



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Ν. Νταλέκος**



---

***Διδακτορική Διατριβή***

***" ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΠΡΩΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ***

***ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ"***

υπό

**Θεοδώρου Α. Ζωγράφου**

Ιατρού

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2011

© 2011 Θεόδωρος Ζωγράφος

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

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (11/5/201 ΓΣΕΣ):**

**1<sup>ος</sup> Εξεταστής  
(Επιβλέπων)**

Δρ. Νταλέκος Γεώργιος  
Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας

**2<sup>ος</sup> Εξεταστής**

Δρ. Σταθάκης Νικόλαος  
Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας

**3<sup>ος</sup> Εξεταστής**

Δρ. Ρηγοπούλου Ειρήνη  
Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**4<sup>ος</sup> Εξεταστής**

Δρ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστος  
Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**5<sup>ος</sup> Εξεταστής**

Δρ. Καψωριτάκης Ανδρέας  
Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας-Γαστρεντερολογίας, Τμήμα  
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**6<sup>ος</sup> Εξεταστής**

Δρ. Κουκούλης Γεώργιος  
Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**7<sup>ος</sup> Εξεταστής**

Δρ. Μακαρίτσης Κωνσταντίνος  
Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το 2011 συμπληρώθηκαν 160 χρόνια από την πρώτη περιγραφή της κλινικής οντότητας που σήμερα καλείται πρωτοπαθής χολική κίρρωση (ΠΧΚ). Η νόσος όταν είχε αρχικά περιγραφεί χαρακτηριζόταν από την παρουσία ικτέρου και κίρρωσης και την επακόλουθη ηπατική ανεπάρκεια, ενώ σήμερα εξαιτίας της πρωιμότερης διάγνωσης της νόσου το 60% των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί κατά τη διάγνωση και δεν εμφανίζουν κίρρωση.

Ορόσημο στη διάγνωση της ΠΧΚ ήταν η ανακάλυψη των αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων και η κατ'εξοχήν συσχέτισή τους με τη νόσο. Ωστόσο, η σχέση των αντισωμάτων αυτών με τη παθογένεια της ΠΧΚ και των επιπέδων τους με την ενεργότητα της νόσου παραμένει ασαφής. Παράλληλα, η ανακάλυψη πιο ευαίσθητων διαγνωστικών τεχνικών και η αναγνώριση ειδικών για τη νόσο αντιπυρηνικών αντισωμάτων, δίνουν τη δυνατότητα για μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση ασθενών με ΠΧΚ.

Επιδημιολογικά δεδομένα έχουν καταδείξει τη συσσώρευση ασθενών με ΠΧΚ σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές και συγκεκριμένους πληθυσμούς, ενώ η νόσος φαίνεται να εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα σε μέλη της ίδιας οικογένειας, τα οποία επίσης εμφανίζουν αυξημένη επίπτωση διάφορων αυτοάνοσων νοσημάτων.

Παράλληλα, κλινικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία της ΠΧΚ σε αρχικά στάδια μπορεί να προλάβει την εξέλιξη της νόσου και να κανονικοποιήσει την επιβίωση των ασθενών, καθιστούν σημαντική την ανίχνευση υποκλινικών μορφών της νόσου, ιδίως σε πληθυσμούς με αυξημένη επίπτωση αυτής, όπως είναι οι συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με ΠΧΚ. Τα κλινικά, βιοχημικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά των πρώτου βαθμού συγγενών έχουν αποτέλεσει αντικείμενο περιορισμένης μελέτης στη διεθνή βιβλιογραφία, ωστόσο αφενός οι



υπάρχουσες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στα αντιμιτοχονδριακά αυτοαντισώματα χωρίς να διερευνήσουν την παρουσία των ειδικών για τη νόσο αντιπυρηνικών αντισωμάτων, αφετέρου δεδομένα για τον ελληνικό πληθυσμό απουσιάζουν.

Με αυτά τα δεδομένα, η παρούσα μελέτη προσδιόρισε της συχνότητα αυτών των αυτοαντισωμάτων στους πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ, συγκριτικά με συγγενείς ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα, πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα, αλλά και υγιείς αιμοδότες και αναζήτησε συσχετίσεις με κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των ατόμων αυτών.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να αναγνωρίσω τη βοήθεια όλων αυτών που είχαν σημαντική συνεισφορά στην εκπόνηση της διατριβής μου. Σίγουρα μεγάλο μέρος της διατριβής βασίζεται σε ομαδική δουλειά και είχα την τύχη να αποτελώ μέρος μιας εξαιρετικής ομάδας που έστησε με κόπο ο Καθηγητής Γ.Ν Νταλέκος, γεγονός για το οποίο του είμαι εξαιρετικά ευγνώμων. Επιπρόσθετα, τον ευγνωμονώ γιατί κοντά του, από τρίτοετης φοιτητής ακόμα, γνώρισα και αγάπησα την τεκμηριωμένη με δεδομένα άσκηση της ιατρικής και την ιατρική έρευνα. Θέλω οπωσδήποτε να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Καθηγητή κ. Ν. Σταθάκη και την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Ε. Ρηγοπούλου για τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους ιατρούς κ. Χ. Λιάσκο και κ. Κ. Ζάχου για τη σημαντική τους καθοδήγηση στα πρώτα μου βήματα ως ερευνητής, ιδιαίτερα τον πρώτο γιατί κοντά του απέκτησα βασικές γνώσεις και δεξιότητες, απαραίτητες στη βιοϊατρική έρευνα. Στο πρόσωπό τους θέλω να ευχαριστήσω όλους τους συνεργάτες του Ερευνητικού Εργαστηρίου της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη βοήθειά τους.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον άνθρωπο που με στήριξε μετά την αποχώρησή μου από το Ερευνητικό Εργαστήριο Παθολογίας, μου έδωσε μια νέα

ερευνητική στέγη και κατεύθυνση και με εισήγαγε στον καταπληκτικό κόσμο της ερευνητικής Καρδιολογίας, τον κ. Δ. Κατρίτση.

Τέλος, θέλω να αφιερώσω τη διατριβή μου στους ανθρώπους που με στηρίζουν καθημερινά. Στους γονείς μου, Απόστολο και Νίκη, για την καθημερινή τους συμπαράσταση σε όλες τις πτυχές της ζωής μου. Στη σύζυγό μου, Θάλεια, που με έκανε να πιστέψω στις δυνάμεις μου και είναι πάντα δίπλα μου ομορφαίνοντας τη ζωή μου. Στα παιδιά μου, Αποστόλη και Νίκη, που μου δίνουν απλόχερα την αγάπη τους και με τον ερχομό τους επαναπροσδιόρισαν τις προτεραιότητές μου.

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

### ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Όνοματεπώνυμο	Θεόδωρος Ζωγράφος
Τόπος Γέννησης	Αθήνα Αττικής
Ημερομηνία Γέννησης	21/7/2011
Τόπος Κατοικίας	Λέσβου 36, Χέρωμα Βάρης 16672 Αττική
Οικογενειακή Κατάσταση	Έγγαμος, 2 τέκνα
Τηλέφωνο	2109653315, 6956161001
E-mail	theodoroszografos@gmail.com

### ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1996-2003	Πτυχίο Ιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
2003-2011	Υποψήφιος Διδάκτωρ, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
2009-2011	ΠΜΣ «Καρδιοαναπνευστική Αναζωογόνηση», Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
7/ 2010	Advanced Life Support Provider (European Resuscitation Council)
11/2010	Advanced Cardiac Life Support Provider – Nominated for Instructor (American College of Emergency Physicians)

### ΕΡΓΑΣΙΑ

2003-2004	Υπηρεσία Υπαίθρου στο Κ.Υ. Τυρνάβου
2005-2006	Στρατιωτική θητεία. Ειδίκευση στην Παθολογία στο Ναυτικό Νοσοκομείο Σαλαμίνας και το Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών
2006-2008	Ειδίκευση στην Παθολογία στο Γενικό Νοσοκομείο Αγρινίου
2008-2011	Επιστημονικός συνεργάτης της Α Καρδιολογικής Κλινικής της Ευρωκλινικής Αθηνών
2011-σήμερα	Ειδίκευση στην Καρδιολογία στην Α Καρδιολογική Κλινική του Νοσοκομείου Ελληνικός Ερυθρός Σταυρός «Κοργιαλένιο- Μπενάκειο»

#### ΒΡΑΒΕΙΑ-ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

2011-2013	Υπότροφος του Κοινοφελούς Ιδρύματος «Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης» για την εκπόνηση μελέτης με θέμα την κατάλυση κατακερματισμένων κολπικών δυναμικών ως θεραπευτικό στόχο της κατάλυσης της κολπικής μαρμαρυγής σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο CITY University London
-----------	--

#### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Katritsis DG, Korovesis S, Tzanalaridou E, Giazitzoglou E, **Zografos T**, Meier B. **Spot drug-eluting stenting for long coronary stenoses: long-term results of a randomized clinical study.** J Interv Cardiol 2011;24(5):437-41. IF: **1.387**
2. Efsthathopoulos EP, Pantos I, Thalassinou S, Argentos S, Kelekis NL, **Zografos T**, Panayiotakis G, Katritsis DG. **Patient radiation doses in cardiac computed tomography: comparison of published results with prospective and retrospective acquisition.** Radiat Prot Dosimetry. 2011 Feb 15. [Epub ahead of print] IF: **0.966**
3. Katritsis DG, Giazitzoglou E, **Zografos T**, Pokushalov E, Po SS, Camm AJ. **Rapid pulmonary vein isolation combined with autonomic ganglia modification: a randomized study.** Heart Rhythm. 2011;8(5):672-8. IF:**4.246**
4. Katritsis DG, Giazitzoglou E, **Zografos T**, Ellenbogen KA, Camm AJ. **An approach to left septal slow pathway ablation.** J Interv Card Electrophysiol. 2011;30(1):73-9. IF: **1.228**
5. **Zografos TA**, Haliassos A, Korovesis S, Giazitzoglou E, Serelis J, Katritsis DG. **Serum cathepsin levels in coronary artery ectasia.** Int J Cardiol 2010;145(3):606-7. IF: **6.802**
6. Katritsis DG, **Zografos T**, Korovesis S, Giazitzoglou E, Youinou P, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. **Antiendothelial cell antibodies in patients with coronary artery ectasia.** Coron Artery Dis. 2010;21(6):352-6. IF: **1.665**
7. **Zografos T**, Katritsis DG. **Inhibition of the renin-angiotensin system for prevention of atrial fibrillation.** Pacing Clin Electrophysiol. 2010;33(10):1270-85. IF: **1.353**

8. **Zografos TA**, Katritsis DG. **Guidelines and regulations for driving in heart disease.** Hellenic J Cardiol. 2010;51(3):226-34. **IF: 1.172**
9. **Zografos T**, Haliassos A, Korovesis S, Giazitzoglou E, Vouridis E, Katritsis D. **Association of neutrophil gelatinase-associated lipocalin with the severity of coronary artery disease.** Am J Cardiol 2009;104:917-20. **IF: 3.680**
10. **Zografos T**, Kokladi M, Katritsis D. **Coronary artery ectasia and systolic flow cessation in a patient with hypertrophic cardiomyopathy: a case report.** Int J Cardiol 2010;145:e114-5. **IF: 6.802**
11. **Zografos TA**, Liaskos C, Rigopoulou EI, Togousidis E, Makaritsis K, Germenis A, Dalekos GN. **Adiponectin: a new independent predictor of liver steatosis and response to IFN-alpha treatment in chronic hepatitis C.** Am J Gastroenterol 2008;103:605-14. **IF: 6.882**
12. Gabeta S, Norman GL, Liaskos C, Papamichalis PA, **Zografos T**, Garagounis A, Rigopoulou EI, Dalekos GN. **Diagnostic relevance and clinical significance of the new enhanced performance M2 (MIT3) ELISA for the detection of IgA and IgG antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis.** J Clin Immunol 2007;27:378-87. **IF: 3.326**
13. **Zografos TA**, Rigopoulou EI, Liaskos C, Togousidis E, Zachou K, Gatselis N, Germenis A, Dalekos GN. **Alterations of leptin during IFN-alpha therapy in patients with chronic viral hepatitis.** J Hepatol 2006;44:848-55. **IF: 9.334**

#### ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

- |   |
|---|
| Ganglionated plexi ablation combined with pulmonary vein isolation as a treatment for paroxysmal atrial fibrillation. Giazitzoglou E, Korovesis S, <b>Zografos T</b> , Kokladi M, Venetsanakos I, Katritsis DG, 32nd Panhellenic Cardiological Congress, Salonica, Greece, October 2011 |
| Angiographic and clinical characteristics of patients with coronary artery ectasia. <b>Zografos T</b> , Giazitzoglou E, Korovesis S, Kokladi M, Venetsanakos I, Katritsis DG, 32nd Panhellenic Cardiological Congress, Salonica, Greece, October 2011                                   |
| Reduced reproducibility of heart rate recovery in asymptomatic individuals. Fourlas C, <b>Zografos T</b> , Giazitzoglou E, Korovesis S, Kokladi M, Venetsanakos I, Katritsis DG,  |

31st Panhellenic Cardiological Congress, Athens, Greece, October 2010
An approach to left septal slow pathway ablation. Giazitzoglou E, Korovesis S, <b>Zografos T</b> , Kokladi M, Venetsanakos I, Katritsis DG, 31st Panhellenic Cardiological Congress, Athens, Greece, October 2010
Association between NGAL levels, AECA titer and the extent of coronary artery disease. <b>Zografos T</b> , Giazitzoglou E, Korovesis S, Kokladi M, Venetsanakos I, Katritsis DG, 31st Panhellenic Cardiological Congress, Athens, Greece, October 2010
Serum cathepsin L and cystatin C levels are associated with geometric characteristics and the extent of coronary artery ectasia. <b>Zografos T</b> , Giazitzoglou E, Korovesis S, Kokladi M, Venetsanakos I, Katritsis DG, 31st Panhellenic Cardiological Congress, Athens, Greece, October 2010
Antiendothelial cell antibodies in patients with coronary artery ectasia. <b>Zografos T</b> , Giazitzoglou E, Korovesis S, Kokladi M, Venetsanakos I, Katritsis DG, 31st Panhellenic Cardiological Congress, Athens, Greece, October 2010
Long-term follow-up of patients treated with drug-eluting stents. Korovesis S, <b>Zografos T</b> , Giazitzoglou E, Kokladi M, Venetsanakos I, Katritsis DG, 31st Panhellenic Cardiological Congress, Athens, Greece, October 2010
Serum Cathepsins K, L and cystatin C in patients with coronary artery ectasia. <b>T.A. Zografos</b> , A. Haliassos, S. Korovesis, E. Giazitzoglou, E. Voridis, D.G. Katritsis. 8th Panhellenic Clinical Chemistry Congress, Patras, October 2-4, 2009. Clin Chem Lab Med 2009;47(9):A79–A102.
Association Of Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin with the Severity of Coronary Artery Disease. <b>T.A. Zografos</b> , A. Haliassos, S. Korovesis, E. Giazitzoglou, E. Voridis, D.G. Katritsis. 8th Panhellenic Clinical Chemistry Congress, Patras, October 2-4, 2009. Clin Chem Lab Med 2009;47(9):A79–A102.
Depressive symptoms in patients with dementia in a Greek rural community. K. Demos, <b>T. Zografos</b> , et al. WONCA Europe Regional Conference, Istanbul, Turkey, September 2008.
Diagnostic significance of anti-filamentous actin (F-actin) antibodies in autoimmune hepatitis. C. Liaskos; D. P. Bogdanos; E. I. Rigopoulou; A. Garagounis; <b>T. Zografos</b> ; E. T. Davies; G. N. Dalekos. 57th Annual meeting of the American Association for the

Study of Liver Diseases, Boston, USA, October 2006.
Disappointing Adherence to the Mediterranean Dietary Pattern of a Sample of Young Greek Navy Recruits. Dimosthenopoulos C, Makrilakis K, Doupis J, Diamanti K, Perrea D, Tsiamalos P, Metaxas Y, <b>Zografos TA</b> , Tsipis DA, Katsilambros N. 24th International Symposium on Diabetes and Nutrition of the DNSG, Salerno, Italy, June-July 2006.
Metabolic Syndrome and Mediterranean Dietary Pattern in a Sample of Young Greek Navy Recruits. Doupis J, Makrilakis K, Dimosthenopoulos C, Perrea D, Tsiamalos P, Diamanti K, Metaxas Y, <b>Zografos TA</b> , Tsipis DA, Katsilambros N. 24th International Symposium on Diabetes and Nutrition of the DNSG, Salerno, Italy, June-July 2006.
Carotid Bruits in Rural Central Greece: Prevalence and Correlation with Cardiovascular Risk Factors , <b>T. Zografos</b> , E. Kareli, 18th Congress of the Greek Association of General Practitioners, Corfu , April 2006.
Differences in Atrial Fibrillation presentation between Inpatients and Outpatients. C. Patsa, A. Patialiakas, A.Destounis, <b>T. Zografos</b> , D. Klettas, C. Katsikas, A. Antoniou, P. Strempelas, A. Spanos, 10th Multidisciplinary medical conference of the Greek Armed Forces, Athens, February 2006.
Beta-blockers in Chronic Heart Failure. C. Patsa, A. Patialiakas, A.Destounis, <b>T. Zografos</b> , D. Klettas, C. Katsikas, A. Antoniou, P. Strempelas, A. Spanos, 10th Multidisciplinary medical conference of the Greek Armed Forces, Athens, February 2006.
Alterations of leptin levels during IFN- $\alpha$ treatment in patients with chronic viral hepatitis B and C: Evidence of an IFN- $\alpha$ -mediated suppression of leptin production. C. Liaskos; <b>T. A. Zografos</b> ; E. Togousidis; K. Zachou; N. Gatselis; E. Rigopoulou; A. Germenis; G. N. Dalekos. 56th Annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, USA, November 2005.

**" ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΠΡΩΤΟΥ  
ΒΑΘΜΟΥ ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ  
ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ"**

**Θεόδωρος Ζωγράφος**

**Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2011**

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

- 1. Δρ. Νταλέκος Γεώργιος. Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)**
- 2. Δρ. Σταθάκης Νικόλαος, Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**
- 3. Δρ. Ρηγοπούλου Ειρήνη Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογίας,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**



# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	15
<b>1. Η ιστορία της μελέτης του ήπατος ανά τους αιώνες</b>	17
1.1 Η μελέτη του ήπατος στην οιωνοσκοπία	17
1.2 Η μελέτη του ήπατος στην Αρχαία Ελλάδα	19
1.3 Η μελέτη του ήπατος στους Ρωμαϊκούς χρόνους	20
1.4 Η μελέτη του ήπατος από την Αναγέννηση έως σήμερα	22
<b>2. Ανατομία και παθολογική φυσιολογία του ήπατος</b>	26
2.1 Ιστολογία του ήπατος	26
2.2 Στοιχεία φυσιολογίας και παθοφυσιολογίας του ήπατος	35
2.3 Βιοχημική εκτίμηση της λειτουργικότητας του ήπατος	45
<b>3. Ανοσία</b>	50
3.1 Συστατικά της φυσικής ανοσίας	51
3.2 Επίκτητη ανοσία	62
3.3 Ανοσολογική ανοχή	78
<b>4. Αυτοανοσία-αυτοαντισώματα</b>	90
4.1 Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA)	95
4.2 Αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ινών (SMA)	123
4.3 Αντισώματα έναντι τοιχωματικών κυττάρων στομάχου	126
4.4 Αντισώματα έναντι κυτταροπλάσματος ουδετερόφιλων (ANCA)	129
<b>5. Αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος</b>	133
5.1 Αυτοάνοση ηπατίτιδα (AH)	133
5.2 Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ)	157
5.3 Πρωτοπαθής χολική κίρρωση (ΠΧΚ)	182
5.4 Σύνδρομο επικάλυψης	228
<b>B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	231
<b>1. Εισαγωγή – σκοπός της μελέτης</b>	233
<b>2. Υλικό και μέθοδοι</b>	237
2.1. Ασθενείς και συγγενείς πρώτου βαθμού	237
2.2 Μέθοδοι	238
<b>3. Στατιστική ανάλυση</b>	245
<b>4. Αποτελέσματα</b>	246

4.1. Δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης	246
4.2. Κλινικά χαρακτηριστικά των πρώτου βαθμού συγγενών των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος – Νοσηρότητα.	249
4.3. Τρόπος ζωής-Διατροφικές συνήθειες-Κατανάλωση αλκοόλ	251
4.4. Αιματολογικές και βιοχημικές παράμετροι του υπό μελέτη πληθυσμού.	254
4.5. Συχνότητα αυτοαντισωμάτων στους πρώτου βαθμού συγγενείς των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος	258
<b>5. Συζήτηση</b>	271
<b>Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	279
<b>Δ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ</b>	341
<b>Ε. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	350

## **Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



# 1. Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ ΑΝΑ ΤΟΥΣ

## ΑΙΩΝΕΣ

Ήδη από τους πρώτους ιστορικούς χρόνους, φαίνεται ότι οι περισσότεροι πολιτισμοί της αρχαιότητας είχαν σημαντικές γνώσεις γύρω από την ανατομία του ήπατος. Οι γνώσεις αυτές επήλθαν ως αποτέλεσμα δοξασιών ότι το αίμα αποτελούσε την πηγή κάθε ζωτικής λειτουργίας, καθώς επίσης ότι το ήπαρ χρησίμευε ως το συλλεκτικό κέντρο του αίματος και ως εκ τούτου αποτελούσε την έδρα της ζωής (1). Άλλωστε, σύμφωνα με την θεωρία της ινδοευρωπαϊκής γλώσσας, η λέξη «hīr» είχε διττή σημασία, υποδηλώνοντας τόσο τη ζωή όσο και το ήπαρ. Εκ της παραφθοράς αυτής της λέξεως προέκυψαν οι λέξεις για τη ζωή και το ήπαρ τόσο στην Αγγλική (life / liver), όσο και στη Γερμανική (leben / leber) (2).

### 1.1 Η μελέτη του ήπατος στην οιωνοσκοπία

Μία εξαιρετικά δημοφιλής μέθοδος για την πρόβλεψη του μέλλοντος, ίσως δε και η σημαντικότερη, στον πολιτισμό τόσο των Σουμέριων όσο και των Βαβυλωνίων ήταν η μελέτη των σπλάγχχνων σφαγιασθέντων ζώων. Η μαντική αυτή τέχνη της οιωνοσκοπίας συχνά επικεντρωνόταν στη μελέτη του ήπατος περισσότερο από τα υπόλοιπα σπλάγχχνα και οι μάντεις έπρεπε να έχουν πολύ καλές γνώσεις της ανατομίας του ήπατος. Πιστεύεται ότι για τη διδασκαλία της ανατομίας του ήπατος οι Σουμέριοι αρχικά και οι Βαβυλώνιοι ιερείς στη συνέχεια χρησιμοποιούσαν πηλίνα προπλάσματα, τα οποία επίσης χρησίμευαν και στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ηπατοσκοπίας. Το παλαιότερο πρόπλασμα ήπατος που έχει βρεθεί έως σήμερα προέρχεται από ένα ναό των Βαβυλώνιων και χρονολογείται από το 2000 π.Χ., φυλάσσεται δε στο Βρετανικό Μουσείο του Λονδίνου (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1. Πήλινο ομοίωμα ήπατος προβάτου, περί το 2000 π.Χ. (Βρετανικό Μουσείο, Λονδίνο) (2)**

Το συγκεκριμένο πρόπλασμα απεικονίζει ήπαρ προβάτου, στο οποίο διακρίνονται με λεπτομέρειες: ο δεξιός και ο αριστερός λοβός του ήπατος, ο κερκοφόρος λοβός, η χοληδόχος κύστη και ο κυστικός πόρος. Η επιφάνεια του ήπατος είναι διαχωρισμένη σε 40 μικρότερες ορθογώνιες περιοχές, πολλές εκ των οποίων φέρουν οπές στις οποίες προσαρμόζονταν ξύλινοι δείκτες για την ακριβέστερη απεικόνιση των ευρημάτων της ηπατοσκοπίας.

Η μαντική τέχνη της ηπατοσκοπίας επεκτεινόμενη πέρα από τα όρια της Μεσοποταμίας, διαδόθηκε και στην Ελλάδα, όπου έτυχε ευρείας αποδοχής. Αρκετές αναφορές στην ηπατοσκοπία υπάρχουν σε αρχαία κείμενα, όπως η Ηλέκτρα του Ευριπίδη: «ἱερὰ δ' ἐς χεῖρας λαβὼν Αἴγισθος ἦθρει. καὶ λοβὸς μὲν οὐ προσὴν σπλάγχνοις, πύλαι δὲ καὶ δοχαὶ χολῆς πέλας κακὰς ἔφαινον τῷ σκοποῦντι προσβολάς.», ενώ έχουν διασωθεί πολλές παραστάσεις σε αγγεία πολεμιστών που

πριν την αναχώρησή τους για τη μάχη χρησιμοποιούν το ήπαρ για οίονοσκοπία (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2. Παραστάσεις από ερυθρόμορφο και μελανόμορφο αγγείο απεικονίζουν διενέργεια ηπατοσκοπίας από οπλίτες, 550-450 π.Χ (2)**

Οι γνώσεις των αρχαίων Ελλήνων γύρω από την ανατομία και φυσιολογία του ήπατος φαίνεται ότι ξεπερνούν τη μαντική τέχνη της ηπατοσκοπίας. Ο μύθος του Προμηθέα που αναφέρεται τόσο από τον Ησίοδο (8<sup>ος</sup> αιώνας π.Χ) όσο και από τον Αισχύλο (525-456 π.Χ) αποτελεί την πρώτη καταγραφή της αναγεννητικής ικανότητας του ήπατος. Παρομοίως, η αναγεννητική ικανότητα του ήπατος καταγράφεται και στο μύθο του Τιτυού, ενός γίγαντα που βασανιζόταν στον Άδη από δύο όρνεα που καταβρόχθιζαν συνεχώς το αναγεννώμενο ήπαρ του.

## **1.2 Η μελέτη του ήπατος στην Αρχαία Ελλάδα**

Κατά την Κλασσική εποχή, οι γνώσεις γύρω από τη λειτουργία του ήπατος ξεφεύγουν από το πλαίσιο των δοξασιών και των μύθων και οργανώνονται με επιστημονικό τρόπο. Ιδίως στα κείμενα του Ιπποκράτη και των μαθητών του, που συνοψίζονται με τον τίτλο Ιπποκρατική συλλογή, συναντούμε στοιχεία σημειολογίας που είναι ακόμη και σήμερα πρωταρχικά στη διάγνωση παθήσεων του ήπατος. Οι Ιπποκρατικοί

χρησιμοποιούσαν την ψηλάφηση της κοιλιάς για την ανεύρεση ηπατοπαθειών και αναγνώριζαν ως συμπτώματα ηπατικής νόσου τον ασκίτη, τον αποχρωματισμό των κοπράνων, τον πυρετό, τον κνησμό και τον ίκτερο. Ειδικά για τον τελευταίο πίστευαν ότι είναι αποτέλεσμα δυσκρασίας, δηλαδή ότι οφείλεται σε παθολογική αύξηση της χολής στον οργανισμό.

Το επόμενο στάδιο στην εξέλιξη της μελέτης του ήπατος ήλθε με το έργο του Αριστοτέλη (384-322 π.Χ.), που ασχολήθηκε τόσο με την ανατομία αλλά και τη φυσιολογία του ήπατος. Ο Αριστοτέλης περιέγραψε την ηπατική αρτηρία και τις ηπατικές φλέβες και διέκρινε την πυλαία φλέβα από το υπόλοιπο φλεβικό σύστημα του ήπατος, ενώ συνέλαβε τον πρωταρχικό ρόλο του ήπατος στην πέψη.

Κατά το 2<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ η σχολή των Αλεξανδρινών, με κύριους εκπροσώπους τον Ηρόφιλο (330/320-260/250π.Χ.) και τον Ερασίστρατο (περ. 304-250 π.Χ.), συνετέλεσε στη λεπτομερέστερη έρευνα της ανατομίας του ήπατος. Η δυνατότητα που είχαν αμφότεροι να εκτελούν ανατομές ανθρώπινων πτωμάτων τους βοήθησε να περιγράψουν το πυλαίο φλεβικό σύστημα και το χοληφόρο δένδρο. Ο Ερασίστρατος ασχολήθηκε με την παθοφυσιολογία των ηπατικών παθήσεων, θεωρούσε δε ότι ο αποφρακτικός ίκτερος οφείλεται στη διακοπή της φυσιολογικής ροής της χολής στα χοληφόρα που προκαλεί φλεγμονή του ήπατος και ότι ο ασκίτης οφείλεται σε σκλήρυνση του ήπατος, για την οποία πρότεινε την ονομασία «σκίρρος», με αποτέλεσμα τη συμπίεση των ενδοηπατικών αγγείων και την έξοδο υδαρούς υγρού στην περιτοναϊκή κοιλότητα (2, 3).

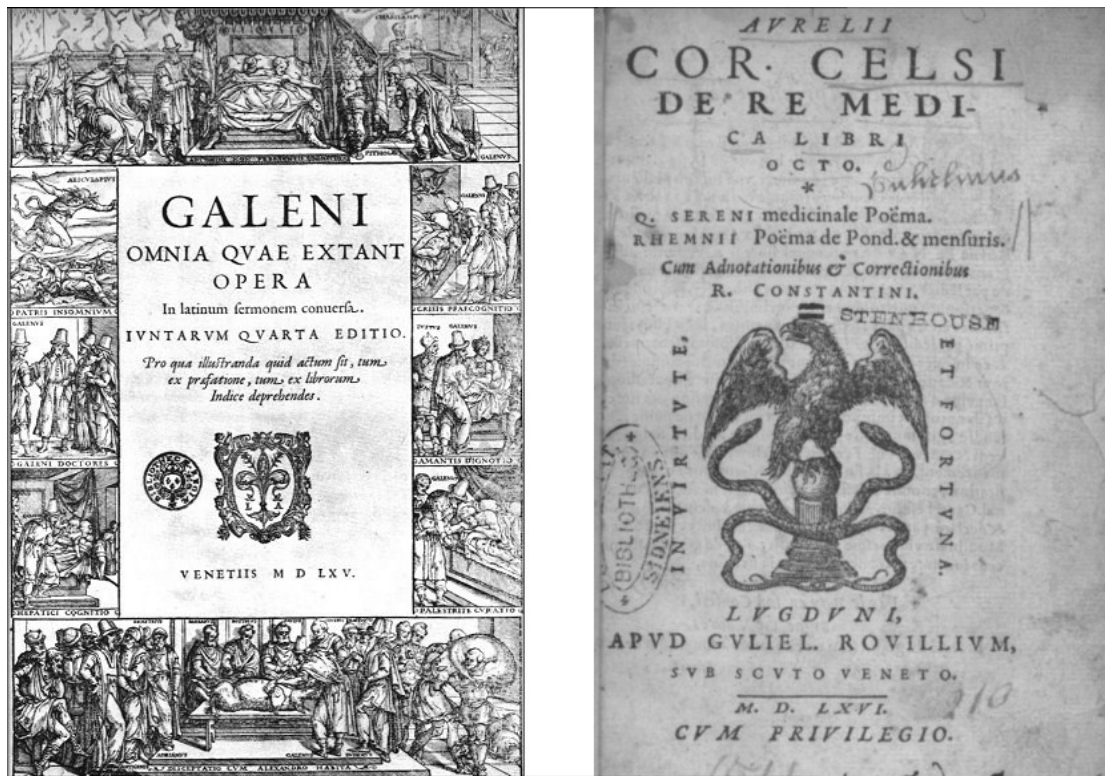
### **1.3 Η μελέτη του ήπατος στους Ρωμαϊκούς χρόνους**

Κατά τους Ρωμαϊκούς χρόνους, από τα ιατρικά συγγράμματα ξεχωρίζει το οκτάτομο έργο του Κέλσου (Aulus Cornelius Celsus) (περ.30π.Χ-50μ.Χ) “De re medica” στο



οποίο συγκεντρώνεται η μέχρι τότε διαθέσιμη ιατρική γνώση και εισάγεται η Λατινική ορολογία. Το έργο αυτό ήταν ελάχιστα γνωστό στις ημέρες του και παρέμεινε εντελώς ξεχασμένο κατά το Μεσαίωνα, ωστόσο ανακαλύφθηκε το 1426 και το 1478 κατέστη το πρώτο αρχαίο ιατρικό κείμενο που εκδόθηκε τυπογραφικώς (Εικόνα 3). Στο έργο του ο Κέλσος περιγράφει με ακρίβεια χειρουργικές επεμβάσεις στο ήπαρ με χρήση της τεχνικής του καυτηριασμού, προσθέτει στα αίτια του ασκίτη και παθήσεις του σπληνός και συστήνει την παρακέντηση του ασκитικού υγρού ως θεραπευτική πρακτική.

Ωστόσο, μία άλλη προσωπικότητα των ρωμαϊκών χρόνων είναι αυτή που θα επηρεάσει βαθύτατα την ιατρική σκέψη γενικά, όσο και την ηπατολογία ειδικότερα για χίλια περίπου χρόνια. Ο Γαληνός (131-200μ.Χ) σταχυολόγησε όλες τις γνώσεις από τον 5<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ. έως και την εποχή του, τις εμπλούτισε με τις προσωπικές του κλινικές και πειραματικές παρατηρήσεις και τις κατέγραψε σε τετρακόσιες περίπου πραγματείες (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3. Σελίδες τίτλου από έργα του Γαληνού και του Κέλσου που τυπώθηκαν το 1565-1566**

Ήταν ο πρώτος που περιέγραψε την ανατομία του ήπατος με εξαιρετική λεπτομέρεια. Σύμφωνα με το Γαληνό, η χοληδόχος κύστη κατακρατεί τη χολή που συλλέγεται από τα ενδοηπατικά χοληφόρα, τα οποία εκτείνονται σε όλο το ήπαρ και καταλήγουν σε μικροσκοπικά χολαγγεία που τερματίζονται στο ήπαρ. Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι η κατάταξη των μορφών του ίκτερου σύμφωνα με το Γαληνό: α. ο ίκτερος μπορεί να προκληθεί από φλεγμονή, σκλήρυνση ή συμπίεση του χοληδόχου πόρου, β. μπορεί να εμφανιστεί σε κρίση εμπύρετου νοσήματος, γ. μπορεί να οφείλεται σε αδυναμία έκκρισης της χολής από το ήπαρ στα χοληφόρα και δ. μπορεί να εμφανιστεί κατά τη μετατροπή του αίματος σε χολή, όπως μετά από δηλητηριώδες δόγμα ζωού.

#### **1.4 Η μελέτη του ήπατος από την Αναγέννηση έως σήμερα**

Για ένα χρονικό διάστημα διάρκειας περίπου 1000 ετών, η ιατρική επιστήμη παρέμεινε δογματικά προσκολλημένη στις απόψεις του Γαληνού. Ωστόσο η

συγγραφή του “De humani corporis fabrica libri septem” από τον Vesalius το 1543, σε ηλικία μόλις 28 ετών, αποτελεί ορόσημο για τη σύγχρονη ανατομία και σηματοδοτεί τη μεταστροφή της ιατρικής από τις μεσαιωνικές προκαταλήψεις προς το πείραμα και την παρατήρηση (Εικόνα 4).

Στο πέμπτο από τα επτά βιβλία του “De humani corporis fabrica” ο Vesalius περιγράφει λεπτομερώς το ήπαρ (4). Απορρίπτει την έως τότε πεποίθηση ότι το ήπαρ αποτελείται από τέσσερις ή πέντε ανεξάρτητους λοβούς και ότι αποτελεί την αφετηρία του φλεβικού συστήματος και την πεποίθηση του Γαληνού ότι η κάτω κοίλη φλέβα εκπορεύεται εκ του ήπατος.

Η έκδοση ενός τόσο ριζοσπαστικού βιβλίου είχε σαν αποτέλεσμα την εξέγερση της επιστημονικής κοινότητας και σφοδρές επιθέσεις εναντίον του Vesalius, τόσο από τους συναδέλφους του όσο και από την Εκκλησία. Ως αποτέλεσμα αυτών των πιέσεων ο Vesalius εγκατέλειψε την έδρα της ανατομικής στο πανεπιστήμιο της Πάδουα και άσκησε την ιατρική ως ιδιώτης, γρήγορα όμως η αξία του έργου του αναγνωρίστηκε.



**Εικόνα 4. Η σελίδα τίτλου του De corporis humani και αποσπάσματα από το βιβλίο: Απεικόνιση του συστήματος της πυλαίας φλέβας, και απεικόνιση της σπλαγχνικής επιφάνειας του ήπατος με τα χοληφόρα και τη χοληδόχο κύστη (4).**

Σημαντικό ορόσημο στη μελέτη του ήπατος αποτελεί και η δημοσίευση του “Anatomia Hepatis” από τον Francis Glasson (1597-1677) το 1654, η πρώτη ενδελεχής μονογραφία για την ανατομία του ήπατος. Ο Glasson περιέγραψε με λεπτομέρεια την κάψα που περιβάλλει το ήπαρ και τη δομή των ενδοηπατικών αιμοφόρων και χοληφόρων αγγείων. Προς τιμήν του, τόσο η κάψα του ήπατος όσο και η τριάδα αγγείων που παρατηρείται στα πυλαία διαστήματα πήραν το όνομά του. Μία εφεύρεση που χρονολογείται στα τέλη του 16<sup>ου</sup> αιώνα μ.Χ. ήρθε να ενισχύσει ακόμη περισσότερο τη μελέτη του ήπατος. Με τις προσπάθειες των Hans και Zacharias Jansen, του Hans Lippershey, του Galileo Galilei και του Antoni van Leeuwenhoek κατέστη δυνατή η μικροσκοπική παρατήρηση δομών του ανθρώπινου σώματος, ωστόσο ήταν ο Marcello Malpighi (1628-1694) που επινόησε βασικές μικροσκοπικές τεχνικές και εισήγαγε τη χρήση του μικροσκοπίου στην ανατομία. Ο Malpighi περιέγραψε την οργάνωση του ηπατικού παρεγχύματος σε ηπατικά λόβια και συνέλαβε την ιδέα της ηπατικής λοβιοκυψέλης. Παράλληλα, ο Malpighi κατόρθωσε να περιγράψει τη συμπύκνωση της χολής στη χοληδόχο κύστη, και να εντοπίσει την παραγωγή της στο ήπαρ και όχι στη χοληδόχο.

Τέλος, ένα από τα δίχως αμφιβολία σημαντικότερα βιβλία στο χώρο της μελέτης του ήπατος είναι το “Elementa physiologiae corporis humani” του Albert von Haller (1708-1777), που εκδόθηκε το 1764. Στον έκτο τόμο του συγγράμματος αυτού ο Haller ασχολείται με το ήπαρ συγκεντρώνοντας με κριτική ματιά όλη την υπάρχουσα γνώση γύρω από την ηπατολογία από την αρχαιότητα έως το μέσο του 18<sup>ου</sup> αιώνα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τόσο για την ηπατολογία όσο και για την ιατρική επιστήμη γενικότερα, τα τέλη του 18<sup>ου</sup> αιώνα και η αρχή του 19<sup>ου</sup> χαρακτηρίζονται

από την άνθηση των περιοδικών ιατρικών εκδόσεων που συνετέλεσαν στην ταχεία ανταλλαγή της ιατρικής γνώσης και την εν συνεχεία καταγιστική αύξηση της.

## **2. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ**

Το ήπαρ είναι το μεγαλύτερο συμπαγές όργανο του ανθρώπινου σώματος, κυμαινόμενο μεταξύ 1.4 Kg έως 1.6 Kg στις γυναίκες. Αποτελείται κυρίως από δύο λοβούς, το δεξιό και τον αριστερό, που χωρίζονται από το δρεπανοειδή σύνδεσμο και από δύο πολύ μικρότερους λοβούς, τον τετράπλευρο και τον κερκοφόρο. Μεταξύ του κερκοφόρου και του τετράπλευρου λοβού διακρίνεται περιοχή που καλείται πύλη του ήπατος και υποδέχεται την ηπατική αρτηρία, την πυλαία φλέβα και τα νεύρα του ήπατος, ενώ εξέρχονται από αυτή οι ηπατικοί πόροι και τα λεμφαγγεία του ήπατος (5, 6).

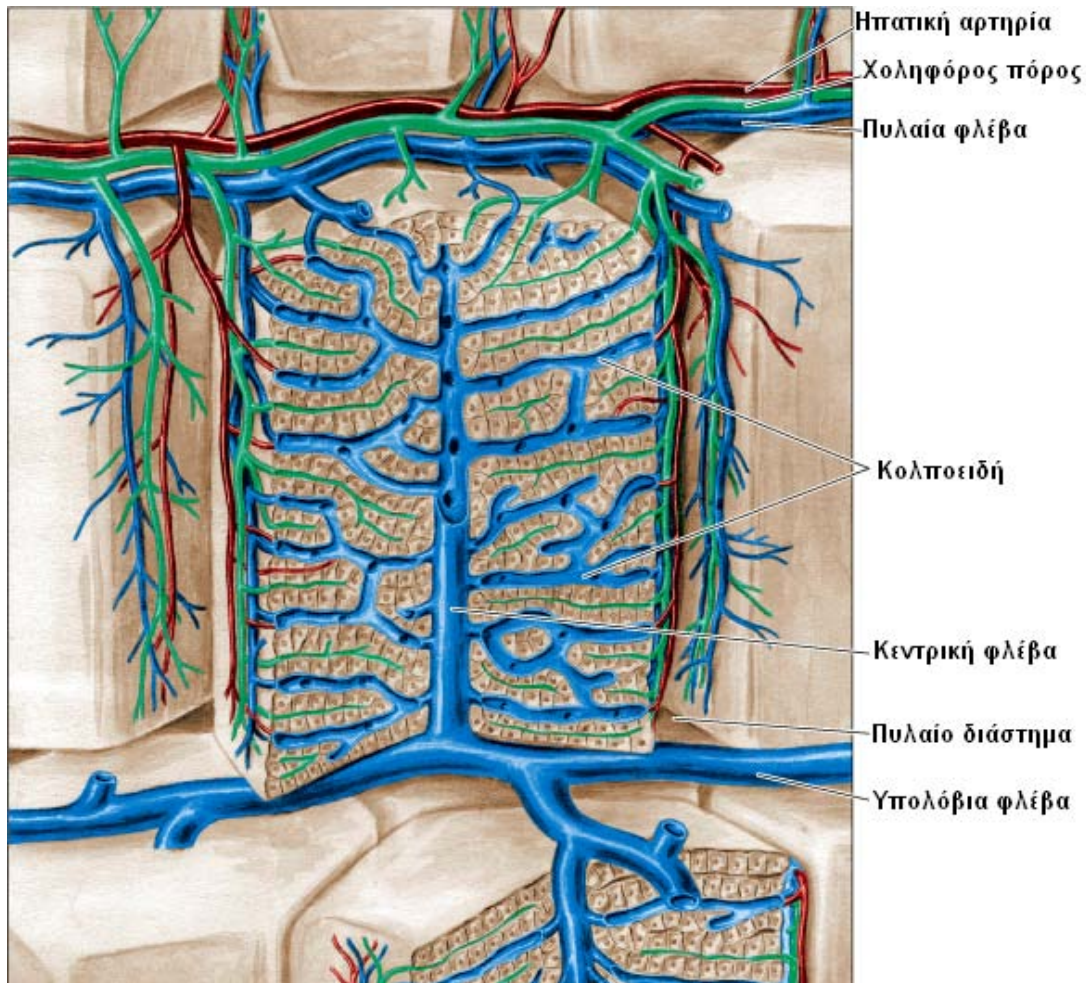
### **2.1 Ιστολογία του ήπατος**

#### **Στρώμα**

Το ήπαρ καλύπτεται από μία κάψα λεπτού συνδετικού ιστού (κάψα Glisson), η οποία γίνεται παχύτερη στην πύλη. Τα αγγεία και οι πόροι της πύλης περιβάλλονται από συνδετικό ιστό σε όλο το διάστημα μέχρι την κατάληξή τους στα πυλαία διαστήματα μεταξύ των κλασσικών ηπατικών λοβίων. Σε αυτό το σημείο σχηματίζεται ένα λεπτό πλέγμα δικτυωτών ινών που στηρίζει τα ηπατοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολλοειδών των ηπατικών λοβίων (7).

#### **Ηπατικό Λόβιο**

Το κύριο δομικό συστατικό του ήπατος είναι το ηπατικό κύτταρο ή ηπατοκύτταρο (8, 9). Αυτά τα επιθηλιακά κύτταρα είναι συγκεντρωμένα σε πετάλια τα οποία αλληλοσυνδέονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε σε τομές στο φωτομικροσκόπιο να παρουσιάζουν δομικές μονάδες που ονομάζονται κλασσικά ηπατικά λόβια (Εικόνα 5).

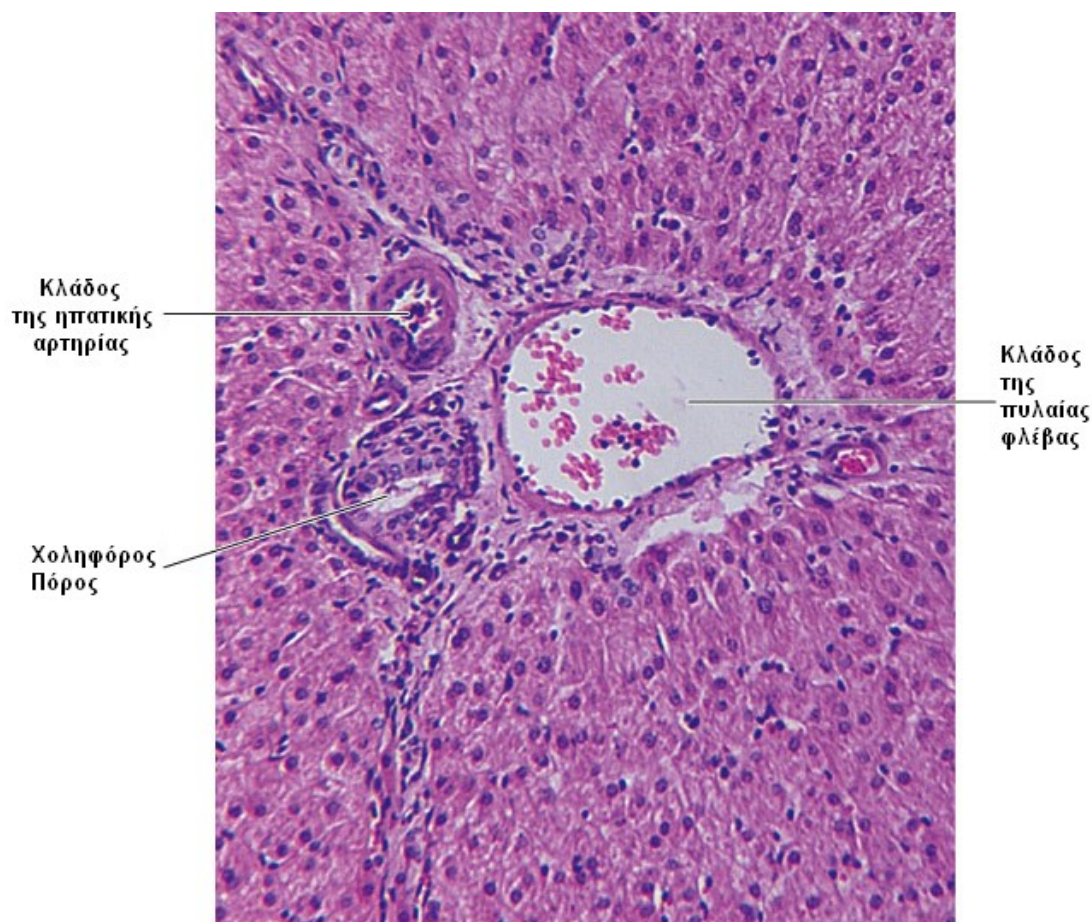


**Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση δομής ήπατος. Στο κέντρο απεικονίζεται το ηπατικό λόβιο με εκατέρωθεν πυλαία διαστήματα (7).**

Το ηπατικό λόβιο σχηματίζει μία πολυγωνική μάζα ιστού με διαστάσεις περίπου  $0,7 \times 2 \text{ mm}$ . Σε ορισμένα ζώα (π.χ. στο χοίρο), τα λόβια χωρίζονται μεταξύ τους με μία στιβάδα συνδετικού ιστού. Αυτό δεν συμβαίνει στους ανθρώπους όπου τα λόβια βρίσκονται σε στενή επαφή στο μεγαλύτερο μέρος της έκτασής τους. Αυτό προκαλεί δυσκολίες στον ακριβή καθορισμό των ορίων μεταξύ των διαφόρων λοβίων. Σε ορισμένες περιοχές, όμως, τα λόβια διαχωρίζονται από συνδετικό ιστό, που περιέχει χοληφόρους πόρους, λεμφαγγεία, νεύρα και αιμοφόρα αγγεία. Αυτές οι περιοχές, τα πυλαία διαστήματα, βρίσκονται στις γωνίες των ηπατικών λοβίων και καταλαμβάνονται από τις πυλαίες τριάδες (Εικόνα 6). Το ανθρώπινο ήπαρ περιέχει 3-6 πυλαίες τριάδες σε κάθε λόβιο, η κάθε μία εκ των οποίων περιλαμβάνει ένα



φλεβίδιο (κλάδο της πυλαίας φλέβας), ένα αρτηρίδιο (κλάδο της ηπατικής αρτηρίας)  
ένα πόρο (μέρος του συστήματος του χοληφόρου πόρου) και λεμφικά αγγεία.

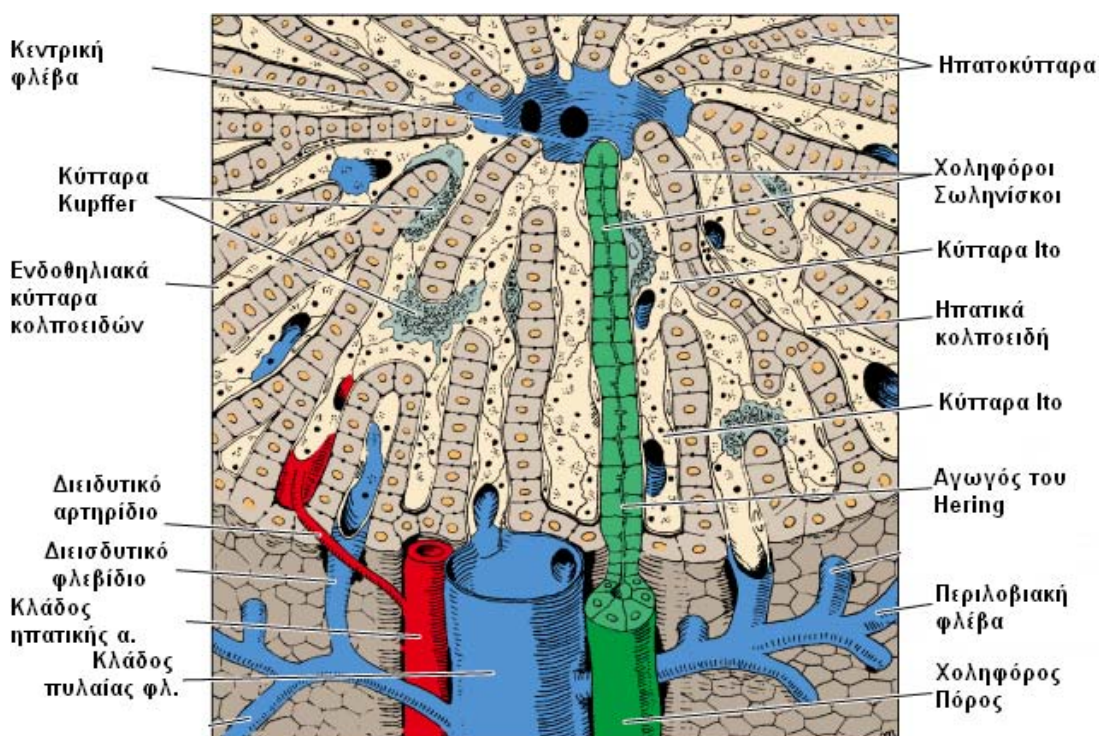


**Εικόνα 6. Πυλαίο διάστημα όπου διακρίνονται αρτηρίδιο, φλεβίδιο και χοληφόρος πόρος. Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (7).**

Το φλεβίδιο είναι συνήθως η μεγαλύτερη από τις δομές και περιέχει αίμα που έρχεται από την άνω και κάτω μεσεντέριο και τη σπληνική φλέβα. Το αρτηρίδιο περιέχει αίμα από το κοιλιακό στέλεχος της αορτής. Ο πόρος επενδύεται από κυβοειδές επιθήλιο, μεταφέρει χολή από τα παρεγχυματικά κύτταρα (ηπατοκύτταρα) και τελικά αδειάζει στον ηπατικό πόρο. Ένα ή περισσότερα λεμφοφόρα μεταφέρουν λέμφο, η οποία τελικά εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος. Όλες αυτές οι δομές περικλείονται μέσα σε ένα έλυτρο συνδετικού ιστού.



Τα ηπατοκύτταρα έχουν ακτινωτή διάταξη μέσα στο ηπατικό λόβιο (Εικόνα 7). Σχηματίζουν μία στοιβάδα με πάχος ένα ή δύο κύτταρα με τρόπο παρόμοιο με των πλίνθων τοιχοποιίας. Αυτά τα κυτταρικά πετάλια κατευθύνονται από την περιφέρεια του λοβίου προς το κέντρο του και αναστομώνονται με ακαθόριστο τρόπο σχηματίζοντας έτσι μία λαβυρινθώδη και σπογγοειδή δομή.



**Εικόνα 7.** Τρισδιάστατη όψη φυσιολογικού ήπατος. Απεικονίζεται η ακτινωτή διάταξη των στοιχών των ηπατοκυττάρων με τα ενδιάμεσα κολποειδή. Επίσης απεικονίζεται η θέση και η μορφολογία των λιποαποταμιευτικών κυττάρων και των κυττάρων Kupffer (7).

Το διάστημα μεταξύ αυτών των πεταλίων περιέχει τριχοειδή, τα κολποειδή του ήπατος. Τα κολποειδή είναι διασταλμένα αγγεία με ακανόνιστο τρόπο και αποτελούνται μόνο από ασυνεχή στοιβάδα θυριδωτών ενδοθηλιακών κυττάρων. Σε αυτά τα αγγεία δεν υπάρχουν διαφράγματα ανάμεσα στις θυρίδες, ούτε βασικός υμένας. Οι θυρίδες έχουν διάμετρο 100 nm και είναι συναγμένες σε αθροίσματα ώστε να σχηματίζουν «διάτρητες πλάκες».

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα χωρίζονται από τα υποκείμενα ηπατοκύτταρα με ένα υπενδοθηλιακό διάστημα που είναι γνωστό ως χώρος του Disse, ο οποίος περιέχει μερικές δικτυωτές ίνες και μικρολάχνες ηπατοκυττάρων. Κατά συνέπεια, τα άμορφα στοιχεία του αίματος διηθούνται εύκολα μέσα από τα ενδοθηλιακά τοιχώματα και έρχονται σε στενή επαφή με την επιφάνεια του ηπατοκυττάρου. Εξάλλου έτσι επιτρέπεται εύκολη ανταλλαγή μακροφάγων από τον αυλό των κολποειδών προς τα ηπατικά κύτταρα και αντίστροφα. Αυτό από λειτουργική άποψη είναι σημαντικό γιατί όχι μόνο εκκρίνεται από τα ηπατοκύτταρα προς το αίμα ένας μεγάλος αριθμός μακρομορίων (π.χ. λιποπρωτεΐνες, λευκωματίνη, ινωδογόνο) αλλά γιατί το ήπαρ προσλαμβάνει και καταβολίζει πολλά από αυτά τα μόρια. Τα κολποειδή περιβάλλονται και στηρίζονται από ένα εξαιρετικά λεπτό πλέγμα δικτυωτών ινών. Εκτός από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κολποειδή περιέχουν επίσης φαγοκύτταρα της μονοκυτταρικής-φαγοκυτταρικής σειράς, γνωστά ως κύτταρα Kupffer. Αυτά τα κύτταρα βρίσκονται στην επιφάνεια του αυλού των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα κύτταρα Kupffer έχουν ιδιαίτερα κυτταρολογικά χαρακτηριστικά, όπως διαυγή κενοτόπια, λυσοσωμάτια και διάσπαρτο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο μέσα στο κυτταρόπλασμα.

Μέσα στο χώρο του Disse, βρίσκονται εντοπισμένα και τα λιποαποταμιευτικά κύτταρα (κύτταρα Ito), τα οποία είναι αστεροειδή κύτταρα που έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν την εξωγενώς χορηγούμενη βιταμίνη Α με τη μορφή εστέρων ρετινόλης μέσα σε σταγονίδια λιπιδίων.

Τα κολποειδή ξεκινούν από την περιφέρεια του ηπατικού λοβίου, ενισχύονται από τα φλεβίδια που διεισδύουν εκεί και αποτελούν τελικούς κλάδους της πυλαίας φλέβας. Ενισχύονται επίσης από τα ηπατικά αρτηρίδια και κατόπιν κατευθύνονται στο κέντρο του λοβίου όπου εκβάλλουν στην κεντρική φλέβα.

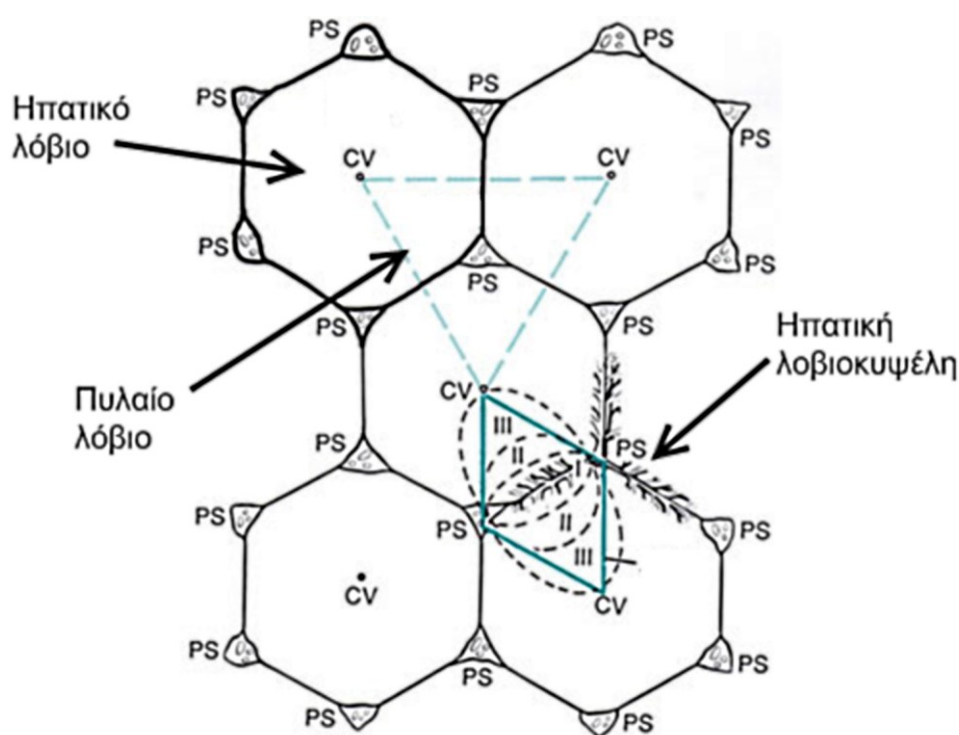
## Αιμάτωση του ήπατος

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του ήπατος είναι ότι έχει δύο προσαγωγούς αιμοφόρους οδούς: 1) την πυλαία φλέβα, η οποία σχηματίζεται από την σπληνική φλέβα, την άνω και κάτω μεσεντέριο, την αριστερή γαστρική, τις βραχείες γαστρικές και τις παραομφάλιες φλέβες και φέρει αίμα πλούσιο σε θρεπτικές ουσίες και πτωχό σε οξυγόνο από τα κοιλιακά σπλάγχνα και 2) την ηπατική αρτηρία, η οποία αποτελεί κλάδο της κοιλιακής αρτηρίας (τρίπους του Haler) και φέρει αίμα πλούσιο σε οξυγόνο. Υπολογίζεται ότι η πυλαία φλέβα προσφέρει το 70% της αιματικής ροής και το 40% του απαιτούμενου οξυγόνου, ενώ η ηπατική αρτηρία συνεισφέρει το 30% της αιματικής ροής και το 60% του οξυγόνου (10).

Η πυλαία φλέβα διακλαδίζεται κατ' επανάληψη και στέλνει μικρά φλεβίδια, τα πυλαία φλεβίδια, στις πυλαίες τριάδες. Αυτά ορισμένες φορές καλούνται μεσολόβιοι κλάδοι. Τα πυλαία φλεβίδια διακλαδίζονται σε περιλοβιακές φλέβες (φλέβες κατανομής), οι οποίες πορεύονται στην περιφέρεια του λοβίου. Από τις περιλοβιακές φλέβες μικρά διεισδυτικά φλεβίδια εκβάλλουν στα κολποειδή. Τα κολποειδή έχουν ακτινωτή πορεία και συγκλίνουν στο κέντρο του λοβίου για να σχηματίσουν την κεντρική ή κεντρολόβια φλέβα. Αυτά τα αγγεία έχουν λεπτά τοιχώματα, τα οποία αποτελούνται μόνο από ενδοθηλιακά κύτταρα που στηρίζονται σε ένα αραιό πληθυσμό κολλαγόνων ινών. Καθώς η κεντρική φλέβα προχωρά στο λόβιο δέχεται όλο και περισσότερα κολποειδή και σταδιακά αυξάνει σε διάμετρο. Στο τέλος εγκαταλείπει το λόβιο όταν φτάνει στη βάση του και υποκαθίσταται από τη μεγάλη υπολόβια φλέβα. Οι υπολόβιες φλέβες βαθμηδόν συγκλίνουν και συγχωνεύονται σχηματίζοντας τις δύο ή περισσότερες μεγάλες ηπατικές φλέβες, οι οποίες εκβάλλουν στην κάτω κοίλη φλέβα.

Η ηπατική αρτηρία διακλαδίζεται συνεχώς και σχηματίζει τις μεσολόβιες αρτηρίες. Μερικές αρδεύουν τις δομές των πυλαίων πόρων και άλλες εκβάλλουν στα κολποειδή σε ποικίλες αποστάσεις από τα πυλαία διαστήματα, πραγματοποιώντας την ανάμιξη του αρτηριακού και του πυλαίου φλεβικού αίματος στα κολποειδή.

Σύμφωνα με τον Kiernan, που θεωρεί το κλασικό ηπατικό λόβιο τη βασική λειτουργική μονάδα του ήπατος, το αίμα ρέει από την περιφέρεια προς το κέντρο του κλασικού ηπατικού λοβίου (8). Συνεπώς το οξυγόνο, οι μεταβολίτες, καθώς και οι άλλες τοξικές και μη ουσίες που απορροφώνται στο έντερο, φτάνουν πρώτα στα κύτταρα της περιφέρειας και μετά στα κεντρικά κύτταρα του λοβίου (Εικόνα 8). Αυτό εξηγεί μερικώς, γιατί η κυτταρική και φυσιολογική συμπεριφορά των περιλόβιων κυττάρων είναι διαφορετική από αυτή των κεντρολοβίων κυττάρων.



**Εικόνα 8.** Σχηματικό σχεδιάγραμμα που απεικονίζει τις περιοχές του καθιερωμένου ηπατικού λοβίου, της ηπατικής λοβιοκυψέλης και του πυλαίου λοβίου. Το κλασικό ηπατικό λόβιο είναι εξαγωνικό με μία κεντρική φλέβα στο κέντρο του. Το πυλαίο λόβιο είναι τριγωνικό, αφοριζόμενο από τρεις γειτονικές κεντρικές φλέβες με ένα πυλαίο διάστημα στο κέντρο του. Η ηπατική λοβιοκυψέλη προσεγγίζει το σχήμα ρόμβου. CV: κεντρική φλέβα, PS: πυλαίο διάστημα (11).

Αντίθετα σύμφωνα με τον Mall, ως βασική λειτουργική μονάδα του ήπατος μπορεί να θεωρηθεί το πυλαίο λόβιο, το οποίο έχει στο κέντρο του την πυλαία τριάδα και στην περιφέρεια τις περιοχές των γειτονικών ηπατικών λοβίων (12). Όλα αυτά τα λόβια διοχετεύουν τη χολή στο χοληφόρο πόρο της κεντρικής πυλαίας τριάδας. Ένα πυλαίο λόβιο θα είναι τριγωνικό με τις τρεις γωνίες του να ορίζονται από κεντρικές φλέβες τριών κλασικών ηπατικών λοβίων (Εικόνα 8). Η κατεύθυνση της ροής του αίματος είναι από το κέντρο προς της περιφέρεια, ενώ της χολής από την περιφέρεια προς το κέντρο.

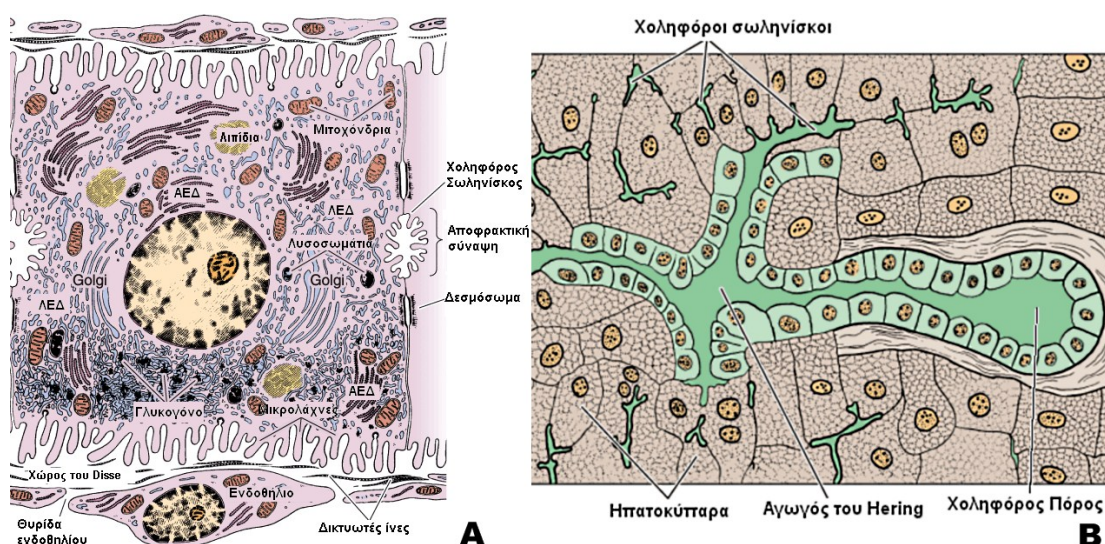
Τέλος, ως βασική λειτουργική μονάδα του ήπατος θα μπορούσε να θεωρηθεί η περιοχή που αρδεύεται από ένα τελικό κλάδο της περιλοβιακής φλέβας. Η περιοχή αυτή καλείται ηπατική λοβιοκυψέλη και περιγράφηκε από τους Rappaport et al (13). Η ηπατική λοβιοκυψέλη είναι ρομβοειδής και στο κέντρο της φέρει εκτός από τελικούς κλάδους της πυλαίας φλέβας, ένα μικρό κλάδο της ηπατικής αρτηρίας και ένα μικρό χοληφόρο πόρο (Εικόνα 8). Ανάλογα με την απόσταση από τις περιλοβιακές φλέβες, τα κύτταρα της ηπατικής λοβιοκυψέλης κατατάσσονται σε ζώνες. Η ζώνη 1 περιλαμβάνει τα ηπατοκύτταρα που βρίσκονται εγγύτερα στο αγγείο και έρχονται πρώτα σε επαφή με το αίμα της πυλαίας φλέβας και της ηπατικής αρτηρίας, ενώ η ζώνη 3 περιλαμβάνει τα κύτταρα που βρίσκονται στη μεγαλύτερη απόσταση και έρχονται τελευταία σε επαφή με το αίμα από την πυλαία φλέβα και την ηπατική αρτηρία. Σε ενδιάμεση θέση βρίσκονται τα κύτταρα της ζώνης 2.

Η έρευνα για ένα επιτυχημένο μοντέλο της λειτουργικής μονάδας του ήπατος συνεχίζεται μέχρι τις ημέρες μας με αρκετούς ερευνητές να προτείνουν τροποποιήσεις του μοντέλου του Rappaport (14-16). Ωστόσο το κυρίαρχο σήμερα μοντέλο που περιγράφει τη λειτουργική δομική μονάδα του ήπατος είναι αυτό που προτάθηκε από τους Matsumoto *et al.* και περιγράφει το πρωτογενές λόβιο (14).



## Το σύστημα των χοληφόρων

Το πρώτο μέρος του συστήματος των χοληφόρων αποτελείται από τους χοληφόρους σωληνίσκους. Ένας χοληφόρος σωληνίσκος είναι ένας σωληνοειδής χώρος με διάμετρο 1-2  $\mu\text{m}$  που αφορίζεται μόνο από τις κυτταρικές μεμβράνες δύο γειτονικών ηπατοκυττάρων και έχει ένα μικρό αριθμό μικρολαχνών στο εσωτερικό του (Εικόνα 9Α). Οι κυτταρικές μεμβράνες κοντά σε αυτούς τους σωληνίσκους είναι στενά συνδεδεμένες με αποφρακτικές συνάψεις. Οι χοληφόροι σωληνίσκοι σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα αναστομούμενου δικτύου που προωθείται κατά μήκος των πεταλίων του ηπατικού λοβίου και που καταλήγει στην περιοχή των πυλαίων πόρων. Η ροή της χολής προωθείται με αντίθετη φορά από την αιματική ροή, δηλαδή από το κέντρο του κλασικού ηπατικού λοβίου προς την περιφέρεια. Στην περιφέρεια η χολή εισέρχεται στους χοληφόρους αγωγούς ή αγωγούς του Hering, οι οποίοι αποτελούνται από κυβοειδή κύτταρα με διαυγές κυτταρόπλασμα και ελάχιστα οργάνδια. Μετά από σύντομη πορεία, οι χοληφόροι αγωγοί διασχίζουν τα οριακά ηπατοκύτταρα του λοβίου και εκβάλλουν στους χοληφόρους πόρους της πυλαίας τριάδας (Εικόνα 9Β).



**Εικόνα 9. Α: Σχηματική απεικόνιση ηπατοκυττάρου. Στα πλάγια τοιχώματά του διακρίνονται οι χοληφόροι σωληνίσκοι. Β: Απεικόνιση της συρροής των χοληφόρων σωληνίσκων προς τους αγωγούς του Hering και εν συνεχεία τους χοληφόρους πόρους (7).**

Οι χοληφόροι πόροι επενδύονται από ένα κυβοειδές ή κυλινδρικό επιθήλιο και περιβάλλονται από έλυτρο συνδετικού ιστού. Σταδιακά διευρύνονται και συγχωνεύονται σχηματίζοντας το δεξιό και τον αριστερό ηπατικό πόρο, που στη συνέχεια εξέρχονται του ήπατος.

## **2.2 Στοιχεία φυσιολογίας και παθοφυσιολογίας του ήπατος**

Το ήπαρ έχει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπιδίων, ενώ έχει επίσης ως βασική λειτουργία το μεταβολισμό της χολερυθρίνης, ορμονών και φαρμάκων.

### **A. Μεταβολισμός υδατανθράκων**

Σημαντικές λειτουργίες του μεταβολισμού των υδατανθράκων επισυμβαίνουν στον ήπαρ, με απώτερο αποτέλεσμα τη διατήρηση σταθερών επιπέδων γλυκόζης αίματος ακόμη και σε περιόδους νηστείας.

Οι βασικές λειτουργίες του ήπατος όσον αφορά στο μεταβολισμό των υδατανθράκων μπορούν να διαιρεθούν σε:

1. λειτουργίες παραγωγής γλυκόζης, που περιλαμβάνουν τη μετατροπή του γλυκογόνου σε γλυκόζη (γλυκογονόλυση) και τη σύνθεση της γλυκόζης από μη υδατανθρακικές ουσίες (γλυκονεογένεση).
2. λειτουργίες αποθήκευσης γλυκόζης με τη μορφή του γλυκογόνου (γλυκογονογένεση) και
3. μεταβολισμός των υπόλοιπων εξοζών (κυρίως της φρουκτόζης).

Η φυσιολογική λειτουργία του ήπατος εξασφαλίζει ότι ακόμη και σε περιόδους νηστείας τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα δεν παρουσιάζουν πολύ σημαντικές διακυμάνσεις. Το ήπαρ σε περιόδους νηστείας παράγει γλυκόζη είτε μέσω γλυκογονόλυσης, από την οποία προκύπτει το 75% της απελευθερούμενης γλυκόζης,

είτε μέσω γλυκονεογένεσης. Εφόσον η περίοδος νηστείας είναι παρατεταμένη εξαντλούνται τα αποθέματα γλυκογόνου του ήπατος (70-80 g) και η γλυκόζη παράγεται μέσω γλυκονεογένεσης από γαλακτικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ, αλανίνη και γλυκερόλη. Αντίθετα, τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης αίματος μετά από σίτιση εξισορροπούνται από το ήπαρ με τη μετατροπή ενός μεγάλου ποσοστού της απορροφούμενης γλυκόζης σε γλυκογόνο και την αναστολή της γλυκογονόλυσης. Υπογλυκαιμία γενικά συμβαίνει σε οξείες παθήσεις του ήπατος όπως επίσης και σε σπάνιες περιπτώσεις αρρώστων με κίρρωση ή με καρκίνωμα του ήπατος. Τα πιθανά αίτια ηπατογενούς υπογλυκαιμίας είναι η μειωμένη σύνθεση και ο καταβολισμός του γλυκογόνου και η μειωμένη γλυκονεογένεση. Σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ενδέχεται η υπογλυκαιμία να οφείλεται και σε ινσουλινομιμητικές ουσίες που παράγονται από τον όγκο.

Παράλληλα, δεν είναι σπάνια η εμφάνιση υπεργλυκαιμίας σε ηπατοπάθειες. Σε άτομα με ηπατικές παθήσεις μπορεί να παρατηρούνται μεγάλες διακυμάνσεις των επιπέδων γλυκόζης, με συχνή εμφάνιση υπεργλυκαιμιών που ενίοτε μπορεί να συνοδεύονται από αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης. Οι μηχανισμοί που έχουν ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη υπεργλυκαιμίας σε ηπατοπαθείς περιλαμβάνουν την ανεπάρκεια καλίου, τη μείωση του ηπατικού παρεγχύματος και τη μειωμένη ικανότητα αποθήκευσης και σύνθεσης γλυκογόνου, η αυξημένη έκκριση γλυκαγόνης, κορτιζόλης και αυξητικής ορμόνης και η περιφερική αντίσταση στην ινσουλίνη. Η περιφερική αντίσταση στην ινσουλίνη έχει αποδοθεί με πρόσφατες έρευνες στη διαταραχή των αδιποκινών που παρατηρείται στις ηπατοπάθειες, όπως είναι η μειωμένη παραγωγή αδιπονεκτίνης.

## B. Μεταβολισμός των λιπιδίων- λιποπρωτεϊνών

Τα κυριότερα λιπίδια που κυκλοφορούν στο πλάσμα είναι η χοληστερόλη, τα φωσφολιπίδια και τα τριγλυκερίδια. Εξαιτίας του υδρόφοβου χαρακτήρα τους, η



μεταφορά τους στο πλάσμα γίνεται μέσω των λιποπρωτεϊνών. Οι λιποπρωτεΐνες συντίθενται σχεδόν αποκλειστικά στο ήπαρ. Οι τρεις κύριες τάξεις των λιποπρωτεϊνών είναι: οι λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), οι οποίες περιέχουν υψηλή συγκέντρωση τριγλυκεριδίων και μέτρια συγκέντρωση φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης, οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL), οι οποίες περιέχουν σχετικά λίγα τριγλυκερίδια, αλλά υψηλή συγκέντρωση χοληστερόλης και τέλος οι λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL), οι οποίες περιέχουν περίπου 50% πρωτεΐνη και μικρότερη συγκέντρωση λιπιδίων (17).

Ο ρόλος του ήπατος στο μεταβολισμό των λιπιδίων εκτείνεται πέραν της σύνθεσης των λιποπρωτεϊνών, αφού αν και όλα γενικά τα κύτταρα του οργανισμού μεταβολίζουν τα λίπη, συγκεκριμένες φάσεις του μεταβολισμού των λιπιδίων επιτελούνται κυρίως στο ήπαρ. Αυτές περιλαμβάνουν τη βήτα οξείδωση των λιπών σε ακέτυλο-CoA, τη σύνθεση λιπιδίων από υδατάνθρακες και πρωτεΐνες και τη σύνθεση άλλων λιπιδίων από τα λιπαρά οξέα, και ειδικότερα χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων.

Ειδικότερα, όταν οι εισερχόμενες στον οργανισμό ποσότητες υδατανθράκων είναι περισσότερες από αυτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα για την παραγωγή ενέργειας ή για την αποθήκευση με τη μορφή γλυκογόνου, η περίσσεια μετατρέπεται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ σε τριγλυκερίδια και αποθηκεύεται στο λιπώδη ιστό (18).

Επιπρόσθετα, το ήπαρ είναι η κύρια πηγή ενδογενούς χοληστερόλης, ιδιαιτέρως της ενδογενούς χοληστερόλης που κυκλοφορεί με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος. Μέσω του ήπατος η μη μεμβρανική χοληστερόλη χρησιμοποιείται στο μεγαλύτερο ποσοστό της στη σύνθεση χολικών οξέων, τα οποία συνενούμενα με γλυκίνη και ταυρίνη σχηματίζουν τα χολικά άλατα. Τα χολικά άλατα παίζουν σπουδαίο ρόλο στη

γαλακτωματοποίηση των λιπιδίων στο έντερο και διευκολύνουν την πέψη και την απορρόφησή τους.

Σε παθήσεις του ήπατος είναι επόμενο να παρατηρούνται διαταραχές στα επίπεδα των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Χαρακτηριστικά σε αποφρακτικό ίκτερο παρατηρείται αύξηση των επιπέδων χοληστερόλης στο πλάσμα, ιδίως της ελεύθερης χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων, ενώ συχνά ανευρίσκεται αυξημένη μία λιποπρωτεΐνη που καλείται λιποπρωτεΐνη X, η οποία είναι πλούσια σε φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη και φτωχή σε τριγλυκερίδια και εστέρες χοληστερόλης (19).

Ακόμη σε ηπατοπάθειες παρατηρείται διαταραχή στη φυσιολογική σύνθεση και έκκριση τριγλυκεριδίων, που έχει σαν αποτέλεσμα τη μεγάλη συνάθροιση τριγλυκεριδίων στα ηπατοκύτταρα. Η συνάθροιση περιγράφεται ως λιπώδης διήθηση του ήπατος. Οι μηχανισμοί μέσα από τους οποίους μπορεί να προκύψει η αυξημένη αυτή εναπόθεση τριγλυκεριδίων στα ηπατοκύτταρα είναι: η αυξημένη κινητοποίηση λιπαρών οξέων από το λιπώδη ιστό ή η αυξημένη πρόσληψη λιπιδίων με την τροφή, η αυξημένη σύνθεση λιπαρών οξέων, η μειωμένη οξείδωση λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια του ηπατοκυττάρου, και η μειωμένη απέκκριση τριγλυκεριδίων με τη μορφή λιποπρωτεϊνών λόγω αναστολής στη σύνθεση αποπρωτεϊνών ή μη επαρκούς σύνθεσης αποπρωτεϊνών. Συντονιστικό ρόλο σε αυτές τις διαδικασίες φαίνεται πως έχουν οι αδιποκίνες, οι οποίες ασκούν ορμονικές δράσεις που ρυθμίζουν την κατανομή των ενεργειακών αποθεμάτων του οργανισμού ενώ διαταραχές των επιπέδων λεπτίνης και αδιπονεκτίνης έχουν ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη λιπώδους διήθησης σε διάφορες ηπατοπάθειες (18, 20).

Οι κυριότερες κλινικές καταστάσεις στις οποίες μπορεί να παρατηρηθεί λιπώδης διήθηση του ήπατος είναι: ο αλκοολισμός, η παχυσαρκία και το μεταβολικό

σύνδρομο, ο σακχαρώδης διαβήτης, η χρόνια ηπατίτιδα C, η κύηση, το σύνδρομο Cushing και διάφορα φάρμακα και χημικές ουσίες όπως οι τετρακυκλίνες, ο CCl<sub>4</sub>, ο φωσφόρος κλπ (19).

### Γ. Μεταβολισμός των πρωτεϊνών

#### Αμινοξέα

Το ήπαρ αποτελεί το κυριότερο όργανο του ενδιάμεσου μεταβολισμού των αμινοξέων. Εκεί γίνεται απαμίνωση και/ή τρανσαμίνωση των αμινοξέων καθώς και η σύνθεση πρωτεϊνών από τα αμινοξέα. Τρανσαμίνωση είναι η μεταφορά μιας α-αμινοομάδας από ένα αμινοξύ (π.χ. ασπαραγινικό οξύ) σε ένα κετοξύ, συνήθως το α-κετογλουταρικό οξύ. Απαμίνωση (οξειδωτική απαμίνωση) είναι η περαιτέρω διάσπαση των αμινοξέων μετά την τρανσαμίνωση προς αμμωνία. Στη διάρκεια του μεταβολισμού των αμινοξέων παράγεται αμμωνία που είναι πολύ τοξική για τα κύτταρα του οργανισμού. Το ήπαρ, σχεδόν αποκλειστικά, μετατρέπει την αμμωνία σε ουρία που δεν είναι τοξική μέσα από τον κύκλο των Krebs-Henseleit. Σε περιπτώσεις βαριάς ηπατικής βλάβης μειώνεται η σύνθεση ουρίας με συνέπεια αύξηση των επιπέδων της αμμωνίας του αίματος.

#### Πρωτεΐνες

Το ήπαρ είναι το σημείο όπου παράγονται οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες του ορού. Η λευκωματίνη παράγεται σε μεγάλα ποσά. Αυτή χρησιμεύει για τη μεταφορά οργανικών ανιόντων και κατιόντων, ορμονών, τρυπτοφάνης, λιπαρών οξέων και χολερυθρίνης, καθώς επίσης συμμετέχει σχεδόν αποκλειστικά και στη ρύθμιση της κολλοειδωσμοτικής πίεσης του πλάσματος.

Η ημερήσια σύνθεση λευκωματίνης είναι 120-200 mg/kg βάρους σώματος. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι 17-20 ημέρες και η συνολική ποσότητά της κυμαίνεται από

3.5-5 g/kg βάρους σώματος από τα οποία περίπου 40% κυκλοφορούν στο αίμα. Σε καταστάσεις απώλειας λευκώματος η σύνθεσή της μπορεί να αυξηθεί 2 έως 3 φορές.

Η σύνθεση της λευκωματίνης στα πολυριβοσώματα των ηπατοκυττάρων φαίνεται ότι αρχίζει από τη σύνθεση μιας πρόδρομης ουσίας, της προλευκωματίνης. Η ικανότητα του ήπατος για σύνθεση λευκωματίνης αυξάνεται όταν μειώνεται η κολλοειδωσμοτική πίεση του πλάσματος.

Στο ήπαρ επίσης παράγονται και αρκετοί από τους παράγοντες πήξης του αίματος όπως το ινωδογόνο, η προθρομβίνη και οι παράγοντες V, VII, VIII, IX, X, XI, XII και XIII. Η σύνθεση των παραγόντων II, VII, IX και X προϋποθέτει τη φυσιολογική απορρόφηση της λιποδιαλυτής βιταμίνης K. Η βιταμίνη K είναι απαραίτητος παράγων για τη μεταμεταφραστική τροποποίηση των παραγόντων II, VII, IX και X από τη γ-γλουταμυλ-καρβοξυλάση, η οποία προσθέτει μία καρβοξυλική ομάδα στις ρίζες γλουταμικού οξέος των παραγόντων αυτών με ταυτόχρονη οξείδωση της βιταμίνης K. Σε καταστάσεις στις οποίες υπάρχει σημαντική ηπατοκυτταρική καταστροφή τα επίπεδα των παραγόντων II, V, VII, IX και X είναι μειωμένα.

Άλλες πρωτεΐνες που συντίθενται στο ήπαρ είναι η τρανσφερίνη (β-σφαιρίνη), η σερουλοπλασμίνη (α<sub>2</sub>-σφαιρίνη), η α-1-αντιθρυψίνη (α<sub>1</sub>-σφαιρίνη), η φερριτίνη (β-σφαιρίνη), η απτοσφαιρίνη (α<sub>2</sub>-σφαιρίνη), οι λιποπρωτεΐνες (α<sub>1</sub>-σφαιρίνη και β-σφαιρίνη), αιμοπηκτίνη (β-σφαιρίνη).

Σε βλάβες του ήπατος παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης στο πλάσμα ορισμένων πρωτεϊνών όπως ινωδογόνο, απτοσφαιρίνες, C- αντιδρώσα πρωτεΐνη, α-1-αντιθρυψίνη κ.α.

#### Δ. Μεταβολισμός φαρμάκων και ορμονών

Το ήπαρ είναι το κυριότερο όργανο όπου γίνεται αδρανοποίηση πάρα πολλών εξωγενών ουσιών (τοξινών ή φαρμάκων) και ενδογενών ουσιών (ορμονών).

Ο μεταβολισμός αυτών των ουσιών γίνεται στα μιτοχόνδρια, στο κυτταρόπλασμα και στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο. Το λείο ενδοπλασματικό δίκτυο αποτελεί το σημείο όπου γίνεται ο μεταβολισμός των περισσότερων ουσιών. Μεταξύ των ενζύμων του λείου ενδοπλασματικού δικτύου ή συστήματος μικροσωματίων που παίρνουν μέρος στο μεταβολισμό των ουσιών αυτών είναι το κυτόχρωμα P-450, τα ένζυμα της φλαβίνης, εστεράσες και τρανσφεράσες. Οι μεταβολικοί δρόμοι αδρανοποίησης των διάφορων ουσιών μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ο μεταβολισμός γίνεται με οξείδωση (κυτόχρωμα P-450), αναγωγή (ένζυμα φλαβίνης) και υδρόλυση (εστεράσες). Στη δεύτερη κατηγορία γίνεται κυρίως σύζευξη (με γλυκουρονικό οξύ ή θειικά άλατα), μεθυλίωση ή ακετυλίωση. Οι αντιδράσεις αυτές γίνονται με τη βοήθεια διάφορων τρανσφερασών, και μερικές από αυτές γίνονται στο κυτταρόπλασμα.

#### Καταβολισμός ορμονών

Οι ορμόνες που καταβολίζονται κυρίως στο ήπαρ είναι: ινσουλίνη, γλυκαγόνη, αυξητική ορμόνη, κορτικοστεροειδή, οιστρογόνα, προγεστερόνη, παραθορμόνη και εντερικά ορμονικά πεπτίδια.

Οι ορμόνες που δεν καταβολίζονται αποκλειστικά στο ήπαρ, αλλά και σε άλλους ιστούς περιλαμβάνουν: θυρεοειδικές ορμόνες, αντιδιουρητική ορμόνη, ωχρινοτρόπος ορμόνη, τεστοστερόνη, αλδοστερόνη, ωκυτοκίνη, θυρεοειδοτρόπος ορμόνη.

#### Καταβολισμός φαρμάκων

Τα περισσότερα φάρμακα αδρανοποιούνται ή μετατρέπονται στο ήπαρ σε μεταβολίτες που μπορεί να απεκκριθούν από τα χοληφόρα ή τους νεφρούς. Υπάρχουν όμως φάρμακα που στη διάρκεια του καταβολισμού τους στο ήπαρ μετατρέπονται σε τοξικούς μεταβολίτες, όπως η παρακεταμόλη. Ενώ υπάρχουν επίσης φάρμακα που

επηρεάζουν το μεταβολισμό άλλων φαρμάκων στο ήπαρ. Παραδειγματικά αναφέρεται η φαινοβαρβιτάλη, η οποία προκαλεί επαγωγή των ενζύμων του λείου ενδοπλασματικού δικτύου με αποτέλεσμα την αυξημένη αδρανοποίηση άλλων ουσιών.

#### Ε. Μεταβολισμός χολερυθρίνης

##### *Φυσιολογικές πηγές και σχηματισμός χολερυθρίνης*

Η ημερήσια παραγωγή χολερυθρίνης κυμαίνεται από 230-350 mg. Το μεγαλύτερο ποσοστό της χολερυθρίνης (περίπου 70-80%) προέρχεται από τον καταβολισμό της αιμοσφαιρίνης των γηρασμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων στα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (σπλήνας, ήπαρ, μυελός των οστών). Στο μεταβολισμό της αιμοσφαιρίνης το πρώτο βήμα είναι η αποδέσμευση και ο καταβολισμός της σφαιρίνης. Στη συνέχεια γίνεται οξείδωση του σιδηροπρωτοπορφυρινικού δακτυλίου από την οξυγενάση της αίμης με αποτέλεσμα την παραγωγή χολοπρασίνης. Επί της χολοπρασίνης δρα στη συνέχεια η αναγωγή της χολοπρασίνης με αποτέλεσμα την παραγωγή χολερυθρίνης. Το υπόλοιπο 20-30% της χολερυθρίνης προέρχεται: α) από τον καταβολισμό διαφόρων πρωτεϊνών και ενζύμων που περιέχουν αίμη όπως η μυοσφαιρίνη και τα μιτοχονδριακά ή μικροσωμιακά κυτοχρώματα, β) από την πρόιμη καταστροφή ερυθροκυττάρων είτε στο μυελό των οστών είτε αμέσως μετά την έξοδό τους στην κυκλοφορία.

##### *Μεταφορά χολερυθρίνης*

Η χολερυθρίνη μετά την παραγωγή της (μη συζευγμένη ή έμμεσος χολερυθρίνη) απελευθερώνεται στο πλάσμα όπου μεταφέρεται συνδεδεμένη με λευκωματίνη με δεσμό ισχυρής συγγένειας. Όταν υπάρχει περίσσεια τέτοιας χολερυθρίνης τότε συνδέεται και δεύτερο μόριο χολερυθρίνης σε άλλο σημείο του μορίου της

λευκωματίνης. Για τη θέση σύνδεσης αυτή είναι δυνατό να συναγωνιστούν τη χολερυθρίνη και άλλες ουσίες που μεταφέρονται με λευκωματίνη όπως είναι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, οι σουλφοναμίδες, τα παράγωγα πενικιλλίνης, τα σαλικυλικά, η φαινυλβουταζόνη, διάφορα σκιαγραφικά και η φουροσεμίδη. Η μη συζευγμένη χολερυθρίνη είναι αδιάλυτη στο νερό και έχει την ικανότητα να διαπερνά κυτταρικές μεμβράνες όπως ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός. Η συζευγμένη χολερυθρίνη, που είναι διαλυτή στο νερό, μπορεί επίσης να μεταφερθεί με τη λευκωματίνη, αλλά ο δεσμός συγγενείας αυτός φαίνεται ότι είναι λιγότερο ισχυρός. Το γεγονός αυτό εξηγεί και την παρατήρηση ότι ένα μικρό ποσοστό συνδεδεμένης χολερυθρίνης που δε μεταφέρεται στο πλάσμα συνδεδεμένο με λευκωματίνη διηθείται στο νεφρικό σπείραμα. Αυτό αποτελεί περίπου το 1% της συνολικής συζευγμένης χολερυθρίνης στους ικτερικούς ασθενείς.

#### *Μεταβολισμός χολερυθρίνης στο ήπαρ*

Διακρίνονται τρεις φάσεις που περιλαμβάνουν: α) την πρόσληψη, β) τη σύνδεση και γ) την απέκκριση της χολερυθρίνης.

##### *α) Πρόσληψη μη συζευγμένης χολερυθρίνης.*

Η έμμεσος χολερυθρίνη σε φυσιολογικές καταστάσεις αφού αποδεσμευτεί από τη λευκωματίνη προσλαμβάνεται πολύ γρήγορα από το ηπατοκύτταρο με παθητική διάχυση αλλά και μέσω της δράσης της πρωτεΐνης OATP2 (organic anion transport protein 2). Μέσα στο ηπατοκύτταρο η χολερυθρίνη συνδέεται με πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος, όπως είναι η λιγανδίνη, που αποτελεί μέλος των τρανσφερασών της γλουταθειόνης.

β) Σύνδεση.

Για να διευκολυνθεί η απέκκριση προς τα χοληφόρα της μη συζευγμένης χολερυθρίνης θα πρέπει να μετατραπεί σε μία μορφή διαλυτή στο νερό. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μετατροπή της χολερυθρίνης σε σύμπλεγμα χολερυθρίνης μονο-γλυκουρονιδίου με τη δράση του ενζύμου UDP-γλυκουρονοτρανσφεράση, που βρίσκεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Περίπου το 85% της συζευγμένης χολερυθρίνης απεκκρίνεται με τη μορφή διγλυκουρονιδίου.

γ) Απέκκριση.

Το σύμπλεγμα χολερυθρίνης-γλυκουρονιδίου απεκκρίνεται από το ηπατοκύτταρο προς τα χοληφόρα μέσω μεταφορέα της κυτταρικής μεμβράνης (MDRP2, multi-drug resistance protein 2) , δηλαδή με ενεργητική μεταφορά.

#### *Μεταβολισμός χολερυθρίνης στο έντερο*

Η απορρόφηση της συζευγμένης χολερυθρίνης στη χοληδόχο κύστη και το έντερο είναι μηδαμινή επειδή έχει μεγάλο μοριακό βάρος και εμφανίζει πολικότητα. Κατά συνέπεια η άμεσος ή συζευγμένη χολερυθρίνη είτε αποβάλλεται ακέραια με τα κόπρανα ή υδρολύεται προς μη συζευγμένη χολερυθρίνη από τα βακτήρια του τελικού ειλεού και του παχέος εντέρου (δράση της β-γλυκουρονιδάσης). Στη συνέχεια η χολερυθρίνη αυτή ανάγεται με τη δράση και πάλι των βακτηριδίων του εντέρου σε ουροχολινογόνο. Το ουροχολινογόνο επαναρροφάται από το λεπτό έντερο. Έτσι, το 20% περίπου του ουροχολινογόνου που παράγεται στο έντερο επαναρροφάται και απεκκρίνεται σχεδόν εξ ολοκλήρου αμέσως από το ήπαρ. Το υπόλοιπο 10% απεκκρίνεται από τους νεφρούς και το ποσοστό αυτό αυξάνεται σε αιμολυτικές αναιμίες και σε αρρώστους με ηπατοκυτταρική βλάβη.



### 2.3 Βιοχημική εκτίμηση της λειτουργικότητας του ήπατος

#### *Δοκιμασίες ελέγχου της βιοσυνθετικής ικανότητας του ήπατος*

Περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό της λευκωματίνης του ορού και του χρόνου προθρομβίνης. Τα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των περισσότερων πρωτεϊνών του πλάσματος, όπως της λευκωματίνης, του ινωδογόνου και άλλων παραγόντων πήξης καθώς και των περισσότερων α- και β-σφαιρινών, των πρωτεϊνών οξείας φάσης κ.α. Ο προσδιορισμός της λευκωματίνης αποτελεί χρήσιμο δείκτη της ηπατικής λειτουργίας. Το γεγονός όμως ότι η μείωση της συνθετικής ικανότητας του ήπατος κατά 50% έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της λευκωματίνης του ορού μόνο κατά 20% , καθώς και ο μεγάλος χρόνος ημίσειας ζωής (που φθάνει τις 20 ημέρες) της, δεν την καθιστούν αξιόπιστο δείκτη σε οξεία ηπατοκυτταρική βλάβη. Αντίθετα, η λευκωματίνη αποτελεί αρκετά καλό δείκτη της ηπατικής λειτουργίας στις χρόνιες ηπατοπάθειες, με τιμές λευκωματίνης <3g/dl να υποδηλώνουν συνήθως σοβαρού βαθμού ηπατική βλάβη. Ωστόσο, η υπολευκωματιναιμία δεν είναι ειδικό εύρημα ηπατοπάθειας, διότι μπορεί να εμφανισθεί σε υποσιτισμό, χρόνια αλκοολισμό, νεφρωσικό σύνδρομο, χρόνιες λοιμώξεις και άλλες παθήσεις.

Στο ήπαρ συντίθενται επίσης οι παράγοντες πήξης I, II, V, VII, IX, X, XII, και XIII. Η ελάττωση ή η έλλειψή τους αντανακλά σημαντική επιδείνωση της ηπατικής λειτουργίας αφού συνήθως η σύνθεσή τους από το ήπαρ γίνεται σε περίσσεια. Η πλέον εύχρηστη δοκιμασία για την εκτίμηση των επιπέδων τους είναι ο προσδιορισμός του χρόνου προθρομβίνης.

Ο χρόνος προθρομβίνης επηρεάζεται γρήγορα στην οξεία ηπατοκυτταρική βλάβη και αποτελεί χρήσιμο προγνωστικό δείκτη (παράτασή του σε οξεία ηπατίτιδα αυξάνει την πιθανότητα εκδήλωσης κεραυνοβόλου ηπατικής ανεπάρκειας). Διαταραχή του

χρόνου προθρομβίνης αντανακλά προχωρημένο στάδιο έκπτωσης της ηπατικής λειτουργίας και σε χρόνιες ηπατοπάθειες και σχετίζεται, επίσης, με κακή πρόγνωση.

Κατά την ερμηνεία του χρόνου προθρομβίνης θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν τα επίπεδα της βιταμίνης Κ. Οι παράγοντες II, VII, IX και X μετά την παραγωγή τους υφίστανται μετα-μεταφραστική τροποποίηση κατά την οποία μία επιπλέον καρβοξυλική ομάδα προστίθεται σε ρίζες γλουταμικού οξέος που υπάρχουν στο μόριό τους, με αποτέλεσμα να μετατρέπονται σε ρίζες γ-καρβοξυγλουταμικού οξέος, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύουν το απαραίτητο για την πήξη του αίματος ασβέστιο. Η προσθήκη αυτής της καρβοξυλικής ομάδας γίνεται από τη γ-γλουταμυλική καρβοξυλάση και για να πραγματοποιηθεί απαιτείται η οξειδωση αναχθείσας βιταμίνης Κ. Επομένως, η έλλειψη βιταμίνης Κ ή η λήψη αναστολέων της αναγωγής της βιταμίνης Κ μπορεί να προκαλέσουν παράταση του χρόνου προθρομβίνης που δεν οφείλεται σε ηπατοπάθεια.

### *Έλεγχος ηπατοκυτταρικής βλάβης*

#### **A. Μέτρηση αμινοτρανσφερασών**

Οι αμινοτρανσφεράσες είναι τα ένζυμα που συχνότερα χρησιμοποιούνται ως δείκτες ηπατοκυτταρικής βλάβης. Από αυτές, η αλανινική αμινοτρανσφεράση (ALT) καταλύει την αναστρέψιμη μεταφορά μίας αμινοομάδας από την αλανίνη στο α-κετογλουταρικό οξύ με προϊόντα πυροσταφυλικό και γλουταμικό οξύ, ενώ η ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AST) καταλύει τη μεταφορά μίας αμινοομάδας από το ασπαρτικό στο α-κετογλουταρικό οξύ με προϊόντα οξαλοξεικό και γλουταμικό οξύ. Η ασπαρτική αμινοτρανσφεράση απαντάται ως δύο ισοένζυμα, το ένα με εντόπιση στο κυτταρόπλασμα και το δεύτερο με εντόπιση στα μιτοχόνδρια, ενώ η αλανινική αμινοτρανσφεράση εντοπίζεται μόνο στο κυτταρόπλασμα. Ειδικότερη για το ήπαρ είναι η ALT, καθώς η AST ανευρίσκεται εκτός από το ήπαρ, στην καρδιά,

τους νεφρούς, τους σκελετικούς μύες και σε μικρότερες ποσότητες στο πάγκρεας, το σπλήνα, τους πνεύμονες, τον εγκέφαλο και τα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Υψηλά επίπεδα αμινοτρανσφερασών ανευρίσκονται σε οξεία ηπατοκυτταρική καταστροφή. Χρόνιες ηπατικές παθήσεις εμφανίζουν επίσης αυξημένα επίπεδα αμινοτρανσφερασών, χωρίς όμως τα φυσιολογικά επίπεδα αμινοτρανσφερασών να τις αποκλείουν.

#### B. Μέτρηση γαλακτικής δεϋδρογονάσης

Η γαλακτική δεϋδρογονάση (LDH) καταλύει την αμφίδρομη μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό και αντίστροφα, με ταυτόχρονη μετατροπή του NADH σε NAD<sup>+</sup>. Η LDH αποτελείται από 4 ενζυμικές υπομονάδες, οι οποίες μπορεί να είναι δύο ειδών είτε μυϊκές (M), είτε καρδιακές (H). Ανάλογα με τις ενζυμικές υπομονάδες που την αποτελούν η LDH διακρίνεται σε 5 ισοένζυμα: LDH-1 έως LDH-5. Η LDH-1 αποτελείται από 4 H ενζυμικές υπομονάδες και απαντάται κυρίως στην καρδιά και η LDH-5 αποτελείται από 4 M ενζυμικές υπομονάδες και απαντάται κυρίως στο ήπαρ και τους γραμμωτούς μύες. Τα υπόλοιπα ισοένζυμα αποτελούνται από συνδυασμούς των H και M υπομονάδων και απαντώνται στους νεφρούς, τους πνεύμονες, το πάγκρεας και τα ερυθροκύτταρα.

Εξαιτίας της παρουσίας της LDH σε διάφορους ιστούς, η μέτρηση της LDH σε παθήσεις του ήπατος δεν έχει μεγάλη διαγνωστική αξία.

#### *Έλεγχος χολόστασης*

##### A. Αλκαλική φωσφατάση

Η αλκαλική φωσφατάση είναι ένα ένζυμο που σε αλκαλικό περιβάλλον καταλύει την υδρόλυση των φωσφορικών εστέρων. Παράγεται από όλα τα κύτταρα και περισσότερο από τις οστεοβλάστες και τα ηπατοκύτταρα. Αποβάλλεται από το

χολαγγειακό σύστημα του ήπατος. Βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα οστά, το ήπαρ καθώς επίσης και τον εντερικό βλεννογόνο, τους νεφρούς, τον πλακούντα και τα λευκά αιμοσφαίρια. Στον ορό του αίματος βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις που κυμαίνονται φυσιολογικά αναλόγως της ηλικίας. Η συγκέντρωσή της παρουσιάζει σημαντική αύξηση στη φάση της αύξησης των οστών και στους τρεις τελευταίους μήνες της εγκυμοσύνης. Τα αυξημένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης στον ορό, οφείλονται συνήθως σε νόσους των οστών με αυξημένη οστεοβλαστική δραστηριότητα ή σε νόσους του ήπατος. Στις ηπατικές νόσους, η αλκαλική φωσφατάση μπορεί να βοηθήσει στη διαφοροδιάγνωση του αποφρακτικού από τον ηπατοκυτταρικό ίκτερο, αφού στην πρώτη περίπτωση παρουσιάζει πολύ μεγάλη αύξηση, ενώ στη δεύτερη μικρή ή καθόλου αύξηση.

#### B. γ-γλουταμυλική τρανσφεράση (γ-GT)

Η γ-GT είναι ένζυμο των κυτταρικών μεμβρανών των κυττάρων του ήπατος, του νεφρού, του παγκρέατος, της καρδιάς, του εγκεφάλου και της σπερματοδόχου κύστεως. Η γ-GT είναι υπεύθυνη για την κυτταρική πρόσληψη των αμινοξέων μέσω του γ-γλουταμυλικού κύκλου, κυρίως στα όργανα που έχουν μεγάλη πρόσληψη αμινοξέων. Η γ-GT καταλύει τη μεταφορά της γ-γλουταμινικής ομάδας από τη γλουταθειόνη ή άλλες γλουταμινικές ενώσεις σε αποδέκτες αμινοξέα ή μικρά πεπτίδια. Οι φυσιολογικές τιμές του ενζύμου σχετίζονται με την ηλικία (5-8 φορές υψηλότερες στα νεογέννητα) και το φύλο (υψηλότερες στους άνδρες). Εκτός των νοσημάτων του ήπατος και των χοληφόρων, η γ-GT αυξάνει σε νοσήματα του παγκρέατος και σπανιότερα σε έμφραγμα του μυοκαρδίου, νεφρική ανεπάρκεια, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και σακχαρώδη διαβήτη. Στα νοσήματα του ήπατος και των χοληφόρων, με επίπεδα στον ορό κινούμενα παράλληλα με αυτά της αλκαλικής φωσφατάσης, είναι ένας πολύ ευαίσθητος δείκτης. Έχει όμως χαμηλή

ειδικότητα και συχνά η αξία της περιορίζεται στον αποκλεισμό νοσημάτων των οστών σε ασθενείς με αυξημένη αλκαλική φωσφατάση.

#### Γ. 5-Νουκλεοτιδάση

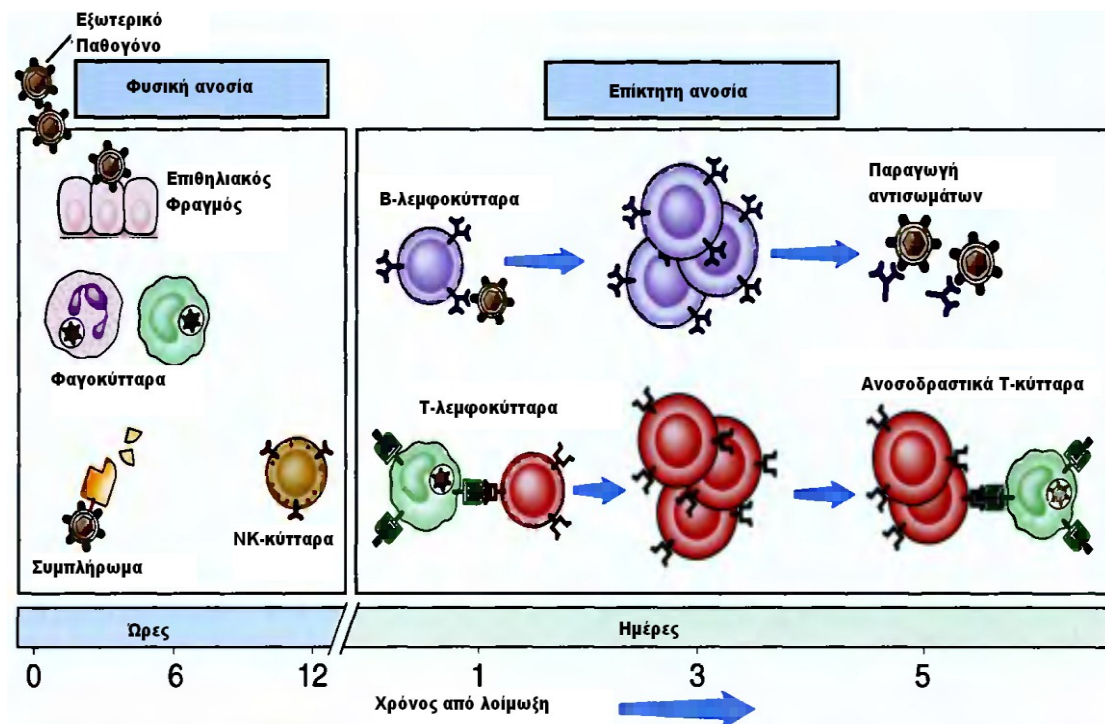
Η 5-νουκλεοτιδάση ανήκει στην τάξη των φωσφομονοεστερασών. Είναι ένζυμο αποικοδόμησης που παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του μεταβολισμού των νουκλεϊνικών οξέων. Όπως και οι άλλες φωσφομονοεστεράσες καταλύει την αποφωσφορυλίωση των μονονουκλεοτιδίων της πουρίνης και διευκολύνει τη μεταφορά των νουκλεοτιδίων διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών. Η 5-νουκλεοτιδάση αποτελεί συστατικό των κυτταροπλασματικών μεμβρανών των κυττάρων και έχει ανευρεθεί σε όλους τους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού. Ωστόσο, παρά την ευρεία της κατανομή στους διάφορους ιστούς του οργανισμού, η ειδικότητά της είναι πολύ υψηλή αφού τα αυξημένα επίπεδά της είναι σχεδόν πάντα ηπατικής προέλευσης. Για το λόγο αυτό μπορεί να αποτελέσει επιπρόσθετο διαγνωστικό βοήθημα στη διερεύνηση πιθανής, χολοστατικού τύπου, ηπατοπάθειας σε περιπτώσεις αυξημένης αλκαλικής φωσφατάσης όπως στα παιδιά και της έγκυες.

### 3. ΑΝΟΣΙΑ

Στον άνθρωπο όπως και στα υπόλοιπα θηλαστικά υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που συντελούν στην προστασία από εξωτερικά παθογόνα (ιούς, βακτήρια, μύκητες, παράσιτα, και τοξίνες) (21). Η λειτουργία της απάντησης και αντίστασης του οργανισμού έναντι αυτών των παθογόνων ονομάζεται ανοσία και μπορεί να διακριθεί σε δύο κύριους τύπους:

1. τη φυσική ανοσία, που αποτελείται από μηχανισμούς που υφίστανται πριν από την έκθεση του οργανισμού στα ξένα μακρομόρια και χαρακτηρίζεται από απουσία ειδικότητας ή μνήμης, και
2. την επίκτητη ή ειδική ανοσία, που χαρακτηρίζεται από τη δυνατότητα άμυνας έναντι ενός ευρύτατου αριθμού παθογόνων, καθώς και από την ύπαρξη ειδικότητας και την ανάπτυξη μνήμης.

Μία περαιτέρω διαφορά μεταξύ φυσικής και επίκτητης ανοσίας είναι και η ταχύτητα με την οποία αποκρίνονται στα διάφορα παθογόνα (Εικόνα 10). Αμέσως μετά την επαφή του οργανισμού με τα διάφορα παθογόνα, λειτουργούν μηχανισμοί της φυσικής ανοσίας που βρίσκονται σε κατάσταση άμεσης ετοιμότητας και είναι ικανοί να απομακρύνουν και να καταστρέψουν τα περισσότερα από αυτά. Μετά πάροδο τεσσάρων περίπου ωρών, η αντιμετώπιση των εξωγενών παθογόνων απαιτεί τη συμμετοχή μηχανισμών που αν και κινητοποιούνται από την ίδια την παρουσία των παθογόνων συνεχίζουν να μην είναι ειδικοί για καθένα από αυτά. Οι μηχανισμοί αυτοί καλούνται πρόιμη ή επαγωγίμη φυσική ανοσία και αναγνωρίζουν τα παθογόνα μέσω μη κλωνικών υποδοχέων χαμηλής ετερογένειας. Εφόσον η φυσική ανοσία δεν κατορθώσει να εξουδετερώσει την έκθεση του οργανισμού στις ξένες ουσίες, κινητοποιούνται οι μηχανισμοί της επίκτητης ανοσίας (22).



Εικόνα 10. Χρονική αλληλουχία ενεργοποίησης των μηχανισμών φυσικής και επίκτητης ανοσίας (23).

### 3.1 Συστατικά της φυσικής ανοσίας

Τα κύρια στοιχεία της φυσικής ανοσίας περιλαμβάνουν:

- α) τους επιθηλιακούς φραγμούς,
- β) τα φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα/μακροφάγα)
- γ) τα ηωσινόφιλα, τα βασεόφιλα και τα ιστιοκύτταρα
- δ) τα κύτταρα φυσικούς φονείς (NK-κύτταρα) και
- ε) τις πρωτεΐνες πλάσματος – συμπλήρωμα

#### 3.1.α Επιθηλιακοί φραγμοί

Οι συνήθεις πύλες εισόδου των μικροβίων στον οργανισμό, δηλαδή το δέρμα, ο γαστρεντερικός σωλήνας και η αναπνευστική οδός, προστατεύονται από συνεχή επιθήλια που παρέχουν φυσικούς και χημικούς φραγμούς ενάντια στη μόλυνση. Τα επιθηλιακά κύτταρα παράγουν πεπτιδικά αντιβιοτικά που θανατώνουν τα βακτήρια.

Επιπρόσθετα, αποικίζονται από τα ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα (intraepithelial lymphocytes, IEL) που ανήκουν στην T-λεμφοκυτταρική σειρά και χωρίζονται σε δύο ομάδες. Η μία ομάδα περιλαμβάνει τα CD4<sup>+</sup> ή CD8<sup>+</sup>TCRαβ<sup>+</sup> -IEL, τα οποία πιστεύεται ότι έχουν υποστεί ωρίμανση στο θύμο και εντοπίζονται στο εντερικό επιθήλιο μετά από αντιγονικό ερεθισμό στην περιφέρεια. Η άλλη ομάδα περιλαμβάνει T-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν κυρίως γδTCR (T-κυτταρικό υποδοχέα) ή αβTCR χωρίς συνοδά μόρια, αλλά ομοδιμερή του CD8α (CD8αα) (24). Αυτά τα T-κύτταρα φαίνεται να παρουσιάζουν χαρακτηριστικά τυπικά της φυσικής ανοσίας. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που εκφράζουν γδTCR (TcR1-κύτταρα) φαίνεται ότι επιτυγχάνουν τον άμεσο αλλά μη ειδικό περιορισμό των παθογόνων, συνδεόμενα και ενεργοποιούμενα από μη πολυμορφικούς συνδέτες, όπως είναι τα υπεραντιγόνα ορισμένων βακτηρίων (22, 25).

