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

Καλλιόπη Β. Ζάχου
Ιατρός Παθολόγος

Διδακτορική Διατριβή που υποβλήθηκε στο Ιατρικό Τμήμα
tου Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Λάρισα 2003
ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ ΜΙΚΡΟΣΩΜΙΩΝ ΗΠΑΤΟΣ-ΝΕΦΡΩΝ (ANTI-LKM) ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΜΗ-ΟΡΓΑΝΟΕΙΔΙΚΩΝ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C

Καλλιόπη Β. Ζάχου
Ιατρός Παθολόγος

Διδακτορική Διατριβή που υποβλήθηκε στο Ιατρικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Λάρισα 2003
Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή
Σταθάκης Νικόλαος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Νταλέκος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Τσικρίκας Θωμάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή
Σταθάκης Νικόλαος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Κουκούλης Γεώργιος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Μελέκος Μιχαήλ, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Μολυβδάς Πασχάλης Αδάμ, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Νταλέκος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Τσικρίκας Θωμάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Γουργουλιάνης Κων/νος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Περιεχόμενα

Πρόλογος

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

ΜΕΡΟΣ Α’

Αυτοανασοσία – Αυτοαντισώματα – Αυτοάνοσες παθήσεις του ήπατος ........................................ 2

1. Ειδική ανοσολογική απόκριση – Ανοσολογική ανοχή .......................................................... 2

2. Αυτοανασοσία – Αυτοαντισώματα .................................................................................... 10

2.1. Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) ............................................................................. 13

2.2. Αντισώματα έναντι δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (anti-DNA) .................................. 15

2.3. Αντισώματα έναντι καρδιολιπίνης (anti-CL) ......................................................... 18

2.4. Αντισώματα κατά του κυτταροπλάσματος των ουδετερόφιλων (ANCA) .................. 21

2.5. Αντισώματα έναντι τοιχωματικών κυττάρων στομάχου (PCA) .............................. 23

2.6. Αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ινών (SMA) ...................................................... 25

3. Αυτοαντισώματα στα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος .............................................. 26

3.1. Πρωτοπαθής χολική κίρρωση ............................................................................. 26

3.2. Πρωτοπαθής σκληρυντική χολλαγγείιτιδα (ΠΣΧ) ............................................... 30

3.3. Αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ) .................................................................................. 31

3.4. Σύνδρομα επικάλυψη .......................................................................................... 39

Βιβλιογραφία 1 ........................................................................................................................ 42

ΜΕΡΟΣ Β’

Ηπατίτιδα C ....................................................................................................................... 72

1. Επιδημιολογία

1.1. Τρόποι μετάδοσης .............................................................................................. 74

1.1.1. Μετάδοση με την παρεντερική οδό ................................................................ 75

1.1.2. Μετάδοση με μη παρεντερική οδό ................................................................ 79

1.1.3. Στοριειογενής ή κρυψιγενής μετάδοση ......................................................... 81

1.2. Η έκταση του προβλήματος ............................................................................. 81

2. Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) .................................................................................. 83

2.1. Η δομή του HCV ............................................................................................. 83

2.2. Η γενετική ετερογένεια του HCV .................................................................. 89

2.2.1. Γονότυποι του HCV .................................................................................... 89

2.2.2. Σχεδόν είδη ή παρόμοια γονιδιώματα του HCV (quasispecies) ............. 91

3. Φυσική ιστορία της ηπατίτιδας C .......................................................................... 95
4. Εξωηπατικές εκδηλώσεις της χρόνιας λοίμωξης από τον HCV

4.1. Εξωηπατικές εκδηλώσεις με ισχυρή συσχέτιση με τον HCV

4.1.1. Μικτή κρυοσφαιριαμία (MC)

4.1.2. Σπειραματονεφρίτιδα

4.1.3. Αγγειίτιδα

4.1.4. Σύνδρομο Sicca

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

4.2.1. Non-Hodgkin's λέμφωμα

4.2.2. Δερματολογικές εκδηλώσεις

4.2.3. Αυτοάνοσες νόσοι του θυρεοειδούς

4.2.4. Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APLS)

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

5. Αυτοαντισώματα και χρόνια λοίμωξη από τον HCV

Βιβλιογραφία

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Επιπολασμός αντισωμάτων κατά μικροσωμίων ήπατος-νεφρών (αντι-LKM) και άλλων μη-οργανοειδικών αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C

1. Εισαγωγή

2. Ασθενείς και μέθοδοι

2.1.1. Ασθενείς

2.1.2. Ασθενείς (n = 174)

2.1.3. Ασθενείς (n = 39)

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

2.3. Ανίχνευση ANA, AMA, SMA με έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα κυπαρισσίες σειρές λαρυγγικού καρκινώματος ανθρώπου (ΗΕρ2 κύτταρα)

2.4. Ανίχνευση ANCA με έμμεσο ανοσοφθορισμό

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

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

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

2.8. Άλλες μέθοδοι ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων
2.9. Στατιστική ανάλυση ................................................................. 195
3. Αποτελέσματα ............................................................................. 197
  3.1. Συχνότητα ανίχνευσης αντισωμάτων στους ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV ................................................................. 197
  3.2. Συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων με δημογραφικά και επιδημιολογικά δεδομένα ........................................................................... 202
  3.3. Συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων με κλινικά, εργαστηριακά στοιχεία και λήψη ειδικής αντι-ιικής θεραπείας ........................................ 206
  3.4. Συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων με ιστολογικά ευρήματα και ιολογικές παράμετρους (ιικό φορτίο, γονότυπος) ........................................ 213
  3.5. Αποτελέσματα στους 174 τυχαία επιλεγμένους ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV ........................................................................ 215
  3.6. Αποτελέσματα στους 39 τυχαία επιλεγμένους ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV ................................................................. 223
4. Συζήτηση ..................................................................................... 226
Βιβλιογραφία ............................................................................................. 239
Περίληψη και συμπεράσματα ..................................................................... 250
Summary and conclusions ........................................................................ 255
Η λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) αποτελεί μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας, παγκοσμίως. Ο HCV είναι ένας ηπατοτρόπος και λεμφοτρόπος ιός, που προκαλεί μια σιωπηλή και ασυμπτωματική νόσο στο πλείστο των περιπτώσεων, καταλήγοντας σε χρονιότητα σε υψηλό ποσοστό. Επιπλέον, ο HCV χαρακτηρίζεται από επαγωγή αυτοανόσων αντιδράσεων, οι οποίες συνίστανται στον συσχετισμό της λοίμωξης με ποικίλες εξωηπατικές εκδηλώσεις και στην ανίχνευση οργανοειδικών και μη οργανοειδικών αυτοαντισωμάτων στον ορό των ασθενών με χρόνια λοίμωξη. Πολλά από τα αυτοαντισώματα αυτά είναι παρόμοια με εκείνα, που ανιχνεύονται και χαρακτηρίζουν τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος. Τόσο οι εξωηπατικές εκδηλώσεις όσο και η παραγωγή αυτοαντισωμάτων μπορούν να ευοδωθούν από τη χορηγούμενη θεραπευτική αγωγή (α-ιντερφερόνη, α-IFN). Επιπρόσθετα, είναι γνωστό ότι ένα μικρό ποσοστό ασθενών με χρόνια
λοίμωξη από τον HCV και θετικά αντισώματα έναντι μικροσωμίων ήπατος-νεφρών (αντι-LKM) παρουσιάζουν έξαρση της ηπατικής νόσου κατά τη θεραπεία με α-IFN.

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

Τα παραπάνω αναμένεται να συμβάλλουν στον προσδιορισμό του πραγματικού επιπολασμού των αντι-LKM και διαφόρων άλλων αυτοαντισωμάτων στους Έλληνες ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C, τη διερεύνηση της συσχέτισής τους με τις εξωηπατικές εκδηλώσεις της λοίμωξης.
και την επιδείνωση της ηπατικής νόσου και τέλος τον καθορισμό των
παραγόντων, που πιθανώς να συμβάλλουν στην εμφάνισή τους.

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

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

ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ-
ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ-
ΑΥΤΟΑΝΟΣΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

1. ΕΙΔΙΚΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ – ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΟΧΗ.

Η ειδική ανοσολογική απόκριση δημιουργείται, φυσιολογικά, όταν ο οργανισμός εκτεθεί σε ξένα αντιγόνα, έχοντας σαν πρωταγωνιστές τα Τ και Β λεμφοκύτταρα. Η απόκριση αυτή λαμβάνει χώρα, κατά τεκμήριο, στο δομημένο δευτερογενή λεμφικό ιστό. Οι φάσεις της ειδικής ανοσολογικής απόκρισης είναι τρεις: η φάση αναγνώρισης του αντιγόνου, η φάση ενεργοποίησης (πολλαπλασιασμός του λεμφοκυτταρικού κλώνου και διαφοροποίησή του) των ανοσοδραστικών κυττάρων και η φάση καταστροφής του αντιγόνου μέσω ειδικών ανοσοσφαιρινών (χυμική ανοσία) ή κυττάρων (κυτταρική ανοσία) (1,2). Συνοπτικά, η ειδική ανοσολογική απόκριση φαίνεται στο Σχήμα 1.
Σχήμα 1. Μοντέλο κυτταρικής αλληλεπίδρασης κατά την ανοσολογική απόκριση.
(Από το: Pathophysiology. The biologic basis of disease in adults and children, 1998, σελ. 199(2)).
Τα Β λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν το αντιγόνο μέσω της επιφανειακής τους ανοσοσφαιρίνης. Η αναγνώριση του αντιγόνου και στη συνέχεια η ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων χωρίς τη βοήθεια των Τ λεμφοκυττάρων, αφορά τα ‘θυμοανεξάρτητα’ αντιγόνα (μεγάλα πολυμερή μόρια με επαναλαμβανόμενες πανομοιότυπες ομάδες), ενώ η αναγνώριση του αντιγόνου και τελικά η παραγωγή αντισωμάτων με τη βοήθεια των Τ λεμφοκυττάρων, αφορά τα ‘θυμοεξαρτώμενα’ αντιγόνα (μικρά πρωτεϊνικά μόρια) (1,3). Τα περισσότερα αντιγόνα και όλα τα αυτοαντιγόνα είναι ‘θυμοεξαρτώμενα’ (1).

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


Τα Τ λεμφοκύτταρα, που δεν παράγουν IL-2, λέγονται ανεργικά (anergic), και μερικά από αυτά παράγουν ιντερλευκίνη 10 (IL-10), η οποία καταστέλλει την ενεργοποίηση όλων των Τ λεμφοκύτταρων (5,6). Οι κυτταροκίνες, επίσης, που εκκρίνονται αρχικά από διάφορα κύτταρα του λεμφικού ιστού σε απάντηση στο αντιγονικό ερέθισμα καθορίζουν την διαφοροποίηση του Τ-βοηθητικού λεμφοκύτταρου προς τύπου 1 (T₃₁) ή τύπου 2 (T₃₂), ώστε να επιλεγεί ο αποτελεσματικός μηχανισμός 'εξόντωσης' του αντιγονικού εισβολέα (3,4). Τα T₃₁ λεμφοκύτταρα παράγουν κυρίως IL-2 και ιντερφερόν-γ (INF-γ) και έτσι ενεργοποιούν τα μακροφάγα και τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (CD8 θετικά), ενώ τα T₃₂ λεμφοκύτταρα απελευθερώνουν, κυρίως,
ιντερλευκίνες 4,5,6,10 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) και έτσι προάγουν την παραγωγή ημισινοφίλων, μαστοκυττάρων και αντισωμάτων από τα πλασμακυττάρα (3,4). Τα ΤH2 λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν με τα Β λεμφοκύτταρα μέσω σύνδεσης TCR-MHC II, αλλά και με τη βοήθεια άλλων μορίων, κυρίως του συνδέτη του μορίου CD40 (CD40 ligand, που βρίσκεται στο ενεργοποιημένο Τ λεμφοκύτταρο) και του CD40 (που βρίσκεται στο Β λεμφοκύτταρο) (1,2,3) (Σχήμα 3).

Σχήμα 3. Μόρια της κυτταρικής μεμβράνης που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση μεταξύ ΤH και Β λεμφοκύτταρου. Η ανοσοσοφιαίρηση της μεμβράνης (mlg) προσλαμβάνει το αντιγόνο στον ενδοκυττάριο χώρο, όπου διασπάται και τα πεπτίδια συνδέονται με τα μόρια MHC τάξης II. Τα A και B αφορούν οδούς διαβίβασης σήματος (μεταξύ αντιγόνου-υποδοχέα), που σχετίζονται με τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης και τη διάσπαση της φωσφοϊνοσιτόλης. Το CD28 (Γ) και το CD40 (Δ) στέλνουν σημαντικό «σήμα» ενεργοποίησης στο Τ και το Β λεμφοκύτταρο αντίστοιχα, ενώ τα MHC II (Ζ) και CD72 (Ε) αποτελούν ξεχωριστά «σήματα».

(Από το: Roit I (Ed). Immunology, 4th edition, Mosby 1996, σελ. 8.4(3)).
Η αλληλεπίδραση μεταξύ Τ και Β λεμφοκυττάρου οδηγεί είτε σε ενεργοποίηση του Β λεμφοκυττάρου, διαφοροποίηση προς πλασματοκύτταρα και τελικά παραγωγή ειδικών για το αντιγόνο αντισωμάτων είτε σε απενεργοποίησή του (κλωνική ανεργία), όπως συμβαίνει κατά την αλληλεπίδραση Τ λεμφοκυττάρου και αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου (3).

Η ανοσολογική ειδικότητα των αντιγονικών υποδοχέων τόσο των Τ (TCR) όσο και των Β λεμφοκυττάρων (ανοσοσφαιρίνες), είναι αποτέλεσμα τυχαίου συνδυασμού πολλών γονιδίων και δημιουργεί τη θέση σύνδεσης των υποδοχέων αυτών με το αντιγόνο (3,4). Οι διαφορετικές ανοσολογικές ειδικότητες, που σχετίζονται με την αναγνώριση των αντιγόνων γονιδίων, δημιουργούνται από τους διάφορους ανοσολογικούς κύτταρους με το αντιγόνο (3,4). Θεωρητικά, αυτή η διαδικασία οδηγεί σε δημιουργία πολύ μεγάλης ποικιλίας ειδικών υποδοχών, ορισμένων από τους οποίους μπορεί να αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα. Αυτή η διαδικασία, που περιορίζει ή εξουδετερώνει αυτοδραστικά κύτταρα (auto-reactive cells) δημιουργεί μία κατάσταση έλλειψης απόκρισης, ειδική για συγκεκριμένο αντιγόνο (3,5). Η αναγνώριση των επαναληπτικών αντιγόνων (self-tolerance) είναι η διαδικασία, της διαδικασίας αυτής μπορεί να προκαλέσει αυτοανοσία, δηλαδή ανοσολογική 'επίθεση' εναντίον ιστικών στοιχείων του ίδιου του οργανισμού.

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

- Κλωνική διαγραφή (clonal deletion): εξουδετέρωση των κυττάρων σε κάποιο στάδιο κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους.
- Κλωνική εκτροπή (clonal abortion): αναστολή της περαιτέρω διαφοροποίησης των ανώριμων κυττάρων.
• Κλωνική ανεργία (clonal anergy): καταστολή των μηχανισμών της ανοσολογικής απόκρισης.

• Καταστολή (suppression): αναστολή της κυτταρικής ενεργοποίησης μέσω αλληλεπίδρασης με άλλα κύτταρα, όπως αυτά, που παράγουν ανασταλτικές κυτταροκίνες ή ειδικά αντι-ιδιοτυπικά λεμφοκύτταρα, που αναγνωρίζουν τον αντιγονικό υποδοχέα.

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

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

• Τ λεμφοκύτταρα, που χωρίζονται από το αντίστοιχο αντιγόνο από φυσικό φραγμό (πχ ο αιματοεγκεφαλικός), βρίσκονται σε κατάσταση ανοσολογικής 'άγνοιας' (immunologic ignorance), γιατί δεν μπορούν να ενεργοποιηθούν.
• Τ ιδαλφοκύτταρα, που εκφράζουν το μόριο Fas (CD95) στην επιφάνειά τους, μπορούν να λαμβάνουν σήματα από κύτταρα, που εκφράζουν τον υποδοχέα του Fas (Fas ligand), οπότε οδηγούνται σε απόπτωση, μία διαδικασία γνωστή ως 'διαγραφή' (deletion) (8,9,10).

• Το μόριο CD152 (CTLA-4, cytotoxic-T-lymphocyte-associated protein 4) των Τ ιδαλφοκυττάρων συνδέεται με το CD80 (B7-1) και το CD86 (B7-2) των Β λεμφοκυττάρων με υψηλότερη συγγένεια (affinity) σε σχέση με το συν-διεγερτικό μόριο CD28. Έτσι, το CD152 αναστέλλει την ενεργοποίηση των Τ ιδαλφοκυττάρων (11).

• Ανοσορρυθμιστικά Τ ιδαλφοκύτταρα μπορούν να καταστείλουν άλλα Τ ιδαλφοκύτταρα μέσω της παραγωγής ανασταλτικών κυτταροκινών όπως η IL-10 και ο TGF-β (5,6,12).

Σχήμα 4. Περιφερικοί μηχανισμοί ανάπτυξης ανοσολογικής ανοχής (Από το: Tolerance and autoimmunity. N Engl J Med 2001; 344, σελ. 657(5)).
ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ-ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

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

Η γενετική προδιάθεση αποτελεί έναν από τους παράγοντες, που μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση αυτοανοσίας, όπως, κυρίως, ο απλότυπος του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (HLA haplotype) (5). Η έκταση της εξουδετέρωσης των αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων στο θύμο ποικίλλει, εξαρτώμενη από το γονότυπο των MHC τάξης II μορίων του κάθε ατόμου: ορισμένοι MHC τάξης II γονότυποι μπορεί να αποτυγχάνουν να οδηγήσουν σε αρνητική επιλογή αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων ή σε θετική επιλογή ανοσορρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων, που καταστέλλουν τα αυτοαντιδραστικά (3). Κάτι ανάλογο μπορεί να συμβεί και στην περιφερική Τ λεμφοκυτταρική ανοχή κατά την παρουσίαση του αντιγόνου στα Τ λεμφοκύτταρα μέσω του MCH II. Επιπρόσθετα, η ανάλυση του ανθρώπινου γενώματος έδειξε ότι κάποια γονίδια κυτταροκινών, υποδοχέων κυτταροκινών και άλλων ανοσορρυθμιστικών μορίων μπορεί να σχετίζονται με γενετική προδιάθεση σε αυτοανοσία (5,13).
Άλλος μηχανισμός πρόκλησης αυτοανοσίας είναι η ενεργοποίηση
ανεργικών, αυτόδραστικών Τ λεμφοκυττάρων (που υπάρχουν φυσιολογικά
στη φαρέτρα του ανοσολογικού συστήματος) από λοιμογόνους παράγοντες
(5). Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι οι λοιμώξεις ενέχονται στην
παθογένεια αυτοανόσων νόσων, μέσω ποικίλων μηχανισμών όπως: α) η
απελευθέρωση στην κυκλοφορία αυτοαντιγόνων, που ήταν περιορισμένα
ώστε να μην έρχονται σε επαφή με ανοσοδραστικά κύτταρα, λόγω ιστικής
βλάβης από τον λοιμογόνο παράγοντα (14), β) η ενεργοποίηση μεγάλου
μέρους του πληθυσμού των Τ λεμφοκυττάρων από υπεραντιγόνα
(superantigens), τα οποία είναι μόρια (όπως η σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη
και μερικές ικές πρωτεΐνες), που οδηγούν σε μη ειδική ενεργοποίηση των Τ
λεμφοκυττάρων (15), γ) η προαγωγή παραγωγής κυτταροκινών και συν-
dιεγερτικών μορίων, που αποτελούν το δεύτερο σήμα κατά την ανοσολογική
απόκριση (costimulatory molecules), από προϊόντα του εισβάλλοντος
μικροοργανισμού (by-stander activation) (16,17), δ) η επαγωγή, από ορισμένα
βακτήρια, παραγωγής αντισωμάτων, τα οποία φέρουν παθολογικούς
ιδιότυπους αυτοαντισωμάτων, που σε συνδυασμό με την επίδραση
επιπρόσθετου λοιμογόνου παράγοντα, οδηγούν σε αυτοάνοση απόκριση (18).

Εναλλακτικά, η μοριακή ομολογία ορισμένης ακολουθίας αμινοξέων
μεταξύ λοιμογόνου παράγοντα και αυτοαντιγόνου (‘μοριακή μίμηση’) μπορεί
να παίξει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση αυτοαντιδραστικών Τ
λεμφοκυττάρων, που αναγνωρίζουν τόσο το πεπτίδιο του λοιμογόνου
παράγοντα όσο και το ‘ίδιο’ πεπτίδιο (5,19). Εντούτοις, δεν υπάρχουν, προς
το παρόν in vivo ισχυρές ενδείξεις ότι η ‘μοριακή μίμηση’ συμμετέχει στην
πρόκληση αυτοανοσίας (19). Στην πραγματικότητα, ο TCR είναι ικανός να
αναγνωρίζει πολλά πεπτίδια, που δεν έχουν ισχυρή μοριακή ομολογία, οπότε η ιδέα της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας μεταξύ λοιμωγόνων και αυτόλογων πεπτιδίων πιθανόν να είναι απλοϊκή (20,21).

Τα αυτοαντισώματα αποτελούν σημαντικό τμήμα της αυτοάνοσης απόκρισης και βρίσκονται συχνά σε συνδυασμό με κάποια συγκεκριμένη νόσο. Στην τελευταία περίπτωση υπάρχουν τρεις πιθανές εκδοχές: i) τα αυτοαντισώματα να ενδίνουν για τις βλάβες της νόσου, ii) η νόσος να προηγείται και μέσω πρόκλησης ιστικής βλάβης να παράγονται τα αυτοαντισώματα, iii) υπάρχει κάποιος παράγοντας, που προκαλεί τόσο τις βλάβες όσο και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων (3). Τα αυτοαντισώματα μπορεί να υπάρχουν ως 'φυσικά' αυτοαντισώματα, που συναντώνται σε φυσιολογικά άτομα, είναι συνήθως χαμηλής συγγένειας IgM αντισώματα και αντιδρούν με ποικιλία αυτοαντιγόνων (3,22). Τα 'φυσικά', όμως, αυτά αυτοαντισώματα μπορεί να υποστούν ισοτυπική μετατροπή, με τη βοήθεια ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων και να γίνουν IgG, τα οποία έχουν μεγάλη συγγένεια προς το αυτοαντιγόνο και είναι δυνητικά παθογόνα (3,22). Επιπλέον, σωματικές μεταλλαγές των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή υψηλής συγγένειας IgG αυτοαντισωμάτων (3,22). Τα αυτοαντισώματα αυτά απαντώνται κατά τεκμήριο στα αυτοάνοσα νοσήματα.

Τα αυτοαντισώματα χωρίζονται σε 'οργανοειδικά' και 'μη οργανοειδικά' (non-organ specific autoantibodies, NOSA). Στις 'οργανοειδικές' διαταραχές, υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι τα αυτοδραστικά Τ λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα, που είναι παρόντα στα όργανα στόχους (3). Στη 'μη οργανοειδική' αυτοανοσία λίγα είναι γνωστά για τα αντιγόνα, που
αναγνωρίζονται από τα Τ λεμφοκύτταρα. Πιθανώς, στις τελευταίες περιπτώσεις, τα Τ λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν όχι το αντιγονικό πεπτίδιο, αλλά κάποιον ιδιότυπο του αντισώματος και στη συνέχεια βοηθούν τα Β λεμφοκύτταρα, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αυτοαντισωμάτων, να πολλαπλασιαστούν (3). Επιπλέον, τα αυτοαντισώματα εναντίον ενδοκυττάριων αντιγόνων θεωρούνταν, γενικώς, μη παθογενετικά, καθώς πιστεύονταν ότι αναπτύσσονται αυτόματα ως αποτέλεσμα της νόσου (23). Εντούτοις, υπάρχουν πειραματικά δεδομένα, που πείθουν και για το αντίθετο. Για παράδειγμα, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα σε ζώα με αυτοάνοσο αρθρίτιδα, υποστηρίζουν ότι μεταφόρα I gG (που στρέφονταν εναντίον ενδοκυττάριου αντιγόνου) ενδοκυττάριο αντιγόνου στη γλυκοζο-6-φωσφατάσης από τα νοσούντα ζώα μπορεί να ευοδώσει την ανάπτυξη αρθρίτιδας στα υγιή ζώα λήπτες (24,25).

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

2.1. Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA).

Τα ANA αποτελούν μία ετερογενή ομάδα αυτοαντισωμάτων, που στρέφονται κατά διαφόρων αντιγόνων του πυρήνα. Στην καθημερινή πράξη, τονοσερίσιος τους γίνεται με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού (ΕΑΦ), που είναι απλή και ευαίσθητη αλλά μη ειδική εξέταση. Αποτελεί την αρχική εξέταση του χρήστη, καθώς και η κλινική τους σημασία.
πολυμυοσίτιδα) (26). Στην τεχνική του ΕΑΦ προτιμούνται υποστρώματα από καλλιέργειες ανθρώπινων κυτταρικών σειρών και κυρίως τα ΗΕρ2 κύτταρα (ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα λαρυγγικού καρκινώματος), ενώ σαν υπόστρωμα μπορεί να χρησιμοποιηθούν και κατεψυγμένες ιστικές τομές σε κρυοστάτη από ήπαρ και νεφρό τρωκτικών (27, 28) (Εικόνα 1).

1.1. Ομοιογενής τύπος φθορισμού
1.2. Στικτός τύπος φθορισμού
1.3. Πυρηνισκικός τύπος φθορισμού
1.4. Φθορισμός ANA σε τομή ήπατος αρουραίου.

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

Τα ANA είναι θετικά στο 95-99% των ασθενών με ΣΕΛ (27), με θετική προγνωστική αξία 15-35% σε υψηλούς τίτλους, μιας και βρίσκονται και σε διάφορα άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (σύνδρομο Sjögren, σκληρόδερμα, πολυμυοσίτιδα, αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1, κλπ) (29). Τα ANA μπορεί να
είναι θετικά και στο 1-2% του γενικού πληθυσμού, συνήθως όμως σε χαμηλούς τίτλους. Η συχνότητα αυτή αυξάνει με την ηλικία φτάνοντας στο 20-25% σε άτομα άνω των 60 ετών, καθώς και σε συγγενείς ασθενών με αυτοάνοση νόσο (30). Επίσης, θετικά ANA ανιχνεύονται συνήθως σε χαμηλούς τίτλους, σε λοιμώξεις, λευχαιμίες και συμπαγείς όγκους, καθώς και χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως η τοξικομανία και οι χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες (30-33).

Με υπόστρωμα τα κύτταρα HER2 ανιχνεύονται διάφοροι τύποι ανοσοφθορισμού στον πυρήνα (ομοιογενής, λεπτός, αδρός και διακριτός στικτός, πυρηνισικός, αντικεντρομεριδιακός, δακτυλιοειδής κα.), ενώ συγχρόνως ανιχνεύονται και διάφοροι τύποι κυτταροπλασματικού φθορισμού (30). Καθένας από αυτούς αντιστοιχεί σε διαφορετικά αντιγόνα στόχους των αυτοαντισωμάτων, γεγονός, που σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να έχει διαγνωστική αξία (30-31).

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

Τα αντι-DNA αντισώματα είναι μια ετερογενής υποομάδα των ANA αυτοαντισωμάτων. Αντιδρούν με 'φυσικό' διπλής έλικας DNA (dsDNA) ή μονής έλικας DNA (ssDNA) ή και με τα δυο (22,34). Μεγάλο μέρος του γενικού πληθυσμού έχει ανιχνεύσιμα IgM τάξης αντι-ssDNA αντισώματα στον ορό, τα οποία έχουν χαμηλή συγγένεια για το DNA, ενώ συνδέουν και άλλα αυτοαντιγόνα (22). IgG αντι-dsDNA αντισώματα ανιχνεύονται στατιστικά σε φυσιολογικά άτομα και συνήθως είναι υψηλής συγγένειας (22,35). Η ανίχνευση των αντι-dsDNA αντισωμάτων έχει μεγάλη στρεβλωτική στη διάγνωση, παθογένεια και παρακολούθηση ασθενών με ΣΕΛ (36,37). Τα
αυτοαντισώματα αυτά ανιχνεύονται σε ποσοστό 60-83% των ασθενών με ΣΕΛ ανάλογα με τη φάση της νόσου (36,38). Πολλοί μηχανισμοί οδηγούν στην παραγωγή των αντι-DNA αντισωμάτων (Πίνακας 1) (22). Εντούτοις, δεν είναι

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Φυσικά αυτοαντισώματα</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Πολυκλωνική Β λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση</td>
</tr>
<tr>
<td>Ειδική αντιγονική διέγερση</td>
</tr>
<tr>
<td>• Βακτήρια (φωσφολιπίδια, DNA, συμπλέγματα DNA-πρωτεϊνών</td>
</tr>
<tr>
<td>• Ιοί</td>
</tr>
<tr>
<td>• Χημικές ουσίες</td>
</tr>
<tr>
<td>• Συμπλέγματα DNA-πρωτεϊνών (χρωματίνη, νουκλεοσώματα)</td>
</tr>
<tr>
<td>• Συμπλέγματα RNA-πρωτεϊνών</td>
</tr>
<tr>
<td>Τ λεμφοκυτταρική βοήθεια</td>
</tr>
<tr>
<td>• Ενεργοποίηση από νουκλεοσωματικά πεπτίδια</td>
</tr>
<tr>
<td>• Ενεργοποίηση από πεπτίδια ανοσοσφαιρινών</td>
</tr>
<tr>
<td>Επέκταση της διασταυρούμενης αντίδρασης σε εκτεταμένες ανοσολογικές αποκρίσεις</td>
</tr>
<tr>
<td>• Επέκταση του ιδιοτυπικού δικτύου</td>
</tr>
<tr>
<td>• 'Διάχυση' των επιτόπων στα Τ και Β λεμφοκύτταρα</td>
</tr>
<tr>
<td>• Εκφύλιση της Τ λεμφοκυτταρικής δεξαμενής</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

Η μέθοδος εκλογής για τον προσδιορισμό των αντι-dsDNA αντισωμάτων είναι η τεχνική Farr (22,27,36,38). Η τεχνική αυτή αποτελεί
ραδιοανοσολογική μέθοδο υγρής φάσης, χρησιμοποιώντας dsDNA
ραδιοσημασμένο με τρίτο και καθίζηση με θειϊκό αμμώνιο και έχει το
πλεονέκτημα της ανίχνευσης αντισωμάτων υψηλής συγγένειας με τη διπλή
έλικα του DNA (34,36,38). Παρόλα αυτά, παρουσιάζει σημαντικά
μειονεκτήματα (υψηλό κόστος, μεγάλος εργαστηριακός εξοπλισμός, μεγάλος
χρόνος εκτέλεσης, μη δυνατός ο καθορισμός της τάξης των
αυτοαντισωμάτων), που καθιστούν δύσκολη τη χρήση της ως μεθόδου
ρουτίνας (34).

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

Αν και ο έλεγχος για anti-dsDNA αντισώματα με εμπορικά διαθέσιμες
ανοσοενζυμικές μεθόδους (ELISA) δεν είναι γενικά πάρα πολύ αξιόπιστος,
καθώς ανιχνεύει τόσο αντισώματα υψηλής συγγένειας όσο και αντισώματα
χαμηλής συγγένειας για το dsDNA (41), οι Τζιούφας και συν (42) ανέπτυξαν
ευαισθητή και αυξημένης ειδικότητας ELISA, για την ανίχνευση των anti-
dsDNA αντισωμάτων, που προσδιορίζει IgM και IgG ανοσοσφαιρινικές τάξεις
αντισωμάτων. Η ειδικότητα της παραπάνω μεθόδου κατέστη δυνατή μετά από
πειράματα αναστολής του θετικού μάρτυρα χρησιμοποιώντας dsDNA: το dsDNA προκαλούσε αναστολή της ELISA για IgG αντι-dsDNA σε ποσοστό 90% ενώ για IgM αντι-dsDNA σε ποσοστό 76% (42). Η μέθοδος αυτή φαίνεται να έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από τη μέθοδο Ferr και τη μέθοδο του ΕΑΦ σε Crithidia Luciliae, αν και είναι λιγότερο ειδική (43).

2.3. Αντισώματα κατά καρδιολιπίνης (αντι-CL)

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

Τα aPL αντισώματα συσχετίστηκαν, στη συνέχεια, με το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (antiphospholipid syndrome, APS). Το APS είναι μια αυτοάνοση διαταραχή, που χαρακτηρίζεται από αρτηριακές ή/και φλεβικές θρομβώσεις, καθ' εξί αυτοβολές, και συχνά μέτρια θρομβοποιία σε συνδυασμό με παρουσία aPL αντισωμάτων (46). Νευρολογικές και ψυχιατρικές διαταραχές, δικτυωτή πελίωση, νεφρικές και ηπατικές διαταραχές, αρθραλγίες ή αρθρίτιδα, αιμολυτική αναιμία καθώς και βαλβιδοπάθειες έχουν
η επίσης ανακοινωθεί στα πλαίσια του APS (46,50). Το APS διακρίνεται σε πρωτοπαθές, όταν δεν συνδέεται με άλλες υποκείμενες διαταραχές (51) και δευτεροπαθές, όταν αποδεδειγμένα συνυπάρχουν και άλλες καταστάσεις, όπως αυτοάνοσες παθήσεις (κυρίως ΣΕΛ), κακοήθειες και χρήση ορισμένων φαρμάκων (48). Επιπλέον, το 1992 ο όρος καταστροφικό APS προτάθηκε από τους Asherrson et al (52) για να περιγράψει μια σπάνια 'ποικιλία' APS. Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από οξεία ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων και ιστοπαθολογικές ενδείξεις πολλαπλών μικροθρομβώσεων (52). Οι λοιμώξεις θεωρούνται οι κύριοι προδιαθεσικοί παράγοντες για την ανάπτυξή του καταστροφικού APS. Σύμφωνα με τα πρόσφατα κριτήρια διάγνωσης του APS, τα αντι-CL αντισώματα και το αντιπηκτικό του λύκου θεωρούνται οι εργαστηριακές εξετάσεις εκλογής, που σε συνδυασμό με τα κλινικά κριτήρια θα οδηγήσουν στη διάγνωση του συνδρόμου (47).

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

Όσον αφορά τις λοιμώξεις, τα αντι-CL αντισώματα έχουν ιστορικά συνδεθεί με αυτές, μιας και η VDRL (που χρησιμοποιεί σαν αντιγόνο μίγμα φωσφολιπιδίων) συνδέθηκε με τη σύφιλη. Η παρουσία αντι-CL αντισωμάτων σε οξείες και χρόνιες λοιμώξεις έχει αναφερθεί από τους Harris et al, από το 1985 (59). Έκτοτε, έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς: με HIV [με συχνότητα 12-67% (53,60-64)], με HCV λοίμωξη [με συχνότητα 3.3-46% (32,62,65-80)], με λοίμωξη από παρβοϊό B19 (81), από το Epstein-Barr (82), από
κυτταρομεγαλοϊό (CMV) (83,84), καθώς και με βακτηριακές λοιμώξεις, όπως
λοίμωξη από mycoplasma penetrans (85), φυματίωση (86), λοίμωξη από
Klebsiella (86), από salmonella typhi (87), Staphylococcus aureus,
Streptococcus pyogens και Escherichia coli (88).

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

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

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

2.1. Φθορισμός κυτταροπλάσματος ουδετερόφιλων (cANCA)

2.2. Περιπυρηνικός φθορισμός κυτταροπλάσματος ουδετερόφιλων (pANCA).

Εικόνα 2. Τύποι ανοσοφθορισμού των ANCA σε υπόστρωμα ουδετερόφιλων μονιμοποιημένων σε αιθανόλη.
Ο κυτταροπλασματικός φθορισμός διακρίνεται σε δύο τύπους (96,97):

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

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

Τα cANCA και πιο ειδικά τα αντισώματα κατά της Πρ3, είναι πολύ ευαίσθητοι για τη διάγνωση ενεργού KW (28,100). Πράγματι, στις περιπτώσεις εκτεταμένης KW (κοκκιώδης φλεγμονή της αναπνευστικής οδού, συστηματική αγγείιτιδα, νεκρωτική σπειραματοφρένη με μηνοειδείς σχηματισμούς) τα cANCA βρίσκονται στο 90% και πλέον των ασθενών ενώ στην περιορισμένη μορφή, χωρίς νεφρική συμμετοχή ανιχνεύονται στο 67-
86% των ασθενών (31,100-102). Τα cANCA, όμως, έχουν ανιχνευθεί κατά καρπούς και σε ασθενείς με μικροσκοπική πολυαρτηρηρίτιδα, καθώς και σε άλλες καταστάσεις, όπως σε λοιμώξεις (φυματίωση) και περιπτώσεις λεμφώματος (άτυπα cANCA) (102-104). Έτσι, τα cANCA δεν μπορούν να αποτελέσουν το μοναδικό-βασικό κριτήριο για τη διάγνωση της KW, αλλά την υποβοηθούν στο συγκεκριμένο ασθενή με την ύποπτη κλινική σημειωματοδοτήσεις (102).


