

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΠΣΕ ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ**

## **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Με Θέμα:**

**Αντισώματα έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης σε ασθενείς με  
ηπατικά νοσήματα.**

**Της Ειρήνης Γ. Κοροβέση**

**Επιβλέπον καθηγητής: Γερμενής Ε. Αναστάσιος**

**Επιτροπή αξιολόγησης: Γερμενής Ε. Αναστάσιος  
Σακκάς Λάζαρος  
Γεωργιάτσου Έλενα**

**Λάρισα Ιούνιος 2004**

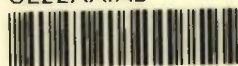
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΑΘΕΡΩΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ  
Ημερομηνία 30-06-2004  
Αρ. Πρωτ. 2662



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

Αριθ. Εισ.: 7972/1  
Ημερ. Εισ.: 14-01-2010  
Δωρεά: \_\_\_\_\_  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ  
2004  
ΚΟΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083868

✓

**Αντισώματα έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης σε ασθενείς με ηπατικά νοσήματα.**

Της Ειρήνης Γ. Κοροβέση

**Επιβλέπον καθηγητής: Γερμενής Ε. Αναστάσιος**

**Επιτροπή αξιολόγησης: Γερμενής Ε. Αναστάσιος  
Γεωργιάτσου Έλενα  
Σακκάς Λάζαρος**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ανάπτυξη αυτοανοσίας στην ιστική διαγλουταμινάση (t TG) είναι ένα χαρακτηριστικό της κοιλιοκάκης (CD), μιας εντεροπάθειας που εμφανίζεται σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα κατά την έκθεση τους στην γλουτένη της διατροφής. Τα αντισώματα IgA έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης εμφανίζονται τουλάχιστον στο 98% των ασθενών που πάσχουν από κοιλιοκάκη και παρέχουν ένα αξιόπιστο εργαλείο για την διάγνωση της διαταραχής.

Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν την σύνδεση της εμφάνισης της κοιλιοκάκης με την χρόνια ηπατίτιδα C, με την αυτοάνοση ηπατίτιδα και με την αυτοάνοση χολόσταση. Αυτά τα στοιχεία επιβάλουν τον ορολογικό έλεγχο αυτής της ομάδας των ασθενών για κοιλιοκάκη για την ανίχνευση αντισωμάτων IgA έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης και του ενδομυίου.

Στα πλαίσια της εκπόνησης της πτυχιακής εργασίας της κ. Ειρήνης Κοροβέση φοιτήτριας του τμήματος ΠΣΕ Ιατρικής Βιοχημείας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μελετήθηκε η παρουσία αντισωμάτων IgA αντί-h-t TG σε ασθενείς με νοσήματα του ήπατος.

Η εργασία εκπονήθηκε στο ανοσολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας υπό την εποπτεία του κ. Αναστάσιου Ε. Γερμενή, Αναπληρωτή Καθηγητή Ανοσολογίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Αναστάσιο Ε. Γερμενή, Αναπληρωτή Καθηγητή Ανοσολογίας, την κ. Έλενα Γεωργιάτσου, Επίκουρο καθηγήτρια Βιοχημείας, τον κ. Λάζαρο Σακκά, Επίκουρο καθηγητή Παθολογίας-Ρευματολογίας για την αξιολόγηση της πτυχιακής μου εργασίας και την κ. Έφη Γιαννάκη, Δρ. Βιολόγο για το ενδιαφέρον και την καθοδήγησή της. Επίσης το προσωπικό του Ανοσολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας για την συνεργασία τους κατά την διάρκεια της παρουσίας μου εκεί και εξ αυτών να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Ελευθερία Μπαρμπούτση, Τεχνολόγο για την καθοδήγηση και την συμπαράσταση της. Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μπονάνου, Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιοχημείας και διευθύντρια σπούδων του Πσε Ιατρικής Βιοχημείας για την γενικότερη υποστήριξή της.

Τέλος, Ευχαριστώ θερμά τον αδερφό μου κ. Γεώργιο Κοροβέση, Οικονομολόγο γιατί χωρίς την υποστήριξή του τίποτα δεν θα ήταν εφικτό για μένα αλλά και τις κυρίες Σοφία Αλμπανίδου, Βιοχημικό και Παυλίνα Αλμπανίδου, Βιοχημικό για τις πολύτιμες συμβουλές και την τεράστια ψυχολογική υποστήριξη τους.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>1</b>
<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>3</b>
<b>2.ΙΣΤΙΚΗ ΔΙΑΓΛΟΥΤΑΜΙΝΑΣΗ.....</b>	<b>9</b>
i)Δομικά χαρακτηριστικά των TGases και ειδικά της ιστικής διαγλουταμινάσης	
ii)Λειτουργία της ιστικής διαγλουταμινάσης	
<b>3.ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟΥΣ ΟΠΟΙΟΥΣ</b>	
<b>ΕΜΠΛΕΚΕΤΑΙ Η ΙΣΤΙΚΗ ΔΙΑΓΛΟΥΤΑΜΙΝΑΣΗ.....</b>	<b>19</b>
i)Κοιλιοκάκη: αυτοανοσία και TGases	
ii)Επιδημιολογία	
iii)Παθογένεση της κοιλιοκάκης	
iv)Μη HLA γονίδια σχετιζόμενα με την κοιλιοκάκη	
v)Συμμετοχή των Tgases στην Παθολογία άλλων νοσημάτων	
<b>4.ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΙΣΤΙΚΗΣ</b>	
<b>ΔΙΑΓΛΟΥΤΑΜΙΝΑΣΗΣ.....</b>	<b>30</b>
<b>5. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΙΣΤΙΚΗΣ</b>	
<b>ΔΙΑΓΛΟΥΤΑΜΙΝΑΣΗΣ ΚΑΙ ΗΠΑΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....</b>	<b>36</b>
<b>6.ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗΣ.....</b>	<b>41</b>
i)Elisa	
a)Τα ένζυμα και τα υποστρώματα της Elisa	
i)Τα συζεύγματα της Elisa	
ii)Ανοσοφθορισμός	
iii)Αρχή του ανοσοφθορισμού	
iv)Φθορισμός	
v)Έμμεσος ανοσοφθορισμός	
vi)Αντιγόνα που χρησιμοποιούνται στις τεχνικές για την ανίχνευση αντισωμάτων αντί-t TG	
a)Ανθρώπινη ιστική διαγλουταμινάση ερυθροκυττάρων (h-t TG)-Διαγλουταμινάση ήπατος ινδικών χοιριδίων (gpl-t TG)	

b)Ανθρώπινη ανασυνδιασμένη διαγλουταμινάση

<b>7.ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΙΣΤΙΚΗΣ ΔΙΑΓΛΟΥΤΑΜΙΝΑΣΗΣ.....</b>	<b>49</b>
---	-----------

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

<b>8.ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>51</b>
---	-----------

i)Οροί

ii)Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων

iii)Μέθοδοι

a)Elisa αντί-ανθρώπινης ιστικής διαγλουταμινάσης

b)Έμμεσος ανοσοφθορισμός για τον προσδιορισμό αντισωμάτων IgA EMA

iv)Elisa Quanta™ Lite Inova, human erythrocyte- t TG

a)Αρχή της διαδικασίας

b)Αντιδραστήρια

c)Αντιδραστήρια και εξοπλισμός που δεν συμπεριλαμβάνονταν στο κίτ

v)Autostat™ Η anti-human recombinant-t TG Elisa, hycor

vi)Πειράματα αναστολής

x)Προσδιορισμός EMA με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε υπόστρωμα οισοφάγου πιθήκου

xi)Προσδιορισμός EMA με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε υπόστρωμα ανθρώπινου ομφάλιου λώρου

<b>9.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>56</b>
----------------------------	-----------

<b>10.ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....</b>	<b>66</b>
---	-----------

<b>11.ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>68</b>
--------------------------	-----------

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>70</b>
----------------------	-----------

<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>71</b>
--------------------------	-----------

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι διαγλουταμινάσες είναι ένζυμα ευρέως διαδεδομένα στα διάφορα βιολογικά συστήματα, με ποικίλες λειτουργίες.

Στον άνθρωπο συμμετέχουν στην αποφυγή και στην προστασία από τραυματισμούς του σώματος και στην ιστική επιδιόρθωση.

Διάφορες μεταλλάξεις οδηγούν στην απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας της διαγλουταμινάσης, με αποτέλεσμα την συμμετοχή της στην παθογένεση διαφόρων ασθενειών. Η κοιλιοκάκη είναι μια τυπική χρόνια φλεγμονώδης ασθένεια που αναπτύσσεται εξαιτίας της δυσανεξίας στη γλουτένη ή σε συγγενείς πρωτεΐνες από σίκαλη και κριθάρι. Οι ασθενείς που πάσχουν από κοιλιοκάκη εμφανίζουν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων για διάφορα αντιγόνα, συμπεριλαμβανομένης της γλουτένης και του αυτοαντιγόνου της ιστικής διαγλουταμινάσης.

Τελευταία, κάποιες μελέτες αναφέρουν αυξημένα ποσοστά συνύπαρξης της κοιλιοκάκης με την HCV λοίμωξη (3,5 έως 5%) και με χολοστατική νόσο του ήπατος.

Σκοπός της εργασίας ήταν η διαλεύκανση της συνύπαρξης της κοιλιοκάκης με τα ηπατικά νοσήματα και της παρουσίας IgA αντί- t TG αντισωμάτων σε ορούς ασθενών που νοσούν από ηπατικά νοσήματα χωρίς ή με την σύγχρονη παρουσία αντισωμάτων IgA αντί-ενδομυίου.

Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε ορολογικός έλεγχος ανίχνευσης αντισωμάτων IgA αντί-ενδομυίου (EMA) με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε υποστρώματα οισοφάγου πιθήκου και ομφάλιου λώρου ανθρώπινου εμβρύου και έλεγχος ανίχνευσης αντισωμάτων IgA έναντι της ανθρώπινης ιστικής διαγλουταμινάσης (αντί-h-tTG) ανασυνδιασμένης ή απομονωμένης από ερυθροκύτταρα.

Η ακρίβεια των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με την διεξαγωγή πειραμάτων αναστολής στους ορούς, που είχαν ήδη ελεγχθεί για τις άλλες παραμέτρους, με την επώαση τους με τρία διαφορετικά αντιγόνα (BSA, t TG, Actine) σε συνθήκες που υπαγορεύονται από την αρχή των πειραμάτων αναστολής.



## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος διαγλουταμινάση (TG) πρώτα εισήχθη από τους Clark et al (13), το 1975 για να περιγράψει την δραστηριότητα της τρανσαμινάσης που παρατηρήθηκε στο ήπαρ ινδικών χοιριδίων.

Μεταγενέστερη μελέτη από τους Pisano et al (39), στην σταθεροποίηση των μονομερών φιμπρίνης κατά την διάρκεια της συγκόλλησης του αίματος έδειξαν ότι οι διαγλουταμινάσες είναι μια οικογένεια ευρέως κατανεμήμενων ενζύμων (ενδοκυττάρια, εξωκυττάρια και ενδοπυρηνικά), η δράση των οποίων είναι  $Ca^{2+}$ -εξαρτώμενη και καταλύουν τις μετά-μεταγραφικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών και τον σχηματισμό ισοπεπτιδικών δεσμών μεταξύ των αμινοξέων λυσίνης και γλουταμίνης (32).

Τα ένζυμα αυτά προωθούν τον σχηματισμό σταθερών πρωτεϊνικών πολυμερών μέσω αμινικών ομάδων (ε-γ- γλουταμύλο-λυσίνη) διασυνδέσεων και / ή την συγχώνευση των πολυαμινών μέσα σε πρωτεΐνες (38).

Επίσης πολυαμίνες και διαμίνες, μπορούν να συμμετέχουν στις αντιδράσεις διασύνδεσης διαμέσω του σχηματισμού N,N-δι (γ-γλουταμύλο) πολυαμινικών δεσμών.

Ο σχηματισμός αυτών των ομοιοπολικών διασυνδέσεων οδηγεί στον ολιγομερισμό των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, καταλήγοντας στο σχηματισμό συμπλόκων υψηλού MW που γίνονται ανθεκτικά στο φυσικοχημικό στρες, στις μηχανικές πιέσεις και στη διάσπαση, ούτως ώστε τα πολυπεπίδια να απελευθερώνονται από τα πολυμερή μόνο με πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνικών αλυσίδων (37).

Πρωτεΐνες με δραστηριότητα τρανσγλουταμινάσης βρέθηκαν σε ευρύ φάσμα ειδών όπως σε μικροοργανισμούς, φυτά, ασπόνδυλα, αμφίβια, ψάρια, πουλιά, θηλαστικά και στον άνθρωπο.

Τουλάχιστον εννέα διαφορετικοί τύποι τρανσγλουταμινάσων έχουν ταυτοποιηθεί σε γενωμικό επίπεδο από τις οποίες μόνο 6 έχουν απομονωθεί και χαρακτηρισθεί στο επίπεδο της πρωτεΐνης μετά από κάθαρση είτε από φυσικές πηγές είτε από ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες, οι οποίες είναι οι εξής: α) η διαγλουταμινάση των κερατινοκυττάρων (TGase 1-TG K), η οποία υπάρχει σε μεμβρανοσύνδετες και διαλυτές μορφές, ενεργοποιείται με πρωτεόλυση και εμπλέκεται στη τελική διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων

β) η ιστική διαγλουταμινάση που δρα ως συβικουιτίνη (TGase2), της οποίας ο ρόλος είναι ακόμη υπό εξέταση, γ) η επιδερμική και των ριζών των τριχών διαγλουταμινάση (TGase 3-TG E), η οποία επίσης απαιτεί πρωτεόλυση για να γίνει ενεργός και εμπλέκεται στην τελική διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, δ) το ζυμογόνο παράγοντας συγκόλλησης XIII το οποίο μετατρέπεται από μια πρωτεόλυση που είναι εξαρτώμενη από την θρομβίνη στον ενεργό παράγοντα XIII a (Tgase του πλάσματος) που εμπλέκεται στην σταθεροποίηση των θρόμβων ινώδους και στην επούλωση των πληγών, ε) η πρόσφατα χαρακτηρισμένη τύπου 5 διαγλουταμινάση και ζ) η προστατική εκκριτική διαγλουταμινάση, τύπος 4, απαραίτητη για την γονιμότητα στα τρωκτικά (32,21).

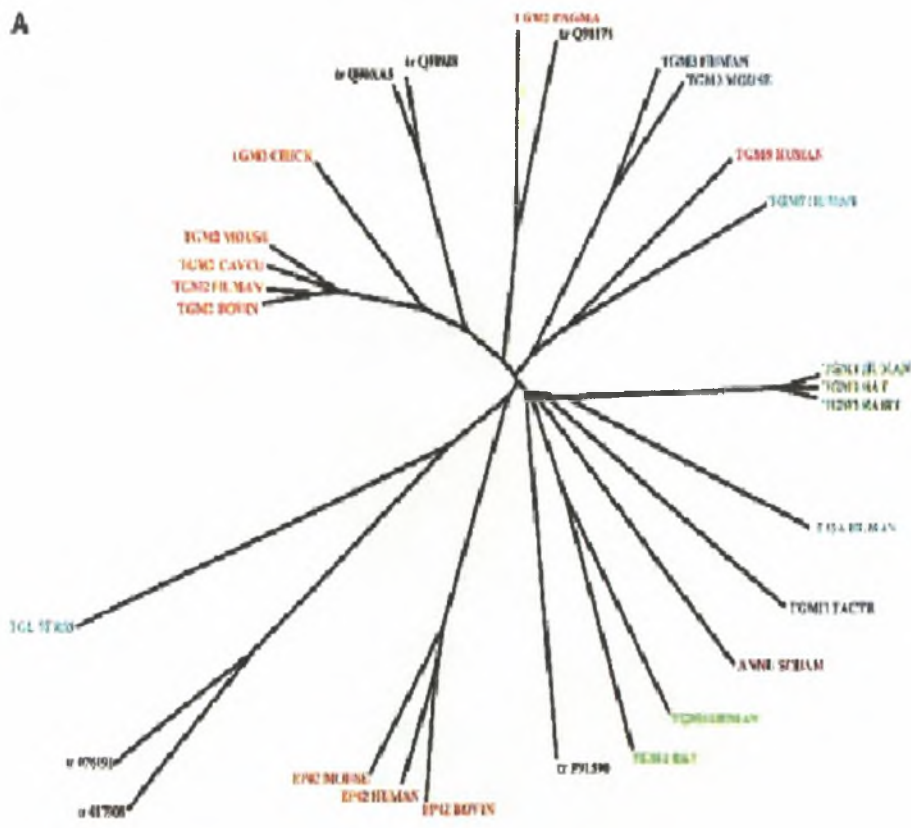
Το εξελικτικό δέντρο που φαίνεται στο **σχήμα 1A** μπορεί να βοηθήσει στην αναγνώριση των σχέσεων μεταξύ των διαγλουταμινασών (21).

Από κάποιες αρχαίες διαγλουταμινάσες βακτηρίων όπως είναι οι *streptovercillum* sp., *Dirofilaria immitis* σκουληκιού, *Caenorhabditis elegans* νηματοειδούς σκουληκιού, εξελίχθηκαν άλλες διαγλουταμινάσες.

Όλες οι διαγλουταμινάσες των θηλαστικών έχουν δομική ομολογία, είναι τα προϊόντα γονιδίων που προέκυψαν με αναδιοργάνωση διπλασιασμού και χρωμοσωμικές μετατοπίσεις και είναι μέλη της υπεροικογένειας των papain-like πρωτεασών κυστεΐνης (21). Όλα τα μέλη αυτής της υπεροικογένειας κατέχουν μία καταλυτική τριάδα που είναι Cys-His-Asp ή Cys-His-Asn και η δραστηριότητα τους είναι ασβέστιο-εξαρτώμενη. Πολλοί παράγοντες -μεταγραφικοί ενεργοποιητές (κυτταροκίνες, ρετινοειδή, βιταμίνη D, στεροειδής ορμόνες), ρυθμίζουν την έκφραση του ενζύμου (**σχήμα 2**) τοπολογικά και ιστολογικά με μεταγραφικές επιδράσεις στην περιοχή του προαγωγέα η δομή του οποίου ανακεφαλαιώνεται στο **σχήμα 1B** (21).

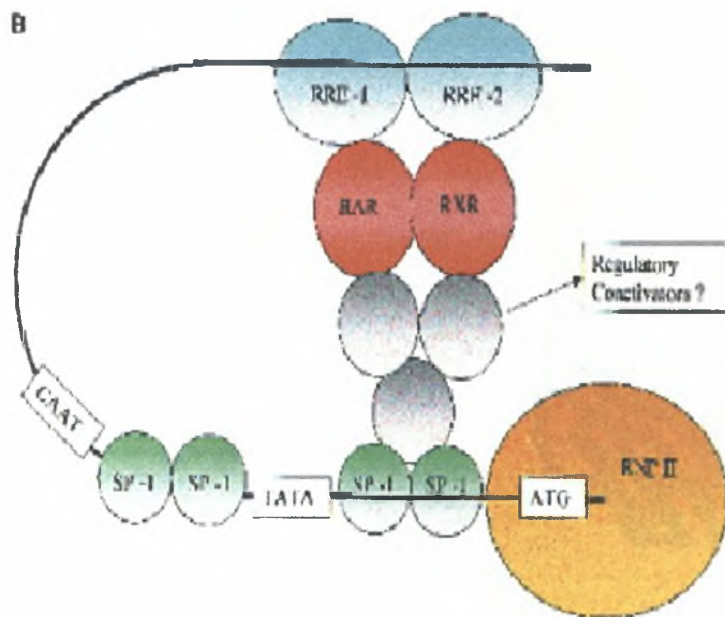
**Σχήμα 1 Α.** Το εξελικτικό δέντρο της οικογένειας των T gase βασισμένο στην ομολογία τους.

Οι ίδιες οικογένειες έχουν το ίδιο χρώμα. Με μαύρο είναι οι εισαγωγές των *Strep. Morabense*, *D. immitis*, *C. elegans*, *C. intestinalis*, όπως είναι και οι περισσότερες T gase από τα ψάρια. Η TGMH είναι η T gase από τα ερυθροκύτταρα ενός Ιαπωνικού καβουριού, η EP42 είναι η μη ενεργός ερυθροκυτταρική μπάντα 4.2, και η TGM2 CAVCU είναι η T gase από το ήπαρ ινδικού χοιριδίου.



**Σχήμα 1B.** Ρύθμιση της λειτουργίας του 5' του προαγωγέα του γονιδίου της διαγλουταμινάσης,

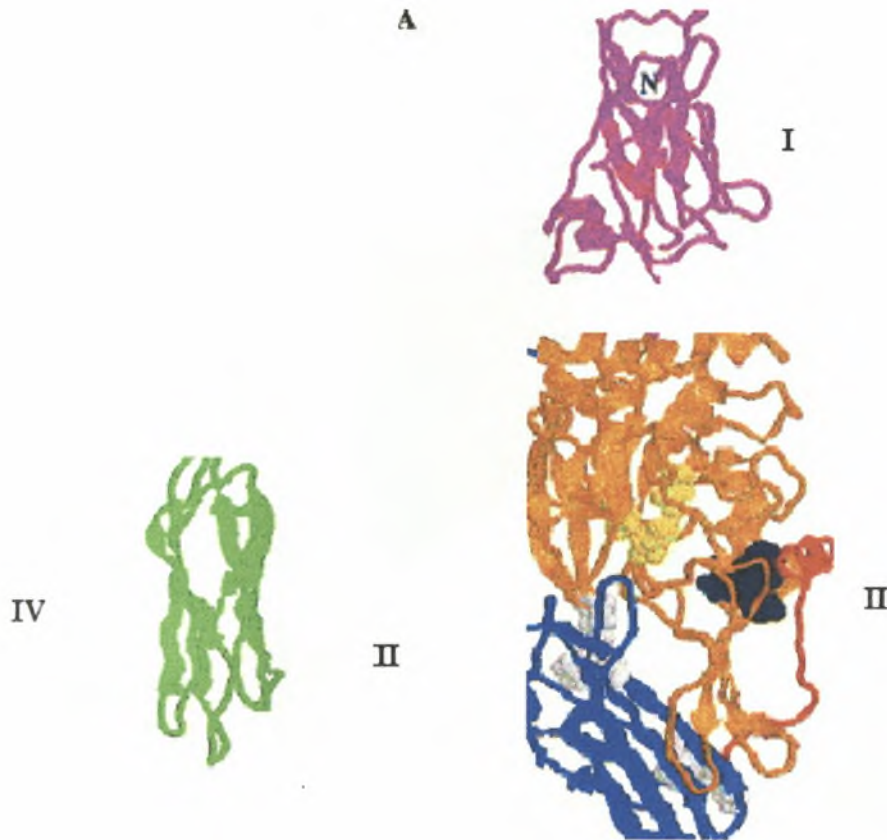
Το 5' άκρο του προαγωγέα της διαγλουταμινάσης μεγέθους περίπου 2kb περιλαμβάνει τα ρυθμιστικά στοιχεία για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων δύο διαδοχικών θέσεων που αναγνωρίζονται από τα ρετινοειδή, στοιχείων (PRE), τα οποία δεσμεύουν τους υποδοχείς των ρετινοειδών RAR και RXR, στις περιοχές της δέσμευσης για το Sp1 (253), καθώς επίσης και στις περιοχές για την ρύθμιση έκφρασης τους από τον TGF- $\beta$ , τις ιντερλευκίνες και ενδεχομένως τους στεροειδείς υποδοχείς. Στο υποθετικό πρότυπο για τη συνεργειακή ενεργοποίηση της μεταγραφής από τα ρετινοειδή, οι συνδεδεμένοι μεταγραφικοί ενεργοποιητές πρέπει να αλληλεπιδράσουν με την RNA πολυμεράση II για να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή. Το Sp1 είναι πιθανό να διαδραματίσει έναν κεντρικό ρόλο σε αυτήν την αλληλεπίδραση.



**Σχήμα 2.** Η δομή και η εξαρτώμενη από συνδέματα ρύθμιση της t Tgase

(A) Η σπονδυλική δομή της t Tgase. Οι περιοχές I-IV είναι χρωματισμένες αντίστοιχα με χρώμα ιώδες, πορτοκαλί, μπλε και πράσινο ο ρυθμιστικός βρόχος μεταξύ της περιοχής II and III είναι χρωματισμένος κόκκινος.

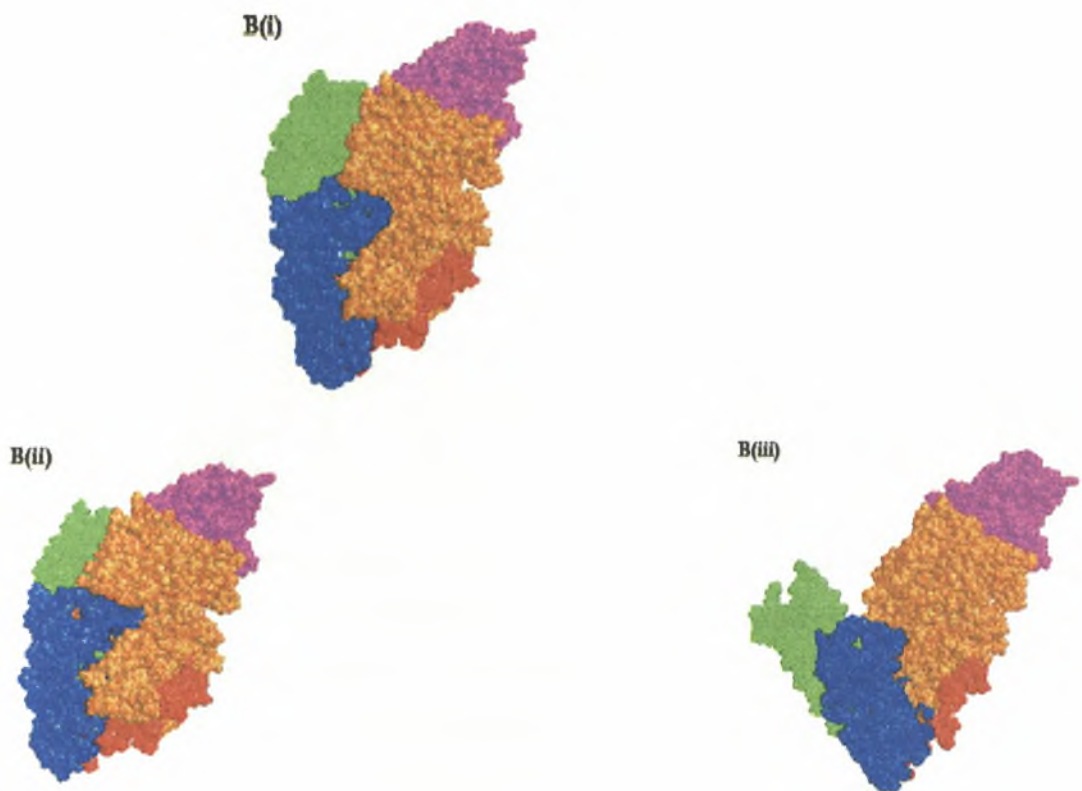
Τα Αμινοξέα που περιλαμβάνονται στο ενεργό κέντρο (Cys<sup>277</sup>, His<sup>335</sup> και Asp<sup>358</sup>) στην Ca<sup>2+</sup> συνδέουσα περιοχή (Ser<sup>449</sup>, Pro<sup>446</sup>, Glu<sup>451</sup> και Glu<sup>452</sup>) και στην περιοχή αλληλεπίδρασης με την GTP (Ser<sup>171</sup>, Lys<sup>173</sup>, Arg<sup>478</sup>, Val<sup>479</sup> και Arg<sup>580</sup>) είναι χρωματισμένα κίτρινα, μαύρα και ανοικτό γκρι.