### 3.1.β Φαγοκύτταρα

Υπάρχουν δύο τύποι κυκλοφορούντων φαγοκυττάρων, τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα, που στρατολογούνται στις περιοχές της λοίμωξης, όπου αναγνωρίζουν μικρόβια με σκοπό τη φαγοκυττάρωσή τους.

Τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα αποτελούν τον πολυπληθέστερο πληθυσμό λευκοκυττάρων και σε απόκριση σε λοίμωξη, η παραγωγή ουδετερόφιλων αυξάνεται έτι περαιτέρω. Η παραγωγή των ουδετερόφιλων διεγείρεται από κυτταροκίνες, γνωστές ως αυξητικοί παράγοντες (colony-stimulating factors, CSFs) (23, 26). Τα ουδετερόφιλα έχουν τη δυνατότητα να απαντούν ταχύτατα σε χημειοτακτικά ερεθίσματα, να συγκολλώνται στο αγγειακό ενδοθήλιο με τη μεσολάβηση ειδικών μεμβρανικών υποδοχέων, να διέρχονται τη βασική μεμβράνη των αγγείων και να αθροίζονται στα σημεία της ιστικής βλάβης. Στους ιστούς τα ουδετερόφιλα υπό την επίδραση κυτταροκινών εκδηλώνουν 4 αντιμικροβιακές δράσεις. Τα ουδετερόφιλα



μπορούν να φαγοκυτταρώνουν διάφορα μικρόβια και εν συνεχεία, μέσω μίας διαδικασίας που ονομάζεται οξειδωτική έκρηξη, να ενεργοποιούν το ένζυμο NADPH και να παράγουν ιόντα υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) που οδηγούν στη καταστροφή του μικροβίου. Επίσης, τα ουδετερόφιλα, έχουν την ιδιότητα να αποκοκκιώνονται και να εκλύουν στο σημείο της φλεγμονής πληθώρα ενζύμων με αντιμικροβιακή δράση. Φαίνεται ακόμη ότι τα ουδετερόφιλα, πέραν του να δέχονται την επίδραση κυτταροκινών, έχουν τη δυνατότητα να εκκρίνουν κυτταροκίνες με αποτέλεσμα να συνεπικουρούν στο συντονισμό της φλεγμονής (27). Τέλος, σχετικά πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι τα ουδετερόφιλα έχουν τη δυνατότητα να εκλύουν στο σημείο της φλεγμονής εξωκυτταρικές παγίδες (neutrophil extracellular traps, NETs), οι οποίες αποτελούνται από ένα δίκτυο χρωματίνης μαζί με πρωτεάσες σερίνης μέσα στο οποίο παγιδεύονται και εν τέλει φονεύονται τα μικρόβια (28). Σημαντικό χαρακτηριστικό των ουδετερόφιλων είναι ότι φέρουν υποδοχείς για τα Fc-τμήματα των ανοσοσφαιρινών με αποτέλεσμα να συμμετέχουν και στους μηχανισμούς της ειδικής ανοσίας (29).

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα αποτελούν το δεύτερο μεγαλύτερο κυτταρικό πληθυσμό του ανοσολογικού συστήματος. Πρόκειται για κύτταρα μυελικής προέλευσης με κύρια λειτουργία τους τη φαγοκυττάρωση. Τα μονοκύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα όταν εξαγγειώνονται στους ιστούς, διαφοροποιούνται σε μακροφάγα και εκεί επιβιώνουν για μακρές περιόδους. Επομένως, τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος και τα μακροφάγα των ιστών είναι δύο στάδια της ίδιας κυτταρικής σειράς που συχνά καλείται μονοπυρηνικό φαγοκυτταρικό σύστημα. Μακροφάγα απαντώνται σε διάφορους ιστούς και ανάλογα με την εντόπισή τους έχουν άλλοτε άλλη ονομασία. Τα μακροφάγα που επαλείφουν τα κολποειδή του ήπατος καλούνται κύτταρα Kupffer (22, 30).

Τα μακροφάγα είναι ειδικευμένα κύτταρα που εγκολπώνουν μεγάλα σωματίδια όπως βακτήρια, μύκητες και νεκρά κύτταρα μέσω της φαγοκυττάρωσης και καθίστανται οι κυριότεροι κυτταρικοί μεσολαβητές της φυσικής ανοσίας. Παράλληλα, όμως, τα μακροφάγα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο σε όλες τις φάσεις της ειδικής ανοσολογικής απάντησης. Στη φάση της αναγνώρισης τα μακροφάγα συμμετέχουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που επεξεργάζονται τα αντιγόνα και τα παρουσιάζουν στην επιφάνειά τους σε μορφή αναγνωρίσιμη από τα Τ-λεμφοκύτταρα. Κατά τη φάση της ενεργοποίησης, τα μακροφάγα υφίστανται την επίδραση των κυτταροκινών με αποτέλεσμα να εκδηλώνουν αποτελεσματικότερα τη φαγοκυτταρική και κυτταροκτόνο δράση τους με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που περιγράφηκε για τα ουδετερόφιλα.

Ταυτόχρονα, τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκκρίνουν πλήθος πρωτεϊνικών μορίων, με πρωταρχική σημασία στην εξέλιξη της ανοσολογικής απάντησης. Οι κυτταροκίνες των μακροφάγων, όπως η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και ο παράγων νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α) προκαλούν συνάθροιση των κυττάρων της φλεγμονής στο σημείο της βλάβης και εκδήλωση πολλών από τις συστηματικές διαταραχές που συνοδεύουν τη φλεγμονή. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παράγουν, επίσης, αυξητικούς παράγοντες που επιδρούν στα κύτταρα του συνδετικού ιστού στο σημείο της φλεγμονής. Τέλος, τα μακροφάγα μέσω υποδοχέων για παράγοντες του συμπληρώματος, όπως είναι οι CR1 και CR3 και μέσω υποδοχέων για το Fc τμήμα των IgG ανοσοσφαιρινών, συμμετέχουν στη δραστική φάση της ανοσολογικής απάντησης (31).

Ένα χαρακτηριστικό που διευκολύνει τη φαγοκυττάρωση των μικροβίων είναι η ύπαρξη υποδοχέων στην επιφάνεια του φαγοκυττάρου για αντίστοιχα μόρια που χαρακτηρίζουν τα μικρόβια. Διάφοροι τέτοιοι υποδοχείς μπορεί να υπάρχουν στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων, όπως είναι οι TLRs (Toll-like receptors), οι υποδοχείς

ιντεγκρινών, οι υποδοχείς μαννόζης, και οι υποδοχείς πεπτιδίων που περιέχουν N-φορμύλ-μεθειονίνη. Οι δε υποδοχείς TLR μπορεί να εμφανίζουν διάφορες ειδικότητες, όπως ο TLR-2 που αναγνωρίζει βακτηριακές λιπογλυκάνες, ο TLR-4 που αναγνωρίζει βακτηριακούς λιποπολυσακχαρίτες, ο TLR-5 φλαγκελίνη, ο TLR-9 μη-μεθυλιωμένα CpG νουκλεοτίδια κλπ.

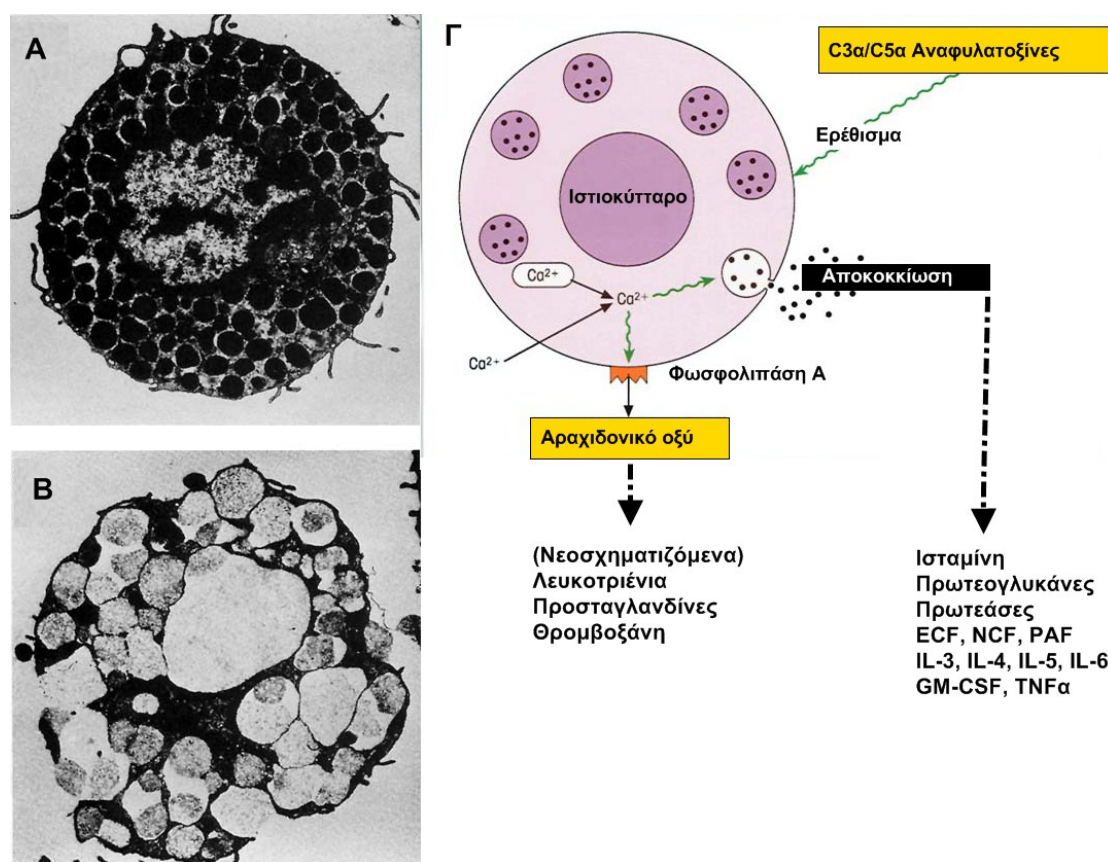
### 3.1.γ Κοκκιοκύτταρα (ηωσινόφιλα-βασεόφιλα-ιστιοκύτταρα)

Τα ηωσινόφιλα κύτταρα είναι μυελικής προέλευσης κοκκιοκύτταρα,. Το κυτταρόπλασμά τους περιέχει άφθονα κοκκία που βάφονται με χρώση ηωσίνης και περιέχουν μείζονα βασική πρωτεΐνη και άλλες κατιονικές πρωτεΐνες που είναι τοξικές για ορισμένα παράσιτα. Η αποκοκκίωση των ηωσινόφιλων αποδεικνύεται αποτελεσματική για την καταστροφή μικροοργανισμών ανθεκτικών στα λυτικά ένζυμα των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων. Τα ηωσινόφιλα εκφράζουν Fc υποδοχείς ειδικούς για την IgE, αν και χαμηλής συγγένειας (FcεRII), και είναι ιδιαίτερα δραστικά για αντιγόνα που επάγουν την παραγωγή IgE αντισωμάτων (26).

Τα βασεόφιλα κύτταρα δεν έχουν φαγοκυτταρικές ιδιότητες, αλλά εκδηλώνουν τη λειτουργία τους με την έκκριση δραστικών ουσιών που περιέχονται στα κυτταροπλασματικά κοκκία τους. Έχουν παρόμοια μορφολογία με τα ιστιοκύτταρα και, όπως και εκείνα, εμφανίζουν υποδοχείς υψηλής συγγένειας για την IgE (FcεRI) με αποτέλεσμα να συνδέονται ισχυρά με IgE αντισώματα. Τα ιστιοκύτταρα είναι κύτταρα μυελικής προέλευσης που εξέρχονται ως αδιαφοροποίητα πρόδρομα κύτταρα στην κυκλοφορία και εγκαθίστανται στους περιφερικούς ιστούς, όπου και λαμβάνουν την τελική τους μορφή. Τόσο τα ιστιοκύτταρα όσο και τα βασεόφιλα κατά την αποκοκκίωσή τους εκλύουν μεταξύ άλλων πληθώρα κυτταροκινών και αγγειοδραστικών ουσιών (Εικόνα 11) (32).

### 3.1.δ. Κύτταρα φυσικοί φονείς (NK-κύτταρα)

Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (natural killer cells, NK-κύτταρα) προέρχονται από λεμφοκυτταρικό πρόγονο στο μυελό των οστών, αποτελούν το 5-15% των λεμφοκυττάρων και μορφολογικά είναι μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα. Αποτελούν ξεχωριστή λεμφική σειρά και, σε αντίθεση με τα T-κύτταρα, η εξέλιξή τους δεν συνοδεύεται από αποτελεσματικό ανασυνδυασμό των TcR γονιδίων τους, με αποτέλεσμα να μην εκφράζουν στη μεμβράνη τους σύμπλεγμα TcR.



**Εικόνα 11. Αποκοκκίωση ιστιοκυττάρου. Α:** Ιστιοκύτταρο σε ηρεμία που περιέχει πληθώρα κοκκίων (Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ×5400). **Β:** Ενεργοποιημένο ιστιοκύτταρο μετά από αποκοκκίωση. Παρατηρούνται τα κοκκία που είναι ανοικτά στο εξωκυττάριο χώρο (Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ×5400). **Γ:** Σχηματική ενεργοποιημένου ιστιοκυττάρου. Παρατηρείται ότι απελευθερώνονται όχι μόνο προσχηματισμένοι παράγοντες, που υπήρχαν αποθηκευμένοι στα κοκκία, αλλά μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης Α<sub>2</sub> συντίθεται αραχιδονικό οξύ που εν συνεχεία θα ακολουθήσει την οδό της κυκλοοξυγενάσης ή της λιποοξυγενάσης. ECF: eosinophil chemotactic factor; NCF: neutrophil chemotactic factor; PAF: platelet activating factor; IL: interleukin; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; TNFα: tumor necrosis factor (31, 33).

Η βασική βιολογική αποστολή των NK-κυττάρων είναι η αναγνώριση και η λύση κυττάρων που μολύνθηκαν από ιούς ή εξαλλάχθηκαν νεοπλασματικά, με απελευθέρωση του περιεχομένου των κοκκίων τους. Τα NK-κύτταρα αναγνωρίζουν τα μολυσμένα από τους ιούς κύτταρα μέσω υποδοχέων του τύπου της λεκτίνης που φέρουν στην επιφάνειά τους. Οι υποδοχείς αυτοί αναγνωρίζουν γλυκοπρωτεϊνικούς σχηματισμούς που εκφράζουν στην επιφάνειά τους τα μολυσμένα κύτταρα. Η ενεργοποίηση των NK-κυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση του περιεχομένου των κοκκίων τους στον εξωκυττάριο χώρο μεταξύ NK-κυττάρου και κυττάρου-στόχου. Ένα από τα σημαντικότερα περιεχόμενα αυτών των κοκκίων είναι μία περφορίνη, η οποία είναι μία πρωτεΐνη που φέρει σημαντική ομολογία με πρωτεΐνες του συστήματος του συμπληρώματος που απαρτίζουν το σύμπλεγμα προσβολής μεμβράνης (membrane attack complex, MAC) (34). Η πρωτεΐνη αυτή όταν εισαχθεί στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου στόχου πολυμερίζεται σχηματίζοντας διαμεμβρανικό πόρο. Σε αντίθεση με το MAC η περφορίνη δεν προκαλεί λύση του κυττάρου στόχου. Φαίνεται ότι μέσα από το διαμεμβρανικό πόρο εισέρχονται ουσίες των NK-κυττάρων όπως είναι ο TNF-α και ορισμένες πρωτεάσες του τύπου της σερίνης που καλούνται γρανζύμες (35). Τόσο οι γρανζύμες όσο και ο TNF-α μπορούν να ενεργοποιήσουν τον καταρράκτη των κασπασών και να οδηγήσουν στην απόπτωση του κυττάρου-στόχου (31). Παράλληλα, τα NK-κύτταρα συμμετέχουν και στους μηχανισμούς της ειδικής ανοσίας καθώς ασκούν και κυτταροτοξικότητα επαγόμενη από αντίσωμα (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), έναντι κυττάρων στόχων μέσω του μορίου τους CD16 που είναι υποδοχέας για το Fc κλάσμα των IgG αντισωμάτων (FcγRIIIa) (36).

### 3.1.ε. Συμπλήρωμα

Το σύστημα του συμπληρώματος περιλαμβάνει ένα σύνολο διαλυτών παραγόντων που παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσική αλλά και την επίκτητη ανοσία. Ανακαλύφθηκε στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα από τον μόλις 25 χρόνων γιατρό Jules Bordet, ως ένα εκ των δύο συστατικών του ορού που μπορούσαν να καταστρέφουν βακτήρια, και συγκεκριμένα ως εκείνο το συστατικό που αδρανοποιούνταν με τη θερμότητα. Ο όρος συμπλήρωμα είχε προταθεί από τον Paul Ehrlich, ως μέρος της θεωρίας του για το ανοσολογικό σύστημα. Το σύστημα του συμπληρώματος περιλαμβάνει πλέον των 20 πρωτεϊνών, οι οποίες κυκλοφορούν κυρίως ως αδρανείς διαλυτές πρωτεΐνες στο πλάσμα. Υπό την επίδραση κατάλληλων ερεθισμάτων που κινητοποιούν τη λειτουργία του συστήματος, υφίστανται, διαδοχικά, περιορισμένου βαθμού πρωτεόλυση και διασπώνται σε μικρότερα πολυπεπτιδικά τμήματα. Τα προϊόντα αυτής της αποδόμησης των πρωτεϊνών του συμπληρώματος είτε ασκούν αφ' εαυτών συγκεκριμένη βιολογική δράση είτε συνδέονται μεταξύ τους και σχηματίζουν ένζυμα, υπόστρωμα των οποίων είναι ο αμέσως επόμενος στην αλληλουχία του συστήματος παράγοντας (22).

Παραδοσιακά περιγράφονται δύο οδοί ενεργοποίησης του συμπληρώματος, η κλασσική και η εναλλακτική οδός. Η κλασσική οδός ενεργοποιείται κυρίως από συμπλέγματα αντιγόνου-IgG (ή IgM) αντισώματος και έτσι ενισχύει την ειδική χυμική ανοσία. Η εναλλακτική οδός μπορεί να ενεργοποιηθεί χωρίς αντίσωμα στην επιφάνεια μικροβίων και έτσι συμμετέχει στη φυσική ανοσία.

Η τρίτη οδός του συμπληρώματος, η οποία ανακαλύφθηκε πλέον πρόσφατα, καλείται οδός της λεκτίνης που συνδέει μαννόζη. Η λεκτίνη που συνδέει μαννόζη, ανήκει στην οικογένεια των κολλεκτινών και συντίθεται στο ήπαρ (37). Πολλοί μικροοργανισμοί φέρουν γλυκοπρωτεΐνες που έχουν μαννόζη στο τελικό άκρο τους, εν αντιθέσει με τα

θηλαστικά, των οποίων οι γλυκοπρωτεΐνες καταλήγουν σε σιαλικό οξύ ή N-ακετυλογαλακτοζαμίνη. Επομένως, μέσω της σύνδεσης με τη λεκτίνη αναγνωρίζονται οι μικροβιακές γλυκοπρωτεΐνες και μπορεί να ενεργοποιηθεί άμεσα το συμπλήρωμα έναντι του μικροοργανισμού (38).

Οι τρεις οδοί του συμπληρώματος συγκλίνουν στην πρωτεολυτική διάσπαση του παράγοντα C3 του συμπληρώματος σε C3a και C3b (Εικόνα 12). Το παραγόμενο μόριο C3a έχει ισχυρές δράσεις αναφυλατοξίνης και μπορεί να προκαλέσει την αποκοκκίωση των ιστιοκυττάρων, τη συστολή λείων μυϊκών ινών και την αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών. Το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου C3b δρα για την οψωνινοποίηση των μικροβίων, προάγει δηλαδή τη φαγοκυττάρωσή τους σε συνδυασμό με υποδοχείς των φαγοκυττάρων.

Ένα τμήμα του παραγόμενου C3b συνδέεται με την C3-κομβερτάση (το υπεύθυνο ένζυμο για τη διάσπαση του παράγοντα C3 σε C3a και C3b) με αποτέλεσμα το σχηματιζόμενο σύμπλεγμα να αλλάζει ειδικότητα και να μετατρέπεται σε C5-κομβερτάση. Με τη δράση της C5-κομβερτάσης παράγεται C5a, που έχει παρόμοιες με το C3a δράσεις αναφυλατοξίνης, και C5b, το οποίο συνδεόμενο πάνω στις κυτταρικές μεμβράνες των μικροοργανισμών με τους παράγοντες C6, C7, C8 και C9 σχηματίζει το σύμπλεγμα προσβολής της μεμβράνης MAC.

Επομένως οι λειτουργίες του συστήματος του συμπληρώματος μπορούν να συνοψισθούν ως εξής:

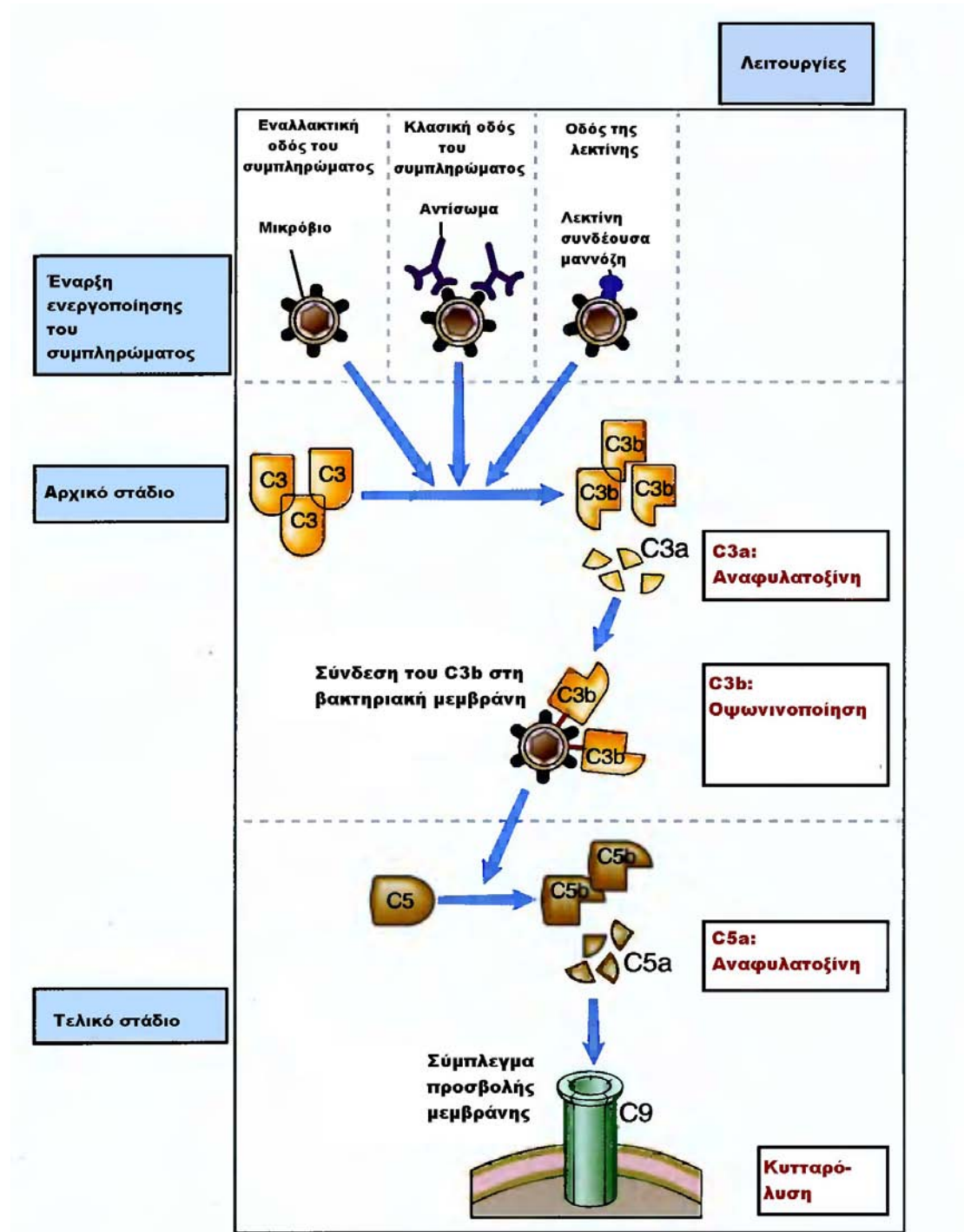
α. Κυτταρόλυση. Ο σχηματισμός του MAC πάνω στις μεμβράνες των μικροοργανισμών που ενεργοποιούν το συμπλήρωμα συνεπάγεται την ελεύθερη διάοδο ύδατος και ηλεκτρολυτών με αποτέλεσμα την ωσμωτική λύση των κυττάρων τους.

β. Οψωνινοποίηση. Η εναπόθεση προϊόντων διάσπασης των παραγόντων του συμπληρώματος πάνω στις κυτταρικές μεμβράνες των μικροοργανισμών ή σε μακρομόρια, προάγουν τη φαγοκυττάρωσή τους.

γ. Φλεγμονή. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος συνεπάγεται την παραγωγή πρωτεϊνικών τμημάτων με χημειοτακτικές ιδιότητες ή τμημάτων που δρουν ως αναφυλατοξίνες.

δ. Προστασία από ανοσοσυμπλέγματα. Το συμπλήρωμα προφυλάσσει τον οργανισμό από τις βλαπτικές συνέπειες που έχει η καθήλωση αδιάλυτων μεγαλομοριακών ανοσοσυμπλεγμάτων στους ιστούς, ενώ ασκεί και ανοσορρυθμιστικές δράσεις συντελώντας στην μακρά παραμονή του αντιγόνου στα βλαστικά κέντρα των λεμφοζιδίων.





Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση των οδών του συμπληρώματος. Απεικονίζονται 3 οδοί που συγκλίνουν στη διάσπαση του C3 σε C3a και C3b. Στο δεξιό άκρο της εικόνας αναφέρονται επιγραμματικά οι λειτουργίες των διαφόρων παραγόντων του συμπληρώματος (23).

Εκτός από τις πρωτεΐνες του συμπληρώματος, σημαντικό ρόλο στη φυσική ανοσία επιτελούν και άλλες πρωτεΐνες που κυκλοφορούν στο πλάσμα, όπως για παράδειγμα οι πεντραξίνες (pentraxins). Οι πλέον γνωστές πεντραξίνες είναι οι βραχείες

πεντραξίνες C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP) και το αμυλοειδές P του ορού (serum amyloid P, SAP), καθώς και η μακρά πεντραξίνη-3 (pentraxin-3, PTX3). Η CRP παράγεται κατεξοχήν στο ήπαρ και κυκλοφορεί σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σε φυσιολογικούς ενήλικες, αλλά μπορεί να αυξηθεί έως και 1000 φορές κατά τη διάρκεια οξέων φλεγμονωδών καταστάσεων, όπως οι λοιμώξεις (39). Τα αυξημένα επίπεδα CRP και SAP, είναι αποτέλεσμα της σημαντικής αύξησης της ηπατικής σύνθεσής τους ως απάντηση στις κυτταροκίνες IL-1 και IL-6. Επειδή αυτές οι πρωτεΐνες, μαζί με διάφορες άλλες, αυξάνονται ιδιαιτέρως κατά την οξεία φάση της φλεγμονής καλούνται πρωτεΐνες οξείας φάσεως. Τόσο η CRP, όσο και το SAP έχουν τη δυνατότητα να συνδέονται με μόρια που εκφράζονται στις μεμβράνες βακτηρίων και αποπτωτικών κυττάρων, αλλά όχι στα υγιή ευκαρυωτικά κύτταρα (40). Η σύνδεση αυτή επιτρέπει την οψωνινοποίηση αλλά και την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, επιτελώντας σημαντικό ρόλο στη φυσική ανοσία (23).

### **3.2 Επίκτητη ανοσία**

Μετά τους μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας, η έκθεση του οργανισμού σε ξένες ουσίες κινητοποιεί μηχανισμούς που είναι εξαιρετικά ειδικοί για αυτές και αυξάνουν σημαντικά την αμυντική ικανότητα του οργανισμού κατά τις μελλοντικές επαφές με τις ίδιες ουσίες. Οι μηχανισμοί αυτοί συνιστούν την επίκτητη ή ειδική ανοσία και οι ουσίες που τους επάγουν καλούνται αντιγόνα (22).

Ανάλογα με τους μηχανισμούς που συμμετέχουν στην εκδήλωση της ανοσολογικής απάντησης, η επίκτητη ανοσία διακρίνεται σε:

α. Χυμική ανοσία, που μεταφέρεται στα μη ανοσοποιημένα άτομα με το ελεύθερο κυττάρων μέρος του αίματος, δηλαδή το πλάσμα ή τον ορό. Η χυμική ανοσία μεσολαβείται από μόρια του αίματος που εξυπηρετούν την ειδική αναγνώριση και την

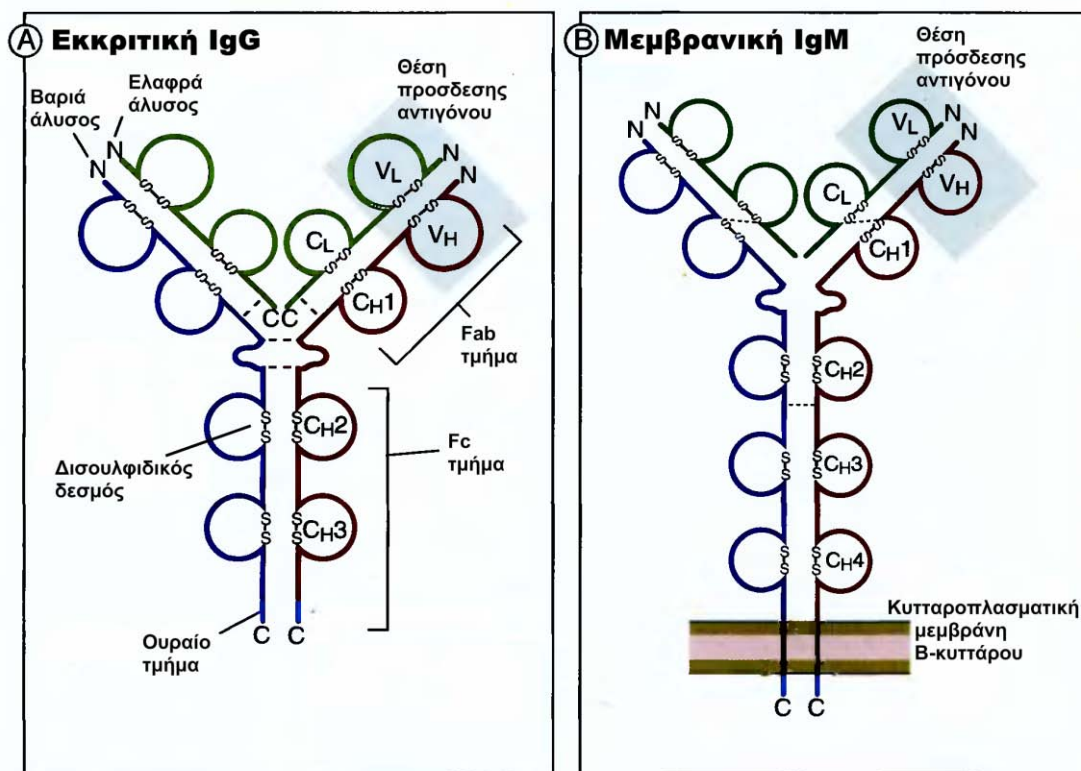
εξουδετέρωση των αντιγόνων και καλούνται αντισώματα. Τα αντισώματα παράγονται από ειδικό υποπληθυσμό των λεμφοκυττάρων, τα Β-κύτταρα, τα οποία αφού συναντήσουν και αναγνωρίσουν το αντιγόνο, μετατρέπονται σε κύτταρα που παράγουν αντισώματα και καλούνται πλασματοκύτταρα. Η χυμική ανοσία είναι ο κατεξοχήν προστατευτικός μηχανισμός έναντι των εξωκυττάρων μικροβίων και των τοξινών τους. Τα παραγόμενα αντισώματα συνδέονται με αυτά και συμβάλλουν στην καταστροφή τους.

β. Κυτταρική ανοσία, που μεταφέρεται στα μη ανοσοποιημένα άτομα με κύτταρα άλλων ανοσοποιημένων ατόμων και όχι με πλάσμα ή ορό. Μεσολαβητές της κυτταρικής ανοσίας είναι ένας άλλος υποπληθυσμός των λεμφοκυττάρων, τα Τ-κύτταρα που συνήθως συνεργάζονται με τα φαγοκύτταρα προκειμένου να επιτευχθεί η καταστροφή των μικροβίων. Οι αναγκαστικά ενδοκυττάριοι μικροοργανισμοί, όπως οι ιοί και ορισμένα βακτήρια, πολλαπλασιάζονται μέσα στα κύτταρα του ξενιστή, όπου είναι απροσπέλαστα από τα αντισώματα που κυκλοφορούν μέσα στον ορό. Η άμυνα έναντι αυτών των μικροοργανισμών εξυπηρετείται από την κυτταρική ανοσία, η οποία προάγει την ενδοκυττάρια καταστροφή τους ή τη λύση των μολυσμένων κυττάρων.

Τα τρία είδη μορίων που χρησιμοποιούνται από το ανοσολογικό σύστημα για την ειδική αναγνώριση των αντιγόνων είναι οι ανοσοσφαιρίνες, τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας και οι υποδοχείς των Τ-κυττάρων.

### 3.2.α Ανοσοσφαιρίνες-Αντισώματα

Οι ανοσοσφαιρίνες είναι πρωτεΐνες που ανήκουν στην κατηγορία των γ-σφαιρινών και παράγονται από τα Β-λεμφοκύτταρα, είτε ως μεμβρανικές είτε ως εκκριτικές πρωτεΐνες (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση της δομής μορίων εκκριτικής IgG (Α) και μεμβρανικής IgM (Β) (23).

Όλα τα μόρια των ανοσοσφαιρινών εμφανίζουν κοινή μοριακή δομή, αποτελούμενα από δύο ελαφρές αλυσούς (light chains, L) και δύο βαριές αλυσούς (heavy chains, H). Για το σχηματισμό ενός μορίου ανοσοσφαιρίνης, δύο μόρια ελαφρών αλυσών συνδέονται με δύο μόρια βαριών αλυσών σε συμμετρικό σχηματισμό που σταθεροποιείται με δισουλφιδικούς και μη ομοιοπολικούς δεσμούς με τη μορφή του ελληνικού γράμματος «Υ».

Στον άνθρωπο διακρίνονται 2 ισότυποι ελαφρών αλυσών (κ και λ) και 5 ισότυποι βαριών αλυσών (μ, δ, α, γ, ε). Ανάλογα με τον ισότυπο της βαριάς αλυσού που συμμετέχει στο σχηματισμό μίας ανοσοσφαιρίνης, διακρίνουμε 5 τάξεις ανοσοσφαιρινών, τις IgG, IgM, IgA, IgD και IgE. Οι IgG και IgA τάξεις διακρίνονται περαιτέρω σε IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 και IgA1, IgA2, αντίστοιχα.

Τα αμινοτελικά άκρα των ελαφρών και βαριών αλυσών εμφανίζουν εξαιρετική ποικιλομορφία και ως εκ τούτου καλούνται μεταβλητές περιοχές ή V-περιοχές (variable regions). Αντίθετα, το υπόλοιπο μόριο των ανοσοσφαιρινών αποτελείται από σταθερές ή C-περιοχές (constant regions). Η σύνδεση του αντισώματος με την ειδική θέση του αντιγόνου που αναγνωρίζει, τον αντιγονικό επίτοπο, γίνεται μέσω τριών μικρότερων περιοχών που βρίσκονται μέσα στις V-περιοχές των ελαφρών και βαριών αλυσών που εμφανίζουν ακόμη μεγαλύτερη ποικιλομορφία στην πρωτοταγή αμινοξική δομή τους και καλούνται υπερμεταβλητές περιοχές ή περιοχές ορίζουσες τη συμπληρωματικότητα (complementarity determining regions, CDRs) (41).

Στο καρβοξυτελικό τους άκρο οι διαλυτές μορφές των  $\mu$ ,  $\alpha$  και  $\delta$  αλυσών φέρουν επιπλέον ουραίο τμήμα που τους επιτρέπει να πολυμερίζονται. Αντίθετα, οι μεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες είναι μονομερείς και στο καρβοξυτελικό τους άκρο φέρουν υδρόφοβο, διαμεμβρανικό τμήμα που τους επιτρέπει να σταθεροποιούνται στην κυτταρική μεμβράνη και κυτταροπλασματικό τμήμα που διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ισοτύπων.

Τα αντισώματα μέσω της σύνδεσής τους με τα αντίστοιχα αντιγόνα ασκούν προστατευτικές βιολογικές δράσεις που μπορούν να συνοψισθούν ως εξής:

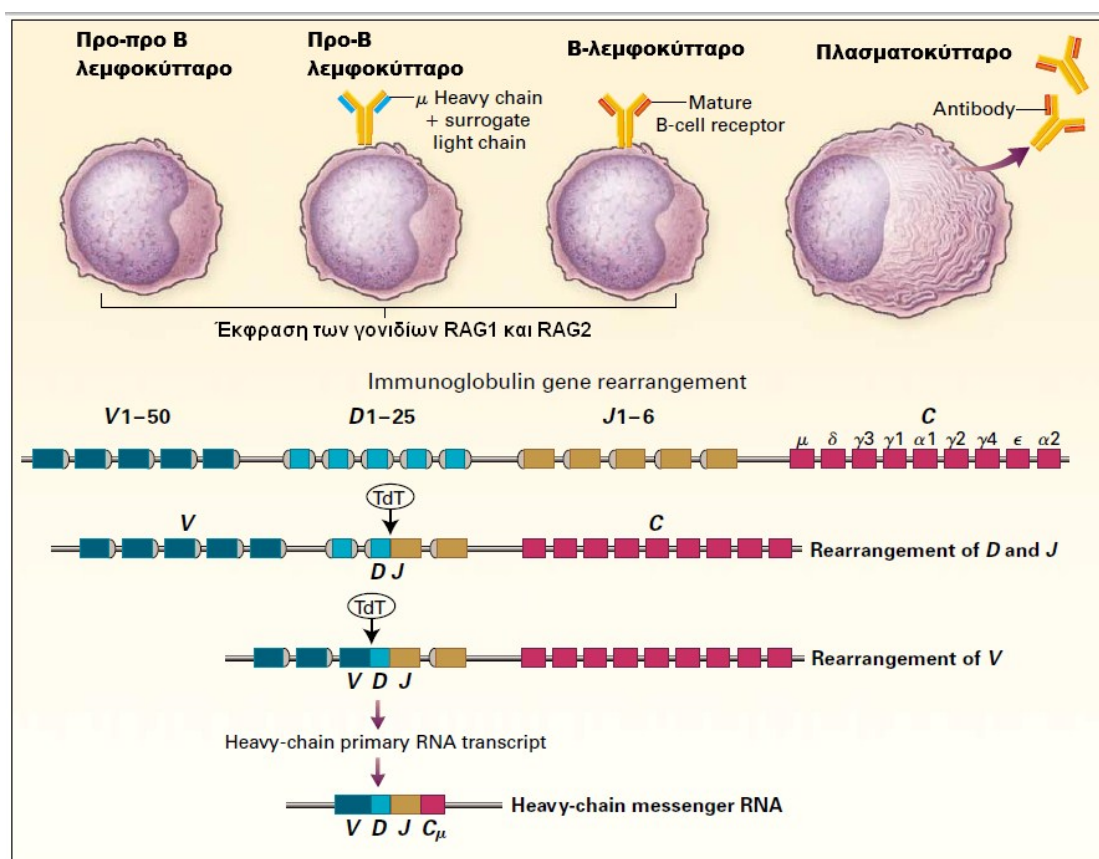
- α. Άμεση εξουδετέρωση των αντιγόνων. Η κυτταρική βλάβη που προκαλούν διάφοροι παράγοντες συχνά μεσολαβείται από τη σύνδεση τους με ειδικούς επιφανειακούς υποδοχείς. Η σύνδεση των αντισωμάτων με τους επίτοπους των παραγόντων αυτών ή σπανιότερα με τους κυτταρικούς τους υποδοχείς επιφέρει στερεοτακτικό αποκλεισμό της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης και εξουδετερώνει την τοξική ή τη λοιμογόνο τους δράση.
- β. Ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Τα IgM και IgG αντισώματα μπορούν να συνδέονται με το C1q και να ενεργοποιούν την κλασική οδό του συμπληρώματος. Η

ενεργοποίηση του συμπληρώματος μπορεί να οδηγήσει στην καταστροφή των παθογόνων που φέρουν το αντιγόνο όπως προαναφέρθηκε είτε μέσω κυτταρόλυσης είτε μέσω οψωνινοποίησης.

γ. Ενεργοποίηση κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος. Τα αντισώματα μπορούν να προάγουν την ενεργοποίηση διάφορων κυττάρων μέσω υποδοχέων που φέρουν τα τελευταία για το Fc τμήμα των αντισωμάτων (42). Ο όρος Fc χαρακτηρίζει το τμήμα εκείνο που προκύπτει μετά από πρωτεολυτική διάσπαση του αντισώματος από παπαΐνη και πρακτικά αντιστοιχεί στα καρβοξυτελικά άκρα των βαρέων αλυσών. Τόσο τα φαγοκύτταρα όπως τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, όσο και τα ηωσινόφιλα, τα ιστιοκύτταρα και τα NK-κύτταρα φέρουν τέτοιους υποδοχείς που προάγουν είτε τη φαγοκυττάρωση είτε την αποκοκκίωση των αντίστοιχων κυττάρων (29, 43).

Προκειμένου να αντιμετωπίσει τον απεριόριστο αριθμό αντιγόνων με τα οποία έρχεται σε επαφή κατά τη διάρκεια της ζωής του ο οργανισμός απαιτείται η παραγωγή αντίστοιχα απεριόριστου αριθμού αντισωμάτων μοναδικής αντιγονικής ειδικότητας. Εφόσον κάθε αντίσωμα κωδικοποιούνται από ένα ακέραιο λειτουργικό γονίδιο αυτό θα απαιτούσε την ύπαρξη απεριόριστου αριθμού γονιδίων αποκλειστικών για τη σύνθεση ανοσοσφαιρινών. Το ανοσολογικό σύστημα ανταπεξέρχεται σε αυτό το παράδοξο με τον ανασυνδυασμό και τη σύντηξη των γονιδιακών τμημάτων που κωδικοποιούν τα μόρια των ανοσοσφαιρινών και ιδίως αυτών που κωδικοποιούν τις V-περιοχές των H και L αλυσών. Συγκεκριμένα, τα γονίδια των κ και λ ελαφρών αλυσών προκύπτουν από την ένωση ενός C εξονίου, που κωδικοποιεί το σταθερό τμήμα της αλυσού, με το τμήμα που προκύπτει από τον ανασυνδυασμό και τη σύντηξη ενός V και ενός J εξονίου που κωδικοποιούν τις μεταβλητές περιοχές. Αντίστοιχα, τα γονίδια των βαριών αλυσών προκύπτουν από

τον ανασυνδυασμό και τη σύντηξη των V και J εξονίων αλλά με την προσθήκη και ενός τρίτου γονιδιακού τμήματος, του τμήματος ετερογένειας D. Μετά το σχηματισμό του το εξόνιο V/D/J μεταγράφεται μαζί με το γειτονικό του C<sub>μ</sub> ώστε να δημιουργηθεί το RNA των μ βαριών αλύσων. Εναλλακτικά, μπορεί να περιέχεται στο προς μεταγραφή γονίδιο και η C<sub>δ</sub> αλληλουχία που γειτνιάζει με τη C<sub>μ</sub>. Το RNA που προκύπτει μπορεί να ματισθεί είτε προς μ είτε εναλλακτικά προς δ mRNA με αποτέλεσμα τη συνέκφραση πάνω στο ίδιο B-κύτταρο και IgM και IgD ανοσοσφαιρίνης. Η παραγωγή των υπόλοιπων τάξεων ανοσοσφαιρινών γίνεται μέσω της διαδικασίας που καλείται ισοτυπική μεταστροφή, κατά την οποία η δομή του τμήματος V/D/J παραμένει ανέπαφη, ώστε να διατηρείται η αντιγονική ειδικότητα του αντισώματος και αλλάζει μόνο το C<sub>H</sub> τμήμα (Εικόνα 14).

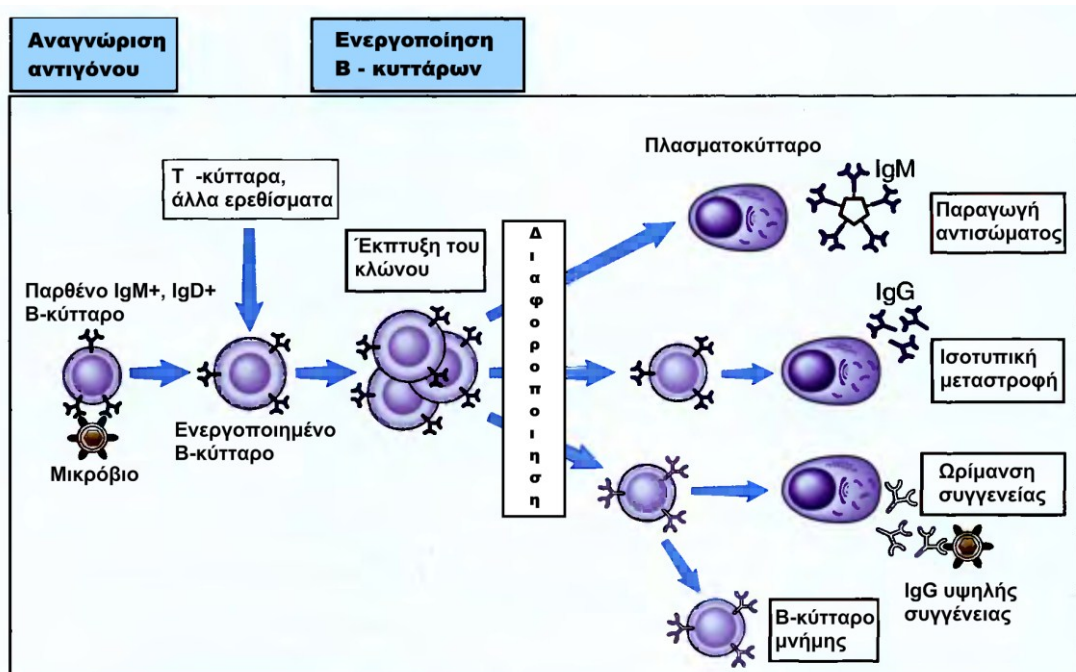


**Εικόνα 14.** Στο στάδιο της ωρίμανσης των προ-προ Β-λεμφοκυττάρων σε προ-Β λεμφοκύτταρα, εκφράζονται τα γονίδια ενεργοποίησης του ανασυνδυασμού (recombination activating genes, RAG1 και RAG2). Οι παραγόμενες ρεκομπινάσες επάγουν τον ανασυνδυασμό των γονιδίων των V/D/J περιοχών (44).



### 3.2.β. B-λεμφοκύτταρα

Τα B-λεμφοκύτταρα αντιπροσωπεύουν το 5-15% περίπου του συνόλου των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων στον οργανισμό. Παράγονται και ωριμάζουν στο μυελό των οστών και χαρακτηρίζονται από την παρουσία ανοσοσφαιρινών που λειτουργούν ως υποδοχείς αντιγόνων στη κυτταροπλασματική μεμβράνη τους. Κατά τη διαδικασία ωρίμανσής τους τα B-κύτταρα εκφράζουν πρώτα τις ανοσοσφαιρίνες IgM και IgD (Εικόνα 15).

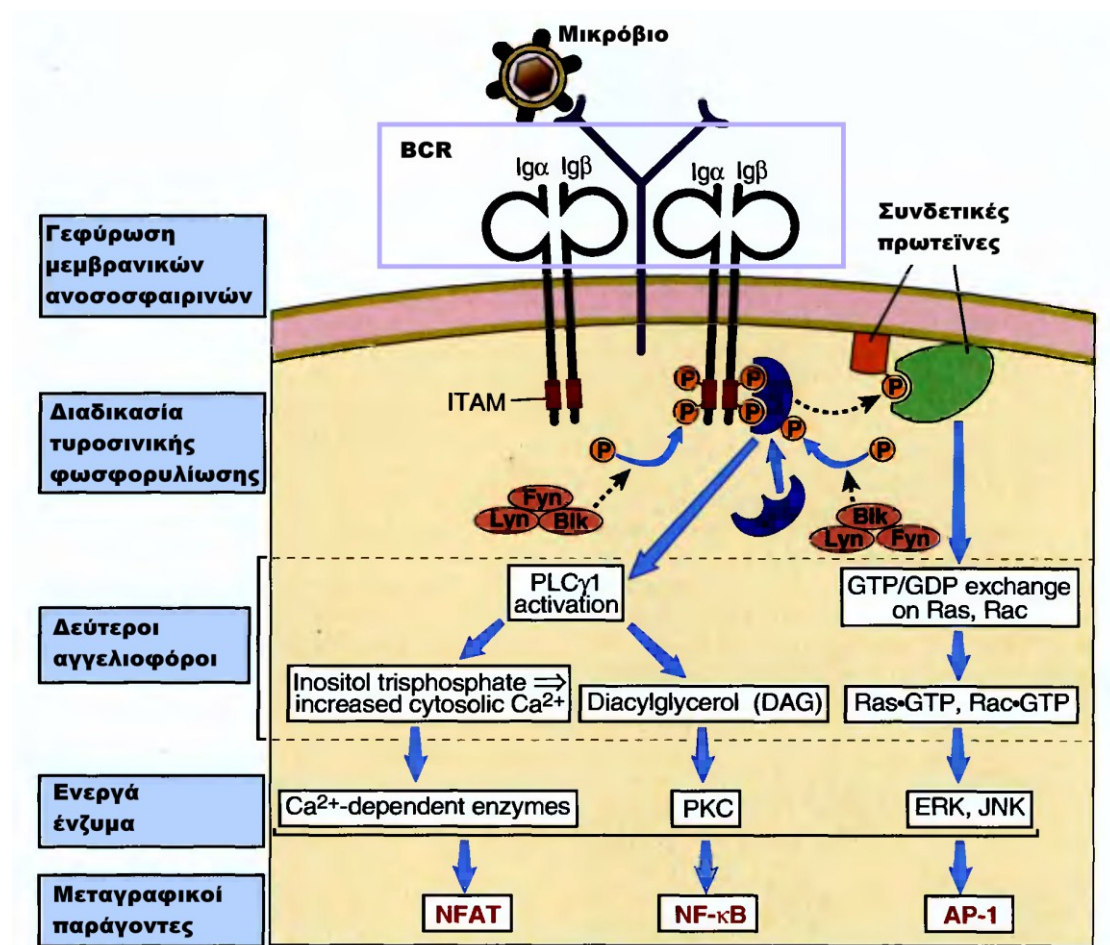


**Εικόνα 15.** Περιγραφή των κυριότερων σταδίων της χυμικής ανοσολογικής απάντησης. Τα παρθένα B-λεμφοκύτταρα μετά την επαφή τους με το αντιγόνο υφίστανται ενεργοποίηση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση με αποτέλεσμα τη μετατροπή τους ανοσοδραστικά κύτταρα που εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνες (πλασματοκύτταρα). Η αρχική παραγωγή IgM ανοσοσφαιρίνης μέσω των διαδικασιών της ισοτυπικής μεταστροφής και της ωρίμανσης συγγένειας οδηγεί στην παραγωγή IgG αντισωμάτων με υψηλή συγγένεια για το αντιγόνο (23).

Από τη στιγμή που θα εκφράσουν πλήρη μεμβρανική IgM και θα έχουν ειδικότητα, τα B-κύτταρα μεταναστεύουν ως ώριμα B-κύτταρα από το μυελό των οστών προς το αίμα και τους λεμφικούς ιστούς, όπου συνεχίζουν να ωριμάζουν. Τα ώριμα B-κύτταρα που δε θα συνδεθούν με αντιγόνο πεθαίνουν μέσα σε διάστημα λίγων ημερών ή εβδομάδων. Αντιθέτως, τα ώριμα B-κύτταρα που διεγείρονται από αντιγόνο



μετατρέπονται σε ενεργοποιημένα B-κύτταρα, τα οποία πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται παράγοντας προοδευτικά περισσότερη ανοσοσφαιρίνη σε εκκριτική και λιγότερη σε μεμβρανική μορφή, ενώ μέσω της διαδικασίας της ισοτυπικής μεταστροφής έχουν τη δυνατότητα να παράγουν και άλλες ανοσοσφαιρίνες εκτός των IgM και IgD. Για το σχηματισμό του αντιγονικού υποδοχέα της μεμβράνης των B-κυττάρων οι ανοσοσφαιρίνες συνδέονται με άλλα επικουρικά μόρια στην επιφάνεια των B-κυττάρων σχηματίζοντας το σύμπλεγμα του B-κυτταρικού υποδοχέα (B-cell receptor, BCR). Αυτά τα μόρια αποτελούνται από ετεροδιμερή Igα (CD79a) και Igβ (CD79b). Τα κυτταροπλασματικά τμήματα των Igα και Igβ περιέχουν συντηρημένες αλληλουχίες των ανοσοϋποδοχέων βασισμένες στην τυροσίνη (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAMs). Στα B-λεμφοκύτταρα, η μεταβίβαση του σήματος μέσω του υποδοχέα Ig προϋποθέτει τη διασύνδεση δύο ή περισσότερων μορίων υποδοχέα. Η διασύνδεση του υποδοχέα συμβαίνει όταν δύο ή περισσότερα μόρια αντιγόνου από ένα συσσωμάτωμα, ή επαναλαμβανόμενοι επίτοποι σε ένα μόριο αντιγόνου, προσδεθούν σε γειτονικά μόρια Ig στη μεμβράνη ενός B-λεμφοκυττάρου. Όταν δύο ή περισσότεροι υποδοχείς ενός B-λεμφοκυττάρου γεφυρωθούν, οι τυροσίνες στα ITAMs φωσφορυλιώνονται από κινάσες που συνδέονται με το σύμπλεγμα BCR και γίνονται θέσεις εγκατάστασης για πρωτεΐνες προσαρμογής. Οι τελευταίες επιστρατεύουν μόρια σηματοδότησης ενεργοποιούντα γονίδια, τα πρωτεϊνικά προϊόντα των οποίων συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των B-κυττάρων (45) (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Η γεφύρωση δύο ή περισσότερων B-κυτταρικών υποδοχέων οδηγεί στη φωσφορυλίωση των τυροσινικών τμημάτων των ITAMs την εκκίνηση μιας αλληλουχίας ενδοκυττάρων μηνυμάτων που τελικά καταλήγει στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του B-κυττάρου (23).

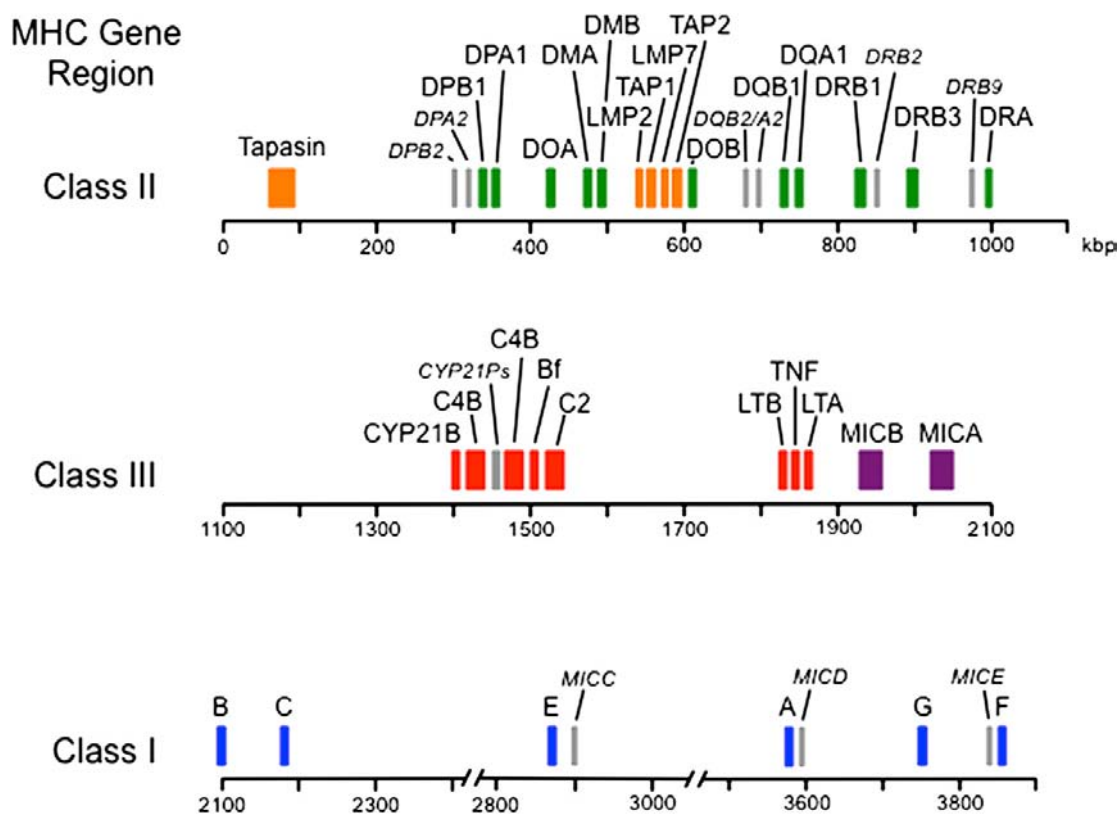
Πολλές φορές στην επιφάνεια του B-λεμφοκυττάρου ανευρίσκονται και μόρια όπως τα CD19, CD21, και TAPA-1 τα οποία λειτουργούν ως συνυποδοχείς αντιγόνου, δηλαδή ισχυροποιούν τη σύνδεση του αντιγόνου πάνω στη μεμβρανική ανοσοσφαιρίνη (46). Επίσης, φαίνεται ότι πολύ λίγα αντιγόνα κυρίως πολυσακχαριδικά μπορούν να προκαλέσουν άμεσα την παραγωγή αντισωμάτων από τα B-λεμφοκύτταρα, χωρίς τη μεσολάβηση των T-λεμφοκυττάρων. Τα αντιγόνα αυτά ονομάζονται θυμοανεξάρτητα και οδηγούν συνήθως στην παραγωγή χαμηλής συγγένειας IgM αντισωμάτων. Αντίθετα, τα περισσότερα αντιγόνα είναι

θυμοεξαρτώμενα, δηλαδή χρειάζονται την παρεμβολή των CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων που παρέχουν βοηθητικά σήματα στα B κύτταρα για την ενεργοποίηση τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους. Η αρχική σύνδεση γίνεται μέσω του CD4 μορίου του T-κυττάρου με μόριο HLA τάξης II του B-κυττάρου, ενώ το βοηθητικό σήμα παρέχεται μέσω σύνδεσης του μορίου CD40 του B-κυττάρου με τον CD154/CD40L συνδέτη του T-κυττάρου και υπό την επίδραση κυτταροκινών, κυρίως ιντερλευκίνης-2 (IL-2), IL-4, IL-5 και IL-6 που παράγονται από τα T βοηθητικά κύτταρα (47). Όπως αναφέρθηκε, τα θυμοεξαρτώμενα πεπτιδικά αντιγόνα προκαλούν την παραγωγή αντισωμάτων υψηλότερης συγγένειας. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μιας διαδικασίας που καλείται ωρίμανση συγγενείας και χαρακτηρίζεται από την αύξηση της συγγένειας των παραγόμενων αντισωμάτων μετά από παρατεταμένη ή επαναλαμβανόμενη έκθεση σε πεπτιδικά θυμοεξαρτώμενα αντιγόνα. Η ωρίμανση συγγενείας συμβαίνει στα βλαστικά κέντρα των λεμφοζιδίων και βασίζεται στις σωματικές υπερμεταλλάξεις που υφίστανται τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών των B-κυττάρων αλλά και στην επαφή με το αντιγόνο που εξασφαλίζεται μέσω των δενδριτικών κυττάρων στα λεμφοζίδια (48, 49).

### 3.2.γ. Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας

Το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας είναι ένα σύνολο πολύμορφων γονιδίων, χαρακτηριστικό των σπονδυλωτών, που κωδικοποιούν την παραγωγή γλυκοπρωτεϊνών, τις οποίες συναντάμε στην επιφάνεια διαφόρων κυττάρων (με διαφορετική κατανομή). Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται αντιγόνα HLA (50). Τα HLA αντιγόνα κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες που χαρακτηρίζονται ως τάξεις I, II και III (Εικόνα 17). Τα τάξης I και II αντιγόνα είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, βασικός βιολογικός ρόλος των οποίων είναι η δημιουργία

συμπλέγματος με αντιγόνα, πάνω στην επιφάνεια αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, ώστε να μπορέσουν να αναγνωριστούν από τον υποδοχέα των T κυττάρων και να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων.



**Εικόνα 17.** Μοριακός χάρτης του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα HLA αντιγόνα εδράζονται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6. Οι μεταξύ τους αποστάσεις αναγράφονται στο παραπάνω σχήμα σε kbp (kilobase pairs) (51).

Τα τάξης III αντιγόνα αποτελούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη λειτουργία του συμπληρώματος (C2, C4, Bf), TNF, και πρωτεΐνες θερμικού shock (52). Τα HLA αντιγόνα τάξης I εκφράζονται στην επιφάνεια σχεδόν όλων των εμπύρηνων κυττάρων με ορισμένες εξαιρέσεις, ενώ η έκφραση των HLA αντιγόνων τάξης II περιορίζεται κατά κύριο λόγο στα B-λεμφοκύτταρα, και κατά δεύτερο λόγο στα ενεργοποιημένα T-κύτταρα, στα μονοκύτταρα και στα δενδριτικά κύτταρα (53). Εντούτοις, ορισμένα άλλα κύτταρα όπως οι ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορούν να εκφράσουν MHC II στην επιφάνειά τους αν δεχτούν την επίδραση κυτταροκινών

όπως TNF, IFN- $\gamma$  και IL-10 (54). Η τάξη των MHC-μορίων που θα συνδεθούν με το αντιγόνο που παρουσιάζεται στην μεμβράνη του APC, καθορίζει και τον υποπληθυσμό των T-λεμφοκυττάρων που πρόκειται να ενεργοποιηθούν. Τα HLA αντιγόνα τάξης I συνδέονται με ενδογενή αντιγόνα (επεξεργασμένα προϊόντα ιών ή βακτηρίων) και τα παρουσιάζουν σε κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (CD8+). Αντίθετα τα HLA αντιγόνα τάξης II, παρουσιάζουν εξωγενή αντιγόνα (προϊόντα βακτηρίων ή ευκαρυωτικών παρασίτων) και ενεργοποιούν τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα (CD4+) (55). Το MHC εδράζεται στο χρωμόσωμα 6 και αποτελείται από τρεις δομικές περιοχές (regions), που αντιστοιχούν στις τρεις τάξεις των μορίων HLA (τάξης I, II και III). Κάθε τάξη αποτελείται από αθροίσματα γονιδίων (clusters). Η τάξη I αποτελείται από τρεις ομάδες γενετικών τόπων A, B και C, με εντυπωσιακό πολυμορφισμό: για παράδειγμα στους Καυκάσιους υπάρχουν 60 HLA-A, 138 HLA-B και 40 HLA-C αλληλόμορφα γονίδια. Ο συνδυασμός των γενετικών αυτών τόπων, δημιουργεί το τελικό HLA αντιγόνο. Αντίστοιχα για τα HLA αντιγόνα τάξης II υπάρχουν 8 DP $\alpha$ , 62 DP $\beta$ , 16 DQ $\alpha$ , 25 DQ $\beta$ , 1 DR $\alpha$  και 122DR $\beta$  αλληλόμορφα γονίδια. Λόγω της στενής τους σύνδεσης, ο συνδυασμός των αλληλόμορφων γονιδίων κληρονομείται σαν ενιαία μονάδα, που λέγεται απλότυπος και ο οποίος χαρακτηρίζει πληθυσμούς και φυλετικές ομάδες (55).

Η συχνότητα ορισμένων HLA γονιδίων ανευρίσκεται αυξημένη σε κάποια νοσήματα σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Η πλειονότητα των περιπτώσεων αυτών αφορά κυρίως HLA αντιγόνα τάξης II (56).

### 3.2.δ. T-λεμφοκύτταρα

Όλα τα T-λεμφοκύτταρα έχουν στη μεμβράνη τους υποδοχέα (T-cell receptor, TCR) για πεπτιδικά αντιγόνα, τα οποία παρουσιάζονται από το μείζον σύμπλεγμα

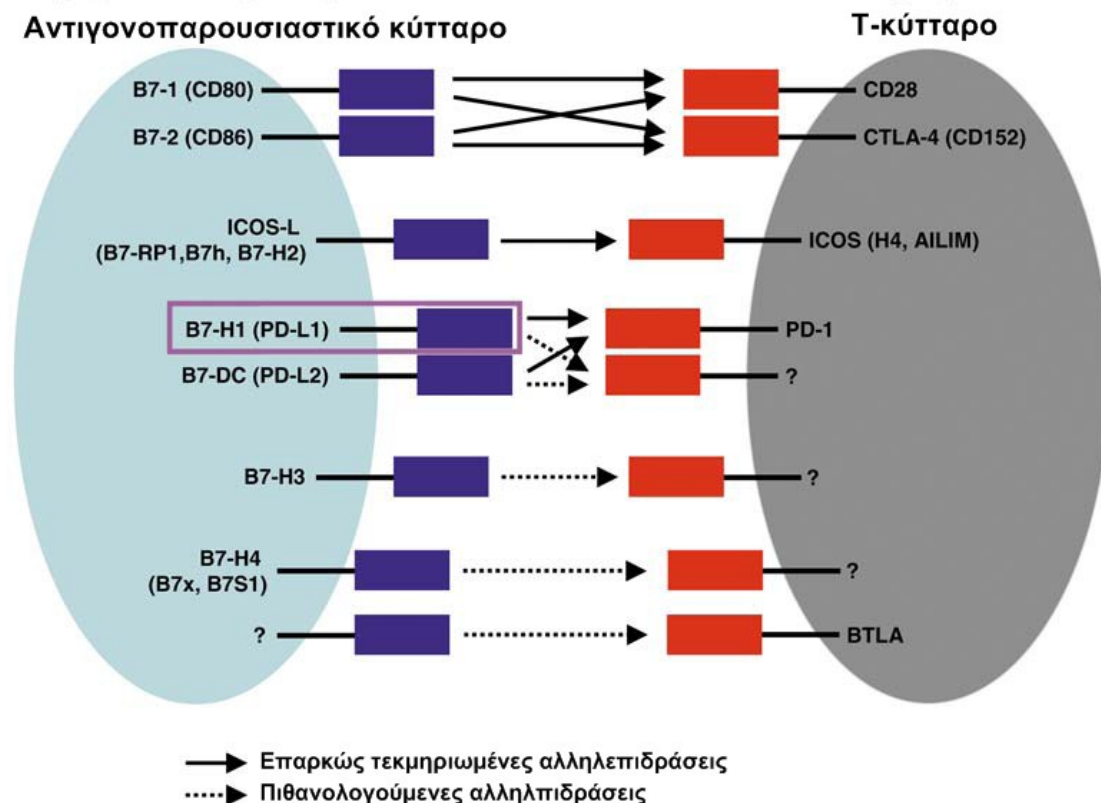
ιστοσυμβατότητας. Ο υποδοχέας αυτός είναι ένα ετεροδιμερές αποτελούμενο από μία  $\alpha$  και μία  $\beta$  αλυσίδα, κάθε μία από τις οποίες περιέχει μία μεταβλητή (V) και μία σταθερή (C) περιοχή. Σε ένα ποσοστό έως 5% ο TCR μπορεί να αποτελείται εναλλακτικά από  $\gamma$  και  $\delta$  αλυσίδες. Αντίστοιχα με τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών, τα γονίδια που κωδικοποιούν τον TCR προκύπτουν από ανασυνδυασμό και σύντηξη ξεχωριστών γονιδιακών τμημάτων, ώστε να επιτυγχάνεται ο μέγιστος αριθμός υποδοχέων με αντιγονική ειδικότητα.

Τα  $\alpha\beta$  T-λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε δύο λειτουργικά διαφορετικούς μη επικαλυπτόμενους υποπληθυσμούς. Τα κύτταρα του ενός από αυτούς φέρουν τον επιφανειακό δείκτη CD4 και κυρίως επικουρούν και επάγουν ανοσολογικές αποκρίσεις, για αυτό και ονομάζονται βοηθητικά T-κύτταρα (helper T-cells,  $T_H$ ). Τα κύτταρα του άλλου υποπληθυσμού καλούνται κυτταροτοξικά T-κύτταρα (cytotoxic T-cells,  $T_C$  ή CTLs) και εκφράζουν το δείκτη CD8. Οι δύο αυτοί υποπληθυσμοί διαφέρουν ως προς τον τρόπο που αναγνωρίζουν αντιγόνα. Τα CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα σε συνδυασμό με τα μόρια MHC της τάξης II, ενώ τα CD8<sup>+</sup> αναγνωρίζουν τα αντιγόνα τους σε συνδυασμό με τα μόρια MHC της τάξης I (26).

Η σύνδεση του συμπλέγματος αντιγονικό πεπτίδιο-MHC μόριο με τον TCR ακολουθείται από σειρά ενδοκυττάρων μηνυμάτων που περιλαμβάνουν την τυροσινική φωσφορύλιωση διαφόρων μεμβρανικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, την υδρόλυση ενός ινοσιτολικού φωσφολιπιδίου της κυτταρικής μεμβράνης, την αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού ασβεστίου και την αύξηση της δραστηριότητας της πρωτεϊνικής κινάσης C. Μέσω των μηχανισμών αυτών επιτελείται η ενεργοποίηση του T-κυττάρου, η οποία οδηγεί σε μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές που επισυμβαίνουν σε χρονικό διάστημα ωρών, όπως η

έκφραση υποδοχέων κυτταροκινών και η έκκριση κυτταροκινών, ή ημερών όπως η αντιγραφή του DNA και η διαίρεση και διαφοροποίηση των κυττάρων.

Τα CD4 και CD8 μόρια κατά την αναγνώριση του αντιγόνου συμπλησιάζουν με το σύμπλεγμα του TCR και συνδέονται με περιοχές του μη μεταβλητού τμήματος των τάξης II και I HLA-μορίων, αντίστοιχα. Η σύνδεση αυτή ενισχύει τη σύνδεση του συμπλέγματος αντιγόνου/HLA μορίου με τον TCR και φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του T-κυττάρου, ως εκ τούτου τα CD4, CD8 καλούνται συνοδά μόρια ή συνυποδοχείς. Επιπρόσθετα, η προσκόλληση του T-κυττάρου στο αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο ενισχύεται με προσκολλητικά μόρια όπως τα LFA-1, CD2 και CD45 που συνδέονται με τα ICAM-1,-2,-3, LFA-3 και CD45L, αντίστοιχα. Η αναγνώριση του συμπλέγματος πεπτιδίου/HLA από τον TCR δεν είναι αρκετή για να ενεργοποιήσει T-λεμφοκύτταρα που δεν έχουν έλθει προηγουμένως σε επαφή με αντιγόνο (παρθένα, naïve T-κύτταρα), αλλά απαιτείται και η παρουσία συνδιεγερτικών μορίων, όπως είναι μόρια της οικογένειας των B7 πρωτεϊνών.



**Εικόνα 18.** Αλληλεπιδράσεις μεταξύ συνδιεγερτικών μορίων του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου και υποδοχέων του T-κυττάρου (57).

Οι B7 πρωτεΐνες περιλαμβάνουν 7 μέχρι σήμερα γνωστά μόρια: τα B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), inducible costimulator ligand (ICOS-L), programmed death -1 ligand (PD-L1), programmed death-2 ligand (PD-L2), B7-H3 και B7-H4. Τα μόρια αυτά εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και συνδέονται με υποδοχείς στην μεμβράνη των T-κυττάρων καθένας εκ των οποίων είναι ειδικός για συγκεκριμένα B7 μόρια (Εικόνα 18). Η σύνδεση των μορίων αυτών στους υποδοχείς των T-κυττάρων μπορεί να έχει τόσο διεγερτική όσο και ανασταλτική δράση για την ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Για παράδειγμα, η σύνδεση του υποδοχέα CD28, που εκφράζεται στην επιφάνεια των παρθένων T-κυττάρων, με τα B7.1 και B7.2 ασκεί συνδιεγερτική δράση αντιγόνου/MHC μορίου στον TCR προκαλεί πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων, παραγωγή κυτταροκινών και απόκτηση ανοσοδραστικών ιδιοτήτων από τα T-κύτταρα.



Τα CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα μετά την ενεργοποίησή τους παράγουν μεσολαβητικές ουσίες που είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση της λειτουργίας T- και B- κυττάρων. Τα βοηθητικά T-κύτταρα βάσει των κυτταροκινών που εκκρίνουν διακρίνονται σε δύο υποπληθυσμούς, τα T<sub>H</sub>1 και T<sub>H</sub>2 κύτταρα. Τα T<sub>H</sub>1 κύτταρα παράγουν IFN- $\gamma$  και TNF- $\beta$  καθώς και IL-2. Οι κυτταροκίνες αυτές προάγουν τις λειτουργίες των μακροφάγων και των άλλων φαγοκυττάρων και κατά συνέπεια την ενδοκυττάρια καταστροφή των παθογόνων. Αντίθετα, τα T<sub>H</sub>2 κύτταρα εκκρίνουν IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 και IL-13, που δρουν ως χημειοτακτικοί παράγοντες των B-κυττάρων, των ιστιοκυττάρων και των βασεόφιλων και προάγουν τη συμμετοχή αυτών των κυττάρων στην ανοσολογική απάντηση. Τέλος, οι διαφορετικοί υποπληθυσμοί βοηθητικών T-κυττάρων προάγουν την παραγωγή διαφορετικών ισότυπων ανοσοσφαιρινών και υποτάξεων αυτών από τα B-κύτταρα (58). Πρόσφατα έχουν αναγνωρισθεί και άλλες κατηγορίες βοηθητικών T-κυττάρων, όπως τα T<sub>H</sub>3 λεμφοκύτταρα που εκκρίνουν κυρίως TGF- $\beta$ 1, έχοντας κατασταλτική δράση στην παραγωγή κυτταροκινών από τα T<sub>H</sub>1 και γενικά φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας στην παραγωγή των T<sub>H</sub>1 και T<sub>H</sub>2 κυτταροκινών και την περιφερική ανοχή (59-61), τα T<sub>H</sub>9 και τα T<sub>H</sub>17 κύτταρα που χαρακτηρίζονται, αντίστοιχα, από την παραγωγή IL-9 και IL-17, και η συμμετοχή τους στην παθογένεια αυτοάνοσων νοσημάτων αποτελεί αντικείμενο έντονης έρευνας (62-64).

Τα CD8<sup>+</sup> κύτταρα απαντούν στα αντιγονικά ερεθίσματα καταστρέφοντας τα κύτταρα που παρουσιάζουν τα αντιγόνα. Η ανάπτυξη της κυτταρολυτικής δράσης κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των CTLs είναι αποτέλεσμα συνδυασμού της αναγνώρισης του αντιγόνου και έκθεσης στην δράση της IL-2. Χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση κυτταροπλασματικών κοκκίων που περιέχουν περφορίνες και γρανζύμες, οι οποίες με τη σειρά τους συντελούν στην ενεργοποίηση

αποπτωσιογόνων κασπασών στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων στόχων. Τα ενεργοποιημένα CTLs εκφράζουν ακόμη μία μεμβρανική πρωτεΐνη, τον προσδέτη του Fas (Fas Ligand, FasL), ο οποίος συνδεόμενος με τον υποδοχέα Fas των κυττάρων-στόχων οδηγεί επίσης στην απόπτωσή τους.

### **3.3 Ανοσολογική ανοχή**

Ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του ανοσολογικού συστήματος είναι ότι αν και έχει τη δυνατότητα να αντιδρά σε μία πληθώρα μικροοργανισμών, δεν αντιδρά έναντι των αντιγόνων του ίδιου του οργανισμού. Αυτή η δυνατότητα του ανοσολογικού να μην αντιδρά σε ίδια αντιγόνα καλείται ανοσολογική ανοχή.

Εντός του ανοσολογικού συστήματος, κατά την ωρίμανση των λεμφοκυττάρων παράγονται συνεχώς λεμφοκύτταρα τα οποία αναγνωρίζουν τα ίδια αντιγόνα. Επομένως, καθίσταται απαραίτητη η ύπαρξη μηχανισμών που αποτρέπουν την ανοσολογική απάντηση έναντι των ίδιων αντιγόνων. Η ύπαρξη αυτών των μηχανισμών αποτελεί μία από τις κυριότερες λειτουργίες του ανοσολογικού συστήματος, τη διάκριση δηλαδή μεταξύ ίδιων και ξένων αντιγόνων. Συνοπτικά οι βασικοί μηχανισμοί ανοσολογικής ανοχής περιγράφονται παρακάτω.

#### **3.3.a Κεντρική T-λεμφοκυτταρική ανοχή**

Κατά την άφιξή τους στο θύμο τα προγονικά κύτταρα στερούνται όλων σχεδόν των επιφανειακών δεικτών που χαρακτηρίζουν τα ώριμα T-κύτταρα. Η επαφή των προγονικών κυττάρων με τα κύτταρα του στρώματος του θύμου πυροδοτεί τον ταχύτατο πολλαπλασιασμό τους και την έκφραση της πρώτης ειδικής για τα T-κύτταρα μεμβρανικής πρωτεΐνης, που είναι το CD2. Στο τέλος αυτής της φάσης, τα άωρα θυμοκύτταρα φέρουν μερικούς χαρακτηριστικούς δείκτες της T-κυτταρικής

σειράς, αλλά δεν εκφράζουν ούτε το σύμπλεγμα του TcR ούτε CD4 ή CD8 (διπλά αρνητικά θυμοκύτταρα) (44, 65).

Τη φάση αυτή ακολουθεί μία φάση έντονου πολλαπλασιασμού των θυμοκυττάρων στην υποκάψια ζώνη και διαφοροποίησής τους προς κύτταρα που εκφράζουν μικρό αριθμό TcR, CD4 και CD8. Αυτά τα διπλά θετικά θυμοκύτταρα μετακινούνται προς το φλοιό, όπου υφίστανται θετική και αρνητική επιλογή (65, 66). Η θετική επιλογή ή εκπαίδευση των λεμφοκυττάρων είναι αποτέλεσμα κριτικών αλληλεπιδράσεων των TcR, CD4 και CD8 με τα MHC-μόρια των επιθηλιακών κυττάρων του θυμικού φλοιού. Από τη διαδικασία αυτή επιβιώνουν μόνο όσα κύτταρα συνδέονται με τα MHC-μόρια με μία συγκεκριμένη συγγένεια. Τα υπόλοιπα, που συνδέονται με μικρότερη ή με μεγαλύτερη συγγένεια, καταστρέφονται μέσω μιας διεργασίας που ονομάζεται απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Η διεργασία αυτή είναι αποτέλεσμα της σύνθεσης ενδονουκλεασών, οι οποίες κατακερματίζουν το DNA σε τεμάχια μεγέθους 200 περίπου βάσεων.

Η θετική επιλογή επιτρέπει, τελικά, την έκπτυξη T-κυτταρικών κλώνων περιορισμένων ως προς τα ίδια MHC-μόρια και ειδικών τόσο για τα ξένα όσο και για τα ίδια αντιγόνα. Προκειμένου, να αποφευχθεί η απελευθέρωση στην περιφέρεια των ειδικών για τα ίδια αντιγόνα κλώνων, τα λεμφοκύτταρα υφίστανται στη συνέχεια τη λεγόμενη αρνητική επιλογή. Η επιλογή αυτή επιτυγχάνεται κατά τη μετακίνηση των διπλά θετικών, MHC-περιορισμένων θυμοκυττάρων από το φλοιό προς το μυελό του θύμου και είναι συνέπεια της αλληλεπίδρασής τους με τα αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά και μακροφάγα κύτταρα της φλοιομυελικής συμβολής.

Όταν άωρα T-κύτταρα κατά τη διάρκεια της παραμονής τους στο θύμο αναγνωρίσουν με υψηλή συγγένεια ίδια αντιγόνα που βρίσκονται στο θύμο, τότε τα T-λεμφοκύτταρα υφίστανται απόπτωση και πεθαίνουν, μέσω ενός μηχανισμού που καλείται αρνητική

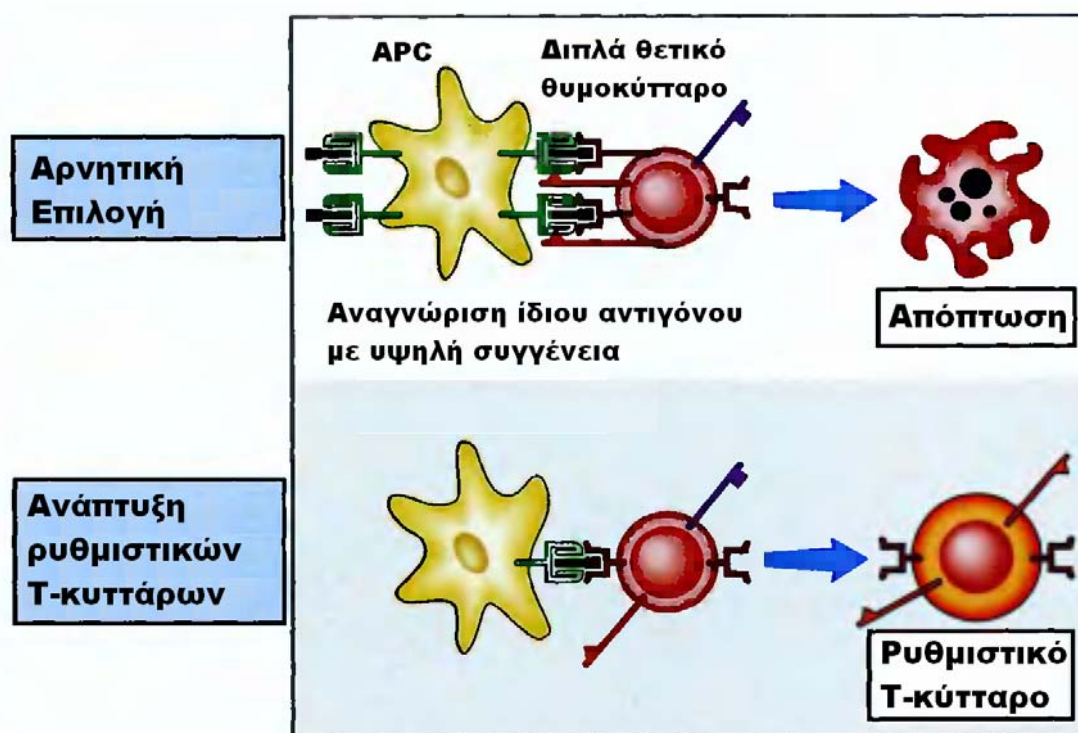
επιλογή και είναι ο κυριότερος μηχανισμός της κεντρικής ανοχής (67). Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους περνούν από το θύμο λεμφοκύτταρα με την ικανότητα να αναγνωρίζουν τόσο ίδια όσο και ξένα αντιγόνα. Φαίνεται ότι μέσα στο θύμο τέτοια ίδια αντιγόνα εκτίθενται στα λεμφοκύτταρα ως πεπτίδια συνδεδεμένα με μόρια του MHC. Τα άωρα λεμφοκύτταρα μπορεί να εμφανίζουν έντονη αλληλεπίδραση με αυτά τα αντιγόνα, τόσο επειδή τα αντιγόνα βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση στο θύμο, όσο και επειδή τα λεμφοκύτταρα εκφράζουν υποδοχείς που συνδέουν το αντιγόνο με υψηλή συγγένεια. Τα ίδια αντιγόνα που προκαλούν ανοχή μέσω του μηχανισμού της αρνητικής επιλογής τείνουν να βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο θύμο σε σχέση με αντιγόνα που επάγουν τη θετική επιλογή. Τέτοια αντιγόνα περιλαμβάνουν πεπτιδικά αντιγόνα που βρίσκονται σε αφθονία σε όλο τον οργανισμό, όπως πρωτεΐνες πλάσματος και συνήθεις κυτταρικές πρωτεΐνες. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά ίδια αντιγόνα που θεωρούνταν ότι εκφράζονται αποκλειστικά σε περιφερικούς ιστούς, εκφράζονται και σε επιθηλιακά κύτταρα του θύμου. Ένας μεταγραφικός παράγοντας που καλείται AIRE (autoimmune regulator) θεωρείται υπεύθυνος για την έκφραση αυτών των ίδιων αντιγόνων στο θύμο (68). Μεταλλάξεις του γονιδίου aire που κωδικοποιεί αυτόν τον παράγοντα, είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη του αυτοάνοσου συνδρόμου APECED (autoimmune polyendocrinopathy syndrome with candidiasis and ectodermal dysplasia), καταδεικνύοντας τη σημασία της διαδικασίας της θυμικής έκφρασης των ίδιων αντιγόνων για την προστασία από αυτοάνοσες νόσους.

Τα άωρα λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν αυτά τα ίδια αντιγόνα, δέχονται σήματα που εκκινούν τη διαδικασία της απόπτωσης, του προγραμματισμένου δηλαδή κυτταρικού θανάτου, ούτως ώστε να ωριμάζουν μόνο τα T-λεμφοκύτταρα που δεν επάγουν αυτοάνοσες αντιδράσεις. Μέσω της διαδικασίας αυτής της κεντρικής ανοχής

ελέγχονται τα CD4<sup>+</sup> T-κύτταρα που αναγνωρίζουν αντιγόνα της τάξης II του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας και CD8<sup>+</sup> T-κύτταρα που αναγνωρίζουν αντιγόνα της τάξης I του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας.

Ωστόσο, δεν οδηγούνται όλα τα T-κύτταρα που αναγνωρίζουν ίδια αντιγόνα σε απόπτωση, καθώς ορισμένα τέτοια κύτταρα ωριμάζουν σε ρυθμιστικά (regulatory) T-κύτταρα που διανέμονται στην περιφέρεια (Εικόνα 19).

Το ερέθισμα που ρυθμίζει αν ένα αυτοαντιδρόν T-κύτταρο θα υποστεί απόπτωση ή μετατροπή σε ρυθμιστικό T-κύτταρο δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως.



Εικόνα 19. Μηχανισμός κεντρικής ανοχής. Η αναγνώριση ίδιων αντιγόνων στο θύμο από διπλά θετικά θυμοκύτταρα οδηγεί μέσω της διαδικασίας της αρνητικής επιλογής σε απόπτωσή τους, σε ορισμένες όμως περιπτώσεις ενδέχεται να οδηγήσει στην ανάπτυξη ρυθμιστικών κυττάρων (23).

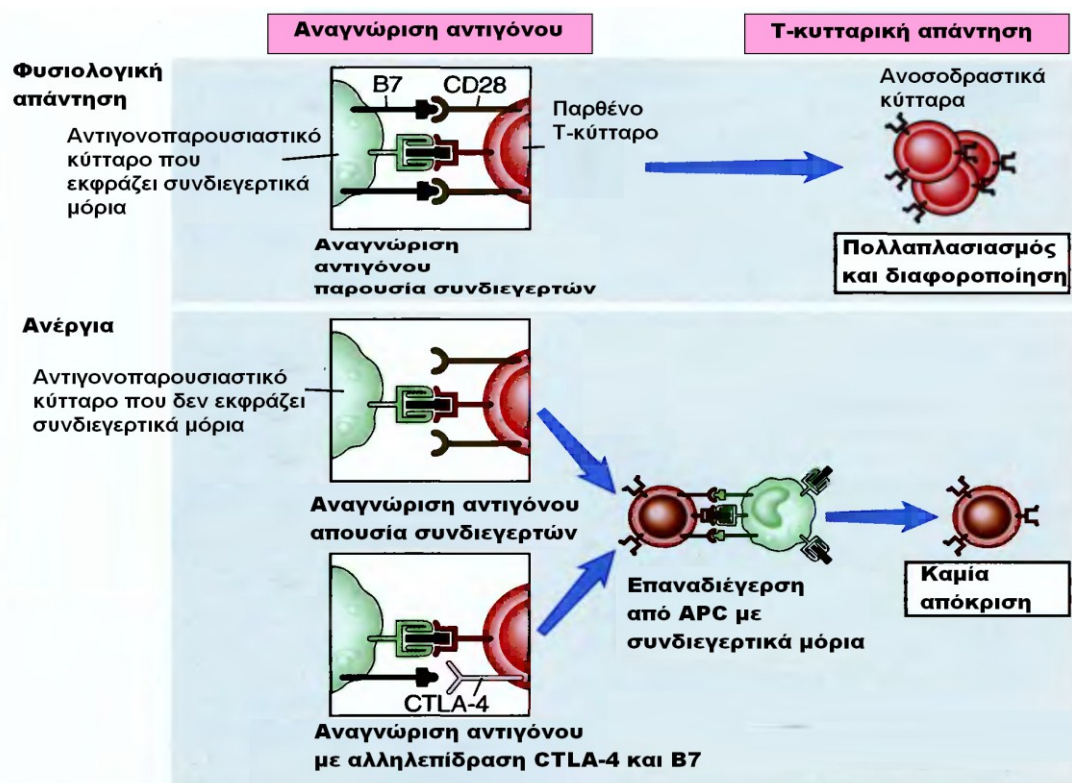
### 3.3.β Περιφερική Ανοχή.

Όταν η αναγνώριση των ίδιων αντιγόνων γίνεται από ώριμα λεμφοκύτταρα σε περιφερικούς ιστούς, τότε κινητοποιείται η διαδικασία της περιφερικής ανοχής, κατά την οποία τα T-λεμφοκύτταρα οδηγούνται είτε σε λειτουργική αδρανοποίηση

(ανέργια) είτε σε κυτταρικό θάνατο είτε τέλος σε καταστολή από τα ρυθμιστικά T-κύτταρα (69). Η σημασία της περιφερικής ανοχής έγκειται αφενός στην αποτροπή της T-κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης έναντι ίδιων αντιγόνων που βρίσκονται κατεξοχήν στους περιφερικούς ιστούς αλλά όχι στο θύμο και αφετέρου ως ένας αναπληρωματικός μηχανισμός για την αποτροπή αυτοάνοσων παθήσεων στην περίπτωση που η διαδικασία της κεντρικής ανοχής είναι ατελής.

### *Ανέργια*

Ο όρος ανέργια χρησιμοποιείται για να περιγράψει την λειτουργική αδρανοποίηση των T-λεμφοκυττάρων που συμβαίνει όταν τα T-κύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα χωρίς όμως την παρουσία του απαραίτητου για την ενεργοποίησή τους δεύτερου μηνύματος που χρειάζεται για την επαγωγή πλήρους T-κυτταρικής απόκρισης (Εικόνα 20).



**Εικόνα 20. T-κυτταρική ανέργια.** Η ενεργοποίηση των T-κυττάρων απαιτεί εκτός από την αναγνώριση του αντιγόνου και τη συνύπαρξη συνδιεγερτικών μορίων που ανήκουν στην οικογένεια των B7 πρωτεϊνών. Τα ενεργοποιημένα κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα CTLA-4 που συνδέεται με τα B7 μόρια ασκώντας ανασταλτική δράση στην ενεργοποίηση του T-κυττάρου (23).

Σύμφωνα με την κλασσική θεωρία των Bretscher και Cohn, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των T-κυττάρων σε ανοσοδραστικά κύτταρα απαιτεί δύο μηνύματα (70). Το πρώτο περιλαμβάνει τη σύνδεση του συμπλέγματος αντιγονικό πεπτίδιο-MHC μόριο με τον TcR του T-κυττάρου και ακολουθείται από την πρώιμη φάση μεταβίβασης του μηνύματος.

Το δεύτερο μήνυμα παρέχεται από μόρια που εκφράζονται πρωταρχικά από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και ανήκουν στην οικογένεια των B7 πρωτεϊνών (71). Τα μόρια αυτά εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και συνδέονται με υποδοχείς στην μεμβράνη των T-κυττάρων καθένας εκ των οποίων είναι ειδικός για συγκεκριμένα B7 μόρια. Η

σύνδεση των μορίων αυτών στους υποδοχείς των T-κυττάρων μπορεί να έχει τόσο διεγερτική όσο και ανασταλτική δράση για την ενεργοποίηση των T-κυττάρων (57).

Συγκεκριμένα, ο υποδοχέας CD28 που εκφράζεται στην επιφάνεια των άωρων T-κυττάρων συνδεόμενος με τα B7.1 και B7.2 ασκεί συνδιεγερτική δράση που μαζί με τη σύνδεση του συμπλέγματος αντιγόνου-MHC στον TCR προκαλεί πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων, παραγωγή κυτταροκινών και απόκτηση ανοσοδραστικών ιδιοτήτων από τα T-κύτταρα.

Στα ενεργοποιημένα T-κύτταρα εκφράζεται ένας δεύτερος υποδοχέας, που καλείται ICOS και συνδέει το ICOS-L και αυτή η σύνδεση έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω ενεργοποίηση του T-κυττάρου, την έκκριση κυτταροκινών και την παραγωγή αντισωμάτων από τα B-κύτταρα. Φαίνεται ότι η ενεργοποίηση του ICOS επάγει ως επί το πλείστον T<sub>H</sub>2 κυτταρική απάντηση και έχει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση T- και B-κυττάρων.

Η ενεργοποίηση των T-κυττάρων συνοδεύεται και από την παραγωγή του υποδοχέα CTLA-4 που εκφράζεται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων T-κυττάρων σε ποσοστό 2-3% σε σχέση με τον CD28 (72, 73). Ο CTLA-4 συνδέει ισχυρότερα τα B7.1 και B7.2 κατά 20-50 φορές σε σχέση με τον CD28. Η σύνδεση των B7 μορίων στον CTLA-4 έχει ανασταλτική δράση για την ενεργοποίηση των T-κυττάρων ελαττώνοντας την παραγωγή IL-2 και IL2-R και διακόπτοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παράλληλα, το CTLA-4 ανταγωνίζεται τον CD28 για τα B7.1 και B7.2.

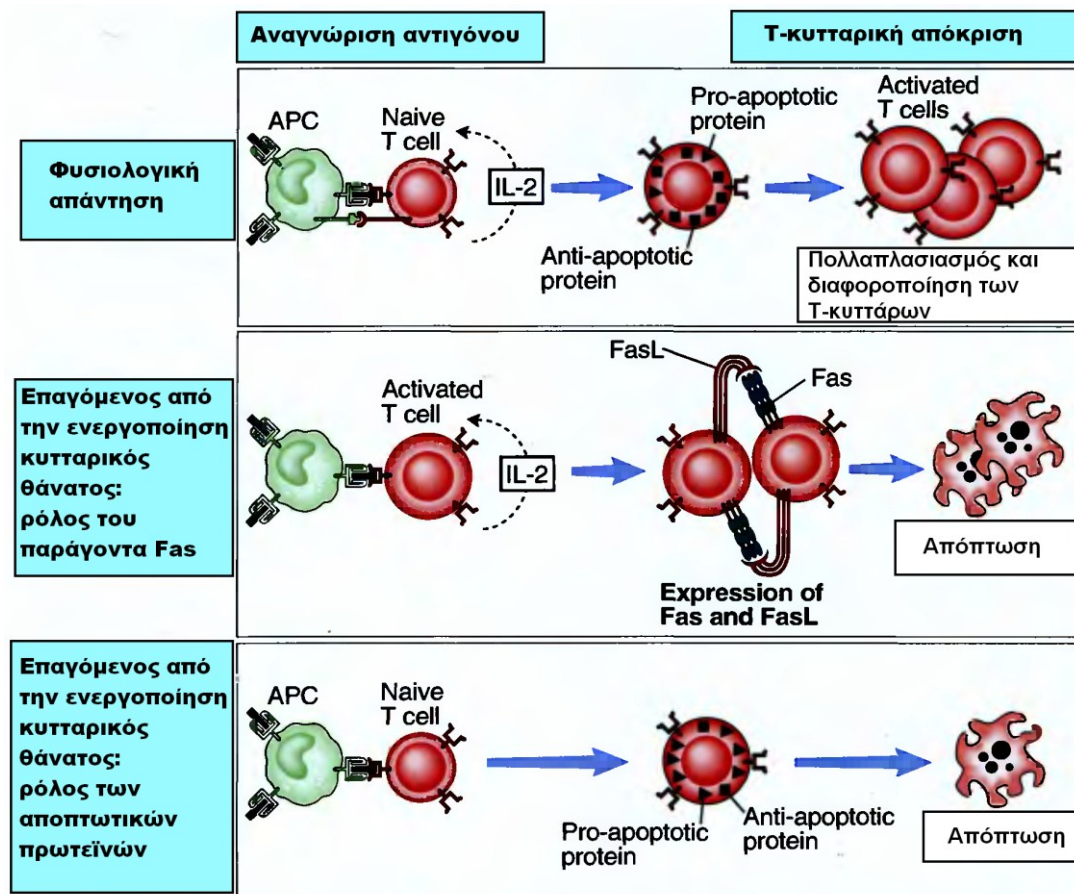
Η ισορροπία μεταξύ ανασταλτικών και συνδιεγερτικών μεσολαβητών του δεύτερου μηνύματος καθορίζει αν το T-κύτταρο θα μετατραπεί σε ανοσοδραστικό κύτταρο, ικανό για ανοσολογική απάντηση ή θα υποστεί ανέργια και δεν θα είναι ικανό για μετέπειτα ανοσολογική απάντηση.



Οι παράγοντες που ρυθμίζουν αυτή την ισορροπία δεν είναι επαρκώς αποσαφηνισμένοι, ωστόσο πολυμορφισμοί του γονιδίου που κωδικοποιεί το CTLA-4 ίσως έχουν πρωταρχικό ρόλο. Αν και οι γενετικοί πολυμορφισμοί του CTLA-4 προκαλούν μόνον ήπιες μεταβολές στην έκφραση του γονιδίου και στην ενδοκυττάρια κατανομή του CTLA-4, το γεγονός ότι αριθμός μελετών έχει αποδείξει θετική συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών αυτών και πληθώρας αυτοάνοσων παθήσεων (όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα, η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα κ.α.) συνηγορεί υπέρ της σημασίας του ανασταλτικού ρόλου του CTLA-4 για την προστασία από την αυτοανοσία (74).

#### *Εξάλειψη- Επαγόμενος από την ενεργοποίηση κυτταρικός θάνατος.*

Επανεπιλημμένη ενεργοποίηση των ώριμων T-λεμφοκυττάρων από ίδια αντιγόνα ή αναγνώριση ίδιων αντιγόνων χωρίς την παρουσία δευτέρου σήματος, ενεργοποιεί αποπτωτικούς μηχανισμούς που οδηγούν στην εξάλειψη των λεμφοκυττάρων που αντιδρούν με ίδια αντιγόνα, με έναν εκ των δύο ακόλουθων μηχανισμών (Εικόνα 21): Πρώτον, η επανεπιλημμένη ενεργοποίηση των CD4<sup>+</sup> T-κυττάρων προάγει την έκφραση ενός παράγοντα που καλείται Fas και του προσδέτη του, FasL (Fas Ligand). Ο FasL συνδέεται με τον Fas στο ίδιο ή σε παρακείμενα κύτταρα και η σύνδεση αυτή ενεργοποιεί κυτταρικούς μηχανισμούς που οδηγούν στη παραγωγή κασπασών, κυτταροπλασματικών δηλαδή ενζύμων που επάγουν την απόπτωση των κυττάρων. Ιδιαίτερο ρόλο σε αυτή τη διαδικασία έχει και η ιντερλευκίνη-2 (IL-2), η οποία αν και έχει πρωταρχικό ρόλο κατά την ενεργοποίηση των T-κυττάρων φαίνεται ότι ασκεί και αρνητική ανατροφοδοτική δράση με την ενίσχυση της FasL-απόπτωσης.



Εικόνα 21. Η T-κυτταρική απάντηση φυσιολογικά χαρακτηρίζεται από την παραγωγή IL-2, αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών και τον επακόλουθο πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Σε επανειλημμένη ενεργοποίηση των T-κυττάρων από ίδια αντιγόνα, έχουμε αυξημένη έκφραση του αποπτωτικού παράγοντα Fas και αποπτωτικών πρωτεϊνών που καταλήγουν στην απόπτωση των T-κυττάρων (23).

Ο μηχανισμός της εξάλειψης μέσω της ενεργοποίησης δεν επηρεάζει τόσο την ανοσολογική απόκριση έναντι των ξένων όσο έναντι των ιδίων αντιγόνων. Οι ενίοτε ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι των μικροβιακών αντιγόνων συνήθως οδηγούν στην απομάκρυνση των μικροβίων και τις περιορισμένες ενεργοποιήσεις των ειδικών T-κυττάρων. Αντίθετα, η επαφή με τα ίδια αντιγόνα είναι συνεχής και επανειλημμένη με αποτέλεσμα να ενισχύεται η FasL-σχετιζόμενη απόπτωση.

Ο δεύτερος πιθανολογούμενος μηχανισμός δεν περιλαμβάνει τη συμμετοχή του παράγοντα Fas (Εικόνα 21). Σύμφωνα με αυτόν η αναγνώριση του αντιγόνου οδηγεί στην παραγωγή αποπτωτικών πρωτεϊνών εντός των T-κυττάρων. Κατά την

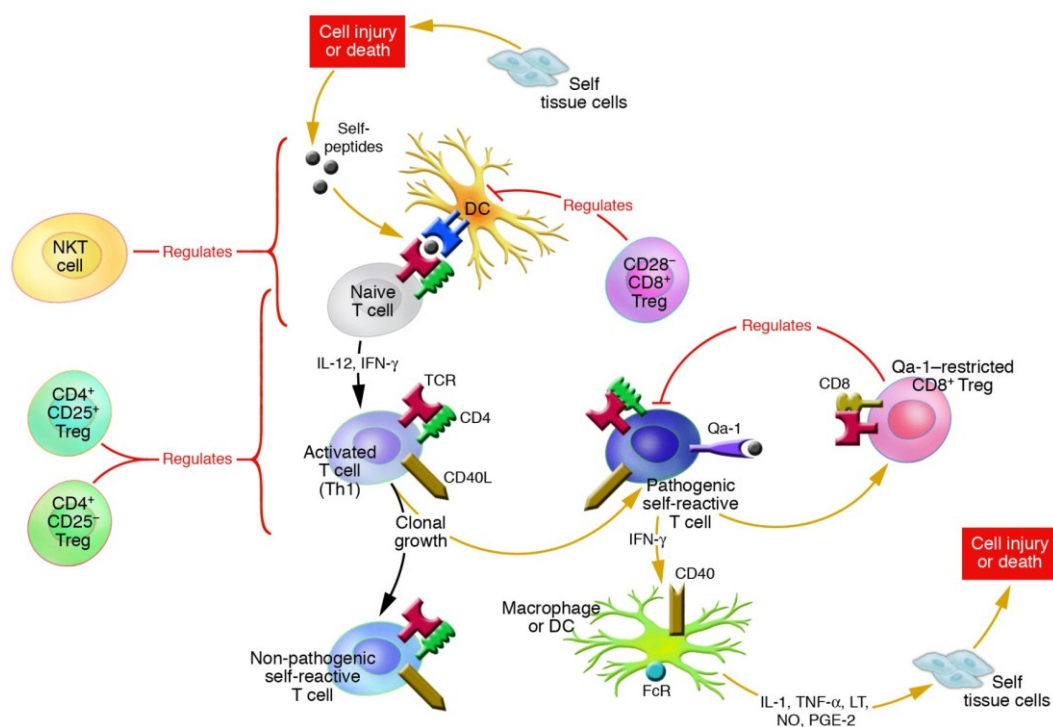
ανοσολογική απάντηση έναντι μικροβιακών αντιγόνων η δράση αυτών των πρωτεϊνών αντισταθμίζεται από αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες που παράγονται πιθανότατα κατά τη διαδικασία της συνδιέγερσης. Κατά την ανοσολογική απάντηση έναντι ίδιων αντιγόνων δεν παράγονται τέτοιες αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να μην αντισταθμίζεται η δράση των αποπτωτικών πρωτεϊνών.

Η σημασία της FasL-απόπτωσης στην ανάπτυξη της περιφερικής ανοχής υποστηρίζεται τόσο από κλινικά όσο και από πειραματικά δεδομένα. Συγκεκριμένα, ποντίκια με μεταλλάξεις των γονιδίων fas ή fasL αναπτύσσουν αυτοανοσία, ενώ παιδιά με μετάλλαξη του γονιδίου fas αναπτύσσουν το σπάνιο αυτοάνοσο λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο.

#### *Περιφερική καταστολή της ανοσολογικής απάντησης*

Ένας σημαντικός μηχανισμός ελέγχου της ανοσολογικής απάντησης στην περιφέρεια είναι και η κατασταλτική δράση που ασκούν διάφορα κύτταρα του ίδιου του ανοσολογικού συστήματος στην υπέρμετρη ενεργοποίησή του (Εικόνα 22).

Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο μεταξύ των κατασταλτικών κυττάρων έχουν ορισμένα T-κύτταρα, που αναγνωρίζουν ίδια αντιγόνα και μετά την επαφή τους με αυτά εξελίσσονται σε ρυθμιστικά T-κύτταρα (regulatory T-cells, Tregs). Η ανάπτυξη των ρυθμιστικών T-κυττάρων μπορεί να λαμβάνει χώρα είτε στο θύμο, είτε στην περιφέρεια.



**Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση διάφορων μηχανισμών ελέγχου της ανοσολογικής απάντησης. Διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί μπορούν να ασκούν κατασταλτική δράση, όπως είναι τα NK-κύτταρα, τα CD4+ και τα CD8+ κύτταρα (75).**

Συχνότερα τα ρυθμιστικά T-κύτταρα είναι CD4+ T-κύτταρα που εκφράζουν αυξημένα επίπεδα CD25 (που είναι η α-άλυσος του υποδοχέα της IL-2), ωστόσο παρατηρείται σημαντική ετερογένεια μεταξύ των ρυθμιστικών κυττάρων. Ιδιότητες ρυθμιστικών κυττάρων μπορούν να έχουν, εκτός από CD4+CD25+ T-κύτταρα, και CD4+CD25- T-κύτταρα, ενώ CD25 εκφράζουν και άλλα T-κύτταρα στη φάση της ενεργοποίησής τους. Επομένως η διάκριση των ρυθμιστικών κυττάρων είναι δυσχερής όταν χρησιμοποιείται ως κριτήριο μόνο η ύπαρξη του CD25, και ως εκ τούτου, έχει προταθεί η διάκριση των ρυθμιστικών T-κυττάρων να γίνεται με κριτήριο την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3, ο οποίος απαιτείται για την εκδήλωση της κατασταλτικής λειτουργίας των ρυθμιστικών T-κυττάρων.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα ρυθμιστικά T-κύτταρα περιορίζουν την ανοσολογική απάντηση περιλαμβάνουν την έκκριση ανασταλτικών κυτταροκινών (όπως είναι η IL-10 και ο TGFβ), την απευθείας κυτταρολυτική δράση μέσω της έκκρισης γρανζυμών, την τροποποίηση των μεταβολικών λειτουργιών των ανοσοδραστικών T-κυττάρων (μέσω της κατανάλωσης της IL-2 που απαιτούν τα ανοσοδραστικά κύτταρα και μέσω της παραγωγής αδενοσίνης που επηρεάζει τη λειτουργικότητα των ανοσοδραστικών κυττάρων) και τέλος, την καταστολή των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων που απαιτούνται για την ενεργοποίηση των T-κυττάρων (76, 77).

Ο σημαντικός ρόλος των ρυθμιστικών T-κυττάρων στην περιφερική καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης και τον περιορισμό αυτοάνοσων παθήσεων, τεκμαίρεται έμμεσα και από το γεγονός ότι μεταλλάξεις του Foxp3 οδηγούν σε σοβαρό σύνδρομο ανοσολογικής δυσλειτουργίας, πολυενδοκρινοπάθειας, και εντεροπάθειας με φυλοσύνδετη κληρονομικότητα (Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy and X-linked inheritance, IPEX Syndrome) (76).

#### 4. ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ-ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα αυτοάνοσα νοσήματα χαρακτηρίζονται από την παρουσία λεμφοκυττάρων που αναγνωρίζουν ίδια αντιγόνα και από την κυκλοφορία αυτοαντισωμάτων, δηλαδή ανοσοσφαιρινών έναντι των ίδιων αντιγόνων. Η ανακάλυψη αντισωμάτων έναντι δομών του ανθρωπίνου σώματος στα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα (78, 79), σε συνδυασμό με τη βελτίωση των γνώσεων για τη λειτουργία του ανοσολογικού συστήματος, μας βοήθησε να κατανοήσουμε ότι οι προαναφερθέντες μηχανισμοί ανοσολογικής ανοχής ενδέχεται να δυσλειτουργήσουν και να υπερκεραστούν (breakdown of tolerance) με αποτέλεσμα την ανοσολογική απόκριση έναντι ίδιων αντιγόνων.

Η ανοσολογική απόκριση προϋποθέτει την ενεργοποίηση από διάφορους παράγοντες των αυτο-ανοσοδραστικών κυττάρων που υπάρχουν φυσιολογικά στην κυκλοφορία, αλλά βρίσκονται σε κατάσταση ανέργειας, με έναν από τους παρακάτω τρόπους:

- Ιστική βλάβη συνεπεία της λοίμωξης μπορεί να απελευθερώσει στην κυκλοφορία αντιγόνα που είναι ενδοκυττάρια ή αποκεκρυμμένα από το ανοσολογικό σύστημα (κρυπτικά αυτοαντιγόνα) (80).
- Προϊόντα των μικροοργανισμών, καθώς και κυτταροκίνες που παράγονται στο σημείο της φλεγμονής μπορεί να λειτουργήσουν σαν συνδιεγερτικά μόρια ενισχύοντας την αντιγονοπαρουσίαση (81, 82).
- Πολλές τοξίνες διαφόρων μικροοργανισμών, όπως η σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη, και δομικά στοιχεία ιών, όπως ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV), και ο ιός Epstein-Barr, δρουν σαν υπεραντιγόνα, προκαλώντας μη ειδική πολυκλωνική ενεργοποίηση μεγάλης ομάδας λεμφοκυττάρων (83).
- Προσκόλληση ξένης απτίνης σε πρωτεΐνη κυτταρικής επιφάνειας μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία αντισωμάτων με δράση αυτοαντισώματος. Μέσω αυτού του μηχανισμού η χορήγηση κινιδίνης μπορεί να προκαλέσει αιμολυτική αναιμία και το

αμέσως δρών αγγειοδιασταλτικό, υδραλαζίνη, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη φαρμακευτικού λύκου (84).

- Άλλος πιθανός μηχανισμός ανάπτυξης αυτοαντισωμάτων είναι η μοριακή μίμηση. Ο όρος «μοριακή μίμηση» εισήχθη από τον R. Damian το 1964 για να περιγράψει το φαινόμενο της μεγάλης ομολογίας μεταξύ ενός συστατικού στοιχείου ή ενός προϊόντος ενός λοιμογόνου παράγοντα με κάποιο «ίδιο» πεπτίδιο και τις συνέπειες αυτής της ομοιότητας στην ανοσολογική απόκριση μετά από λοίμωξη από αυτό τον λοιμογόνο παράγοντα (85). Ωστόσο, αν και ο Damian θεωρούσε απίθανο αυτή η εξελικτική διαδικασία να επέτρεπε την ύπαρξη τέτοιων αντιγόνων, η επακόλουθη έρευνα συνηγορεί υπέρ του ότι η μοριακή μίμηση αποτελεί σημαντικό μηχανισμό επαγωγής αυτοανοσίας σε διάφορες παθήσεις. Συγκεκριμένα, ομοιότητες μεταξύ του στρεπτόκοκκου και καρδιακών πρωτεϊνών έχουν ενοχοποιηθεί στην παθογένεια του ρευματικού πυρετού, ομοιότητες μεταξύ του ιού Coxsackie και του παγκρέατος έχουν ενοχοποιηθεί στην παθογένεια του σακχαρώδους διαβήτη, ενώ ομοιότητες μεταξύ λιποολιγосακχαριτών του *Campylobacter jejuni* και του ανθρώπινου γαγγλιοσιδίου GM1 έχουν ενοχοποιηθεί στην παραγωγή αντιγαγγλιοσιδικών αντισωμάτων και την εμφάνιση συνδρόμου Guillain-Barré (Πίνακας 4.1) (86, 87).