2.5. Αντισώματα έναντι τοιχωματικών κυττάρων στομάχου (PCA).

Τα PCA αντισώματα είναι οργανοειδικά αυτοαντισώματα έναντι της α και της β υπομονάδας της γαστρικής Η⁺, K⁺-ATΡάσης των τοιχωματικών
κυττάρων του στομάχου (117,118). Τα PCA συνδέονται άμεσα με την αυτοάνοση ατροφική γαστρίτιδα του σώματος του στομάχου (τύπου Α) και την κακοήθη αναιμία, καθώς βρίσκονται στο 50-90% των ασθενών (27,119,120).
Η ανίχνευσή τους γίνεται με ΕΑΦ σε κατεψυγμένες τομές στομάχου αρσυραίου (27) (Εικόνα 3).
Η κακοήθης αναιμία και η εύρεση θετικών PCA, συνδυάζεται συχνά και με άλλες αυτοάνοσες διαταραχές (θυρεοειδίτιδα Hashimoto, σακχαρώδη δια-

![Εικόνα 3. Φθορισμός των PCA σε τομή στομάχου αρουραίου.](image)

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

Τα SMA είναι αυτοαντισώματα, που κατευθύνονται εναντίον αντιγόνων του κυτταροσκελετού (F ακτίνη, G ακτίνη, μυοσίνη, καλδεσμόνη, τουμπουλίνη, βιμεντίνη, δεσμίνη, κερατίνη κα) (125,126). Τα SMA ανιχνεύονται με ΕΑΦ σε κυτταρικές σειρές HEP2 και σε τομές ήπατος, νεφρού αρουραίου λόγω φθορισμού του τοιχώματος των αγγείων και τομές στομάχου αρουραίου λόγω φθορισμού του μυικού χιτώνα. Τα SMA, όπως τα ANA, ανιχνεύονται, σε χαμηλούς συνήθως τίτλους, σε υγείς [σε σειρά 131 υγιών ατόμων, SMA ανιχνεύτηκαν στο 43% (127)], σε ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες A, B ή C (128-130), καθώς και σε άλλες παθήσεις (131). Στις περισσότερες όμως από τις προαναφερθείσες περιπτώσεις τα SMA δεν έχουν ειδικότητα κατά της F ακτίνης. Αντίθετα, η ανίχνευση SMA εναντίον F ακτίνης, ιδιαίτερα σε υψηλούς τίτλους, συνδέεται κυρίως, με την αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1 (AH-1) και τη χαρακτηρίζουν (132,133).
3. ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ.

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

3.1. Πρωτοπαθής χολική κίρρωση (ΠΧΚ)

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

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

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

4.1. Κυτταροπλασματικός φθορισμός ΑΜΑ σε κύτταρα HEp2

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

Στη δεκαετία του '80 έγινε αντιληπτό ότι οι οροί ασθενών με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, διαφορετικές από την ΠΧΚ και τις πιθανές συνοδείς της νόσους, είχαν αντίδραστικότητα κατά μιτοχονδριακών συστατικών, με
διαφορετικά πρότυπα από αυτή που σχετίζεται με την ΠΧΚ. Έτσι, το το 1981 οι Baum και Berg (140) αναγνώρισαν το πρώτο μιτοχονδριακό αντιγόνο των AMA, την καρδιολιπίνη, που δεν σχετίζοταν με την ΠΧΚ και ονομάστηκε M1, ενώ το σχετιζόμενο με την ΠΧΚ ονομάστηκε M2 (136-140). Στη συνέχεια, με βάση την εκλεκτική φυγοκέντριση των μιτοχονδριακών αντιγόνων, τα τελευταία διακρίθηκαν σε εννέα ομάδες (fractions) (M1-M9) (141). Εκτός από τα M1 και M2 αντιγόνα, που έχουν ταυτοποιηθεί (καρδιολιπίνη και σύμπλεγμα πυροσταφυλικής δεϋδρογενάσης, αντίστοιχα), η ταυτότητα των υπόλοιπων είναι αμφιλεγόμενη. Τα αυτοαντισώματα αυτά, ανιχνεύονται σε διάφορες παθήσεις (όπως οξεία μυοκαρδίτιδα (M7), φαρμακευτικός λύκος από venocuran (M3), φαρμακευτικός λύκος από iproniacide (M6), διάφορες νόσοι του κολλαγόνου (M5), λοιμώξεις), ενώ υπάρχει διάσταση απόψεων σχετικά με την προγνωστική αξία της M-ταξινόμησης (137).

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

Εκτός της τεχνικής του ΕΑΦ, χρησιμοποιούνται μέθοδοι ELISA (με υπόστρωμα ανασυνδυασμένα ΠΔΓ-E2, ΚΔΓΔΑ-E2, ΚΓΔΓ-E2 αντιγόνα ή
καθαρά αντίστοιχα αυτοαντιγόνα) και ανοσοαττοτύττωσης (με υπόστρωμα
genetικά ανασυνδυασμένα αντιγόνα ή εκχύλισμα μιτοχονδρίων αρουραίου ή
ανθρώπου), με στόχο την επιπρόσθετη ταυτοποίηση των ΑΜΑ (137).

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Πυρουβική δεύδρογενάση (ΠΔΓ)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>ΠΔΓ-Ε2 αποκαρβοξυλάση</td>
</tr>
<tr>
<td>74 kd 95% M2a</td>
</tr>
<tr>
<td>ΠΔΓ-Ε1 α αποκαρβοξυλάση</td>
</tr>
<tr>
<td>41 kd 41-66% M2d</td>
</tr>
<tr>
<td>ΠΔΓ-Ε1 β αποκαρβοξυλάση</td>
</tr>
<tr>
<td>36 kd 2-7% M2e</td>
</tr>
<tr>
<td>Πρωτεϊνή Χ</td>
</tr>
<tr>
<td>52 kd 95% M2c</td>
</tr>
</tbody>
</table>

| 2-κετοξικής δεύδρογενάσης με
dιακλαδούμενη άλυσο (ΚΔΓΔΑ) |
<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>ΚΔΓΔΑ-Ε2 (ακυλτρανσφεράση)</td>
</tr>
<tr>
<td>50 kd 53-55% M2c</td>
</tr>
<tr>
<td>ΚΔΓΔΑ-Ε1 α</td>
</tr>
<tr>
<td>46 kd -</td>
</tr>
<tr>
<td>ΚΔΓΔΑ-Ε1 β</td>
</tr>
<tr>
<td>38 kd -</td>
</tr>
</tbody>
</table>

<table>
<thead>
<tr>
<th>Κετόγλουταρικής δεύδρογενάσης</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>(ΚΓΔΓ)</td>
</tr>
<tr>
<td>ΚΓΔΓ-Ε2 (σουκινυλτρανσφεράση)</td>
</tr>
<tr>
<td>48 kd 39-88% M2c</td>
</tr>
<tr>
<td>ΚΓΔΓ-Ε1</td>
</tr>
<tr>
<td>110 kd -</td>
</tr>
<tr>
<td>Ε3</td>
</tr>
<tr>
<td>55 kd 38% M2c</td>
</tr>
</tbody>
</table>

β) Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) στην ΠΧΚ.

Τα ANA όχι διαφορετικά σαν ορολογική παράμετρος στο 52%
περίπου των ασθενών με ΠΧΚ (137). Τα ANA στην ΠΧΚ περιλαμβάνουν τα
αντικεντρομεριδιακά αντισώματα (AKA), αντισώματα κατά πρωτεϊνών της
πυρηνικής μεμβράνης (gp 210, p62, υποδοχέας της B-λαμίνης) και
αντισώματα κατά ρυθμιστικών πρωτεϊνών του πυρήνα (Sp 100, κυκλίνη Α)
(147-150). Με την τεχνική του ΕΑΦ, τα ANA κατά πρωτεϊνών της μεμβράνης
dίνουν χαρακτηριστικό δακτυλιοειδή φθορισμό (nuclear rim), ενώ το πρότυπο
των ANA εναντίον ρυθμιστικών πρωτεϊνών του πυρήνα χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων (multiple nuclear dots) (137, 147-149) (Εικόνα 5).

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

3.2. Πρωτοπαθής σκληρυντική χολλαγγειίτιδα (ΠΣΧ).

Η ΠΣΧ χαρακτηρίζεται από την προσβολή των ενδοηπατικών ή/και εξωηπατικών χοληφόρων ανεξαρτήτως μεγέθους. Η νόσος οδηγεί σε χρόνια χολόσταση και τελικά σε κίρρωση. Προσβάλλει κυρίως άνδρες και στο 70% περίπτωσεων υπάρχουν διαγνωστικά ορολογικά ανοσολογικά χαρακτηριστικά (152). Τα ‘άτυπα’ pANCA είναι τα αυτοαντισώματα, που περισσότερο σχετίζονται με την ΠΣΧ, ευρισκόμενα στο 85% περίπτωσεων (151), αν και το εύρημα αυτό υποδεικνύει μάλλον ταυτόχρονη ύπαρξη ελκώδους κολίτιδας (153). Τα αυτοαντιγόνα στόχοι των pANCA στην ΠΣΧ ποικίλλουν, χωρίς όμως να έχει ταυτοποιηθεί μέχρι στιγμής κάποιο από αυτά ως ειδικό της νόσου.
3.3. Αυτοάνοση ηπατίτιδα (AH).

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

Σύμφωνα με τα αυτοαντισώματα, που ανιχνεύονται η ΑΗ υποδιαιρέθηκα αρχικά σε τρεις τύπους (157,166-169): α) την ΑΗ τύπου 1 (AH-1), που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ANA και αντισώματων έναντι ιογενών νυκτών (SMA) και ήταν παλαιότερα γνωστή ως κλασσική ή
λυκοειδής. Επιπλέον, ανιχνεύονται pANCA και αντισώματα έναντι του υποδοχέα της ασιαλογλυκοπρωτεΐνης (αντι-ASGP-R). β) Την ΑΗ τύπου 2 (AH-2), που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ειδικών αυτοαντισωμάτων έναντι μικροσωμιακών αντιγόνων ήπατος-νεφρών τύπου 1 (liver-kidney microsomal antibodies, αντι-LKM 1) ή/και αυτοαντισωμάτων κατά κυτοσολίων ήπατος τύπου 1 (antibodies against liver cytosol type 1, αντι-LC 1). γ) Την ΑΗ τύπου 3 (AH-3), που χαρακτηρίζεται από την ανίχνευση αντισωμάτων κατά διαλυτών αντιγόνων ήπατος (antibodies against soluble liver antigens, αντι-SLA), τα οποία, πολύ πρόσφατα, βρέθηκε ότι είναι τα ίδια αυτοαντισώματα με τα εκείνα κατά του αντιγόνου ήπατος-παγκρέατος (antibodies against liver-pangreas antigen, αντι-LP) (170). Τα αυτοαντισώματα αυτά αναφέρονται πλέον ως αντι-SLA/LP.


Η ΑΗ-1 έχει ισχυρή γενετική προδιάθεση (169). Μεταξύ των Καυκάσιων ασθενών της Βόρειας Ευρώπης και Αμερικής, η προδιάθεση
σχετίζεται με το γονίδιο DRB1: το DRB1*0301 είναι το κυριότερο αλλήλιο προδιάθεσης, ενώ το DRB1*0401 είναι δευτερεύον, αλλά ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για ΑΗ-1 (176-178). Τα γονίδια αυτά φαινεται να επηρεάζουν την κλινική έκφραση της νόσου: οι ασθενείς που φέρουν το DRB1*0301 είναι νεότεροι και απαντούν σε χαμηλότερο ποσοστό στη θεραπεία με κορτιζόνη σε σχέση με τους φέροντες το DRB1*0401 (179). Η γενετική βάση της ΑΗ-2 δεν έχει τεκμηριωθεί, παρόλα αυτά, η προδιάθεση για ΑΗ-2 φαινεται να σχετίζεται με το DRB1*0701 (180,181) και τα HLA B14, DR3, C4A-QO (182).

α) Αυτοαντισώματα στην ΑΗ-1.

Τα ANA και SMA δεν είναι ούτε ειδικά για την ΑΗ-1 ούτε φαινεται να σχετίζονται παθογενετικά με τη νόσο (183). Όπως προαναφέρθηκε, τα ANA ανιχνεύονται με την τεχνική ΕΑΦ με καλύτερο υπόστρωμα τα HEP2 κύτταρα. Τα SMA ανιχνεύονται με την ίδια τεχνική αλλά καλύτερο υπόστρωμα αποτελούν τομές κρυοστάτη ήπατος-νεφρών-στομάχου ορυκτών (θετικός τίτλος > 1:40) (157). Χρησιμοποιούντας ως υπόστρωμα τα κύτταρα HEP2, έχουν παρατηρηθεί διάφοροι τύποι φθορισμού των ANA, με συχνότερο τον ομοιογενή (34-58%) και τον στικτό (21-34%) (157,159,184). Τα αυτοαντιγόνα στόχοι των ANA στην ΑΗ-1 ποικίλλουν (μονής και διπλής έλικας DNA, tRNA, snRNPs, ιστόνες, κυκλίνη A, λαμινίνη Α και C, κεντρομερίδιο), χωρίς το καθένα να αφορά διαφορετικές κλινικές υποομάδες της ΑΗ-1 και να έχει κάποια ιδιαίτερη διαγνωστική αξία (150,157,159,184-188).
Τα SMA εμφανίζουν αντιδραστικότητα έναντι της F-ακτίνης, κυρίως, αλλά και άλλων συστατικών (τουμπουλίνη, βιμεντίνη, δεσμίνη, σκελετίνη) (169,188) (Εικόνα 6,7).

6.1. Κυτταροπλασματικός φθορισμός SMA σε κύτταρα HEp2

6.2. Φθορισμός του νεφρικού σπειράματος σε τομή νεφρού αρουραίου

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

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

Σε γενικές γραμμές δεν είναι αποδεκτό ότι οι επιμέρους αντιδραστικότητες των SMA έχουν κάποια διαγνωστική ή προγνωστική αξία.
Εντούτοις, η παρουσία SMA εναντίον της F-ακτίνης του κυτταροσκελετού χαρακτηρίζει την πορεία και την έκβαση των προσβληθέντων: οι ασθενείς αυτοί είναι νεότεροι, συνήθως HLA-DR3 θετικοί και παρουσιάζουν φτωχή απάντηση στη θεραπεία με τα κορτικοστεροειδή (159,189,190).


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

Τα αντι-SLA/LP αντισώματα δεν ανιχνεύονται με ΕΑΦ, αλλά με ραδιοενζυμικές μεθόδους, ανταγωνιστικές ELISA και μεθόδους ανοσοαποτύπωσης. Είναι ειδικά αυτοαντισώματα για την AH-1, καθώς μέχρι στιγμής δεν έχουν ανιχνευθεί σε χρόνιες και οξείες ιογενείς ηπατίτιδες (156,157,166,172,190,200). Το αυτοαντιγόνο στόχος τους είναι μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού 50kd, που αναγνωρίζεται από την ΑΗ-1 (170).
β) Αυτοαντισώματα στην ΑΗ-2.

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

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

Αλλες μέθοδοι ανίχνευσης των αντι-LKM-1 αποτελούν οι ανταγωνιστικές ELISA και η ανοσοαποτύπωση, καθώς και μια πιο πρόσφατη ευαίσθητη, ποσοτική μέθοδος, που στηρίζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων κατά του αυτοαντιγόνου-στόχου των αντι-LKM-1 (κυτόχρωμα Ρ450 2D6,
KYTP450 2D6), μετά από ανοσοκαθίζηση ανασυνδυασμένου και ραδιοσημασμένου με $^{35}$S μεθειονίνη KYTP450 2D6 (163,173).

Το αυτοαντιγόνο στόχος των αντι-LKM-1 αντισωμάτων, το KYTP450 2D6, είναι σημαντικό για το μεταβολισμό φαρμάκων, καθώς καταλύει την οξείδωσή τους με ένα άτομο οξυγόνου (mono-oxidation), ώστε να μετατραπούν σε μη τοξικούς, υδατοδιαλυτούς μεταβολίτες (201,204-206). Στην ΑΗ-2 τα αντι-LKM-1 αντισώματα αναγνωρίζουν μικρούς, επίπεδους κυρίως επιτόπους στο KYTP450 2D6 και πιο συγκεκριμένα πέντε αντιγονικές θέσεις, που βρίσκονται μεταξύ των πεπτιδίων 193-212, 257-269, 321-351, 373-389 και 410-429 (207-209). Η κύρια όμως αντιγονική θέση αναγνώρισης είναι η αλληλουχία πεπτιδίων 257-269 και η δεύτερη συχνότερη, η αλληλουχία 321-351 (207-210). Επιπλέον, πολύ πρόσφατα, με μοριακές τεχνικές βρέθηκε ότι η αντιγονική θέση 316-327 εντοπίζεται στην επιφάνεια του KYTP450 2D6 και μπορεί να αποτελεί κύριο στόχο των αντι-LKM-1 καθώς η αντιδραστικότητά των εν λόγω αυτοαντισωμάτων έναντι της περιοχής αυτής είναι ιδιαίτερα αυξημένη (211). Η αναγνώριση μικρών επιτόπων από τα αντι-LKM-1 στην ΑΗ-2 τα διαχωρίζει από τα αντι-LKM-1, που ανιχνεύονται σε ασθενείς με ηπατίτιδα C, καθώς τα τελευταία αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους, τόσο επίπεδους όσο και τρισδιάστατους (163,211-216).

Η συμμετοχή των αντι-LKM-1 αντισωμάτων στην παθογένεια της ηπατικής βλάβης της ΑΗ-2 φαίνεται πιθανή είτε μέσω του συμπληρώματος είτε μέσω της εξαρτώμενης από αντίσωμα κυτταροτοξικότητας (163,166,173,217). Απαραίτητη, πάντως, είναι η έκφραση του KYT450 2D6 στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων, πράγμα που έχει δειχθεί από πρόσφατες.
μελέτες, ανεξάρτητα από τη φυσιολογική μικροσωμιακή του εντόπιση (218-221).

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

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

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

3.4. Σύνδρομα επικάλυψης.

Ως σύνδρομα επικάλυψης χαρακτηρίζονται οι περιπτώσεις εκείνες ασθενών που πληρούν τα διαγνωστικά κριτήρια δύο από τα τρία κύρια αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (ΠΧΚ, ΑΗ και ΠΣΧ) (210,235-237). Πιο συγκεκριμένα, διακρίνονται δύο οντότητες: i) το σύνδρομο επικάλυψης μεταξύ ΑΗ και ΠΧΚ και ii) το σύνδρομο επικάλυψης μεταξύ ΑΗ και ΠΣΧ, ενώ δε φαίνεται να υπάρχει σύνδρομο επικάλυψης μεταξύ ΠΧΚ και ΠΣΧ (210, 235-237) (Σχήμα 5).
Σχήμα 5. Διαγνωστικός αλγόριθμος συνδρόμων επικάλυψης αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος. Η οροθετικότητα για SMA, ANA ή anti-LKM-1, υψηλός τίτλος γ-σφαιρινών ή IgG, παρουσία περιπυλαίας ηπατίτιδας στην ιστολογική εξέταση και/ή συνολικό 'score' πάνω από 15 σύμφωνα με το σύστημα βαθμοποίησης του IAHG στηρίζουν τη διάγνωση της ΑΗ. Συνύπαρξη θετικών AMA, κλινικών ή/και εργαστηριακών ευρημάτων χολόστασης και ιστολογικών ευρημάτων χολαγγειίτιδας υποδεικνύουν τη διάγνωση συνδρόμου επικάλυψης ΑΗ και ΠΧΚ. Αντίθετα, απουσία AMA, κλινικών ή/και εργαστηριακών ευρημάτων χολόστασης, συνύπαρξη ελκώδους κολίτιδας και παθολογικά χολαγγειογραφικά ευρήματα στην ERCP ή την MRCP υποδεικνύουν τη διάγνωση συνδρόμου επικάλυψης ΑΗ και ΠΣΧ (Gut 2001; 49 σελ. 591).

Η συμπεριφορά του καθενός συνδρόμου επικάλυψης και η απάντηση στη θεραπεία εξαρτώνται κύρια από τη νόσο που κυριαρχεί στην κλινική και/ή εργαστηριακή εικόνα (210,238-241). Η αναγνώριση αυτών των συνδρόμων είναι σημαντική, αφού μπορεί να συνεισφέρει τόσο στην απόφαση για αλλαγή
στρατηγικής στη θεραπεία όσο και στη διευκρίνιση της παθογένεσης των
tυπικών των αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος (210,242).
Βιβλιογραφία 1


43. Tzioufas AG, Terzoglou C, Stavropoulos ED, et al. Determination of anti-dsDNA antibodies by three different methods: comparison of


75. Biron C, Andreani H, Blanc P, et al. Prevalence of antiphospholipid antibodies in patients with chronic liver disease related to alcohol or


96. Γούσια ΑΧ, Μανουσάκης MN, Γερμανίδης ΓΣ, και συν. Αντισώματα κατά αντιγόνων κυτταροπλάσματος ουδετερόφιλων σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα. Ελλ Ρευματολογία 1991; 3:121-130.

97. Γερμενής ΑΕ. Διαγνωστική Ανοσολογία. Λάρισα 2002.


104. Davenport A. ’False positive’ perinuclear and cytoplasmic antineutrophil antibody results leading to misdiagnosis of Wegener’s granulomatosis and/or microscopic polyarteritis. Clin Nephrol 1992; 37:124-130.


150. ΓΝ Νταλέκος. Μοριακά ταυτοποιημένα αυτοαντιγόνα-στόχοι στη διάγνωση, διαφοροδιάγνωση και μελέτη της αιτιοπαθογένειας των αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος. Ιατρική 1999, 75: 408-418.


on Microsomes and Drugs Oxidations, Montpellier, France 1998
(Abstract No 416).

235. Czaja AJ. Frequency and nature of the variant syndromes of

236. Czaja AJ. Variant forms of autoimmune hepatitis. Curr Gastroenterol

Hepatology 2001; 33:994-1002.

Characterization of the overlap syndrome of primary biliary cirrhosis
(PBC) and autoimmune hepatitis: evidence for it being a hepatitic form
of PBC in genetically susceptible individuals. Hepatology 1999;
29:1078-84.

239. Chazouilleres O, Wendum D, Serfaty L, et al. Primary biliary cirrhosis-
autoimmune hepatitis overlap syndrome: clinical features and response
to therapy Hepatology 1998; 28:296-301.

overlapping primary sclerosing cholangitis in five cases. Am J
Gastroenterol 1998; 93:777-84.

autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis in two cases.
Eur J Gastroenterol Hepatol 2000; 12:559-64.

investigational and clinical challenges. Hepatology 2000; 31:1194-
1200.
Η ιονοφόρηση από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) αποτελεί μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας, παγκοσμίως (1). Σύμφωνα με τα στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), 170 εκατομμύρια άνθρωποι, δηλαδή περίπου 3% του πληθυσμού της υδρογείου, έχουν μολυνθεί από τον HCV, ενώ τα νέα κρούσματα υπολογίζονται σε 3 με 4 εκατομμύρια κάθε χρόνο (1,2). Το πρόβλημα είναι ιδιαίτερα μεγάλο καθώς σημαντικό ποσοστό των μολυνθέντων αναμένεται να αναπτύξει κίρρωση ή/και ηπατοκυτταρικό καρκίνο μετά πάροδο 20-30 ετών από τη μόλυνση. Ο επιπολασμός της λοίμωξης από τον HCV παρουσιάζει ευρεία γεωγραφική κατανομή: στις ΗΠΑ η συχνότητα της ηπατίτιδας C σε αιμοδοτικό πληθυσμό κυμαίνεται στο 0.1-1.8% (3,4), στη Δυτική Ευρώπη φαίνεται ότι το 0.005-1% περίπου του πληθυσμού έχει μολυνθεί (4,5), στη λεκάνη της Μεσογείου το ποσοστό των χρονίως
πασχόντων είναι υψηλότερο φτάνοντας στην Αίγυπτο το 13% του πληθυσμού (5,6), ενώ στις χώρες της Ανατολικής Ευρώπης η συχνότητα της λοίμωξης φτάνει περίπου το 5% (7). Στον Πίνακα 1 φαίνεται ο εκτιμώμενος επιπολασμός της ηπατίτιδας C από τον WHO το 1999, ενώ ο χάρτης 1 συνοψίζει τα επιδημιολογικά δεδομένα, που κατατέθηκαν στον WHO 131 χώρες μέχρι τον Ιούνιο 1999.

Πίνακας 1. Εβδομαδιαία επιδημιολογική αναφορά. No 49, 10 Δεκεμβρίου 1999, WHO.

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

Στην Ελλάδα τα ποσοστά της λοίμωξης στον αιμοδοτικό πληθυσμό κυμαίνονται από 0.14 έως 0.83% (8,9). Στον αιμοδοτικό όμως πληθυσμό, όπως είναι γνωστό, δεν περιλαμβάνονται ομάδες υψηλού κινδύνου για λοίμωξη από τον HCV, όπως αυτές με ιστορικό μεταγγίσεων, τοξικομανίας, οι
Χάρτης 1. Παγκόσμια επίπτωση της ηπατίτιδας C, Ιούνιος 1999
ηλικιωμένοι και επομένως ο επιπολασμός της λοίμωξης αναμένεται να είναι μικρότερος από ότι στο γενικό πληθυσμό. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της διαστροφάς της λοίμωξης και καθησυχασμό των Υπηρεσιών Υγείας. Σε πρόσφατη μελέτη μελέτη ο επιπολασμός της λοίμωξης από τον HCV στον γενικό πληθυσμό της χώρας βρέθηκε 1.9% με εύρος 0.6-7.5%, ποσοστό σημαντικά υψηλότερο εκείνου των αιμοδοτών (10), ενώ έχουν βρεθεί και ενδημικές περιοχές [πχ σε μερικά χωριά της Κρήτης ο επιπολασμός ανέρχεται στο 10% (11)].

1.1. Τρόποι μετάδοσης

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

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

Κατ’ επέκταση, ως παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη από τον HCV θεωρούνται: η χρήση ενδοφλεβίων ναρκωτικών ουσιών (περιλαμβάνει και τη χρησιμοποίηση μολυσμένων με αίμα εργαλείων κατά τη χρήση κοκαΐνης από τη ρίνα), η χρόνια αιμοκάθαρση, η μετάγγιση παραγώγων αίματος, η
διενέργεια τατουάζ, η συχνή νοσοκομειακή έκθεση και η μεταμόσχευση οργάνων από HCV-θετικούς δότες (4,12). Η σεξουαλική μετάδοση του HCV είναι πολύ σπάνια, ενώ σπάνια είναι και η κάθετη μετάδοση από τη μητέρα στο παιδί (με συχνότητα μετάδοσης κάτω του 6%), οπότε πρακτικά η συμμετοχή των παραγόντων αυτών στη μετάδοση της λοίμωξης από τον HCV είναι πολύ μικρή (13).

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

1.1.1. Μετάδοση με την παρεντερική οδό

Α) Μετάγγιση αίματος ή παραγώγων του

Οι μεταγγίσεις μη ελεγμένων μονάδων αίματος και παραγώγων του καθώς και η χρήση παραγόντων πηξής, που δεν επεξεργάστηκαν ώστε να απενεργοποιηθούν οι ιοί, είχε σαν αποτέλεσμα τη μετάδοση της HCV λοίμωξης σε μεγάλο αριθμό ατόμων στο παρελθόν. Έτσι η μετά μετάγγιση ηπατίτιδα μη-Α, μη-Β αποτελούσε τη συχνότερη μετά μετάγγιση ηπατίτιδα στις δεκαετίες του '70 και '80 (14,15). Η συχνότητα της μετά μετάγγισης ηπατίτιδας σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό και την ποσότητα των παραγώγων αίματος, που μεταγγίστηκαν (4). Κατά συνέπεια μεγάλο ποσοστό πολυμεταγγιζόμενων ατόμων, που έλαβαν μεταγγίσεις πριν το 1990-91 (όταν άρχισε η ευρεία χρήση των ανοσοενζυμικών μεθόδων ανίχνευσης των αντισωμάτων έναντι του HCV τόσο για λόγους διαγνωστικούς όσο και για την επιλογή των αιμοδοτών) εμφανίζει αντισώματα έναντι του HCV. Πράγματι την προηγούμενη δεκαετία φαίνεται ότι μολύνθηκε το 80% των θαλασσαμβικών
ασθενών, το 46-90% των αιμορροφικών και το 75% των ασθενών με ιστορικό μεταγγίσεων λόγω κακοήθων αιματολογικών νοσημάτων (4,16,17). Σήμερα, ο συστηματικός έλεγχος των αιμοδοτών με ευαίσθητες και ειδικές ανοσοενζυμικές μεθόδους (ELISA 2η και 3η γενεάς, που ανιχνεύουν την ορομετατροπή σε 2-3 εβδομάδες από την έκθεση στον ιό) και η χρήση τεχνικών εξουδετέρωσης των ιών κατά την παρασκευή των παραγώγων αίματος έχει απαλείψει, σχεδόν, τον κίνδυνο της μετάδοσης της νόσου με τις μεταγγίσεις (18). Στις μέρες μας, ο κίνδυνος μετάδοσης της λοίμωξης από τον HCV μετά από μετάγγιση στις ΗΠΑ εκτιμάται ότι είναι 0.004-0.0004% για κάθε μονάδα αίματος, που μεταγγίζεται (2). Παράλληλα, αρχίζουν σε αρκετές χώρες να εφαρμόζονται ακόμα πιο ευαίσθητες τεχνικές ανίχνευσης του ιού στις αιμοδοσίες, όπως η μέθοδος NAT (nucleic acid amplification testing), ώστε να εξαλειφθεί και η οπτικοακουστική μέθοδος ανίχνευσης των anti-HCV αντισωμάτων, όταν ο αιμοδότης βρίσκεται στην περίοδο παραθύρου από πολύ πρόσφατη μόλυνση (κάτω των 2-3 εβδομάδων). Β) Νοσοκομειακή μετάδοση

Η μετάδοση του HCV εντός του νοσοκομείου, είναι καλά τεκμηριωμένη. Στις αναπτυγμένες χώρες, αυτός ο τρόπος μετάδοσης δεν είναι συχνός, με εξαίρεση της αιμοκαθαιρομένου ασθενείας: η ομάδα αυτών των ασθενών εμφανίζει θετικά anti-HCV αντισώματα σε ποσοστό 30-70% (2,19). Στην Ελλάδα, το ποσοστό κυμαίνεται περίπου στο 12-17% (20,21). Το ποσοστό
της λοίμωξης από τον HCV, μεταξύ των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών, είναι πιθανό να είναι ακόμη μεγαλύτερο, καθώς λόγω της ανοσοκαταστολής που εμφανίζουν, υπάρχει η πιθανότητα να μην παράγουν αντι-HCV αντισώματα ή να παράγουν αντισώματα σε χαμηλούς τίτλους, που δεν είναι ανιχνεύσιμα με τις συνήθεις ανοσοενζυμικές μεθόδους. Παρ' όλα αυτά, η πιθανή ύπαρξη ιαιμίας (ανιχνευόμενης με μοριακές τεχνικές) σε αντι-HCV αρνητικούς αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, είναι αμφιλεγόμενη (22,23). Ο υψηλός επιπολασμός της HCV λοίμωξης στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς σχετίζεται με: α) τον αριθμό των μεταγγίσεων (πριν το 1991), β) τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης και γ) τη μετάδοση εντός της μονάδας τεχνητού νεφρού (24).

Η νοσοκομειακή μετάδοση φαίνεται να αποτελεί μια από τις κυριότερες πηγές μόλυνσης από τον HCV σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες, λόγω της πλημμελείας εφαρμογής των κανόνων υγιεινής και πρόληψης της μετάδοσης λοίμωξεων. Η εφαρμογή μη ασφαλών πρακτικών διενέργειας ενέσεων ενέχει σοβαρό κίνδυνο μετάδοσης της λοίμωξης. Στον τρόπο αυτό μετάδοσης υπολογίζεται ότι οφείλονται 2.3 με 4.7 εκατομμύρια νέες λοιμώξεις από τον HCV κατ' έτος (6,25). Τέτοιες πρακτικές αποτελούν: η επαναλαμβανόμενη χρήση βελονών και συριγγών (κανονικά έπρεπε να είναι μιας χρήσης), η μόλυνση των φιαλιδίων σημερίδων δόσεων, η επιτέλεση ενέσεων εξωνοσοκομειακά, συχνά από άτομα που δεν έχουν σχέση με τις υπηρεσίες παροχής υγείας, η κατάχρηση ενέσιμων φαρμάκων (θα μπορούσαν το ίδιο αποτελεσματικά να χορηγηθούν από το στόμα), η επαναλαμβανόμενη χρήση βελονών κατά την επιτέλεση 'παραδοσιακών' τεχνικών (όπως διενέργεια 'κοφτών' βεντουζών, σκαρφισμού, κλπ). Παρ' όλο, που η νοσοκομειακή
μετάδοσή του HCV είναι σπάνια πηγή λοίμωξης στις αναπτυγμένες χώρες, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις μετάδοσής του ιού σε νοσηλευόμενους ασθενείς, όπως η περιγραφείσα από Σουηδούς μελετητές μετάδοσή του HCV σε 37 ασθενείς με αιματολογικά προβλήματα, που νοσηλεύτηκαν εκ περιτροπής στους ίδιους θαλάμους κατά το διάστημα 1990-93 και αποδόθηκε σε ενδονοσοκομειακή μετάδοση από ασθενή σε ασθενή (26), ή η μετάδοση μετά από ενδοσκόπτηση στη Γαλλία, που αποδόθηκε στην πλημμελή απολύμανση του ενδοσκοπίου (27). Επιπλέον, έχουν περιγραφεί στη βιβλιοφραφία μεμονωμένα περιστατικά μετάδοσης της λοίμωξης από ιατρό σε ασθενείς (28,29). Παγκοσμίως, οι ασχολούμενοι στο χώρο της υγείας αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου: προοπτικές μελέτες υπολογίζουν ότι μετά από τρύπημα με βελόνα από HCV θετικό ασθενή το 2-5% των ατόμων θα αναπτύξει λοίμωξη (30).

Γ) Ενδοφλέβια χρήση τοξικών ουσιών

Μετά το 1991 (χρονολογία ελέγχου των αντι-HCV αντισωμάτων στις φίαλες αίματος), η μετάδοση μέσω της ενδοφλέβιας χρήσης τοξικών ουσιών αποτελεί τη σημαντικότερη οδό μόλυνσης από τον HCV στις αναπτυγμένες χώρες. Ο επιπολασμός της λοίμωξης από τον HCV στους χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών, κυμαίνεται στο 31-98% στις διάφορες χώρες (4,31,32). Για τη λοίμωξη στους χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών ευθύνονται, κυρίως, η ανταλλαγή βελονών, η χρήση μη αποστειρωμένων συριγγών και λιγότερο τατουάζ ή οι κοινωνικοοικονομικές συνθήκες (31,32). Η μόλυνση με τον ιό επέρχεται χρονικά πολύ νωρίς από την έναρξη της ενδοφλέβιας χρήσης τοξικών ουσιών, με αποτέλεσμα το 20-40% των
χρηστών να έχουν μολυνθεί κατά τον πρώτο χρόνο της χρήσης, ποσοστό, που ανέρχεται στο 92% γι’ αυτούς που κάνουν χρήση πάνω από 5 χρόνια (2).

1.1.2. Μετάδοση με μη παρεντερική οδό

Α) Σεξουαλική και ενδοοικογενειακή μετάδοση

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

Ενδοοικογενειακή διασπορά του HCV μπορεί να επιτευχθεί, καθώς η οροθετικότητα για αντι-HCV αντισώματα φαίνεται να είναι 5-10 φορές μεγαλύτερη μεταξύ οικογενειών με ένα αντι-HCV θετικό μέλος, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Πράγματι, η συχνότητα της λοίμωξης από τον HCV κατά την ενδοοικογενειακή (μη σεξουαλική) επαφή κυμαίνεται από 0% ως 11% (4).
Τα παιδιά έχουν μικρότερο κίνδυνο προσβολής από τους συζύγους. Ο πιθανότερος τρόπος ενδοοικογενειακής μετάδοσης της λοίμωξης είναι η αφανής διαδερμική έκθεση στον ιό με την κοινή χρήση μολυσμένων βελονών, αιχμηρών αντικειμένων (πχ ξυραφάκια) ή οδοντοβουρτσών. Το κατά πόσο υπάρχει πραγματικά αυξημένος κίνδυνος διασποράς της λοίμωξης μεταξύ των συζύγων εκ των οποίων ο ένας είναι αντι-HCV θετικός και κατά πόσο η διάρκεια του έγγαμου βίου παίζει κάποιο ρόλο στη μετάδοση, αποτελεί θέμα αντικρουόμενων απόψεων στη βιβλιογραφία (2-5,35,36). Γενικώς όμως, ο κίνδυνος τόσο της σεξουαλικής όσο και της ενδονοσοκομειακής μετάδοσης του HCV είναι σαφώς χαμηλότερος από αυτόν της μετάδοσης του ιού της ηπατίτιδας Β.