**(B)** Η παρουσίαση του διαστήματος - γεμίσματος της δομής της t Tgase εμφανίζει απουσία συνδετών (B,i), και στην παρουσία του GTP (B,ii) και του  $Ca^{2+}$  (B,iii), για να επεξηγήσουν τις γενικές διαφορές στο μέγεθος και στη δυνατότητα πρόσβασης της ενεργού περιοχής στα γλουταμυλ-υποστρώματα.

Το ίδιο κλειδί χρώματος υιοθετείται όπως για το (A). Οι επιβεβαιώσεις ελλείπει των συνδετών (i) και στην παρουσία του GTP (ii) είναι σχετικά παρόμοιες (αν και οι αλληλεπιδράσεις εντός της αρμόδιας περιοχής ενισχύονται παρουσία του νουκλεοτιδίου), ενώ σημαντικές διαφορές είναι εμφανείς κατά την παρουσία του  $Ca^{2+}$  (iii).

Τα στοιχεία είναι βασισμένα στα αρχικά στοιχεία από τους Mariani et al και αναπαράχθηκαν με την άδεια της βιοφυσικής κοινωνίας, Bethesda, MD, U.S.A.



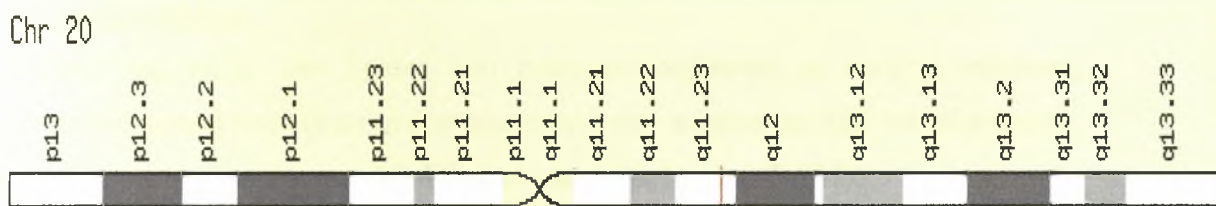
Πολλές σημαντικές ασθένειες σχετίζονται με έλλειψη των προϊόντων των γονιδίων των τρανσγλουταμινασών γεγονός που καταδεικνύει την σημαντική βιολογική λειτουργία αυτών των ενζύμων (13).

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι ποικιλία τρανσγλουταμινασών εμπλέκονται σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες όπως στην πήξη του αίματος, στην κερατινοποίηση, στον κυτταρικό θάνατο κ.λ.π (14).

## **2. ΙΣΤΙΚΗ ΔΙΑΓΛΟΥΤΑΜΙΝΑΣΗ**

Το γονίδιο της ιστικής διαγλουταμινάσης εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 20, στην χρωμοσωμική τοποθεσία (LocusLink) 20q12, στην κυττογενετική μάντα 20q11.23 (Σχήμα 3). Η αρχή του είναι 37,442,998 bp από το pter και το τέλος του 37,479,075 bp από το pter. Το μέγεθος του είναι 36,077 βάσεις και η έναρξη του -negative strand origin-με αρνητική αλυσίδα (genecard web site).

**Σχήμα 3. Το γονίδιο της ιστικής διαγλουταμινάσης στο χρωμόσωμα 20.**



Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο της ιστικής τρανσγλουταμινάσης συμβολίζεται ως: TGC, Tgase C, Tgase-H, ιστική τρανσγλουταμινάση, TGM2, τρανσγλουταμινάση C, ιστική τύπου ΙΙ. Οι N-τελικές και C-τελικές περιοχές της TGM2 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για να καθορίσουν τη δομή της πρωτεΐνης.

Έχει μέγεθος 687 αμινοξέων, μοριακό βάρος 77328 Da (~80KDa), είναι μονομερής και κυτταροπλασματική.

Το γονίδιο της tTG φυσιολογικά εκφράζεται σε έναν μικρό αριθμό κυτταρικών τύπων που εντοπίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές μέσα στους ιστούς των θηλαστικών (ενδοθηλιακά κύτταρα, κύτταρα λείων μυϊκών ινών και μεσογλοιακά κύτταρα).

Η TGM2 επάγεται από το ρετινοϊκό οξύ, συνδέει ένα ιόν  $Ca^{++}$  σε κάθε υπομονάδα, εμφανίζει δράση ουβικουιτίνης δηλαδή εμπλέκεται στην απόπτωση και αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες όπως είναι και η χαντικτίνη, οι οποίες αποτελούν υπόστρωμα



Το γονίδιο της t TG μεταγράφεται σε δύο mRNA ισομορφές (m RNA variant 1, m RNA variant 2) οι οποίες μέσω εναλλακτικού ματίσματος μεταφράζονται αντίστοιχα σε δύο πρωτεϊνικές ισομορφές. Συγκεκριμένα τα προϊόντα του γονιδίου είναι η ισομορφή a της ιστικής διαγλουταμινάσης και η ισομορφή b της ιστικής διαγλουταμινάσης.

Η ισομορφή a έχει μεγαλύτερο μήκος από την ισομορφή b γιατί προκύπτει και από το μακρύτερο μεταγράφημα 1 του m RNA του γονιδίου.

Το μεταγράφημα 2 του m RNA του ίδιου γονιδίου διαφέρει στο 3' UTR και στην κωδικοποιούσα περιοχή σε σύγκριση με το μεταγράφημα 1 του m RNA.

Η ισομορφή b που προκύπτει έχει μικρότερο μήκος από την ισομορφή a και έχει ένα ιδιόμορφο C άκρο συγκρινόμενη με την ισομορφή a.

Κατά αυτό τον τρόπο προκύπτουν δυο πρωτεϊνικές οικογένειες από το ίδιο γονίδιο, μια που έχει δράση διαγλουταμινάσης και η άλλη με δράση πρωτεϊνικής-γλουταμινικής -γ-γλουταμυλοτρανσφεράσης ([genecard web site](#)).

#### **i. Δομικά χαρακτηριστικά των TGases και ειδικά της ιστικής διαγλουταμινάσης.**

Μελέτες της δομής των Tgases που πραγματοποιήθηκαν με υψηλής ανάλυσης κρυσταλλογραφία στην ζυμογόνο υπομονάδα A του παράγοντα XIII του πλάσματος, αποκάλυψαν ότι αποτελείται από 4 δομικές περιοχές (**σχήμα 5**) (45).

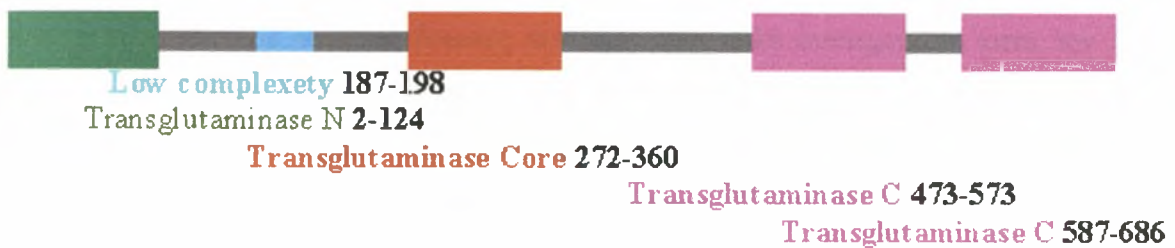
Το μόριο της tTGase είναι ελλειψοειδές με προλίνες (6.2 x 4.2 x 11nm) και οι τέσσερις δομικές περιοχές που αναφέραμε είναι οι ακόλουθες:

Η N-terminal β-sandwich περιοχή (**σχήμα 7**), η περιοχή του πυρήνα-core domain-που περιλαμβάνει την καταλυτική και την ρυθμιστική περιοχή (**σχήμα 6**), και η περιοχή C-terminal β-barrels 1 και 2 (**σχήμα 4**).

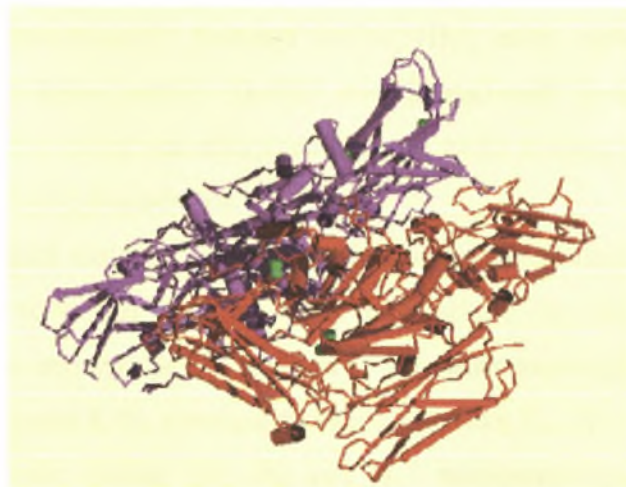
**Σχήμα 4.** Η C-τελική περιοχή της Tgase.



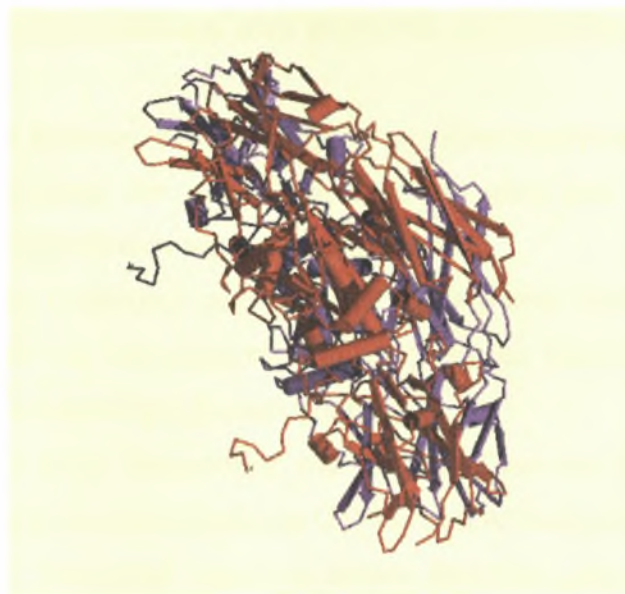
**Σχήμα 5.** Οι τέσσερις δομικές περιοχές της T gase.



**Σχήμα 6.** Η Περιοχή του πυρήνα - Core Domain.  
Αυτή η περιοχή εμφανίζει δράση διαγλουταμινάσης



**Σχήμα7.** Η N- τελική περιοχή.



Αυτή η οργάνωση σε τέσσερις δομικές περιοχές είναι πολύ συντηρημένη κατά την διάρκεια της εξέλιξης μεταξύ των ισομορφών της Tgase.

Στον ανθρώπινο τύπο t Tgase 2 τυπικά οι περιοχές 1-4 περιέχουν τα αμινοξέα έκτασης 1-139, 140-454 και 479-585 αντίστοιχα, με τις διαφορετικές ρυθμίσεις των δευτεροβάθμιων δομών, δεδομένου ότι η περιοχή 1,3 και 4 είναι διπλωμένη σε β-δομές και η περιοχή 2 παρουσιάζει μια α-ελικοειδή δευτεροβάθμια δομή (45). Επιπλέον τα 13 κατάλοιπα τρυπτοφάνης της πρωτεΐνης είναι όλα παρόντα μέσα στις περιοχές 1 και 2. Η περιοχή 1 αποτελείται από έναν αρχικά ευκίνητο βρόγχο, μια κοντή έλικα  $3_{10}$ , ένα απομονωμένο β-strand σκέλος ( $B_1$ ), πέντε πρόσθετα στενά συσκευασμένα αντιπαράλληλα σκέλη ( $B_2$ - $B_6$ ) στο β-sandwich μοτίβο και ένα περαιτέρω κοντό σκέλος  $B_7$ , κοντά και αλληλοεπιδρόν με το  $B_1$  σκέλος, καλύπτοντας το χαμηλότερο όριο της δομής β-sandwich.

Στην περιοχή 2, η πεπτιδική αλυσίδα διπλώνει σε δύο πρόσθετα β-σκέλη  $B_8$  και  $B_9$  που κινούνται προς τα κάτω και προς τα πάνω κατά μήκος της επιφάνειας της περιοχής του πυρήνα, που περιέχει Ser<sup>171</sup> και Lys<sup>173</sup> τα οποία περιλαμβάνονται στη σύνδεση με το GTP (σχήματα 8, 9), τέσσερα πρόσθετα β-σκέλη  $B_{10}$ - $B_{13}$  και τέσσερις α- έλικες. Οι πρώτες τρεις έλικες ( $H_1$ ,  $H_2$  και  $H_3$ ) τακτοποιούνται τριγωνικά, δείχνοντας προς την ενεργό περιοχή δηλαδή την τριάδα Cys<sup>277</sup>, His<sup>335</sup> και Asp<sup>358</sup>.

Η τελευταία έλικα ( $H_4$ ) είναι κοντά στο τέλος της περιοχής του πυρήνα και ελιμενίζει τα αμινοξέα που εμπλέκονται στην δεσμευτική για τα ιόντα  $Ca^{2+}$  περιοχή

(Ser449, Glu451 και Glu452) (**σχήμα 11**). Ο ακόλουθος βρόγχος (αμινοξέα 454-478) είναι η περιοχή σημαντικής παραλλαγής στην ακολουθία των αμινοξέων στις τύπου 2 t Tgases.

Αυτός ο βρόγχος είναι κρίσιμος για την ρύθμιση της δραστηριότητας της ιστικής διαγλουταμινάσης, δεδομένου ότι ενεργεί ως άρθρωση πέρα από την οποία η τρισδιάστατη θέση των πρωτεϊνικών περιοχών είναι ποικίλη.

Οι περιοχές 3 και 4 της C-terminal στην τύπου 2 t Tgase είναι οργανωμένες σαν αντιπαράλληλα β-barrels και αποτελούνται από έξι β- σκέλη (strands) και μια β-στροφή και από επτά αντιπαράλληλα β- σκέλη (strands).

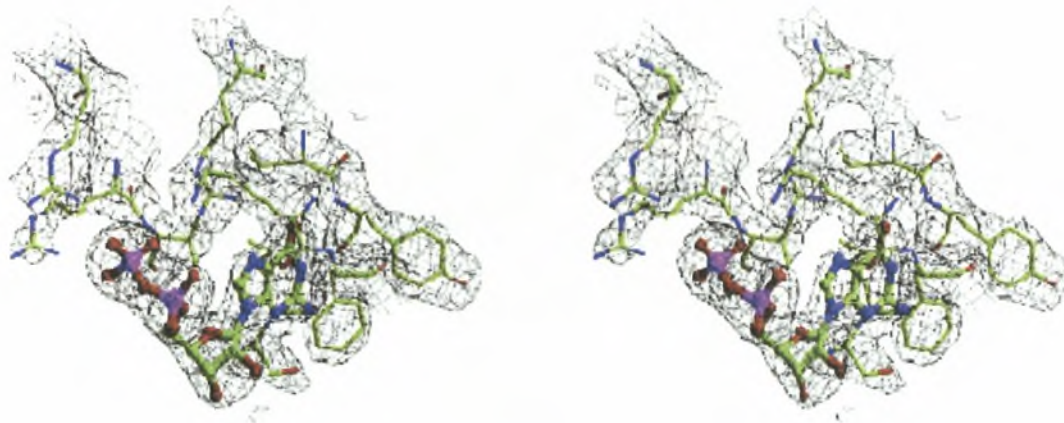
Οι περιοχές C-terminal είναι απαραίτητες στο να ρυθμίζουν την δραστηριότητα τρανσαμίνωσης και επίσης την δραστηριότητα GTPase (και ATPase) (**σχήμα 10**).

Οι περιοχές C-terminal, N-terminal και core domain κινούνται χώρα επάνω στην προσθήκη των ιόντων ασβεστίου, αποκαλύπτοντας την ενεργό περιοχή για την κατάλυση.

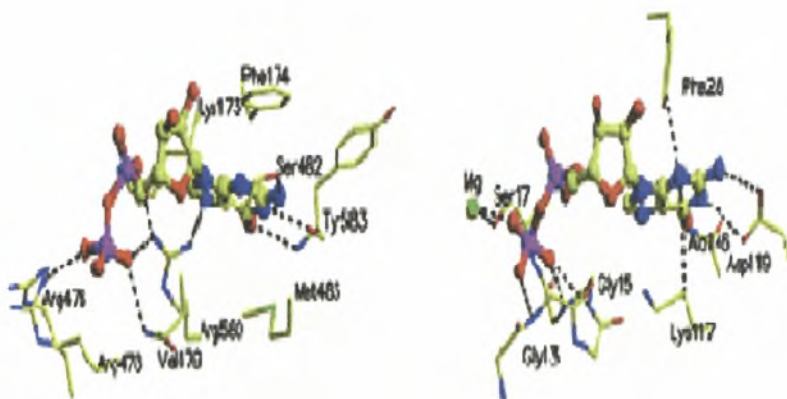
Η ακτίνα (gyration radius) της πρωτεΐνης (3nm) αυξάνεται παρουσία των ιόντων ασβεστίου (3.9nm), αλλά είναι ουσιαστικά απρόσβλητη παρουσία GTP, προτείνοντας ότι μόνο τα ιόντα ασβεστίου μπορούν να προωθήσουν σημαντικές δομικές αλλαγές στην εγγενή πρωτεΐνη.

Η πρωτεόλυση ενός εκτεθειμένου βρόγχου που συνδέει τις N-τελικές και C -τελικές περιοχές κατά την ενζυμική αδρανοποίηση, αποτρέπει τις διαμορφωτικές αλλαγές που προκαλούνται από το ασβέστιο.

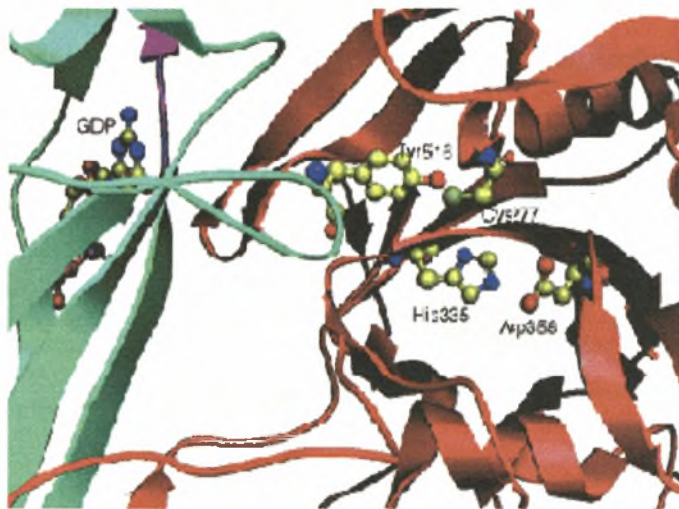
**Σχήμα 8.** Ένας χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας ( $2 F_o - F_c$ ,  $1.2 \sigma$ , GDP παραλειμμένος,  $2.8\text{-\AA}$  ανάλυσης) της GDP-δεσμεύουσας τσέπης. Ένα ατομικό μοντέλο από την τελική δομή ενσωματώνεται στην πυκνότητα ηλεκτρονίων.



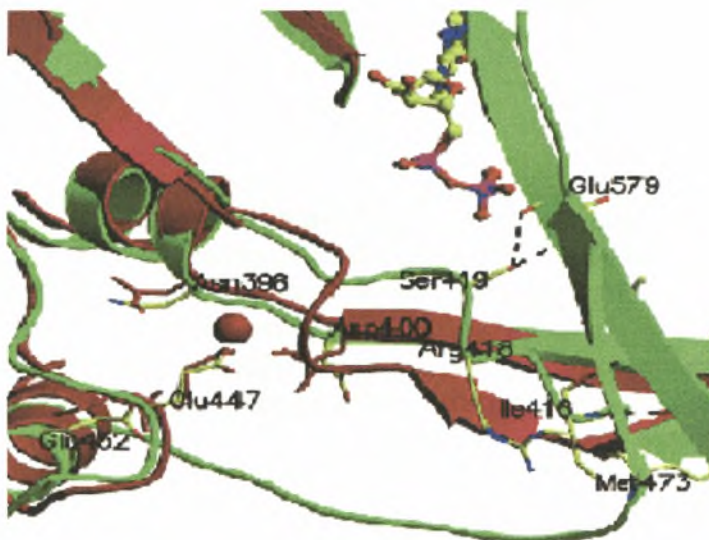
**Σχήμα 9.** Συγκρίσεις μεταξύ των ατομικών αλληλεπιδράσεων του GDP με την TG (αριστερά) και Ras (δεξιά). Οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις ζευγαριού ιόντων παρουσιάζονται στις σκιασμένες γραμμές. Το μόριο GDP παρουσιάζεται σαν σφαίρα-και-ραβδί. Η TG και τα υπολείμματα Ras παρουσιάζονται στα λεπτά ραβδιά



**Σχήμα 10.** Καταλυτικό κέντρο τρανσαμίνωσης της διαγλουταμινάσης. Μία κοντινή ματιά της καταλυτικής τριάδας Cys-277-His-335-Asp-358 και της Tyr-516 σχετικής με την περιοχή σύνδεσης του GTP. Οι Cys-277, His-335, Asp-358, Tyr-516, και GTP φαίνονται ως σφαίρα-και-ραβδί. Η Tyr-516 στρέφεται προς την Cys-277, το καταλυτικό νουκλεόφιλο, στην ενεργό περιοχή.



**Σχήμα 11** Σύγκριση της περιοχής δέσμευσης του ασβεστίου της TG (πράσινο) και του παράγοντα XIII a (κόκκινο). Στον παράγοντα XIII a, ο βρόγχος που σχετίζεται με την περιοχή δέσμευσης του ασβεστίου είναι προσανατολισμένος προς την περιοχή δέσμευσης του ασβεστίου, ενώ στο TG-GDP, ο ίδιος βρόγχος είναι προσανατολισμένος προς το GDP.



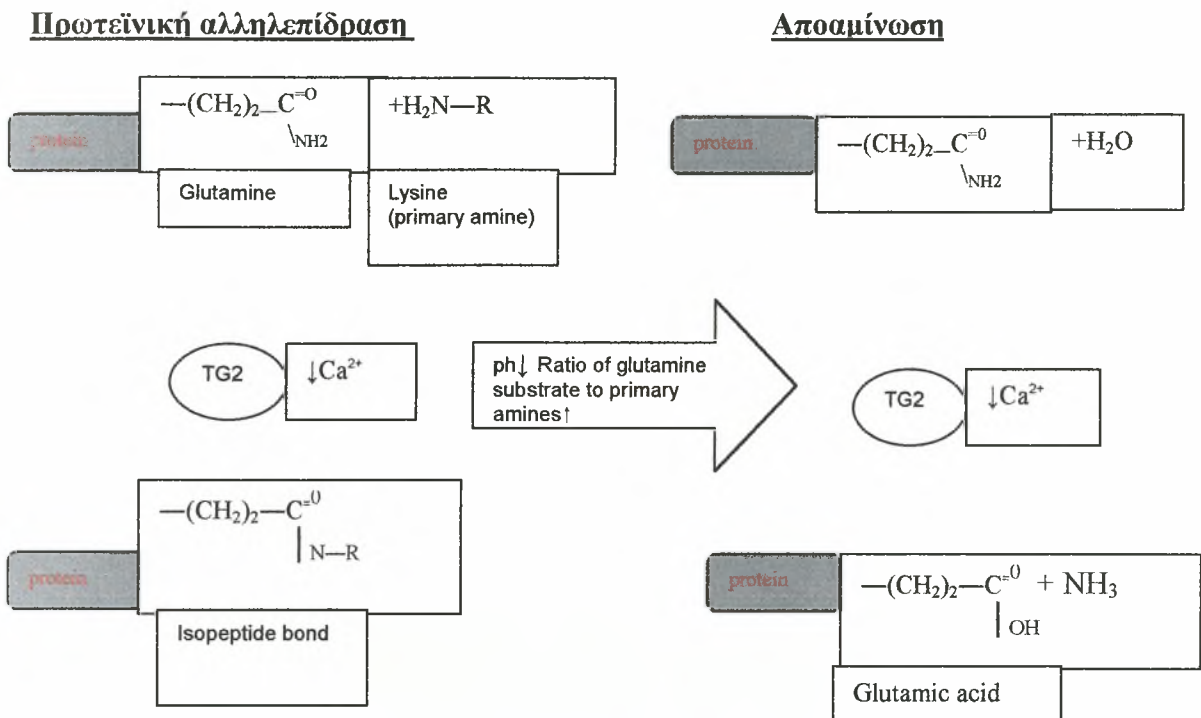
## ii. Η λειτουργία της ιστικής διαγλουταμινάσης

Η TG2 καταλύει την διασύνδεση-cross linking-των πρωτεϊνών και την σύζευξη των πολυαμινών σε πρωτεΐνες και απαιτεί GTP για να σταθεροποιηθεί και να φανεί η δράση της ως τρανσαμινάσης.

Η καταλυτική της ενεργότητα εκφράζεται με την εξής "αντίδραση":

Πρωτεϊνική γλουταμίνη + Αλκυλαμίνη = Πρωτεΐνη N(5)-αλκυλογλουταμίνη + NH<sub>3</sub> (42)

(Σχήμα 12)



**Σχήμα 12:** Το σχήμα δείχνει την ενζυμική δράση της ιστικής διαγλουταμινάσης (TG2). Η TG2 καταλύει την τρανσαμίνωση (διασύνδεση) μέσω αμινομάδων ή την αποαμίνωση αμινοξέων γλουταμίνης εντός πρωτεϊνών ή και μεταξύ πολυπεπτιδίων. Όταν μειώνεται το pH, η τάση για αποαμίνωση αυξάνεται σε σύγκριση με την τάση για τρανσαμίνωση όπως επίσης αυξάνοντας την αναλογία συγκέντρωσης των υποστρωμάτων γλουταμίνης σε σχέση με την συγκέντρωση των πολυαμινών.

