro- inflammatory and anti- inflammatory cytokine responses by kupffer cells in endotoxin- enhanced reperfusion injury after total hepatic ischemia. *Transpl Int* 2003;16: 231-240.
235. Sun Z, Wada T, Maemura K, Uchikura K, Hoshino S, Diehl AM, Klein AS, Hepatic allograft–derived Kupffer cells regulate T cell response in rats. *Liver Transpl* 2003; 9: 489–497.
236. Fischer R, Caries A, Reinehr R, Haussinger D, Caspase 9-dependent killing of hepatic stellate cells by activated Kupffer cells. *Gastroenterology* 2002; 123: 845
237. Adachi Y, Bradford BU, Gao W, Bojes HK, Thurman RG, Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* 1994; 20:453-460.
238. Jaechke H, Inflammation in response to hepatocellular apoptosis. *Hepatology* 2002; 35: 964-966.
239. Lawson JA, Fisher MA, Simmons CA, Farhood A, Jaeschke H, Parenchymal cell apoptosis as a signal for sinusoidal sequestration and transendothelial migration of neutrophils in murine models of endotoxin and Fas antibody induced liver injury. *Hepatology* 1998; 28: 761-767.
240. Maher JJ, Scott MK, Saito JM, Burton MC, Adenovirus mediated expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in rat liver induces a neutrophilic hepatitis. *Hepatology* 1997; 25: 624-630.
241. Canbay A, Higuchi H, Bronk SF, Taniai M, Sebo TJ, Gores GJ, Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology* 2002; 123: 1323-1330.
242. Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Feldstein A, Bronk SF, Rydzewski R, Taniai M, et al, Cathepsin B inactivation attenuates hepatic injury during cholestasis. *J Clin Invest* 2003; 112: 152-159.

243. Faouzi S, Burckhardt BE, Hanson JC, Campe CB, Schrum LW, Rippe RA, Maher JJ, Anti- Fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF- κ B-independent, caspase 3-dependent-pathway, *J Biol Chem*, 2001;276:49077-49082.
244. Kiener PA, Davis PM, Starling GC , Mehlin C, Klebanoff SJ, Ledbetter JA, Liles WC, Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages. *J Exp Med* 1997; 185: 1511-1516.
245. Geske FJ, Monks J, Lehman L, Fadok VA, The role of the macrophage in apoptosis: hunter, gatherer and regulator. *Int J Hematol* 2002; 76: 16-26.
246. Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ, Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 2003; 83: 655-663.
247. Jaeschke H, Neutrophil-mediated tissue injury in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 2002; 7: 23-27.
248. Jomantaite I, Dikopoulos N, Kroger A, et al, Hepatic dendritic cell subsets in the mouse. *Eur J Immunol* 2004; 34: 355–365.
249. Ekataksin W, Kaneda K, Liver macrovascular architecture: an insight into the pathophysiology of portal hypertension. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 359-382.
250. Greenwel P, Geerts A, Ogata I, Solis Herruzo JA, Rojkind M, Liver fibrosis. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jacoby WB, Schachter DA, Shafritz DS, eds. *The liver: Biology and pathobiology*. 3rd Ed. New York Raven, 1994; 1367-1381.
251. Friedman SL, Molecular mechanism of hepatic fibrosis and principles of therapy. *Gastroenterol* 1997; 32: 424-430.
252. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG, Matrix as modulator of stellate cell and hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001: 351–372.
253. Goodman ZD, Pathologic evaluation of fibrosis in Liver Disease in the 21st Century. Postgraduate course syllabus, AGA 2003.
254. Coons AH, et al, Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941; 47: 200-202.
255. Coons AH and Kaplan MH, Localization of antigen in tissue cells, Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Exp Med* 1950; 91: 1-13.
256. Weber K, et al, Specific visualization of tubulin-containing structures in tissue culture cells by immunofluorescence, Cytoplasmic microtubules, vinblastine-induced paracrystals, and mitotic figures. *Exp Cell Res* 1975; 95: 111-120.

257. Williams DG, Stocks MR, Charles PJ, Maini RN. Antibodies to La, Jo-1, nRNP and Sm detected by multi-track immunoblotting using a novel filter holder: a comparative study with counterimmunoelectrophoresis and immunodiffusion using sera from patients with systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *J Immunol Methods* 1986; 91: 65–73.
258. Burnette WN, "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Anal Biochem* 1981; 112: 195-203.
259. Towbin H, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; 4350-4354.
260. Towbin H, Gordon J, Immunoblotting and dot immunobinding-current status and outlook. *J Immunol Methods*, 72, 1984;313-340.
261. Butler JE, Enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunoassay* 2000; 21: 165–209.
262. Crowther JR, The ELISA guidebook, Springer Protocols, Methods in Molecular Biology, 2009, Humana Press, 2nd Edition.
263. Crowther JR, ELISA : Theory and Practice, 1995, Humana Press, Totowa, NJ.
264. Engvall E, Perlmann P, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 8: 871-874.
265. Kemeny DM, Challacombe SJ, ELISA and other Solid-Phase Immunoassays. Theoretical and Practical Aspects, 1988, Wiley, Chichester, UK.
266. Kemeny DM, Challacombe SJ, Advances in ELISA and other solid-phase immunoassays. *Immunol Today* 1986; 7-67.
267. Maggio T, The Enzyme Immunoassay, 1979, CRC, New York.
268. Νταλέκος ΓΝ, Αυτοαντισώματα και αυτοαντιγόνα σχετιζόμενα με την αυτοάνοση ηπατίτιδα και την επαγόμενη από ιούς ηπατιτίδων αυτοάνοση απόκριση : σημαντικά εργαλεία στην κλινική πράξη και στη μελέτη της παθογένειας των αυτοανόσων ηπατικών παθήσεων. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2004; 21: 502-527.
269. Zachou K, Rigopoulou EI, Dalekos GN, Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis : important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease, *J Autoimmune Dis* 2004; 15; 1(1):2.
270. Waldenstrom JVS, Blutproteine und Nahrungseiweiss. *Deutsch Z Verdau Stoffwechsellk* 1950; 15: 113–119.

271. Mackay IR, Taft LI, Cowling DC, Lupoid hepatitis. *Lancet* 1956; 271: 1323–1326.
272. Berdal JE, Ebbesen J, Rydning A, Incidence and prevalence of autoimmune liver diseases. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1998; 118: 4517–4519.
273. Czaja AJ, Autoimmune hepatitis, In: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH (eds) *Gastrointestinal and liver disease, Pathophysiology/diagnosis/management*, 6th ed. WB Saunders Co, Philadelphia, USA, 1998: 1265–1274.
274. Bobberg KM, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N, Stiris M, Bell M, Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a norwegian population. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 99–103.
275. Zachou K, Muratori P, Koukoulis GK, Granito A, Gatselis N, Fabbri A, Dalekos GN, Muratori L, Review article: autoimmune hepatitis -- current management and challenges. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 38: 887-913.
276. Obermayer-Straub P, Strassburg CP, Manns MP, Autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2000; 32: 181–197.
277. Dalekos GN, Zachou K, Makri E, Liaskos C, Pliaka A, Papadamou G et al, Autoimmune hepatitis type 1 (AIH-1) in Greece: clinical, laboratory and demographic characteristics. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 25.
278. Van Der Berg AP, Autoimmune hepatitis: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Scand J Gastroenterol* 1998; 225: 66–69.
279. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EI et al, International autoimmune hepatitis group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 929–938.
280. Mcfarlane IG, Definition and classification of autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2002; 22: 317–324.
281. Vergani D, Alvarez F, Bianchi FB, Cancado ELR, Mackay IR, Manns MP, Nishioka M, Penner E, Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *Journal of Hepatology* 2004; 41: 677–683.
282. Bogdanos DP, Invernizzi P, Mackay IR, Vergani D, Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3374-3387.
283. Bogdanos DP, Mieli-Vergani G, Vergani D, Autoantibodies and their antigens in autoimmune hepatitis, *Semin Liver Dis*, 2009; 29: 241-253.
284. Czaja AJ, Cassani F, Cataleta M, Valenti P, Bianchi FB, Frequency and significance of antibodies to actin in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1996; 24: 1068–1073.