B) Περιγεννητική μετάδοση

Ο κίνδυνος μετάδοσης από τη μητέρα στο παιδί υπολογίζεται στο 5% περίπου όταν δεν υπάρχει συνλοίμωξη από τον ιό της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (HIV) (37-39). Σε HIV θετικές μητέρες το ποσοστό μετάδοσης στα νεογνά αυξάνεται σημαντικά (πάνω από 3 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με τις HIV αρνητικές μητέρες) (39-43). Σε HIV αρνητικές μητέρες η μετάδοση του HCV στα νεογνά σχετίζεται με την παρουσία ιαιμίας κατά τον τοκετό. Πράγματι, έχει δειχθεί ότι όσο υψηλότερο είναι το HCV-RNA στην οροφή της μητέρας τόσο μεγαλύτερος είναι ο κίνδυνος μετάδοσης της λοίμωξης στο νεογνό, χωρίς όμως να έχει καθοριστεί μέχρι σημείο στιγμής αςφαλείς, για το νεογνό, επίπεδο του HCV RNA (4,37,42,44). Το είδος του τοκετού δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό μετάδοσης (38,41), αν και μια πρόσφατη μελέτη (37) δείχνει ότι η εκλεκτική καισαρική τομή (πριν τη ρήξη των
μεμβρανών) σχετίζεται με μικρότερο κίνδυνο μετάδοσης. Ανεπαρκή στοιχεία υπάρχουν για τον κίνδυνο κάθετης μετάδοσης κάτα την διενέργεια εξωσωματικής γονιμοποίησης σε ασθενείς με ηπατίτιδα C (13). Ο θηλασμός, επίσης, εφόσον η μητέρα είναι HIV αρνητική, δε φαίνεται να αποτελεί παράγοντα κινδύνου, καθώς σχετίζεται πρακτικά με μηδενική πιθανότητα μετάδοσης της λοίμωξης από τη μητέρα στο παιδί (13,37,40).

1.1.3. Σποραδική ή κρυψιγενής μετάδοση

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

1.2. Η έκταση του προβλήματος

Στις αναπτυγμένες χώρες, η λοίμωξη από τον HCV αποτελεί την αιτία του 20% των περιπτώσεων ηπατίτιδας, του 70% των περιπτώσεων χρόνιας ηπατίτιδας, του 40% των περιπτώσεων κίρρωσης τελικού σταδίου, του 60% των περιπτώσεων ηπατοκυτταρικού καρκίνου και του 30% των μεταμοσχεύσεων ήπατος (46). Καθώς ο επιπλασμός της λοίμωξης από τον
ΗCV είναι σημαντικός στον γενικό πληθυσμό ηλικίας 30-45 ετών σε πολλές χώρες, η σχετιζόμενη με τον HCV νοσηρότητα και θνητότητα αναμένεται να αυξηθεί σημαντικά τις δύο επόμενες δεκαετίες. Πρόσφατοι υπολογισμοί στις ΗΠΑ, τον Καναδά και την Γαλλία προβλέπουν αύξηση κατά 61-92% των περιπτώσεων κίρρωσης, κατά 68-102% των περιπτώσεων ηπατοκυτταρικού καρκίνου, κατά 279% των περιπτώσεων μη αντιρροπούμενης κίρρωσης, κατά 126-223% των θανάτων από ηπατική νόσο και κατά 528% των αναγκών για μεταμόσχευση ήπατος εξ' αιτίας της HCV λοίμωξης ως το έτος 2008, χωρίς αποτελεσματική θεραπευτική παρέμβαση (47-49).
2. O ΙΟΣ TΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C (HCV).

2.1. H δομή του HCV.

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

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

Το γονιδίωμα του HCV αποτελείται από 9600 περίπου νουκλεοτίδια (Σχήμα 1) με ένα και μοναδικό ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF), μήκους 9000 νουκλεοτίδιών περίπου (52). Του πλαίσιο προηγούνται και έπονται αριθμός σιωπηρών νουκλεοτίδων, που συνιστούν τις 5' και 3' μη κωδικογραφούσες περιοχές του ιού (μη μεταφραζόμενη περιοχή, untranslated region, UTR), ενώ το ORF κωδικογραφεί μια πολυπρωτεΐνη, που αποτελείται από 3000 περίπου αμινοξέα, η οποία διασπάται, με τη βοήθεια πρωτεασών του ιού όσο και του ξενιστή, σε 10 τουλάχιστο δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες (Πίνακας 2).
Σχήμα 1. HCV: οργάνωση του γονιδιώματος (από το: The hepatitis C virus, Update on Viral Hepatitis, AASL 1999).

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Πρωτεϊνή</th>
<th>Μοριακή μάζα (kDa)</th>
<th>Λειτουργία</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>C</td>
<td>21</td>
<td>Πρωτεϊνή νουκλεοκαψιδίου</td>
</tr>
<tr>
<td>E1</td>
<td>31-35</td>
<td>Πρωτεϊνή ιικού φακέλου</td>
</tr>
<tr>
<td>E2</td>
<td>68-72</td>
<td>Πρωτεϊνή ιικού φακέλου</td>
</tr>
<tr>
<td>P7</td>
<td>7</td>
<td>Άγνωστη</td>
</tr>
<tr>
<td>NS2</td>
<td>23</td>
<td>Συστατικό της NS2-3 πρωτεάσης</td>
</tr>
<tr>
<td>NS3</td>
<td>70</td>
<td>Συστατικό της NS2-3 πρωτεάσης, πρωτεάσης της σερίνης και της ελικάσης</td>
</tr>
<tr>
<td>NS4A</td>
<td>8</td>
<td>Συμπαράγοντας της NS3 πρωτεάσης της σερίνης</td>
</tr>
<tr>
<td>NS4B</td>
<td>27</td>
<td>Άγνωστη</td>
</tr>
<tr>
<td>NS5A</td>
<td>58</td>
<td>Άγνωστη (πιθανώς να σχετίζεται με την αντίσταση στην ιντερφερόνη)</td>
</tr>
<tr>
<td>NS5B</td>
<td>68</td>
<td>RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Η 5′ UTR περιοχή του ιοκού γονιδιώματος, που αποτελείται από 340 νουκλεοτίδια, χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό συντήρησης της αλληλουχίας των βάσεων του και έχει σημαντική ομολογία αλληλουχίας νουκλεοτίδιων με την αντίστοιχη περιοχή των pesti-ϊών και του GBV-B. Η 5′ UTR παρουσιάζει εκτεταμένη δευτερεύουσα δομή, λόγω του ενδομοριακού ζευγαρώματος νουκλεοτίδιων με αποτέλεσμα το σχηματισμό αγκυλών, που συνιστούν αναγνωριστικά στοιχεία της περιοχής αυτής με ρυθμιστικό ρόλο στην αναγνώριση του πλαισίου ανάγνωσης (54). Συγκεκριμένα, η περιοχή που είναι γνωστή ως εσωτερική περιοχή εισόδου ριβοσωμάτων (internal ribosome entry site, IRES), ελέγχει τη μετάφραση (Σχήμα 1), ενώ άλλες αλληλουχίες νουκλεοτίδιων της 5′ UTR χρησιμοποιούν ως σήματα πολλαπλασιασμού είτε μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με το άκρο 3′ του γονιδιώματος είτε μέσω έμμεσων αλληλεπιδράσεων RNA-πρωτεϊνών. Εξαιτίας αυτών των ιδιοτήτων της, η 5′ UTR περιοχή του HCV καθίσταται καλά αναγνωρισμένος στόχος για αντι-ιοκή θεραπεία κατευθυνόμενη κατά το RNA, με τη χρησιμοποίηση αντικωδογόνων ολιγονουκλεοτιδίων κατά του IRES ώστε να εμποδιστεί η μετάφραση του γονιδιώματος (55-57).

Η περιοχή 3′ UTR του ιοκού γονιδιώματος αποτελείται από μια μεταβλητή περιοχή 27 βάσεων, μια πολυπυριμιδινική «ουρά» ποικίλου μήκους και στο τέλος ακολουθεί μια καλά συντηρημένη αλληλουχία 98 νουκλεοτίδιων, που θεωρείται απόλυτα αναγκαία για τον πολλαπλασιασμό του ιού. Συγκεκριμένα, οι τρεις σταθερές αγκύλες, που σχηματίζουν τη συντηρημένη αυτή αλληλουχία της 3′ UTR του HCV (Σχήμα 1), παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην αναπαραγωγή του ιού και κυρίως στη σύνθεση του
αρνητικής κατεύθυνσης γονιδιώματος, που αποτελεί τη μήτρα για τη σύνθεση των θετικής κατεύθυνσης γονιδιωμάτων των νέων στελεχών του ιού. Για αυτό το λόγο, η περιοχή αυτή μπορεί να αποτελέσει επίσης στόχο αντι-ιηκής παρέμβασης με 'αντικωδογόνα ολιγονουκλεοτίδια' (58).

Το RNA του HCV συνδέεται με την πρωτεΐνη του πυρηνοκαψιδίου σχηματίζοντας το νουκλεοκαψίδιο, το οποίο είναι σφαιρικό, διάμετρου 30nm περίπου. Το λοιμογόνο ιικό σωμάτιο αποτελείται από το νουκλεοκαψίδιο και από ένα περίβλημα, που προέρχεται κυρίως από μεμβράνες των κυττάρων του ξενιστή και περιέχει δύο ιικές γλυκοπρωτεΐνες την Ε1 και την Ε2 (59,60).

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

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

• Τις πρωτείνες E1 και E2, που είναι Ν-γλυκοζυλιωμένες πρωτείνες με μοριακές μάζες 31kDa και 70kDa, αντίστοιχα, παρουσιάζουν μεγάλη γενετική
ετερογένεια μεταξύ των διαφόρων στελεχών του HCV. Το αμινοτελικό άκρο της E2 πρωτεΐνης είναι εξαιρετικά μεταβλητό και χαρακτηρίζεται ως «υπερμεταβλητή περιοχή 1» (hypervariable region 1, HVR1), ενώ στον γονότυπο 1b του ιού ταυτοποιήθηκε και δεύτερη υπερμεταβλητή περιοχή (HVR2), που βρίσκεται αμέσως μετά την ΗVR1 (53). Η περιοχή ΗVR1 θεωρείται ότι αποτελεί καθοριστικό στόχο των εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι του HCV (62, 63). Επιπλέον, η υπερμεταβλητή αυτή περιοχή αλλάζει ταχέως σε HCV ασθενείς με χρόνια λοίμωξη. Ο ρυθμός δημιουργίας μεταλλαγών αυξάνει σε ασθενείς, που υποβάλλονται σε ανοσοδιέγερση, ενώ οι μεταλλαγές του γονιδιώματος φαίνεται να σχετίζονται με εκλεκτική διαφυγή από προηγούμενη ανοσιακή απάντηση. Επομένως, η περιοχή ΗVR1 του HCV πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην εμμονή της λοίμωξης και τη μετάπτωσή της σε χρόνια (64).

Επιπρόσθετα, αν και ο μηχανισμός με τον οποίο ο HCV εισέρχεται στα κύτταρα δεν είναι επακριβώς γνωστός, φαίνεται πολύ πιθανό ότι οι πρωτεΐνες E1 και E2 του φακέλου σχετίζονται με τη σύνδεση του ιού με κυτταρικούς υποδοχείς και την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή. Οι Pileri et al (65) έδειξαν ότι το μόριο CD81 αποτελεί πιθανό υποδοχέα του HCV, που συνδέεται με την πρωτεΐνη E2. Σε αντίθεση, όμως, με τα παραπάνω έρχεται μία επίσης πρόσφατη μελέτη των Agnello et al (66), που δείχνει ότι ο HCV, όπως και άλλα μέλη της οικογένειας των flavivi-ιών, εισέρχονται στα κύτταρα με ενδοκύτωση μέσω του υποδοχέα των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL).
Το υπόλοιπο της πολυπρωτεΐνης, διασπάται σε έξι ή επτά μη δομικές πρωτεΐνες (Πίνακας 2) (δεν είναι γνωστό αν η p7 είναι δομική ή μη δομική πρωτεΐνη):

- Η NS2 πρωτεΐνη (p23) σε συνεργασία με την NS3, επιφέρει το διαχωρισμό της NS2 από το υπόλοιπο μη δομικό υλικό.
- Η NS3 πρωτεΐνη (p70) έχει διπλή ιδιότητα, ενεργώντας ως πρωτεάση σερίνης και ως ελικάση. Η πρώτη ιδιότητά της εντοπίζεται στο αμινικό άκρο της και ευθύνεται για την πρωτεολυτική επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης δρώντας στις NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A και NS5A/NS5B περιοχές. Το καρβοξυλικό άκρο της NS3 πρωτεΐνης περιέχει μία RNA-ελικάση και μία νουκλεοτιδική τριφωσφατάση (NTPase). Η ελικάση ευθύνεται για το ξεδίπλωμα του RNA κατά τον ιικό πολλαπλασιασμό, ενώ η NTPase έχει την ιδιότητα να δεσμεύει RNA. Η τρισδιάστατη μορφή της πρωτεΐνης έχει διαλευκανθεί επαρκώς με κρυσταλλογραφικές μελέτες (67) και αποτελεί καλό στόχο αδρανοποίησης από αναστολείς, οι οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά σαν αναστολείς του ιικού πολλαπλασιασμού (68,69).
- Η NS4A πρωτεΐνη ενεργεί ως βοηθητικός συντελεστής της NS3 πρωτεάσης της σερίνης, με την οποία δημιουργεί σταθερό σύμπλοκο και είναι απαραίτητη για τη διάσπαση των περιοχών NS3/NS4A και NS4B/NS5A.
- Οι λειτουργίες των NS4B και NS5A πρωτεϊνών είναι προς το παρόν άγνωστες. Μια μικρή περιοχή της NS5A πρωτεΐνης (interferon sensitivity determining region, ISDR) βεβαιώνει ότι πιθανώς εμπλέκεται στην τροποποίηση της απάντησης του ξενιστή στην ιντερφερόνη (70), αν και το όλο θέμα είναι αμφιλεγόμενο (71). Ειδικότερα, μεταλλαγές στην περιοχή αυτή
φαίνεται να συσχετίζονται με την απάντηση του γονότυπου 1b του HCV στη θεραπεία με α-ιντερφερόνη (α-IFN), καθώς η NS5A πρωτεΐνη χαρακτηρίζεται από την ικανότητα να αναστέλλει τη δράση της επαγόμενης από την ιντερφερόνη πρωτεΐνης PKR και τους επίσης επαγόμενους από την ιντερφερόνη διαβιβαστές Jak-Stat (72-74). Εντούτοις, η απάντηση αυτή φαίνεται ότι δεν επιφέρει παρατεταμένη ιολογική ανταπόκριση αλλά μόνο βιοχημική, όπως έδειξαν πρόσφατα οι Κουρούμαλης και συν (75).

- Η NS5B πρωτεΐνη, της οποίας η τριτοταγή δομή έχει πρόσφατα προσδιοριστεί (76), αποτελεί μία RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, που χρησιμοποιεί για τη σύνθεση νέων RNA αλύσων του ιού. Η σημαντική πιθανότητα σφάλματος της NS5B πρωτεΐνης της RNA πολυμεράσης (συχνότητα εσφαλμένης ενσωμάτωσης νουκλεοτιδίων 10^{-4} ως 10^{-6} ανά νουκλεοτιδική θέση, ανά κύκλο πολλαπλασιασμού του HCV) ευθύνεται για τη μεγάλη ετερογένεια παρόμοιων ικίων γονιδιωμάτων, που παρουσιάζει ο HCV (77).

2.2. Η γενετική ετερογένεια του HCV.

Η γενετική ετερογένεια του HCV, όπως όλων των RNA ιών, είναι πραγματικά αξιοσημείωτη και πιθανότατα, όπως προειπώθηκε, οφείλεται στην αυξημένη πιθανότητα σφάλματος της NS5B πρωτεΐνης της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης και στην έλλειψη επιδιορθωτικών μηχανισμών των σφαλμάτων αυτών.

2.2.1. Γονότυποι του HCV

Τα στελέχη του ιού, που έχουν απομονωθεί ως σήμερα παγκοσμίως, ταξινομήθηκαν σε 6 μείζονες γονότυπους και πάνω από 100 υπότυπους (78-80). Με εφαρμογή της μεθόδου της φυλογενετικής ανάλυσης οι γονότυποι,
υπότυποι και στελέχη (isolates) του HCV διακρίνονται με βάση την ποσοστιαία κατά μέσο όρο διαφοροποίηση επί της συνολικής αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων τους κατά περίπου 30%, 20% και 10% αντίστοιχα (78-80).

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

Οι γονότυποι του HCV παρουσιάζουν γεωγραφική κατανομή: οι γονότυποι 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3α ευθύνονται για το 90% των λοιμώξεων στην Ευρώπη, Αμερική, Ρωσία, Κίνα, Ιαπωνία και Αυστραλία, ο γονότυπος 4 απαντάται κυρίως στην Κεντρική Αφρική, ο γονότυπος 5α βρίσκεται κυρίως
στην Νότια Αφρική και ο γονότυπος 6 στη Νοτιοανατολική Ασία. Επιπλέον, η κατανομή των γονοτύπων διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ομάδων της ίδιας γεωγραφικής περιοχής. Για παράδειγμα, στις δυτικές χώρες στο μεγαλύτερο ποσοστό των χρηστών ενδοφλεβίων ναρκωτικών με λοίμωξη από τον HCV, στις Δυτικές χώρες, απαντάται ο γονότυπος 3a ή 2 (90).

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

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

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

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

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

Επιπλέον, έχει πρόσφατα δειχθεί, ότι τα παρόμοια γονιδίωματα του HCV, που συναντώνται στο ήπαρ διαφέρουν από αυτά, που ανιχνεύονται στον ορό και στα περιφερικά μονοπύρηνα κύτταρα γεγονός που υποδεικνύει ότι η μόλυνση των κυττάρων του λεμφικού ιστού, πιθανώς, ευνοεί την επιλογή συγκεκριμένων παρομοίων γονιδιωμάτων του ιού (101-104). Επιπλέον, ύπαρξη διαφοροποιημένων, μεταξύ τους, 'σχεδών ειδών' έχει εντοπιστεί σε υποομάδες περιφερικών μονοπυρήνων κυττάρων, όπως στα CD8⁺ (κυτταροτοξικά) λεμφοκύτταρα, στα μονοκύτταρα και μακροφάγα (CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺), αλλά και στα Β λεμφοκύτταρα (CD19⁺), που σχετίζονται με την παραγωγή αντισωμάτων (101). Η πιθανή μόλυνση των κυττάρων αυτών, και
ιδίως των Β λεμφοκυττάρων, που μπορεί να εθίζονται για υπερπαραγωγή αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών του ιού, πολύ πιθανό να αποτελεί έναν από τους κύριους παθογενετικούς μηχανισμούς των εξωηπατικών εκδηλώσεων της λοίμωξης από τον HCV, οι οποίες έχουν, κατά κύριο λόγο, λεμφοϋπερπλαστική (lymphoproliferative) ή/και αυτοάνοση φύση (95,105-108).

β) Εμμένουσα χρόνια λοίμωξη

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

γ) Βαρύτητα και πρόγνωση της χρόνιας λοίμωξης από τον HCV

Αντικρουόμενα αποτελέσματα έχουν ανακοινωθεί σχετικά με την πιθανή συσχέτιση της γενετικής πολυπλοκότητας των παρόμοιων γονιδιωμάτων του HCV και της εξέλιξης της χρόνιας λοίμωξης σε κίρρωση. Παρ' όλα αυτά, έχει υποστηριχθεί από διάφορους μελετητές, ότι εξάρσεις λοβιακής ηπατίτιδας είναι σημαντικές για την εξέλιξη και παθογένεση
της χρόνιας ηπατίτιδας C (110-113), ενώ η υψηλού βαθμού νεκροφλεγμονώδης δραστηριότητα της νόσου έχει συσχετιστεί με ταχύτερη εξέλιξη προς κίρρωση (114,115). Οι εξάρσεις αυτές της λοβιακής δραστηριότητας, που μοιάζουν με οξεία ηπατίτιδα, και ευνοούν την εξέλιξη της χρόνιας ηπατίτιδας C σε κίρρωση, μπορεί να σχετίζονται με την ανάδυση νέων παρόμοιων γονιδιωμάτων σε ανοσοεπαρκείς ξενιστές (112,113). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από μελέτες σε ασθενείς με μεταμεταμοσχευτική ηπατίτιδα C, όπου η γενετική ετερογένεια του ιού δε σχετίζονταν με βαρύτερη πορεία της νόσου (113,116,117).

δ) Αντίσταση του HCV στην αντι-ιική θεραπεία

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

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

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

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

Πάντως, σε γενικές γραμμές, για τη φυσική ιστορία της λοίμωξης από τον HCV, φαίνεται να ισχύουν τα ακόλουθα (Σχήμα 2) (120,121). Ο χρόνος επώασης της οξείας λοίμωξης κυμαίνεται στις 2-26 εβδομάδες (συνήθως 6-12). Στην πλειονότητα των ασθενών (65-75%) η νόσος είναι ασυμπτωματική και ανικτερική. Η μετάπτωση σε οξεία κεραυνοβόλο ηπατίτιδα θεωρείται πολύ σπάνια (<1%). Στο 20% περίπου των ατόμων με οξεία λοίμωξη, η νόσος
اوتوتεριορίζεται και ιάται. Το ποσοστό αυτό είναι πιθανώς μεγαλύτερο (30-50%) σε κάποιες ομάδες πληθυσμού, όπως τα παιδιά και οι νέες γυναίκες (125-127) καθώς και σε περιπτώσεις οξείας ηπατίτιδας C μη σχετιζόμενης με μετάγγιση (228). Στο 80-85% η νόσος θα μεταπέσει σε χρονιότητα. Από την τελευταία αυτή ομάδα, το 30% θα έχει μάλλον στάσιμη (stable) χρόνια ηπατίτιδα, το 40% θα έχει ποικίλη εξέλιξη, ενώ το υπόλοιπο 30% θα αναπτύξει σοβαρή ηπατοπάθεια. Συνολικά, περίπου το 56% των ασθενών με χρόνια λοίμωξη θα χρειαστεί θεραπεία, από τους οποίους το 60% περίπου θα έχει παρατεταμένη ύφεση (84,85,120).

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

1. Μηχανισμοί μετάπτωσης σε χρόνια λοίμωξη

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

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

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

• Τέλος, άλλο μηχανισμό χρονιότητας αποτελεί η πολύπλοκη φύση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών του HCV σχετικά με τις πρωτεϊνές των κυττάρων του ξενιστή. Συγκεκριμένα, όπως προαναφέρθηκε, η NS5A πρωτεΐνη του HCV σχετιζόταν με αναστολή της αντι-ιικής δράσης της γ-ιντερφερόνης μέσω της PKR (71), ενώ και η HVR1 περιοχή της Ε2 πρωτεΐνης βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με την PKR (133). Η χρονιότητα της λοίμωξης μπορεί, επομένως, να σχετίζεται με την επιλογή μεταλλαγμένων στις NS5A και HVR1.
περιοχές στελεχών, τα οποία αναστέλλουν αποτελεσματικότερα την αντι-ιική
dράση της γ-ιντερφερόνης, που παράγεται φυσιολογικά από τα ΤΗ1-λεμφοκύτταρα κατά την ανοσολογική απάντηση στην οξεία λοίμωξη (93).


Ο ιός ενδοκυτταρώνεται από τα APC (δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα κλπ) τα οποία επεξεργάζονται τις ιικές πρωτεΐνες και τις παρουσιάζουν συνδεμένες με τα μόρια MHC II. Τα CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα σε συνδυασμό με τα MHC II και ελευθερώνουν ΤΗ1-σχετιζόμενες κυτταροκίνες (INFγ, TNFα, IL-2), που ρυθμίζουν τη δράση των CD8+ Τ-λεμφοκυττάρων και ΤΗ2-σχετιζόμενες κυτταροκίνες (IL-4,5,6,9,10,11), που ρυθμίζουν την παραγωγή αντισωμάτων από τα Β λεμφοκύτταρα. Τα CD8+ Τ-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα ιικά αντιγόνα της επιφάνειας των μολυσμένων ηπατοκυττάρων, που είναι
συνδεμένα με μόρια του MHC I και τελικά είτε λύουν τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα είτε απελευθερώνουν αδρανοποιητικές για τον ιό κυτταροκίνες. Τα Β λεμφοκύτταρα παράγουν αντισώματα εναντίον επιτόπων όλων των πρωτεϊνών του HCV, που είναι σημαντικά για την αδρανοποίηση των ελεύθερων σωματιδίων και όχι αυτών, που έχουν εισέλθει στα ηπατοκύτταρα. Η κάθαρση του ιού, γενικά, συνδέεται με ανίχνευση εξουδετερωτικών αντισωμάτων και υψηλά επίπεδα κυκλοφορώντων HCV-ειδικών T-λεμφοκυττάρων, που παράγουν κυρίως T₃,1 κυτταροκίνες. Όταν η οξεία λοίμωξη μετατρέπεται σε χρονιότητα, η T-κυτταρική απόκριση είναι συνήθως μη ανιχνευόμενη στο περιφερειακό αίμα και είναι προσανατολισμένη προς παραγωγή μεταβολικών ινονόμων HCV-κυττάρων (132,134). Παρόλο που και αντικείμενο έρευνας αποτελεί το γεγονός ότι τα ειδικά για τον ιό ή έναντι του ιού παράγουν κυρίως την κάθαρση του ιού από τον οργανισμό και τον ιού την πλακτική βλάβη κατά την χρόνια λοίμωξη.

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

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

Η συχνότερη πορεία της νόσου είναι προϊούσα, συνήθως αυταμπτωματική ή με ελάχιστα μη ειδικά συμπτώματα (με την κάπωση να αποτελεί το συχνότερο σύμπτωμα) και η εξέλιξη είναι συνήθως βραδιά, γεγονός, που οδηγεί τους ασθενείς στο γιατρό όταν ήδη παρουσιάζουν είτε
βαριά ηπατική νόσο είτε κάποια από τις εξωηπατικές εκδηλώσεις (124,135).
Κατ’ αυτόν τον τρόπο, όπως αναφέρθηκε, το 30% περίπου των ασθενών με
χρόνια ηπατίτιδα C, παρουσιάζει στάσιμη πορεία, με φυσιολογικές
τρανσαμινάσεις, ιστολογικά ήπια δραστηριότητα για έτη και εξέλιξη προς
κίρρωση είτε ανυπάρκτη είτε πολύ μακροχρόνια (σε 5-10 έτη <2%) (136).

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

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

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
30/04/2020 16:37:06 EEST - 54.70.40.11
οργανισμού με την πάροδο της ηλικίας (121), επαύξηση των μηχανισμών του 'αναδιπλασιαστικού γηρασμού' (replicative senescence) των ηπατοκυττάρων από τον HCV (113,143), ή ακόμη σύμπτωση της μεγάλης ηλικίας με μεγαλύτερη διάρκεια της λοίμωξης (121,124), είναι οι πιθανολογούμενοι μηχανισμοί επίδρασης της ηλικίας στην εξέλιξη της ίνωσης.

• Το ανδρικό φύλο (137,140).

• Η χρόνια κατανάλωση οινοπνεύματος συσχετίζεται, στις διάφορες μελέτες, σίγουρα, με την ταχύτερη εξέλιξη της ίνωσης και την ανάπτυξη κίρρωσης. Εντούτοις, η συσχέτιση είναι ασθενής και οι παθογενετικοί μηχανισμοί δεν είναι επαρκώς διευκρινισμένοι (137,142,144,145).

• Η ανοσοκαταστολή των ασθενών με χρόνια λοίμωξη από τον HCV, συσχετίζεται με ταχύτερη ανάπτυξη κίρρωσης (113). Αυτό δείχθηκε από μελέτες τόσο σε ασθενείς με HIV συν-λοίμωξη (146), όσο και μετά από μεταμόσχευση (147): ο αναμενόμενος μέσος χρόνος της ανάπτυξης HCV-σχετιζόμενης κίρρωσης στο μόσχευμα, είναι περίπου 10 χρόνια.

• Ιολογικοί παράγοντες και κατά κύριο λόγο ο γονότυπος 1b, έχουν συσχετιστεί κατά καιρούς με την εξέλιξη της νόσου και την ταχύτερη ανάπτυξη κίρρωσης, αλλά τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών είναι αντικρουόμενα (116,124). Τα επίπεδα του HCV-RNA τόσο κατά τη μόλυνση όσο και κατά τη διάρκεια της χρόνιας λοίμωξης δε φαίνεται να επηρεάζουν την εξέλιξή της (124).

Επιπλέον, παράγοντας σημαντικός της εξέλιξης της χρόνιας ηπατίτιδας C προς κίρρωση φαίνεται να είναι η νεκροφλεγμονώδης δραστηριότητα: επαναλαμβανόμενα επεισόδια αυξημένης νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας της νόσου (που, όπως προαναφέρθηκε, μπορεί να
συσχέτιζονται με την ανάδειξη καινούργιων 'σχεδών ειδών'), πιθανόν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ταχύτερη ανάπτυξη της κίρρωσης (113-115).

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

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

Τέλος, η εξέλιξη της χρόνιας λοίμωξης από τον HCV προς ηπατοκυτταρικό καρκίνο, που αποτελεί τη σοβαρότερη επιπλοκή, εξαρτάται άμεσα από την ανάπτυξη κίρρωσης και αναπτύσσεται σε κιρρωτικό ήπαρ με
ετήσια συχνότητα 1.5-3% και πενταετή συχνότητα 3-13% (148-150). Σπάνια, αναγνωρίζεται ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου σε μη κιρρωτικό ήπαρ ασθενών με χρόνια λοίμωξη από τον ΗCV (151). Πιθανολογείται η κατασταλτική δράση της πρωτεΐνης του πυρηνοκαψιδίου του ΗCV στην ογκοκατασταλτική δράση του p53 ή/και στην επίδρασή της στη ρύθμιση της απόπτωσης (152,153).
4. ΕΞΩΗΠΑΤΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ 
ΤΟΝ HCV.

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

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Ισχυρή συσχέτιση</th>
<th>Πιθανή συσχέτιση</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Μικτή κρυοσφαιριναιμία</td>
<td>Αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα</td>
</tr>
<tr>
<td>Μεμβρανουπερπλαστική σπειραματοφρούρηη</td>
<td>Σποραδική άνοσος δερματική πορφυρία</td>
</tr>
<tr>
<td>Οξώδης παναρτηρίτιδα</td>
<td>Απλαστική αναιμία</td>
</tr>
<tr>
<td>Σύνδρομο Sicca</td>
<td>Αυτοάνοση θρομбоπένια</td>
</tr>
<tr>
<td>Β-κυτταρικό λέμφωμα</td>
<td>Β-κυτταρικό λέμφωμα</td>
</tr>
<tr>
<td>Περιφερική νευροπάθεια</td>
<td>Αρθρίτιδα</td>
</tr>
<tr>
<td>Σακχαρώδης διαβήτης</td>
<td>Ελκος κερατοειδούς Mooren</td>
</tr>
<tr>
<td>Ομαλός λειχήνας</td>
<td>Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο</td>
</tr>
<tr>
<td>Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση</td>
<td>Έλκος κερατοειδούς Mooren</td>
</tr>
<tr>
<td>Νεφροειδής ινόσθερος</td>
<td>Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Σημαντικές προσπάθειες έχουν γίνει ώστε να διευκρινιστεί αν αυτές οι αυτοάνοσες διαταραχές, που σχετίζονται με την χρόνια λοίμωξη από τον HCV, είναι διεργασίες κατευθυνόμενες από αντιγόνα του ιού και επομένως άμεσα σχετιζόμενες με τη λοίμωξη (32), ή κατευθυνόμενες από αυτοαντιγόνα.
και επομένως αποτελούν αληθείς, μάλλον, αυτοάνοσες διαταραχές, πιθανώς τυχαία συνυπάρχουσες (157,158). Η διάκριση αυτή θα είχε ενδεχομένως και πρακτικό-κλινικό ενδιαφέρον καθώς η θεραπεία θα μπορούσε να κατευθύνεται ανάλογα με την προέκουσα εκδήλωση της νόσου.

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

Τα ειδικά χαρακτηριστικά του ιού και του ξενιστή, που προδιαθέτουν στην εμφάνιση εξωηπατικών εκδηλώσεων δεν έχουν διαλευκανθεί. Φαίνεται, όμως, ότι οι εξωηπατικές εκδηλώσεις του HCV, δε συσχετίζονται με το γονότυπο του ιού, αλλά με τη γενετική προδιάθεση του ξενιστή (159,160). Η πιο συχνή αλλά και καλύτερα τεκμηριωμένη εξωηπατική εκδήλωση της χρόνιας λοίμωξης από τον HCV είναι η κρυοσφαιριναιμία: φυγοκέντριση ορών και διαχωρισμός ανοσοσυμπλεγμάτων από το υπερκείμενο υγρό, έχει δείξει την παρουσία όχι μόνο HCV RNA στο κρυοίζημα, αλλά και την ύπαρξη διαφορετικών ειδών ειδών από εκείνα που ήταν ελεύθερα στο υπόλοιπο μέρος του ορού (106,107). Κατά συνέπεια, η μόλυνση των αιμοποιητικών κυττάρων από τον HCV μπορεί να αποτελεί
κοινό παθογενετικό μηχανισμό των εξωητατικών εκδηλώσεων της λοίμωξης, με διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις, εξαιτίας επίδρασης διαφορετικών ατομικών (του ασθενούς) ή/και περιβαλλοντικών παραγόντων (105). Επιπλέον, η άμεση μόλυνση οργανοειδικών κυτταρικών πληθυσμών από τον HCV, μπορεί να σχετίζεται με μερικές εξωητατικές εκδηλώσεις, όπως αυτές από το νεφρό και τους σιελογόνους αδένες (108).

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

4.1. Εξωηπατικές εκδηλώσεις με ισχύρη συσχέτιση με τον HCV

4.1.1. Μικτή κρυοσφαιριναιμία (MC)

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

Η κρυοσφαιριναιμία χαρακτηρίζεται από την παρουσία στον ορό κυκλοφορούντων ανοσοσφαιρινών, που καθιζάνουν σε χαμηλές θερμοκρασίες αλλά επαναδιαλύονται με θέρμανση στους 37°C. Σύμφωνα με την ταξινόμηση των Brouet et al (165), η κρυοσφαιριναιμία κατατάσσεται σε τρεις τύπους: στον τύπο I, οι κρυοσφαιρίνες αποτελούνται από μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες (συνήθως βρίσκονται σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα ή νόσο Waldenstrom), στον τύπο II, οι κρυοσφαιρίνες αποτελούνται από ανοσοσυμπλέγματα, που περιέχουν μια μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη (IgM) με δράση ρευματοειδούς παράγοντα κατά πολυκλωνικών IgG ανοσοσφαιρινών και στον τύπο III, οι κρυοσφαιρίνες αποτελούν συμπλέγματα πολυκλωνικών IgG ανοσοσφαιρινών με πολυκλωνικούς ρευματοειδείς παράγοντες (συνήθως IgM τάξης). Οι δύο τελευταίοι τύποι μαζί, αποτελούν τη μικτή κρυοσφαιριναιμία (mixed cryoglobulinemia, MC), με κοινό χαρακτηριστικό ότι οι κρυοσφαιρίνες έχουν δράση ρευματοειδούς παράγοντα. Η μικτή κρυοσφαιριναιμία έχει συσχετιστεί με ποικιλία καταστάσεων όπως διάφορες λεμφούπερπλαστικές παθήσεις, αυτοάνοσα νοσήματα καθώς και οξείες ή χρόνιες λοιμώξεις (161).
Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών καταδείχτηκε η σαφής ύπαρξη αιτιοπαθογενετικής σχέσης μεταξύ της λοίμωξης από τον HCV και της MC (164,166-170):

- Ένδειξη υπέρ της σχέσης αυτής αποτελεί, πρώτα απ’ όλα, η εύρεση, σε μεγάλη συχνότητα (μέχρι 90%), δεικτών της λοίμωξης σε ασθενείς με MC (167-171), όπως για παράδειγμα η ανίχνευση αλληλουχιών του HCV σε περιφερικά μονοπύρηνα κύτταρα και μονοπύρηνα του μυελού των οστών, ακόμα και σε απουσία ιαιμίας (172).