Στο παραπάνω σχήμα (12) φαίνεται η δράση της ασβέστιο-εξαρτώμενης τρανσγλουταμινάσης, που είναι υπεύθυνη για τις μετά-μεταγραφικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών που γίνονται με τρανσαμίνωση ή αποαμίνωση συγκεκριμένων αμινοξέων (γλουταμινών) που περιέχονται σε πολυπεπίδια.

Η αντίδραση τρανσαμίνωσης εμπλέκει μια πρωτοταγή αμίνη (λυσίνη ή πολυαμίνη) και η αντίδραση αποαμίνωσης χρησιμοποιεί το H<sub>2</sub>O.

Όταν η λυσίνη ενός άλλου πολυπεπτιδίου επιτίθεται σε μια γλουταμίνη, ως αποτέλεσμα έχουμε την δημιουργία ενός ισοπεπτιδικού δεσμού και την ομοιοπολική σύζευξη των πρωτεϊνών.

Σε pH 7,3 η ταχύτητα της αντίδρασης με τις πρωτοταγείς αμίνες -τρανσαμίνωση- είναι ταχύτερη από την αντίδραση με το H<sub>2</sub>O.

Όταν ελαττώνεται το pH η ταχύτητα της αντίδρασης τρανσαμίνωσης που καταλύει η TG2 μειώνεται, ενώ η ταχύτητα της αποαμίνωσης αυξάνεται.

Αμινοξικά κατάλοιπα στις θέσεις -1,+1,+2 και +3 αλληλεπιδρούν με το κατάλοιπο γλουταμίνης που είναι ο ενζυμικός στόχος (Πίνακας 1) και επηρεάζουν την ενεργότητα της TG2. Πολύ σημαντικό για την εξειδίκευση του ενζύμου είναι το κενό μεταξύ της γλουταμίνης στόχου και των γειτονικών καταλοίπων προλίνης ( 37 ).

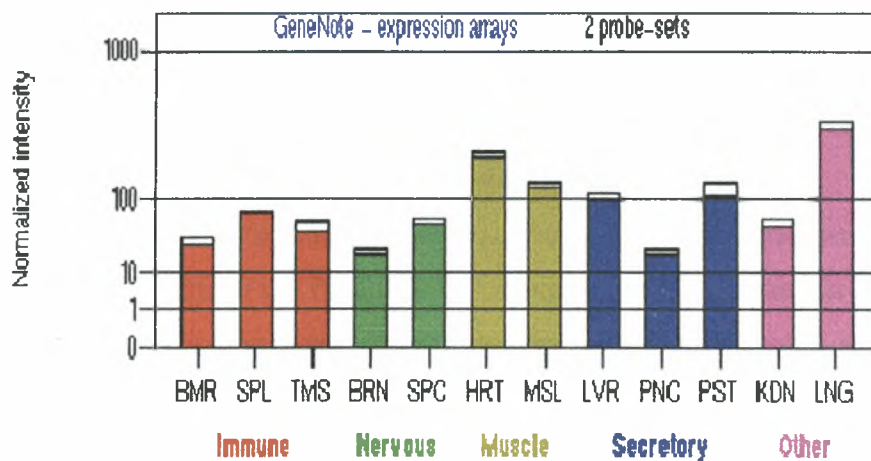
**Πίνακας 1.** Αλληλουχίες αμινοξέων που αποτελούν τον ενζυμικό στόχο της TG2.

Εξειδίκευση του ενζύμου TG2	
Αλληλουχίες που προτιμά η TG2	Αλληλουχίες που δεν προτιμά η TG2
Gln-Xaa-Pro	Gln-Pro
Gln-Xaa-Pro-	Gln-Gly
(Ile,Leu,Val,Phe,Tyr,Trp,Thr,Ser)	Gln-Xaa-Xaa-Pro
	Gln-Xaa-Xaa-Gly
<b>Το Xaa υποδηλώνει οποιοδήποτε αμινοξύ. Το γλουταμινικό οξύ που είναι ο στόχος συμβολίζεται με Gln</b>	

Η TGM2 εκφράζεται σε πολλούς ιστούς όπως φαίνεται και στο Σχήμα 13 και τον Πίνακα 2 που ακολουθούν:



**Σχήμα 13.** Γραφική αναπαράσταση της συχνότητας εμφάνισης της διαγλουταμινάσης σε διάφορους ιστούς.



**Πίνακας 2.** Αριθμός κλώνων της διαγλουταμινάσης ανά γονίδιο και στο σύνολο σε διάφορους ιστούς.

Tissue	Clones per gene	Total clones
<b>BMR</b> Bone marrow	0	22,374
<b>SPL</b> Spleen	0	10,537
<b>TMS</b> Thymus	0	6,367
<b>BRN</b> Brain	3	126,886
<b>SPC</b> Spinal cord	0	576
<b>HRT</b> Heart	3	5,039
<b>MSL</b> Skeletal muscle	0	13,971
<b>LVR</b> Liver	20	86,791
<b>PNC</b> Pancreas	2	55,250
<b>PST</b> Prostate	4	58,395
<b>KDN</b> Kidney	0	65,578
<b>LNG</b> Lung	12	87,703

### **3. ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟΥΣ ΟΠΟΙΟΥΣ ΕΜΠΛΕΚΕΤΑΙ Η ΙΣΤΙΚΗ ΔΙΑΓΛΟΥΤΑΜΙΝΑΣΗ.**

Οι διαγλουταμινάση εκφράζεται κανονικά σε χαμηλά επίπεδα σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς. Περαιτέρω, γίνεται προφανές ότι οι διαγλουταμινάσες είναι μη ορθά ενεργοποιημένες σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις. Με εξαίρεση των ασθενειών που οφείλονται στις μεταλλάξεις των διαγλουταμινασών, δεν είναι σαφές ποιος είναι ο ρόλος τους στην αιτιολογία των ασθενειών.

Ασθένειες στην παθολογία των οποίων συμμετέχουν οι διαγλουταμινάσες είναι οι Huntington's, Alzheimer's, Parkinson's, προοδευτική supranuclear παράλυση, Διαβήτης τύπου 1, διαταραχή της κερατινοποίησης του δέρματος-ιχθύωση, μυοσίτιδα σωματικών εγκλείστων, Κοιλιοκάκη, Καταρράκτης, Αρτηριοσκλήρωση κ.λ.π στις οποίες είναι γνωστοί οι μηχανισμοί εμπλοκής των διαγλουταμινασών ενώ παρατηρείται πάντα η συμμετοχή της ισομορφής της διαγλουταμινάσης 2 (ιστική) σε αυτές τις παθολογικές καταστάσεις.

Πιο αναλυτικά θα δούμε τους μηχανισμούς εμπλοκής της ιστικής διαγλουταμινάσης στην κοιλιοκάκη, γιατί με βάση τα αντισώματα έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης που έχουν ανιχνευθεί σε αυτή την ασθένεια, μελετήσαμε την ύπαρξη αντίστοιχων αντισωμάτων στους ασθενείς με νόσους του ήπατος.

#### **i. Κοιλιοκάκη: αυτοανοσία και Tgases.**

Η κοιλιοκάκη είναι μια πολύπλοκη φλεγμονώδης δυσλειτουργία του εντέρου (48), μια ευαίσθητη στην γλουτένη εντεροπάθεια, που προκύπτει ως αποτέλεσμα της κακής απορρόφησης θρεπτικών ουσιών από το έντερο εξαιτίας του φλεγμονώδους τραυματισμού του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου μετά την κατάποση της γλουτένης σίτου ή συναφών ειδών δημητριακών όπως σίκαλης και κριθαριού (16).

Η κοιλιοκάκη χαρακτηρίζεται από τη ζημιά στο ανώτερο λεπτό έντερο, που προκαλεί καταστροφή του εντερικού επιθηλίου, εξάλειψη των λαχνών και αποκαλύπτει ένα χαρακτηριστικό επίπεδο βλεννογόνο με εμφανώς υπερτροφικές κρύπτες (26).

Συνεπώς, οι ασθενείς με κοιλιοκάκη αντιμετωπίζουν έντονα προβλήματα δυσαπορρόφησης, με αποτέλεσμα την έλλειψη φολικού οξέος, έλλειψη σιδήρου, σπανιότερα έλλειψη βιταμίνης B<sub>12</sub> και κατ' επέκταση προβλήματα αναιμίας και αβιταμίνωσης όπως έλλειψης βιταμίνης K, βιταμίνης D, υποκαλιαμία και αυξημένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης, εμφάνιση οστεοπόρωσης, καταγμάτων οστών, απώλεια βάρους, καχεξία, στεατόρροια, διάρροια, δυσφορία, κόπωση, αφθώδη στοματίτιδα, συμπτωματική δυσαπορρόφηση της λακτόζης, έλλειψη γονιμότητας,

ψυχιατρικά σύνδρομα, διάφορες νευρολογικές καταστάσεις όπως περιφερική νευροπάθεια, αταξία (26, 16). Επίσης αρκετά αυτοάνοσα νοσήματα εμφανίζονται σε συνδυασμό με την εμφάνιση της κοιλιοκάκης όπως είναι η ερπιτόμορφη δερματίτιδα, ο μελιταίος διαβήτης τύπου 1 και η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα (16).

### **ii. Επιδημιολογία.**

Η πραγματική συχνότητα της κοιλιοκάκης είναι δύσκολο να προσδιοριστεί γιατί πολλοί ασθενείς έχουν ατυπικά συμπτώματα ή κανένα σύμπτωμα.

Παλαιότερα πίστευαν ότι η κοιλιοκάκη ήταν νόσος των παιδιών και ότι η διαγνωσή της γινόταν μέχρι την ηλικία των 2 ετών. Αργότερα που συνειδητοποίησαν την εμφάνιση της ασθένειας και στους ενήλικες και θεώρησαν ότι η συχνότητα εμφάνισης ήταν 1:1500 σε όλη την Ευρώπη με υψηλότερη συχνότητα 1:150 στην Ιρλανδία (42).

Η υψηλότερη συχνότητα είναι στην ανατολική Ευρώπη ή σε μέρη όπου μετανάστευσαν οι Ευρωπαίοι όπως η Βόρεια Αμερική και η Αυστραλία ενώ οι πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η παρουσία της κοιλιοκάκης είναι πολύ συχνή προσβάλλοντας 1 σε κάθε 120 έως 300 άτομα στην Ευρώπη και την Βόρεια Αμερική (16). Επίσης η κοιλιοκάκη εμφανίζεται σε μέρη όπως η Βορειοανατολική Ινδία και είναι υπό διάγνωση στην Νότιο Αμερική, την Βόρειο Αφρική και την Ασία (16).

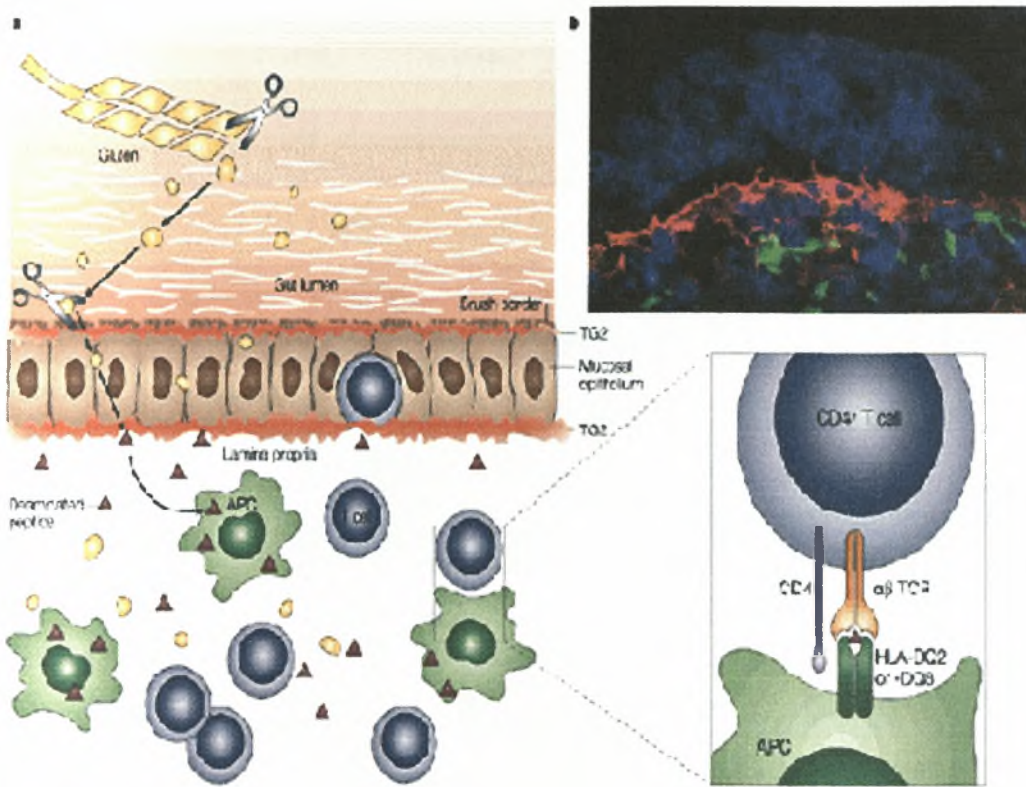
Είναι σπάνια μεταξύ ατόμων με μακρινή καταγωγή από την Αφρική, Καραϊβική, ή την Ιαπωνία. Εμφανίζεται συχνά στα παιδιά, ενώ στους ενήλικες 20% των περιπτώσεων εμφάνισης της πάθησης είναι σε άτομα ηλικίας άνω των 60 ετών.

Στις περισσότερες περιπτώσεις υπάρχει μια μικρή γυναικεία υπεροχή.

Επίσης η κοιλιοκάκη μπορεί να εμφανίζεται κατά την εγκυμοσύνη σε εγκύους όπου εμφανίζεται βαρείας μορφής αναιμία.

### **iii. Παθογένεση της κοιλιοκάκης.**

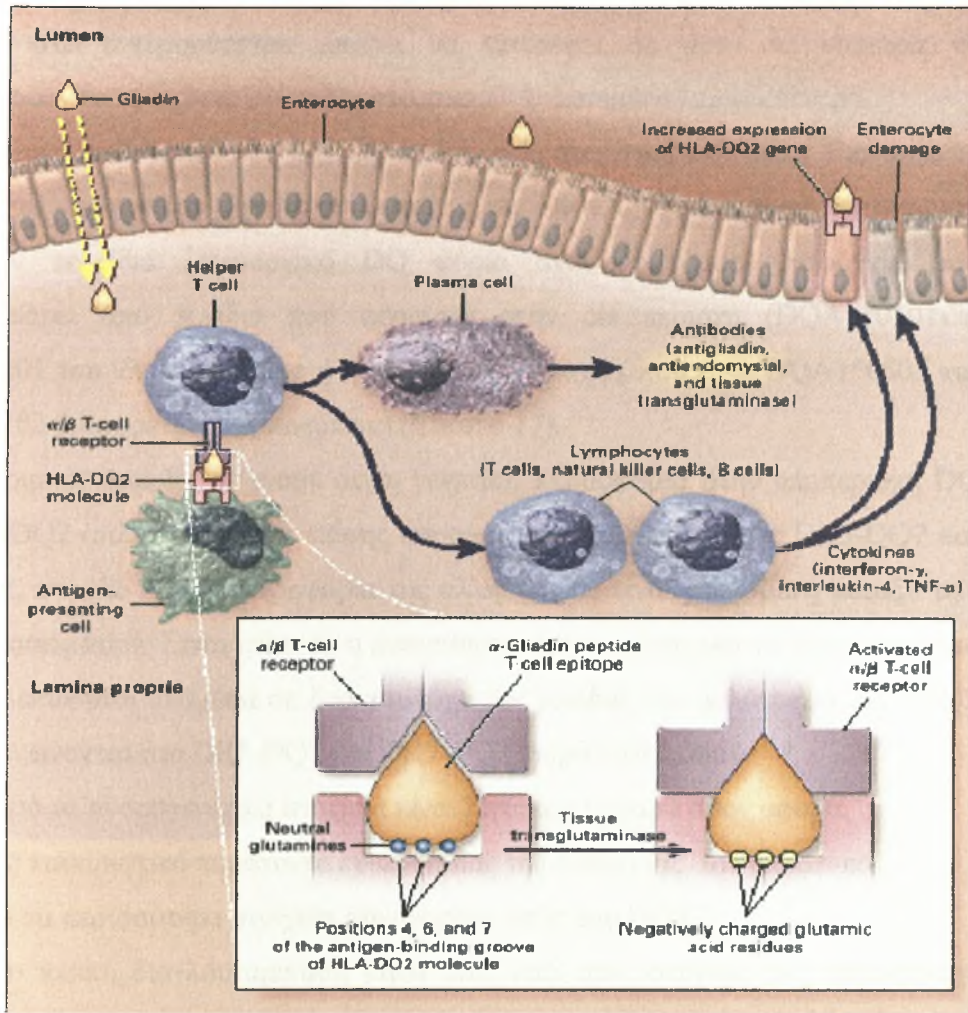
Η κοιλιοκάκη είναι αποτέλεσμα μιας μη φυσιολογικής ανοσιακής απάντησης των T- κυττάρων ενάντια στην ληφθείσα γλουτένη σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα (16). Η σημασία των γενετικών παραγόντων υποστηρίζεται από το ποσοστό περίπου 10 % επικράτησης της ασθένειας μεταξύ των συγγενών πρώτου-βαθμού. Πάνω από 95% των ασθενών με κοιλιοκάκη εκφράζουν τον απλότυπο HLA DQ (A1\*501, B1\*01) ή τον απλότυπο DQ A1\*0301, B1\*0302, το ετεροδιμερές (HLA-DQ2), το οποίο πιθανά παρουσιάζει κατά προτίμηση τα παραγόμενα από την γλοιαδίνη πεπτίδια γλουτένης, στο αντιγόνο-παρουσιαστικό αυλάκι του ενεργοποιώντας τα κυτταροτοξικά T CD8 λεμφοκύτταρα (16, 26) (Εικόνα 15,16).



**Εικόνα 15.** Αναπαράσταση της παρουσίας των πεπτιδίων γλουτένης από τα μόρια HLA-DQ2 στα T λεμφοκυττάρια και της ενεργοποίησής τους.

Η συσχέτιση του HLA στους ασθενείς με κοιλιοκάκη εκτός από το DQ2 είναι και στη μειοψηφία των ασθενών με το DQ8 (DQA1\*0301/DQB1\*0302).

Οι περισσότεροι κοιλιοκακικοί ασθενείς έχουν τον απλότυπο DR3-DQ2 (τον DRB1\*0301-DQA1\*0501-DQB1\*0201 απλότυπο) ή είναι DR5-DQ7 και DR7-DQ2 ετεροζυγώτες (DRB1\*11/12-DQA1\*0505-DQB1\*0301 και DRB1\*07-DQA1\*0201-DQB1\*0202 απλότυπους) (48). Οι DQ A-αλυσίδες που κωδικοποιούνται από το DQA1\*0501 και το DQA1\*0505 διαφέρουν κατά ένα αμινοξύ πεπτιδική αλληλουχία των αλυσίδων DQ B που κωδικοποιούνται από το DQB1\*0201 και από το DQB1\*0202 διαφέρουν κατά ένα αμινοξύ που βρίσκεται στη διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης (48).



**Εικόνα 16.** Παθογένεση της κοιλιοκάκης.

Η γλοιαδίνη απορροφάται στο lamina propria και παρουσιάζεται από κοινού με HLA-DQ2ή DQ8 αντιγόνα επιφάνειας -κυττάρου με τα κύτταρα αντιγόνο-παρουσίασης πιθανώς δενδριτικών κυττάρων ώστε να ευαισθητοποιήσουν τα T κύτταρα που εκφράζουν τον  $\alpha/\beta$  υποδοχέα των T κυττάρων.

Η ιστική διαγλουταμινάση αποαμινώνει πεπτίδια γλοιαδίνης παράγοντας όξινα αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα γλουταμινικού οξέος από τις ουδέτερες γλουταμίνες (παρεμβολή). Επειδή τα αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα προτιμώνται στις θέσεις 4, 6, και 7 του αντιγόνο-δεσμευτικού αυλακιού των HLA-DQ2 οι αποαμινωμένες γλοιαδίνες αποσπών μια ισχυρότερη απάντηση των T κυττάρων.

Αυτά τα λεμφοκύτταρα ενεργοποιούν έπειτα άλλα λεμφοκύτταρα για να παραγάγουν κυτταροκίνες όπως ιντερφερόνη- $\gamma$ , ιντερλευκίνη 4, παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF- $\alpha$ ) που βλάπτουν τις λάχνες του εντέρου με συνέπεια εμφάνιση εντερίτιδας.

Η επαγωγή της παρεκκλίνουσας κατηγορίας HLA-II αντιγόνων επιφάνειας του κυττάρου στα εντεροκύτταρα μπορεί να επιτρέψει σε αυτά τα κύτταρα να παρουσιάσουν τα πρόσθετα αντιγόνα στα ευαισθητοποιημένα λεμφοκύτταρα.

Μπορεί αυτές οι διαφορές να μην έχουν καμία λειτουργική επίπτωση. Για αυτό οι ασθενείς με κοιλιοκάκη που έχουν αυτούς τους DR-DQ συνδυασμούς απλοτύπων εκφράζουν το ίδιο λειτουργικό DQ μόριο στην κυτταρική επιφάνεια που κωδικοποιείται από γονίδια που φέρονται στην cis περιοχή (DQA1\*0501 και DQB1\*0201 του ίδιου απλοτύπου) ή στην trans περιοχή ( που είναι DQA1\*0505 και DQB1\*0202 διαφορετικών απλοτύπων) (Εικόνα 17).

Πρωτοποριακές θεωρίες δείχνουν ότι η γενετική πληροφορία στην υποπεριοχή DQ του DR3-DQ2 απλοτύπου είναι επίσης παρούσα στους ετεροζυγώτες DR5-DQ7 και DR7-DQ2, παρόλο που η πληροφορία της αλληλουχίας είναι χωρισμένη μεταξύ των δύο χρωμοσωμάτων. Είναι πιθανόν η ευαισθησία στην κοιλιοκάκη να εξαρτάται από μια αλληλεπίδραση ανάμεσα σε δύο τουλάχιστον γονίδια του απλότυπου DR3-DQ2 που επανενώνονται στα DR5-DQ7 και DR7-DQ2 ετερόζυγα άτομα.

Παρόλο που τα ανοσογενετικά στοιχεία είναι λιγότερο καθαρά όσον αφορά τον αρχικό καθοριστικό παράγοντα ευαισθησίας της ασθένειας τον απλότυπο DR4-DQ8 τα περισσότερα στοιχεία συνηγορούν υπέρ του DQ8.

Το ένζυμο ιστική διαγλουταμινάση είναι ένας από τους στόχους της αυτοάνοσης απάντησης στην κοιλιοκάκη (26).

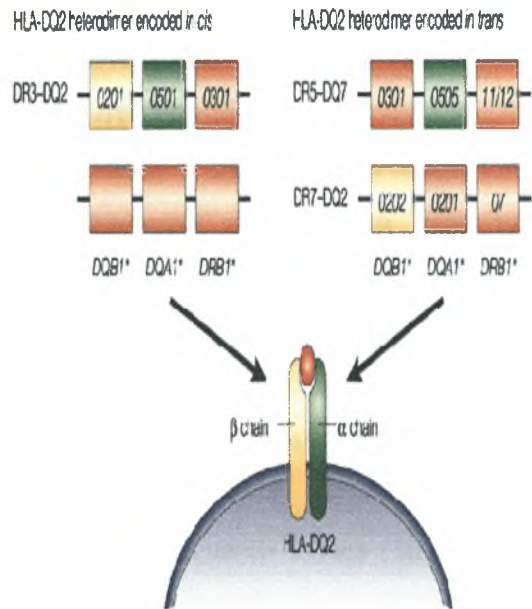
Η ενεργός κοιλιοκάκη συνοδεύεται από τα αυτοαντισώματα του βλεννογόνου του ενδομυσίου, αντισώματα έναντι στην ρετικουλίνη που είναι ένα κοινό συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας του.

Αυτά τα αντισώματα δίνουν ειδική ανίχνευση ειδικότητα με 100%, για την με βιοψία-αποδεδειγμένη κοιλιοκάκη (26).

Η ανοσοκαθήλωση των πρωτεϊνών από κύτταρα ινωσαρκώματος με IgA συζευγμένη ανοσοσφαιρίνη από ασθενείς με κοιλιοκάκη οδήγησε στην ταυτοποίηση της ιστικής διαγλουταμινάσης ως του κυρίαρχου αυτοαντιγόνου του ενδομυσίου (16).

Κατά συνέπεια οι ερώτηση είναι, πώς προκύπτει η αυτοανοσία;

Με βάση μια σειρά in vitro πειραμάτων, η ιστική διαγλουταμινάση είναι πιθανά αρμόδια μετά από την ενζυμική διάσπαση της γλοιαδίνης που προκαλεί για την παραγωγή νεοεπιτόπων γλοιαδίνης μέσω αποαμίνωσης καταλοίπων γλουταμίνης.



Nature Reviews | Immunology

**Εικόνα 17.** Οι διάφοροι συνδυασμοί απλοτύπων DR-DQ στις cis και trans περιοχές τους.

Τα μόρια HLA-DQ είναι χαμηλής χημικής συγγένειας για τα μη τροποποιημένα πεπτίδια που προέρχονται από την γλοιαδίνη (26).

Εντούτοις, η επεξεργασία τους με την ιστική διαγλουταμινάση *in vitro* αυξάνει σημαντικά τη δυνατότητα των τμημάτων γλοιαδίνης να υποκινήσουν την ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων που αναγνωρίζουν τους επιτόπους γλοιαδίνης (26).

Μετρήσεις με φασματοφωτομετρία μάζας έχουν δείξει ότι η

Ιστική διαγλουταμινάση επιδρά στα πεπτίδια γλοιαδίνης και τα αποαμινώνει

Η αποαμίνωση μετατρέπει τις γλουταμίνες στα αρνητικά-φορτισμένα μόρια του γλουταμινικού οξέος, τα οποία στη συνέχεια αυξάνουν την χημική συγγένεια για τις περιοχές συνδέσεων στο HLA-DQ2 και στο DQ8.

Είναι γνωστό ότι τα HLA-DQ2 και DQ8 κατά προτίμηση δεσμεύουν αρνητικά -φορτισμένα πεπτίδια (26).

Κατά τρόπο ενδιαφέροντα, μόνο T κύτταρα που προέρχονται από τον εντερικό λεμφικό ιστό ασθενών αποκρίνονται στα επεξεργασμένα πεπτίδια γλοιαδίνης από την ιστική διαγλουταμινάση. Αυτό βεβαιώνει την όργανο- ειδική φύση αυτής της ασθένειας.