285. Liaskos C, Bogdanos DP, Davies ET, Dalekos GN, Diagnostic relevance of anti-filamentous actin antibodies in autoimmune hepatitis. *J Clin Pathol* 2007; 60:107-108.
286. Czaja AJ, Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 30: 394–401.
287. Dalekos GN, Manoussakis MN, Zervou E, Tsianos EV, Moutsopoulos HM. Immunologic and viral markers in anti-HIV negative heroin addicts. *Eur J Clin Invest* 1993; 23: 219–225.
288. Dalekos GN, Manoussakis MN, Merkouropoulos MC, Tsianos EV, Autoimmunity and cellular immune activation before and after α -interferon administration in Greek patients with chronic viral hepatitis, A preliminary study. *Hell J Gastroenterol* 1993; 6: 166–171.
289. Cassani F, Cataleta M, Valentini P, Muratori P, Giostra F, Francesconi R et al, Serum autoantibodies in chronic hepatitis C: Comparison with autoimmune hepatitis and impact on disease profile. *Hepatology*, 1997; 26: 561–566.
290. Lenzi M, Bellentani S, Saccoccio G, Muratori P, Massutti F, Muratori L et al, Prevalence of non-organ-specific autoantibodies and chronic liver disease in the general population: A nested case-control study of the Dionysos cohort. *Gut* 1999; 45: 435–441.
291. Muratori P, Muratori L, Stroffolini T, Pappas G, Terlizzi P, Ferrari F et al, Prevalence of non-organ specific autoantibodies in HCV-infected subjects in the general population. *Clin Exp Immunol* 2003; 131: 118–121.
292. Massard J, Johanet C, Bedossa P, Poynard T, Buffet C, Dimartino V, Impact of hepatitis C-associated autoantibodies (AABs) on the liver pathology and the response to antiviral therapy (abstract). *J Hepatol* 2003; 38 (Suppl 2):155.
293. Gatselis NK, Georgiadou SP, Koukoulis GK, Tassopoulos N, Zachou K, Liaskos C, Hatzakis A, Dalekos GN, Clinical significance of organ- and non-organ-specific autoantibodies on the response to anti-viral treatment of patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24):1563-1573.
294. Gregorio GV, Choudhuri K, Ma Y, Pensati P, Iorio R, Grant P et al, Mimicry between the hepatitis C virus polyprotein and antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 2003; 133: 404–413.
295. Van Der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, Van Es LA et al, Autoantibodies against neutrophils and monocytes tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985; i:425–429.
296. Czaja AJ, Homburger HA, Autoantibodies in liver disease. *Gastroenterolgy* 2001; 120: 239–249.

297. Rooszendaal C, Kallenberg CGM, Anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies (ANCA) in autoimmune liver diseases. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 3034–3040.
298. Obermayer-Straub P, Strassburg CP, Manns MP, Autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2000; 32: 181–197.
299. Mulder AHL, Horst G, Haagsma EB, Limburg PC, Kleibeuker JH, Kallenberg GM, Prevalence and characterization of neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune liver diseases. *Hepatology* 1993; 17: 411–417.
300. Ohira H, Tojo J, Shinzawa J, Suzuki T, Miyata M, Nishimaki T et al, Antineutrophil cytoplasmic antibody in patients with antinuclear antibody-positive chronic hepatitis C. *Fukushima J Med Sci* 1998; 44:83–92.
301. Czaja AJ, Pfeifer KD, Decker RH, Vallari AS, Frequency and significance of antibodies to asialoglycoprotein receptor in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1733–1740.
302. Treichel U, Gerken G, Rossol S, Rotthauwe HW, Buschenfelde KH, Poralla AS, Autoantibodies against the human asialoglycoprotein receptor: Effects of therapy in autoimmune and virus induced chronic active hepatitis. *J Hepatol* 1993; 19: 55–63.
303. Rigopoulou EI, Roggenbuck D, Smyk DS, Liaskos C, Mytilinaiou MG, Feist E, Conrad K, Bogdanos DP, Asialoglycoprotein receptors (ASGPR) as target autoantigen in liver autoimmunity : lost and found. *Autoimmun Rev* 2012; 12 : 260-269.
304. Mcfarlane BM, Sipos J, Gove CD, Mcfarlane IG, Williams R, Antibodies against the hepatic asialoglycoprotein receptor perfused *in situ* preferentially attach to periportal liver cells in the rat. *Hepatology* 1990; 11: 408–415.
305. Mcfarlane IG, Pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Biomed Pharmacother*, 1999; 53: 255–263.
306. Manns M, Gerken G, Kyriatsoulis A, Staritz M, Meyer Zum Buschenfelde KH, Characterization of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against soluble liver antigen. *Lancet* 1987; i: 292–294.
307. Wachter B, Kyriatsoulis A, Lohse AW, Gerken G, Buschenfelde KH, Manns M, Characterization of liver cytokeratin as a major target antigen of anti-SLA antibodies. *J Hepatol* 1990; 11: 232–239.
308. Fabien N, Desbos A, Bienbenu J, Magdalou J, Autoantibodies directed against the UDP-glucuronotransferases in human autoimmune hepatitis. *Autoimmune Rev* 2004; 3: 1–9.
309. Ballot E, Homberg JC, Johanet C, Antibodies to soluble liver antigen: an additional marker in type 1 auto-immune hepatitis. *J Hepatol* 2000; 33: 208–215.

310. Volkman M, Martin L, Baeurle A, Heid H, Strassburg CP, Trautwein C 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: 591–596.
311. Costa M, Rodriguez-Sanchez JL, Czaja AJ, Gelpi C, 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.
312. Baeres M, Herkel J, Czaja AJ, Wies I, Kanzler S, Cancado EI et al, Establishment of standardised SLA/LP immunoassays: specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence and clinical characteristics. *Gut* 2002; 51: 259–264.
313. Ma Y, Okamoto M, Thomas MG, Bogdanos DP, Lopes AR, Portmann B et al, Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease. *Hepatology* 2002; 36: 658–664.
314. Stechemesser E, Klein R, Berg PA, Characterization and clinical relevance of liver-pancreas antibodies in autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1993; 18: 1–9.
315. Manns MP, Cytoplasmic autoantigens in autoimmune hepatitis: Molecular analysis and clinical relevance. *Semin Liver Dis* 1991; 11: 205–214.
316. Obermayer-Straub P, Strassburg CP, Manns MP, Targets proteins in human autoimmunity: Cytochromes P450 and UDP glucuronosyltransferases. *Can J Gastroenterol* 2000; 14: 429–439.
317. Rizzetto M, Swana G, Doniach D, Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. *Clin Exp Immunol* 1973; 15: 331–344.
318. Manns M, Johnson EF, Griffin KJ, Tan EM, Sullivan KF, The major target antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P450 db1, *J Clin Invest* 1989; 83: 1066–1072.
319. Bogdanos DP, Dalekos GN, Enzymes as target antigens of liver-specific autoimmunity : the case of cytochromes P450s. *Curr med Chem* 2008; 15 : 2285-2292.
320. Todros L, Saracco G, Durazzo M, Abbate MI, Touscoz G, Scaglione L et al, Efficacy and safety of interferon alpha therapy in chronic hepatitis C with autoantibodies to liver-kidney microsomes. *Hepatology* 1995; 22: 1374–1378.
321. Muratori L, Lenzi M, Cataleta M, Giostra F, Cassani F, Ballardini G et al, Interferon therapy in liver/kidney microsomal antibody type 1-positive patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1994; 21: 199–203.