- Το HCV-RNA του ιού βρέθηκε ότι αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα του κρυοϊζήματος και απομονώθηκε σε συγκεντρώσεις 10-1000 φορές εκείνων του HCV-RNA του ορού (167).

- Η απάντηση τόσο της χρόνιας ηπατίτιδας C όσο και της MC στη θεραπεία με α-IFN αποτελεί εμμέσο αλλά ισχυρό δείκτη της αιτιοπαθογενετικής τους συσχέτισης (171). Μάλιστα οι παλαιότερα προτεινόμενες θεραπείες της MC με ανοσοκαταστολή, αντικαθίστανται, πλέον, με αντι-ιική θεραπεία (155,157), καθώς η χορήγησή της σχετίζεται με βελτίωση των κλινικών εκδηλώσεων της MC και των επιπέδων του κρυοκρίτη (173).

- Ο HCV είναι, όπως προαναφέρθηκε, ένας λεμφοτρόπος ιός. Παρατεταμένη διέγερση του ανοσολογικού συστήματος από τον ιό φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση κρυοσφαιριναιμίας στους ασθενείς με χρόνια λοίμωξη από τον HCV (155). Το γεγονός αυτό εξηγεί πιθανά γιατί όσο μακρύτερη είναι η διάρκεια της λοίμωξης ή/και μεγαλύτερη η ηλικία του ασθενούς τόσο συχνότερα παρατηρείται η εμφάνιση της κρυοσφαιριναιμίας (160,171,174). Επίσης, η κρυοσφαιριναιμία βρέθηκε ότι σχετίζεται με τον
απλότυπο HLA-B8-DR3 (175), ενώ δε φαίνεται να σχετίζεται, στις περισσότερες μελέτες, με τον γονότυπο του HCV (164,170,174).

Οι κλινικές εκδηλώσεις της μικτής κρυοσφαιριναιμίας περιλαμβάνουν την παρουσία αρθραλγιών, ψηλαφητής πορφύρας, αδυναμίας, καταβολής, συστηματικής αγγείας και με ή χωρίς την εμφάνιση συμπτωματολογίας (161). Η ύπαρξη κρυοσφαιριναιμίας σε ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV, σχετίζεται με κλινική συμπτωματολογία σε ποσοστό 10-66% (157,164). Σε γενικές, όμως, οι συμπτώματα είναι ήπια και δε φαίνεται να αποτελούν μείζον πρόβλημα στην κλινική πράξη (164). Πιθανόν, οι ιστολογικές βλάβες να προκαλούνται από την εναπόθεση στα αγγεία, ανοσοσυμπλεγμάτων και κρυοσφαιρινών, που περιέχουν HCV-RNA, αντί-HCV και ρευματοειδές παράγοντες εναντίον των αντί-HCV αντισωμάτων (157,161,176). Ο έλεγχος για την πιθανή παρουσία κρυοσφαιριναιμίας σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C πρέπει να γίνεται και αντι-HCV αντισωμάτων (157,161,176). Ο έλεγχος για την παρουσία ρευματοειδούς παράγοντα μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά πριν τον έλεγχο για κρυοσφαιριναιμία σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη από τον HCV (164).

4.1.2. Σπειραματονεφρίτιδα

Η πιο συχνή νεφρική εκδήλωση της χρόνιας λοίμωξης από τον HCV είναι η μεμβρανομβρανοϋπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα (MPGN). Η λοίμωξη από τον HCV φαίνεται να ευθύνεται για το 10-20% των περιπτώσεων MPGN (161,177). Η MPGN στους ασθενείς με ηπατίτιδα C, σχετίζεται συνήθως με την ύπαρξη κρυοσφαιριναιμίας, την εναπόθεση κρυοϊζήματος και
ενεργοποίηση του συμπληρώματος, του οποίου τα επίπεδα βρίσκονται χαμηλά στην πλειονότητα των ασθενών (161,156). Οι κύριες κλινικές εκδηλώσεις της MPGN είναι η μικροσκοπική αιματουργία και η πρωτεϊνουρία. Οι περισσότεροι ασθενείς έχουν ήπια νεφρική ανεπάρκεια, που σε λίγους εξελίσσεται σε τελικού σταδίου νόσο (161,177).

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

4.1.3. Αγγειίτιδα

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

4.1.4. Σύνδρομο Sicca

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

Επιπλέον, η αυτοάνοση σιελαδενίτιδα φαίνεται να σχετίζεται, όπως και
οι προαναφερθείσες εξωηπατικές εκδηλώσεις, πολύ συχνά με
κρυοσφαιριναιμία στους ασθενείς με ηπατίτιδα C (105,157).
4.2. Άλλες εξωηττικές εκδηλώσεις με λιγότερο ισχυρή ή αμφισβητήσιμη συσχέτιση με τον HCV

4.2.1. Non-Hodgkin's λέμφωμα (NHL)


Η συχνότητα της ηπατίτιδας C μεταξύ των ασθενών με Β-κυτταρικό NHL ποικίλλει από 2% (161,188) ως 40% (161,186), με μεγάλες διαφορές γεωγραφικής κατανομής: στη νότια Ευρώπη οι περισσότερες αναφορές έχουν σημαντική συσχέτιση του HCV με τα B-NHL, ενώ στη βόρεια το αντίθετο. Παρ’ όλα αυτά, υπάρχουν μέχρι στιγμής, ομοφωνία στο ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της λοίμωξης με μη-Β-κυτταρικής αρχής λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα (πχ T-NHL, Hodgkin’s lymphoma), ενώ η συσχέτιση του HCV με άλλες Β-κυτταρικές λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές (πχ χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, μονοκλωνικές γαμμαπάθειες κλπ) βρίσκεται υπό έρευνα (105).

Μια σταθερή γενετική μεταλλαγή, που βρίσκεται στα οζώδη αλλά και σε μερικά διάχυτα λεμφώματα είναι η μετάθεση t(14;18). Η μεταλλαγή αυτή, φαίνεται να αποτελεί βασικό βήμα της καρκινογένεσης, καθώς υπολογίζεται σε υπερέκφραση της πρωτεΐνης bcl-2, η οποία εμποδίζει την απόπτωση των
κυττάρων. Αυξημένη έκφραση της bcl-2 πρωτεΐνης (105) και αυξημένη
συχνότητα ανίχνευσης της προαναφερθείσας μεταλλαγής (105,189) βρέθηκε
σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C με ή χωρίς κρυοσφαιριναιμία ή/και
λέμφωμα. Η χρόνια διέγερση του ανοσολογικού συστήματος από τον HCV,
pολλαπλασιαζόμενη από την μόλυνση των αιμοποιητικών κυττάρων από τον
ιό και τη μεγάλη γενετική ποικιλότητα του ιό, πιθανόν να εξηγεί τα τελευταία
αυτά ευρήματα και να οδηγεί σε ανάδειξη κλώνου λεμφοκυττάρων
προστατευμένου από την απόπτωση, που με τη συσσώρευση κι άλλων
μεταλλαγών, μπορεί να εξελιχθεί σε αληθή κακοήθεια (105).

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

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

Η όψιμη δερματική πορφυρία χαρακτηρίζεται από ευθρυπτότητα δέρματος, βλατίδες και φυσσαλίδες, υπέρχωση και υπερτρίχωση. Το αίτιο είναι η ελάττωση της δραστικότητας της δεκαρβοξυλάσης του ουροπορφυρινογόνου, που μπορεί να είναι υποκλινική για χρόνια, εώς ότου γίνεται κλινικά εμφανής (156). Οι απόψεις διίστανται στο κατά πόσο η λοίμωξη από τον HCV αποτελεί εκλυτικό παράγοντα εμφάνισης των κλινικών εκδηλώσεων της όψιμης δερματικής πορφυρίας. Σε κάποιες μελέτες, ο μεταβολισμός της πορφυρίνης δείχθηκε ότι δεν επηρεάζεται σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C χωρίς όψιμη δερματική πορφυρία (192). Η λοίμωξη από τον HCV φαίνεται, επίσης, να έχει μικρή επίδραση στη δράση της ηπατικής δεκαρβοξυλάσης του ουροπορφυρινογόνου (193) και τα χαρακτηριστικά ευρήματα της πορφυρίας μάλλον βρίσκονται στάνα σε ασθενείς με ηπατιτίδα C, αν και η πορφυρίνη στα ούρα και το ήπαρ είναι συχνά αυξημένη (194). Επιπλέον, μερικές μελέτες βρίσκουν χαμηλή συχνότητα όψιμης δερματικής πορφυρίας σε ασθενείς με ηπατιτίδα C (3-8%) (163,195). Ωστόσο, πολλές μελέτες έχουν δείξει αυξημένη συχνότητα της όψιμης δερματικής πορφυρίας με την λοίμωξη από τον HCV, βρίσκοντας υψηλή συχνότητα (50-90%) θετικών αντι-HCV αντισωμάτων ανάμεσα στους ασθενείς με όψιμη δερματική πορφυρία (196-199). Αν και δεν υπάρχουν τυχαιοποιημένες μελέτες για την
αποτελεσματικότητα της α-IFN σε ασθενείς HCV θετικούς με όψιμη δερματική πορφυρία, έχουν ανακοινωθεί δύο περιπτώσεις εξαφάνισης των δερματικών αλλοιώσεων μετά από θεραπεία με α-IFN (200,201).

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

4.2.3. Αυτοάνοσες νόσοι του θυρεοειδούς

Διαταραχές της θυρεοειδικής λειτουργίας παρατηρούνται στο 5-10% των ασθενών με ηπατίτιδα C, ποσοστό, που δε διαφέρει σημαντικά από το ανευρισκόμενο στον γενικό πληθυσμό (157,203). Τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών υποδεικνύουν, ότι η αυξημένη συχνότητα θυρεοειδικών διαταραχών, που βρίσκονται στους ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV, τετεροίζεται, συνήθως, στην εύρεση υψηλών τίτλων αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων (συχνότητα 3-36%), κυρίως σε γυναίκες ασθενείς (157,161,156). Αντιθυρεοειδικά αντισώματα βρίσκονται με υψηλότερη συχνότητα σε HCV θετικούς ασθενείς σε σχέση με ασθενείς με ηπατίτιδα Β ή υγιείς μάρτυρες (204). Υψηλοί τίτλοι αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων πριν από θεραπεία με α-IFN συσχετίζονται σημαντικά με ανάπτυξη διαταραχών της θυρεοειδικής λειτουργίας κατά τη διάρκεια της θεραπείας (157). Επιπλέον, η συχνότητα
ανίχνευσής τους φαίνεται ότι αυξάνει κατά τη διάρκεια της θεραπείας (156,205). Επομένως, από κλινικής σκοπιάς κρίνεται ακόμη και από την θεραπεία της θυρεοειδικής λειτουργίας και η ανίχνευση αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων προ και κατά τη διάρκεια της θεραπείας με α-IFN σε HCV θετικούς ασθενείς, ώστε να διαγνωσθεί εγκαίρως η θυρεοειδική δυσλειτουργία προκύπτουσα (156,157). Ο έλεγχος για την πιθανή εμφάνιση των ανωτέρω διαταράχων πρέπει να γίνεται έως και 6 μήνες μετά το τέλος της αγωγής (206).

4.2.4. Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APLS)

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

Η συχνότητα ανίχνευσης των αντι-CL αντισωμάτων στην ηπατίτιδα C κυμαίνεται στη βιβλιογραφία από 3.3% ως 46% (Πίνακας 3), (209). Οι διαφορές αυτές στη συχνότητα μπορεί να οφείλονται στις χρησιμοποιούμενες μεθόδους ανίχνευσης των αντι-CL αντισωμάτων και το σχεδιασμό των μελετών. Συγκεκριμένα, έχει σημασία το αν χρησιμοποιηθεί εμπορική ELISA ή ανεπτυγμένη μέθοδος σε ερευνητικά εργαστήρια, που όμως να έχει γίνει διεθνώς αποδεκτή για τον προσδιορισμό των αντι-CL αντισωμάτων. Μια πολυκεντρική ανάλυση αξιολόγησης εννέα εμπορικών ELISA για ποσοτικό
προσδιορισμό αντι-CL αντισωμάτων, εδείξει αποκλίσεις 31-60% και 6-50% στον προσδιορισμό των IgG και των IgM αντι-CL αντισωμάτων, αντίστοιχα (210). Οι διαφορές αυτές των αποτελεσμάτων είναι πιο συχνές σε δείγματα με χαμηλό τίτλο αντι-CL αντισωμάτων, όπως εκείνα των ασθενών με λοίμωξη από τον HCV. Οι περισσότερες μελέτες συμπιέζουν στο ότι οι τίτλοι των αντι-CL αντισωμάτων στους ορούς ορούς των ασθενών με ηπατίτιδα C είναι χαμηλοί έως μέτριοι και πάντα σημαντικά χαμηλότεροι από αυτούς που βρίσκονται σε ασθενείς με APLS (32,211-215). Επιπλέον, τα αποτελέσματα μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με το αν συνυπολογίζεται ή όχι η μη ειδική δέσμευση των αντισωμάτων στο πλακίδιο της ELISA. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να υπερκεραστεί είτε αφαιρώντας από τις τιμές των δείγματων, τις τιμές των κελιών (wells), που δεν έχουν καλυφθεί με το αντιγόνο (καρδιολιπίνη) κατά την εκτέλεση της ELISA και αντιπροσωπεύουν την μη ειδική δέσμευση, είτε υιοθετώντας πιο αυστηρά σημεία 'cut-off' για τη θετικότητα των αντι-CL αντισωμάτων (πχ: η μέση τιμή των υγιών συν 4 ή 5 σταθερές αποκλίσεις, SD) (209).

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Μελέτη</th>
<th>Αντι-CL (+), %</th>
<th>Εκδηλώσεις APS</th>
<th>Μελέτη</th>
<th>Αντι-CL (+), %</th>
<th>Εκδηλώσεις APS</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Dalekos et al (32)</td>
<td>21.9</td>
<td>Απούσες</td>
<td>Al-Saeed et al (224)</td>
<td>27.3</td>
<td>Απούσες</td>
</tr>
<tr>
<td>Matsuda et al (217)</td>
<td>12.5</td>
<td>Απούσες</td>
<td>Prieto et al (220)</td>
<td>22</td>
<td>10/22 (45.4%)</td>
</tr>
<tr>
<td>Giordano et al (219)</td>
<td>12/46 (δύο συχνότητες ανάλογα με την τεχνική)</td>
<td>Απούσες</td>
<td>Leroy et al (212)</td>
<td>20.8/30.4 (δύο συχνότητες προ και μετά θεραπείας με α-IFN)</td>
<td>6/37 (16.2%)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>Cacoub et al (215)</td>
<td>19.5</td>
<td>Απούσες</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>Biron et al (221)</td>
<td>33</td>
<td>1/41 (2.4%)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>Mangia et al (218)</td>
<td>8.1</td>
<td>Απούσες</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>Baid et al (225)</td>
<td>33.3</td>
<td>5/6 (83.3%)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>Dalekos et al (211)</td>
<td>37.3</td>
<td>3/28 (12%)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>Ordi-Ros et al (222)</td>
<td>3.3</td>
<td>Απούσες</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>Cacoub et al (163)</td>
<td>26.5</td>
<td>3/79 (3.8%)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>Sthoe ger et al (216)</td>
<td>44</td>
<td>Απούσες</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>Harada et al (214)</td>
<td>40</td>
<td>2/16 (12.5%)</td>
</tr>
<tr>
<td>Σύνολο</td>
<td>1475</td>
<td>20.9</td>
<td>Απούσες</td>
<td></td>
<td>30/308 (9.7%)</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Εντούτοις, οι Prieto et al (220), βρήκαν ότι η ανίχνευση anti-CL αντισωμάτων σε 100 ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV, συσχετίζονταν σημαντικά με την εμφάνιση θρομβοπενίας και προηγούμενα θρομβωτικά επεισόδια. Παράλληλα, ανίχνευσαν δείκτες της λοίμωξης στο 16.7% των ασθενών με πρωτοπαθές APLS. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, θα μπορούσαν να εξηγηθούν από το σχεδιασμό της μελέτης καθώς το 25% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε βιοσκότα είχαν κίρρωση, που σχετίζεται συχνά, ανεξάρτητα από την αιτιολογία της, με την παρουσία anti-CL αντισωμάτων (212,221). Ένα άλλο αδύνατο σημείο της μελέτης ήταν η μέθοδος προσδιορισμού των αντισωμάτων. Πιο αναλυτικά, η μη ειδική δέσμευση συνυπολογίστηκε στις μετρήσεις αυξάνοντας τους τίτλους, ενώ δεν προσδιορίστηκε η εξάρτηση των ανιχνευόμενων anti-CL αντισωμάτων από...
συμπαράγοντες, ώστε να αποδειχθεί αν ανήκουν στα 'αυτοάνοσα' ή 'παθογενετικά' aPL αντισώματα (220). Από την άλλη μεριά η ανεύρεση δεικτών της λοίμωξης από τον HCV σε μερικούς ασθενείς με APLS, μπορεί να σχετιζείται με την αυξημένη πιθανότητα μετάδοσης της λοίμωξης στους ασθενείς αυτούς, λόγω των πολλαπλών εισαγωγών τους στα νοσοκομεία για θεραπεία ή στην εκτέλεση επεμβατικών πράξεων (209). Εξάλλου, πιο πρόσφατη μελέτη των Munoz-Rodriguez et al (222) στην ίδια χώρα, έδειξε αντίθετα αποτελέσματα από αυτή των Prieto et al, βρίσκοντας την ίδια συχνότητα δεικτών λοίμωξης από τον HCV σε 88 ασθενείς με APLS και σε υγιείς μάρτυres της ίδιας γεωγραφικής περιοχής, ενώ απουσία αιτιοπαθογενετικής συσχέτισης του HCV με το APLS έδειξε και πρόσφατη μελέτη της ομάδας μας (223).

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

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

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

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

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση σε άλλες μελέτες σχετίζεται με τον HCV (230) και σε άλλες όχι (231). Το γεγονός, πάντως, ότι η MC μπορεί να επιπλέκεται με διάμεση πνευμονοπάθεια, υποδεικνύει ότι, σε μερικές
τουλάχιστον περιπτώσεις, μπορεί να υπάρχει έμμεση συσχέτιση, που πιθανώς οφείλεται στην HCV-σχετιζόμενη ΜC (105,232).

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

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

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η ανεύρεση διαφόρων αυτοαντισωμάτων είναι συχνή στους ορούς ασθενών με ηπατίτιδα C. Πράγματι, η παρουσία ενός τουλάχιστον αυτοαντισώματος ανιχνεύεται στο 20% έως 90% των ασθενών (Πίνακας 4) (32,239-250). Το μεγάλο εύρος των συχνοτήτων ανεύρεσης αυτοαντισωμάτων στη βιβλιογραφία, μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στους μελέτωμα οριζόντια ασθενείς. Επίσης, μπορεί να οφείλεται και σε διαφορές στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται περιοχής, ενδεικτικά, χαμηλούς τίτλους (209,239,251).

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

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

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

Ειδικά για τα ANA και SMA, οι τίτλοι ανίχνευσής τους έχουν προταθεί σαν δείκτες διαφοροποίησης της κυρίως-αυτοάνοσης από την κυρίως-ιογενή νόσο σε ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV και ευρήματα αυτοανοσίας (157,260,261). Η διάκριση μεταξύ των δύο αυτών καταστάσεων θεωρείται σημαντική, γιατί η θεραπεία με α-IFN σε μικρό ποσοστό ασθενών με κυρίως-αυτοάνοση νόσο μπορεί να προκαλέσει σοβαρή επιδείνωση (262-265), ενώ η
θεραπεία με κορτικοστεροειδή της κυρίως-ιογενούς νόσου μπορεί να αυξήσει το ικό φορτίο (266,267).

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

Τα αντι-LKM αυτοαντισώματα ανιχνεύονται σε ποσοστό 0% έως 10% των ασθενών με χρόνια λοίμωξη από τον HCV, αναλόγως της γεωγραφικής θέσης, (Πίνακας 4) (163,239-246,249,250,256-258,272). Τα αντισώματα αυτά δίνουν τον ίδιο τύπο φθορισμού με την τεχνική του ΕΑΦ, με τα αντι-LKM 1, που βρίσκονται στην ΑΗ-2 (239,240,273). Και στις δύο νοσολογικές οντότητες το κύριο αυτοαντιγόνο στόχο των αντι-LKM 1 αποτελεί το KYTP450 2D6. Περαιτέρω χαρακτηρισμός των αντι-LKM 1 αντισωμάτων με ανταγωνιστικές ELISA και μεθόδους ανοσοαποτύπωσης ανέδειξε διαφορές μεταξύ αυτών, που ανιχνεύονται στην λοίμωξη από τον HCV και των αντι-
LKM 1 αντισωμάτων, που ανιχνεύονται στην ΑΗ-2. Έτσι, η συχνότητα ανίχνευσης των anti-KYTP450 2D6 σε HCV/anti-LKM θετικούς ορούς ήταν διαφορετική από τη συχνότητα του αυτοαντισώματος αυτού στην ΑΗ-2 (274-278). Οι διαφορές αυτές αποδόθηκαν σε διαφορές στη δομή των επιτόπων του αυτοαντιγόνου KYTP450 2D6: στην χρόνια λοίμωξη από τον HCV τα αντι-LKM αυτοαντισώματα στρέφονται κυρίως κατά 'μη επίπεδων' (conformational) επιτόπων του KYTP450 2D6, ενώ αυτοαντισώματα κατά μικρών, επίπεδων επιτόπων του KYTP450 2D6 ανευρίσκονται πιο συχνά στην ΑΗ-2 (275-277). Η αυτοάνοση αντίδραση των HCV θετικών ορών είναι πιο ετερογενής, ενώ όλοι οι γνωστοί επίπεδοι επίπονοι αναγνωρίζονται από λιγότερους από 25% των ορών ασθενών με ηπατίτιδα C (156,272). Πράγματι, ο επίτοπος 257-269aa, ο επίτοπος 196-218aa και η καρβοξυτελική περιοχή του επιτόπου 350-494aa του KYTP450 2D6, έχει δειχθεί ότι ανιχνεύονται πολύ σπάνιοτερα στους HCV/anti-LKM θετικούς ορούς σε σχέση με τους ορούς ασθενών με ΑΗ-2 (278,279,280). Το ίδιο βρέθηκε, πολύ πρόσφατα, ότι συμβαίνει και με την αμινοτελική περιοχή του KYTP450 2D6, από τους Kitazawa et al (281): ο επίτοπος 181-245aa αντιδρά πολύ συχνότερα με ορούς ασθενών με ΑΗ-2, παρά με ορούς ασθενών με λοίμωξη από τον HCV.

Εντούτοις, όταν χρησιμοποιήθηκε η πιο ευαίσθητη, ποσοτική μέθοδος, που στηρίζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων κατά τον αυτοαντιγόνο-στόχο των anti-LKM-1 (KYTP450 2D6), μετά από ανοσοκαθίζηση ανασυνδυασμένου και ραδιοσημασμένου με 35S μεθειονίνη KYTP450 2D6 (που ανιχνεύει επιπλέον τα anti-LKM 1 αντισώματα κατά μη-επίπεδων επιτόπων), το 100%, περίπου, των ορών με anti-LKM 1 αντισώματα εμφάνιζαν anti-KYTP450 2D6 αντιδραστικότητα, ανεξάρτητα από το αν ήταν HCV θετικοί ή όχι (282,283).
σε ασθενείς με HCV λοίμωξη (256,258,290,291), επιβεβαιώνοντας την ετερογένεια, που παρουσιάζουν τα αυτοαντισώματα έναντι των μικροσωμίων του ήπατος στους ασθενείς με HCV-σχετιζόμενη χρόνια ηπατική νόσο.

Τα αντι-LC 1 αυτοαντισώματα, που αρχικά θεωρήθηκαν πιο ειδικοί δείκτες της AH-2, ανιχνεύονται και στην χρόνια ηπατίτιδα C, όπως έδειξε η μελέτη των Lenzi et al (292), στην οποία βρέθηκε ότι το 52% (13/25) των ασθενών με θετικά αντι-LC 1 αντισώματα είχαν θετικά αντι-HCV αντισώματα και ανιχνεύσιμο HCV-RNA στον ορό τους. Τέλος, τα αντισώματα έναντι του KYP450 2A6, που ανιχνεύονται στα πλαίσια του ΣΑΠΕ 1, πρόσφατα ανιχνεύτηκαν, από τους Dalekos et al (293), και σε HCV/αντι-LKM 1 θετικούς ασθενείς. Το γεγονός αυτό μαζί με την πρόσφατη ταυτοποίηση των KYP450 2E1 και KYP450 3A4 σε δύο ασθενείς HCV/αντι-LKM αυτοάνοσεις, από τους Miyakawa et al (294), υποδεικνύει ότι τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 στο σύνολό τους, αποτελούν 'εξέχοντα' αυτοαντιγόνα στόχους κατά τις αυτοάνοσεις αντιδράσεις, που προκαλούνται στα πλαίσια της χρόνιας ιογενούς λοίμωξης.

Ο μηχανισμός παραγωγής των αυτοαντισωμάτων στη χρόνια λοίμωξη από τον HCV δεν είναι γνωστός. Ο λεμφοτροπισμός του ιού, όπως προαναφέρθηκε, αποδειχθηκε από πολλές μελέτες· η ικανότητα του HCV να πολλαπλασιάζεται μέσα στα αιμοποιητικά κύτταρα μπορεί να αποτελεί έναν κοινό παθογενετικό μηχανισμό για τις αυτοάνοσεις αντιδράσεις με τις οποίες συσχετίζεται (105,295). Επιπλέον, η αναγνώριση της πρωτεΐνης CD81 ως υποψήφιο υποδοχέα του HCV (65), έχει μεγάλη σημασία για τον πιθανό μηχανισμό παραγωγής αυτοαντισωμάτων κατά την χρόνια λοίμωξη. Το 'δεύτερο συνδιεγερτικό σήμα' (costimulatory signal) κατά την αυτοάνοση
αντίδραση, μπορεί να μεταφέρεται στα Β λεμφοκύτταρα μέσω αυτού του μορίου, καθώς αποτελεί συστατικό ενός μοριακού συμπλέγματος με το CD21 και το CD19 (296), που συμμετέχει στην ενεργοποίηση του Β λεμφοκυττάρου. Δέσμευση του συμπλέγματος αυτού από τον HCV μπορεί να κατεβάζει το 'κατώφλι' ενεργοποίησης των Β λεμφοκυττάρων (297), διευκολύνοντας την παραγωγή αυτοαντισωμάτων, παρόμοια με τον ιό Ebstein-Barr (EBV), ο οποίος έχει βρεθεί ότι συνδέεται με το CD21 (298).

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

Δεν είναι γνωστό αν η παρουσία των αντι-LKM αυτοαντισωμάτων αποτελεί ειδικό φαινόμενο της λοίμωξης από τον HCV ή αν είναι αποτέλεσμα
μιας γενικευμένης, μη ειδικής Β-λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης, που οδηγεί στην ανίχνευση διαφόρων αυτοαντισωμάτων σε χαμηλούς τίτλους. Στοιχεία υπερ μιας ειδικής απόκρισης κατά του KYTP450 στη χρόνια ηπατίτιδα C πήγαζουν από το γεγονός της απουσίας αυτών των αυτοαντισωμάτων σε άλλες χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες, την ανάπτυξη αντι-LKM 1 μετά από μεταμόσχευση ήπατος, που ήταν μολυσμένο από τον HCV, σε ασθενή αρνητικό για τον ιό και τέλος από την επανεμφάνιση ηπατικών αυτοάνοσων φαινομένων, με επακόλουθο επιδείνωση της ηπατικής νόσου σε ορισμένους HCV/αντι-LKM 1 θετικούς ασθενείς, μετά από θεραπεία με α-IFN (279,285,286,288,303).

Η γενετική προδιάθεση του ατόμου φαίνεται να παίζει πολύ πιο σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση αυτοανόσων εκδηλώσεων σχετιζόμενων με τα αυτοαντισώματα κατά την χρόνια λοίμωξη από τον HCV, από ότι ο ίδιος ο ιός (302,304). Έτσι, συγκεκριμένα αντιγόνα του MHC, όπως η τάξης II MHC αντιγόνα DR3 και DR4, που έχουν την ιδιότητα να καθορίζουν πιο αποτελεσματικά την αναγνώριση των αυτοαντιγόνων σε σχέση με άλλα (305-307), έχουν συσχετιστεί τόσο με την ΑΗ (308) όσο και με αυτοάνοσες αντιδράσεις-εκδηλώσεις σε ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (305,307).

Κατά συνέπεια, η δομή του HCV, που σχετίζεται με τον εκάστοτε γονότυπο του ιού, δε φαίνεται να επηρεάζει την παραγωγή αυτοαντισωμάτων, την παρουσία αυτοανόσων εκδηλώσεων, ή και των δύο (160,255,305,309).

Επιπλέον, ενώ η απάντηση στην a-IFN σχετίζεται άμεσα με τον γονότυπο του ιού (13,310,311), η παρουσία αυτοαντισωμάτων δε φαίνεται να την επηρεάζει, τουλάχιστο, στους περισσότερους ασθενείς (157,163,255,312).
Η ετερογενής αυτή αυτοάνοση απάντηση, που παρατηρείται στην χρόνια ηπατίτιδα C, με την παραγωγή πληθώρας αυτοαντισωμάτων, γεννά το ερώτημα αν τα αυτοαντισώματα συμβάλλουν στη σχετιζόμενη με τον HCV ηπατοπάθεια. Παρά την χρησιμότητά τους στη διάγνωση και την έρευνα της ιστικής βλάβης, δεν είναι σαφής αν τα αυτοαντισώματα συμβάλλουν στην πρόοδο της ιστικής βλάβης. Στη μελέτη των Lenzi et al (239), που συμπεριέλαβε υπολογισμένους HCV θετικούς ασθενείς από το γενικό πληθυσμό, η παρουσία NOSA βρέθηκε ότι συσχετίζεται με τις κλινικές εκδηλώσεις της χρόνιας ηπατικής νόσου και με αυξημένες τιμές αμινοτρανσφερασών χωρίς όμως να σημαίνει ότι σχετίζονται και αιτιοπαθογενετικά με την ιστική βλάβη. Επιπλέον, οι Cassani et al (245) βρήκαν ότι η παρουσία αντι-LKM1 αντισωμάτων σε ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV σχετίζεται με πιο σοβαρή ιστολογικά νόσο. Πιθανόν, ο παθογενετικός ρόλος των αντι-LKM 1 αντισωμάτων στην πρόκληση ιστικής βλάβης σε ορισμένους ασθενείς HCV/αντι-LKM 1 θετικούς, να σχετίζεται, όπως και στην AH-2, με την άμεση σύνδεση των αντισωμάτων αυτών στην ηπατοκύτταρα, οδηγώντας στη συνέχεια τους, ή τη διήθηση του ήπατος από KYTP450 2D6-ειδικά Τ λεμφοκύτταρα. Απαραίτητη προϋπόθεση για την παραπάνω πιθανή εξήγηση αποτελεί η έκφραση του κυτοχρώματος στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων, που έχει πειστικά αποδειχθεί από πρόσφατες μελέτες (313-316).
Βιβλιογραφία 2

1. WHO. Hepatitis C. Weekly Epidemiol Record 2000; Fact Sheet 164.


5. Trepo C, Pradat P. HepatitisC virus infection in Western Europe. J Hepatol 1999 ; 31(Suppl 1) :80-83.


Epidemiology of the HCV infection in various regions of 

A, B and C in a well defined area in rural Crete, Greece. J Viral Hepat 

12. Conry-Cantilena C et al. Routes of infection, viremia and liver disease 
in blood donors found to have hepatitis C virus infection. N Engl J Med 
1996; 334:1691-1696.

13. EASL International Consensus Conference on hepatitis C. J Hepatol 

to hepatitis C virus infection in a study of transfusion associated 

15. Tassopoulou NK, Chatzakis A, Delladetsima I, et al. Ο ρόλος του ιού 
tης ηπατίτιδας C στην οξεία μετά μετάνομα μη-Α, μη-Β ηπατίτιδα. 

chronic disease in children with leukemia in long term remission. Blood 

hepatitis C virus by second generation immunoassays in a cohort of 

18. Vander Poel C. Hepatitis C virus and blood transfusion: past and 


54. Honda M, Beard MR, Ping LH, et al. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site


62. Shimizu YK, Igarashi H, Kiohara T, et al. A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1
of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures. Virology 1996; 223;409-412.


77. Γερμανίδης Γ, Pawlotsky JM. Προσδιορισμός γονότυπων και παρόμοιων γονιδιωμάτων του ιού της ηπατίτιδας C (HCV). Βασικές
141


94. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, et al. Search for hepatitis C virus extrahepatic replication sites in patients with acquired


176. Agnello V. The etiology and pathophysiology of mixed cryoglobulinemia secondary to hepatitis C virus infection. Springer Sem Immunopathol 1997; 19:111-129.


(CVH) are mainly linked to hepatitis C virus (HCV) infection. Digestion 1998; 59(Suppl 3):36-37.


ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΑΝΤΙΕΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ ΜΙΚΡΟΣΩΜΙΩΝ ΗΠΑΤΟΣ-ΝΕΦΡΩΝ (ANTI-LKM) ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΜΗ-ΟΡΓΑΝΟΕΙΔΙΚΩΝ ΑΥΤΟΑΝΤΙΕΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΔΕΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C.
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

Στην αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1 (AH-1) ανευρίσκονται αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA), αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ινών (SMA), αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος ουδετεροφιλών (ANCA), ή/και αντισώματα κατά διαλυτών ηπατικών αντιγόνων ή/κατά κυτοσολίων ήπατος (αντι-LKM) ή/κατά κυτοσολίων ήπατος τύπου 1 (αντι-LC1) (21,22). Η αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 2 (AH-2) χαρακτηρίζεται από την παρουσία ειδικών αυτοαντισωμάτων κατά μικροσωμικών αντιγόνων ήπατος-νεφρών (αντι-LKM) ή κατά κυτοσολίων ήπατος τύπου 2 (αντι-LC2) (21,22). Η πρωτοπαθής χολική κίρρωση χαρακτηρίζεται από την ανίχνευση αντιμιτοχονδρικών αντισωμάτων (AMA) στο 90% των ασθενών. Επιπρόσθετα, μπορεί να ανιχνεύονται σε διάφορους τίτλους ANA και pANCA.
(20,23). Τέλος η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα χαρακτηρίζεται από την απουσία των ΑΜΑ και συχνή ανίχνευση pANCA και ANA (20,24).

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

Η σύγχρονη χρήση του προσδιορισμού των αυτοαντισωμάτων έγκειται στην πιθανή υποβοήθηση της διάγνωσης, της παρακολούθησης και τη μελέτη της παθογένειας της ηπατικής βλάβης καθώς και στην πιθανή αναγνώριση υποομάδων HCV θετικών ασθενών με διαφορετική ανταπόκριση στη θεραπεία ή διαφορετική έκβαση. Παρ'όλα αυτά, δεν είναι γνωστό μέχρι στιγμής, αν τα αυτοαντισώματα, που ανιχνεύονται στη χρόνια λοίμωξη από τον HCV, σχετίζονται παθογενετικά είτε με τις εξωηπατικές εκδηλώσεις της λοίμωξης είτε με επιδείνωση της ηπατικής νόσου (3,7,28,29). Επί του παρόντος, είναι γνωστό ότι ένα μικρό ποσοστό ασθενών HCV/αντι-LKM θετικών παρουσιάζουν έξαρση της ηπατικής νόσου κατά τη θεραπεία με α-IFN (30,31) και επομένως η χορήγηση θεραπείας στην υποομάδα αυτή των ασθενών θα πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή και στενή παρακολούθηση για τυχόν επαναληπτική λανθάνουσας ΑΗ (25,32,33). Αντίθετα, η ανοσοκατασταλτική θεραπεία, που χορηγείται στις περιπτώσεις ΑΗ μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο ικόνο πολλαπλασιασμό και επιδείνωση της ηπατικής
βλάβης στην περίπτωση ιογενούς ηπατίτιδας (4,34). Επιπλέον, καθώς ο μηχανισμός παραγωγής των αυτοαντισωμάτων κατά τη διάρκεια της χρόνιας ηπατίτιδας C δεν είναι γνωστός, δεν είναι διευκρινισμένο αν ο γονότυπος του ιού παίζει κάποιο ρόλο στην εμφάνιση των αυτοαντισωμάτων ή/και των αυτοανόσων εκδηλώσεων (18,35).