Η TGase 2 επίσης διασυνδέεται περιστασιακά με την γλοιαδίνη *in vitro*, και έχει προταθεί ότι *in vivo* η διασυνδεμένη TGase μπορεί να ενεργήσει ως απτίνη για το σχηματισμό αντισωμάτων ενάντια στη γλοιαδίνη.

Αυτό είναι μια εύλογη υπόθεση επειδή ο τίτλος των αντισωμάτων του ορού έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης μειώνεται εντυπωσιακά όταν τα προϊόντα σίτου αφαιρούνται από τη διατροφή του ασθενούς. Κατά συνέπεια, η παρουσίαση των τμημάτων της γλοιαδίνης που διασυνδέονται με την ιστική διαγλουταμινάση έχει ως αποτέλεσμα αντισώματα ενάντια στην γλοιαδίνη, ενάντια στην ιστική διαγλουταμινάση και αντισώματα έναντι του συμπλόκου γλοιαδίνης/ιστικής διαγλουταμινάσης.

Η μεγαλύτερη υπεροχή των αντισωμάτων αντί- TGase (16) πιθανώς αντανακλά την μεγαλύτερη αντιγονικότητα αυτού του αντιγόνου.

Η απαμίνωση στην γλοιαδίνη από την TGase 2 έχει αναφερθεί ως το πρώτο παράδειγμα ενός ενζυματικά παραγόμενου νεοεπιτόπου σε μια αυτοάνοση ασθένεια (Σχήμα 18). Παρά την κομψότητα αυτής της υπόθεσης επαγωγής αυτοανοσίας, είναι προβληματική επειδή δεν είναι ακόμα σαφές πώς αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί *in vivo* επειδή η TGase 2 θα ενεργούσε στην γλοιαδίνη σε ένα περιβάλλον με δότες αμινών. Τα πειράματα των επεξεργασμένων με TGase πεπτιδίων γλοιαδίνης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την TGase 2 ελλείψει των χορηγών αμίνης.

Μια δυνατότητα βασισμένη στις *in vitro* δοκιμές είναι ότι οι ομάδες αμινών στην επιφάνεια των μορίων TGase 2 θα μπορούσαν να εξυπηρετήσουν ως πυρηνόφιλα. Εναλλακτικά, το νερό είναι το πιο άφθονα διαθέσιμο πυρηνόφιλο, το οποίο προκαλεί αποαμίνωση. Είναι επίσης δυνατό ότι η γλοιαδίνη είναι αποαμινωμένη από τα ισχυρά οξέα στο στομάχι.

Η Γλουταμίνη καταλαμβάνει περίπου το 40% των αμινοξέων της γλοιαδίνης. Κατά συνέπεια, θα αναμενόταν ότι μερικά από αυτά τα κατάλοιπα γλουταμίνης θα διασώζονταν από την όξινη αποαμίνωση για να χρησιμεύσουν ως δότες καρβοξυαμιδίων για τον σχηματισμό δεσμών ε (γ-γλουταμύλ) λυσίνης.





Αυξήσεις στα επίπεδα των IL-2, IL-4, IL-6 και TNF - α έχουν αναφερθεί επίσης σε κοιλιοκακικούς ασθενείς.

Πρόσφατα, οι Kim και Steinert (26), έδειξαν ότι η INF - γ μπορεί να προκαλέσει την έκφραση της TGase 2 στον αρουραίο IEC-6 στα κύτταρα του λεπτού εντέρου, και κατά τρόπο ενδιαφέροντα, ο TGF - β καταστέλλει την έκφραση της TGase 2 σε αυτά τα κύτταρα.

Επομένως, προτάθηκε ότι η αυξανόμενη έκφραση της TGase 2 που οδηγεί στην παθογένεση της κοιλιοκάκης σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα (HLA-DQ2 +) θα μπορούσε να οφείλεται σε αυξανόμενη έκφραση της IFN - γ, ή σε απώλεια σηματοδότησης του TGF - β, ή και τα δύο, στο λεπτό έντερο.

Η δυσαναλογία έκφρασης των κυτταροκινών είναι σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας έναρξης αυτοάνοσων νόσων. Παραδείγματος χάριν, η INF - γ διεγείρει την έκφραση στην επιφάνεια των κυττάρων των HLA II μορίων και με αυτόν τον τρόπο την έκφραση νεοαντιγόνων.

Η IL-2 προωθεί τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και μπορεί με αυτόν τον τρόπο να υποκινήσει την κλωνική επέκταση των αυτό-δραστικών κλώνων των T κυττάρων. Η έκφραση και των δύο αυτών κυτταροκινών είναι αυξημένη στην κοιλιοκάκη (26).

Συνολικά, οι ανωτέρω παρατηρήσεις προτείνουν ότι η TGase 2 ίσως αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα παθογένεσης της κοιλιοκάκης, αλλά περισσότερες μελέτες είναι απαραίτητες για να εξακριβωθεί εάν ο ρόλος της είναι άμεσος ή έμμεσος.

Οι ασθενείς με την κοιλιοκάκη είναι επίσης επιρρεπής σε άλλες αυτοάνοσες ασθένειες συμπεριλαμβανομένων της Ερπιτοειδούς δερματίτιδας (26) και του διαβήτη τύπου I (26).

Η Ερπιτοειδής δερματίτιδα χαρακτηρίζεται από δημιουργία φουσκαλών στις εκτεινούσες επιφάνειες και μια ευαισθησία στην γλουτένη. Κατά συνέπεια, η παρουσία αντισωμάτων αντί- TGase 2 στην κοιλιοκάκη και στην ερπιτοειδή δερματίτιδα μπορούν να αντανακλούν μία κοινή αιτιολογία.

Επιπλέον, τα αντισώματα στην ερπιτοειδή δερματίτιδα μπορούν να προκύψουν κατά τρόπο παρόμοιο με αυτόν που περιγράφεται ανωτέρω για την κοιλιοκάκη και ανήκουν στην τάξη των IgG ανοσοσφαιρινών (26).

Τα αντισώματα αντί- TGase 2 που βρίσκονται στον διαβήτη τύπου I ανήκουν στις κατηγορίες των ανοσοσφαιρινών IgG και IgA.

Μερικοί διαβητικοί παρουσιάζουν και αντισώματα IgA αντί- Tgase και παράλληλα πάσχουν από κοιλιοκάκη, η οποία συνήθως είναι ασυμπτωματική.

Αυτοί οι ασθενείς είναι συνήθως ομοζυγώτες για το HLA-DQ2, που μπορεί να είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που οδηγεί στην παραγωγή των αντισωμάτων 'έναντι στην ιστική διαγλουταμινάση. Ενώ περίπου 8% των διαβητικών είναι θετικοί για αντισώματα IgM έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης, ένα εντυπωσιακό 42% των ασθενών εμφανίζουν αντισώματα IgG έναντι της διαγλουταμινάσης (26).

Οι Lampasona et al. (29) έχουν προτείνει τους ακόλουθους μηχανισμούς για την παραγωγή των αντισωμάτων IgG έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης.

Κατ' αρχάς, ο διαβήτης τύπου 1 αυξάνει την εντερική διαπερατότητα (26), γεγονός που μπορεί να επιτρέψει την ενεργοποίηση ενάντια στην TGase 2 από κύτταρα του ανοσοποιητικού της συστηματικής και της γαστρικής κυκλοφορίας.

Δεύτερον, ο διαβήτης αρχίζει από την καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων, τα οποία μπορεί να απελευθερώσουν την TGase 2 ως νεοεπίτοπο.

Εναλλακτικά, βασισμένοι σε στοιχεία in vitro, η TGase 2 μπορεί να ενώσει σε σύμπλοκα τα χαρακτηριστικά αυτοαντιγόνα για το διαβήτη, όπως είναι η ινσουλίνη, η αποκαρβοξυλάση του γλουταμικού και η IA-2, τα οποία εάν εμφανίζονταν in vivo, θα μπορούσαν έπειτα να παρουσιαστούν στα κατάλληλα T κύτταρα για ανοσοποίηση. Από τα αυτοαντιγόνα που φαίνονται συνήθως μέσα στον διαβήτη, η ακετυλιωμένη Β αλυσίδα της οξειδωμένης ινσουλίνης είναι ένας δότης καρβοξυαμίνης για την TGase 2 (26). Κατά συνέπεια, είναι περαιτέρω δυνατό ότι το αντιγόνο για την παραγωγή των αντισωμάτων IgG έναντι στην ιστική διαγλουταμινάση να είναι η ιστική διαγλουταμινάση που συνδέεται με την ινσουλίνη ή ένα άλλο αυτοαντιγόνο.

Λαμβάνοντας υπόψη τις ανωτέρω παρατηρήσεις, προτάθηκε ότι η ιστική διαγλουταμινάση παράγει τα αυτοαντισώματα σε μια ποικιλία αυτοάνοσων δυσλειτουργιών με τη διασύνδεση πιθανών αυτοαντιγόνων και ενεργώντας ως απτίνη.

Επιπλέον, αντισώματα έναντι στην ιστική διαγλουταμινάση έχουν αναφερθεί στο Λύκο, η ιστική διαγλουταμινάση έχει ανιχνευθεί στο αρθρικό υγρό ασθενών με αρθρίτιδα, και στον ορό και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό των ασθενών της αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης (Πίνακας 2).

Enzyme substrate autoantigen	Autoimmune disease	References for	
		Autoimmunity	Enzyme substrate
Actin	Hepatitis Necrobiosis lipidica Lupus (human)	Orth et al. (1997) Hamalamos et al. (1995) Adyel et al. (1996)	Nemes et al. (1997)
Keratins	Hepatitis Necrobiosis lipidica		Buxman and Woeppel (1975)
Histone H2B	Lupus (human and murine)		Bilkeir et al. (1996)
IgG-coated I	Lupus (murine)	Igai et al. (1992)	Ando et al. (1991)
Myosin	Lupus (human) Myasthenia gravis	Cardona et al. (1995)	Eligula et al. (1998)
Trypsin	Necrobiosis lipidica		Bergamini et al. (1995)
Tubulin	Hemolytic anemia Lupus (human)	Hentati et al. (1994)	Predda et al. (1999)
Acetylcholine receptor	Myasthenia		Hucho and Bandaru (1986)
Gliadin	Celiac disease	Dierich et al. (1957)	Schuppan et al. (1998)
Collagen	Autoimmune disease with subepidermal blisters Bullous pemphigoid Goodpasture disease Rheumatoid arthritis Amyotrophic lateral sclerosis	Ghobestani et al. (2000) Chinawitch et al. (2000) Bora et al. (2000) Diao et al. (1999) Chesadov et al. (2000)	Bowness et al. (1987)
Myelin basic protein	Multiple sclerosis	Wagt and Gorny (1983)	Selkoe et al. (1982)

**Πίνακας 2.** Αυτοαντισώματα εναντίων υποστρωμάτων της TG ase σε αυτοάνοσα νοσήματα.

#### **iv. Μη HLA γονίδια σχετιζόμενα με την κοιλιοκάκη.**

Πολύ λιγότερα είναι γνωστά για την συμμετοχή των μη HLA γονιδίων στην κοιλιοκάκη. Υπάρχουν κάποιες αναφορές που υποδεικνύουν την συμμετοχή του γονιδίου που κωδικοποιεί το αρνητικό συνδεδεμένο μόριο, το κυτταροτοξικό αντιγόνο 4 T- λεμφοκύτταρο (CTLA4) ή ένα γειτονικό γονίδιο, αλλά η συνολική συμμετοχή αυτού του γονιδίου είναι μικρή. Κάθε γονίδιο εκτός των HLA έχει μικρή επίδραση από μόνο του στην ανάπτυξη της κοιλιοκάκης (26).

Η περιοχή που συνδέθηκε περισσότερο με την κοιλιοκάκη είναι στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 5 (5q31-33). Αυτή είναι μια 'καυτή' περιοχή για την παρουσία υποψήφιων γονιδίων συμπεριλαμβανομένων των TH2 T 2 βοηθητικών κυττάρων της συστάδας των κυτταροκινών, του λιποπολυσακχαριδικού υποδοχέα του γονιδίου CD14, του Tmp1 που ελέγχει την ανταπόκριση της ιντερλευκίνης-12, της IL12β που εμπλέκεται στον διαβήτη τύπου 1, και του Tim που εμπλέκεται στο άσθμα.

Μέχρι τώρα δεν έχει βρεθεί καμία συσχέτιση του γονιδίου IL12B με την κοιλιοκάκη και τα υπόλοιπα γονίδια είναι υπό έλεγχο (26).

Υπάρχουν επίσης στοιχεία συσσώρευσης για έναν παράγοντα ευαισθησίας για την κοιλιοκακική ασθένεια στο χρωμόσωμα 11q.

#### **v. Συμμετογή των Tgases στην παθολογία άλλων ασθενειών.**

Ο πολυμερισμός των ανώμαλα επιμηκυσμένων κατά 38 καταλοίπων, των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών CAG, μορίων χαντικτίνης από τις Tgases 1,2,3 δημιουργούν τα παθολογικά συσσωματώματα πολυμερών των μεταλλαγμένων μορίων χαντικτίνης στη νόσο του Huntington. Το μη-αμυλοειδικό τμήμα NAC της  $\alpha$ -synuclein είναι υπόστρωμα των Tgases και ο πολυμερισμός τους σε συσσωματώματα καταστρέφει τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες στην νόσο του Parkinson ενώ δημιουργεί τις νευριτικές πλάκες στη νόσο του Alzheimer ενώ σε αυτή τη νόσο (Alzheimer) και το tau αποτελεί υπόστρωμα των Tgases (26).

Στον καταρράκτη, η αύξηση του ασβεστίου λόγω οξειδωτικού στρες, UV ακτινοβολίας και επομένως υπεροξειδίου του  $O_2$ , προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας των Tgases, με αποτέλεσμα την παρεκκλίνουσα διασύνδεση της  $\beta$ -κρυσταλλίνης στα εξωτερικά επιθηλιακά στρώματα του κερατοειδή χιτώνα (26).

Τέλος στην αρτηριοσκλήρωση, οι Tgases ενσωματώνουν την λιποπρωτεΐνη Lp (a), και τις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας (ιωδονεκτίνη, ιωδογόνο, οστεονεκτίνη, οστεοποντίνη, κολλαγόνο, ελαφίνη) που αποτελούν υποστρώματα της δράσης τους, στο σχηματισμό αθηρωματικών πλακών (26).

#### **4. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΙΣΤΙΚΗΣ ΔΙΑΓΛΟΥΤΑΜΙΝΑΣΗΣ.**

Η ταυτοποίηση των αυτοαντισωμάτων που σχετίζονται ισχυρά με την κοιλιοκακική ασθένεια, και συγκεκριμένα των αντισωμάτων IgA αντί-ενδομυσίου (IgA EMA), επέτρεψαν την ανάπτυξη μη επεμβατικών ορολογικών tests ελέγχου για αυτή την κατάσταση. Ο προσδιορισμός των αντισωμάτων IgA αντί-ενδομυσίου (IgA EMA) με έμμεσο ανοσοφθορισμό IIF έχει ειδικότητα 94-100% και ευαισθησία 84-100% και υπερέχει της δοκιμασίας αντισωμάτων IgA έναντι της ρετικουλίνης με έμμεσο ανοσοφθορισμό IIF και της δοκιμασίας Elisa αντισωμάτων IgA/IgG έναντι της γλοιαδίνης (58).

Από τότε που ο Dieterich et al περιέγραψαν την ιστική διαγλουταμινάση ενός 82-85kDa ενζύμου ουβικουιτινοποίησης, ως του κύριου αυτοαντιγόνου στόχου των IgA EMA αντισωμάτων, πάνω από 30 δημοσιεύσεις εμφανίστηκαν να χρησιμοποιούν αυτή την πρωτεΐνη ως την βάση για μία εναλλακτική δοκιμή στην IgA EMA IIF δοκιμασία.

Δύο κατηγορίες αντισωμάτων έναντι της t TG υπάρχουν: τα τάξης IgA και τα τάξης IgG αντισώματα. Από αυτά τα IgA κυρίως έχουν διαγνωστικό ενδιαφέρον και οι δοκιμασίες για την ανίχνευσή τους είναι κυρίως οι εξής: Elisa IgA αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου της ανθρώπινης ερυθροκυτταρικής ή ανασυνδιασμένης ιστικής διαγλουταμινάσης, Elisa IgA αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου της διγλουταμινάσης ήπατος ινδικού χοιριδίου, κεκαθαρμένης ή μη.

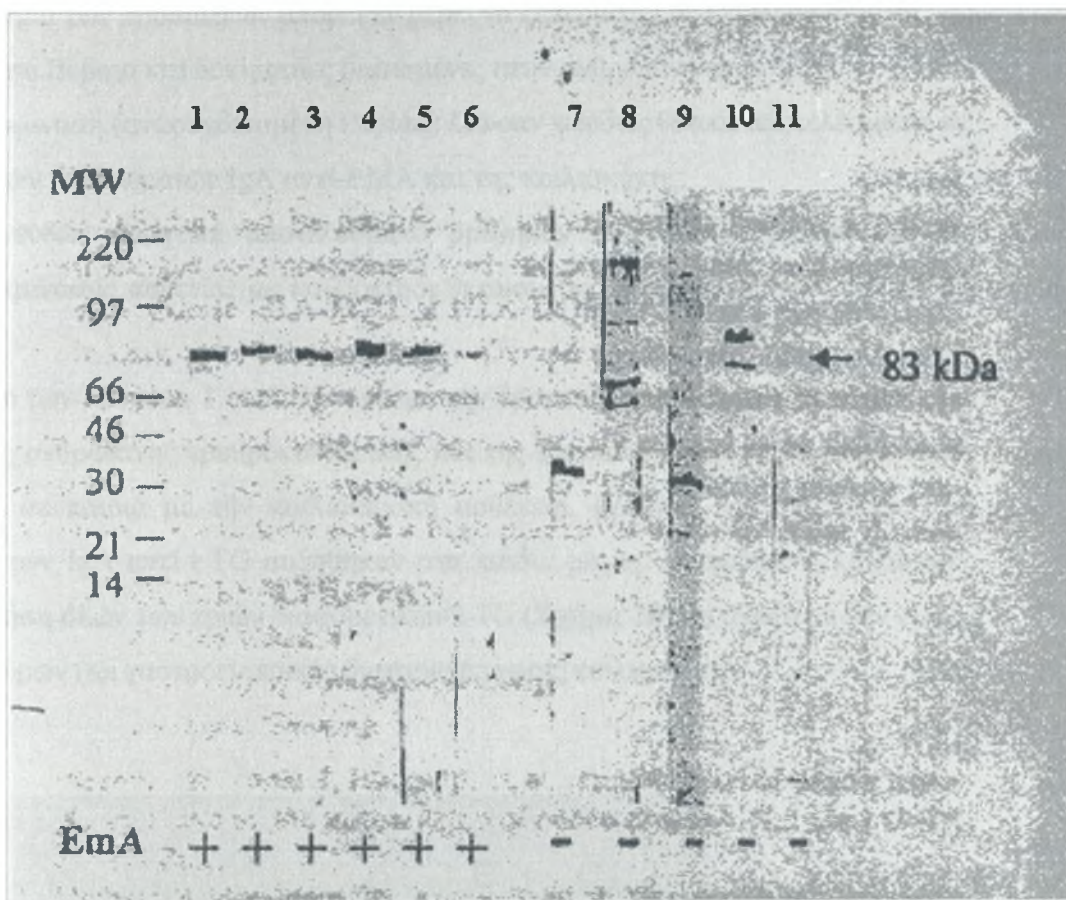
Φυσικά, έχουν ανιχνευθεί και αντισώματα IgG έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης και μετρούνται ειδικά σε περιπτώσεις έλλειψης των IgA ανοσοσφαιρινών ενώ γενικά αυξήθηκε η ευαισθησία από το 91,5%, όταν χρησιμοποιούνται μόνο τέστ προσδιορισμού των IgA anti-t TG αντισωμάτων, στο 98,5% όταν χρησιμοποιούνται τέστ προσδιορισμού και των IgA και των IgG αντί-t TG αντισωμάτων.

Τα τέστ που ανιχνεύουν τα αντισώματα IgA έναντι της ανθρώπινης ερυθροκυτταρικής διαγλουταμινάσης έχουν την μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα, αν και το συγκεκριμένο αντιγόνο έχει κάποιους περιορισμούς εξαιτίας προσμίξεων ενώ τα τέστ που χρησιμοποιούν το αντιγόνο της ανθρώπινης ανασυνδιασμένης διαγλουταμινάσης έχουν κάποιους περιορισμούς εξαιτίας προβλημάτων σχετικών με την αντιγονικότητα τους, αφού από τα ανασυνδιασμένα μόρια, απουσιάζουν αρκετοί επίτοποι διαμόρφωσης (10).

Παρόλο που αρκετές μελέτες κατέληξαν στο ότι η δοκιμασία IgA αντί-t TG έχει συγκρινόμενη απόδοση με την δοκιμασία IgA EMA IIF, πολλοί περιέγραψαν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα ύπαρξης αντισωμάτων IgA έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης σε ασθενείς με θετική δοκιμασία ανεύρεσης αντισωμάτων IgA έναντι του ενδομυσίου (αντί-EMA) χωρίς λήψη θεραπείας κοιλιοκάκης, και ψευδώς θετικά αποτελέσματα ύπαρξης αντισωμάτων IgA έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης κατά την απουσία ύπαρξης των αντισωμάτων IgA έναντι του ενδομυσίου και της κοιλιοκάκης. Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες χρησιμοποίησαν διαγλουταμινάση ινδικού χοιριδίου, που έχει μόνο περίπου 81% ομολογία με την ανθρώπινη ερυθροκυτταρική διαγλουταμινάση.

Σε αντίθεση η χρήση της ανθρώπινης ερυθροκυτταρικής διαγλουταμινάσης ( h-t TG) αναφέρθηκε να σχετίζεται με λιγότερα ψευδή αποτελέσματα, και μια συνολική απόδοση συγκριτικά πολύ κοντά ή ίση με το πρότυπο της δοκιμασίας IgA EMA IIF. Στο άρθρο των Wong R C W et al (58), έγινε η σύγκριση 13 εμπορικών IgA Elisa τεχνικών, 7 τεχνικών βασισμένων στην διαγλουταμινάση ήπατος ινδικών χοιριδίων, 6 τεχνικών βασισμένων στην ανθρώπινη ιστική διαγλουταμινάση (4 ανασυνδιασμένα h-t TG), σε 49 IgA EMA ενήλικες ασθενείς με CD και 64 ενήλικες ασθενείς ως control για να επιτευχθεί η ευαισθησία και η ειδικότητα κάθε τεχνικής και προσδιορίστηκε ότι οι τεχνικές που χρησιμοποιούν ως αντιγόνο την h-t TG υπερτερούν σε απόδοση σε σχέση με τις τεχνικές που βασίζονται στην gpl-t TG από τις οποίες μόνο δύο έδωσαν συγκρινόμενα σε απόδοση αποτελέσματα με την δοκιμασία αντισωμάτων IgA αντί-EMA IIF (58).

Επιπλέον, δύο από τις τεχνικές Elisa βασισμένες στην διαγλουταμινάση ήπατος ινδικού χοιριδίου είχαν μετρήσεις που δεν διέφεραν σημαντικά από τις τεχνικές Elisa που χρησιμοποίησαν ως αντιγόνο την ανθρώπινη ερυθροκυτταρική διαγλουταμινάση. Αυτό δείχνει ότι παράγοντες εκτός της πηγής των αντιγόνων είναι σημαντικοί στο να καθορίζουν την απόδοση των τεχνικών (58), όπως είναι οι επιμολύνσεις των αντιγόνων gpl-t TG που χρησιμοποιούν ορισμένες τεχνικές, από άλλες ηπατικές πρωτείνες σε βαθμό που η διαγλουταμινάση να αντιστοιχεί μόνο στο 30% της συνολικής πρωτεΐνης (Σχήμα 19), επομένως τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα στην ανίχνευση των αντισωμάτων να οφείλονται στην δραστηριοποίηση αντισωμάτων IgA έναντι άλλων πρωτεϊνών (40-70% επιμολύνσεις) και όχι των αντιγόνων της gpl-t TG αλλά και στην μη απόλυτη ύπαρξη ομολογίας μεταξύ της ανθρώπινης ιστικής διαγλουταμινάσης και της διαγλουταμινάσης του ήπατος των ινδικών χοιριδίων (50).



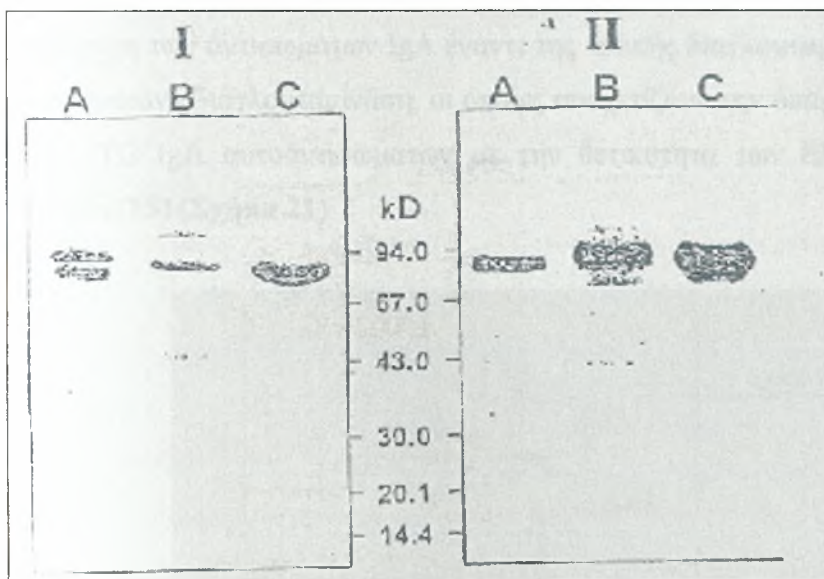
**Σχήμα 19.** IgA Western blotting για την tTG. Το εκχύλισμα της διαγλουταμινάσης ήπατος ινδικού χοιριδίου ανασυγκροτήθηκε σε buffer που περιέχει CaCl<sub>2</sub> - κάτω από μειωμένες συνθήκες όπως περιγράφεται από τους Dieterich et al. Οι πρωτεΐνες χωρίστηκαν με 12% SDS PAGE ηλεκτροφόρηση, μεταφερόμενες σε μια μεμβράνη πολυβυνιλίου, και επώαστηκαν διαδοχικά με τον ορό του ασθενή και με αντί-IgA αντισώματα συζευγμένα με υπεροξειδάση. Οι επιλεγμένοι αντιπροσωπευτικοί ασθενείς, επιδεικνύονται. Και οι 42 κοιλιοκακικοί δοκιμάστηκαν (EMA\* λωρίδες 1-6), συμπεριλαμβανομένων των διαβητικών κοιλιοκακικών (λωρίδες 4-6), επιδεικνύοντας μια μπάντα 83-KD που αντιστοιχούσε στην διαγλουταμινάση ινδικού χοιριδίου. Αντίθετα, 7 εκ των 12 ελέγχων ήταν αρνητικοί για EMA, κεκαθαρμένη διαγλουταμινάση ινδικού χοιριδίου, και ερυθροκυτταρική ανθρώπινη διαγλουταμινάση (λωρίδες 7-11, διαβητικοί στις λωρίδες 10 and 11) αλλά ψευδώς θετικός για την μη κεκαθαρμένη διαγλουταμινάση ινδικού χοιριδίου, έχουν αντισώματα IgA που δεσμεύουν πρωτεΐνες εκτός από την ιστική διαγλουταμινάση.