- Γενετική προδιάθεση. Τα αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα δέχονται την επίδραση ενός μεγάλου αριθμού σημάτων, κάποια από τα οποία προάγουν την ανοχή (ανοχογεννητικά σήματα), όπως IL2, Fas/FasL, TGF-β, IL10, CTLA4, FcγR2b, CD5, CD22, ενώ άλλα προάγουν την ανοσία (ανοσογεννητικά), όπως LPS, TNFα, C3d/CD21, IL7 και IL15. Η αυτοάνοση απόκριση φαίνεται να προκύπτει από διαταραχή της ισορροπίας ανοχογεννητικών-ανοσογεννητικών σημάτων (88). Ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν αυτή την ισορροπία είναι και η γενετική προδιάθεση, με ιδιαίτερη σημασία του HLA απλότυπου (89). Η έκταση της

εξουδετέρωσης των αυτοδραστικών T-κυττάρων στο θύμο ποικίλλει, εξαρτώμενη από το γονότυπο των MHC II μορίων του κάθε ατόμου, με ορισμένους MHC II γονότυπους να αποτυγχάνουν να οδηγήσουν σε αρνητική επιλογή αυτοδραστικών T-λεμφοκυττάρων ή σε θετική επιλογή ανοσορρυθμιστικών T-λεμφοκυττάρων. Κάτι ανάλογο μπορεί να και στην περιφερική T-λεμφοκυτταρική ανοχή κατά την παρουσίαση του αντιγόνου στα T-κύτταρα μέσω του MHC II. Επιπρόσθετα, δεδομένα που προκύπτουν από την ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος συνηγορούν υπέρ της ύπαρξης πολυμορφισμών σε γονίδια κυτταροκινών, υποδοχέων κυτταροκινών και άλλων ανοσορρυθμιστικών μορίων που σχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση για αυτοανοσία (89).

**Πίνακας 1. Μηχανισμοί μοριακής μίμησης που ενοχοποιούνται σε διάφορες αυτοάνοσες παθήσεις**

Νόσος	Όργανο / Αυτοαντιγόνο	Λοιμογόνος παράγων / αντιγόνο
Αρθρίτιδα Lyme	Αρθρώσεις / LFA 1	Borrellia burgdorferi/ OspA
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	Αρθρώσεις/ Hsp60	Mycobacteria/ Hsp60
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	Αρθρώσεις/ DRB1*0401	E. coli/ DNAj
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	Αρθρώσεις/ DRB1*0401	EBV/ gp110
Πολλαπλή σκλήρυνση	Εγκέφαλος/ Μυελίνη	EBV/ capsid
Πολλαπλή σκλήρυνση	Εγκέφαλος/ Μυελίνη	Papillomavirus/ L2
Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1	β-κύτταρα παγκρέατος/ GAD <sub>65</sub>	Coxsackie B/ P2C
Σύνδρομο stiff-man (SPS)	Νευρώνες/ GAD <sub>67</sub>	CMV/ DNA binding protein
Πρωτοπαθής χολική κίρρωση	Χοληφόρα/ PDC-E2	E. coli/ PDC-E2
Νόσος Chagas	Καρδιά/ β1-αδρενεργικοί υποδοχείς	Trypanosoma cruzi/ ribosomal protein
Μυασθένεια Gravis	Μυς/ υποδοχέας ακετυλοχολίνης	HSV/ gpD

LFA-1: leukocyte function associated antigen-1; OspA: outer surface protein A; hsp 60/65: heat shock protein 60/65; DNAj: j domain chaperone ; gp110: glucoprotein 110kDa; L2: πρωτεΐνη του καψιδίου; GAD<sub>65/67</sub>: glutamate decarboxylase 65kDa/67kDa; P2C: μη δομική πρωτεΐνη του Coxsackie B; PDC-E2: E2 ενζυμική υπομονάδα της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης; gpD: γλυκοπρωτεΐνη D



Τα αυτοαντισώματα μπορεί να υπάρχουν ως «φυσικά» αυτοαντισώματα, που συναντώνται σε φυσιολογικά άτομα, είναι συνήθως χαμηλής συγγένειας IgM αντισώματα και αντιδρούν με ποικιλία αυτοαντιγόνων, αλλά ασθενώς. Τα φυσικά αυτοαντισώματα παράγονται από διακριτό υποπληθυσμό των Β-κυττάρων, τα Β1-κύτταρα, τα οποία διαφοροποιούνται από τα Β2-κύτταρα, που παράγουν τα αντισώματα ως αποτέλεσμα έκθεσης σε ξένο αντιγόνο, ως προς τους επιφανειακούς τους υποδοχείς και την ιστική τους κατανομή (90).

Ο φυσιολογικός ρόλος των φυσικών αυτοαντισωμάτων δεν είναι επαρκώς διασαφηνισμένος. Αφ' ενός, η ύπαρξη πληθώρας αντισωμάτων, έστω και χαμηλής συγγένειας, φαίνεται να αποτελεί έναν αρχικό αμυντικό μηχανισμό, μεταξύ φυσικής και επίκτητης ανοσίας. Αφ'ετέρου, τα φυσικά αυτοαντισώματα δρουν προστατευτικά έναντι της ανάπτυξης μιας γενικευμένης αυτοάνοσης διαταραχής, αφού η σύνδεση των φυσικών αυτοαντισωμάτων στα ίδια αυτοαντιγόνα αποτρέπει τη γενικευμένη αντίδραση ενός αυτοδραστικού κλώνου με αυτά (91).

Ωστόσο, υφίσταται το ενδεχόμενο τα «φυσικά» αυτοαντισώματα να υποστούν ισοτυπική μεταστροφή, με τη βοήθεια ενεργοποιημένων Τ-λεμφοκυττάρων και να γίνουν IgG, με μεγάλη συγγένεια προς το αυτοαντιγόνο και δυνητικά παθογόνα. Επιπλέον σωματικές μεταλλαγές των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή υψηλής συγγένειας IgG αυτοαντισωμάτων.

Τα αυτοαντισώματα χωρίζονται σε οργανοειδικά (organ-specific) και μη οργανοειδικά (non organ-specific). Στις οργανοειδικές διαταραχές, υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι τα αυτοδραστικά Τ-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα που είναι παρόντα στα όργανα-στόχους. Στη μη οργανοειδική αυτοανοσία λίγα είναι γνωστά για τα αντιγόνα που αναγνωρίζονται από τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα οποία πιθανώς

αναγνωρίζουν όχι το αντιγονικό πεπτίδιο, αλλά κάποιον ιδιότυπο του αντισώματος και στη συνέχεια βοηθούν τα Β-λεμφοκύτταρα να πολλαπλασιαστούν (92).

Συμπερασματικά, τα αυτοαντισώματα αποτελούν σημαντικό τμήμα της αυτοάνοσης αντίδρασης και βρίσκονται συχνά σε συνδυασμό με κάποια νόσο (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2. Αυτοάνοσα νοσήματα με γνωστά αυτοαντιγόνα στόχους**

Νόσος	Αυτοαντιγόνο	Συχνότητα (%)*
<b>Οργανοειδικές</b>		
Αυτοάνοση θυρεοειδίτις	Θυρεοσφαιρίνη,	1-2
Γαστρίτις	θυρεοϋπεροξειδάση Αντλία H/K ATPάση, ενδογενής παράγων	1-2 (σε άτομα >60ετών)
Κοιλιοκάκη	Deaminated gliadin	0.2-1.1
Νόσος Graves	Υποδοχέας TSH	0.2-1.1
Λεύκη	Τυροσινάση, συσχετιζόμενη πρωτεΐνη 2	0.4
Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1	Ινσουλίνη, αποκαρβοξυλάση γλουταμικού οξέος	0.2-0.4
Πολλαπλή σκλήρυνση	Μυελίνη, πρωτεολιπιδικό πεπτίδιο	0.01-0.15
Πέμφιγα	Δεσμογλεΐνες	<0.01-3
Μυασθένεια gravis	Υποδοχέας ακέτυλοχολίνης	<0.01
Πρωτοπαθής χολική κίρρωση	Σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης	0.01-0.5
<b>Συστηματικές</b>		
Ρευματοειδής αρθρίτις	IgG, φιμπρίνη, φилаγγρίνη	0.8
Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος	Πυρηνικά αντιγόνα (DNA, ιστόνες, ριβονουκλεοπρωτεΐνες)	0.1
Πολυμυοσίτιδα, δερματομυοσίτιδα	Αμινοάκυλο-tRNA- συνθετάση, πυρηνικά αντιγόνα, μυϊκά αντιγόνα	<0.01

\*Η συχνότητα αναφέρεται στο γενικό πληθυσμό

Η ύπαρξη των αυτοαντισωμάτων μπορεί να είναι αντιπροσωπεύει τρεις πιθανές εκδοχές: α) τα αυτοαντισώματα να συμμετέχουν ενεργά στην παθογένεια της νόσου, β) η νόσος να προηγείται και η εμφάνιση των αυτοαντισωμάτων να έπεται εξαιτίας της προκληθείσας ιστικής βλάβης, ή γ) να υπάρχει κοινός παράγων που οδηγεί τόσο στην εμφάνιση των βλαβών, όσο και στην παραγωγή των αυτοαντισωμάτων.

Ορισμένα από τα γνωστά αυτοαντισώματα (ως επί το πλείστον μη οργανοειδικά) αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω μαζί με την κλινική τους σημασία.

#### **4.1 Αντιπυρηνικά αντισώματα**

Τα αντιπυρηνικά αντισώματα (antinuclear antibodies, ANA) αποτελούν μία ετερογενή ομάδα αυτοαντισωμάτων, τα οποία στρέφονται έναντι διαφόρων αντιγονικών συστατικών του πυρήνα. Ο πυρήνας του κυττάρου ήταν η πρώτη κυτταρική δομή που προσδιορίστηκε και περιγράφηκε αρχικά από τον Franz Bauer το 1802 (93). Αντισώματα έναντι πυρηνικών αντιγόνων ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1950 σε ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (94, 95).

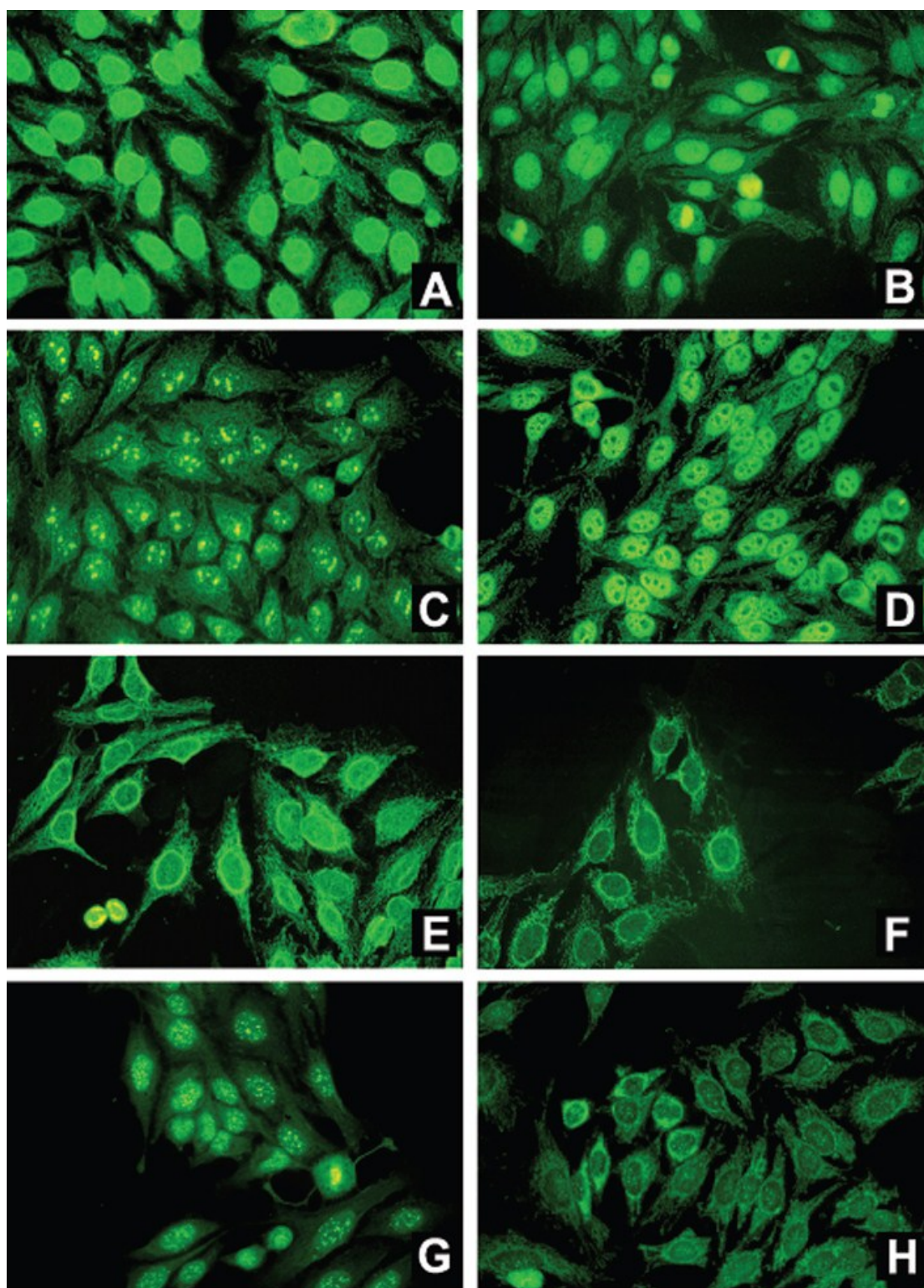
Στην καθημερινή κλινική πράξη τα ANA ανιχνεύονται με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ιστικές τομές ήπατος και νεφρού τρωκτικών ή συνηθέστερα HEp-2 κύτταρα (96, 97), δηλαδή κύτταρα μίας κυτταρικής σειράς που προέρχεται από επιδερμοειδές καρκίνωμα του λάρυγγα (98).

Ο προσδιορισμός των ANA με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού έχει εδραιωθεί ως εξέταση ρουτίνας για κάθε άτομο με υποψία αυτοάνοσου νοσήματος (99), καθώς εμφανίζει σημαντική ευαισθησία και δίνει περαιτέρω πληροφορίες ανάλογα με το πρότυπο φθορισμού, όπως την πιθανή εντόπιση των πυρηνικών αντιγόνων-στόχων των ανιχνευόμενων αυτοαντισωμάτων (100). Συνοπτικά, τα διάφορα πρότυπα φθορισμού που παρουσιάζουν τα ANA σε υπόστρωμα HEp-2

κυττάρων αναφέρονται στον Πίνακα 3 και ορισμένα εξ αυτών παρουσιάζονται στην Εικόνα 23.

**Πίνακας 3. Κυριότερα πρότυπα ανοσοφθορισμού των ANA σε υπόστρωμα HEp-2 κυττάρων και αντίστοιχα αυτοαντιγόνα**

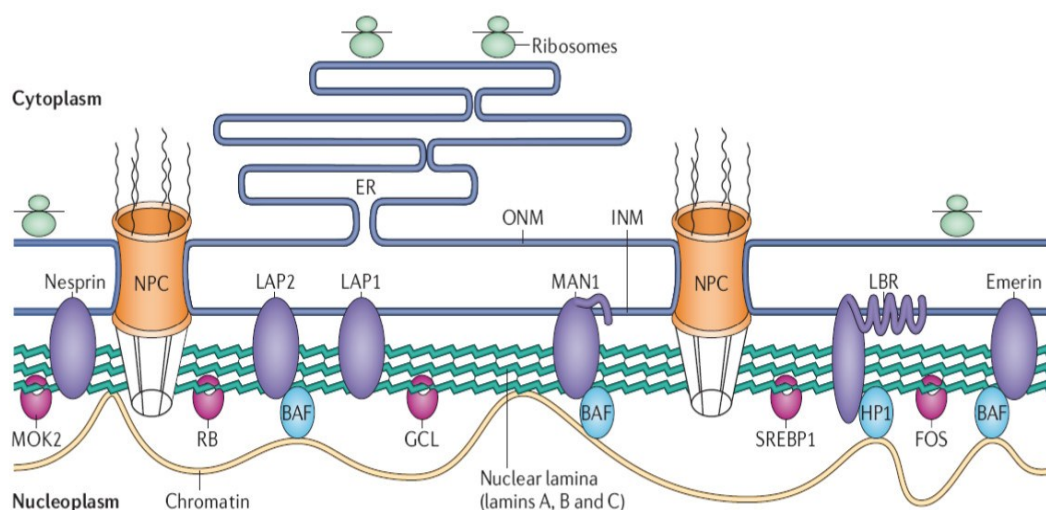
<b>Πρότυπο ανοσοφθορισμού</b>	<b>Αντιγόνο-στόχος</b>
Περιπυρηνικός τύπος (rim-like)	Συμπλέγματα πυρηνικών πόρων (gp210, p62, Tpr) Ινοϋμενίνες/ λαμίνες (Lamins A, B, C) Αντιγόνα της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης (LAP1, LAP2, LBR, MAN1)
Ομοιογενής (homogeneous)	Χρωματίνη dsDNA
Αντικεντρομεριδιακός	CENP-A,B,C
Λεπτός στικτός (fine speckled)	SS-B/ La SS-A/ Ro60, Ro52 Scl-70 (Τοποϊσομεράση-I)
Αδρός στικτός (coarse speckled)	U1 snRNP 70, 33, 22 Sm snRNP core 29, 28, 16 Ki, Ku RNAP II
Πυρηνισκικός (nucleolar)	Fibrillarin- U3 RNP NOR90 B23 RNAP I-III Th/To PM-Scl
Πυρηνικές κηλίδες (nuclear dot)	Sp100 PML SUMO



**Εικόνα 23. Χαρακτηριστικά πρότυπα ανοσοφθορισμού σε υπόστρωμα HEp-2 κυττάρων. A και B: Ομοιογενής (homogeneous); C: Πυρηνισκικός (nucleolar); D: Λεπτός στικτός (fine speckled); E και F: Περιπυρηνικός (rim-like); G: Αντικεντρομεριδιακός (anti-centromere); H: Πυρηνικές κηλίδες (nuclear dots) (93).**

#### 4.1.α Περιπυρηνικός τύπος (*rim-like pattern*).

Ο τύπος αυτός χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη φθορισμού που περιβάλλει δίκην στεφάνης τον πυρήνα του κυττάρου. Οφείλεται σε αυτοαντισώματα έναντι των 3 από τα 5 κύρια συστατικά της πυρηνικής μεμβράνης (nuclear envelope) (Εικόνα 24): α) του ινώδους υμένα (lamina), και δη των ινοϋμενινών ή λαμινών (lamins A, B και C), β) των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων (gp210, p62, Tpr), και γ) της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης [lamina-associated polypeptides 1 and 2 (LAP1, LAP2), lamin B receptor (LBR), και MAN1)](101).

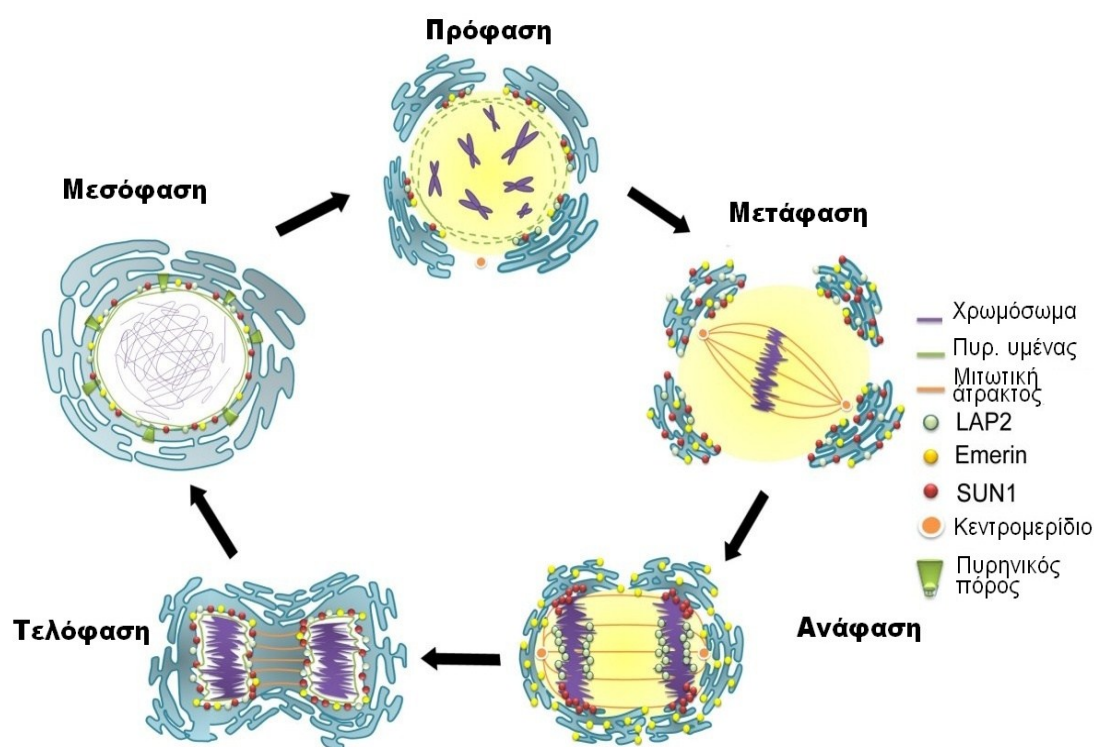


**Εικόνα 24. Σχηματική απεικόνιση της πυρηνικής μεμβράνης με τα σημαντικότερα αντιγόνα-στόχους. Η πυρηνική μεμβράνη είναι διπλή μεμβράνη αποτελούμενη από την εξωτερική (ONM) και την εσωτερική (INM) πυρηνική μεμβράνη. Στενά συνδεδεμένος με την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη είναι ο ινώδης υμένας του πυρήνα (nuclear lamina), ο οποίος συμβάλλει στη σταθερότητα του πυρήνα και την οργάνωση της χρωματίνης, ενώ συντελεί στη σταθερή πρόσδεση των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων (NPC), διαφόρων πρωτεϊνών της πυρηνικής μεμβράνης (μωβ χρώμα) και διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων (ροζ χρώμα) (102)**

Τα αντισώματα έναντι των λαμινών (antilamin antibodies, ALA) χαρακτηρίζονται από λεπτό, ομαλό και συνεχή φθορισμό που περιβάλλει τον πυρήνα των κυττάρων που βρίσκονται στη μεσόφαση, ενώ απουσιάζει από τα κύτταρα που βρίσκονται στη



διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης, όπως και τα υπόλοιπα πρότυπα φθορισμού που αφορούν αντιγόνα της πυρηνικής μεμβράνης (Εικόνα 25). Λόγω της συχνής συνύπαρξης με άλλα ANA, συχνά ο τυπικός ανοσοφθορισμός γίνεται εμφανής μόνο σε μεγάλες αραιώσεις. Τα ALA σχετίζονται με πληθώρα νοσημάτων, όπως η αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ), η πρωτοπαθής χολική κίρρωση (ΠΧΚ), ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος και το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, η ελκώδης κολίτιδα και το σύνδρομο χρόνιας κόπωσης (103, 104).



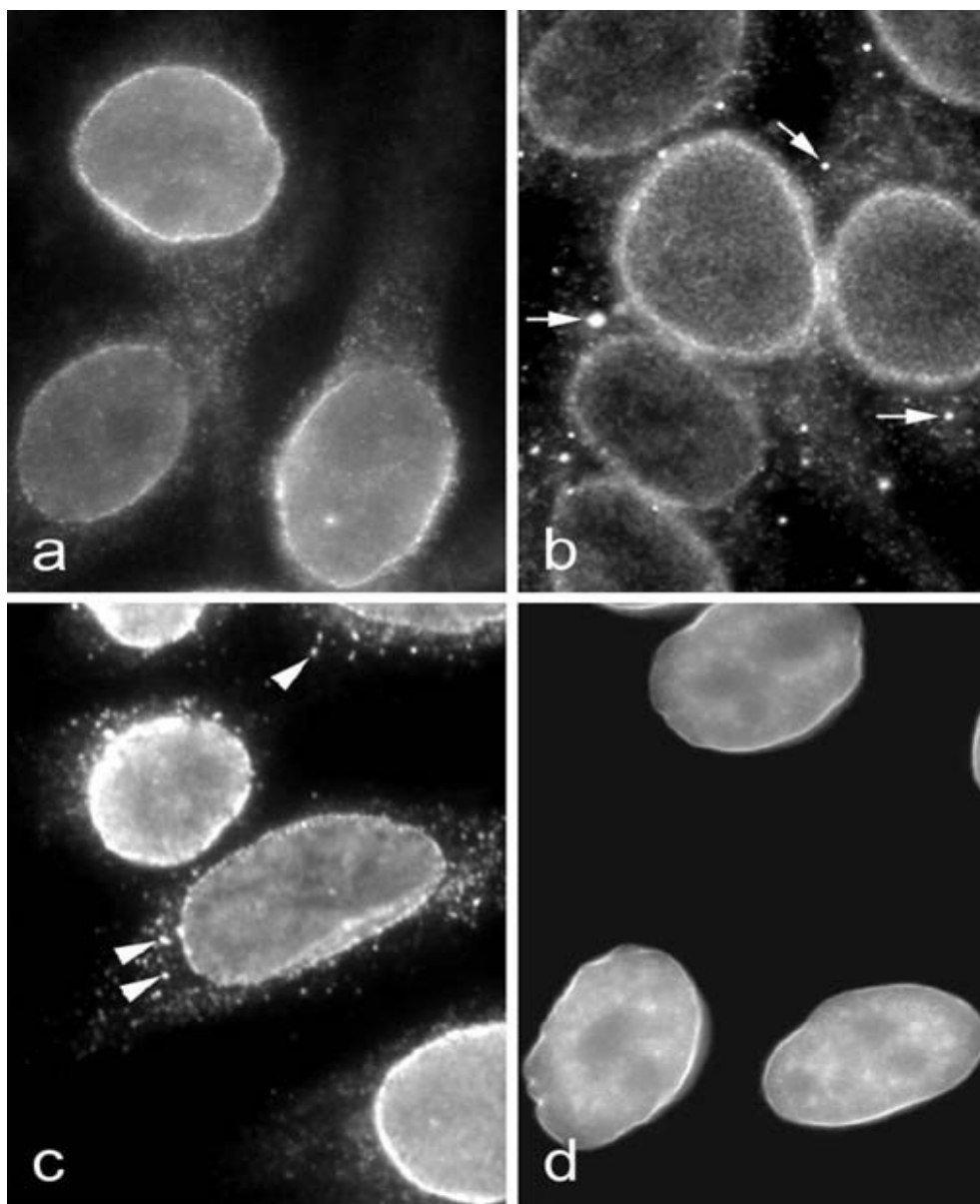
**Εικόνα 25.** Σχηματική απεικόνιση της διάσπασης και επανασύστασης του πυρηνικού περιβλήματος κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Στο τέλος της G2 φάσης της μεσόφασης, η ενεργοποίηση κινασών εξαρτώμενων από κυκλίνη (cyclin-dependent kinases), πυροδοτεί την είσοδο στην πρόφαση. Σταδιακά η πυρηνική μεμβράνη διασπάται και οι πρωτεΐνες της είτε μεταφέρονται στα κεντρομέρη, είτε κατανέμονται με το κατακερματισμένο ενδοπλασματικό δίκτυο είτε διασπώνται στο κυτταρόπλασμα. Κατά τη διάρκεια της ανάφασης, οι SUN1 και LAP2 είναι οι πρώτες πρωτεΐνες που συνδέονται περιφερικά της συμπυκνωμένης χρωματίνης, ακολουθούμενες από τις λαμίνες και την επανακατανομή των πυρηνικών πόρων (105, 106).

Τα δεδομένα που αφορούν τα αντισώματα έναντι αντιγόνων της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης είναι περιορισμένα. Αντισώματα έναντι του LBR έχουν περιγραφεί σε ορισμένους ασθενείς με ΠΧΚ, και έχει βρεθεί ότι αναγνωρίζουν

αντιγονικό επίτοπο αποτελούμενο από 60 αμινοξέα που συμμετέχει στη σύνδεση της λαμίνης Β στον LBR(107). Αν και τα anti-LBR αντισώματα εμφανίζουν υψηλή ειδικότητα στην ανίχνευση της ΠΧΚ, η ευαισθησία τους στην ανίχνευση της νόσου είναι εξαιρετικά χαμηλή και η κλινική τους σημασία παραμένει αδιευκρίνιστη (108). Αντίστοιχα, ελλιπή δεδομένα υπάρχουν για τα anti-LAP αντισώματα. Μία μελέτη επί 31 ασθενών με ΠΧΚ αναφέρει συχνότητα anti-LAP2 ίση με 16% (108). Ωστόσο, anti-LAP αντισώματα ανιχνεύονται σε μία πληθώρα αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, το σύνδρομο Sjögren, η ρευματική πολυμυαλγία, το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο, κ.α (103).

Το πρότυπο ανοσοφθορισμού των αντισωμάτων έναντι των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων (nuclear pore complexes, NPCs) χαρακτηρίζεται από την παρουσία περιπυρηνικού φθορισμού, ο οποίος όμως δεν είναι ομαλός και συνεχής αλλά στικτός και κοκκώδης, εξαιτίας του περιορισμένου αριθμού των NPCs (3000-5000 σε κάθε τυπικό κύτταρο θηλαστικών) (Εικόνα 26). Τα αντισώματα έναντι NPCs έχουν ως αντιγόνα-στόχους τις πρωτεΐνες που συγκροτούν τους πυρηνικούς πόρους, οι οποίες ανέρχονται σε 30 διαφορετικές πρωτεΐνες που καλούνται νουκλεοπορίνες (109).





**Εικόνα 26.** Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε HEp-2 κύτταρα. Στα a-c παρουσιάζονται αντισώματα έναντι πρωτεϊνών των πυρηνικών πόρων που δίνουν χαρακτηριστικό κοκκώδη φθορισμό (a: gr210, b: Tpr, c: p62). Εν αντιθέσει, στο d παρουσιάζεται αντίσωμα έναντι λαμινών, με ομαλό, συνεχή φθορισμό (101).

Αυτοαντισώματα έχουν περιγραφεί για 5 νουκλεοπορίνες (Tpr, p62, gr210, Nup358, και Nup153). Τα αντισώματα έναντι Tpr (translocated promoter region) έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο κ.α. (110). Τα δε αντισώματα έναντι του συμπλέγματος p62 ανευρίσκονται στο 23-32% των ασθενών με ΠΧΚ και στο 13% των ασθενών με σύνδρομο Sjögren, αλλά έχουν επίσης περιστασιακά

περιγραφεί σε ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο και μικτή νόσο του συνδετικού ιστού (101). Σε σημαντικό ποσοστό ασθενών με ΠΧΚ (10-41%) ανευρίσκονται επίσης και αντισώματα έναντι της νουκλεοπορίνης gp210, που αναγνωρίζουν τουλάχιστον δύο διαφορετικούς επίτοπους στο μόριό της. Ο ένας εξ αυτών εντοπίζεται στο αμινοτελικό (μεμβρανικό) τμήμα της gp210, ενώ ο άλλος στο καρβοξυτελικό άκρο της. Η ανίχνευση των anti-gp210 αντισωμάτων εμφανίζει μεγάλη ειδικότητα για την ανίχνευση της ΠΧΚ και σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου. Τέλος, υπάρχουν περιορισμένες αναφορές για αυτοαντισώματα με αντιγόνα-στόχους άλλες νουκλεοπορίνες, όπως η Nup358 και Nup153 (101).

#### **4.1.β Ομοιογενής (homogeneous)**

Ο ομοιογενής φθορισμός (homogeneous) χαρακτηρίζεται από ομοιόμορφο, διάχυτο φθορισμό του πυρήνα και μπορεί να οφείλεται σε αυτοαντισώματα έναντι του DNA διπλής έλικας (double stranded DNA, dsDNA), χρωματίνης, ιστονών και τοποϊσομεράσης.

Τα anti-dsDNA αντισώματα είναι, συνήθως, IgG τάξης και υψηλής συγγένειας για το DNA, σε αντίθεση με τα αντισώματα κατά μονής έλικας (single stranded, ssDNA), που είναι συνήθως πολύ χαμηλής συγγένειας για το DNA, δίνουν συχνά διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα αντιγόνα, είναι ως επί το πλείστον IgM τάξης και γενικά θεωρούνται φυσικά αυτοαντισώματα, ανιχνευόμενα στον ορό αρκετών φυσιολογικών ατόμων.

Η ανίχνευση των anti-dsDNA θεωρείται σημαντική στην διάγνωση και την παρακολούθηση των ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο, καθώς ανιχνεύονται σε ποσοστό άνω του 60% των πασχόντων, ενώ χρησιμοποιώντας μεθόδους υψηλής ευαισθησίας, το ποσοστό των ασθενών με συστηματικό

ερυθηματώδη λύκο που είναι θετικοί για anti-dsDNA αντισώματα σε κάποια στιγμή κατά την πορεία της νόσου ανέρχεται στο 99% (111).

Φαίνεται δε ότι στην περίπτωση του συστηματικού ερυθηματώδη λύκου, τα anti-dsDNA αυτοαντισώματα διαδραματίζουν και σημαντικό παθογενετικό ρόλο. Των εξάρσεων της νόσου συχνά προηγούνται αυξημένα επίπεδα anti-dsDNA αντισωμάτων, ενώ μετά τις εξάρσεις παρατηρείται ραγδαία μείωση των επιπέδων των αντισωμάτων αυτών. Προφυλακτική θεραπεία των ασθενών στους οποίους παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των anti-DNA αντισωμάτων, ενδέχεται να προλάβει τις εξάρσεις της νόσου σε σημαντικό ποσοστό εξ αυτών (112).

Πιθανολογείται ότι ο μηχανισμός με τον οποίο τα anti-dsDNA αντισώματα συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου (τουλάχιστον όσον αφορά στη νεφριτιδική προσβολή που παρατηρείται στους ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο) είναι ο εξής: Οι ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο πιθανόν εμφανίζουν ανεπαρκή κάθαρση των αποπτωτικών κυττάρων, η οποία οδηγεί σε αύξηση των νουκλεοσωμάτων στο πλάσμα των ασθενών. Ως εκ τούτου, μπορεί να παραχθούν αντισώματα έναντι του DNA των νουκλεοσωμάτων, τα anti-dsDNA αντισώματα. Πράγματι, κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει αυξημένα επίπεδα νουκλεοσωμάτων στο πλάσμα ασθενών με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο και στενή συσχέτισή τους με επακόλουθα αυξημένα επίπεδα anti-dsDNA αντισωμάτων (113). Το σύμπλεγμα νουκλεοσώματος-anti-DNA αντισωμάτων μπορεί να προσδένεται με τη θεϊκή ηπαράνη, που αποτελεί την κύρια γλυκοζαμινογλυκάνη της βασικής μεμβράνης του σπειράματος, προκαλώντας τη χαρακτηριστική σπειραματονεφρίτιδα της νόσου (114).

Η μέθοδος εκλογής για τον προσδιορισμό των anti-dsDNA θεωρείται η ραδιοανοσολογική μέθοδος υγρής φάσης Farr κατά την οποία χρησιμοποιείται

ραδιοσημασμένο με τρίτιο dsDNA και καθίζηση με θειικό αμμώνιο (115-117). Με την τεχνική αυτή ανιχνεύονται μόνο τα anti-dsDNA με υψηλή συγγένεια (115, 116). Το υψηλό, όμως, κόστος, ο απαιτούμενος εργαστηριακός εξοπλισμός και ο μεγάλος χρόνος εκτέλεσης καθιστούν δύσκολη την καθιέρωση της τεχνικής ως μεθόδου ρουτίνας (116). Μία δεύτερη τεχνική που έχει αναπτυχθεί, είναι αυτή του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα *Crithidia luciliae* (C. luciliae immunofluorescence test, CLIFT), ένα πρωτόζωο με μεγάλα μιτοχόνδρια που περιέχουν άφθονο DNA. Τα τελευταία όμως χρόνια μειώνεται σταδιακά η χρησιμοποίησή της ως μεθόδου ρουτίνας, διότι υπάρχουν πολλά ερωτηματικά ως προς την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου (ανιχνεύει και anti-dsDNA χαμηλής συγγένειας, ενώ αμφισβητείται και το αν τα μιτοχόνδρια περιέχουν μόνο dsDNA χωρίς τη συνύπαρξη και άλλων πυρηνικών αντιγόνων (117, 118).

Ένας τρίτος τρόπος προσδιορισμού των anti-dsDNA αντισωμάτων είναι με εμπορικά διαθέσιμες ELISA (enzyme linked immunoassays), αλλά οι μέθοδοι αυτοί θεωρούνται από πολλούς αναξιόπιστες διότι ανιχνεύουν αντισώματα τόσο υψηλής όσο και χαμηλής συγγένειας για το dsDNA, και επομένως απαιτείται προσοχή στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους, ιδίως όταν αυτά είναι ασθενώς θετικά (119). Μία συνοπτική αναφορά της ευαισθησίας και της ειδικότητας των παραπάνω μεθόδων με βάση πρόσφατα δημοσιευμένες έρευνες παρατίθεται στον Πίνακα 4 (120-124).

**Πίνακας 4. Ευαισθησία και ειδικότητα διαφόρων μεθόδων ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι DNA διπλής έλικας**

Μέθοδος	Ειδικότητα (%)	Ευαισθησία (%)
ELISA	71-97	44-79
EliA	84-94	40-73
Farr	95-99	32-85
CLIFT	99-100	13-47

### *Αντισώματα έναντι χρωματίνης*

Τα αντισώματα έναντι χρωματίνης συγκροτούν μία ευρεία οικογένεια αυτοαντισωμάτων που στρέφονται: α) έναντι αντιγονικών επιτόπων των ιστονών, οι οποίοι βρίσκονται εκτεθειμένοι κατά την οργάνωση των ιστονών στη χρωματίνη, β) έναντι DNA διπλής έλικας (μόνο τύπου B έλικα), και γ) έναντι αντιγονικών επιτόπων που διαμορφώνονται από την αλληλεπίδραση των ιστονών που συγκροτούν τον πυρήνα του νουκλεοσώματος με το DNA διπλής έλικας (125).

Εξ' ορισμού στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται αυτοαντισώματα που αναγνωρίζουν ιστόνες και DNA μόνο όταν είναι οργανωμένα σε νουκλεοσώματα. Η ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι χρωματίνης-νουκλεοσωμάτων γίνεται με τις μεθόδους της ELISA και της ανοσοαποτύπωσης και απαιτείται αρνητική σχετική ELISA για τον αποκλεισμό της παρουσίας αντισωμάτων έναντι ιστονών ή dsDNA.

Τα αντισώματα έναντι νουκλεοσωμάτων φαίνεται να εμφανίζουν παρόμοιο παθογενετικό ρόλο με τα anti-dsDNA αντισώματα στη νεφρίτιδα του λύκου, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (126).

Παρουσία αντισωμάτων έναντι νουκλεοσωμάτων ανιχνεύεται στο 31-100% των ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο και στο 50-100% των ασθενών με φαρμακευτικό λύκο (από κινιδίνη ή προκαϊναμίδη, αντίστοιχα), ενώ με μικρότερη συχνότητα αντισώματα έναντι νουκλεοσωμάτων ανιχνεύονται σε ασθενείς με σκληρόδερμα (5-67%) και μικτή νόσο του συνδετικού ιστού (3-55%) (127, 128). Με βάση δεδομένα από διάφορες μελέτες, η ευαισθησία των αντισωμάτων έναντι νουκλεοσωμάτων στην ανίχνευση του συστηματικού ερυθματώδους λύκου είναι συγκρίσιμη ή και καλύτερη των anti-dsDNA αντισωμάτων (31-100% έναντι 21-82%, αντίστοιχα). Μάλιστα, σε ορισμένους ασθενείς, ιδίως σε όσους δεν έχουν ενεργή νόσο, ενδέχεται μόνο τα αντισώματα έναντι χρωματίνης να είναι θετικά ενώ τα

αντισώματα έναντι DNA διπλής έλικας να είναι αρνητικά. Αντίστοιχα, τα αντισώματα έναντι χρωματίνης επιτυγχάνουν συγκρίσιμη ή και καλύτερη ειδικότητα σε σχέση με τα anti-dsDNA, έχοντας συνολική διαγνωστική αξία εφάμιλλη ή και καλύτερη για τη διάγνωση του συστηματικού ερυθματώδους λύκου (129).

#### **4.1.γ Λεπτός στικτός τύπος (*fine speckled*)**

##### *Αντισώματα έναντι τοποϊσομεράσης I (anti-Scl-70)*

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1960 είχε διαπιστωθεί η παρουσία αντιπυρηνικών αντισωμάτων στον ορό των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (130). Το 1979 διαπιστώθηκε ότι τα αντισώματα αυτά αναγνωρίζουν μία πρωτεΐνη 70kDa που είχε απομονωθεί από τους πυρήνες ηπατοκυττάρων αρουραίου και ονομάστηκε Scl-70 (131), η οποία ταυτοποιήθηκε ως τμήμα της τοποϊσομεράσης-I (132). Η τοποϊσομεράση-I είναι ένα ένζυμο που αποτελείται από 765 αμινοξέα με M.B 105kDa, που καταλύει τη χαλάρωση του υπερελικωμένου DNA, διευκολύνοντας την αντιγραφή και τη μεταγραφή του (133).

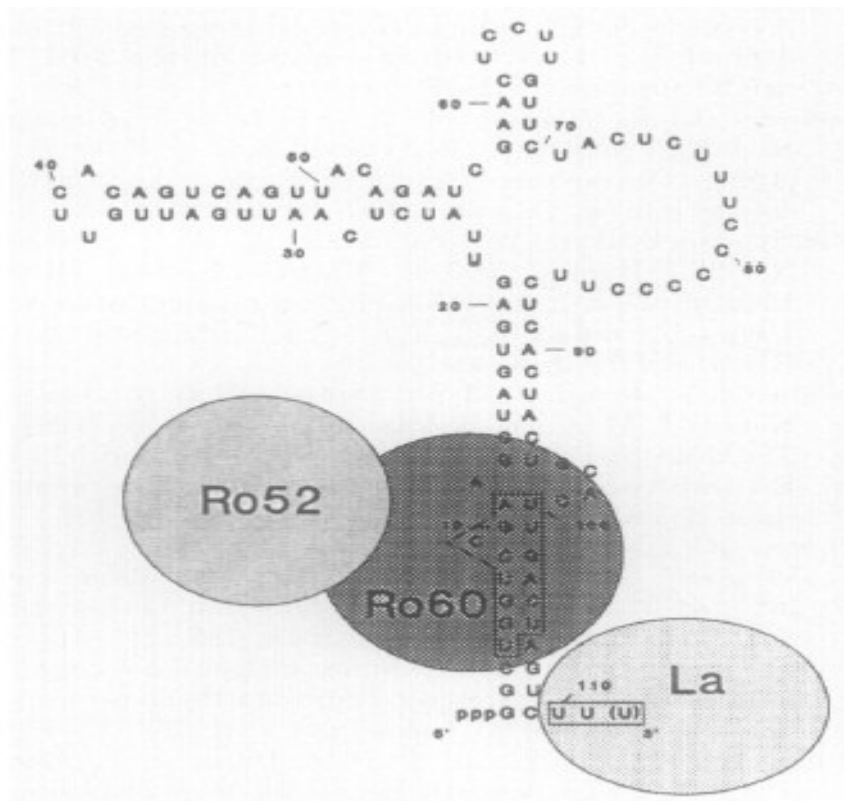
Για την ανίχνευση των anti-Scl-70 αντισωμάτων έχει παραδοσιακά χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της διπλής ανοσοδιάχυσης, της ανοσοαποτύπωσης και της ELISA. Με τη μέθοδο της ανοσοδιάχυσης anti-Scl-70 αντισώματα ανιχνεύονται στο 15-25% των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (134-136). Αν και η ευαισθησία της μεθόδου είναι σχετικά χαμηλή, η ειδικότητά της είναι πολύ υψηλή, τόσο στο γενικό πληθυσμό, όσο και σε ασθενείς με άλλα νοσήματα του συνδετικού ιστού (134). Χρησιμοποιώντας τις μεθόδους της ανοσοαποτύπωσης και της ELISA για τον προσδιορισμό των αντισωμάτων έναντι της τοποϊσομεράσης-I, τα αντισώματα αυτά έχουν ευαισθησία που ανέρχεται στο 40% περίπου για την ανίχνευση ασθενών με συστηματική σκλήρυνση ενώ η ειδικότητά τους παραμένει πολύ υψηλή (περίπου

99%) (135, 136). Η αντίχνευση αντισωμάτων έναντι τοποϊσομεράσης-I συνήθως αποκλείει τη συνύπαρξη αντικεντρομεριδιακών αντισωμάτων, αφού κάτι τέτοιο έχει περιγραφεί μόλις στο 0.5% των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (135-138).

Φαίνεται ότι τα αντισώματα έναντι τοποϊσομεράσης-I σχετίζονται με την κλινική εικόνα και με τη φυσική ιστορία της συστηματικής σκλήρυνσης, καθώς ανευρίσκονται συχνότερα σε ασθενείς με τη διάχυτη μορφή της νόσου (επιπολασμός: περίπου 40%) παρά σε ασθενείς με περιορισμένη δερματική σκληροδερμία (επιπολασμός μικρότερος του 10%) (134). Αντίστοιχα, οι ασθενείς που αναπτύσσουν διάμεση πνευμονική ίνωση χαρακτηρίζονται από αυξημένη συχνότητα anti-Scl-70 αντισωμάτων ( $\approx 45\%$ ) (134, 136), τα οποία αποτελούν προγνωστικό παράγοντα για την προσβολή του πνευμονικού παρεγχύματος από τη νόσο (139, 140). Τέλος, τα αντισώματα έναντι τοποϊσομεράσης-I έχουν έμμεσα συσχετιστεί με μικρότερη επιβίωση, εξαιτίας της πρωιμότερης ανάπτυξης δεξιάς καρδιακής ανεπάρκειας σε ασθενείς, οι οποίοι είναι θετικοί για anti-Scl-70 (141, 142).

#### *Anti-Ro/SS-A αντισώματα*

Σε σημαντικό ποσοστό ασθενών με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο ή σύνδρομο Sjögren ανευρίσκονται αντισώματα έναντι του συμπλέγματος Ro/La RNP (143). Το σύμπλεγμα Ro/La RNP αποτελείται από μία ριβονουκλεοπρωτεΐνη, η οποία σχηματίζεται από τον μη ομοιοπολικό δεσμό των αντιγόνων La και Ro60 με ένα μικρό κυτταροπλασματικό μόριο RNA (hYRNA). Με τη ριβονουκλεοπρωτεΐνη Ro/La RNP συνδέεται επίσης το αντιγόνο Ro52 (Εικόνα 27) (144, 145). Επιπρόσθετα, στο σχηματιζόμενο σύμπλεγμα μπορούν να συνδεθούν και οι πρωτεΐνες καλρετικουλίνη και νουκλεολίνη (146, 147).



**Εικόνα 27. Απεικόνιση μοντέλου του hYRNA με συνδεδεμένα τα Ro60, La και Ro52. Στην κεντρικά σχηματιζόμενη από το RNA έλικα συνδέεται η νουκλεολίνη (145, 147).**

Αρχικά, το αντιγόνο-στόχος έναντι του οποίου στρέφονται τα anti-SS-A (Ro) αυτοαντισώματα είχε περιγραφεί το 1962, και ονομάστηκε “SjD” (148). Η διπλή ονομασία που μετέπειτα καθιερώθηκε και χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα, οφείλεται στην περιγραφή αυτού του αντιγονικού συστήματος από δύο ερευνητικές ομάδες, η πρώτη εκ των οποίων επέλεξε την ονομασία Ro με βάση τα στοιχεία του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε και η δεύτερη επέλεξε την ονομασία SS-A με βάση τη συσχέτιση που παρουσίαζε το αυτοαντιγόνο αυτό με το σύνδρομο Sjögren (149, 150). Η ονομασία των αντιγόνων Ro στη συνέχεια συμπληρώθηκε ώστε να περιλαμβάνει και το μοριακό τους βάρος (Ro60 και Ro52, με MB 60 και 52 kDa, αντίστοιχα).

Τα anti-Ro/SS-A αντισώματα ανευρίσκονται στο 40-50% των ασθενών με συστηματικό ερυθρεματώδη λύκο και ιδίως στους ασθενείς με υποξύ δερματικό λύκο, και στο 60-70% των ασθενών με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren (151). Σύμφωνα δε



με νεότερα δεδομένα, τα anti-Ro αντισώματα σχετίζονται με διαφορετικές κλινικές εικόνες ανάλογα με το αν πρόκειται για αντισώματα έναντι Ro52 ή Ro60. Συγκεκριμένα, ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση ή μυοσίτιδα εμφανίζουν συχνότερα anti-Ro52 αυτοαντισώματα, με το 37% των ασθενών με μυοσίτιδα να έχουν αποκλειστικά anti-Ro52 αντισώματα, τα οποία συχνά συνυπάρχουν με anti-Jo-1 αντισώματα (152). Αξίζει να σημειωθεί ότι η εμφάνιση αυτών των αντισωμάτων στον ορό των ασθενών μπορεί να προηγείται κατά πολύ της εμφάνισης κλινικών εκδηλώσεων της νόσου (153).

Επίσης, τα κυκλοφορούντα anti-Ro/SS-A αντισώματα έχουν ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη νεογνικού λύκου στα παιδιά γυναικών θετικών για αυτά τα αυτοαντισώματα, ενώ θεωρείται ότι έχουν παθογενετικό ρόλο στην εμφάνιση συγγενούς κολποκοιλιακού αποκλεισμού σε ορισμένα εξ αυτών των παιδιών (153).

#### *Anti-La/SS-B αυτοαντισώματα*

Κατά τις δεκαετίες του 1960 και 1970, είχε διαπιστωθεί ότι ορός ασθενών με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο ή σύνδρομο Sjögren περιέχει αντισώματα που αντιδρούν με μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 46.7kDa, η οποία καλούνταν La, SS-B, Ha, και SjT. Με την από κοινού εξέταση των ορών που περιείχαν αυτά τα αντισώματα, διαπιστώθηκε ότι τα ανιχνευόμενα αυτοαντισώματα αναγνώριζαν ένα ενιαίο αυτοαντιγόνο, το La/SS-B (154). Το La/SS-B είναι μία φωσφοπρωτεΐνη που αποτελείται από 408 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 47 kDa. Συνδέεται με διάφορα μικρά μόρια RNA που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση III, όπως το 5S rRNA, tRNA και hYRNA, ενώ μπορεί να συνδέεται και με ιικό RNA, όπως το VA RNA των αδενοϊών και το EBER RNA του EBV (155, 156). Η σύνδεση των La/SS-B με τα μόρια του RNA επιτελεί δύο τουλάχιστον λειτουργίες, αφενός προστατεύει τα

τελευταία από τη δράση των εξωνουκλεασών και αφετέρου τα περιορίζει εντός του πυρήνα, μέσα στον οποίο βρίσκεται η πλειονότητα της La/SS-B πρωτεΐνης που υπάρχει στα κύτταρα των θηλαστικών (157).

Ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την ανίχνευσή τους, τα anti-La/SS-B αντισώματα ανιχνεύονται στο 25-50% των ασθενών με σύνδρομο Sjögren, στο 10-15% των ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο και στο 5-10% των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα ή συστηματικό ερυθματώδη λύκο, η ύπαρξη anti-La/SS-B αντισωμάτων προδιαθέτει στην ανάπτυξη δευτεροπαθούς συνδρόμου Sjögren. Ακόμη, anti-La/SS-B ανιχνεύονται στο 60% περίπου των γυναικών με παιδιά που εμφάνισαν νεογνικό λύκο, όπου φαίνεται ότι έχουν παθογενετικό ρόλο (158).

Η παρουσία anti-Ro/SS-A και των anti-La/SS-B αυτοαντισωμάτων σχετίζεται με πρόωμη έναρξη και μεγαλύτερη διάρκεια του συνδρόμου Sjögren και με κλινικές εκδηλώσεις όπως η σπληνομεγαλία, η λεμφαδενοπάθεια και η αγγειίτιδα, εξαπλασιάζοντας τις πιθανότητες εμφάνισης εξωαδενικών εκδηλώσεων της νόσου (159). Στους δε ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο η ανίχνευση των anti-Ro και anti-La αντισωμάτων προηγείται κατά πολύ της εμφάνισης των κλινικών εκδηλώσεων της νόσου (κατά μέσο όρο προηγούνται κατά 3.4 έτη της διάγνωσης της νόσου) (160).

Μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση των anti-La/SS-B αντισωμάτων θεωρείται η ανοσοκαθίζηση, η οποία επιτυγχάνει πολύ υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, ωστόσο η ανοσοηλεκτροφόρηση και η ELISA επιτυγχάνουν συγκρίσιμα αποτελέσματα και χρησιμοποιούνται, ως επί το πλείστον, στη κλινική πράξη εξαιτίας της ευκολότερης μεθόδου και του συντομότερου χρόνου (157).

#### **4.1.δ Αντικεντρομεριδιακά αντισώματα**

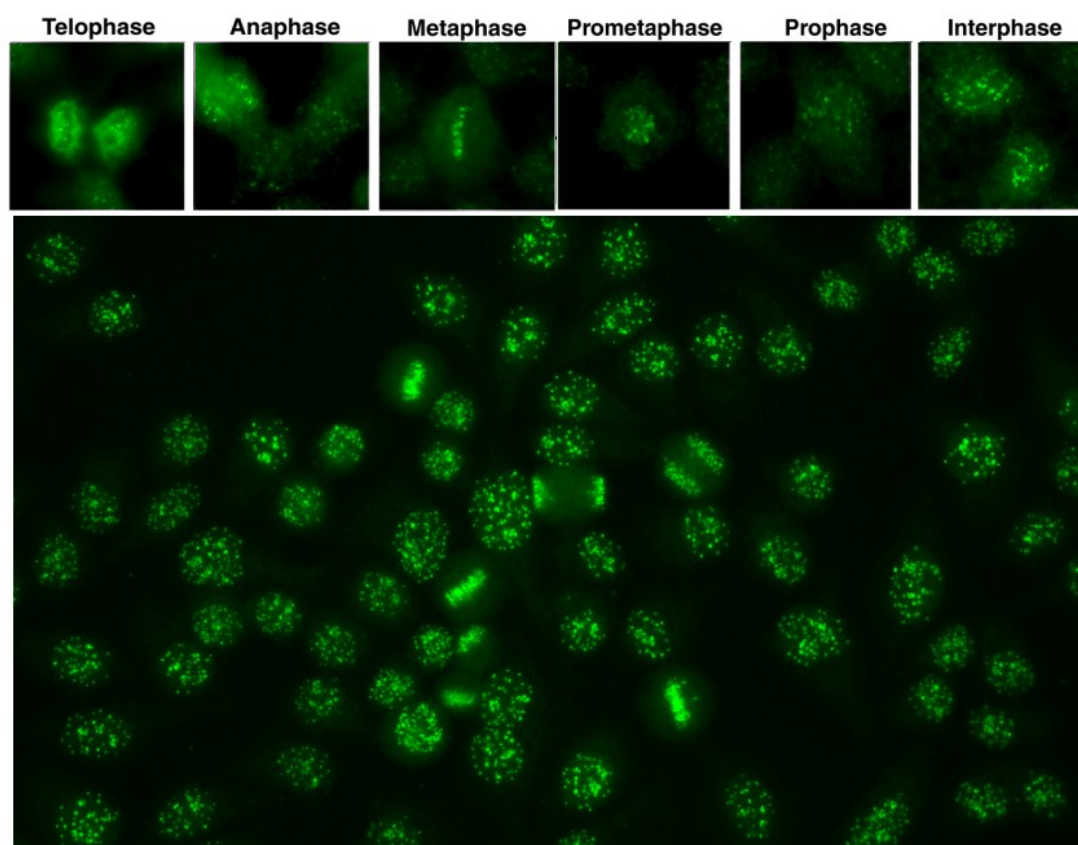
Η παρουσία αυτοαντισωμάτων που αντιδρούσαν με κεντρομερίδια παρατηρήθηκε στον ορό ασθενών αρχικά το 1980 (161), ωστόσο η ανίχνευσή τους άρχισε να καθίσταται πιο ευχερής με την εδραίωση των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων κυτταρικών σειρών, όπως τα HEp-2 κύτταρα, ως υπόστρωμα στον έμμεσο ανοσοφθορισμό. Σε πρώιμες μελέτες είχε διαπιστωθεί ότι αυτά τα αυτοαντισώματα ανευρίσκονται σε μία μορφή της συστηματικής σκλήρυνσης που καλείται σύνδρομο CREST (από τα αρχικά των λέξεων: Calcinosis, Raynaud's, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly και Telangiectasia) (162).

Τα κεντρομερίδια αποτελούν χώρους περίσφιγξης των χρωμοσωμάτων των ευκαρυωτικών οργανισμών, όπου βρίσκονται στενά συνδεδεμένες οι αδελφές χρωματίδες. Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, στην περιοχή του κεντρομεριδίου, δημιουργείται μία δομή που καλείται κινητοχώρος και επιτελεί τη λειτουργία της πρόσδεσης των χρωμοσωμάτων στους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου. Τα αντικεντρομεριδιακά αντισώματα αντιδρούν με 3 κύριες πρωτεΐνες που προσδένονται στα κεντρομερίδια, τις πρωτεΐνες CENP-A, CENP-B και CENP-C, με μοριακό βάρος 19kDa, 80kDa, και 140kDa, αντίστοιχα (163). Συνήθως στον ορό ασθενών κυκλοφορούν από κοινού anti-CENP-A, anti-CENP-B και anti-CENP-C αυτοαντισώματα, ενώ σπανιότερα ενδέχεται να εμφανίζονται αντισώματα που αναγνωρίζουν μόνο ένα εκ των CENP-A, CENP-B, CENP-C, ή και άλλες πρωτεΐνες που σχετίζονται με τα κεντρομερίδια (CENP-D, CENP-E, και CENP-F).

Πιθανή συμμετοχή των αντικεντρομεριδιακών αντισωμάτων σε παθογενετικούς μηχανισμούς δεν έχει τεκμηριωθεί επαρκώς. Φαίνεται, ωστόσο, ότι τα αντισώματα αυτά μπορούν να επηρεάζουν τη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης, καθώς

μικροέγχυση anti-CENP-A ή anti-CENP-C αντισωμάτων στον πυρήνα ευκαρυωτικών κυττάρων προκαλεί στάση του κυτταρικού κύκλου (164, 165).

Η ανίχνευση των αντικεντρομεριδιακών αντισωμάτων μπορεί να γίνει με τον έμμεσο ανοσοφθορισμό σε υπόστρωμα HEp-2 κυττάρων. Στα HEp-2 κύτταρα που βρίσκονται στη μεσόφαση, τα αντικεντρομεριδιακά αντισώματα δίνουν ένα διακριτό στικτό πρότυπο ανοσοφθορισμού (discrete speckled), ενώ στα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση της μετάφασης παρατηρούνται στικτές συναθροίσεις στον ισημερινό της ατράκτου (Εικόνα 28) (166).



**Εικόνα 28.** Χαρακτηριστικό πρότυπο ανοσοφθορισμού των αντι-κεντρομεριδιακών αντισωμάτων σε υπόστρωμα HEp-2 κυττάρων. Απεικονίζονται επίσης τα διάφορα πρότυπα ανοσοφθορισμού ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου. (Ανασυσταθείσα εικόνα από διάφορες πηγές).

Η κύρια κλινική συσχέτιση των αντικεντρομεριδιακών αντισωμάτων παρατηρείται με τη συστηματική σκλήρυνση, όπου ανευρίσκονται στο 20-30% των ασθενών, ανάλογα

με τη μορφή της νόσου και με την εθνικότητα του ασθενούς (134). Η ανίχνευση των αντικεντρομεριδιακών αντισωμάτων με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε υπόστρωμα HEp-2 κυττάρων εμφανίζει μεγάλη ειδικότητα για τη διάγνωση της συστηματικής σκλήρυνσης, καθώς σπάνια ανιχνεύονται σε υγιή άτομα (167-169). Αντίστοιχα, παρουσία αντικεντρομεριδιακών αντισωμάτων σπάνια ανιχνεύεται σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (167, 168, 170, 171), με τη σημαντική εξαίρεση ίσως της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης. Στην ΠΧΚ αντικεντρομεριδιακά αντισώματα ανιχνεύονται σε ποσοστό που ανέρχεται στο 30% των ασθενών (172-174) και ενδέχεται να συνδυάζονται με διαφορετικά κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου (175, 176).

Στους ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση η παρουσία αντικεντρομεριδιακών αντισωμάτων είναι στενά συνδεδεμένη με την ανάπτυξη συνδρόμου CREST (177, 178) και ιδιαίτερα με την παρουσία ασβέστωσης και περιφερικής αγγειοπάθειας (140, 179). Φαίνεται ότι αν και η παρουσία των αντικεντρομεριδιακών αντισωμάτων σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα ανάπτυξης πνευμονικής υπέρτασης (180), συνδέεται επίσης με μικρότερη συχνότητα διάμεσης πνευμονικής ίνωσης και ανάπτυξης περιοριστικής πνευμονοπάθειας, αλλά και μικρότερη συχνότητα εκδηλώσεων εκ της καρδιάς και των νεφρών (181-183). Ως εκ τούτου, έχει διαπιστωθεί ότι οι ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση που είναι θετικοί για αντικεντρομεριδιακά αντισώματα εμφανίζουν μικρότερη θνητότητα σε σχέση με όσους είναι αρνητικοί (137, 183).

#### **4.1.ε Πυρηνισκικός τύπος (*nucleolar*)**

Η ύπαρξη αυτοαντισωμάτων που στρέφονται έναντι διαφόρων δομών του πυρηνίσκου (antinucleolar antibodies, ANoA), διαπιστώθηκε με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού αρχικά το 1962 (184). Στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν κατά

τις δεκαετίες του 1980 και 1990 διάφορα αυτοαντιγόνα-στόχοι των ANoA, κυρίως με ορούς ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (anti-Th/To-RNP το 1983, anti-U3-RNP το 1985, anti-RNAP I το 1987, και anti-RNAP II και III το 1993) (185).

Ο πυρηνίσκος είναι μία σφαιρική δομή με διάμετρο μέχρι 1  $\mu\text{m}$  που εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου, αποτελείται από πρωτεΐνες και ριβοσωμικό DNA (rDNA) και έχει ως κύρια λειτουργία τη σύνθεση των ριβοσωμάτων. Το μέγεθος του πυρηνίσκου σχετίζεται με το επίπεδο ενεργότητας του κυττάρου. Κύτταρα με υψηλό ρυθμό πρωτεϊνοσύνθεσης, όπως τα εμβρυϊκά κύτταρα και τα κακοήγη κύτταρα, έχουν συνήθως μεγάλους πυρηνίσκους. Επιπρόσθετα, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ο αριθμός των πυρηνίσκων που έχει κάθε κύτταρο δεν είναι σταθερός, καθώς ο πυρηνίσκος εμφανίζεται κατά την τελόφαση και εξαφανίζεται πάλι κατά τη διάρκεια της πρόφασης. Το μόνο μέρος του πυρηνίσκου που παραμένει διακριτό κατά τη διάρκεια της μίτωσης είναι ο πυρηνισκικός οργανωτής (nucleolar organizer), δηλαδή το rDNA.

Μικροσκοπικά, ο πυρηνίσκος οργανώνεται σε μία ινώδη περιοχή (fibrillar center), που αποτελείται από γονίδια αρχικών μεταγραφών rRNA, η οποία περιβάλλεται από μία πυκνή ινώδη περιοχή (dense fibrillar component), που συγκροτείται από φιμπριλαρίνη ενωμένη με μικρά πυρηνισκικά RNA (small nucleolar RNA, snoRNA). Περί των ινωδών περιοχών παρατηρούνται κοκκιώδεις περιοχές (granular components) που αποτελούνται από κοκκία 15-20nm, τα οποία είναι ωριμάζοντα ριβοσωμάτια. Τέλος ο πυρηνίσκος περιλαμβάνει περιοχές στις οποίες ανευρίσκεται το rDNA (nucleolar organizer region, NOR). Μετά τη μεταγραφή του rDNA από τις RNA πολυμεράσες, το παραγόμενο rRNA με τη δράση των ριβονουκλεασών MRP RNase και RNase P κατατμείται σε snoRNA που οργανώνεται σε snoRNPs.

Τα περισσότερα από τα μακρομόρια που αναφέρθηκαν μπορεί να αποτελούν αντιγονικούς στόχους των ANoA. Ο πρώτος αντιγονικός στόχος των ANoA που περιγράφηκε σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση ήταν το αντιγόνο PM-Scl, που αποτελεί ένα πολύ-πρωτεϊνικό σύμπλεγμα εξωριβονουκλεασών (186). Τα anti-PM-Scl αντισώματα παρατηρούνται μόνο στο 2% των ασθενών με σκληρόδερμα, αλλά ανιχνεύονται στο 24% των ασθενών που πάσχουν από το σύνδρομο επικάλυψης σκληροδέρματος-μυοσίτιδας. Η παρουσία του αντισώματος σχετίζεται με καλή πρόγνωση και ανταπόκριση στη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή (180, 187).

Τα anti-RNAP I-III, στρέφονται έναντι των αντίστοιχων RNA πολυμερασών και επίσης ανιχνεύονται σε ασθενείς με σκληρόδερμα. Τα anti-RNAP I και anti-RNAP III είναι πολύ ειδικά για τη νόσο αλλά έχουν περιορισμένη ευαισθησία, περίπου 20%. Τα anti-RNAP II είναι λιγότερο ειδικά καθώς ανιχνεύονται και σε ασθενείς με σύνδρομο επικάλυψης σκληροδέρματος-συστηματικού ερυθηματώδους λύκου. Εν γένει, τα anti-RNAP αντισώματα σχετίζονται με την κλινική εικόνα της συστηματικής σκλήρυνσης είναι αυξημένα σε ασθενείς με διάχυτη δερματική νόσο και νεφρική προσβολή και συνδέονται με μειωμένη επιβίωση (188).

Άλλος αντιγονικός στόχος των ANoA είναι το σύμπλεγμα U3 snoRNP, το οποίο αποτελείται από τουλάχιστον 6 πρωτεΐνες, φμπριλαρίνη, και ένα μόριο snoRNA μεγέθους 217 νουκλεοτιδίων. Τα αντισώματα έναντι U3-RNP ανευρίσκονται συνήθως σε ασθενείς με διάχυτο σκληρόδερμα και σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης πνευμονικής υπέρτασης (189). Επιπρόσθετα, οι ασθενείς που είναι θετικοί για anti-U3-RNP, μπορεί να εμφανίζουν συχνότερα εκδηλώσεις από το μυοσκελετικό και έχουν μεγαλύτερη θνητότητα (190).

Τα anti-Th και anti-To αντισώματα αναγνωρίζουν αντίστοιχα την RNάση MRP και την RNάση P. Τα anti-Th/To αντισώματα έχουν περιγραφεί στο 2-13% των ασθενών

με σκληρόδερμα και σχετίζονται με την περιορισμένη δερματική μορφή της νόσου και το σύνδρομο CREST. Ωστόσο, έχουν επίσης συνδεθεί με αυξημένη συχνότητα νεφρικής προσβολής και πνευμονικής ίνωσης (191), ενώ πιθανώς να συνδέονται με δυσμενέστερη πρόγνωση (180). Η ειδικότητά τους για τη συστηματική σκλήρυνση είναι σχετικά περιορισμένη, αφού ανευρίσκονται και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως στο συστηματικό ερυθρεματώδη λύκο, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, την πολυμυοσίτιδα και το πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren, παρότι αυτό συμβαίνει σπανιότερα (192).

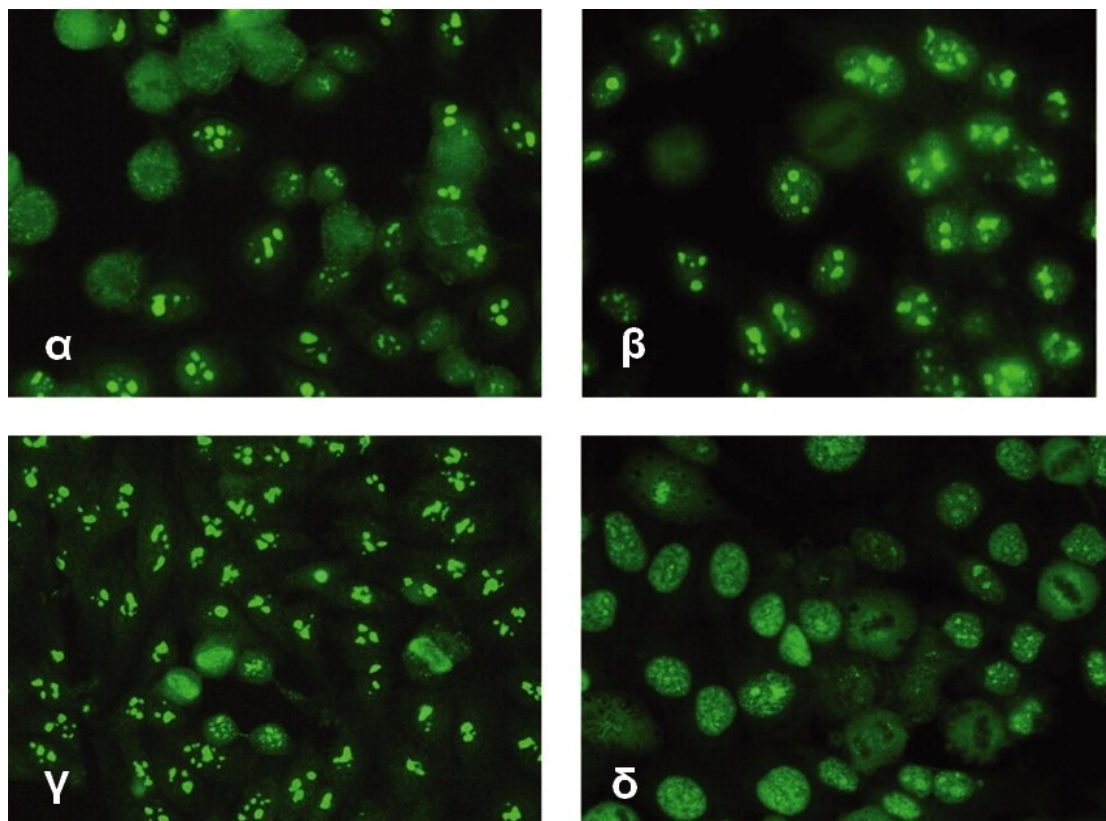
Διάφορες κλινικές συσχετίσεις έχουν αναφερθεί και για τα αντιπυρηνισκικά αντισώματα που στρέφονται έναντι του αντιγόνου NOR90 ή αλλιώς UBF (upstream binding factor). Τα anti-NOR90 αντισώματα έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, συστηματικό ερυθρεματώδη λύκο, ρευματοειδή αρθρίτιδα, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και κακήθες μελάνωμα (193). Στο 50% των ασθενών με anti-NOR90 αντισώματα παρατηρείται φαινόμενο Raynaud (194).

Τέλος, άλλο αυτοαντιγόνο που αναγνωρίζεται από τα ANoA είναι η νουκλεοφωσμίνη ή B23, η οποία είναι μία φωσφοπρωτεΐνη M.B 37kDa που συνδέεται με το rRNA στην κοκκιώδη περιοχή και συνεισφέρει στην οργάνωσή του σε ριβοσώματα και τη μεταφορά αυτών στο κυτταρόπλασμα. Anti-B23 αντισώματα έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με σκληρόδερμα, στη νόσο δότη κατά ξενιστή, και σε διάφορες κακοήθειες (185).

Η αρχική ανίχνευση ANoA αυτοαντισωμάτων γίνεται με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού σε υπόστρωμα HEp-2 ή HeLa κυττάρων. Η σωρευμένη εμπειρία στην εφαρμογή της μεθόδου έχει οδηγήσει στη διάκριση τριών προτύπων ανοσοφθορισμού που χαρακτηρίζουν το αντιπυρηνισκικό πρότυπο: Α) Το ομοιογενές (homogeneous), που είναι συνήθως μη ειδικό και απαντά σε διάφορα αυτοάνοσα



νοσήματα αλλά και σε υγιή άτομα. Χαρακτηρίζεται από διάχυτο ομοιογενή (anti-PM-Scl) έως λεπτό στικτό (anti-Th/To) φθορισμό. Β) Το συρρέον (clumpy), που χαρακτηρίζεται από παρουσία μεγάλων κοκκίων που τείνουν προς ομοιογενή φθορισμό στα μεσοφασικά κύτταρα (έναντι-φιμπριλαρίνης, anti-U3-snoRNP). Γ) Το στικτό (speckled) που οφείλεται σε αντισώματα που στρέφονται έναντι RNA πολυμερασών (Εικόνα 29) (195). Μετά την ανεύρεση των προτύπων αυτών με τον έμμεσο ανοσοφθορισμό, η ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων επιβεβαιώνεται με ανοσοκαθίζηση ή κατάλληλες ELISA, όπου αυτές είναι διαθέσιμες.

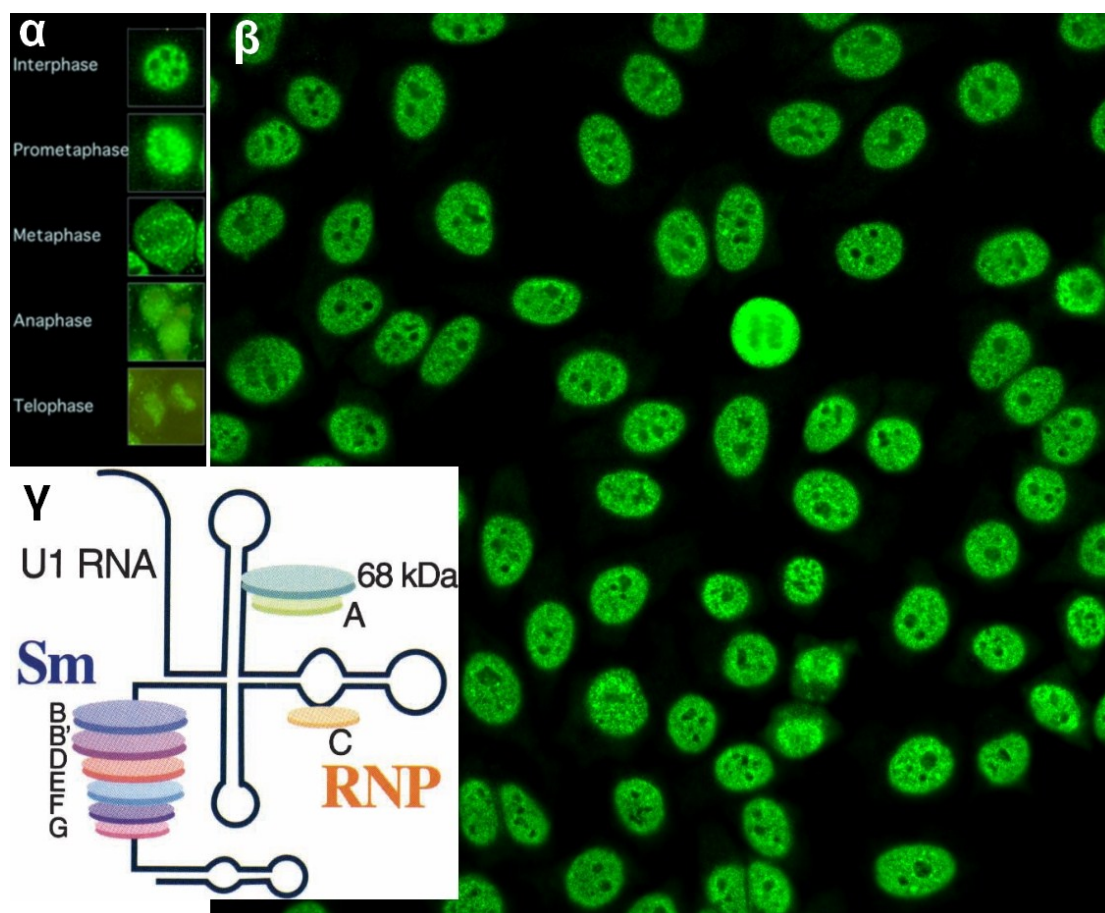


**Εικόνα 29. Διάφοροι τύποι πυρηνισκικού φθορισμού. α και β: ομοιογενής (homogeneous), γ: συρρέων (clumpy), δ: στικτός (speckled) (195).**

#### **4.1.στ Αδρός στικτός τύπος (*coarse speckled*)**

Το πρότυπο του αδρού στικτού φθορισμού στα HEp-2 κύτταρα χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη κοκκίων ενδιαμέσου μεγέθους, πυκνά διατεταγμένων στον πυρήνα

(Εικόνα 30β). Τα κοκκία αυτά ανευρίσκονται μόνο σε εκείνα τα κύτταρα του υποστρώματος που βρίσκονται στη μεσόφαση και δεν ανιχνεύονται σε κύτταρα που βρίσκονται σε μίτωση (Εικόνα 30α) (196). Τα κύρια αυτοαντισώματα που εμφανίζουν αυτό το πρότυπο φθορισμού είναι τα anti-Sm και anti-RNP.



**Εικόνα 30.** Αδρό στικτό (coarse speckled) πρότυπο ανοσοφθορισμού. α: χαρακτηριστικές μεταβολές του προτύπου ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου, β) τυπική εικόνα coarse speckled φθορισμού σε HEp-2 κύτταρα, γ: σχηματική απεικόνιση της δομής της U1 snRNP, στην οποία σημαίνονται ως έγχρωμοι δίσκοι τα πρωτεϊνικά μόρια που συμμετέχουν στη συγκρότησή της. ( εικόνα ανασυσταθείσα από διάφορες πηγές)

Τα anti-Sm αντισώματα έχουν ως αντιγονικούς στόχους 7 πρωτεΐνες (B/B', D1, D2, D3, E, F, και G) που σχηματίζουν τον πρωτεϊνικό πυρήνα του μορίου των U1, U2, U4, και U5, snRNP ριβονουκλεοπρωτεϊνών (Εικόνα 30γ) (197, 198). Από αυτές τις πρωτεΐνες, τα κύρια αντιγόνα των anti-Sm αυτοαντισωμάτων είναι οι B/B', D1, και D3.

Αντίστοιχα, τα anti-RNP αυτοαντισώματα αντιδρούν με πρωτεΐνες (70kDa, A, C) που συνδέονται με το U1 RNA για το σχηματισμό της U1 snRNP (Εικόνα 30γ). Τα snRNPs είναι ριβονουκλεοπρωτεΐνες που βρίσκονται σε αφθονία στους πυρήνες όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων και συμμετέχουν στην επεξεργασία του προ-mRNA(199).

Τα anti-Sm αντισώματα ανιχνεύονται σε ποσοστό που κυμαίνεται από 5 έως 30% μεταξύ των ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο, παρουσιάζοντας διαφορές στον επιπολασμό ανάλογα με τη γεωγραφική θέση (αυξημένη συχνότητα στη Β. Αμερική σε σχέση με την Ευρώπη) και τη φυλή (αυξημένη συχνότητα στους μαύρους) (200-202). Η ειδικότητα των anti-Sm αντισωμάτων για τη διάγνωση του λύκου είναι πολύ υψηλή και ως εκ τούτου έχουν συμπεριληφθεί στα διαγνωστικά κριτήρια της νόσου (200). Τα anti-RNP αντισώματα ανιχνεύονται στο 25-47% των ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο, ενώ υψηλοί τίτλοι anti-RNP θεωρούνται διαγνωστικοί για μικτή νόσο του συνδετικού ιστού (203). Υπάρχει στενή συσχέτιση μεταξύ των δύο αυτοαντισωμάτων, τα οποία συνήθως συνυπάρχουν στον ίδιο ασθενή και στις ελάχιστες περιπτώσεις που αρχικά ανιχνεύονται μόνο anti-Sm, τα anti-RNP θα αναπτυχθούν στην πορεία της νόσου.

Παρότι τα ερευνητικά δεδομένα είναι μάλλον αντικρουόμενα, η παρουσία anti-Sm αντισωμάτων έχει συνδυαστεί με αυξημένη συχνότητα προσβολής του κεντρικού νευρικού συστήματος από το συστηματικό ερυθματώδη λύκο και εκδήλωση νευροψυχιατρικών διαταραχών (204-206) Ακόμη, τα αντισώματα αυτά έχουν συσχετιστεί με την πιθανότητα εμφάνισης νεφρικής προσβολής και με τη συνολική ενεργότητα της νόσου (206-208).

### *Anti-Ku και anti-Ki αντισώματα*

Το αντιγόνο Ku ονομάστηκε έτσι γιατί περιγράφηκε για πρώτη φορά σε ορό ασθενούς που έπασχε από σύνδρομο επικάλυψης σκληροδέρματος-πολυμυοσίτιδας, ο οποίος είχε καταχωρηθεί με το αναγνωριστικό Ku (209). Το αντιγόνο Ku είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από 2 υπομονάδες με μοριακό βάρος 70 και 80 kDa, αντίστοιχα (p70, Ku70 και p80, Ku80). Η πρωτεΐνη Ku συνδέεται με μία πρωτεΐνη 460 kDa με ενζυμική δραστικότητα κινάσης (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, DNA-PKcs) και σχηματίζουν μία εξαρτώμενη από το DNA πρωτεϊνική κινάση, την DNA-PK. Η DNA-PK έχει καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία της επιδιόρθωσης χασμάτων του μορίου του DNA και στον ανασυνδυασμό των γονιδίων V/D/J (210). Χαρακτηριστικό της σημασίας της DNA-PK είναι ότι διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη της DNA-PKcs εμφανίζουν βαρεία συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια.

Το αντιγόνο Ki ανιχνεύτηκε αρχικά ως μία πυρηνική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 32 kDa που αναγνωριζόταν από αυτοαντισώματα στον ορό μιας ομάδας ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο ή σύνδρομο Sjögren. Εν συνεχεία το αντιγόνο μετονομάστηκε σε PA28γ εξαιτίας της ομολογίας του με τις πρωτεΐνες PA28α και PA28β, οι οποίες συμμετέχουν στη ρύθμιση της δραστηριότητας των πρωτεοσωμάτων (211).

Τα anti-Ku αντισώματα έχουν περιγραφεί σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα, με διαφορετικές κλινικές συσχετίσεις ανάλογα με τη φυλή και την εθνικότητα του εκάστοτε εξεταζόμενου πληθυσμού, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται το σύνδρομο επικάλυψης πολυμυοσίτιδας-σκληροδέρματος και ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (212). Σε κάθε περίπτωση η ανίχνευση των anti-Ku αντισωμάτων είναι σπάνια σε άτομα της λευκής φυλής (213). Τα anti-Ki αντισώματα ανιχνεύονται σε ποσοστό

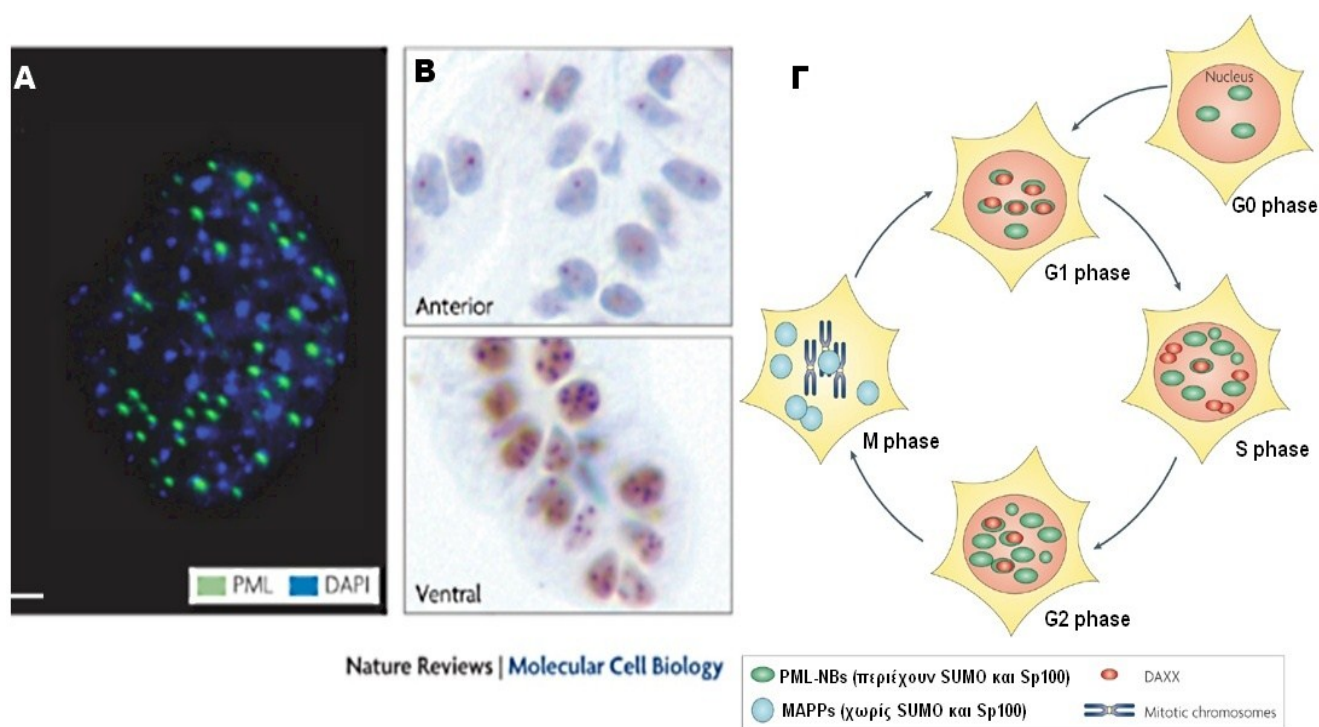
έως 20% σε ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο, αλλά και σε σημαντικό ποσοστό ασθενών με σύνδρομο Sjögren, σκληρόδερμα και μικτή νόσο του συνδετικού ιστού (214, 215). Τόσο για τα anti-Ku όσο και για τα anti-Ki αντισώματα δεν υπάρχουν επαρκή κλινικά δεδομένα που να τεκμηριώνουν τη συσχέτισή τους με συγκεκριμένες κλινικές εκδηλώσεις ή τη χρησιμότητά τους ως προγνωστικοί δείκτες (215, 216).

#### **4.1.ζ Τύπος πυρηνικών κηλίδων (nuclear dots)**

Μεταξύ των διάφορων διακριτών περιοχών του πυρήνα, τα κύτταρα των θηλαστικών περιλαμβάνουν πυρηνικές περιοχές που περιγράφηκαν τη δεκαετία του 1960 ως πυρηνικά σωμάτια της προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (promyelocytic leukemia nuclear bodies, PML-NBs)(217). Ο αριθμός των πυρηνικών σωμάτων κυμαίνεται μεταξύ 10-30 ανά πυρήνα και το μέγεθός τους μεταξύ 0.2 – 1 μm (218). Πρόσφατα, τα PML-NBs έχουν συγκεντρώσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, εξαιτίας της πληθώρας των λειτουργιών του κυττάρου στις οποίες συμμετέχουν, όπως είναι η κυτταρική αύξηση, η καταστολή ογκογονιδίων, η ανοσολογική απάντηση και η απόπτωση (219, 220). Ακόμη τα σωμάτια PML-NB φαίνεται ότι συμμετέχουν στην αντιγραφή και την επιδιόρθωση του DNA (221), στη μεταγραφή και τροποποίηση του RNA (222), ή δρουν ως χώροι αποθήκευσης πρωτεϊνών στον πυρήνα, που μπορεί να χρησιμοποιούνται για την προστασία έναντι ιογενών λοιμώξεων (223, 224).

Χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημικές μεθόδους, μπορούμε να επιτύχουμε τη χρώση των σωμάτων PML-NB που εμφανίζονται ως 5 έως 30 πυρηνικές κηλίδες (Εικόνα 31Α). Ο αριθμός των πυρηνικών κηλίδων στα κύτταρα, το μέγεθός τους και η ένταση με την οποία φθορίζουν εξαρτώνται από τον τύπο του κυττάρου (Εικόνα 31Β) και τη

φάση του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 31Γ), και είναι ιδιαιτέρως αυξημένα μετά από ιογενείς λοιμώξεις, θερμικό shock και έκθεση σε ιντερφερόνη ή βαρέα μέταλλα (225). Τα σωματίδια PML-NB αποτελούνται από έναν αριθμό διαφορετικών πρωτεϊνικών υπομονάδων (226), που περιλαμβάνουν, εκτός από την πρωτεΐνη PML, τις πρωτεΐνες: Sp100, BLM (Bloom's syndrome gene product), SUMO-1 (small ubiquitin-related modifier-1), CBP (CREB-binding protein) κ.α.



**Εικόνα 31. Α:** Χρώση μέσω ανοσοφθορισμού του πυρήνα ινοβλάστης επίμυος. Με κυανό χρώμα είναι χρωματισμένη η χρωματίνη και με πράσινο η πρωτεΐνη PML καταδεικνύοντας την τυπική κατανομή των σωματίων PML-NB στον πυρήνα. **Β:** Ανοσοϊστοχημική χρώση της πρωτεΐνης PML σε κύτταρα προστάτη επίμυος. Ανάλογα με τη θέση και τον κυτταρικό τύπο παρατηρείται σημαντική διακύμανση του αριθμού των PML-NBs. **Γ:** Διακυμάνσεις των πυρηνικών κηλίδων ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου. Τα σωματίδια PML-NB παρατηρούνται σε κύτταρα που βρίσκονται στη φάση της μεσόφασης και περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες SUMO και Sp100 (πράσινες κηλίδες). Αντίθετα, κατά τη φάση της μίτωσης τα PML-NB οργανώνονται σε μεγαλύτερους και ολιγάριθμους σχηματισμούς που δεν περιέχουν SUMO ή Sp100 και καλούνται MAPPs (mitotic accumulations of PML protein) (224).

Οι Szosteki και συν. διαπίστωσαν ότι ο ορός ασθενών με ΠΧΚ εμφάνιζε αντιδραστικότητα έναντι μιας πρωτεΐνης με MB 100kDa που έδινε χαρακτηριστικό πρότυπο πυρηνικών κηλίδων στον έμμεσο ανοσοφθορισμό (227). Η πρωτεΐνη αυτή

ονομάστηκε Sp100 και αποτέλεσε το πρώτο μέλος που χαρακτηρίστηκε από μία ομάδα πρωτεϊνών που περιλαμβάνει επίσης τις Sp110, Sp140/LYSp100 και τον AIRE (228, 229). Η πρωτεΐνη Sp100 είναι συνδεδεμένη μέσω ομοιοπολικών δεσμών με την πρωτεΐνη SUMO-1, από την οποία υφίσταται μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Η σύνδεση της SUMO-1 στην Sp100 φαίνεται ότι ενισχύει τη σταθερότητα των συμπλεγμάτων Sp100-HP1 και διαδραματίζει πιθανότατα ρυθμιστικό ρόλο στην ενδοκυττάρια κατανομή της Sp100 και στην αλληλεπίδρασή της με τη χρωματίνη του πυρήνα (230, 231).

Αντιπυρηνικά αντισώματα έναντι PML, Sp100 και SUMO έχουν ανιχνευθεί στον ορό ασθενών με ΠΧΚ κατά κύριο λόγο, αλλά και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (225, 232-234). Εξαιτίας της συσχέτισής του με την ΠΧΚ η κλινική τους σημασία περιγράφεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

#### **4.2 Αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ινών (SMA)**

Τα αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ινών ανιχνεύθηκαν αρχικά το 1965 στον ορό ασθενών με την τότε καλούμενη «χρόνια ενεργό ηπατίτιδα», που αργότερα αναγνωρίστηκε ως ΑΗ (235). Εν συνεχεία, το 1971 διαπιστώθηκε ότι τα αντισώματα αυτά αναγνώριζαν μικροϊνίδια ακτίνης του κυτταροσκελετού των ηπατοκυττάρων (236).

Ο κυτταρικός σκελετός αποτελεί πολύπλοκο δίκτυο ινιδίων που επιτελεί διάφορες λειτουργίες μέσα στο ευκαρυωτικό κύτταρο. Με βάση το μέγεθός τους διακρίνονται τρεις τύποι ινιδίων: τα μικρονημάτια, τα ενδιάμεσα νημάτια και οι μικροσωληνίσκοι. Τα μικρονημάτια αποτελούνται κυρίως από ακτίνη, οι μικροσωληνίσκοι από τουμπουλίνη, ενώ τα ενδιάμεσα νημάτια αποτελούνται από διάφορες πρωτεΐνες ανάλογα με το είδος του ιστού στον οποίο ανήκει το κύτταρο. Τα ενδιάμεσα νημάτια



των μεσεγγυματικών κυττάρων περιέχουν βιμεντίνη, των επιθηλιακών κυττάρων κυτταροκερατίνες, και των μυϊκών κυττάρων δεσμίνη. Τα συστατικά του κυτταροσκελετού επιτελούν διάφορες λειτουργίες, όπως η υποστήριξη της δομής του κυττάρου, η συσταλτικότητα και η κινητικότητα του (7). Τα SMA μπορεί να αναγνωρίζουν πέραν της ακτίνης που προαναφέρθηκε και άλλα συστατικά του κυτταροσκελετού, όπως η βιμεντίνη, η τουμπουλίνη και η δεσμίνη (237, 238). Η αντιγονική τους ειδικότητα και ο τίτλος τους καθορίζουν την κλινική τους σημασία και τη διαγνωστική τους αξία.

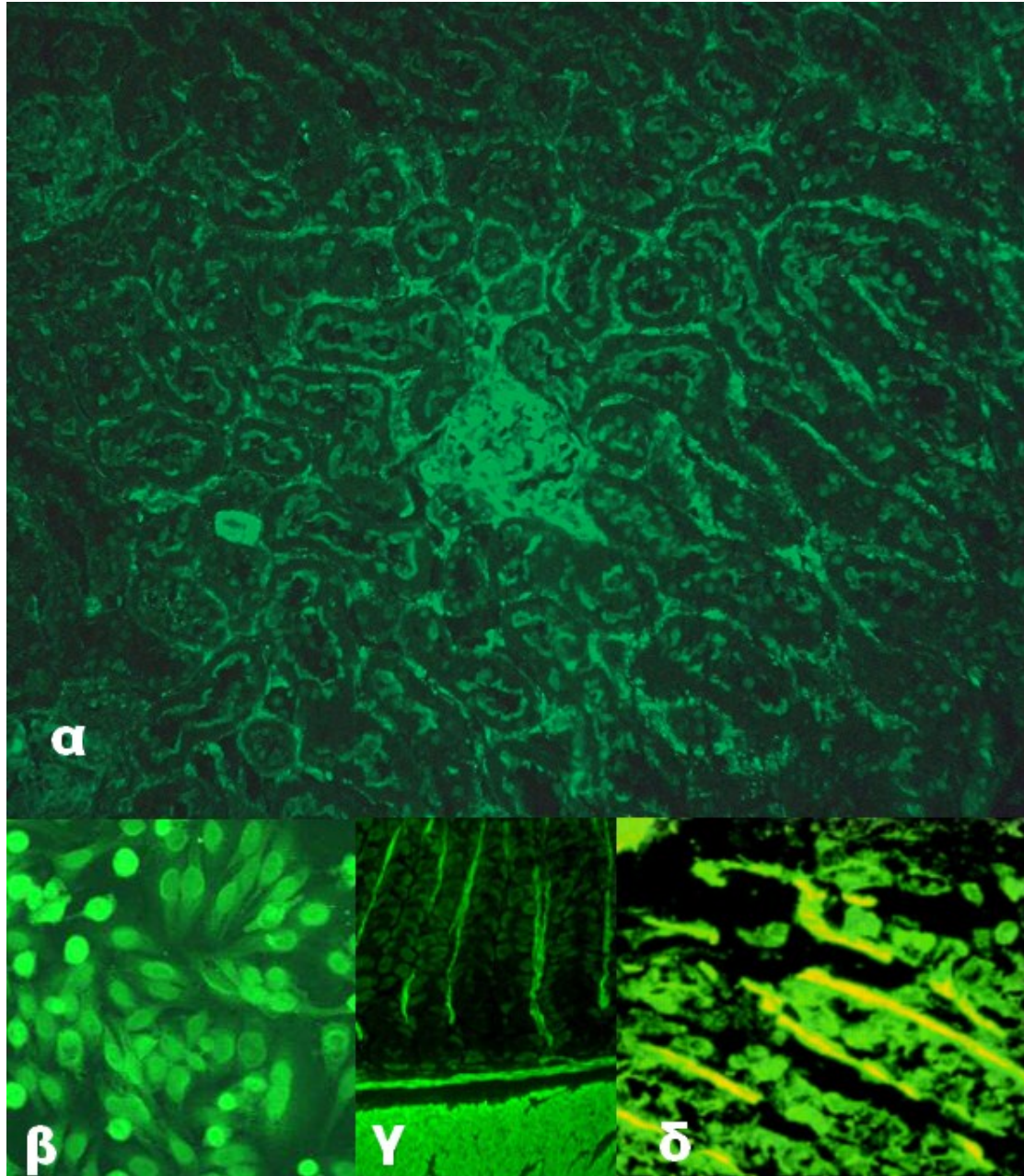
Επί μακρόν, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για την ανίχνευση των SMA. Σε αυτό συνετέλεσαν οι δυσκολίες στο να απομονωθούν κεκαθαρμένες πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, αλλά και τα αρχικά αναξιόπιστα αποτελέσματα όταν για τον προσδιορισμό των SMA έναντι ακτίνης χρησιμοποιείτο η μέθοδος της ELISA. Φαίνεται ότι η συγγένεια των SMA έναντι ακτίνης μεταβάλλεται ανάλογα της διαμόρφωσης του μορίου της, με την «νηματοειδή» μορφή της ακτίνης (filamentous actin, F-actin) να εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγγένεια και να δίνει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα (239). Νεώτερες διατάξεις που χρησιμοποιούν κεκαθαρμένη F-ακτίνη έχουν βελτιωμένη διαγνωστική αξία, ωστόσο ο έμμεσος ανοσοφθορισμός αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για την ανίχνευση SMA.

Ως υπόστρωμα στη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε HEp-2 κύτταρα, είτε καλύτερα τομές ήπατος, νεφρού και στομάχου αρουραίων (Εικόνα 32).

Ειδικά οι τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου, επιτρέπουν τη διάκριση του προτύπου φθορισμού των SMA σε τρεις κατηγορίες: α) SMA-V (vessels): χαρακτηρίζεται από φθορισμό μόνο του λείου μυϊκού τοιχώματος των μικρού και μετρίου μεγέθους αγγείων. β) SMA-G (glomeruli): χαρακτηρίζεται από φθορισμό των μεσαγγειακών



κυττάρων των νεφρικών σπειραμάτων. γ) SMA-T (tubuli): χαρακτηρίζεται από φθορισμό που περιβάλλει τα ουροφόρα σωληνάκια (240). Το πρότυπο SMA-G και κυρίως το SMA-T χαρακτηρίζει συνήθως τα αυτοαντισώματα έναντι F-ακτίνης (241).



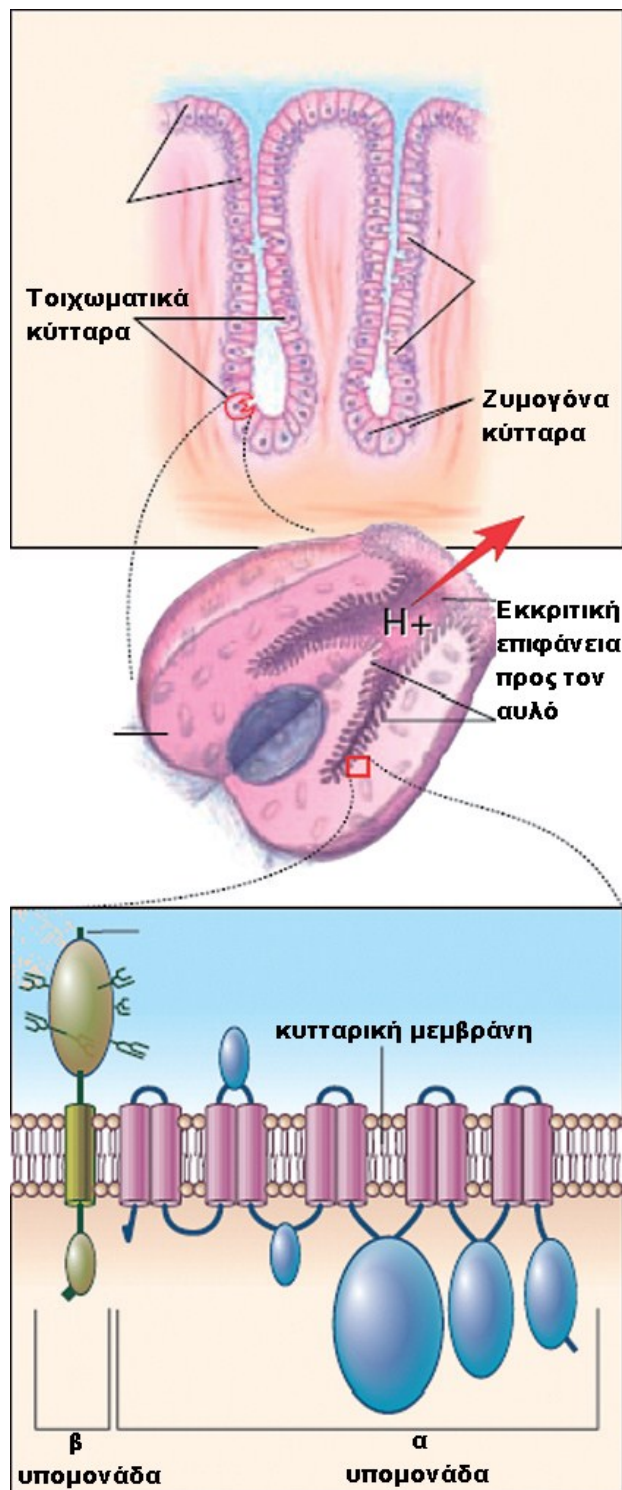
**Εικόνα 32. Πρότυπα φθορισμού των SMA. α) Νεφρός αρουραίου, όπου παρατηρείται ταυτόχρονα φθορισμός των αγγείων, του νεφρικού σπειράματος και του περίσωληναριακού χώρου. β) SMA σε υπόστρωμα HEp-2 κυττάρων. γ) και δ) SMA (F-actin) σε υπόστρωμα στομάχου αρουραίου.**

Παρουσία SMA ανιχνεύεται σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 80% ασθενών με AH τύπου 1 (AH-1), συνήθως σε τίτλους υψηλότερους από 1:80 και συχνά μαζί με ANA

αντισώματα (237, 242). Τα SMA στην AH-1 έχουν ειδικότητα έναντι F-ακτίνης και είναι χαρακτηριστικά της νόσου (237, 243), παρότι 20% των ασθενών με AH-1 μπορεί να μην παρουσιάζουν το πρότυπο SMA-T σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου (244). Αντισώματα SMA με ειδικότητα έναντι ακτίνης IgA τάξης έχουν περιγραφεί και στην κοιλιοκάκη, όπου έχουν συσχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση και με τη βαρύτητα της εντεροπάθειας (245). Ακόμη, SMA έχουν περιγραφεί σε ιογενείς λοιμώξεις όπως είναι η λοιμώδης μονοπυρήνωση και οι ιογενείς ηπατίτιδες, ωστόσο σε αυτές τις περιπτώσεις βρίσκονται συνήθως σε χαμηλούς τίτλους και ακολουθούν κατά κανόνα το πρότυπο φθορισμού SMA-V χωρίς να έχουν ειδικότητα έναντι F-ακτίνης (246-250). Παρομοίως, χαμηλοί τίτλοι SMA έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με κακοήγη νεοπλάσματα, σε αιμοδότες και σε υγιή άτομα (251-253).

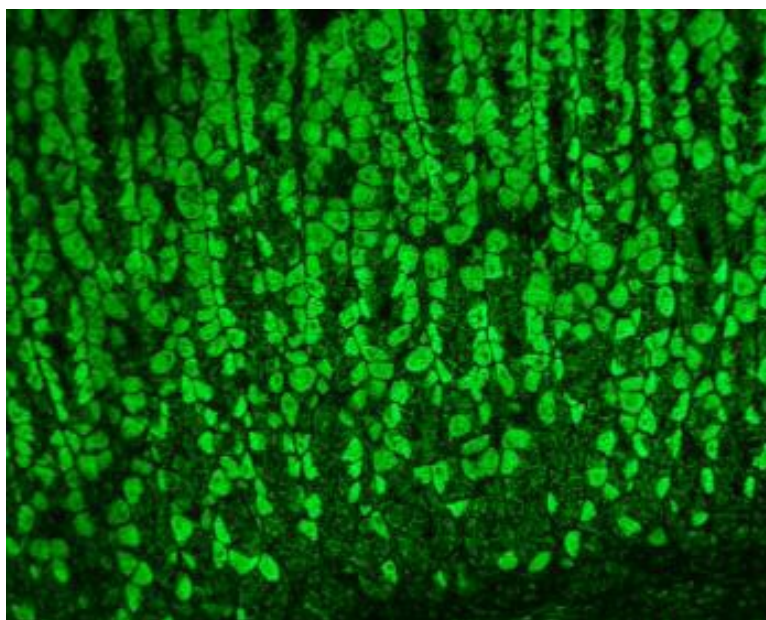
#### **4.3 Αντισώματα έναντι τοιχωματικών κυττάρων στομάχου**

Τα αντισώματα έναντι τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου (parietal cell autoantibodies, PCA) είναι οργανοειδικά αντισώματα που στρέφονται έναντι της αντλίας  $H^+/K^+$  ATPάση αυτών των κυττάρων (Εικόνα 33) (254, 255). Η  $H^+/K^+$  ATPάση είναι υπεύθυνη για την έκκριση ιόντων  $H^+$ , σε ανταλλαγή με ιόντα  $K^+$  και είναι ως εκ τούτου υπεύθυνη για την οξύνιση του γαστρικού υγρού.



Εικόνα 33. Αντλία  $H^+/K^+$  τοιχωματικού κυττάρου στομάχου. Στο πρώτο σχήμα σημειώνεται η θέση των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου μέσα στα γαστρικά αδένια. Ακολουθεί σχηματική απεικόνιση τοιχωματικού κυττάρου, όπου φαίνεται η εκκριτική επιφάνειά του προς τον αυλό του γαστρικού αδενίου. Στην επιφάνεια αυτή εδράζεται η αντλία  $H^+/K^+$  ATPάση, η οποία αποτελείται από μία  $\alpha$ -υπομονάδα μεγέθους 100kDa με καταλυτικές ιδιότητες και μία  $\beta$ -υπομονάδα 60-90kDa γλυκοπρωτεϊνικής σύστασης, που αποτελεί τον αντιγονικό στόχο των PCA (256).

Η ανίχνευσή τους γίνεται με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού σε τομές στομάχου αρουραίου (Εικόνα 34) καθώς και με εμπορικά διαθέσιμες ELISA. Αν και ο έμμεσος ανοσοφθορισμός αποτελεί καθιερωμένη μέθοδο για την ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι τοιχωματικών κυττάρων στομάχου (257), σύμφωνα με τους Karlsson και συν. η ELISA μπορεί να επιτύχει παρόμοια ή και μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση αντισωμάτων έναντι  $H^+/K^+$  ATPάσης (258). Οι εμπορικά διαθέσιμες ELISA σήμερα επιτυγχάνουν ευαισθησία και ειδικότητα που κυμαίνονται στο 85-93% και 80-85%, αντίστοιχα (259).



**Εικόνα 34. Πρότυπο ανοσοφθορισμού αντισωμάτων έναντι τοιχωματικών κυττάρων σε στόμαχο αρουραίου.**

Ανευρίσκονται κυρίως στον ορό ασθενών με κακοήγη αναιμία Biermer σε ποσοστό έως 90% (260), σε άτομα με ατροφική γαστρίτιδα του σώματος (τύπου Α) σε μικρότερο ποσοστό (261), καθώς επίσης και στα πλαίσια αυτοάνοσων ενδοκρινοπαθειών που περιλαμβάνουν και άλλες καταστάσεις όπως αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, λεύκη κ.α. σε ποσοστό έως και 60% (262, 263). Στις καταστάσεις αυτές ο τίτλος των αντισωμάτων έναντι τοιχωματικών κυττάρων στομάχου φαίνεται ότι αυξάνει με την ηλικία, σχετίζεται με τα επίπεδα



γαστρίνης (264, 265), καθώς και με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης σιδηροπενίας και έλλειψης B12 (266, 267).

Έχει βρεθεί ότι περίπου 20-30% των ατόμων με γαστρίτιδα προκαλούμενη από *Helicobacter pylori* έχει αντισώματα έναντι τοιχωματικών κυττάρων στομάχου (268, 269), ο τίτλος των οποίων έχει συσχετισθεί και με τον βαθμό της ατροφίας (270, 271).

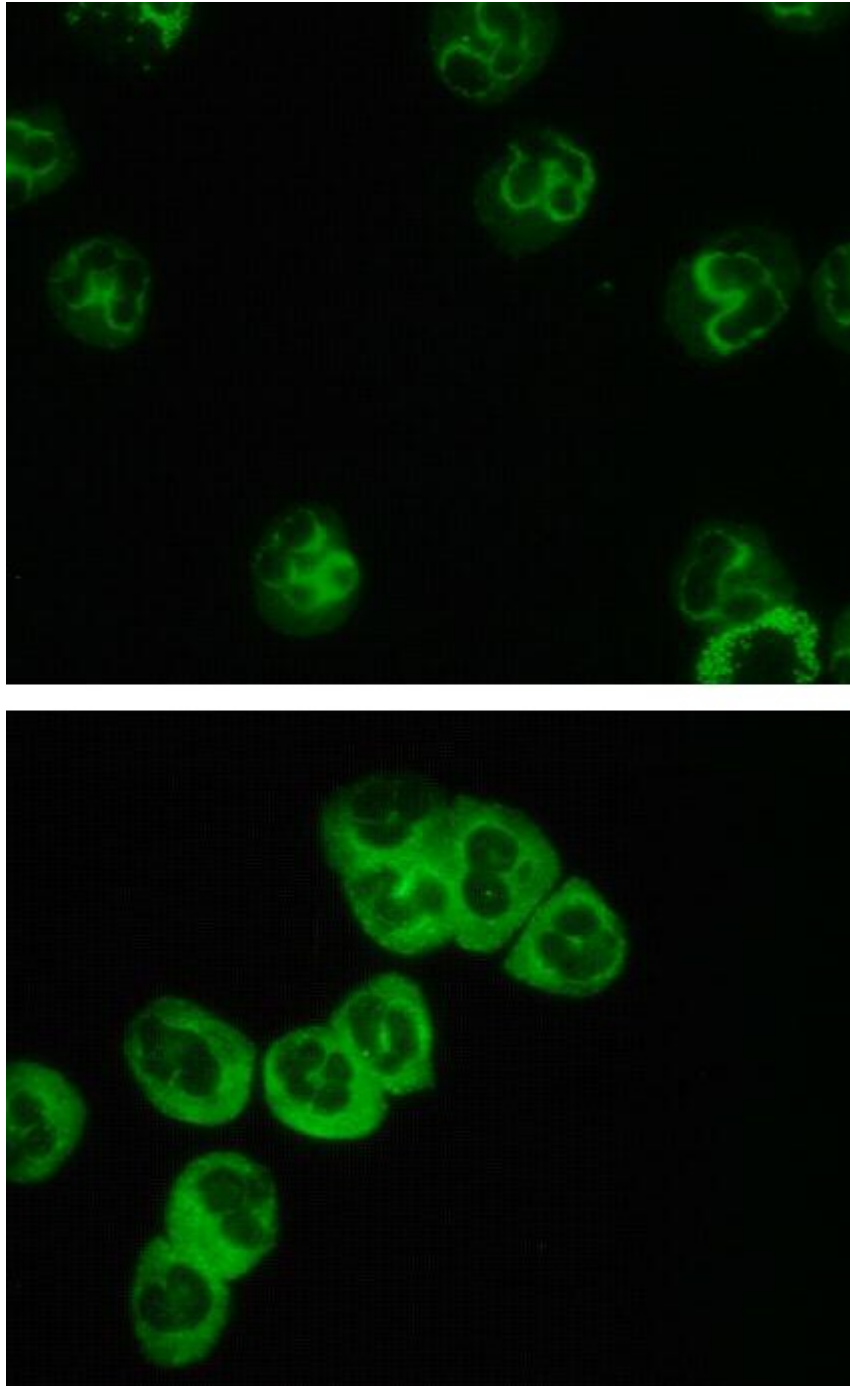
Έχει προταθεί ότι το βακτήριο μπορεί να προκαλεί ατροφική γαστρίτιδα και παραγωγή αντιτοιχωματικών αντισωμάτων μέσω του μηχανισμού της μοριακής μίμησης (272). Αντισώματα έναντι τοιχωματικών κυττάρων στομάχου έχουν επίσης ανιχνευθεί και σε ασυμπτωματικά άτομα με θετική δοκιμασία για *H. pylori*, όπως και στο 2-3% του γενικού πληθυσμού (273). Ο επιπολασμός των PCA στο γενικό πληθυσμό αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας από 2.5% στην 3<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής σε 12% στην 8<sup>η</sup> δεκαετία (274).