322. Dalekos GN, Obermayer-Straub P, Bartels M, Maeda T, Kayser A, Braun S, Loges S, Schmidt E, Gershwin ME, Manns MP, Cytochrome P450 2A6 : a new hepatic autoantigen in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2003; 39: 800-806.
323. Beaune P, Dansette PM, Mansuy D, Kiffel L, Finck M, Amar C 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.
324. Strassburg CP, Obermayer-Straub P, Alex B, Durazzo M, Rizzetto M, Tukey RH et al, Autoantibodies against glucuronosyltransferases differ between viral hepatitis and autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1996; 111: 1582–1592.
325. Philipp T, Durazzo M, Trautwein C, Alex B, Straub P, Lamb JG et al, LKM-3 autoantibodies in chronic hepatitis D recognize the UDP-glucuronosyl-transferases. *Lancet* 1994; 344: 578–581.
326. Crivelli O, Lavarini C, Chiaberge E, Amoroso A, Farci P, Negro F et al, Microsomal autoantibodies in chronic infection with HBsAg associated delta (D) agent. *Clin Exp Immunol* 1983; 54: 232–238.
327. Lapierre P, Hajoui O, Homberg JC, Alvarez F, Forminotransferase cyclodeaminase is organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999;116: 643–649.
328. Abuaf N, Johanet C, Chretien P, et al, Characterization of the liver cytosol antigen type 1 reacting with autoantibodies in chronic active hepatitis. *Hepatology* 1992;16: 892–898.
329. Lenzi M, Manotti P, Muratori L, et al, Liver cytosolic 1 antigenantibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Gut* 1995; 36: 749–754.
330. Johnson PJ, McFarlane IG, Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993; 18: 998-1005.
331. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Pares A, Dalekos GN et al, Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008; 48:169-176.
332. Gatselis NK, Zachou K, Papamichalis P, Koukoulis GK, Gabeta S, Dalekos GN, Rigopoulou EI, Comparison of a simplified score with the revised original score for the diagnosis of autoimmune hepatitis : a new or a complementary diagnostic score?. *Dig Liver Dis* 2010 Nov; 42: 807-812.
333. Manns MP, Luttig B, Obermayer-Straub P, Autoimmune hepatitis, In: Rose NR, Mackay IR, eds. *The Autoimmune Diseases*, 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1998; 511–525.

334. Vergani D, Mieli-Vergani G, Autoimmune hepatitis. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 241–247.
335. Czaja AJ, Carpenter HA, Autoimmune hepatitis In: Macsween RNM, Burt AD, Portmann BC, eds. *Pathology of the Liver*, 4th ed, New York Churchill Livingstone, 2001; 415–434.
336. Bogdanos DP, Choudhuri K, Vergani D, Molecular mimicry and autoimmune liver disease: virtuous intentions, malign consequences. *Liver* 2001; 21:225-232.
337. Bjornsson E, Talwalkar J, Treeprasertsuk S, Kamath PS, Takahashi N, Sanderson S, et al, Drug-induced autoimmune hepatitis: clinical characteristics and prognosis. *Hepatology* 2010; 51: 2040-2048.
338. Rigopoulou EI, Dalekos GN, Autoimmune Hepatitis: of host and pathogen. *Hepatology* 2008; 47: 2147-2148.
339. Ebrahimkhani MR, Mohar I, Crispe IN, Cross-presentation of antigen by diverse subsets of murine liver cells. *Hepatology* 2011; 54: 1379-1387.
340. Ichiki Y, Aoki CA, Bowlus CL, Shimoda S, Ishibashi H, Gershwin ME, T cell immunity in autoimmune hepatitis. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 315-321.
341. Lobo-Yeo A, Senaldi G, Portmann B, Mowat AP, Mieli-Vergani G, Vergani D, Class I and class II major histocompatibility complex antigen expression on hepatocytes: a study in children with liver disease. *Hepatology* 1990; 12: 224-232.
342. Senaldi G, Lobo-Yeo A, Mowat AP, Mieli-Vergani G, Vergani D, Class I and class II major histocompatibility complex antigens on hepatocytes: importance of the method of detection and expression in histologically normal and diseased livers. *J Clin Pathol* 1991; 44: 107-114.
343. Zhao L, Tang Y, You Z, Wang Q, Liang S, Han X, et al, Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression. *PLoS One* 2011; 6: 189-109.
344. Harada K, Shimoda S, Sato Y, Isse K, Ikeda H, Nakanuma Y, Periductal interleukin-17 production in association with biliary innate immunity contributes to the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 2009; 157: 261-270.
345. Wen L, Peakman M, Mieli-Vergani G, Vergani D, Elevation of activated gamma delta T cell receptor bearing T lymphocytes in patients with autoimmune chronic liver disease. *Clin Exp Immunol* 1992; 89: 78-82.
346. Ferri S, Longhi MS, De Molo C, Lalanne C, Muratori P, Granito A, et al, A multifaceted imbalance of T cells with regulatory function characterizes type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 2010; 52: 999-1007.
347. Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D, Impairment of CD4CD25 regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol* 2004; 41: 31-37.

348. Longhi MS, Ma Y, Mitry RR, Bogdanos DP, Heneghan M, Cheeseman P, et al, Effect of CD4CD25regulatory T-cells on CD8 T-cell function in patients with autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2005; 25: 63-71.
349. Liberal R, Grant CR, Holder B, Ma Y, Mieli-Vergani G, Vergani D, et al, The impaired immune regulation of autoimmune hepatitis is linked to a defective Galectin-9/Tim-3 pathway. *Hepatology* 2012; 56: 677-686.
350. Peiseler M, Sebode M, Franke B, Wortmann F, Schwinge D, Quaas A, et al, FOXP3 regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *J Hepatol* 2012; 57: 125-132.
351. Vergani D, Mieli-Vergani G, Pharmacological management of autoimmune hepatitis. *Expert Opin Pharmacother* 2011; 12: 607-613.
352. Strassburg CP, Autoimmune hepatitis. *Dig Dis*. 2013; 31: 155-63.
353. Cook GC, Mulligan R, Sherlock S, Controlled prospective trial of corticosteroid therapy in active chronic hepatitis. *Q J Med* 1971; 40: 159-185.
354. Soloway RD, Summerskill WH, Baggenstoss AH, Geall MG, Gitnick GL, Elveback IR, et al, Clinical, biochemical, and histological remission of severe chronic active liver disease: a controlled study of treatments and early prognosis. *Gastroenterology* 1972; 63: 820-833.
355. Murray-Lyon IM, Stern RB, Williams R, Controlled trial of prednisone and azathioprine in active chronic hepatitis. *Lancet* 1973; 1: 735-737.
356. Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D, et al, Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010; 51: 2193-2130.
357. Johnson PJ, McFarlane IG, Williams R, Azathioprine for long-term maintenance of remission in autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 1995; 333: 958-963.
358. Van Thiel DH, Wright H, Carroll P, Abu-Elmagd K, Rodriguez-Rilo H, McMichael J, 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.
359. Fernandes NF, Redeker AG, Vierling JM, Villamil FG, Fong TL, Cyclosporine therapy in patients with steroid resistant autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 241-248.
360. Burak KW, Urbanski SJ, Swain MG, Successful treatment of refractory type 1 autoimmune hepatitis with methotrexate. *J Hepatol* 1998; 29: 990-993.
361. Kanzler S, Gerken G, Dienes HP, Meyer zum Buschenfelde KH, Lohse AW, Cyclophosphamide as alternative immunosuppressive therapy for autoimmune hepatitisereport of three cases. *Z Gastroenterol* 1997; 35: 571-578.