Το πρόβλημα των προσμίξεων μπορεί εν μέρει να ξεπεραστεί με επιπλέον βήματα καθαρισμού. Βέβαια και δοκιμασίες βασισμένες στην ανθρώπινη ιστική διαγλουταμινάση (ανασυνδιασμένη κυρίως) έδωσαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε έλλειψη των αντισωμάτων IgA αντί-EMA και της κοιλιοκάκης.

Επίσης ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα βρέθηκαν στις δοκιμασίες με και της διαγλουταμινάσης ασθενείς με κοιλιοκάκη θετικούς για αντισώματα IgA αντί-EMA (58).

Στο άρθρο των Hansson T et al, που αφορά την δραστικότητα των αντισωμάτων t TG έναντι της ανθρώπινης ερυθροκυτταρικής και της διαγλουταμινάσης ήπατος ινδικών χοιριδίων σε παιδιά με την κοιλιοκακική ασθένεια, βρέθηκε ότι τα επίπεδα των αντισωμάτων IgA αντί-t TG αυξήθηκαν στα παιδιά με μη θεραπευμένη κοιλιοκάκη με την χρήση όλων των τριών διαφορετικών t TG (Σχήμα 20) σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων (με γαστροεντερικές διαταραχές χωρίς κοιλιοκάκη).



**Εικόνα 20.** Διαχωρισμός ηλεκτροφόρησης πηκτωμάτων Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE ) (I) και ανάλυση Western blot (II) της εμπορικά διαθέσιμης ιστικής τρανσγλουταμινάσης ήπατος ινδικών χοιριδίων (ITG, Sigma Chemical Co., St. ST Louis, MO U.S.A: lane A). Ανθρώπινη ερυθροκυτταρική t TG (lane B) και μια προετοιμασία ηπατικής tTG ινδικού χοιριδίου (lane C). Τα μοριακά βάρη είναι υποδεδειγμένα σε kilodaltons, και το μονοκλωνικό αντίσωμα TG100 στην tTG ήπατος ινδικών χοιριδίων χρησιμοποιήθηκε στην ταυτοποίηση της tTG

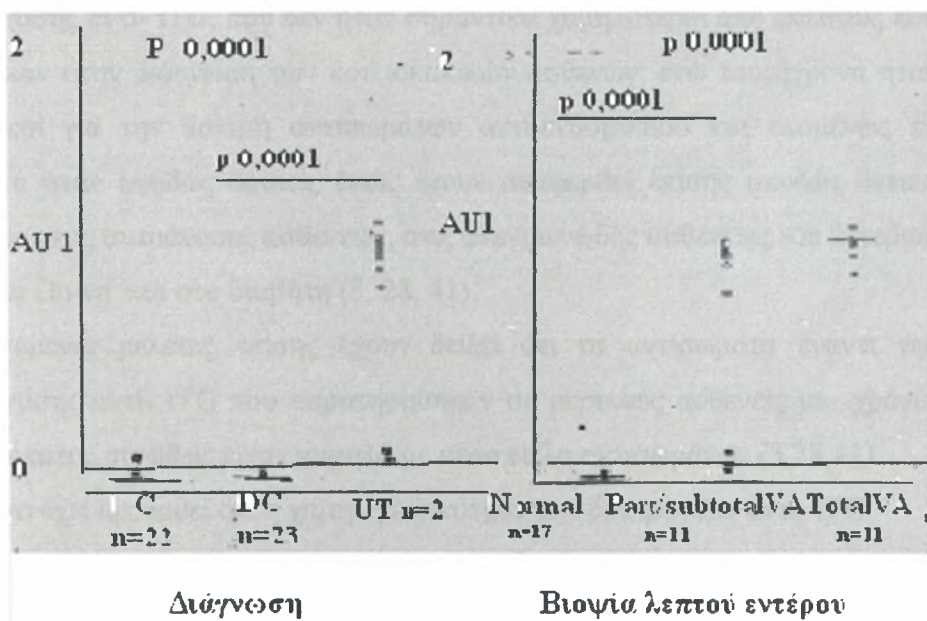
Περαιτέρω κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι μετρήσεις του ορού για IgA αντισώματα έναντι των gpl-t TG μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο των μη θεραπευμένων κοιλιοκακικών. Σε αυτές τις μετρήσεις η ευαισθησία κυμαίνεται μεταξύ 92%-98% και η ειδικότητα από 94% έως 98% (55).

Η Elisa με αντιγόνο ανθρώπινη ερυθροκυτταρική διαγλουταμινάση έχει την υψηλότερη ευαισθησία 100% και την υψηλότερη ειδικότητα 98% για την διάγνωση της κοιλιοκάκης στα παιδιά (55).

Σε αυτή την μελέτη τα αντιγόνα διαγλουταμινάσης των μεθόδων ήταν από ήπαρ ινδικών χοιριδίων και ανθρώπινα ερυθροκυτταρικά. Καμία παρασκευή των t TG δεν ήταν απολύτως κεκαθαρμένη (55).

Η χρήση της ανθρώπινης ερυθροκυτταρικής διαγλουταμινάσης αύξησε την ευαισθησία και την ειδικότητα, αλλά η Elisa που χρησιμοποίησε την πιο καθαρή διαγλουταμινάση ινδικών χοιριδίων έδειξε μικρότερη ευαισθησία από ότι η πιο ακατέργαστη παρασκευή της gpl-t TG.

Τελικά στα παιδιά με υποψία κοιλιοκάκης είναι καλύτερα να χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των αντισωμάτων IgA έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης οι δοκιμασίες με ανθρώπινη διαγλουταμινάση, οι οποίες συσχετίζουν την ύπαρξη υψηλών επιπέδων αντί-t TG IgA αυτοαντισωμάτων με την θετικότητα των EMA και της βιοψίας εντέρου (55) (Σχήμα 21).



**Σχήμα 21.** Τα επίπεδα αντισωμάτων IgA αντισώματα ενάντια στην ανθρώπινη ιστική τρανσγλουταμινάση ερυθροκυττάρων που εκφράζεται ως αυθαίρετες μονάδες (AU) στο (A) (HC) υγιή δείγματα ελέγχου(HC), τα δείγματα ελέγχου ασθενών (DC) και τους ασθενείς με τη μη θεραπευμένη κοιλιοκάκη (UT).

(B) Συγκρινόμενα δείγματα ελέγχου και δείγματα με μη επεξεργασμένη κοιλιοκακική ασθένεια, παρουσιάζοντας την ιστοπαθολογία του βλενογόνου του λεπτού εντέρου (VA,ατροφία εντερικών λαχνών, μερική- ολική VA, μια αναλογία λαχνών-κρυπτών ευδιάκριτα μικρότερη από 2:1). Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις μεσαίες τιμές. Cut off, 0.06 AU.

## **5. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΙΣΤΙΚΗΣ ΔΙΑΓΛΟΥΤΑΜΙΝΑΣΗΣ ΚΑΙ ΗΠΑΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.**

Ο προσδιορισμός αντισωμάτων έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης (αντί- t TG) με την βοήθεια των διαφόρων τεχνικών που έχουν αναπτυχθεί για τον σκοπό αυτό και η σύγκριση των αποτελεσμάτων τους έχει γίνει αντικείμενο μελέτης τόσο σε ασθενείς με κοιλιοκάκη όσο τελευταία και σε ασθενείς με χρόνιες παθήσεις του Ήπατος (51).

Οι Vecchi M et al (51) στη μελέτη τους σε ασθενείς με χρόνιες παθήσεις του ήπατος παρατήρησαν μια υψηλή συχνότητα θετικών αποτελεσμάτων (26,8%) όσον αφορά τα αντισώματα IgA έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης (αντί- t TG), ενώ όλοι αυτοί ήταν ασθενείς με κίρρωση και αντιπροσώπευαν το 57,9% του συνόλου των κίρρωτικών ασθενών ενώ όλοι οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα δεν εμφάνιζαν αντισώματα έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης (αντί-tTG αρνητικοί).

Σε αυτή τη μελέτη, οι κίρρωτικοί ασθενείς είχαν τίτλους αντισωμάτων έναντι της διαγλουταμινάσης αντί- tTG, που δεν ήταν σημαντικά χαμηλότεροι από εκείνους που παρατήρηθηκαν στην διάγνωση των κοιλιοκακικών ασθενών, ενώ ταυτόχρονα ήταν όλοι αρνητικοί για την δοκιμή αντισωμάτων αντί-ενδομυσίου και επομένως τα αποτελέσματα ήταν ψευδώς θετικά, όπως έχουν αναφερθεί επίσης ψευδώς θετικά αποτελέσματα στις αυτοάνοσες ασθένειες, στις φλεγμονώδης ασθένειες του έντερου, στο σύνδρομο Down και στο διαβήτη (3, 28, 41).

Δύο προηγούμενες μελέτες επίσης έχουν δείξει ότι τα αντίσωματα έναντι της διαγλουταμινάσης αντί- tTG που παρατηρήθηκαν σε μερικούς ασθενείς με χρόνια πάθηση του ήπατος συνήθως είχαν χαμηλό με μέσο τίτλο αντισωμάτων (3,28,41).

Δεδομένου ότι έχει προταθεί ότι η χαμηλή ειδικότητα των δοκιμασιών αντί- tTG θα μπορούσε να αφορά τη χρησιμοποίηση της διαγλουταμινάσης από το ήπαρ ινδικών χοιριδίων (5,6,31,56), αξιολογήθηκαν επίσης όλοι οι ασθενείς με χρόνια πάθηση του ήπατος με την χρήση μιας πρόσφατα αναπτυγμένης δοκιμής ELISA στην οποία χρησιμοποιείται ανθρώπινη ανασυνδιασμένη διαγλουταμινάση tTG.

Αυτό μείωσε τον αριθμό θετικών αποτελεσμάτων από 28,6% σε 17,1% αλλά παρέμεινε η υψηλή συχνότητα των θετικών ποσοστών αντί-tTG αντισωμάτων σε ασθενείς με κίρρωση του ήπατος.

Αντίθετα, στο άρθρο των Carroccio et al (8), τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα καταργήθηκαν εντελώς κατά την χρησιμοποίηση της ανθρώπινης ανασυνδιασμένης tTG (8).

Είναι κατανοητό ότι η απόκλιση μπορεί να προέλθει από τη διαφορετική μεθοδολογία στις δοκιμές ELISA, αλλά επίσης διαφορές στα κλινικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα των ασθενών μπορεί να διαδραματίζουν έναν ρόλο.

Πράγματι, στη μελέτη των Vecchi M. et al (51), δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση της αιτιολογίας της κίρρωσης του ήπατος στη εμφάνιση ή την συχνότητα των αντισωμάτων αντί- tTG, η υψηλή συχνότητα των αντί- tTG ήταν αυστηρώς σχετική με μια υψηλή καταστροφή του ήπατος εξαιτίας της κίρρωσης.

Σε συμφωνία με τη μελέτη των Carroccio et al (8), στη μελέτη των Vecchi M et al (51), όλοι όσοι παρουσίασαν θετικά αντισώματα αντί- tTG χαρακτηρίστηκαν από τα υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρινών και από μια υψηλή συχνότητα των αυτοαντισωμάτων, συγκρινόμενη με τους αρνητικούς στα αντισώματα αντί- tTG κίρρωτικούς ασθενείς, αν και τέτοιες διαφορές έφθασαν σε μια στατιστική σημασία μόνο για την IgM.

Εντούτοις, τα συμπεράσματα των Vecchi M. et al (51), μαζί με εκείνα των Carroccio et al (8), είναι αρκετά ισχυρά ώστε να προτείνουν ότι τα υψηλά επίπεδα των ανοσοσφαιρινών και των αυτοαντισωμάτων μπορεί να είναι υπεύθυνα για μια παρέμβαση στις δοκιμασίες ELISA για αντί- tTG. Αυτό θα μπορούσε να είναι σε συμφωνία με το υψηλό ψευδώς θετικό ποσοστό αντί- tTG που παρατηρήθηκε σε αυτοάνοσες ασθένειες όπως ο διαβήτης και σε φλεγμονώδης ασθένειες των εντέρων (3,28,41).

Η πυλαία υπέρταση μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση αντί-tTG αντισωμάτων στους ασθενείς με κίρρωση.

Πώς η πυλαία υπέρταση μπορεί να προδιαθέσει την έκφραση αντισωμάτων αντι- tTG είναι ασαφές. Η παρουσία πυλαίας υπέρτασης είναι γνωστό ότι προκαλεί ιστολογικές αλλαγές στο γαστρικό επιθήλιο του παχέος εντέρου (5,31).

Η συμμετοχή του επιθηλίου του εντέρου υποστηρίζεται από την αυξανόμενη εντερική διαπερατότητα του εντέρου που παρατηρείται σε κίρρωτικούς ασθενείς (6,15).

Κατά συνέπεια, κάποιος θα μπορούσε να υποθέσει ότι η ζημία του βλεννογόνου και η αυξανόμενη διαπερατότητα του εντέρου μπορούν να προκαλέσουν τις αλλαγές στην ανοσιακή απάντηση προς τα κανονικά αντιγονικά υλικά συμπεριλαμβανομένου του tTG. Κανένα στοιχείο δεν είναι διαθέσιμο, ούτε στη μελέτη των Vecchi M et al (51), ούτε στις προηγούμενες μελέτες, που να υποστηρίζει σταθερά αυτήν την υπόθεση.

Εντούτοις, εάν συνέβαινε αυτό, η παραγωγή αντί- tTG αντισώματων θα επρέπε να θεωρηθεί ως δευτεροβάθμια απάντηση στην βλάβη του εντερικού ιστού και στη διάσπαση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού.

Κατά συνέπεια εκφράζονται αμφιβολίες για τη χρήση αυτής της δοκιμής ως μιας διαδικασίας ελέγχου μεγάλων μη διαγνωσμένων πληθυσμών.

Στο άρθρο των Kenneth D. Fine et al (18), γίνεται μια προσπάθεια συσχέτισης της κοιλιοκάκης με την ηπατίτιδα C.

Έχουν υπάρξει διάφορες δημοσιευμένες μελέτες, συνήθως από Ευρωπαϊκά κέντρα, για την συνύπαρξη κοιλιοκάκης με την ηπατίτιδα C και κατά μέσον όρο, περίπου 5% των ασθενών με την αυτοάνοση ηπατική ασθένεια σε αυτές τις μελέτες ανακαλύφθηκαν να έχουν κοιλιοκάκη όταν ελέγχθηκαν με δοκιμασίες που γίνονται σε ορούς.

Το ποσοστό αυτό είναι πολύ κοντά με το ποσοστό 3,4% της συχνότητας εμφάνισης ηπατοπαθών με κοιλιοκάκη που ανακαλύφθηκε στη μελέτη των

Kenneth D. Fine et al (18). Επειδή η ηπατίτιδα C είναι γνωστή στο να υποκινεί τις αυτοάνοσες αντιδράσεις που μπορούν να μιμηθούν τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της αυτοάνοσης ηπατίτιδας (1, 34) και αυτό μπορεί να έχει επιπτώσεις στους ιστούς έξω από το ήπαρ (23,24,35,44), υπέθεσαν ότι μολυσμένοι με τον ιό της ηπατίτιδας C ασθενείς, μπορεί επίσης να έχουν μια αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης κοιλιοκάκης σε σύγκριση με άλλες μορφές ασθενειών του ήπατος ή σε σχέση με τα controls δηλαδή ατόμων που δεν πάσχουν από ασθένεια του ήπατος.

Χρησιμοποιώντας την ορολογική διαλογή, βρέθηκε ότι 3 από τους 259 αξιολογημένους ασθενείς με ηπατίτιδα C (1.2%) παρουσίαζαν αντισώματα αντιγλοιαδίνης, αντί-ενδομυσίου, και αντί-tTG στον ορό και στη συνέχεια βρέθηκαν στην εντερική βιοψία να πάσχουν και απο κοιλιοκάκη.

Υπάρχει μια εκτενής ιατρική βιβλιογραφία στους μηχανισμούς και σε συγκεκριμένες αυτοάνοσες αντιδράσεις και ασθένειες πιθανά υποκινημένες από τη μόλυνση με τον ιό της ηπατίτιδας C (1,2,23,24,34,35,36,40,44).

Ακόμα γνωρίζουμε μόνο μια άμεση αναφορά στην συσχέτιση μεταξύ ηπατίτιδας C και κοιλιοκάκης. Μια επιστολή σε συντάκτη δημοσιεύθηκε πρόσφατα προτείνοντας ότι η θεραπεία της ηπατίτιδας C με ιντερφερόνη οδήγησε στην ανάπτυξη κοιλιοκάκης σε δύο ασθενείς (43).

Αν και αυτό φαίνεται θεωρητικά πιθανό, αφού μερικές αυτοάνοσες ασθένειες έχει παρατηρηθεί ότι επιδεινώνονται κατά τη διάρκεια θεραπείας με ιντερφερόνη, στη μελέτη των Fine D. K et al (18), τρία από τα τέσσερα άτομα (δύο ασθενείς και 1 κανονικός εθελοντής) βρέθηκαν να έχουν κοιλιοκάκη και ηπατίτιδα C χωρίς να είχαν λάβει ποτέ θεραπεία με ιντερφερόνη, γεγονός που προτείνει ότι είναι πράγματι η μόλυνση με την ηπατίτιδα C παρά η θεραπεία της, που συνδέεται με την αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης κοιλιοκάκης σε αυτό τον πληθυσμό των ασθενών. Ένας από αυτούς τους ασθενείς είχε αντί-tTG αντισώματα στον ορό του πριν λάβει θεραπεία με ιντερφερόνη δηλαδή είχε εμφανίσει ήδη αυτοάνοσες αντιδράσεις ειδικές για την κοιλιοκάκη. Η υψηλή συχνότητα με την οποία βρέθηκε το HLA-DQ2 στους ασθενείς με τη χρόνια ηπατίτιδα C μέσα σε αυτή η μελέτη (52%) επίσης προσφέρει την υποστήριξη στην αληθινή συσχέτιση αυτής της ιογενούς ηπατικής λοίμωξης και της κοιλιοκάκης.

Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι τρεις από τους έξι ασθενείς με κοιλιοκάκη που παρουσιάστηκαν από τους Cellier et al (4), βρέθηκαν να έχουν ηπατίτιδα C.

Στον πληθυσμό των ηπατοπαθών της μελέτης των Fine D. K et al (18), η ηπατίτιδα C και η αυτοάνοση ηπατίτιδα ήταν οι μόνες ηπατικές ασθένειες που συνδέθηκαν με την παραγωγή αντισωμάτων αντί- tTG/ αντί- ενδομυσίου .

Εντούτοις, ένα μεγάλο μέρος των ηπατοπαθών (37%), ανεξάρτητα από τη διάγνωση, παράγγαγαν αντισώματα αντιγλοιαδίνης, μια παρατήρηση που γίνεται και από άλλους επιστήμονες επίσης (9). Αν και η αληθινή σημασία αυτής του ευρήματος είναι ακόμα υπό έρευνα, είναι πιθανόν ότι πολλοί (εάν όχι όλοι) αυτοί οι ασθενείς έχουν κάποιο στοιχείο ανοσολογικής ευαισθησίας στη γλοιαδίνη (επειδή το χυμικό ανοσοποιητικό σύστημά τους έχει παράξει τέτοια αντισώματα) αλλά ότι αυτό δεν έχει ακόμα προκαλέσει μια σημαντική αυτοάνοση αντίδραση (δηλ., αρνητική δοκιμή για αντισώματα έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης ) ή σημαντική εντερική ζημία (46, 54). Εάν αυτό τελικά αποδεικνύεται αληθινό, η ευαισθησία έναντι στη γλουτένη μπορεί να συμβάλει στην ασθένεια των οστών σε ασθενείς με την αρχική χολική κίρρωση και άλλες ασθένειες του ήπατος (20-33).

Από αυτή την μελέτη των Fine.D.K. et al (18), φάνηκε ότι η εμφάνιση κοιλιοκάκης είναι επιδημιολογικά συνδεδεμένη με τους ασθενείς που πάσχουν από ηπατίτιδα C και άλλες αυτοάνοσες παθήσεις του ήπατος. Συγκεκριμένα η ηπατίτιδα C είναι η πιο συχνή ασθένεια του ήπατος που συνδέεται με την ανάπτυξη κοιλιοκάκης.

Στο άρθρο των Volta U. et al (57), η ορολογική διαλογή για την κοιλιοκάκη (CD) εκτελέστηκε στους ασθενείς με αυτοάνοσο χολόσταση για να καθοριστεί η συχνότητα συσχέτισης μεταξύ τους και για να αξιολογηθεί ο αντίκτυπος της απόσυρσης της γλουτένης από την διατροφή στους πάσχοντες από ασθένειες του ήπατος που συνδέονται με ευαίσθητες στη γλουτένη εντεροπάθειες.

Τα αντισώματα ανοσοσφαιρίνης A ενδομυσίου και ανθρώπινης ιστικής διαγλουταμινάσης ήταν θετικά σε εννέα ασθενείς από τους 255 (επτά με αρχική χολική κίρρωση, ένας με αυτοάνοση χολαγγειίτιδα, και ένας με αρχική σκληρωτική χολαγγειίτιδα), στους οποίους τα αποτελέσματα δωδεκαδακτυλικών βιοψιών έδειξαν λαχνωτή ατροφία σύμφωνη με την κοιλιοκάκη.

Δύο από αυτούς τους ασθενείς είχαν ένα σύνδρομο δυσαπορρόφησης, και κάποιος είχε την αναιμία της ανεπάρκειας του σίδηρου.

Τα Κλινικά και βιοχημικά σημάδια της χολόστασης δεν βελτιώθηκαν μετά από την απόσυρση της γλουτένης από την διατροφή στους τρεις ασθενείς με την βαριά ηπατική ασθένεια. Η συχνότητα των αποδεδειγμένων με βιοψία-ευαίσθητων στη γλουτένη εντεροπαθειών σε ασθενείς με αυτοάνοσες χολοστατικές δυσλειτουργίες του ήπατος στη Βόρεια Ευρώπη ήταν η 1 σε 25 περιπτώσεις PBC, 1 σε 21 περιπτώσεις AIC, και 1 σε 61 περιπτώσεις PSC, με μια γενική συχνότητα 3,5%.

Αυτή η συχνότητα εμφάνισης είναι πολύ υψηλότερη από την αντίστοιχη συχνότητα που βρέθηκε μέσα στο γενικό πληθυσμό της Ισπανίας (2.6/1000, 95% CI = 0,7 –8.2) και στην Ιταλία (5.7/1000, 95% CI = 3,5–8.8) (53-54).

Είδαμε τελικά ότι οι περισσότερες ηπατοπάθειες σχετίζονται με την εμφάνιση αντισωμάτων έναντι της t TG στους ορούς των ασθενών όπως συμβαίνει και στους ασθενείς με CD, όπως και ότι πολλές φορές συνυπάρχουν αυτές οι δύο ασθένειες.

Εν περιλήψει, η ορολογική διαλογή για το CD πρέπει να εκτελείται ως ρουτίνα στους ασθενείς με αυτοάνοσο χολοστατική ηπατική δυσλειτουργία.

Για τον σκοπό αυτό, η απόδοση της μέτρησης των IgA h - t TGA είναι πολύ υψηλότερη από αυτή της IgA gp- tTGA και μπορεί να θεωρηθεί μια έγκυρη εναλλακτική λύση από την δοκιμασία IgA EmA.

## 6. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗΣ.

Η θετική λαχνωτή ατροφία που χαρακτηρίζει την κοιλιοκάκη μπορεί να ελεγχθεί με βιοψία εντέρου και μπορεί να συμβεί και σε άλλες διαταραχές εκτός της κοιλιοκάκης. Η παρουσία κοιλιοκάκης στους ασθενείς μπορεί να αποδειχθεί με το να ακολουθηθούν τα κριτήρια της Ευρωπαϊκής Κοινότητας για παιδιατρική γαστρεντερολογία και διατροφή (ESPGAN) και διάστημα ενός χρόνου αυστηρών μελετών για την ταυτοποίηση της κοιλιοκάκης (4) (Πίνακας 3).

- α) μια αρχική θετική βιοψία του εντέρου
- β) 6 μήνες με διατροφή χωρίς γλουτένη
- γ) μια αρνητική δεύτερη βιοψία του εντέρου,
- δ) πρόσληψη της γλουτένης για 6 μήνες,
- ε) μια θετική τρίτη βιοψία του εντέρου.

### Πίνακας 3. Αρχικά κριτήρια ESPGAN

Οι ασθενείς με κοιλιοκάκη που εκτίθενται στη γλουτένη εκφράζουν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων του ορού ενάντια στη γλοιαδίνη, στο ενδομύσιο, στην ρετικουλίνη, στον ειλέο και στην ιστική διαγλουταμινάση (4).

Η ανάπτυξη των εξετάσεων του ορού για τρία διαφορετικά αντισώματα του ισοτύπου IgA έκανε την παραγωγή πιο γρήγορων, διορθωμένων κριτηρίων ESPGAN για την κοιλιοκάκη από το 1990. Αυτές οι εξετάσεις περιλαμβάνουν **Πίνακας 4:**

### Πίνακας 4 εξετάσεις ορών ασθενών με υποψία κοιλιοκάκης.

1. Αντισώματα αντί-ενδομυσίου IgA (EMA)
2. Αντισώματα αντί-γλοιαδίνης IgA (AGA)
3. Αντισώματα αντί-ρετικουλίνης R1 (ARA)



Η ανίχνευση των αντισωμάτων αντί-ρετικουλίνης πραγματοποιείται με τεχνική που έχει ειδικότητα αλλά όχι πολύ μεγάλη ευαισθησία. Τα αντισώματα IgA και IgG έναντι στην γλοιαδίνη έχουν χρησιμοποιηθεί για την διάγνωση της κοιλιοκάκης, με ευαισθησία 52-91% και 76-88% αντίστοιχα και ειδικότητα 45-94% και 88-92% αντίστοιχα (4).