Τα αντισώματα αυτά έχουν ανιχνευθεί σε σημαντικό ποσοστό ασθενών με ηπατίτιδα C, με αυξητική τάση κατά τη διάρκεια της αγωγής με ιντερφερόνη-α και φαίνεται να εμφανίζουν αρνητική συσχέτιση με την ανταπόκριση στην παραπάνω θεραπεία (275-277), ενώ ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος εμφανίζουν αντιδραστικότητα έναντι τοιχωματικών κυττάρων στομάχου σε ποσοστό 11% για την AH-1 και 32% για την ΠΧΚ. Ειδικά για τους ασθενείς με ΠΧΚ, η ύπαρξη αντισωμάτων έναντι τοιχωματικών κυττάρων συνοδεύεται με αντισώματα έναντι του ενδογενούς παράγοντα και χαμηλά επίπεδα βιταμίνης B12 στο 12% των ασθενών (278).

#### **4.4 Αντισώματα έναντι κυτταροπλάσματος ουδετερόφιλων (ANCA)**

Τα ANCA αποτελούν μία ετερογενή ομάδα αυτοαντισωμάτων που στρέφονται έναντι διαφόρων στοιχείων του κυτταροπλάσματος των ουδετεροφίλων. Ανιχνεύονται με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα

ουδετερόφιλα κύτταρα μονιμοποιημένα σε αιθανόλη. Με την τεχνική αυτή μπορούν να παρατηρηθούν δύο πρότυπα ανοσοφθορισμού. Ένα με κυτταροπλασματικό φθορισμό (cytoplasmic, c-ANCA) και ένα με περιπυρηνικό φθορισμό (perinuclear, p-ANCA) (Εικόνα 35).



**Εικόνα 35. Χαρακτηριστικοί τύποι φθορισμού κυτταροπλάσματος ουδετεροφίλων. Στην πάνω εικόνα απεικονίζεται περιπυρηνικός κυτταροπλασματικός φθορισμός (pANCA) και στην κάτω διάχυτος κυτταροπλασματικός (cANCA).**

Το πρώτο αυτοαντιγόνο-στόχος των c-ANCA που ανιχνεύθηκε ήταν η πρωτεΐνωση 3 (PR3) (279, 280), μία πρωτεΐνωση σερίνης 29 kDa, που αποτελεί βασικό συστατικό των αζουρόφιλων κοκκίων των ουδετεροφίλων (280). Τα αντισώματα αυτά αποτελούν πολύ ευαίσθητους δείκτες για τη διάγνωση της κοκκιωμάτωσης Wegener (μια κοκκιωματώδης φλεγμονή της αναπνευστικής οδού με συστηματική αγγειίτιδα και νεκρωτική σπειραματονεφρίτιδα με μηνοειδείς σχηματισμούς) καθώς ανιχνεύονται στο 70-100% των ασθενών (281, 282). Αντιθέτως, τα p-ANCA στρέφονται κυρίως κατά της μυελοϋπεροξειδάσης (MPO) (283), μιας γλυκοζυλιωμένης πρωτεΐνης των αζουρόφιλων κοκκίων των πολυμορφοπύρηνων, μοριακού βάρους 140 kDa, που είναι απαραίτητη για την αμυντική λειτουργία των φαγοκυττάρων, μέσω της παραγωγής υποχλωρικών ιόντων (284, 285). Τα αντισώματα αυτά απαντώνται σε διάφορους τύπους αγγειιτών και κυρίως στην οζώδη πολυαρτηρίτιδα, στο σύνδρομο Churg-Strauss και στη μικροσκοπική πολυαγγειίτιδα (286-288). Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις των αγγειιτών τα c- και p-ANCA, φαίνεται ότι εκτός από διαγνωστικοί δείκτες συμμετέχουν και στην παθογένεια των νοσημάτων αυτών (289, 290), καθώς φαίνεται να συσχετίζονται με τις κλινικές εκδηλώσεις, την ενεργότητα και τον κίνδυνο υποτροπής των αγγειιτών (291, 292).

Εκτός από τα προαναφερθέντα αντιγόνα, βρέθηκε ότι τα ANCA μπορούν να έχουν δραστηριότητα και έναντι άλλων συστατικών του κυτταροπλάσματος, όπως έναντι καθεψίνης G (293), λακτοφερρίνης (294), λυσοζύμης (295), ελαστάσης (296), α-ενολάσης, καταλάσης (297), BPI (bactericidal/ permeability-increasing protein) (298, 299), αζουροσιδίνης (299), β-γλυκουρονιδάσης (300), καθώς επίσης και έναντι πυρηνικών αντιγόνων με περιφερική κατανομή, όπως ιστόνη H1 (301), high mobility

group proteins (HMG1 και HMG2) (302), συστατικά πυρηνικών μεμβρανών, όπως λαμινίνη B1 (303) κ.α. Τα αντισώματα έναντι όλων των παραπάνω αντιγόνων συνήθως δίνουν ένα διάχυτο και άτυπο πρότυπο ανοσοφθορισμού και συχνά χαρακτηρίζονται ως άτυπα ANCA ή x-ANCA ή snow-drift like ANCA (304-306).

Τα άτυπα αυτά ANCA μπορεί να τα ανιχνεύσει κάποιος σε διάφορες παθήσεις. Τα cANCA έχουν παρατηρηθεί σε περιπτώσεις φυματίωσης και λεμφώματος (307, 308), ενώ τα άτυπα pANCA έχουν βρεθεί σε ασθενείς με χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες (309), αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (237, 310, 311), ρευματοειδή αρθρίτιδα (312), νεανική αρθρίτιδα (313), κυστική ίνωση (314), ελκώδη κολίτιδα (315), νόσο Crohn (316), ελονοσία (317), αμοιβάδωση (318), HIV λοίμωξη (308, 319), λοιμώδη ενδοκαρδίτιδα (307, 308, 320), κ.α. Στις μη-αγγειιδικές αυτές καταστάσεις, τα ANCA αποτελούν ετερογενή ομάδα αυτοαντισωμάτων έναντι περισσότερων του ενός αυτοαντιγόνων, ενώ σε μικρό μόνο ποσοστό μπορεί να συνυπάρχει και αντιδραστικότητα έναντι της PR3, όπως στο συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (321, 322), σε ενδοκαρδίτιδα (320), κ.α.



## 5. ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

### 5.1 Αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ)

Η ΑΗ είναι μία χρόνια νεκροφλεγμονώδης ηπατική νόσος άγνωστης αιτιολογίας που οδηγεί σε προοδευτική καταστροφή του ήπατος, με αποτέλεσμα τη συχνή μετάπτωση σε κίρρωση και την αυξημένη θνητότητα, ιδιαιτέρως εάν η νόσος δε διαγνωστεί έγκαιρα και αφεθεί χωρίς θεραπεία.

Η νόσος προσβάλλει κυρίως γυναίκες, με αναλογία γυναικών: ανδρών ίση με 4:1. Ενώ μέχρι πρόσφατα υπήρχε η άποψη ότι η νόσος προσβάλλει συχνότερα κορίτσια και νέες γυναίκες 5-20 ετών, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι κατά την έναρξη της νόσου, οι περισσότερες ασθενείς είναι ηλικίας 50-70 ετών, διαπίστωση που αναγνωρίζεται και από τα τροποποιημένα κριτήρια για τη διάγνωση της ΑΗ.

Ο επιπολασμός της νόσου στη Βορειοδυτική Ευρώπη υπολογίζεται σε 140-170 ασθενείς ανά εκατομμύριο κατοίκων, ενώ η μέση επίπτωση κυμαίνεται μεταξύ 0.7-1.9 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους (323, 324). Αντίθετα, στην Ιαπωνία η συχνότητα της νόσου θεωρείται πιο μικρή, υπολογιζόμενη σε 0.8 έως 1.5 ασθενείς ανά εκατομμύριο πληθυσμού. Υπολογίζεται ότι στη Βόρεια Αμερική και τη Δυτική Ευρώπη αποτελεί το 20% του συνόλου των χρόνιων ηπατιτίδων, ενώ στη Νότια Αμερική φαίνεται ότι αντιπροσωπεύει μόνο το 5 έως το 10% (325). Στη χώρα μας δεν υπάρχουν σαφή στοιχεία για την επιδημιολογία της νόσου. Εντούτοις, πρόδρομες μελέτες στην Κεντρική Ελλάδα έχουν δείξει συχνότητα 8.25 ανά  $10^5$  κατοίκους (326).

#### 5.1.α Κλινική εικόνα ΑΗ

Η ΑΗ μπορεί να εκδηλωθεί ως εξής (327-330):

Α). Ήπια συμπτωματική μορφή. Αποτελεί την πιο συχνή μορφή (περίπου 60%) και συνήθως τα άτομα αυτά μπορεί να αναπτύξουν κίρρωση χωρίς να έχουν ιδιαίτερα

ενοχλήματα. Υπάρχουν διάφορα γενικά, μη ειδικά, συμπτώματα, όπως κακουχία, ανορεξία, απώλεια βάρους, αίσθημα αδυναμίας και εύκολης κόπωσης, διάχυτες αρθραλγίες και μυαλγίες. Στο 10% μπορεί να υπάρξει μετρίου βαθμού πυρετική κίνηση και σπανιότατα υψηλός πυρετός. Αντικειμενικά, μπορεί να διαπιστωθεί υπερτρίχωση, σταγονοειδής ακμή, πολλαπλές τηλεαγγειεκτασίες και ηπατοσπληνομεγαλία. Αμηνόρροια και ίκτερος μπορεί επίσης να συνυπάρχουν.

Β). Οξεία μορφή. Απαντάται στο 20-30% των ασθενών, με κλινική εικόνα παρόμοια με αυτή της οξείας ιογενούς ηπατίτιδας. Σπάνια η οξεία μορφή μπορεί να είναι ανικτερική, ενώ σπανιότερα μπορεί να εκδηλωθεί με τη μορφή οξείας κεραυνοβόλου ηπατικής ανεπάρκειας (2-10% του συνόλου των περιπτώσεων ΑΗ), συνήθως σε παιδιά μικρότερα των 10 ετών.

Γ). Ασυμπτωματική μορφή. Απαντάται στο 10-20% των ασθενών με ΑΗ. Η νόσος διαδράμει εντελώς ασυμπτωματικά, οπότε και η διάγνωση γίνεται τυχαία (στα πλαίσια κλινικής εξέτασης με διαπίστωση ηπατοσπληνομεγαλίας ή βιοχημικών εξετάσεων ρουτίνας όπου διαπιστώνεται τρανσαμινασαιμία) και συνήθως σε προχωρημένα στάδια.

Η ΑΗ συχνά συσχετίζεται με διάφορες άλλες αυτοάνοσες παθήσεις, όπως αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα (η πιο συχνή συνυπάρχουσα διαταραχή), νόσο Graves, ελκώδη κολίτιδα, αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, ιδιοπαθή θρομβοκυττοπενία, συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, ρευματοειδή αρθρίτιδα, σύνδρομο Sjogren, πολυμυοσίτιδα, μикτή νόσο του συνδετικού ιστού, κοιλιοκάκη, μυασθένεια Gravis, αλωπεκία, ονυχοδυστροφία, υμενίτιδα και ομαλό λειχήνα. Οι εξωηπατικές αυτές εκδηλώσεις παρατηρούνται στο 10-50% των ασθενών με ΑΗ (331).

### **5.1.β Εργαστηριακά ευρήματα ΑΗ**

Εκτός των επηρεασμένων ηπατικών βιοχημικών δεικτών (με προεξάρχουσα την αύξηση της χολερυθρίνης και των αμινοτρανσφερασών), χαρακτηριστική είναι και η παρουσία διάχυτης υπεργαμμασφαιριναιμίας (κυρίως IgG, ενώ η IgA μπορεί να είναι μειωμένη) καθώς και διαφόρων αυτοαντισωμάτων, που αποτελούν ιδιαίτερα σημαντικούς εργαστηριακούς δείκτες για τη διάγνωση και την ταξινόμηση της ΑΗ (327-329, 332, 333).

Σύμφωνα με τα αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται, η ΑΗ υποδιαιρέθηκε αρχικά σε τρεις τύπους (327, 334-336): α) την ΑΗ-1, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ANA ή/και SMA και ήταν παλαιότερα γνωστή ως κλασική ή λυκοειδής ηπατίτιδα. Επιπλέον, ανιχνεύονται pANCA και αντισώματα έναντι του υποδοχέα της ασιαλογλυκοπρωτεΐνης (anti-ASGP-R); β) την ΑΗ τύπου 2 (ΑΗ-2), που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ειδικών αυτοαντισωμάτων έναντι μικροσωμιακών αντιγόνων ήπατος-νεφρών τύπου 1 (liver-kidney microsomal antibodies, anti-LKM 1) ή/και αυτοαντισωμάτων κατά κυτοσολίων ήπατος τύπου 1 (antibodies against liver cytosol type 1, anti-LC 1); γ) την ΑΗ τύπου 3 (ΑΗ-3), που χαρακτηρίζεται από την ανίχνευση αντισωμάτων κατά διαλυτών αντιγόνων ήπατος (antibodies against soluble liver antigens, anti-SLA), τα οποία διαπιστώθηκε ότι είναι ίδια με τα αυτοαντισώματα εκείνα κατά του αντιγόνου ήπατος-παγκρέατος (antibodies against liver-pancreas antigen, anti-LP) (337). Για τον παραπάνω λόγο σήμερα πλέον μιλάμε για anti-SLA/LP αυτοαντισώματα.

Μετά από πρόσφατα κλινικά, ορολογικά και γενετικά δεδομένα, έγινε σαφές ότι οι ασθενείς με ΑΗ-3 παρουσιάζουν παρόμοια χαρακτηριστικά με εκείνα των ασθενών με ΑΗ-1. Ως εκ τούτου, έχει προταθεί πλέον η ταξινόμηση της ΑΗ σε δύο κατηγορίες: την ΑΗ-1, με θετικά ANA, SMA, pANCA, anti-ASGP-R, ή/και anti-

SLA/LP αντισώματα, και την AH-2, με θετικά anti-LKM ή anti-LC 1 αντισώματα (329, 334, 336, 338, 339).

Σκόπιμο είναι να παρουσιαστεί και μία ειδική μορφή της AH στα πλαίσια του συνδρόμου αυτοάνοσης πολυενδοκρινολογικής τύπου 1 (ΣΑΠΕ-1, APECED), που χαρακτηρίζεται από χρόνια καντιντίαση των βλεννογόνων και του δέρματος, αυτοάνοση προσβολή πολλαπλών ενδοκρινών αδένων και στο 10-18% των ασθενών προσβολή του ήπατος. Η AH στα πλαίσια του ΣΑΠΕ-1 χαρακτηρίζεται από την ανίχνευση αντισωμάτων κατά μικροσωμίων ήπατος (liver microsomal antibodies, anti-LM) (340-343).

Παρουσία αντισωμάτων που είναι παρόμοια με αυτά που ανιχνεύονται στην AH μπορεί να παρατηρηθεί και σε ορισμένους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C ή D (343-345). Στις περιπτώσεις αυτές είναι πολύ σημαντική η κλινική διάκριση μεταξύ αυτών των δύο μορφών, καθώς τυχούσα χορήγηση ιντερφερόνης-α (ως θεραπεία της χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας) ενδέχεται να επάγει έξαρση ή ενεργοποίηση μιας λανθάνουσας AH (346-349), ενώ χορήγηση ανοσοκατασταλτικής αγωγής (βασική θεραπευτική στρατηγική στην αντιμετώπιση της AH), θα οδηγήσει σε αυξημένο ιικό πολλαπλασιασμό και επιδείνωση της ηπατικής βλάβης στις περιπτώσεις ιογενών λοιμώξεων (344, 350). Επιπρόσθετα, ανίχνευση ANA, αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων και αντι-μικροσωμιακών αντισωμάτων έχει παρατηρηθεί και σε περιπτώσεις φαρμακευτικών ηπατιτίδων που επάγονται από αυτοάνοσους μηχανισμούς (343, 351).

### ***5.1.γ Αντισώματα που ανιχνεύονται στην AH-1***

Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA)

Η AH-1 χαρακτηρίζεται από την παρουσία ANA σε σημαντικούς τίτλους (θετικός τίτλος  $\geq 1:80$  σε ενήλικες και  $\geq 1:40$  σε παιδιά). Τα ANA ανιχνεύονται με έμμεσο

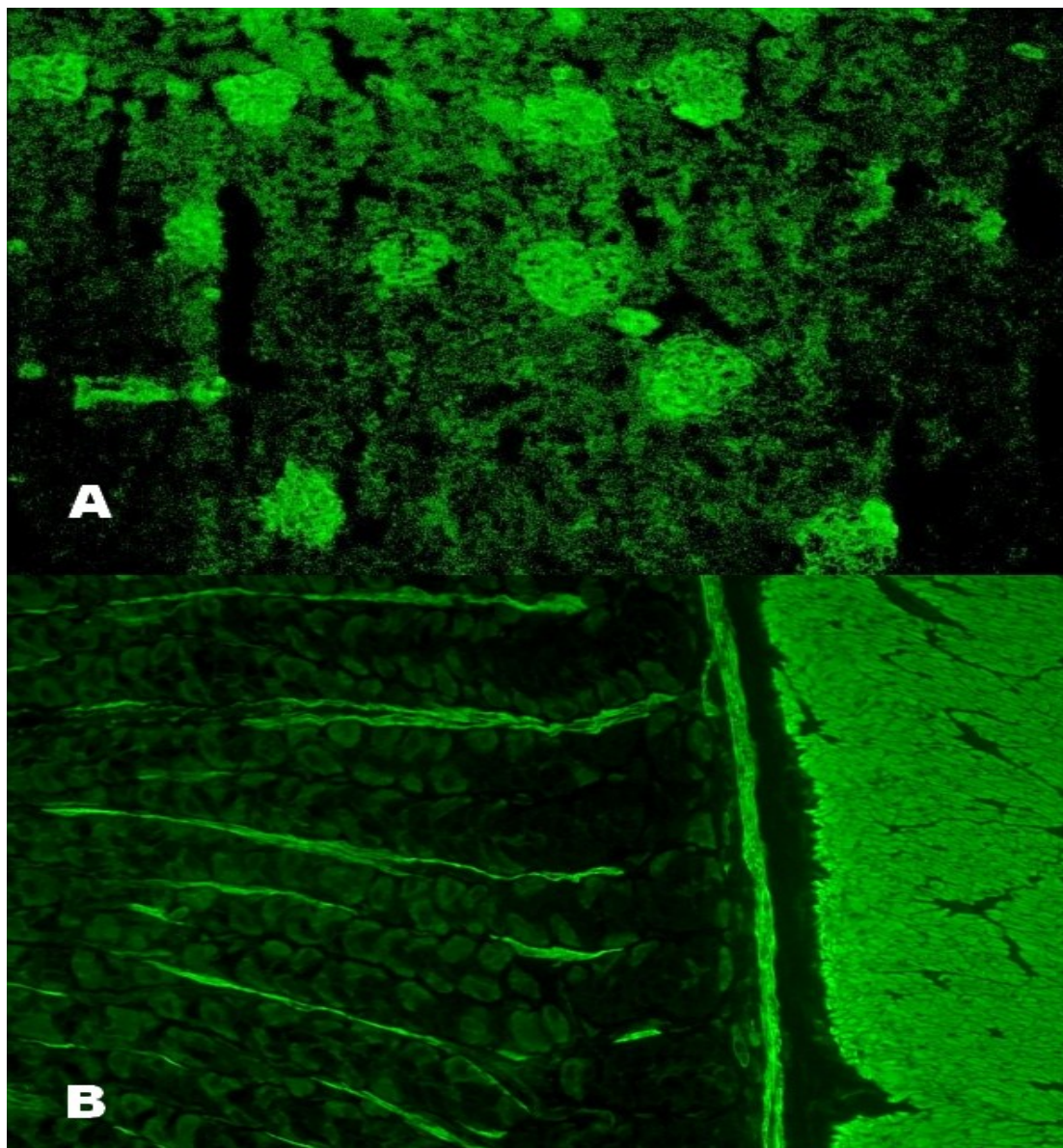
ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα HEp-2 κύτταρα (237, 352). Οροί ασθενών με AH-1 δίνουν διάφορα πρότυπα ανοσοφθορισμού στα HEp-2 κύτταρα, με πιο συχνούς τον ομοιογενή ή διάχυτο (homogeneous) (συχνότητα 34-58%) και τον λεπτό στικτό (fine speckled) (συχνότητα 21-34%) (237, 327, 353, 354). Τα αυτοαντιγόνα-στόχοι των ANA που ανιχνεύονται στην AH-1 ποικίλλουν (έναντι μονής ή διπλής έλικας DNA, ιστονών, κυκλίνης A, t-RNA, sn-RNPs, λαμινίνης A και C, κεντρομεριδίων) αλλά δε φαίνεται να έχουν ιδιαίτερη διαγνωστική αξία ή να βοηθούν στη διάκριση διαφορετικών κλινικών υποομάδων της AH-1 (355-359).

#### Αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ινών (SMA)

Τα SMA ανιχνεύονται με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα είτε HEp-2 κύτταρα, είτε καλύτερα τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου σε κρυοστάτη (θετικός τίτλος  $\geq 1:40$ ) (96, 237). Το βασικότερο αυτοαντιγόνο-στόχος είναι η F-ακτίνη του κυτταροσκελετού, αλλά εμφανίζεται αντιδραστικότητα και έναντι άλλων συστατικών του κυτταροσκελετού (τουμπουλίνη, βιμεντίνη, δεσμίνη, σκελετίνη) (Εικόνα 36). Σε γενικές γραμμές δε φαίνεται ότι οι αντιδραστικότητες έχουν προγνωστική ή διαγνωστική αξία (336, 358). Εντούτοις, η παρουσία SMA κατά F-ακτίνης χαρακτηρίζει συνήθως την πορεία και την έκβαση των προσβληθέντων. Οι ασθενείς αυτοί είναι νεότεροι, συνήθως HLA-DR3 θετικοί, με φτωχή ανταπόκριση στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή, και η ανάγκη μεταμόσχευσης εμφανίζεται σχετικά πρώιμα, σε σχέση με τους ANA-θετικούς, αλλά αρνητικούς για F-ακτίνη ασθενείς (237, 360, 361).

Χαμηλοί τίτλοι SMA (1:40-1:160) ανιχνεύονται συχνά και σε ασθενείς με οξείες ή χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες, αλλά στις περισσότερες εξ αυτών των περιπτώσεων δεν παρουσιάζεται ειδικότητα έναντι της F-ακτίνης (237, 246, 362, 363).

Τόσο τα ANA όσο και τα SMA, μπορεί να εξαφανιστούν κατά τη διάρκεια της ανοσοκατασταλτικής αγωγής, χωρίς όμως αυτό να αποτελεί προγνωστικό παράγοντα καλύτερης έκβασης της θεραπείας της AH-1 (364). Επιπλέον, ο τίτλος των ANA και SMA κατά τη διάγνωση ή ελάττωση του τίτλου κατά τη διάρκεια της θεραπείας δε φαίνεται να αποτελούν αξιόπιστο δείκτη εκτίμησης της βαρύτητας και της πρόγνωσης της νόσου (364). Σύμφωνα με τα παραπάνω ευρήματα, τα ANA και τα SMA, φαίνεται πως δε συμμετέχουν στην παθογένεια της AH-1.



**Εικόνα 36. Φθορισμός SMA έναντι νηματίων ακτίνης σε υπόστρωμα A) νεφρού και B) στομάχου αρουραίου. Ορός γυναίκας ασθενούς με AH-1 (237).**

Φαίνεται ότι τα αντισώματα έναντι F-ακτίνης έχουν ως αντιγονικό επίτοπο την περιοχή σύνδεσης της α-ακτινίνης, μιας πρωτεΐνης του κυτταροσκελετού με σημαντικό ρόλο στη σύνδεση του κυτταροσκελετού με διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου της F-ακτίνης (365). Σε πρόσφατη μελέτη του κέντρου μας διαπιστώθηκε ότι το 40% των ασθενών με AH-1 εμφάνιζαν αντιδραστικότητα έναντι α-ακτινίνης, ενώ το 30% των ασθενών εμφάνιζε αντιδραστικότητα τόσο έναντι F-ακτίνης, όσο και έναντι α-ακτινίνης, χωρίς το φαινόμενο αυτό να οφείλεται στην ύπαρξη διασταυρούμενης αντιδραστικότητας. Το εύρημα δε αυτό εμφανίζει ειδικότητα που προσεγγίζει το 99% για την AH-1 (366). Επιπρόσθετα, με βάση δεδομένα της ερευνητικής μας ομάδας, φαίνεται οι ασθενείς με διπλή αντιδραστικότητα έναντι F-ακτίνης και α-ακτινίνης, έχουν κλινικά και ιστολογικά ενεργό νόσο και η ανίχνευση των αντισωμάτων είναι συχνότερη σε ασθενείς άνευ θεραπείας (366), ενώ τα αντισώματα έναντι α-ακτινίνης αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες για την απάντηση στη θεραπεία (367).

#### Αντισώματα κατά του κυτταροπλάσματος των ουδετεροφίλων (ANCA)

Τα ANCA ανιχνεύονται με έμμεσο ανοσοφθορισμό, κατά τον οποίο -όταν χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα απομονωμένα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα- ανευρίσκονται στο 65-96% των ασθενών με AH-1. Στην πλειονότητά τους πρόκειται για pANCA (237, 303, 310, 329, 368), ενώ μέχρι στιγμής δεν έχουν ανιχνευθεί στην AH-2 (368). Οι τίτλοι ανίχνευσής τους είναι σημαντικά υψηλότεροι σε σχέση με άλλες χρόνιες ηπατικές παθήσεις, ενώ η παρουσία τους φαίνεται να σχετίζεται με πιο βαριά ηπατική νόσο (310, 368-370). Τα αυτοαντιγόνα που ανιχνεύονται από τα pANCA στην AH-1 ποικίλλουν, όπως καθεψίνη G, καταλάση, α-ενολάση, λακτοφερίνη, HMG1 και HMG2 (369-372). Η ετερογένεια αυτή, υποδεικνύει την

μικρή μάλλον κλινική σημασία της αντιγονοειδικότητας των αυτοαντισωμάτων αυτών στην AH-1 (370, 371).

#### Αντισώματα κατά του υποδοχέα της ασιαλογλυκοπρωτεΐνης (anti-ASGP-R)

Ο ASGP-R είναι ένας ειδικός υποδοχέας των ηπατοκυττάρων, που εκφράζεται κυρίως στην επιφάνεια των κυττάρων που βρίσκονται στις περιπυλαίες περιοχές των ηπατικών λόβιων και η κύρια λειτουργία του είναι η σύνθεση και μεταφορά εντός του κυττάρου γλυκοπρωτεϊνών που φέρουν ομάδες γαλακτόζης (373). Anti-ASGP-R αντισώματα ανιχνεύονται στο 75-90% των ασθενών με AH-1 και η παρουσία τους έχει θετική συσχέτιση με την ενεργότητα της νόσου (327, 329, 340, 361, 374). Η ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων αυτών παρουσιάζει αρκετές τεχνικές δυσκολίες καθώς είναι δύσκολη η απομόνωση καθαρού αντιγόνου (336). Anti-ASGP-R αντισώματα ανιχνεύονται σε χαμηλούς τίτλους και σε μικρότερο ποσοστό και σε άλλες ηπατικές παθήσεις, όπως στην ΠΧΚ, την αλκοολική ηπατοπάθεια και σε οξείες ιογενείς ηπατίτιδες (κυρίως Α και Β), μειώνοντας την ειδικότητα του αυτοαντισώματος αυτού (361, 374, 375). Ωστόσο, τα anti-ASGP-R αντισώματα μπορούν να βοηθήσουν στη διάγνωση της AH-1 όταν τα άλλα αυτοαντισώματα είναι αρνητικά.

#### Anti-SLA/LP αντισώματα

Τα anti-SLA/LP ανιχνεύονται με μεθόδους ELISA, με ραδιοανοσοενζυμικές μεθόδους, με μεθόδους ανοσοαποτύπωσης και ανοσοκαθίζηση με ραδιοδεσμευτικές μεθόδους (96, 237, 337, 376, 377). Χαρακτηρίζονται από υψηλή ειδικότητα για την AH-1, ανευρίσκονται στο 10-30% των ατόμων, δεν ανιχνεύονται ποτέ σε οξείες ή χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες (378), και αποτελούν δείκτη σοβαρότερης μορφής της



νόσου (379-381). Το αυτοαντιγόνο-στόχος είναι μία πρωτεΐνη του κυτταροπλάσματος με μοριακό βάρος 50kDa, με άγνωστη ως επί το πλείστον λειτουργία σύμφωνα με μελέτες του πρόσφατα απομονωμένου αυτοαντιγόνου των anti-SLA/LP (337). Σε αντίθεση με τα προηγούμενα ευρήματα που θεωρούσαν ότι ανήκε στις κυτταροκερατίνες ή τις πρωτεϊνικές υπομονάδες της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (382, 383), φαίνεται ότι το αυτοαντιγόνο-στόχος έχει κλωνοποιηθεί και είναι μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που σχετίζεται με το σύμπλεγμα της tRNP (Ser)Sec και ανήκει στην οικογένεια των υδρόξυ-μέθυλο-τρανσφερασών σερίνης (384). Πολύ πρόσφατα το αυτοαντιγόνο αυτό έχει πλέον απομονωθεί και από ανθρώπινα ηπατοκύτταρα (385).

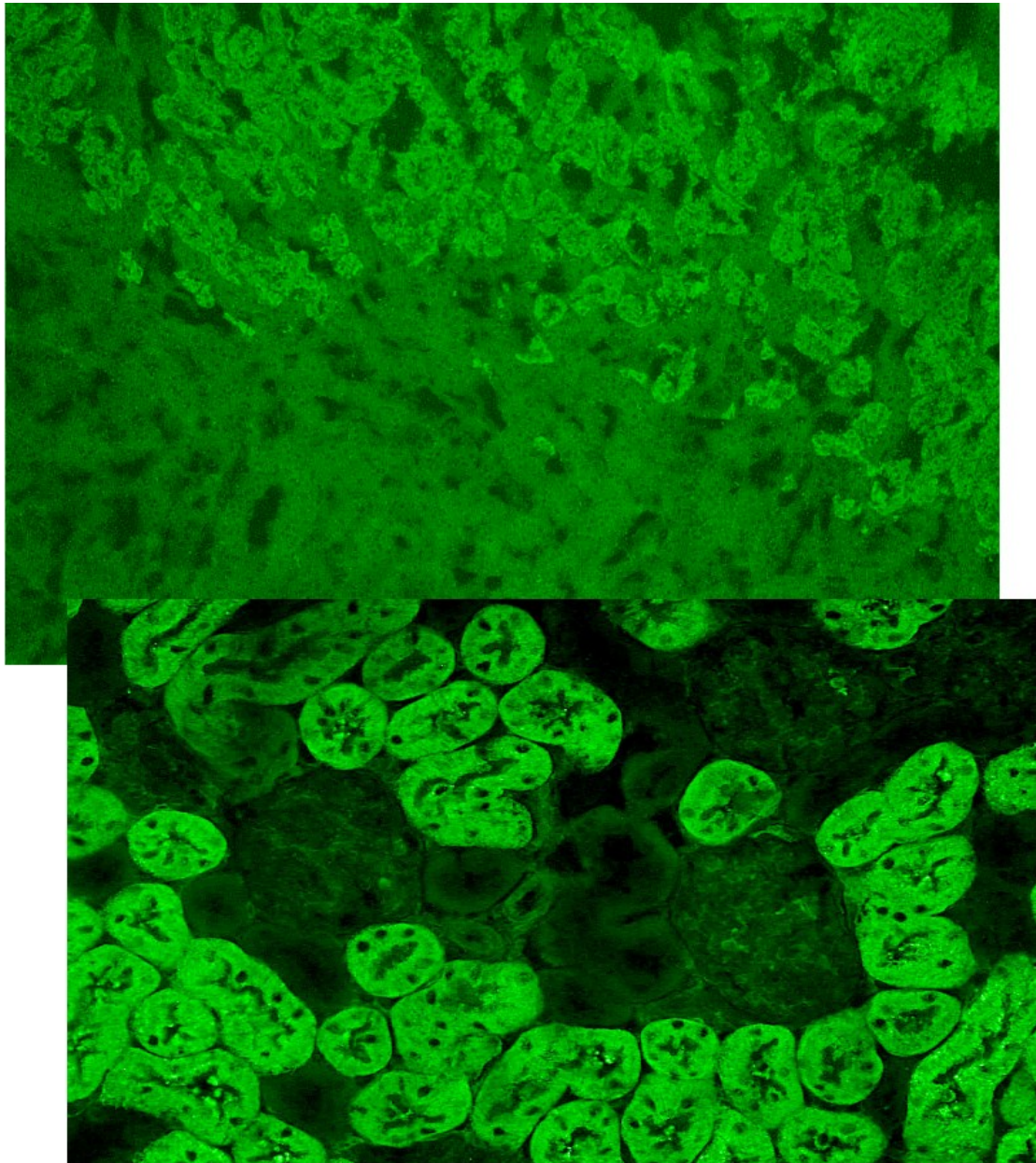
Τέλος, δεδομένα της ομάδας μας έχουν δείξει ότι σχεδόν όλοι (98%) οι ασθενείς με AH-1 και αντιδραστικότητα έναντι SLA έχουν αντιδραστικότητα και έναντι του Ro52, εν αντιθέσει με τους SLA (-) ασθενείς που εμφάνιζαν anti-Ro52 αντισώματα σε ποσοστό 25% (386).

#### ***5.1.δ Αντισώματα που ανιχνεύονται στην AH-2***

##### **Anti-LKM αντισώματα**

Τα αντισώματα αυτά περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1973 και ανιχνεύονται με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ήπαρ και νεφρό αρουραίου, δίνοντας ένα διάχυτο σήμα στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων (387), και αποκλειστική αντιδραστικότητα μόνο του P3 τμήματος των εγγύς νεφρικών σωληναρίων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση χαρακτηριστικής διαχωριστικής γραμμής (borderline) (Εικόνα 37)(388). Τα αντισώματα αυτά ανιχνεύονται κυρίως στην AH-2, ενώ σπανιότερα ανευρίσκονται στη χρόνια

ηπατίτιδα C, τη χρόνια ηπατίτιδα D και σε ορισμένες περιπτώσεις φαρμακευτικών ηπατιτίδων (237, 361, 389).



**Εικόνα 37.** Πρότυπο φθορισμού anti-LKM αντισωμάτων. Σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου παρατηρείται απουσία φθορισμού στα τοιχωματικά κύτταρα του στομάχου και χαρακτηριστική διαχωριστική γραμμή (borderline) στο νεφρό εξαιτίας της χρώσης μόνο των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων (237). Σε υπέρθεση, μεγεθυμένη λεπτομέρεια που δείχνει το σαφή περιορισμό του φθορισμού στο P3 τμήμα των εγγύς εσπειραμένων (ερανισθείσα από Deutsche Gesellschaft für Immunologie)

Τα anti-LKM διακρίνονται σε τρεις επιμέρους τύπους (237, 327). Τα anti-LKM-1 ανιχνεύονται στην πλειονότητα των περιπτώσεων της AH-2 (90-95%) καθώς και στο

2-10% των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C και έχουν ως αυτοαντιγόνο-στόχο το κυτόχρωμα P450 2D6 (KYT P4502D6) (237, 361, 390-393). Τα anti-LKM-2 ανιχνεύονται σε ορισμένες περιπτώσεις φαρμακευτικών ηπατιτίδων (ιδιαίτερα από τιενιλικό οξύ), με αυτοαντιγόνο-στόχο το KYT P4502C9 (340, 361). Τέλος, τα anti-LKM-3 έχουν ως αυτοαντιγόνο-στόχο την οικογένεια 1 των UDP-γλυκουρονικών μετασφαιρών (UGT-1), ανιχνεύονται στο υπόλοιπο 5-10% των ασθενών με AH-2 και στο 10-13% των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα D (394-398). Με τεχνικές ανοσοαποτύπωσης, χρησιμοποιώντας εκχύλισμα ηπατικών μικροσωμίων διαπιστώθηκε ότι τα anti-LKM-1 αντιστοιχούν σε μία πρωτεϊνική μπάντα 50kDa, τα anti-LKM-3 σε μία μπάντα 55kDa, ενώ μπορεί επίσης να ανιχνευθούν και μπάντες 64 και 80kDa (361).

Τα anti-LKM-1 που ανιχνεύονται στην AH-2, σε σύγκριση με εκείνα που ανιχνεύονται στους ασθενείς με HCV λοίμωξη, φαίνεται ότι αναγνωρίζουν διαφορετικούς επίτοπους. Στην AH-2 τα anti-LKM-1 αναγνωρίζουν μικρούς και κυρίως γραμμικούς επίτοπους του KYT P4502D6 (399), ενώ στην HCV λοίμωξη τα αντισώματα αυτά στρέφονται συχνότερα έναντι διαφορετικών επιτόπων του KYT P4502D6, τόσο γραμμικών όσο και τρισδιάστατων (390, 394, 400-403). Συγκεκριμένα στην AH-2, αναγνωρίζονται πέντε κύριοι γραμμικοί (B-κυτταρικής σειράς) επίτοποι του CYP2D6: 257-269 στο 85% των ατόμων, 321-351 στο 53%, 373-389 στο 7%, 410-429 στο 13% και 193-212 στο 93% των ατόμων με AH-2 (389, 404, 405).

Οι τίτλοι των anti-LKM-1 αντισωμάτων των ατόμων με AH-2 σε σχέση με εκείνους των anti-LKM-1 θετικών ασθενών με HCV λοίμωξη φαίνεται να είναι υψηλότεροι όταν για την ανίχνευσή τους χρησιμοποιείται ο έμμεσος ανοσοφθορισμός. Χρησιμοποιώντας όμως πιο ευαίσθητες ποσοτικές τεχνικές, όπως η ανοσοκαθίζηση

ανασυνδυασμένου KYT P4502D6 σημασμένου με  $^{35}\text{S}$ -μεθειονίνη, φαίνεται ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους τίτλους των αντισωμάτων αυτών μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών (406, 407).

Τα anti-LKM-1 είναι πολύ πιθανό να συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου, δεδομένου ότι στους ασθενείς με AH-2 υπάρχει έκφραση του KYT P4502D6 στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων και επομένως μπορεί δυνητικά να προκληθεί ενεργοποίηση ανοσολογικών μηχανισμών είτε μέσω ενεργοποίησης του συμπληρώματος, είτε μέσω της εξαρτώμενης από αντίσωμα κυτταροτοξικότητας (408-410). Επιπρόσθετα, η παρουσία anti-LKM-1 στους ασθενείς με ηπατίτιδα C, δε φαίνεται να σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου ή την ανταπόκριση στη θεραπεία με ιντερφερόνη. Επίσης, φαίνεται λογικό να υποθέσει κανείς ότι τα anti-LKM-1 αντισώματα εμφανίζονται νωρίς σχεδόν αμέσως με την έναρξη της ανοσολογικά ρυθμιζόμενης ηπατικής βλάβης, δεδομένου ότι έχει παρατηρηθεί ανάπτυξή τους σε περιπτώσεις απόρριψης ηπατικού μοσχεύματος (411).

#### Anti-LC1 αντισώματα

Τα anti-LC1 αντισώματα ανιχνεύονται με έμμεσο ανοσοφθορισμό, με διπλή ανοσοδιάχυση, με ανάστροφη ηλεκτροφόρηση και με ανοσοαποτύπωση, ενώ μετά την ταυτοποίηση του αυτοαντιγόνου-στόχου των anti-LC1 (412), έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι ELISA και ανοσοκαθίζησης (237). Με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού μπορεί να παρατηρηθεί φθορισμός των ηπατοκυττάρων που διακόπτεται γύρω από την κεντρική φλέβα, αλλά λόγω συνύπαρξής τους με την παρουσία των anti-LKM-1 αντισωμάτων στο 50% το πρότυπο αυτό δεν είναι εμφανές. Εκτός από την AH-2, τα anti-LC1 μπορεί να παρατηρηθούν και σε ορισμένους ασθενείς με ηπατίτιδα C, οι οποίοι είναι θετικοί για anti-LKM-1 αντισώματα, αλλά και σπάνια σε κάποιους ασθενείς με ηπατίτιδα C και απουσία anti-

LKM-1 αντισωμάτων (378, 413, 414). Η ύπαρξη των anti-LC1 στους ασθενείς με ΑΗ-2, φαίνεται να σχετίζεται με την ενεργότητα και τη βαρύτητα της νόσου υποδεικνύοντας τον πιθανό παθογενετικό ρόλο αυτών των αντισωμάτων (415).

### **5.1.ε Σύνδρομο αυτοάνοσης πολυενδοκρινοπάθειας 1 (ΣΑΠΕ-1)**

Το ΣΑΠΕ-1 είναι ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση ποικίλων αυτοάνοσων διαταραχών (416). Πιο αναλυτικά, χαρακτηρίζεται από τρία κύρια συστατικά στοιχεία: χρόνια καντιντίαση των βλεννογόνων και του δέρματος, υποπαραθυρεοειδισμό και νόσο Addison, με δύο εκ των τριών να απαιτούνται για τη διάγνωση. Σε μικρότερο ποσοστό παρατηρούνται αλωπεκία, ονυχοδυστροφία, λεύκη κ.α (Πίνακας 5) (342, 417).

**Πίνακας 5. Συχνότητα εμφάνισης των πλέον συχνών διαταραχών σε ΣΑΠΕ-1**

<b>Διαταραχή</b>	<b>Συχνότητα εμφάνισης (%)</b>
Ενδοκρινικές διαταραχές	
Υποπαραθυρεοειδισμός	79
Νόσος Addison	72
Ωοθηκική δυσλειτουργία	60
Σακχαρώδης διαβήτης	12
Υποθυρεοειδισμός	4
Μη-ενδοκρινικές διαταραχές	
Χρόνια καντιντίαση δέρματος-βλεννογόνων	100
Δυστροφία αδαμαντίνης οδόντων	77
Ονυχοδυστροφία	52
Κερατοπάθεια	35
Αλωπεκία	29
Σύνδρομο δυσαπορρόφησης	18
Λεύκη	13
Αναιμία	13
Αυτοάνοση ηπατίτιδα	12

Σε ποσοστό 10-15% το σύνδρομο συνοδεύεται και από προσβολή του ήπατος με τη μορφή της ΑΗ, που όπως προαναφέρθηκε χαρακτηρίζεται από την ανίχνευση anti-LM αντισωμάτων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η γενετική βάση του συνδρόμου έγκειται σε ετερογενείς μεταλλάξεις του γονιδίου *aire* στο χρωμόσωμα 21 (418). Το σύνδρομο αυτό αποτελεί μέχρι στιγμής τη μόνη γνωστή αυτοάνοση διαταραχή που έχει σαφή μονογονιδιακή συσχέτιση. Το γονίδιο *aire* κωδικογραφεί μία πρωτεΐνη που λειτουργεί ως πυρηνικός μεταγραφικός ενεργοποιητής, ενώ συγχρόνως επηρεάζει και την έκφραση των HLA II μορίων. Εκφράζεται κυρίως στο θύμο και τα περιφερικά λεμφικά όργανα και πιστεύεται ότι είναι σημαντικός παράγοντας για τη διαδικασία της επιλογής των ανοσοδραστικών κυττάρων στο θύμο (419).

#### Anti-LM αντισώματα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα anti-LM αντισώματα χαρακτηρίζουν την ειδική μορφή ΑΗ που εκδηλώνεται στα πλαίσια του ΣΑΠΕ-1 και θεωρούνται πολύ υψηλής ειδικότητας (340, 342). Δίνουν χαρακτηριστικό φθορισμό με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού μόνο σε τομές ήπατος (κυρίως στα περίξ των κεντρικών φλεβών ηπατοκύτταρα, σε αντίθεση με το ομοιόμορφο πρότυπο ανοσοφθορισμού των ηπατοκυττάρων των anti-LKM αντισωμάτων) ενώ δε δίνουν καθόλου φθορισμό σε τομές νεφρού (επίσης σε αντίθεση με τα anti-LKM) (420-422). Το αυτοαντιγόνο-στόχος των anti-LM είναι το KYT P4501A2 (420-422), ωστόσο έχουν ανιχνευτεί και αντισώματα έναντι του KYTP 4501A1, του KYT P4502B6 και του KYT P4502A6 (423), αλλά η παρουσία των αυτοαντισωμάτων αυτών δε φαίνεται να σχετίζεται με κλινικές εκδηλώσεις ΑΗ στο ΣΑΠΕ-1 (422). Παρόμοια anti-LM αντισώματα (με αυτοαντιγόνο-στόχο το KYT P4501A2) έχουν παρατηρηθεί εκτός του ΣΑΠΕ-1 και στη φαρμακευτική ηπατίτιδα που επάγεται από διυδραλαζίνη (424).

### **5.1.στ Γενετικές συσχετίσεις της ΑΗ**

Όπως σε όλες τις αυτοάνοσες νόσους, οι περισσότερες μελέτες γενετικής προδιάθεσης έχουν γίνει στα γονίδια του MHC. Δύο είναι οι κύριοι συσχετισμοί που έχουν βρεθεί: ο απλότυπος HLA A1-B8-DR3 που παρατηρείται κυρίως σε νεαρότερους ασθενείς, με μεγαλύτερη συχνότητα υποτροπής μετά τη θεραπεία, και ο απλότυπος HLA-DR4 που σχετίζεται με μεγαλύτερη ηλικία και φαινομενικά ηπιότερη νόσο (425). Επίσης, έχουν βρεθεί ασθενέστερες συσχετίσεις με τα αλληλόμορφα γονίδια DRB4\*0103, DRB4\*0301 (πτωχή ανταπόκριση στα κορτικοστεροειδή) και DRB4\*0401 (ηπιότερη νόσος) (426). Σε μοριακό επίπεδο βρέθηκε ότι σημαντικό ρόλο παίζει και η εξαμερής αλληλουχία αμινοξέων LLEQKR στη θέση 67-72 του γονιδίου της HLA-DRB1 πολυπεπτιδικής αλυσίδας του HLA-DR μορίου και κυρίως η τοποθέτηση λυσίνης (K) ή αργινίνης (R) στη θέση 71 της αλληλουχίας LLEQ-R, που θεωρείται κρίσιμης σημασίας γιατί αυτή η περιοχή συνδέεται με την α-έλικα της αντιγονοδεσμευτικής περιοχής (427).

Οι παραπάνω μελέτες αναφέρονται κατά κύριο λόγο σε Καυκάσιους πληθυσμούς. Αντίθετα, στην Ιαπωνία ο απλότυπος HLA A1-B8-DR3 είναι πολύ σπάνιος και υπάρχει αυξημένη συχνότητα απλότυπου Bw54 (428, 429), ενώ σε περιοχές όπως η Βραζιλία και η Αργεντινή υπάρχει ισχυρή συσχέτιση σε παιδιατρικούς ασθενείς με τα αλληλόμορφα γονίδια HLA-DRB1\*1301-DQB1\*0603 και στο Μεξικό υπάρχει συσχέτιση με HLA-DRB1\*0404 (430, 431). Σε μοριακό επίπεδο, σε Ιάπωνες ασθενείς έχει ενοχοποιηθεί η ύπαρξη ιστιδίνης στη θέση 13 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας DRβ (432).

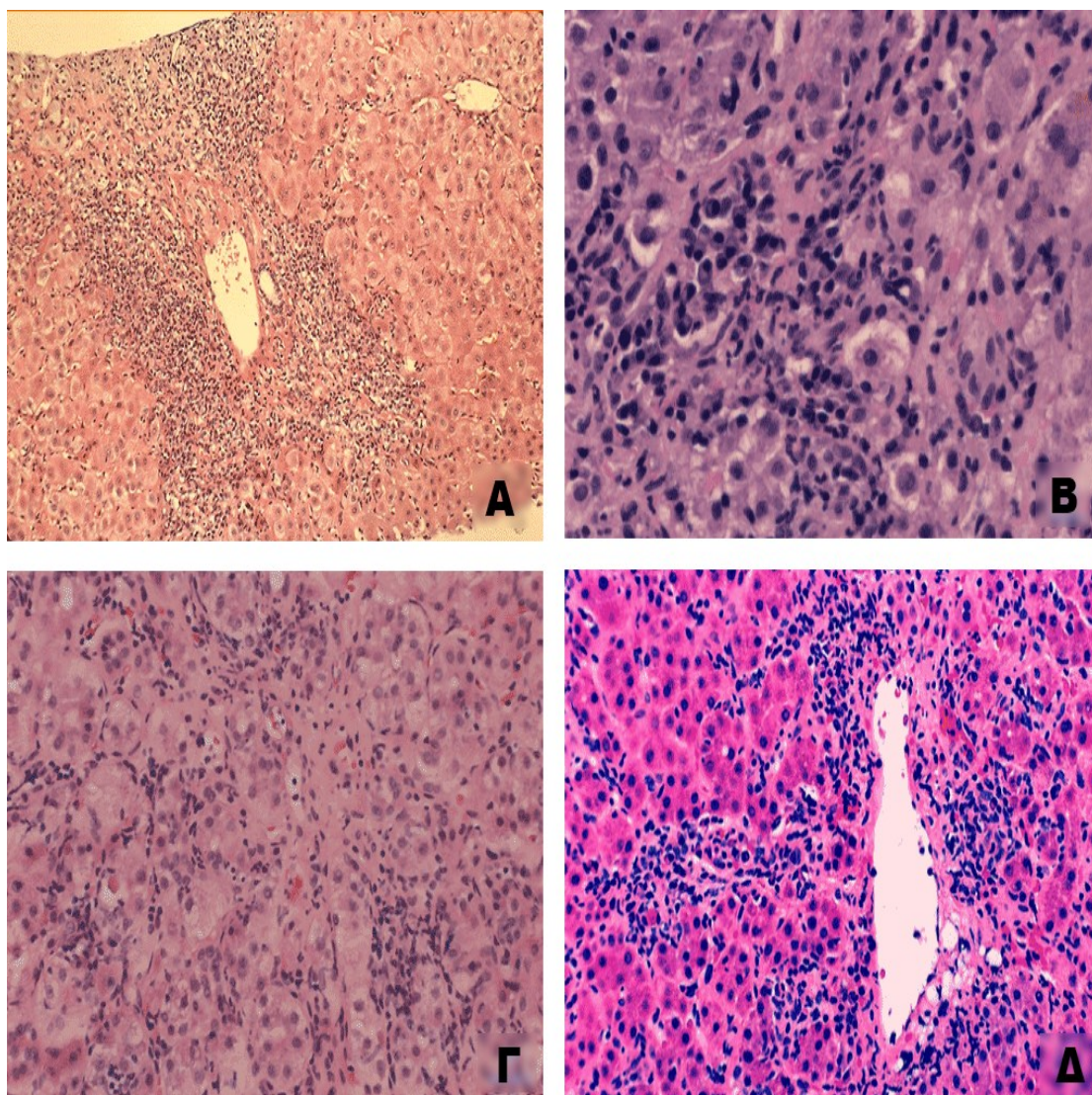
Η ΑΗ-2 φαίνεται να συσχετίζεται γενετικά με το αλληλόμορφο γονίδιο DRB1\*0701 (433), ενώ επίσης έχουν ενοχοποιηθεί και οι απλότυποι B14, DR3, C4A-QO (434).

Η οικογενής προδιάθεση για ΑΗ δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά και υπάρχουν μόνο μερικές αναφορές εμφάνισης ΑΗ και σε άλλο μέρος της οικογένειας (435, 436). Πάντως είναι πολύ συχνή η παρατήρηση κάποιας αυτοάνοσης διαταραχής σε συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με ΑΗ, κάτι που έχει συμπεριληφθεί το 1993 και στα τροποποιημένα κριτήρια για τη διάγνωση της νόσου (329).

### **5.1.ζ Παθολογοανατομικά ευρήματα ΑΗ**

Αν και δεν υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο ιστοπαθολογικό εύρημα που να είναι παθογνωμονικό για την ΑΗ, τα ευρήματα της βιοψίας είναι χαρακτηριστικά και συμπεριλαμβάνονται στο τροποποιημένο σύστημα βαθμολόγησης για τη διάγνωση της νόσου το 1993, αλλά και στα πρόσφατα απλοποιημένα κριτήρια του 2008 (329, 437, 438). Οι δύο τύποι της νόσου (ΑΗ-1 και ΑΗ-2) έχουν παρόμοια παθολογοανατομικά ευρήματα (Εικόνα 38). Η ιστολογική εξέταση αποκαλύπτει: - φλεγμονώδεις διηθήσεις στα πυλαία διαστήματα, κυρίως από CD4+ T-κύτταρα, αλλά και πλασματοκύτταρα και ενίοτε ηωσινόφιλα, -περιπυλαία ή διαφραγματική ηπατίτιδα, -γεφυροποιές νεκρώσεις μεταξύ πυλαίων διαστημάτων, -λοβιακή φλεγμονή ποικίλης έντασης κυρίως στη ζώνη 1, συχνά με σχηματισμό ψευδοαδενίων χωρίς εμφανή αυλό, -παρουσία πολυπύρηνων ηπατοκυττάρων (γιγαντοκυτταρική ηπατίτιδα), και σπάνια -χολόσταση στις ζώνες 2 και 3 (437-442).





**Εικόνα 38. Α) Περιπυλαία φλεγμονώδης διήθηση από μονοπύρρηνα που εκτείνεται εντός του ηπατικού λοβίου. Β) Διήθηση από πλασματοκύτταρα που χαρακτηρίζονται από διανυγή περιπυρηνική άλω. Γ) Λοβιακή ηπατίτιδα με σχηματισμό ροζετών ηπατοκυττάρων και αρχόμενων αναγεννητικών όζων και Δ) κεντρολοβιακή νέκρωση.**

### **5.1.η Παθογένεια της ΑΗ**

Σύμφωνα με ανοσοϊστοχημικές μελέτες, οι ασθενείς με ΑΗ χαρακτηρίζονται από συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων στο ήπαρ, κυρίως CD4<sup>+</sup> Τα/β κυττάρων και κατά δεύτερο λόγο CD8<sup>+</sup> Τ κυττάρων, NK-κυττάρων, μακροφάγων και Β-λεμφοκυττάρων (443). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων των ατόμων με ΑΗ υπάρχει έκφραση MHC II μορίων, εν αντιθέσει με υγιή άτομα (444), δείχνει ότι πιθανότατα στην παθογένεια της νόσου

συμμετέχει αντιγονοπαρουσίαση που οδηγεί σε τοπική ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος, με επακόλουθη φλεγμονή και νέκρωση (389, 445, 446).

Τουλάχιστον δύο αντιγόνα έχουν βρεθεί ότι μπορούν να εκφραστούν στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων των ασθενών με ΑΗ: το KYTP450 2D6, που αποτελεί το βασικό αυτοαντιγόνο των anti-LKM-1 αντισωμάτων, και ο ASGP-R, που αποτελεί συστατικό ενός μακρομοριακού συμπλέγματος με κυριότερη εντόπιση στα περιτυλαία ηπατοκύτταρα. Η αναγνώριση των αντιγόνων αυτών από το ανοσολογικό σύστημα πιθανότατα ευθύνεται για την ηπατοκυτταρική βλάβη και την παραγωγή των αντίστοιχων αυτοαντισωμάτων (446).

Συμμετοχή στην παθογένεια της νόσου φαίνεται να έχουν και κυτταροκίνες, όπως η IL-4 που φαίνεται να βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα στους ασθενείς με ΑΗ σε σχέση με υγιή άτομα, και η επαγόμενη από ιντερφερόνη πρωτεΐνη 10 που επίσης είναι αυξημένη σε ασθενείς με ΑΗ (447). Αντίστοιχα, πολυμορφισμοί του γονιδίου του TNF-α έχουν ενοχοποιηθεί για αυξημένα επίπεδα του TNF-α στο αίμα και έχουν συσχετιστεί με τη βαρύτητα της νόσου και την πτωχή ανταπόκριση στην θεραπεία με κορτικοστεροειδή στους παιδιατρικούς ασθενείς (448, 449). Ωστόσο, σύμφωνα με νεότερα δεδομένα οι πολυμορφισμοί του TNF-α δεν έχουν άμεση επίδραση στην παθογένεια της νόσου αλλά σχετίζονται μέσω ανισορροπίας σύνδεσης (linkage disequilibrium) με τον απλότυπο HLA A1-B8-DR3 (450).

Άλλος μηχανισμός που έχει προταθεί για τη ρήξη της ανοχής και την εμφάνιση της νόσου ενοχοποιεί πολυμορφισμό του γονιδίου του CTLA-4, που ασκεί μειωμένη ανασταλτική δράση στην ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων. Ωστόσο, δε θεωρείται ειδικός της νόσου, καθώς έχει βρεθεί και σε ασθενείς με ΠΧΚ (451).

Η κλινική εμφάνιση της ΑΗ έχει γενικά συσχετισθεί με διάφορες ιογενείς λοιμώξεις, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις ο μηχανισμός με τον οποίον αυτές μπορούν να

επάγουν ΑΗ είναι άγνωστος. Υπάρχουν αναφορές εμφάνισης της ΑΗ μετά από οξεία ιογενή Α ή Β ηπατίτιδα (452, 453), ενώ λοίμωξη με HCV έχει, επίσης, ενοχοποιηθεί για την επαγωγή ΑΗ. Ως υπεύθυνος παθογενετικός μηχανισμός πιθανολογείται αυτός της μοριακής μίμησης. Οι Manns και συν. διαπίστωσαν ότι η αντιδραστικότητα έναντι του κύριου επίτοπου του KYT P4502D6 μπορεί να είναι αποτέλεσμα διασταυρούμενης αντίδρασης μετά από λοίμωξη από τον HCV ή τον ιό του απλού έρπητα (HSV), καθώς διαπιστώθηκε ότι οι αα 310-324 της Ε1 περιοχής του HCV και η αα 156-170 της IE175 περιοχής του HSV, παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με την περιοχή 254-271 του KYT P4502D6 (399). Πέραν της ύπαρξης της ομολογίας αυτής, έχει βρεθεί ότι τα αντισώματα που παράγονται έναντι ομόλογων περιοχών του HCV και του CMV μπορούν να αναγνωρίζουν τον επίτοπο 204-209 του KYT P4502D6 (405). Το γεγονός ότι τα anti-LKM-1 αντισώματα μπορούν να αναγνωρίζουν ομόλογες περιοχές των KYT P4502D6, HCV, HSV και CMV, έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι η πολλαπλή έκθεση ενός ατόμου σε κοινά παθογόνα, όπως οι CMV και HSV, μπορεί να οδηγήσει στην επαγωγή αυτοάνοσης αντίδρασης (445).

### **5.1.θ Διάγνωση ΑΗ**

Η διάγνωση της ΑΗ απαιτεί στην ουσία τον αποκλεισμό άλλων αιτίων που μπορεί να προκαλούν οξείες ή χρόνιες ηπατικές βλάβες, όπως: -ιογενή αίτια (ιοί της ηπατίτιδας Α, Β και C, αλλά και άλλοι ηπατοτρόποι ιοί, όπως CMV, EBV, HSV), -χρήση ηπατοτοξικών φαρμάκων, -ΠΧΚ, -πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ), -νόσος Wilson, -αιμοχρωμάτωση, -ανεπάρκεια α1-αντιθρυψίνης, κ.α. Τη διάγνωση βοηθούν τα στοιχεία από τη βιοψία ήπατος και από αξιόπιστο ανοσολογικό έλεγχο (332).

Για την ακριβέστερη διάγνωση της νόσου, η Διεθνής Ομάδα Μελέτης της ΑΗ θέσπισε το 1993 και τροποποίησε κατάλληλα το 1999 ένα διαγνωστικό σκορ που αξιολογεί ένα σύνολο κλινικών, δημογραφικών, ιστολογικών και εργαστηριακών παραμέτρων (329, 454) (Πίνακας 6).

**Πίνακας 6. Τροποποιημένο σύστημα βαθμολόγησης για τη διάγνωση της ΑΗ**

<b>Παράμετροι/ Χαρακτηριστικά</b>	<b>Βαθμοί</b>
Θήλυ φύλο	+2
Λόγος ALP:AST (ή ALT)	
<1.5	+2
1.5-3.0	0
>3.0	-2
Λόγος σφαιρινών ορού ή IgG προς τις φυσιολογικές τιμές	
>2.0	+3
1.5-2.0	+2
1.0-1.5	+1
<1.0	0
ANA, SMA ή LKM-1	
>1:80	+3
1:80	+2
1:40	+1
<1:40	0
Θετικά AMA	-4
Δείκτες ιογενών ηπατιτίδων:	
Θετικοί	-3
Αρνητικοί	+3
Χρήση ηπατοτοξικών φαρμάκων	
Θετική	-4
Αρνητική	+1
Μέση κατανάλωση οινοπνεύματος	
<25g/ημέρα	+2
>60g/ημέρα	-2
Βιοψία ήπατος	
Περιπυλαία ηπατίτιδα	+3
Προεξάρχουσα λεμφοκυτταρική/πλασματοκυτταρική διήθηση	+1
Σχηματισμός ροζετών	+1
Τίποτε από τα παραπάνω	-5
Βλάβες χοληφόρων	-3
Άλλες βλάβες	-3
Άλλες αυτοάνοσοι νόσοι	+2
Άλλες παράμετροι	
Οροθετικότητα για άλλα αυτοαντισώματα	+2
HLA DR3 ή DR4	+1
Ανταπόκριση στην αγωγή:	
Πλήρης	+2
Υποτροπή	+3

Με βάση αυτό το σκορ, ένα άθροισμα μεγαλύτερο του 15 προ θεραπείας ή του 17 μετά από θεραπεία, καθιστά σίγουρη τη διάγνωση της ΑΗ, ενώ σε άθροισμα 10-15 προ θεραπείας και 12-17 μετά από τη θεραπεία η διάγνωση είναι πολύ πιθανή(329). Επειδή το σύστημα αυτό βαθμολόγησης είχε ορισμένα μειονεκτήματα, με κυριότερη την πολυπλοκότητά του που το καθιστούσε κατάλληλο εργαλείο για την επιστημονική έρευνα, αλλά όχι για την κλινική πράξη, πρόσφατα προτάθηκε από τη Διεθνή Ομάδα Μελέτης της ΑΗ ένα απλοποιημένο σύστημα κριτηρίων για τη διάγνωση της ΑΗ (Πίνακας 7) (438).

**Πίνακας 7. Απλοποιημένα διαγνωστικά κριτήρια ΑΗ**

Παράμετρος	Διαχωριστικό όριο	Βαθμοί
ANA ή SMA	$\geq 1:40$	1
ANA ή SMA ή LKM	$\geq 1:80$	2*
ή SLA	$\geq 1:40$	
IgG	Θετικά	1
	Άνω του φυσιολογικού	2
	>1.1 φορές το ανώτερο φυσιολογικό όριο	
Βιοψία ήπατος (απαραίτητη η ύπαρξη ηπατίτιδας)	Συμβατή με ΑΗ	1
	Τυπική για ΑΗ	2
Απουσία ιογενούς ηπατίτιδας	Ναι	2

\*: Ανώτερο σκορ 2, ανεξάρτητα αν υπάρχουν περισσότερα του ενός αυτοαντισώματα

Με βάση τα απλοποιημένα διαγνωστικά κριτήρια της ΑΗ, συγκέντρωση  $\geq 6$  βαθμών καθιστά τη διάγνωση της ΑΗ πιθανή, ενώ συγκέντρωση  $\geq 7$  βαθμών καθιστά τη διάγνωση βέβαιη.

Πέραν της όποιας κριτικής (455-457), και τα δύο διαγνωστικά συστήματα επιτυγχάνουν πολύ καλή ευαισθησία και ειδικότητα, σύμφωνα με πρόσφατα κλινικά δεδομένα (458-461), και θα μπορούσαν να συνεισφέρουν συμπληρωματικά (460), αν και τα δύο δεν μπορούν να βοηθήσουν στις περιπτώσεις ΑΗ με συνοδό άλλο νόσημα του ήπατος (460, 461).

### **5.1.1 Φυσική ιστορία και πρόγνωση της ΑΗ**

Η φυσική εξέλιξη και πρόγνωση της ΑΗ επηρεάζεται από τη φλεγμονώδη δραστηριότητα και την παρουσία ή ανάπτυξη κίρρωσης τη στιγμή της διάγνωσης. Άτομα που έχουν 5-10πλάσιες τιμές αμινοτρανσφερασών και διπλάσιες τιμές γ-σφαιρίνης έχουν θνητότητα μεγαλύτερη από 90% στη δεκαετία, χωρίς θεραπεία (332). Αντίστοιχα, η θνητότητα σε κίρρωτικούς ασθενείς αυτοάνοσης αιτιολογίας χωρίς θεραπεία ανέρχεται στο 58% στην πενταετία (462).

Η πιθανότητα που έχει ένας ασθενής με ΑΗ να εμφανίσει κίρρωση σε χρονικό διάστημα πέντε ετών εξαρτάται από την ιστολογική εικόνα κατά την πρώτη βιοψία ήπατος και κυμαίνεται από 17% όταν στη βιοψία υπάρχει εικόνα περιπυλαιάς ηπατίτιδας έως 92% όταν υπάρχουν γεφυροποιές νεκρώσεις ή ενδολοβιακή νέκρωση (462).

Σημαντικό ρόλο στην πρόγνωση της νόσου έχει η παρουσία διάφορων αντισωμάτων, όπως anti-SLA/LP, α-ακτινίνης, LKM-1 ή LC1, καθώς και η γενετική προδιάθεση. Πράγματι, οι απλότυποι HLA-DR3 και HLA-B8 έχουν συσχετιστεί με μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπών μετά από θεραπεία και συχνότερη ανάγκη για μεταμόσχευση. Αντίθετα, ο απλότυπος HLA-DR4 σχετίζεται με προχωρημένη ηλικία έναρξης και ηπιότερης μορφής νόσο (425).

### **5.1.1α Θεραπεία ΑΗ**

Οι περισσότεροι ασθενείς με ΑΗ ανταποκρίνονται ικανοποιητικά στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή (332, 463). Τα επικρατούντα σχήματα περιλαμβάνουν θεραπεία με 40-60mg πρεδνιζολόνης ημερησίως, βαθμιαία μειούμενα κατά 5-10mg κάθε 7-10 ημέρες, ώστε να καταλήξουν σε μία δόση συντήρησης 5-15mg για τουλάχιστον δύο έτη. Εναλλακτικά μπορεί να χορηγηθεί συνδυασμένο σχήμα πρεδνιζολόνης και

αζαθειοπρίνης σε δόση 1-2mg/Kg σωματικού βάρους, με σκοπό τη μείωση των απαιτούμενων δόσεων κορτικοστεροειδών και επομένως των επιπλοκών που σχετίζονται με τη μακροχρόνια χρήση τους. Το συγκεκριμένο σχήμα ενέχει έναν αρκετά μικρό σχετικό κίνδυνο καρκινογένεσης, αλλά και κίνδυνο μυελοτοξικότητας, για τον οποίο απαιτείται συνεχής παρακολούθηση (463).

Τα θεραπευτικά σχήματα επιτυγχάνουν βιοχημική ύφεση στους πρώτους 4-12 μήνες, ενώ ιστολογική ανταπόκριση στους 12-24 μήνες εμφανίζει το 80-90% των ασθενών, με τη δεκαετή επιβίωση να ανέρχεται στο 90%. Τον πρώτο χρόνο μετά τη διακοπή της θεραπευτικής αγωγής, το 50-75% των ασθενών εμφανίζει υποτροπή, υποδηλώνοντας πιθανώς την ανάγκη χορήγησης ανοσοκαταστολής για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (3-5 έτη) (464). Κλινικά δεδομένα υποστηρίζουν τη μακροχρόνια χορήγηση ανοσοκαταστολής, καθώς ασθενείς που έλαβαν ανοσοκαταστολή για τέσσερα έτη είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα παρατεταμένης ύφεσης συγκρινόμενοι με ασθενείς που έλαβαν αγωγή για ένα έτος, ενώ έχουν περιγραφεί περιπτώσεις ασθενών στις οποίες η μακροχρόνια λήψη ανοσοκατασταλτικών οδήγησε σε υποστροφή των κίρρωτικών αλλοιώσεων (464-466).

Διάφορα άλλα θεραπευτικά σχήματα, όπως χορήγηση tacrolimus, κυκλοσπορίνης Α, κυκλοφωσφαμίδης, βουδεσονίδης κ.α. έχουν θέση επί αποτυχίας ή έντονης δυσανεξίας στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή ή αζαθειοπρίνη (463, 467). Ιδιαίτερα, πρόσφατα ενθαρρυντικά αποτελέσματα εμφάνιζαν αναδρομικές σειρές ασθενών που χρησιμοποίησαν ως θεραπεία διάσωσης ή λόγω παρενεργειών στην αζαθειοπρίνη (θεραπεία δεύτερης επιλογής) το MMF (Mycophenolate Mofetil) που είναι ένα πρόδρομο μόριο του μυκοφαινολικού οξέος (468-471). Αντίθετα, σε άλλες αναδρομικές μελέτες η χορήγηση MMF συνοδεύτηκε από χαμηλά ποσοστά ανταπόκρισης (472).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρώτη προοπτική μελέτη του MMF ως πρώτη θεραπεία, και η μεγαλύτερη σε αριθμό δείγματος δημοσιεύτηκε από το κέντρο μας το 2011 και έδειξε ότι το MMF, σε συνδυασμό με πρεδνιζολόνη, μπορεί να αποτελέσει ασφαλή και αποτελεσματική θεραπεία πρώτης εκλογής για ασθενείς με ΑΗ, καθώς επιτυγχάνει βιοχημική ανταπόκριση στο 88% των ασθενών (473). Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι στην πλειοψηφία των ασθενών (70%) η ανταπόκριση επιτυγχάνεται ταχέως, εντός τριμήνου από την έναρξη της αγωγής, γεγονός που συνδυάζεται με βελτιωμένη πρόγνωση (474). Ακόμη ο συνδυασμός MMF και πρεδνιζολόνης επέτρεψε τη γρήγορη διακοπή του κορτικοστεροειδούς (διάμεσος χρόνος διακοπής: 8 μήνες), ενώ μόνο το 3.4% των ασθενών χρειάστηκε να διακόψουν την αγωγή με MMF λόγω παρενεργειών, ποσοστό που είναι χαμηλότερο από τα αναφερόμενα για την αγωγή με αζαθειοπρίνη (475).

Οι ασθενείς τελικού σταδίου πρέπει να υποβάλλονται σε μεταμόσχευση ήπατος. Οι ασθενείς με ΑΗ αποτελούν το 2.6% του συνόλου των μεταμοσχευθέντων ασθενών στις ΗΠΑ και το 5.9% στην Ευρώπη (476). Το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης κυμαίνεται στο 90% (477), το ποσοστό των υποτροπών, όμως, κυμαίνεται μεταξύ 10-35% στις περισσότερες σειρές (478, 479), ενώ σε μία πολυκεντρική μελέτη στην Ισπανία, το 68% των μεταμοσχευμένων ασθενών με ΑΗ παρουσίασε υποτροπή κατά τη διάρκεια 5ετούς παρακολούθησης (477). Τέλος, δεν είναι σπάνια η de novo επανεμφάνιση ΑΗ στο μόσχευμα, που παρατηρείται στο 10-30% των περιπτώσεων σύμφωνα με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία (479-481).



## 5.2. Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ)

Η ΠΣΧ είναι μία χρόνια χολοστατική νόσος αγνώστου αιτιολογίας που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή, ίνωση και τελικά στένωση του αυλού και καταστροφή του ενδοηπατικού και του εξωηπατικού χοληφόρου δένδρου, με έκταση της βλάβης που μπορεί να ποικίλλει σημαντικά (482). Η ΠΣΧ προσβάλλει πιο συχνά τους άνδρες με αναλογία ανδρών:γυναικών μεταξύ 2:1 και 5:1 στις διάφορες μελέτες (483), ενώ στην πλειονότητα των περιπτώσεων εκδηλώνεται στην τρίτη με τέταρτη δεκαετία της ζωής (324, 484). Τελευταία, η νόσος αναγνωρίζεται συχνότερα ως μία βασική αιτία χρόνιας ηπατικής νόσου στα παιδιά (485, 486).

Η ΠΣΧ χαρακτηρίζεται από μία σαφή συσχέτιση με φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου και οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει υπολογίζουν έμμεσα την επίπτωση και τον επιπολασμό της νόσου με βάση τα διαθέσιμα επιδημιολογικά δεδομένα για τις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου.

Χρησιμοποιώντας άμεσα επιδημιολογικά δεδομένα για το διάστημα 1986-1995 οι Boberg και συν. υπολόγισαν ότι στη Νορβηγία η μέση ετήσια επίπτωση ήταν 1,3 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού και ο επιπολασμός της νόσου ανέρχεται σε 8,5 ασθενείς ανά 100.000 πληθυσμού (323). Στην πρώτη μεγάλη επιδημιολογική μελέτη για την ΠΣΧ στις ΗΠΑ η επίπτωση και ο επιπολασμός της νόσου ανήλθαν σε 0,9 και 13,6 περιπτώσεις ανά 100.000 ασθενών, αντίστοιχα (487). Σχεδόν ταυτόσημα συμπεράσματα προέκυψαν από μία επιδημιολογική μελέτη που αφορούσε τη νότια Ουαλία της Μεγάλης Βρετανίας, στην οποία βρέθηκε επίπτωση της νόσου ίση με 0,91 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού και επιπολασμός 12,7 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού (488). Για τη χώρα μας δεν υπάρχουν επαρκή επιδημιολογικά δεδομένα, στοιχεία όμως από την Ισπανία καταδεικνύουν σημαντικές γεωγραφικές διακυμάνσεις μεταξύ βόρειας και νότιας Ευρώπης με την επίπτωση και τον

επιπολασμό να ανέρχονται σε 0,07 και 0,22 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους (489).

### **5.2.α Κλινική εικόνα της ΠΣΧ**

Η ΠΣΧ διατρέχει για μεγάλο χρονικό διάστημα ασυμπτωματικά. Το 15 έως 40% των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί κατά τη στιγμή της διάγνωσης (490). Μία πρόσφατη μελέτη ανέδειξε ότι έως και το 55% των ασθενών παρουσιάζεται με ασυμπτωματική αύξηση των ηπατικών ενζύμων (491).

Τα πρώτα συμπτώματα που μπορούν να παρατηρηθούν δεν είναι διαγνωστικά και θεωρούνται ήπια και μη ειδικά, όπως αίσθημα αδυναμίας και κόπωση, ήπιος κνησμός και ήπιος άλγος στο δεξιό υποχόνδριο, ενώ κλινικά εμφανής ίκτερος δεν υπάρχει. Σε πρόσφατη έρευνα τα πλέον συχνά συμπτώματα που οδήγησαν τους ασθενείς με ΠΣΧ στο γιατρό ήταν κοιλιακό άλγος (20%), κνησμός (10%), διάρροιες (8%), ίκτερος (6%), κόπωση (6%), και πυρετός (4%) (491). Σε προχωρημένα στάδια της νόσου τα συμπτώματα είναι σημαντικά με ευρήματα πυλαίας υπέρτασης ως αποτέλεσμα της χολικής κίρρωσης (492).

Υπάρχει μία έντονη συσχέτιση μεταξύ της ΠΣΧ και των ιδιοπαθών φλεγμονωδών παθήσεων του εντέρου, καθώς ανευρίσκονται σε ποσοστό μέχρι και 90% των ασθενών με ΠΣΧ (493). Περίπου στα 2/3 των ασθενών με ΠΣΧ συνυπάρχει και ελκώδης κολίτιδα, αλλά έχει βρεθεί επίσης και συσχέτιση με τη νόσο Crohn σε 2 έως 13% των περιπτώσεων (493). Ενδιαφέρον είναι ότι οι ασθενείς με νόσο Crohn και ΠΣΧ χαρακτηρίζονται στο σύνολο τους από τελική ειλεΐτιδα και νόσο που δεν προσβάλλει το ορθό (494). Η σχέση μεταξύ ιδιοπαθών φλεγμονωδών νόσων του εντέρου και ΠΣΧ δεν είναι αμφίδρομη, καθώς μόνο ένα μικρό ποσοστό (1-4%) των πασχόντων από ελκώδη κολίτιδα αναπτύσσει κλινικά σημαντική ΠΣΧ (493). Τα

δεδομένα αυτά ισχύουν γενικά για την Ευρώπη, αλλά φαίνεται να είναι διαφορετικά σε χώρες όπως η Ιταλία και η Ιαπωνία, όπου η συνύπαρξη ΠΣΧ και φλεγμονωδών νόσων του εντέρου παρατηρείται στο 50% και 20% των ασθενών, αντίστοιχα (495, 496).

Σε μικρότερο βαθμό η ΠΣΧ μπορεί να συνδυαστεί και με άλλες αυτοάνοσες διαταραχές, όπως η ψωρίαση, το σύνδρομο sicca, η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1, η προσβολή των αρθρώσεων, η ιστιοκυττάρωση X, η οπισθοπεριτοναϊκή ίνωση, αλλά και κακοήθειες όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου (324, 497).

Η κλινική εικόνα της ΠΣΧ μπορεί συχνά να επιπλέκεται από καταστάσεις που είτε χαρακτηρίζουν εν γένει τα χρόνια χολοστατικά νοσήματα είτε είναι πιο ειδικές για τη νόσο (498). Η σοβαρή οστεοπενία στην ΠΣΧ είναι λιγότερο συχνή από ότι στην ΠΧΚ, παρά ταύτα είναι συχνότερη από άλλα χολοστατικά νοσήματα (499). Συγκεκριμένα μεταξύ των ασθενών με ΠΣΧ αυξημένο κίνδυνο για σοβαρή οστεοπόρωση είχαν ασθενείς με συνυπάρχουσα μακροχρόνια φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και με προχωρημένη ηπατική νόσο (499). Αντίθετα, η σχέση μεταξύ της βαρύτητας της ηπατικής νόσου και της συνυπάρχουσας οστεοπόρωσης δεν επιβεβαιώθηκε σε επακόλουθη μελέτη (500). Η πτωχή συσχέτιση μεταξύ άλλων παραμέτρων και της βαρύτητας της οστεοπόρωσης καθιστά σημαντική την επανειλημμένη μέτρηση της οστικής πυκνότητας σε ασθενείς με ΠΣΧ, ιδίως σε ασθενείς με βαριά νόσο που είναι πιθανό να υποβληθούν σε μεταμόσχευση. Η εκσεσημασμένη μείωση της οστικής πυκνότητας που παρατηρείται πρώιμα μετά τη μεταμόσχευση, οδηγεί σε πρόκληση κατάγματος στο 1/3 των ασθενών με χαμηλές τιμές οστικής πυκνότητας πριν τη μεταμόσχευση (499).

Συχνή επιπλοκή που παρατηρείται στο 26% των ασθενών με ΠΣΧ είναι η ύπαρξη χολολιθίασης, η οποία είναι ασυμπτωματική στην πλειονότητα των περιπτώσεων (501). Ακόμη, θα πρέπει να ελέγχεται η χοληδόχος κύστη για την ύπαρξη πολυπόδων, οι οποίοι εξαιτίας της πιθανότητας κακοήθους εξαλλαγής, αποτελούν ένδειξη χολοκυστεκτομής (502).

Ένα συχνό εύρημα που παρατηρείται στο 45-85% των ασθενών με ΠΣΧ κατά τη φυσική ιστορία της νόσου, είναι η ανάπτυξη μιας επικρατούσας στένωσης των χοληφόρων, που ορίζεται ως στενωτική περιοχή του κοινού ηπατικού πόρου με διάμετρο μικρότερη από 1.5 mm ή του δεξιού ή αριστερού ηπατικού πόρου με διάμετρο μικρότερη από 1 mm (503), που προκαλεί σημαντική χολόσταση και απαιτεί ενδοσκοπική παρέμβαση για την αποκατάστασή της (504). Οι ασθενείς με επικρατούσες στενώσεις εμφανίζουν αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης μιας άλλης επιπλοκής, της βακτηριακής χολαγγειίτιδας, είτε αυτόματα, είτε μετά από τη διενέργεια της ενδοσκοπικής επέμβασης (505, 506). Τα κυριότερα υπεύθυνα παθογόνα για την ανάπτυξη βακτηριακής χολαγγειίτιδας σε ασθενείς με ΠΣΧ είναι η *Escherichia coli*, η *Klebsiella* και ο *Enterococcus faecalis* (507).

Από τις σημαντικότερες επιπλοκές της νόσου είναι η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης κακοηθειών του γαστρεντερικού συστήματος, και ιδίως χολαγγειοκαρκινώματος (498, 508). Το χολαγγειοκαρκίνωμα μπορεί να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε στάδιο της ΠΣΧ, αν και συνήθως αυξημένη επίπτωση παρατηρείται σε ασθενείς με προχωρημένη ΠΣΧ (509). Η συνολική πιθανότητα εμφάνισης χολαγγειοκαρκινώματος σε έναν ασθενή με ΠΣΧ ανέρχεται σε 6-23% (510), με τις μισές των περιπτώσεων να ανευρίσκονται ταυτόχρονα με την ΠΣΧ ή εντός ενός έτους από τη στιγμή της διάγνωσης της ΠΣΧ (508, 511-513). Η εμφάνιση του χολαγγειοκαρκινώματος συμβαίνει συνήθως στην τέταρτη δεκαετία της ζωής σε

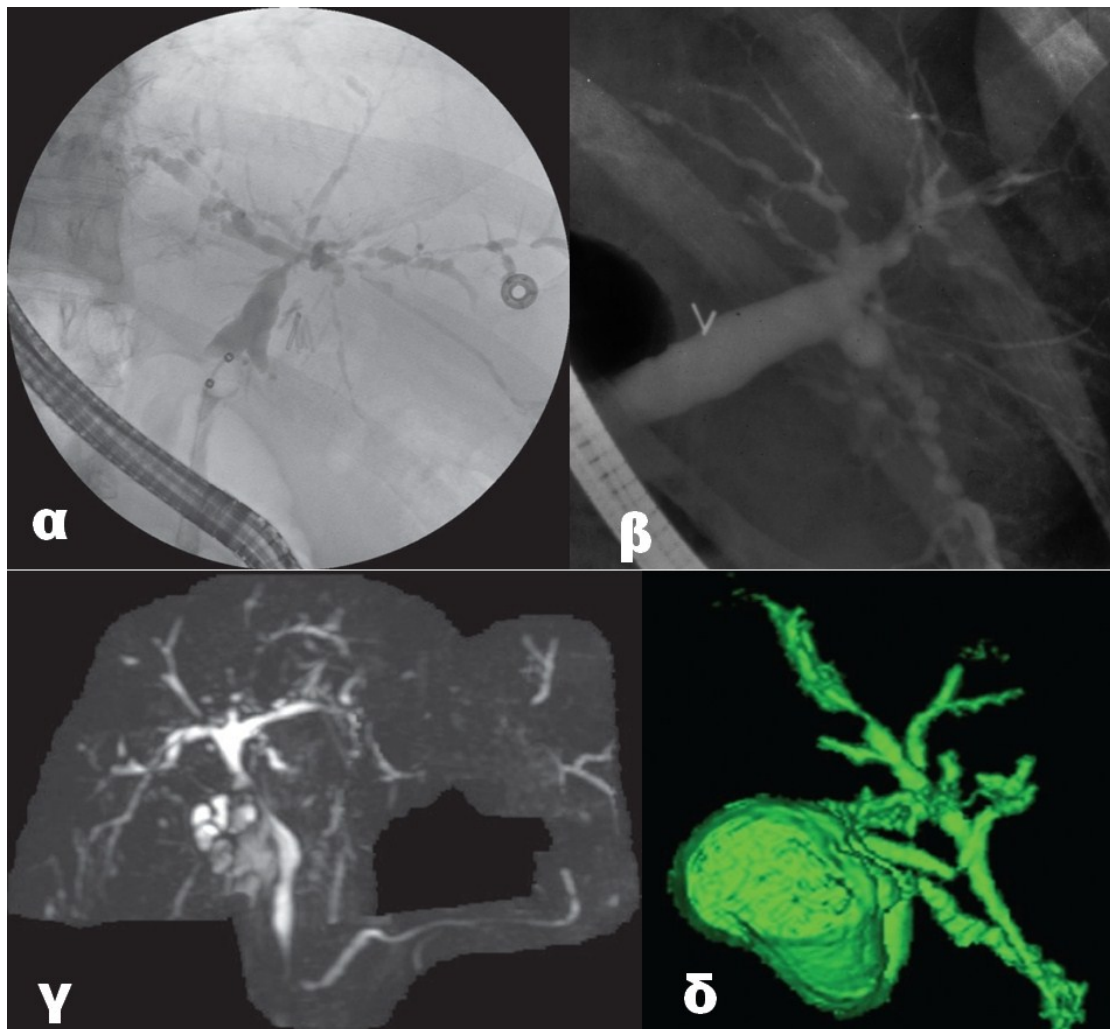
ασθενείς με ΠΣΧ, ενώ στο γενικό πληθυσμό ο χρόνος εμφάνισης συμπίπτει συνήθως με την έβδομη δεκαετία της ζωής (510). Άλλη κακοήθεια που έχει συσχετιστεί με την ΠΣΧ είναι ο καρκίνος του παχέος εντέρου. Μολονότι τα διαθέσιμα δεδομένα δεν επιτρέπουν τη σαφή τοποθέτηση για το αν η συνύπαρξη ΠΣΧ αυξάνει έτι περαιτέρω τον ήδη αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα (513-517), η ισχύουσα άποψη είναι ότι σε έδαφος ΠΣΧ η συχνότητα καρκίνου του παχέος εντέρου είναι μάλλον αυξημένη (518). Αντίστοιχα αυξημένη σε ασθενείς με ΠΣΧ είναι και η πιθανότητα εμφάνισης δυσπλασιών, αδενώματος ή καρκινώματος της χοληδόχου κύστεως (502, 519).

## **5.2.β Εργαστηριακά ευρήματα στην ΠΣΧ**

Οι βιοχημικές εξετάσεις στους ασθενείς με ΠΣΧ, συνήθως δείχνουν ένα τυπικό προφίλ χολοστατικής νόσου. Η αλκαλική φωσφατάση είναι αυξημένη στην πλειονότητα των ασθενών, συνήθως σε επίπεδα μεταξύ του τριπλάσιου και του δεκαπλάσιου των ανώτερων φυσιολογικών τιμών (520, 521), και μόνο σε ένα ποσοστό, της τάξης του 5-10%, των ασθενών μπορεί να είναι φυσιολογική κατά τη στιγμή της διάγνωσης (522, 523). Συχνά συνυπάρχει μέτρια αύξηση του επιπέδου των αμινοτρανσφερασών (2-3πλάσιο των ανώτερων φυσιολογικών τιμών) (523). Η συγκέντρωση της χολερυθρίνης στο αίμα είναι εντός φυσιολογικών ορίων στο 60% των ασθενών κατά τη στιγμή της διάγνωσης και αυξάνεται στην πορεία της νόσου (496, 522). Η βιοσυνθετική ικανότητα του ήπατος στα αρχικά στάδια της νόσου φαίνεται ανεπηρέαστη, με φυσιολογικά επίπεδα αλβουμίνης και παραγόντων πήξης (496, 520, 522).

Αρκετά συχνά (30-50% των ασθενών) παρατηρείται υπεργαμμασφαιριναιμία. Σε μία μελέτη 114 ατόμων με ΠΣΧ, διαπιστώθηκε αύξηση της IgG ανοσοσφαιρίνης σε

ποσοστό 61% (524), ενώ τα επίπεδα της IgM βρίσκονται αυξημένα στο 20-45% των ασθενών (520, 525). Τιμές του νεοπλασματικού δείκτη CA 19-9 >100 U/mL σε ασθενείς με ΠΣΧ θεωρούνται ως ισχυρή ένδειξη ανάπτυξης χολαγγειοκαρκινώματος. Τα απεικονιστικά ευρήματα στην ΠΣΧ είναι χαρακτηριστικά της νόσου. Η απεικόνιση σήμερα γίνεται με τις μεθόδους της ERCP (endoscopic retrograde cholangiopancreatography) και της MRCP (magnetic resonance cholangiopancreatography) (Εικόνα 39).



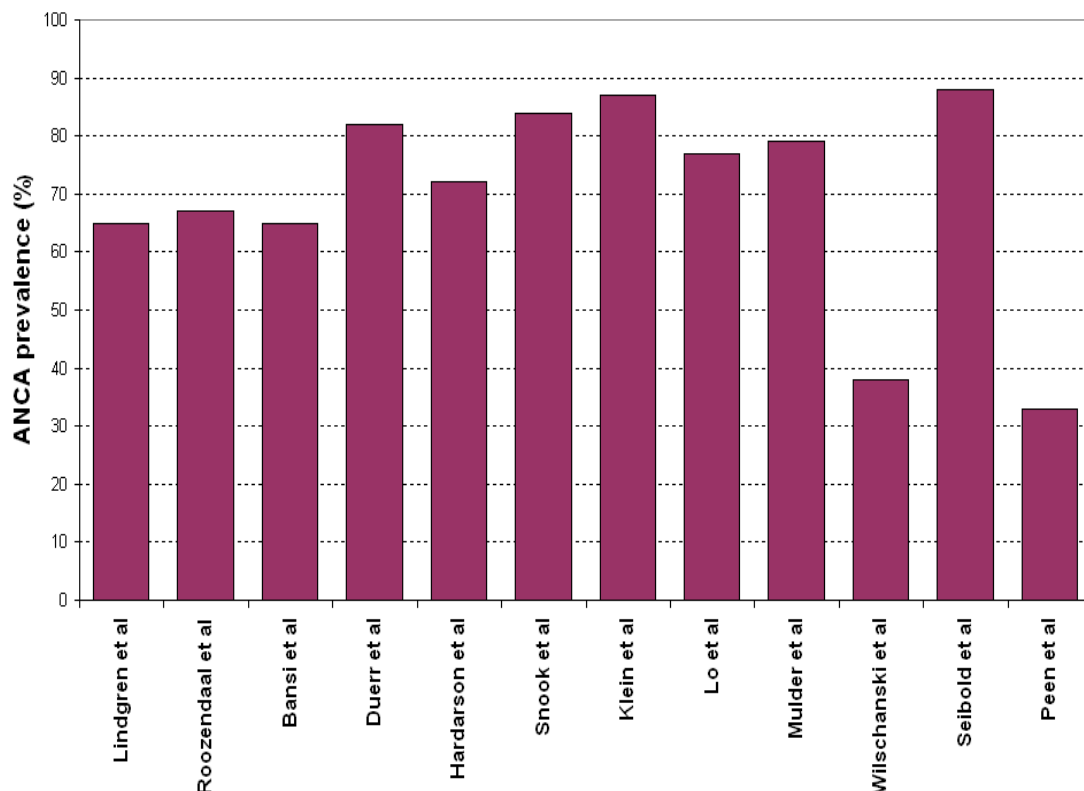
**Εικόνα 39. α) και β) Τυπική ακτινολογική εικόνα ΠΣΧ με τη μέθοδο της ERCP. γ) Εικόνα MRCP και δ) ανασύσταση του χοληφόρου δένδρου μετά από επεξεργασία δεδομένων ERCP (ερανισθείσες από διάφορες πηγές)**

Ανάλογα με την εμπειρία του εξεταστή η ERCP μπορεί να απεικονίσει επιτυχώς το 95% των ενδοηπατικών και εξωηπατικών χοληφόρων (498). Οι επιπλοκές της εξέτασης περιλαμβάνουν κοιλιακό άλγος, παγκρεατίτιδα, αιμορραγία, διάτρηση χοληφόρων, χολοπεριτόναιο και θάνατο και συμβαίνουν σε 3 έως 8% των ασθενών (526-528). Ως εναλλακτική που χαρακτηρίζεται από σαφώς μικρότερη νοσηρότητα (529), αλλά και πιθανόν μικρότερο κόστος (528), προσφέρεται η μέθοδος της MRCP, που δίδει συγκρίσιμα αποτελέσματα με την ERCP ως προς τη διαγνωστική ακρίβεια και έχει περιορίσει την ERCP στην σύγχρονη κλινική πράξη σε περιπτώσεις που οι βλάβες δεν απεικονίζονται με MRCP (530-533). Η τυπική εικόνα περιλαμβάνει πολλαπλές στενώσεις και διατάσεις που αφορούν τόσο τα ενδοηπατικά όσο και τα εξωηπατικά χοληφόρα. Η εναλλαγή στενωτικών περιοχών με παρεμβαλλόμενα φυσιολογικού εύρους ή διατεταμένα τμήματα οδηγεί στη χαρακτηριστική «κομβολογιοειδή» εμφάνιση.

### **5.2.γ Αυτοαντισώματα στην ΠΣΧ**

Αντισώματα έναντι ουδετεροφίλων

Η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι ουδετεροφίλων (ANCA) στον ορό ασθενών με ΠΣΧ είναι ένα συχνό εύρημα, με συχνότητα εμφάνισης που ανέρχεται από 42 έως 93% (298, 369, 371, 485, 534-539) (Εικόνα 40).



**Εικόνα 40.** Επιπολασμός ANCA αντισωμάτων στον ορό ασθενών με ΠΣΧ. Τροποποιημένο σχήμα από Terjung et al (539).

Τα ανιχνευόμενα ANCA στους ασθενείς με ΠΣΧ μπορεί να είναι p-ANCA, c-ANCA ή άτυπα p-ANCA. Τα τυπικά p-ANCA και c-ANCA στρέφονται και στις δύο περιπτώσεις έναντι κυτταροπλασματικών αντιγόνων των ουδετερόφιλων, τα οποία όμως παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή εξαιτίας ενός τεχνουργήματος που προκαλείται κατά τη μονιμοποίηση των ουδετερόφιλων με αιθανόλη σε πλακίδια για την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού (539). Στα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, οι πρωτεΐνες που βρίσκονται αποθηκευμένες στα αζουρόφιλα ή ειδικά κοκκία κατανέμονται στο κυτταρόπλασμα ανάλογα με το φορτίο τους. Η μονιμοποίηση με αιθανόλη προκαλεί τη μετανάστευση των θετικά φορτισμένων κοκκίων προς τον αρνητικά φορτισμένο πυρήνα και τη συσσώρευσή τους στον περιπυρηνικό χώρο. Τα αντισώματα που στρέφονται έναντι αυτών των πρωτεϊνών δίνουν το p-ANCA πρότυπο στον έμμεσο ανοσοφθορισμό. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες που έχουν ουδέτερο ή



ελαφρά θετικό φορτίο διαχέονται σε όλο το κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα τα αντισώματα που τις αναγνωρίζουν να δίνουν το c-ANCA πρότυπο.

Το πρότυπο φθορισμού που δίνουν τα άτυπα p-ANCA, όμως, δεν προκύπτει μέσω της ίδιας διαδικασίας. Τα άτυπα p-ANCA χαρακτηρίζονται από φθορισμό της περιφέρειας του πυρήνα δίκην στεφάνης και σε πολλές περιπτώσεις συνοδεύονται από εμφανή φθορισμό εντός του πυρήνα (302, 303, 540-543). Αν η μονιμοποίηση γίνει με παραφορμαλδεΐδη αντί για αιθανόλη, προκαλείται σταθεροποίηση των πρωτεϊνών και αποφεύγεται η μετανάστευσή τους, με αποτέλεσμα τα p-ANCA να δίνουν κυτταροπλασματικό αντί για περιπυρηνικό φθορισμό (544). Τα άτυπα p-ANCA ωστόσο δίνουν περιπυρηνικό φθορισμό και σε μονιμοποίηση με παραφορμαλδεΐδη, γεγονός που συνηγορεί υπέρ της πυρηνικής εντόπισης του αντιγόνου-στόχου τους, ως εκ τούτου έχει προταθεί να ονομάζονται σωστότερα p-ANNA (peripheral anti-neutrophil nuclear antibodies) (540).

Διάφορα κυτταροπλασματικά ή πυρηνικά αντιγόνα έχουν κατά καιρούς προταθεί ως στόχοι των ANCA σε ασθενείς με ΠΣΧ. Τα κυτταροπλασματικά αντιγόνα περιλαμβάνουν τη λακτοφερρίνη (294, 369, 371, 372, 545-549), τη μυελοϋπεροξειδάση (294, 369, 372, 545-547, 550), την πρωτεΐνη BPI (bactericidal/permeability increasing protein)(298, 369, 371, 547, 550), την καθεψίνη G (369, 371, 545-547), την πρωτεΐνωση 3 (369, 372, 546, 547, 550), την ελαστάση (371, 372, 546, 547), την α-ενολάση (369, 551, 552), την καταλάση (369, 551), τη h-lamp-2 (human lysosomal-associated membrane protein 2)(550), ενώ τα πυρηνικά αντιγόνα περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες HMG1 και HMG2 και την ιστόνη H1 (έχουν ανευρεθεί σε ασθενείς με φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου και ΑΗ αλλά όχι σε ασθενείς με ΠΣΧ) (301, 302, 542, 553). Ιδιαίτερης μνείας χρήζει η προσπάθεια να εντοπιστεί το υπεύθυνο για τα p-ANNA αντιγόνο, που αρχικά είχε προσδιοριστεί ως

ένα ειδικό για τα ουδετερόφιλα αντιγόνο της πυρηνικής μεμβράνης με MB 50kDa (540), ενώ πλέον πρόσφατα η ίδια ερευνητική ομάδα ταυτοποίησε το υπεύθυνο αντιγόνο ως την πρωτεΐνη TBB5 (human beta-tubulin isotype 5)(554). Ωστόσο, τα ευρήματα αυτά δεν έχουν επιβεβαιωθεί από άλλες ερευνητικές ομάδες.

Η συμμετοχή των ANCA στην παθογένεια της νόσου δεν έχει διευκρινιστεί επαρκώς, ενώ φαίνεται πως η αξία τους στη διάγνωση της νόσου είναι περιορισμένη (539, 555). Περιορισμένες ενδείξεις έχουν δημοσιευθεί που υποστηρίζουν τη συσχέτιση των ANCA με την κλινική εικόνα της ΠΣΧ. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με ΠΣΧ που είναι θετικοί για ANCA εμφανίζουν συχνότερα επιπλοκές εκ των χοληφόρων (556), και εμφανίζουν συχνότερα συμμετοχή των ενδοηπατικών χοληφόρων (557). Τέλος έχει βρεθεί ότι κιρρωτικοί ασθενείς εμφανίζουν συχνότερα υψηλούς τίτλους ANCA σε σχέση με ασθενείς σε προωμότερα στάδια της νόσου (372).

Αντισώματα έναντι αντιγόνων των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων και του παχέος εντέρου

Αντισώματα έναντι αντιγόνων των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων και του παχέος εντέρου μπορούν να ανιχνευθούν στον ορό ασθενών με ΠΣΧ. Συγκεκριμένα, οι Das και συν., προσδιόρισαν αντισώματα έναντι μίας πρωτεΐνης 40 kDa που ανευρίσκεται, εκτός από τα χοληφόρα και το παχύ έντερο, στο δέρμα, τους χόνδρους και τους οφθαλμούς (558), η οποία αναγνωρίστηκε ως η ανθρώπινη τροπομυοσίνη 5 (human tropomyosin isoform 5, hTM5). Χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της hTM5, το οποίο ονομάστηκε Das-1, διαπιστώθηκε ότι ορός ασθενών με ελκώδη κολίτιδα ή/και ΠΣΧ ανέστειλε τη σύνδεση του Das-1 με επιθηλιακά κύτταρα, αποτελώντας έμμεση απόδειξη της ύπαρξης αντισωμάτων έναντι της hTM5 στον ορό των ασθενών αυτών (559). Θεωρώντας ότι η hTM5 είναι ενδοκυττάρια πρωτεΐνη,

προτάθηκε ότι η εξωτερίκευσή της στα κύτταρα του παχέος εντέρου τουλάχιστον, γίνεται μέσω της σύνδεσής της με μία πρωτεΐνη 200kDa που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων και καλείται CEP (colonic epithelial protein) (560). Τα αντισώματα έναντι hTM5 ανιχνεύονται στον ορό ασθενών με ελκώδη κολίτιδα (561), όπου πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι ασκούν κυτταροτοξική δράση όταν επωάζονται με επιθηλιακά κύτταρα παχέος εντέρου *in vitro* (562), γεγονός που καθιστά πιθανή τη συμμετοχή τους στην παθογένεια της ελκώδους κολίτιδας. Αντισώματα έναντι ανθρώπινου τροπομοσίνης έχουν, επίσης, ανιχνευθεί και στον ορό ασθενών με ΠΣΧ χωρίς τη συνύπαρξη ελκώδους κολίτιδας, καθιστώντας πιθανή τη συσχέτισή τους και με την ΠΣΧ (563).

Αντίστοιχα, αντισώματα έναντι επιθηλιακών κυττάρων χοληφόρων (biliary epithelial cells, BEC) έχουν ανιχνευθεί στο 63% των ασθενών με ΠΣΧ και στο 37% των ασθενών με ΠΧΚ, έναντι 8% σε υγιείς μάρτυρες (564). Παρότι και σε αυτή την περίπτωση το αντιγόνο-στόχος των αντισωμάτων είναι μία πρωτεΐνη 40 kDa, δεν έχει παρατηρηθεί αντιδραστικότητα των anti-hTM5 αντισωμάτων έναντι αυτής της πρωτεΐνης. Υπάρχουν κάποια πειραματικά δεδομένα που υποστηρίζουν τον παθογενετικό ρόλο των anti-BEC αντισωμάτων στην ανάπτυξη της ΠΣΧ. Anti-BEC αντισώματα, που έχουν απομονωθεί από τον ορό ασθενών με ΠΣΧ, διεγείρουν *in vitro* απομονωμένα BEC ώστε να παράγουν IL-6 και το προσκολλητικό μόριο CD-44. Παρομοίως, πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι η επώαση BEC με ορό ασθενών που περιέχει anti-BEC αντισώματα, διεγείρει τα BEC να εκφράσουν TLR και να παράγουν κυτταροκίνες μετά την έκθεση σε λιποπολυσακαρίδια. Αυτό το εύρημα είναι εξαιρετικά σημαντικό γιατί καταδεικνύει ότι η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα BEC απαιτεί τη συνύπαρξη αυτοαντισώματος και gram-αρνητικού βακτηρίου (565). Η ανίχνευση των anti-BEC αντισωμάτων έχει

υποστηριχθεί ότι δίνει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες καθώς έχει δημοσιευθεί συσχέτισή τους με αυξημένη πιθανότητα οξείας απόρριψης μοσχεύματος σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση ήπατος (566). Ωστόσο, τη σημασία τους στη διάγνωση της ΠΣΧ μειώνει η χαμηλή τους ειδικότητα, καθώς έχει βρεθεί ότι σε τελικού σταδίου ηπατοπάθεια η συχνότητα εμφάνισης anti-BEC είναι αυξημένη ανεξαρτήτως της ηπατικής νόσου (χρόνια ηπατίτιδα C 32%, ΑΗ 57%, ΠΣΧ 56% και ΠΧΚ 75%) (566).

#### Άλλα αυτοαντισώματα στην ΠΣΧ

Στους ασθενείς με ΠΣΧ μπορεί να ανιχνεύεται μία πληθώρα άλλων αυτοαντισωμάτων πέραν των ANCA και των αντισωμάτων έναντι επιθηλιακών κυττάρων (Πίνακας 8). Παρουσία ANA έχει ανιχνευθεί σε ποσοστό 8-77%, με βάση δημοσιευμένες μελέτες, συνήθως όμως σε χαμηλούς τίτλους (323, 339, 372, 521, 547, 548, 550, 551, 567-570). Τα ανιχνευόμενα ANA εμφανίζουν αντιδραστικότητα έναντι διάφορων πυρηνικών αντιγόνων, όπως dsDNA στο 3 έως 29% (546, 550, 568, 569), ENA 4 έως 12% (550, 569, 570), SSA/B σε 1 έως 28% (546, 550), αλλά και RNP, Scl-70, Sm, ssDNA σε μικρότερες συχνότητες (546, 550). Παρουσία SMA έχει αναφερθεί σε ποσοστό έως και 83% των ασθενών με ΠΣΧ, αλλά πάλι σε χαμηλούς ως επί το πλείστον τίτλους (323, 339, 521, 548, 550, 551, 567-570).

Στον ορό ασθενών με ΠΣΧ έχουν επίσης ανιχνευθεί σε μία μελέτη αντισώματα έναντι του *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), τα οποία αναγνωρίζουν ως αντιγόνο-στόχο τον πολυσακχαρίτη μαννάνη (571). Σε αυτή τη μελέτη οι ασθενείς με ΠΣΧ εμφάνισαν ASCA σε συνολικό ποσοστό 44%, με τους ασθενείς στους οποίους συνυπήρχε και φλεγμονώδης νόσος του εντέρου να εμφανίζουν ASCA σε ποσοστό 57% και τους ασθενείς που έπασχαν μόνο από ΠΣΧ να εμφανίζουν ASCA σε

ποσοστό 39%. Ωστόσο, η παρουσία αυτών των αντισωμάτων παρατηρήθηκε επίσης και στην ΠΧΚ και την ΑΗ σε χαμηλότερα ποσοστά (23% και 18%, αντίστοιχα) και δεν μπορεί να βοηθήσει στη διαφορική διάγνωση μεταξύ τους.

**Πίνακας 8. Επιπολασμός αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς με ΠΣΧ πέραν των ANCA**

<i>Αυτοαντίσωμα</i>	<i>Επιπολασμός (Διάμεσος)</i>
ANA	8-77% (30%)
SMA	0-83% (17%)
Anti-BEC	63% (63%)
ASCA	44% (44%)
aCL	4-63% (27%)
AECA	35% (35%)
Ρευματοειδής παράγων	15% (15%)
anti-TPO	16% (16%)
anti-GBM	17% (17%)
anti-sulfite oxidase	33% (33%)
anti-GSTT1	5% (5%)
AMA	0-9% (0%)

ANA: antinuclear antibodies; SMA: smooth muscle antibodies; anti-BEC: antibodies against biliary epithelial cells; ASCA: anti- *Sacharomyces cerevisiae* antibodies; aCL: anti-cardiolipin antibodies; AECA: anti-endothelial cell antibodies; anti-TPO: antibodies against thyroid peroxidase; anti-GBM: antibodies against glomerular basement membrane; anti-GSTT1: antibodies against glutathione S transferase theta 1; AMA: anti-mitochondrial antibodies

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν αναφορές που περιγράφουν αυξημένη συχνότητα αντισωμάτων που πιθανώς να προδιαθέτουν σε προθρομβωτικές καταστάσεις τους ασθενείς με ΠΣΧ (546, 550, 568). Ο επιπολασμός των αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων σε ασθενείς με ΠΣΧ βρέθηκε να κυμαίνεται μεταξύ 4% και 63% σε τρεις μελέτες (546, 550, 568). Μάλιστα οι Ζάχου και συν. διαπίστωσαν ότι τα αυτοαντισώματα αυτά είχαν συγκρίσιμη συγγένεια προς το αντιγόνο-στόχο με αντικαρδιολιπινικά αντισώματα ασθενών με αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο και σχετίζονταν με τη βιοχημική ενεργότητα της νόσου (568). Αντίστοιχα, οι Angulo και

συν. διαπίστωσαν συσχέτιση του τίτλων των αυτοαντισωμάτων με το Mayo risk score και το ιστολογικό στάδιο της νόσου (550). Άλλα αντισώματα που πιθανώς να προδιαθέτουν τους ασθενείς με ΠΣΧ σε προθρομβωτικές καταστάσεις ή αγγειίτιδες είναι τα αντισώματα έναντι ενδοθηλιακών κυττάρων (anti-endothelial cell antibodies, AECA), που έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με αγγειίτιδες, συστηματικό ερυθρεματώδη λύκο, συστηματική σκλήρυνση και εκτασίες των στεφανιαίων αρτηριών (572, 573). Τα AECA έχουν ανιχνευθεί σε ποσοστό 35% των ασθενών με ΠΣΧ σε μία μόνο μελέτη (546). Ωστόσο, οι αναφορές προθρομβωτικών καταστάσεων στην ΠΣΧ είναι εξαιρετικά σπάνιες.

Τέλος αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA) ανιχνεύονται εξαιρετικά σπάνια στην ΠΣΧ, καθώς μόνο μία μελέτη έχει ανιχνεύσει AMA στο 9% των ασθενών με ΠΣΧ (521). Αυτό πιθανότατα υποδηλώνει την έλλειψη αλληλοεπικάλυψης μεταξύ ΠΣΧ και ΠΧΚ, μολονότι υπάρχουν ήδη δύο δημοσιευμένες αναφορές συνδρόμου αλληλοεπικάλυψης μεταξύ των δύο παθήσεων (574, 575).

#### **5.2.δ Γενετική προδιάθεση ΠΣΧ**

Οι πρώτες μελέτες που επιχείρησαν στη δεκαετία του 1980 να διαπιστώσουν συσχετίσεις της ΠΣΧ με γονίδια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, ανακάλυψαν αυξημένη συχνότητα HLA B8 και DR3 και μειωμένη συχνότητα B44 σε ασθενείς με ΠΣΧ σε σχέση με υγιείς μάρτυρες (576). Τα περισσότερα από τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια, εκτός από την προστατευτική δράση του B44, ενώ παρατηρήθηκε και μία συσχέτιση της νόσου με το DR2 σε DR3-αρνητικούς ασθενείς (577).

Επακόλουθες έρευνες έχουν καταφέρει να προσδιορίσουν 6 διαφορετικούς HLA αλλότυπους που σχετίζονται με την ΠΣΧ (πίνακας 9) (578-587).

**Πίνακας 9. HLA απλότυποι που σχετίζονται με την ΠΣΧ**

<b>Απλότυπος</b>	<b>Είδος συσχέτισης</b>
B8-MICA*008-MICB*24-TNFA*2-DRB3*0101- DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201	Θετική – αυξημένος κίνδυνος
DRB3*0101-DRB1*1301-DQA1*0103-DQB1*0603	Θετική – αυξημένος κίνδυνος
MICA*008-DRB5*0101-DRB1*1501-DQA1*0102- DQB1*0602	Θετική – αυξημένος κίνδυνος
DRB4*0103-DRB1*0401-DQA1*03-DQB1*0302	Αρνητική – μειωμένος κίνδυνος
DRB4*0103-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303	Αρνητική – μειωμένος κίνδυνος
MICA*002	Αρνητική – μειωμένος κίνδυνος

Ιδιαίτερη σημασία για την παθογένεια της νόσου πιθανολογείται πως έχει η συσχέτιση με τους πολυμορφισμούς του γονιδίου MICA, που κωδικοποιεί την γλυκοπρωτεΐνη MICa (450). Η πρωτεΐνη MICa εκφράζεται μάλλον αποκλειστικά στα επιθήλια του γαστρεντερικού (συμπεριλαμβανομένων και των χοληφόρων) και στο θύμο και μπορεί να επάγεται από στρες και θερμικό σοκ (588, 589). Το μόριο της MICa έχει βρεθεί ότι είναι συνδέτης των γδ T-κυττάρων και των NK-κυττάρων, άφθονοι πληθυσμοί των οποίων εντοπίζονται τόσο σε φυσιολογικό ήπαρ, αλλά και σε ήπαρ ασθενών με ΠΣΧ. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 9, υπάρχουν δύο ανεξάρτητες συσχετίσεις της ΠΣΧ με πολυμορφισμούς του MICA. Το αλληλίο MICA\*008 σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης ΠΣΧ, ενώ το αλληλίο MICA\*002 σχετίζεται με μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου. Φαίνεται ότι το αλληλίο MICA\*008 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη MICa με μικρό κυτταροπλασματικό τμήμα, που μάλλον είναι λιγότερο σταθερή από τις MICa που κωδικοποιούνται από

τα υπόλοιπα αλληλόμορφα. Αν θεωρηθεί ότι η ΠΣΧ είναι απώτερη συνέπεια κάποιας λοίμωξης, τότε μπορεί να υποτεθεί ότι αυτή η λοίμωξη είναι το έναυσμα για την παραγωγή αυξημένων επιπέδων MICα, και την αυξημένη ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών γδ Τ-κυττάρων και των NK-κυττάρων, που επάγουν την περαιτέρω αυτοάνοση αντίδραση. Ομοζυγώτες για το MICA\*008, θα έχουν λειτουργικά αδρανή πρωτεΐνη MICα, και παρατεταμένη ενεργοποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης, ενώ άτομα με έστω και ένα αντίγραφο του MICA\*002 παράγουν σταθερά μόρια MICα και χαρακτηρίζονται από περιορισμένη ενεργοποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης.