362. Barth E, Clawson J, A case of autoimmune hepatitis treated with rituximab. *Case Rep Gastroenterol* 2010; 4: 502-509.
363. Zachou K, Gatselis N, Papadamou G, Rigopoulou EI, Dalekos GN, Mycophenolate for the treatment of autoimmune hepatitis : prospective assessment of its efficacy and safety for induction and maintenance of remission in a large cohort of treatment-naïve patients. *J Hepatol* 2011; 55: 636-646.
364. Liberal R, Longhi MS, Grant CR, Mieli-Vergani G, Vergani D, Autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10: 346-353.
365. Kim WR, Lindor KD, Locke GR 3rd, et al, Epidemiology and natural history of primary biliary cirrhosis in a US community. *Gastroenterology* 2000; 119: 1631–1636.
366. Invernizzi P, Role of X chromosome defects in primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 2007; 3: 384-388.
367. 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.
368. Bergasa NV, Mehlman JK, Jones EA, Pruritus and fatigue in primary biliary cirrhosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000; 14: 643–655.
369. Terg R, Coronel E, Sorda J, Munoz AE, Findor J, Efficacy and safety of oral naltrexone treatment for pruritus of cholestasis, a crossover, double blind, placebo-controlled study. *J Hepatol* 2002; 37: 717–722.
370. Zein CO, Jorgensen RA, Clarke B, et al, Alendronate improves bone mineral density in primary biliary cirrhosis: a randomized placebocontrolled trial, *Hepatology*, 2005; 42:762–771.
371. Allocca M, Crosignani A, Gritti A, et al, Hypercholesterolaemia is not associated with early atherosclerotic lesions in primary biliary cirrhosis. *Gut* 2006; 55: 1795–1800.
372. Lanspa SJ, Chan AT, Bell JS 3rd, Go VL, Dickson ER, DiMagno EP, Pathogenesis of steatorrhea in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1985; 5: 837–842.
373. Phillips JR, Angulo P, Petterson T, Lindor KD, Fat-soluble vitamin levels in patients with primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2745–2750.
374. Lindor KD, Jorgensen RA, Therneau TM, Malinchoc M, Dickson ER, Ursodeoxycholic acid delays the onset of esophageal varices in primary biliary cirrhosis. *Mayo Clin Proc* 1997; 72: 1137–1140.

375. Gershwin ME, Selmi C, Worman HJ, et al, Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: a controlled interview-based study of 1032 patients. *Hepatology* 2005; 42: 1194–1202.
376. Findor J, He XS, Sord J, Terg R, Gershwin ME, Primary biliary cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Autoimmun Rev* 2002; 1: 220–225.
377. 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.
378. Liu H, Norman GL, Shums Z, Worman HJ, Krawitt EL, Bizzaro N, Vergani D, Bogdanos DP, Dalekos GN et al, PBC screen : an IgG/IgA dual isotype ELISA detecting multiple mitochondrial and nuclear autoantibodies specific for primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2010; 35: 436-442.
379. Gabeta S, Norman GL, Liaskos C, Papamichalis PA, Zografos T, Garagounis A, Rigopoulou EI, Dalekos GN, 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: 378-387.
380. Bogdanos DP, Komorowski L, Disease-specific autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Clin Chim Acta* 2011 18; 412: 502-512.
381. Granito A, Yang WH, Muratori L, Lim MJ, Nakajima A, Ferri S, Pappas G, Quarneti C, Bianchi FB, Bloch DB, Muratori P, PML nuclear body component Sp140 is a novel autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2010;105:125-131.
382. Invernizzi P, Selmi C, Ranftler C, Podda M, Wesierska-Gadek J, Antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis, *Semin Liver Dis* 2005; 25: 298–310.
383. Muratori P, Muratori L, Cassani F, Terlizzi P, Lenzi M, Rodrigo L, Bianchi FB, Anti-multiple nuclear dots (anti-MND) and anti-sp100 antibodies in hepatic and rheumatological disorders. *Clin Exp Immunol*, 2002; 127:172–175.
384. Worman HJ, Nuclear envelope protein autoantigens in PBC. *Hepatology Research* 2007; 37: 406–411.
385. Rigopoulou EI, Davies ET, Pares A, Zachou K, Liaskos C, Bogdanos DP, Rodes J, Dalekos GN, Vergani D, Prevalence and clinical significance of isotype specific antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Gut* 2005; 54: 528-532.
386. Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y et al, Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2005; 42: 386–392.

387. 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.
388. Bogdanos DP, Liaskos C, Pares A, Norman G, Rigopoulou EI, Caballeria L, Dalekos GN, Rodes J, Vergani D, Anti-gp210 antibody mirrors disease severity in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007; 45: 1583-1584.
389. Bernstein RM, Callender ME, Neuberger JM, Hughes GR, Williams R, Anticentromere antibody in primary biliary cirrhosis. *Ann Rheum Dis* 1982; 41: 612–614.
390. Tsuneyama K, Harada K, Kono N, et al, Scavenger cells with gram-positive bacterial lipoteichoic acid infiltrate around the damaged interlobular bile ducts of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2001; 35: 156–163.
391. Harada K, Ozaki S, Sudo Y, Tsuneyama K, Ohta H, Nakanuma Y, Osteopontin is involved in the formation of epithelioid granuloma and bile duct injury in primary biliary cirrhosis. *Pathol Int* 2003; 53: 8–17.
392. Goldstein NS, Soman A, Gordon SC, Portal tract eosinophils and hepatocyte cytokeratin 7 immunoreactivity helps distinguish early-stage, mildly active primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 846–853.
393. Neuberger J, Eosinophils and primary biliary cirrhosis-stoking the fire?. *Hepatology* 1999; 30: 335–337.
394. Gershwin ME, Ansari AA, Mackay IR, et al, Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells. *Immunol Rev* 2000; 174: 210–225.
395. 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.
396. Padgett KA, Selmi C, Kenny TP, et al, Phylogenetic and immunological definition of four lipoylated proteins from *Novosphingobium aromaticivorans*, implications for primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2005; 24: 209–219.
397. Smyk DS, Rigopoulou EI, Bogdanos DP, Potential Roles for Infectious Agents in the Pathophysiology of Primary Biliary Cirrhosis: What's New? *Curr Infect Dis Rep* 2013; 15: 14-24.
398. Bogdanos DP, Baum H, Vergani D, Burroughs AK, The role of *E. coli* infection in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Dis Markers* 2010; 29: 301-311.
399. Bogdanos DP, Vergani D, Bacteria and primary biliary cirrhosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009; 36: 30-39.

400. Lan RY, Cheng C, Lian ZX, et al, Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: 729–737.
401. Kaplan MM, Gershwin ME, Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med*, 2005; 353: 1261–1273.
402. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 2009; 51: 237–267.
403. Gluud C, Christensen E, Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2002; CD000551.
404. Leuschner M, Dietrich CF, You T, et al, Characterisation of patients with primary biliary cirrhosis responding to long term ursodeoxycholic acid treatment. *Gut* 2000; 46: 121–126.
405. Pares A, Caballeria L, Rodes J, Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 2006; 130: 715–720.
406. Talwalkar JA, Angulo P, Keach JC, Petz JL, Jorgensen RA, Lindor KD, 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.
407. Combes B, Emerson SS, Flye NL, et al, Methotrexate (MTX) plus ursodeoxycholic acid (UDCA) in the treatment of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2005; 42: 1184–1193.
408. Rautiainen H, Karkkainen P, Karvonen AL, et al, Budesonide combined with UDCA to improve liver histology in primary biliary cirrhosis: a three-year randomized trial. *Hepatology* 2005; 41: 747–752.
409. Reddy A, Prince M, James OF, Jain S, Bassendine MF, Tamoxifen: a novel treatment for primary biliary cirrhosis?. *Liver Int* 2004; 24: 194–197
410. Invernizzi P, Alvaro D, Crosignani A, Gaudio E, Podda M, Tamoxifen in treatment of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2004; 39: 1175–1176.
411. Czul F, Peyton A, Levy C, Primary biliary cirrhosis : therapeutic advances. *Clin Liver Dis* 2013; 17: 229-242.
412. Lee YM, Kaplan MM, Primary sclerosing cholangitis. *N Engl J Med* 1995; 332: 924-933.
413. Chapman RWG, Arborgh BA, Rhodes JM, et al, Primary sclerosing cholangitis: a review of its clinical features, cholangiography and hepatic histology. *Gut* 1980; 21: 870-877.
414. LaRusso NF, Wiesner RH, Ludwig J, MacCarty RL, Primary sclerosing cholangitis. *N Engl J Med* 1984; 310: 899-903.