Τα αντισώματα τάξης IgA αντί-ενδομυσίου έχουν από αναφορές πολύ καλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα 97-100% και 98-99% αντίστοιχα και ο συνδυασμός ανίχνευσης αντισωμάτων αντί-γλοιαδίνης και αντί-ενδομυσίου μπορεί να δώσει μια θετική ή αρνητική τιμή πρόγνωσης που πλησιάζει το 100% γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα την τροποποίηση των κριτηρίων ESPGAN για την διάγνωση της κοιλιοκάκης. Τα διορθωμένα κριτήρια ESPGAN θέλουν (**Πίνακας 5**):

**A. Μια και μοναδική θετική βιοψία εντέρου**

**B Επίδειξη τουλάχιστον δύο από τις αναφερθείσες 3 τάξεις αντισωμάτων IgA**

#### **Πίνακας 5. Διορθωμένα κριτήρια ESPGAN**

Πρόσφατα αναγνωρίστηκε ότι η ιστική διαγλουταμινάση είναι το υπόστρώμα-αντιγόνο που αναγνωρίζεται από τα αντισώματα αντί-ενδομυσίου (EMA).

Μέθοδοι ανοσοπροσροφητικών ενζυμικών δοκιμασιών Elisa με ενσωματωμένο ως αντιγόνο την ιστική διαγλουταμινάση παρέχουν μια αξιόπιστη, αντικειμενική, εναλλακτική στις βασισμένες στον ανοσοφθορισμό παραδοσιακές μεθόδους όπως είναι η ανίχνευση των αντί-EMA αντισωμάτων σε υποστρώματα λεπτών τομών οισοφάγου, ειλεού, ομφάλιου λώρου, νεφρών, ήπατος και άλλων ιστών θηλαστικών (42). Η δοκιμασία Elisa μπορεί να προσαρμοστεί και σε μικρό και σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων των ασθενών ενώ η ευαισθησία και η ειδικότητα της για την ανίχνευση IgA αντισωμάτων είναι 92,7% και 91,6% ενώ για τον συνδυασμό ανίχνευσης IgG και IgA αντισωμάτων η ευαισθησία της μεθόδου αυξήθηκε στο 98,5%.

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3, η μέθοδος Elisa για την ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι στην ιστική διαγλουταμινάση χρησιμοποιεί τρία κυρίως είδη αντιγόνων: την διαγλουταμινάση ήπατος ινδικού χοιριδίου, την ανασυνδιασμένη ανθρώπινη διαγλουταμινάση που έχει κάποια πλεονεκτήματα σε σχέση με την διαγλουταμινάση ήπατος ινδικού χοιριδίου και την πρόσφατα απομονωμένη από ερυθρά αιμοσφαίρια ανθρώπινη διαγλουταμινάση, η οποία έχει το πλεονέκτημα της

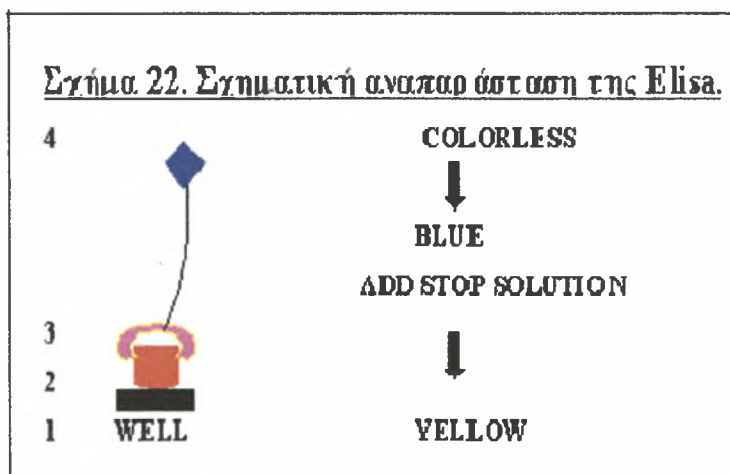
ευκολίας καθαρότητας και των αποτελεσμάτων που είναι ελεύθερα από προσμίξεις βακτηριακών παραγόντων, εντόμων ή άλλων μολυσματικών πρωτεϊνών. Οι μέθοδοι Elisa που χρησιμοποιούν ανθρώπινη ερυθροκυτταρική διαγλουταμινάση δίνουν πολύ πιο ακριβή αποτελέσματα από τις αντίστοιχες που χρησιμοποιούν την πιο παραδοσιακή διαγλουταμινάση ήπατος ινδικών χοιριδίων.

### **i. Elisa**

Οι Elisa's είναι γενικά μέθοδοι ενζυμικής δοκιμής ανοσοπροσρόφησης για ημιποσοτικό προσδιορισμό ειδικών αντισωμάτων (συνήθως) και στην συγκεκριμένη μελέτη αυτοαντισωμάτων IgA έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης σε δείγματα ορών. Τα αποτελέσματα της χρησιμοποιούνται στην διάγνωση και αυτοάνοσων νόσων με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα που στην περίπτωση της κοιλιοκάκης συγκρίνονται με την ευαισθησία, την ειδικότητα και την διαγνωστική αξία των IgA EMA, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση των ατόμων με υποψία κοιλιοκάκης που υποβάλλονται σε βιοψία εντέρου όταν οι άλλες δύο ανωτέρω τεχνικές δώσουν αποτελέσματα που μπορούν να αποκλείσουν περίπτωση κοιλιοκάκης και να βοηθήσουν με αυτό τον τρόπο αναίμακτα στην διάγνωση της.

Με Elisa μετράται, συνήθως, η συγκέντρωση αντισωμάτων οπότε η ακινητοποιημένη στη στερεά φάση συνδέουσα ουσία είναι αντιγόνο. Το αντίσωμα συνδέεται κατ' αρχήν με το αντιγόνο της στερεάς φάσης και στη συνέχεια, με το προστιθέμενο δεύτερο αντίσωμα, που είναι σημασμένο με κάποιο ένζυμο.

Τέλος, στο σύστημα προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου, το οποίο διασπάται παράγοντας ένα χρωστικό προϊόν. Η ένταση του χρώματος μετρείται φωτομετρικά και δίνει το μέτρο της συγκέντρωσης του αναλυόμενου αντισώματος (σχήμα 22) (58).



### **α. Τα ένζυμα και τα υποστρώματα της Elisa.**

Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται περισσότερο για την παρασκευή συζευγμάτων είναι η υπεροξειδάση (από μαύρο ρεπάνι), η αλκαλική φωσφατάση (από E.coli ή από έντερο μοσχαριού), η β-γαλακτοσιδάση (από E.coli) και η οξειδάση της γλυκόζης (από aspergillus niger) (58). Για τα ένζυμα αυτά υπάρχει μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων, τα οποία έχουν την ιδιότητα να δίνουν προϊόντα αντίδρασης διαλυτά και έγχρωμα, που επιτρέπουν ακριβείς μετρήσεις της απορρόφησης ακτινοβολίας σε ορισμένο μήκος κύματος (58). Ως υπόστρωμα της υπεροξειδάσης χρησιμοποιείται το υπεροξείδιο του υδρογόνου και ως χρωμογόνο η ο-φαινυλενοδιαμίνη (OPD), η ο-διανισιδίνη και 3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB). Ως υπόστρωμα της αλκαλικής φωσφατάσης χρησιμοποιείται κυρίως η φωσφορική π-νιτροφαινόλη (58).

### **β. Τα συζεύγματα της Elisa.**

Η σύζευξη των ενζύμων με το αντιγόνο ή αντίσωμα γίνεται με διάφορα διδύναμα ή πολυδύναμα αντιδραστήρια, από τα οποία τη μεγαλύτερη εφαρμογή έχουν η γλουταραλδεύδη και το υπεριοδικό νάτριο. Το σύζευγμα πρωτεΐνης ενζύμου για να χρησιμοποιηθεί στην Elisa πρέπει να διατηρεί, τόσο τις ανοσολογικές όσο και τις ενζυμικές του ιδιότητες (58).

#### **ii. Ανοσοφθορισμός.**

Ο Ανοσοφθορισμός (1940-1950, Coons et al) στηρίζεται σε αντίσωμα σεσημασμένο με φθοριόχρωμα για την ανίχνευση αντιγόνου ή αντισώματος.

#### **iii. Αρχή του ανοσοφθορισμού.**

Στηρίζεται στην ιδιότητα του φθοριοχρώματος να φθορίζει όταν διεγείρεται με ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος.

#### **iv. Φθορισμός.**

Πρόκειται για την εκπομπή ακτινοβολίας από τα διεγερμένα μόρια του φθοριοχρώματος.

Το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι μεγαλύτερο από το μήκος κύματος της απορροφούμενης. Συνήθη φθοριοχρώματα είναι : η ισοθειοκυανίνη φλουορεσκεΐνη (FITC), η ισοθειοκυανίνη τετραμεθυλροδαμίνη (PE) και η φυκοερυθρίνη.

Κυριότερα συστήματα ανίχνευσης του φθορισμού είναι το μικροσκόπιο φθορισμού και η κυτταρομετρία ροής. Τα κυριότερα είδη ανοσοφθορισμού είναι ο άμεσος ανοσοφθορισμός και ο έμμεσος ανοσοφθορισμός.

## ν. Έμμεσος ανοσοφθορισμός.

**Σχήμα 23. Σχηματική απεικόνιση του έμμεσου ανοσοφθορισμού.**



Οι εφαρμογές του έμμεσου ανοσοφθορισμού είναι στην ανίχνευση αντισωμάτων έναντι μικροβίων, ιών, παρασίτων και στην ανίχνευση στον ορό διάφορων αυτοαντισωμάτων. Ως συνδέτης (conjugate) χρησιμοποιείται είτε πολυδύναμος (IgG, IgA, IgM) αντιανθρώπινος ορός είτε μονοδύναμος (IgG ή IgA ή IgM) αντιανθρώπινος ορός.

### νι. Αντιγόνα που χρησιμοποιούνται στις τεχνικές για την ανίχνευση αντισωμάτων αντί-t TG.

#### α. Ανθρώπινη ιστική διαγλουταμινάση ερυθροκυττάρων (h-t TG)-

##### Διαγλουταμινάση ήπατος ινδικών χοιριδίων (gpl-t TG).

Η διαγλουταμινάση των ερυθροκυττάρων "καθαρίστηκε" με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, χρωματογραφία μοριακής διήθησης και συγγένειας.

Η ομογενοποίηση επιτεύχθηκε με ένα πρόσθετο βήμα HPLC χρωματογραφίας Μεγέθους-αποκλεισμού (33).

Το MB της κεκαθαρμένης ανθρώπινης διαγλουταμινάσης ερυθροκυττάρων υπολογίστηκε να είναι 65000 kDa από την χρωματογραφία μεγέθους- αποκλεισμού και με φυγοκέντριση και διαβαθμιση συγκέντρωσης σουκρόζης και 92.000 kDa με SDS-PAGE Αυτό υποδηλώνει τον υψηλό βαθμό ασυμμετρίας και αστάθειας του μορίου (33).

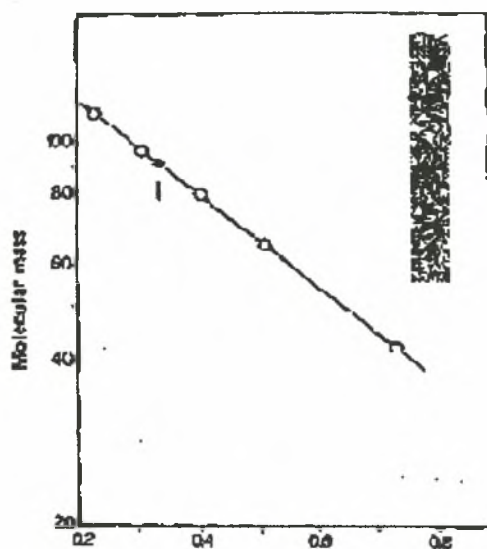
Η κάθαρση της τρανσγλουταμινάσης των ερυθροκυττάρων δίνει μια σταθερή μορφή, μαζί με μερικές νέες δομικές και καταλυτικές ιδιότητες του ενζύμου. Ακολουθεί ένας πίνακας που περιλαμβάνει την διαδικασία κάθαρσης της τρανσγλουταμινάσης των ερυθροκυττάρων σύμφωνα με τους Signorini M et al (33).

Step	Activity [U]	Protein [mg]	Specific activity [U/mg]	Recovery [%]	Purification n-fold
1. Lysate	16.8	140000	0.00012	100	1
2. DEAE cellulose chromatography	13.0	271	0.048	77	400
3. AcA 44 size exclusion	9.8	51	0.19	58	1580
4. Heparin-sepharose chromatography	7.5	5.4	1.4	45	11650
5. HPLC size exclusion <sup>a</sup>	4.3	1.7	2.5	25	21000

**Πίνακας 6.** Κάθαρση της τρανσγλουταμινάσης από τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα.

Το HPLC- κεκαθερμένο ένζυμο εμφανίζεται ομοιογενές με τα χρωματογραφικά κριτήρια (δήθηση πηκτωμάτων και χρωματογραφία σε υδροξυηπατίτη, DEAE κυτταρίνη και hexylamine-sepharose με το άλας εκλεκτικής προσρόφησης) και από την φυγοκέντρηση με διαβάθμιση σακχαρόζης.

Η τρανσγλουταμινάση του ήπατος και η τρανσγλουταμινάση των ερυθροκυττάρων έχουν μοριακή μάζα 65 (ατόφια πρωτεΐνη) και 92 kDa (κεκαθαυμένη πρωτεΐνη) με την έλλειψη και με την παρουσία του SDS, αντίστοιχα (Σχήμα 24).



**Σχήμα 24.** Προσδιορισμός Μοριακής μάζας με SDS PAGE.

Το κεκαθαρισμένο ένζυμο υποβλήθηκε στην ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων 8% πολυακρυλαμίδης μαζί με πρωτεΐνες δεικτών, E. COLI (γαλακτοσιδάση 3, φωσφορυλάση μυών, φωσφοφρουκτοκινάση μυών, λευκωματίνη ορών βοοειδών και ακτίνη). Ο αστερίσκος δείχνει τη μετανάστευση της τρανσγλουταμινάσης των ερυθροκυττάρων. Στο ένθετο παρουσιάζεται η φωτογραφία του ηλεκτροφορητικού σχεδίου του 10 Jig του καθαρού ενζύμου.

Μεγάλες διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των ενζύμων της ανθρώπινης διαγλουταμινάσης και της διαγλουταμινάσης του ήπατος ινδικού χοιριδίου στη πρωτοταγή τους δομή, η διαγλουταμινάση των ερυθροκυττάρων έχει μικρότερη περιεκτικότητα σε κυστεΐνη, μεθειονίνη, αργινίνη, τυροσίνη και σερίνη ενώ έχει αυξημένο αριθμό καταλοίπων γλυκίνης, ιστιδίνης και γλουταμικού οξέος (Πίνακας 7). Αυτό το μεγάλο ποσοστό των όξινων αμινοξέων προσδίδει ένα χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο για το ένζυμο PI 5,6.

Μεταξύ των αδιάλυτων πρωτεϊνών, που συλλέγονται από τη φυγοκέντριση προσδιορίσαμε με SDS-PAGE τα πεπτίδια MB ίδιου με αυτό της σπεκτρίνης και της ακτίνης, γεγονός που προτείνει ότι το κλάσμα είναι εμπλουτισμένο με κυτταροσκελετικά στοιχεία, οπότε η διαγλουταμινάση αλληλεπιδρά με τον κυτταροσκελετό.

Aspartic acid	89.6	83.2
Threonine	30.0	39.8
Serine	36.9	53.9
Glutamic acid	127.0	93.2
Proline	41.4	40.0
Glycine	81.2	60.1
Alanine	63.2	52.4
Half-cysteine	11.2	17.4
Valine	63.2	63.3
Methionine	6.7	15.7
Isoleucine	37.4	37.4
Leucine	85.9	79.1
Tyrosine	14.9	29.2
Phenylalanine	29.4	27.0
Lysine	25.0	34.4
Histidine	38.1	15.0
Arginine	35.8	46.4
Tryptophan	n.d. <sup>b</sup>	17.1

**Πίνακας 7.** Η σύσταση σε αμινοξέα της τρανσγλουταμινάσης των ερυθροκυττάρων και του Ήπατος. Η σύσταση σε αμινοξέα της τρανσγλουταμινάσης των ερυθροκυττάρων καθορίστηκε λεπτομερώς και παρουσιάζεται ως υπολείμματα ανά μοριακή μάζα 90 kDa, λόγω των αβεβαιοτήτων σχετικά με την ακριβή μοριακή μάζα του ενζύμου και για μια πιο στενή σύγκριση με το ένζυμο από ήπαρ ινδικού χοιριδίου.

#### **b. Ανθρώπινη ανασυνδιασμένη διαγλουταμινάση.**

Τα αυτοαντιγόνα που χρησιμοποιούνται στις τεχνικές Elisa για τον έλεγχο αυτοαντισωμάτων παρασκευάζονται και παρουσιάζουν δυσκολίες είτε στην απομόνωση τους από τους αντίστοιχους ιστούς είτε γιατί ανευρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες είτε λόγω απώλειας μέρους της αντιγονικότητάς τους κατά τη διαδικασία απομόνωσης. Όλα αυτά τα προβλήματα οδήγησαν στην παραγωγή ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών, η οποία παρουσιάζει και αυτή προβλήματα σχετικά με την αντιγονικότητα των μορίων, επειδή συχνά από τα ανασυνδιασμένα μόρια, απουσιάζουν σημαντικοί επίτοποι (58).

Το γονίδιο της h-t TG μπορεί να αναπτυχθεί από την βιοψία εντέρου ενός ασθενούς με κοιλιοκάκη χρησιμοποιώντας εκκινητές (primers) ειδικούς για την περιοχή κωδικοποίησης του γονιδίου.

Εν συντομία, το c DNA κλωνοποιείται σε έναν βακτηριακό φορέα έκφρασης και υφίσταται διαδικασία καθαρισμού υπό όρους μη-μετουσίωσης.

Η καθαρότητα της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης αξιολογείται από την ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων SDS (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide) (47).

## **7. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΙΣΤΙΚΗΣ**

### **ΔΙΑΓΛΟΥΤΑΜΙΝΑΣΗΣ.**

Εκτός από τις μεθόδους ανοσοπροσοφητικών ενζυμικών δοκιμασιών Elisa που αναφέραμε για την ανίχνευση αντισωμάτων IgG και IgA (κυρίως) έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης, ανοσοενζυμικές δοκιμασίες με μικροσωμάτια (microparticle enzyme immunoassay, MEIA), και η παραλλαγή της Elisa, η ημοποσοτική μέθοδος ανοσοαποτύπωσης (western blot ή dot blot) χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων έναντι της διαγλουταμινάσης (58).



## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## **8. ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.**

### **i. Οροί.**

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν οροί 47 ασθενών με διάφορα ηπατικά νοσήματα της Παθολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, του Ηπατολογικού Ιατρείου και του Ερευνητικού Εργαστηρίου Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε μονά ή διπλά δείγματα.

Οι ασθενείς είχαν ένα μέσο όρο ηλικίας 54,5 έτη με μια κλίμακα ηλικιών από 34 έως 75 έτη. Από αυτούς τους ασθενείς, έξι έπασχαν από HBV, τρεις από HCV, ένας από HBV και άλλη ασθένεια, ένας από AH (αυτοάνοση ηπατίτιδα), δύο από αλκοολική ηπατίτιδα, ένας από συνδυασμό αυτοάνοσης και αλκοολικής ηπατίτιδας (AH+NASH), και οι υπόλοιποι ήταν αδιάγνωστοι (άλλη ασθένεια που δημιουργεί πρόβλημα στο ήπαρ).

Οι οροί είχαν ελεγχθεί για κοιλιοκάκη και δεν είχαν χαρακτηριστεί ως θετικοί στην κοιλιοκάκη, για παρουσία τρανσαμινασών και ολικών ανοσοσφαιρινών και παρουσίαζαν υψηλές τιμές τρανσαμινασών και γ-σφαιρινών, για παρουσία αντισωμάτων έναντι της ανθρώπινης ιστικής διαγλυταμινάσης και έναντι του ενδομυσίου και παρουσίαζαν αντισώματα IgA έναντι της ht TG >26 units (cut off Elisa inova: 20 units) και απουσία εμφάνισης αντισωμάτων αντί- ενδομυσίου (EMA).

### **ii. Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων.**

Οι οροί που χρησιμοποιήθηκαν, φυλάσσονταν σε αρχείο ορών ασθενών με ηπατικές νόσους στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , σε aliquots των 500μl αναλόγως με την διαθέσιμη ποσότητα τους.

Οι οροί αυτοί αποψύχθηκαν στους  $37^{\circ}\text{C}$  λίγο πριν την χρησιμοποίησή τους, γιατί η θερμοκρασία επηρεάζει την περιεκτικότητα των ορών σε αντισώματα (πτώση τίτλου αντισωμάτων), όπως και διάφορες άλλες φυσικοχημικές παραμέτρους της σύστασης τους, με αρνητικές επιδράσεις στις αντιδράσεις των ορών με τα αντιδραστήρια των χρησιμοποιούμενων τεχνικών και τελικά στην ακρίβεια των αποτελεσμάτων.

### **iii. Μέθοδοι.**

#### **a. Elisa αντί-ανθρώπινης ιστικής διαγλυταμινάσης.**

Χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση αντισωμάτων IgA αντί- h t TG δύο εμπορικές Elisa. Η ELISA της INOVA (QUANTA Lite, INOVA Diagnostics, Inc, San Diego, California, USA) που χρησιμοποιεί σαν αντιγονικό υπόστρωμα ανθρώπινη κεκαθαυμένη

ιστική διαγλουταμινάση από ερυθροκύτταρα και ELISA HYCOR, USA (Autostat<sup>TM</sup> II Elisa anti-human recombinant t TG) που χρησιμοποιεί σαν αντιγονικό υπόστρωμα ανθρώπινη ανασυνδιασμένη διαγλουταμινάση. Οι τεχνικές πραγματοποιήθηκαν σε αυτόματους αναλυτές DSX (ELISA analyser DSX, labtechnics, Thermolab System, Virginia, USA), και HYTEC αντίστοιχα.

#### **b. Έμμεσος ανοσοφθορισμός για τον προσδιορισμό αντισωμάτων IgA EMA.**

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός για τον προσδιορισμό αντισωμάτων IgA EMA πραγματοποιήθηκε σε εμπορικά πλακίδια επιστρωμένα με δύο υποστρώματα, οισοφάγου πιθήκου και ομφάλιου λώρου εμβρύου ανθρώπου, και επειδή το αυτοαντιγόνο-στόχος των αντισωμάτων αντί-ενδομυσίου που ταυτοποιήθηκε πρόσφατα είναι η ιστική διαγλουταμινάση χρησιμοποιήθηκε και η εμπορική elisa (INOVA Diagnostics, Inc) ενώ η μικροσκοπία έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού Axioskop Zeiss Germany, HBO 50/AC.

#### **iv. ELISA QUANTA<sup>TM</sup> LITE INOVA, human erythrocyte-t TG.**

##### **a. Αρχή της διαδικασίας.**

Το κεκαθαρμένο φυσικό ανθρώπινο αντιγόνο h- t TG απομονωμένο από τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι συνδεδεμένο στα πηγαδάκια της μικροπλάκας από πολυστυρένιο υπό συνθήκες όπου διατηρούνται οι φυσικοχημικές του ιδιότητες.

Οι υπό έλεγχο οροί δουλεύτηκαν σε δύο αραιώσεις 1/100 και 1/200 το σημείο που χάνουν την θετικότητά τους. Κάθε ορός δουλεύτηκε διπλά.

Προαραιωμένοι πρότυποι οροί ελέγχου (Controls) και αραιωμένα δείγματα ασθενών προσθέτονται στα πηγαδάκια επιτρέποντας στα h- t TG IgA αντισώματα να συνδεθούν με το ακινητοποιημένο αντιγόνο. Στα φρεάτια μιας μικροπλάκας πολυστυρενίου 96 οπών, προστέθηκαν 100μl προαραιωμένων μαρτύρων του κίτ της Elisa, δύο αρνητικοί (NC), τέσσερις θετικοί, δύο χαμηλά θετικοί (LC) και δύο υψηλά θετικοί (HC) μάρτυρες και 100μl αραιωμένων ορών, ώστε τα αντισώματα έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης να δεσμευτούν στο ακινητοποιημένο αντιγόνο με επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 διαδοχικά πλυσίματα της πλάκας με προσθήκη 200 μl διαλύματος πλύσεων, προσθήκη 100 μl δεύτερου αντί-ανθρώπινου αντισώματος IgA συζευγμένου με ένζυμο υπεροξειδάσης ραπανιού (HRP) και επώαση για 30 λεπτά.

Επανάληψη της διαδικασίας πλύσεως και προσθήκη 100 µl υποστρώματος TMB για την υπεροξειδάση, που οδηγεί σε αλλαγή του χρώματος μετά από επώαση σε σκοτεινό μέρος για 30 λεπτά. Τελική προσθήκη 100 µl διαλύματος διακοπής θειικού οξέος.

Αυτή η διαδικασία έγινε χειρονακτικά και η μικροπλάκα της Elisa φωτομετρήθηκε στον DSX, σε μήκος κύματος 450-620 nm. Η παρουσία ή η απουσία των αντισωμάτων έναντι στην ιστική διαγλουταμινάση τεκμηριώνεται με την σύγκριση της οπτικής πυκνότητας (OD) των ορών με την οπτική πυκνότητα των πρότυπων διαλυμάτων προκειμένου να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη (calibration curve) της οπτικής πυκνότητας (OD) προς την συγκέντρωση αντισώματος (u/ml).

#### **b. Αντιδραστήρια.**

Περιλαμβάνονται έτοιμα στο κίτ της Elisa τα περισσότερα προαραιωμένα εκτός του διαλύματος πλύσης 1:40 25 ml που διαλύεται σε 975 ml d H<sub>2</sub>O.

Πριν την χρήση τους αφήνονται εκτός ψυγείου να λάβουν θερμοκρασία δωματίου και ανακινούνται πολύ καλά.

#### **c. Αντιδραστήρια και εξοπλισμός που δεν συμπεριλαμβάνονται στο kit.**

1. Μικροπιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου 5,100, 200-300 και 500 µl.
2. 8κάναλη πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου.
3. Σωληνάρια RIA των 4 ml για τις αραιώσεις των δειγμάτων.
4. Ογκομετρικός κύλινδρος ενός λίτρου για την αραιώση του διαλύματος πλύσεων.
5. Απεσταγμένο νερό.
6. Φωτόμετρο με δυνατότητα φίλτρου στα 450 και 620 nm.