Μελέτες για τη διερεύνηση άλλων γενετικών συσχετίσεων της ΠΣΧ έχουν επικεντρωθεί σε πολυμορφισμούς, κυρίως, γονιδίων κυτταροκινών και άλλων παραγόντων του ανοσοποιητικού, με αρνητικά ως επί το πλείστον αποτελέσματα.

Ωστόσο, έχει βρεθεί συσχέτιση της νόσου με πολυμορφισμούς του γονιδίου του TNFα, αλλά επειδή έχει έντονο συσχετισμό με τον απλότυπο HLA-B8-DR3-DQ2 δεν μπορεί να θεωρηθεί ως ανεξάρτητος γενετικός παράγοντας. Έντονη συσχέτιση με την ΠΣΧ έχει βρεθεί και με πολυμορφισμούς του γονιδίου της μεταλλο-πρωτεΐνάσης MMP-3. Η MMP-3 είναι ένζυμο απαραίτητο για τον καταβολισμό της θεμέλιας ουσίας του συνδετικού ιστού και πολυμορφισμοί του γονιδίου της που κωδικοποιούν μορφές του ενζύμου με μειωμένη ενεργότητα ίσως συνεισφέρουν στην εκτεταμένη ίνωση που παρατηρείται πέριξ των χοληφόρων στην ΠΣΧ.

Τέλος, αν και υπάρχουν αναφορές για οικογενή εμφάνιση της ΠΣΧ, δεν υπάρχουν συστηματικές μελέτες για το σχετικό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε συγγενείς πρώτου βαθμού. Η μόνη πρόσφατη μελέτη που εκτίμησε το σχετικό κίνδυνο δημοσιεύτηκε το 2005 και αναφέρει ότι η συχνότητα εμφάνισης ΠΣΧ σε συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών είναι 0.7%, που σημαίνει ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης της

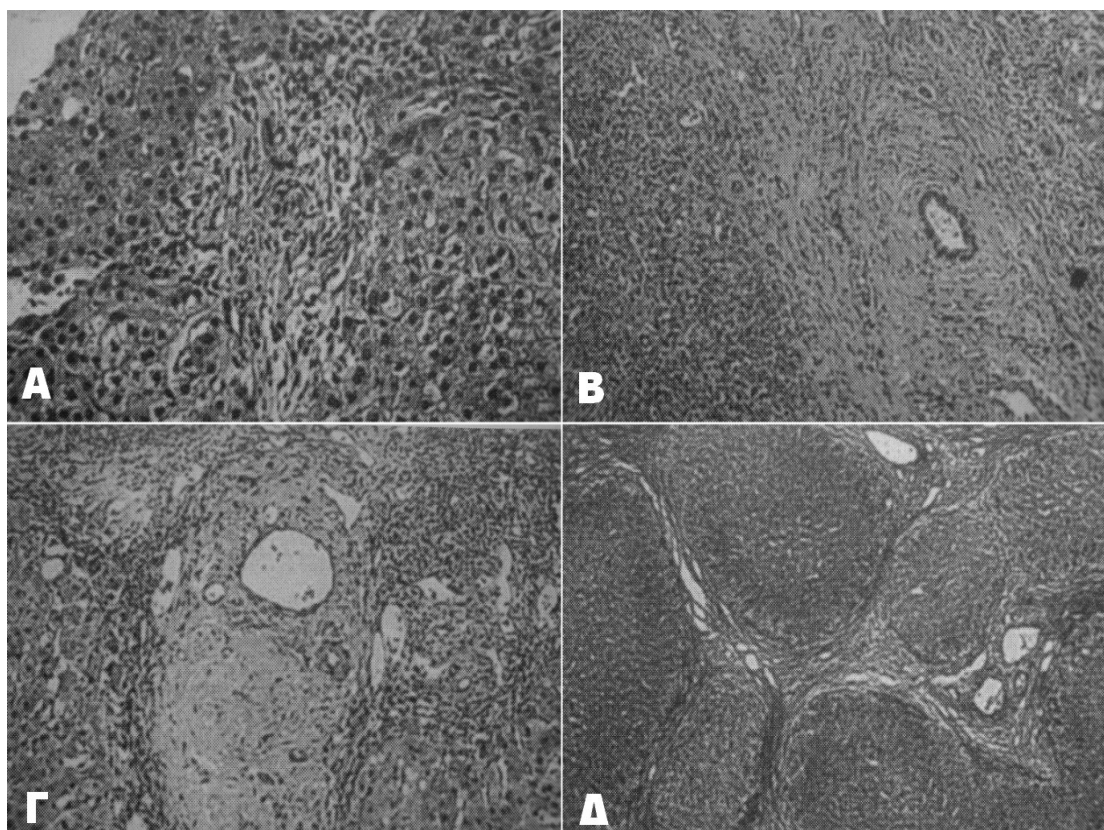


νόσου σε συγγενείς πρώτου βαθμού εκατονταπλασιάζεται σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (590).

### **5.2.ε Παθολογοανατομικά ευρήματα στην ΠΣΧ**

Οι πιο συχνές μεταβολές που παρατηρούνται στην βιοψία ήπατος είναι η ινοαποφρακτική φλεγμονή και εκφύλιση των χοληφόρων με απώλεια του αυλού και αντικατάσταση από ουλώδη ιστό και χολαγγειοπενία στα τελικά στάδια, η περιχολαγγειακή ίνωση των μικρού μεγέθους χοληφόρων, σε συνδυασμό με παρεγχυματικές αλλαγές όπως το οίδημα ορισμένων πυλαίων διαστημάτων, η τοπική ίνωση και φλεγμονή, η διαβρωτική νέκρωση και η υπερπλασία των κυττάρων Kupffer (483, 591).

Αρχικά η νόσος χαρακτηρίζεται από αλλοιώσεις που περιορίζονται ως επί το πλείστον στα πυλαία διαστήματα με ήπια περιπυλαία φλεγμονώδη αντίδραση και διάταση πυλαίων διαστημάτων, οίδημα και αύξηση των χοληφόρων πόρων. Οι αλλαγές αυτές αποτελούν το στάδιο I της νόσου (χολαγγειίτιδα ή περιπυλαία ηπατίτιδα). Το στάδιο II της νόσου χαρακτηρίζεται από την επέκταση της φλεγμονής και της ίνωσης εκτός των πυλαίων διαστημάτων (περιπυλαία ίνωση με περιπυλαία ηπατίτιδα). Στο στάδιο III ινώδη διαφραγμάτια εκτείνονται από τα πυλαία διαστήματα που μπορεί να συνοδεύονται από νέκρωση (διαφραγματική ίνωση και γεφυροποιός νέκρωση). Τελικά στο στάδιο IV παρατηρούνται αλλοιώσεις τυπικές χολικής κίρρωσης (Εικόνα 41) (592, 593). Εντούτοις, η ιστολογική ταξινόμηση στα τέσσερα στάδια που περιγράφηκαν παραπάνω δε φαίνεται να έχει πρακτική κλινική σημασία, καθώς η νόσος δεν είναι διάχυτη αλλά τμηματική στο ηπατικό παρέγχυμα, με αποτέλεσμα η ταξινόμηση να είναι τελείως επισφαλής ιστολογικά.



**Εικόνα 41. Ιστολογικές αλλοιώσεις τυπικές των σταδίων της ΠΣΧ. Α. Φλεγμονή των μικρών χοληφόρων πόρων που περιορίζεται εντός του πυλαίου διαστήματος. Β. Χαρακτηριστική είναι η ανάπτυξη περιπυλαίας ίνωσης που συνοδεύει την φλεγμονή του πυλαίου διαστήματος και του περιπυλαίου χώρου. Γ. Εκτεταμένη ίνωση του πυλαίου διαστήματος και εξαφάνιση του χοληφόρου πόρου. Δ. Χολική κίρρωση με εμφανή την ίνωση και την ανάπτυξη αναγεννητικών οζίων (592).**

## 5.2.στ Διάγνωση ΠΣΧ

Αρχικά για τη διάγνωση της νόσου χρησιμοποιούνταν τα κριτήρια του Warren (594), που απαιτούσαν: α) απουσία ιστορικού χειρουργείου των χοληφόρων, β) απουσία χολολιθίασης, γ) διάχυτες στενώσεις των εξωηπατικών χοληφόρων και δ) απουσία χολαγγειοκαρκινώματος. Η καλύτερη κατανόηση της νόσου κατέστησε απαραίτητη την τροποποίηση των κριτηρίων αυτών ώστε να περιλαμβάνονται οι ασθενείς με χολόλιθους που περιορίζονται εντός της χοληδόχου κύστεως, οι ασθενείς με μεμονωμένη προσβολή των ενδοηπατικών χοληφόρων και να αναγνωρίζεται το χολαγγειοκαρκίνωμα ως πιθανή επιπλοκή της ΠΣΧ (Πίνακας 9).

**Πίνακας 10. Διαγνωστικά κριτήρια της ΠΣΧ**

<i>Παράμετρος</i>	<i>Κριτήρια επιβεβαίωσης</i>	<i>Κριτήρια αποκλεισμού</i>
Κλινικά / ιστορικό	Ιστορικό φλεγμονώδους νόσου του εντέρου. Ηπατομεγαλία	Σύνδρομα ανοσοανεπάρκειας Κακώσεις (χειρουργικές) του χοληφόρου δέντρου Ηπατική ισχαιμία Τοξική βλάβη (χημειοθεραπεία με φλοξουριδίνη, θεραπεία με φορμαλίνη για εχينوκοκκίαση)
Εργαστηριακά	Αυξημένη αλκαλική φωσφατάση Αυξημένες αμινοτρανσφεράσες Φυσιολογική ή αυξημένη χολερυθρίνη	Θετικός ιολογικός έλεγχος για HBV, HCV λοίμωξη
Ιστολογικά	Περιχολαγγειακή φλεγμονή και ίνωση Εξαφάνιση των χοληφόρων Αποφρακτική ινώδης χολαγγειίτιδα Χολική κίρρωση	Non suppurative destructive cholangitis
Ορολογικά	Παρουσία pANCA, ANA	Παρουσία AMA
Χολαγγειογραφικά	Σκληρυντικές αλλοιώσεις των εξωηπατικών χοληφόρων με ή χωρίς προσβολή των ενδοηπατικών . Φυσιολογική εικόνα σε προσβολή των μικρών πόρων	Συγγενείς ανωμαλίες Χοληδοχολιθίαση

Η διάγνωση της νόσου στηρίζεται στα χαρακτηριστικά χολαγγειογραφικά ευρήματα των διάχυτων πολυεστιακών στενώσεων και αλλοιώσεων των χοληφόρων, δίνοντας μία κομβολογιοειδή εμφάνιση του χοληφόρου δένδρου, όπως αυτό απεικονίζεται

στην MRCP, ή επί αρνητικής MRCP στην ERCP (595). Η βιοψία ήπατος δεν κρίνεται απαραίτητη σήμερα για διαγνωστικούς λόγους, εκτός και αν παρά την αρνητική MRCP ή ERCP, υπάρχει ισχυρή υποψία υπέρ ΠΣΧ των μικρών χοληφόρων (small duct PSC). Συνήθως, και σε ποσοστό άνω του 80%, υπάρχει ταυτόχρονη προσβολή των ενδοηπατικών και των εξωηπατικών χοληφόρων, στο 20-30% υπάρχει προσβολή μόνο των ενδοηπατικών χοληφόρων (κάτι που παρατηρείται σχεδόν πάντοτε σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα), ενώ πολύ σπάνια (1-2%) παρατηρούνται αλλοιώσεις μόνο στα εξωηπατικά χοληφόρα (520). Τέλος, αλλοιώσεις του παγκρεατικού πόρου, παρόμοιες με της χρόνιας παγκρεατίτιδας, συχνά συνυπάρχουν σε ένα σημαντικό αριθμό ασθενών με ΠΣΧ (596), ενώ χολικοί λίθοι ανευρίσκονται στο 15% (483).

### **5.2.ζ Παθογένεια ΠΣΧ**

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ενδείξεων που υποδεικνύουν ότι αυτοάνοσοι μηχανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου, όπως η συσχέτιση με συγκεκριμένους HLA απλότυπους, η ύπαρξη αυτοαντισωμάτων και η αυξημένη συχνότητα συνύπαρξης άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων (597). Επίσης έχουν βρεθεί μια σειρά από διαταραχές στην κυτταρική και τη χυμική ανοσία, όπως είναι η σταδιακή μείωση των CD8 κυττάρων με την πρόοδο της νόσου, η διήθηση των πυλαίων διαστημάτων με T-λεμφοκύτταρα, ο αυξημένος αριθμός Tγδ κυττάρων στην κυκλοφορία και Vβ3 T-κυττάρων στο ήπαρ, ανώμαλο προφίλ τόσο Th1 όσο και Th2 κυτταροκινών από τα αρχικά ακόμη στάδια της νόσου, η σταδιακή μετατροπή των επιθηλιακών κυττάρων σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, μέσω έκφρασης HLA II στην επιφάνειά τους και συνδιεγερτικών μορίων όπως ICAM-I, B7 και CD44 (482). Ωστόσο, η ισχύουσα άποψη είναι ότι η ΠΣΧ δεν ανήκει στα τυπικά αυτοάνοσα νοσήματα, αλλά στις φλεγμονώδεις νόσους με συμμετοχή του ανοσολογικού συστήματος (immune-mediated inflammatory diseases, IMIDs), όπως είναι οι

ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, και η ψωρίαση (598). Φαίνεται ότι χαρακτηριστικά της ΠΣΧ όπως η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στους άνδρες, η απουσία αυτοαντισωμάτων με παθογενετικό ρόλο που να αναγνωρίζουν συγκεκριμένο αυτοαντιγόνο και η πτωχή ανταπόκριση στην ανοσοκαταστολή στους ενήλικες ασθενείς, τη διακρίνουν από τα τυπικά αυτοάνοσα νοσήματα και προσιδιάζουν με τις IMID (599). Σε αυτά τα νοσήματα η νόσος εμφανίζεται όχι ως απάντηση σε ένα ίδιο αντιγόνο αλλά σε ένα ξένο ως προς τον οργανισμό αντιγόνο, εκτρέπεται όμως από τη φυσιολογική ανοσολογική απάντηση και χαρακτηρίζεται από αυξημένη φλεγμονώδη αντίδραση (598).

Σε διάφορα πειραματικά μοντέλα έχει βρεθεί ότι η έγχυση στην ηπατική αρτηρία διαφόρων ουσιών, όπως φλοξουριδίνη, 5-φλουορακίλη, και μιτομυκίνη C, μπορεί να οδηγήσει στη εμφάνιση βλαβών τυπικών ΠΣΧ. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η ΠΣΧ μπορεί να είναι αποτέλεσμα άμεσης επίδρασης τοξικών ουσιών στα χοληφόρα, είτε ισχαιμίας λόγω θρόμβωσης των ηπατικών αγγείων (600, 601).

Όπως και στην ελκώδη κολίτιδα, έτσι και στην ΠΣΧ υπάρχουν επιδημιολογικές μελέτες που διαπιστώνουν ότι το κάπνισμα ασκεί προστατευτικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου, αποτελώντας ανεξάρτητο παράγοντα σε σχέση με την ύπαρξη φλεγμονώδους νόσου στο έντερο (602).

Διάφοροι λοιμώδεις παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί ως το αρχικό έναυσμα για την ανάπτυξη της ΠΣΧ, αλλά η συμμετοχή τους στην παθογένεια της νόσου δεν είναι σε καμία περίπτωση επαρκώς τεκμηριωμένη από πειραματικά δεδομένα.

Η λοίμωξη από ρεοϊό τύπου 3 έχει βρεθεί ότι προκαλεί χολαγγειίτιδα, σε επίμυες, πρωτεύοντα και πιθανώς ανθρώπους (603-605), εντούτοις δεν έχουν τεκμηριωθεί σημεία λοίμωξης από τον ιό στα χοληφόρα ασθενών με ΠΣΧ, ούτε παρατηρούνται διαφορές στον τίτλο των αντισωμάτων έναντι του ρεοϊού μεταξύ ασθενών με ΠΣΧ

και υγιών μαρτύρων (606). Αντίστοιχα, ενώ ο CMV μπορεί να προσβάλει τα ενδοηπατικά χοληφόρα και να προκαλέσει δευτεροπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα, δεν έχει τεκμηριωθεί αιτιολογική σχέση σε ασθενείς με ΠΣΧ (607, 608).

Η πιθανότητα λοιμώδεις παράγοντες να συμμετέχουν στην παθογένεια της ΠΣΧ, υποστηρίζεται από μελέτες που ανιχνεύουν με αυξημένη συχνότητα DNA *Helicobacter pylori* σε ηπατικό ιστό ασθενών με τη μέθοδο της PCR (609), και αυξημένη αντιδραστικότητα έναντι συγκεκριμένων πρωτεϊνών ρετροϊών στο ορό ασθενών με ΠΣΧ μέσω της μεθόδου της ανοσοαποτύπωσης (610). Η συνύπαρξη σε μεγάλο ποσοστό της ΠΣΧ με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι η νόσος είναι αποτέλεσμα εισόδου μικροοργανισμών διαμέσου του εντερικού τοιχώματος στην πυλαία κυκλοφορία, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ανοσολογικού μηχανισμού και την πρόκληση βλαβών στα χοληφόρα πιθανώς μέσω μηχανισμών μοριακής μίμησης (482).

Ένας υποθετικός μηχανισμός παθογένειας της ΠΣΧ που έχει προταθεί, θέλει η είσοδος ενός μικροοργανισμού στην πυλαία κυκλοφορία μέσω του εντερικού τοιχώματος (στα πλαίσια κολίτιδας ή επανειλημμένων εντερολοιμώξεων) να προκαλεί ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer με επακόλουθη έκλυση κυτταροκινών και χυμοκινών. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας, προκαλείται ενεργοποίηση μονοκυττάρων, μακροφάγων, λεμφοκυττάρων και ινοβλαστών. Η επακόλουθη ίνωση γύρω από τα χοληφόρα οδηγεί σε ισχαιμία και τελικά ατροφία των επιθηλιακών κυττάρων. Τελικό αποτέλεσμα είναι η προοδευτική χολόσταση και τελικά η ανάπτυξη χολικής κίρρωσης (611). Πιο πρόσφατα διατυπώθηκε και η υπόθεση της εντεροηπατικής κυκλοφορίας κάποιων λεμφοκυττάρων που ενεργοποιούνται εξαιτίας κάποιας εντερικής φλεγμονής και τα οποία στη συνέχεια προάγουν τη φλεγμονώδη αντίδραση στο ήπαρ (612).

## 5.2.η Φυσική ιστορία και πρόγνωση της ΠΣΧ

Η εξέλιξη της νόσου ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ασθενών. Στους ασυμπτωματικούς ασθενείς (αποτελούν το 15-40% του συνόλου των πασχόντων από ΠΣΧ) (496, 522), οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι υπάρχει μία περίοδος 7 έως 9 ετών όπου το 75% παραμένει χωρίς ιδιαίτερη συμπτωματολογία (484, 613). Εντούτοις, άλλες μελέτες διαπιστώνουν μικρότερα ασυμπτωματικά διαστήματα (614). Οι διαφορές αυτές πιθανώς να οφείλονται στα κριτήρια που χρησιμοποιούνται από τα διάφορα κέντρα για την αναγνώριση των ασυμπτωματικών ασθενών. Αντίθετα, από τη στιγμή της εμφάνισης των συμπτωμάτων, ο μέσος χρόνος επιβίωσης των ασθενών ή ο μέσος χρόνος μέχρι την ανάγκη για μεταμόσχευση φαίνεται να είναι κατά μέσο όρο 12 έτη (484, 615).

Μέσω της αξιολόγησης μιας πληθώρας κλινικών, εργαστηριακών και ιστολογικών παραμέτρων, διάφορα κέντρα έχουν προτείνει τη χρησιμοποίηση ορισμένων εξ' αυτών ως προγνωστικών παραγόντων (Πίνακας 11) (484, 522, 615).

**Πίνακας 11. Προγνωστικοί παράγοντες επιβίωσης ασθενών με ΠΣΧ**

<i>Μοντέλο</i>	<i>Μοντέλο</i>	<i>Σουηδικό</i>	<i>Αναθεωρημένο</i>	<i>Νέο</i>
<i>Mayo Clinic</i>	<i>King's College</i>	<i>μοντέλο</i>	<i>μοντέλο Mayo</i>	<i>μοντέλο</i>
<i>(484)</i>	<i>(615)</i>	<i>(522)</i>	<i>Clinic (616)</i>	<i>Mayo Clinic (617)</i>
Ηλικία	Ηλικία	Ηλικία	Ηλικία	Ηλικία
Χολερυθρίνη	Ηπατομεγαλία	Χολερυθρίνη	Χολερυθρίνη	Χολερυθρίνη
Ιστολογικό	Ιστολογικό	Ιστολογικό	Ιστολογικό	Αλβουμίνη
στάδιο	στάδιο	στάδιο	στάδιο	
Αιμοσφαιρίνη	Σπληνομεγαλία		Σπληνομεγαλία	AST
Παρουσία	Αλκαλική			Κιρσορραγία
φλεγμονώδους	φωσφατάση			
νόσου εντέρου				

Μετά τη δημοσίευση των προγνωστικών μοντέλων της Mayo Clinic (484), του King's College (615), του αναθεωρημένου μοντέλου της Mayo Clinic (616), και του Σουηδικού μοντέλου (522), η ομάδα της Cleveland Clinic ανακοίνωσε πως η ταξινόμηση κατά Child-Pugh προσφέρει αρκετές προγνωστικές πληροφορίες χωρίς να απαιτείται ο υπολογισμός πολυπλοκότερων μαθηματικών μοντέλων (618). Μεταγενέστερες μελέτες της Mayo Clinic υποστήριξαν τα πλεονεκτήματα χρησιμοποίησης του Mayo model (619), και πρότειναν το 2000 ένα νέο, αναθεωρημένο μοντέλο, που είχε το σημαντικό πλεονέκτημα ότι (ορθώς λόγω των μη διάχυτων ιστολογικών βλαβών) δεν περιελάμβανε το ιστολογικό στάδιο της νόσου, άρα μπορούσε να υπολογιστεί ανεξάρτητα από την ανάγκη βιοψίας ήπατος (617). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ασθενείς με ΠΣΧ έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης χολαγγειοκαρκινώματος, η αναφερόμενη συχνότητα εμφάνισης του οποίου κυμαίνεται μεταξύ 6 και 30%. Οι ασθενείς με ΠΣΧ και χολαγγειοκαρκίνωμα έχουν πολύ κακή πρόγνωση με διάμεση επιβίωση που ανέρχεται σε 5 έως 11 μήνες (510, 512, 620). Ταυτόχρονα, ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του εντέρου και του παγκρέατος ήταν 4 και 14 φορές αντίστοιχα μεγαλύτερος σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (513).

### **5.2.0 Θεραπεία ΠΣΧ**

Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει ειδική θεραπεία που να καθυστερεί ή και να αναστρέφει την πορεία της νόσου. Πολλές μελέτες έχουν γίνει σχετικά με τα αποτελέσματα της χρήσης UDCA σε ασθενείς με ΠΣΧ (621-629). Στις περισσότερες από αυτές φαίνεται να υπάρχει βιοχημική ή ιστολογική ανταπόκριση, χωρίς ωστόσο να βελτιώνει τη διάμεση επιβίωση. Άλλες θεραπευτικές στρατηγικές που έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί είναι η χρήση d-πενικιλλαμίνης, ανοσοκατασταλτικών, αντινωτικών,



νικοτίνης, πεντόξυφυλλίνης, μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά TNFα, και η εφαρμογή συνδυασμένης θεραπείας (UDCA, αζαθειοπρίνη, πρεδνιζόνη ή βουδεσονίδη) (630, 631). Τα παραπάνω όμως σχήματα δεν επιφέρουν μεγάλα οφέλη στην επιβίωση του ασθενούς.

Μία τεχνική που επιτυγχάνει αποκατάσταση των βιοχημικών ανωμαλιών, χωρίς όμως επιβεβαιωμένη βελτίωση της επιβίωσης είναι η ενδοσκοπική σφιγκτηρεκτομή με προοδευτική διάταση του χοληφόρου δένδρου και τοποθέτηση πλέγματος, η οποία ωστόσο συνοδεύεται από σημαντικό κίνδυνο επιπλοκών (632).

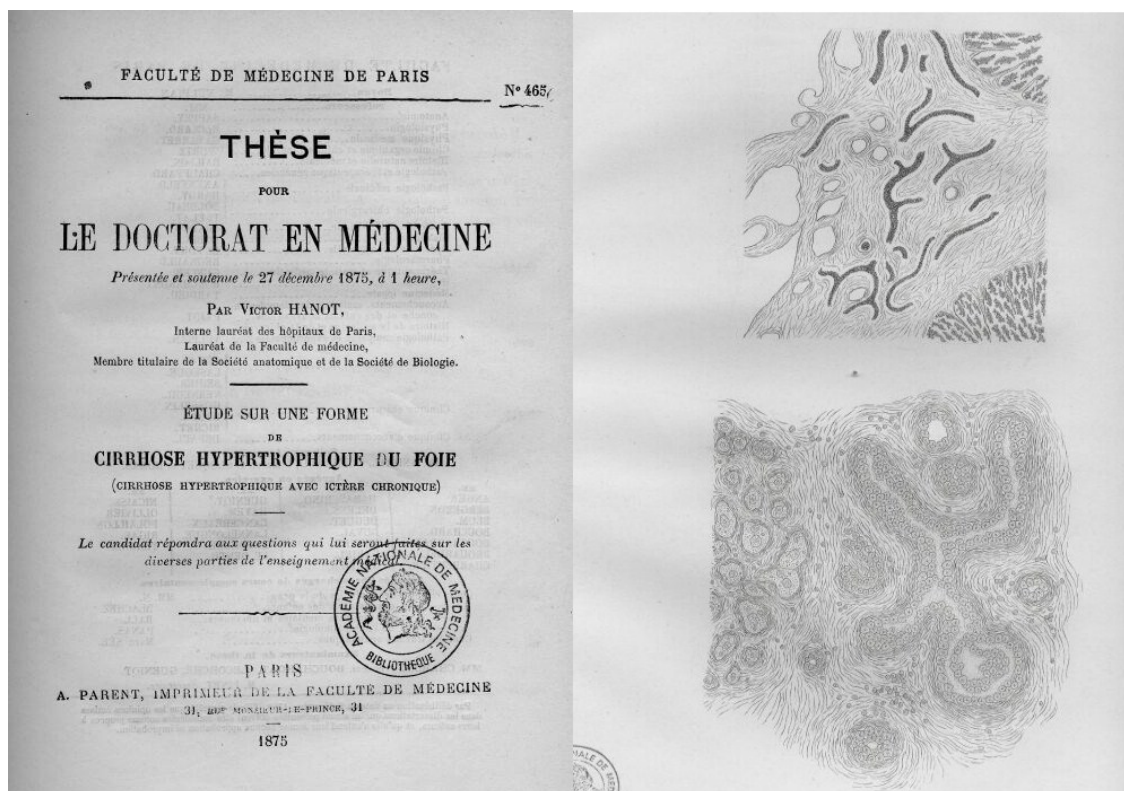
Σε ασθενείς τελικού σταδίου (προχωρημένη χολόσταση, πυλαία υπέρταση και επιπλοκές αυτής) έχει ένδειξη η μεταμόσχευση ήπατος, η οποία επιτυγχάνει πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα με πενταετή επιβίωση από 73 έως και 100% (633). Η επιλογή του βέλτιστου χρόνου κατά τον οποίο θα οδηγηθεί ο ασθενής σε μεταμόσχευση μπορεί να καθοριστεί με τη χρήση προγνωστικών μοντέλων, όπως το μοντέλο της Mayo Clinic, στο οποίο ένα σκορ άνω του 4 δηλώνει την ανάγκη για μεταμόσχευση. Σημαντικός παράγων που επηρεάζει την επιβίωση μετά τη μεταμόσχευση ήπατος είναι η ύπαρξη χολαγγειοκαρκινώματος, το οποίο μπορεί να επιβαρύνει την πρόγνωση, οδηγώντας σε ετήσια επιβίωση της τάξης του 30% (634).

Τέλος, σε ένα ποσοστό ασθενών που κυμαίνεται μεταξύ 8 και 20% μπορεί να παρατηρηθεί επανεμφάνιση της ΠΣΧ στο μόσχευμα. Προδιαθεσικός παράγων επανεμφάνισης ΠΣΧ στο μόσχευμα φαίνεται να είναι η συνυπάρχουσα ελκώδης κολίτιδα (635).

### 5.3 Πρωτοπαθής χολική κίρρωση (ΠΧΚ)

Η ΠΧΚ είναι μία αυτοάνοση χρόνια χολοστατική νόσος του ήπατος που χαρακτηρίζεται από φλεγμονώδη διήθηση και καταστροφή των μικρών ενδοηπατικών χοληφόρων πόρων οδηγώντας προοδευτικά σε κίρρωση και σε έκπτωση της ηπατικής λειτουργίας (636, 637). Η νόσος προσβάλλει κατά κύριο λόγο γυναίκες (με αναλογία ως προς τους άνδρες 6:1 έως 22:1) μέσης ηλικίας μεταξύ 40 και 60 ετών (638, 639).

Η πρώτη ιστορική περιγραφή της ΠΧΚ έγινε από τους Thomas Addison και William Gull το 1851 στην επιστημονική επιθεώρηση *Guys Hospital Report* με τίτλο: “On a certain affection of the Skin- Vitiligoidea- α plana, β tuberosa”(640). Σύμφωνα με μία ιστορική αναδρομή της Heathcote (641), η πρώτη πληρέστερη περιγραφή της νόσου έγινε το 1892 από τον Hanot στη μονογραφία : “La cirrhose hypertrophique avec ictère chronique”(642). Με βάση την προσωπική άποψη του γράφοντος, υπάρχει και παλαιότερη καταγραφή της νόσου από τον Hanot στη διδακτορική του διατριβή με τίτλο “ Étude sur une forme de cirrhose hypertrophique du foie (cirrhose hypertrophique avec ictère chronique)”, που δημοσιεύτηκε το 1875 (Εικόνα 42) (643).



**Εικόνα 42. Διδακτορική διατριβή του Hanot, στην οποία περιγράφει την ΠΧΚ. Αριστερά: σελίδα τίτλου; Δεξιά: Σχέδιο του Hanot που απεικονίζει την ιστολογική εικόνα της νόσου (643).**

Από τις σχετικές δημοσιεύσεις προκύπτει ότι τη δεκαετία του 1930 υπήρχε έντονο ενδιαφέρον για αυτή την κλινική οντότητα, για την οποία είχε προταθεί η ονομασία κίρρωση του Hanot, αλλά και σημαντική ασάφεια όσον αφορά στα παθολογοανατομικά ευρήματα που τη στοιχειοθετούν. Ερευνητές είχαν προτείνει διάφορες ονομασίες για τη νόσο με βάση την ιστολογική εικόνα όπως «Χρόνια Ενδοηπατική Καταστροφική Χολαγγειίτις», «Χολαγγειολιτική Κίρρωση», «Ξανθοματώδης Χολική Κίρρωση» και «Περιολλοαγγειολιτική Χολική Κίρρωση». Με βάση την ανασκόπηση της Heathcote ο όρος ΠΧΚ αποδίδεται στους Ahrens et al που δημοσίευσαν το Δεκέμβριο του 1950 ομώνυμη εργασία στην ιατρική επιθεώρηση της Βαλτιμόρης Medicine (644). Φαίνεται όμως ο όρος να πρωτοχρησιμοποιείται από τους Dauphinee και Sinclair στο Canadian Medical Association Journal και από τους

Ahrens et al στο Journal of Clinical Investigation την ίδια περίπου χρονική περίοδο (645, 646).

Το 1959 η Sheila Sherlock δημοσίευσε μία σειρά 42 ασθενών με ΠΧΚ που παρακολουθήθηκαν για 15 έτη, που μας έδωσε σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά στην κλινική εικόνα και τη φυσική ιστορία της νόσου. Όπως και σε προηγούμενες σειρές, ένα σημαντικό μειονέκτημα της συγκεκριμένης έρευνας ήταν η απουσία διαγνωστικών εξετάσεων για να διαπιστώνεται η ενδοηπατική ή η εξωηπατική απόφραξη των χοληφόρων. Η διάγνωση ετίθετο μετά από διεγχειρητικό έλεγχο του χοληφόρου δέντρου και σε ορισμένες περιπτώσεις βιοψία ήπατος (647).

Μία σημαντική παρατήρηση των Walker et al που δημοσιεύτηκε το 1965 έμελλε να αλλάξει τον τρόπο διάγνωσης της νόσου. Οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι ο ορός ασθενών με ΠΧΚ έδινε ένα χαρακτηριστικό πρότυπο κοκκιώδους κυτταροπλασματικού φθορισμού σε ιστικές τομές κρυοστάτη από θυρεοτοξικό θυρεοειδή αδένα και από βλεννογόνο του θόλου του στομάχου, που αργότερα αποδόθηκε στην ύπαρξη AMA (648). Η μέθοδος έδειξε ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα και γρήγορα καθιερώθηκε για τη διάγνωση της ΠΧΚ, ώστε ακόμη και σήμερα, η ανίχνευση AMA με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού να αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο στη διάγνωση της ΠΧΚ.

### **5.3.α Επιδημιολογία της ΠΧΚ**

Πρώιμα επιδημιολογικά δεδομένα για την ΠΧΚ, που αφορούν στο γενικό πληθυσμό και όχι σε σειρές ασθενών, έχουμε το 1974 όταν οι Hamlyn και Sherlock δημοσίευσαν δεδομένα για τη θνησιμότητα από τη νόσο στην Αγγλία και την Ουαλία (649). Στη μελέτη αυτή επιβεβαίωσαν την παρατήρηση ότι ο επιπολασμός της νόσου είναι σημαντικά υψηλότερος στις γυναίκες, ενώ παρατήρησαν και συσχέτιση της

νόσου με ανώτερα κοινωνικά στρώματα. Ακόλουθες επιδημιολογικές μελέτες που αφορούσαν στα έτη 1970 έως 1986 υπολόγισαν ότι η μέση ετήσια επίπτωση της ΠΧΚ στην Ευρώπη ανερχόταν σε 0,6 έως 13,7 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού (Πίνακας 12) (649-656).

**Πίνακας 12. Πρώιμες επιδημιολογικές μελέτες της ΠΧΚ στην Ευρώπη**

<i>Περιοχή Μελέτης</i>	<i>Διάρκεια Μελέτης</i>	<i>Αριθμός Ασθενών με ΠΧΚ</i>	<i>Μέση Επίπτωση (ανά εκατομμύριο)</i>	<i>Επιπολασμός (ανά εκατομμύριο)</i>
England & Wales (649)	1967-1971	165	0.6	Δεν αναφέρεται
Tayside, Scotland (654)	1975-1979	21	10.6	40.2
Sheffield, England (655)	1977-1979	34	5.8	54.0
10 Ευρωπαϊκές Χώρες (656)	1981	569	4.0	23.1
Newcastle, England (651)	1972-1979	117	5.9	55.3
Malmö, Sweden (650)	1973-1982	33	13.7	96
Catalonia, Spain (653)	1971-1980	106	3.0	11.1
Orebro, Sweden (652)	1976-1983	26	13.7	128

Νεότερες επιδημιολογικές έρευνες που επακολούθησαν προσδιόρισαν την ετήσια επίπτωση της νόσου μεταξύ 0,7 και 49 περιπτώσεων ανά εκατομμύριο πληθυσμού και τον επιπολασμό της νόσου μεταξύ 6.7 και 402 περιπτώσεων ανά εκατομμύριο πληθυσμού (323, 657-674). Οι μελέτες αυτές χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια του εκάστοτε μελετώμενου πληθυσμού (καθώς αφορούν πληθυσμούς όχι μόνο από την Ευρώπη, αλλά και τη Βόρειο Αμερική, την Αυστραλία, τη Μέση Ανατολή και την Ασία) αλλά και των κριτηρίων διάγνωσης της ΠΧΚ. Ορισμένες εξ αυτών επανεξέτασαν πληθυσμούς που αποτέλεσαν αντικείμενο των πρώιμων μελετών και διαπίστωσαν ότι σε κάθε περίπτωση αυξήθηκε τόσο ο επιπολασμός όσο και η επίπτωση της ΠΧΚ μεταξύ πρώιμης και νεότερης μελέτης, είτε πιθανόν λόγω

αυξημένης ευαισθησίας των διαγνωστικών εργαλείων για την ανίχνευση της ΠΧΚ, είτε λόγω πραγματικής αύξησης της συχνότητας της νόσου.

Η ύπαρξη αρκετών επιδημιολογικών μελετών από τη Μεγάλη Βρετανία δίνει σημαντικά στοιχεία για αυτή την αύξηση της συχνότητας της ΠΧΚ συν τω χρόνω. Στην περιοχή του Sheffield ενώ η επίπτωση της ΠΧΚ ήταν 5.8 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο κατοίκων στα τέλη της δεκαετίας του 1970 (655), το διάστημα 1987 υπολογίστηκε σε 20.5 περιπτώσεις και παρέμεινε σταθερή έως το 1999 (675). Αντίστοιχα, ο επιπολασμός της νόσου από 54 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο το 1977 αυξήθηκε σε 57 περιπτώσεις το 1987, 136 περιπτώσεις το 1993 και 238 περιπτώσεις το 1999.

Παρομοίως, στην περιοχή του Tayside της Σκωτίας, η ετήσια επίπτωση της ΠΧΚ αυξήθηκε από 48 σε 55 νέες περιπτώσεις ανά εκατομμύριο τη δεκαετία 1986-1996 (674), ενώ στα τέλη της δεκαετίας του 1970 ήταν περίπου 10,6 ανά εκατομμύριο (654, 676). Ο επιπολασμός της ΠΧΚ αντίστοιχα παρουσίασε αύξηση από 40,2 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο το 1980 σε 186 περιπτώσεις το 1986 και 379 περιπτώσεις το 1996 (674).

Τέλος, διάφορες μελέτες που διενεργήθηκαν στη βορειοανατολική Αγγλία καταλήγουν σε παρόμοια συμπεράσματα με την ετήσια επίπτωση να τριπλασιάζεται από το 1976 στο 1994 και τον επιπολασμό να υπερδεκαπλασιάζεται (662, 665, 668). Κοινό χαρακτηριστικό των παραπάνω μελετών πέραν της αύξησης της επίπτωσης είναι ο δυσανάλογα αυξημένος επιπολασμός που μάλλον αντανακλά τη σημαντική πρόοδο των θεραπευτικών μεθόδων για τη νόσο.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό της ΠΧΚ που καθίσταται σαφές από τις υπάρχουσες επιδημιολογικές μελέτες είναι οι σημαντικές γεωγραφικές διακυμάνσεις του επιπολασμού της. Συχνά παρατηρούνται περιοχές με αυξημένο επιπολασμό της νόσου

που καλούνται γεωγραφικοί θύλακοι της νόσου (geographical clusters). Σε μία ανασκόπηση 14 επιδημιολογικών μελετών που αφορούσαν διάφορες περιοχές της Ευρώπης, της Αυστραλίας και του Καναδά, η ύπαρξη τέτοιων έντονων διακυμάνσεων της κατανομής της ΠΧΚ διαπιστώθηκε στις 11 από τις 14 μελέτες (677). Συγκρίνοντας δύο μελέτες για την Εσθονία και τη Σουηδία διαπιστώθηκε ότι το φαινόμενο των γεωγραφικών θυλάκων παρατηρείται σε περιοχές και των δύο χωρών, παρότι η συχνότητα της νόσου διαφέρει σημαντικά μεταξύ τους (εξαπλάσια επίπτωση και πενταπλάσιος επιπολασμός στη Σουηδία) (661, 670). Συγκεκριμένα, ο επιπολασμός της ΠΧΚ στην περιοχή Viljandi της Εσθονίας ήταν τριπλάσιος από ότι στην υπόλοιπη χώρα (670), ενώ στην περιοχή Vaterbotten της Σουηδίας η συχνότητα εμφάνισης της ΠΧΚ ανέρχεται στο ήμισυ της συχνότητας εμφάνισης σε άλλες περιοχές της Σουηδίας (661). Αντίστοιχα, ευρήματα προκύπτουν από μία επιδημιολογική έρευνα στη βόρεια Αγγλία που διαπίστωσε συσσώρευση κρουσμάτων της νόσου σε αστικά κέντρα (678), ενώ ο επιπολασμός στη Νέα Υόρκη φαίνεται να είναι αυξημένος σε ορισμένες γεωγραφικές περιοχές και να εμφανίζει συσχέτιση με περιοχές εναπόθεσης τοξικών λυμάτων (679).

Επιδημιολογικές μελέτες σε χώρες με σημαντικό ποσοστό μεταναστευτικών πληθυσμών υποδεικνύουν ότι η διαφορετική γεωγραφική κατανομή της ΠΧΚ μπορεί να είναι αποτέλεσμα τόσο περιβαλλοντικών όσο και γενετικών παραγόντων. Μία Αυστραλιανή μελέτη διαπίστωσε ότι αν και ο επιπολασμός της ΠΧΚ στην επαρχία της Βικτώρια ανέρχεται σε 51 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού, σε ειδικές ομάδες όπως μετανάστες από τη Μεγάλη Βρετανία, την Ελλάδα και την Ιταλία, είναι τρεις έως τέσσερις φορές μεγαλύτερος (παρότι μικρότερος από τον επιπολασμό της νόσου στη χώρα προέλευσης), καταδεικνύοντας τη σημασία του γενετικού υποβάθρου στην εκδήλωση της νόσου (680). Αντίστοιχα, η συχνότητα εμφάνισης της

ΠΧΚ σε άτομα νοτιοασιατικής καταγωγής που κατοικούν στο Birmingham της Μεγάλης Βρετανίας προσεγγίζει εκείνη των γηγενών κατοίκων, παρότι η νόσος είναι εξαιρετικά σπάνια στην νότιο Ασία, καταδεικνύοντας τη σημασία των περιβαλλοντικών παραγόντων (658).

### **5.3.β Κλινική εικόνα της ΠΧΚ**

Η κλινική εικόνα της ΠΧΚ έχει μεταβληθεί τα τελευταία χρόνια σε σχέση με τις κλασικές περιγραφές της νόσου. Εξαιτίας της αυξημένης ευαισθητοποίησης των κλινικών ιατρών, της εισαγωγής των AMA στη διάγνωση της νόσου και της ευρύτατα διαδεδομένης χρήσης του εργαστηριακού ελέγχου της ηπατικής βιοχημείας, η διάγνωση της ΠΧΚ γίνεται σε ολοένα προωμότερα κλινικά στάδια, με αποτέλεσμα να αυξάνεται σταθερά ο αριθμός των ασθενών με ασυμπτωματική νόσο (681).

#### *Ασυμπτωματική νόσος*

Ενώ πριν από μία δεκαετία το ποσοστό των ασθενών με ασυμπτωματική ΠΧΚ ανερχόταν σε 40% (639, 682, 683), νεότερες κλινικές μελέτες ανευρίσκουν ποσοστό ασυμπτωματικών ασθενών που ανέρχεται στο 60% (666, 684, 685) (Πίνακας 13). Η τάση αυτή μείωσης των ασθενών με συμπτωματική ΠΧΚ είναι εντονότερη στην Αμερική, την Ιαπωνία και τη Δυτική Ευρώπη, ενώ σε μελέτες από την Ινδία, τη Λιθουανία, το Χονγκ Κονγκ και τη Σιγκαπούρη τα ποσοστά συμπτωματικής ΠΧΚ παραμένουν υψηλά (686-689).

Γενικά οι ασυμπτωματικοί ασθενείς διαγιγνώσκονται όταν κατά τη διάρκεια συνήθους εργαστηριακού ελέγχου παρουσιάσουν αυξημένες τιμές αλκαλικής φωσφατάσης ή γGT ή ολικής χοληστερόλης, ή στα πλαίσια διερεύνησης κάποιου άλλου συνοδού νοσήματος (681).



**Πίνακας 13. Κλινική εικόνα κατά τη διάγνωση της ΠΧΚ (681)**

Εργασία Έτος	Διάρκεια μελέτης	Σομπτωματικοί	Κόπωση	Ίκτερος	Κνησμός	Άλγος Υποχονδρίου	Ασκίτης	Κίρσοι	Ηπατομεγαλία	Σπληνομεγαλία
Sherlock et al 1973 (638)	1965- 1972	-	0	33	57	0	1	3	3	3
Long et al 1977 (690)	1975	-	-	-	-	-	-	-	35	10
Christensen et al 1980 (691)	1971- 1977	93	8	12	47	7	2	6	-	-
James et al 1981 (692)	1974- 1981	52	0	16	18	-	2	7	-	-
Kapelman et al 1981 (693)	1958- 1981	63	12	9	39	1	2	1	48	24
Eriksson et al 1984 (650)	1973- 1982	54	-	9	48	-	9	-	33	15
Crowe et al 1985 (694)	-	68	5	11	35	5	6	7	-	-
Nyberg et al 1989 (695)	1979- 1986	30	11	4	28	8	1	-	1	-
Witt-Sullivan et al 1990 (673)	1986- 1988	71	81	23	66	34	-	-	-	-
Mitchison et al 1990 (682)	1966- 1984	74	-	-	-	-	-	-	4	-
Rydning et al 1990 (683)	1970- 1986	80	47	23	49	45	8	0 <sup>*</sup> 2 5 <sup>#</sup>	49	17 <sup>#</sup>
Mahl et al 1994 (639)	1955- 1979	87	-	52	-	-	7	-	71	43
Invernizzi et al 1997 (696)	1974- 1994	38	-	-	-	-	-	-	-	-

Springer et al 1999 (697)	1983- 1994	0	20	-	-	10	-	-	10	7
Kim et al 2000 (666)	1975- 1995	20	-	20	20	-	-	-	-	-
Uddenfeldt et al 2000 (698)	1983	63	-	-	41	-	2	7	34	20
Prince et al 2002 (685)	1987- 1994	39	21	3	19	8	3	1 <sup>#</sup>	-	-
Nakano et al 2002 (684)	1968- 1998	30	-	30	30	-	-	-	-	-
Leuschner et al 2003 (699)	-	58	-	-	-	-	0 <sup>*</sup>	-	29 <sup>*</sup>	11 <sup>*</sup>
Sood et al 2004 (680)	1990- 2002	50	30	5	20	16	-	-	-	-
Wong et al 2005 (687)	1996- 2004	69	21	18	41	13	5	5	-	10
Delgado et al 2005 (700)	1993- 2004	70	70	-	36	-	-	-	-	-
Sarin et al 2006 (686)	1993- 2002	80	70	67	80	-	40	20	87	33
Peters et al 2007 (701)	1989- 1998	-	-	5	-	-	3	4	28	13
Pla et al 2007 (702)	1990- 2002	38	11	1	23	-	2	2	-	-
Wong et al 2008 (689)	1990- 2005	53	15	27	18	12	-	-	-	-
Speiciene et al 2007 (688)	1984- 2004	70	12	28	61	5	-	-	-	-

\*: Ασυμπτωματική ΠΧΚ, #: Συμπτωματική ΠΧΚ

Στους περισσότερους ασυμπτωματικούς ασθενείς η φυσική εξέταση παρουσιάζει πτωχά ευρήματα. Αρκετοί από αυτούς εμφανίζουν ηπατομεγαλία, η οποία έχει αναφερθεί ότι μπορεί να εμφανίζεται με συχνότητα μεγαλύτερη από 50% (639), ενώ σε άλλες μελέτες η συχνότητα εμφάνισης της ηπατομεγαλίας κυμαίνεται από 4 έως

31% (650, 682, 683, 697). Σπληνομεγαλία παρατηρείται στο 5 έως και 25% των ασυμπτωματικών ασθενών.

Η νόσος μπορεί να διαδράμει ασυμπτωματικά για έτη πριν την εμφάνιση συμπτωμάτων. Η απουσία συμπτωμάτων δεν συνδυάζεται πάντα με πρώιμα στάδια της νόσου, ενώ δεν έχουν βρεθεί προγνωστικοί παράγοντες για την εμφάνιση συμπτωμάτων (697).

#### *Συμπτωματική νόσος*

Ο έντονος και γενικευμένος κνησμός αποτελεί συνήθως το πρώτο σύμπτωμα. Ο κνησμός μπορεί να προηγείται μέχρι και δύο χρόνια από την εμφάνιση του ίκτερου.

Σύμφωνα με μελέτη που στηρίχθηκε σε αναφορές ασθενών μέσω του διαδικτύου, κατεξοχήν γυναικών, οι υποκειμενικοί χαρακτήρες του κνησμού ήταν οι ακόλουθοι: το 69% των ασθενών ανέφεραν την ύπαρξη κνησμού, στα τρία τέταρτα δε αυτών ο κνησμός είχε εμφανισθεί πριν τη διάγνωση της ΠΧΚ. Το 60% των ασθενών ανέφερε ότι ο κνησμός επιδειωνόταν με τη θερμότητα, ενώ στο 65% ο κνησμός βελτιωνόταν με δροσερά επιθέματα. Σε ίδιο ποσοστό οι ασθενείς ανέφεραν ότι ο κνησμός επιδειωνόταν κατά τη διάρκεια της νύχτας. Τέλος, στην πλειοψηφία των ασθενών ο κνησμός δεν ήταν καλά ανεκτός, αφού στο 75% επηρέαζε την ποιότητα του ύπνου, σε ποσοστό 17.6% ήταν αφόρητος, ενώ το 3.6% ανέφερε την ανάπτυξη δρυφάδων εξαιτίας έντονου κνησμού (703).

Αν και ο κνησμός είναι καθαρά υποκειμενικός και είναι δύσκολο να ποσοτικοποιηθεί, η απάντηση στον κνησμό (ξύσιμο του ασθενούς) είναι καλά διατηρημένη και στερεότυπη και μπορεί ευκολότερα να καταγραφεί σε σχέση με την απάντηση των ασθενών σε άλλα συμπτώματα. Σε μία κλινική μελέτη που χρησιμοποίησε το ξύσιμο των ασθενών για την ποσοτικοποίηση του κνησμού διαπιστώθηκε ότι σε ορισμένους

ασθενείς ο κνησμός εμφάνιζε περιοδικότητα διάρκειας 24 ωρών, θέτοντας την υπόνοια ότι ο κνησμός ακολουθεί τον κιρκάδιο ρυθμό (704). Αν και σε τουλάχιστον μία μελέτη διαπιστώθηκε συσχέτιση του κνησμού με βιοχημικά και κλινικά δεδομένα (αλκαλική φωσφατάση ορού και Mayo risk score) (705), η σχέση αυτή δεν έχει αποδειχθεί επαρκώς (706).

Παλαιότερα ο κνησμός της νόσου αποδιδόταν στην αυξημένη συγκέντρωση των χολικών αλάτων στο διάμεσο υγρό των ιστών (κνησμός περιφερικής αιτιολογίας). Η θεωρία αυτή για την προέλευση του κνησμού στηριζόταν στο ότι είχαν απομονωθεί χολικά άλατα από δερματικές επιφάνειες ασθενών με κνησμό που σχετίζονταν και με την ένταση του κνησμού και στην παρατήρηση ότι η χορήγηση χολικών αλάτων μπορεί να προκαλέσει κνησμό (707, 708).

Ωστόσο, υπάρχουν κλινικές παρατηρήσεις που αποδυναμώνουν το ρόλο των χολικών αλάτων ως γενεσιουργό αίτιο του κνησμού: α) ενίοτε ο κνησμός μπορεί να υποχωρεί παρά την παραμονή της χολόστασης και των υψηλών επιπέδων χολικών αλάτων στο πλάσμα (709), β) σε αρκετούς ασθενείς με χολόσταση και αυξημένα επίπεδα χολικών οξέων μπορεί να μην εμφανίζεται κνησμός (709) και, γ) η απουσία συσχέτισης μεταξύ επιπέδων χολικών αλάτων δέρματος και εμφάνισης ή βαρύτητας κνησμού σε μεταγενέστερες και καλύτερα σχεδιασμένες μελέτες (710). Ακόμη, φαίνεται ότι οι ιοντοανταλλακτικές ρητίνες, χολεστυραμίνη και κολεστιπόλη, που δεσμεύουν τα χολικά άλατα, μπορούν να καταπραΰνουν τον κνησμό και σε άλλες παθήσεις στις οποίες ο κνησμός δε σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα χολικών αλάτων, όπως την ουραιμία και την αληθή πολυκυτταραιμία. Σύμφωνα με μία εναλλακτική υπόθεση, ενδέχεται τα χολικά άλατα να μην υπεισέρχονται στη διέγερση περιφερικών νευρικών απολήξεων αλλά ο κνησμός μπορεί να οφείλεται στη τοξική επίδραση των χολικών αλάτων στα ηπατοκύτταρα που οδηγεί στη διαφυγή ουσιών με κνησμογόνο δράση

(711). Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται και από την αποτελεσματικότητα της ριφαμπικίνης για την καταπολέμηση του ίκτερου, της οποίας η δραστικότητα έγκειται στην αναστολή της πρόσληψης χολικών αλάτων από τα ηπατοκύτταρα (712).

Σήμερα ο κνησμός αποδίδεται στα ενδογενή οπιοειδή και στον αυξημένο τόνο που παρουσιάζουν οι υποδοχείς τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα σε παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από χολόσταση (713). Πράγματι, έχει βρεθεί ότι η χορήγηση ανταγωνιστών των οπιοειδών σε ασθενείς με ΠΧΚ, προκαλεί κλινική συνδρομή προσομοιάζουσα με στερητικά φαινόμενα, ενώ βελτιώνει σημαντικά τον κνησμό (714). Σύμφωνα με κλινικές μελέτες η χορήγηση ανταγωνιστών των οπιοειδών μπορεί να βελτιώσει τον κνησμό σε ποσοστό έως και 90% (715). Φαίνεται ότι παθοφυσιολογικά η χολόσταση συνδέεται με τον αυξημένο τόνο των κεντρικών υποδοχέων των οπιοειδών μέσω της παραγωγής ενδογενών οπιοειδών από το ήπαρ (716).

Επιπλέον, έχει ενοχοποιηθεί και διαταραχή του τόνου των σεροτονινεργικών υποδοχέων του κεντρικού νευρικού συστήματος. Συχνά ο κνησμός μπορεί να εμφανίζεται για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της κύησης και σε αντιδιαστολή με τη χολόσταση του τρίτου τριμήνου της εγκυμοσύνης μπορεί να επιμένει και μετά τον τοκετό (715).

Ένα άλλο κυρίαρχο σύμπτωμα της νόσου, που πολλές φορές μπορεί να είναι και το μοναδικό, αποτελεί το αίσθημα χρόνιας κόπωσης η οποία μπορεί να είναι σημαντικού βαθμού και δεν αποδίδεται στα πλαίσια της χρόνιας νόσου.

Η κόπωση δεν εξαρτάται από την ηλικία, τη διάρκεια της νόσου και τη βαρύτητα της ηπατικής νόσου όπως αυτή υπολογίζεται με την ολική χολερυθρίνη και το Mayo risk score, αλλά φαίνεται να συσχετίζεται με την ποιότητα του ύπνου και την ύπαρξη

κατάθλιψης (717). Η κόπωση επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα ζωής και την καθημερινή δραστηριότητα των ασθενών με ΠΧΚ (673).

Άλλοτε οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάζουν κατά τη διάγνωση σημεία πυλαίας υπέρτασης, όπως κιρσούς οισοφάγου σε ποσοστό περί το 5 έως 7 % στις μεγαλύτερες σύγχρονες μελέτες (Πίνακας 13).

Αν και η παρουσία κιρσών οισοφάγου και πυλαίας υπέρτασης μπορεί να υποδηλώνει την ύπαρξη μη αντιρροπούμενης κίρρωσης, πυλαία υπέρταση και κιρσοί οισοφάγου μπορούν να παρατηρηθούν στην ΠΧΚ και χωρίς την παρουσία κίρρωσης, εξαιτίας πυλαίας υπέρτασης προκολποειδικής αιτιολογίας (6, 718). Επομένως, σε ασθενείς με αριθμό αιμοπεταλίων μικρότερο των  $200.000 /\text{mm}^3$ , συγκέντρωση λευκοματίνης μικρότερη από 4 g/dL και χολερυθρίνης άνω των 1,16 mg/dL θα πρέπει να γίνεται περιοδικός έλεγχος για την ύπαρξη κιρσών οισοφάγου, άσχετα με το ιστολογικό στάδιο της νόσου (719). Φαίνεται ότι η παρουσία κιρσών οισοφάγου χαρακτηρίζεται από χειρότερη πρόγνωση σε κατά τα άλλα ασυμπτωματικούς ασθενείς με ΠΧΚ (720), και συνδέεται με αυξημένη επίπτωση ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (721).

Η παρουσία σημείων πυλαίας υπέρτασης και ικτέρου αποτελούν όψιμα ευρήματα. Ενώ πριν από 5 δεκαετίες περίπου το 80% των ασθενών με ΠΧΚ εμφάνιζαν ίκτερο κατά τη διάγνωση της νόσου, σήμερα το ποσοστό αυτό ανέρχεται μόλις σε 5% (Πίνακας 13). Στο Πίνακα 13 όμως παρατηρούμε ότι σε ορισμένες χώρες ο ίκτερος μπορεί να αποτελεί σύμπτωμα της νόσου κατά τη διάγνωση σε πάνω από το ένα τέταρτο των ασθενών (686, 688). Όχι σπάνια σε αυτό το στάδιο η νόσος μπορεί να επιπλέκεται από στεατόρροια και ανεπάρκεια λιποδιαλυτών βιταμινών. Τα επίπεδα των βιταμινών A, D και ιδίως E έχουν βρεθεί μειωμένα στον ορό ορισμένων ασθενών με ΠΧΚ ακόμη και πριν από την εμφάνιση του ίκτερου (722). Η οστεομαλακία αν και έχει περιγραφεί σε ασθενείς με ΠΧΚ, παρατηρείται σπανιότατα καθώς οι

περισσότεροι των ασθενών οδηγούνται σε μεταμόσχευση ήπατος πριν από την εμφάνιση αυτής της επιπλοκής του παρατεταμένου βαθέος ίκτερου (723).

Η συσχέτιση της οστεοπόρωσης με την ΠΧΚ έχει περιγραφεί από παλιά. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες η πρόοδος στην μέτρηση της οστικής πυκνότητας με τη μέθοδο DEXA (διπλοενεργειακή απορροφησιομετρία ακτίνων X) στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και στον αυχένα του μηριαίου οστού βοήθησαν στην καλύτερη εκτίμηση του επιπολασμού της οστεοπόρωσης στην ΠΧΚ (724). Ο επιπολασμός της νόσου σε μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν ιστομορφομετρικά κριτήρια κυμαινόταν από 9 έως 60%, με τις σημαντικότερες μελέτες να τον προσδιορίζουν περί το 35% (Πίνακας 14).

**Πίνακας 14. Συχνότητα εμφάνισης οστεοπόρωσης σε ασθενείς με ΠΧΚ**

<i>Συγγραφέας, Έτος</i>	<i>Πληθυσμός μελέτης</i>	<i>Οστεοπόρωση (%)</i>
Matloff et al 1982 (725)	10	90*
Cuthbert et al 1984 (726)	11	9*
Hodgson et al 1985 (727)	13	46*
Stellon et al, 1987 (728)	30	37*
Mitchison et al, 1989 (729)	25	12
Guañabens et al, 1990 (730)	20	35*
Guañabens et al, 1994 (731)	38	45
Lindor et al, 1995 (732)	88	35
Pereira et al, 1999 (733)	36	17
Springer et al, 2000 (734)	72	24
Menon et al, 2001 (735)	176 (147 γυναίκες)	20
Newton et al, 2001 (736)	272 (255 γυναίκες)	31
Pares et al, 2001 (737)	61	21
Le Gars et al, 2002 (738)	40	32
Guichelaar et al, 2002 (739)	22	32
Solerio et al, 2003 (740)	133	35
Pereira et al, 2004 (741)	42	21
Guañabens et al, 2005 (742)	142	32
Guichelaar et al, 2006 (743)	156 (135 γυναίκες)	44
Pares et al, 2008 (724)	185	32

\*: Ιστομορφομετρικά κριτήρια οστεοπόρωσης

Σε μεταγενέστερες μελέτες που χρησιμοποιήθηκε οστική πυκνομετρία η συχνότητα της οστεοπόρωσης σε ασθενείς με ΠΧΚ εκτιμήθηκε περίπου 30%, ενώ διαπιστώνεται ότι η συχνότητα εμφάνισης της οστεοπόρωσης εμφανίζει συσχέτιση με τη βαρύτητα της ΠΧΚ, καθώς ασθενείς σε προχωρημένα στάδια ΠΧΚ έχουν πενταπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης οστεοπόρωσης σε σχέση με ασθενείς σταδίου 1 ή 2 (735).

Η βαρύτητα της νόσου σχετίζεται με την εμφάνιση οστεοπόρωσης και έχει βρεθεί ότι η μείωση του πάχους των οστικών δοκίδων και ο οστικός καταβολισμός είναι ανάλογοι του βαθμού της ηπατικής ανεπάρκειας και της χολόστασης (744), ενώ οι ασθενείς με την πιο βαριά χολόσταση εμφανίζουν σημαντικότερη απώλεια οστικής μάζας. Ως εκ τούτου έχει προταθεί ότι η χολόσταση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της οστεοπόρωσης (724). Η χολόσταση συντελεί σε μειωμένη απορρόφηση ασβεστίου από το γαστρεντερικό σύστημα και σε ανεπάρκεια βιταμίνης Κ και D. Η βιταμίνη Κ συμμετέχει στη διαδικασία καρβοξυλίωσης των γλουταμικών ριζών της οστεοκαλσίνης, η οποία έχει σημαντικό ρόλο στην προσθήκη ασβεστίου στα οστά. Ο ρόλος της βιταμίνης Κ επιβεβαιώνεται από το εύρημα της βελτίωσης της οστικής πυκνότητας με συμπληρωματική λήψη της (745). Η ανεπάρκεια της βιταμίνης D σε συνδυασμό με τη μειωμένη απορρόφηση ασβεστίου από το γαστρεντερικό οδηγούν στην ανάπτυξη δευτεροπαθούς υπερπαραθυρεοειδισμού που επιτείνει την απώλεια οστικής μάζας (727).

Επίσης στην παθογένεια της οστεοπόρωσης στους ασθενείς με ΠΧΚ φαίνεται να διαδραματίζουν ρόλο παράγοντες όπως η οστεοπροτεγερίνη, ο παράγοντας αύξησης τύπου ινσουλίνης I (IGF-I) και η γενετική προδιάθεση (γονίδια VDR, COLIA1) (724).

Ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος είναι η συχνότερη κακοήθεια σε ασθενείς με ΠΧΚ. Συνήθως εμφανίζεται όψιμα στην κλινική πορεία της νόσου, ιδιαίτερα σε



ηλικιωμένους, άνδρες και ασθενείς με πυλαία υπέρταση ή κίρρωση (721, 746). Σύμφωνα με μία μελέτη, ο κίνδυνος που διατρέχουν οι ασθενείς με ΠΧΚ να αναπτύξουν ηπατοκυτταρικό καρκίνο είναι παρόμοιος με τον κίνδυνο των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C (747), και είναι ιδιαίτερα αυξημένος σε ασθενείς με προχωρημένο ιστολογικό στάδιο της νόσου (748, 749). Πέραν του ηπατοκυτταρικού καρκίνου, υπάρχουν αναφορές για αυξημένη επίπτωση και άλλων κακοηθειών σε ασθενείς με ΠΧΚ, όπως ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του τραχήλου και του ενδομητρίου και λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα (749), ωστόσο εξαιτίας της έλλειψης σαφών επιδημιολογικών δεδομένων το κατά πόσον οι εξωηπατικές κακοήθειες εμφανίζονται με αυξημένη συχνότητα στους ασθενείς με ΠΧΚ σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, αποτελεί αντικείμενο αμφισβήτησης (750).

Οι ασθενείς με ΠΧΚ έχουν διάφορες διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων. Η χολόσταση που χαρακτηρίζει την ΠΧΚ προκαλεί τη μειωμένη έκκριση χολικών οξέων από το ήπαρ, με αποτέλεσμα τη μειωμένη εντερική απορρόφηση της χοληστερόλης, και τη μειωμένη ηπατική σύνθεση χοληστερόλης.

Η μειωμένη σύνθεση χοληστερόλης, ωστόσο, δε συνεπάγεται μείωση των επιπέδων χοληστερόλης ορού διότι ταυτόχρονα συμβαίνει και μείωση των λειτουργικών υποδοχέων της LDL στα ηπατοκύτταρα, εξαιτίας της ηπατικής βλάβης. Επομένως, η ολική χοληστερόλη αυξάνεται εξαιτίας της αυξημένης LDL που δεν προσλαμβάνεται από τα ηπατοκύτταρα (751). Η LDL χοληστερόλη αυξάνεται με τη βαρύτητα της ηπατικής βλάβης και έχει βρεθεί ότι τόσο η LDL χοληστερόλη όσο και η απολιποπρωτεΐνη Β εμφανίζουν σημαντική συσχέτιση με τα επίπεδα χολερυθρίνης ορού (752).

Η άνοδος των επιπέδων της χοληστερόλης στους ασθενείς με χολόσταση εκδηλώνεται με τα αυξημένα επίπεδα της λιποπρωτεΐνης-X (LP-X), η οποία είναι ένα

μόριο με παρόμοια πυκνότητα με την LDL, πλούσιο σε χοληστερόλη και φωσφολιπίδια (753). Πέραν των παραπάνω φαίνεται ότι η LP-X συμμετέχει στην υπερχοληστερολαιμία της ΠΧΚ μέσω αύξησης της ηπατικής σύνθεσης χοληστερόλης. Η πρόσληψη της χοληστερόλης από τα ηπατοκύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της δραστηριότητας της HMG Co-A αναγωγάσης και την ρύθμιση με αρνητική ανατροφοδότηση της ηπατικής σύνθεσης της χοληστερόλης. Ωστόσο, η διαταραγμένη ηπατική πρόσληψη της LP-X έχει ως αποτέλεσμα να μην αναστέλλεται η δραστηριότητα της HMG Co-A αναγωγάσης. Η LP-X έχειδειχθεί ότι αυξάνει στο διπλάσιο την HMG Co-A αναγωγή και πενταπλασιάζει τη δραστηριότητά της (754, 755). Έχει αποδειχθεί ότι η LP-X έχει αντιαθηρογόνες ιδιότητες, καθώς αναστέλλει την οξείδωση της LDL και αποτρέπει την βλαπτική επίδραση της οξειδωμένης LDL (oxLDL) στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επομένως, τα αυξημένα επίπεδα LP-X στο πλάσμα ασθενών με ΠΧΚ μπορεί να μειώνουν τον κίνδυνο αθηροσκλήρωσης (751). Ωστόσο, έχουν περιγραφεί επίπεδα LP-X τόσο υψηλά που να προκαλούν ιστική ισχαιμία εξαιτίας συνδρόμου υπεργλοιότητας (756). Πέραν της LDL, οι ασθενείς εμφανίζουν και διακυμάνσεις στα επίπεδα της HDL, η οποία είναι αυξημένη στα στάδια 1 και 2 της νόσου, ενώ είναι μειωμένη στο στάδιο 4 της νόσου (757, 758). Αντίθετα, στα τελευταία στάδια της νόσου οι ασθενείς έχουν υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων (759).



**Εικόνα 43. Παρουσία ξανθωμάτων σε ασθενείς με ΠΧΚ. Α. Ξανθώματα κατά μήκος του Αχιλλείου τένοντα. Β. Επίπεδα ξανθώματα παλαμιαίας επιφάνειας της άκρας χείρας**

Εξαιτίας της υπερχοληστερολαιμίας είναι δυνατόν οι ασθενείς με ΠΧΚ να παρουσιάζουν ξανθώματα, τα οποία είναι κίτρινες ή υποκίτρινες βλατίδες ή οζίδια που οφείλονται στη συσσώρευση αφρωδών κυττάρων, δηλαδή μακροφάγων που έχουν φαγοκυτταρώσει το λιπιδικό τμήμα των λιποπρωτεϊνών. Τα ξανθώματα μπορεί να εμφανίζονται ως λοβώδη οζίδια στους αγκώνες και τα γόνατα ή κατά μήκος των τενόντων (Εικόνα 43Α). Άλλοτε εμφανίζονται ως επίπεδα ξανθώματα στις πτυχές των παλαμών (Εικόνα 43Β) και άλλοτε ως εξανθηματικά ξανθώματα που εντοπίζονται κυρίως στους γλουτούς (760). Μία ιδιαίτερη μορφή επίπεδων ξανθωμάτων, είναι τα ξανθελάσματα που εντοπίζονται στα βλέφαρα περίξ των οφθαλμών (Εικόνα 44).



**Εικόνα 44. Ασθενής με προχωρημένη ΠΧΚ. Παρατηρείται ικτερική χροιά και ξανθελάσματα περικογχικά**

Πέραν των εκδηλώσεων αυτών, στην ΠΧΚ είναι πάρα πολύ συχνή η συνύπαρξη και άλλων εξωηπατικών αυτοάνοσων καταστάσεων σε ποσοστό που φτάνει μέχρι και το 80% των ασθενών (Πίνακας 15) (636, 761). Η πιο συχνή από αυτές είναι το σύνδρομο Sicca, που έχει αναφερθεί σε συχνότητα μέχρι και 80% (762). Άλλες αυτοάνοσες παθήσεις που μπορεί επίσης να συνυπάρχουν είναι: σκληρόδερμα και σύνδρομο CREST στο 10% (761), αυτοάνοσα νοσήματα του θυρεοειδούς (θυρεοειδίτιδα Hashimoto, που συνήθως είναι υποκλινική και νόσος Graves) στο 15-25% (763), ρευματοειδής αρθρίτιδα στο 20%, ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου κ.α (761, 763). Σε ποσοστό μέχρι και 50% των

ασθενών μπορεί να αναπτυχθεί εγγύς και άπω νεφρική σωληναριακή οξέωση, ενώ χολολιθίαση μπορεί να εμφανίζει το 30% των ασθενών (764) .

**Πίνακας 15. Εξωηπατικές αυτοάνοσες διαταραχές που έχουν συσχετισθεί με την ΠΧΚ**

<i>Διαταραχή</i>	<i>Συχνότητα (%)</i>
Σύνδρομο Sicca	60-80
Σύνδρομο Sjögren	60
Φαινόμενο Raynaud	10
Θυρεοειδίτιδα Hashimoto	20
Νόσος Graves	10-25
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	20
Σκληρόδερμα	10
Μικτή νόσος του συνδετικού ιστού	<5
Πολυμυοσίτιδα	<5
Ρευματική πολυμυαλγία	5
Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση	5-20
Νόσος Addison	10
Σύνδρομο CREST	5
Σπειραματονεφρίτιδα	5
Φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου	<5
Μυασθένεια Gravis	<5
Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος	<5
Κακοήθης αναιμία Biermer	<5
Θρομβοπενική πορφύρα	<5
Υπερτροφική πνευμονική οστεοαρθροπάθεια	<5
Λεύκη	<5
Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο	<5

### **5.3.γ Εργαστηριακά ευρήματα ΠΧΚ**

Η ΠΧΚ συχνά χαρακτηρίζεται από αύξηση ενός ή περισσότερων χολοστατικών ενζύμων, όπως της αλκαλικής φωσφατάσης, της γ-GT και της 5-νουκλεοτιδάσης. Η αύξηση των χολοστατικών ενζύμων μπορεί να είναι το μόνο εύρημα σε

ασυμπτωματικούς ασθενείς (765), αν και ενδέχεται οι δοκιμασίες αυτές να είναι φυσιολογικές στα προ-συμπτωματικά στάδια (636) (Πίνακας 16).

**Πίνακας 16. Βιοχημικές παράμετροι ασθενών κατά τη διάγνωση της ΠΧΚ**

<i>Μελέτη</i>	<i>ALP<sup>#</sup></i>	<i>ALT</i> (IU/L)	<i>Ολική</i> <i>χολερυθρίνη</i> ( $\mu\text{mol/L}$ )	<i>Αλβουμίνη</i> (g/dL)
Sherlock et al (638)	47% >5x	-	41% <34	-
Long et al (690)	50% >4.2x	-	>12	4.1
Christensen et al (691)	533 IU/L	103	31	3.5
James et al (692)	45% 200-600 IU/L	-	84% <34	-
Eriksson et al (650)	19 $\mu\text{kat/L}$	-	30	4.1
Crowe et al (694)	60% >400IU/L	93% >40	-	-
Mitchison et al (682)	-	-	42	3.8
Rydning et al (683)	50% >3.6x	79	27	3.3
Mahl et al (639)	96,4% >2x	-	43	3.5
Invernizzi et al (696)	50% >3.5x	76	37	3.9
Springer et al (697)	63.7% >2x	43% >80	10% >20	19% <3.5
Uddenfeldt et al (698)	61% >2x	1.4 $\mu\text{kat/L}$	29	-
Wong et al (687)	271 IU/L	87	16	3.5
Delgado et al (700)	406 IU/L	-	14	3.7
Sarin et al (686)	50% >4.4x	138	58	3.5
Peters et al (701)	349 IU/L	76	19	4
Pla et al (702)	50% >5.1x	71	14	3.4
Wong et al (689)	381 IU/L	100	33	3.6

<sup>#</sup>:Οι τιμές της αλκαλικής φωσφατάσης δίνονται ως μέση τιμή (IU/L) ή ως ποσοστό ασθενών πάνω από το πολλαπλάσιο των ανώτερων φυσιολογικών ορίων (οι τιμές θεωρείται ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή).

Οι αμινοτρανσφεράσες είναι συνήθως ελαφρά αυξημένες και σπάνια ξεπερνούν το 5-πλάσιο των ανώτερων φυσιολογικών τιμών. Η ολική χολερυθρίνη είναι συνήθως

εντός των φυσιολογικών ορίων στα αρχικά στάδια και αυξάνει με την εξέλιξη της νόσου. Σε πρόσφατες μελέτες από την Ισπανία και τις ΗΠΑ, η διάμεση τιμή της ολικής χολερυθρίνης κατά τη διάγνωση ήταν 0.8 και 1.1 mg/dL αντίστοιχα (701, 702), ενώ προ 30 ετών το 20% των ασθενών είχε ολική χολερυθρίνη μεγαλύτερη από 5mg/dL κατά τη διάγνωση (638).

Διαταραχές της συνθετικής ικανότητας του ήπατος που αντανakλώνται στη λευκωματίνη και το χρόνο προθρομβίνης μπορεί να παρατηρηθούν σε προχωρημένα στάδια της νόσου (681), αν και ο παρατεταμένος χρόνος προθρομβίνης μπορεί να οφείλεται επίσης στην ένδεια βιταμίνης K, λόγω δυσαπορρόφησης των λιποδιαλυτών βιταμινών εξαιτίας της χρόνιας χολόστασης (636).

Σε σημαντικό ποσοστό των ασθενών με ΠΧΚ παρατηρείται επίσης υπεργαμμασφαιριναιμία, με κυρίαρχη αύξηση των IgM τάξης ανοσοσφαιρινών και κατά δεύτερο λόγο των IgG (681), ενώ μπορεί να παρατηρείται και ενεργοποίηση του συμπληρώματος αν και τα επίπεδα του C3 είναι συνήθως φυσιολογικά.

Ένα ακόμη εργαστηριακό εύρημα που μπορεί να χαρακτηρίζει τη νόσο είναι η περιφερική ηωσινοφιλία, η οποία μπορεί να εμφανιστεί από τα αρχικά στάδια της νόσου ή και να αποτελεί την αρχική της εκδήλωση (766).

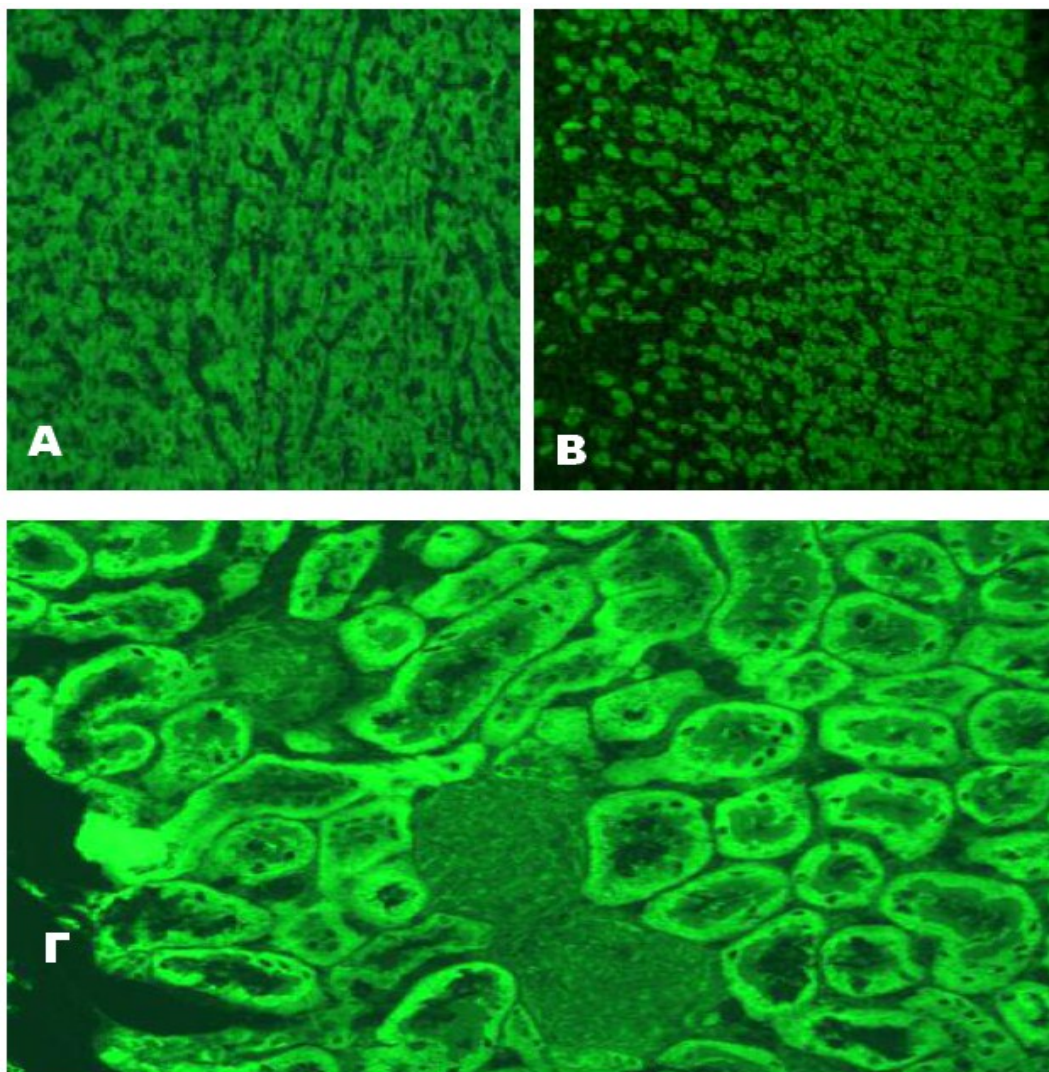
Το πλέον τυπικό, όμως, εργαστηριακό εύρημα των ασθενών με ΠΧΚ είναι η παρουσία AMA που θεωρούνται ειδικά για τη νόσο και αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο για τη διάγνωση της νόσου, καθώς και τα ειδικά για την ΠΧΚ ANA.

#### **5.3.δ Αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA)**

Στη δεκαετία του 1960 παρατηρήθηκε για πρώτη φορά ότι ασθενείς με ΠΧΚ είχαν στον ορό τους κυκλοφορούντα αντισώματα τα οποία στρέφονταν έναντι μιτοχονδριακών αντιγόνων (648, 767). Τα αντισώματα αυτά υπήρχαν σε όλους τους



ασθενείς με ΠΧΚ και δεν ανευρίσκονταν σε κανένα άλλο πληθυσμό ατόμων που αποτελούσαν τις ομάδες ελέγχου (ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες, επαγόμενη από φάρμακα χολόσταση, προσβολή εξωηπατικών χοληφόρων) (768). Έκτοτε, τα AMA αποτελούν ένα ισχυρό διαγνωστικό εργαλείο για τη διαφοροδιάγνωση των χρόνιων χολοστατικών παθήσεων (96, 97). Τα AMA δίνουν ένα χαρακτηριστικό πρότυπο ανοσοφθορισμού σε έμμεσο ανοσοφθορισμό σε υπόστρωμα ήπατος-νεφρού-στομάχου τροκτικών (Εικόνα 45) ή σε υπόστρωμα HEp-2 κυττάρων (96, 97).



**Εικόνα 45.** Πρότυπο φθορισμού των AMA σε τομές ήπατος (Α), στομάχου (Β) και νεφρού (Γ) αρουραίου. Στο ήπαρ δίνουν ένα διάχυτο κυτταροπλασματικό φθορισμό, στο στομάχι φθορισμό των τοιχωματικών κυττάρων και στο νεφρό δίνουν φθορισμό των εγγύς και άπω νεφρικών σωληναρίων αλλά όχι των σπειραμάτων.



Το 1967 οι Berg και συν., παρατήρησαν ότι οροί ασθενών με ΠΧΚ αντιδρούσαν *in vitro* με απομονωμένα μιτοχόνδρια και ότι το αντιγόνο-στόχος ήταν ευαίσθητο στη δράση θρυψίνης (769). Αυτά τα μιτοχονδριακά αντιγόνα ονομάστηκαν M2, σε αντιδιαστολή με τα M1, που αποτελούν το αντιγόνο των αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων και που τότε ανευρίσκονταν σε ασθενείς με σύφιλη (770). Τα M2 διαπιστώθηκε ότι εντοπίζονται στην εσωτερική επιφάνεια της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων.

Η ταυτοποίηση των αντιγονικών στόχων των AMA αποτέλεσε ένα σημαντικό βήμα για τη μελέτη των ασθενών με ΠΧΚ. Αρχικά παρατηρήθηκε ότι οι οροί των ασθενών με ΠΧΚ είχαν αντιδραστικότητα έναντι μιας μιτοχονδριακής πρωτεΐνης μοριακού βάρους 74kDa (771, 772). Αργότερα όμως διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν, σε μικρότερη συχνότητα, αντιγονικοί στόχοι με μοριακό βάρος 36, 41, 48, και 56 kDa (773). Σήμερα είναι γνωστό ότι τα μιτοχονδριακά αντιγόνα αποτελούν μέρος του πολυενζυμικού συστήματος της 2-κετοξικής δεϋδρογονάσης, το οποίο αποτελείται από επιμέρους συμπλέγματα: το σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης (ΠΔΓ) (pyruvate dehydrogenase complex, PDC), το σύμπλεγμα της 2-κετοξικής δεϋδρογονάσης διακλαδισμένης αλύσου (ΚΔΓΔΑ) (branched-chain 2-oxoacid pyruvate dehydrogenase complex-BCOADC), και το σύμπλεγμα της κετογλουταρικής δεϋδρογονάσης (ΚΓΔΓ) (2-oxoglutarate pyruvate dehydrogenase complex-OGDC) (774).

Κάθε ένα από τα ενζυμικά αυτά συμπλέγματα παίζει σημαντικό ρόλο στον ενεργειακό μεταβολισμό του κυττάρου: το ΠΔΓ συνδέει την πορεία της γλυκόλυσης με τον κύκλο του Krebs, το ΚΓΔΓ είναι βασικό ένζυμο του κύκλου του Krebs και το ΚΔΓΔΑ συμμετέχει στο μεταβολισμό και την οξείδωση των αμινοξέων με διακλαδισμένη αλυσό (775, 776). Κάθε ένα από τα ενζυμικά αυτά συμπλέγματα

αποτελείται από 3 υπομονάδες E1, E2 και E3. Η βασική υπομονάδα είναι η E2, που αποτελείται από μία αμινοτελική περιοχή που περιέχει μια λιποειδική επικρατούσα περιοχή (lipoid domain), μία περιφερική στην οποία γίνεται η σύνδεση με τις άλλες υπομονάδες και μία καρβοξυτελική που έχει και τον ενζυμικό ρόλο της μεταφοράς των ακετυλοομάδων (776). Το ΠΔΓ περιέχει και ένα τέταρτο πολυπεπτίδιο, το E3BP (E3-binding protein), παλαιότερα γνωστό ως πρωτεΐνη X, που φαίνεται πως έχει μάλλον δομικό ρόλο (777). Από τα πολυπεπτίδια του συμπλέγματος, το βασικό αντιγόνο-στόχος των AMA στους ασθενείς με ΠΧΚ είναι η E2 υπομονάδα της ΠΔΓ (74 kDa) σε ποσοστό άνω του 92% (Πίνακας 17) (778-780).

**Πίνακας 17. Μιτοχονδριακά αυτοαντιγόνα-υποομάδες του συμπλέγματος της 2-κετοξικής δεϋδρογονάσης**

Μοριακή ταυτοποίηση	Παλαιά ονομασία	M.B (kDa)	Λειτουργία	Συχνότητα (%)
<b>ΠΔΓ</b>				
E1-α-αποκαρβοξυλάση	M2d	41	Αποκαρβοξυλίωση ΠΟ με TPP ως συμπράγοντα	41-66
E1-β-αποκαρβοξυλάση	M2e	36	Αποκαρβοξυλίωση ΠΟ με TPP ως συμπράγοντα	2-7
E2 ακετυλοτρανσφεράση	M2a	74	Μεταφορά ακετυλο-ομάδων από E1 στο CoA	92-95%
Πρωτεΐνη X (E3BP)	M2c	52	-	95
<b>ΚΔΓΔΑ</b>				
E2 ακυλοτρανσφεράση	M2c	50	Μεταφορά ακυλο-ομάδων από E1 στο CoA	53-55
<b>ΚΓΔΓ</b>				
E2-ηλεκτρική τρανσφεράση	M2c	48	Μεταφορά ηλεκτρυλο-ομάδων από E1 στο CoA	39-88

ΠΔΓ: πυροσταφυλική δεϋδρογονάση; ΚΔΓΔΑ: 2-κετοξική δεϋδρογονάση διακλαδισμένης αλύσου; ΚΓΔΓ: κετογλουταρική δεϋδρογονάση; CoA: συνένζυμο Α; TPP: πυροφωσφορική θειαμίνη; ΠΟ: πυροσταφυλικό οξύ

Αντιδραστικότητα των AMA έναντι ΚΔΓΔΑ-E2 (50kDa) και ΚΓΔΓ-E2 (48kDa) ανευρίσκεται στο 50% έως 70% των ασθενών (234, 781). Συνήθως ασθενείς με αντιδραστικότητα έναντι ΠΔΓ-E2, έχουν και αντιδραστικότητα έναντι ΚΔΓΔΑ-E2 και ΚΓΔΓ-E2, λιγότερο συχνά συναντάμε αντιδραστικότητα μόνο έναντι ΠΔΓ-E2, και πολύ σπάνια αντιδραστικότητα μόνο έναντι ΚΔΓΔΑ-E2 και ΚΓΔΓ-E2 (234, 781). Η αντιδραστικότητα έναντι ΠΔΓ-E3BP (50-56 kDa), εμφανίζεται πάντοτε όταν υπάρχει ΠΔΓ-E2 αντιδραστικότητα και αυτό συμβαίνει διότι, όπως έδειξαν πειράματα αναστολής, μάλλον πρόκειται για διασταυρούμενη αντίδραση (781-785). Η συχνότητα κοινής εμφάνισης αυτοαντισωμάτων έναντι των διαφόρων αντιγόνων της 2-κετοξικής δεϋδρογονάσης, όπως δημοσιεύτηκε πρόσφατα από τους Muratori και συν., αναφέρεται στον πίνακα 18 (786).

**Πίνακας 18. Συχνότητα ανίχνευσης συνδυασμών αυτοαντισωμάτων έναντι διαφόρων μιτοχονδριακών με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης σε 147 ασθενείς με ΠΧΚ (786)**

<i>Αντιγόνα</i>	<i>Συχνότητα</i>
ΠΔΓ-E2 + E3BP	43 %
ΠΔΓ-E2 + E3BP + ΚΓΔΓ-E2	20 %
ΠΔΓ-E2 + E3BP + ΚΔΓΔΑ-E2 + ΚΓΔΓ-E2	12 %
ΠΔΓ-E2 + E3BP + ΚΔΓΔΑ-E2	6 %
ΚΔΓΔΑ-E2	6 %
Κανένα	13 %

ΠΔΓ: πυροσταφυλική δεϋδρογονάση; ΚΔΓΔΑ: 2-κετοξική δεϋδρογονάση διακλαδισμένης αλυσού;  
ΚΓΔΓ: κετογλουταρική δεϋδρογονάση

Εκτός από τα AMA έναντι ΠΔΓ, η παλαιότερη ονομασία των οποίων ήταν M2, υπάρχει και μία σειρά από άλλα AMA που ταξινομούνται σε 9 τύπους M1-M9 (Πίνακας 19) (773). Από αυτά, τα M1 (έναντι καρδιολιπίνης), M4 (οξειδάσης θεικών ριζών), M8 (άγνωστο αντιγόνο ευαίσθητο στη θρυψίνη) και M9 (φωσφορυλάση γλυκογόνου) είχαν θεωρηθεί στο παρελθόν ειδικά για ΠΧΚ (787) συσχετίζοντάς τα

μάλιστα με την πρωιμότητα (M9) ή τη βαρύτητα (M4) της νόσου (788). Νεότερες μελέτες, όμως δείχνουν ότι αυτά τα αντισώματα δεν είναι ειδικά για την ΠΧΚ και δεν αποτελούν προγνωστικό δείκτη της νόσου (789).

**Πίνακας 19. Τύποι αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων και συχνότητα εμφάνισής τους σε διάφορες παθήσεις**

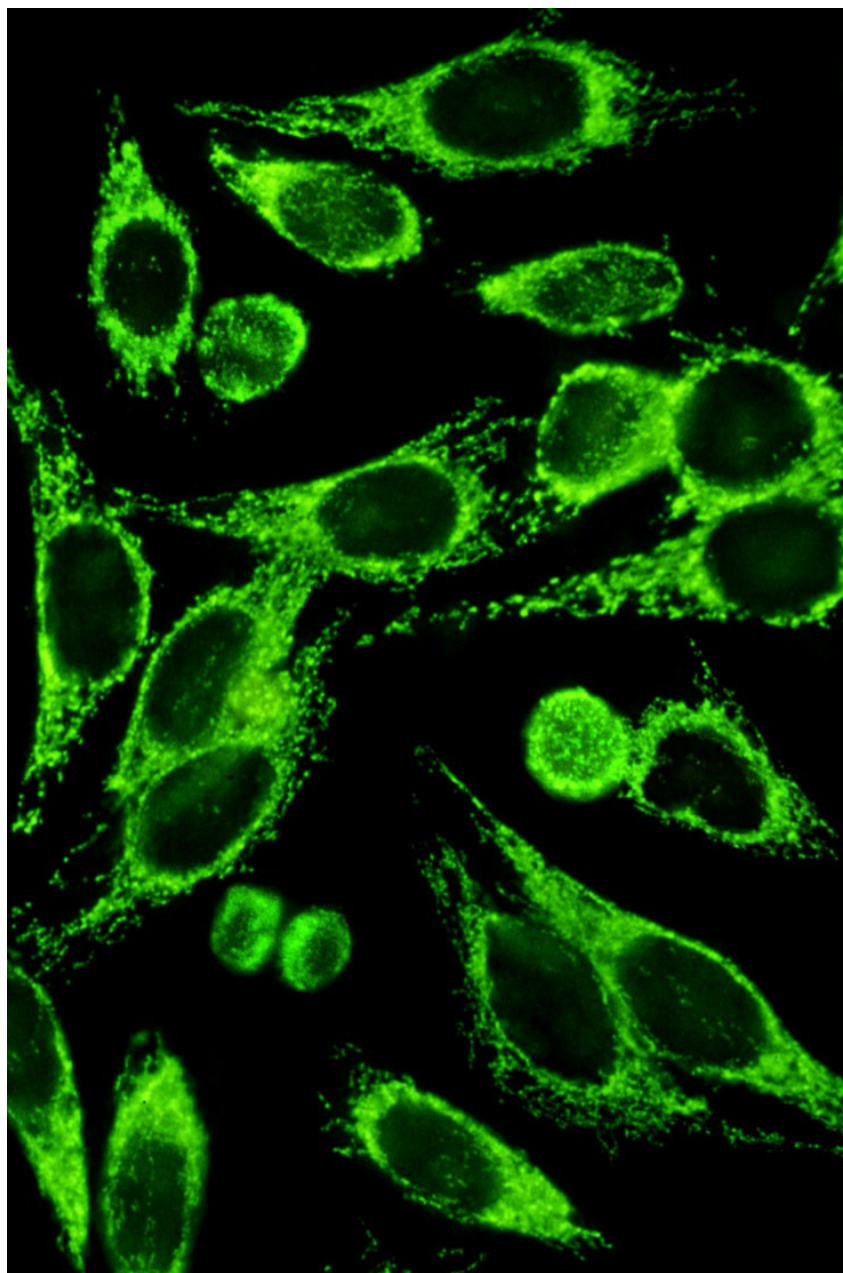
<i>Τύπος AMA</i>	<i>Συσχετιζόμενη νόσος</i>	<i>Συχνότητα (%)</i>
M1	Σύφιλη (ενεργός)	100
	ΣΕΛ	50
	Συστηματική σκλήρυνση, ΜΝΣΙ, σ. Sjögren, ρευματοειδής αρθρίτιδα	5-15
M2	ΠΧΚ	95
	Συστηματική σκλήρυνση	7-25
M3	Σύνδρομο προσομοιάζον στο ΣΕΛ	100
M4	ΠΧΚ	55
M5	Μη ειδικές κολλαγονώσεις	
M6	Φαρμακευτική ηπατίτιδα από ιπρονιαζίδη	100
M7	Οξεία μυοκαρδίτιδα	60
	Μυοκαρδιοπάθειες	30
M8	ΠΧΚ	55
M9	ΠΧΚ	37-82
	Άλλες ηπατοπάθειες	3-10

ΣΕΛ: συστηματικός ερυθριματώδης λύκος, ΜΝΣΙ: μεικτή νόσος συνδετικού ιστού;

### **5.3.ε Ανίχνευση και κλινική σημασία των AMA**

Τα AMA ανιχνεύονται σε επίπεδο ρουτίνας με έμμεσο ανοσοφθορισμό, με ELISA και με ανοσοαποτύπωση. Ο πιο διαδεδομένος τρόπος είναι η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου τρωκτικών (96, 97). Τα AMA δίνουν ένα συνεχές πρότυπο φθορισμού τόσο στα εγγύς όσο και στα άπω εσπειραμένα σωληνάρια του νεφρού, ενώ σημαίνουν και τα τοιχωματικά κύτταρα του στομάχου δίνοντας ένα πρότυπο φθορισμού παρόμοιο με

αυτό των αντισωμάτων έναντι τοιχωματικών κυττάρων. Στις δε τομές ήπατος δίνουν διάχυτο κυτταροπλασματικό φθορισμό που όμως δε θεωρείται ειδικός. Η ταυτόχρονη χρησιμοποίηση επομένως και των τριών υποστρωμάτων (ήπατος-νεφρού-στομάχου) δίνει ένα σαφές διαγνωστικό πρότυπο (Εικόνα 45) (234, 781). Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί υπόστρωμα HEp-2 κυττάρων στο οποίο επίσης παρατηρείται χαρακτηριστικό πρότυπο ανοσοφθορισμού, το οποίο όμως δεν είναι ειδικό και απαιτείται επιβεβαίωση με τις υπόλοιπες μεθόδους (Εικόνα 46).



**Εικόνα 46. Πρότυπο φθορισμού των AMA σε υπόστρωμα HEp-2 κυττάρων**

Στη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα ομογενοποίημα ιστών (συνήθως καρδιά βοός ή χοίρου, ήπαρ αρουραίου ή ανθρώπινος πλακούντας). Ο διαχωρισμός των συστατικών γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE), ακολουθεί αποτύπωση σε φύλλα νιτροκυτταρίνης και τέλος ανοσοσήμανση με ενζυμο-σημασμένες ανοσοσφαιρίνες. Τα διάφορα αντιγόνα διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος (781).

Τέλος η ανίχνευση των AMA μπορεί να γίνει και με ELISA, χρησιμοποιώντας ως αντιγόνο απομονωμένο M2 από βόειο ομογενοποίημα ή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (358, 790, 791). Φαίνεται ότι όλες οι μέθοδοι μπορούν να δώσουν παρόμοια αποτελέσματα ως προς την ευαισθησία και την ειδικότητα (Πίνακας 20)(786), με τις σύγχρονες ELISA με ανασυνδυασμένα αντιγόνα να έχουν συμβάλει σε μία περαιτέρω αύξηση της ευαισθησίας (792).

**Πίνακας 20. Σύγκριση ευαισθησίας και ειδικότητας διαφόρων μεθόδων ανίχνευσης AMA.**

	Ευαισθησία	Ειδικότητα	Θετική διαγνωστική αξία
ΕΑΦ σε υπόστρωμα τρωκτικών	71.6%	97.4%	0.938
ΕΑΦ σε υπόστρωμα HEp-2 κυττάρων	72.4%	93.3%	0.835
Ανοσοαποτύπωση	85%	97.8%	0.947
Εμπορική ELISA	81.1%	97.8%	0.944
In-house ELISA	78.8%	97.8%	0.943

ΕΑΦ: έμμεσος ανοσοφθορισμός

Η ανίχνευση AMA στον ορό ασθενών καθιστά σχεδόν βέβαιη τη διάγνωση της ΠΧΚ (786). Όταν τα AMA ανιχνεύονται σε κατά τα άλλα ασυμπτωματικούς ασθενείς, η βιοψία ήπατος μπορεί να είναι διαγνωστική ΠΧΚ στο 40% των περιπτώσεων (793),

ενώ μεταξύ των υπολοίπων η πιθανότητα εκδήλωσης της νόσου τα επόμενα χρόνια είναι σημαντικά αυξημένη (685, 697, 765, 794).

Παρά την σημαντική διαγνωστική τους αξία, τα AMA έχουν μάλλον περιορισμένη προγνωστική αξία. Μεταξύ διαφόρων ασθενών τα επίπεδα των AMA μπορεί να παρουσιάζουν σημαντικές διακυμάνσεις, ενώ στο ίδιο ασθενή οι διακυμάνσεις είναι μικρότερες, σε κάθε περίπτωση όμως υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν την απουσία συσχέτισης με την πορεία της νόσου (795), παρότι προηγούμενες παρατηρήσεις διαπίστωναν ότι η ποσοτικοποίηση των επιπέδων των IgG AMA σχετίζεται με το ιστολογικό στάδιο της νόσου (796). Αντίστοιχα, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι το προφίλ των AMA στα αρχικά στάδια της νόσου μπορεί να αποτελέσει προγνωστικό παράγοντα για την εξέλιξη της ΠΧΚ (788, 797), τα αποτελέσματά τους όμως δεν επιβεβαιώθηκαν από επακόλουθη έρευνα σε μεγάλη σειρά ασθενών (789). Ακόμη, δεν βρέθηκε οποιαδήποτε συσχέτιση του τύπου των μιτοχονδριακών αντιγόνων, τα οποία αναγνώριζαν τα AMA, με κλινικά, βιοχημικά ή ιστολογικά χαρακτηριστικά της νόσου (798).

Αντίθετα, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι τα IgA αντισώματα έναντι της ΚΓΔΓ εμφανίζουν συσχέτιση με το ιστολογικό στάδιο της νόσου (799-801), και ο τίτλος τους υποστρέφει μετά από θεραπεία με UDCA (801). Ωστόσο, τα δεδομένα αυτά προκύπτουν από σειρές με μικρό αριθμό ασθενών και απαιτούν επιβεβαίωση σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών, γεγονός που δεν επιβεβαιώθηκε σε μεγαλύτερες σειρές ασθενών από την ομάδα μας (792).

Τέλος, φαίνεται ότι συγκεκριμένες υποτάξεις των IgG AMA μπορεί να σχετίζονται με ΠΧΚ χειρότερης πρόγνωσης, καθώς έχει πρόσφατα βρεθεί ότι ασθενείς θετικοί για IgG3 AMA έχουν νόσο πιο προχωρημένου ιστολογικού σταδίου και εμφανίζουν

συχνότερα κίρρωση, ενώ υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του τίτλου των IgG3 AMA και του Mayo risk score (802).

### **5.3.στ AMA-αρνητική ΠΧΚ**

Ένα χρόνο μετά την καθοριστική δημοσίευση των Walker και συν. για την ύπαρξη AMA στον ορό των ασθενών με ΠΧΚ (648), δημοσιεύτηκε μελέτη των Goudie και συν., στην οποία στο 13% των ασθενών με ΠΧΚ δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση AMA παρότι είχαν παρόμοια κλινική, βιοχημική και ιστολογική εικόνα με τους AMA-θετικούς ασθενείς (803). Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε και από τους Χατζηγιάννη και συν. το 1970 (804). Για το χαρακτηρισμό αυτής της νοσολογικής οντότητας προτάθηκε το 1987 ο όρος «ανοσοχολαγγειίτις» (805), ενώ άλλοι ερευνητές πρότειναν τους όρους «αυτοάνοση χολαγγειοπάθεια» ή «πρωτοπαθής αυτοάνοση χολαγγειίτιδα» (806-808).

Οι ασθενείς με AMA-αρνητική ΠΧΚ έχουν τα τυπικά κλινικά, βιοχημικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΠΧΚ, αλλά χωρίς να ανιχνεύονται AMA στον ορό τους. Η συχνότητα της AMA-αρνητικής ΠΧΚ στο σύνολο των ΠΧΚ ασθενών, κυμαίνεται στις διάφορες δημοσιευμένες σειρές περίπου στο 5% (787, 809), αν και υπάρχει αναφορά που διαπιστώνει ποσοστό 32% επί του συνόλου των ασθενών με ΠΧΚ (810).

Χρησιμοποιώντας πιο ευαίσθητες τεχνικές ανίχνευσης των AMA σε σχέση με τον έμμεσο ανοσοφθορισμό, όπως η ανοσοαποτύπωση, η ELISA με ανασυνδυασμένα πεπτίδια ή μεθόδους αναστολής, σε πολλούς εκ των ασθενών που θεωρούνταν ως AMA-αρνητικοί ανιχνεύθηκαν AMA. Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν ότι το ποσοστό των αληθώς AMA-αρνητικών ασθενών είναι ακόμα μικρότερο και



εξαρτάται από την τεχνική ανίχνευσης των AMA και την εμπειρία του εργαστηρίου (234, 696, 807, 811-814).

Σε μία μεγάλη πρόσφατη αναδρομική μελέτη από την Ιαπωνία, παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με AMA-αρνητική ΠΧΚ μπορεί να εμφανίζουν μικρές διαφορές στις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου, εμφανίζοντας σπανιότερα κνησμό σε σχέση με τους AMA-θετικούς, αλλά συχνότερα εξωηπατικές εκδηλώσεις, όπως σύνδρομο Sjogren, ρευματοειδή αρθρίτιδα, και σκληρόδερμα. Επίσης, οι AMA-αρνητικοί ασθενείς είχαν χαμηλότερα επίπεδα γGT, αλκαλικής φωσφατάσης και IgM (815). Τα μειωμένα επίπεδα IgM ανοσοσφαιρινών στους ασθενείς με AMA-αρνητική ΠΧΚ σε σχέση με τους AMA-θετικούς έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες σειρές ασθενών (807, 809). Άλλο χαρακτηριστικό εύρημα στους AMA-αρνητικούς ασθενείς είναι η υψηλότερη συχνότητα ειδικών για την ΠΧΚ ANA και SMA αντισωμάτων (232, 234, 696, 809, 816, 817), έχει μάλιστα προταθεί τα ANA που χαρακτηρίζονται από υψηλή ειδικότητα για την ΠΧΚ να χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της ΠΧΚ σε ασθενείς με συμβατά ευρήματα και απουσία AMA αντισωμάτων (234, 816, 817).

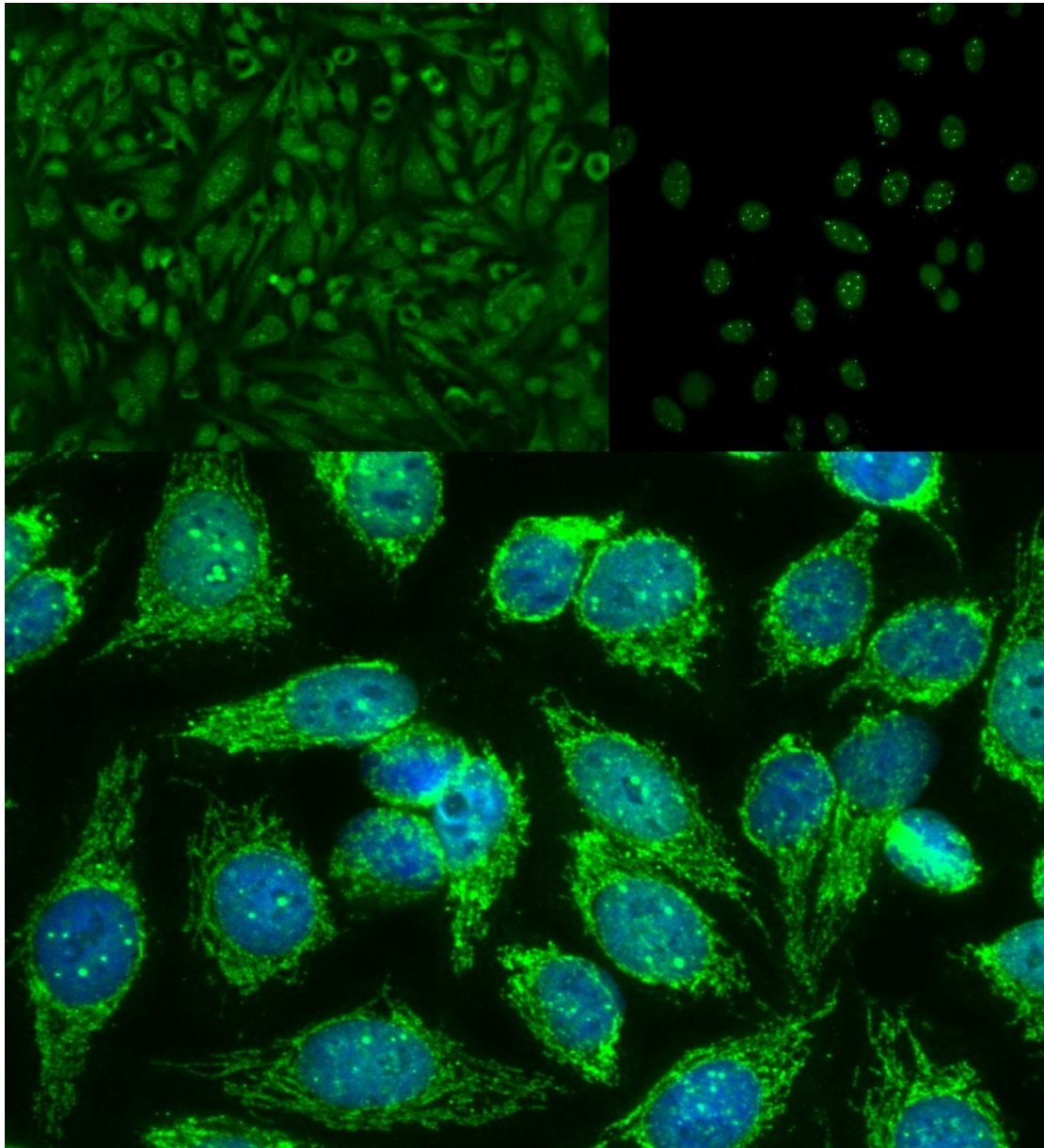
Η ανταπόκριση των AMA-αρνητικών ασθενών στη θεραπεία της ΠΧΚ δε διαφέρει από αυτή των AMA-θετικών ασθενών και ως εκ τούτου τα υπάρχοντα κλινικά δεδομένα συνηγορούν υπέρ της ίδιας αντιμετώπισης των ασθενών με ΠΧΚ, ανεξάρτητα από την παρουσία των AMA (818, 819).

### **5.3.ζ Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) στην ΠΧΚ**

Αντισώματα έναντι πυρηνικών κηλίδων

Οι ασθενείς με ΠΧΚ χαρακτηρίζονται από την παρουσία αυτοαντισωμάτων που στον έμμεσο ανοσοφθορισμό σε υπόστρωμα HEp-2 κυττάρων δίνουν χαρακτηριστικό

πρότυπο πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων (multiple nuclear dots, MND) (Εικόνα 47) (227, 232, 234).



**Εικόνα 47. Πρότυπο φθορισμού πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων (MND) σε υπόστρωμα HEp-2 κυττάρων.**

Τα αντισώματα αυτά αναγνωρίζουν κυρίως ως αντιγονικό στόχο μία πρωτεΐνη 100 kDa που εντοπίζεται στα σωμάτια PML-NB του πυρήνα και καλείται Sp100 (820, 821). Αντισώματα έναντι Sp100 ανιχνεύονται στο 20-30% περίπου των ασθενών με ΠΧΚ και πολύ σπάνια (<3%) σε ασθενείς με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (822, 823).

Η ανακάλυψη του αντιγονικού επίτοπου των anti-Sp100 αντισωμάτων, που εντοπίζεται στο καρβόξυ-τελικό άκρο του μορίου της Sp100, κατέστησε δυνατή την ανάπτυξη και διάδοση σχετικής ELISA που συνετέλεσε στην εναρμόνιση των αποτελεσμάτων των διαφόρων ανοσολογικών εργαστηρίων και την καλύτερη εκτίμηση της ειδικότητάς των για τη διάγνωση της ΠΧΚ. Παρότι τα αντισώματα έναντι πυρηνικών κηλίδων και ειδικά έναντι Sp100 θεωρούνται ως ειδικά για τη νόσο, υπάρχουν διάφορες αναφορές για ανίχνευσή τους και σε ασθενείς με άλλες ηπατοπάθειες ή άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (824, 825). Τα διαθέσιμα κλινικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι ασθενείς χωρίς ΠΧΚ εμφανίζουν συχνότερα anti-MND χωρίς ειδικότητα για Sp100, γεγονός που συνηγορεί υπέρ της ύπαρξης αντισωμάτων έναντι άλλων πυρηνικών αντιγόνων στους ασθενείς αυτούς (824).

Πέραν της διαγνωστικής τους αξίας, φαίνεται ότι τα anti-Sp100 αντισώματα έχουν και προγνωστική αξία, αφού έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με την εμφάνιση κίρρωσης και υψηλότερα επίπεδα χολερυθρίνης ορού (232-234). Αντίστοιχα, έχει βρεθεί ότι οι anti-Sp100-θετικοί ασθενείς εμφανίζουν ταχύτερη εξέλιξη της νόσου (823).

Το πρότυπο φθορισμού των πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων (MND) μπορεί να οφείλεται, όπως ήδη αναφέρθηκε, σε αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης PML. Anti-PML αντισώματα έχουν ανιχνευθεί στον ορό ασθενών με ΠΧΚ, συχνά σε συνδυασμό με την παρουσία anti-Sp100 αντισωμάτων και σε ίδια περίπου συχνότητα (826). Η ίδια ερευνητική ομάδα που ανίχνευσε τα αντισώματα αυτά σε ασθενείς με ΠΧΚ, διαπίστωσε ότι έχουν παρόμοια προγνωστική αξία με τα anti-Sp100 (823).

Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι οι ασθενείς με ΠΧΚ εμφανίζουν αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών SUMO που συνδέουν ομοιοπολικά τις πρωτεΐνες Sp100 και PML στα πυρηνικά σωματίδια. Χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες SUMO-1 και SUMO-2 βρέθηκε πρόσφατα ότι μεταξύ των ασθενών με ΠΧΚ που εμφανίζουν το

πρότυπο των πυρηνικών κηλίδων, το 15% εμφανίζει αντισώματα έναντι της SUMO-1 και το 42% έναντι της SUMO-2 (827). Φαίνεται επομένως ότι οι πρωτεΐνες SUMO αποτελούν ανεξάρτητα αυτοαντιγόνα στην ΠΧΚ, η δε ανακάλυψη των anti-SUMO αντισωμάτων παρέχει ενδείξεις για την σχέση μεταξύ των διαφόρων αντισωμάτων που δίνουν το πρότυπο των πυρηνικών κηλίδων σε ασθενείς με ΠΧΚ.

Τέλος, πρόσφατη έρευνα ανακάλυψε κυκλοφορία αντισωμάτων έναντι μιας ακόμη πρωτεΐνης των πυρηνικών σωματίων σε ασθενείς με ΠΧΚ (828). Οι ασθενείς με ΠΧΚ εμφανίζουν αντισώματα έναντι της Sp140 σε ποσοστό 15%, τα οποία φαίνεται να έχουν σημαντική διαγνωστική αξία, διότι, τουλάχιστον σε αυτή την σειρά ασθενών, έχουν ειδικότητα 100%, ενώ ανιχνεύονται επίσης στο 53% των ασθενών με AMA-αρνητική ΠΧΚ.