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

2.1.1. Ασθενείς

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

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

Η διάγνωση της χρόνιας λοίμωξης από τον HCV έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια του EASL (EASL International Consensus criteria) (36). Εν συντομία, οι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη πληρούσαν τα παρακάτω κριτήρια: α) ορολογική απόδειξη χρόνιας λοίμωξης από τον HCV όπως αυτή ορίζεται από την ανίχνευση αντισωμάτων εναντίον του ιού (anti-HCV) με ανοσοενζυμική μέθοδο δεύτερης ή τρίτης γενεάς (Murex Diagnostics, Temple Hill, Dartford, UK), τουλάχιστο δύο φορές μέσα σε έξι μήνες πριν την είσοδο στη μελέτη, β) ενεργό πολλαπλασιασμό του ιού όπως ορίζεται από την
ανίχνευση HCV RNA με τη χρήση της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, Cobas Amplicor HCV Monitore test, Roche) ή με τη μέθοδο τροποποιημένης ενίσχυσης του προϊόντος μεταγραφής (transcription mediated amplification, TMA, Bayer). Ολοι οι ασθενείς ήταν αρνητικοί για αντισώματα έναντι του HIV (anti-HIV) (Abbot Laboratories, Wiesbaden, Germany), το VDRL test, και την άμεση αντίδραση Coombs.

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

Επιπρόσθετα, στη στατιστική ανάλυση συμπεριλήφθηκαν ορισμένοι επιδημιολογικοί και δημογραφικοί παράγοντες όπως: ιστορικό εγχειρήσεων, τατουάζ, ενέσεις με κοινόχρηστες σύριγγες, παραδοσιακές πρακτικές (όπως βελονισμός ή βεντούζες), ή κατάχρηση αλκοόλ. Από το ιατρικό ιστορικό κάθε ασθενούς δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην παρουσία ή όχι μη ειδικών συμπτωμάτων (καταβολή, μυαλγίες, αρθραιτίδες), κατά τη διάγνωση της λοίμωξης, καθώς και εξωηπατικών εκδηλώσεων σχετιζόμενων με την ηπατίτιδα C. Έτσι, καταγράφηκε η ύπαρξη εξωηπατικών εκδηλώσεων σχετικά με την ηπατίτιδα C. Έτσι, καταγράφηκε η ύπαρξη εξωηπατικών εκδηλώσεων, όπως: δερματικές εκδηλώσεις (Raynaud φαινόμενο, αγγειίτιδα, πορφύρα), ρευματολογικές εκδηλώσεις (αρθραιτίδα, μυοσίτιδα), νεφρική συμμετοχή (σπειραματονεφρίτιδα), νευρολογικές εκδηλώσεις (περιφερική αισθητική ή/και κινητική νευροπάθεια, εκδηλώσεις από το κεντρικό νευρικό σύστημα, ημικρανίες), νεφρική συμμετοχή (στοιχειατονεφρίτιδα), σύνδρομο σικσί (οφθαλμών ή/και στόματος), σύνδρομο Sjögren, ιστορικό B-κυτταρικού μη-
Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των 303 ασθενών με λοίμωξη από τον HCV.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των 303 ασθενών με λοίμωξη από τον HCV.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td><strong>HCV (+) ασθενείς (n = 303)</strong></td>
</tr>
<tr>
<td>Φύλο (άνδρας/ γυναίκα)</td>
</tr>
<tr>
<td>Μέση ηλικία</td>
</tr>
<tr>
<td>Διάρκεια λοίμωξης</td>
</tr>
<tr>
<td>Πηγή λοίμωξης</td>
</tr>
<tr>
<td>Βέβαιη</td>
</tr>
<tr>
<td>Ιν χρήση ναρκωτικών</td>
</tr>
<tr>
<td>αιμοκάθαρση</td>
</tr>
<tr>
<td>Αβέβαιη</td>
</tr>
<tr>
<td>πολλαπλές ερωτικοί σύντροφοι</td>
</tr>
<tr>
<td>πολλαπλές ναρκωτικές χρήσεις</td>
</tr>
<tr>
<td>πολλαπλές οδοντιατρικές εργασίες</td>
</tr>
<tr>
<td>επάγγελμα υπηρεσιών νυχιών</td>
</tr>
<tr>
<td>μέλος οικογένειας με λοίμωξη από τον HCV</td>
</tr>
<tr>
<td>άγνωστη</td>
</tr>
<tr>
<td>Ιστορικό εγχειρήσεων (ναι/ όχι)</td>
</tr>
<tr>
<td>Τατουάζ (ναι/όχι)</td>
</tr>
<tr>
<td>Ιστορικό ενέσεων με κοινόχρηστες σύριγγες (ναι/όχι)</td>
</tr>
<tr>
<td>Ιστορικό παραδοσιακών τεχνικών (ναι/όχι)</td>
</tr>
<tr>
<td>Κατάχρηση αλκοολ (ναι/όχι)</td>
</tr>
<tr>
<td>Λήψη άλλων φαρμάκων (ναι/όχι)</td>
</tr>
<tr>
<td>Συμπτώματα κατά τη διάγνωση (ναι/όχι)</td>
</tr>
<tr>
<td>Εξωητικές εκδηλώσεις</td>
</tr>
<tr>
<td>Sjogren</td>
</tr>
<tr>
<td>Sicca</td>
</tr>
<tr>
<td>κρυοσφαιριναιμία</td>
</tr>
<tr>
<td>σπειραματονεφρίτιδα</td>
</tr>
<tr>
<td>μυοσίτιδα</td>
</tr>
<tr>
<td>Hashimoto</td>
</tr>
<tr>
<td>πνευμονική ίνωση</td>
</tr>
<tr>
<td>ψωρίαση</td>
</tr>
<tr>
<td>ύμημη δερματική πορφυρία</td>
</tr>
<tr>
<td>πολυαρθριτικό σύνδρομο</td>
</tr>
<tr>
<td>ομαλός λειχήνας</td>
</tr>
<tr>
<td>ειδιοπαθή θρομβοπενική πορφυρά</td>
</tr>
<tr>
<td>Θρομβοβεβαλικά επεισόδια</td>
</tr>
<tr>
<td>έμφραγμα μυοκαρδίου</td>
</tr>
<tr>
<td>ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο</td>
</tr>
<tr>
<td>πνευμονική εμβολή</td>
</tr>
<tr>
<td>εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση άκρου</td>
</tr>
<tr>
<td>θρόμβωση κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδούς</td>
</tr>
<tr>
<td>θρομβοποιητική θρομβοπενική πορφυρά</td>
</tr>
<tr>
<td>Αποβολές (ναι/όχι)</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Hodgkin λεμφώματος, ιστορικό θρομβωτικών επεισοδίων αρτηριών ή/και φλεβών (οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, πνευμονική εμβολή, εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση των κάτω, των άνω άκρων ή εσωτερικών οργάνων), καθ'έξιν αποβολές (δύο ή πετρισσότερες). Έτσι (Πίνακας 1), τέσσερις ασθενείς έπασχαν από σύνδρομο Sjögren εκ των οποίων ο ένας έπασχε και από κλινικώς εμφανή κρυοσφαιραιμία. Ένας ασθενής έπασχε από σύνδρομο sicca (ξηροστομία). Δύο ασθενείς έπασχαν από σπειραματονεφρίτιδα, δύο από κλινικώς έκδηλη κρυοσφαιραιμία, ένας από μυοσίτιδα, οκτώ από θυρεοειδίτιδα Hashimoto, ένας από ιδιοπαθή τρομοκερατική ινωση, τρεις από ψωρίαση, ένας από όψιμη δερματική πορφυρία, ένας από πολυαρθριτικό σύνδρομο, ένας από οξύ θάνατο λειχήνα και ένας από ιδιοπαθή βρομβοπενική πορφυρία. Ως σαφείς εξωηπατικές εκδηλώσεις σχετιζόμενες με την εξωηπατική εκδηλώση της λοίμωξης της ιοτικής κρυοσφαιραιμίας, η σπειραματονεφρίτιδα, το σύνδρομο sicca και Sjögren, καθώς και η οξύ θάνατος πολυαρθρητιδίτιδα (6). Για στατιστικούς και πάλι λόγους οι ασθενείς χωρίς αποβολή δύο ή περισσότερες εκδηλώσεις από τον HCV θεωρήθηκαν οι από σχετικές με την ιοτική κρυοσφαιραιμία, η σπειραματονεφρίτιδα, το σύνδρομο sicca και Sjögren, καθώς και η οξύ θάνατος πολυαρθρητιδίτιδα (6). Για στατιστικούς και πάλι λόγους οι ασθενείς χωρίς αποβολή δύο ή περισσότερες εκδηλώσεις από τον HCV θεωρήθηκαν οι από σχετικές με την ιοτική κρυοσφαιραιμία, η σπειραματονεφρίτιδα, το σύνδρομο sicca και Sjögren, καθώς και η οξύ θάνατος πολυαρθρητιδίτιδα (6). Για στατιστικούς και πάλι λόγους οι ασθενείς χωρίς αποβολή δύο ή περισσότερες εκδηλώσεις από τον HCV θεωρήθηκαν οι από σχετικές με την ιοτική κρυοσφαιραιμία, η σπειραματονεφρίτιδα, το σύνδρομο sicca και Sjögren, καθώς και η οξύ θάνατος πολυαρθρητιδίτιδα (6).
θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας (ιστορικό θρομβοεμβολικών επεισοδίων 10 από τους 243 HCV ασθενείς για τους οποίους υπήρχε καταγραφή της ύπαρξης ή όχι ιστορικού θρομβοεμβολικών επεισοδίων). Από τις 131 γυναίκες (για τις οποίες υπήρχε καταγραφή της ύπαρξης ή όχι ιστορικού καθ' έξιν αποβολών), 10 ανέφεραν στο ιστορικό τους δύο ή περισσότερες αποβολές. Τέλος, 233 ασθενείς δεν έπαιρναν κατά την είσοδό τους στη μελέτη ειδική αντι-ιική θεραπεία, ενώ οι υπόλοιποι 70 βρισκόταν υπό αγωγή (α-IFN ή συνδυασμό α-IFN με ριμπαβιρίνη).

Τα επίπεδα της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST), της αλανινοαμινοτρανσφεράσης (ALT), της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP), της γ-γλουταμυλικής-τρανσπεπτιδάσης (γΘΤ), και των γ-σφαιρινών και αλβουμίνης προσδιορίστηκαν σε αυτόματους αναλυτές. Η παρουσία θρομβοπενίας ορίστηκε ως τιμή αιμοπεταλίων κάτω των 140.000/mm³. Δείκτες ηπατίτιδας Β υπήρχαν στους 268 από τους 303 ασθενείς [οι υπόλοιποι 35 είχαν αρνητικό αντιγόνο επιφάνειας του ιού της ηπατίτιδας Β (HBsAg), αλλά δεν υπήρχαν στοιχεία για τους υπόλοιπους δείκτες]. Από τους 268 αυτούς ασθενείς οι 10 είχαν θετικό HBsAg. Ετσι, οι ασθενείς χωρίστηκαν για λόγους στατιστικής ανάλυσης σε δύο κατηγορίες α) HCV(+)/HBsAg(+) (10 από τους 303 HCV ασθενείς) και β) HCV(+)/HBsAg(−) (οι υπόλοιποι 293). Επιπλέον, οι 258 ασθενείς, με αρνητικό HBsAg και γνωστούς τους υπόλοιπους δείκτες λοίμωξης από τον ιο της ηπατίτιδας Β (HBV), χωρίστηκαν σε: α) HCV ασθενείς με αρνητικούς όλους τους δείκτες (163 από τους 258 ασθενείς) και β) HCV ασθενείς με διάφορους συνδυασμούς δεικτών (95 από τους 258 ασθενείς: 35 ήταν αντι-HBc και αντι-HBs θετικοί, 23 ήταν μόνο αντι-HBc θετικοί, 9 ήταν αντι-HBc, αντι-HBs και αντι-HBe θετικοί, 7 ήταν αντι-HBc και
αντι-HBe θετικοί, ένας ήταν αντι-HBs και αντι-HBe θετικός και 20 είχαν θετικά μόνο τα αντι-HBs αντισώματα). O γονότυπος προσδιορίστηκε σε 167 από τους 303 ασθενείς μετά από υβριδισμό του προϊόντος PCR σε λωρίδες νιτροκυτταρίνης (Innolipa, HCV III Innogenetics), ενώ ποσοτικός προσδιορισμός του HCV RNA έγινε στους 55 από τους 303 HCV ασθενείς (PCR, Cobas Amplicor HCV Monitore test, Roche).

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

2.1.2. Ασθενείς (n = 174)

Από τους 303 ασθενείς οι 174, με τυχαία επιλογή, ελέγχθηκαν για αντι-CL αντισώματα και επιπλέον για αντισώματα έναντι του συμπαράγοντα β2-γλυκοπρωτεΐνη I (αντι-β2-GPI), ώστε να διερευνηθεί αν τα αντι-CL αντισώματα, που ανιχνεύονται στους ασθενείς με ηπατίτιδα C είναι ή όχι 'παθογενετικά' (εξαρτώμενα από τη β2-GPI). Ως μάρτυρες ελέγχθηκαν 50
ασθενείς με ηπατίτιδα B και 267 υγιείς αιμοδότες. Όλοι οι 174 ασθενείς με ηπατίτιδα C ήταν αρνητικοί για το HBsAg, οι ασθενείς με ηπατίτιδα B ήταν αρνητικοί για anti-HCV αντισώματα, ενώ οι υγιείς ήταν αρνητικοί για το HBsAg και για anti-HCV αντισώματα. Ασθενείς και υγιείς ήταν αρνητικοί για αντισώματα έναντι του HIV. Τα χαρακτηριστικά των 174 HCV ασθενών, των 50 HBV ασθενών και των 267 υγιών αιμοδοτών φαίνονται στον Πίνακας 2.

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

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>HCV ασθενείς (n=174)</th>
<th>HBV ασθενείς (n=50)</th>
<th>Υγιείς αιμοδότες (n=267)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Άνδρες/γυναίκες</td>
<td>82/92</td>
<td>30/20</td>
<td>150/117</td>
</tr>
<tr>
<td>Μέση ηλικία (χρόνια)</td>
<td>51</td>
<td>47</td>
<td>48</td>
</tr>
<tr>
<td>Εύρος ηλικίας (χρόνια)</td>
<td>17-83</td>
<td>18-71</td>
<td>18-60</td>
</tr>
<tr>
<td>Πηγή λοίμωξης</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Βέβαια</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>metagýisis</td>
<td>51</td>
<td>3</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Χρήση ναρκωτικών ουσιών</td>
<td>38</td>
<td>-</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Αιμοκάθαρση</td>
<td>3</td>
<td>-</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Αβέβαια</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Πολλαπλές νοσηλείες</td>
<td>6</td>
<td>-</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Πολλαπλοί ερωτικοί σύντροφοι</td>
<td>5</td>
<td>-</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Πολλαπλες οδοντιατρικες εργασιες</td>
<td>1</td>
<td>-</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Λοίμωξη μέλους της οικογένειας</td>
<td>11</td>
<td>25</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Επάγγελμα Υγείας</td>
<td>2</td>
<td>-</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Αγνωστη</td>
<td>57</td>
<td>22</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Θεραπεία (όχι/ναι)*</td>
<td>122/52</td>
<td>40/10</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Δείκτες προηγούμενης HBV λοίμωξης**</td>
<td>119</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Ολοί αρνητικοί</td>
<td>119</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Αντι-HBcore (+)</td>
<td>49</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Γονότυπος HCV***</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>1b/non 1b</td>
<td>39/45</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

*Θεραπεία: α-IFN 3MU t.i.w ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με ριμπαβιρίνη (ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV) και α-IFN 5MU t.i.w (ασθενείς με λοίμωξη από τον HBV).
**Διαθέσιμα δεδομένα για 168 ασθενείς. Οι υπόλοιποι 6 ασθενείς ήταν αρνητικοί για το HBsAg, ενώ οι υπόλοιποι δείκτες λοίμωξης από τον HBV δεν ήταν διαθέσιμοι.
***Γονότυπος προσδιορίστηκε ατούς 84 ασθενείς με ηπατίτιδα C.
Επιπλέον, εξωηπατικές εκδηλώσεις είχαν 7 από τους 174 ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV (3 είχαν σύνδρομο Sjögren, 2 κλινικά εκδηλή κρυοσφαιριναιμία, 1 σύνδρομο Sjögren και κρυοσφαιριναιμία και 1 σπειραματονεφρίτιδα) και 1 από τους 50 ασθενείς με λοίμωξη από τον HBV (κλινικά εκδηλη κρυοσφαιριναιμία). Ιστολογικά δεδομένα ήταν διαθέσιμα για τους 113 ασθενείς με ηπατίτιδα C και για τους 30 ασθενείς με ηπατίτιδα B.

2.1.3. Ασθενείς (n = 39)

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

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

Η ανίχνευση των αντι-LKM αντισωμάτων, καθώς και των ANA, SMA, AMA PCA και αντι-LC1, χρησιμοποιήθηκαν σαν υπόστρωμα κατεψυγμένες τομές ήπατος, νεφρού και στομάχου αρουραίων (Wistaar rats).
Αναλυτικότερα, μετά από αφαίρεση του ήπατος, των νεφρών και του στομάχου των αρουραίων, κόβονταν τομές πάχους 7μμ σε κρυοτόμο (Leica CM 1850), που στη συνέχεια τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και φυλάσσονταν στους -20οC. Αρχικά, για το πείραμα γινόταν τοποθέτηση σε κάθε block ήπατος-νεφρού-στομάχου 200 μl των δειγμάτων θετικών και αρνητικών μαρτύρων και των υπό εξέταση ορών σε αραίωση σε αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.15 mol/l, PH 7.4 (PBS), 1:40, 1:80, 1:160 και 1:320. Μετά από επώαση 40min σε ιχνοφωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.15 mol/l, PH 7.4 (PBS), 1:40, 1:80, 1:160 και 1:320. Μετά από επώαση 40min σε υγρό περιβάλλον με υδρογονανθράκη της θερμοκρασίας και μονοπλακός 200 μl της αντι-ανθρώπινης IgG σε αραίωση 1:50, που ήταν συνδεμένη με φλουοροσκετένη (FITC conjugate, DAKO). Μετά από νέα επώαση 40min στις προαναφερθείσες συνθήκες, γινόταν πλύσιμο των πλακών με PBS (τρεις φορές) και μετά από τοποθέτηση, πτώση 40min στις προαναφερθείσες συνθήκες, γινόταν πλύσιμο (τρεις φορές) και μετά από τοποθέτηση γλυκερόλης (1%), παρατήρηση των αποτελεσμάτων σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού (tύπος μικροσκοπίου: Axiolab, 35mm SLR Cameras, Zeiss). Θετικό θεωρήθηκε κάθε δείγμα με ανιχνεύσιμο φθορισμό σε αραίωση ≥1:40.

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

Η ανίχνευση των ANA, AMA, SMA έγινε εκτός από τις τομές σε ιστούς τρωκτικών (βλέπε 2.2.) και μετά από χρήση εμπορικά διαθέσιμων πλακιδίων μονοπλακομεμβρήνων κυττάρων λαρυγγικού καρκίνωματος ανθρώπου (NOVA Lite, HEp2 ANA kit, INOVA Diagnostics). Αρχικά τοποθετούνταν στις θέσεις του πλακίδιου τα δείγματα των θετικών και αρνητικών μαρτύρων και των υπό
εξέταση ορών σε αραιώσεις 1:80, 1:160 και 1:320 και επωάζονται για 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στο σκοτάδι με ικανοποιητική υγρασία. Στη συνέχεια γίνεται πλύσιμο των πλακιδίων με PBS (δύο φορές για 10 min) και τοποθέτηση, μίας σταγόνας ανά θέση (=50μΙ), αντι-ανθρώπινης IgG συνδεμένης με φλουοροσκείνη (FITC conjugate). Μετά από νέα επώαση, στις προαναφερθείσες συνθήκες, για 30min και επανάληψη του πλυσίματος, γινόταν εκτίμηση των αποτελεσμάτων σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού (τύπος: AxioLab, 35mm SLR Cameras, Zeiss ). Θετικό θεωρήθηκε κάθε δείγμα με ανιχνεύσιμο φθορισμό σε αραιώση ≥1:40.

2.4. Ανίχνευση ANCA με έμμεσο ανοσοφθορισμό
Η ανίχνευση των ANCA, έγινε χρησιμοποιώντας εμπορικά εμβρύοντα διαθέσιμα πλακίδια, που φέρουν σε θέσεις μονιμοποιημένα σε αιθανόλη ουδετερόφιλα (NOVA Lite, ANCA kit, INOVA Diagnostics). Σε κάθε πείραμα τοποθετήθηκαν στις θέσεις των πλακιδίων τα δείγματα των θετικών και αρνητικών μαρτύρων καθώς και οι προς εξέταση οροί σε αραιώσεις 1:20, 1:40 και 1:80 και στη συνέχεια ακολουθείται η ίδια διαδικασία, που περιγράφηκε για την ανίχνευση των ANA, AMA, SMA σε υπόστρωμα HEP2. Θετικό θεωρήθηκε κάθε δείγμα με ανιχνεύσιμο φθορισμό σε αραιώση ≥1:20.

2.5. Ανίχνευση IgG αντισωμάτων κατά καρδιολιπίνης (anti-CL)
Οι τίτλοι των IgG anti-CL αντισωμάτων προσδιορίστηκαν με μία ποσοτική στερεάς φάσης ανοσοενζυμική μέθοδο που αναπτύχθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Παθολογίας (8). Εν συντομία, έγινε στρώση πλακιδίων με επίπεδο πυθμένα (microtitre flat bottom plates) (Nunc, Roskilde
Denmark) με 25μι διαλύματος βοείου καρδιολιττίνης (Sigma, St Louis, MO, USA) σε απόλυτη αιθανόλη (50μg/ml). Τα πλακίδια αφέθηκαν να στεγνώσουν στους 0-4°C για 16-18 ώρες στο σκοτάδι. Στη συνέχεια μετά από τρείς φορές πλύσιμο με PBS γινόταν προσθήκη 100 μι/πηγάδι βοείου ορού (BS) 10% σε PBS και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά από μία φορά πλύσιμο με PBS, γινόταν προσθήκη 50 μι/πηγάδι των δειγμάτων (ασθενών, θετικών μαρτύρων και 10 υγίων ανά πλακίδιο) σε αραίωση 1:50 σε 10% BS, εις διπλούν και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από πλύσιμο του κάθε πλακίδιου πέντε φορές με PBS, γινόταν προσθήκη σε κάθε πηγάδι 50μι αντι-ανθρώπινης IgG αιγός συνδεμένης με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (alkaline phosphatase conjugated goat anti-human IgG, Seralab), σε αραίωση 1:2000 σε 10% BS. Μετά από νέα επώαση για 90min σε θερμοκρασία δωματίου το κάθε πλακίδιο πλενόταν με PBS (πέντε φορές). Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη του υποστρώματος [50 μι/πηγάδι p-nitrophenyl phosphate (Sigma) σε συγκέντρωση 1 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα διεθανολαμίνης, PH 9.8]. Μετά από επώαση 30 min στους 37°C στο σκοτάδι, γινόταν διακοπή της αντίδρασης με προσθήκη 50 μι/πηγάδι διαλύματος NaOH 3N. Τα αποτελέσματα (οπτική πυκνότητα, OD) διαβάζονταν σε 'ανιχνευτή' (Stat 2100) στα 405 nm με μήκος κύματος αναφοράς τα 630 nm. Η ειδικότητα και αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου έχουν καθοριστεί από εκτενή προκαταρκτικά πειράματα όπως έχει περιγραφεί σε παλαιότερες μελέτες (28,29,40-43). Εν συντομία, η καμπύλη κατασκευάστηκε με
επαναλαμβανόμενες εξετάσεις δειγμάτων θετικών μαρτύρων για IgG αντι-CL αντισώματα σε σειρά αραιώσεων από 1:50 ως 1:6400. Η OD της αραιώσης 1:6400 επιλέχθηκε αυθαίρετα να αντιπροσωπεύει 1 μονάδα δεύσμευσης (BU, binding unit). Οι τιμές BU των υπό εξέταση δειγμάτων υπολογίστηκαν σύμφωνα με την καμπύλη του εκάστοτε πλακιδίου, διαιρώντας την OD κάθε υπό εξέταση δείγματος με την OD, που αντιστοιχούσε σε 1 BU του συγκεκριμένου πλακιδίου. Τελικά, η έκφραση των αποτελεσμάτων γινόταν ως δείκτης δέσμευσης (BI, binding index), που υπολογίζονταν διαιρώντας την BU κάθε δείγματος με τη μέση τιμή των BU τιμών της ομάδας των υγιών μαρτύρων συν 4SD, πολλαπλασιαζόμενο επί 100. Σύμφωνα με αυτόν τον τύπο, το BI με τιμή 100 ορίστηκε ως το cut-off της μεθόδου. Η υιοθέτηση αυτού του υψηλού cut-off ελαχιστοποιεί την πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (7,28,29,40-43). Επιπλέον, με βάση παλαιότερες μελέτες (28,29,40), τιμές BI>200 ορίστηκαν ως πολύ θετικό αποτέλεσμα για IgG αντι-CL αντισώματα, ενώ τιμές BI μεταξύ 100 και 200 ορίστηκαν ως χαμηλά-μέτρια θετικές.

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

Αρχικά γινόταν στρώση των πλακιδίων με επίπεδο πυθμένα (Nunc, Roskilde Denmark), με L-πολυλυσίνη (συγκέντρωση 50μγ/ml σε PBS) 50μΙ ανά πηγάδι του πλακιδίου και επώαση στους 37°C για 2 ώρες. Μετά από πλύσιμο του πλακιδίου με 100μΙ/πηγάδι PBS μία φορά, γινόταν προσθήκη 50μΙ/πηγάδι του αντιγόνου (φυσικό DNA 50μιγ/ml σε απιονισμένο H₂O). Μετά από επώαση για 1 ώρα στους 37°C γινόταν επίσης στο σκοτάδι στους 4°C.
188

για 16-18 ωρες. Στη συνέχεια, μετά από πλύσιμο του πλακιδίου με 100μι/πηγάδι PBS (τρεις φορές), γινόταν προσθήκη S1-νουκλεάσης (100μι/πηγάδι, συγκέντρωση 50U/ml σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα, S1-nuclease buffer: 0.3Μ CH₃COONa, 0.05Μ NaCl, 0.01Μ ZnSO₄·H₂O, γλυκερόλη 5% και απεσταγμένο νερό, PH=4.6). Μετά από επώαση 1 ώρα στους 37°C γινόταν νέο πλύσιμο με 100μι/πηγάδι PBS (δύο φορές) και στη συνέχεια προσθήκη 100μι/πηγάδι BS 10% σε PBS. Μετά από νέα επώαση 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος η διαδικασία συνέχιζταν μέχρι τέλους όπως ακριβώς γινόταν στον προσδιορισμό των IgG αντι-CL αντισωμάτων, που περιγράφηκε παραπάνω (βλέπε 2.5.).

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

Τα αντι-β2-GPI αντισώματα ανιχνεύθηκαν με εμπορικά διαθέσιμο kit ανοσοενζυμικής μεθόδου (ELISA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (QUANTA Lite™ β2 GPI IgG, INOVA Diagnostics). Εν συντομία, γινόταν προσθήκη (100μι/πηγάδι) των δειγμάτων (μαρτύρων, και ασθενών) στα πηγάδια των πλακιδίων πολυστερίνης του kit (στον πυθμένα των οποίων ήταν ήδη συνδεδεμένο το αντιγόνο, δηλαδή κεκαθαρμένη β2-GPI), εις διπλούν: οi μάρτυρες είχαν γνωστούς τίτλους αντι-β2-6ΡΙ αντισωμάτων, ενώ τα δείγματα προσθέτονταν σε αραίωση 1:101. Μετά από επώαση 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, γινόταν πλύσιμο των πλακιδίων 3 φορές με 200μι/πηγάδι HRP Wash buffer (που περιείχε: Tween 20, tris-buffered saline διαλυμένα σε απιονισμένο νερό). Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 100μι/πηγάδι αντι-ανθρώπινης IgG αιγός (HRP IgG conjugate), επώαση για 30min και πλύσιμο 3
φορές με το προαναφερθέν διάλυμα (HRP Wash buffer). Μετά από προσθήκη
100μ/πηγάδι χρωμογόνου (TMB Chromogen) και επώαση στο σκοτάδι για
30min σε θερμοκρασία δωματίου, γίνονταν διακοπή της ενζυμικής αντίδρασης,
προσθέτοντας 100μ/πηγάδι διάλυμα θειικού οξέος 0.344Μ (HRP Stop
solution). Τα αποτελέσματα (οπτική πυκνότητα, OD) διαβάζονταν σε
'ανιχνευτή' (Stat 2100) στα 450 nm με μήκος κύματος αναφοράς τα 630nm. Η
παρουσία ή απουσία αντι-β2-GPI αντισωμάτων προσδιορίζονταν
συγκρίνοντας τη μέση τιμή της OD του κάθε δείγματος με αυτές της καμπύλης
των πέντε μαρτύρων της μεθόδου. Τα αποτελέσματα εκφράζονταν
ημιποσοτικά σε IgG αντι-β2-GPI μονάδες (SGU; θετικός τίτλος > 20 SGU,
σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή).

2.8. Άλλες μέθοδοι ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων

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

Από τους 39 ορούς εκείνοι που ήταν θετικοί για αντι-LKM αντισώματα
tουλάχιστο με μία από τις χρησιμοποιηθείσες μεθόδους (ΕΑΦ σε τομές
ήπατος, νεφρού, στομάχου αρουραίου, ανοσοαποτύπωση και ανταγωνιστική ELISA) ελέγχθηκαν περαιτέρω με μεθόδους ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένο KYT 2D6 και ανασυνδυασμένο P450 2C9 (KYT 2C9, που αποτελεί στόχο των anti-LKM 2 αντισωμάτων) ως αντιγόνα. Επιπλέον, οι οροί που στην ανοσοαποτύπωση σε ανθρώπινα μικροσώματα έδιναν 'μπάντα' στα 55 kDa ελέγχθηκαν και με μέθοδο ανοσοαποτύπωσης με τη χρήση ανασυνδυασμένης UGT (αυτοαντιγόνον στόχου των anti-LKM 3 αντισωμάτων).

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

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

Κατασκευή pCITE- KYT 2A6

Δημοσιευμένες αλληλουχίες του KYT 2A6 χρησιμοποιήθηκαν ώστε να κατασκευαστεί ένας 'φορέας' έκφρασης του KYT 2A6, pCITE- KYT 2A6 (GenEMBL, M33316 και M33318) (50). Δύο επικαλυπτόμενα τμήματα του
ΚΥΤ 2Α6 cDNA πολλαπλασιάστηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με ανάστροφη μεταγραφή (RT-PCR). Για τον πολλαπλασιασμό του 5' άκρου του 820 bp εκκινητή (primer) οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: 5'GACTGAATTC-CTGGCCTCAGGATGCTTC3' (τέσσερα επιπλέον νουκλεοτίδια - EcoR1 θέση - θέσεις νουκλεοτιδίων 4-22) και 5'ATGCGGATGAGAAAGGAGTC3' (νουκλεοτίδια θέσεων 805-824). Το άκρο 3' των θέσεων 726-1485 πολλαπλασιάστηκε με τη χρήση ζεύγους εκκινητών που αποτελούνταν από τις εξής ακολουθίες: 5'AGGGCTGAGGACTTCATA3' (θέσεις 726-744) και 5'GATC-CTCGAGCGGCACAGCCCGT CAGC3' (τέσσερα επιπλέον νουκλεοτίδια - Xhol θέση - θέσεις νουκλεοτιδίων 1481-1500). Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής έγινε με 500 ng RNA ολικού ανθρώπινου ήπατος, τους αντίστροφους εκκινητές και την ανάστροφη μεταγραφή του ιού MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή (Life Technologies, Eggenstein, Germany). Ο πολλαπλασιασμός των μεταγραφέντων cDNAs έγινε με PCR χρησιμοποιώντας το ένζυμο Taq DNA πολυμεράση (Life Technologies, Eggenstein, Germany) και τους παραπάνω περιγραφέντες εκκινητές. Το cDNA πολλαπλασιάστηκε με 30 κύκλους PCR: στάδιο αποδιάταξης της διπλής έλικας (denaturation) για 1 min στους 94 °C, στάδιο πρόσδεσης εκκινητών (annealing) 2 min στους 50 °C, και στάδιο επιμήκυνσης (extension) για 3 min στους 72 °C. Ένα επιπλέον στάδιο επιμήκυνσης στους 72 °C για 7 min προστέθηκε στον τελευταίο κύκλο. Για να γίνει η σύνδεση των δύο προϊόντων της PCR, χρησιμοποιήθηκε μια κοινή BamH1 θέση, εντοπισμένη στη θέση 777-782 και των δύο προϊόντων PCR. BamH1 πέψη έγινε και στα δύο προϊόντα PCR και οι θέσεις περιορισμού της BamH1 συνδέθηκαν με μία.
Τ4 λιγκάση (New England Biolabs, Schwalbach, Germany). Το παραχθέν cDNA του KYT 2A6 περιορίστηκε από την EcoR1 και τη Xho1 και κλωνοποιήθηκε μέσα στις αντίστοιχες θέσεις περιορισμού της περιοχής pCITE4a (Novagen, Heidelberg, Germany) του 'φορέα' έκφρασης. Η κλωνοποιημένη αλληλουχία του KYT 2A6 επιβεβαιώθηκε με ανάλυσή της (sequencing).

Κατασκευή του pCITE-KYT 1A2

Το αρχικό cDNA pBS/1A2, που χρησιμοποιήθηκε ως 'μήτρα' για την κλωνοποίηση του KYT 1A2 cDNA, ήταν ευγενική προσφορά του καθηγητού R.H. Tukey (UC San Diego). Το cDNA πολλαπλασιάστηκε χρησιμοποιώντας ένα 'προς τα εμπρός' εκκινητή με αλληλουχία: 5’CATT-GGATTCGCA TTGTCCAGTCTGTCC3’ (τέσσερα επιπλέον νουκλεοτίδια – BamH1 θέση – θέσεις: 4-23) και έναν 'ανάστροφο' εκκινητή με αλληλουχία 5’CTGA-CTCGAGTCTTCAATTGATGGAGAACG3’ (τέσσερα επιπλέον νουκλεοτίδια – Xho1 θέση – θέσεις: 1534-1555). Ο πολλαπλασιασμός του cDNA έγινε με PCR χρησιμοποιώντας το ένζυμο Taq DNA πολυμεράση (Life Technologies, Eggenstein, Germany). Οι συνθήκες της PCR για τον πολλαπλασιασμό αυτό ήταν οι εξής: στάδιο αποδιάταξης για 1 min στους 94 0°C, στάδιο πρόσδεσης εκκινητών για 2 min στους 50 0°C και στάδιο επιμήκυνσης για 3 min στους 72 0°C (σύνολο 30 κύκλοι PCR) και τέλος επιμήκυνση στους 72 0°C για 10 min. Ένα μg του προϊόντος της PCR και 0.1 μg pCITE 4a 'φορέος' αναμιχθηκαν, διασπάστηκαν με τα BamH1 και Xho1 και στη συνέχεια συνδέθηκαν με μία T4 λιγκάση (New England Biolabs, Schwalbach, Germany). Και πάλι η κλωνοποιημένη αλληλουχία του KYT 2A6 επιβεβαιώθηκε με ανάλυσή της.
Κατασκευή του pCITE-KYT 2D6

To cDNA για το KYT 2D6 πολλαπλασιάστηκε από ένα πλασμίδιο που το 'εξέφραζε', το pCWVDB11, το οποίο ήταν ευγενική χορηγία του καθηγητού Guengerich (Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA). Η έκφραση του cDNA για το KYT 2D6 στο πλασμίδιο βελτιώθηκε εισάγοντας το σε E.coli, ενώ ο κλώνος περιείχε αλλαγές στα 96 N-τελικά ζεύγη βάσεων (51). Εφόσον ο σκοπός ήταν η in vitro έκφραση της 'φυσικής' πρωτεΐνης KYT 2D6, έγινε αλλαγή της Ν-τελικής αλληλουχίας σύμφωνα με εκείνη που αντιστοιχεί στο 'φυσικό' KYT 2D6. Για το σκοπό αυτό, πολλαπλασιάστηκαν τα πρώτα 255 ζεύγη βάσεων του KYT 2D6 με nested RT-PCR από ανθρώπινο ηπατικό RNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθοι: GTG CCA GGT GTG TCC AGA G (EMBL, M 33388, θέση 1576-1584) και GAG GGT CGT CGT ACT CGA AGC (EMBL, M 33388, θέση 3541-3562) ως πρώτη σειρά εκκινητών και οι GCA TGG ATC CGG GCT AGA AGC ACT GGT G (EMBL, M 33388, θέση 1623-1640 και στη θέση 5’ 10 ζεύγη βάσεων εππλέον συμπεριλαμβανομένου του BamH1) και CAG GAT CTG GGT GAT GGG CAC AG (EMBL, M 33388, θέση 2629-2652) ως δεύτερη σειρά εκκινητών πολλαπλασιασμού. Η C-τελική περιοχή των θέσεων 255-1485 πολλαπλασιάστηκε από το πλασμίδιο pCW/DB11 χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τους: GCC GGT GGT CGT GCT CAA G (EMBL, M 33388, θέση 2551-2571) και GAC TCT CGA GCT AGC GGG GCA CAG CAC AAA GCT C (EMBL, M 33388, θέση 5813-5836). Μία Eag1 θέση εντοπίζοντας στις θέσεις 254-259 και χρησιμοποιήθηκε για τη συγχώνευση του N-τελικού τμήματος του cDNA με το C-τελικό τμήμα. Και τα δύο τμήματα διασπάστηκαν από την Eag1. Το N-τελικό τμήμα περιορίστηκε περαιτέρω.
από την BamH1 και το C-τελικό από την Xho1. Και τα δύο (Ν-τελικό και C-τελικό) παράγωγα της PCR συνδέθηκαν μεταξύ τους στο Eagl τέλος τους, με αποτέλεσμα την κατασκευή ολόκληρου του μήκους του cDNA, το οποίο κλωνοποιήθηκε στις BamH1 και Xho1 περιοριζόμενες θέσεις του pCITE 4a. Η κλωνοποιημένη αλληλουχία του KYT 2A6 επιβεβαιώθηκε με ανάλυσή της.