415. Lindor KD, Wiesner RH, LaRusso NF, Recent advances in the management of primary sclerosing cholangitis. *Semin Liver Dis* 1987; 7: 322-327.
416. MacCarty RI, LaRusso NF, Wiesner RH, Ludwig J, Primary sclerosing cholangitis: findings on cholangiography and pancreatography. *Radiology* 1983; 149: 39-44.
417. Chen LY, Goldberg HI, Sclerosing cholangitis: broad spectrum of radiographic features. *Gastrointest Radiol* 1984; 9: 39-47.
418. Wiesner RH, Grambsch P, LaRusso NF, Dickson ER, Is primary sclerosing cholangitis a progressive disease or not?. *Hepatology* 1988; 8: 970-972.
419. Porayko MK, Wiesner RH, LaRusso NF, et al, Patients with asymptomatic primary sclerosing cholangitis frequently have progressive disease. *Gastroenterology* 1990; 98: 1594-1602.
420. Sivak MV Jr, Farmer RG, Lalli AF, Sclerosing cholangitis: its increasing frequency of recognition and association with inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 1981; 3: 261-266.
421. Kaplan MM, Medical approaches to primary sclerosing cholangitis. *Semin Liver Dis* 1991; 11: 56-63.
422. Wiesner RH, Porayko MK, LaRusso NF, Ludwig J, Primary sclerosing cholangitis, In: Schiff L, Schiff ER, eds. *Diseases of the liver*. 7th ed. Vol. 1. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1993; 411-426.
423. 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.
424. Wee A, Ludwig J, Pericholangitis in chronic ulcerative colitis: primary sclerosing cholangitis of the small bile ducts? *Ann Intern Med* 1985; 102: 581-587.
425. Ludwig J, LaRusso NF, Wiesner RH, Primary sclerosing cholangitis. In: Peters RL, Craig JR, eds. *Contemporary issues in surgical pathology: liver pathology*, New York: Churchill Livingstone, 1986.
426. Eddleston AL, Williams R, HLA and liver disease. *Br Med Bull* 1978; 34:295-300.
427. Prochazka EJ, Terasaki PI, Park MS, Goldstein LI, Busuttil RW, Association of primary sclerosing cholangitis with HLA-DRw52a. *N Engl J Med* 1990; 322: 1842-1844.
428. Mehal WZ, Lo YM, Wordsworth BP, et al, HLA DR4 is a marker for rapid disease progression in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*, 1994; 106: 160-167.

429. Lindor KD, Wiesner RH, Katzmann JA, LaRusso NF, Beaver SJ, Lymphocyte subsets in primary sclerosing cholangitis. *Dig Dis Sci* 1987; 32: 720-725.
430. Snook JA, Chapman RW, Sachdev GK, et al, Peripheral blood and portal tract lymphocyte populations in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 1989; 9: 36-41.
431. Whiteside TL, Lasky S, Si L, Van Thiel DH, Immunologic analysis of mononuclear cells in liver tissues and blood of patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 1985; 5: 468-474.
432. Lindor KD, Wiesner RH, LaRusso NF, Homburger HA, Enhanced autoreactivity of T-lymphocytes in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 1987; 7: 884-888.
433. Chazouilleres O, Poupon R, Capron JP, et al, Ursodeoxycholic acid for primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 1990; 11: 120-123.
434. O'Brien CB, Senior JR, Arora-Mirchandani R, Batta AK, Salen G, Ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis: a 30-month pilot study. *Hepatology* 1991; 14: 838-847.
435. Podda M, Ghezzi C, Battezzati PM, et al, Effect of different doses of ursodeoxycholic acid in chronic liver disease. *Dig Dis Sci*,1989; 34: 59-65.
436. Hayashi H, Higuchi T, Ichimiya H, Hishida N, Sakamoto N, Asymptomatic primary sclerosing cholangitis treated with ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 1990; 99: 533-535.
437. Tabibian JH, Lindor KD, Primary sclerosing cholangitis: a review and update on therapeutic developments. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 7:103-114.
438. Trauner M, Halilbasic E, Baghdasaryan A, Moustafa T, Krones E, Fickert P, Hofer H, Penner E, Primary sclerosing cholangitis: new approaches to diagnosis, surveillance and treatment. *Dig Dis* 2012; 30: 39-47.
439. Boberg KM, Chapman RW, Hirschfield GM, Lohse AW, Manns MP, Schrupf E; International Autoimmune Hepatitis Group. Overlap syndromes: the International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) position statement on a controversial issue. *J Hepatol* 2011; 54: 374-385.
440. Dienes HP, Erberich H, Dries V, Schirmacher P, Lohse A, Autoimmune hepatitis and overlap syndromes. *Clin Liver Dis* 2002; 6: 349-362.
441. Trivedi PJ, Hirschfield GM, Review article: overlap syndromes and autoimmune liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36: 517-533.
442. Chazouilleres O, Diagnosis of primary sclerosing cholangitis - autoimmune hepatitis overlap syndrome: to score or not to score? *J of Hepatol* 2000; 33: 661-663.

443. Gohlke F, Lohse AW, Dienes HP, Lohr H, Marker-Hermann E, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde KH, Evidence for an overlap syndrome of autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis, *J of Hepatol* 1996; 24: 699-705.
444. Mieli-Vergani G, Vergani D, Unique features of primary sclerosing cholangitis in children. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26: 265-268.
445. Oikonomou KG, Zachou K, Dalekos GN, Alpha-actinin: a multidisciplinary protein with important role in B-cell driven autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2011; 10: 389-396.
446. Sjöblom B, Salmazo A, Djinović-Carugo K, Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 2688–2701.
447. Otey CA, Carpen O, Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton* 2004; 58: 104–111.
448. Millake DB, Blanchard AD, Patel B, Critchley DR, The cDNA sequence of a human placental α -actinin. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 6725.
449. Beggs AH, Byers TJ, Knoll JHM, Boyce FM, Bruns GAP, Kunkel LM, Cloning and characterization of two human skeletal muscle α -actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *J Biol Chem* 1992; 267: 9281–9288.
450. Honda K, Yamada T, Endo R, Ino Y, Gotoh M, Tsuda H, et al, Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol* 1998; 140: 1383–1393.
451. Otey CA, Vasquez GB, Burrige K, Erickson BW, Mapping of the alpha-actinin binding site within the beta 1 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 1993; 268: 21193–21197.
452. Rajfur Z, Roy P, Otey C, Romer L, Jacobson K, Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with EGFP fusion proteins. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 286–293.
453. Dwir O, Kansas GS, Alon R, Cytoplasmic anchorage of L-selectin controls leucocyte capture and rolling by increasing themechanical stability of the selectin tether. *J Cell Biol* 2001; 155: 145–156.
454. Harazaki M, Kawai Y, Su L, Hamazaki Y, Nakahata T, Minato N, Hattori M, Specific recruitment of SPA-1 to the immunological synapse: involvement of actin bundling protein actinin. *Immunol Lett* 2004; 92: 221–226.
455. Mostoslavsky G, Fischel R, Yachimovich N, Yarkoni Y, Rosenmann E, Monestier M, et al, Lupus anti-DNA autoantibodies cross-react with a glomerular structural protein: a case for tissue injury by molecular mimicry. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1221–1227.
456. Deocharan B, Qing X, Lichauco J, Putterman C, Alpha-actinin is a cross-reactive renal target for pathogenic anti-DNA antibodies. *J Immunol* 2002; 168: 3072–3078.