#### **v. Autostat™ II anti-human recombinant - t TG ELISA, HYCOR-HYTEC.**

Οι οροί αραιώθηκαν μόνο σε αραιώση 1/100. Οι μάρτυρες και τα αντιδραστήρια περιέχονταν στο κίτ της Elisa, HYCOR-HYTEC. Η μέθοδος είναι πλήρως αυτοματοποιημένη σε αντίθεση με την Elisa INOVA αν και η αρχή της τεχνικής είναι ίδια με αυτή που περιγράψαμε για την Elisa INOVA.

#### **v. Πειράματα αναστολής.**

Για να αξιολογηθεί η ειδικότητα των δοκιμασιών ανίχνευσης των αντισωμάτων έναντι της ιστικής διαγλουταμινάσης που χρησιμοποιήθηκαν, πραγματοποιήθηκαν πειράματα αναστολής στους ορούς των ασθενών με ηπατικά νοσήματα, με τους κωδικούς 453, 183bio και 219bio.

Αυτοί οι οροί ήταν θετικοί στην Elisa με κεκαθαρισμένο ανθρώπινο αντιγόνο διαγλουταμινάσης ερυθροκυττάρων, με αντιγόνο ανασυνδιασμένης διαγλουταμινάσης ενώ με EMA ανοσοφθορισμό ήταν θετικοί ή μη στην παρουσία αυτών των αντισωμάτων.

Επίσης ένας ορός ασθενούς με κοιλιοκάκη με τα ίδια χαρακτηριστικά

(Αντί- h-t TG +/- EMA +/-) χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αναστολής ως μάρτυρας γιατί ήταν πολύ πιθανόν να δούμε αναστολή σε αυτόν.

Οι συνθήκες των πειραμάτων αναστολής είναι οι εξής:

Οι οροί προαραιωμένοι σε αραιώσεις 1/100 ή 1/200 προεπεώστηκαν με διαλυτό αντιγόνο σε συγκέντρωση 100, 200 και 400  $\mu\text{g/ml}$ , σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες ή ολονύκτια στο ψυγείο. Εν συνεχεία στα δείγματα αυτά ελέγχθηκε η παρουσία ή όχι αντισωμάτων IgA αντί- h-t TG, όπως περιγράφηκε στην τεχνική Elisa INOVA.

Ως αντιγόνα για τις επεώσεις των ορών σύμφωνα με το πρωτόκολλο των πειραμάτων αναστολής χρησιμοποιήθηκαν διαγλουταμινάση ινδικού χοιριδίου (sigma 0.8mg), αλβουμίνη Βοός (sigma 0.8 mg), και ακτίνη (sigma 1mg).

Τα αντιγόνα που ήταν σε λυοφιλοποιημένη μορφή διαλυτοποιήθηκαν σε 200  $\mu\text{l}$  και 160 $\mu\text{l}$  απεσταγμένο νερό για να φτάσουν την τελική επιθυμητή συγκέντρωση των 5mg/ml. Στους πίνακες 7, 8, 9 φαίνεται το περιεχόμενο των αντιγόνων της sigma.

<i>BSA 0,8 mg</i>
<i>Λυοφ/ποιημένο</i>
<i>Περιεχόμενο ~80% πρωτεΐνη</i>
<i>Ισορροπία σε tris +</i>
<i>διθειοερυθρίτολη</i>

**Πίνακας 7.** Αντιγόνο αλβουμίνης βοός.

<i>Ακτίνη από μύ βοός 1 mg</i>
<i>Λυοφ/ποιημένο</i>
<i>Περιεχόμενο ~90% πρωτεΐνη</i>
<i>Ισορροπία σε tris , ATP, <math>\text{CaCl}_2</math></i>

**Πίνακας 8.** Αντιγόνο ακτίνης.

*1 TG 0,8 mg από ήπαρ Ινδικού χοιριδίου*  
Λυοφ/ποιημενό  
Περιεχόμενο ~80% πρωτεΐνη  
Ισορροπία σε tris + διθειοερυθριτόλη

**Πίνακας 9.** Αντιγόνο διαγλουταμινάσης ήπατος ινδικού χοιριδίου.

**vii. Προσδιορισμός EMA με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε υπόστρωμα οισοφάγου πιθήκου.**

Ο προσδιορισμός αντισωμάτων αντί-ενδομυσίου με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε εμπορικά πλακίδια με υπόστρωμα οισοφάγου πιθήκου έχει βρεθεί ότι έχει 100% ακρίβεια στην διάγνωση της κοιλιοκάκης.

Το ενδομύιο είναι ο υποστηρικτικός ιστός που περιβάλλει το συνδυασμό λειών και γραμμωτών μυικών ινών που βρίσκονται στο μέσο τριτημόριο του οισοφάγου (11). Αντιγόνα ενδομυσίου βρίσκονται στον οισοφάγο του ανθρώπου, του πιθήκου, του αρουραίου και σε πολλά άλλα είδη καθώς επίσης στο στομάχι, την νήστιδα και τον ομφάλιο λώρο. Όπως ήδη αναφέραμε, αυτοαντιγόνο-στόχος του που ταυτοποιήθηκε πρόσφατα είναι η διαγλουταμινάση (11).

Οι πλάκες με το υπόστρωμα πρέπει να έχουν αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου αρκετή ώρα πριν την έναρξη της δοκιμασίας.

Όλοι οι οροί αραιώθηκαν σε αραιώση 1/10. Μεταφορά των ορών και των μαρτύρων θετικών ή αρνητικών στις οπές των πλακών και επώαση των ορών με το υπόστρωμα σε σκοτεινό και υγρό περιβάλλον για 30 λεπτά. Ξέπλυμα για 5 λεπτά με PBS.

Προσθήκη του φθορίζοντος σύζευγματος αντί-ανθρώπινης IgA σε κάθε θέση του πλακιδίου. Επώαση για 30 λεπτά και λήξη της δοκιμασίας με πλύσιμο, στέγνωμα των πλακών, προσθήκη μίας σταγόνας λαδιού (mounting medium), προσθήκη καλυπτρίδας και μικροσκόπηση σε μικροσκόπιο φθορισμού, Axioskop Zeiss Germany, HBO 50/AC.

### viii. Προσδιορισμός EMA με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε υπόστρωμα ανθρώπινου ομφάλιου λώρου.

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση IgA αντισωμάτων αντί-ενδομυσίου σε υπόστρωμα οισοφάγου πιθήκου παραμένει η μέθοδος και το υπόστρωμα εκλογής (11) αλλά το υψηλό κόστος και τα ηθικά διλήμματα που σχετίζονται με τα υπό εξαφάνιση είδη οδήγησαν και στην χρήση του ομφάλιου λώρου εμβρύου ανθρώπου

(ηλικίας 40 εβδομάδων) ως υποστρώματος για την ανίχνευση αντισωμάτων αντί-ενδομυσίου (51). Όλοι οι οροί αραιώθηκαν σε αραιώση 1/5 και εξετάστηκαν για την παρουσία IgA αντισωμάτων αντί-ενδομυσίου χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ανθρώπινο ομφάλιο λώρο. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε περιγράφηκε ανωτέρω.

Η ειδικότητα της ανίχνευσης των αντισωμάτων αντί-ενδομυσίου με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε εμπορικά πλακάκια υποστρώματος ανθρώπινου ομφάλιου λώρου HUC-ab, για την διάγνωση της κοιλιοκάκης ήταν 100% αλλά η ευαισθησία δεν ήταν τόσο υψηλή.

### 9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

Στον πίνακα 10, εμπεριέχονται τα αποτελέσματα μέτρησης των ορών με τις δύο διαφορετικές ELISA του εμπορίου που χρησιμοποιήθηκαν, για όλες τις αραιώσεις αλλά και τα αποτελέσματα παλαιότερης μέτρησης των ορών με ELISA.

Επίσης τα αποτελέσματα της μέτρησης των IgA EMA με έμμεσο ανοσοφθορισμό στα δύο υποστρώματα. Στα γραφήματα 1,2,3,4,5 εμπεριέχονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων αναστολής που έγιναν στον ορό του ασθενούς με κοιλιοκάκη που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας, γιατί εμφανίζει αναστολή και στους ορούς των ηπατοπαθών με κωδικούς 453, 183bio και 219bio.

Επίσης στα σχήματα 25, 26, 27, 28, 29, 30 φαίνονται τα αποτελέσματα με έμμεσο ανοσοφθορισμό για EMA και αναστολή.

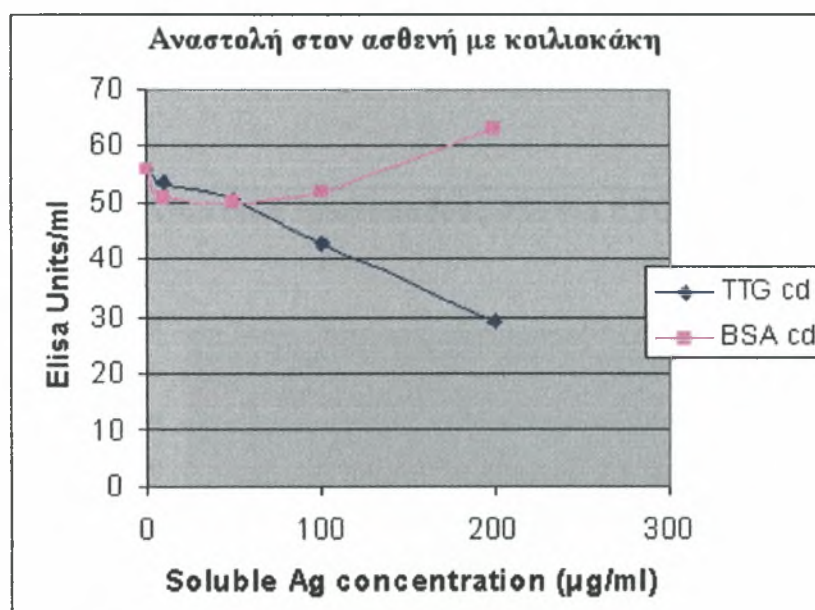
code	HtTG 1/100 INOVA-DSX Παλαιότερη μέτρηση	HtTG 1/100 INOVA- DSX	HtTG 1/200 INOVA- DSX	HtTG 1/100 HYCOR	Ανοσοφ/ρισμός αντί-ΕΜΑ ab σε οισοφάγο πιθήκου	Ανοσ/σμός αντί-ΕΜΑ ab σε ανθρώπινο ομφάλιο λώρο	Νόσος
835	93,51	over	over	10,11 POS	Emalike	Emalike	Alcoholic
803	37,79	47,574 POS	30,486 POS	2,47 NEG	Emalike	Emalike	HBV
238	31,73	18,959 NEG	14,981 NEG	Έλλειψη Δείγματος	Emalike	Emalike	HBV
303	30,05	44,662 POS	26,409 POS	2,33 NEG	Emalike	Emalike	?
342	61,51	82,318 POS	49,706 POS	Έλλειψη Δείγματος	Αρνητικό	Emalike	HBV+ OTHER
511	26,16	32,711 POS	21,714 POS	Έλλειψη Δείγματος	Emalike	Emalike	HBV
432	54,12	63,347 POS	38,578 POS	Έλλειψη Δείγματος	Emalike	Emalike	HBV+ HCV
453	65,57	80,141 POS	52,306 POS	12,22 POS	Emalike!!	Emalike	HBV
455	29,99	27,443 POS	15,132 NEG	Έλλειψη Δείγματος	Αρνητικό	Emalike	HCV
510	35,38	21,152 POS	37,700 POS	Έλλειψη Δείγματος	Αρνητικό	Emalike	OTHER
512	35,14	20,470 POS	61,961 POS	Έλλειψη Δείγματος	Αρνητικό	Emalike	HCV
755	44,64	31,426 POS	67,533 POS	19,66 POS	Emalike	Emalike	HCV
766	46,02	36,484 POS	63,863 POS	7,90 POS	Emalike	Emalike	Alcoholic
341	43,59	49,687 POS	37,325 POS	Έλλειψη Δείγματος	Emalike Weak	Emalike	?
341 bio	Όχι μέτρηση	99,010 POS	59,700 POS	5,80 NEG	Emalike	Emalike	?
453 bio	Όχι μέτρηση	58,615 POS	38,089 POS	5,32 NEG	Emalike	Emalike	HBV
510 bio	Όχι μέτρηση	35,366 POS	23,768 POS	0,70 NEG	Αρνητικό	Emalike	OTHER
511 bio	Όχι μέτρηση	22,160 POS	14,996 NEG	3,07 NEG	Emalike	Emalike	HBV
183 bio	29,66	32,475 POS	25,118 POS	13,61 POS	Emalike	Emalike	AH+ NASH
109 bio	20,45	20,522 POS	13,349 NEG	4,42 NEG	Emalike	Emalike	AH
284 bio	Όχι μέτρηση	9,457 NEG	7,528 NEG	1,41 NEG	Emalike	Emalike	HBV
219 bio	12,13	37,012 POS	21,472 POS	219 bio	Emalike!!	Emalike	HBV

**Πίνακας 10.** Αποτελέσματα ELISA και ανοσοφθορισμού.

1<sup>η</sup> στήλη οι κωδικοί των ορών, 2<sup>η</sup> στήλη αποτελέσματα παλαιότερης μέτρησης των ορών 1/100 με ELISA της INOVA, στην 3<sup>η</sup> και η 4<sup>η</sup> στήλη πρόσφατες μετρήσεις των ορών (1/100, 1/200) με ELISA της INOVA. Στην 5<sup>η</sup> στήλη οι μετρήσεις των ορών (1/100), με ELISA της HYCOR. Στην 6<sup>η</sup> στήλη τα αποτελέσματα του έμμεσου ανοσοφθορισμού σε υπόστρωμα οισοφάγου πιθήκου, στην 7<sup>η</sup> σε υπόστρωμα ομφάλιου λώρου εμβρύου ανθρώπου. Στην 8<sup>η</sup> στήλη αναφέρεται η νόσος κάθε ασθενούς.

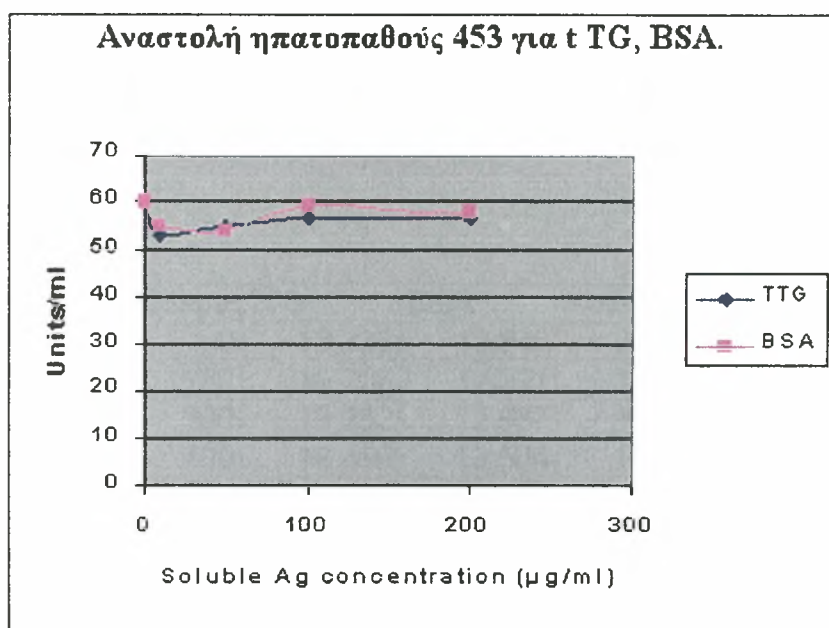


CD patient	OD	Units			
0 TG	1.143	56	0 BSA	1.143	56
10	0,949	53,57	10	0,908	51
50	0,89	50,31	50	0,884	50
100	0,79	44,68	100	0,996	52
200	0,54	29	200	1.286	63

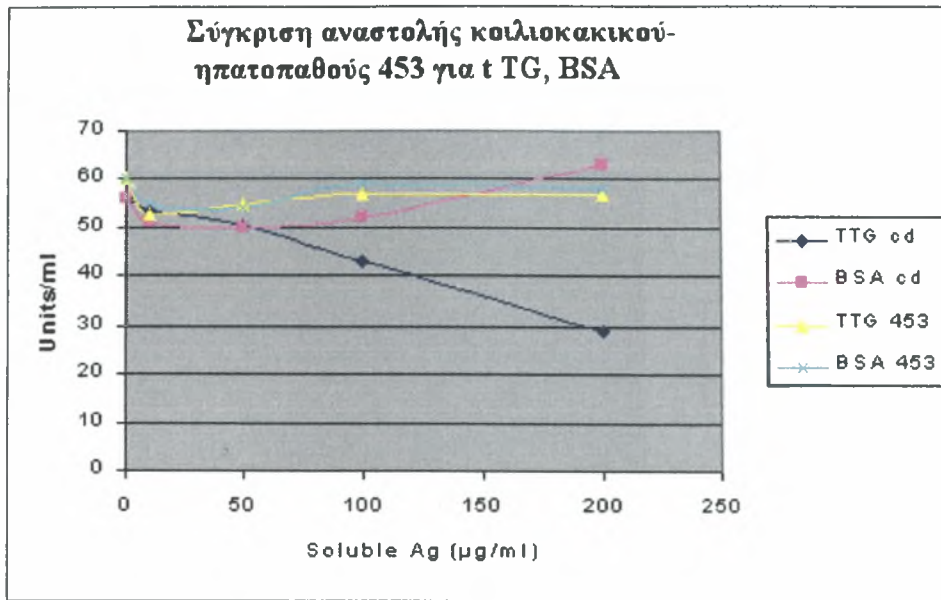


**Γράφημα 1.** Η αναστόλη του ορού του ασθενούς με κοιλιοκάκη για τα Ag t TG, BSA.

453 HEP PATIENT		
Ag Conce	TTG	BSA
0	60	60
10	53	55
50	55	54
100	57	59
200	57	58

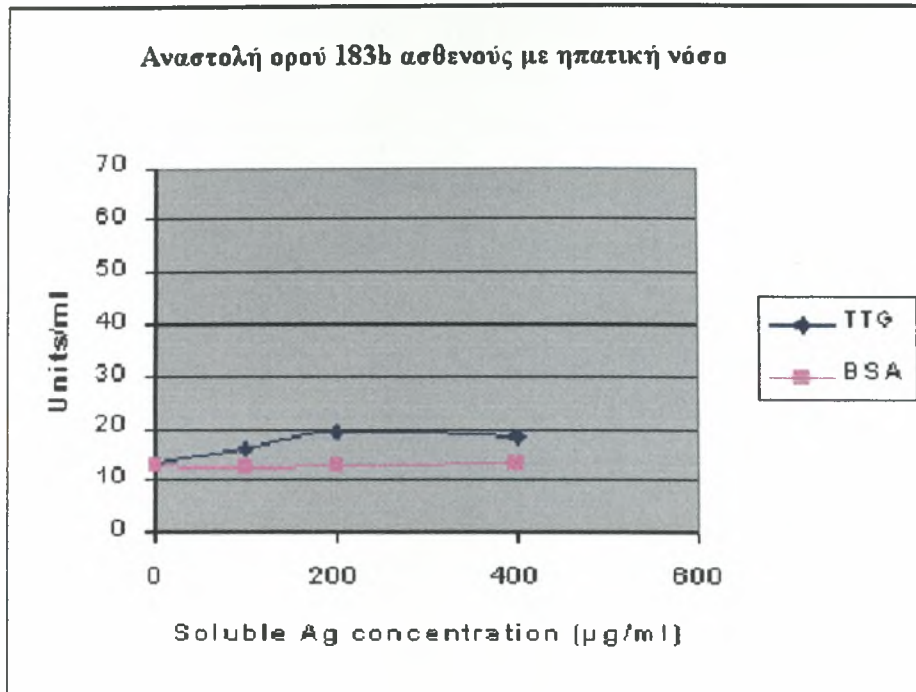


**Γράφημα 2.** Αναστολή ορού 453 ηπατοπαθούς για τα αντιγόνα t TG, BSA.



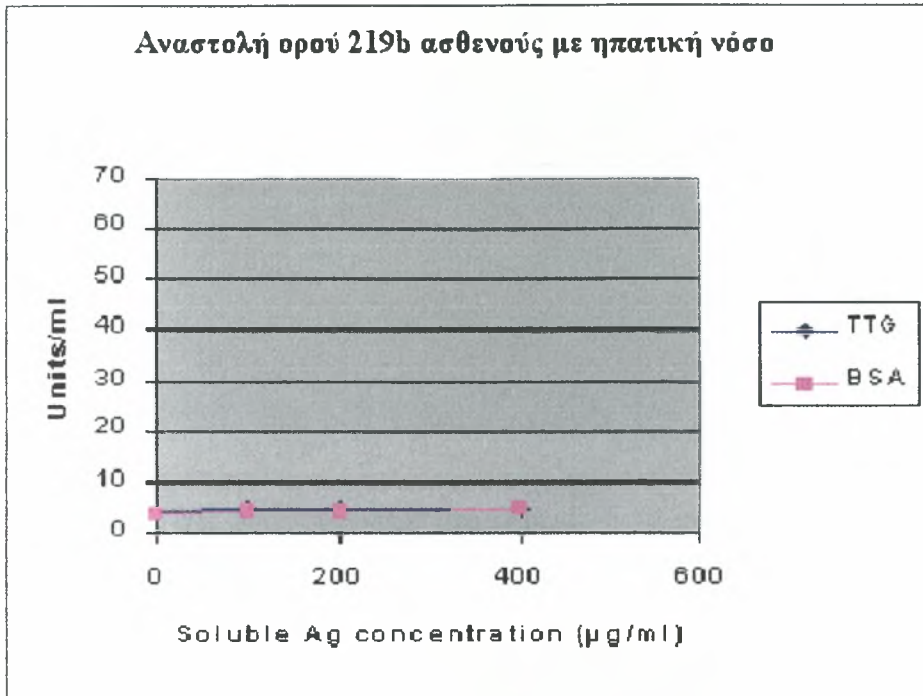
**Γράφημα 3.** Σύγκριση αναστολής ορού κοιλιοκακικού και του ορού 453 για τα αντιγόνα t TG, BSA.

Ag Concet	TTG	BSA	Actine
0	13,333	12,946	21,977
100	16,206	12,321	14,232
200	19,292	12,987	16,341
400	18,456	13,504	16,582



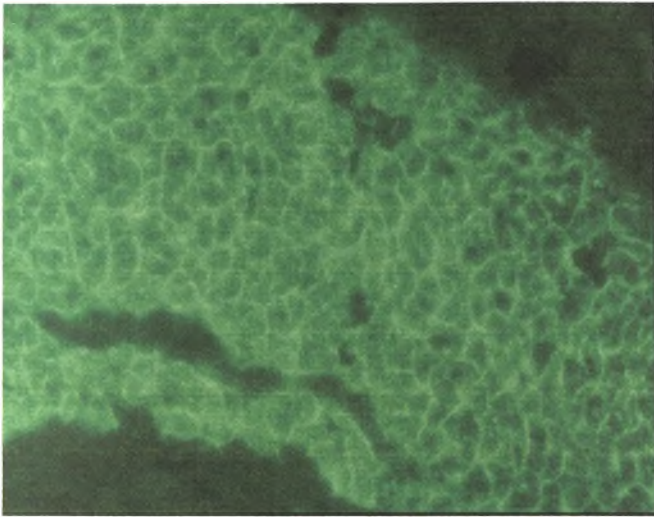
**Γράφημα 4.** Αναστολή ορού 183b ηπατοπαθούς για τα αντιγόνα t TG, BSA.

219b HEP PATIENT			
Ag Conce	TTG	BSA	actine
0	4,222	4,001	4,689
100	5,12	4,478	5,182
200	4,778	4,644	5,08
400	4,848	4,851	5,42

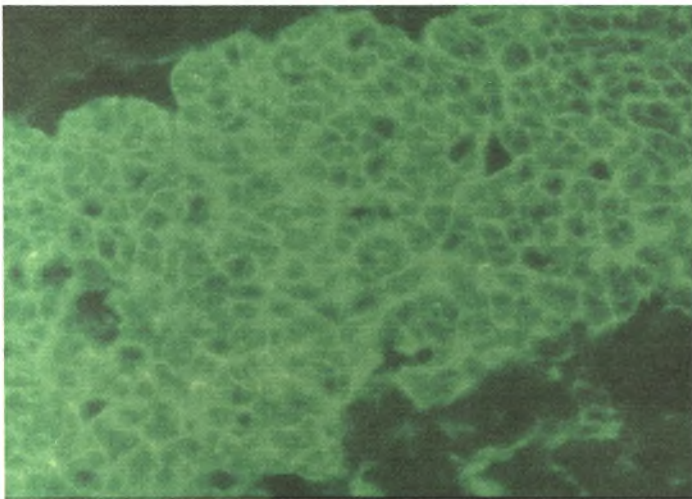


**Γράφημα 5.** Αναστολή ορού 219b ηπατοπαθούς για τα αντιγόνα t TG, BSA.

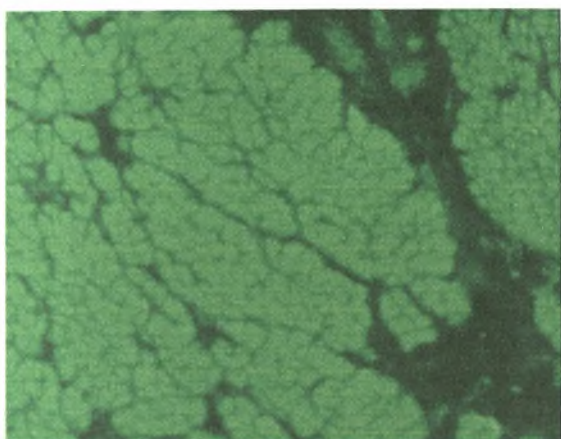
Στις εικόνες που ακολουθούν φαίνονται τα πρότυπα EMA+, EMAlike της ανίχνευσης αντισωμάτων αντί-ενδομυίου (EMA) με έμμεσο ανοσοφθορισμό.



**Σχήμα 25.** EMA+ πρότυπο ανοσοφθορισμού.  
Οι μυικές ίνες φθορίζουν στην περιφέρεια.



**Σχήμα26.** EMA+ πρότυπο ανοσοφθορισμού.

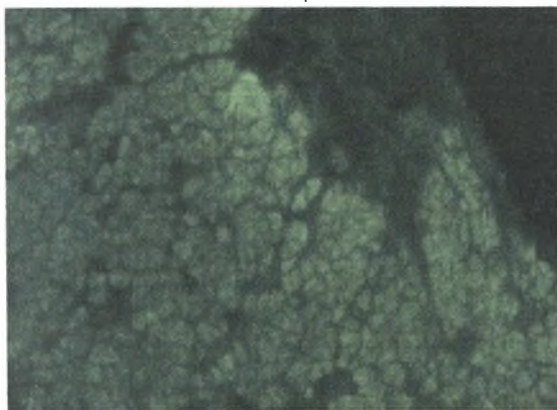


**Σχήμα 27.** EMAlike πρότυπο ανοσοφθορισμού.

Οι μυικές ίνες φθορίζουν στο κέντρο αντίθετα από ότι στο EMA+ πρότυπο.