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

Οι 39 οροί ελέγχθηκαν για την παρουσία anti-KYT 2A6, anti-KYT 1A2 και anti-KYT 2D6 αντισωμάτων με τη χρήση RLA. Η έκφραση του ανασυνδυασμένου KYT 2A6 έγινε με τη χρήση του συστήματος TNT T7 γρήγορης συνδυασμένης μεταγραφής-μετάφρασης (Quick Coupled Transcription Translation System, Promega, Madison, USA). Ένα μg cDNA και 1.85 MBq (50 µCi) [35S]-μεθειονίνη (Amersham, UK) προστέθηκαν σε 40 µl TNT διάλυμα 'λύσης'. Νερό προστέθηκε σε τελικό όγκο 50 µl και έγινε in vitro μεταγραφή/ in vitro μετάφραση στους 30 °C για 90 min. Το in vitro μεταφρασθέν [35S]-KYT 2A6 διαχωρίστηκε από την ελεύθερη [35S]-μεθειονίνη με διήθηση σε γέλη σε μια στήλη Sephadex G10 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Η ποσότητα [35S]-KYT 2A6 που ελήφθηε ποσοτικοποιήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε γέλη SDS-πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) με τη χρήση αναλυτή Fujix Bas 1000 (Raytest, Straubenthal, Germany). Η ποσοτική RLA έγινε όπως έχει ήδη αναλυτικά περιγραφεί (5). Σε όλες τις μεθόδους χρησιμοποιήθηκε 200000 cpm 35S σημασιμένη πρωτεΐνη στόχος για ανοσοκαβίζηση από 0.6 µl ορού ασθενούς και 50 µl πρωτεΐνης A σε σεφαρόζη (sepharose, BioRad, Munich, Germany). Οι ποσότητες της 35S
σημασμένης πρωτεΐνης μετά την ανοσοκαθίζηση ποσοτικοποιήθηκαν με 'μέτρηση των αναπνοητικών' (5). Τα δείγματα με τιμές πάνω από τη μέση τιμή των υγιών μαρτύρων συν 4 σταθερές αποκλίσεις (λόγω της ανωμαλίας της κατανομής) θεωρήθηκαν θετικά. Οι τιμές του cut-off ήταν τα 650 cpm για την ανίχνευση του KYT 2A6, τα 700 cpm για την ανίχνευση του KYT 1A2 και τα 897 cpm για την ανίχνευση του KYT 2D6. Η ισοθέτηση τόσο αυστηρών cut-off για ορισμού των θετικών δειγμάτων έγινε ώστε να αποφεύγουν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Όλα τα θετικά δείγματα ελέγχθηκαν με τρία ανεξάρτητα πειράματα. Σε κάθε πείραμα, συμπεριλαμβάνονταν ένα ισχυρά θετικό και μερικά αρνητικά δείγματα. Ο μεταξύ των πειραμάτων συντελεστής μεταβλητότητας της μεθόδου ήταν 14.6% για την ανίχνευση του KYT 2A6, 5% για την ανίχνευση του KYT 1A2 και 9% για την ανίχνευση του KYT 2D6. Ο εσωτερικός συντελεστής μεταβλητότητας της μεθόδου ήταν 3.5% για την ανίχνευση του KYT 2A6, 6.5% για την ανίχνευση του KYT 1A2 και 11.8% για την ανίχνευση του KYT 2D6.

2.9. Στατιστική ανάλυση

Όλοι οι στατιστικοί υπολογισμοί έγιναν σε Microsoft computer με τη χρήση του προγράμματος SPSS, 10η έκδοση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση. Τα ερώτημα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τις παρακάτω στατιστικές μεθόδους: unpaired t-test, Mann-Whitney U test (MWU), χ² (2 x 2 μετά από διόρθωση κατά Yates), Fisher's exact test, Pearson χ², Spearman's correlation coefficient, όπου ήταν εφαρμόσιμα. Στατιστικά σημαντική διαφορά θεωρήθηκε εκείνη όπου η διπλής κατεύθυνσης τιμή του P ήταν μικρότερη του 0.05 (P<0.05). Τα όρια
αξιοπιστίας (95% CI) προσδιορίστηκαν βάσει του τύπου $P = \rho \pm 1.96 \sqrt{(\rho q/n)}^{1/2}$
(όπου $\rho$ είναι η συχνότητα, $q$ είναι το $1-\rho$ και $n$ είναι ο αριθμός των ατόμων που ελέγθηκαν από κάθε ομάδα).
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

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

Εκατόν ενενήντα από τους 303 HCV ασθενείς είχαν θετικά ANA με την τεχνική του ΕΑΦ σε κύτταρα HEr2 (Εικόνα 1) (62.7%; 95% CI, 57.2-68.1%) (Πίνακας 3). Εκατόν δώδεκα από τους 190 ορούς παρουσίαζαν λεπτό στικτό φθορισμό (58.9%; 95% CI, 51.9-65.9%), 27 από τους 190 ομοιογενή (14.2%; 95% CI, 9.2-19.1%), και οι υπόλοιποι 51 είχαν: 30 πυρηνισκικό, 2 ομοιογενή και πυρηνισκικό μαζί, 7 λεπτό στικτό και πυρηνισκικό μαζί, 8 αδρό στικτό, 1 διακριτό στικτό, 1 πολλαπλές πυρηνικές κηλίδες και 2 οροί είχαν φθορισμό συμβατό με αντικεντρομεριδιακά αντισώματα (AKA). Ο μέσος τίτλος των ANA ήταν 1:237 (εύρος 1:40-1:1280).

Εικόνα 1. Φθορισμός ANA από ασθενή με λοίμωξη από τον HCV σε HEr2 (λεπτό στικτός φθορισμός).

Με την τεχνική του ΕΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου ANA ανιχνεύτηκαν μόνο σε 12 από τους 303 HCV ασθενείς (Εικόνα 1) (4%; 95% CI, 1.8-6.2%, μέσος τίτλος 1:122). Από τους 12 αυτούς ασθενείς οι 11 είχαν θετικά ANA και στα HEr2, ενώ ένας είχε ανιχνεύσιμα ANA μόνο σε
τομές ἡπατο-νεφρο-στομάχου αρουραίου. Έτσι, συνολικά (και με τις δύο
tεχνικές) ANA θετικά είχαν 191 από τους 303 ασθενείς (63%; 95% CI, 57.5-
68.4%).

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ</th>
<th>Μέθοδος προσδιορισμού αντισωμάτων</th>
<th>HCV ασθενείς (n = 228)</th>
<th>Θετικοί</th>
<th>Αρνητικοί</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>ANA</td>
<td>ΕΑΦ, ΗΕρ2 κύτταρα</td>
<td>190 (62.7%)</td>
<td>113</td>
<td>117</td>
</tr>
<tr>
<td>SMA</td>
<td>ΕΑΦ, ΗΕρ2 κύτταρα</td>
<td>86 (28.4%)</td>
<td>217</td>
<td>131</td>
</tr>
<tr>
<td>AMA</td>
<td>ΕΑΦ, ΗΕρ2 κύτταρα</td>
<td>19 (6.3%)</td>
<td>284</td>
<td>265</td>
</tr>
<tr>
<td>ANA</td>
<td>ΕΑΦ, τομές ἡπατο-νεφρο-στομάχου αρουραίων</td>
<td>12 (4%)</td>
<td>191</td>
<td>209</td>
</tr>
<tr>
<td>SMA</td>
<td>ΕΑΦ, τομές ἡπατο-νεφρο-στομάχου αρουραίων</td>
<td>200 (66%)</td>
<td>103</td>
<td>117</td>
</tr>
<tr>
<td>AMA</td>
<td>ΕΑΦ, τομές ἡπατο-νεφρο-στομάχου αρουραίων</td>
<td>5 (1.7%)</td>
<td>298</td>
<td>283</td>
</tr>
<tr>
<td>ANA</td>
<td>Σύνολο</td>
<td>191 (63%)</td>
<td>112</td>
<td>119</td>
</tr>
<tr>
<td>SMA</td>
<td>Σύνολο</td>
<td>217 (71.6%)</td>
<td>86</td>
<td>131</td>
</tr>
<tr>
<td>AMA</td>
<td>Σύνολο</td>
<td>23 (7.6%)</td>
<td>280</td>
<td>257</td>
</tr>
<tr>
<td>Anti-LKM</td>
<td>ΕΑΦ, τομές ἡπατο-νεφρο-στομάχου αρουραίων</td>
<td>14 (4.6%)</td>
<td>289</td>
<td>275</td>
</tr>
<tr>
<td>Anti-LC1</td>
<td>ΕΑΦ, τομές ἡπατο-νεφρο-στομάχου αρουραίων</td>
<td>9 (3%)</td>
<td>294</td>
<td>285</td>
</tr>
<tr>
<td>PCA</td>
<td>ΕΑΦ, τομές ἡπατο-νεφρο-στομάχου αρουραίων</td>
<td>26 (8.6%)</td>
<td>277</td>
<td>251</td>
</tr>
<tr>
<td>ANCA</td>
<td>ΕΑΦ, συδετερόφιλα</td>
<td>160 (52.8%)</td>
<td>143</td>
<td>117</td>
</tr>
<tr>
<td>Anti-CL</td>
<td>ELISA</td>
<td>62 (20.4%)</td>
<td>241</td>
<td>199</td>
</tr>
<tr>
<td>Anti-dsDNA</td>
<td>ELISA</td>
<td>79 (26.1%)</td>
<td>224</td>
<td>245</td>
</tr>
<tr>
<td>Τουλάχιστο ένα θετικό αυτοαντίσωμα</td>
<td>273 (90.1%)</td>
<td>30 (9.9%)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
Διακόσιοι ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV είχαν θετικά SMA με την τεχνική του ΕΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου (Εικόνα 2) (66%; 95% CI, 60.6-71.3%) (Πίνακας 3) με μέσο τίτλο 1:113 (εύρος 1:40-1:640). Από τα 200 θετικά δείγματα 38 (19%; 95% CI, 13.5-24.4%) παρουσιάζαν φθορισμό συμβατό με ειδικότητα κατά F-ακτίνης. Επιπλέον, με την ίδια τεχνική, 5 δείγματα ήταν θετικά για ΑΜΑ (1.7%; 95% CI, 0.2-3.1%) (Πίνακας 3) με μέσο τίτλο 1:272 (εύρος 1:80-1:640). Με την τεχνική του ΕΑΦ σε κύτταρα HEP2, 10 οροί παρουσιάζαν μη ειδικό κυτταροπλασματικό φθορισμό (3.3%; 95% CI, 1.3-5.3%), 86 είχαν φθορισμό συμβατό με SMA (Εικόνα 2) (28.4%; 95% CI, 23.3-33.4%, μέσος τίτλος 1:134, εύρος 1:40-1:640) και 19 δείγματα είχαν φθορισμό συμβατό με ΑΜΑ (6.3%; 95% CI, 3.5-9%, μέσος τίτλος 1:370, εύρος 1:80-1:1280). Συνολικά (με την τεχνική του ΕΑΦ σε κύτταρα HEP2 και σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου), θετικοί για SMA ήταν 217 ασθενείς (71.6%; 95% CI, 66.5-76.6%) και για ΑΜΑ 23 ασθενείς (7.6%; 95% CI, 4.6-10.5%). Επιπλέον, θετικοί για ANA και SMA συγχρόνως ήταν 139 ασθενείς (45.9%; 95% CI, 40.3-51.5%).

Εικόνα 2. Φθορισμός SMA ασθενούς με λοίμωξη από τον HCV σε κύτταρα HEP2 (φθορισμός κυτταροπλάσματος) και σε τομή νεφρού αρουραίου (φθορισμός των νεφρικών σπειραμάτων).
Δεκατέσσερις από τους 303 HCV ασθενείς είχαν θετικά αντι-LKM αντισώματα (Εικόνα 3) [4.6%; 95% CI, 2.2-6.9%, δεκατρείς ασθενείς είχαν τυπικό αντι-LKM πρότυπο φθορισμού με ΕΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου (μέσος τίτλος 1:174, εύρος 1:40-1:640), ενώ ένας ήταν αρνητικός με την προαναφερθείσα τεχνική αλλά ήταν αντι-KYT 2D6 θετικός με μοριακές τεχνικές (Πίνακας 3). Θετικά αντι-LC1 αντισώματα ανιχνεύτηκαν σε 9 από τους 303 ασθενείς (3%; 95% CI, 0.9-5.6%), ενώ θετικά PCA βρέθηκαν σε 26 ασθενείς (Εικόνα 4) (8.6%; 95% CI, 5.4-11.7%, με μέσο τίτλο 1:195 και εύρος 1:40-1:1280) (Πίνακας 3).

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

Εικόνα 4. Φθορισμός των PCA ασθενούς με λοίμωξη από τον HCV σε τομή στομάχου αρουραίου (φθορισμός των τοιχωματικών κυττάρων).
Επιπλέον, 160 από τους 303 ασθενείς είχαν θετικά ΑΝCA (52.8%; 95% CI, 47.2-58.4%) (Πίνακας 3). Από αυτούς σε 131 ανιχνεύτηκαν ‘άτυπα’ cANCA (Εικόνα 5.1.) (81.8%; 95% CI, 75.8-87.7%, μέσος τίτλος 1:25, εύρος 1:20-1:160), ‘άτυπα’ pANCA ανιχνεύτηκαν σε 19 από τους 160 ANCA θετικούς ασθενείς (Εικόνα 5.2.) (11.8%; 95% CI, 6.8-16.8%, μέσος τίτλος 1:35, εύρος 1:20-1:160) και ‘άτυπα’ c+pANCA ανιχνεύτηκαν σε 10 από τους 160 ANCA θετικούς HCV ασθενείς (6.2%; 95% CI, 2.4-9.9%, μέσος τίτλος 1:26, εύρος 1:20-1:40). Ο ένας από τους δύο ορούς των ασθενών, που είχαν θετικά ΑΚΑ στα κύτταρα Hep2, εμφάνιζε φθορισμό παρόμοιο με ΑΚΑ στον πυρήνα των ουδετερόφιλων των μονιμοποιημένων με αιθανόλη, που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των ANCA, ενώ 19 αριθμός ασθενών με θετικά ANA στα Hep2 κύτταρα, εμφάνιζαν επίσης ομοιογενή φθορισμό του πυρήνα των ουδετερόφιλων (anti-neutrophil-nuclear antibodies, ANNA).

Εικόνα 5. Φθορισμός ANCA ασθενών με λοίμωξη από τον HCV σε ουδετερόφιλα μονιμοποιημένα σε αιθανόλη.
Εξήντα δύο από τους 303 ασθενείς είχαν θετικά αντι-CL αντισώματα (20.4%; 95% CI, 15.8-24.9%) (Πίνακας 3) με τίτλο 157.6 ± 90.5 BI (μέση τιμή, mean ± σταθερή απόκλιση, SD), εύρος 100-660 BI, ενώ θετικά αντι-dsDNA ανιχνεύτηκαν σε 79 από τους 303 ασθενείς (26.1%; 95% CI, 21.1-31%) (Πίνακας 3) με τίτλο 149.3 ± 68.7 BI (mean ± SD), εύρος 101-531 BI.

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

3.2. Συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων με δημογραφικά και επιδημιολογικά δεδομένα.

Η παρουσία κανενός από τα ελεγχθέντα αυτοαντισώματα δε σχετιζόταν με το φύλο και τη διάρκεια της λοίμωξης από τον HCV. Η παρουσία ή απουσία των ANA, όταν αυτά προσδιορίστηκαν με την τεχνική του ΕΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου βρέθηκε ότι συσχετίζόταν στατιστικά σημαντικά με την ηλικία (60 ± 12.6 έτη έναντι 48.5 ± 16.3 έτη αντίστοιχα, p=0.021, MWU test) (Πίνακας 5). Ωστόσο, η παρουσία ANA, όταν ανιχνεύτηκαν με EAF σε κύτταρα HEP2 και των συνολικών ANA (και με τις δύο τεχνικές ανίχνευσης) δε συσχετίζονταν με την ηλικία (Πίνακες 4,6). Επίσης, με την ηλικία σχετίζονταν η παρουσία ή απουσία AMA (συνολικά, προσδιοριζόμενα με EAF σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου και σε κύτταρα HEP2) (55.5 ± 14.9 έτη έναντι 48.5 ± 16.3 έτη αντίστοιχα, p=0.046, t-test) και η παρουσία ή απουσία αντι-CL αντισωμάτων (52.9 ± 15.2 έτη έναντι 48.2 ± 16.5 έτη αντίστοιχα, p=0.044, t-test) (Πίνακες 6,8).
Πίνακας 4. Συσχέτιση των ANA, SMA και ΑΜΑ (ανίχνευση σε κύτταρα ΗEρ2) με δημογραφικά, επιθεώρηματικά, κλινικά, ιστολογικά, ιολογικά δεδομένα.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Αυτοαντισώματα</th>
<th><strong>ANA</strong> (ΗΕρ2)</th>
<th><strong>SMA</strong> (ΗΕρ2)</th>
<th><strong>ΑΜΑ</strong> (ΗΕρ2)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>(+)</td>
<td>(-)</td>
<td>(+)</td>
<td>(-)</td>
</tr>
<tr>
<td>Hλικία (έτη)</td>
<td>49±16</td>
<td>49±16.8</td>
<td>47.5±15.6</td>
</tr>
<tr>
<td>Φύλο (ανδρες/γυναίκες)</td>
<td>99/91</td>
<td>51/62</td>
<td>48/38</td>
</tr>
<tr>
<td>Διάρκεια λοίμωξης (έτη)</td>
<td>4.3±3.7</td>
<td>4±3.5</td>
<td>3.5±3.8</td>
</tr>
<tr>
<td>Πηγή μόλυνσης (βέβαια/αβέβαια)</td>
<td>96/94</td>
<td>60/53</td>
<td>46/40</td>
</tr>
<tr>
<td>Χρήση αλκοόλ (ναι/όχι)</td>
<td>33/105</td>
<td>20/83</td>
<td>11/36</td>
</tr>
<tr>
<td>HBsAg (+)/(-)</td>
<td>8/182</td>
<td>2/111</td>
<td>8/24</td>
</tr>
<tr>
<td>Δείκτες HBV (όλοι αρνητικοί/κάποιοι θετικοί)</td>
<td>104/50</td>
<td>59/45</td>
<td>41/22</td>
</tr>
<tr>
<td>AST (UI)</td>
<td>55.3±40.7</td>
<td>50.4±52</td>
<td>62.9±31.2</td>
</tr>
<tr>
<td>ALT (UI)</td>
<td>76±52.9</td>
<td>69.6±80</td>
<td>93.2±52.4*</td>
</tr>
<tr>
<td>yGT (UI)</td>
<td>46.8±55.3</td>
<td>49±80.7</td>
<td>58.7±75.4</td>
</tr>
<tr>
<td>ALP (UI)</td>
<td>138.5±82.6</td>
<td>138±85.3</td>
<td>146±76</td>
</tr>
<tr>
<td>γ-σφαιρίνες (g/dl)</td>
<td>1.7±0.6</td>
<td>1.6±0.4</td>
<td>1.8±0.7</td>
</tr>
<tr>
<td>Θηρομποτενία (ναι/όχι)</td>
<td>40/147</td>
<td>15/93</td>
<td>16/70</td>
</tr>
<tr>
<td>Κιρρωσία (ναι/όχι)</td>
<td>66/122*</td>
<td>17/96*</td>
<td>36/51</td>
</tr>
<tr>
<td>Χρ.ηπατίτιδα (ναι/όχι)</td>
<td>104/85</td>
<td>74/36</td>
<td>45/41</td>
</tr>
<tr>
<td>K.φ. τρανσαμινάσεις (ναι/όχι)</td>
<td>17/173**</td>
<td>20/93**</td>
<td>5/81**</td>
</tr>
<tr>
<td>Θεραπεία (ναι/όχι)</td>
<td>44/146</td>
<td>26/87</td>
<td>13/73*</td>
</tr>
<tr>
<td>Φλεγμονή (ελάχιστη-μέτρια-έντονη)</td>
<td>57/49</td>
<td>30/29</td>
<td>27/16</td>
</tr>
<tr>
<td>Ινωσία (καθόλου-ήπια/ μέτρια-έντονη)</td>
<td>54/52</td>
<td>33/26</td>
<td>25/18</td>
</tr>
<tr>
<td>Γονότυπος (lb/μη 1b)</td>
<td>52/62</td>
<td>25/24</td>
<td>22/35</td>
</tr>
<tr>
<td>Ιικό φορτίο (U/ml)</td>
<td>537410±334296</td>
<td>482369±334893</td>
<td>378658±339022</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση. *P<0.05 (χ² διόρθωση κατά Yates, Fisher's exact test, t-test, Mann-Whitney U test). **P<0.001 (t-test). ***P<0.000 (χ² διόρθωση κατά Yates). **P=0.035 (χ² διόρθωση κατά Yates). ""P<0.047 (χ² διόρθωση κατά Yates). "P=0.047 (χ² διόρθωση κατά Yates).
αντισώματα, ρ=0.011, χ²). Επιπρόσθετα, η μέση τιμή των αντι-dsDNA αντισωμάτων διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των χρηστών και των υπόλοιπων ασθενών (101.3 ± 71.6 BI έναντι 79.4 ± 49.6 BI αντίστοιχα, p=0.018, MWU test). Αντίθετα, όταν οι ασθενείς χωρίστηκαν ανάλογα με το αν η πηγή μόλυνσης ήταν βέβαια και αβέβαια δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για κανένα από τα αυτοαντισώματα (Πίνακες 4,5,6,7,8,9).

Κανένα αυτοαντίσωμα δε συσχετιζόταν στατιστικά σημαντικά με διάφορους επιδημιολογικούς παράγοντες (ιστορικό εγχειρήσεων στο παρελθόν, τατουάζ, ενέσεις με κοινόχρηστες σύριγγες, παραδοσιακές πρακτικές, σεξουαλική συμπεριφορά), την κατάχρηση αλκοόλ και τη λήψη φαρμάκων. Εξαίρεση, βρέθηκε να αποτελούν τα αντι-CL αντισώματα και τα ANCA: η παρουσία των πρώτων σχετιζόταν με την κατάχρηση αλκοόλ (θετικά αντι-CL ανιχνεύτηκαν σε 17 από τους 53 HCV ασθενείς με γνωστό ιστορικό κατάχρησης αλκοόλ (32.1%) και σε 34 από τους 188 ασθενείς με αρνητικό ιστορικό κατάχρησης αλκοόλ (18.1%), ρ=0.044, χ²) (Πίνακας 8) και των δεύτερων με το ιστορικό διενέργειας παραδοσιακών πρακτικών (θετικά ANCA ανιχνεύτηκαν σε 43 από τους 77 HCV ασθενείς με γνωστό ιστορικό διενέργειας παραδοσιακών πρακτικών (55.8%) και σε 64 από τους 159 ασθενείς με αρνητικό ιστορικό (40.3%), ρ=0.034, χ²). Παρ’ όλα αυτά, όταν συγκρίθηκαν οι μέσες τιμές των αντι-CL αντισωμάτων των ασθενών με ιστορικό κατάχρησης αλκοόλ και αυτών με αρνητικό ιστορικό κατάχρησης, δε βρέθηκε να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (78.9 ± 39.5 BI έναντι 74.9 ± 70.8 BI αντίστοιχα, p=0.695, t-test).
Πίνακας 5. Συσχέτιση των ANA, SMA και AMA (ανίχνευση σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου) με δημογραφικά, επιδημιολογικά, κλινικά, ιστολογικά, ιολογικά δεδομένα.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Autoantισώματα</th>
<th>ANA (αρουραίος)</th>
<th>SMA (αρουραίος)</th>
<th>AMA (αρουραίος)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>(+)</td>
<td>(-)</td>
<td>(+)</td>
<td>(-)</td>
</tr>
<tr>
<td>(+)</td>
<td>(-)</td>
<td>(+)</td>
<td>(-)</td>
</tr>
<tr>
<td>Ηλικία (έτη)</td>
<td>60±12.6&quot;</td>
<td>48.5±16.3&quot;</td>
<td>49.1±15.8</td>
</tr>
<tr>
<td>Φύλο (άνδρες / γυναίκες)</td>
<td>6/6</td>
<td>144/147</td>
<td>102/98</td>
</tr>
<tr>
<td>Διάρκεια λοίμωξης (έτη)</td>
<td>4.6±3.6</td>
<td>4.2±3.6</td>
<td>4.1±3.6</td>
</tr>
<tr>
<td>Πηγή μόλυνσης (βέβαια / αβέβαια)</td>
<td>3/9</td>
<td>155/136</td>
<td>101/99</td>
</tr>
<tr>
<td>Χρήση αλκοόλ (ναι / όχι)</td>
<td>2/8</td>
<td>51/180</td>
<td>36/109</td>
</tr>
<tr>
<td>Συμπτώματα (ναι / όχι)</td>
<td>2/8</td>
<td>66/165</td>
<td>46/98</td>
</tr>
<tr>
<td>Εξωηπατικές εκδηλώσεις (ναι/όχι)</td>
<td>1/9</td>
<td>8/225</td>
<td>5/141</td>
</tr>
<tr>
<td>HBsAg (+) / (-)</td>
<td>0/12</td>
<td>10/281</td>
<td>5/195</td>
</tr>
<tr>
<td>Δείκτες HBV (αρνητικοί/κάποιοι θετικοί)</td>
<td>12/0**</td>
<td>151/95**</td>
<td>101/64</td>
</tr>
<tr>
<td>AST (U/I)</td>
<td>56.8±27.5</td>
<td>53±46.6</td>
<td>55±50.5</td>
</tr>
<tr>
<td>ALT (U/I)</td>
<td>69.5±36.2</td>
<td>74.4±65.2</td>
<td>77.5±62.4</td>
</tr>
<tr>
<td>γGT (U/I)</td>
<td>80.8±77.4</td>
<td>46.4±66.7</td>
<td>50.4±63.7</td>
</tr>
<tr>
<td>ALP (U/I)</td>
<td>173.2±85.6</td>
<td>136.7±88.6</td>
<td>140.7±92</td>
</tr>
<tr>
<td>γ-σφαιρίνες (g/dl)</td>
<td>1.6±0.5</td>
<td>1.7±0.5</td>
<td>1.7±0.5</td>
</tr>
<tr>
<td>Θρομβοπενία (ναι / όχι)</td>
<td>4/8</td>
<td>51/232</td>
<td>33/164</td>
</tr>
<tr>
<td>Κίρρωση (ναι / όχι)</td>
<td>5/7</td>
<td>80/211</td>
<td>66/134**</td>
</tr>
<tr>
<td>Χρ.ηπατίτιδα (ναι / όχι)</td>
<td>6/6</td>
<td>175/116</td>
<td>111/89</td>
</tr>
<tr>
<td>Κ.φ. τρανσαμινάσεις (ναι / όχι)</td>
<td>1/11</td>
<td>36/252</td>
<td>23/177</td>
</tr>
<tr>
<td>Θεραπεία (ναι / όχι)</td>
<td>3/9</td>
<td>67/224</td>
<td>37/163</td>
</tr>
<tr>
<td>Φλεγμονή (ελάχιστη-ήπια / μέτρια-έντονη)</td>
<td>3/2</td>
<td>84/76</td>
<td>59/45</td>
</tr>
<tr>
<td>Ινωση (καθόλου-ήπια / μέτρια-έντονη)</td>
<td>3/2</td>
<td>84/76</td>
<td>54/50</td>
</tr>
<tr>
<td>Γονότυπος (1 b / μηΐ b)</td>
<td>4/2</td>
<td>73/88</td>
<td>52/63</td>
</tr>
<tr>
<td>Ιικό φορτίο (U/ml)</td>
<td>427310±507773</td>
<td>517679±328142</td>
<td>497724±326297</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

Όσον αφορά στους δείκτες ηπατίτιδας Β, η παρουσία θετικού HBsAg σχετίζται με την ανίχνευση AMA σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου (θετικά AMA ανιχνεύτηκαν σε 2 από τους 10 HCV ασθενείς με θετικό HBsAg (20%) και σε 3 από τους 293 με αρνητικό HBsAg (1%).
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
30/04/2020 16:37:06 EEST - 54.70.40.11
Πίνακας 6. Συσχέτιση των ANA, SMA, AMA (συνολικά, ανιχνευόμενων με ΕΑΦ σε κύτταρα ΗΕρ2 και σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου) με δημογραφικά, ετιδημιολογικά, κλινικά, ιστολογικά, ιολολογικά δεδομένα.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Αυτοαντισώματα</th>
<th>ANA (σύνολο)</th>
<th>SMA (σύνολο)</th>
<th>AMA (σύνολο)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>(+)</td>
<td>(-)</td>
<td>(+)</td>
<td>(-)</td>
</tr>
<tr>
<td>n=191</td>
<td>n=112</td>
<td>n=217</td>
<td>n=86</td>
</tr>
<tr>
<td>Ηλικία (έτη)</td>
<td>49±16</td>
<td>48.9±16.9</td>
<td>49.2±15.9</td>
</tr>
<tr>
<td>Φύλο (Ανδρες/Γυναίκες)</td>
<td>99/92</td>
<td>51/61</td>
<td>109/108</td>
</tr>
<tr>
<td>Διάρκεια λοίμωξης (έτη)</td>
<td>4.3±3.7</td>
<td>4±3.5</td>
<td>4±3.6</td>
</tr>
<tr>
<td>Πηγή μόλυνσης (βέβαιοι/αβέβαιοι)</td>
<td>96/95</td>
<td>62/50</td>
<td>112/105</td>
</tr>
<tr>
<td>Χρήση αλκοόλ (ναι/όχι)</td>
<td>33/106</td>
<td>20/82</td>
<td>36/122</td>
</tr>
<tr>
<td>Συμπτώματα (ναι/όχι)</td>
<td>45/95</td>
<td>23/78</td>
<td>47/111</td>
</tr>
<tr>
<td>HBsAg (+)/(-)</td>
<td>8/183</td>
<td>2/110</td>
<td>6/211</td>
</tr>
<tr>
<td>Δείκτες HBV (αρνητικοί/κάποιοι θετικοί)</td>
<td>105/50</td>
<td>58/45</td>
<td>113/67</td>
</tr>
<tr>
<td>AST (U/I)</td>
<td>55±40.6</td>
<td>50.6±52.6</td>
<td>55.6±48.7</td>
</tr>
<tr>
<td>ALT (U/I)</td>
<td>76.7±52.8</td>
<td>69.9±80.5</td>
<td>77.7±61</td>
</tr>
<tr>
<td>γGT (U/I)</td>
<td>46.6±55.2</td>
<td>49.3±81</td>
<td>49.3±61.5</td>
</tr>
<tr>
<td>ALP (U/I)</td>
<td>138.7±92.3</td>
<td>138.8±85.7</td>
<td>140.9±90.5</td>
</tr>
<tr>
<td>γ-σφαιρίνες (g/dl)</td>
<td>1.7±0.6</td>
<td>1.5±0.4</td>
<td>1.7±0.5</td>
</tr>
<tr>
<td>Θρομβοπένια (ναι/όχι)</td>
<td>40/148</td>
<td>15/92</td>
<td>40/174</td>
</tr>
<tr>
<td>Κίρωση (ναι/όχι)</td>
<td>68/132*</td>
<td>17/95*</td>
<td>72/145*</td>
</tr>
<tr>
<td>Χρπωτάτηδα (ναι/όχι)</td>
<td>105/86**</td>
<td>76/36**</td>
<td>122/95</td>
</tr>
<tr>
<td>Κ.φ. τρανσαμινάσες (ναι/όχι)</td>
<td>181/73</td>
<td>19/93</td>
<td>23/194</td>
</tr>
<tr>
<td>Θεραπεία (ναι/όχι)</td>
<td>44/147</td>
<td>26/86</td>
<td>43/174**</td>
</tr>
<tr>
<td>Φλεγμονή (ελάχιστη-ήπια/μέτρια-έντονη)</td>
<td>58/49</td>
<td>29/29</td>
<td>64/51</td>
</tr>
<tr>
<td>Γονότυπος (1 b/μη 1 b)</td>
<td>55/52</td>
<td>32/26</td>
<td>59/56</td>
</tr>
<tr>
<td>Ιικό φορτίο (U/ml)</td>
<td>546882</td>
<td>485659</td>
<td>448200</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

Από τους 26 ασθενείς με θετικά PCA κανείς δεν είχε ενδείξει μακροκυττάρωσης, τα επίπεδα της B12 ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια και η
ενδοσκόπηση του ανωτέρου πεπτικού είχε ενδείξεις γαστρικής ατροφίας σε έναν μόνο ασθενή (ο οποίος είχε τίτλο PCA 1:1280).

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

Συγκεκριμένα, θετικά ANA, συνολικά (και με τις δύο χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανίχνευσης), είχαν οι 68 από τους 85 ασθενείς με HCV-σχετιζόμενη κίρρωση (80%), έναντι 123 από τους 218 μη κιρρωτικούς (56.4%) (ρ=0.000, χ²) (Πίνακας 6). Θετικά SMA σε κύτταρα HEP2, σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου και συνολικά είχαν αντίστοιχα οι 36 (42.4%), οι 66 (77.6%) και οι 72 (84.7%) από τους 85 κιρρωτικούς, έναντι 51 (23.4%), 134 (61.4%) και 146 (66.9%) από τους 218 ασθενείς χωρίς κίρρωση αντίστοιχα (p=0.002, p=0.016 και p=0.004 αντίστοιχα) (Πίνακες 4,5,6). Θετικά ANCA και ένα τουλάχιστο θετικό αυτοαντίσωμα είχαν 64 (75.3%) και 83 (97.6%) από τους 85 κιρρωτικούς ασθενείς αντίστοιχα, έναντι 96 (44%) και 190 (87%) από τους 218 ασθενείς χωρίς κλινικά στοιχεία κίρρωσης αντίστοιχα (p=0.000 και p=0.01 αντίστοιχα, χ²) (Πίνακες 8,9). Επιπλέον, ενώ η παρουσία ή απουσία αντι-CL αντισωμάτων δε σχετίζονταν με την παρουσία ή απουσία κίρρωσης, η μέση τιμή των αντι-CL αντισωμάτων ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στους ασθενείς με HCV-κίρρωση σε σχέση με τους ασθενείς.
χωρίς κλινικά στοιχεία κίρρωσης (89.8 ± 67.5 ΒΙ έναντι 70.3 ± 58.1 ΒΙ, αντίστοιχα, ρ=0.013, t-test). Επιπρόσθετα, η θετικότητα για ANA (συνολικά, ιστολογικά, ιολογικά δεδομένα).