457. Mageed RA, Zack DJ, Cross-reactivity and pathogenicity of anti-DNA autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2002; 11: 783–786.
458. Deocharan B, Qing X, Beger E, Putterman C, Antigenic triggers and molecular targets for anti-double-stranded DNA antibodies. *Lupus* 2002; 11: 865–871.
459. Mason LJ, Ravirajan CT, Rahman A, Putterman C, Isenberg DA, Is alpha-actinin a target for pathogenic anti-DNA antibodies in lupus nephritis? *Arthritis Rheum* 2004; 50: 866–870.
460. Zhao Z, Weinstein E, Tuzova M, Davidson A, Mundel P, Marambio P, Putterman C, Cross-reactivity of human lupus anti-DNA antibodies with alpha-actinin and nephritogenic potential. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 522–530.
461. Renaudineau Y, Croquefer S, Jousse S, Renaudineau E, Devauchelle V, Gueguen P, et al, Association of alpha-actinin-binding anti-double-stranded DNA antibodies with lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2523–2532.
462. Zhao Z, Deocharan B, Scherer PE, Ozelius LJ, Putterman C, Differential binding of cross-reactive anti-DNA antibodies to mesangial cells: the role of alpha-actinin. *J Immunol* 2006; 176: 7704–7714.
463. Becker-Merok A, Kalaaji M, Haugbro K, Nikolaisen C, Nilsen K, Rekvig OP, Nossent JC, Alpha-actinin-binding antibodies in relation to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: (6): R162.
464. Deocharan B, Zhou Z, Antar K, Siconolfi-Baez L, Angeletti RH, Hardin J, Putterman C, Alpha-actinin immunization elicits anti-chromatin autoimmunity in nonautoimmune mice. *J Immunol* 2007; 179: 1313–1321.
465. Renaudineau Y, Deocharan B, Jousse S, Renaudineau E, Putterman C, Youinou P, Anti-alpha-actinin antibodies: a new marker of lupus nephritis. *Autoimmun Rev* 2007; 6: 464–468.
466. Zhang WH, Pan HF, Zhao XF, Ye DQ, Li XP, Xu JH, Anti-alpha-actinin antibodies in relation to new-onset systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Mol Biol Rep* 2010; 37: 1341–1345.
467. Gueguen P, Dalekos G, Nouisbaum JB, Zachou K, Putterman C, Youinou P, Renaudineau Y, Double reactivity against actin and alpha-actinin defines a severe form of autoimmune hepatitis type 1. *J Clin Immunol* 2006; 26: 495–505.
468. Renaudineau Y, Dalekos GN, Gueguen P, Zachou K, Youinou P, Anti-alpha actinin antibodies cross-react with anti-ssDNA antibodies in active autoimmune hepatitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008; 34: 321–325.

469. Ylanne J, Scheffzek K, Young P, Saraste M, Crystal structure of the alpha-actinin rod reveals an extensive torsional twist. *Structure* 2001; 9: 597–604.
470. Broderick MJF, Winder SJ, Towards a complete atomic structure of spectrin family proteins. *J Struct Biol* 2002; 137: 184–193.
471. Djinovic-Carugo K, Young P, Gautel M, Saraste M, Structure of the alpha-actinin rod: molecular basis for cross-linking of actin filaments. *Cell* 1999; 98: 537–546.
472. Franzot G, Sjoblom B, Gautel M, Djinovic Carugo K, The crystal structure of the actin binding domain from alpha-actinin in its closed conformation: structural insight into phospholipid regulation of alpha-actinin. *J Mol Biol* 2005; 348: 151–165.
473. Tang J, Taylor DW, Taylor KA, The three-dimensional structure of alpha-actinin obtained by cryoelectron microscopy suggests a model for Ca (2+)-dependent actin binding. *J Mol Biol* 2001; 310: 845–858.
474. McGough A, Way M, DeRosier D, Determination of the alpha-actinin-binding site on actin filaments by cryoelectron microscopy and image analysis. *J Cell Biol* 1994; 126: 433–443.
475. Mills M, Yang N, Weinberger R, Vander Woude DL, Beggs AH, Eastal S, North K, Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1335–1346.
476. Luther PK, The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signaling. *J Muscle Res Cell Motil* 2009; 30: 171–185.
477. North KN, Beggs AH. Deficiency of a skeletal muscle isoform alpha-actinin (α -actinin-3) in merosin-positive congenital muscular dystrophy. *Neuromusc Disord* 1996; 6: 229–235.
478. Chan Y, Tong HQ, Beggs AH, Kunkel LM. Human skeletal muscle-specific α -actinin-2 and -3 isoforms form homodimers and heterodimers in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 134–139.
479. von Nandelstadh P, Ismail M, Gardin C, Suila H, Zara I, Belgrano A, et al, A class III PDZ binding motif in the myotilin and FATZ families binds enigma family proteins: a common link for Z-disc myopathies. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 822–834.
480. Pappas CT, Bhattacharya N, Cooper JA, Gregorio CC, Nebulin interacts with CapZ and regulates thin filament architecture within the Z-disc. *Mol Biol Cell* 2008; 19: 1837–1847.
481. Ilkovski B, Investigations into the pathobiology of thin-filament myopathies. *Adv Exp Med Biol* 2008; 642: 55–65.
482. Chiu C, Bagnall RD, Ingles J, Yeates L, Kennerson M, Donald JA, et al, Mutations in alpha-actinin-2 cause hypertrophic cardiomyopathy: a genome-wide analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 1127–1135.

483. Mohapatra B, Jimenez S, Lin JH, Bowles KR, Coveler KJ, Marx JG, et al, Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. *Mol Genet Metab* 2003; 80: 207–215.
484. Borbely A, Toth A, Edes I, Virag L, Papp JG, Varro A, et al, Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovasc Res* 2005; 67: 225–233.
485. North KN, Yang N, Wattanasirichaigoon D, Mills M, Eastal S, Beggs AH, A common nonsense mutation results in α -actinin-3 deficiency in the general population. *Nat Genet* 1999; 21: 353–354.
486. Wyszynski M, Lin J, Rao A, Nigh E, Beggs AH, Craig AM, Sheng M, Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature* 1997; 385: 439–442.
487. Krupp JJ, Vissel B, Thomas CG, Heinemann SF, Westbrook GL, Interactions of calmodulin and alpha-actinin with the NR1 subunit modulate Ca^{2+} dependent inactivation of NMDA receptors. *J Neurosci* 1999; 19: 1165–1178.
488. Michailidis IE, Helton TD, Petrou VI, Mirshahi T, Ehlers MD, Logothetis DE, Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate regulates NMDA receptor activity through α -actinin. *J Neurosci* 2007; 27: 5523–5532.
489. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF, The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 7–61.
490. Kowal C, Degiorgio LA, Lee JY, Edgar MA, Huerta PT, Volpe BT, et al, Human lupus autoantibodies against NMDA receptors mediate cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 19854–19859.
491. Wehland J, Osborn M, Weber K. Cell to substratum contacts in living cells, A direct correlation between interference reflection and indirect immunofluorescence microscopy using antibodies against actin and α -actinin. *J Cell Sci* 1979; 37: 257–273.
492. Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ, Interaction of α -actinin with the cadherin/catenin cell–cell adhesion complex via α -catenin. *J Cell Biol* 1995; 130: 67–77.
493. Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, et al, Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000; 24: 251–256.
494. Smoyer WE, Mundel P, Gupta A, Welsh MJ, Podocyte α -actinin induction precedes foot process effacement in experimental nephritic syndrome. *Am J Physiol* 1997; 273:150–157.
495. Kos CH, Le TC, Sinha S, Henderson JM, Kim SH, Sugimoto H, Kalluri R, et al, Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease. *J Clin Invest* 2003; 111: 1683–1690.