#### Αντισώματα έναντι πυρηνικού φακέλου

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, περίπου το 25% των ασθενών με ΠΧΚ έχουν αντισώματα έναντι πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου. Τα αντισώματα αυτά δίνουν το χαρακτηριστικό RLM πρότυπο φθορισμού, το οποίο συχνά για να γίνει αντιληπτό απαιτεί αυξημένη εμπειρία ιδίως όταν συνυπάρχει με τον κυτταροπλασματικό φθορισμό των AMA. Η συχνότητα ανίχνευσης των RLM αυτοαντισωμάτων στην ΠΧΚ φαίνεται να είναι υψηλότερη από αυτή του 25%, εάν χρησιμοποιηθούν αντιοροί IgG1, IgG2, IgG3 και IgG4 υποτάξης (αντί για ολικό IgG), οπότε ανευρίσκεται ότι περίπου το 65% των ασθενών με ΠΧΚ είναι θετικοί για τουλάχιστον μία υποτάξη (232). Ο επιπολασμός αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του πυρηνικού φακέλου σε διάφορες δημοσιευμένες μελέτες ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο ανίχνευσης παρατίθεται στον Πίνακα 21.

Τα αντισώματα έναντι της gp210 θεωρούνται ειδικά για την ΠΧΚ και ανιχνεύονται στο 10-41% των AMA-θετικών ασθενών (234, 817, 829-832) και στο 20-50% των AMA-αρνητικών (234, 817, 829, 831). Η αυξημένη συχνότητα στους AMA-αρνητικούς ασθενείς τους προσδίδει ιδιαίτερη διαγνωστική αξία στη διάγνωση της ΠΧΚ επί απουσίας AMA.

**Πίνακας 21. Επιπολασμός αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του πυρηνικού φακέλου ανάλογα με τη μέθοδο προσδιορισμού.**

Στοιχεία μελέτης	Μέθοδος ανίχνευσης	Συχνότητα σε ΠΧΚ	Συχνότητα σε μάρτυρες	Συσχέτιση με χειρότερη πρόγνωση
Lozano et al, 1998 (833)	RLM σε ΕΑΦ IB με πρωτεΐνες τρωκτικών	53% 42%*	0.7% -	Όχι
Lassoued et al, 1990 (834)	RLM σε ΕΑΦ IB με πρωτεΐνες τρωκτικών	29% 93%*	- -	Όχι
Nickowitz et al, 1994 (831)	RLM σε ΕΑΦ IB με πρωτεΐνες τρωκτικών και rGP210	30% 19%*	15% 0%	Όχι
Itoh et al, 1998 (829)	RLM σε ΕΑΦ IB με ανθρώπινες πρωτεΐνες	27% 22%	1.9% 0%	Ναι
Invernizzi et al, 2001 (835)	RLM σε ΕΑΦ IB με ανθρώπινες πρωτεΐνες	4% 27%	- 3%	Ναι
Miyachi et al, 2003 (836)	IB με πρωτεΐνες τρωκτικών και rGP210	26%	0%	Ναι
Muratori et al, 2003 (816)	RLM σε ΕΑΦ ELISA με rGP210 τρωκτικού	9% 19%	- 1%	Ναι
Rigopoulou et al, 2005 (232)	RLM σε ΕΑΦ (ολικό IgG) RLM σε ΕΑΦ (υποτάξεις IgG)	15% 65%	- 1%	Ναι

\*Επί των ANA θετικών στον ΕΑΦ

ΕΑΦ: έμμεσος ανοσοφθορισμός; IB: immunoblotting (ανοσοαποτύπωση); rGP210: ανασυνδυασμένη gp210

Σε διάφορες μελέτες η παρουσία των anti-grp210 αντισωμάτων έχει συσχετισθεί με εξωηπατικές εκδηλώσεις της ΠΧΚ, όπως είναι η εμφάνιση αρθρίτιδας (831), καθώς και με χειρότερη πρόγνωση (837, 838). Αντισώματα έναντι της νουκλεοπορίνης p62 ανευρίσκονται σε ποσοστό από 14% έως και 32%, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο, στους ασθενείς με ΠΧΚ (108, 234, 839). Πρόσφατα, χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένη νουκλεοπορίνη p62, μία μικρή μελέτη διαπίστωσε παρουσία anti-p62 αντισωμάτων στο 55% των ασθενών με ΠΧΚ (840). Anti-p62 ανιχνεύονται επίσης στο 13% των ασθενών με σύνδρομο Sjögren και σπανιότερα σε ασθενείς με μεικτή νόσο του συνδετικού ιστού (841).

Τέλος, στους ασθενείς με ΠΧΚ έχουν αναφερθεί αντισώματα έναντι και άλλων συστατικών του πυρηνικού φακέλου, μεταξύ των οποίων είναι οι λαμινίνες και ο Tpr, ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις η συχνότητά τους ήταν κάτω από 8% (110, 817, 842).

Αντίστοιχα, το ποσοστό των ασθενών με ΠΧΚ που εμφανίζει anti-LAP αντισώματα κυμαίνεται μεταξύ 6% και 16% (108, 836), χωρίς όμως τα αντισώματα αυτά να είναι ειδικά για τη νόσο αφού παρατηρούνται και σε άλλες παθήσεις όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, το σύνδρομο Sjögren, η ρευματική πολυμυαλγία, κ.α. (843). Πιο ειδικά για την ΠΧΚ θεωρούνται τα anti-LBR αντισώματα, τα οποία ωστόσο ανιχνεύονται μόνο στο 1-9% των πασχόντων (107, 831, 836).

Άλλα ANA που έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με ΠΧΚ είναι έναντι του μεταγραφικού παράγοντα SOX13 στο 18% των ασθενών (844), ενώ γενικά πληθώρα άλλων αυτοαντισωμάτων έχει περιγραφεί σε συνδυασμό με ΠΧΚ (845). Συμπερασματικά, οι ασθενείς με ΠΧΚ χαρακτηρίζονται από εν γένει αυξημένη συχνότητα αντισωμάτων

που αντανακλά και την αυξημένη συννοσηρότητα από άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (234, 845).

### **5.3.η Παθολογοανατομικά ευρήματα της ΠΧΚ**

Η βιοψία ήπατος είναι σημαντική για τη σταδιοποίηση της νόσου αν και η διαγνωστική της αξία έχει αμφισβητηθεί (846). Ειδικά για τους AMA-αρνητικούς ασθενείς, η διάγνωση της νόσου δεν μπορεί να τεκμηριωθεί χωρίς τη συμβατή βιοψία ήπατος. Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά της ΠΧΚ περιλαμβάνουν ηπατικές αλλοιώσεις της χρόνιας χολόστασης, όπως είναι οι χολοστατικές ηπατικές ροζέτες, τα λιποειδοφόρα ιστιοκύτταρα, η πτεροειδής εκφύλιση, η χολόσταση, η χολερυθρινόσταση, και η διήθηση των πυλαίων διαστημάτων από ουδετερόφιλα με συνοδό περιπορική ίνωση, αλλά και πιο ειδικά στοιχεία, όπως υπερπλασία των κυττάρων Kupffer, λεμφοκυτταρική διήθηση των κολποειδών, χολαγγειοπενία, ηπατοκυτταρική και αναγεννητική υπερπλασία.

Για την ιστολογική ταξινόμηση της νόσου έχουν προταθεί διάφορα συστήματα σταδιοποίησης (Πίνακας 22) που διαχωρίζουν τα παθολογοανατομικά ευρήματα σε τρία ή τέσσερα στάδια, ανάλογα με το βαθμό της ίνωσης, της φλεγμονής και της καταστροφής των χοληφόρων (847-851).

Δεδομένου ότι η προσβολή του ήπατος δεν είναι ομοιογενής, για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα που δεν θα υπό- ή υπέρ-εκτιμούν το στάδιο της νόσου, αρκούντως μεγάλο βιοπτικό υλικό κρίνεται απαραίτητο, ώστε να περιέχει τουλάχιστον 10 πυλαία διαστήματα (681, 852).

**Πίνακας 22. Συγκριτική παράθεση 4 διαθέσιμων συστημάτων σταδιοποίησης για την ΠΧΚ (681).**

	<b>Rubin et al, 1965</b>	<b>Scheuer et al, 1967</b>	<b>Popper and Schaffner, 1970</b>	<b>Ludwig et al, 1978</b>
Χολόσταση		Στάδιο 1		
Βλάβες florid duct lesion (CNSDC)	Στάδιο 1		Στάδιο 1	
Περιχολαγγειίτις	Στάδιο 1		Στάδιο 1	
Καταστροφή χοληφόρων	Στάδιο 2			
Πορική αντίδραση	Στάδιο 2	Στάδιο 2	Στάδιο 2	
Φλεγμονή και νέκρωση				
Πυλαία ηπατίτιδα		Στάδιο 1	Στάδιο 1	Στάδιο 1
Περιπυλαία ηπατίτιδα		Στάδιο 1 <sup>α</sup>		Στάδιο 2
		Στάδιο 2 <sup>β</sup>	Στάδιο 2 <sup>β</sup>	
Γεφυροποιός νέκρωση				Στάδιο 3
Ίνωση				
Ινώδη διαφραγμάτια	Στάδιο 2	Στάδιο 3	Στάδιο 3	Στάδιο 3
Κίρρωση	Στάδιο 3	Στάδιο 4	Στάδιο 4	Στάδιο 4

α: Χωρίς πορική αντίδραση; β: Με πορική αντίδραση; CNSDC: chronic nonsuppurative destructive cholangitis

Με βάση το σύστημα του Ludwig η ιστολογική ταξινόμηση της ΠΧΚ περιλαμβάνει τέσσερα στάδια (848): Στο στάδιο I (πυλαία ηπατίτιδα) υπάρχει καταστροφή των διαφραγματικών και ενδολοβιακών χολαγγείων με διήθησή τους από Τ-λεμφοκύτταρα και τάση επέκτασης της φλεγμονής στα πυλαία διαστήματα. Μπορεί να παρατηρηθούν εστιακές ρήξεις των πόρων και επιθηλιοειδή κοκκιώματα γύρω από τους χοληφόρους πόρους. Η καταστροφή αυτή σε πολύ αρχικό στάδιο είναι περιορισμένη κατά τόπους και εμφανίζεται ασύμμετρα γι' αυτό πολλές φορές η εξέταση του βιοπτικού υλικού μπορεί να είναι απολύτως φυσιολογική. Στο στάδιο II (χολαγγειακή περιπυλαία ηπατίτιδα ή biliary interface hepatitis) έχουμε την ύπαρξη άτυπων χολαγγείων με ανώμαλο σχήμα και υποπλαστικό αυλό που συνοδεύεται από



διάχυτη ίνωση των πυλαίων διαστημάτων. Στο στάδιο III (διαφραγματικό) δημιουργούνται πυλαίο-πυλαίες ή πυλαίο-κεντρικές γεφυροποιές νεκρώσεις. Στο στάδιο IV (κίρρωτικό) υπάρχει εικόνα κίρρωσης με έντονη ίνωση και αναγεννητικά οζία.

### **5.3.θ Παθογένεια ΠΧΚ**

Υπάρχει ένα πλήθος διαταραχών της κυτταρικής και χυμικής ανοσίας που έχουν παρατηρηθεί στους ασθενείς με ΠΧΚ και που υποδηλώνουν ότι πρόκειται για νόσο ανοσολογικής αρχής. Το βασικό σημείο από το οποίο ξεκινάει η πορεία της νόσου φαίνεται πως είναι η καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων.

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι στις πυλαίες και περιπυλαίες περιοχές του ήπατος υπάρχει συγκέντρωση μεγάλου αριθμού CD4 και CD8 T-λεμφοκυττάρων καθώς επίσης και ηωσινόφιλων από τα αρχικά ακόμη στάδια της νόσου (853). Επίσης τα επιθηλιακά κύτταρα αρχίζουν να παρουσιάζουν φαινοτυπικές αλλαγές εκφράζοντας στην επιφάνειά τους μόρια MHC II, αντιγόνα ΠΔΓ, καθώς και διάφορα συνδεδεργετικά μόρια που φαίνεται ότι διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην παθογένεια της νόσου (854). Επιπρόσθετα, υπάρχει ένα παθολογικό προφίλ κυτταροκινών με κυριότερα στοιχεία την αύξηση της συγκέντρωσης της IFN- $\gamma$ , του TNF- $\alpha$ , και των IL-4, IL-5, IL-8 και IL-12, κυρίως σε προχωρημένα στάδια της νόσου. Τέλος υπάρχουν πολλές ενδείξεις για ενεργοποίηση των αποπτωτικών μηχανισμών τόσο στο ήπαρ όσο και στο μυελό των οστών ασθενών με ΠΧΚ (υπερέκφραση των Fas, Lewis Y και bax γονιδίων και μείωση των αντιαποπτωτικών μορίων bcl-2) (855, 856).

Ο παθογενετικός ρόλος της παρουσίας των AMA δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένος. Μελέτες τόσο in vivo όσο και in vitro δείχνουν ότι υπάρχει έκφραση της E2 υπομονάδας της ΠΔΓ στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων και μάλιστα το

γεγονός αυτό φαίνεται να συμβαίνει πριν την εμφάνιση των μορίων MHC II (857). Επομένως μπορεί δυνητικά να προκληθεί ενεργοποίηση του ανοσολογικού μηχανισμού μέσω της εξαρτώμενης από το αντίσωμα κυτταροτοξικότητας. Αντίθετα, ενδείξεις υποδηλωτικές του μη παθογενετικού ρόλου των AMA αποτελούν: η απουσία συσχέτισης της ανεύρεσής τους ή του τίτλου τους με κλινικές εκδηλώσεις της νόσου, η παραμονή των AMA ακόμη και μετά από τη μεταμόσχευση ήπατος και χωρίς επανεμφάνιση της νόσου στο μόσχευμα, καθώς και οι περιπτώσεις των AMA-αρνητικών ασθενών με ΠΧΚ. Ο βασικός επίτοπος που αναγνωρίζεται από τα AMA βρίσκεται στην εσωτερική λιποειδική περιοχή της ΠΔΓ και φαίνεται να είναι τρισδιάστατος, διότι η ελάχιστη αμινοξική αλληλουχία που απαιτείται είναι η 91-227 (858). Αντίθετα, οι T αυτοεπίτοποι είναι γραμμικοί και έχουν προσδιοριστεί και μελετηθεί με ακρίβεια. Τα CD4 λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος αναγνωρίζουν κυρίως το πεπτίδιο 163-176 (GDLLAEIETDKATI) της εσωτερικής λιποειδικής περιοχής της ΠΔΓ, ενώ πειράματα αντικατάστασης βάσεων έδειξαν ότι τα απαραίτητα αμινοξέα είναι τα 170 (γλουταμίνη-E), 172 (ασπαρτικό οξύ-D) και 173 (λυσίνη-K), επομένως υπάρχει ένα βασικό μοτίβο ExDK. Κατά δεύτερο λόγο υπάρχει και ένας άλλος επίτοπος στην εξωτερική δομή της ΠΔΓ και αντιστοιχεί στη αα 36-49 (GDLIAEVUETDKATV) (859).

Υπάρχουν αρκετές αναφορές και επιδημιολογικές μελέτες που δείχνουν ότι οι ασθενείς με ΠΧΚ έχουν αυξημένη συχνότητα βακτηριακών λοιμώξεων. Για παράδειγμα φαίνεται ότι οι ασθενείς με ΠΧΚ έχουν πολύ υψηλή συχνότητα επαναλαμβανόμενων ουρολοιμώξεων κατά κύριο λόγο από *Escherichia coli* (860, 861). Επιπρόσθετα, σε μια μελέτη διαπιστώθηκε ότι το 69% των ατόμων με επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις του ουροποιητικού είχαν αντισώματα που μπορούσαν να αναγνωρίσουν την ΠΔΓ-E2 υπομονάδα του συμπλέγματος (861). Επίσης έχει

παρατηρηθεί συσχέτιση της ΠΧΚ και με τη φυματίωση καθώς έχει βρεθεί ότι οι οροί των ασθενών με ΠΧΚ παρουσιάζουν αντιδραστικότητα έναντι του *Mycobacterium gordonae* (862, 863). Κατά καιρούς μια σειρά από διάφορους άλλους μικροοργανισμούς, όπως *Helicobacter* sp. (864), *Chlamydia pneumoniae* (865), *Propionibacterium acnes* (866), *Pseudomonas* sp., *Azotobacter vinelandii* (867), *Novosphingobium aromaticivorans* (868), *Retrovirus* sp.(869), έχουν ενοχοποιηθεί για την παθογένεια της νόσου, δεδομένου ότι ανιχνεύονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με ΠΧΚ συγκριτικά με τον υπόλοιπο πληθυσμό. Οι διάφοροι αυτοί λοιμογόνοι παράγοντες μπορούν να εμπλακούν στην παθογένεια της ΠΧΚ με δύο τρόπους: α) μέσω της άμεσης τοξικής τους επίδρασης στα επιθηλιακά κύτταρα των πύρων, προάγουν την απόπτωση των κυττάρων αυτών και την ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος για την απομάκρυνση των μολυσμένων κυττάρων, και β) προάγουν την ανοσία μέσω μοριακής μίμησης, δηλαδή μέσω διασταυρούμενης αντίδρασης μεταξύ αντιγόνων των μικροοργανισμών αυτών και αντιγόνων του ξενιστού. Αντίθετα, ενδέχεται οι μικροοργανισμοί αυτοί να μην έχουν πρωτογενή συμμετοχή στην παθογένεια της νόσου, αλλά να αντανακλούν μια δευτερογενή λοίμωξη των ήδη κατεστραμμένων επιθηλιακών κυττάρων (870).

Ο μηχανισμός της μοριακής μίμησης από μικροβιακά αντιγόνα που δίνουν διασταυρούμενη αντίδραση με αυτοαντιγόνα έχει μελετηθεί διεξοδικά στην περίπτωση της ΠΧΚ. Όπως αναφέρθηκε, η αμινοξική αλληλουχία ExDK είναι απαραίτητη για την αναγνώριση από τα T-λεμφοκύτταρα. Το ίδιο μοτίβο έχει βρεθεί και σε διάφορες πρωτεΐνες σε μικροοργανισμούς όπως η *E.coli*, το *A.vinelandii*, η *P. putiga* και *P.aeruginosa* και το *N. aromaticivorans*. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν επίσης να αναγνωριστούν από τα ειδικά λεμφοκύτταρα έναντι ΠΔΓ-E2 (867, 868, 871). Η δημιουργία επομένως αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών αυτών που

μπορούν να αναγνωρίζουν και τα αυτοαντιγόνα μπορεί να οδηγήσει στον υπερκερασμό των μηχανισμών ανοσολογικής ανοχής και να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου.

### ***5.3.1 Γενετική προδιάθεση στην ΠΧΚ***

Σε αντίθεση με την ΑΗ και παρά το μεγάλο αριθμό αναφορών δε φαίνεται να υπάρχει πολύ ισχυρή συσχέτιση της ΠΧΚ με κάποιον συγκεκριμένο HLA απλότυπο. Οι πιο κοινοί απλότυποι και αλληλόμορφα γονίδια που παρατηρούνται σε ασθενείς με ΠΧΚ είναι οι HLA-DR8(DRB1\*08), DR3, DPB1\*0501 και DRB1\*0803 στους Καυκάσιους, και οι DR2, DPB1\*0501 και DRB1\*0803 σε ασιατικούς πληθυσμούς (324). Έχουν επίσης μελετηθεί συσχετίσεις και με άλλα γονίδια, όπως πολυμορφισμοί του προαγωγέα του TNFα (872), TAP1/TAP2 (873), της IL-10 (874), του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D (734) και άλλα, χωρίς όμως αξιόλογα αποτελέσματα.

Πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι οι ασθενείς με ΠΧΚ έχουν αυξημένη συχνότητα μονοσωμίας X στα περιφερικά λεμφοκύτταρά τους σε σύγκριση με πάσχοντες από ηπατίτιδα C καθώς και με τον υγιή πληθυσμό (875). Το παραπάνω στοιχείο αν συσχετιστεί με τη γυναικεία υπεροχή της νόσου και το γεγονός ότι πάρα πολλά γονίδια ανοσολογικής ανοχής εδράζονται στο X χρωμόσωμα (876), μπορεί να φανεί χρήσιμο για την καλύτερη κατανόηση της παθογένειας της νόσου.

Μελέτες στο οικογενειακό περιβάλλον των ασθενών με ΠΧΚ, έδειξαν ότι υπάρχει σαφής οικογενής προδιάθεση, καθώς υπάρχει θετικό ιστορικό συγγενούς πρώτου βαθμού σε ποσοστό 1.33 έως και 6.4% στις διάφορες μελέτες (877-879). Σε μια πρόσφατη έρευνα, στην οποία λήφθηκε υπόψη και η συχνότητα της ΠΧΚ στο γενικό πληθυσμό, ο σχετικός κίνδυνος ήταν 10.5 για τα αδέλφια, 30.6 για τους απογόνους και συνολικά 18.4 για τους συγγενείς πρώτου βαθμού (880).

### 5.3.1α Φυσική πορεία και πρόγνωση της ΠΧΚ

Το προσδόκιμο επιβίωσης σε ασυμπτωματικούς ασθενείς κυμαίνεται μεταξύ 10 και 15 ετών, ενώ σε ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο της νόσου (στάδια III ή IV), το προσδόκιμο επιβίωσης είναι περίπου 8 χρόνια (691). Διάφορα κέντρα κατά καιρούς προσπάθησαν να προσδιορίσουν προγνωστικούς παράγοντες και να αναπτύξουν προγνωστικά μοντέλα επιβίωσης με βάση κλινικές και βιοχημικές παραμέτρους των ασθενών (Πίνακες 23 και 24)(683, 847, 881, 882). Γενικά, προγνωστικοί παράγοντες κακής έκβασης και πορείας της νόσου θεωρούνται η μεγάλη ηλικία, οι αυξημένες τιμές ολικής χολερυθρίνης, η έκπτωση της ηπατικής λειτουργίας (όπως εκτιμάται από τη μείωση της βιοσυνθετικής ικανότητας του ήπατος, που μετράται με τα επίπεδα αλβουμίνης) και το προχωρημένο ιστολογικό στάδιο.

**Πίνακας 23. Προγνωστικοί παράγοντες επιβίωσης ασθενών με ΠΧΚ**

<b>Yale (n=238)(847)</b>	<b>European (n=216)(881)</b>	<b>Mayo clinic (n=418)(882)</b>
Ηλικία	Ηλικία	Ηλικία
Χολερυθρίνη	Χολερυθρίνη	Χολερυθρίνη
Ηπατομεγαλία	Αλβουμίνη	Αλβουμίνη
Γεφυροποιός ίνωση ή εικόνα κίρρωσης στη βιοψία	Εικόνα κίρρωσης και κεντρικής χολόστασης στη βιοψία	Χρόνος προθρομβίνης
	Χρήση αζαθειοπρίνης	Οίδημα

Ένα από τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα προγνωστικά μοντέλα είναι το Mayo score, που προκύπτει από μαθηματικό τύπο στον οποίο λαμβάνονται υπ' όψιν παράμετροι όπως η ηλικία, η τιμή της ολικής χολερυθρίνης και της αλβουμίνης, ο χρόνος προθρομβίνης και η παρουσία ή όχι οιδήματος και ασκίτη (Πίνακας 24) (882).

**Πίνακας 24. Προγνωστικά μοντέλα ΠΧΚ.**

Μοντέλο	Τύπος υπολογισμού
European (881)	$R = 1.09 \times \log_e (\text{ολική χολερυθρίνη σε mg/dL}) + 0.0069 \times \exp[(\text{ηλικία σε έτη} - 20)/10] - 0.05 \times (\text{αλβουμίνη σε g/L}) + 0.88 \times (\text{δείκτης κίρρωσης}) + 0.68 \times (\text{δείκτης κεντρικής χολόστασης}) + 0.52 \times (\text{δείκτης θεραπείας}) + 3.09$
Mayo (882)	$R = 0.871 \times \log_e (\text{ολικής χολερυθρίνης σε mg/dL}) - 2.53 \times \log_e (\text{αλβουμίνη σε g/L}) + 0.039 \times (\text{ηλικία σε έτη}) + 2.38 \times (\text{χρόνος προθρομβίνης}) + 0.859 \times (\text{δείκτης οιδήματος})$
Oslo (683)	$R = 0.88 \times \log_e (\text{ολική χολερυθρίνη σε mg/dL} - 1.77) + 1.6812 \times (\text{δείκτης κίρρωσης} - 0.25)$

<sup>a</sup> 1: παρουσία, 0: απουσία; <sup>b</sup> 1:παρουσία, 0: απουσία; <sup>c</sup> 1: placebo, 0: αζαθειοπρίνη; <sup>d</sup> δείκτης οιδήματος 0: απουσία οιδήματος, 0.5 οίδημα που αντιμετωπίζεται επιτυχώς με διουρητική αγωγή, 1:ασκίτης ή οίδημα μη αντιμετωπίσιμο με διουρητικά; <sup>e</sup> 1: ιστορικό επεισοδίου κίρρωσης, 0: ελεύθερο ιστορικό

### 5.3.1β Θεραπεία της ΠΧΚ

Το φάρμακο εκλογής για την ΠΧΚ είναι το ούρσο-δεόξυ-χολικό οξύ (ursodeoxycholic acid, UDCA). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης του παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος, αν και μελέτες δείχνουν ότι μπορεί και επηρεάζει την έκκριση χολικού οξέος, βοηθάει στη σταθεροποίηση των κυτταρικών μεμβρανών (883), επηρεάζει την έκφραση HLA τάξης I στα ηπατοκύτταρα (884), μειώνει την παραγωγή κυτταροκινών (885) και χημειοτακτικών κυττάρων που συνεισφέρουν στη φλεγμονή (766), όπως τα ηωσινόφιλα, και καθυστερεί τη διαδικασία της απόπτωσης (886).

Σε μία σειρά από μελέτες διαπιστώθηκε ότι η χρήση UDCA, μπορεί να μειώσει ή να εξαφανίσει τα συμπτώματα και να ομαλοποιήσει το βιοχημικό προφίλ των ασθενών (887-891). Η μη ανταπόκριση στο UDCA μπορεί να ανέρχεται στο 66% των ασθενών και αυτό παρατηρείται πιο συχνά σε προχωρημένα στάδια της νόσου (892). Η δοσολογία του κυμαίνεται από 13-20 mg/kg/ημέρα. Παρά τη σημαντική βελτίωση στην κλινική εικόνα των ασθενών, η δυνατότητα του UDCA να βελτιώσει την

επιβίωση έχει αμφισβητηθεί έντονα. Δύο μεταανалύσεις έδειξαν ότι η χορήγηση UDCA δεν επηρέαζε στατιστικώς σημαντικά την πορεία της νόσου, την επιβίωση ή την ανάγκη για μεταμόσχευση (893, 894).

Εκτός του UDCA, έχει κατά καιρούς δοκιμαστεί η χρήση και άλλων φαρμάκων, όπως κορτικοστεροειδή (729, 895), αζαθειοπρίνη (881, 896), κυκλοσπορίνη (897, 898), μεθοτρεξάτη (899, 900), αντι-ινωτικών παραγόντων (πενικιλλαμίνη, κολχικίνη, θαλιδομίδα, χλωραμβουκίλη, σιλυμαρίνη, βεξαφιμπράτη, MMF) χωρίς αξιόλογα αποτελέσματα. Η σύγχρονη στρατηγική στην αντιμετώπιση της ΠΧΚ είναι όσοι ασθενείς δεν ανταποκρίνονται στη μονοθεραπεία με UDCA, να λαμβάνουν είτε συνδυασμό UDCA με κορτικοστεροειδή, αζαθειοπρίνη, μεθοτρεξάτη, κολχικίνη, είτε ακόμα και τριπλό σχήμα. Παρά ταύτα, το ιστολογικό όφελος δε φαίνεται και πάλι σημαντικό, εκτός από μια αναφορά που διαπιστώνει βελτίωση των παθολογοανατομικών βλαβών μετά από χορήγηση συνδυασμένου σχήματος UDCA-κολχικίνης.

## 5.4 Σύνδρομο επικάλυψης

Η καθημερινή κλινική εμπειρία έχει δείξει ότι περίπου 3%-15% των ατόμων με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, εμφανίζουν κλινικά, εργαστηριακά και ιστολογικά ευρήματα που αποτελούν ένα μείγμα χαρακτηριστικών ΑΗ και αυτοάνοσου χολοστατικού νοσήματος (901, 902). Οι καταστάσεις αυτές ονομάζονται σύνδρομο επικάλυψης και μπορούν να εμφανιστούν με τρεις μορφές: 1. ταυτόχρονη συνύπαρξη δύο αυτοάνοσων καταστάσεων (ΑΗ και ΠΧΚ ή ΑΗ και ΠΣΧ). 2 ύπαρξη μιας βασικής αυτοάνοσης ηπατοπάθειας που έχει και μερικά δευτερεύοντα χαρακτηριστικά άλλου αυτοάνοσου νοσήματος του ήπατος και 3. διαδοχική στο χρόνο εμφάνιση δύο διαφορετικών νόσων, κατάσταση που θεωρείται αρκετά σπάνια (901, 903).

### 5.4.α Σύνδρομο επικάλυψης ΑΗ/ΠΧΚ

Η συχνότητα του συνδρόμου επικάλυψης ΑΗ/ΠΧΚ υπολογίζεται στο 2-10% (903). Εντούτοις, σύμφωνα με εκτιμήσεις της διεθνούς ομάδας για τη μελέτη της ΑΗ, η πραγματική συχνότητα φαίνεται να είναι πολύ μικρότερη (1-2%). Οι διαφορές στην παρατηρούμενη συχνότητα στις διάφορες μελέτες εξαρτώνται κυρίως από τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση. Σε μια μεγάλη σειρά ασθενών με ΠΧΚ, υπολογίστηκε ότι ένα ποσοστό 19% των πασχόντων είχε ενδείξεις ΑΗ (score 10-15) χρησιμοποιώντας το τροποποιημένο σύστημα βαθμολόγησης, ενώ το ποσοστό αυτό ανερχόταν στο 62% χρησιμοποιώντας το προηγούμενο σύστημα. Το ποσοστό ασθενών με σίγουρη διάγνωση ΑΗ (score>15) ήταν 2.2% (904). Σε μια άλλη τυχαioποιημένη μελέτη αναφέρεται συχνότητα 2.7% έως 4.8% (905). Αντίστροφα, στο 5% των ασθενών με διάγνωση ΑΗ παρατηρήθηκαν ευρήματα ή συμπτώματα ΠΧΚ (ιστολογικά ευρήματα, αυξημένη χολερυθρίνη και/ ή αλκαλική φωσφατάση) (906).



Στις περισσότερες περιπτώσεις οι ασθενείς εμφανίζουν ταυτόχρονα ευρήματα και των δύο αυτοάνοσων διαταραχών. Λιγότερο συχνά υπάρχουν ασθενείς με τυπική διάγνωση ΑΗ που ανταποκρίνονται καλά στην ανοσοκατασταλτική αγωγή και εν συνεχεία εμφανίζουν σημεία ΠΧΚ (903). Τέλος υπάρχουν σπάνιες αναφορές μετάβασης από τη μία μορφή ηπατοπάθειας στην άλλη με αλλαγή της αρχικής διάγνωσης και της θεραπείας (907).

Για τη διάγνωση του συνδρόμου επικάλυψης ΑΗ/ΠΧΚ πρέπει να υπάρχουν δύο τουλάχιστον από τα τρία κριτήρια για κάθε νόσο. Τα κριτήρια αυτά για την ΑΗ είναι: α) επίπεδα ALT τουλάχιστον πέντε φορές άνω του φυσιολογικού ορίου, β) τιμές IgG ανοσοσφαιρίνης τουλάχιστον δύο φορές άνω του φυσιολογικού ορίου ή παρουσία SMA αντισωμάτων και γ) βιοψία ήπατος με εικόνα μέτριας ή σοβαρής περιτυλαίας διαβρωτικής νέκρωσης. Τα κριτήρια για τη διάγνωση της ΠΧΚ είναι: α) επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης δύο φορές άνω του φυσιολογικού ή γGT πέντε φορές άνω του φυσιολογικού ορίου, β) ανίχνευση AMA και γ) βιοψία ήπατος με εικόνα βλάβης στα χοληφόρα. Κάθε ασθενής θα πρέπει επίσης να ελέγχεται υπερηχογραφικά για αποφρακτικά φαινόμενα στα χοληφόρα, να έχει αρνητικό ιολογικό έλεγχο για HCV, να μην αναφέρει ημερήσια κατανάλωση αλκοόλ άνω των 20g και να μην έχει ιστορικό χρήσης ηπατοτοξικών ή χολαγγειοτοξικών ουσιών (907).

Η θεραπευτική αντιμετώπιση αυτού του συνδρόμου επικάλυψης είναι κατά κύριο λόγο συνδυασμός της αγωγής των δύο νόσων, δηλαδή συνδυασμός ανοσοκατασταλτικής αγωγής με UDCA (906, 907).

#### **5.4.β Σύνδρομο επικάλυψης ΑΗ/ΠΣΧ**

Η συχνότητα του συνδρόμου επικάλυψης ΑΗ/ΠΣΧ, όταν εφαρμοστεί το σύστημα βαθμολόγησης της ΑΗ σε ασθενείς με ΠΣΧ φαίνεται ότι προκύπτει μεταξύ 1.4% και 8.6% στις περισσότερες μελέτες.

Στις περισσότερες περιπτώσεις στους ενήλικες συνυπάρχουν οι εκδηλώσεις και των δύο αυτοάνοσων καταστάσεων τη στιγμή της διάγνωσης, σε αντίθεση με τους παιδιατρικούς ασθενείς όπου αρκετά συχνά οι πάσχοντες από ΑΗ, αναπτύσσουν εν συνεχεία χολαγγειογραφικά ευρήματα διαγνωστικά ΠΣΧ (903).

Η θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με αυτό το σύνδρομο επικάλυψης θα πρέπει να περιλαμβάνει χρήση κορτικοστεροειδών με ή χωρίς UDCA, που φαίνεται ότι έχει αποτέλεσμα σε αρκετές μελέτες τουλάχιστον στο ηπατιτιδικό σκέλος της νόσου (903).

#### ***5.4.γ Σύνδρομο επικάλυψης ΠΧΚ/ΠΣΧ***

Προς το παρόν μόνο δύο αναφορές υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία για την ύπαρξη τέτοιου είδους επικάλυψης αυτοάνοσων νοσημάτων του ήπατος και θεωρείται εξαιρετικά αμφίβολη η ύπαρξη μιας τέτοιας νοσολογικής οντότητας στην πραγματικότητα (574, 575).

## **Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η πρωτοπαθής χολική κίρρωση (ΠΧΚ) αποτελεί χρόνιο χολοστατικό νόσημα του ήπατος αγνώστου αιτιολογίας που χαρακτηρίζεται από την ανοσοεπαγόμενη καταστροφή των ενδοηπατικών χοληφόρων και την προοδευτική εμφάνιση ίνωσης, κίρρωσης και ηπατικής ανεπάρκειας (637).

Η ΠΧΚ προσβάλλει κυρίως τις γυναίκες μέσης ηλικίας, με το λόγο ανδρών:γυναικών να φτάνει ενίοτε το 1:10 και την μεγαλύτερη επίπτωση της νόσου να εμφανίζεται στην πέμπτη δεκαετία της ζωής (637).

Με την καλύτερη κατανόηση της νόσου και την πρόοδο των διαγνωστικών τεχνικών, η νόσος πλέον διαγιγνώσκεται σε πρωιμότερα στάδια, ώστε σήμερα το 60% των ασθενών με ΠΧΚ να είναι ασυμπτωματικοί κατά τη στιγμή της διάγνωσης, ενώ προ δεκαετίας το ποσοστό αυτό ανερχόταν σε 40% (681). Η πρώιμη διάγνωση της νόσου κρίνεται σημαντική διότι οι ασθενείς με ΠΧΚ, παρότι ενδέχεται να είναι ασυμπτωματικοί, εμφανίζουν μειωμένη επιβίωση σε σχέση με υγιή άτομα (639). Ωστόσο, η έγκαιρη έναρξη αγωγής με ουρσοδεόξυχολικό οξύ (UDCA 13-15 mg/kg/ημέρα σε δύο διηρημένες δόσεις), πριν τα τελικά στάδια της νόσου μάλλον κανονικοποιεί το προσδόκιμο της επιβίωσης (908, 909).

Η παθογένεια της νόσου δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, μολονότι η ισχύουσα άποψη δέχεται ένα πολυπαραγοντικό μοντέλο της νόσου που περιλαμβάνει τόσο γενετικούς όσο και περιβαλλοντικούς παράγοντες (910). Η συμμετοχή περιβαλλοντικών παραγόντων στην εκδήλωση της νόσου καταδεικνύεται από το γεγονός ότι πληθυσμοί με κοινό γενετικό υπόβαθρο που κατοικούν σε διαφορετικές περιοχές εμφανίζουν διαφορές στον επιπολασμό της νόσου (668, 680). Επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν συσχέτιση της νόσου με διάφορους προδιαθεσικούς παράγοντες, όπως είναι το ιστορικό επανειλημμένων ουρολοιμώξεων

και η ορμονική θεραπεία υποκατάστασης (911). Επιπρόσθετα, πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν τη συμμετοχή ξενοβιοτικών αλλά και διάφορων μικροοργανισμών, όπως είναι η *Escherichia coli* και το *Novosphingobium aromaticivorans* ως εκλυτικών παραγόντων της νόσου (912).

Ωστόσο, υπάρχουν ισχυρά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου έχει και η γενετική προδιάθεση του ασθενούς, όπως είναι η αυξημένη συχνότητα από κοινού εμφάνισης της νόσου σε μονοζυγωτικούς διδύμους, αλλά και η αυξημένη επίπτωση της ΠΧΚ και άλλων αυτοάνοσων διαταραχών στις οικογένειες ασθενών με ΠΧΚ (913, 914). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι ο επιπολασμός της οικογενούς ΠΧΚ μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 1.3% και 9% (877-880, 915-917). Πέραν όμως της αυξημένης συχνότητας εμφάνισης της νόσου και άλλων αυτοάνοσων διαταραχών, στις οικογένειες ασθενών με ΠΧΚ έχει περιγραφεί και αυξημένη συχνότητα ανίχνευσης αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων (AMA), ο επιπολασμός των οποίων σε πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ μπορεί να ανέρχεται σε 1% έως 13.1% (915, 916, 918-921).

Η ανίχνευση AMA, που στρέφονται έναντι μιτοχονδριακών αντιγόνων του πολυενζυμικού συστήματος της 2-κετοξικής δεϋδρογονάσης, κυρίως της E2 ενζυμικής υπομονάδας του συμπλέγματος της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης (ΠΔΓ) (pyruvate dehydrogenase complex, PDC), της 2-κετοξικής δεϋδρογονάσης διακλαδισμένης αλύσου (ΚΔΓΔΑ) (branched-chain 2-oxoacid pyruvate dehydrogenase complex-BCOADC), και της κετογλουταρικής δεϋδρογονάσης (ΚΓΔΓ) (2-oxoglutarate pyruvate dehydrogenase complex-OGDC), αποτελεί τη θεμέλια λίθο στη διάγνωση της ΠΧΚ (97, 637). Τα AMA ανιχνεύονται στο 90-95% των ασθενών και μπορεί να εμφανίζονται πολύ πριν την εμφάνιση των κλινικών εκδηλώσεων της νόσου (97, 637). Έχει διαπιστωθεί ότι η ανίχνευση των AMA σε

ασυμπτωματικούς ασθενείς μπορεί να συνοδεύεται από συμβατή με ΠΧΚ ιστολογική εικόνα στο 40% αυτών και να ακολουθείται από κλινική εκδήλωση της νόσου (793, 794).

Πέραν των AMA, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η ανίχνευση ειδικών για την ΠΧΚ αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) που δίνουν πρότυπο πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων (multiple nuclear dots, MND) ή περιπυρηνικό φθορισμό δίκην στεφάνης (rim-like/membranous, RL/M) στον έμμεσο ανοσοφθορισμό χαρακτηρίζει το 25% - 65% των ασθενών με ΠΧΚ αν χρησιμοποιηθούν IgG υποτάξης αντιοροί και έχει υψηλή ειδικότητα για τη νόσο, αλλά και προγνωστική αξία (232, 816).

Παρότι υπάρχουν αρκετές μελέτες που έχουν ασχοληθεί με την ανίχνευση των AMA σε πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ, δεν υπάρχει καμία πληροφορία στον Ελλαδικό χώρο, ενώ δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες και για την συσχέτιση της εμφάνισης των AMA με την έκθεση σε γνωστούς παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου. Επιπρόσθετα, ο επιπολασμός των ειδικών για τη νόσο ANA (MND και RL/M) στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς. Δεδομένου δε, ότι οι δημοσιευμένες μελέτες εμφανίζουν σημαντική διακύμανση στη συχνότητα εμφάνισης των AMA ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευσή τους και στον υπό εξέταση πληθυσμό, είναι χρήσιμη η ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων με διάφορες μεθόδους και η συλλογή δεδομένων που αφορούν στον Ελληνικό πληθυσμό. Τέλος, η σύγκριση της συχνότητας εμφάνισης αυτών των αυτοαντισωμάτων γίνεται στην πλειονότητα των μελετών με υγιείς μάρτυρες και δεν έχει επιχειρηθεί σύγκριση μεταξύ πρώτου βαθμού συγγενών ασθενών με διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος.

Ως εκ τούτου, ο σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της συχνότητας εμφάνισης AMA και ANA σε πρώτου βαθμού συγγενείς Ελλήνων ασθενών με ΠΧΚ

σε σύγκριση με πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ) ή αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ) και υγιείς μάρτυρες. Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε η συσχέτιση της παρουσίας αυτών των αυτοαντισωμάτων με επιδημιολογικά δεδομένα, στοιχεία εκ του ιατρικού ιστορικού, διατροφικές συνήθειες και χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής των εξεταζόμενων συγγενών.



## 2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Ασθενείς και συγγενείς πρώτου βαθμού

Από 140 ασθενείς με καλά τεκμηριωμένη ΠΧΚ ζητήθηκε να συμμετέχουν στην μελέτη. Για κάθε έναν εξ αυτών η διάγνωση της ΠΧΚ είχε τεθεί εφόσον πληρούνταν τουλάχιστον 2 από τα 3 ακόλουθα διαγνωστικά κριτήρια: θετικά AMA (σε αραιώση  $\geq 1:40$ ) με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε υπόστρωμα ήπατος-νεφρού-στομάχου επίμυος, αυξημένα χολοστατικά ένζυμα και ιστολογική εικόνα συμβατή με ΠΧΚ.

Εφόσον ο ασθενής έδινε τη συγκατάθεσή του για τη συμμετοχή στη μελέτη, ακολουθούσε συνέντευξη και στοχευμένο ιστορικό, ώστε να ληφθούν πληροφορίες για όλους τους συγγενείς πρώτου βαθμού του ασθενούς, δηλαδή γονείς, αδέρφια και τέκνα. Με τις πληροφορίες αυτές σχεδιαζόταν γενεαλογικό δένδρο του ασθενούς με τη χρήση του λογισμικού SmartDraw VP (SmartDraw Inc., San Diego, CA, USA) (Παράρτημα Α).

Εν συνεχεία, ακολουθούσε επικοινωνία με τους πρώτου βαθμού συγγενείς από τους οποίους ζητούνταν να συμμετέχουν στη μελέτη σε προκαθορισμένη συνάντηση που περιελάμβανε: α) λήψη ιατρικού ιστορικού και στοχευμένη συνέντευξη με χρήση ειδικά διασκευασμένου ερωτηματολογίου με βάση το ερωτηματολόγιο NHANES 2001-2002 (US National Health and Nutrition Examination Survey) (Παράρτημα Β)), β) κλινική εξέταση, και γ) λήψη δείγματος αίματος που περιελάμβανε γενική αίματος, έλεγχο ηπατικής βιοχημείας και ορό για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων. Οι συναντήσεις έλαβαν χώρα στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, στο Κέντρο Υγείας Τυρνάβου, στο Κέντρο Υγείας Ελασσόνας και σε κατ'οίκον επισκέψεις στους συγγενείς που κατοικούσαν στην Καρδίτσα, τα Τρίκαλα, το Βόλο ή σε χωριά των αντίστοιχων νομών. Σε κάθε περίπτωση η μεταφορά των δειγμάτων για επεξεργασία στο Ερευνητικό Εργαστήριο Παθολογίας γινόταν με τη χρήση ειδικού ψυκτικού

θαλάμου, εντός λίγων ωρών από την αιμοληψία. Εκ των 140 ασθενών με ΠΧΚ από τους οποίους ζητήθηκε η συμμετοχή στη μελέτη, μόνο οι 44 συμφώνησαν ή είχαν εν ζωή συγγενείς που κατοικούσαν στην Ελλάδα. Μεταξύ αυτών, οι 8 ασθενείς ήταν αρνητικοί για AMA σε όλους τους προηγούμενους ελέγχους και είχαν διαγνωστεί με AMA-αρνητική ΠΧΚ. Τελικά 101 πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ δέχθηκαν να συμμετάσχουν και συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

Ως πρώτη ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 40 πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΑΗ-1 ή ΠΣΧ, που δέχθηκαν να συμμετάσχουν στη μελέτη μέσω αντίστοιχης διαδικασίας, όπως αυτή που ακολουθήθηκε για τους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ. Αυτοί οι πρώτου βαθμού συγγενείς αντιστοιχούσαν σε 11 ασθενείς με ΑΗ-1 και 7 ασθενείς με ΠΣΧ.

Ως δεύτερη ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 40 υγιείς αιμοδότες με ελεύθερο ιατρικό ιστορικό, που είχαν βρεθεί αρνητικοί για HBsAg, για anti-HCV, και για anti-HIV.

## **2.2 Μέθοδοι**

### **2.2.1 Ανίχνευση αυτοαντισωμάτων με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε ιστικές τομές.**

Η ανίχνευση των AMA αντισωμάτων, καθώς και των ANA, SMA (smooth muscle antibodies), PCA (parietal cell antibodies) και anti-LKM (liver kidney microsomes), έγινε χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα ήπαρ, νεφρό και στομάχι επίμυος (Wistar rats). Αναλυτικότερα, για τη εκτέλεση του έμμεσου ανοσοφθορισμού, από τους επίμυες, αφού θανατώθηκαν, αφαιρέθηκαν το ήπαρ, ο στόμαχος και οι νεφροί τους. Τα εν λόγω όργανα παρασκευάστηκαν στη συνέχεια σε τομές πάχους 7  $\mu\text{m}$  με τη βοήθεια κρυοτόμου και εν συνεχεία τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες

και φυλάσσονταν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο των 6 εβδομάδων.

Αρχικά, για το πείραμα έγινε τοποθέτηση σε κάθε block ήπατος-νεφρού-στομάχου των δειγμάτων θετικών και αρνητικών μαρτύρων και των υπό εξέταση ορών σε αραιώση, σε αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα  $0.15 \text{ mol/L}$ , pH 7.4 (PBS), ίση με 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 και 1:320. Αφού επώστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι και σε ικανοποιητική υγρασία για 40 min, έγινε έκπλυση των πλακών με PBS (τρεις φορές) και κατόπιν τοποθέτηση της αντι-ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης (IgA, IgG, IgM,  $\kappa$  και  $\lambda$  αλύσων), που είναι συζευγμένη με φλουορεσκεΐνη (FITC conjugate) (Dako Inc., Glostrup, Denmark). Ακολούθησε εκ νέου επώση για 40 min στις προαναφερθείσες συνθήκες, πλύσιμο (τρεις φορές) και τελικά παρατήρηση των αποτελεσμάτων σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού. Θετικό θεωρείται το αποτέλεσμα όταν ανιχνεύεται φθορισμός σε αραιώση  $\geq 1:40$ .

### **2.2.2 Ανίχνευση ANA, AMA, SMA σε υπόστρωμα HEP-2 κυττάρων**

Η ανίχνευση των ANA, AMA και SMA έγινε χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα πλακίδια μονιμοποιημένων κυττάρων HEP-2 (NOVA Lite Hep-2, INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA). Αρχικά τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις (wells) του πλακιδίου τα δείγματα των θετικών και αρνητικών μαρτύρων (positive και negative controls) και στη συνέχεια οι υπό εξέταση οροί σε αραιώσεις 1:40, 1:80, 1:160 και 1:320. Ακολουθεί επώση των δειγμάτων για 30 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, στο σκοτάδι και σε ικανοποιητική υγρασία. Στη συνέχεια γίνεται δύο φορές πλύσιμο των πλακιδίων με PBS για 10 min και επακόλουθη τοποθέτηση, μιας σταγόνας ανά well, αντι-ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG συνδεδεμένης με φλουορεσκεΐνη (FITC conjugate). Στη συνέχεια ακολουθεί επώση στις προαναφερθείσες συνθήκες για 30min και επανάληψη του πλυσίματος. Τελικά

γίνεται εκτίμηση των αποτελεσμάτων σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού. Θετικό θεωρείται το δείγμα όταν ανιχνεύεται φθορισμός σε αραιώση  $\geq 1:80$ .

### **2.2.3 Ανίχνευση των ANCA**

Η ανίχνευση των ANCA έγινε χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα πλακίδια που φέρουν σε ειδικές θέσεις (wells) ουδετερόφιλα μονιμοποιημένα σε αιθανόλη (Nova Lite ANCA, INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA). Στις θέσεις των πλακιδίων τοποθετούνται αρχικά οι θετικοί και οι αρνητικοί μάρτυρες και στη συνέχεια οι εξεταζόμενοι οροί σε αραιώσεις 1:20, 1:40 και 1:80 και στη συνέχεια ακολουθείται η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε για την ανίχνευση των ANA, AMA και SMA σε υπόστρωμα HEp-2 κυττάρων. Περιληπτικά, μετά την επί 30min επώαση των ορών σε κατάλληλες συνθήκες ακολουθούν δύο κύκλοι πλυσίματος με PBS διάρκειας 10min. Στη συνέχεια μία σταγόνα FITC conjugate τοποθετείται σε κάθε well και επώάζεται για 30min, ενώ ακολουθούν δύο κύκλοι πλυσίματος με PBS. Η τελική εκτίμηση των αποτελεσμάτων γίνεται σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού. Θετικό θεωρείται το αποτέλεσμα όταν ανιχνεύεται φθορισμός σε αραιώση  $\geq 1:20$ .

### **2.2.4 Ανοσοαποτύπωση.**

Η διενέργεια της ανοσοαποτύπωσης έγινε μέσω εμπορικά διαθέσιμης μεθόδου που χρησιμοποιεί μεμβράνες με καθηλωμένο κεκαθαρμένο αντιγόνο στερεωμένες σε λωρίδες πλαστικού υλικού (Euroline, Euroimmun AG., Lubeck, Γερμανία). Μετά την επώαση των λωρίδων με 1.5mL διαλύματος blocking buffer για 5 λεπτά, ακολουθεί επώαση κάθε ξεχωριστής λωρίδας με 1.5mL δείγματος ορού ασθενούς σε αραιώση 1:50 για χρονικό διάστημα 30 λεπτών. Ακολουθούν 3 κύκλοι έκπλυσης και προσθήκη αντι-ανθρώπινου IgG αντισώματος συνδεδεμένου με ένζυμο με επώαση για 30 λεπτά ώστε να επιτραπεί η σύνδεση του αντι-ανθρώπινου IgG αντισώματος με τα

σχηματισμένα συμπλέγματα αντισώματος-ακίνητοποιημένου αντιγόνου . Μετά από 3 κύκλους έκπλυσης προστίθεται χρωμογόνο και ακολουθεί επώαση 10 λεπτών, στο τέλος της οποίας η αντίδραση διακόπτεται και ακολουθεί η οπτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων. Κάθε λωρίδα φέρει σε ειδική θέση θετικό μάρτυρα (positive control) ενώ σε κάθε δέσμη εξετάσεων χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας (negative control) από την παρακαταθήκη του Ερευνητικού Εργαστηρίου Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Παθολογίας. Για την αντικειμενικότερη εκτίμηση των αποτελεσμάτων, μετά την οπτική εκτίμηση ακολουθούσε ψηφιακή σάρωση και ψηφιοποίηση των λωρίδων. Οι ψηφιακές εικόνες επεξεργάστηκαν στην συνέχεια με το λογισμικό ImageJ (National Institutes of Health, USA) ώστε να ληφθεί ιστόγραμμα που αντιστοιχούσε στην ένταση του χρώματος κάθε λωρίδας.

#### **2.2.5 Enhanced performance MIT3 ELISA**

Πέραν του έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των IgG AMA χρησιμοποιήθηκε, όπως έχουμε περιγράψει (792), εμπορικά διαθέσιμη ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιεί ένα ανασυνδυασμένο αντιγόνο (MIT3), το οποίο περιλαμβάνει τους τρεις κυριότερους αντιγονικούς επίτοπους των AMA, ήτοι PDC-E2, BCOADC-E2 και OGDC-E2 (M2 EP, MIT3, ELISA, Quanta Lite, INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA). Περιληπτικά, η μέθοδος χρησιμοποιεί κεκαθαρμένο αντιγόνο MIT3 που είναι δεσμευμένο στα πηγαδάκια μιας μικροπλάκας πολυστυρενίου υπό συνθήκες που διατηρούν το αντιγόνο στην αμιγή του κατάσταση. Συγκεκριμένη ποσότητα (100μL) προαραιωμένων ορών ελέγχου και υπό εξέταση ορών σε αραιώση 1:101 (5μL ορού σε 500μL αραιωτικού δείγματος) προστίθενται σε ξεχωριστά πηγαδάκια, επιτρέποντας στα παρόντα AMA να δεσμευθούν στο ακίνητοποιημένο αντιγόνο. Ακολουθεί επώαση 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 3 κύκλους

έκπλυσης με το παρεχόμενο ρυθμιστικό διάλυμα τα μη αντιδρώντα αντισώματα ξεπλένονται και προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι 100μL αντι-ανθρώπινου IgG αντισώματος συνδεδεμένου με ένζυμο. Ακολουθεί δεύτερη επώαση 30 λεπτών που επιτρέπει τη σύνδεση του αντι-ανθρώπινου IgG αντισώματος με τα σχηματισμένα συμπλέγματα αντισώματος-ακινητοποιημένου αντιγόνου. Ακολουθούν 3 κύκλοι έκπλυσης και στη συνέχεια προσθήκη 100μL υποστρώματος υπεροξειδάσης που προκαλεί χρωματική αλλαγή ανάλογη με τη συγκέντρωση των αντισωμάτων. Μετά από 30 λεπτά επώασης σε σκοτεινό μέρος, προστίθενται 100μL όξινου διαλύματος ανά πηγαδάκι που διακόπτει την ενζυματική αντίδραση παραγωγής χρώματος. Ακολουθεί η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων (εντός μιας ώρας από το τέλος της διαδικασίας) σε φωτόμετρο στα 450nm με φίλτρο αναφοράς στα 620nm. Θετικά θεωρήθηκαν τα δείγματα που παρουσίαζαν συγκέντρωση μεγαλύτερη από διαχωριστικό όριο που υπολογίστηκε σε ταυτόχρονη εργασία του Ερευνητικού Εργαστηρίου Παθολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (μέσος όρος + 3 σταθερές αποκλίσεις ενός δείγματος υγιών μαρτύρων) (792).

Η ευαισθησία της μεθόδου, με βάση τις παρεχόμενες από την κατασκευάστρια εταιρεία πληροφορίες, ανέρχεται σε 87.3%, ενώ η ειδικότητά της σε 98.7%. Ο συντελεστής διακύμανσης ήταν 1.5% εντός της ίδιας ανάλυσης και 2.3% μεταξύ επανειλημμένων αναλύσεων.

#### **2.2.6 Sp100 και gp210 ELISA.**

Για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των Sp100 και gp210 αντιγόνων χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμες ELISA (Quanta Lite sp100 και Quanta Lite gp210, INOVA Diagnostics, San Diego, CA, ΗΠΑ). Περιληπτικά, η μέθοδος χρησιμοποιεί κεκαθαρμένο κλάσμα Sp100 και κεκαθαρμένο τμήμα του καρβοξυτελικού άκρου της gp210 που είναι δεσμευμένα στα πηγαδάκια μιας

μικροπλάκας πολυστυρενίου υπό συνθήκες που διατηρούν το αντιγόνο στην αμιγή του κατάσταση. Συγκεκριμένη ποσότητα (100μL) προαραιωμένων ορών ελέγχου και υπό εξέταση ορών σε αραιώση 1:101 (5μL ορού σε 500μL αραιωτικού δείγματος) προστίθενται σε ξεχωριστά πηγαδάκια, επιτρέποντας στα παρόντα αυτοαντισώματα να δεσμευθούν στο ακινητοποιημένο αντιγόνο. Ακολουθεί επώαση 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά από 3 κύκλους έκπλυσης με το παρεχόμενο ρυθμιστικό διάλυμα τα μη αντιδρώντα αντισώματα ξεπλένονται και προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι 100μL αντι-ανθρώπινου IgG αντισώματος συνδεδεμένου με ένζυμο. Ακολουθεί δεύτερη επώαση 30 λεπτών που επιτρέπει τη σύνδεση του αντι-ανθρώπινου IgG αντισώματος με τα σχηματισμένα συμπλέγματα αντισώματος-ακινητοποιημένου αντιγόνου. Ακολουθούν 3 κύκλοι έκπλυσης και στη συνέχεια προσθήκη 100μL υποστρώματος υπεροξειδάσης που προκαλεί χρωματική αλλαγή ανάλογη με τη συγκέντρωση των αντισωμάτων. Μετά από 30 λεπτά επώασης σε σκοτεινό μέρος, προστίθενται 100μL όξινου διαλύματος ανά πηγαδάκι που διακόπτει την ενζυματική αντίδραση παραγωγής χρώματος. Ακολουθεί η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων (εντός μιας ώρας από το τέλος της διαδικασίας) σε φωτόμετρο στα 450nm με φίλτρο αναφοράς στα 620nm.

Για κάθε δείγμα υπολογίστηκε ο μέσος όρος της απορροφητικότητας και στη συνέχεια εκτιμήθηκε η τιμή δείγματος σε μονάδες χρησιμοποιώντας τον τύπο:

Τιμή δείγματος (μονάδες) = (απορρόφηση δείγματος : απορρόφηση χαμηλού θετικού ορού ελέγχου) × συγκέντρωση στον ορό ελέγχου.

Τα δείγματα ερμηνεύθηκαν ως:

- αρνητικά, όταν η τιμή δείγματος ήταν μεταξύ 0.0 και 20.0 μονάδων,
- οριακά, όταν η τιμή δείγματος ήταν μεταξύ 20.1 και 24.9 μονάδων,

-θετικά, όταν η τιμή δείγματος ήταν άνω των 25.0 μονάδων.

Η ευαισθησία της Sp100 ELISA ανέρχεται σε 24.5% και η ειδικότητά της σε 99.5%.

Για την gp210 ELISA η ευαισθησία και ειδικότητα είναι 26.1% και 100%, αντίστοιχα.



### 3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Το τεστ Kolmogorov-Smirnov χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί αν οι συνεχείς μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν στην στατιστική ανάλυση ακολουθούσαν την κανονική κατανομή. Οι συνεχείς μεταβλητές που ακολουθούν την κανονική κατανομή εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση, ενώ οι συνεχείς μεταβλητές που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή παρουσιάζονται ως διάμεσος (ενδοτεταρτημοριακό εύρος). Οι ποιοτικές μεταβλητές, όπως οι κατηγορικές ή ονομαστικές μεταβλητές και οι μεταβλητές διάταξης παρουσιάζονται ως απόλυτες ή σχετικές συχνότητες. Ανάλογα με τις εκάστοτε προϋποθέσεις χρησιμοποίησής τους, για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν οι εξής δοκιμασίες: Student's *t* test, Mann-Whitney U-test, One-way ANOVA με post-hoc δοκιμασίες LSD ή Tukey's HSD, Kruskal-Wallis test,  $\chi^2$  test και Fischer's exact test. Όλες οι στατιστικές δοκιμασίες ήταν αμφίπλευρες (two-tailed) και θεωρήθηκαν σημαντικές όταν  $p < 0.05$ . Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων ήταν το SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) και το MedCalc 10.6 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. Δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

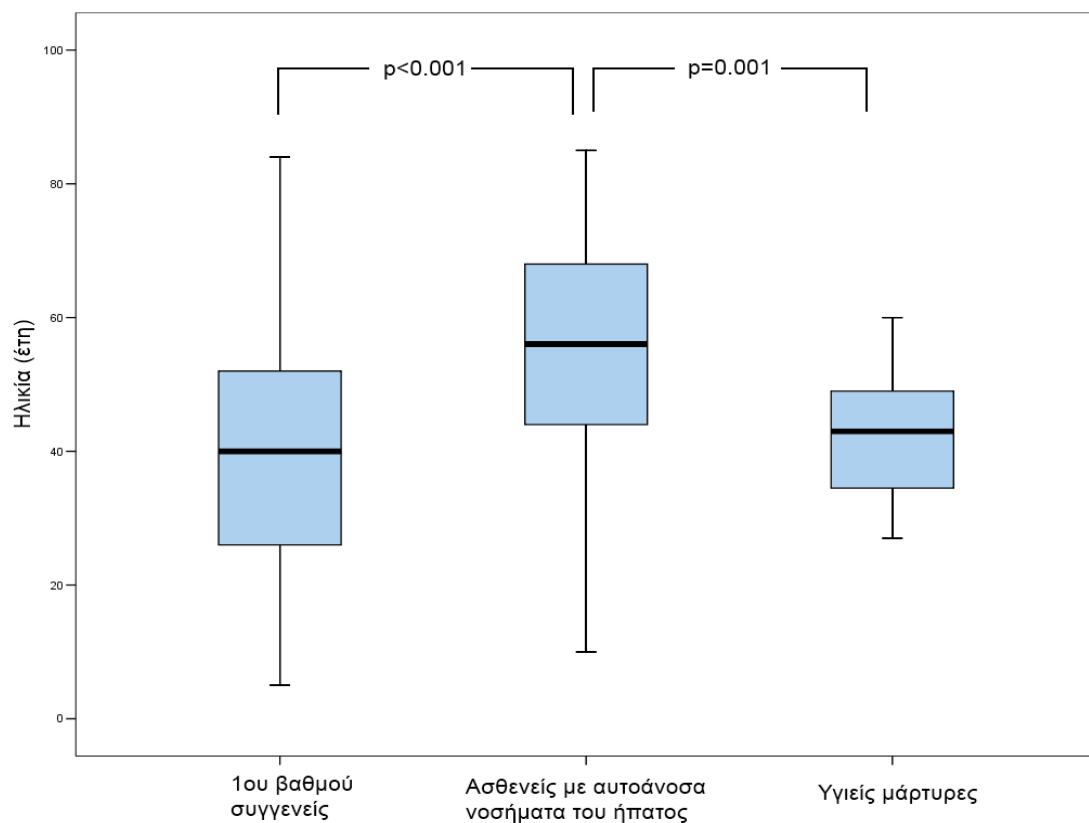
Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1. Δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης**

	Σύνολο	Άρρενες	Θήλεις	Ηλικία (Ετη)
Ασθενείς με ΠΧΚ	44			58,8±11,8
Συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με ΠΧΚ	101	45 (44,6%)	56 (55,4%)	40,8±17,9
Γονείς	9 (8,9%)	5 (55,6%)	4 (44,4%)	
Τέκνα	69 (68,3%)	30 (43,5%)	39 (56,5%)	
Αδέλφια	23 (22,8%)	10 (43,5%)	13 (56,5%)	
Ασθενείς με ΑΗ-1	11			48,8±22,0
Συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με ΑΗ-1	21	12 (57,1%)	9 (42,9%)	37,2±14,0
Γονείς	3 (14,3%)	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
Τέκνα	13 (61,9%)	7 (53,8%)	6 (46,2%)	
Αδέλφια	5 (23,8%)	4 (80%)	1 (20%)	
Ασθενείς με ΠΣΧ	7			40,7±9,5
Συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με ΠΣΧ	19	9 (47,4%)	10 (52,6%)	49,9±21,0
Γονείς	9 (47,4%)	4 (44,4%)	5 (55,6%)	
Τέκνα	4 (21,1%)	2 (50%)	2 (50%)	
Αδέλφια	6 (31,6%)	3 (50%)	3 (50%)	
Υγιείς αιμοδότες	40	17 (42,5%)	23 (57,5%)	43,1±9,8

Συνολικά μελετήθηκαν 141 πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος και 40 υγιείς αιμοδότες. Εξ αυτών οι 101 ήταν συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ, οι 21 πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΑΙΗ και οι 19 πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΠΣΧ.

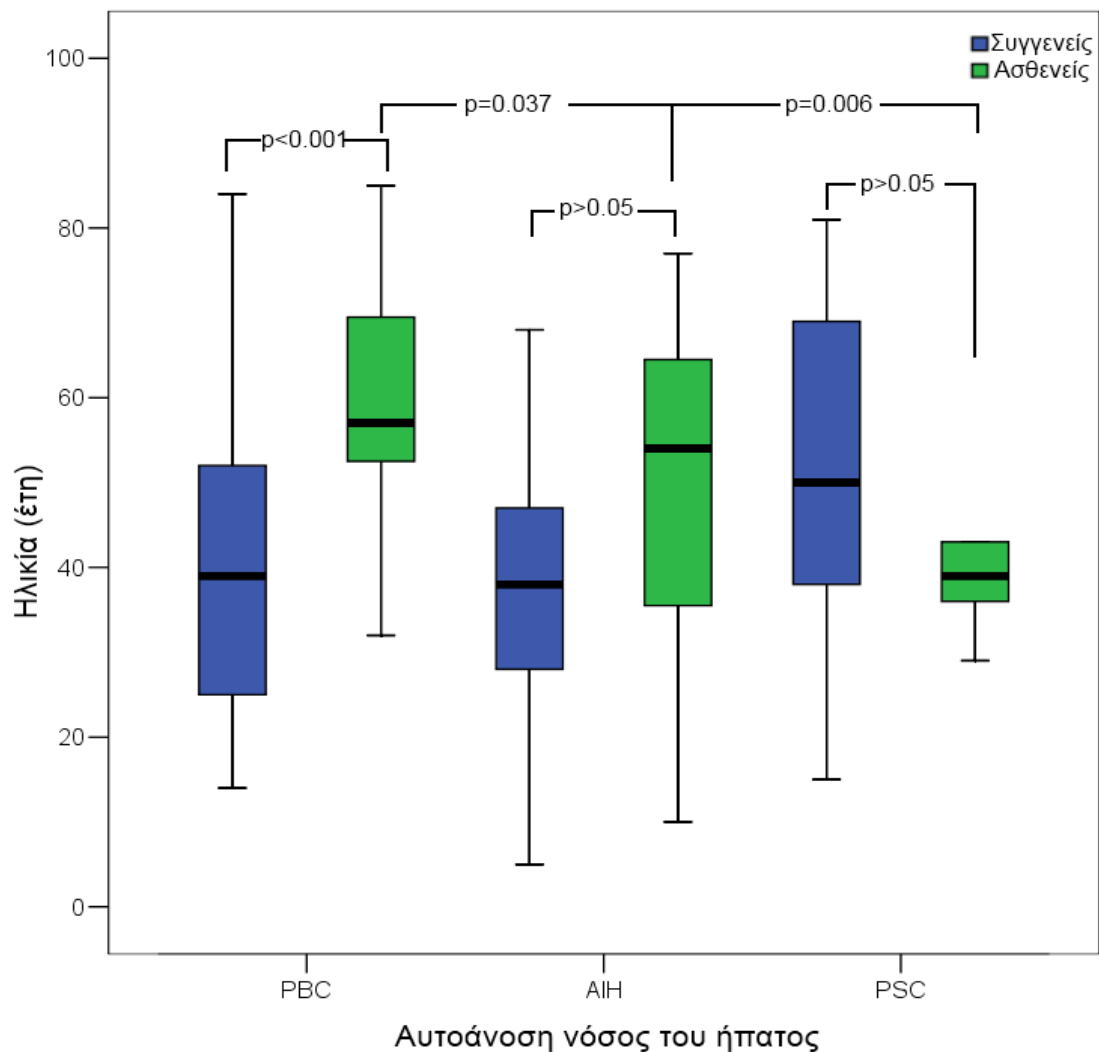
Καθώς ένα σημαντικό ποσοστό των συγγενών πρώτου βαθμού ήταν τέκνα των ασθενών, η μέση ηλικία της ομάδας των ασθενών ήταν υψηλότερη της μέσης ηλικίας της ομάδας των συγγενών πρώτου βαθμού, αλλά και της ομάδας των υγιών μαρτύρων ( $55.0 \pm 15.1$  έναντι  $41.5 \pm 18.1$ ,  $p < 0.001$  και  $55.0 \pm 15.1$  έναντι  $43.1 \pm 9.7$ ,  $p = 0.001$ , αντίστοιχα) (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1. Μέση ηλικία των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος σε σχέση με τους πρώτου βαθμού συγγενείς και τους υγιείς μάρτυρες.**

Η διαφορά αυτή στην ηλικία παρατηρείται κυρίως μεταξύ των ασθενών με ΠΧΚ και των συγγενών τους ( $58.8 \pm 11.8$  έναντι  $40.8 \pm 17.9$ ,  $p < 0.001$ ) και όχι μεταξύ των ασθενών με ΑΙΗ ή ΠΣΧ και των συγγενών τους (Εικόνα 2). Αυτό αντανακλά, κυρίως,

τις επιδημιολογικές διαφορές που έχουν τα τρία αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος ως προς την ηλικία εμφάνισης, όπως επίσης φαίνεται από τις διαφορές στην ηλικία μεταξύ των ίδιων των ασθενών (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2. Σύγκριση της μέσης ηλικίας μεταξύ ασθενών και συγγενών τους για κάθε αυτοάνοσο νόσημα του ήπατος ξεχωριστά. Σημειώνεται επίσης η στατιστικά σημαντική διαφορά στην ηλικία μεταξύ των ασθενών με ΠΧΚ και των ασθενών με ΑΗ ή ΠΣΧ.**

Η ηλικία δεν παρουσίαζε στατιστικά σημαντική διακύμανση μεταξύ των τριών ομάδων των πρώτου βαθμού συγγενών (ανάλογα με το νόσημα του συγγενούς τους) ( $p=0.07$ ).

#### 4.2. Κλινικά χαρακτηριστικά των πρώτου βαθμού συγγενών των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος – Νοσηρότητα.

Με βάση στοιχεία από το ιστορικό και το ερωτηματολόγιο που κλήθηκαν να απαντήσουν οι πρώτου βαθμού συγγενείς των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, υπολογίστηκε ο επιπολασμός διαφόρων νόσων και διαταραχών στους συγγενείς των ασθενών με ΠΧΚ και συγκρίθηκε με τον επιπολασμό στους συγγενείς των ασθενών με ΑΗ-1 ή ΠΣΧ (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2. Επιπολασμός νοσημάτων σε πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος**

	Συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ (%) (n=101)	Συγγενείς ασθενών με ΑΗ/ΠΣΧ (%) (n=40)	P
Σύνδρομο Sjogren	7 (6.9%)	1 (2.5%)	0.440
Φαινόμενο Raynaud	8 (7.9%)	2 (5%)	0.725
Αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα	3 (3%)	0	0.328
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	1 (1%)	0	0.716
Σ.Ε.Λ	0	1 (1%)	0.284
Άσθμα	3 (3%)	4 (10%)	0.100
Ατοπική δερματίτιδα	2 (2%)	1 (2.5%)	1.000
Λεύκη	1 (1%)	0	0.716
Ψωρίαση	1 (1%)	0	0.716
Οζώδες ερύθημα	1 (1%)	0	0.716
Σ.Δ τύπου 1	1 (1%)	1 (2.5%)	0.488
Ι.Θ.Π	1 (1%)	0	0.716
Οστεοπόρωση	4 (4%)	3 (7.5%)	0.405
Ουρολοιμώξεις	33(32.7%)	11 (27.5%)	0.687
Υπερχοληστερολαιμία	10 (9.9%)	7 (17.5%)	0.253
Αρτηριακή υπέρταση	6 (5.9%)	5 (12.5%)	0.293

Σ.Ε.Λ: συστηματικός ερυθματώδης λύκος, Σ.Δ: σακχαρώδης διαβήτης,

Ι.Θ.Π: ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα

Μεταξύ των συγγενών των ασθενών με ΠΧΚ και των συγγενών των ασθενών με ΑΗ ή ΠΣΧ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στον επιπολασμό των διάφορων νοσημάτων. Ειδικά για το ιστορικό ουρολοιμώξεων αξίζει να σημειωθεί ότι μεταξύ των δύο ομάδων δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στον αριθμό των επεισοδίων ( $0.64 \pm 1.5$  για τους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ έναντι  $1.5 \pm 5.2$  για τους συγγενείς ασθενών με ΠΣΧ/ΑΗ,  $p=0.314$ ) ή στην ηλικία πρώτης εμφάνισης επεισοδίου ουρολοίμωξης ( $39.1 \pm 20.8$  για τους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ έναντι  $35.9 \pm 15.6$  για τους συγγενείς ασθενών ΑΗ/ΠΣΧ,  $p=0.697$ ). Επιπρόσθετα, το ποσοστό των ατόμων που εμφάνιζαν υποτροπιάζουσες ουρολοιμώξεις ήταν παρόμοιο και στις δύο ομάδες (10.9% στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ έναντι 15% στους συγγενείς ασθενών με ΑΗ/ΠΣΧ,  $p=0.568$ ).

Αντίστοιχα, όσον αφορά στο ιστορικό χειρουργικών παθήσεων, οι διαφορές μεταξύ πρώτου βαθμού συγγενών ασθενών με ΠΧΚ και ασθενών με ΑΗ/ΠΣΧ συνοψίζονται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3. Επίπτωση χειρουργικών παθήσεων σε πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος**

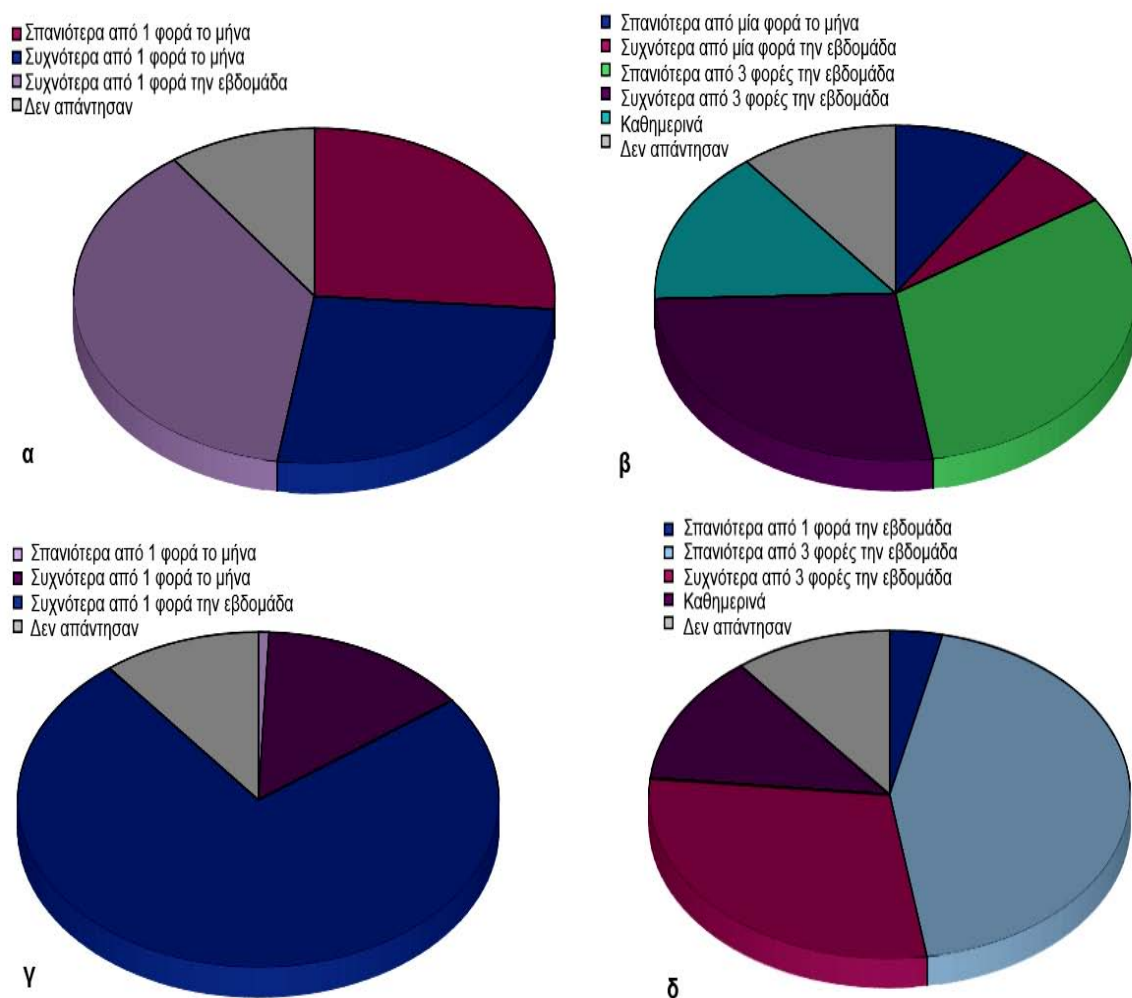
	Συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ (%) (n=101)	Συγγενείς ασθενών με ΑΗ/ΠΣΧ (%) (n=40)	P
Αμυγδαλεκτομή	14 (13.9%)	3 (7.5%)	0.396
Σκωληκοειδεκτομή	18 (17.8%)	7 (17.5%)	0.964
Χολοκυστεκτομή	6 (5.9%)	1 (2.5%)	0.673
Βουβωνοκήλη	14 (13.9%)	0	0.011

Μεταξύ των δύο ομάδων συγγενών δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς το χειρουργικό ιστορικό, παρά μόνο ως προς την επίπτωση της βουβωνοκήλης, η οποία ήταν σημαντικά συχνότερη στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ.

#### 4.3. Τρόπος ζωής-Διατροφικές συνήθειες-Κατανάλωση αλκοόλ

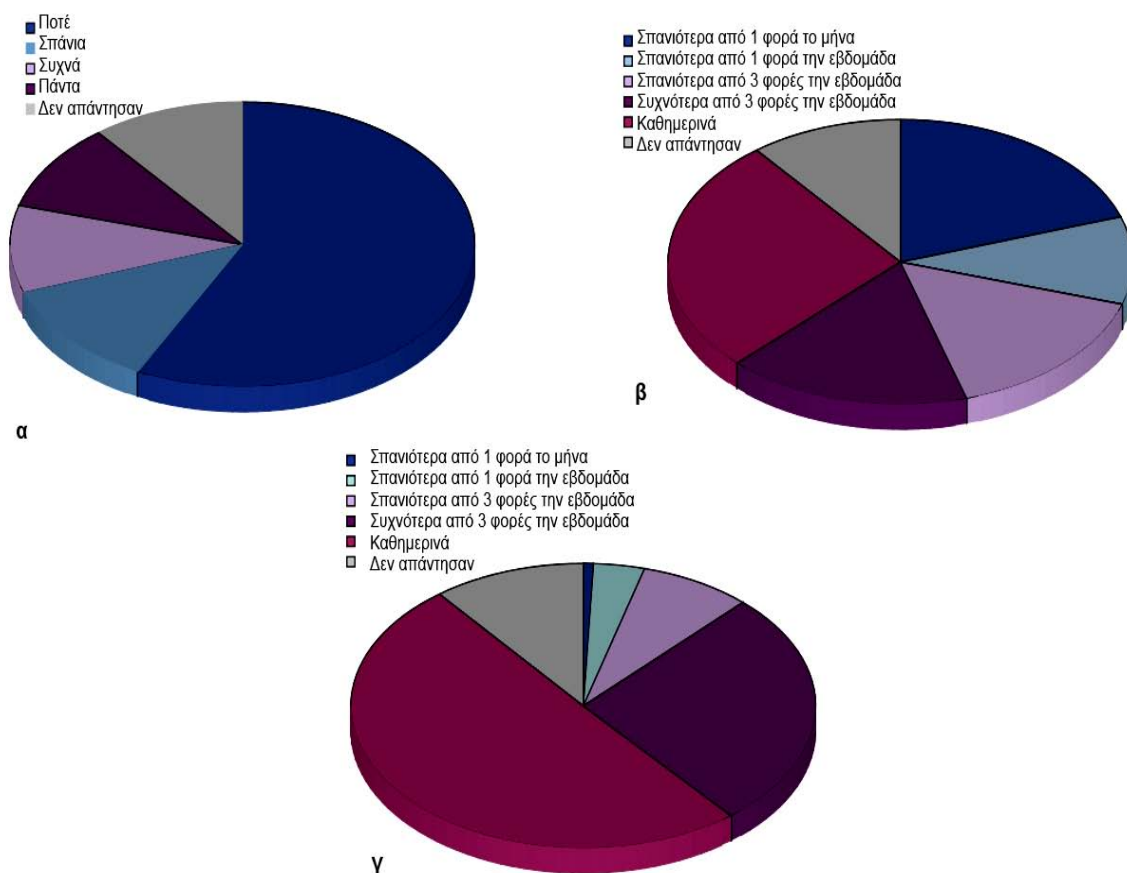
Από τους 141 πρώτου βαθμού συγγενείς των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, το 29.8% ήταν καπνιστές. Εκ των 98 που ανέφεραν ότι δεν κάπνιζαν κατά τη στιγμή της έρευνας, το 12,2% δήλωσαν παλαιοί καπνιστές. Οι καπνιστές ανέφεραν κατανάλωση  $15.9 \pm 19.7$  pack-years.

Τα δεδομένα για τις διατροφικές συνήθειες των ατόμων του δείγματος περιγράφονται στις Εικόνες 3 και 4.



**Εικόνα 3.** Διατροφικές συνήθειες των πρώτου βαθμού συγγενών των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος. α. Συχνότητα κατανάλωσης φαγητού που ετοιμάστηκε εκτός σπιτιού. β. Συχνότητα κατανάλωσης πράσινων λαχανικών. γ. Συχνότητα κατανάλωσης λευκού κρέατος. δ. Συχνότητα κατανάλωσης ερυθρού κρέατος.

Περίληπτικά, το 37.6% των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη κατανάλωναν συχνότερα από μία φορά την εβδομάδα φαγητό που ετοιμάστηκε εκτός σπιτιού, το οποίο στο 85% των περιπτώσεων ήταν χοιρινό κρέας ή αιγοπρόβειο κρέας. Το 53.2% των συμμετεχόντων κατανάλωναν πράσινα λαχανικά σπανιότερα από 3 φορές την εβδομάδα. Το 74.5% των ασθενών κατανάλωνε λευκό κρέας συχνότερα από μία φορά την εβδομάδα, ενώ κατανάλωση ερυθρού κρέατος συχνότερα από 3 φορές την εβδομάδα ανέφερε το 46.8% των ατόμων, εκ των οποίων το 14.3% ανέφερε καθημερινή κατανάλωση ερυθρού κρέατος. Κατά την κατανάλωση κρέατος, οι ερωτηθέντες συγγενείς απάντησαν ότι στο 77.8% αφαιρούν πάντα ή συχνά το ορατό λίπος, ενώ το 22.2% τις περισσότερες φορές ή πάντα το καταναλώνει (Εικόνα 4).

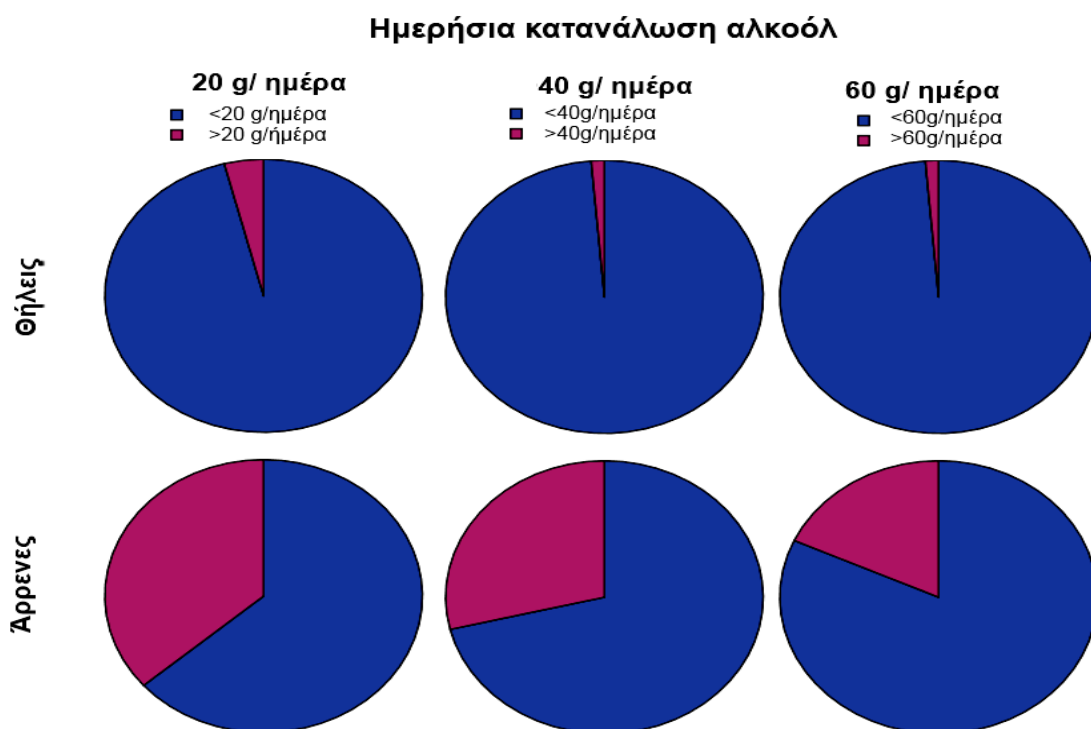


**Εικόνα 4. Διατροφικές συνήθειες των πρώτου βαθμού συγγενών των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος. α. Συχνότητα κατανάλωσης του ορατού λίπους κατά την κατανάλωση κρέατος. β. Συχνότητα κατανάλωσης γάλακτος. γ. Συχνότητα κατανάλωσης τυριού, άλλων γαλακτοκομικών.**



Τέλος, συχνότερη από 3 φορές την εβδομάδα κατανάλωση γάλακτος αναφέρει το 49.2% των ερωτηθέντων, το οποίο στη συντριπτική πλειοψηφία (93.2%) ήταν παστεριωμένο, πλήρες. Κατανάλωση τυριού ή άλλων γαλακτοκομικών συχνότερα από 3 φορές την εβδομάδα αναφέρεται σε ποσοστό 86.5% των συγγενών και καθημερινά στο 56.3%.

Με βάση τις απαντήσεις που έδωσαν οι συμμετέχοντες στην έρευνα συγγενείς για δεδομένα του τελευταίου εξαμήνου υπολογίστηκε ότι η μέση ημερήσια κατανάλωση αλκοόλ ήταν  $18.0 \pm 42.7$ g. Οι άρρενες συγγενείς εμφάνιζαν σημαντικά μεγαλύτερη μέση ημερήσια κατανάλωση αλκοόλ ( $33.8 \pm 57.6$ g/ημέρα έναντι  $4.1 \pm 10.8$ g/ημέρα,  $p < 0.001$ ). Στους άνδρες, η συχνότητα κατανάλωσης αλκοόλ άνω των 20g/ημέρα, άνω των 40g/ημέρα και άνω των 60g/ημέρα ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τις γυναίκες (36.4% έναντι 4%,  $p < 0.001$ ; 28.8% έναντι 1.3%,  $p < 0.001$ , 18.2% έναντι 1.3%,  $p = 0.001$ ) (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5. Συχνότητα ημερήσιας κατανάλωσης αλκοόλ σε άνδρες και γυναίκες συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος.**

#### 4.4. Αιματολογικές και βιοχημικές παράμετροι του υπό μελέτη πληθυσμού.

Τα βασικά αιματολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των πρώτου βαθμού συγγενών των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος παρατίθενται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4. Βασικές αιματολογικές και βιοχημικές παράμετροι του πληθυσμού της μελέτης**

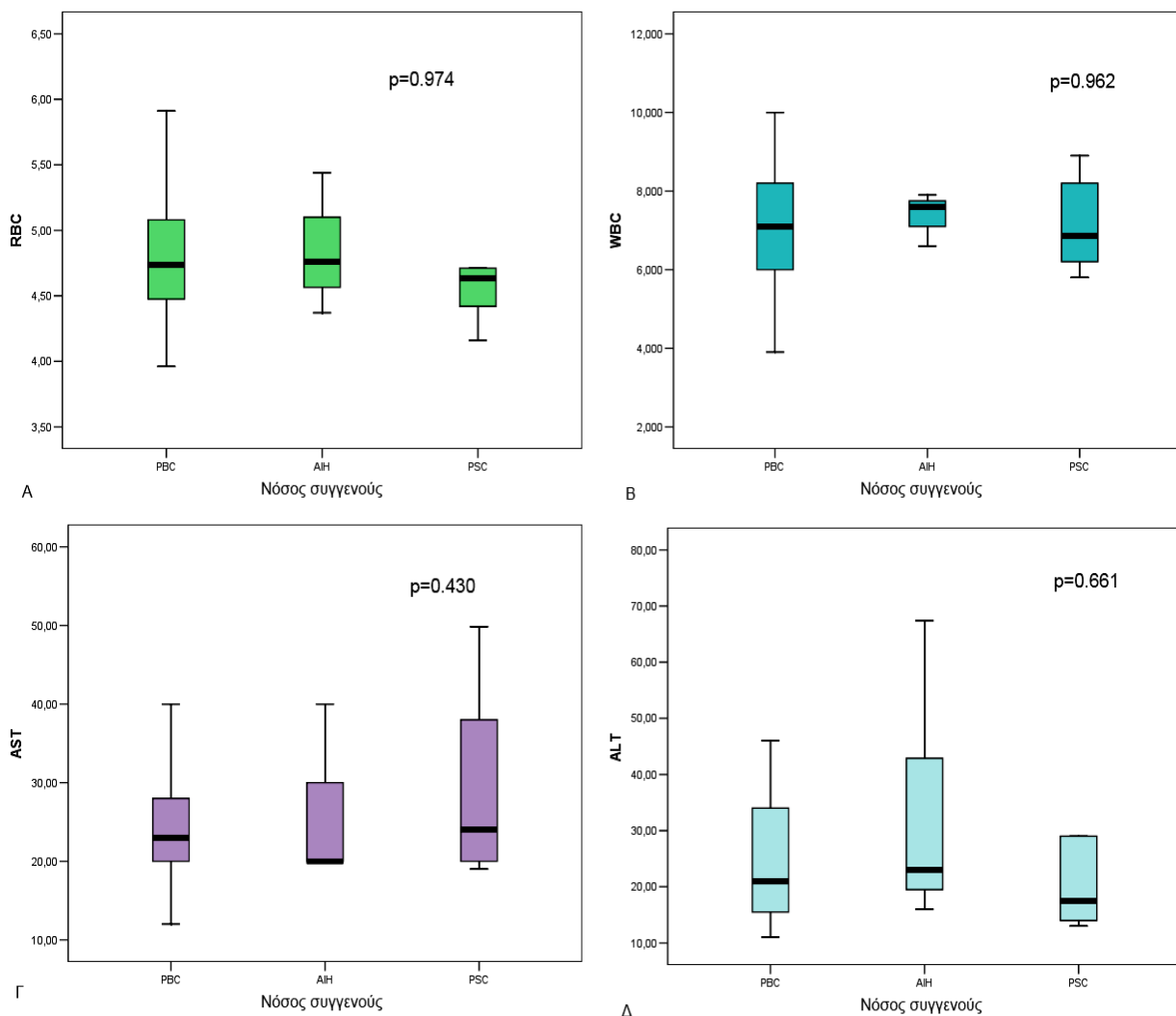
	Συγγενείς ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (n=141)	Υγιείς μάρτυρες (n=40)	P
Ερυθρά ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	4.79 $\pm$ 0.49	4.91 $\pm$ 0.51	NS
Αιμοσφαιρίνη (g/dL)	13.8 $\pm$ 1.5	14.8 $\pm$ 1.1	NS
Αιματοκρίτης (%)	41.3 $\pm$ 3.9	44.3 $\pm$ 3.6	NS
Λευκά ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	7.3 $\pm$ 1.9	7.5 $\pm$ 1.4	NS
Ουδετερόφιλα (%)	56.5 $\pm$ 7.5	57.6 $\pm$ 2.5	NS
Λεμφοκύτταρα (%)	33.5 $\pm$ 6.9	33.9 $\pm$ 2.0	NS
Μονοκύτταρα (%)	7.0 $\pm$ 2.5	5.9 $\pm$ 0.5	NS
Ηωσινόφιλα (%)	2.3 $\pm$ 1.4	2.1 $\pm$ 0.3	NS
Βασεόφιλα (%)	0.9 $\pm$ 1.1	0.4 $\pm$ 0.2	NS
Αιμοπετάλια ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	261.9 $\pm$ 59.4	277.0 $\pm$ 29.5	NS
AST (U/L)	25.5 $\pm$ 9.1	28.0 $\pm$ 2.8	NS
ALT (U/L)	28.7 $\pm$ 23.2	27.2 $\pm$ 2.4	NS
$\gamma$ -GT (U/L)	34.0 $\pm$ 36.5	30.5 $\pm$ 3.6	NS
ALP (U/L)	78.8 $\pm$ 40.6	56.5 $\pm$ 13.1	NS
Ολική χολερυθρίνη (mg/dL)	0.61 $\pm$ 0.35	0.71 $\pm$ 0.21	NS
Άμεσος χολερυθρίνη (mg/dL)	0.12 $\pm$ 0.07	0.20 $\pm$ 0.1	NS

AST: ασπαρτική αμινοτρανσφεράση, ALT: αλανινική αμινοτρανσφεράση,  $\gamma$ -GT: γάμμα-γλουταμυλική τρανσπεπτιδάση, ALP: αλκαλική φωσφατάση, NS: μη-σημαντική διαφορά

Εν γένει, οι συγγενείς των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος είχαν γενική αίματος και ηπατική βιοχημεία εντός φυσιολογικών ορίων, γεγονός που

αντανακλάται και στην απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ της ομάδας των συγγενών και των υγιών μαρτύρων, όπως φαίνεται στο πίνακα 4.

Αντίστοιχα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγγενών ασθενών με ΠΧΚ και των συγγενών ασθενών με ΠΣΧ ή με ΑΗ (Εικόνες 6 και 7).



**Εικόνα 6.** Κύρια αιματολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά πρώτου βαθμού συγγενών ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος ανάλογα με την πάθηση του συγγενούς. Α. Αριθμός ερυθροκυττάρων (RBC) (×10<sup>6</sup>/μL). Β. Αριθμός λευκοκυττάρων (WBC) (×10<sup>3</sup>/μL). Γ. Συγκέντρωση ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST) (U/L). Δ. Συγκέντρωση αλανινικής αμινοτρανσφεράσης (ALT) (U/L). Επί των επιμέρους εικόνων παρατίθενται οι δοκιμασίες σημαντικότητας για την ύπαρξη διακύμανσης της μέσης τιμής μεταξύ των τριών ομάδων.

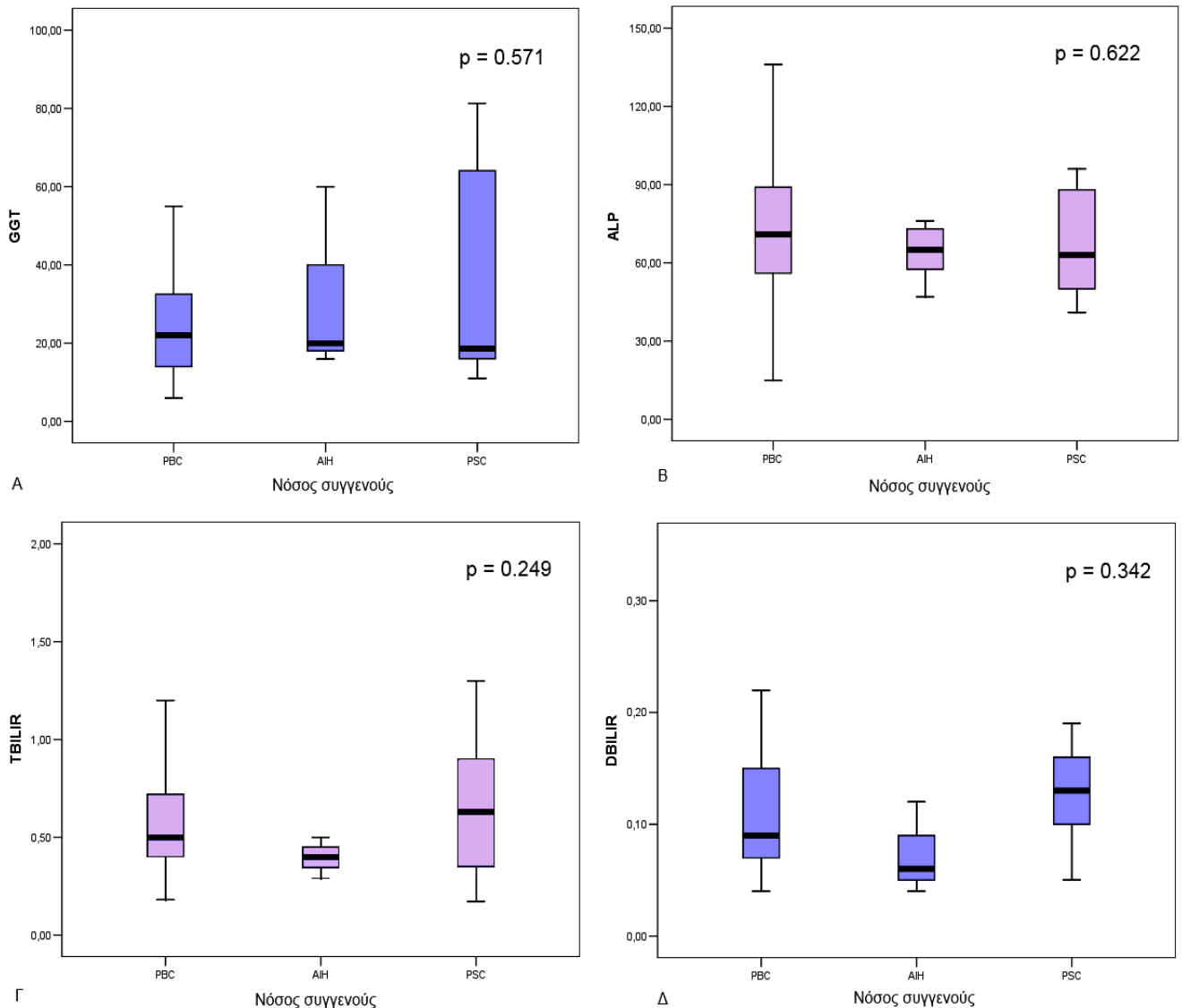
Οι πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ έχουν αριθμό ερυθροκυττάρων  $4.79 \times 10^6 \pm 0.46 \times 10^6 / \mu\text{L}$ , έναντι  $4.86 \times 10^6 \pm 0.54 \times 10^6 / \mu\text{L}$  των συγγενών ασθενών με ΠΣΧ και  $4.81 \times 10^6 \pm 0.76 \times 10^6 / \mu\text{L}$  των συγγενών ασθενών με ΑΗ. Η αιμοσφαιρίνη στις 3 ομάδες διαμορφώνεται ως  $13.9 \pm 1.5$ ,  $13.5 \pm 0.9$ , και  $13.6 \pm 1.2$  για συγγενείς ασθενών ΠΧΚ, ΑΗ και ΠΣΧ, αντίστοιχα. Τέλος, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 6, τα επίπεδα των λευκοκυττάρων μεταξύ των 3 ομάδων των συγγενών ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διακύμανση της μέσης τιμής τους. Αντίστοιχα, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST) στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ ( $24.8 \pm 8.4 \text{ U/L}$ ) σε σχέση με τα επίπεδα της AST στους συγγενείς ασθενών με ΑΗ ( $26.6 \pm 11.5 \text{ U/L}$ ) ή στους συγγενείς ασθενών με ΠΣΧ ( $29.0 \pm 11.9 \text{ U/L}$ ), ενώ σε παρόμοια επίπεδα και στις 3 ομάδες συγγενών κυμαίνεται η συγκέντρωση της αλανινικής αμινοτρανσφεράσης (ALT) ( $27.8 \pm 21.6 \text{ U/L}$ ,  $37.0 \pm 30.5 \text{ U/L}$  και  $33.0 \pm 31.9$ , για ΠΧΚ, ΑΗ και ΠΣΧ, αντίστοιχα).

Απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των 3 ομάδων συγγενών παρατηρείται και στη συγκέντρωση της γGT, της αλκαλικής φωσφατάσης και της χολερυθρίνης (συζευγμένης ή μη) (Εικόνα 7).

Συγκεκριμένα, τα επίπεδα γGT στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ ήταν  $32.4 \pm 35.3 \text{ U/L}$  έναντι  $32.0 \pm 24.3 \text{ U/L}$  στους συγγενείς ασθενών με ΑΗ και  $45.5 \pm 47.8 \text{ U/L}$  στους συγγενείς ασθενών με ΠΣΧ. Η αλκαλική φωσφατάση ορού ήταν  $78.6 \pm 38.4 \text{ U/L}$  στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ,  $86.3 \pm 64.5 \text{ U/L}$  στους συγγενείς ασθενών με ΑΗ και  $67.3 \pm 20.4 \text{ U/L}$  στους συγγενείς ασθενών με ΠΣΧ.

Τέλος, στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ, τα επίπεδα χολερυθρίνης προσδιορίστηκαν σε  $0.6 \pm 0.3 \text{ mg/dL}$  για την ολική και  $0.1 \pm 0.07 \text{ mg/dL}$  για την άμεσο, έναντι  $0.5 \pm 0.2$

mg/dL και  $0.07 \pm 0.04$  mg/dL αντίστοιχα για τους συγγενείς ασθενών με ΑΗ και  $0.7 \pm 0.5$  mg/dL και  $0.1 \pm 0.08$  mg/dL για τους συγγενείς ασθενών με ΠΣΧ.



**Εικόνα 7. Βιοχημικά χαρακτηριστικά πρώτου βαθμού συγγενών ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, ανάλογα με την πάθηση του συγγενούς. Α. Συγκέντρωση γάμμα-γλουταμυλικής τρανσπεπτιδάσης (γGT) (U/L). Β. Συγκέντρωση αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) (U/L). Γ. Συγκέντρωση ολικής χολερυθρίνης (mg/dL). Δ. Συγκέντρωση άμεσης χολερυθρίνης (mg/dL).**

#### 4.5. Συχνότητα αυτοαντισωμάτων στους πρώτου βαθμού συγγενείς των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος

##### *Αντιμιτοχονδριακά αντισώματα*

Χρησιμοποιώντας έμμεσο ανοσοφθορισμό, παρουσία AMA διαπιστώθηκε στο 24.1% των συγγενών και σε κανέναν εκ των μαρτύρων (Πίνακας 5). Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική με  $p < 0.001$ .

**Πίνακας 5. Επιπολασμός αυτοαντισωμάτων σε πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ, σε σχέση με τον επιπολασμό τους σε συγγενείς ασθενών με ΑΗ/ΠΣΧ και υγιείς μάρτυρες.**

Αυτοαντίσωμα	Συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ (%) (n=101)	Συγγενείς ασθενών με ΑΗ-1/ΠΣΧ (%) (n=40)	Υγιείς μάρτυρες (%) (n=40)	P-value*	P-value**
AMA (ΕΑΦ)	28 (27.7%)	6 (15%)	0	NS	<0.001
1:40	18 (64.3%)	5 (83.3%)	-		
1:80	8 (28.6%)	1 (16.7%)	-		
1:160	1 (3.6%)	-	-		
1:320	1 (3.6%)	-	-		
IgG MIT3 ELISA	12 (11.9%)	0	0	0.02	0.02
ANA (ΕΑΦ)					
Στικτός φθορισμός (speckled pattern)	54 (53.5%)	18 (45.0%)	8 (25.0%)	NS	<0.001
1:40	24 (23.8%)	9 (22.5%)	5 (62.5%)		
1:80	26 (25.7%)	8 (20.0%)	1 (12.5%)		
1:160	4 (4.0%)	1 (2.5%)	2 (25%)		

*Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα*

Ομοιογενής φθορισμός (homogeneous pattern)	5 (5.0%)	4 (10%)	0	NS	NS
1:40	1 (1.0%)	.	-		
1:80	3 (3.0%)	1 (2.5%)	-		
1:160	1 (1.0%)	2 (5.0%)	-		
1:320	-	-	-		
1:640	-	1 (2.5%)	-		
Περιπυρηνικός φθορισμός (RLM pattern)	16 (15.8%)	1 (2.5%)	0	0.04	<0.01
1:40	8 (7.9%)	1 (2.5%)	-		
1:80	8 (7.9%)	-	-		
Πολλαπλές πυρηνικές κηλίδες (MND pattern)	13 (12.9%)	11 (27.5%)	0	0.04	0.02
1:40	4 (4.0%)	6 (15.0%)	-		
1:80	7 (6.9%)	3 (7.5%)	-		
1:160	1 (1.0%)	-	-		
1:320	-	2 (5.0%)	-		
1:640	1 (1.0%)	-	-		
pANCA	6 (5.9%)	7 (17.5%)	2 (5.0%)	0.05	NS
cANCA	9 (8.9%)	14 (35.0%)	6 (15.0%)	<0.001	NS

\*Σύγκριση μεταξύ συγγενών ασθενών με ΠΧΚ και συγγενών ασθενών με ΑΗ/ΠΣΧ, \*\*Σύγκριση μεταξύ συγγενών ασθενών με ΠΧΚ και υγιών μαρτύρων, ΕΑΦ: έμμεσος ανοσοφθορισμός, RLM: rim-like/membranous, MND: multiple nuclear dots.

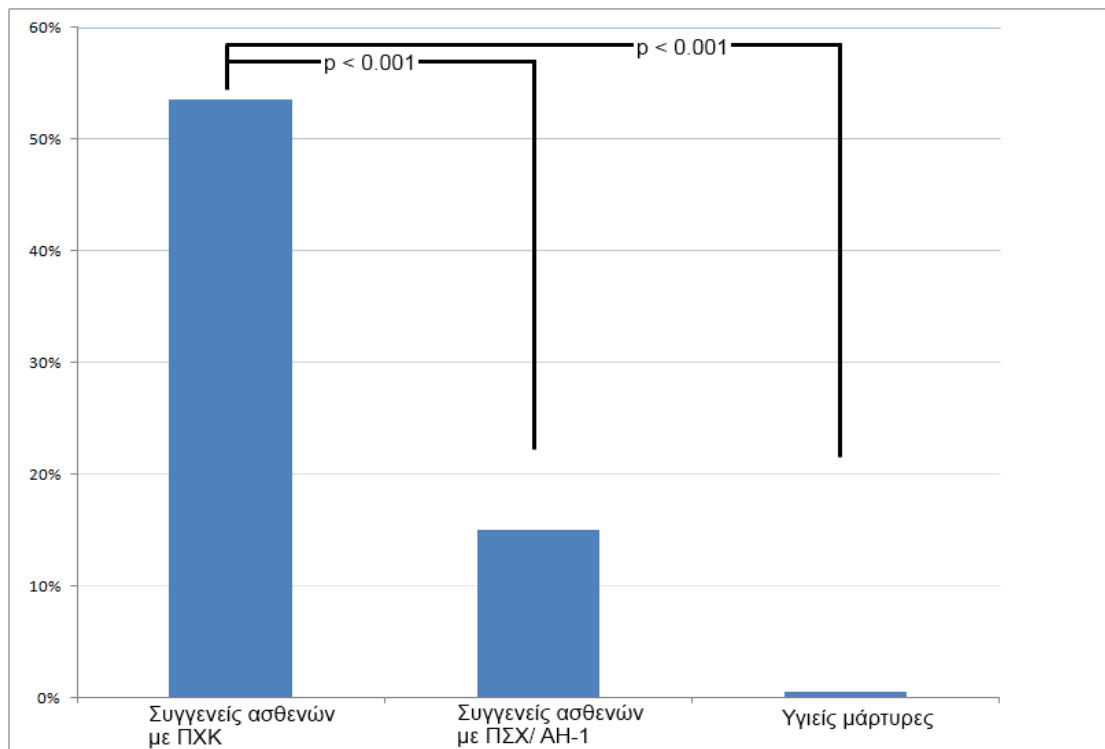
Ο επιπολασμός θετικών AMA στον έμμεσο ανοσοφθορισμό ήταν 27.7% στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ και 15% στους συγγενείς ασθενών με ΑΗ-1 ή ΠΣΧ. Η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντική, διαπιστώθηκε ωστόσο ότι οι συγγενείς των ασθενών με ΑΗ ή ΠΣΧ είχαν χαμηλότερους τίτλους αντισωμάτων αφού μόνο ένας ασθενής (2.5%) εμφάνισε AMA σε τίτλο μεγαλύτερο από 1:40, ενώ στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ οι 10 από τους 101 (9.9%) εμφάνισαν τίτλους από 1:80 έως 1:320.

Αντιθέτως, στατιστικά σημαντική διαφορά στον επιπολασμό των AMA παρατηρήθηκε μεταξύ των συγγενών ασθενών με ΠΧΚ και των υγιών μαρτύρων (27.7% έναντι 0%,  $p < 0.001$ ).

Η χρησιμοποίηση της MIT3-ELISA για την ανίχνευση IgG αντι-M2 αντισωμάτων συνοδεύτηκε από βελτιωμένη ειδικότητα, αλλά χαμηλότερη ευαισθησία. Μεταξύ των συγγενών των ασθενών με ΠΧΚ, το ποσοστό των θετικών για AMA ήταν 11.9%, ενώ μεταξύ των συγγενών των ασθενών με ΑΗ-1 ή ΠΣΧ, κανένας δεν ήταν AMA-θετικός ( $p = 0.02$ ). Αντίστοιχα, στατιστικά σημαντική ήταν η διαφορά μεταξύ συγγενών ασθενών με ΠΧΚ και υγιών μαρτύρων (11.9% έναντι 0%,  $p = 0.02$ ).

Η συνδυασμένη AMA-αντιδραστικότητα (όταν λαμβανόταν συνδυαστικά υπ' όψιν η ανίχνευση AMA με όλες τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους) ήταν σημαντικά υψηλότερη στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ έναντι τόσο των συγγενών ασθενών με ΑΗ/ΠΣΧ (53.5% έναντι 15%,  $p < 0.001$ ), όσο και έναντι των υγιών μαρτύρων (53.5% έναντι 0%,  $p < 0.001$ ) (Εικόνα 8).





**Εικόνα 8. Συνδυασμένη AMA-αντιδραστικότητα στον πληθυσμό της μελέτης.**

### *Αντιπυρηνικά αντισώματα*

Χρησιμοποιώντας υπόστρωμα ήπατος-στομάχου-νεφρού επίμυος, ANA αντισώματα ανιχνεύθηκαν στο 4% των συγγενών ασθενών με ΠΧΚ, σε σύγκριση με 12.5% των συγγενών ασθενών με ΑΗ-1 ή ΠΣΧ, ωστόσο η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική.

Τα ευρήματα από τον προσδιορισμό ANA σε HEp-2 κύτταρα αναφέρονται στον Πίνακα 5. Η παρουσία ANA με χαρακτηριστικό πρότυπο στικτού φθορισμού ανευρέθηκε σε σημαντικό ποσοστό τόσο στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ (53.5%), όσο και στους συγγενείς ασθενών με ΠΣΧ ή ΑΗ (45%), αλλά και σε σημαντικό ποσοστό μαρτύρων (25%). Στατιστικά σημαντική διαφορά προέκυψε μόνο κατά τη σύγκριση των συγγενών ασθενών με ΠΧΚ και υγιών μαρτύρων ( $p < 0.001$ ).

Αντιπυρηνικά αντισώματα με ομοιογενές πρότυπο φθορισμού ανακαλύφθηκαν με πολύ μικρότερη συχνότητα, στο 5% των συγγενών στην ομάδα της ΠΧΚ, στο 10%

στην ομάδα των ΑΗ/ΠΣΧ και σε κανέναν εκ των μαρτύρων, χωρίς οι διαφορές μεταξύ των ομάδων να προκύπτουν στατιστικά σημαντικές.