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Αυτοαντισώματα</th>
<th>Αντι-LKM (+)</th>
<th>Αντι-LKM (-)</th>
<th>Αντι-LC1 (+)</th>
<th>Αντι-LC1 (-)</th>
<th>PCA (+)</th>
<th>PCA (-)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Ηλικία (έτη)</td>
<td>49.1±14.3</td>
<td>49±16.4</td>
<td>48.8±16.3</td>
<td>55.4±17.9</td>
<td>53±14.3</td>
<td>48.6±16.5</td>
</tr>
<tr>
<td>Φύλο (άνδρες/γυναίκες)</td>
<td>6/8</td>
<td>144/145</td>
<td>4/5</td>
<td>146/148</td>
<td>11/15</td>
<td>139/138</td>
</tr>
<tr>
<td>Διάρκεια λοίμωξης (έτη)</td>
<td>3.1±3.2</td>
<td>4.2±3.6</td>
<td>4.2±3.6</td>
<td>3.8±3.3</td>
<td>4.9±3.5</td>
<td>4.1±3.6</td>
</tr>
<tr>
<td>Πηγή μόλυνσης (βέβαιοι/ αβέβαιοι)</td>
<td>6/8</td>
<td>152/137</td>
<td>4/5</td>
<td>154/140</td>
<td>10/16</td>
<td>148/129</td>
</tr>
<tr>
<td>Χρήση αλκοόλ (ναι/όχι)</td>
<td>2/6</td>
<td>51/182</td>
<td>2/6</td>
<td>51/182</td>
<td>3/14</td>
<td>50/174</td>
</tr>
<tr>
<td>Συμπτώματα (ναι/όχι)</td>
<td>1/7</td>
<td>67/166</td>
<td>2/6</td>
<td>66/167</td>
<td>4/13</td>
<td>64/160</td>
</tr>
<tr>
<td>Εξωηπατικές εκδηλώσεις (ναι/όχι)</td>
<td>0/8</td>
<td>9/226</td>
<td>1/7</td>
<td>8/227</td>
<td>1/16</td>
<td>8/218</td>
</tr>
<tr>
<td>HBsAg (+) / (-)</td>
<td>0/14</td>
<td>10/279</td>
<td>0/9</td>
<td>10/284</td>
<td>0/26</td>
<td>10/267</td>
</tr>
<tr>
<td>Αντι-LKM (αρνητικοί/ κάποιοι θετικοί)</td>
<td>3/6</td>
<td>160/89</td>
<td>4/3</td>
<td>159/92</td>
<td>17/4</td>
<td>146/91</td>
</tr>
<tr>
<td>AST (U/I)</td>
<td>52±33.6</td>
<td>53.2±46.4</td>
<td>53±44.9</td>
<td>57.7±76</td>
<td>38±17.7</td>
<td>54.4±47.3</td>
</tr>
<tr>
<td>ALT (U/I)</td>
<td>67±39</td>
<td>74.5±65</td>
<td>74.6±64.2</td>
<td>62.3±69</td>
<td>63.3±48.1</td>
<td>75.2±65.6</td>
</tr>
<tr>
<td>γGT (U/I)</td>
<td>23.2±13.6</td>
<td>48.6±68.2</td>
<td>47.7±67.9</td>
<td>48±49.5</td>
<td>25±16.2</td>
<td>49.5±69.4</td>
</tr>
<tr>
<td>ALP (U/I)</td>
<td>125.7±62.3</td>
<td>138.8±90.2</td>
<td>138.7±98.8</td>
<td>130.3±80.8</td>
<td>145.9±77</td>
<td>137.8±90.4</td>
</tr>
<tr>
<td>γ-σφαιρίνες (g/dl)</td>
<td>1.8±0.3</td>
<td>1.7±0.5</td>
<td>1.7±0.5</td>
<td>1.6±0.5</td>
<td>1.5±0.4</td>
<td>1.7±0.5</td>
</tr>
<tr>
<td>Θρομμοβοτενία (ναι/όχι)</td>
<td>2/9</td>
<td>53/231</td>
<td>2/7</td>
<td>53/233</td>
<td>3/23</td>
<td>52/217</td>
</tr>
<tr>
<td>Κίρωση (ναι/όχι)</td>
<td>6/8</td>
<td>82/207</td>
<td>3/6</td>
<td>82/212</td>
<td>8/18</td>
<td>77/200</td>
</tr>
<tr>
<td>Χρ.πτ.πτέτιδα (ναι/όχι)</td>
<td>9/5</td>
<td>172/117</td>
<td>5/4</td>
<td>176/118</td>
<td>18/8</td>
<td>163/114</td>
</tr>
<tr>
<td>K.F. τρανσαμινάσεις (ναι/όχι)</td>
<td>2/12</td>
<td>35/254</td>
<td>1/8</td>
<td>36/258</td>
<td>0/26</td>
<td>37/240</td>
</tr>
<tr>
<td>Θεραπεία (ναι/όχι)</td>
<td>2/12</td>
<td>68/221</td>
<td>0/9</td>
<td>70/224</td>
<td>11/15*</td>
<td>59/218*</td>
</tr>
<tr>
<td>Φλεγμονή (ελάχιστη/ μετριά-έντονη)</td>
<td>3/3</td>
<td>84/75</td>
<td>3/3</td>
<td>84/75</td>
<td>10/6</td>
<td>77/72</td>
</tr>
<tr>
<td>Ινώση (καθόλου-ήπια/ μετριά-έντονη)</td>
<td>3/3</td>
<td>84/75</td>
<td>3/3</td>
<td>84/75</td>
<td>7/9</td>
<td>80/69</td>
</tr>
<tr>
<td>Γονότυπο (1b/μη 1b)</td>
<td>4/4</td>
<td>73/86</td>
<td>2/3</td>
<td>75/87</td>
<td>13/4*</td>
<td>64/86*</td>
</tr>
<tr>
<td>Ιικό φορτίο (U/ml)</td>
<td>515500 ±473054</td>
<td>514351 ±332488</td>
<td>514455 ±335685</td>
<td>511000 ±332488</td>
<td>515500 ±473054</td>
<td>514351 ±332488</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση. P>0.05 (χ² διόρθωση κατά Yates. Fisher's exact test, t-test, Mann-Whitney U test). *P=0.029 (χ² διόρθωση κατά Yates). #P=0.017 (χ² διόρθωση κατά Yates)

και με τις δύο χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανίχνευσης) και ANCA σχετίζονταν αρνητικά με την παρουσία χρόνιας ηπατίτιδας με βιοχημική δραστηριότητα.
(θετικά ANA και ANCA είχαν οι 105 (58%) και οι 80 (44.2%) από τους 181 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα αντίστοιχα, έναντι 86 (70.5%) και 80 (65.6%) από τους 122 ασθενείς χωρίς χρόνια ηπατίτιδα με βιοχημική δραστηριότητα αντίστοιχα (p=0.045 και p=0.000 αντίστοιχα, χ²) (Πίνακας 6,8). Τέλος, με την παρουσία χρόνιας λοίμωξη από τον HCV με φυσιολογικές τρανσαμινάσες σχετίζονταν αρνητικά η παρουσία ANA και SMA ανιχνευόμενα με EΑΦ σε κύτταρα HEp2 (θετικά ANA και SMA είχαν οι 17 (45.9%) και οι 5 (13.5%) από τους 37 ασθενείς με χρόνια λοίμωξη από τον HCV με φυσιολογικές τρανσαμινάσες, έναντι 173 (65%) και 81 (30.4%) από τους υπόλοιπους ασθενείς, p=0.035 και p=0.047 αντίστοιχα, χ²) (Πίνακας 4).

Όσον αφορά στη συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων με τα εργαστηριακά στοιχεία, η θετικότητα κανενός από αυτά δε βρέθηκε να σχετίζεται με τις τιμές της γGT και της ALP. Η παρουσία AMA (ανιχνευόμενων με EΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου) σχετίζονταν με υψηλότερη μέση τιμή της AST σε σχέση με τη μέση τιμή της AST των ασθενών με αρνητικά AMA (114.6 ± 91.8 έναντι 51.9 ± 44 αντίστοιχα, p=0.049, MWU test) (Πίνακας 5). Η παρουσία SMA (ανιχνευόμενων με EΑΦ σε κύτταρα HEp2) σχετίζονταν με υψηλότερη μέση τιμή της ALT σε σχέση με τη μέση τιμή της ALT των ασθενών με αρνητικά SMA (93.3 ± 52.4 έναντι 66.4 ± 67.2 αντίστοιχα, p=0.001, t-test) (Πίνακας 4), ενώ η παρουσία ή απουσία ανίχνευσης SMA με EΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου και συνολικά (και με τις δύο τεχνικές) δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές της ALT (Πίνακες 5,6). Επίσης, η θετικότητα για τα ANCA σχετίζονταν τόσο με υψηλότερη μέση τιμή AST όσο και ALT σε σχέση με τη μέση τιμή της AST και ALT των ασθενών με αρνητικά ANCA (AST: 62.2 ± 57.1 έναντι 45.7 ± 32.5,
αντίστοιχα, $p=0.014$, MWU test και ALT: $84.5 \pm 74.1$ εναντίον $62.7 \pm 49.1$, αντίστοιχα, $p=0.004$, t-test) (Πίνακας 8). Επιπλέον, η παρουσία θετικών anti-CL και anti-dsDNA αντισωμάτων συσχετίζονταν με υψηλότερες μέσες τιμές γ-σφαιρινών (1.9 ± 0.6 εναντίον 1.6 ± 0.5 αντίστοιχα για τους ασθενείς με θετικά και αρνητικά anti-CL, $p=0.011$, t-test και 1.9 ± 0.5 εναντίον 1.6 ± 0.5 αντίστοιχα για τους ασθενείς με θετικά και αρνητικά anti-dsDNA, $p=0.001$, t-test) (Πίνακας 8). Ήταν ενδιαφέρον ότι, ενώ η παρουσία anti-CL αντισωμάτων δε συσχετίζονταν με την ύπαρξη θρομβοπενίας (Πίνακας 8), η μέση τιμή του τίτλου των anti-CL αντισωμάτων μεταξύ των ασθενών με και χωρίς θρομβοπενία διέφερε στατιστικά σημαντικά (92.4 ± 77.7 BI εναντίον 72.1 ± 56.6 BI αντίστοιχα, $p=0.027$, t-test). Επιπλέον, η μέση τιμή των αιμοπεταλίων των ασθενών με θετικά anti-CL αντισώματα ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση εκείνη των ασθενών με αρνητικά anti-CL αντισώματα (178164 ± 78020 εναντίον 205209 ± 82538 αντίστοιχα, $p=0.02$, t-test).

Η λήψη θεραπείας για την λοίμωξη από τον HCV βρέθηκε να σχετίζεται με την παρουσία θετικών PCA (θετικά PCA ανιχνεύτηκαν σε 11 από τους 70 ασθενείς που βρίσκονταν σε θεραπεία με α-IFN (15.7%), έναντι 15 ασθενών από τους 233 που δεν έπαιρναν αντι-ιική αγωγή (6.4%), $p=0.029$, $x^2$) (πίνακας 7). Επίσης, η παρουσία SMA ανεξαρτήτως της τεχνικής ανίχνευσής τους και συνολικά (και με τις δύο χρησιμοποιούμενες τεχνικές) σχετίζονταν αρνητικά με τη λήψη αντι-ιικής αγωγής (θετικά τα SMA συνολικά και με τις δύο τεχνικές είχαν οι 43 από τους 70 ασθενείς που ελάμβαναν αντι-ιική θεραπεία (61.4%) έναντι 174 από τους 233 ασθενείς που δεν ελάμβαναν αντι-ιική θεραπεία (74.7%), $p=0.045$, $x^2$) (Πίνακες 4,5,6).
Πίνακας 8. Συσχέτιση των ANCA, αντι-CL, αντι-dsDNA αντισωμάτων με δημογραφικά, επιδημιολογικά, κλινικά, ιστολογικά, ιολογικά δεδομένα.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Αυτοαντισώματα</th>
<th>ANCA (+) n=160</th>
<th>ANCA (-) n=143</th>
<th>Anti-CL (+) n=62</th>
<th>Anti-CL (-) n=241</th>
<th>Anti-dsDNA (+) n=79</th>
<th>Anti-dsDNA (-) n=224</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Ηλικία (ήη)</td>
<td>48.8±16.1</td>
<td>49±16.6</td>
<td>52.9±15.1 1e</td>
<td>48.2±16.5 1e</td>
<td>49.3±16.2</td>
<td>48.2±16.8</td>
</tr>
<tr>
<td>Φύλο (άνδρες/γυναίκες)</td>
<td>84/76</td>
<td>66/77</td>
<td>35/27</td>
<td>115/126</td>
<td>41/38</td>
<td>109/115</td>
</tr>
<tr>
<td>Διάρκεια λοίμωξης (ήη)</td>
<td>4.2±3.8</td>
<td>4.2±3.4</td>
<td>4.5±3.8</td>
<td>4.1±3.5</td>
<td>4±3.7</td>
<td>4.6±3.4</td>
</tr>
<tr>
<td>Πιθήκη μόλυνσης (βέβαια/ αβέβαια)</td>
<td>79/81</td>
<td>79/64</td>
<td>35/27</td>
<td>123/118</td>
<td>43/36</td>
<td>115/109</td>
</tr>
<tr>
<td>Χρήση αλκοόλ (ναι/όχι)</td>
<td>84/76</td>
<td>34/96</td>
<td>15/35</td>
<td>53/138</td>
<td>19/47</td>
<td>49/126</td>
</tr>
<tr>
<td>Συμπτώματα (ναι/όχι)</td>
<td>34/77</td>
<td>34/96</td>
<td>15/35</td>
<td>53/138</td>
<td>19/47</td>
<td>49/126</td>
</tr>
<tr>
<td>ΗBAg (+) / (-)</td>
<td>6/154</td>
<td>4/139</td>
<td>5/57</td>
<td>5/236</td>
<td>3/76</td>
<td>7/217</td>
</tr>
<tr>
<td>Διάταξη του βίντεο (αρνητικοί/κάποιοι θετικοί)</td>
<td>80/49</td>
<td>83/46</td>
<td>36/15</td>
<td>127/80</td>
<td>44/25</td>
<td>119/70</td>
</tr>
<tr>
<td>AST (U/l)</td>
<td>62.2±57.7 2e</td>
<td>45.9±32.5 1e</td>
<td>60.2±45.5</td>
<td>51.4±46.1</td>
<td>53±48.9</td>
<td>53.6±37.6</td>
</tr>
<tr>
<td>ALT (U/l)</td>
<td>84.5±74.1 2**</td>
<td>62.7±49.1 2**</td>
<td>69.7±50.2</td>
<td>75.3±67.5</td>
<td>75.9±69.7</td>
<td>69.4±46.4</td>
</tr>
<tr>
<td>γGT (U/l)</td>
<td>57/91</td>
<td>40±35.9</td>
<td>53.8±48.7</td>
<td>45.3±71.7</td>
<td>50.4±74.9</td>
<td>40.7±40.3</td>
</tr>
<tr>
<td>ALP (U/l)</td>
<td>139.9±99.9 8e</td>
<td>137.1±79.9 8e</td>
<td>142.5±76.7</td>
<td>134.3±92</td>
<td>140.7±94.5</td>
<td>132.2±74.5</td>
</tr>
<tr>
<td>y-σφαιρίνες (g/dl)</td>
<td>1.6±0.5</td>
<td>1.7±0.5</td>
<td>1.9±0.6 3***</td>
<td>1.6±0.5 3***</td>
<td>1.9±0.5 3**</td>
<td>1.9±0.5 3**</td>
</tr>
<tr>
<td>Αμινοπετάλια (x10^3/mm)</td>
<td>192.5±80.3</td>
<td>207.5±83.8</td>
<td>178±78 4e</td>
<td>205.2±82.5 4e</td>
<td>200.8±79.5</td>
<td>196±89.7</td>
</tr>
<tr>
<td>Θρομμοκεντρές (ναι/όχι)</td>
<td>33/123</td>
<td>22/117</td>
<td>17/44</td>
<td>38/196</td>
<td>19/59</td>
<td>36/181</td>
</tr>
<tr>
<td>Ορούμπουσι (ναι/όχι)</td>
<td>3/48</td>
<td>7/185</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Ατομικοεσ (ναι/όχι)</td>
<td>1/21</td>
<td>9/100</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Κινηματικότητα (ναι/όχι)</td>
<td>64/96 6e</td>
<td>21/122 6e</td>
<td>24/38</td>
<td>61/180</td>
<td>29/50</td>
<td>56/168</td>
</tr>
<tr>
<td>Χρηματικότητα (ναι/όχι)</td>
<td>80/80 2**</td>
<td>101/42 2**</td>
<td>31/31</td>
<td>149/91</td>
<td>41/38</td>
<td>140/84</td>
</tr>
<tr>
<td>Κ.φ. τρανσαμινάσες (ναι/όχι)</td>
<td>16/144</td>
<td>21/122</td>
<td>7/55</td>
<td>30/211</td>
<td>9/70</td>
<td>28/196</td>
</tr>
<tr>
<td>Θεραπεία (ναι/όχι)</td>
<td>30/130</td>
<td>40/103</td>
<td>12/50</td>
<td>58/183</td>
<td>18/61</td>
<td>52/172</td>
</tr>
<tr>
<td>Φλεγμονή (ελάχιστη-μέτρια-έντονη)</td>
<td>49/37</td>
<td>38/41</td>
<td>14/15</td>
<td>73/63</td>
<td>21/20</td>
<td>66/58</td>
</tr>
<tr>
<td>Ιατρική γενετική (καθόλου-έντονη)</td>
<td>47/39</td>
<td>40/39</td>
<td>10/19</td>
<td>77/59</td>
<td>17/24</td>
<td>70/54</td>
</tr>
<tr>
<td>Γονότυπος (lb/μη 1b)</td>
<td>47/52</td>
<td>30/38</td>
<td>7/9</td>
<td>13/15</td>
<td>22/21</td>
<td>55/69</td>
</tr>
<tr>
<td>Ικικό φορτίο (U/ml)</td>
<td>484631</td>
<td>541075</td>
<td>361533</td>
<td>533110</td>
<td>528258</td>
<td>483400</td>
</tr>
</tbody>
</table>
| Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση. P>0.05 (x² διόρθωση κατά Yates, Fisher's exact test, t-test, Mann-Whitney U test). *P=0.014 (MWU test) **P=0.004 (t-test). "P=0.000 (x² διόρθωση κατά Yates). "P=0.000 (x² διόρθωση κατά Yates). "P=0.011 (t-test). **P=0.022 (t-test). 1P=0.001 (t-test).
3.4. Συσχέτιση των αυτοαντισώματων με ιστολογικά ευρήματα και ιολογικές παραμέτρους (ιικό φορτίο, γονότυπο).

Κανένα από τα εξετασθέντα αυτοαντισώματα δεν συσχετίζονταν με το βαθμό της ιστολογικής δραστηριότητας και της ίνωσης (πίνακες 4,5,6,7,8,9). Παρ’όλα αυτά, τάση συσχέτισης με το βαθμό ίνωσης παρουσιάζει η παρουσία AMA (συνολικά, ανιχνευόμενα και με τις δύο χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανίχνευσης) (θετικά AMA είχαν 3 από τους 87 HCV ασθενείς χωρίς ή με ήπια ίνωση (3.4%) και 10 από τους 78 ασθενείς με μέτρια ή έντονη ίνωση (12.8%), ρ=0.052, χ² (Πίνακας 6) καθώς και η παρουσία αντι-CL αντισωμάτων (θετικά αντι-CL αντισώματα είχαν 10 από τους 87 HCV ασθενείς χωρίς ή με ήπια ίνωση (11.5%) και 19 από τους 78 ασθενείς με μέτρια ή έντονη ίνωση (24.4%), ρ=0.05, χ² (Πίνακας 8).

Το ιικό φορτίο δε συσχετίζονταν με κανένα από τα εξετασθέντα αυτοαντισώματα (Πίνακες 4,5,6,7,8,9). Οι γονότυποι των 167 HCV ασθενών (στους οποίους έγινε προσδιορισμός) κατανέμονταν ως εξής: 91 ασθενείς είχαν γονότυπο 1 (1, 1a, 1b, 1a/1b), από τους οποίους οι 67 είχαν γονότυπο 1b, 13 είχαν γονότυπο 2 (2, 2a, 2c, 2a/c), 39 είχαν γονότυπο 3, 14 είχαν γονότυπο 4, 6 είχαν συνδυασμούς γονοτύπων (1b+2a+2b, 1b+3, 3+4, 4/5a) και 4 είχαν απροσδιόριστο γονότυπο. Κανένα από τα αυτοαντισώματα δε βρέθηκε να σχετίζεται με συγκεκριμένο γονότυπο (Pearson χ²). Όταν οι ασθενείς χωρίζηκαν σε εκείνους με γονότυπο 1b (n=77) και σε εκείνους με γονότυπο μη 1b (n=90) τα αυτοαντισώματα, που βρέθηκαν να συσχετίζονταν με το γονότυπο 1b ήταν τα PCA (θετικά PCA ανιχνεύτηκαν σε 13 από τους 77 ασθενείς με γονότυπο 1b (16.9%) έναντι 4 από τους 90 ασθενείς με γονότυπο μη 1b (4.4%), ρ=0.017, χ² (Πίνακας 7). Επίσης, μεταξύ των ασθενών που
ήταν θετικοί για SMA με ΕΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου, οι οροί με φθορισμό συμβατό με αντισώματα SMA εναντίον αντιγόνων άλλων εκτός της F ακτίνης σχετίζονταν με την παρουσία γονοτύπου 1b (44 από τους 86 ασθενείς, 51.2%, είχαν γονότυπο 1b), ενώ οι οροί με φθορισμό συμβατό με αντισώματα SMA εναντίον F ακτίνης σχετίζονταν με την παρουσία γονοτύπου άλλου εκτός του 1b (8 από τους 29 ασθενείς, 27.6%, είχαν γονότυπο 1b) (p=0.047, χ²). Επιπρόσθετα, αρνητική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της παρουσίας μικτού γονοτύπου και της ανίχνευσης SMA (συνολικά και με τις δύο χρησιμοποιούμενες τεχνικές) (θετικά SMA είχαν οι 2 από τους 6 ασθενείς με μικτό γονότυπο (33.3%) έναντι 123 από τους υπόλοιπους 161 ασθενείς με άλλους γονοτύπους (76.4%), p=0.036, Fisher’s exact test), καθώς και της παρουσίας γονοτύπου 4 και της θετικότητας για αντι-dsDNA (θετικά αντι-dsDNA είχαν οι 0 από τους 14 ασθενείς με γονότυπο 4 (0%) έναντι 43 από τους υπόλοιπους 153 ασθενείς με άλλους γονοτύπους (28.3%), p=0.013, Fisher’s exact test).

Τέλος, η ανίχνευση αντι-LKM στους 303 HCV ασθενείς, που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, δε βρέθηκε να συσχετίζεται με κανέναν από τους προαναφερθέντες παράγοντες (δημογραφικούς, επιδημιολογικούς, κλινικούς, ιστολογικούς και ιολογικούς) (Πίνακας 7).
Πίνακας 9. Συσχέτιση της εύρεσης τουλάχιστο ενός αυτοαντισώματος θετικού με δημογραφικά, επιδημιολογικά, κλινικά, ιστολογικά, ιολογικά δεδομένα.

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

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση. P>0.05 (χ² διόρθωση κατά Yates, Fisher's exact test, t-test, Mann-Whitney U test). *P=0.010 (χ² διόρθωση κατά Yates).

3.5. Αποτελέσματα στους 174 τυχαία επιλεγμένους ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV

3.5.1. Ασθενείς με ηπατίτιδα C

Σε ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών με ηπατίτιδα C ανιχνεύθηκαν IgG αντι-CL αντισώματα (21.3%, 95% CI: 15.1-27.2%). Η αντίστοιχη συχνότητα αντι-CL αντισωμάτων σύμφωνα με το φύλο ήταν 26.8% (95% CI: 17.4-36%) στους άνδρες και 16.3% (95% CI:8.8-23.8%) στις γυναίκες. Μόνο
τρεις υγιείς (1.12%, 95% CI: 0.13-2.37%) είχαν θετικά αντι-CL αντισώματα (p<0.0001). Ο μέσος τίτλος των αντι-CL αντισώματων διέφερε στατιστικώς σημαντικά (ANOVA, p<0.05) στις τρεις ομάδες που ελέγχθηκαν (HCV ασθενείς ή αρνητικοί για αντι-CL αντισώματα και υγιείς μάρτυρες) (Πίνακας 10).

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Λοίμωξη από τον HCV</th>
<th>Λοίμωξη από τον HBV</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Αντι-CL (+) (n = 37)</td>
<td>Αντι-CL (+) (n = 7)</td>
</tr>
<tr>
<td>54.3 ± 39.2</td>
<td>48.9 ± 40.5</td>
</tr>
<tr>
<td>59.6 ± 45.6</td>
<td>63.5 ± 68.5</td>
</tr>
<tr>
<td>47.6 ± 44.8</td>
<td>39.8 ± 65</td>
</tr>
<tr>
<td>130.6 ± 77.2*</td>
<td>126.5 ± 78.2*</td>
</tr>
<tr>
<td>1.76 ± 0.55</td>
<td>1.7 ± 0.48</td>
</tr>
<tr>
<td>173.8 ± 73.5</td>
<td>201.9 ± 82.6</td>
</tr>
<tr>
<td>Γονότυπος (1b / non 1b)</td>
<td>7/9</td>
</tr>
<tr>
<td>Δείκτες HBV</td>
<td>139.8 ± 40.4*</td>
</tr>
<tr>
<td>Δείκτες HBV</td>
<td>9/44</td>
</tr>
<tr>
<td>Δείκτες HBV</td>
<td>7/14</td>
</tr>
<tr>
<td>Δείκτες HBV</td>
<td>12/25</td>
</tr>
<tr>
<td>Δείκτες HBV</td>
<td>10/30</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (SD). *P=0.033 και **P=0.014 (ANOVA-PLSD ανάλυση). *P=0.044 (unpaired t-test). **P=0.0001 και "P=0.0001 (Mann-Whitney U test).
πρακτικών και η σεξουαλική συμπεριφορά δε συσχετίζονταν με την ανίχνευση anti-CL antisyμmάτων.

Πίνακας 11. Δημογραφικά χαρακτηριστικά 174 ασθενών με ηπατίτιδα C και 50 με ηπατίτιδα Β σε σχέση με την παρουσία θετικών ή αρνητικών anti-CL antisyμmάτων.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Λοίμωξη από τον HCV</th>
<th>Λοίμωξη από τον HBV</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td><strong>Αντι-CL (+)</strong></td>
<td><strong>Αντι-CL (-)</strong></td>
</tr>
<tr>
<td>(n=37)</td>
<td>(n=137)</td>
</tr>
<tr>
<td><strong>Ηλικία (χρόνια)</strong></td>
<td>54.5 ± 15.1</td>
</tr>
<tr>
<td>Φύλο (άνδρες/γυναίκες)</td>
<td>22/15</td>
</tr>
<tr>
<td>Διάρκεια νόσου (χρόνια)</td>
<td>4.3 ± 3.5*</td>
</tr>
<tr>
<td>Πηγή λοίμωξης (βέβαια/αβέβαια)</td>
<td>18/19</td>
</tr>
<tr>
<td>Κατάχρηση αλκοόλ (ναι/όχι)</td>
<td>14/23</td>
</tr>
<tr>
<td>Συμπτώματα (ναι/όχι)</td>
<td>12/25</td>
</tr>
<tr>
<td><strong>Εξωηπατικές εκδηλώσεις (ναι/όχι)</strong></td>
<td>3/34</td>
</tr>
</tbody>
</table>

**Αντι-CL (-)**
| 4/3                  | 26/17               |
| 6 ± 6.6              | 7.5 ± 4.8*          |
| 3/4                  | 26/17               |
| 2/5                  | 9/33                |
| 2/5                  | 7/35                |
| 0/7                  | 1/42                |

*Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD. \(P=0.0001, \text{unpaired t-test}\).*

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

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

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Πίνακας 12. Συχνότητα και μέσος δείκτης δέσμευσης των anti-CL αντισωμάτων ασθενών με ηπατίτιδα C και ηπατίτιδα B σε σχέση με την παρουσία θετικών ή αρνητικών anti-β2-GPI αντισωμάτων.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>HCV ασθενείς (n = 174)</td>
</tr>
<tr>
<td>Θετικοί (n=4)</td>
</tr>
<tr>
<td>anti-CL (+) (%)</td>
</tr>
<tr>
<td>anti-CL (-) (%)</td>
</tr>
<tr>
<td>Anti-CL (BI)</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD. Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ θετικών και αρνητικών για anti-CL αντισώματα ασθενών με λοίμωξη από τον HCV, μεταξύ θετικών και αρνητικών για anti-CL αντισώματα ασθενών με λοίμωξη από τον HBV ή μεταξύ των τεσσάρων ομάδων HCV και HBV ασθενών μαζί (χ² μετά από διόρθωση κατά Yates, Pearson's x², Mann-Whitney U test, unpaired t-test, Kruskal-Wallis).

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Πίνακας 13. Συχνότητα και μέσος δείκτης δέσμευσης των anti-CL αντισωμάτων και συχνότητα anti-β2-GPI αντισωμάτων 174 ασθενών με ηπατίτιδα C και 50 με Β σε σχέση με το ιστορικό θρομβωτικών επεισοδίων.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Θρομβωτικά επεισόδια</td>
</tr>
<tr>
<td>-----------------------------------------------</td>
</tr>
<tr>
<td>HCV ασθενείς (n = 174)</td>
</tr>
<tr>
<td>Ναι (n = 7)</td>
</tr>
<tr>
<td>anti-CL (+) (%)</td>
</tr>
<tr>
<td>anti-CL (-) (%)</td>
</tr>
<tr>
<td>Anti-CL (BI)</td>
</tr>
<tr>
<td>anti-β2-GPI (+) (%)</td>
</tr>
<tr>
<td>anti-β2-GPI (-) (%)</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD. Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ θετικών και αρνητικών για anti-CL αντισώματα ασθενών με λοίμωξη από τον ΗCV, μεταξύ θετικών και αρνητικών για anti-CL αντισώματα ασθενών με λοίμωξη από τον HBV ή μεταξύ των τεσσάρων ομάδων HCV και HBV ασθενών μαζί (χ² μετά από διόρθωση κατά Yates, Fisher's exact test, Pearson's x², Mann-Whitney U test, unpaired t-test, Kruskal-Wallis).
Επτά ασθενείς ανέφεραν ιστορικό θρομβωτικών επεισοδίων στο παρελθόν (4%, 95% CI: 1.1-6.9%, Πίνακας 13). Εντούτοις, μόνο δύο από αυτούς είχαν θετικά αντι-CL αντισώματα (μη στατιστικώς σημαντική διαφορά). Επιπρόσθετα, μόνο ένας ασθενής με ιστορικό θρομβωτικού επεισοδίου είχε θετικά αντι-β2-GPI αντισώματα, ενώ ήταν αρνητικός για αντι-CL αντισώματα (Πίνακας 13). Τριάντα εξι ασθενείς (20.7%, 95% CI: 14.6-26.6%, Πίνακας 13) είχαν θρομβοπενία, ενώ 12 από αυτούς είχαν θετικά αντι-CL αντισώματα (μη στατιστικώς σημαντική διαφορά). Κανένας από τους ασθενείς με θετικά αντι-β2-GPI αντισώματα δεν είχε θρομβοπενία (Πίνακας 14). Πέντε από τις 92 γυναίκες ανέφεραν τουλάχιστο δύο αποβολές στο παρελθόν (5.4%, 95% CI: 0.8-10%, Πίνακας 15). Παρόλα αυτά, καμία από τις 5 δεν είχε θετικά αντι-CL και/ή αντι-β2-GPI αντισώματα (Πίνακας 15).

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

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

* Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD. Δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ θετικών και αρνητικών για αντι-CL αντισώματα ασθενών με λοίμωξη από τον HCV, μεταξύ θετικών και αρνητικών για αντι-CL αντισώματα ασθενών με λοίμωξη από τον HBV ή μεταξύ των τεσσάρων ομάδων HCV και HBV ασθενών μαζί (Fisher's exact test, Pearson's χ², unpaired t-test). *P=0.034 (unpaired t-test).
Επιπλέον, οι μέσοι τίτλοι των αντι-CL αντισωμάτων των ασθενών με ἡπατίτιδα C δε συσχετίζονταν με το ιστορικό θρομβωτικών επεισοδίων (Πίνακας 13), την παρουσία θρομβοπενίας (Πίνακας 14) ή το ιστορικό υποτροπιαζουσών αποβολών, όσον αφορά στις γυναίκες ασθενείς (Πίνακας 15). Κατά τη διάρκεια παρακολούθησης 30 μηνών, κανείς από τους ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV και θετικά αντι-CL αντισώματα δεν ανέπτυξε κλινική ή εργαστηριακή διαταραχή που να υποδηλώνει την πιθανή διάγνωση APLS.

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Υποτροπιαζουσές αποβολές</th>
<th>HCV ασθενείς (n = 92)</th>
<th>HBV ασθενείς (n = 20)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Ναι (n = 5)</td>
<td>0/5 (0)</td>
<td>1/2 (50)</td>
</tr>
<tr>
<td>Οχι (n = 87)</td>
<td>16/87 (18.4)</td>
<td>2/18 (11.1)</td>
</tr>
<tr>
<td>Αντι-CL (+) (%)</td>
<td>5/5 (100)</td>
<td>1/2 (50)</td>
</tr>
<tr>
<td>Αντι-CL (-) (%)</td>
<td>71/87 (81.6)</td>
<td>16/18 (88.9)</td>
</tr>
<tr>
<td>Αντι-CL (BI)</td>
<td>66.7 ± 23.6</td>
<td>99.5 ± 6.3</td>
</tr>
<tr>
<td>Αντι-β2-GPI (+) (%)</td>
<td>72.1 ± 45.6</td>
<td>62.5 ± 30.3</td>
</tr>
<tr>
<td>Αντι-β2-GPI (-) (%)</td>
<td>0/5 (0)</td>
<td>1/2 (50)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>85/87 (97.7)</td>
<td>0/18 (0)</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD. Δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ θετικών και αρνητικών για αντι-CL αντισώματα ασθενών με λοίμωξη από τον HCV, μεταξύ θετικών και αρνητικών για αντι-CL αντισώματα ασθενών με λοίμωξη από τον HBV ή μεταξύ των τεσσάρων ομάδων HCV και HBV ασθενών μαζί (Fisher's exact test, Pearson's χ², unpaired t-test, ANOVA-PLSD analysis).

3.5.2. Ασθενείς με ηπατίτιδα B

IgG αντι-CL αντισώματα ανιχνεύθηκαν στο 14% των ασθενών με ηπατίτιδα B (95% CI: 4.4-23.6%, p=0.0001 σε σχέση με τους υγιείς αιμοδότες). Ο μέσος τίτλος των αντι-CL αντισωμάτων διέφερε σημαντικά (ANOVA, p<0.05) μεταξύ των τριών ομάδων (των ασθενών με λοίμωξη από
τον HBV θετικών ή αρνητικών για αντι-CL αντισώματα και των υγιών). Εντούτοις, η συχνότητα ανίχνευσης αντι-CL αντισωμάτων στους ασθενείς με ηπατίτιδα Β δε διέφερε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με αυτή των ασθενών με ηπατίτιδα C. Ο μέσος τίτλος των αντι-CL αντισωμάτων δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των ασθενών με ηπατίτιδα C και Β.

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

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

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

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

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

3.6.1. Επιπολασμός των αυτοαντισωμάτων στους 39 μη επιλεγμένους ασθενείς

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

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

Τρία από τα 4 αντι-LKM θετικά δείγματα είχαν τυπικό πρότυπο φθορισμού με ΕΑΦ (εύρος τίτλου 1:80-1:160). Εντούτοις, κανένα από αυτά δεν ήταν θετικό για αντι-KYT 2D6 αντισώματα με ανταγωνιστική αντι-LKM 1 ELISA, ειδική αντι-KYT 2D6 RLA και ανοσοαποτύπωση (με τη χρήση είτε
Η παρουσίαζε την παρουσία της της ιμμοσωμάτων ανθρώπου είτε ανασυνδυασμένου KYT 2D6 (Πίνακας 16). Η ανοσοαποτύπωση με τη χρήση ιμμοσωμάτων ανθρώπου ανέδειξε πρωτεϊνικές ζώνες 80 kDa και >80 kDa στους ορόους δύο ανδρών ασθενών, ενώ ο τρίτος ορός, που ανήκε στη γυναίκα ασθενής δεν ανέδειξε καμία αντιδραστικότητα (Πίνακας 16). Επιπλέον, κανένας από τους ορούς δε βρέθηκε θετικός για αντι-KYT 2C9 αντισώματα με ανοσοαποτύπωση με τη χρήση ανασυνδυασμένης KYT 2C9 πρωτεϊνής.