496. Michaud JL, Lemieux LI, Dube M, Vanderhyden BC, Robertson SJ, Kennedy CR, Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant alpha-actinin-4. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1200–1211.
497. Guan N, Ding J, Zhang J, Yang J, Expression of nephrin, podocin, alpha-actinin, and WT1 in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2003; 18: 1122–1127.
498. Yang C, Glass WF, Expression of α -actinin-1 in human glomerular mesangial cells in vivo and in vitro. *Exp Biol Med* 2008; 233: 689–693.
499. Li Q, Montalbetti N, Shen PY, Dai XQ, Cheeseman CI, Karpinski G, et al, α -Actinin associates with polycystin-2 and regulates its channel activity. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1587–1603.
500. Inada M, Benten D, Cheng K, Joseph B, Berishvili E, Badve S, et al, Stage-specific regulation of adhesion molecule expression segregates epithelial stem/progenitor cells in fetal and adult human livers. *Hepatol Int* 2008; 2: 50–62.
501. Tsukada N, Ackerley CA, Phillips MJ, The structure and organization of the bile canalicular cytoskeleton with special reference to actin and actin-binding proteins. *Hepatology* 1995; 21: 1106–1113
502. Beuers U, Crosstalk of liver, bile ducts and the gut. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009; 36: 1–3.
503. Sansonno L, Tucci FA, Sansonno S, Lauletta G, Troiani L, Sansonno D, B cells and HCV: an infection model of autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2009; 9: 93–94.
504. Lan S, Wang H, Jiang H, Mao H, Liu X, Zhang X, et al, Direct interaction between alpha-actinin and hepatitis C virus NS5B. *FEBS Lett* 2003; 554:289-294.
505. Gluck U, Ben-Ze'ev A, Modulation of alpha-actinin levels affects cell motility and confers tumorigenicity on 3T3 cells. *J Cell Sci* 1994; 107: 1773–1782.
506. Le Clainche C, Carlier M-F, Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev* 2008; 88: 489–513.
507. Guvakova MA, Adams JC, Boettiger D, Functional role of alpha-actinin, PI 3-kinase and MEK1/2 in insulin-like growth factor I receptor kinase regulated motility of human breast carcinoma cells. *J Cell Sci* 2002; 115: 4149–4165.
508. Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, Onozato K, Takano M, Tamai S, et al, Actinin-4 gene amplification in ovarian cancer: a candidate oncogene associated with poor patient prognosis and tumor chemoresistance. *Mod Pathol* 2009; 22: 499–507.

509. Kikuchi S, Honda K, Tsuda H, Hiraoka N, Imoto I, Kosuge T, et al, Expression and gene amplification of actinin-4 in invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5348–5356.
510. Menez J, Le Maux Chansac B, Dorothée G, Vergnon I, Jalil A, Carlier MF, et al, Mutant alpha-actinin-4 promotes tumorigenicity and regulates cell motility of a human lung carcinoma. *Oncogene* 2004; 23: 2630–2639.
511. Quick Q, Skalli O, Alpha-actinin 1 and alpha-actinin 4: contrasting roles in the survival, motility, and RhoA signaling of astrocytoma cells. *Exp Cell Res* 2010; 316: 1137–1147.
512. Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C, Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 1988; 4: 487–525.
513. Evans SS, Schleider DM, Bowman LA, Francis ML, Kansas GS, Black JD, Dynamic association of L-selectin with the lymphocyte cytoskeletal matrix. *J Immunol* 1999; 162: 3615–3624.
514. Celli L, Ryckewaert JJ, Delachanal E, Duperray A, Evidence of a functional role for interaction between ICAM-1 and nonmuscle alpha-actinins in leukocyte diapedesis. *J Immunol* 2006; 177: 4113–4121.
515. Stanley P, Smith A, McDowall A, Nicol A, Zicha D, Hogg N, Intermediate-affinity LFA-1 binds α -actinin-1 to control migration at the leading edge of the T cell. *EMBO J* 2006; 27: 62–75.
516. Harazaki M, Kawai Y, Su L, Hamazaki Y, Nakahata T, Minato N, Specific recruitment of SPA-1 to the immunological synapse: involvement of actin-bundling protein actinin. *Immunol Lett* 2004; 92: 221–226.
517. Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y, Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum* 2004; 34: 501–537.
518. Lipsky PE, Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol* 2001; 2: 764–766.
519. Hahn BH, Antibodies to DNA. *N Engl J Med* 1998; 338: 1359–1368.
520. Chan OT, Madaio MP, Shlomchik MJ, The central and multiple roles of B-cells in lupus pathogenesis. *Immunol Rev* 1999; 169: 107–121.
521. Migliorini P, Pratesi F, Bongiorno F, Moscato S, Scavuzzo M, Bombardieri S, The targets of nephritogenic antibodies in systemic autoimmune disorders. *Autoimmun Rev* 2002; 1: 168–173.
522. Shoenfeld Y, The idiotypic network in autoimmunity: antibodies that bind antibodies that bind antibodies. *Nat Med* 2004; 10: 17–18.
523. Kalaaji M, Sturfelt G, Mjelle JE, Nossent H, Rekvig OP, Critical comparative analyses of anti-alpha-actinin and glomerulus-bound

- antibodies in human and murine lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 914–926.
524. Manson JJ, Ma A, Rogers P, Mason LJ, Berden JH, van der Vlag J, et al, Relationship between anti-dsDNA, anti-nucleosome and anti-alpha-actinin antibodies and markers of renal disease in patients with lupus nephritis: a prospective longitudinal study. *Arthr Res Ther* 2009; 11:R154.
525. Jesaitis AJ, Gizachew D, Dratz EA, Siemsen DW, Stone KC, Burrit JB, Actin surface structure revealed by antibody imprints: evaluation of phage-display analysis of anti-actin antibodies. *Protein Sci* 1999; 8: 760–770.
526. Zamanou A, Samiotaki M, Panayotou G, Margaritis L, Lymberi P, Fine specificity and subclasses of IgG anti-actin autoantibodies differ in health and disease. *J Autoimmun* 2003; 20: 333–344.
527. McGough A, Way M, DeRosier D, Determination of the alpha-actinin-binding site on actin filaments by cryoelectron microscopy and image analysis. *J Cell Biol* 1994; 126: 433–443.
528. Zachou K, Renaudineau Y, Chauveau A, Youinou P, Dalekos GN, Anti-alphaactin in antibodies are independent predictors of response to treatment in autoimmune hepatitis type 1. *J Hepatol* 2010; 52: 422–423.
529. Ichiki Y, Aoki CA, Bowlus CL, Shimoda S, Ishibashi H, Gershwin ME, T cell immunity in autoimmune hepatitis. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 315–321.
530. Costa M, Rodriguez-Sanchez JL, Czaja AJ, Gelpi C, 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.
531. Volkmann M, Martin L, Bäurle A, Heid H, Strassburg CP, Trautwein C, 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: 591–596
532. Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D, Vierling JM; American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010; 51: 2193-213.
533. 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: 413-9.
534. Donaldson PT, Czaja AJ, Genetic effects on susceptibility, clinical expression, and treatment outcome of type 1 autoimmune hepatitis. *Clin Liver Dis* 2002; 6: 707-25.