Στα σχήματα 28, 29 που ακολουθούν φαίνεται η εικόνα που βλέπουμε στο μικροσκόπιο με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού για τον ορό του ασθενούς με κοιλιοκάκη που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας στα πειράματα αναστολής. Μπορούμε να δούμε πως φαίνεται η αναστολή στην πρώτη εικόνα που αντιστοιχεί στον ορό του ασθενούς με κοιλιοκάκη που επώαστηκε με αντιγόνο την ιστική διαγλουταμινάση t TG και όπως φαίνεται έδωσε εικόνα αναστολής.

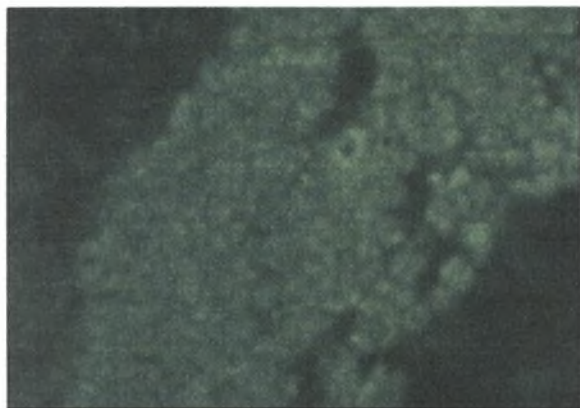
t TG Αναστολή



**Σχήμα 28.** Παρουσία αναστολής στον ορό του ασθενούς με κοιλιοκάκη που επώαστηκε με αντιγόνο t TG στα πειράματα αναστολής.

**Σχήμα 29.** Εικόνα πειραμάτων αναστολής στον ορό του ασθενούς με κοιλιοκάκη.  
Δεν υπάρχει αναστολή.

Control- Ασθενής με κοιλιοκάκη.



**Σχήμα 30.** Εικόνα που έδωσε ο ορός που επώαστηκε με ακτίνη σύμφωνα με την αρχή των πειραμάτων αναστολής. Φυσικά δεν υπάρχει αναστολή αλλά και η διασύνδεση του ορού με την ακτίνη είναι πολύ ασθενής.

Αναστολή με ακτίνη





## 10. Αξιολόγηση αποτελεσμάτων.

Ο τύπος που μετατρέπει τις τιμές OD σε u/ml στις ELISA είναι: O.A. δείγματος/ O.A.

h-t TG ορού ελέγχου x h-t TG ορού ελέγχου (μονάδες).

Εξετάστηκε η παρουσία αντί-t TG αντισωμάτων και η παρουσία αντισωμάτων IgA αντί-ενδομυσίου (EMA) έναντι του αντιγόνου t TG, σε ορούς ασθενών σε διάφορες ηπατικές νόσους( HBV, HCV, Alcoholic, AH, AH+NASH, αδιάγνωστους).

Στην elisa Inova, με αντιγόνο ανθρώπινη ερυθροκυτταρική διαγλουταμινάση και cut off >20 units/ml, όλοι -πλην δύο- οι οροί ήταν θετικοί για αντί- t TG αντισώματα.

Η δεύτερη αραιώση 1/200 των ορών πραγματοποιήθηκε για την μείωση της παρεμβολής άλλων πρωτεϊνών που πιθανόν περιέχονταν στους ορούς και που θα μπορούσαν να διασυνδεθούν μη ειδικά με τα αντισώματα.

Η τεχνική της elisa Inova έγινε χειροκίνητα οπότε υπεισέρχονται παράγοντες σφάλματος όπως είναι η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα του πιπτεταρίσματος των ορών (αραιώσεις, προσθήκη αντιδραστηρίων, πλύσεις, μεταφορά ορών στην πλάκα της elisa).

Ανεπαρκές πλύσιμο της μικροπλάκας ή αναποτελεσματική απομάκρυνση των διαλυμάτων από την πλάκα μπορεί να επηρεάσει την ακρίβεια της μεθόδου.

Άλλοι παράγοντες όπως: η θερμοκρασία του χώρου και των αντιδραστηρίων, οι χρόνοι επώασης, η ποιότητα του φωτόμετρου μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση της μεθόδου.

Στην elisa hycor που χρησιμοποιεί ανθρώπινη ανασυνδιασμένη διαγλουταμινάση ως αντιγόνο και με cut off 7 units/ml, 5 οροί ήταν θετικοί και 7 αρνητικοί για αντισώματα αντί- t TG και παρατηρήθηκε μια μείωση των θετικών αποτελεσμάτων με την χρήση της ανασυνδιασμένης διαγλουταμινάσης. Η αυτοματοποιημένη τεχνική της elisa hycor μείωσε τα σφάλματα από τον χειριστή. Η elisa hycor είχε ευαισθησία 97,1% και ειδικότητα 100%, ενώ η elisa Inova είχε ευαισθησία 92,7% και ειδικότητα 91,6%.

Η ανθρώπινη ερυθροκυτταρική κεκαθαρμένη διαγλουταμινάση ως αντιγόνο για την ανίχνευση των αντί- t TG αντισωμάτων (elisa, Inova) δίνει λιγότερα ψευδώς θετικά αποτελέσματα (58) ενώ η ανθρώπινη ανασυνδιασμένη διαγλουταμινάση ως αντιγόνο μειώνει τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα (51) αλλά αυξάνει τα ψευδώς αρνητικά (58), εξαιτίας της απώλειας ή της τροποποίησης επιτόπων κατά την παρασκευή της, που οδηγεί στην μη ειδική ή στην απώλεια σύνδεσης με τα αντισώματα (10).

Και η διαδικασία καθαρισμού των αντιγόνων μπορεί να μεταβάλει τους επιτόπους και να ευθύνεται για την εμφάνιση ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων στην ανίχνευση αντισωμάτων. Οι τιμές αντί- h- t TG που προκύπτουν από την χρήση εμπορικών ELISA διαφορετικών κατασκευαστών δεν είναι συγκρίσιμες.

Γενικά η διαγλουταμινάση είναι ένα πολύ ευαίσθητο ένζυμο και η τριτοταγής του διαμόρφωση είναι ευμετάβλητη υπό την επιρροή κάποιων παραγόντων όπως των ιόντων ασβεστίου (21). Γι αυτό η παρουσία ιόντων ασβεστίου στα διαλύματα ή στα αντιδραστήρια μας συμβάλουν στην απόκρυψη επιτόπων ή στη δημιουργία νεοεπιτόπων στο μόριο της διαγλουταμινάσης (58), με αποτέλεσμα διαφοροποιήσεις στα αποτελέσματα.

Για την διάγνωση της κοιλιοκάκης η δοκιμασία IgA anti-EMA IIF, έχει ευαισθησία 85-98% και ειδικότητα 97-100% (16). Σε υπόστρωμα οισοφάγου πιθήκου, 5 οροί ήταν αρνητικοί για αντισώματα IgA αντί-EMA και 17 οροί δεν ήταν θετικοί αλλά παρουσίαζαν το πρότυπο EMA like.

Ο τύπος φθορισμού των EMA δείχνει εικόνα μελισσοκηρύθρας γύρω από λείες μυικές ίνες δηλαδή δίκτυο ινών που περιβάλλουν τα κύτταρα των λείων μυικών ινών, σε υπόστρωμα οισοφάγου πιθήκου.

Στο υπόστρωμα ομφάλιου λώρου, και όλοι οι οροί εμφάνισαν το πρότυπο φθορισμού EMA like. Σε αυτό το υπόστρωμα ο φθορισμός των EMA είναι στα αγγεία, η ένταση είναι ασθενέστερη και το πρότυπο του φθορισμού είναι δύσκολο να εκτιμηθεί (11).

Στους κοιλιοκακικούς ασθενείς η ειδικότητα αυτού του υποστρώματος για τον προσδιορισμό των αντισωμάτων αντί-EMA είναι σχεδόν 100% αλλά υστερεί στην ευαισθησία (50). Το μοντέλο endomysium like (EMAlike) σε υπόστρωμα οισοφάγου πιθήκου είναι αντίστροφο από το EMA πρότυπο.

Συγκεκριμένα το κέντρο των ινών φθορίζει ενώ οι ίνες ενδομυσίου είναι αρνητικές δηλαδή το κέντρο φθορίζει ενώ η περιφέρεια δεν φθορίζει (7).

Παρατηρήθηκε μια μικρή ασυμφωνία -σε 5 ορούς-μεταξύ των αποτελεσμάτων για IgA αντί- EMA t TG IIF στα δύο διαφορετικά υποστρώματα αλλά στην πλειοψηφία υπερίσχυσαν τα αποτελέσματα με πρότυπο EMAlike που είναι πολύ συχνό στους ηπατοπαθείς. Αυτή η δοκιμασία εμπεριέχει υποκειμενισμό εξαιτίας της έλλειψης αυτοματοποίησης όσο και στην μικροσκόπηση, όποτε υπεισέρχεται πιθανότητα

σφάλματος από τον χειριστή. Προσοχή χρειάζεται ειδικότερα και στον χειρισμό των υποστρωμάτων για να μην καταστραφούν, κυρίως κατά τα στάδια των πλυσιμάτων.

Όσον αφορά τα πειράματα αναστολής μόνο ο ορός του ασθενούς με κοιλιοκάκη που επώαστηκε με αντιγόνο ιστικής διαγλουταμινάσης (t TG) παρουσίασε αναστολή (Γράφημα 1) η οποία φαίνεται στο γράφημα ως μια πτώση της καμπύλης για το t TG.

Ο ίδιος ορός για την επώαση με το αντιγόνο BSA δεν έδειξε αναστολή, ενώ όλοι οι οροί (453, 183b, 219b) των ασθενών με ηπατική νόσο δεν έδειξαν καμία αναστολή για κανένα αντιγόνο με το οποίο επώασθηκαν (Γραφήματα 1, 2, 3, 4, 5).

### 11. Συζήτηση

Συνολικά οι οροί ήταν θετικοί στην παρουσία αντί- t TG αντισωμάτων και μη θετικοί στην παρουσία αντί-EMA αντισωμάτων, με την εμφάνιση του προτύπου EMAlife.

Επομένως δεν συνυπήρχε κοιλιοκάκη με τις ηπατικές νόσους σε αυτή την ομάδα ασθενών γιατί θα έπρεπε οι οροί να ήταν θετικοί και για τις δύο κατηγορίες αντισωμάτων που μελετήθηκαν, αν και σπάνια μπορεί να υποκρύπτεται κοιλιοκάκη σε ασυμπτωματικούς ασθενείς με αρνητική την δοκιμασία IgA anti-EMA IIF (51).

Η θετική αντίδραση που παρατηρήθηκε στην elisa ht TG+/EMA- (EMAlife) ορών ασθενών με ηπατικά νοσήματα, που δεν πάσχουν από κοιλιοκάκη, πιθανά αποτελεί μη ειδική σύνδεση (background). Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αναστολής στους ορούς 453, 183b και 219b των ασθενών με νοσήματα του ήπατος, της ειδικής σύνδεσης των αντί-t TG αντισωμάτων με τα αντιγόνα TG, BSA και actine, τα οποία συγκρινόμενα με τα πειράματα αναστολής για τα ίδια αντιγόνα σε ορό ασθενούς με κοιλιοκάκη ήταν αρνητικά για αναστολή.

Επειδή οι οροί προέρχονται από ηπατοπαθείς, η αυξημένη παρουσία τρανσαμινασών και γ-σφαιρινών δημιούργησαν πρόβλημα μη ειδικής πρόσδεσης σε στερεό αντιγονικό υπόστρωμα και μη ειδικής διασύνδεσης με τα αντισώματα που υπήρχαν σε αυτούς τους ορούς. Παρόμοια ψευδώς θετικά αντί-t TG αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε διάφορες μελέτες Vecchi M. et al (52), Carroccio et al (8), σε ορούς ασθενών με ηπατικές νόσους και οφείλονταν στη μεγάλη ιστική καταστροφή του ήπατος τόσο από την ασθένεια όσο και από την κατανάλωση αλκοόλ-αλκοολικοί ασθενείς-, στην παρουσία υψηλού τίτλου ανοσοσφαιρινών, αυτοαντισωμάτων καθώς και στην παρουσία υψηλών επιπέδων

τρανσαμινασών, τα οποία συμφωνούν με τους παράγοντες που εμπλέκονται στην εμφάνιση των ψευδώς θετικών αντισωμάτων αντί-t TG που ανιχνεύθηκαν και στους ορούς ηπατοπαθών που ήταν αντικείμενο της μελέτης μας.

Ως τελικό συμπέρασμα, τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν υψηλή συχνότητα παρουσίας αντί- t TG αντισωμάτων χωρίς την παρουσία αντισωμάτων IgA αντί-EMA σε ορούς ασθενών με ηπατικές νόσους, δεν συνδέθηκαν με ταυτόχρονη παρουσία κοιλιοκάκης, μειώθηκαν αλλά δεν εξαφανίσθηκαν με την χρήση ανθρώπινης ανασυνδιασμένης διαγλουταμινάσης και τελικά θεωρούνται ψευδώς θετικά αποτελέσματα και χαρακτηρίζονται ως αποτελέσματα της μη ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων των ορών με πρωτεΐνες των ορών και με τα υποστρώματα των διαφόρων τεχνικών (background).

## **ABSTRACT.**

The development of autoimmunity to tissue transglutaminase is a striking feature of coeliac disease, an enteropathy that develops in genetically susceptible individuals upon exposure to dietary gluten. IgA anti-t TG autoantibodies are present in at least 98% of coeliac patients and provide a very useful tool for the diagnosis of the disorder.

In order to determine the presence of antibodies against tissue transglutaminase in patients with liver diseases and to determine the prevalence of CD in the same group of patients, serological screening was performed in the sera of 47 patients.

Screening for IgA EMA t TG with indirect immunofluorescence (IIF) in monkey esophagus and human umbilical cord substrates has been performed.

This assay is the optimum test for predicting CD but this indirect immunofluorescence test is not easy to apply in large scale screening. However, tissue transglutaminase has recently been identified as the main autoantigen recognized by EMA in CD patients.

Several commercial ELISA tests based on different types of transglutaminases were developed in order to detect the presence of anti-t TG autoantibodies. Two different commercial ELISA'S (INOVA, HYCOR) were used in our study, in the detection of IgA anti-human t TG antibodies.

The screening of the sera of hepatic group patients for IgA EMA antibodies with IIF in both substrates had been negative with the appearance of an EMAl like pattern.

On the contrary, the screening for IgA anti-h-t TG antibodies with both the two ELISA'S showed positivity in the majority of the samples.

This combination of results EMA-/anti-h-t TG+ had excluded the possibility of coexistence of coeliac disease with liver diseases in our samples. On the other hand, positive anti-h-t TG antibodies that were observed were thought to be false positive.

Regarding the cause of these 'false positive' anti-t TG antibodies, we demonstrated that this phenomenon was probably linked to the presence of a variety of proteins in the samples such as transaminases, immunoglobulins, autoantibodies that were co-reacted with antibodies and gave that 'background' phenomenon that is been characterized by false positive anti-t TG antibodies.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Aldersley M A, Howdle P D. Intestinal permeability and liver disease.  
Eur J Gastroenterol Hepatol 1999, 11, 401-3.
- 2) Al-Awadhi A, al-Jarallah K, Hasan F, et al.  
Rheumatic manifestations and immunological abnormalities in patients  
with chronic hepatitis C. A study in the Middle East.  
Rev Rhum Engl Ed 1998, 65, 372-7.
- 3) Bao F, Yu L, Babu S, Wang T, et al. One third of HLA DQ2 homozygous  
patients with type 1 diabetes express celiac disease-associated  
transglutaminase autoantibodies. J Autoimmun 1999, 13, 143-8.
- 4) Bardella M T, Marino R, Meroni P L.  
Celiac disease during interferon treatment. Ann Intern Med 1999, 131, 157-8.
- 5) Bardella M T, Trovato C, Cesana B M, Pagliary C, Gebbia C, Peracchi M.  
Serological markers for celiac disease: is it time to change?  
Digest Liver Dis 2001, 33, 420-31.
- 6) Biagi F, Corazza G R. Tissue transglutaminase antibodies:  
is sensitivity more important than specificity?  
Digest Liver Dis 2001, 33, 401-2.
- 7) Bradwell A R, Stokes R P, Mead G P.  
Advanced Atlas of Autoantibody Patterns.  
Printed by KNP Group Ltd 1999, Redditch B98 ORE.
- 8) Carroccio A, Giannitrapani L, Soresi M, Not T, Iacono G et al.  
Guinea pig transglutaminase immunolinked assay does not predict coeliac disease  
in patients with chronic liver disease. Glut 2001, 49, 506-511.
- 9) Cellier C, Patey N, Mauvieux L, et al.  
Abnormal intestinal intraepithelial Lymphocytes in refractory sprue.  
Gastroenterology 1998, 114, 471-81.
- 10) Γερμενής Α.Ε. Ιατρική Ανοσολογία. Αθήνα: Εκδόσεις Παπαζήση, 2000, 398-400.
- 11) Γερμενής Α. Ε. Διαγνωστική ανοσολογία. Αθήνα: Εκδόσεις Παπαζήση, 2000.
- 12) Chan A W, Butzner J D, McKenna R, Fritzier J M.  
Tissue Transglutaminase Enzyme-Linked Immunosorbent Assay as a  
Screening Test for Celiac Disease in Pediatric Patients. Pediatrics 2001, 07(1), 1-4.

- 13) Clark D D, Mycek M J, Neidle A, Waeisch H. The incorporation of amines into proteins. *Arch. Biochem. Biophys* 1957, 79, 338-354.
- 14) Dickey W, McMillan S A, Gallender M E.  
High prevalence of celiac sprue among patients with primary biliary cirrhosis. *J Clin Gastroenterol* 1997, 25, 328-9.
- 15) Ersoz G, Aydin A, Erdem S, Yuksel D, Akarca U, Kumangliaglu K.  
Intestinal permeability in liver cirrhosis.  
*Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999, 11, 409-12.
- 16) Farrell R J, Kelly C P. Celiac Sprue. *N Engl J Med*, 2002, 346 (3), 180-188.
- 17) Feitag T, Schulze-Koops H, Niedobitek G, Melino G, Schuppan D.  
The role of the immune response against tissue transglutaminase in the pathogenesis of coeliac disease.  
*Autoimmunity Reviews* 2003, Published by Elsevier Science B.V.
- 18) Fine K D, Ogunji F, Saloum Y.  
Celiac Sprue: Another Autoimmune Syndrome Associated with Hepatitis C.  
*Am J Gastroenterol* 2001, 96 (1), 138-145.
- 19) Gentile V, Violante V, Amico B D, Illiano M, Luongo A.  
Tissue transglutaminase and coeliac disease pathogenesis: potential molecular mechanisms for other human diseases.  
*Neurochemistry International* 2002, 40, 79-83.
- 20) Green P H R, Stavropoulos S N, Lo W, et al.  
Detection of antiendomysial antibodies in adult celiacs depends on histologic and clinical disease severity. *Gastroenterology* 1999, 116, A883.
- 21) Griffin M, Casadio R, Bergamini C M.  
Transglutaminases: Nature's biological glues. *Biochem. J.* 2002, 368 (377-396).
- 22) Holmes G K T, Prior P, Lane M R, et al.  
Malignancy in coeliac disease-effect of gluten free diet. *Gut* 1989, 30, 333-8.
- 23) Iltanen S, Collin P, Korpela M, et al.  
Celiac disease and markers of celiac disease latency in patients with primary Sjogren's syndrome.  
*Am J Gastroenterol* 1999, 94, 1042-6.
- 24) Kaukinen K, Collin P, Mykkanen A H, et al.  
Celiac disease and autoimmune endocrinologic disorders.  
*Dig Dis Sci* 1999, 44, 1428-33.

- 25) Kim SY, Steinert PM.  
IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  induce the expression of TGase 2 in rat small intestinal cells: implications for the pathogenesis of celiac disease, 2001(submitted).
- 26) Kim S Y, Jeitner T M, Steinert P M.  
Transglutaminase in disease. *Neurochemistry international* 2002, 40, 85-103.
- 27) Kingham J G C, Parker D R.  
The association between primary biliary cirrhosis and coeliac disease: A study of relative prevalences. *Gut* 1998, 42, 120-2.
- 28) Koop I, Ilchmann R, Izzi L, Adragna A, Koop H, Barthelmes H.  
Detection of autoantibodies against tissue transglutaminase in patients with celiac disease and dermatitis herpetiformis. *Am J Gastroenterol* 2000, 95, 2009-14.
- 29) Lampasona V, Bonfanti R, Bazzigaluppi E, et al.  
Antibodies to tissue TGase C in type I diabetes. *Diabetologia* 1999, 42, 1195-1198.
- 30) Lasagni D, Ferrari R, Lapini M.  
Unmasking anti-endomysial antibodies in coeliac subjects positive for anti-smooth muscle antibodies. *Acta Paediatr* 1999, 88, 462-464.
- 31) Leon F, Pena R R, Camarero C, Sanchez L, Eiras P, Del Amo A, et al.  
Limitations of anti-guinea pig transglutaminase IgA in screening of celiac disease. *Gastroenterology* 2001, 120, 586-7.
- 32) Letter to the Editor. Tissue Transglutaminase in HCV infection. *Cell Death and Differentiation* (2003) 10, S79-S80. Nature Publishing Group.
- 33) Long R G, Willis M R. Hepatic osteodystrophy. *Br J Hosp Med* 1978, 20, 312-21.
- 34) Manns M P. Hepatotrophic viruses and autoimmunity. *J Viral Hepatol* 1997, 4(suppl 1), 7-10.
- 35) Manns M P, Obermayer-Straub P. Viral induction of autoimmunity: mechanisms and examples in Hepatology. *J Viral Hepatol* 1997, 4(suppl 2), 42-7.
- 36) Ozdemir F N, Turan M, Sezer S, et al. Prevalence of serological markers of autoimmunity in hemodialysis patients with hepatitis C virus. *Transplant Proc* 1998, 30, 848-9.



- 37)Piacentini M, Collizzi V. Tissue transglutaminase: apoptosis versus autoimmunity. Viewpoint Immunology Today 1999, 20 (3), 130-134.
- 38)Piacentini M, Farrace M G, Hassan C, et al. Tissue Transglutaminase release from apoptotic cells into extracellular matrix during Human Liver fibrogenesis. J. Pathol. 1999, 189, 92-98.
- 39)Pisano J J, Finlayson J S, Peyton M P. Cross-link in fibrin polymerized by factor 13:  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl) lysine. Science 1968,160, 892-893.
- 40)Raunala T, Collin P. Diseases associated with dermatitis herpetiformis. Br J Dermatol 1997, 136, 315-8.
- 41)Reeves G E, Burnes C, Hall S T, Gleeson M, Lemmert K, Clancy R L. The measurement of IgA and IgG transglutaminase antibodies in celiac disease: a comparison with current diagnostic methods. Pathology 2000, 32, 181-5.
- 42)Reif S, Lerner A. Tissue transglutaminase-the key player in celiac disease: a review. Science direct, Elsevier Science B.V, Autoimmunity reviews, 2003.
- 43)Riestra S, Fernandez E, Rodrigo L, et al. Prevalence of coeliac disease in the general population of Northern Spain. Scand J Gastroenterol 2000, 35, 398-402.
- 44)Rostaing L, Modesto A, Cisterne J M, et al. Serological markers of autoimmunity in renal transplant patients with chronic hepatitis C. Am J Nephrol 1998, 18, 50-6.
- 45)Sategna -Guidetti C, Bruno M, Mazza E, et al. Autoimmune thyroid diseases and coeliac disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 1998, 10, 927-31.
- 46)Sblattero D, Florian F, Azzoni E. The analysis of the fine specificity of celiac disease antibodies using tissue transglutaminase fragments. Eur. J. Biochem. 2002, 269,5175-5181.
- 47)Sjoberg K, Lindgren S, Eriksson S. Frequent occurrence of non-specific gliadin antibodies in chronic liver disease. Endomycial but not gliadin antibodies predict coeliac disease in patients with chronic liver disease. Scand J Gastroenterol 1997, 32, 1162-7.
- 48)Signorini M, Bortolotti F, Poltronieri L, Bergamini C. M.

- Human Erythrocyte Transglutaminase: Purification and Preliminary Characterisation. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1988, 369, 275-281.
- 49) Sollid L M. Coeliac Disease: Dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature reviews immunol* 2002, 2, 647-655.
- 50) Sorensen H T, Thulstrup A M, Blomqvist P, et al. Risk of primary biliary liver cirrhosis in patients with coeliac disease. Danish and Swedish cohort data. *Gut* 1999, 44, 736-8.
- 51) Sulkanen S, Collin P, Laurila K, Maki M. IgA- and IgG- class antihuman umbilical cord antibody tests in adult coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1998, 33, 251-254.
- 52) Vecchi M, Folli C, Formenti S, et al. High rate of positive Anti-Tissue Transglutaminase Antibodies in Chronic Liver Disease. *Scand J Gastroenterol* 2003, 38, 50-54.
- 53) Vivas S, Ruiz de Morales J M, Martinez J, et al. Human recombinant anti-transglutaminase antibody testing is useful in the diagnosis of silent coeliac disease in a selected group of at-risk patients. *Eur j Gastroenterol & Hepatology* 2002, 15, 479-483.
- 54) Vleggaar F P, van Buuren H R, Wolfhagen F H, et al. Prevention and treatment of osteoporosis in the primary biliary cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999, 11, 617-21.
- 55) Volta U, Molinaro N, De Franchis R, et al. Correlation between IgA antiendomysial antibodies and subtotal villous atrophy in dermatitis herpetiformis. *J Clin Gastroenterol* 1992, 14, 298-301.
- 56) Volta U, Ballentani S, Bianchi F B, et al. High Prevalence of coeliac disease in the Italian general population. *Dig Dis Sci* 2001, 46, 1500-5.
- 57) Volta U, Granito A, De Franceschi L, Petrolini N, Bianchi SB. Anti tissue transglutaminase antibodies as predictors of silent coeliac disease in patients with hypertransaminasaemia of unknown origin. *Digest Liver Dis* 2001, 33, 420-5.
- 58) Volta U, Rodrigo L, Granito A, et al. Celiac Disease in Autoimmune Cholestatic Liver Disorders. *Am J Gastroenterol* 2002, 97, 2609-2613.

- 59) Wong R C W, Wilson R J, Steele R H, Radford-Smith G, Adelstein S.  
A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase  
antibody Elisa Kits. J Clin Pathol 2002, 55, 488-494.