Πίνακας 16. Χαρακτηριστικά των αντι-LKM αντισώματων των τεσσάρων αντι-LKM θετικών πρωτεϊνών ανθρώπου με λοίμωξη από τον HCV

<table>
<thead>
<tr>
<th>No.</th>
<th>Φύλο</th>
<th>Αντι-LKM (ΕΑΦ)</th>
<th>Τίτλος</th>
<th>ELISA KYT 2D6</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1</td>
<td>Άνδρας</td>
<td>+</td>
<td>1:80</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>2</td>
<td>Άνδρας</td>
<td>+</td>
<td>1:80</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>3</td>
<td>Γυναίκα</td>
<td>+</td>
<td>1:160</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>4</td>
<td>Άνδρας</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
</tr>
</tbody>
</table>

<table>
<thead>
<tr>
<th>Ανοσοαποτύπωση (ανθρώπινα μικροσωμάτα)</th>
<th>Ανοσοαποτύπωση (ανασυνδυασμένες πρωτεϊνές)</th>
<th>Αντι-KYT 2D6 (RLA)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>KYT 2D6</td>
<td>KYT 2C9</td>
<td>UGT</td>
</tr>
<tr>
<td>1 80 kDa</td>
<td>-</td>
<td>ΔΕ</td>
</tr>
<tr>
<td>&gt;80 kDa</td>
<td>-</td>
<td>ΔΕ</td>
</tr>
<tr>
<td>3 -</td>
<td>-</td>
<td>ΔΕ</td>
</tr>
<tr>
<td>4 50 + 55 kDa</td>
<td>50 kDa</td>
<td>55 kDa</td>
</tr>
</tbody>
</table>

ΔΕ: δεν έγινε

Ο τέταρτος ασθενής είχε αρνητικά αντι-LKM αντισώματα με τη μέθοδο ΕΑΦ ή την ανταγωνιστική αντι-LKM 1 ELISA. Εντούτοις, βρέθηκε τρεις φορές θετικός για αντι-KYT 2D6 αντισώματα με την ευαίσθητη και ειδική μέθοδο RLA (μέσος τίτλος 2150 cpm, εύρος 1865-2627 cpm). Τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης με τη χρήση ιμμοσωμάτων ανθρώπινων ανθρώπου στον ορό του ασθενούς αυτού, ανέδειξαν δύο ζώνες στα 50 kDa και στα 55 kDa, που
φάνηκε να αντιστοιχούν σε αντι-KYT 2D6 και αντι-UGT αυτοαντισώματα, όταν
gια την ανοσοποιητική χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένα KYT 2D6 και
UGT αντιγόνα, αντίστοιχα (Πίνακας 16). Όπως και οι άλλοι τρεις οροι, και
αυτό το δείγμα ήταν αρνητικό για αντι-KYT 2C9 αυτοαντισώματα.
4. Συζήτηση

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

Αναλυτικότερα, η υψηλή συχνότητα ανίχνευσης των ANA (63%) και SMA (71.6%) σε ασθενείς με ηπατίτιδα C συμβαδίζει με την συχνότητα εύρεσης των αυτοαντισωμάτων αυτών και σε άλλες μελέτες από την Ευρώπη και την Αμερική (3,7,10-12,15,17,52). Τα SMA φαίνεται να αποτελούν, αν και με μικρή διαφορά από τα ANA, τα πιο συχνά ανιχνευόμενα αυτοαντισώματα (10-17,19,52). Εππλέον, ο τίτλος τόσο των ANA (μέση τιμή 1:237,
υπόστρωμα κυττάρων HEP2) όσο και των SMA (1:113, υπόστρωμα τομών ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου) βρέθηκε χαμηλός, όπως αναμένεται συνήθως σε ασθενείς με χρόνιες ιογενείς λοιμώξεις (3,7-10,14). Η ανάλυση των 'υποκατηγοριών' των ANA και SMA έδειξε ότι ο πιο συχνά ευρισκόμενος τύπος φθορισμού των ANA είναι ο λεπτός στικτός (58.9%), ενώ τα SMA κατευθύνονται, ως επί το πλείστον, εναντίον άλλων πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού εκτός της Η ακτίνης (SMA εναντίον F ακτίνης ανιχνεύτηκαν στο 19% των SMA θετικών ορών με EAF σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου), σε αντίθεση με ότι συμβαίνει συνήθως στην ΑΗ-1, όπου ο συχνότερος τύπος φθορισμού των ANA είναι ο ομοιογενής και η ειδικότητα των SMA είναι κυρίως εναντίον της Η ακτίνης (52,54,55). Τα ευρήματα αυτά βοηθούν σημαντικά στην ασφαλή χορήγηση θεραπείας με α-IFN καθώς ο κίνδυνος 'λανθάνουσας' ΑΗ-1 σε HCV θετικούς ασθενείς φαίνεται να είναι πολύ χαμηλός. Πράγματι, η αλληλοεπικάλυψη μεταξύ ΑΗ-1 και ιογενούς ιεράτης και το τίτλο των αυτοαντισωμάτων φαίνεται ότι είναι, στη μελέτη αυτή, χαμηλή.

Επιπρόσθετα, η ανίχνευση αντι-dsDNA αντισωμάτων σε υψηλό ποσοστό (26%), παρόμοιο με τη μελέτη των Dalekos et al (7), υποδεικνύει το διπλής έλικας DNA ως ένα από τα συχνά αντιγόνα στόχους των HCV/ANA θετικών ασθενών, σε αντίθεση με τις μελέτες των Cacoub et al (3) και Lenzi et al (9), στις οποίες αντι-dsDNA αντισωμάτα ανιχνεύτηκαν στο 3% και 0% των HCV ασθενών αντίστοιχα. Η διαφορά αυτής πιθανότατα οφείλεται στις τεχνικές ανίχνευσης των εν λόγω αντισωμάτων (μέθοδος Farr στη μελέτη των Cacoub et al και EAF σε Crithidia luciliae στη μελέτη των Lenzi et al) και επιβεβαιώνουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης των αντι-dsDNA.
αντισωμάτων με τη χρήση προτυποποιημένης ELISA (56,57). Εππιπέδειον, η
συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων αυτών με τη χρήση ενδοφλεβιών
ναρκωτικών ουσιών ως πηγή μόλυνσης από τον HCV, συμφωνεί με τη μελέτη
tων Dalekos et al (7), που ανίχνευσαν τα αυτοαντισωμάτα αυτά σε 30 από
tους 60 χρήστες (50%), που συμπεριέλαβαν στη μελέτη τους. Η αυξημένη
συχνότητα ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων στα άτομα αυτά πιθανότατα
cheatizetai me to auexhmeno antignonikoforotio me to otopio ergonontai se eptaφη,
exaitias tis endoflebibiias egxhiasis maizi me tis varkwktikes kai diafories
prosothekikes ousties.

Η υψηλή συχνότητα ανίχνευσης των ANCA (53%), στην παρούσα
melētē, συμφωνεί με τις μελέτες των Dalekos et al (58), Wu et al (59) και
Ohira et al (60). Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τη γενική
πεποίθηση ότι τα ANCA ανιχνεύονται σχετικά σπάνια σε ασθενείς με ιονενείς
ηπατίτιδες και ότι μπορούν, για το λόγο αυτό, να αποτελέσουν χρήσιμους
déiktés sti diaforodiagnwssis twn aștheniwn me AH-1 kai autów me loímws
apó toν HCV kai bêtiká ANA h/kai SMA (58,61,62). Par' óla autá, ópws
déixnei h parousa melētē, oi títoi anîxhneusis tōus se așthenesís me hīpatínda
C einai polûu xamhloî (mésos títlos 1:25), evnû súxhôtera anîxhneûontai
'átutpa' cANCA, se antîthēsē me tin AH-1, sthn opoia anîxhneûontai svnîthws
υψηλοί títloí pANCA (61,62,63).

Ένα εππιπέδειον αυτοαντίσωμα, που ανίχνευτηκε στην παρούσα melētē
se υψηλο χετικά ποσοστό HCV bêtikwν aștheniwn (20%) einai to anti-CL
antísomma. To eýrhma autó einai parómoio me állywn melētówn (3,7,28,29,64-
68). Eντούτοις, η συχνότητα ανίχνευσης του αυτοαντισώματος αυτού σε
așthenesís HCV bêtikou pîkilei polû sti bîblîografiα (3,3-46%) (8). Oi
μεγάλες αυτές διαφορές οφείλονται στις χρησιμοποιούμενες μεθόδους ανίχνευσης και το σχεδιασμό των μελετών (8). Παρ' όλα αυτά, η παρουσία του στην λοίμωξη από τον HCV δε βρέθηκε να συνδέεται με εκδηλώσεις APLS (θρομβώσεις, καθ΄έξιν αποβολές, θρομβοπενία), όπως και στην πλεονότητα των προηγούμενων μελετών (3,7,28,29,64-66,69), οπότε ο ισχυρισμός των Prieto et al (67) της πιθανής αιτοπαθογενετικής σχέσης του APLS με τον HCV δε φαίνεται να επιβεβαιώνεται. Επιπλέον, IgG αντι-CL αντισωμάτα ανιχνεύτηκαν σε υψηλό, σχετικά, ποσοστό (14%) στους 50 ασθενείς με ηπατίτιδα Β, που χρησιμοποιηθηκαν ως μάρτυρες, γεγονός, που υποδεικνύει ότι τα αυτοαντισώματα αυτά μπορεί να ανιχνεύονται σε διάφορες ηπατικές νόσους (7,28,69,70). Έτσι, η συσχέτιση των αντισωμάτων αυτών με το ιστορικό κατάχρησης αλκοόλ, που βρέθηκε στην παρούσα μελέτη, συμφωνεί με τους Mangia et al (69) και Biron et al (70), που ανίχνευσαν αντι-CL αντισώματα σε ασθενείς με αλκοολική νόσο του ήπατος σε ποσοστά υψηλότερα αυτών των HCV θετικών ασθενών. Εππρόσθετα, τα αντισώματα αυτά βρέθηκαν να συσχετίζονται με μεγαλύτερη ηλικία των ασθενών, γεγονός, που έχει ήδη δημοσιευθεί από τους Manoussakis et al (41).

Μείζονας σημασίας, είναι η διευκρίνιση της κλινικής σημασίας των αντι-CL αντισωμάτων, εάν δηλαδή είναι 'παθογενετικά' ή όχι. Η παρούσα μελέτη είδε ότι τα αντι-CL αντισώματα, που ανιχνεύθηκαν σε Έλληνες ασθενείς με ηπατίτιδα C αλλά και B, είναι μη παθογενετικά καθώς είναι ανεξάρτητα από τον συμπαράγοντα β2-GPI, που αποτελεί τον σημαντικότερο συμπαράγοντα των αντι-CL αντισωμάτων. Η πρωτοποποιημένη ELISA, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για την ανίχνευση των αντι-CL αντισωμάτων, χρησιμοποιεί βόειο υόρο ως παράγοντα δέσμευσης και διάλυσης των ορών.
(βλέπε 2.1.5.), ο οποίος περιέχει β2-GPI. Έτσι, ελαττώνεται η μη ειδική
dέσμευση των αντι-CL αντισωμάτων μέσω ανταγωνιστικού μηχανισμού.
Ωστόσο, μια μέθοδος που χρησιμοποιούμε ως αντιγόνο β2-GPI, όπως αυτή που
χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των 174 HCV θετικών ασθενών και των 50
HBV θετικών ασθενών, είναι πιο άμεση. Με τη μέθοδο αυτή μόνο το 2,3% των
HCV ασθενών και το 2% των HBV ασθενών ήταν θετικοί για τα ‘παθογενετικά’
αντι-β2-GPI αντισώματα, γεγονός που συμφωνεί με την απουσία συσχέτισης
tων αντι-CL αντισωμάτων με κλινικά ευρήματα APLS, είτε στο παρελθόν είτε
κατά την περίοδο παρακολούθησης των HCV και HBV ασθενών. Επιπλέον,
ένας ακόμη δείκτης της μικρής κλινικής σημασίας των αντι-CL αντισωμάτων
στις χρόνιες ιογενείς ισχυρεύτηκε αναφέροντας τον χαμηλό τίτλο ανίχνευσής τους.
Τα ANA, SMA, ANCA και η ανίχνευση ενός τουλάχιστον
αυτοαντισώματος, συνδυάζονταν με την παρουσία HCV-σχετιζόμενης
kίρρωσης. Επιπρόσθετα, η παρουσία των SMA βρέθηκε να σχετίζεται με

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

Η ανίχνευση για πρώτη φορά των αντι-LKM αντισωμάτων σε Έλληνες HCV θετικούς ασθενείς, σε ποσοστό 4.6%, συμβαδίζει με τη συχνότητα ανίχνευσης (0-7%), που έχει ανακοινωθεί από την πλειονότητα των διεθνών μελετών (3,9-14,17,52,72,73). Η παρουσία μελέτης δε φαίνεται να συμφωνεί με την εξαιρετικά χαμηλή συχνότητα (0.7%), που αναφέρεται από την Κρήτη (74). Στην τελευταία μελέτη η ανίχνευση έγινε με τη χρήση ΕΑΦ και υπόστρωμα τομών της αυτοαντισωμάτων αυτών με αποτέλεσμα να συμφωνεί με την εκατοντάδες χαμηλή συχνότητα (0.7%), που αναφέρεται από την Κρήτη (74). Στην παρούσα μελέτη μελέτη η ανίχνευση έγινε με τη χρήση ΕΑΦ και υπόστρωμα τομών της αυτοαντισωμάτων αυτών και την παρουσία των αντι-LKM σύμφωνως με την Διεθνή Ομάδα Αυτοανόσου Ηπατίτιδας (IAHG) (75).

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

Το αυτοαντιγόνο στόχο των anti-LKM 1 αντισωμάτων στην ΑΗ-2 είναι το KYT 2D6 (47). Το idio είναι και το αυτοαντιγόνο στόχο των anti-LKM 1 αντισωμάτων των HCV θετικών ασθενών (76,77). Η διαφορά έγκειται στο ότι τα μεν anti-LKM 1 στην ΑΗ-2 στρέφονται κατά μικρών 'επίπεδων' επιτόπων του KYT 2D6, ενώ τα anti-LKM 1 στην λοίμωξη από τον HCV στρέφονται κυρίως, κατά 'μη επίπεδων' επιτόπων. Γι' αυτό το λόγο, υπήρχαν αντιφάσεις στη βιβλιογραφία σχετικά με την ανίχνευση anti-KYT 2D6 στους HCV θετικούς ασθενείς (47,76,77). Παρ'όλα αυτά, πιο πρόσφατα ανακοινώθηκε η ανίχνευση anti-KYT 2D6 αυτοαντισωμάτων στο 100%, σχεδόν, των anti-LKM 1 θετικών αρών ανεξαρτήτως αν προέρχονται από HCV θετικούς ή αρνητικούς ασθενείς, όταν χρησιμοποιήθηκε η εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική μέθοδος RLA (26,27).

Στην παρούσα μελέτη, αν και στους 39 HCV ασθενείς χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές, δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση του KYT 2D6 ως αυτοαντιγόνο στόχο στους τρεις από τους τέσσερις HCV/anti-LKM θετικούς αρών. Η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στον μικρό αριθμό ασθενών που ελέγχθηκαν, στην αντιπροσωπευτικότητα του ελεγχθέντος πληθυσμού (30/39...

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

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

Η απουσία αντι-SLA και αντι-ΚΥΤ 1Α2 αντισωμάτων (στους 39 HCV θετικούς ορούς που ελέγχθηκαν για τα αυτοαντισώματα αυτά) δείχνει την υψηλή ειδικότητα των αντισωμάτων αυτών για την ΑΗ-1 και την ΑΗ στα πλαίσια του συνδρόμου αυτοάνοσης πολυενδοκρινοπάθειας τύπου 1 (APS-1), αντίστοιχα.

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

Η ανίχνευση ΑΜΑ (με ΕΑΦ σε τομές ηπατος-νεφρού-στομάχου ποντικού) στο (1.7%) των ασθενών με χρόνια λοίμωξη από τον HCV (σε χαμηλούς τίτλους), συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες (3,9,10,17,72). Ο υψηλός τίτλος (1:640) των ΑΜΑ, που ανιχνεύτηκε σε έναν από τους 5 θετικούς HCV ασθενείς της μελέτης, μπορεί να αποδειχθεί στην παρουσία εντόνως θετικών αντι-CL αντισωμάτων (660 BI) στον ίδιο ασθενή, καθώς είναι
γνωστό ότι η καρδιολιπίνη αποτελεί ένα από τα αντιγόνα-στόχους των ΑΜΑ (82). Αν και τα ΑΜΑ βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη να σχετίζονται με υψηλότερες τιμές AST, δε φάνηκε να σχετίζονται με κανένα άλλο από τα ηπατικά ένζυμα, ούτε με την ιστολογική δραστηριότητα της νόσου, οπότε η παρουσία τους στην χρόνια λοίμωξη είναι μάλλον αποτέλεσμα μη ειδικής χρόνιας Β λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης.

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

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

Συμπερασματικά:

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

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

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

- Προοπτική παρακολούθηση χρειάζονται επίσης και οι PCA θετικοί/HCV θετικοί ασθενείς, για την διευκρίνιση τόσο της κλινικής σημασίας των οργανοειδικών αυτών αυτοαντισωμάτων, κυρίως κατά τη θεραπεία με α-IFN, όσο και του πιθανού ρόλου τους στην ανταπόκριση της λοίμωξης στη θεραπεία.
· Όσον αφορά στην ειδικότητα και τον τίτλο των ANA και SMA η αλληλοεπικάλυψη μεταξύ AH-1 και ιογενούς ηπατίτιδας, φαίνεται ότι είναι, στη μελέτη αυτή, χαμηλή, γεγονός που βοηθά στην ασφαλέστερη χορήγηση θεραπείας με α-IFN, καθώς ο κίνδυνος 'λανθάνουσας' AH-1 σε HCV θετικούς ασθενείς φαίνεται να είναι πολύ χαμηλός.

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


ΠΕΡΙΛΗΨΗ
ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

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

Στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν:

➢ Ο προσδιορισμός της συχνότητας της παρουσίας των αντισωμάτων εναντίον μικροσωμίων ήπατος-νεφρών (anti-LKM) και διαφόρων άλλων αυτοαντισωμάτων (αντιπυρηνικών (ANA), αντιμιτοχονδριακών (AMA), εναντίον λείων μυϊκών ινών (SMA), εναντίον κυτταροπλάσματος ουδετερόφιλων (ANCA), εναντίον πολυγωματικών κυττάρων στομάχου (PCA), εναντίον καρδιολιπίνης (αντι-
CL), έναντι κυτοσολίων ήπατος 1 (αντι-LC1), κατά διπλής έλικας DNA (αντι-dsDNA)) σε ένα μεγάλο μη επιλεγμένο δείγμα Ελλήνων HCV θετικών ασθενών (n=303), ανεξάρτητα αν βρίσκονται ή όχι υπό θεραπεία καθώς παρόμοια πληροφορία δεν υπάρχει στη χώρα μας.

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

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

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

Τα συχνότερα ανιχνευόμενα αυτοαντισώματα ήταν τα SMA (71.6%) και τα ANA (63%), με ειδικότητα όμως διαφορετική από εκείνη, που συνήθως
απαντάται στα αντίστοιχα αυτοαντισώματα, που ανιχνεύονται στην αυτοάνοση 
ηπατίτιδα τύπου 1 (ΑΗ-1). Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε ότι τα ANCA και τα αντι-
LC1 αντισώματα δεν ανιχνεύονται αποκλειστικά στην ΑΗ-1 και την αυτοάνοση 
ηπατίτιδα τύπου 2 (ΑΗ-2) αντίστοιχα, καθώς βρέθηκαν στο 52.8% και στο 3% 
tων ασθενών με χρόνια λοίμωξη από τον HCV, αντίστοιχα. Επίσης, 
anιχνεύονταν ANA (7.6%), PCA (5.4%), anti-CL (20.4%) και anti-dsDNA 
(26.1%) αντισώματα.

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

Από τα επιδημιολογικά και δημογραφικά στοιχεία, που εξετάσθηκαν, 
συσχέτιση στατιστικώς σημαντική βρέθηκε α) μεταξύ της ηλικίας και της 
θετικότητας για anti-CL αντισώματα (p<0.05) β) της χρήσης ενδοφλεβιώς 
ναυκωτικών ουσιών και της θετικότητας για anti-dsDNA αντισώματα 
(p=0.011) και γ) της κατάχρησης αλκοόλ και της θετικότητας για anti-CL 
αντισώματα (p<0.05).
Κανείς από τους HCV θετικούς/αντι-CL θετικούς ασθενείς δεν παρουσίαζε ούτε ανέπτυξε στη διάρκεια της παρακολούθησης εκδηλώσεις συμβατές με το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APLS) (θρομβώσεις, καθ’ έξιν αποβολές, θρομβοπενία). Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν από το γεγονός ότι τα αντι-CL αντισώματα, σε μη επιλεγμένο δείγμα HCV θετικών ασθενών (n=174) της μελέτης, βρέθηκαν να είναι ανεξάρτητα από τον συμπαράγοντα β2-γλυκοπρωτεΐνη I (β2-GPI) και επομένως ‘μη παθογενετικά’, ενώ ‘μη παθογενετικά’ αντι-CL αντισώματα ανιχνεύτηκαν και σε υψηλό ποσοστό (14%) των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β, που εξετάσθηκαν (ομάδα ελέγχου ασθενών). Παρ’ όλα αυτά, προοπτικές μελέτες με μακρύ χρόνο παρακολούθησης (>10 ετών) των HCV θετικών/αντι-CL θετικών ασθενών χρειάζονται, ώστε να αποσαφηνιστεί η κλινική σημασία των αντι-CL αντισωμάτων στις χρόνιες ιογενείς λοιμώξεις.

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

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε, ότι η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων είναι πολύ συχνή στους Έλληνες ασθενείς με χρόνια ιολομοίωση από τον HCV, η παρουσία τους, όμως, φαίνεται να είναι αποτέλεσμα του χρόνιας Β λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης από τον λεμφοτρόπο αυτό ιό, πιθανόν σε συνδυασμό με γενετική προδιάθεση του ξενιστή ή εμφάνισης ‘νέο-
αντιγόνων' στα πλαίσια της ηπατοκυτταρικής καταστροφής. Από κλινική
σκοπιά, φαίνεται ότι ορισμένα μη οργανοειδικά αυτοαντισώματα (π.χ. ANA,
SMA, ANCA) που ανιχνεύονται κατά τη χρόνια λοίμωξη από τον HCV
μπορούν να αποτελέσουν επιπρόσθετους εργαστηριακούς δείκτες
προχωρημένης ηπατικής νόσου. Μακροχρόνιες προοπτικές μελέτες
απαιτούνται για να αποσαφηνιστεί η κλινική σημασία και ο ακριβής ρόλος των
αυτοαντισωμάτων αυτών, όπως και των anti-CL και PCA, στη χρόνια
ηπατίτιδα C.
Hepatitis C virus (HCV) is an hepatotropic and lymphotropic virus, who provokes a chronic, 'silent' and non symptomatic disease, in the majority of patients, being a major problem of public health, world while. In addition, HCV is characterized by the induction of autoimmune reactions, as can be demonstrated by the presence of extrahepatic manifestations and organ specific and non-organ specific autoantibodies. A lot of these autoantibodies are similar with those that characterize the autoimmune liver diseases. The extrahepatic manifestations and autoantibody production can be promoted by the administration of antiviral treatment (a-interferon, a-IFN).

The aims of the present study were:

> To evaluate the prevalence of liver-kidney microsomal antibodies (anti-LKM) and of several other autoantibodies (antinuclear (ANA), antimitochondrial (AMA), smooth muscle autoantibodies (SMA), antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), parietal cells antibodies (PCA), anticardiolipin antibodies (anti-CL), autoantibodies against liver cytosol 1 antigen (anti-LC1),
antibodies against double stranded DNA (anti-dsDNA) in a large non selected sample of Greek HCV positive patients (n=303), independently of being under treatment or not, since there is no such information for our country.

➢ To evaluate the parameters, that are possibly correlated with the presence of the autoantibodies mentioned above and if these autoantibodies are of any clinical significance or not. For these reasons, the presence of the autoantibodies was associated with certain demographic, epidemiologic, clinical, laboratory, histologic and virologic characteristics of HCV positive patients, as well as with the administration of antiviral treatment.

➢ To investigate the target autoantigens of anti-LKM antibodies in a non-selected part of the patients (n=39), with the use of molecular methods.

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

The more frequently detected autoantibodies were SMA (71.6%) and ANA (63%). However, their specificity was different than that of the respective autoantibodies detected in autoimmune hepatitis 1 (AH-1). In addition, it was confirmed that ANCA and anti-LC1 antibodies are not exclusively detected in
AH-1 and autoimmune hepatitis 2 (AH-2) respectively, since they were found in 52.8% and 3% of patients suffering from chronic hepatitis C, respectively. Furthermore, AMA (7.6%), PCA (5.4%), anti-CL (20.4%) and anti-dsDNA (26.1%) antibodies, were also detected.

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

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

None of the HCV positive/anti-CL positive patients presented or developed during the follow up period manifestations suggestive of antiphospholipid syndrome (APLS) (thrombosis, recurrent fetal losses, thrombocytopenia). The above findings were confirmed by the fact that, in a non selected sample of HCV positive patients (n=174) of the study, anti-CL antibodies were found to be independent from the 'co-factor' beta 2-
glucoprotein I (β2-GPI) and therefore, 'non-pathogenic', while, 'non-pathogenic anti-CL antibodies were found in a high percentage (14%) of the patients with chronic hepatitis B, who were studied (disease control group). However, prospective studies with long-term follow up (>10 years) of HCV positive/anti-CL positive patients are needed, in order to determine the clinical significance of anti-CL antibodies in chronic viral infections.

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

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

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

ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ

Ιούνιος 1987 Απολυτήριο Λυκείου από το 4ο Λύκειο Λάρισας.
Σεπτέμβριος 1987 Εισαγωγή στην Ιατρική Σχολή Παν/μίου Θεσσαλονίκης.
Δεκέμβριος 1993 Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Θεσσαλονίκης.
Οκτώβριος 1995 - Φεβρουάριος 1998 Ειδικευόμενη ιατρός στην Παθολογική Κλινική του Α’ Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης “Άγιος Παύλος” (Δ/ντης: Δρ. Ν. Στίγγας).
Μάρτιος 1998 - Μάρτιος 1999 Παρακολούθηση μεταπτυχιακού προγράμματος του ΕΚΑΒ με θέμα Επείγουσα Προνοοσκομειακή Ιατρική (Ε.Π.Ι) και απόκτηση πιστοποιητικού επάρκειας μετά από εξετάσεις.
Ιούνιος 2000 - Νοέμβριος 2002
Ειδικευόμενη ιατρός στην Παθολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (Δ/ντης: κ. Κ. Καραμήτσος).

Δεκέμβριος 2002
Τίτλος Ειδικότητας Παθολογίας (Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Ιωαννίνων)

Νοέμβριος 1998 - σήμερα
Υποψήφια διδάκτωρ της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΤΙΤΛΟΙ ΣΠΟΥΔΩΝ
2. Πτυχίο Ιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (1993).
5. Τίτλος Ιατρικής Ειδικότητας Παθολογίας (2002).

ΑΔΕΙΑ ΑΣΚΗΣΗΣ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ
Αδεια άσκησης Ιατρικού Επαγγέλματος, 13 Δεκεμβρίου 1993.

ΤΙΤΛΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ
Τίτλος Ιατρικής Ειδικότητας Παθολογίας, 15 Ιανουαρίου 2003.

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ
Ελληνική Εταιρεία Μελέτη Ήπατος, 2002.

ΟΜΙΛΙΕΣ, ΔΙΑΛΕΞΕΙΣ
1. Ομιλία με θέμα: "Εργαστηριακή διάγνωση της οξείας και χρόνιας ηπατίτιδας Β". Στρογγυλό τραπέζι με θέμα: Ηπατίτιδα Β τρέχουσες απόψεις για τη διάσταση του προβλήματος και τους τρόπους προφύλαξης. Ιατρική Σχολή Λάρισας, 14 Οκτωβρίου 2000.
ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΩΝ Ή/ΚΑΙ ΕΠΙΜΟΡΦΩΤΙΚΩΝ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ
1. Ετήσια Μετεκτταιδευτικά Μαθήματα στο Σακχαρώδη Διαβήτη (19ο έτος), Αθήνα, 24-28 Νοεμβρίου 1997 (διάρκειας 25 ωρών).
2. Σεμινάριο Ανοσολογίας (15ος κύκλος), Θεσσαλονίκη, 5-6 Ιουνίου 1997.
3. Postgraduate course of the International Association for the Study of the liver (IASL) and the European Association for the Study of the Liver (EASL) entitled: 'Prevention and intervention in liver diseases', Madrid, April 17-18, 2002 (διάρκειας 14 ωρών).
4. Πολυθεματική Εκπαιδευτική Ημερίδα της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης του Ήπατος, Αθήνα, 27 Απριλίου 2002 (διάρκειας 9 ωρών).

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

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

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΑΡΘΡΩΝ
Α) Στον Διεθνή Ιατρικό Τύπο


B) Στον Ελληνικό Ιατρικό Τύπο

1. Ε.Γ. Βλαχογιάννης, Π. Κράχτης, Π. Ζάγου. Ι. Χατζηγιάννης, Ε. Δασκαλοπούλου, Ν. Στίγγας, Κ. Βουδούρης. Η συχνότητα του συνδρόμου απνοιών στον ύπνο και η επίδρασή του στους προδιαθεσικούς παράγοντες αθηροσκλήρωσης σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Ελληνική Ρευματολογία 1999, 10(2): 105-111.


ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

Α) ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΙΑΤΡΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ


B) ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΙΑΤΡΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Κ. Ζάγου, Ε. Βλαχογιάννης, Ν. Στίγγας. Παρουσίαση περιστατικού με σύνδρομο Churg-Strauss. 16ο Ιατρικό Συνέδριο Ενόπλων Δυνάμεων, Θεσσαλονίκη, 1996.

2. Π. Κράχτης, Κ. Ζάγου, Κ. Βουδούρης, Ε. Βλαχογιάννης. Συσχέτιση ρευματοειδούς αρθρίτιδας και συνδρόμου απνοιών στον ύπνο. 14ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ρευματολογίας, Αθήνα, 1996.


4. Ε.Δ. Μακρή, Κ. Ζάγου, Χ. Λιάσκος, Κ. Πατσιαούρα, Α. Πλίάκα, Γ. Παπαδάμου, Γ.Ν. Νταλέκος. Κλινικο-εργαστηριακά ευρήματα ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1 (ΑΗ-1) στην Κεντρική Ελλάδα. 7ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2001.

5. Ε.Δ. Μακρή, Κ. Ζάγου, Ι. Δελλαδέτσιμα, Γ. Παπαδάμου, Κ. Πατσιαούρα, Α. Καραντάνας, Α. Βάσιου, Ν. Κελέκης, Γ.Ν. Νταλέκος. Περίπτωση συνύπαρξης αυτοανόσου ηπατίτιδας τύπου 1 (ΑΗ-1) σε γυναίκα μέσης ηλικίας. 7ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2001.


7. Γ.Ν. Νταλέκος, Κ. Ζάγου, Ε.Δ. Μακρή, Ε. Μπακράτση, Κ. Πατσιαούρα, Χ. Λιάσκος, Α. Πλίάκα, Α. Καραντάνας, Ν. Κελέκης. Περίπτωση εστιακής οξύδου υπερπλασίας (ΕΟΥ) εμφανιζόμενη με χαρακτήρες αυτοανόσου ηπατίτιδας τύπου 1 (ΑΗ-1). 7ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2001.

8. Μ. Βενιζέλος, Π. Τσούτσου, Α. Πλίάκα, Κ. Ζάγου, Χ. Λιάσκος, Ε.Δ. Μακρή, Κ. Γουργουλιάνης, Γ.Ν. Νταλέκος. Επιπλασμός HBsAg σε γενικό και νοσοκομειακό πληθυσμό της κεντρικής Ελλάδας: πρόδρομα αποτελέσματά με την χρήση της ταχείας μεθόδου ανοσοαποτυπώματος. 7ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2001.

9. Γ.Ν. Νταλέκος, Χ. Λιάσκος, Ε.Δ. Μακρή, Κ. Ζάγου, Κ. Πατσιαούρα, Α. Πλίάκα, Ν. Σταθάκης, Η. Ράγκολα: νέο χαρακτηριστικό εύρημα σε ασθενείς με πρωτοπαθή χολική κίρρωση. 7ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2001.

11. Σ. Γεωργιάδου, Κ. Ζάγου, Χ. Λιάσκος, Ν. Γατσέλης, Α. Τσικρικώνη, Φ. Γεροβασίλης, Μ. Καρδάση, Ε. Μακρή, Γ. Παπαδάμου, και Γ.Ν. Νταλέκος. Αυξημένη συχνότητα «λανθάνουσας» λοίμωξης από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (HCV) από την Κεντρική Ελλάδα. Διημερίδα για την ηπατίτιδα Β και C, Αθήνα, 15-16 Φεβρουαρίου 2003.


13. Α. Στέφος, Χ. Λιάσκος, Κ. Ζάγου, Ε. Μακρή, Γ. Παπαδάμου, Σ. Γεωργιάδου, Ν. Γατσέλης, Χ Χατζηχριστοδούλου, Γ.Ν. Νταλέκος. Δημογραφικά χαρακτηριστικά ασθενών με χρόνιες HBV λοίμωξη στην περιοχή της κεντρικής Ελλάδας (ΚΕ): Παρουσία ενδείξεων παράτασης του προβλήματος. 8ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.

14. Α. Τσέζου, Μ. Σιάτρα, Π. Κάλλια, Γ. Παπαδάμου, Κ. Ζάγου, Ε. Μακρή, Ν. Βαμβακόπουλος, Γ.Ν. Νταλέκος. Ανίχνευση των μεταγραφών της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) σε περιφεριακά λεμφοκύτταρα ασθενών με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες Β και ΤΗ (HCV). 8ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.

15. Κ. Ζάγου, Δ.Σ. Κυριάκου, Μ.Γ. Αλεξανδράκης, F. Passam, Χ. Λιάσκος, Α. Τσικρικώνη, Ν.Ε. Σταθάκης, Γ.Ν. Νταλέκος. Παραγωγή κυτταροκινών μετά από καλλιέργειες λεμφομονοκυττάρων μυελού των οστών (ΜΟ) ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1 (ΑΗ-1) και πρωτοπαθή χολική κίρρωση (ΠΧΚ). 8ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.

16. Κ. Ζάγου, X. Λιάσκος, Δ.Κ Χριστοδούλου, Μ. Καρδάση, Γ. Παπαδάμου, Ν. Γατσέλης, Ε.Β. Τσιάνος, Γ.Ν. Νταλέκος. Τα αντικαρδιολιπινικά αντισώματα (α-CLAbs) στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες είναι ανεξάρτητα από τη β2-γλυκοπρωτέινη I (β2-GPI) ή τις εκδηλώσεις του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου. 8ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.

17. Χ. Λιάσκος, Κ. Ζάγου. Άνταρτα αντικαρδιολιπινικού (α-CLAbs) σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (ΑΝΗ). 8ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.

18. Κ. Ζάγου, Δ.Σ. Κυριάκου, Μ.Γ. Αλεξανδράκης, F. Passam, Α. Τσικρικώνη, Χ. Λιάσκος, Ν.Ε. Σταθάκης, Γ.Ν. Νταλέκος. Αντικαρδιολιπινικά αντισώματα (α-CLAbs) σε ασθενείς με αυτοάνοσο νοσήμα του ήπατος (ΑΝΗ). 8ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.
19. Κ. Ζάγου, Χ. Λιάσκος, Ν. Γατσέλης, Σ. Γεωργιάδου, Γ. Παπαδάμου, Ε. Μακρή, Μ. Καρδάση, Δ.Κ. Χριστοδούλου, Ε.Β. Τσιάνος, Γ.Ν. Νταλέκος. Αντισώματα κατά μικροσωμίων ήπατος/νεφρών και άλλα αυτοαντισώματα (ΑΑ) σε ΗCV ασθενείς της Κεντρικής Ελλάδας. 8ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.

20. Σ. Γεωργιάδου, Κ. Ζάγου, Χ. Λιάσκος, Ν. Γατσέλης, Α. Τσικρικώνη, Φ. Γεροβασίλης, Μ. Καρδάση, Ε. Μακρή, Γ. Παπαδάμου, Γ.Ν. Νταλέκος. Αυξημένη συχνότητα λανθάνουσας HBV λοίμωξης σε ΗCV ασθενείς της Κεντρικής Ελλάδας: απουσία συσχέτισης με βαρύτερη ηπατική νόσο. 8ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.

ΔΙΔΑΚΤΙΚΑ ΕΓΧΕΙΡΙΔΙΑ-ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

1. Κ. Ζάγου. «Σημειώσεις Κλινικής Φαρμακολογίας», Λάρισα 1999 (Διανεμήθηκε στους σπουδαστές του τμήματος Διαιτολογίας του 2ου Ι.Ε.Κ. Λάρισας).

2. Γ.Ν. Νταλέκος, Χ. Λιάσκος, Κ. Ζάγου, Ε. Μακρή, και Μ. Βενιζέλος. Αντιμετώπιση ασυμπτωματικών ασθενών με διαταραχές των ηπατικών ενζύμων. Ενημερωτικό δοκίμιο στα πλαίσια της Εκπαιδευτικής Ημερίδας με θέμα: «Ηπατικές Παθήσεις στην Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας», Κ.Ε.Ε.Α. και Γ.Ν. Νταλέκος (εκδ.), Λάρισα, 2001.