535. Treichel U, McFarlane BM, Seki T, Krawitt EL, Alessi N, Stickel F, McFarlane IG, Kiyosawa K, Furuta S, Freni MA, et al. Demographics of anti-asialoglycoprotein receptor autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1994; 107: 799-804.
536. Muratori L, Cataleta M, Muratori P, Lenzi M, Bianchi FB. Liver/kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2 autoimmune hepatitis. *Gut*. 1998; 42: 721-6.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η α-ακτινίνη είναι μία πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού, η οποία ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών που προσδένονται στην f-ακτίνη (FA). Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερις ισομορφές της α-ακτινίνης στον άνθρωπο : οι «μυϊκές» α-ακτινίνη-2 και -3 και οι «μη μυϊκές» α-ακτινίνη-1 και -4. Οι ακριβείς λειτουργίες των ισομορφών της α-ακτινίνης δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί μέχρι σήμερα, εντούτοις φαίνεται ότι το μόριο αυτό επιτελεί σημαντικό ρόλο στην παθογένεια αυτοανόσων νοσημάτων, όπως ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (Σ.Ε.Λ.) και η Αυτοάνοση Ηπατίτιδα (ΑΗ). Ιδιαίτερα στην ΑΗ-τύπου 1 (ΑΗ-1), μελέτες έχουν δείξει ότι ο συνδυασμός αντισωμάτων έναντι της FA (AFA) και έναντι της α-ακτινίνης είναι ειδικός για τη διάγνωση της ΑΗ-1.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί εάν τα αντισώματα έναντι της α-ακτινίνης και τα AFA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ανταπόκρισης στην ανοσοκατασταλτική θεραπεία και ως δείκτες πρόβλεψης των υποτροπών σε μία μεγάλη σειρά ασθενών με ΑΗ-1.

Μεθοδολογία: Αναλυτικά, 764 διαδοχικά δείγματα 86 ασθενών με ΑΗ-1, 509 «παθολογικών» και 110 υγιών μαρτύρων εξετάστηκαν για την παρουσία AFA με εμπορικά διαθέσιμη ELISA, καθώς και αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης με *in house* ELISA που αναπτύχθηκε και προτυποποιήθηκε στο εργαστήριο. Οι οροί των ασθενών χωρίστηκαν στις ακόλουθες ομάδες: Ομάδα Baseline = ενεργός νόσος προ έναρξης θεραπείας, n=86 ασθενείς, ομάδα A = Responders – ασθενείς που εμφάνισαν πλήρη ανταπόκριση στην

ανοσοκατασταλτική αγωγή (n = 40 ασθενείς), Ομάδα Β = Relapsers/incomplete responders – ασθενείς που εμφάνισαν είτε τουλάχιστον μία υποτροπή μετά από πλήρη ανταπόκριση στη θεραπεία (relapsers, n=23 ασθενείς) ή εμφάνισαν υποτροπή μετά τη διακοπή της θεραπείας (n=5) ή εμφάνισαν μερική ανταπόκριση (n=9 ασθενείς που δεν πληρούσαν τα κριτήρια πλήρους ανταπόκρισης (σύνολο 37 ασθενείς), Ομάδα Γ = ασθενείς που δεν έλαβαν θεραπεία (n=9 ασθενείς).

Αποτελέσματα: Τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης και των AFA ήταν σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα baseline. Η διπλή αντιδραστικότητα έναντι της α-ακτινίνης και της f-ακτινίνης συσχετίστηκε με ενεργότητα της νόσου (OR 4,9; 95% CI : 2,7-9). Οι τιμές της οπτικής πυκνότητας των αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης παρουσίασαν σημαντική μείωση στην πρώτη παρατηρούμενη ύφεση (p<0,05). Η ανταπόκριση στη θεραπεία συσχετίστηκε με απουσία αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης προ έναρξης αγωγής (OR 3,4; 95% CI : 1,3-8,9) και απουσία αντισωμάτων έναντι α-ακτινίνης και AFA προ έναρξης θεραπείας (OR 3,8; 95% CI : 1,4-10,4). Οι ασθενείς που εμφάνισαν πλήρη ανταπόκριση στην ανοσοκατασταλτική αγωγή εμφάνιζαν χαμηλότερα επίπεδα αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης σε σχέση με ασθενείς που εμφάνισαν είτε τουλάχιστον μία υποτροπή μετά από πλήρη ανταπόκριση στη θεραπεία ή εμφάνισαν υποτροπή μετά τη διακοπή της θεραπείας ή εμφάνισαν μερική ανταπόκριση (p=0,002). Η δυαδική λογιστική παλινδρόμηση (binary logistic regression) ανέδειξε ότι τα επίπεδα των αντισωμάτων κατά της α-ακτινίνης είναι ο μόνος προγνωστικός παράγοντας ανταπόκρισης στη θεραπεία (p=0,05).

Συμπεράσματα: Τα επίπεδα αντισωμάτων έναντι της α-ακτινίνης πριν από την έναρξη θεραπείας φαίνεται ότι αποτελούν προγνωστικό παράγοντα ανταπόκρισης στην ανοσοκατασταλτική αγωγή και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες παρακολούθησης του θεραπευτικού αποτελέσματος στην AH-1.

Summary

Alpha-actinin (α -actinin) is a ubiquitous cytoskeletal protein, which belongs to the superfamily of f-actin (FA) crosslinking proteins. Four isoforms of human α -actinin have already been identified namely, the “muscles” α -actinin-2 and α -actinin-3 and the “non-muscles” α -actinin-1 and α -actinin-4. The precise functions of α -actinin isoforms have been elusive. It seems that α -actinin plays a crucial role in pathogenesis of autoimmune diseases, particularly systemic lupus erythematosus (SLE) and autoimmune hepatitis (AH). Previous studies have shown that combined presence of autoantibodies against FA (AFA) and α -actinin are specific for AH-type 1 (AH-1) diagnosis.

Aim of the study: To assess whether anti- α -actinin antibodies and AFA could be used as indicators of response to treatment and predictors of AH-1 flares in a large cohort of AIH-1 patients.

Methods: Seven hundred and sixty-four serial serum samples of 86 consecutive AIH-1 patients, 509 pathological and 110 normal controls were tested for the presence of anti- α -actinin antibodies and AFA by an in-house IgG-specific ELISA and a standardised commercially available ELISA

respectively. Patients sera were divided into baseline group (active disease before treatment initiation, n = 86) and then according to treatment response into group A-responders (n = 40 patients), group B-relapsers / incomplete responders (n = 37 patients) and group C-not-treated (n = 9 patients).

Results: Anti-a-actinin and AFA levels were significantly higher at baseline. Double reactivity against a-actinin and AFA was associated with disease activity (OR 4.9; 95% CI: 2.7–9). Anti-a-actinin optical densities (ODs) before treatment decreased significantly at first remission ($p < 0.05$). Treatment response was associated with anti-a-actinin antibodies negativity before treatment (OR 3.4; 95% CI: 1.3–8.9) and absence of double positivity for anti-a-actinin antibodies and AFA before treatment (OR 3.8; 95% CI: 1.4–10.4). Responders had lower baseline levels of anti-a-actinin than relapsers and/or incomplete responders ($p = 0.002$). Binary logistic regression revealed lower levels of anti-a-actinin as the only independent predictors of response ($p = 0.05$).

Conclusions: Anti-a-actinin antibodies at baseline appear to predict treatment response and therefore they might be used for monitoring treatment outcome in AH-1.