Περιπυρηνικό πρότυπο φθορισμού ανιχνεύθηκε σε 15.8 % των συγγενών ασθενών με ΠΧΚ, έναντι ενός συγγενούς ασθενούς με ΠΣΧ (2.5%) και κανενός εκ των συγγενών ασθενών με ΑΗ και των υγιών μαρτύρων ( $p<0.05$  και  $p<0.01$ , αντίστοιχα). Παρότι, όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν περαιτέρω με anti-gp210 ELISA, κανένα δείγμα δεν ήταν θετικό για παρουσία anti-gp210 αντισωμάτων.

Το πρότυπο φθορισμού του τύπου των πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων ανευρέθηκε σε σημαντικό ποσοστό συγγενών ασθενών με ΠΧΚ (12.9%), αλλά και σε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό συγγενών ασθενών με ΑΗ-1 ή ΠΣΧ (27.5%). Η συχνότητα ΜΝΔ φθορισμού στον έμμεσο ανοσοφθορισμό ήταν σημαντικά υψηλότερη και στις δύο κατηγορίες συγγενών ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων (Πίνακας 5). Χρησιμοποιώντας anti-Sp100 ELISA, αντιδραστικότητα έναντι Sp100 διαπιστώθηκε μόνο σε έναν συγγενή ασθενούς με ΠΣΧ, ενώ ο υπόλοιπος υπό μελέτη πληθυσμός ήταν αρνητικός.

#### ***Αντισώματα έναντι ουδετεροφίλων***

Ο υψηλότερος επιπολασμός pANCA και cANCA παρατηρήθηκε στους συγγενείς ασθενών με ΑΗ ή ΠΣΧ. Η διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης pANCA μεταξύ συγγενών ασθενών με ΑΗ/ΠΣΧ και συγγενών ασθενών με ΠΧΚ ήταν οριακά σημαντική (17.5% έναντι 5.9%, αντίστοιχα,  $p=0.05$ ). Αντίθετα, cANCA ανιχνεύθηκαν σε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό συγγενών ασθενών με ΑΗ/ΠΣΧ σε σύγκριση με τους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ (35% έναντι 8.9%,  $p<0.001$ ).

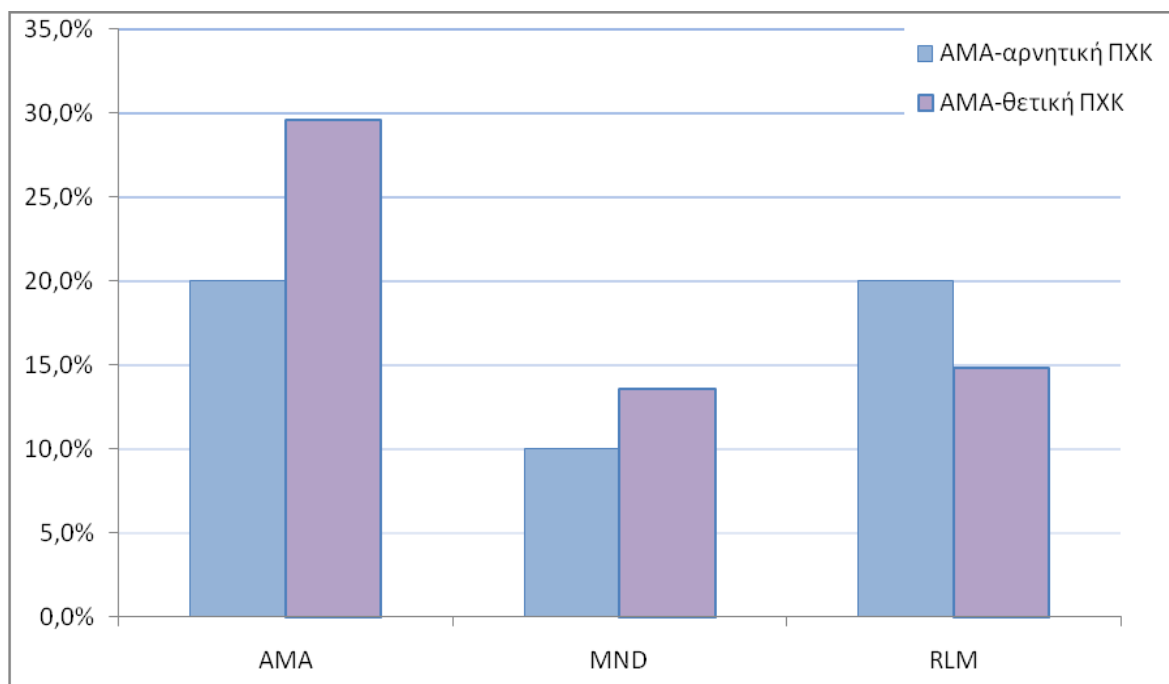
Ο επιπολασμός των pANCA και cANCA στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ δε διέφερε σημαντικά από τον επιπολασμό τους στους υγιείς μάρτυρες (Πίνακας 5).

*Ανίχνευση αυτοαντισωμάτων στους πρώτου βαθμού συγγενείς ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των ασθενών*

Η ομάδα των 101 συγγενών πρώτου βαθμού των ασθενών με ΠΧΚ, περιελάμβανε 20 άτομα που ήταν συγγενείς ασθενών με AMA-αρνητική ΠΧΚ. Η συχνότητα ανίχνευσης AMA με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε υπόστρωμα επίμυος σε αυτά τα άτομα (20%) δε διέφερε από τη συχνότητα ανίχνευσης AMA στους συγγενείς ασθενών με AMA-θετική ΠΧΚ (29.6%)( $p=0.389$ ) (Εικόνα 9).

Χρησιμοποιώντας τη συνολική συνδυασμένη AMA-αντιδραστικότητα, διαπιστώθηκε ότι ο επιπολασμός των AMA στους συγγενείς ασθενών με AMA-αρνητική ΠΧΚ ήταν εμφανώς χαμηλότερος, χωρίς ωστόσο η διαφορά μεταξύ συγγενών AMA-αρνητικών και AMA-θετικών ασθενών να είναι στατιστικά σημαντική (40% έναντι 56.8%,  $p=0.178$ ).

Παρομοίως, δε διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ του επιπολασμού των MND και RLM προτύπων, σε ΕΑΦ σε HEp-2 κύτταρα, σε αυτούς τους συγγενείς ασθενών με AMA-αρνητική ΠΧΚ και στους συγγενείς ασθενών με AMA-θετική ΠΧΚ (10% έναντι 13.6%, και 20% έναντι 14.8%, αντίστοιχα) (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9.** Συχνότητα ανίχνευσης αντισωμάτων σε συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ, ανάλογα με την ύπαρξη AMA στον ασθενή. AMA: αντιμιτοχονδριακά αντισώματα; MND: φθορισμός του τύπου των πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων; RLM: rim-like membranous, περιπυρηνικός φθορισμός.

Επίσης, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα που ανιχνευόταν το πρότυπο φθορισμού MND μεταξύ των συγγενών ασθενών που εμφάνιζαν οι ίδιοι MND στον ανοσοφθορισμό και των συγγενών ασθενών που δεν εμφάνιζαν MND στον ανοσοφθορισμό (13% έναντι 12.8%,  $p=0.978$ ).

Αντίστοιχα, το RLM πρότυπο ανιχνεύθηκε με παρόμοια συχνότητα σε συγγενείς ασθενών που εμφάνιζαν RLM (20%) αλλά και σε συγγενείς ασθενών που δεν εμφάνιζαν RLM (15.4%) ( $p=0.657$ ).

#### ***Συσχέτιση χαρακτηριστικών των πρώτου βαθμού συγγενών με την παρουσία AMA***

Διαπιστώθηκε ότι η ανίχνευση AMA στους πρώτου βαθμού συγγενείς (η συνδυασμένη AMA-αντιδραστικότητα) εμφάνιζε σημαντικές συσχετίσεις με διάφορα χαρακτηριστικά τους, τόσο κλινικά όσο και εργαστηριακά (Πίνακας 6).

**Πίνακας 6. Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των πρώτου βαθμού συγγενών ανάλογα με την ύπαρξη AMA.**

	AMA-θετικοί (n=60)	AMA-αρνητικοί (n=81)	p
Γυναίκες (%)	61.7 %	46.9 %	NS
Ηλικία (έτη)	44.8±17.7	39.0++_18.1	<0.05
Πάθηση συγγενούς (ΠΧΚ)(%)	90%	58%	<0.001
Ιστορικό ουρολοιμώξεων (%)	45%	21%	<0.01
Ιστορικό αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδος (%)	6.7%	0	<0.05
Ερυθρά ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	4.80±0.54	4.79±0.47	NS
Λευκά ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	6.89±1.45	7.64±2.09	NS
Ουδετερόφιλα (%)	54.8±6.7	57.6±8.1	NS
Λεμφοκύτταρα (%)	34.1±6.3	33.1±7.3	NS
Μονοκύτταρα (%)	7.4±2.7	6.7±2.2	NS
Ηωσινόφιλα (%)	2.9±1.4	1.9±1.3	<0.05
Βασεόφιλα (%)	0.9±0.8	0.9±1.3	NS
Αιμοπετάλια ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	252.8±56.7	268.2±61.1	NS
AST (U/L)	29.3±11.0	22.9±6.6	<0.01
ALT (U/L)	33.1±28.6	24.3±14.9	NS
γ-GT (U/L)	23 (14.5-35.0)	19 (14.3-28)	NS
ALP (U/L)	78.0±31.7	81.1±45.3	NS

AST: ασπαρτική αμινοτρανσφεράση, ALT: αλανινική αμινοτρανσφεράση, γ-GT: γαμμα-γλουταμυλική τρανσπεπτιδάση, ALP: αλκαλική φωσφατάση, NS: μη σημαντικό ( $p>0.05$ ).

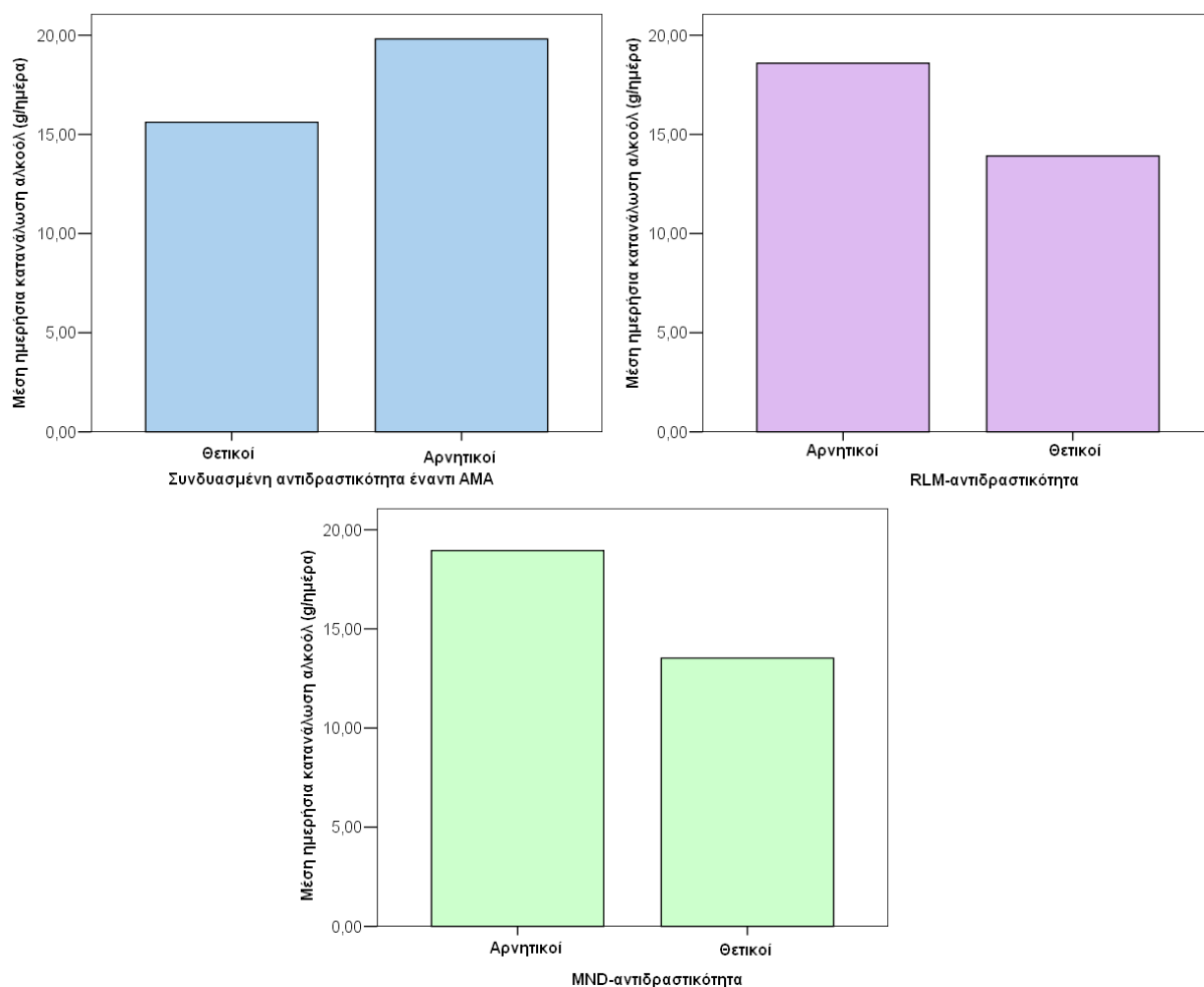
Οι συγγενείς που εμφάνιζαν AMA ήταν κατά κύριο λόγο γυναίκες (61.7%), ενώ αυτοί που ήταν AMA-αρνητικοί ήταν στην πλειονότητά τους άνδρες (53.1%), χωρίς ωστόσο αυτή η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική ( $p=0.08$ ). Στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρχε μεταξύ των δύο ομάδων ως προς την ηλικία, με τους

AMA-θετικούς συγγενείς να είναι μεγαλύτερης ηλικίας. Εκ του ατομικού αναμνηστικού, οι AMA-θετικοί συγγενείς είχαν συχνότερα ιστορικό ουρολοιμώξεων και αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας.

Τα εργαστηριακά ευρήματα ήταν παρόμοια τόσο στους συγγενείς με AMA όσο και σε αυτούς χωρίς AMA, με την εξαίρεση των επιπέδων της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης που ήταν υψηλότερα στους AMA-θετικούς και των ηωσινόφιλων. Τα ηωσινόφιλα ήταν σημαντικά υψηλότερα στους AMA-θετικούς συγγενείς, παρότι παρέμεναν εντός φυσιολογικών ορίων και στις δύο ομάδες.

Εκ του τρόπου ζωής και των διατροφικών συνηθειών δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ύπαρξη AMA αντισωμάτων, ή ANA αντισωμάτων ειδικών για την ΠΧΚ. Συγκεκριμένα, εκ των 60 AMA-θετικών συγγενών 19 ήταν καπνιστές (31.7%), ενώ εκ των 80 AMA-αρνητικών καπνιστές ήταν οι 23 (28.8%) ( $p=0.709$ ). Αντίστοιχα, καπνιστές και μη καπνιστές εμφάνιζαν σε παρόμοια ποσοστά MND και RLM πρότυπα φθορισμού (καπνιστές: 19% και 7.1%, αντίστοιχα, μη καπνιστές: 16.3% και 14.3%, αντίστοιχα).

Συγκρίνοντας τη μέση ημερήσια κατανάλωση αλκοόλ μεταξύ των συγγενών ανάλογα με την ανίχνευση ή όχι AMA, MND ή RLM, δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10. Μέση ημερήσια κατανάλωση αλκοόλ μεταξύ των πρώτου βαθμού συγγενών ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος ανάλογα με την αντίχνευση AMA, RLM ή MND.**

Οι πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών που ήταν αρνητικοί για την αντίχνευση AMA με οποιαδήποτε εκ των χρησιμοποιούμενων μεθόδων ανέφεραν μέση ημερήσια κατανάλωση αλκοόλ  $19.8 \pm 46.0$  g/ ημέρα έναντι  $15.6 \pm 38.0$  g/ ημέρα στους AMA-θετικούς ( $p=0.566$ ). Αντίστοιχα, οι συγγενείς που εμφάνιζαν MND στον έμμεσο ανοσοφθορισμό, ανέφεραν μέση ημερήσια κατανάλωση αλκοόλ  $13.5 \pm 19.7$  g/ ημέρα, έναντι  $18.9 \pm 46.0$  g/ ημέρα στους MND-αρνητικούς, ενώ η μέση ημερήσια κατανάλωση αλκοόλ στους RLM-θετικούς ήταν  $13.9 \pm 37.3$  g/ ημέρα και στους RLM-αρνητικούς ήταν  $18.6 \pm 43.5$  g/ ημέρα. Η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ στους

αρνητικούς για AMA, RLM, MND ασθενείς πιθανότατα αντανακλά και τη μικρότερη ηλικία τους, αλλά και το μεγαλύτερο ποσοστό ανδρών στη συγκεκριμένη ομάδα.

Οι διατροφικές συνήθειες των πρώτου βαθμού συγγενών ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με την ανίχνευση AMA ή άλλων αυτοαντισωμάτων.

#### ***Κλινικές εκδηλώσεις ΠΧΚ και παθολογικά εργαστηριακά ευρήματα σε θετικούς για AMA συγγενείς***

Εκ των 60 πρώτου βαθμού συγγενών που εμφάνισαν θετικά AMA με μία εκ των χρησιμοποιούμενων μεθόδων ανίχνευσης, οι επτά (11.7%) είχαν διαταραχές της ηπατικής βιοχημείας. Από αυτούς τους επτά, οι πέντε ήταν AMA-θετικοί σε έμμεσο ανοσοφθορισμό σε υπόστρωμα ήπατος-νεφρού-στομάχου επίμυος, ενώ οι υπόλοιποι δύο είχαν συμβατή στον έμμεσο ανοσοφθορισμό εικόνα (ο ένας είχε AMA σε τίτλο 1:20 σε τομές επίμυος και ο δεύτερος είχε χαρακτηριστικό κυτταροπλασματικό φθορισμό σε τίτλο 1:40 σε Hep-2 κύτταρα) που επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωση. Τα χαρακτηριστικά των συγγενών αυτών παρουσιάζονται στον πίνακα 7. Οι συγγενείς Γ, Δ, και Ε ήταν συγγενείς του ιδίου ασθενούς, μίας γυναίκας με AMA-αρνητική ΠΧΚ.

Οι άνδρες συγγενείς ασθενών, δηλαδή οι συγγενείς Α, Β, και Δ ήταν ασυμπτωματικοί. Οι συγγενείς ασθενών Γ, Ε, και ΣΤ ανέφεραν ξηροφθαλμία και ξηροστομία, ενώ οι Γ και Ε είχαν ιστορικό αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδος. Ιστορικό υποθυρεοειδισμού αγνώστου αιτιολογίας παρουσίαζαν οι συγγενείς ασθενών ΣΤ και Ζ.



**Πίνακας 7. Χαρακτηριστικά των AMA-θετικών πρώτου βαθμού συγγενών ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος που εμφανίζουν διαταραχές της ηπατικής βιοχημείας**

Αναγνωρι- στικό	Ηλι- κία	Βαθμός συγγενείας με τον ασθενή	Νόσος ασθενούς	AST/ALT (U/L)	ALP/γGT (U/L)	Ευρήματα ανοσολογικού ελέγχου
Συγγενής Α	44	Γιος	ΠΧΚ	37/45	102/122	1:80 AMA (+) LKS 1:40 RLM (+) HEp-2
Συγγενής Β	47	Αδελφός	ΠΧΚ	23/18	65/104	1:40 AMA (+) LKS 1:80 RLM (+) HEp-2
Συγγενής Γ	42	Κόρη	ΠΧΚ	29/34	60/73	1:20 AMA (+) LKS M2 (+) Line blot
Συγγενής Δ	40	Γιος	ΠΧΚ	37/90	67/154	1:80 AMA (+) LKS 1:80 MND (+) HEp-2
Συγγενής Ε	62	Αδελφή	ΠΧΚ	47/62	94/161	1:40 κυτταροπλ. φθορισμός σε HEp-2 M2 (+) Line blot
Συγγενής ΣΤ	24	Κόρη	ΠΧΚ	60/165	136/61	1:40 AMA (+) LKS 1:40 RLM (+) HEp-2
Συγγενής Ζ	52	Αδελφή	ΠΣΧ	53/103	91/94	1:40 AMA (+) LKS 1:80 MND (+) HEp-2

AST: ασπαρτική αμινοτρανσφεράση, ALT: αλανινική αμινοτρανσφεράση, γ-GT: γάμμα-γλουταμυλική τρανσπεπτιδάση, ALP: αλκαλική φωσφατάση, LKS: υπόστρωμα ήπατος (L)-νεφρού (K)- στομάχου (S) επίμυος

Τέλος, η συγγενής Ε έπασχε από κνησμό και οστεοπόρωση. Η φυσική εξέταση δεν απέκλυσε αξιόλογα ευρήματα σε κανέναν εκ των συγγενών ασθενών, ενώ βιοψία

ήπατος δε διενεργήθη σε κανέναν εκ των συγγενών ασθενών μέχρι την ολοκλήρωση της παρούσης μελέτης.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το κύριο εύρημα της παρούσας μελέτης είναι ότι οι πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ εμφανίζουν αυξημένο επιπολασμό αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων (AMA), καθώς και ειδικών για τη νόσο αντιπυρηγικών αντισωμάτων (ANA) σε σχέση με υγιείς μάρτυρες. Επιπρόσθετα διαπιστώθηκε ότι θετικοί για AMA μπορεί να είναι και συγγενείς ασθενών με AMA-αρνητική ΠΧΚ.

Στις πρώτες μελέτες που ασχολήθηκαν με τη συχνότητα εμφάνισης αυτοαντισωμάτων σε συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ, ο επιπολασμός των AMA υπολογίστηκε περί το 7.5% των ελεγχμένων συγγενών (920, 921). Συγκεκριμένα, οι Feizi και συν., αναζήτησαν την παρουσία AMA σε 118 πρώτου βαθμού συγγενείς 27 ασθενών με ΠΧΚ, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού και διαπίστωσαν ότι οι εννέα (7.6%) εξ αυτών είχαν ανιχνεύσιμα AMA (920). Η σύσταση του υπό εξέταση πληθυσμού παρουσίαζε διαφορές σε σχέση με τον πληθυσμό της δικής μας μελέτης, καθώς οι εξεταζόμενοι συγγενείς ήταν σε ποσοστό 6.7% γονείς και σε ποσοστό 50.8% αδέρφια, ενώ στην παρούσα μελέτη το 68.3% των εξετασθέντων συγγενών ήταν τέκνα ασθενών. Ακόμη, η διαφορετική μεθοδολογία ανίχνευσης των AMA που χρησιμοποιήθηκε (έμμεσος ανοσοφθορισμός σε υπόστρωμα τομών ανθρώπινου θυρεοειδούς, στομάχου και νεφρού) δεν επιτρέπει άμεσες συγκρίσεις μεταξύ των δύο μελετών.

Η επακόλουθη μελέτη των Galbraith και συν. έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, καθώς σε αυτή οι Galbraith και συν. επέλεξαν να συγκρίνουν τον επιπολασμό των AMA και ANA μεταξύ 95 συγγενών ασθενών με ΠΧΚ και 165 συγγενών ασθενών με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα (μεταξύ των 260 συγγενών που εξετάστηκαν, πρώτου βαθμού συγγενείς ήταν οι 228) (921). Ο επιπολασμός των AMA στους συγγενείς των ασθενών με ΠΧΚ ήταν

παρόμοιος (7.4%) με αυτόν που υπολογίστηκε από τους Feizi και συν., γεγονός που εξηγείται πιθανότατα από το ότι και οι δύο μελέτες αναφέρονταν σε κατοίκους της περιοχής του Λονδίνου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει όμως ότι ο επιπολασμός των AMA ήταν αυξημένος και στους συγγενείς των ασθενών με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα, υπολογιζόμενος περί το 3.6%, στο ήμισυ δηλαδή του επιπολασμού των AMA στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ, με αποτέλεσμα να μην ανευρίσκεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ συγγενών ασθενών με ΠΧΚ και ασθενών με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα. Ανάλογα είναι τα ευρήματα στον δικό μας πληθυσμό, με τη συχνότητα ανίχνευσης AMA στον ανοσοφθορισμό στους πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΑΗ-1 και ΠΣΧ να είναι ιδιαίτερα αυξημένη και να αντιστοιχεί στο ήμισυ του επιπολασμού των AMA στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ.

Επακόλουθη μελέτη από τους Caldwell και συν., διαπίστωσε ότι μεταξύ 41 πρώτου βαθμού συγγενών 27 ασθενών με ΠΧΚ, η συχνότητα εμφάνισης των AMA ανήρχετο σε 4.9% (919). Το χαμηλότερο ποσοστό σε σχέση με τις άλλες δύο προηγούμενες μελέτες πιθανολογείται από τους ερευνητές ότι οφείλεται στην απώλεια 2 συγγενών με τεκμηριωμένη ΠΧΚ, από τους οποίους δε ήταν δυνατό να ληφθεί δείγμα ορού προς ανίχνευση AMA. Αν οι ασθενείς αυτοί συμπεριλαμβάνονταν στη μελέτη πιθανολογείται από τους ερευνητές ότι θετικοί για AMA θα ήταν το 6% των συγγενών (και ειδικότερα το 7.3% των πρώτου βαθμού συγγενών), επομένως τα ευρήματα αυτής της μελέτης θα ήταν παρεμφερή με τα ευρήματα των προγενέστερων. Ένα χαρακτηριστικό της μελέτης που αναφέρεται ως αξιοσημείωτο από τους ερευνητές είναι ότι μία συγγενής που βρέθηκε AMA-θετική ήταν συγγενής ασθενούς με AMA-αρνητική ΠΧΚ. Το γεγονός αυτό συνάδει με το εύρημα της παρούσας μελέτης ότι δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στον

επιπολασμό των AMA μεταξύ συγγενών ασθενών με AMA-αρνητική ή AMA-θετική ΠΧΚ.

Τα πρώτα στοιχεία για μία μεσογειακή χώρα δημοσίευσαν οι Floreani και συν., οι οποίοι χρησιμοποιώντας έμμεσο ανοσοφθορισμό ανίχνευσαν AMA σε ποσοστό 6.1% μεταξύ 115 συγγενών 30 ασθενών με ΠΧΚ, χωρίς ωστόσο να διευκρινίζεται ο βαθμός συγγένειας μεταξύ των εξεταζόμενων συγγενών και των ασθενών (915). Αντίθετα, σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2004 και αφορούσε πληθυσμό από τη Βραζιλία, ο επιπολασμός των AMA στους πρώτου βαθμού συγγενείς υπολογίστηκε μόλις στο 1% (918).

Στη συγκριτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων αυτών των μελετών θα πρέπει να λαμβάνονται υπ'όψιν, εκτός των μεθοδολογικών διαφορών, διαφορές στο γενετικό υπόβαθρο των εκάστοτε μελετούμενων πληθυσμών. Επομένως, διαφορές στη γενετική προδιάθεση ίσως είναι υπεύθυνες για το σημαντικά χαμηλότερο επιπολασμό των AMA στην μελέτη που διενεργήθηκε στη Βραζιλία σε σχέση με τις μελέτες που αφορούν ευρωπαϊκούς πληθυσμούς. Η συχνότητα ανίχνευσης AMA στο γενικό πληθυσμό της Ευρώπης έχει υπολογιστεί μεταξύ 0.5% και 0.89%, ενώ σε μελέτες από την Κίνα και την Ιαπωνία κυμαινόταν μεταξύ 0.16% και 0.64%, καταδεικνύοντας ότι πράγματι, διακυμάνσεις στον επιπολασμό των AMA μπορεί να οφείλονται τόσο στη σύσταση του μελετώμενου πληθυσμού όσο και στη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευσή τους (922-925).

Η πιο καλά σχεδιασμένη καταγραφή της συχνότητας των AMA στους πρώτου βαθμού συγγενείς των ασθενών με ΠΧΚ, δημοσιεύτηκε από τους Lazaridis και συν., και αφορούσε τους συγγενείς ασθενών που παρακολουθούνταν από τη Mayo Clinic, στη Minnesota των ΗΠΑ (916). Σε αυτή τη μελέτη, ο επιπολασμός των AMA προσδιορίστηκε στο 13.1% των πρώτου βαθμού συγγενών και στο 1% των υγιών

μαρτύρων. Όταν συγκρίνουμε τα αποτελέσματα που λάβαμε χρησιμοποιώντας την M2 ELISA, μέθοδο που χρησιμοποίησαν και οι Lazaridis και συν., διαπιστώνουμε ότι η συχνότητα εμφάνισης AMA στο δικό μας πληθυσμό (11.9%) είναι παραπλήσια με αυτή στη μελέτη της Mayo Clinic.

Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι η συχνότητα ανίχνευσης AMA στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ ήταν σημαντικά υψηλότερη όταν λαμβάνονταν υπ'όψιν τα αποτελέσματα του έμμεσου ανοσοφθορισμού (27.7%) ή όταν λαμβάνονταν υπ'όψιν συνδυαστικά τα αποτελέσματα του έμμεσου ανοσοφθορισμού, της M2 ELISA και της ανοσοαποτύπωσης (53.5%). Άλλωστε, ο ορισμός της συνδυασμένης AMA-αντιδραστικότητας αποσκοπούσε στην αύξηση της συνολικής ευαισθησίας για την ανίχνευση των AMA, χωρίς όμως να μειωθεί η ειδικότητα, η οποία εξ ορισμού δε θα ήταν μικρότερη από την ειδικότητα της λιγότερο ειδικής μεθόδου, δηλαδή του ανοσοφθορισμού. Πράγματι, διαπιστώνεται ότι αν και η συνολική ανίχνευση AMA στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ ανήλθε σε 53.5%, δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη αύξηση της συνολικής ανίχνευσης των AMA στην ομάδα των συγγενών ασθενών με ΑΗ-1/ΠΣΧ ή στην ομάδα υγιών μαρτύρων.

Διάφοροι παράγοντες μπορεί να συμβάλλουν στον τόσο αυξημένο επιπολασμό των AMA στο πληθυσμό που μελετήσαμε. Σίγουρα σημαντικό ρόλο στις διαφορετικές συχνότητες εμφάνισης AMA φαίνεται να διαδραματίζουν τα διαφορετικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε μελετούμενου πληθυσμού. Οι Lazaridis και συν., βρίσκουν την υψηλότερη μέχρι σήμερα συχνότητα AMA μελετώντας πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ σε μία περιοχή που ούτως ή άλλως έχει έναν από τους υψηλότερους επιπολασμούς ΠΧΚ παγκοσμίως, με βάση τη διαθέσιμη βιβλιογραφία (40.2 ασθενείς ανά 100.000 κατοίκους) (666). Αντίστοιχα επιδημιολογικά δεδομένα για την Ελλάδα δεν είναι διαθέσιμα, ωστόσο πιθανολογείται ότι η ΠΧΚ είναι

ιδιαίτερα διαδεδομένη στην Ελλάδα καθώς μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Αυστραλία και συμπεριέλαβε μετανάστες διαφόρων εθνικοτήτων διαπίστωσε ότι οι μετανάστες ελληνικής καταγωγής είχαν τον υψηλότερο επιπολασμό της νόσου.

Κατά δεύτερο λόγο, η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης AMA στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ στις πιο πρόσφατες μελέτες, με την εξαίρεση της μελέτης των Bittencourt και συν., ενδέχεται να οφείλεται εν μέρει στη γενικότερη αύξηση της επίπτωσης της νόσου. Επί παραδείγματι, όπως έχει ήδη αναφερθεί, από τη δεκαετία του 1970 που δημοσιεύτηκαν οι μελέτες των Feizi και συν. και Galbraith και συν. μέχρι τη δεκαετία του 1990 η επίπτωση της νόσου στο Sheffield της Μεγάλης Βρετανίας τριπλασιάστηκε, ενώ ο επιπολασμός της νόσου τετραπλασιάστηκε (655, 675). Αντίστοιχα, στο Tayside της Σκωτίας η επίπτωση της νόσου στο τέλος της δεκαετίας του 1990 ήταν τέσσερις φορές μεγαλύτερη της επίπτωσης που καταγραφόταν στο τέλος της δεκαετίας του 1970 (654, 674, 676).

Ένα ακόμη ενδιαφέρον εύρημα αυτής της μελέτης είναι ότι οι AMA-θετικοί συγγενείς εμφάνιζαν υψηλότερη συχνότητα ουρολοιμώξεων εκ του ιστορικού. Η συσχέτιση ιστορικού ουρολοιμώξεων με την εμφάνιση ΠΧΚ έχει ήδη επιβεβαιωθεί σε επιδημιολογικές έρευνες (860, 911, 926), ενώ έχει επίσης παρατηρηθεί αυξημένος επιπολασμός AMA σε ασθενείς με ιστορικό επανειλημμένων ουρολοιμώξεων (861). Ωστόσο, είναι η πρώτη φορά που η συσχέτιση της ανίχνευσης AMA με το ιστορικό ουρολοιμώξεων περιγράφεται σε συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ. Φαίνεται ότι τα επανειλημμένα επεισόδια ουρολοιμώξεων μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη AMA μέσω συγκεκριμένων παθογενετικών μηχανισμών που περιλαμβάνουν τη μοριακή μίμηση, πειραματικά δεδομένα δε ενισχύουν αυτή τη θεωρία αποκαλύπτοντας διασταυρούμενη αντιδραστικότητα των AMA με πεπτιδικές αλληλουχίες παθογόνων του ουροποιητικού, όπως η *Escherichia coli* (927).

Μία ακόμη ενδιαφέρουσα παρατήρηση που προκύπτει από την παρούσα μελέτη είναι ότι οι συγγενείς με AMA εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα ηωσινοφίλων στο περιφερικό αίμα, σε σχέση με τους AMA-αρνητικούς, παρότι και στις δύο ομάδες ο αριθμός των ηωσινοφίλων κυμαινόταν εντός φυσιολογικών ορίων. Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με προγενέστερη δημοσίευση της κλινικής μας, στην οποία περιγράφεται η περιφερική ηωσινοφιλία ως πρώτη εκδήλωση της ΠΧΚ που σχετίζεται με πρώιμα στάδια της νόσου (766).

Το δεύτερο κύριο εύρημα της μελέτης είναι ότι οι πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ χαρακτηρίζονται από αυξημένη συχνότητα εμφάνισης ANA, και ιδιαιτέρως των ειδικών για τη νόσο προτύπων MND και RLM σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Ορισμένες προηγούμενες μελέτες προσδιόρισαν τον επιπολασμό των ANA στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ μεταξύ 11.8% και 15.8%, ωστόσο δεν συμπεριέλαβαν πληροφορίες για το ανιχνευόμενο πρότυπο των ANA (920, 921). Σύμφωνα με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία, στο 50% περίπου των ασθενών με ΠΧΚ ανιχνεύονται ANA (218). Με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε υπόστρωμα HEp-2 κυττάρων, διαπιστώνεται ότι τα ANA στους ασθενείς με ΠΧΚ είναι ετερογενή, ωστόσο ιδιαίτερη κλινική σημασία έχουν εκείνα που δίνουν τα MND και RLM πρότυπα ανοσοφθορισμού. Οι κύριοι αντιγονικοί στόχοι των αντισωμάτων που δίνουν το πρότυπο των πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων είναι η πρωτεΐνη Sp100 και λιγότερο συχνά η πρωτεΐνη PML, ενώ οι κύριοι αντιγονικοί στόχοι που δίνουν το πρότυπο του περιπυρηνικού RLM φθορισμού είναι δομικές πρωτεΐνες της πυρηνικής μεμβράνης, κυρίως οι gp210, νουκλεοπορίνη p62 και ο υποδοχέας της λαμινίνης B (786). Ο επιπολασμός των anti-gp210 και anti-Sp100 στους ασθενείς με ΠΧΚ κυμαίνεται από 25% έως 65% αν χρησιμοποιηθούν οροί IgG υποτάξης και τα δύο αντισώματα θεωρούνται ειδικά για τη νόσο (218, 232, 234, 816). Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της παρούσας μελέτης



είναι ότι το 27.5% των συγγενών των ασθενών με ΑΗ/ΠΣΧ εμφάνιζε πυρηνικό φθορισμό του τύπου των πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων, αν και αντισώματα έναντι Sp100 ανιχνεύθηκαν μόνο σε έναν συγγενή ασθενούς με ΠΣΧ. Το υψηλό αυτό ποσοστό μπορεί να οφείλεται σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι οι 6 από τους 11 MND-θετικούς συγγενείς ανήκουν σε δύο οικογένειες ασθενών με ΠΣΧ, στις οποίες παρατηρείται και ανίχνευση AMA. Η μία δε εξ αυτών παρουσιάζει αύξηση των χολοστατικών ενζύμων και περιγράφεται στον πίνακα 7 ως συγγενής Ζ. Με βάση τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, συγγενείς ασθενών με ΠΣΧ ενδέχεται να παρουσιάζουν ανοσολογικό προφίλ συμβατό με ΠΧΚ. Παρότι, η συνύπαρξη ΠΧΚ και ΠΣΧ με τη μορφή συνδρόμου επικάλυψης θεωρείται αμφίβολη, υπάρχουν στη βιβλιογραφία σχετικές αναφορές (574, 575), ενώ έχει αναφερθεί ανίχνευση AMA σε χαμηλούς τίτλους σε μικρό ποσοστό ασθενών με ΠΣΧ (555, 928).

Εν κατακλείδι, με βάση τα διαθέσιμα από την παρούσα μελέτη δεδομένα, που πρέπει να τονιστεί ότι διενεργήθηκε για πρώτη φορά στον Ελλαδικό χώρο, μπορούμε να επιβεβαιώσουμε ότι οι πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ, και αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος γενικότερα, παρουσιάζουν σημαντικά αυξημένη προδιάθεση για την εμφάνιση ανοσολογικών διαταραχών. Η εκδήλωση αυτών των διαταραχών μπορεί να περιλαμβάνει την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης διάφορων αυτοάνοσων παθήσεων σε ορισμένους συγγενείς, στην πλειονότητα ωστόσο των συγγενών συνίσταται στον αυξημένο επιπολασμό κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων. Παρότι η παθογονικότητα αυτών των αυτοαντισωμάτων δεν διασαφηνίστηκε, σε ένα σημαντικό ποσοστό των θετικών για τα αυτοαντισώματα συγγενών καταγράφηκαν διαταραχές της ηπατικής βιοχημείας με κλινικά χαρακτηριστικά προσομοιάζοντα σε ΠΧΚ.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Margotta, R., Αντωνακόπουλος, Γ.Ν., *Ιστορία της Ιατρικής* 1999: Εκδόσεις Παρισιάνου.
2. Kuntz, E. and H.-D. Kuntz, *Hepatology : principles and practice : history, morphology, biochemistry, diagnostics, clinic, therapy*. 2nd ed 2006, Heidelberg ;: Springer. xii, 906 p.
3. Von Staden, H., *Herophilus : the art of medicine in early Alexandria : edition, translation, and essays* 1989, Cambridge ; New York: Cambridge University Press. xliii, 666 p.
4. Vesalius, A., *De humani corporis fabrica libri septem* 1543, Basel: Oporin.
5. Gray, H. and W.H. Lewis, *Anatomy of the human body*. 20th ed 1918, Philadelphia and New York,: Lea & Febiger.
6. Νταλέκος, Γ.Ν., *Παθήσεις του ήπατος, των χοληφόρων οδών και του παγκρέατος* 1999, Λάρισα.
7. Junqueira, L.C. and J. Carneiro, *Basic Histology: Text & Atlas*. 11th ed 2005: McGraw-Hill Medical.
8. Kiernan, F. *The anatomy and physiology of the liver*. Phil Trans R Soc Lond, 1833. **123**: p. 711-770.
9. Malarkey, D.E., K. Johnson, L. Ryan, G. Boorman, and R.R. Maronpot. *New insights into functional aspects of liver morphology*. Toxicol Pathol, 2005. **33**(1): p. 27-34.
10. Burt, A.D. and C.P. Day, *Pathophysiology of the liver*, in *Pathology of the liver*, R.N.M. MacSween, A.D. Burt, B.C. Portmann, K.G. Ishak, P.J. Scheuer, and P.P. Anthony, Editors. 2002, Churchill Livingstone: Edinburgh.
11. Junqueira, L.C. and J. Carneiro, *Basic Histology*. 6th ed 1989, Norwalk: Appleton & Lange.
12. Mall, F. *A study of the structural unit of the liver*. Am J Anat, 1906. **5**: p. 227-308.
13. Rappaport, A.M., Z.J. Borowy, W.M. Loughheed, and W.N. Lotto. *Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology*. Anat Rec, 1954. **119**(1): p. 11-33.
14. Matsumoto, T., R. Komori, and H.K. Hamadech. *A study on the normal structure of human liver, with special reference to its angioarchitecture*. Jikeikai Med, 1979. **26**: p. 1-40.
15. Lamers, W.H., A. Hilberts, E. Furt, J. Smith, G.N. Jonges, C.J. van Noorden, J.W. Janzen, R. Charles, and A.F. Moorman. *Hepatic enzymic zonation: a reevaluation of the concept of the liver acinus*. Hepatology, 1989. **10**(1): p. 72-6.
16. Ekataksin, W. and K. Wake, *The anatomy and physiology of the liver*, in *Progress in liver diseases*, J.L. Boyer and R.K. Ockner, Editors. 1997, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 1-30.
17. Guyton, A.C. and J.E. Hall, *Textbook of medical physiology*. 11th ed 2006, Philadelphia: Elsevier Saunders. xxxv, 1116 p.
18. Unger, R.H. *The physiology of cellular liporegulation*. Annu Rev Physiol, 2003. **65**: p. 333-47.
19. Μουτσόπουλος, Χ.Μ. and Δ.Σ. Εμμανουήλ, *Βασικές Αρχές Παθοφυσιολογίας* 1991, Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.
20. Marra, F. and C. Bertolani. *Adipokines in liver diseases*. Hepatology, 2009. **50**(3): p. 957-69.

21. O'Farrelly, C. and D.G. Doherty, *A short primer on fundamental immunology*, in *Liver immunology : principles and practice*, M.E. Gershwin, J.M. Vierling, and M.P. Manns, Editors. 2007, Humana Press: Totowa, N.J. p. xv, 486 p.
22. Γερμενής, Α., *Ιατρική ανοσολογία* 2000, Αθήνα: Εκδόσεις Παπαζήση. 504.
23. Abbas, A.K. and A.H. Lichtman, *Basic immunology : functions and disorders of the immune system*. 2nd ed 2004, Philadelphia: Saunders. ix, 322 p.
24. Cheroutre, H. *Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 217-46.
25. Cheroutre, H. and F. Lambolez. *The thymus chapter in the life of gut-specific intra epithelial lymphocytes*. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**(2): p. 185-91.
26. Parkin, J. and B. Cohen. *An overview of the immune system*. *Lancet*, 2001. **357**(9270): p. 1777-89.
27. Scapini, P., J.A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni, and M.A. Cassatella. *The neutrophil as a cellular source of chemokines*. *Immunol Rev*, 2000. **177**: p. 195-203.
28. Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D.S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. *Science*, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
29. McKenzie, S.E. and A.D. Schreiber. *Fc gamma receptors in phagocytes*. *Curr Opin Hematol*, 1998. **5**(1): p. 16-21.
30. Ξαπλαντέρη, Π., *Μελέτη του ρόλου των υποδοχέων φυσικής ανοσίας (mannose receptors, Toll-like receptors) στην αλληλεπίδραση της P. aeruginosa με ανθρώπινα μονοκύτταρα*, in *Σχολή Εοιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής* 2008, Πανεπιστήμιο Πατρών: Πάτρα. p. 206.
31. Roitt, I.M. and P.J. Delves, *Roitt's essential immunology*. 10th ed 2001, Oxford, UK ; Malden, MA: Blackwell Science. xi, 481 p.
32. Boyce, J.A. *Mast cells: beyond IgE*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(1): p. 24-32; quiz 33.
33. Lawson, D., C. Fewtrell, B. Gomperts, and M. Raff. *Anti-immunoglobulin-induced histamine secretion by rat peritoneal mast cells studied by immunoferritin electron microscopy*. *J Exp Med*, 1975. **142**(2): p. 391-402.
34. Tschopp, J., D. Masson, and K.K. Stanley. *Structural/functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity*. *Nature*, 1986. **322**(6082): p. 831-4.
35. Παπαδάκη, Ε. and Μ. Βελεγράκη. *Η ανοσολογία του αναπνευστικού συστήματος*. *Πνεύμων*, 2007. **20**(4): p. 372-383.
36. Sulica, A., P. Morel, D. Metes, and R.B. Herberman. *Ig-binding receptors on human NK cells as effector and regulatory surface molecules*. *Int Rev Immunol*, 2001. **20**(3-4): p. 371-414.
37. Turner, M.W. *Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease*. *Immunobiology*, 1998. **199**(2): p. 327-39.
38. Wallis, R. *Structural and functional aspects of complement activation by mannose-binding protein*. *Immunobiology*, 2002. **205**(4-5): p. 433-45.
39. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield. *C-reactive protein: a critical update*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(12): p. 1805-12.
40. Agrawal, A., P.P. Singh, B. Bottazzi, C. Garlanda, and A. Mantovani. *Pattern recognition by pentraxins*. *Adv Exp Med Biol*, 2009. **653**: p. 98-116.
41. Sutton, B.J. *Immunoglobulin structure and function: the interaction between antibody and antigen*. *Curr Opin Immunol*, 1989. **2**(1): p. 106-13.

42. Woof, J.M. and D.R. Burton. *Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(2): p. 89-99.
43. Ravetch, J.V. and S. Bolland. *IgG Fc receptors*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 275-90.
44. Delves, P.J. and I.M. Roitt. *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(1): p. 37-49.
45. DeFranco, A.L., J.D. Richards, J.H. Blum, T.L. Stevens, D.A. Law, V.W. Chan, S.K. Datta, S.P. Foy, S.L. Hourihane, M.R. Gold, and et al. *Signal transduction by the B-cell antigen receptor*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **766**: p. 195-201.
46. Levy, S., S.C. Todd, and H.T. Maecker. *CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 89-109.
47. Banchereau, J., F. Bazan, D. Blanchard, F. Briere, J.P. Galizzi, C. van Kooten, Y.J. Liu, F. Rousset, and S. Saeland. *The CD40 antigen and its ligand*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 881-922.
48. Teng, G. and F.N. Papavasiliou. *Immunoglobulin somatic hypermutation*. Annu Rev Genet, 2007. **41**: p. 107-20.
49. Allen, C.D., T. Okada, and J.G. Cyster. *Germinal-center organization and cellular dynamics*. Immunity, 2007. **27**(2): p. 190-202.
50. Klein, J., *Natural history of the major histocompatibility complex* 1986, New York: Wiley. xv, 775 p.
51. Chaplin, D.D. *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-23.
52. Forbes, S.A. and J. Trowsdale. *The MHC quarterly report*. Immunogenetics, 1999. **50**(3-4): p. 152-9.
53. Klein, J. and A. Sato. *The HLA system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(10): p. 702-9.
54. Rose, M., *HLA antigens in tissues*, in *Methods in clinical histocompatibility*, P. Dyer and D. Middleton, Editors. 1992, Oxford University Press: Oxford.
55. Navarrete, C.V. *The HLA system in blood transfusion*. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol, 2000. **13**(4): p. 511-32.
56. Klein, J. and A. Sato. *The HLA system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(11): p. 782-6.
57. Subudhi, S.K., M.L. Alegre, and Y.X. Fu. *The balance of immune responses: costimulation verse coinhibition*. J Mol Med, 2005. **83**(3): p. 193-202.
58. Stevens, T.L., A. Bossie, V.M. Sanders, R. Fernandez-Botran, R.L. Coffman, T.R. Mosmann, and E.S. Vitetta. *Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells*. Nature, 1988. **334**(6179): p. 255-8.
59. Bach, J.F. *Non-Th2 regulatory T-cell control of Th1 autoimmunity*. Scand J Immunol, 2001. **54**(1-2): p. 21-9.
60. Letterio, J.J. and A.B. Roberts. *TGF-beta: a critical modulator of immune cell function*. Clin Immunol Immunopathol, 1997. **84**(3): p. 244-50.
61. Carrier, Y., J. Yuan, V.K. Kuchroo, and H.L. Weiner. *Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF-beta-transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity*. Journal of immunology, 2007. **178**(1): p. 172-8.
62. Veldhoen, M., C. Uyttenhove, J. van Snick, H. Helmby, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm, and B. Stockinger. *Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset*. Nature immunology, 2008. **9**(12): p. 1341-6.

63. Awasthi, A. and V.K. Kuchroo. *Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection*. International immunology, 2009. **21**(5): p. 489-98.
64. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo. *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
65. Miller, J.F. and A. Basten. *Mechanisms of tolerance to self*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(6): p. 815-21.
66. Klein, L., M. Hinterberger, G. Wirnsberger, and B. Kyewski. *Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(12): p. 833-44.
67. Ziegler, A., C.A. Muller, R.A. Bockmann, and B. Uchanska-Ziegler. *Low-affinity peptides and T-cell selection*. Trends Immunol, 2009. **30**(2): p. 53-60.
68. Rizzi, M., F. Ferrera, G. Filaci, and F. Indiveri. *Disruption of immunological tolerance: role of AIRE gene in autoimmunity*. Autoimmun Rev, 2006. **5**(2): p. 145-7.
69. Walker, L.S. and A.K. Abbas. *The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(1): p. 11-9.
70. Bretscher, P.A. and M. Cohn. *Minimal model for the mechanism of antibody induction and paralysis by antigen*. Nature, 1968. **220**(5166): p. 444-8.
71. Collins, M., V. Ling, and B.M. Carreno. *The B7 family of immune-regulatory ligands*. Genome Biol, 2005. **6**(6): p. 223.
72. Magott-Procelewska, M. *Costimulatory pathways as a basic mechanisms of activating a tolerance signal in T cells*. Ann Transplant, 2004. **9**(3): p. 13-8.
73. Loke, P. and J.P. Allison. *Emerging mechanisms of immune regulation: the extended B7 family and regulatory T cells*. Arthritis Res Ther, 2004. **6**(5): p. 208-14.
74. Scalapino, K.J. and D.I. Daikh. *CTLA-4: a key regulatory point in the control of autoimmune disease*. Immunol Rev, 2008. **223**: p. 143-55.
75. Jiang, H. and L. Chess. *An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation*. J Clin Invest, 2004. **114**(9): p. 1198-208.
76. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman. *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
77. Bettini, M. and D.A. Vignali. *Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(6): p. 612-8.
78. Lange, K., M.M. Gold, D. Weiner, and V. Simon. *Autoantibodies in Human Glomerulonephritis*. J Clin Invest, 1949. **28**(1): p. 50-5.
79. Wiener, A.S., E.B. Gordon, and C. Gallop. *Studies on autoantibodies in human sera*. J Immunol, 1953. **71**(2): p. 58-65.
80. Miller, S.D., C.L. Vanderlugt, W.S. Begolka, W. Pao, R.L. Yauch, K.L. Neville, Y. Katz-Levy, A. Carrizosa, and B.S. Kim. *Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading*. Nat Med, 1997. **3**(10): p. 1133-6.
81. Cella, M., M. Salio, Y. Sakakibara, H. Langen, I. Julkunen, and A. Lanzavecchia. *Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA*. J Exp Med, 1999. **189**(5): p. 821-9.
82. Infante-Duarte, C., H.F. Horton, M.C. Byrne, and T. Kamradt. *Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6107-15.

83. Perron, H., J.A. Garson, F. Bedin, F. Beseme, G. Paranhos-Baccala, F. Komurian-Pradel, F. Mallet, P.W. Tuke, C. Voisset, J.L. Blond, B. Lalande, J.M. Seigneurin, and B. Mandrand. *Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(14): p. 7583-8.
84. Katz, U. and G. Zandman-Goddard. *Drug-induced lupus: An update*. Autoimmun Rev, 2010. **10**(1): p. 46-50.
85. Damian, R.T., *Molecular Mimicry: Antigen Sharing by Parasite and Host and Its Consequences*, 1964. p. 129.
86. Marrack, P., J. Kappler, and B.L. Kotzin. *Autoimmune disease: why and where it occurs*. Nat Med, 2001. **7**(8): p. 899-905.
87. Yuki, N., K. Susuki, M. Koga, Y. Nishimoto, M. Odaka, K. Hirata, K. Taguchi, T. Miyatake, K. Furukawa, T. Kobata, and M. Yamada. *Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and Campylobacter jejuni lipooligosaccharide causes Guillain-Barre syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11404-9.
88. Goodnow, C.C. *Pathways for self-tolerance and the treatment of autoimmune diseases*. Lancet, 2001. **357**(9274): p. 2115-21.
89. Kamradt, T. and N.A. Mitchison. *Tolerance and autoimmunity*. N Engl J Med, 2001. **344**(9): p. 655-64.
90. Tarlinton, D.M., M. McLean, and G.J. Nossal. *B1 and B2 cells differ in their potential to switch immunoglobulin isotype*. Eur J Immunol, 1995. **25**(12): p. 3388-93.
91. Shoenfeld, Y. and E. Toubi. *Protective autoantibodies: role in homeostasis, clinical importance, and therapeutic potential*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(9): p. 2599-606.
92. Abu-Shakra, M. and Y. Shoenfeld, *Idiotypes and anti-idiotypes*, in *Autoantibodies*, Y. Shoenfeld, M.E. Gershwin, and P.-L. Meroni, Editors. 2007, Elsevier: Amsterdam ; Oxford. p. xxxiv, 838 p.
93. Invernizzi, P., *Antinuclear antibodies: general introduction*, in *Autoantibodies*, Y. Shoenfeld, M.E. Gershwin, and P.-L. Meroni, Editors. 2007, Elsevier: Amsterdam ; Oxford. p. xxxiv, 838 p.
94. Cowling, D.C., I.R. Mackay, and L.I. Taft. *Lupoid hepatitis*. Lancet, 1956. **271**(6957): p. 1323-6.
95. Holman, H. and H.R. Deicher. *The reaction of the lupus erythematosus (L.E.) cell factor with deoxyribonucleoprotein of the cell nucleus*. J Clin Invest, 1959. **38**: p. 2059-72.
96. Vergani, D., F. Alvarez, F.B. Bianchi, E.L. Cancado, I.R. Mackay, M.P. Manns, M. Nishioka, and E. Penner. *Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group*. J Hepatol, 2004. **41**(4): p. 677-83.
97. Bogdanos, D.P., P. Invernizzi, I.R. Mackay, and D. Vergani. *Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(21): p. 3374-87.
98. Moore, A.E., L. Sabachewsky, and H.W. Toolan. *Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells*. Cancer Res, 1955. **15**(9): p. 598-602.
99. Ward, M.M. *Laboratory testing for systemic rheumatic diseases*. Postgrad Med, 1998. **103**(2): p. 93-100.

100. Casiano, C.A. and E.M. Tan. *Recent developments in the understanding of antinuclear autoantibodies*. Int Arch Allergy Immunol, 1996. **111**(4): p. 308-13.
101. Enarson, P., J.B. Rattner, Y. Ou, K. Miyachi, T. Horigome, and M.J. Fritzler. *Autoantigens of the nuclear pore complex*. J Mol Med, 2004. **82**(7): p. 423-33.
102. Coutinho, H.D., V.S. Falcao-Silva, G.F. Goncalves, and R.B. da Nobrega. *Molecular ageing in progeroid syndromes: Hutchinson-Gilford progeria syndrome as a model*. Immun Ageing, 2009. **6**: p. 4.
103. Nesher, G., R. Margalit, and Y.J. Ashkenazi. *Anti-nuclear envelope antibodies: Clinical associations*. Semin Arthritis Rheum, 2001. **30**(5): p. 313-20.
104. Tsangaridou, E., H. Polioudaki, R. Sfakianaki, M. Samiotaki, M. Tzardi, M. Koulentaki, G. Panayotou, E. Kouroumalis, E. Castanas, and P.A. Theodoropoulos. *Differential detection of nuclear envelope autoantibodies in primary biliary cirrhosis using routine and alternative methods*. BMC Gastroenterol, 2010. **10**: p. 28.
105. Chi, Y.H., Z.J. Chen, and K.T. Jeang. *The nuclear envelopathies and human diseases*. J Biomed Sci, 2009. **16**: p. 96.
106. Kiseleva, E., S. Rutherford, L.M. Cotter, T.D. Allen, and M.W. Goldberg. *Steps of nuclear pore complex disassembly and reassembly during mitosis in early Drosophila embryos*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 20): p. 3607-18.
107. Lin, F., C.M. Noyer, Q. Ye, J.C. Courvalin, and H.J. Worman. *Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis recognize a region within the nucleoplasmic domain of inner nuclear membrane protein LBR*. Hepatology, 1996. **23**(1): p. 57-61.
108. Miyachi, K., M. Shibata, Y. Onozuka, F. Kikuchi, N. Imai, and T. Horigome. *Primary biliary cirrhosis sera recognize not only gp210 but also proteins of the p62 complex bearing N-acetylglucosamine residues from rat liver nuclear envelope. Anti-p62 complex antibody in PBC*. Mol Biol Rep, 1996. **23**(3-4): p. 227-34.
109. Cronshaw, J.M., A.N. Krutchinsky, W. Zhang, B.T. Chait, and M.J. Matunis. *Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex*. J Cell Biol, 2002. **158**(5): p. 915-27.
110. Ou, Y., P. Enarson, J.B. Rattner, S.G. Barr, and M.J. Fritzler. *The nuclear pore complex protein Tpr is a common autoantigen in sera that demonstrate nuclear envelope staining by indirect immunofluorescence*. Clin Exp Immunol, 2004. **136**(2): p. 379-87.
111. Hamann, D. and R. Smeenk, *dsDNA autoantibodies*, in *Autoantibodies*, Y. Shoenfeld, M.E. Gershwin, and P.-L. Meroni, Editors. 2007, Elsevier: Amsterdam ; Oxford. p. xxxiv, 838 p.
112. Bootsma, H., P. Spronk, R. Derksen, G. de Boer, H. Wolters-Dicke, J. Hermans, P. Limburg, F. Gmelig-Meyling, L. Kater, and C. Kallenberg. *Prevention of relapses in systemic lupus erythematosus*. Lancet, 1995. **345**(8965): p. 1595-9.
113. Amoura, Z., J.C. Piette, H. Chabre, P. Cacoub, T. Papo, B. Wechsler, J.F. Bach, and S. Koutouzov. *Circulating plasma levels of nucleosomes in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with serum antinucleosome antibody titers and absence of clear association with disease activity*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(12): p. 2217-25.



114. van Bruggen, M.C., B. Walgreen, T.P. Rijke, W. Tamboer, K. Kramers, R.J. Smeenk, M. Monestier, G.J. Fournie, and J.H. Berden. *Antigen specificity of anti-nuclear antibodies complexed to nucleosomes determines glomerular basement membrane binding in vivo*. Eur J Immunol, 1997. **27**(6): p. 1564-9.
115. ter Borg, E.J., G. Horst, E.J. Hummel, P.C. Limburg, and C.G. Kallenberg. *Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study*. Arthritis Rheum, 1990. **33**(5): p. 634-43.
116. Τζιούφας, Α.Γ., *Αντισώματα κατά δεόξυριβονουκλεϊκού οξέος*, in *Ανοσολογία-Αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα*, Χ.Μ. Μουτσόπουλος, Editor 1990, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας: Αθήνα. p. 285-300.
117. Hahn, B.H. *Antibodies to DNA*. N Engl J Med, 1998. **338**(19): p. 1359-68.
118. Peter, J., B. *Use and interpretation of tests in clinical immunology*. Eighth ed1991, Santa Monica: Specialty Laboratories Inc. 275.
119. Brinkman, K., R. Termaat, H. Van den Brink, J. Berden, and R. Smeenk. *The specificity of the anti-dsDNA ELISA. A closer look*. J Immunol Methods, 1991. **139**(1): p. 91-100.
120. Haugbro, K., J.C. Nossent, T. Winkler, Y. Figenschau, and O.P. Rekvig. *Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: the role of analytical diversity*. Ann Rheum Dis, 2004. **63**(4): p. 386-94.
121. Wasmuth, J.C., B. Grun, B. Terjung, A. Homrighausen, and U. Spengler. *ROC analysis comparison of three assays for the detection of antibodies against double-stranded DNA in serum for the diagnosis of systemic lupus erythematosus*. Clin Chem, 2004. **50**(11): p. 2169-71.
122. Hernando, M., C. Gonzalez, A. Sanchez, P. Guevara, J.A. Navajo, W. Papisch, and J.M. Gonzalez-Buitrago. *Clinical evaluation of a new automated anti-dsDNA fluorescent immunoassay*. Clin Chem Lab Med, 2002. **40**(10): p. 1056-60.
123. Riboldi, P., M. Gerosa, G. Moroni, A. Radice, F. Allegri, A. Sinico, A. Tincani, and P.L. Meroni. *Anti-DNA antibodies: a diagnostic and prognostic tool for systemic lupus erythematosus?* Autoimmunity, 2005. **38**(1): p. 39-45.
124. Derksen, R.H., E.J. Bast, T. Strooisma, and J.W. Jacobs. *A comparison between the Farr radioimmunoassay and a new automated fluorescence immunoassay for the detection of antibodies against double stranded DNA in serum*. Ann Rheum Dis, 2002. **61**(12): p. 1099-102.
125. Villalta, D. and R. Tozzoli, *Anti-chromatin (nucleosome) autoantibodies*, in *Autoantibodies*, Y. Shoenfeld, M.E. Gershwin, and P.-L. Meroni, Editors. 2007, Elsevier: Amsterdam ; Oxford. p. xxxiv, 838 p.
126. Berden, J.H., C. Grootsholten, W.C. Jurgen, and J. van der Vlag. *Lupus nephritis: a nucleosome waste disposal defect?* J Nephrol, 2002. **15 Suppl 6**: p. S1-10.
127. Burlingame, R.W. and R. Cervera. *Anti-chromatin (anti-nucleosome) autoantibodies*. Autoimmun Rev, 2002. **1**(6): p. 321-8.
128. Koutouzov, S., A.L. Jeronimo, H. Campos, and Z. Amoura. *Nucleosomes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Rheum Dis Clin North Am, 2004. **30**(3): p. 529-58, ix.
129. Van Bavel, C., J. Van der Vlag, and J. Berden, *Anti-nucleosome autoantibodies*, in *Autoantibodies*, Y. Shoenfeld, M.E. Gershwin, and P.-L. Meroni, Editors. 2007, Elsevier: Amsterdam ; Oxford. p. xxxiv, 838 p.

130. Beck, J.S., J.R. Anderson, K.G. Gray, and N.R. Rowell. *Antinuclear and Precipitating Autoantibodies in Progressive Systemic Sclerosis*. Lancet, 1963. **2**(7319): p. 1188-90.
131. Douvas, A.S., M. Achten, and E.M. Tan. *Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma*. J Biol Chem, 1979. **254**(20): p. 10514-22.
132. Shero, J.H., B. Bordwell, N.F. Rothfield, and W.C. Earnshaw. *High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients*. Science, 1986. **231**(4739): p. 737-40.
133. Randone, S., S. Guiducci, and M. Cerinic, *Topoisomerase-I (Scl-70) autoantibodies*, in *Autoantibodies*, Y. Shoenfeld, M.E. Gershwin, and P.-L. Meroni, Editors. 2007, Elsevier: Amsterdam ; Oxford. p. xxxiv, 838 p.
134. Ho, K.T. and J.D. Reveille. *The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma*. Arthritis Res Ther, 2003. **5**(2): p. 80-93.
135. Spencer-Green, G., D. Alter, and H.G. Welch. *Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl-70 antibodies*. Am J Med, 1997. **103**(3): p. 242-8.
136. Reveille, J.D. and D.H. Solomon. *Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies*. Arthritis Rheum, 2003. **49**(3): p. 399-412.
137. Ferri, C., G. Valentini, F. Cozzi, M. Sebastiani, C. Michelassi, G. La Montagna, A. Bullo, M. Cazzato, E. Tirri, F. Storino, D. Giuggioli, G. Cuomo, M. Rosada, S. Bombardieri, S. Todesco, and G. Tirri. *Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients*. Medicine (Baltimore), 2002. **81**(2): p. 139-53.
138. Jarzabek-Chorzelska, M., M. Blaszczyk, Z. Kolacinska-Strasz, S. Jablonska, T. Chorzelski, and G.G. Maul. *Are ACA and Scl 70 antibodies mutually exclusive?* Br J Dermatol, 1990. **122**(2): p. 201-8.
139. Jacobsen, S., P. Halberg, S. Ullman, W.J. Van Venrooij, M. Hoier-Madsen, A. Wiik, and J. Petersen. *Clinical features and serum antinuclear antibodies in 230 Danish patients with systemic sclerosis*. Br J Rheumatol, 1998. **37**(1): p. 39-45.
140. Steen, V.D., D.L. Powell, and T.A. Medsger, Jr. *Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 1988. **31**(2): p. 196-203.
141. Jacobsen, S., S. Ullman, G.Q. Shen, A. Wiik, and P. Halberg. *Influence of clinical features, serum antinuclear antibodies, and lung function on survival of patients with systemic sclerosis*. J Rheumatol, 2001. **28**(11): p. 2454-9.
142. Murata, I., K. Takenaka, S. Shinohara, T. Suzuki, T. Sasaki, and K. Yamamoto. *Diversity of myocardial involvement in systemic sclerosis: an 8-year study of 95 Japanese patients*. Am Heart J, 1998. **135**(6 Pt 1): p. 960-9.
143. Routsias, J.G. and A.G. Tzioufas. *Origin, antigenic specificity and regulation of autoantibodies targeting Ro/La RNP*. Autoimmun Rev, 2004. **3 Suppl 1**: p. S63-5.
144. Ben-Chetrit, E., E.K. Chan, K.F. Sullivan, and E.M. Tan. *A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle*. J Exp Med, 1988. **167**(5): p. 1560-71.
145. Slobbe, R.L., W. Pluk, W.J. van Venrooij, and G.J. Pruijn. *Ro ribonucleoprotein assembly in vitro. Identification of RNA-protein and protein-protein interactions*. J Mol Biol, 1992. **227**(2): p. 361-6.

146. Cheng, S.T., T.Q. Nguyen, Y.S. Yang, J.D. Capra, and R.D. Sontheimer. *Calreticulin binds hYRNA and the 52-kDa polypeptide component of the Ro/SS-A ribonucleoprotein autoantigen*. J Immunol, 1996. **156**(11): p. 4484-91.
147. Fouraux, M.A., P. Bouvet, S. Verkaart, W.J. van Venrooij, and G.J. Pruijn. *Nucleolin associates with a subset of the human Ro ribonucleoprotein complexes*. J Mol Biol, 2002. **320**(3): p. 475-88.
148. Anderson, J.R., K.G. Gray, J.S. Beck, W.W. Buchanan, and E.A. Mc. *Precipitating auto-antibodies in the connective tissue diseases*. Ann Rheum Dis, 1962. **21**: p. 360-9.
149. Clark, G., M. Reichlin, and T.B. Tomasi, Jr. *Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 1969. **102**(1): p. 117-22.
150. Alspaugh, M.A. and E.M. Tan. *Antibodies to cellular antigens in Sjogren's syndrome*. J Clin Invest, 1975. **55**(5): p. 1067-73.
151. Reichlin, M. *Antibodies to Ro and La*. Ann Med Interne (Paris), 1998. **149**(1): p. 34-41.
152. Schulte-Pelkum, J., M. Fritzler, and M. Mahler. *Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(7): p. 632-7.
153. Meyer, O. *[Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies. What's new?]*. Ann Med Interne (Paris), 2002. **153**(8): p. 520-9.
154. Alspaugh, M. and P. Maddison. *Resolution of the identity of certain antigen-antibody systems in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: an interlaboratory collaboration*. Arthritis Rheum, 1979. **22**(7): p. 796-8.
155. Wolin, S.L. and T. Cedervall. *The La protein*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 375-403.
156. Routsias, J.G., A.G. Tzioufas, and H.M. Moutsopoulos. *The clinical value of intracellular autoantigens B-cell epitopes in systemic rheumatic diseases*. Clin Chim Acta, 2004. **340**(1-2): p. 1-25.
157. Routsias, J.G. and A.G. Tzioufas, *SS-B (La) Autoantibodies*, in *Autoantibodies*, Y. Shoenfeld, M.E. Gershwin, and P.-L. Meroni, Editors. 2007, Elsevier: Amsterdam ; Oxford. p. xxxiv, 838 p.
158. Costedoat-Chalumeau, N., S. Georgin-Lavialle, Z. Amoura, and J.C. Piette. *Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibody-mediated congenital heart block*. Lupus, 2005. **14**(9): p. 660-4.
159. Locht, H., R. Pelck, and R. Manthorpe. *Clinical manifestations correlated to the prevalence of autoantibodies in a large (n=321) cohort of patients with primary Sjogren's syndrome: a comparison of patients initially diagnosed according to the Copenhagen classification criteria with the American-European consensus criteria*. Autoimmun Rev, 2005. **4**(5): p. 276-81.
160. Arbuckle, M.R., M.T. McClain, M.V. Rubertone, R.H. Scofield, G.J. Dennis, J.A. James, and J.B. Harley. *Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2003. **349**(16): p. 1526-33.
161. Moroi, Y., C. Peebles, M.J. Fritzler, J. Steigerwald, and E.M. Tan. *Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(3): p. 1627-31.
162. McHugh, N.J., *Centromere autoantibodies*, in *Autoantibodies*, Y. Shoenfeld, M.E. Gershwin, and P.-L. Meroni, Editors. 2007, Elsevier: Amsterdam ; Oxford. p. xxxiv, 838 p.

163. Earnshaw, W., B. Bordwell, C. Marino, and N. Rothfield. *Three human chromosomal autoantigens are recognized by sera from patients with anti-centromere antibodies*. J Clin Invest, 1986. **77**(2): p. 426-30.
164. Figueroa, J., R. Saffrich, W. Ansorge, and M.M. Valdivia. *Microinjection of antibodies to centromere protein CENP-A arrests cells in interphase but does not prevent mitosis*. Chromosoma, 1998. **107**(6-7): p. 397-405.
165. Tomkiel, J., C.A. Cooke, H. Saitoh, R.L. Bernat, and W.C. Earnshaw. *CENP-C is required for maintaining proper kinetochore size and for a timely transition to anaphase*. J Cell Biol, 1994. **125**(3): p. 531-45.
166. Kallenberg, C.G. *Anti-centromere antibodies (ACA)*. Clin Rheumatol, 1990. **9**(1 Suppl 1): p. 136-9.
167. Vazquez-Abad, D., S. Wallace, J.L. Senecal, F. Joyal, A. Roussin, W.C. Earnshaw, and N. Rothfield. *Anticentromere autoantibodies. Evaluation of an ELISA using recombinant fusion protein CENP-B as antigen*. Arthritis Rheum, 1994. **37**(2): p. 248-52.
168. Sato, S., M. Fujimoto, H. Ihn, and K. Takehara. *Antibodies to centromere and centriole in scleroderma spectrum disorders*. Dermatology, 1994. **189**(1): p. 23-6.
169. Chan, H.L., Y.S. Lee, H.S. Hong, and T.T. Kuo. *Anticentromere antibodies (ACA): clinical distribution and disease specificity*. Clin Exp Dermatol, 1994. **19**(4): p. 298-302.
170. Clegg, D.O., H.J. Williams, J.Z. Singer, V.D. Steen, S. Schlegel, C. Ziminski, G.S. Alarcon, M.E. Luggen, R.P. Polisson, R.F. Willkens, and et al. *Early undifferentiated connective tissue disease. II. The frequency of circulating antinuclear antibodies in patients with early rheumatic diseases*. J Rheumatol, 1991. **18**(9): p. 1340-3.
171. Ferri, C., L. Bernini, R. Cecchetti, A. Latorraca, G. Marotta, G. Pasero, R. Neri, and S. Bombardieri. *Cutaneous and serologic subsets of systemic sclerosis*. J Rheumatol, 1991. **18**(12): p. 1826-32.
172. Parveen, S., S.A. Morshed, and M. Nishioka. *High prevalence of antibodies to recombinant CENP-B in primary biliary cirrhosis: nuclear immunofluorescence patterns and ELISA reactivities*. J Gastroenterol Hepatol, 1995. **10**(4): p. 438-45.
173. Chou, M.J., S.L. Lee, T.Y. Chen, and G.J. Tsay. *Specificity of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis*. Ann Rheum Dis, 1995. **54**(2): p. 148-51.
174. Takada, K., K. Suzuki, M. Matsumoto, M. Okada, T. Nakanishi, H. Horikoshi, T. Higuchi, and F. Ohsuzu. *Clinical characteristics of patients with both anti-U1RNP and anti-centromere antibodies*. Scand J Rheumatol, 2008. **37**(5): p. 360-4.
175. Shoji, I., T. Takagi, and R. Kasukawa. *Anti-centromere antibody and CREST syndrome in patients with primary biliary cirrhosis*. Intern Med, 1992. **31**(12): p. 1348-55.
176. Gao, L., X. Tian, B. Liu, and F. Zhang. *The value of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis*. Clin Exp Med, 2008. **8**(1): p. 9-15.
177. Tan, E.M., G.P. Rodnan, I. Garcia, Y. Moroi, M.J. Fritzler, and C. Peebles. *Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome*. Arthritis Rheum, 1980. **23**(6): p. 617-25.

178. Weiner, E.S., W.C. Earnshaw, J.L. Senecal, B. Bordwell, P. Johnson, and N.F. Rothfield. *Clinical associations of anticentromere antibodies and antibodies to topoisomerase I. A study of 355 patients*. Arthritis Rheum, 1988. **31**(3): p. 378-85.
179. Wigley, F.M., R.A. Wise, R. Miller, B.W. Needleman, and R.J. Spence. *Anticentromere antibody as a predictor of digital ischemic loss in patients with systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 1992. **35**(6): p. 688-93.
180. Hamaguchi, Y. *Autoantibody profiles in systemic sclerosis: predictive value for clinical evaluation and prognosis*. J Dermatol, 2010. **37**(1): p. 42-53.
181. Picillo, U., S. Migliaresi, M.R. Marcialis, A.M. Ferruzzi, and G. Tirri. *Clinical setting of patients with systemic sclerosis by serum autoantibodies*. Clin Rheumatol, 1997. **16**(4): p. 378-83.
182. Caramaschi, P., D. Biasi, T. Manzo, A. Carletto, F. Poli, and L.M. Bambara. *Anticentromere antibody--clinical associations. A study of 44 patients*. Rheumatol Int, 1995. **14**(6): p. 253-5.
183. Kuwana, M., J. Kaburaki, Y. Okano, T. Tojo, and M. Homma. *Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 1994. **37**(1): p. 75-83.
184. Beck, J.S., J.R. Anderson, E.A. Mc, and N.R. Rowell. *Antinucleolar antibodies*. Lancet, 1962. **2**(7256): p. 575-7.
185. Oertelt, S., M. Podda, and M.E. Gershwin, *Antinucleolar antibodies*, in *Autoantibodies*, Y. Shoenfeld, M.E. Gershwin, and P.-L. Meroni, Editors. 2007, Elsevier: Amsterdam ; Oxford. p. xxxiv, 838 p.
186. Brouwer, R., G.J. Pruijn, and W.J. van Venrooij. *The human exosome: an autoantigenic complex of exoribonucleases in myositis and scleroderma*. Arthritis Res, 2001. **3**(2): p. 102-6.
187. Ranque, B., F.J. Authier, A. Berezne, L. Guillevin, and L. Mouthon. *Systemic sclerosis-associated myopathy*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1108**: p. 268-82.
188. Bunn, C.C., C.P. Denton, X. Shi-Wen, C. Knight, and C.M. Black. *Anti-RNA polymerases and other autoantibody specificities in systemic sclerosis*. Br J Rheumatol, 1998. **37**(1): p. 15-20.
189. Yang, J.M., B. Hildebrandt, C. Luderschmidt, and K.M. Pollard. *Human scleroderma sera contain autoantibodies to protein components specific to the U3 small nucleolar RNP complex*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(1): p. 210-7.
190. Aggarwal, R., M. Lucas, N. Fertig, C.V. Oddis, and T.A. Medsger, Jr. *Anti-U3 RNP autoantibodies in systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(4): p. 1112-8.
191. Ceribelli, A., I. Cavazzana, F. Franceschini, P. Airo, A. Tincani, R. Cattaneo, B.A. Pauley, E.K. Chan, and M. Satoh. *Anti-Th/To Are Common Antinucleolar Autoantibodies in Italian Patients with Scleroderma*. J Rheumatol, 2010. **37**(10): p. 2071-5.
192. Kuwana, M., K. Kimura, M. Hirakata, Y. Kawakami, and Y. Ikeda. *Differences in autoantibody response to Th/To between systemic sclerosis and other autoimmune diseases*. Ann Rheum Dis, 2002. **61**(9): p. 842-6.
193. Imai, H., K. Kiyosawa, E.K. Chan, and E.M. Tan. *Autoantibodies in viral hepatitis-related hepatocellular carcinoma*. Intervirology, 1993. **35**(1-4): p. 73-85.
194. Routsias, J.G. and A.G. Tzioufas. *Sjogren's syndrome--study of autoantigens and autoantibodies*. Clin Rev Allergy Immunol, 2007. **32**(3): p. 238-51.

195. Khan, S., A. Alvi, S. Holding, M.L. Kemp, D. Raine, P.C. Dore, and W.A. Sewell. *The clinical significance of antinucleolar antibodies*. J Clin Pathol, 2008. **61**(3): p. 283-6.
196. Muro, Y. *Antinuclear antibodies*. Autoimmunity, 2005. **38**(1): p. 3-9.
197. Will, C.L. and R. Luhrmann. *Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(3): p. 290-301.
198. Zieve, G.W. and P.R. Khusial. *The anti-Sm immune response in autoimmunity and cell biology*. Autoimmun Rev, 2003. **2**(5): p. 235-40.
199. Migliorini, P., C. Baldini, V. Rocchi, and S. Bombardieri. *Anti-Sm and anti-RNP antibodies*. Autoimmunity, 2005. **38**(1): p. 47-54.
200. Tan, E.M., A.S. Cohen, J.F. Fries, A.T. Masi, D.J. McShane, N.F. Rothfield, J.G. Schaller, N. Talal, and R.J. Winchester. *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1982. **25**(11): p. 1271-7.
201. Clotet, B., J. Guardia, C. Pigrau, E. Lience, C. Murcia, R. Pujol, and R. Bacardi. *Incidence and clinical significance of anti-ENA antibodies in systemic lupus erythematosus. Estimation by counterimmunoelectrophoresis*. Scand J Rheumatol, 1984. **13**(1): p. 15-20.
202. ter Borg, E.J., H. Groen, G. Horst, P.C. Limburg, A.A. Wouda, and C.G. Kallenberg. *Clinical associations of antiribonucleoprotein antibodies in patients with systemic lupus erythematosus*. Semin Arthritis Rheum, 1990. **20**(3): p. 164-73.
203. Venables, P.J. *Mixed connective tissue disease*. Lupus, 2006. **15**(3): p. 132-7.
204. Winfield, J.B., C.M. Brunner, and D. Koffler. *Serologic studies in patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system dysfunction*. Arthritis Rheum, 1978. **21**(3): p. 289-94.
205. Janwityanuchit, S., O. Verasertniyom, M. Vanichapuntu, and M. Vatanasuk. *Anti-Sm: its predictive value in systemic lupus erythematosus*. Clin Rheumatol, 1993. **12**(3): p. 350-3.
206. Barada, F.A., Jr., B.S. Andrews, J.S.t. Davis, and R.P. Taylor. *Antibodies to Sm in patients with systemic lupus erythematosus. Correlation of Sm antibody titers with disease activity and other laboratory parameters*. Arthritis Rheum, 1981. **24**(10): p. 1236-44.
207. Gripenberg, M., A.M. Teppo, and C. Friman. *Antibodies to Sm and SS-A demonstrated by enzyme immunoassay. Correlation to clinical manifestations and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus*. Rheumatol Int, 1991. **11**(4-5): p. 209-13.
208. Martinez-Cordero, E., E. Martinez-Miranda, M.C. Negrete-Garcia, A. Padilla, and D.E. Aguilar Leon. *Anti-dsDNA and Sm autoantibodies in systemic lupus erythematosus*. Clin Rheumatol, 1992. **11**(3): p. 341-5.
209. Mimori, T., M. Akizuki, H. Yamagata, S. Inada, S. Yoshida, and M. Homma. *Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap*. J Clin Invest, 1981. **68**(3): p. 611-20.
210. Doherty, A.J. and S.P. Jackson. *DNA repair: how Ku makes ends meet*. Curr Biol, 2001. **11**(22): p. R920-4.
211. Rechsteiner, M. and C.P. Hill. *Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(1): p. 27-33.

212. Reeves, W.H. *Use of monoclonal antibodies for the characterization of novel DNA-binding proteins recognized by human autoimmune sera.* J Exp Med, 1985. **161**(1): p. 18-39.
213. Wang, J., M. Satoh, F. Kabir, M. Shaw, M.A. Domingo, R. Mansoor, K.M. Behney, X. Dong, R.G. Lahita, H.B. Richards, and W.H. Reeves. *Increased prevalence of autoantibodies to ku antigen in African American versus white patients with systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 2001. **44**(10): p. 2367-70.
214. Cavazzana, I., F. Franceschini, C. Vassalini, E. Danieli, M. Quinzanini, P. Airo, and R. Cattaneo. *Clinical and serological features of 35 patients with anti-Ki autoantibodies.* Lupus, 2005. **14**(10): p. 837-41.
215. Zhuang, H., S. Narain, A. Chin Loy, M. Satoh, and W.H. Reeves, *Ku and Ki autoantibodies*, in *Autoantibodies*, Y. Shoenfeld, M.E. Gershwin, and P.-L. Meroni, Editors. 2007, Elsevier: Amsterdam ; Oxford. p. xxxiv, 838 p.
216. Cavazzana, I., A. Ceribelli, M. Quinzanini, M. Scarsi, P. Airo, R. Cattaneo, and F. Franceschini. *Prevalence and clinical associations of anti-Ku antibodies in systemic autoimmune diseases.* Lupus, 2008. **17**(8): p. 727-32.
217. de, T.H.E., M. Riviere, and W. Bernhard. *[Examination by electron microscope of the VX2 tumor of the domestic rabbit derived from the Shope papilloma.]* Bull Assoc Fr Etud Cancer, 1960. **47**: p. 570-84.
218. Worman, H.J. and J.C. Courvalin. *Antinuclear antibodies specific for primary biliary cirrhosis.* Autoimmun Rev, 2003. **2**(4): p. 211-7.
219. Brasch, K. and R.L. Ochs. *Nuclear bodies (NBs): a newly "rediscovered" organelle.* Exp Cell Res, 1992. **202**(2): p. 211-23.
220. Zimmer, A., Q.D. Nguyen, and C. Gerspach. *Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease.* Cell Signal, 2004. **16**(10): p. 1085-104.
221. Sourvinos, G. and R.D. Everett. *Visualization of parental HSV-1 genomes and replication compartments in association with ND10 in live infected cells.* Embo J, 2002. **21**(18): p. 4989-97.
222. Eskiw, C.H. and D.P. Bazett-Jones. *The promyelocytic leukemia nuclear body: sites of activity?* Biochem Cell Biol, 2002. **80**(3): p. 301-10.
223. Negorev, D. and G.G. Maul. *Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot.* Oncogene, 2001. **20**(49): p. 7234-42.
224. Bernardi, R. and P.P. Pandolfi. *Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(12): p. 1006-16.
225. Invernizzi, P., C. Selmi, C. Ranftler, M. Podda, and J. Wesierska-Gadek. *Antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis.* Semin Liver Dis, 2005. **25**(3): p. 298-310.
226. Maul, G.G., D. Negorev, P. Bell, and A.M. Ishov. *Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs.* J Struct Biol, 2000. **129**(2-3): p. 278-87.
227. Szostecki, C., H. Krippner, E. Penner, and F.A. Bautz. *Autoimmune sera recognize a 100 kD nuclear protein antigen (sp-100).* Clin Exp Immunol, 1987. **68**(1): p. 108-16.
228. Dent, A.L., J. Yewdell, F. Puvion-Dutilleul, M.H. Koken, H. de The, and L.M. Staudt. *LYSP100-associated nuclear domains (LANDs): description of a new*

- class of subnuclear structures and their relationship to PML nuclear bodies.* Blood, 1996. **88**(4): p. 1423-6.
229. Pitkanen, J., V. Doucas, T. Sternsdorf, T. Nakajima, S. Aratani, K. Jensen, H. Will, P. Vahamurto, J. Ollila, M. Vihinen, H.S. Scott, S.E. Antonarakis, J. Kudoh, N. Shimizu, K. Krohn, and P. Peterson. *The autoimmune regulator protein has transcriptional transactivating properties and interacts with the common coactivator CREB-binding protein.* J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 16802-9.
  230. Sternsdorf, T., K. Jensen, and H. Will. *Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1.* J Cell Biol, 1997. **139**(7): p. 1621-34.
  231. Seeler, J.S., A. Marchio, D. Sitterlin, C. Transy, and A. Dejean. *Interaction of SP100 with HPI proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7316-21.
  232. Rigopoulou, E.I., E.T. Davies, A. Pares, K. Zachou, C. Liaskos, D.P. Bogdanos, J. Rodes, G.N. Dalekos, and D. Vergani. *Prevalence and clinical significance of isotype specific antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis.* Gut, 2005. **54**(4): p. 528-32.
  233. Rigopoulou, E.I. and G.N. Dalekos. *Anti-sp100 antibodies in primary biliary cirrhosis.* Scand J Gastroenterol, 2004. **39**(4): p. 406-7; author reply 407.
  234. Rigopoulou, E.I. and G.N. Dalekos. *Molecular diagnostics of primary biliary cirrhosis.* Expert Opinion on Medical Diagnostics, 2008. **2**(6): p. 621-634.
  235. Johnson, G.D., E.J. Holborow, and L.E. Glynn. *Antibody to smooth muscle in patients with liver disease.* Lancet, 1965. **2**(7418): p. 878-9.
  236. Farrow, L.J., E.J. Holborow, and W.D. Brighton. *Reaction of human smooth muscle antibody with liver cells.* Nat New Biol, 1971. **232**(2): p. 186-7.
  237. Zachou, K., E. Rigopoulou, and G.N. Dalekos. *Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease.* J Autoimmune Dis, 2004. **1**(1): p. 2.
  238. Zamanou, A., A. Tsirogianni, C. Terzoglou, A. Balafas, I. Economidou, and P. Lymberi. *Anti-smooth muscle antibodies (ASMAs) and anti-cytoskeleton antibodies (ACTAs) in liver diseases: a comparison of classical indirect immunofluorescence with ELISA.* J Clin Lab Anal, 2002. **16**(4): p. 194-201.
  239. Selmi, C., L. Muratori, M. Podda, and F.B. Bianchi, *Smooth muscle antibodies*, in *Autoantibodies*, Y. Shoenfeld, M.E. Gershwin, and P.-L. Meroni, Editors. 2007, Elsevier: Amsterdam ; Oxford. p. xxxiv, 838 p.
  240. Bottazzo, G.F., A. Florin-Christensen, A. Fairfax, G. Swana, D. Doniach, and U. Groeschel-Stewart. *Classification of smooth muscle autoantibodies detected by immunofluorescence.* J Clin Pathol, 1976. **29**(5): p. 403-10.
  241. Toh, B.H. *Smooth muscle autoantibodies and autoantigens.* Clin Exp Immunol, 1979. **38**(3): p. 621-8.
  242. Granito, A., L. Muratori, P. Muratori, G. Pappas, M. Guidi, F. Cassani, U. Volta, A. Ferri, M. Lenzi, and F.B. Bianchi. *Antibodies to filamentous actin (F-actin) in type 1 autoimmune hepatitis.* J Clin Pathol, 2006. **59**(3): p. 280-4.
  243. Kurki, P., A. Miettinen, M. Salaspuro, I. Virtanen, and S. Stenman. *Cytoskeleton antibodies in chronic active hepatitis, primary biliary cirrhosis, and alcoholic liver disease.* Hepatology, 1983. **3**(3): p. 297-302.



244. Muratori, P., L. Muratori, D. Agostinelli, G. Pappas, L. Veronesi, A. Granito, F. Cassani, P. Terlizzi, M. Lenzi, and F.B. Bianchi. *Smooth muscle antibodies and type I autoimmune hepatitis*. Autoimmunity, 2002. **35**(8): p. 497-500.
245. Granito, A., P. Muratori, F. Cassani, G. Pappas, L. Muratori, D. Agostinelli, L. Veronesi, R. Bortolotti, N. Petrolini, F.B. Bianchi, and U. Volta. *Anti-actin IgA antibodies in severe coeliac disease*. Clin Exp Immunol, 2004. **137**(2): p. 386-92.
246. Lopez, S.I., J. Seia, A. Roy, M. Cuarterolo, V. Canero, C. Maria, M. Zelazko, and M. Ciocca. *[Anti-actin antibodies in acute viral hepatitis A in children]*. Acta Gastroenterol Latinoam, 1998. **28**(3): p. 261-4.
247. Gregorio, G.V., K. Choudhuri, Y. Ma, A. Vegnente, G. Mieli-Vergani, and D. Vergani. *Mimicry between the hepatitis B virus DNA polymerase and the antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis B virus infection*. J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1802-10.
248. Cassani, F., M. Cataleta, P. Valentini, P. Muratori, F. Giostra, R. Francesconi, L. Muratori, M. Lenzi, G. Bianchi, D. Zauli, and F.B. Bianchi. *Serum autoantibodies in chronic hepatitis C: comparison with autoimmune hepatitis and impact on the disease profile*. Hepatology, 1997. **26**(3): p. 561-6.
249. Toh, B.H., A. Yildiz, J. Sotelo, O. Osung, E.J. Holborow, F. Kanakoudi, and J.V. Small. *Viral infections and IgM autoantibodies to cytoplasmic intermediate filaments*. Clin Exp Immunol, 1979. **37**(1): p. 76-82.
250. Holborow, E.J., E.H. Hemsted, and S.V. Mead. *Smooth muscle autoantibodies in infectious mononucleosis*. Br Med J, 1973. **3**(5875): p. 323-5.
251. Whitehouse, J.M. and E.J. Holborow. *Smooth muscle antibody in malignant disease*. Br Med J, 1971. **4**(5786): p. 511-3.
252. Shu, S., R.J. Nisengard, W.L. Hale, and E.H. Beutner. *Incidence and titers of antinuclear, antismooth muscle, and other autoantibodies in blood donors*. J Lab Clin Med, 1975. **86**(2): p. 259-65.
253. Teubner, A., H.L. Tillmann, D. Schuppan, G. Gericke, M.P. Manns, and U. Stolzel. *[Prevalence of circulating autoantibodies in healthy individuals]*. Med Klin (Munich), 2002. **97**(11): p. 645-9.
254. Gleeson, P.A. and B.H. Toh. *Molecular targets in pernicious anaemia*. Immunol Today, 1991. **12**(7): p. 233-8.
255. Callaghan, J.M., M.A. Khan, F. Alderuccio, I.R. van Driel, P.A. Gleeson, and B.H. Toh. *Alpha and beta subunits of the gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase are concordantly targeted by parietal cell autoantibodies associated with autoimmune gastritis*. Autoimmunity, 1993. **16**(4): p. 289-95.
256. Toh, B.H., I.R. van Driel, and P.A. Gleeson. *Pernicious anemia*. N Engl J Med, 1997. **337**(20): p. 1441-8.
257. Whittingham, S. and I.R. Mackay. *Autoimmune gastritis: historical antecedents, outstanding discoveries, and unresolved problems*. Int Rev Immunol, 2005. **24**(1-2): p. 1-29.
258. Karlsson, F.A., P. Burman, L. Loof, M. Olsson, A. Scheynius, and S. Mardh. *Enzyme-linked immunosorbent assay of H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, the parietal cell antigen*. Clin Exp Immunol, 1987. **70**(3): p. 604-10.
259. De Block, C.E., I.H. De Leeuw, and L.F. Van Gaal. *Autoimmune gastritis in type I diabetes: a clinically oriented review*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(2): p. 363-71.

260. Strickland, R.G. and I.R. Mackay. *A reappraisal of the nature and significance of chronic atrophic gastritis*. Am J Dig Dis, 1973. **18**(5): p. 426-40.
261. Burman, P., F.A. Karlsson, L. Loof, C.K. Axelsson, P.B. Szesci, and K. Borch. *H<sup>+</sup>,K-ATPase antibodies in autoimmune gastritis: observations on the development of pernicious anemia*. Scand J Gastroenterol, 1991. **26**(2): p. 207-14.
262. Ungar, B., A.E. Stocks, F.I. Martin, S. Whittingham, and I.R. Mackay. *Intrinsic-factor antibody, parietal-cell antibody, and latent pernicious anaemia in diabetes mellitus*. Lancet, 1968. **2**(7565): p. 415-7.
263. De Block, C.E., I.H. De Leeuw, J.J. Bogers, P.A. Pelckmans, M.M. Ieven, E.A. Van Marck, K.L. Van Acker, and L.F. Van Gaal. *Autoimmune gastropathy in type 1 diabetic patients with parietal cell antibodies: histological and clinical findings*. Diabetes Care, 2003. **26**(1): p. 82-8.
264. De Block, C.E., I.H. De Leeuw, K. Decochez, F. Winnock, J. Van Autreve, C.M. Van Campenhout, M. Martin, and F.K. Gorus. *The presence of thyrogastric antibodies in first degree relatives of type 1 diabetic patients is associated with age and proband antibody status*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(9): p. 4358-63.
265. Jassel, S.V., J.E. Ardill, D. Fillmore, K.B. Bamford, F.A. O'Connor, and K.D. Buchanan. *The rise in circulating gastrin with age is due to increases in gastric autoimmunity and Helicobacter pylori infection*. QJM, 1999. **92**(7): p. 373-7.
266. Dickey, W., B.D. Kenny, S.A. McMillan, K.G. Porter, and J.B. McConnell. *Gastric as well as duodenal biopsies may be useful in the investigation of iron deficiency anaemia*. Scand J Gastroenterol, 1997. **32**(5): p. 469-72.
267. Burman, P., O. Kampe, W. Kraaz, L. Loof, A. Smolka, A. Karlsson, and A. Karlsson-Parra. *A study of autoimmune gastritis in the postpartum period and at a 5-year follow-up*. Gastroenterology, 1992. **103**(3): p. 934-42.
268. Vorobjova, T., G. Faller, H.I. Maaros, P. Sipponen, K. Villako, R. Uiho, and T. Kirchner. *Significant increase in antigastric autoantibodies in a long-term follow-up study of H. pylori gastritis*. Virchows Arch, 2000. **437**(1): p. 37-45.
269. Rappel, S., H. Muller, and M. Stolte. *[Active pre-atrophic autoimmune gastritis. A practice-oriented concept for diagnosis and treatment]*. Pathologe, 2001. **22**(1): p. 19-24.
270. Annibale, B., R. Negrini, P. Caruana, E. Lahner, C. Grossi, C. Bordi, and G. Delle Fave. *Two-thirds of atrophic body gastritis patients have evidence of Helicobacter pylori infection*. Helicobacter, 2001. **6**(3): p. 225-33.
271. Ito, M., K. Haruma, S. Kaya, T. Kamada, S. Kim, A. Sasaki, M. Sumii, S. Tanaka, M. Yoshihara, and K. Chayama. *Role of anti-parietal cell antibody in Helicobacter pylori-associated atrophic gastritis: evaluation in a country of high prevalence of atrophic gastritis*. Scand J Gastroenterol, 2002. **37**(3): p. 287-93.
272. Amedei, A., M.P. Bergman, B.J. Appelmelk, A. Azzurri, M. Benagiano, C. Tamburini, R. van der Zee, J.L. Telford, C.M. Vandenbroucke-Grauls, M.M. D'Elis, and G. Del Prete. *Molecular mimicry between Helicobacter pylori antigens and H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> --adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity*. J Exp Med, 2003. **198**(8): p. 1147-56.

273. Presotto, F., B. Sabini, A. Cecchetto, M. Plebani, F. De Lazzari, B. Pedini, and C. Betterle. *Helicobacter pylori* infection and gastric autoimmune diseases: is there a link? *Helicobacter*, 2003. **8**(6): p. 578-84.
274. Jacobson, D.L., S.J. Gange, N.R. Rose, and N.M. Graham. *Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1997. **84**(3): p. 223-43.
275. Fabbri, C., M.F. Jaboli, S. Giovanelli, F. Azzaroli, A. Pezzoli, E. Accogli, S. Liva, G. Nigro, A. Miracolo, D. Festi, A. Colecchia, M. Montagnani, E. Roda, and G. Mazzella. *Gastric autoimmune disorders in patients with chronic hepatitis C before, during and after interferon-alpha therapy*. *World J Gastroenterol*, 2003. **9**(7): p. 1487-90.
276. Gatselis, N.K., S.P. Georgiadou, N. Tassopoulos, K. Zachou, C. Liaskos, A. Hatzakis, and G.N. Dalekos. *Impact of parietal cell autoantibodies and non-organ-specific autoantibodies on the treatment outcome of patients with hepatitis C virus infection: a pilot study*. *World J Gastroenterol*, 2005. **11**(4): p. 482-7.
277. Gatselis, N.K., S.P. Georgiadou, G.K. Koukoulis, N. Tassopoulos, K. Zachou, C. Liaskos, A. Hatzakis, and G.N. Dalekos. *Clinical significance of organ- and non-organ-specific autoantibodies on the response to anti-viral treatment of patients with chronic hepatitis C*. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2006. **24**(11-12): p. 1563-73.
278. Liaskos, C., G.L. Norman, A. Moulas, A. Garagounis, I. Goulis, E.I. Rigopoulou, and G.N. Dalekos. *Prevalence of gastric parietal cell antibodies and intrinsic factor antibodies in primary biliary cirrhosis*. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 2010. **411**(5-6): p. 411-5.
279. van der Woude, F.J., N. Rasmussen, S. Lobatto, A. Wiik, H. Permin, L.A. van Es, M. van der Giessen, G.K. van der Hem, and T.H. The. *Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis*. *Lancet*, 1985. **1**(8426): p. 425-9.
280. van der Geld, Y.M., P.C. Limburg, and C.G. Kallenberg. *Proteinase 3, Wegener's autoantigen: from gene to antigen*. *J Leukoc Biol*, 2001. **69**(2): p. 177-90.
281. Radice, A. and R.A. Sinico. *Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA)*. *Autoimmunity*, 2005. **38**(1): p. 93-103.
282. Hagen, E.C., M.R. Daha, J. Hermans, K. Andrassy, E. Csernok, G. Gaskin, P. Lesavre, J. Ludemann, N. Rasmussen, R.A. Sinico, A. Wiik, and F.J. van der Woude. *Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization*. *Kidney Int*, 1998. **53**(3): p. 743-53.
283. Falk, R.J. and J.C. Jennette. *Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis*. *N Engl J Med*, 1988. **318**(25): p. 1651-7.
284. Bretz, U. and M. Baggiolini. *Biochemical and morphological characterization of azurophil and specific granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes*. *J Cell Biol*, 1974. **63**(1): p. 251-69.
285. Hampton, M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn. *Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing*. *Blood*, 1998. **92**(9): p. 3007-17.

286. Gallicchio, M.C. and J.A. Savage. *Detection of anti-myeloperoxidase and anti-elastase antibodies in vasculitides and infections*. Clin Exp Immunol, 1991. **84**(2): p. 232-7.
287. Gueirard, P., A. Delpech, D. Gilbert, M. Godin, X. Le Loet, and F. Tron. *Anti-myeloperoxidase antibodies: immunological characteristics and clinical associations*. J Autoimmun, 1991. **4**(3): p. 517-27.
288. Gayraud, M., L. Guillevin, P. le Toumelin, P. Cohen, F. Lhote, P. Casassus, and B. Jarrousse. *Long-term followup of polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, and Churg-Strauss syndrome: analysis of four prospective trials including 278 patients*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(3): p. 666-75.
289. Bartunkova, J., V. Tesar, and A. Sediva. *Diagnostic and pathogenetic role of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies*. Clin Immunol, 2003. **106**(2): p. 73-82.
290. Falk, R.J. and J.C. Jennette. *ANCA are pathogenic--oh yes they are!* J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(7): p. 1977-9.
291. Muller Kobold, A.C., C.G. Kallenberg, and J.W. Tervaert. *Leucocyte membrane expression of proteinase 3 correlates with disease activity in patients with Wegener's granulomatosis*. Br J Rheumatol, 1998. **37**(8): p. 901-7.
292. Gaskin, G., C.O. Savage, J.J. Ryan, S. Jones, A.J. Rees, C.M. Lockwood, and C.D. Pusey. *Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and disease activity during long-term follow-up of 70 patients with systemic vasculitis*. Nephrol Dial Transplant, 1991. **6**(10): p. 689-94.
293. Halbwachs-Mecarelli, L., P. Nusbaum, L.H. Noel, D. Reumaux, S. Erlinger, J.P. Grunfeld, and P. Lesavre. *Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis*. Clin Exp Immunol, 1992. **90**(1): p. 79-84.
294. Peen, E., S. Almer, G. Bodemar, B.O. Ryden, C. Sjolín, K. Tejle, and T. Skogh. *Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, and Crohn's disease*. Gut, 1993. **34**(1): p. 56-62.
295. Schmitt, W.H., E. Csernok, B.K. Flesch, S. Hauschild, and W.L. Gross. *Autoantibodies directed against lysozyme: a new target antigen for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA)*. Adv Exp Med Biol, 1993. **336**: p. 267-72.
296. Hauschild, S., W.H. Schmitt, E. Csernok, B.K. Flesch, A. Rautmann, and W.L. Gross. *ANCA in systemic vasculitides, collagen vascular diseases, rheumatic disorders and inflammatory bowel diseases*. Adv Exp Med Biol, 1993. **336**: p. 245-51.
297. Roozendaal, C., M.H. Zhao, G. Horst, C.M. Lockwood, J.H. Kleibeuker, P.C. Limburg, G.F. Nelis, and C.G. Kallenberg. *Catalase and alpha-enolase: two novel granulocyte autoantigens in inflammatory bowel disease (IBD)*. Clin Exp Immunol, 1998. **112**(1): p. 10-6.
298. Stoffel, M.P., E. Csernok, C. Herzberg, T. Johnson, S.F. Carroll, and W.L. Gross. *Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against bactericidal/permeability increasing protein (BPI): a new seromarker for inflammatory bowel disease and associated disorders*. Clin Exp Immunol, 1996. **104**(1): p. 54-9.
299. Cooper, T., J. Savage, L. Nassis, B. Paspaliaris, P. Neeson, J. Neil, K.R. Knight, M. Daskalakis, and J.C. Doery. *Clinical associations and*

- characterisation of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against bactericidal/permeability-increasing protein and azurocidin. Rheumatol Int, 2000. 19(4): p. 129-36.*
300. Nassberger, L., A. Ljungh, G. Schumacher, and B. Kollberg. *beta-Glucuronidase antibodies in ulcerative colitis. Lancet, 1992. 340(8821): p. 734-5.*
  301. Eggena, M., O. Cohavy, M.H. Parseghian, B.A. Hamkalo, D. Clemens, S.R. Targan, L.K. Gordon, and J. Braun. *Identification of histone H1 as a cognate antigen of the ulcerative colitis-associated marker antibody pANCA. J Autoimmun, 2000. 14(1): p. 83-97.*
  302. Sobajima, J., S. Ozaki, H. Uesugi, F. Osakada, M. Inoue, Y. Fukuda, H. Shirakawa, M. Yoshida, A. Rokuhara, H. Imai, K. Kiyosawa, and K. Nakao. *High mobility group (HMG) non-histone chromosomal proteins HMGI and HMGI2 are significant target antigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune hepatitis. Gut, 1999. 44(6): p. 867-73.*
  303. Terjung, B., V. Herzog, H.J. Worman, I. Gestmann, C. Bauer, T. Sauerbruch, and U. Spengler. *Atypical antineutrophil cytoplasmic antibodies with perinuclear fluorescence in chronic inflammatory bowel diseases and hepatobiliary disorders colocalize with nuclear lamina proteins. Hepatology, 1998. 28(2): p. 332-40.*
  304. Rump, J.A., J. Scholmerich, V. Gross, M. Roth, R. Helfesrieder, A. Rautmann, J. Ludemann, W.L. Gross, and H.H. Peter. *A new type of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA) in active ulcerative colitis but not in Crohn's disease. Immunobiology, 1990. 181(4-5): p. 406-13.*
  305. Lesavre, P., L.H. Noel, S. Gayno, P. Nusbaum, D. Reumaux, S. Erlinger, J.P. Grunfeld, and L. Halbwachs-Mecarelli. *Atypical autoantigen targets of perinuclear antineutrophil cytoplasm antibodies (P-ANCA): specificity and clinical associations. J Autoimmun, 1993. 6(2): p. 185-95.*
  306. Terjung, B., H.J. Worman, V. Herzog, T. Sauerbruch, and U. Spengler. *Differentiation of antineutrophil nuclear antibodies in inflammatory bowel and autoimmune liver diseases from antineutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) using immunofluorescence microscopy. Clin Exp Immunol, 2001. 126(1): p. 37-46.*
  307. De Clerck, L.S., J.F. Van Offel, W.A. Smolders, F.A. Empsten, C.H. Bridts, N. Bourgeois, E. Van Marck, U. Timmermans, and W.J. Stevens. *Pitfalls with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). Clin Rheumatol, 1989. 8(4): p. 512-6.*
  308. Davenport, A. *"False positive" perinuclear and cytoplasmic anti-neutrophil cytoplasmic antibody results leading to misdiagnosis of Wegener's granulomatosis and/or microscopic polyarteritis. Clin Nephrol, 1992. 37(3): p. 124-30.*
  309. Dalekos, G.N. and E.V. Tsianos. *Anti-neutrophil antibodies in chronic viral hepatitis. J Hepatol, 1994. 20(4): p. 561.*
  310. Targan, S.R., C. Landers, A. Vidrich, and A.J. Czaja. *High-titer antineutrophil cytoplasmic antibodies in type-1 autoimmune hepatitis. Gastroenterology, 1995. 108(4): p. 1159-66.*
  311. Vidrich, A., J. Lee, E. James, L. Cobb, and S. Targan. *Segregation of pANCA antigenic recognition by DNase treatment of neutrophils: ulcerative colitis, type 1 autoimmune hepatitis, and primary sclerosing cholangitis. J Clin Immunol, 1995. 15(6): p. 293-9.*

312. Savige, J.A., M.C. Gallicchio, A. Stockman, T.J. Cunningham, M.J. Rowley, T. Georgiou, and D. Davies. *Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in rheumatoid arthritis*. Clin Exp Immunol, 1991. **86**(1): p. 92-8.
313. Bakkaloglu, A., S. Ozen, U. Saatci, S. Erguven, R. Topaloglu, Y. Bassoy, and N. Besbas. *Antineutrophil cytoplasmic antibodies in juvenile chronic arthritis*. Clin Rheumatol, 1999. **18**(4): p. 304-7.
314. Zhao, M.H., D.R. Jayne, L.G. Ardiles, F. Culley, M.E. Hodson, and C.M. Lockwood. *Autoantibodies against bactericidal/permeability-increasing protein in patients with cystic fibrosis*. QJM, 1996. **89**(4): p. 259-65.
315. Dalekos, G.N., M.N. Manoussakis, A.C. Goussia, E.V. Tsianos, and H.M. Moutsopoulos. *Soluble interleukin-2 receptors, antineutrophil cytoplasmic antibodies, and other autoantibodies in patients with ulcerative colitis*. Gut, 1993. **34**(5): p. 658-64.
316. Vasilias, E.A., S.E. Plevy, C.J. Landers, S.W. Binder, D.M. Ferguson, H. Yang, J.I. Rotter, A. Vidrich, and S.R. Targan. *Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup*. Gastroenterology, 1996. **110**(6): p. 1810-9.
317. Yahya, T.M., S. Benedict, A. Shalabi, and R. Bayoumi. *Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) in malaria is directed against cathepsin G*. Clin Exp Immunol, 1997. **110**(1): p. 41-4.
318. Pudifin, D.J., J. Duursma, V. Gathiram, and T.F. Jackson. *Invasive amoebiasis is associated with the development of anti-neutrophil cytoplasmic antibody*. Clin Exp Immunol, 1994. **97**(1): p. 48-51.
319. Klaassen, R.J., R. Goldschmeding, K.M. Dolman, A.B. Vlekke, H.M. Weigel, J.K. Eeftink Schattenkerk, J.W. Mulder, M.L. Westedt, and A.E. von dem Borne. *Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies in patients with symptomatic HIV infection*. Clin Exp Immunol, 1992. **87**(1): p. 24-30.
320. Choi, H.K., P. Lamprecht, J.L. Niles, W.L. Gross, and P.A. Merkel. *Subacute bacterial endocarditis with positive cytoplasmic antineutrophil cytoplasmic antibodies and anti-proteinase 3 antibodies*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(1): p. 226-31.
321. Nassberger, L., A.G. Sjoholm, H. Jonsson, G. Sturfelt, and A. Akesson. *Autoantibodies against neutrophil cytoplasm components in systemic lupus erythematosus and in hydralazine-induced lupus*. Clin Exp Immunol, 1990. **81**(3): p. 380-3.
322. Spronk, P.E., H. Bootsma, G. Horst, M.G. Huitema, P.C. Limburg, J.W. Tervaert, and C.G. Kallenberg. *Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus*. Br J Rheumatol, 1996. **35**(7): p. 625-31.
323. Boberg, K.M., E. Aadland, J. Jahnsen, N. Raknerud, M. Stiris, and H. Bell. *Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population*. Scand J Gastroenterol, 1998. **33**(1): p. 99-103.
324. Feld, J.J. and E.J. Heathcote. *Epidemiology of autoimmune liver disease*. J Gastroenterol Hepatol, 2003. **18**(10): p. 1118-28.
325. Strassburg, C.P. and M.P. Manns. *Transition of care between paediatric and adult gastroenterology. Autoimmune hepatitis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2003. **17**(2): p. 291-306.
326. Dalekos, G., E. Makri, K. Zachou, C. Liaskos, A. Pliaka, G. Papadamou, and K. Patsiaoura. *Clinical, laboratory and demographic characteristics of*

- autoimmune hepatitis type 1 (AIH-1) in Central Greece*. Hepatology, 2001. **34**(Part 2): p. 528A.
327. Obermayer-Straub, P., C.P. Strassburg, and M.P. Manns. *Autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 2000. **32**(1 Suppl): p. 181-97.
  328. van den Berg, A.P. *Autoimmune hepatitis: pathogenesis, diagnosis and treatment*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1998. **225**: p. 66-9.
  329. Alvarez, F., P.A. Berg, F.B. Bianchi, L. Bianchi, A.K. Burroughs, E.L. Cancado, R.W. Chapman, W.G. Cooksley, A.J. Czaja, V.J. Desmet, P.T. Donaldson, A.L. Eddleston, L. Fainboim, J. Heathcote, J.C. Homberg, J.H. Hoofnagle, S. Kakumu, E.L. Krawitt, I.R. Mackay, R.N. MacSween, W.C. Maddrey, M.P. Manns, I.G. McFarlane, K.H. Meyer zum Buschenfelde, M. Zeniya, and et al. *International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 1999. **31**(5): p. 929-38.
  330. Omagari, K., H. Kinoshita, Y. Kato, K. Nakata, T. Kanematsu, Y. Kusumoto, I. Mori, R. Furukawa, H. Tanioka, H. Tajima, M. Koga, M. Yano, and S. Kohno. *Clinical features of 89 patients with autoimmune hepatitis in Nagasaki Prefecture, Japan*. J Gastroenterol, 1999. **34**(2): p. 221-6.
  331. Rigopoulou, E.I., G. Dalekos, and D.P. Bogdanos. *How common are connective tissue disorders in patients with autoimmune hepatitis?* Seminars in arthritis and rheumatism, 2007. **36**(5): p. 332; author reply 333.
  332. Manns, M.P. and C.P. Strassburg. *Autoimmune hepatitis: clinical challenges*. Gastroenterology, 2001. **120**(6): p. 1502-17.
  333. Vergani, D. and G. Mieli-Vergani. *Autoimmune hepatitis*. Autoimmun Rev, 2003. **2**(5): p. 241-7.
  334. Czaja, A.J. and M.P. Manns. *The validity and importance of subtypes in autoimmune hepatitis: a point of view*. Am J Gastroenterol, 1995. **90**(8): p. 1206-11.
  335. Desmet, V.J., M. Gerber, J.H. Hoofnagle, M. Manns, and P.J. Scheuer. *Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging*. Hepatology, 1994. **19**(6): p. 1513-20.
  336. Al-Khalidi, J.A. and A.J. Czaja. *Current concepts in the diagnosis, pathogenesis, and treatment of autoimmune hepatitis*. Mayo Clin Proc, 2001. **76**(12): p. 1237-52.
  337. Wies, I., S. Brunner, J. Henninger, J. Herkel, S. Kanzler, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and A.W. Lohse. *Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis*. Lancet, 2000. **355**(9214): p. 1510-5.
  338. Kanzler, S., C. Weidemann, G. Gerken, H.F. Lohr, P.R. Galle, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and A.W. Lohse. *Clinical significance of autoantibodies to soluble liver antigen in autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 1999. **31**(4): p. 635-40.
  339. Ballot, E., J.C. Homberg, and C. Johanet. *Antibodies to soluble liver antigen: an additional marker in type 1 auto-immune hepatitis*. J Hepatol, 2000. **33**(2): p. 208-15.
  340. Obermayer-Straub, P., C.P. Strassburg, and M.P. Manns. *Target proteins in human autoimmunity: cytochromes P450 and UDP- glucuronosyltransferases*. Can J Gastroenterol, 2000. **14**(5): p. 429-39.
  341. Consortium, T.F.-A. *An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains*. Nat Genet, 1997. **17**(4): p. 399-403.

342. Obermayer-Straub, P. and M.P. Manns. *Autoimmune polyglandular syndromes*. Baillieres Clin Gastroenterol, 1998. **12**(2): p. 293-315.
343. Νταλέκος, Γ.Ν. *Μοριακά ταυτοποιημένα αυτοαντιγόνα-στόχοι στη διάγνωση, διαφορική διάγνωση και μελέτη της αιτιοπαθογένειας των αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος*. Ιατρική, 1999. **75**: p. 408-418.
344. Krawitt, E.L. *Autoimmune hepatitis*. N Engl J Med, 1996. **334**(14): p. 897-903.
345. Manns, M.P. and P. Obermayer-Straub. *Cytochromes P450 and uridine triphosphate-glucuronosyltransferases: model autoantigens to study drug-induced, virus-induced, and autoimmune liver disease*. Hepatology, 1997. **26**(4): p. 1054-66.
346. Dalekos, G.N., H. Wedemeyer, P. Obermayer-Straub, A. Kayser, A. Barut, H. Frank, and M.P. Manns. *Epitope mapping of cytochrome P4502D6 autoantigen in patients with chronic hepatitis C during alpha-interferon treatment*. J Hepatol, 1999. **30**(3): p. 366-75.
347. Ruiz-Moreno, M., M.J. Rua, V. Carreno, J.A. Quiroga, M. Manns, and K.H. Meyer zum Buschenfelde. *Autoimmune chronic hepatitis type 2 manifested during interferon therapy in children*. J Hepatol, 1991. **12**(2): p. 265-6.
348. Todros, L., G. Saracco, M. Durazzo, M.L. Abate, G. Touscoz, L. Scaglione, G. Verme, and M. Rizzetto. *Efficacy and safety of interferon alfa therapy in chronic hepatitis C with autoantibodies to liver-kidney microsomes*. Hepatology, 1995. **22**(5): p. 1374-8.
349. Vergani, D. and G. Mieli-Vergani. *Type II autoimmune hepatitis: the conundrum of cytochrome P450IID6*. Clin Exp Immunol, 1993. **92**(3): p. 367-8.
350. Muratori, L., M. Lenzi, M. Cataleta, F. Giostra, F. Cassani, G. Ballardini, D. Zauli, and F.B. Bianchi. *Interferon therapy in liver/kidney microsomal antibody type I-positive patients with chronic hepatitis C*. J Hepatol, 1994. **21**(2): p. 199-203.
351. Pessayre, D., *Toxic and immune mechanisms leading to acute and subacute drug induced liver injury*, in *Progress in hepatology*, J. Miguet, Editor 1993, John Libbey Eurotext: Paris. p. 23-39.
352. Λιάσκος, Χ. and Γ.Ν. Νταλέκος. *Νεότερα επιδημιολογικά και κλινικοεργαστηριακά δεδομένα για τη διάγνωση και τη διαφορική διάγνωση της αυτοάνοσης ηπατίτιδας*. Ιατρική, 2000: p. 233-243.
353. Czaja, A.J., M. Nishioka, S.A. Morshed, and T. Hachiya. *Patterns of nuclear immunofluorescence and reactivities to recombinant nuclear antigens in autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 1994. **107**(1): p. 200-7.
354. Czaja, A.J., F. Cassani, M. Cataleta, P. Valentini, and F.B. Bianchi. *Antinuclear antibodies and patterns of nuclear immunofluorescence in type I autoimmune hepatitis*. Dig Dis Sci, 1997. **42**(8): p. 1688-96.
355. Parveen, S., S.A. Morshed, K. Arima, M. Nishioka, A.J. Czaja, W.C. Chow, and H.S. Ng. *Antibodies to Ro/La, Cenp-B, and snRNPs antigens in autoimmune hepatitis of North America versus Asia: patterns of immunofluorescence, ELISA reactivities, and HLA association*. Dig Dis Sci, 1998. **43**(6): p. 1322-31.
356. Czaja, A.J., S.A. Morshed, S. Parveen, and M. Nishioka. *Antibodies to single-stranded and double-stranded DNA in antinuclear antibody-positive type I-autoimmune hepatitis*. Hepatology, 1997. **26**(3): p. 567-72.



357. Chen, M., M. Shirai, A.J. Czaja, K. Kurokohchi, T. Arichi, K. Arima, T. Kodama, and M. Nishioka. *Characterization of anti-histone antibodies in patients with type I autoimmune hepatitis*. J Gastroenterol Hepatol, 1998. **13**(5): p. 483-9.
358. Czaja, A.J. and H.A. Homburger. *Autoantibodies in liver disease*. Gastroenterology, 2001. **120**(1): p. 239-49.
359. Strassburg, C.P., B. Alex, F. Zindy, G. Gerken, B. Luttig, K.H. Meyer zum Buschenfelde, C. Brechot, and M.P. Manns. *Identification of cyclin A as a molecular target of antinuclear antibodies (ANA) in hepatic and non-hepatic autoimmune diseases*. J Hepatol, 1996. **25**(6): p. 859-66.
360. Czaja, A.J., F. Cassani, M. Cataleta, P. Valentini, and F.B. Bianchi. *Frequency and significance of antibodies to actin in type I autoimmune hepatitis*. Hepatology, 1996. **24**(5): p. 1068-73.
361. Dalekos, G.N., K. Zachou, C. Liaskos, and N. Gatselis. *Autoantibodies and defined target autoantigens in autoimmune hepatitis: an overview*. Eur J Intern Med, 2002. **13**(5): p. 293-303.
362. Dalekos, G.N., M.N. Manoussakis, E. Zervou, E.V. Tsianos, and H.M. Moutsopoulos. *Immunologic and viral markers in the circulation of anti-HIV negative heroin addicts*. Eur J Clin Invest, 1993. **23**(4): p. 219-25.
363. Dalekos, G.N., M.N. Manoussakis, and M. Merkouropoulos. *Autoimmunity and cellular activation before and after-interferon administration in patients with chronic viral hepatitis. A preliminary study*. Hel J Gastroenterol, 1993. **6**: p. 166-171.
364. Czaja, A.J. *Behavior and significance of autoantibodies in type I autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 1999. **30**(3): p. 394-401.
365. Oikonomou, K.G., K. Zachou, and G.N. Dalekos. *Alpha-actinin: a multidisciplinary protein with important role in B-cell driven autoimmunity*. Autoimmunity reviews, 2011. **10**(7): p. 389-96.
366. Gueguen, P., G. Dalekos, J.B. Nouisbaum, K. Zachou, C. Putterman, P. Youinou, and Y. Renaudineau. *Double reactivity against actin and alpha-actinin defines a severe form of autoimmune hepatitis type I*. J Clin Immunol, 2006. **26**(6): p. 495-505.
367. Zachou, K., Y. Renaudineau, A. Chauveau, P. Youinou, and G. Dalekos. *Anti-alpha-actinin antibodies are independent predictors of response to treatment in autoimmune hepatitis type I*. J Hepatol, 2010. **52**(Suppl1): p. S422-3.
368. Zauli, D., S. Ghetti, A. Grassi, C. Descovich, F. Cassani, G. Ballardini, L. Muratori, and F.B. Bianchi. *Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in type I and 2 autoimmune hepatitis*. Hepatology, 1997. **25**(5): p. 1105-7.
369. Roozendaal, C., M.A. de Jong, A.P. van den Berg, R.T. van Wijk, P.C. Limburg, and C.G. Kallenberg. *Clinical significance of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune liver diseases*. J Hepatol, 2000. **32**(5): p. 734-41.
370. Roozendaal, C. and C.G. Kallenberg. *Anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies (ANCA) in autoimmune liver diseases*. Hepatogastroenterology, 1999. **46**(30): p. 3034-40.
371. Lindgren, S., S. Nilsson, L. Nassberger, H. Verbaan, and J. Wieslander. *Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with chronic liver diseases: prevalence, antigen specificity and predictive value for diagnosis of autoimmune liver disease. Swedish Internal Medicine Liver Club (SILK)*. J Gastroenterol Hepatol, 2000. **15**(4): p. 437-42.

372. Mulder, A.H., G. Horst, E.B. Haagsma, P.C. Limburg, J.H. Kleibeuker, and C.G. Kallenberg. *Prevalence and characterization of neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune liver diseases*. Hepatology, 1993. **17**(3): p. 411-7.
373. Stockert, R.J. *The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression*. Physiol Rev, 1995. **75**(3): p. 591-609.
374. Treichel, U., B.M. McFarlane, T. Seki, E.L. Krawitt, N. Alessi, F. Stickel, I.G. McFarlane, K. Kiyosawa, S. Furuta, M.A. Freni, and et al. *Demographics of anti-asialoglycoprotein receptor autoantibodies in autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 1994. **107**(3): p. 799-804.
375. Bedlow, A.J., P.T. Donaldson, B.M. McFarlane, M. Lombard, I.G. McFarlane, and R. Williams. *Autoreactivity to hepatocellular antigens in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis*. J Clin Lab Immunol, 1989. **30**(3): p. 103-9.
376. Manns, M., G. Gerken, A. Kyriatsoulis, M. Staritz, and K.H. Meyer zum Buschenfelde. *Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen*. Lancet, 1987. **1**(8528): p. 292-4.
377. Stechemesser, E., R. Klein, and P.A. Berg. *Characterization and clinical relevance of liver-pancreas antibodies in autoimmune hepatitis*. Hepatology, 1993. **18**(1): p. 1-9.
378. Rigopoulou, E.I., M. Mytilinaiou, O. Romanidou, C. Liaskos, and G.N. Dalekos. *Autoimmune hepatitis-specific antibodies against soluble liver antigen and liver cytosol type 1 in patients with chronic viral hepatitis*. Journal of autoimmune diseases, 2007. **4**: p. 2.
379. Ma, Y., M. Okamoto, M.G. Thomas, D.P. Bogdanos, A.R. Lopes, B. Portmann, J. Underhill, R. Durr, G. Mieli-Vergani, and D. Vergani. *Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease*. Hepatology, 2002. **35**(3): p. 658-64.
380. Manns, M.P. *Antibodies to soluble liver antigen: specific marker of autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 2000. **33**(2): p. 326-8.
381. Czaja, A.J., P.T. Donaldson, and A.W. Lohse. *Antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas and HLA risk factors for type 1 autoimmune hepatitis*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(2): p. 413-9.
382. Wachter, B., A. Kyriatsoulis, A.W. Lohse, G. Gerken, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and M. Manns. *Characterization of liver cytokeratin as a major target antigen of anti-SLA antibodies*. J Hepatol, 1990. **11**(2): p. 232-9.
383. Wesierska-Gadek, J., R. Grimm, E. Hitchman, and E. Penner. *Members of the glutathione S-transferase gene family are antigens in autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 1998. **114**(2): p. 329-35.
384. Costa, M., J.L. Rodriguez-Sanchez, A.J. Czaja, and C. Gelpi. *Isolation and characterization of cDNA encoding the antigenic protein of the human tRNP(Ser)Sec complex recognized by autoantibodies from patients with type-1 autoimmune hepatitis*. Clin Exp Immunol, 2000. **121**(2): p. 364-74.
385. Volkmann, M., D. Luithle, H. Zentgraf, M. Schnolzer, S. Fiedler, H. Heid, A. Schulze-Bergkamen, C.P. Strassburg, S.G. Gehrke, and M.P. Manns. *SLA/LP/tRNP((Ser)Sec) antigen in autoimmune hepatitis: identification of the native protein in human hepatic cell extract*. J Autoimmun, 2010. **34**(1): p. 59-65.
386. Liaskos, C., D.P. Bogdanos, E. Rigopoulou, G.L. Norman, Z. Shums, T. Al-Chalabi, E.L. Krawitt, G. Mieli-Vergani, A.J. Czaja, D. Vergani, and G.

- Dalekos. *Antibody responses specific for soluble liver antigen co-occur with Ro52 autoantibodies in patients with autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 2009. **Suppl. 1**: p. S250.
387. Rizzetto, M., G. Swana, and D. Doniach. *Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders*. Clin Exp Immunol, 1973. **15**(3): p. 331-44.
  388. Homberg, J.C., N. Abuaf, O. Bernard, S. Islam, F. Alvarez, S.H. Khalil, R. Poupon, F. Darnis, V.G. Levy, P. Gripon, and et al. *Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type I: a second type of "autoimmune" hepatitis*. Hepatology, 1987. **7**(6): p. 1333-9.
  389. Bogdanos, D.P. and G.N. Dalekos. *Enzymes as target antigens of liver-specific autoimmunity: the case of cytochromes P450s*. Current medicinal chemistry, 2008. **15**(22): p. 2285-92.
  390. Dalekos, G.N., E. Makri, S. Loges, P. Obermayer-Straub, K. Zachou, T. Tsikrikas, E. Schmidt, G. Papadamou, and M.P. Manns. *Increased incidence of anti-LKM autoantibodies in a consecutive cohort of hepatitis C patients from central Greece*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2002. **14**(1): p. 35-42.
  391. Manns, M.P., E.F. Johnson, K.J. Griffin, E.M. Tan, and K.F. Sullivan. *Major antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P450db1*. J Clin Invest, 1989. **83**(3): p. 1066-72.
  392. Gueguen, M., A.M. Yamamoto, O. Bernard, and F. Alvarez. *Anti-liver-kidney microsome antibody type I recognizes human cytochrome P450 db1*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **159**(2): p. 542-7.
  393. Zanger, U.M., H.P. Hauri, J. Loeper, J.C. Homberg, and U.A. Meyer. *Antibodies against human cytochrome P-450db1 in autoimmune hepatitis type II*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(21): p. 8256-60.
  394. Durazzo, M., T. Philipp, F.N. Van Pelt, B. Luttig, E. Borghesio, G. Michel, E. Schmidt, S. Loges, M. Rizzetto, and M.P. Manns. *Heterogeneity of liver-kidney microsomal autoantibodies in chronic hepatitis C and D virus infection*. Gastroenterology, 1995. **108**(2): p. 455-62.
  395. Philipp, T., M. Durazzo, C. Trautwein, B. Alex, P. Straub, J.G. Lamb, E.F. Johnson, R.H. Tukey, and M.P. Manns. *Recognition of uridine diphosphate glucuronosyl transferases by LKM-3 antibodies in chronic hepatitis D*. Lancet, 1994. **344**(8922): p. 578-81.
  396. Philipp, T., P. Straub, M. Durazzo, R.H. Tukey, and M.P. Manns. *Molecular analysis of autoantigens in hepatitis D*. J Hepatol, 1995. **22**(1 Suppl): p. 132-5.
  397. Strassburg, C.P., P. Obermayer-Straub, B. Alex, M. Durazzo, M. Rizzetto, R.H. Tukey, and M.P. Manns. *Autoantibodies against glucuronosyltransferases differ between viral hepatitis and autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 1996. **111**(6): p. 1576-86.
  398. Crivelli, O., C. Lavarini, E. Chiaberge, A. Amoroso, P. Farci, F. Negro, and M. Rizzetto. *Microsomal autoantibodies in chronic infection with the HBsAg associated delta (delta) agent*. Clin Exp Immunol, 1983. **54**(1): p. 232-8.
  399. Manns, M.P., K.J. Griffin, K.F. Sullivan, and E.F. Johnson. *LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase*. J Clin Invest, 1991. **88**(4): p. 1370-8.
  400. Duclos-Vallee, J.C., O. Hajoui, A.M. Yamamoto, E. Jacz-Aigrain, and F. Alvarez. *Conformational epitopes on CYP2D6 are recognized by liver/kidney microsomal antibodies*. Gastroenterology, 1995. **108**(2): p. 470-6.

401. Muratori, L., M. Lenzi, Y. Ma, M. Cataleta, G. Mieli-Vergani, D. Vergani, and F.B. Bianchi. *Heterogeneity of liver/kidney microsomal antibody type 1 in autoimmune hepatitis and hepatitis C virus related liver disease*. Gut, 1995. **37**(3): p. 406-12.
402. Klein, R., U.M. Zanger, T. Berg, U. Hopf, and P.A. Berg. *Overlapping but distinct specificities of anti-liver-kidney microsome antibodies in autoimmune hepatitis type II and hepatitis C revealed by recombinant native CYP2D6 and novel peptide epitopes*. Clin Exp Immunol, 1999. **118**(2): p. 290-7.
403. Herzog, D., A.M. Yamamoto, P. Jara, G. Maggiore, J. Sarles, and F. Alvarez. *Sera of children with hepatitis C infection and anti-liver-kidney microsome-1 antibodies recognize different CYP2D6 epitopes than adults with LKM+/HCV+ sera*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1999. **29**(5): p. 551-5.
404. Yamamoto, A.M., D. Cresteil, O. Boniface, F.F. Clerc, and F. Alvarez. *Identification and analysis of cytochrome P450IID6 antigenic sites recognized by anti-liver-kidney microsome type-1 antibodies (LKM1)*. Eur J Immunol, 1993. **23**(5): p. 1105-11.
405. Bogdanos, D.P., K. Choudhuri, and D. Vergani. *Molecular mimicry and autoimmune liver disease: virtuous intentions, malign consequences*. Liver, 2001. **21**(4): p. 225-32.
406. Yamamoto, A.M., C. Johanet, J.C. Duclos-Vallee, F.A. Bustarret, F. Alvarez, J.C. Homberg, and J.F. Bach. *A new approach to cytochrome CYP2D6 antibody detection in autoimmune hepatitis type-2 (AIH-2) and chronic hepatitis C virus (HCV) infection: a sensitive and quantitative radioligand assay*. Clin Exp Immunol, 1997. **108**(3): p. 396-400.
407. Ma, Y., G. Gregorio, J. Gaken, L. Muratori, F.B. Bianchi, G. Mieli-Vergani, and D. Vergani. *Establishment of a novel radioligand assay using eukaryotically expressed cytochrome P4502D6 for the measurement of liver kidney microsomal type 1 antibody in patients with autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection*. J Hepatol, 1997. **26**(6): p. 1396-402.
408. Loeper, J., A. Le Berre, and D. Pompon. *Topology inversion of CYP2D6 in the endoplasmic reticulum is not required for plasma membrane transport*. Mol Pharmacol, 1998. **53**(3): p. 408-14.
409. Loeper, J., B. Louerat-Oriou, C. Duport, and D. Pompon. *Yeast expressed cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) exposed on the external face of plasma membrane is functionally competent*. Mol Pharmacol, 1998. **54**(1): p. 8-13.
410. Muratori, L., M. Parola, A. Ripalti, G. Robino, P. Muratori, G. Bellomo, R. Carini, M. Lenzi, M.P. Landini, E. Albano, and F.B. Bianchi. *Liver/kidney microsomal antibody type 1 targets CYP2D6 on hepatocyte plasma membrane*. Gut, 2000. **46**(4): p. 553-61.
411. Lohse, A.W., P. Obermayer-Straub, G. Gerken, S. Brunner, U. Altes, H.P. Dienes, M.P. Manns, and K.H. Meyer zum Buschenfelde. *Development of cytochrome P450 2D6-specific LKM-autoantibodies following liver transplantation for Wilson's disease -- possible association with a steroid-resistant transplant rejection episode*. J Hepatol, 1999. **31**(1): p. 149-55.
412. Lapierre, P., O. Hajoui, J.C. Homberg, and F. Alvarez. *Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 1999. **116**(3): p. 643-9.
413. Beland, K., P. Lapierre, G. Marceau, and F. Alvarez. *Anti-LC1 autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection*. J Autoimmun, 2004. **22**(2): p. 159-66.

414. Lenzi, M., P. Manotti, L. Muratori, M. Cataleta, G. Ballardini, F. Cassani, and F.B. Bianchi. *Liver cytosolic I antigen-antibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection*. Gut, 1995. **36**(5): p. 749-54.
415. Muratori, L., M. Cataleta, P. Muratori, M. Lenzi, and F.B. Bianchi. *Liver/kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2 autoimmune hepatitis*. Gut, 1998. **42**(5): p. 721-6.
416. Lankisch, T.O., E. Jaeckel, and C.P. Strassburg. *The autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy or autoimmune polyglandular syndrome type 1*. Semin Liver Dis, 2009. **29**(3): p. 307-14.
417. Ahonen, P., S. Myllarniemi, I. Sipila, and J. Perheentupa. *Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients*. N Engl J Med, 1990. **322**(26): p. 1829-36.
418. *An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains*. Nat Genet, 1997. **17**(4): p. 399-403.
419. Heino, M., P. Peterson, J. Kudoh, K. Nagamine, A. Lagerstedt, V. Ovod, A. Ranki, I. Rantala, M. Nieminen, J. Tuukkanen, H.S. Scott, S.E. Antonarakis, N. Shimizu, and K. Krohn. *Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(3): p. 821-5.
420. Clemente, M.G., A. Meloni, P. Obermayer-Straub, F. Frau, M.P. Manns, and S. De Virgiliis. *Two cytochromes P450 are major hepatocellular autoantigens in autoimmune polyglandular syndrome type 1*. Gastroenterology, 1998. **114**(2): p. 324-8.
421. Clemente, M.G., P. Obermayer-Straub, A. Meloni, C.P. Strassburg, V. Arangino, R.H. Tukey, S. De Virgiliis, and M.P. Manns. *Cytochrome P450 1A2 is a hepatic autoantigen in autoimmune polyglandular syndrome type 1*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(5): p. 1353-61.
422. Obermayer-Straub, P., J. Perheentupa, S. Braun, A. Kayser, A. Barut, S. Loges, A. Harms, G. Dalekos, C.P. Strassburg, and M.P. Manns. *Hepatic autoantigens in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*. Gastroenterology, 2001. **121**(3): p. 668-77.
423. Dalekos, G.N., P. Obermayer-Straub, M. Bartels, T. Maeda, A. Kayser, S. Braun, S. Loges, E. Schmidt, M.E. Gershwin, and M.P. Manns. *Cytochrome P450 2A6: a new hepatic autoantigen in patients with chronic hepatitis C virus infection*. J Hepatol, 2003. **39**(5): p. 800-6.
424. Bourdi, M., D. Larrey, J. Nataf, J. Bernuau, D. Pessayre, M. Iwasaki, F.P. Guengerich, and P.H. Beaune. *Anti-liver endoplasmic reticulum autoantibodies are directed against human cytochrome P-450IA2. A specific marker of dihydralazine-induced hepatitis*. J Clin Invest, 1990. **85**(6): p. 1967-73.
425. Donaldson, P.T., D.G. Doherty, K.M. Hayllar, I.G. McFarlane, P.J. Johnson, and R. Williams. *Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors*. Hepatology, 1991. **13**(4): p. 701-6.
426. Czaja, A.J., M.D. Strettell, L.J. Thomson, P.J. Santrach, S.B. Moore, P.T. Donaldson, and R. Williams. *Associations between alleles of the major histocompatibility complex and type 1 autoimmune hepatitis*. Hepatology, 1997. **25**(2): p. 317-23.

427. Czaja, A.J. and P.T. Donaldson. *Genetic susceptibilities for immune expression and liver cell injury in autoimmune hepatitis*. Immunol Rev, 2000. **174**: p. 250-9.
428. Seki, T., K. Kiyosawa, H. Inoko, and M. Ota. *Association of autoimmune hepatitis with HLA-Bw54 and DR4 in Japanese patients*. Hepatology, 1990. **12**(6): p. 1300-4.
429. Seki, T., M. Ota, S. Furuta, H. Fukushima, T. Kondo, K. Hino, N. Mizuki, A. Ando, K. Tsuji, H. Inoko, and et al. *HLA class II molecules and autoimmune hepatitis susceptibility in Japanese patients*. Gastroenterology, 1992. **103**(3): p. 1041-7.
430. Fainboim, L., Y. Marcos, M. Pando, M. Capucchio, G.B. Reyes, C. Galoppo, I. Badia, G. Remondino, M. Ciocca, M. Ramonet, and et al. *Chronic active autoimmune hepatitis in children. Strong association with a particular HLA-DR6 (DRB1\*1301) haplotype*. Hum Immunol, 1994. **41**(2): p. 146-50.
431. Vazquez-Garcia, M.N., C. Alaez, A. Olivo, H. Debaz, E. Perez-Luque, A. Burguete, S. Cano, G. de la Rosa, N. Bautista, A. Hernandez, J. Bandera, L.F. Torres, D. Kershenobich, F. Alvarez, and C. Gorodezky. *MHC class II sequences of susceptibility and protection in Mexicans with autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 1998. **28**(6): p. 985-90.
432. Ota, M., T. Seki, K. Kiyosawa, S. Furuta, K. Hino, T. Kondo, H. Fukushima, K. Tsuji, and H. Inoko. *A possible association between basic amino acids of position 13 of DRB1 chains and autoimmune hepatitis*. Immunogenetics, 1992. **36**(1): p. 49-55.
433. Czaja, A.J., M. Kruger, P.J. Santrach, S.B. Moore, and M.P. Manns. *Genetic distinctions between types 1 and 2 autoimmune hepatitis*. Am J Gastroenterol, 1997. **92**(12): p. 2197-200.
434. Manns, M.P. and M. Kruger. *Immunogenetics of chronic liver diseases*. Gastroenterology, 1994. **106**(6): p. 1676-97.
435. Ohira, H., J. Shinzawa, T. Suzuki, J. Tojo, H. Sato, T. Nishimaki, T. Morito, and R. Kasukawa. *Two sister cases of autoimmune hepatitis*. Fukushima J Med Sci, 1998. **44**(2): p. 113-20.
436. Findor, J.A., J.A. Sorda, J.R. Daruich, and E.F. Manero. *Familial association in autoimmune liver disease*. Medicina (B Aires), 2002. **62**(3): p. 241-4.
437. Czaja, A.J. and H.A. Carpenter. *Sensitivity, specificity, and predictability of biopsy interpretations in chronic hepatitis*. Gastroenterology, 1993. **105**(6): p. 1824-32.
438. Hennes, E.M., M. Zeniya, A.J. Czaja, A. Pares, G.N. Dalekos, E.L. Krawitt, P.L. Bittencourt, G. Porta, K.M. Boberg, H. Hofer, F.B. Bianchi, M. Shibata, C. Schramm, B. Eisenmann de Torres, P.R. Galle, I. McFarlane, H.P. Dienes, and A.W. Lohse. *Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis*. Hepatology, 2008. **48**(1): p. 169-76.
439. Singh, R., S. Nair, G. Farr, A. Mason, and R. Perrillo. *Acute autoimmune hepatitis presenting with centrilobular liver disease: case report and review of the literature*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(10): p. 2670-3.
440. Misdraji, J., M. Thiim, and F.M. Graeme-Cook. *Autoimmune hepatitis with centrilobular necrosis*. Am J Surg Pathol, 2004. **28**(4): p. 471-8.
441. Bach, N., S.N. Thung, and F. Schaffner. *The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: a comparative analysis*. Hepatology, 1992. **15**(4): p. 572-7.

442. Lau, J.Y., G. Koukoulis, G. Mieli-Vergani, B.C. Portmann, and R. Williams. *Syncytial giant-cell hepatitis--a specific disease entity?* J Hepatol, 1992. **15**(1-2): p. 216-9.
443. Senaldi, G., B. Portmann, A.P. Mowat, G. Mieli-Vergani, and D. Vergani. *Immunohistochemical features of the portal tract mononuclear cell infiltrate in chronic aggressive hepatitis.* Arch Dis Child, 1992. **67**(12): p. 1447-53.
444. Lobo-Yeo, A., G. Senaldi, B. Portmann, A.P. Mowat, G. Mieli-Vergani, and D. Vergani. *Class I and class II major histocompatibility complex antigen expression on hepatocytes: a study in children with liver disease.* Hepatology, 1990. **12**(2): p. 224-32.
445. Vergani, D. and G. Mieli-Vergani. *Mechanisms of autoimmune hepatitis.* Pediatr Transplant, 2004. **8**(6): p. 589-93.
446. Diamantis, I. and D.T. Boumpas. *Autoimmune hepatitis: evolving concepts.* Autoimmun Rev, 2004. **3**(3): p. 207-14.
447. Medina, J., L. Garcia-Buey, and R. Moreno-Otero. *Review article: immunopathogenetic and therapeutic aspects of autoimmune hepatitis.* Aliment Pharmacol Ther, 2003. **17**(1): p. 1-16.
448. Cookson, S., P.K. Constantini, M. Clare, J.A. Underhill, W. Bernal, A.J. Czaja, and P.T. Donaldson. *Frequency and nature of cytokine gene polymorphisms in type I autoimmune hepatitis.* Hepatology, 1999. **30**(4): p. 851-6.
449. Czaja, A.J., S. Cookson, P.K. Constantini, M. Clare, J.A. Underhill, and P.T. Donaldson. *Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type I autoimmune hepatitis.* Gastroenterology, 1999. **117**(3): p. 645-52.
450. Donaldson, P.T., *Immunogenetics of autoimmune liver disease: risk factors for susceptibility and progression*, in *Liver Immunology: Principles and Practice*, M.E. Gershwin, J.M. Vierling, and M. Manns, Editors. 2007, Humana Press: New Jersey. p. 221-233.
451. Agarwal, K., D.E. Jones, A.K. Daly, O.F. James, B. Vaidya, S. Pearce, and M.F. Bassendine. *CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to primary biliary cirrhosis.* J Hepatol, 2000. **32**(4): p. 538-41.
452. Vento, S., T. Garofano, G. Di Perri, L. Dolci, E. Concia, and D. Bassetti. *Identification of hepatitis A virus as a trigger for autoimmune chronic hepatitis type I in susceptible individuals.* Lancet, 1991. **337**(8751): p. 1183-7.
453. Laskus, T. and J. Slusarczyk. *Autoimmune chronic active hepatitis developing after acute type B hepatitis.* Dig Dis Sci, 1989. **34**(8): p. 1294-7.
454. Johnson, P.J. and I.G. McFarlane. *Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group.* Hepatology, 1993. **18**(4): p. 998-1005.
455. Choi, G. and M.G. Peters. *The challenge of diagnosing autoimmune hepatitis: less is more.* Hepatology, 2008. **48**(1): p. 10-2.
456. Yeoman, A.D., R.H. Westbrook, T. Al-Chalabi, I. Carey, N.D. Heaton, B.C. Portmann, and M.A. Heneghan. *Diagnostic value and utility of the simplified International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) criteria in acute and chronic liver disease.* Hepatology, 2009. **50**(2): p. 538-45.
457. Miyake, Y., Y. Iwasaki, H. Kobashi, T. Yasunaka, F. Ikeda, A. Takaki, and K. Yamamoto. *Clinical features of autoimmune hepatitis diagnosed based on simplified criteria of the International Autoimmune Hepatitis Group.* Dig Liver Dis, 2010. **42**(3): p. 210-5.

458. Chandok, N., M.G. Silveira, and K.D. Lindor. *Comparing the simplified and international autoimmune hepatitis group criteria in primary sclerosing cholangitis*. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2010. **6**(2): p. 108-12.
459. Neuhauser, M., E. Bjornsson, S. Treeprasertsuk, F. Enders, M. Silveira, J. Talwalkar, and K. Lindor. *Autoimmune hepatitis-PBC overlap syndrome: a simplified scoring system may assist in the diagnosis*. Am J Gastroenterol. **105**(2): p. 345-53.
460. Gatselis, N.K., K. Zachou, P. Papamichalis, G.K. Koukoulis, S. Gabeta, G.N. Dalekos, and E.I. Rigopoulou. *Comparison of simplified score with the revised original score for the diagnosis of autoimmune hepatitis: A new or a complementary diagnostic score?* Dig Liver Dis, 2010. **42**(11): p. 807-12.
461. Papamichalis, P.A., K. Zachou, G.K. Koukoulis, A. Veloni, E.G. Karacosta, L. Kypri, I. Mamaloudis, S. Gabeta, E.I. Rigopoulou, A.W. Lohse, and G.N. Dalekos. *The revised international autoimmune hepatitis score in chronic liver diseases including autoimmune hepatitis/overlap syndromes and autoimmune hepatitis with concurrent other liver disorders*. Journal of autoimmune diseases, 2007. **4**: p. 3.
462. Roberts, S.K., T.M. Therneau, and A.J. Czaja. *Prognosis of histological cirrhosis in type 1 autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 1996. **110**(3): p. 848-57.
463. Czaja, A.J. *Drug therapy in the management of type 1 autoimmune hepatitis*. Drugs, 1999. **57**(1): p. 49-68.
464. Kanzler, S., G. Gerken, H. Lohr, P.R. Galle, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and A.W. Lohse. *Duration of immunosuppressive therapy in autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 2001. **34**(2): p. 354-5.
465. Dufour, J.F., R. DeLellis, and M.M. Kaplan. *Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis*. Ann Intern Med, 1997. **127**(11): p. 981-5.
466. Cotler, S.J., S. Jakate, and D.M. Jensen. *Resolution of cirrhosis in autoimmune hepatitis with corticosteroid therapy*. J Clin Gastroenterol, 2001. **32**(5): p. 428-30.
467. Czaja, A.J. and K.D. Lindor. *Failure of budesonide in a pilot study of treatment-dependent autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 2000. **119**(5): p. 1312-6.
468. Richardson, P.D., P.D. James, and S.D. Ryder. *Mycophenolate mofetil for maintenance of remission in autoimmune hepatitis in patients resistant to or intolerant of azathioprine*. J Hepatol, 2000. **33**(3): p. 371-5.
469. Devlin, S.M., M.G. Swain, S.J. Urbanski, and K.W. Burak. *Mycophenolate mofetil for the treatment of autoimmune hepatitis in patients refractory to standard therapy*. Can J Gastroenterol, 2004. **18**(5): p. 321-6.
470. Inductivo-Yu, I., A. Adams, R.G. Gish, A. Wakil, N.H. Bzowej, R.T. Frederick, and M. Bonacini. *Mycophenolate mofetil in autoimmune hepatitis patients not responsive or intolerant to standard immunosuppressive therapy*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2007. **5**(7): p. 799-802.
471. Chatur, N., A. Ramji, V.G. Bain, M.M. Ma, P.J. Marotta, C.N. Ghent, L.B. Lilly, E.J. Heathcote, M. Deschenes, S.S. Lee, U.P. Steinbrecher, and E.M. Yoshida. *Transplant immunosuppressive agents in non-transplant chronic autoimmune hepatitis: the Canadian association for the study of liver (CASL) experience with mycophenolate mofetil and tacrolimus*. Liver Int, 2005. **25**(4): p. 723-7.



472. Hennes, E.M., Y.H. Oo, C. Schramm, U. Denzer, P. Buggisch, C. Wiegard, S. Kanzler, M. Schuchmann, W. Boecher, P.R. Galle, D.H. Adams, and A.W. Lohse. *Mycophenolate mofetil as second line therapy in autoimmune hepatitis?* Am J Gastroenterol, 2008. **103**(12): p. 3063-70.
473. Zachou, K., N. Gatselis, G. Papadamou, E.I. Rigopoulou, and G.N. Dalekos. *Mycophenolate for the treatment of autoimmune hepatitis: prospective assessment of its efficacy and safety for induction and maintenance of remission in a large cohort of treatment-naive patients.* Journal of Hepatology, 2011. **55**(3): p. 636-46.
474. Czaja, A.J. *Rapidity of treatment response and outcome in type I autoimmune hepatitis.* Journal of Hepatology, 2009. **51**(1): p. 161-7.
475. Schramm, C. and A.W. Lohse. *Role of mycophenolate mofetil in the treatment of autoimmune hepatitis.* Journal of Hepatology, 2011. **55**(3): p. 510-1.
476. Wiesner, R.H., A.J. Demetris, S.H. Belle, E.C. Seaberg, J.R. Lake, R.K. Zetterman, J. Everhart, and K.M. Detre. *Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome.* Hepatology, 1998. **28**(3): p. 638-45.
477. Prados, E., V. Cuervas-Mons, M. de la Mata, E. Fraga, A. Rimola, M. Prieto, G. Clemente, E. Vicente, T. Casanovas, and E. Fabrega. *Outcome of autoimmune hepatitis after liver transplantation.* Transplantation, 1998. **66**(12): p. 1645-50.
478. Hubscher, S.G. *Recurrent autoimmune hepatitis after liver transplantation: diagnostic criteria, risk factors, and outcome.* Liver Transpl, 2001. **7**(4): p. 285-91.
479. Manns, M.P. and M.J. Bahr. *Recurrent autoimmune hepatitis after liver transplantation-when non-self becomes self.* Hepatology, 2000. **32**(4 Pt 1): p. 868-70.
480. Kerkar, N., N. Hadzic, E.T. Davies, B. Portmann, P.T. Donaldson, M. Rela, N.D. Heaton, D. Vergani, and G. Mieli-Vergani. *De-novo autoimmune hepatitis after liver transplantation.* Lancet, 1998. **351**(9100): p. 409-13.
481. Salcedo, M., J. Vaquero, R. Banares, M. Rodriguez-Mahou, E. Alvarez, J.L. Vicario, A. Hernandez-Albujar, J.L. Tiscar, D. Rincon, S. Alonso, A. De Diego, and G. Clemente. *Response to steroids in de novo autoimmune hepatitis after liver transplantation.* Hepatology, 2002. **35**(2): p. 349-56.
482. Cullen, S. and R. Chapman. *Primary sclerosing cholangitis.* Autoimmun Rev, 2003. **2**(6): p. 305-12.
483. Lee, Y.M. and M.M. Kaplan. *Primary sclerosing cholangitis.* N Engl J Med, 1995. **332**(14): p. 924-33.
484. Wiesner, R.H., P.M. Grambsch, E.R. Dickson, J. Ludwig, R.L. MacCarty, E.B. Hunter, T.R. Fleming, L.D. Fisher, S.J. Beaver, and N.F. LaRusso. *Primary sclerosing cholangitis: natural history, prognostic factors and survival analysis.* Hepatology, 1989. **10**(4): p. 430-6.
485. Wilschanski, M., P. Chait, J.A. Wade, L. Davis, M. Corey, P. St Louis, A.M. Griffiths, L.M. Blendis, S.P. Moroz, L. Scully, and et al. *Primary sclerosing cholangitis in 32 children: clinical, laboratory, and radiographic features, with survival analysis.* Hepatology, 1995. **22**(5): p. 1415-22.
486. Debray, D., D. Pariente, E. Urvoas, M. Hadchouel, and O. Bernard. *Sclerosing cholangitis in children.* J Pediatr, 1994. **124**(1): p. 49-56.
487. Bambha, K., W.R. Kim, J. Talwalkar, H. Torgerson, J.T. Benson, T.M. Therneau, E.V. Loftus, Jr., B.P. Yawn, E.R. Dickson, and L.J. Melton, 3rd.

- Incidence, clinical spectrum, and outcomes of primary sclerosing cholangitis in a United States community.* Gastroenterology, 2003. **125**(5): p. 1364-9.
488. Kingham, J.G., N. Kochar, and M.B. Gravenor. *Incidence, clinical patterns, and outcomes of primary sclerosing cholangitis in South Wales, United Kingdom.* Gastroenterology, 2004. **126**(7): p. 1929-30.
  489. Escorsell, A., A. Pares, J. Rodes, J.A. Solis-Herruzo, M. Miras, and E. de la Morena. *Epidemiology of primary sclerosing cholangitis in Spain. Spanish Association for the Study of the Liver.* J Hepatol, 1994. **21**(5): p. 787-91.
  490. Talwalkar, J.A. and K.D. Lindor. *Primary sclerosing cholangitis.* Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(1): p. 62-72.
  491. Kaplan, G.G., K.B. Laupland, D. Butzner, S.J. Urbanski, and S.S. Lee. *The burden of large and small duct primary sclerosing cholangitis in adults and children: a population-based analysis.* Am J Gastroenterol, 2007. **102**(5): p. 1042-9.
  492. Ponsioen, C.I. and G.N. Tytgat. *Primary sclerosing cholangitis: a clinical review.* Am J Gastroenterol, 1998. **93**(4): p. 515-23.
  493. Schrumpf, E. and K.M. Boberg. *Epidemiology of primary sclerosing cholangitis.* Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2001. **15**(4): p. 553-62.
  494. Loftus, E.V., Jr., G.C. Harewood, C.G. Loftus, W.J. Tremaine, W.S. Harmsen, A.R. Zinsmeister, D.A. Jewell, and W.J. Sandborn. *PSC-IBD: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis.* Gut, 2005. **54**(1): p. 91-6.
  495. Takikawa, H. and T. Manabe. *Primary sclerosing cholangitis in Japan--analysis of 192 cases.* J Gastroenterol, 1997. **32**(1): p. 134-7.
  496. Okolicsanyi, L., L. Fabris, S. Viaggi, N. Carulli, M. Podda, and G. Ricci. *Primary sclerosing cholangitis: clinical presentation, natural history and prognostic variables: an Italian multicentre study. The Italian PSC Study Group.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 1996. **8**(7): p. 685-91.
  497. Saarinen, S., O. Olerup, and U. Broome. *Increased frequency of autoimmune diseases in patients with primary sclerosing cholangitis.* Am J Gastroenterol, 2000. **95**(11): p. 3195-9.
  498. Silveira, M.G. and K.D. Lindor. *Clinical features and management of primary sclerosing cholangitis.* World J Gastroenterol, 2008. **14**(21): p. 3338-49.
  499. Angulo, P., T.M. Therneau, A. Jorgensen, C.K. DeSotel, K.S. Egan, E.R. Dickson, J.E. Hay, and K.D. Lindor. *Bone disease in patients with primary sclerosing cholangitis: prevalence, severity and prediction of progression.* J Hepatol, 1998. **29**(5): p. 729-35.
  500. Campbell, M.S., G.R. Lichtenstein, A.D. Rhim, M. Pazianas, and T. Faust. *Severity of liver disease does not predict osteopenia or low bone mineral density in primary sclerosing cholangitis.* Liver Int, 2005. **25**(2): p. 311-6.
  501. Brandt, D.J., R.L. MacCarty, J.W. Charboneau, N.F. LaRusso, R.H. Wiesner, and J. Ludwig. *Gallbladder disease in patients with primary sclerosing cholangitis.* AJR Am J Roentgenol, 1988. **150**(3): p. 571-4.
  502. Leung, U.C., P.Y. Wong, R.H. Roberts, and J.B. Koea. *Gall bladder polyps in sclerosing cholangitis: does the 1-cm rule apply?* ANZ J Surg, 2007. **77**(5): p. 355-7.
  503. Stiehl, A., G. Rudolph, P. Kloters-Plachky, P. Sauer, and S. Walker. *Development of dominant bile duct stenoses in patients with primary sclerosing cholangitis treated with ursodeoxycholic acid: outcome after endoscopic treatment.* J Hepatol, 2002. **36**(2): p. 151-6.

504. Stiehl, A. and D. Rost. *Endoscopic treatment of dominant stenoses in patients with primary sclerosing cholangitis*. Clin Rev Allergy Immunol, 2005. **28**(2): p. 159-65.
505. Bjornsson, E.S., A.F. Kilander, and R.G. Olsson. *Bile duct bacterial isolates in primary sclerosing cholangitis and certain other forms of cholestasis--a study of bile cultures from ERCP*. Hepatogastroenterology, 2000. **47**(36): p. 1504-8.
506. Lee, Y.M. and M.M. Kaplan. *Management of primary sclerosing cholangitis*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(3): p. 528-34.
507. Pohl, J., A. Ring, W. Stremmel, and A. Stiehl. *The role of dominant stenoses in bacterial infections of bile ducts in primary sclerosing cholangitis*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006. **18**(1): p. 69-74.
508. Burak, K., P. Angulo, T.M. Pasha, K. Egan, J. Petz, and K.D. Lindor. *Incidence and risk factors for cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis*. Am J Gastroenterol, 2004. **99**(3): p. 523-6.
509. Harnois, D.M., G.J. Gores, J. Ludwig, J.L. Steers, N.F. LaRusso, and R.H. Wiesner. *Are patients with cirrhotic stage primary sclerosing cholangitis at risk for the development of hepatocellular cancer?* J Hepatol, 1997. **27**(3): p. 512-6.
510. Bjornsson, E. and P. Angulo. *Cholangiocarcinoma in young individuals with and without primary sclerosing cholangitis*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(8): p. 1677-82.
511. Boberg, K.M., A. Bergquist, S. Mitchell, A. Pares, F. Rosina, U. Broome, R. Chapman, O. Fausa, T. Egeland, G. Rocca, and E. Schrumpf. *Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: risk factors and clinical presentation*. Scand J Gastroenterol, 2002. **37**(10): p. 1205-11.
512. Ahrendt, S.A., H.A. Pitt, A. Nakeeb, A.S. Klein, K.D. Lillemoe, A.N. Kalloo, and J.L. Cameron. *Diagnosis and management of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis*. J Gastrointest Surg, 1999. **3**(4): p. 357-67; discussion 367-8.
513. Bergquist, A., A. Ekbom, R. Olsson, D. Kornfeldt, L. Loof, A. Danielsson, R. Hultcrantz, S. Lindgren, H. Prytz, H. Sandberg-Gertzen, S. Almer, F. Granath, and U. Broome. *Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis*. J Hepatol, 2002. **36**(3): p. 321-7.
514. Broome, U., G. Lindberg, and R. Lofberg. *Primary sclerosing cholangitis in ulcerative colitis--a risk factor for the development of dysplasia and DNA aneuploidy?* Gastroenterology, 1992. **102**(6): p. 1877-80.
515. Kornfeld, D., A. Ekbom, and T. Ihre. *Is there an excess risk for colorectal cancer in patients with ulcerative colitis and concomitant primary sclerosing cholangitis? A population based study*. Gut, 1997. **41**(4): p. 522-5.
516. Loftus, E.V., Jr., W.J. Sandborn, W.J. Tremaine, D.W. Mahoney, A.R. Zinsmeister, K.P. Offord, and L.J. Melton, 3rd. *Risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis*. Gastroenterology, 1996. **110**(2): p. 432-40.
517. Nuako, K.W., D.A. Ahlquist, W.J. Sandborn, D.W. Mahoney, D.M. Siems, and A.R. Zinsmeister. *Primary sclerosing cholangitis and colorectal carcinoma in patients with chronic ulcerative colitis: a case-control study*. Cancer, 1998. **82**(5): p. 822-6.

518. Jayaram, H., J. Satsangi, and R.W. Chapman. *Increased colorectal neoplasia in chronic ulcerative colitis complicated by primary sclerosing cholangitis: fact or fiction?* Gut, 2001. **48**(3): p. 430-4.
519. Lewis, J.T., J.A. Talwalkar, C.B. Rosen, T.C. Smyrk, and S.C. Abraham. *Prevalence and risk factors for gallbladder neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis: evidence for a metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence.* Am J Surg Pathol, 2007. **31**(6): p. 907-13.
520. Chapman, R.W., B.A. Arborgh, J.M. Rhodes, J.A. Summerfield, R. Dick, P.J. Scheuer, and S. Sherlock. *Primary sclerosing cholangitis: a review of its clinical features, cholangiography, and hepatic histology.* Gut, 1980. **21**(10): p. 870-7.
521. Wiesner, R.H. and N.F. LaRusso. *Clinicopathologic features of the syndrome of primary sclerosing cholangitis.* Gastroenterology, 1980. **79**(2): p. 200-6.
522. Broome, U., R. Olsson, L. Loof, G. Bodemar, R. Hultcrantz, A. Danielsson, H. Prytz, H. Sandberg-Gertzen, S. Wallerstedt, and G. Lindberg. *Natural history and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis.* Gut, 1996. **38**(4): p. 610-5.
523. Silveira, M.G. and K.D. Lindor. *Primary sclerosing cholangitis.* Can J Gastroenterol, 2008. **22**(8): p. 689-98.
524. Boberg, K.M., O. Fausa, T. Haaland, E. Holter, O.J. Mellbye, A. Spurkland, and E. Schrumpf. *Features of autoimmune hepatitis in primary sclerosing cholangitis: an evaluation of 114 primary sclerosing cholangitis patients according to a scoring system for the diagnosis of autoimmune hepatitis.* Hepatology, 1996. **23**(6): p. 1369-76.
525. Schrumpf, E., O. Fausa, F. Kolmannskog, K. Elgjo, S. Ritland, and E. Gjone. *Sclerosing cholangitis in ulcerative colitis. A follow-up study.* Scand J Gastroenterol, 1982. **17**(1): p. 33-9.
526. Bilbao, M.K., C.T. Dotter, T.G. Lee, and R.M. Katon. *Complications of endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP). A study of 10,000 cases.* Gastroenterology, 1976. **70**(3): p. 314-20.
527. Freeman, M.L., D.B. Nelson, S. Sherman, G.B. Haber, M.E. Herman, P.J. Dorsher, J.P. Moore, M.B. Fennerty, M.E. Ryan, M.J. Shaw, J.D. Lande, and A.M. Pheley. *Complications of endoscopic biliary sphincterotomy.* N Engl J Med, 1996. **335**(13): p. 909-18.
528. Talwalkar, J.A., P. Angulo, C.D. Johnson, B.T. Petersen, and K.D. Lindor. *Cost-minimization analysis of MRC versus ERCP for the diagnosis of primary sclerosing cholangitis.* Hepatology, 2004. **40**(1): p. 39-45.
529. Mehta, S.N., C. Reinhold, and A.N. Barkun. *Magnetic resonance cholangiopancreatography.* Gastrointest Endosc Clin N Am, 1997. **7**(2): p. 247-70.
530. Fulcher, A.S., M.A. Turner, K.J. Franklin, M.L. Shiffman, R.K. Sterling, V.A. Luketic, and A.J. Sanyal. *Primary sclerosing cholangitis: evaluation with MR cholangiography-a case-control study.* Radiology, 2000. **215**(1): p. 71-80.
531. Moff, S.L., I.R. Kamel, J. Eustace, L.P. Lawler, S. Kantsevov, A.N. Kalloo, and P.J. Thuluvath. *Diagnosis of primary sclerosing cholangitis: a blinded comparative study using magnetic resonance cholangiography and endoscopic retrograde cholangiography.* Gastrointest Endosc, 2006. **64**(2): p. 219-23.
532. Petrovic, B.D., P. Nikolaidis, N.A. Hammond, J.A. Martin, P.V. Petrovic, P.M. Desai, and F.H. Miller. *Correlation between findings on MRCP and*

- gadolinium-enhanced MR of the liver and a survival model for primary sclerosing cholangitis*. Dig Dis Sci, 2007. **52**(12): p. 3499-506.
533. Angulo, P., D.H. Pearce, C.D. Johnson, J.J. Henry, N.F. LaRusso, B.T. Petersen, and K.D. Lindor. *Magnetic resonance cholangiography in patients with biliary disease: its role in primary sclerosing cholangitis*. J Hepatol, 2000. **33**(4): p. 520-7.
  534. Duerr, R.H., S.R. Targan, C.J. Landers, N.F. LaRusso, K.L. Lindsay, R.H. Wiesner, and F. Shanahan. *Neutrophil cytoplasmic antibodies: a link between primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis*. Gastroenterology, 1991. **100**(5 Pt 1): p. 1385-91.
  535. Claise, C., C. Johanet, Y. Bouhnik, N. Kapel, J.C. Homberg, and R. Poupon. *Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in autoimmune liver and inflammatory bowel diseases*. Liver, 1996. **16**(1): p. 28-34.
  536. Klein, R., J. Eisenburg, P. Weber, F. Seibold, and P.A. Berg. *Significance and specificity of antibodies to neutrophils detected by western blotting for the serological diagnosis of primary sclerosing cholangitis*. Hepatology, 1991. **14**(6): p. 1147-52.
  537. Lo, S.K., K.A. Fleming, and R.W. Chapman. *Prevalence of anti-neutrophil antibody in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis using an alkaline phosphatase technique*. Gut, 1992. **33**(10): p. 1370-5.
  538. Schwarze, C., B. Terjung, P. Lilienweiss, U. Beuers, V. Herzog, T. Sauerbruch, and U. Spengler. *IgA class antineutrophil cytoplasmic antibodies in primary sclerosing cholangitis and autoimmune hepatitis*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(2): p. 283-9.
  539. Terjung, B. and H.J. Worman. *Anti-neutrophil antibodies in primary sclerosing cholangitis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2001. **15**(4): p. 629-42.
  540. Terjung, B., U. Spengler, T. Sauerbruch, and H.J. Worman. *"Atypical p-ANCA" in IBD and hepatobiliary disorders react with a 50-kilodalton nuclear envelope protein of neutrophils and myeloid cell lines*. Gastroenterology, 2000. **119**(2): p. 310-22.
  541. Billing, P., S. Tahir, B. Calfin, G. Gagne, L. Cobb, S. Targan, and A. Vidrich. *Nuclear localization of the antigen detected by ulcerative colitis-associated perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies*. Am J Pathol, 1995. **147**(4): p. 979-87.
  542. Sobajima, J., S. Ozaki, F. Osakada, H. Uesugi, H. Shirakawa, M. Yoshida, and K. Nakao. *Novel autoantigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (P-ANCA) in ulcerative colitis: non-histone chromosomal proteins, HMG1 and HMG2*. Clin Exp Immunol, 1997. **107**(1): p. 135-40.
  543. Fricker, M., M. Hollinshead, N. White, and D. Vaux. *Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope*. J Cell Biol, 1997. **136**(3): p. 531-44.
  544. Spickett, G.P. and V. Broomhead. *Formalin fixation and patterns of antineutrophil cytoplasmic antibodies*. J Clin Pathol, 1995. **48**(1): p. 89-90.
  545. Seibold, F., P. Weber, A. Schoning, H. Mork, S. Goppel, and M. Scheurlen. *Neutrophil antibodies (pANCA) in chronic liver disease and inflammatory bowel disease: do they react with different antigens?* Eur J Gastroenterol Hepatol, 1996. **8**(11): p. 1095-100.

546. Gur, H., G. Shen, M. Sutjita, J. Terrberry, I. Alosachie, N. Barka, H.C. Lin, J.B. Peter, P.L. Meroni, M. Kaplan, and et al. *Autoantibody profile of primary sclerosing cholangitis*. Pathobiology, 1995. **63**(2): p. 76-82.
547. Roozendaal, C., A.W. Van Milligen de Wit, E.B. Haagsma, G. Horst, C. Schwarze, H.H. Peter, J.H. Kleibeuker, J.W. Tervaert, P.C. Limburg, and C.G. Kallenberg. *Antineutrophil cytoplasmic antibodies in primary sclerosing cholangitis: defined specificities may be associated with distinct clinical features*. Am J Med, 1998. **105**(5): p. 393-9.
548. Zauli, D., A. Grassi, F. Cassani, G. Ballardini, R. Bortolotti, L. Muratori, M. Fusconi, and F.B. Bianchi. *Autoimmune serology of primary sclerosing cholangitis*. Dig Liver Dis, 2001. **33**(4): p. 391-2.
549. Muratori, L., P. Muratori, D. Zauli, A. Grassi, G. Pappas, L. Rodrigo, F. Cassani, M. Lenzi, and F.B. Bianchi. *Antilactoferrin antibodies in autoimmune liver disease*. Clin Exp Immunol, 2001. **124**(3): p. 470-3.
550. Angulo, P., J.B. Peter, M.E. Gershwin, C.K. DeSotel, Y. Shoenfeld, A.E. Ahmed, and K.D. Lindor. *Serum autoantibodies in patients with primary sclerosing cholangitis*. J Hepatol, 2000. **32**(2): p. 182-7.
551. Orth, T., R. Kellner, O. Diekmann, J. Faust, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and W.J. Mayet. *Identification and characterization of autoantibodies against catalase and alpha-enolase in patients with primary sclerosing cholangitis*. Clin Exp Immunol, 1998. **112**(3): p. 507-15.
552. Vermeulen, N., I. Arijs, S. Joossens, S. Vermeire, S. Clerens, K. Van den Bergh, G. Michiels, L. Arckens, F. Schuit, L. Van Lommel, P. Rutgeerts, and X. Bossuyt. *Anti-alpha-enolase antibodies in patients with inflammatory Bowel disease*. Clin Chem, 2008. **54**(3): p. 534-41.
553. Sobajima, J., S. Ozaki, H. Uesugi, F. Osakada, H. Shirakawa, M. Yoshida, and K. Nakao. *Prevalence and characterization of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (P-ANCA) directed against HMG1 and HMG2 in ulcerative colitis (UC)*. Clin Exp Immunol, 1998. **111**(2): p. 402-7.
554. Terjung, B., J. Sohne, B. Lechtenberg, J. Gottwein, M. Muennich, V. Herzog, M. Mahler, T. Sauerbruch, and U. Spengler. *p-ANCAs in autoimmune liver disorders recognise human beta-tubulin isotype 5 and cross-react with microbial protein FtsZ*. Gut, 2010. **59**(6): p. 808-16.
555. Hov, J.R., K.M. Boberg, and T.H. Karlsen. *Autoantibodies in primary sclerosing cholangitis*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(24): p. 3781-91.
556. Pokorny, C.S., I.D. Norton, G.W. McCaughan, and W.S. Selby. *Anti-neutrophil cytoplasmic antibody: a prognostic indicator in primary sclerosing cholangitis*. J Gastroenterol Hepatol, 1994. **9**(1): p. 40-4.
557. Bansi, D.S., M. Bauducci, A. Bergqvist, K. Boberg, U. Broome, R. Chapman, K. Fleming, R. Jorgensen, K. Lindor, F. Rosina, and E. Schrumpf. *Detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies in primary sclerosing cholangitis: a comparison of the alkaline phosphatase and immunofluorescent techniques*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1997. **9**(6): p. 575-80.
558. Mirza, Z.K., B. Sastri, J.J. Lin, P.S. Amenta, and K.M. Das. *Autoimmunity against human tropomyosin isoforms in ulcerative colitis: localization of specific human tropomyosin isoforms in the intestine and extraintestinal organs*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(11): p. 1036-43.
559. Mandal, A., A. Dasgupta, L. Jeffers, L. Squillante, S. Hyder, R. Reddy, E. Schiff, and K.M. Das. *Autoantibodies in sclerosing cholangitis against a*

- shared peptide in biliary and colon epithelium*. Gastroenterology, 1994. **106**(1): p. 185-92.
560. Kesari, K.V., N. Yoshizaki, X. Geng, J.J. Lin, and K.M. Das. *Externalization of tropomyosin isoform 5 in colon epithelial cells*. Clin Exp Immunol, 1999. **118**(2): p. 219-27.
  561. Biancone, L., G. Monteleone, R. Marasco, and F. Pallone. *Autoimmunity to tropomyosin isoforms in ulcerative colitis (UC) patients and unaffected relatives*. Clin Exp Immunol, 1998. **113**(2): p. 198-205.
  562. Ebert, E.C., X. Geng, J. Lin, and K.M. Das. *Autoantibodies against human tropomyosin isoform 5 in ulcerative colitis destroys colonic epithelial cells through antibody and complement-mediated lysis*. Cell Immunol, 2006. **244**(1): p. 43-9.
  563. Sakamaki, S., N. Takayanagi, N. Yoshizaki, S. Hayashi, T. Takayama, J. Kato, K. Kogawa, N. Yamauchi, N. Takemoto, A. Nobuoka, T. Ayabe, Y. Kohgo, and Y. Niitsu. *Autoantibodies against the specific epitope of human tropomyosin(s) detected by a peptide based enzyme immunoassay in sera of patients with ulcerative colitis show antibody dependent cell mediated cytotoxicity against HLA-DPw9 transfected L cells*. Gut, 2000. **47**(2): p. 236-41.
  564. Xu, B., U. Broome, B.G. Ericzon, and S. Sumitran-Holgersson. *High frequency of autoantibodies in patients with primary sclerosing cholangitis that bind biliary epithelial cells and induce expression of CD44 and production of interleukin 6*. Gut, 2002. **51**(1): p. 120-7.
  565. Karrar, A., U. Broome, T. Sodergren, M. Jaksch, A. Bergquist, M. Bjornstedt, and S. Sumitran-Holgersson. *Biliary epithelial cell antibodies link adaptive and innate immune responses in primary sclerosing cholangitis*. Gastroenterology, 2007. **132**(4): p. 1504-14.
  566. Ge, X., B.G. Ericzon, G. Nowak, H. oHrstrom, U. Broome, and S. Sumitran-Holgersson. *Are preformed antibodies to biliary epithelial cells of clinical importance in liver transplantation?* Liver Transpl, 2003. **9**(11): p. 1191-8.
  567. Terjung, B., F. Bogsch, R. Klein, J. Sohne, C. Reichel, J.C. Wasmuth, U. Beuers, T. Sauerbruch, and U. Spengler. *Diagnostic accuracy of atypical p-ANCA in autoimmune hepatitis using ROC- and multivariate regression analysis*. Eur J Med Res, 2004. **9**(9): p. 439-48.
  568. Zachou, K., C. Liaskos, E. Rigopoulou, S. Gabeta, P. Papamichalis, N. Gatselis, S. Georgiadou, and G.N. Dalekos. *Presence of high avidity anticardiolipin antibodies in patients with autoimmune cholestatic liver diseases*. Clin Immunol, 2006. **119**(2): p. 203-12.
  569. Zauli, D., E. Schruppf, C. Crespi, F. Cassani, O. Fausa, and E. Aadland. *An autoantibody profile in primary sclerosing cholangitis*. J Hepatol, 1987. **5**(1): p. 14-8.
  570. Granito, A., P. Muratori, L. Muratori, G. Pappas, F. Cassani, J. Worthington, S. Ferri, C. Quarneri, V. Cipriano, C. de Molo, M. Lenzi, R.W. Chapman, and F.B. Bianchi. *Antibodies to SS-A/Ro-52kD and centromere in autoimmune liver disease: a clue to diagnosis and prognosis of primary biliary cirrhosis*. Aliment Pharmacol Ther, 2007. **26**(6): p. 831-8.
  571. Muratori, P., L. Muratori, M. Guidi, S. Maccariello, G. Pappas, R. Ferrari, P. Gionchetti, M. Campieri, and F.B. Bianchi. *Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) and autoimmune liver diseases*. Clin Exp Immunol, 2003. **132**(3): p. 473-6.

572. Youinou, P. *New target antigens for anti-endothelial cell antibodies*. Immunobiology, 2005. **210**(10): p. 789-97.
573. Katritsis, D.G., T. Zografos, S. Korovesis, E. Giazitzoglou, P. Youinou, F.N. Skopouli, and H.M. Moutsopoulos. *Antiendothelial cell antibodies in patients with coronary artery ectasia*. Coron Artery Dis, 2010. **21**(6): p. 352-6.
574. Rubel, L.R., L.B. Seeff, and V. Patel. *Primary biliary cirrhosis-primary sclerosing cholangitis overlap syndrome*. Arch Pathol Lab Med, 1984. **108**(5): p. 360-1.
575. Burak, K.W., S.J. Urbanski, and M.G. Swain. *A case of coexisting primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis: a new overlap of autoimmune liver diseases*. Dig Dis Sci, 2001. **46**(9): p. 2043-7.
576. Donaldson, P.T. and S. Norris. *Immunogenetics in PSC*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2001. **15**(4): p. 611-27.
577. Donaldson, P.T., J.M. Farrant, M.L. Wilkinson, K. Hayllar, B.C. Portmann, and R. Williams. *Dual association of HLA DR2 and DR3 with primary sclerosing cholangitis*. Hepatology, 1991. **13**(1): p. 129-33.
578. Farrant, J.M., D.G. Doherty, P.T. Donaldson, R.W. Vaughan, K.M. Hayllar, K.I. Welsh, A.L. Eddleston, and R. Williams. *Amino acid substitutions at position 38 of the DR beta polypeptide confer susceptibility to and protection from primary sclerosing cholangitis*. Hepatology, 1992. **16**(2): p. 390-5.
579. Mehal, W.Z., Y.M. Lo, B.P. Wordsworth, J.M. Neuberger, S.C. Hubscher, K.A. Fleming, and R.W. Chapman. *HLA DR4 is a marker for rapid disease progression in primary sclerosing cholangitis*. Gastroenterology, 1994. **106**(1): p. 160-7.
580. Underhill, J.A., P.T. Donaldson, D.G. Doherty, K. Manabe, and R. Williams. *HLA DPB polymorphism in primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1995. **21**(4): p. 959-62.
581. Olerup, O., R. Olsson, R. Hultcrantz, and U. Broome. *HLA-DR and HLA-DQ are not markers for rapid disease progression in primary sclerosing cholangitis*. Gastroenterology, 1995. **108**(3): p. 870-8.
582. Spurkland, A., S. Saarinen, K.M. Boberg, S. Mitchell, U. Broome, L. Caballeria, E. Ciusani, R. Chapman, G. Ercilla, O. Fausa, I. Knutsen, A. Pares, F. Rosina, O. Olerup, E. Thorsby, and E. Schrumpf. *HLA class II haplotypes in primary sclerosing cholangitis patients from five European populations*. Tissue Antigens, 1999. **53**(5): p. 459-69.
583. Norris, S., E. Kondeatis, R. Collins, J. Satsangi, M. Clare, R. Chapman, H. Stephens, P. Harrison, R. Vaughan, and P. Donaldson. *Mapping MHC-encoded susceptibility and resistance in primary sclerosing cholangitis: the role of MICA polymorphism*. Gastroenterology, 2001. **120**(6): p. 1475-82.
584. Wiencke, K., A. Spurkland, E. Schrumpf, and K.M. Boberg. *Primary sclerosing cholangitis is associated to an extended B8-DR3 haplotype including particular MICA and MICB alleles*. Hepatology, 2001. **34**(4 Pt 1): p. 625-30.
585. Donaldson, P.T. and S. Norris. *Evaluation of the role of MHC class II alleles, haplotypes and selected amino acid sequences in primary sclerosing cholangitis*. Autoimmunity, 2002. **35**(8): p. 555-64.
586. Moloney, M.M., L.J. Thomson, M.J. Strettell, R. Williams, and P.T. Donaldson. *Human leukocyte antigen-C genes and susceptibility to primary sclerosing cholangitis*. Hepatology, 1998. **28**(3): p. 660-2.



587. Bernal, W., M. Moloney, J. Underhill, and P.T. Donaldson. *Association of tumor necrosis factor polymorphism with primary sclerosing cholangitis*. J Hepatol, 1999. **30**(2): p. 237-41.
588. Groh, V., S. Bahram, S. Bauer, A. Herman, M. Beauchamp, and T. Spies. *Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12445-50.
589. Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J.H. Phillips, L.L. Lanier, and T. Spies. *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. Science, 1999. **285**(5428): p. 727-9.
590. Bergquist, A., G. Lindberg, S. Saarinen, and U. Broome. *Increased prevalence of primary sclerosing cholangitis among first-degree relatives*. J Hepatol, 2005. **2005**(42): p. 252-256.
591. Barbatis, C., P. Grases, H.A. Shepherd, R.W. Chapman, J. Trowell, D.P. Jewell, and J.O. McGee. *Histological features of sclerosing cholangitis in patients with chronic ulcerative colitis*. J Clin Pathol, 1985. **38**(7): p. 778-83.
592. Vierling, J.M., *Hepatobiliary complications of ulcerative colitis and Crohn's disease*, in *Hepatology: A textbook of liver disease*, D. Zakim and T. Boyer, Editors. 2003, Saunders: Philadelphia. p. 1235-1272.
593. Ludwig, J., S.S. Barham, N.F. LaRusso, L.R. Elveback, R.H. Wiesner, and J.T. McCall. *Morphologic features of chronic hepatitis associated with primary sclerosing cholangitis and chronic ulcerative colitis*. Hepatology, 1981. **1**(6): p. 632-40.
594. Warren, K.W., S. Athanassiades, and J.I. Monge. *Primary sclerosing cholangitis. A study of forty-two cases*. Am J Surg, 1966. **111**(1): p. 23-38.
595. MacCarty, R.L., N.F. LaRusso, R.H. Wiesner, and J. Ludwig. *Primary sclerosing cholangitis: findings on cholangiography and pancreatography*. Radiology, 1983. **149**(1): p. 39-44.
596. Epstein, O., R.W. Chapman, G. Lake-Bakaar, A.Y. Foo, S.B. Rosalki, and S. Sherlock. *The pancreas in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis*. Gastroenterology, 1982. **83**(6): p. 1177-82.
597. Cullen, S. and R. Chapman. *Aetiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2001. **15**(4): p. 577-89.
598. Cullen, S. and R. Chapman, *Sclerosing cholangitis: Primary and secondary*, in *Liver immunology : principles and practice*, M.E. Gershwin, J.M. Vierling, and M.P. Manns, Editors. 2007, Humana Press: Totowa, N.J. p. 249-261.
599. O'Mahony, C.A. and J.M. Vierling. *Etiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis*. Semin Liver Dis, 2006. **26**(1): p. 3-21.
600. Sherlock, S. *Pathogenesis of sclerosing cholangitis: the role of nonimmune factors*. Semin Liver Dis, 1991. **11**(1): p. 5-10.
601. Ludwig, J., C.H. Kim, R.H. Wiesner, and R.A. Krom. *Floxuridine-induced sclerosing cholangitis: an ischemic cholangiopathy?* Hepatology, 1989. **9**(2): p. 215-8.
602. Loftus, E.V., Jr., W.J. Sandborn, W.J. Tremaine, D.W. Mahoney, A.R. Zinsmeister, K.P. Offord, and L.J. Melton, 3rd. *Primary sclerosing cholangitis is associated with nonsmoking: a case-control study*. Gastroenterology, 1996. **110**(5): p. 1496-502.
603. Morecki, R., J.H. Glaser, A.B. Johnson, and Y. Kress. *Detection of reovirus type 3 in the porta hepatis of an infant with extrahepatic biliary atresia:*

- ultrastructural and immunocytochemical study*. Hepatology, 1984. **4**(6): p. 1137-42.
604. Phillips, P.A., D. Keast, J.M. Papadimitriou, M.N. Walters, and N.F. Stanley. *Chronic obstructive jaundice induced by Reovirus type 3 in weanling mice*. Pathology, 1969. **1**(3): p. 193-203.
  605. Rosenberg, D.P., R. Morecki, L.O. Lollini, J. Glaser, and C.E. Cornelius. *Extrahepatic biliary atresia in a rhesus monkey (Macaca mulatta)*. Hepatology, 1983. **3**(4): p. 577-80.
  606. Minuk, G.Y., N. Rascenin, R.W. Paul, P.W. Lee, K. Buchan, and J.K. Kelly. *Reovirus type 3 infection in patients with primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis*. J Hepatol, 1987. **5**(1): p. 8-13.
  607. Burgart, L.J. *Cholangitis in viral disease*. Mayo Clin Proc, 1998. **73**(5): p. 479-82.
  608. Mehal, W.Z., A.T. Hattersley, R.W. Chapman, and K.A. Fleming. *A survey of cytomegalovirus (CMV) DNA in primary sclerosing cholangitis (PSC) liver tissues using a sensitive polymerase chain reaction (PCR) based assay*. J Hepatol, 1992. **15**(3): p. 396-9.
  609. Nilsson, H.O., J. Taneera, M. Castedal, E. Glatz, R. Olsson, and T. Wadstrom. *Identification of Helicobacter pylori and other Helicobacter species by PCR, hybridization, and partial DNA sequencing in human liver samples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary biliary cirrhosis*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(3): p. 1072-6.
  610. Mason, A.L., L. Xu, L. Guo, S. Munoz, J.B. Jaspan, M. Bryer-Ash, Y. Cao, D.M. Sander, Y. Shoenfeld, A. Ahmed, J. Van de Water, M.E. Gershwin, and R.F. Garry. *Detection of retroviral antibodies in primary biliary cirrhosis and other idiopathic biliary disorders*. Lancet, 1998. **351**(9116): p. 1620-4.
  611. Vierling, J.M., *Aetiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis*, in *Primary sclerosing cholangitis*, M. Manns, A. Stiehl, and R.H. Wiesner, Editors. 1998, Kluwer Academic Publishers: London. p. 9.
  612. Grant, A.J., P.F. Lalor, M. Salmi, S. Jalkanen, and D.H. Adams. *Homing of mucosal lymphocytes to the liver in the pathogenesis of hepatic complications of inflammatory bowel disease*. Lancet, 2002. **359**(9301): p. 150-7.
  613. Aadland, E., E. Schrumpf, O. Fausa, K. Elgjo, A. Heilo, T. Aakhus, and E. Gjone. *Primary sclerosing cholangitis: a long-term follow-up study*. Scand J Gastroenterol, 1987. **22**(6): p. 655-64.
  614. Porayko, M.K., R.H. Wiesner, N.F. LaRusso, J. Ludwig, R.L. MacCarty, B.L. Steiner, C.K. Twomey, and A.R. Zinsmeister. *Patients with asymptomatic primary sclerosing cholangitis frequently have progressive disease*. Gastroenterology, 1990. **98**(6): p. 1594-602.
  615. Farrant, J.M., K.M. Hayllar, M.L. Wilkinson, J. Karani, B.C. Portmann, D. Westaby, and R. Williams. *Natural history and prognostic variables in primary sclerosing cholangitis*. Gastroenterology, 1991. **100**(6): p. 1710-7.
  616. Dickson, E.R., P.A. Murtaugh, R.H. Wiesner, P.M. Grambsch, T.R. Fleming, J. Ludwig, N.F. LaRusso, M. Malinchoc, R.W. Chapman, M.M. Kaplan, and et al. *Primary sclerosing cholangitis: refinement and validation of survival models*. Gastroenterology, 1992. **103**(6): p. 1893-901.
  617. Kim, W.R., T.M. Therneau, R.H. Wiesner, J.J. Poterucha, J.T. Benson, M. Malinchoc, N.F. LaRusso, K.D. Lindor, and E.R. Dickson. *A revised natural history model for primary sclerosing cholangitis*. Mayo Clin Proc, 2000. **75**(7): p. 688-94.

618. Shetty, K., L. Rybicki, and W.D. Carey. *The Child-Pugh classification as a prognostic indicator for survival in primary sclerosing cholangitis*. Hepatology, 1997. **25**(5): p. 1049-53.
619. Kim, W.R., J.J. Poterucha, R.H. Wiesner, N.F. LaRusso, K.D. Lindor, J. Petz, T.M. Therneau, M. Malinchoc, and E.R. Dickson. *The relative role of the Child-Pugh classification and the Mayo natural history model in the assessment of survival in patients with primary sclerosing cholangitis*. Hepatology, 1999. **29**(6): p. 1643-8.
620. Fevery, J., C. Verslype, G. Lai, R. Aerts, and W. Van Steenberghe. *Incidence, diagnosis, and therapy of cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis*. Dig Dis Sci, 2007. **52**(11): p. 3123-35.
621. Beuers, U., U. Spengler, W. Kruis, U. Aydemir, B. Wiebecke, W. Heldwein, M. Weinzierl, G.R. Pape, T. Sauerbruch, and G. Paumgartner. *Ursodeoxycholic acid for treatment of primary sclerosing cholangitis: a placebo-controlled trial*. Hepatology, 1992. **16**(3): p. 707-14.
622. De Maria, N., A. Colantoni, E. Rosenbloom, and D.H. Van Thiel. *Ursodeoxycholic acid does not improve the clinical course of primary sclerosing cholangitis over a 2-year period*. Hepatogastroenterology, 1996. **43**(12): p. 1472-9.
623. Lindor, K.D. *Ursodiol for primary sclerosing cholangitis*. Mayo Primary Sclerosing Cholangitis-Ursodeoxycholic Acid Study Group. N Engl J Med, 1997. **336**(10): p. 691-5.
624. O'Brien, C.B., J.R. Senior, R. Arora-Mirchandani, A.K. Batta, and G. Salen. *Ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis: a 30-month pilot study*. Hepatology, 1991. **14**(5): p. 838-47.
625. Stiehl, A., S. Walker, L. Stiehl, G. Rudolph, W.J. Hofmann, and L. Theilmann. *Effect of ursodeoxycholic acid on liver and bile duct disease in primary sclerosing cholangitis. A 3-year pilot study with a placebo-controlled study period*. J Hepatol, 1994. **20**(1): p. 57-64.
626. Harnois, D.M., P. Angulo, R.A. Jorgensen, N.F. Larusso, and K.D. Lindor. *High-dose ursodeoxycholic acid as a therapy for patients with primary sclerosing cholangitis*. Am J Gastroenterol, 2001. **96**(5): p. 1558-62.
627. Mitchell, S.A., D.S. Bansi, N. Hunt, K. Von Bergmann, K.A. Fleming, and R.W. Chapman. *A preliminary trial of high-dose ursodeoxycholic acid in primary sclerosing cholangitis*. Gastroenterology, 2001. **121**(4): p. 900-7.
628. Okolicsanyi, L., M. Groppo, A. Floreani, A.M. Morselli-Labate, A.G. Rusticali, A. Battocchia, M. Colombo, G. Galatola, G. Gasbarrini, M. Podda, G. Ricci, F. Rosina, and M. Zuin. *Treatment of primary sclerosing cholangitis with low-dose ursodeoxycholic acid: results of a retrospective Italian multicentre survey*. Dig Liver Dis, 2003. **35**(5): p. 325-31.
629. van Hoogstraten, H.J., F.H. Wolfhagen, P.C. van de Meeberg, H. Kuiper, G.A. Nix, M.C. Becx, A.C. Hoek, D.P. van Houte, M.C. Rijk, J.M. Salemans, J. Scherpenisse, M. Schrijver, A.M. Smit, P. Spoelstra, P.H. Stadhouders, T.G. Tan, W.C. Hop, F.J. ten Kate, G.P. vanBerge-Henegouwen, S.W. Schalm, and H.R. van Buuren. *Ursodeoxycholic acid therapy for primary sclerosing cholangitis: results of a 2-year randomized controlled trial to evaluate single versus multiple daily doses*. J Hepatol, 1998. **29**(3): p. 417-23.
630. Levy, C. and K.D. Lindor. *Current management of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis*. J Hepatol, 2003. **38 Suppl 1**: p. S24-37.

631. Cullen, S.N. and R.W. Chapman. *The medical management of primary sclerosing cholangitis*. Semin Liver Dis, 2006. **26**(1): p. 52-61.
632. Baluyut, A.R., S. Sherman, G.A. Lehman, H. Hoen, and N. Chalasani. *Impact of endoscopic therapy on the survival of patients with primary sclerosing cholangitis*. Gastrointest Endosc, 2001. **53**(3): p. 308-12.
633. Sekido, H., K. Takeda, D. Morioka, T. Kubota, K. Tanaka, I. Endo, K. Nagahori, S. Togo, and H. Shimada. *Liver transplantation for primary sclerosing cholangitis*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 1999. **6**(4): p. 373-6.
634. Nashan, B., H.J. Schlitt, G. Tusch, K.J. Oldhafer, B. Ringe, S. Wagner, and R. Pichlmayr. *Biliary malignancies in primary sclerosing cholangitis: timing for liver transplantation*. Hepatology, 1996. **23**(5): p. 1105-11.
635. Graziadei, I.W., R.H. Wiesner, K.P. Batts, P.J. Marotta, N.F. LaRusso, M.K. Porayko, J.E. Hay, G.J. Gores, M.R. Charlton, J. Ludwig, J.J. Poterucha, J.L. Steers, and R.A. Krom. *Recurrence of primary sclerosing cholangitis following liver transplantation*. Hepatology, 1999. **29**(4): p. 1050-6.
636. Neuberger, J. *Primary biliary cirrhosis*. Lancet, 1997. **350**(9081): p. 875-9.
637. Kaplan, M.M. and M.E. Gershwin. *Primary biliary cirrhosis*. N Engl J Med, 2005. **353**(12): p. 1261-73.
638. Sherlock, S. and P.J. Scheuer. *The presentation and diagnosis of 100 patients with primary biliary cirrhosis*. N Engl J Med, 1973. **289**(13): p. 674-8.
639. Mahl, T.C., W. Shockcor, and J.L. Boyer. *Primary biliary cirrhosis: survival of a large cohort of symptomatic and asymptomatic patients followed for 24 years*. J Hepatol, 1994. **20**(6): p. 707-13.
640. Addison, T. and W. Gull. *On a certain affection of the skin vitiligoidea  $\alpha$  plana,  $\beta$  tuberosa*. Guy's Hosp Rep, 1851. **7**: p. 265-276.
641. Heathcote, E.J. *Primary biliary cirrhosis: historical perspective*. Clin Liver Dis, 2003. **7**(4): p. 735-40.
642. Hanot, V., *La cirrhose hypertrophique avec ictère chronique* 1892, Paris: Rueff et cie.
643. Hanot, V., *Étude sur une forme de cirrhose hypertrophique du foie (cirrhose hypertrophique avec ictère chronique)*, in Faculte de medicine de Paris 1875: Paris. p. 156.
644. Ahrens, E.H., Jr., M.A. Payne, H.G. Kunkel, W.J. Eisenmenger, and S.H. Blondheim. *Primary biliary cirrhosis*. Medicine (Baltimore), 1950. **29**(4): p. 299-364.
645. Dauphinee, J.A. and J.C. Sinclair. *Primary biliary cirrhosis*. Can Med Assoc J, 1949. **61**(1): p. 1-6.
646. Ahrens, E.H., Jr. and H.G. Kunkel. *The relationship between serum lipids and skin xanthomata in 18 patients with primary biliary cirrhosis*. J Clin Invest, 1949. **28**(6, Pt. 2): p. 1565-74.
647. Sherlock, S. *Primary billiary cirrhosis (chronic intrahepatic obstructive jaundice)*. Gastroenterology, 1959. **37**: p. 574-86.
648. Walker, J.G., D. Doniach, I.M. Roitt, and S. Sherlock. *Serological Tests in Diagnosis of Primary Biliary Cirrhosis*. Lancet, 1965. **1**(7390): p. 827-31.
649. Hamlyn, A.N. and S. Sherlock. *The epidemiology of primary biliary cirrhosis: a survey of mortality in England and Wales*. Gut, 1974. **15**(6): p. 473-9.
650. Eriksson, S. and S. Lindgren. *The prevalence and clinical spectrum of primary biliary cirrhosis in a defined population*. Scand J Gastroenterol, 1984. **19**(7): p. 971-6.

651. Hamlyn, A.N., A.F. Macklon, and O. James. *Primary biliary cirrhosis: geographical clustering and symptomatic onset seasonality*. Gut, 1983. **24**(10): p. 940-5.
652. Lofgren, J., G. Jarnerot, D. Danielsson, and I. Hemdal. *Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis in a defined population in Sweden*. Scand J Gastroenterol, 1985. **20**(5): p. 647-50.
653. Pares, A., M. Bruguera, J. Rodes, M. Villagrasa, J. Guardia, I. Seres, and F. Vilardell. *[Epidemiology of primary biliary cirrhosis in Cataluna]*. Med Clin (Barc), 1984. **82**(6): p. 237-41.
654. Stuart-Hislop, W. *Primary biliary cirrhosis: an epidemiological study*. Br Med J, 1980. **281**(6247): p. 1069-70.
655. Triger, D.R. *Primary biliary cirrhosis: an epidemiological study*. Br Med J, 1980. **281**(6243): p. 772-5.
656. Triger, D.R., P.A. Berg, and J. Rodes. *Epidemiology of primary biliary cirrhosis*. Liver, 1984. **4**(3): p. 195-200.
657. Almdal, T.P. and T.I. Sorensen. *Incidence of parenchymal liver diseases in Denmark, 1981 to 1985: analysis of hospitalization registry data. The Danish Association for the Study of the Liver*. Hepatology, 1991. **13**(4): p. 650-5.
658. Anand, A.C., E. Elias, and J.M. Neuberger. *End-stage primary biliary cirrhosis in a first generation migrant south Asian population*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1996. **8**(7): p. 663-6.
659. Balakrishnan, V. and A.S. Bhaskaran. *Primary biliary cirrhosis with pruritus in India*. Indian J Gastroenterol, 1997. **16**(3): p. 121-2.
660. Byron, D. and G.Y. Minuk. *Clinical hepatology: profile of an urban, hospital-based practice*. Hepatology, 1996. **24**(4): p. 813-5.
661. Danielsson, A., L. Boqvist, and P. Uddenfeldt. *Epidemiology of primary biliary cirrhosis in a defined rural population in the northern part of Sweden*. Hepatology, 1990. **11**(3): p. 458-64.
662. Goudie, B.M., A.D. Burt, G.J. Macfarlane, P. Boyle, C.R. Gillis, R.N. MacSween, and G. Watkinson. *Risk factors and prognosis in primary biliary cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 1989. **84**(7): p. 713-6.
663. Hurlburt, K.J., B.J. McMahon, H. Deubner, B. Hsu-Trawinski, J.L. Williams, and K.V. Kowdley. *Prevalence of autoimmune liver disease in Alaska Natives*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(9): p. 2402-7.
664. Ilan, Y. and D. Shouval. *Primary biliary cirrhosis in Israel*. Isr J Med Sci, 1992. **28**(10): p. 683-7.
665. James, O.F., R. Bhopal, D. Howel, J. Gray, A.D. Burt, and J.V. Metcalf. *Primary biliary cirrhosis once rare, now common in the United Kingdom?* Hepatology, 1999. **30**(2): p. 390-4.
666. Kim, W.R., K.D. Lindor, G.R. Locke, 3rd, T.M. Therneau, H.A. Homburger, K.P. Batts, B.P. Yawn, J.L. Petz, L.J. Melton, 3rd, and E.R. Dickson. *Epidemiology and natural history of primary biliary cirrhosis in a US community*. Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1631-6.
667. Kingham, J.G. and D.R. Parker. *The association between primary biliary cirrhosis and coeliac disease: a study of relative prevalences*. Gut, 1998. **42**(1): p. 120-2.
668. Metcalf, J.V., R.S. Bhopal, J. Gray, D. Howel, and O.F. James. *Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis in the city of Newcastle upon Tyne, England*. Int J Epidemiol, 1997. **26**(4): p. 830-6.

669. Myszor, M. and O.F. James. *The epidemiology of primary biliary cirrhosis in north-east England: an increasingly common disease?* Q J Med, 1990. **75**(276): p. 377-85.
670. Remmel, T., H. Remmel, R. Uibo, and V. Salupere. *Primary biliary cirrhosis in Estonia. With special reference to incidence, prevalence, clinical features, and outcome.* Scand J Gastroenterol, 1995. **30**(4): p. 367-71.
671. van Dam, G.M. and C.H. Gips. *Primary biliary cirrhosis (PBC) in an European country--a description of death rates in The Netherlands (1979-1992).* Hepatogastroenterology, 1996. **43**(10): p. 906-13.
672. Watson, R.G., P.W. Angus, M. Dewar, B. Goss, R.B. Sewell, and R.A. Smallwood. *Low prevalence of primary biliary cirrhosis in Victoria, Australia. Melbourne Liver Group.* Gut, 1995. **36**(6): p. 927-30.
673. Witt-Sullivan, H., J. Heathcote, K. Cauch, L. Blendis, C. Ghent, A. Katz, R. Milner, S.C. Pappas, J. Rankin, and I.R. Wanless. *The demography of primary biliary cirrhosis in Ontario, Canada.* Hepatology, 1990. **12**(1): p. 98-105.
674. Steinke, D.T., T.L. Weston, A.D. Morris, T.M. MacDonald, and J.F. Dillon. *Incidence, prevalence and resource use of primary biliary cirrhosis in Tayside, Scotland.* J Hepatol, 2001. **34**(Supplement 1): p. 181-181.
675. Ray-Chadhuri, D., E. Rigney, and K. McComack. *Epidemiology of PBC in Sheffield updated: demographics and relation to water supply.* in *British association for the study of the liver.* 2001. London.
676. Hislop, W.S., G. Main, and A.J. Robertson. *Primary biliary cirrhosis: experience in a non-referral centre.* Lancet, 1981. **2**(8238): p. 144.
677. Prince, M.I. and O.F. James. *The epidemiology of primary biliary cirrhosis.* Clin Liver Dis, 2003. **7**(4): p. 795-819.
678. Prince, M.I., A. Chetwynd, P. Diggle, M. Jarner, J.V. Metcalf, and O.F. James. *The geographical distribution of primary biliary cirrhosis in a well-defined cohort.* Hepatology, 2001. **34**(6): p. 1083-8.
679. Ala, A., C.M. Stanca, M. Bu-Ghanim, I. Ahmado, A.D. Branch, T.D. Schiano, J.A. Odin, and N. Bach. *Increased prevalence of primary biliary cirrhosis near Superfund toxic waste sites.* Hepatology, 2006. **43**(3): p. 525-31.
680. Sood, S., P.J. Gow, J.M. Christie, and P.W. Angus. *Epidemiology of primary biliary cirrhosis in Victoria, Australia: high prevalence in migrant populations.* Gastroenterology, 2004. **127**(2): p. 470-5.
681. Kumagi, T. and M. Onji. *Presentation and diagnosis of primary biliary cirrhosis in the 21st century.* Clin Liver Dis, 2008. **12**(2): p. 243-59; vii.
682. Mitchison, H.C., M.R. Lucey, P.J. Kelly, J.M. Neuberger, R. Williams, and O.F. James. *Symptom development and prognosis in primary biliary cirrhosis: a study in two centers.* Gastroenterology, 1990. **99**(3): p. 778-84.
683. Rydning, A., E. Schrumpf, M. Abdelnoor, K. Elgjo, and E. Jenssen. *Factors of prognostic importance in primary biliary cirrhosis.* Scand J Gastroenterol, 1990. **25**(2): p. 119-26.
684. Nakano, T., K. Inoue, J. Hirohara, S. Arita, K. Higuchi, M. Omata, and G. Toda. *Long-term prognosis of primary biliary cirrhosis (PBC) in Japan and analysis of the factors of stage progression in asymptomatic PBC (a-PBC).* Hepatol Res, 2002. **22**(4): p. 250-260.
685. Prince, M., A. Chetwynd, W. Newman, J.V. Metcalf, and O.F. James. *Survival and symptom progression in a geographically based cohort of patients with primary biliary cirrhosis: follow-up for up to 28 years.* Gastroenterology, 2002. **123**(4): p. 1044-51.

686. Sarin, S.K., R. Monga, B.S. Sandhu, B.C. Sharma, P. Sakhuja, and V. Malhotra. *Primary biliary cirrhosis in India*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2006. **5**(1): p. 105-9.
687. Wong, G.L., A.Y. Hui, V.W. Wong, F.K. Chan, J.J. Sung, and H.L. Chan. *A retrospective study on clinical features and prognostic factors of biopsy-proven primary biliary cirrhosis in Chinese patients*. Am J Gastroenterol, 2005. **100**(10): p. 2205-11.
688. Speiciene, D., A. Irnius, U. Leuschner, V. Liakina, T. Semuchiniene, and A. Barakauskiene. *Primary biliary cirrhosis in Lithuania: diagnosis and clinical picture*. Med Sci Monit, 2007. **13**(7): p. CR299-306.
689. Wong, R.K., S.G. Lim, A. Wee, Y.H. Chan, M.O. Aung, and C.T. Wai. *Primary biliary cirrhosis in Singapore: evaluation of demography, prognostic factors and natural course in a multi-ethnic population*. J Gastroenterol Hepatol, 2008. **23**(4): p. 599-605.
690. Long, R.G., P.J. Scheuer, and S. Sherlock. *Presentation and course of asymptomatic primary biliary cirrhosis*. Gastroenterology, 1977. **72**(6): p. 1204-7.
691. Christensen, E., J. Crowe, D. Doniach, H. Popper, L. Ranek, J. Rodes, N. Tygstrup, and R. Williams. *Clinical pattern and course of disease in primary biliary cirrhosis based on an analysis of 236 patients*. Gastroenterology, 1980. **78**(2): p. 236-46.
692. James, O., A.F. Macklon, and A.J. Watson. *Primary biliary cirrhosis--a revised clinical spectrum*. Lancet, 1981. **1**(8233): p. 1278-81.
693. Kapelman, B. and F. Schaffner. *The natural history of primary biliary cirrhosis*. Semin Liver Dis, 1981. **1**(4): p. 273-81.
694. Crowe, J., E. Christensen, D. Doniach, H. Popper, N. Tygstrup, and R. Williams. *Early features of primary biliary cirrhosis: an analysis of 85 patients*. Am J Gastroenterol, 1985. **80**(6): p. 466-8.
695. Nyberg, A. and L. Loof. *Primary biliary cirrhosis: clinical features and outcome, with special reference to asymptomatic disease*. Scand J Gastroenterol, 1989. **24**(1): p. 57-64.
696. Invernizzi, P., A. Crosignani, P.M. Battezzati, G. Covini, G. De Valle, A. Larghi, M. Zuin, and M. Podda. *Comparison of the clinical features and clinical course of antimitochondrial antibody-positive and -negative primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1997. **25**(5): p. 1090-5.
697. Springer, J., K. Cauch-Dudek, K. O'Rourke, I.R. Wanless, and E.J. Heathcote. *Asymptomatic primary biliary cirrhosis: a study of its natural history and prognosis*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(1): p. 47-53.
698. Uddenfeldt, P. and A. Danielsson. *Primary biliary cirrhosis: survival of a cohort followed for 10 years*. J Intern Med, 2000. **248**(4): p. 292-8.
699. Leuschner, U. *Primary biliary cirrhosis--presentation and diagnosis*. Clin Liver Dis, 2003. **7**(4): p. 741-58.
700. Delgado, J., A.D. Sperber, V. Novack, B. Delgado, L. Edelman, N. Gaspar, P. Krugliak, S. Odes, A.B. Jotkowitz, M. Faszczuk, and A. Fich. *The epidemiology of primary biliary cirrhosis in southern Israel*. Isr Med Assoc J, 2005. **7**(11): p. 717-21.
701. Peters, M.G., A.M. Di Bisceglie, K.V. Kowdley, N.L. Flye, V.A. Luketic, S.J. Munoz, G. Garcia-Tsao, T.D. Boyer, J.R. Lake, M. Bonacini, and B. Combes. *Differences between Caucasian, African American, and Hispanic patients with*

- primary biliary cirrhosis in the United States*. Hepatology, 2007. **46**(3): p. 769-75.
702. Pla, X., M. Vergara, M. Gil, B. Dalmau, B. Cistero, R.M. Bella, and J. Real. *Incidence, prevalence and clinical course of primary biliary cirrhosis in a Spanish community*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2007. **19**(10): p. 859-64.
  703. Rishe, E., A. Azarm, and N.V. Bergasa. *Itch in primary biliary cirrhosis: a patients' perspective*. Acta Derm Venereol, 2008. **88**(1): p. 34-7.
  704. Bergasa, N.V., D.W. Alling, T.L. Talbot, M.G. Swain, C. Yurdaydin, M.L. Turner, J.M. Schmitt, E.C. Walker, and E.A. Jones. *Effects of naloxone infusions in patients with the pruritus of cholestasis. A double-blind, randomized, controlled trial*. Ann Intern Med, 1995. **123**(3): p. 161-7.
  705. Talwalkar, J.A., E. Souto, R.A. Jorgensen, and K.D. Lindor. *Natural history of pruritus in primary biliary cirrhosis*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2003. **1**(4): p. 297-302.
  706. Newton, J.L., N. Bhala, J. Burt, and D.E. Jones. *Characterisation of the associations and impact of symptoms in primary biliary cirrhosis using a disease specific quality of life measure*. J Hepatol, 2006. **44**(4): p. 776-83.
  707. Kirby, J., K.W. Heaton, and J.L. Burton. *Pruritic effect of bile salts*. Br Med J, 1974. **4**(5946): p. 693-5.
  708. Varadi, D.P. *Pruritus induced by crude bile and purified bile acids. Experimental production of pruritus in human skin*. Arch Dermatol, 1974. **109**(5): p. 678-81.
  709. Murphy, G.M., A. Ross, and B.H. Billing. *Serum bile acids in primary biliary cirrhosis*. Gut, 1972. **13**(3): p. 201-6.
  710. Ghent, C.N., J.R. Bloomer, and G. Klatskin. *Elevations in skin tissue levels of bile acids in human cholestasis: relation to serum levels and toporitus*. Gastroenterology, 1977. **73**(5): p. 1125-30.
  711. Ghent, C.N. *Pruritus of cholestasis is related to effects of bile salts on the liver, not the skin*. Am J Gastroenterol, 1987. **82**(2): p. 117-8.
  712. Podesta, A., P. Lopez, R. Terg, F. Villamil, D. Flores, R. Mastai, C.B. Udaondo, and J.P. Companc. *Treatment of pruritus of primary biliary cirrhosis with rifampin*. Dig Dis Sci, 1991. **36**(2): p. 216-20.
  713. Jones, E.A. and N.V. Bergasa. *The pruritus of cholestasis: from bile acids to opiate agonists*. Hepatology, 1990. **11**(5): p. 884-7.
  714. Thornton, J.R. and M.S. Losowsky. *Opioid peptides and primary biliary cirrhosis*. Bmj, 1988. **297**(6662): p. 1501-4.
  715. Bergasa, N.V. *Pruritus in primary biliary cirrhosis: pathogenesis and therapy*. Clin Liver Dis, 2008. **12**(2): p. 385-406; x.
  716. Bergasa, N.V., S. Liau, P. Homel, and V. Ghali. *Hepatic Met-enkephalin immunoreactivity is enhanced in primary biliary cirrhosis*. Liver, 2002. **22**(2): p. 107-13.
  717. Cauch-Dudek, K., S. Abbey, D.E. Stewart, and E.J. Heathcote. *Fatigue in primary biliary cirrhosis*. Gut, 1998. **43**(5): p. 705-10.
  718. Colina, F., F. Pinedo, J.A. Solis, D. Moreno, and M. Nevado. *Nodular regenerative hyperplasia of the liver in early histological stages of primary biliary cirrhosis*. Gastroenterology, 1992. **102**(4 Pt 1): p. 1319-24.
  719. Bressler, B., R. Pinto, D. El-Ashry, and E.J. Heathcote. *Which patients with primary biliary cirrhosis or primary sclerosing cholangitis should undergo endoscopic screening for oesophageal varices detection?* Gut, 2005. **54**(3): p. 407-10.



720. Takeshita, E., T. Kumagi, H. Matsui, M. Abe, S. Furukawa, Y. Ikeda, B. Matsuura, K. Michitaka, N. Horiike, and M. Onji. *Esophagogastric varices as a prognostic factor for the determination of clinical stage in patients with primary biliary cirrhosis*. J Gastroenterol, 2003. **38**(11): p. 1060-5.
721. Murata, Y., M. Abe, S. Furukawa, T. Kumagi, H. Matsui, K. Matsuura, B. Matsuura, Y. Hiasa, and M. Onji. *Clinical features of symptomatic primary biliary cirrhosis initially complicated with esophageal varices*. J Gastroenterol, 2006. **41**(12): p. 1220-6.
722. Munoz, S.J., J.E. Heubi, W.F. Balistreri, and W.C. Maddrey. *Vitamin E deficiency in primary biliary cirrhosis: gastrointestinal malabsorption, frequency and relationship to other lipid-soluble vitamins*. Hepatology, 1989. **9**(4): p. 525-31.
723. Hohenester, S., R.P. Oude-Elferink, and U. Beuers. *Primary biliary cirrhosis*. Semin Immunopathol, 2009. **31**(3): p. 283-307.
724. Pares, A. and N. Guanabens. *Osteoporosis in primary biliary cirrhosis: pathogenesis and treatment*. Clin Liver Dis, 2008. **12**(2): p. 407-24; x.
725. Matloff, D.S., M.M. Kaplan, R.M. Neer, M.J. Goldberg, W. Bitman, and H.J. Wolfe. *Osteoporosis in primary biliary cirrhosis: effects of 25-hydroxyvitamin D3 treatment*. Gastroenterology, 1982. **83**(1 Pt 1): p. 97-102.
726. Cuthbert, J.A., C.Y. Pak, J.E. Zerwekh, K.D. Glass, and B. Combes. *Bone disease in primary biliary cirrhosis: increased bone resorption and turnover in the absence of osteoporosis or osteomalacia*. Hepatology, 1984. **4**(1): p. 1-8.
727. Hodgson, S.F., E.R. Dickson, H.W. Wahner, K.A. Johnson, K.G. Mann, and B.L. Riggs. *Bone loss and reduced osteoblast function in primary biliary cirrhosis*. Ann Intern Med, 1985. **103**(6 ( Pt 1)): p. 855-60.
728. Stellon, A.J., A. Webb, J. Compston, and R. Williams. *Low bone turnover state in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1987. **7**(1): p. 137-42.
729. Mitchison, H.C., M.F. Bassendine, A.J. Malcolm, A.J. Watson, C.O. Record, and O.F. James. *A pilot, double-blind, controlled 1-year trial of prednisolone treatment in primary biliary cirrhosis: hepatic improvement but greater bone loss*. Hepatology, 1989. **10**(4): p. 420-9.
730. Guanabens, N., A. Pares, L. Marinoso, M.A. Brancos, C. Piera, S. Serrano, F. Rivera, and J. Rodes. *Factors influencing the development of metabolic bone disease in primary biliary cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 1990. **85**(10): p. 1356-62.
731. Guanabens, N., A. Pares, M. Navasa, M.J. Martinez de Osaba, M.E. Hernandez, J. Munoz, and J. Rodes. *Cyclosporin A increases the biochemical markers of bone remodeling in primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 1994. **21**(1): p. 24-8.
732. Lindor, K.D., C.H. Janes, J.S. Crippin, R.A. Jorgensen, and E.R. Dickson. *Bone disease in primary biliary cirrhosis: does ursodeoxycholic acid make a difference?* Hepatology, 1995. **21**(2): p. 389-92.
733. Pereira, S.P., G.P. Bray, P.I. Pitt, F. Li, C. Moniz, and R. Williams. *Non-invasive assessment of bone density in primary biliary cirrhosis*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1999. **11**(3): p. 323-8.
734. Springer, J.E., D.E. Cole, L.A. Rubin, K. Cauch-Dudek, L. Harewood, J. Evrovski, V.D. Peltekova, and E.J. Heathcote. *Vitamin D-receptor genotypes as independent genetic predictors of decreased bone mineral density in primary biliary cirrhosis*. Gastroenterology, 2000. **118**(1): p. 145-51.

735. Menon, K.V., P. Angulo, S. Weston, E.R. Dickson, and K.D. Lindor. *Bone disease in primary biliary cirrhosis: independent indicators and rate of progression*. J Hepatol, 2001. **35**(3): p. 316-23.
736. Newton, J., R. Francis, M. Prince, O. James, M. Bassendine, D. Rawlings, and D. Jones. *Osteoporosis in primary biliary cirrhosis revisited*. Gut, 2001. **49**(2): p. 282-7.
737. Pares, A., N. Guanabens, L. Alvarez, M.J. De Osaba, J. Oriola, F. Pons, L. Caballeria, A. Monegal, G. Salvador, J. Jo, P. Peris, F. Rivera, A.M. Ballesta, and J. Rodes. *Collagen type I  $\alpha$ 1 and vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mass in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2001. **33**(3): p. 554-60.
738. Le Gars, L., C. Grandpierre, O. Chazouilleres, F. Berenbaum, and R. Poupon. *Bone loss in primary biliary cirrhosis: absence of association with severity of liver disease*. Joint Bone Spine, 2002. **69**(2): p. 195-200.
739. Guichelaar, M.M., M. Malinchoc, J. Sibonga, B.L. Clarke, and J.E. Hay. *Bone metabolism in advanced cholestatic liver disease: analysis by bone histomorphometry*. Hepatology, 2002. **36**(4 Pt 1): p. 895-903.
740. Solerio, E., G. Isaia, R. Innarella, M. Di Stefano, M. Farina, E. Borghesio, L. Framarin, M. Rizzetto, and F. Rosina. *Osteoporosis: still a typical complication of primary biliary cirrhosis?* Dig Liver Dis, 2003. **35**(5): p. 339-46.
741. Pereira, S.P., J. O'Donohue, C. Moniz, M.G. Phillips, H. Abraha, M. Buxton-Thomas, and R. Williams. *Transdermal hormone replacement therapy improves vertebral bone density in primary biliary cirrhosis: results of a 1-year controlled trial*. Aliment Pharmacol Ther, 2004. **19**(5): p. 563-70.
742. Guanabens, N., A. Pares, I. Ros, L. Caballeria, F. Pons, S. Vidal, A. Monegal, P. Peris, and J. Rodes. *Severity of cholestasis and advanced histological stage but not menopausal status are the major risk factors for osteoporosis in primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 2005. **42**(4): p. 573-7.
743. Guichelaar, M.M., R. Kendall, M. Malinchoc, and J.E. Hay. *Bone mineral density before and after OLT: long-term follow-up and predictive factors*. Liver Transpl, 2006. **12**(9): p. 1390-402.
744. Hodgson, S.F., E.R. Dickson, R. Eastell, E.F. Eriksen, S.C. Bryant, and B.L. Riggs. *Rates of cancellous bone remodeling and turnover in osteopenia associated with primary biliary cirrhosis*. Bone, 1993. **14**(6): p. 819-27.
745. Cockayne, S., J. Adamson, S. Lanham-New, M.J. Shearer, S. Gilbody, and D.J. Torgerson. *Vitamin K and the prevention of fractures: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Arch Intern Med, 2006. **166**(12): p. 1256-61.
746. Shibuya, A., K. Tanaka, H. Miyakawa, M. Shibata, M. Takatori, K. Sekiyama, N. Hashimoto, S. Amaki, T. Komatsu, and T. Morizane. *Hepatocellular carcinoma and survival in patients with primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2002. **35**(5): p. 1172-8.
747. Caballeria, L., A. Pares, A. Castells, A. Gines, C. Bru, and J. Rodes. *Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: similar incidence to that in hepatitis C virus-related cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 2001. **96**(4): p. 1160-3.
748. Cavazza, A., L. Caballeria, A. Floreani, F. Farinati, M. Bruguera, D. Caroli, and A. Pares. *Incidence, risk factors, and survival of hepatocellular carcinoma*

- in primary biliary cirrhosis: comparative analysis from two centers.* Hepatology, 2009. **50**(4): p. 1162-8.
749. Deutsch, M., G.V. Papatheodoridis, A. Tzakou, and S.J. Hadziyannis. *Risk of hepatocellular carcinoma and extrahepatic malignancies in primary biliary cirrhosis.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2008. **20**(1): p. 5-9.
  750. Piscaglia, F. and E. Sagrini. *Malignancies in primary biliary cirrhosis.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2008. **20**(1): p. 1-4.
  751. Sorokin, A., J.L. Brown, and P.D. Thompson. *Primary biliary cirrhosis, hyperlipidemia, and atherosclerotic risk: a systematic review.* Atherosclerosis, 2007. **194**(2): p. 293-9.
  752. Gylling, H., M. Farkkila, M. Vuoristo, and T.A. Miettinen. *Metabolism of cholesterol and low- and high-density lipoproteins in primary biliary cirrhosis: cholesterol absorption and synthesis related to lipoprotein levels and their kinetics.* Hepatology, 1995. **21**(1): p. 89-95.
  753. Chang, P.Y., S.C. Lu, T.C. Su, S.F. Chou, W.H. Huang, J.D. Morrisett, C.H. Chen, C.S. Liao, and Y.T. Lee. *Lipoprotein-X reduces LDL atherogenicity in primary biliary cirrhosis by preventing LDL oxidation.* J Lipid Res, 2004. **45**(11): p. 2116-22.
  754. Edwards, C.M., M.P. Otal, and P.W. Stacpoole. *Lipoprotein-X fails to inhibit hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase in HepG2 cells.* Metabolism, 1993. **42**(7): p. 807-13.
  755. Walli, A.K. and D. Seidel. *Role of lipoprotein-X in the pathogenesis of cholestatic hypercholesterolemia. Uptake of lipoprotein-X and its effect on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and chylomicron remnant removal in human fibroblasts, lymphocytes, and in the rat.* J Clin Invest, 1984. **74**(3): p. 867-79.
  756. Rosenson, R.S., A.L. Baker, M.J. Chow, and R.V. Hay. *Hyperviscosity syndrome in a hypercholesterolemic patient with primary biliary cirrhosis.* Gastroenterology, 1990. **98**(5 Pt 1): p. 1351-7.
  757. Jahn, C.E., E.J. Schaefer, L.A. Taam, J.H. Hoofnagle, F.T. Lindgren, J.J. Albers, E.A. Jones, and H.B. Brewer, Jr. *Lipoprotein abnormalities in primary biliary cirrhosis. Association with hepatic lipase inhibition as well as altered cholesterol esterification.* Gastroenterology, 1985. **89**(6): p. 1266-78.
  758. Miller, J.P. *Dyslipoproteinaemia of liver disease.* Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1990. **4**(4): p. 807-32.
  759. Muller, P., R. Felin, J. Lambrecht, B. Agostini, H. Wieland, W. Rost, and D. Seidel. *Hypertriglyceridaemia secondary to liver disease.* Eur J Clin Invest, 1974. **4**(6): p. 419-28.
  760. du Vivier, A., *Atlas of clinical dermatology* 1997, London: Gower medical publishing.
  761. Talwalkar, J.A. and K.D. Lindor. *Primary biliary cirrhosis.* Lancet, 2003. **362**(9377): p. 53-61.
  762. Tsianos, E.V., J.H. Hoofnagle, P.C. Fox, M. Alspaugh, E.A. Jones, D.F. Schaefer, and H.M. Moutsopoulos. *Sjogren's syndrome in patients with primary biliary cirrhosis.* Hepatology, 1990. **11**(5): p. 730-4.
  763. Angulo, P. and K.D. Lindor. *Primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis.* Clin Liver Dis, 1999. **3**(3): p. 529-70.
  764. Pares, A., A. Rimola, M. Bruguera, E. Mas, and J. Rodes. *Renal tubular acidosis in primary biliary cirrhosis.* Gastroenterology, 1981. **80**(4): p. 681-6.

765. Prince, M.I., A. Chetwynd, W.L. Craig, J.V. Metcalf, and O.F. James. *Asymptomatic primary biliary cirrhosis: clinical features, prognosis, and symptom progression in a large population based cohort*. Gut, 2004. **53**(6): p. 865-70.
766. Zachou, K., E. Rigopoulou, C. Liaskos, K. Patsiaoura, E. Makri, N. Stathakis, and G.N. Dalekos. *Primary biliary cirrhosis presented as peripheral eosinophilia in asymptomatic women with or without elevated alkaline phosphatase*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2004. **16**(4): p. 425-8.
767. Mackay, I.R. *Primary biliary cirrhosis showing a high titer of autoantibody; report of a case*. N Engl J Med, 1958. **258**(4): p. 185-8.
768. Doniach, D., I.M. Roitt, J.G. Walker, and S. Sherlock. *Tissue antibodies in primary biliary cirrhosis, active chronic (lupoid) hepatitis, cryptogenic cirrhosis and other liver diseases and their clinical implications*. Clin Exp Immunol, 1966. **1**(3): p. 237-62.
769. Berg, P.A., D. Doniach, and I.M. Roitt. *Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. I. Localization of the antigen to mitochondrial membranes*. J Exp Med, 1967. **126**(2): p. 277-90.
770. Berg, P.A., R. Klein, J. Lindenborn-Fotinos, and W. Kloppel. *ATPase-associated antigen (M2): marker antigen for serological diagnosis of primary biliary cirrhosis*. Lancet, 1982. **2**(8313): p. 1423-6.
771. Lindenborn-Fotinos, J., H. Baum, and P.A. Berg. *Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis: species and nonspecies specific determinants of M2 antigen*. Hepatology, 1985. **5**(5): p. 763-9.
772. Frazer, I.H., I.R. Mackay, T.W. Jordan, S. Whittingham, and S. Marzuki. *Reactivity of anti-mitochondrial autoantibodies in primary biliary cirrhosis: definition of two novel mitochondrial polypeptide autoantigens*. J Immunol, 1985. **135**(3): p. 1739-45.
773. Baum, H. and P.A. Berg. *The complex nature of mitochondrial antibodies and their relation to primary biliary cirrhosis*. Semin Liver Dis, 1981. **1**(4): p. 309-21.
774. Bassendine, M.F., D.E. Jones, and S.J. Yeaman. *Biochemistry and autoimmune response to the 2-oxoacid dehydrogenase complexes in primary biliary cirrhosis*. Semin Liver Dis, 1997. **17**(1): p. 49-60.
775. Yeaman, S.J. *The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances*. Biochem J, 1989. **257**(3): p. 625-32.
776. Yeaman, S.J., J.A. Kirby, and D.E. Jones. *Autoreactive responses to pyruvate dehydrogenase complex in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis*. Immunol Rev, 2000. **174**: p. 238-49.
777. De Marcucci, O. and J.G. Lindsay. *Component X. An immunologically distinct polypeptide associated with mammalian pyruvate dehydrogenase multi-enzyme complex*. Eur J Biochem, 1985. **149**(3): p. 641-8.
778. Gershwin, M.E., I.R. Mackay, A. Sturgess, and R.L. Coppel. *Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis*. J Immunol, 1987. **138**(10): p. 3525-31.
779. Van de Water, J., M.E. Gershwin, P. Leung, A. Ansari, and R.L. Coppel. *The autoepitope of the 74-kD mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis corresponds to the functional site of dihydrolipoamide acetyltransferase*. J Exp Med, 1988. **167**(6): p. 1791-9.

780. Yeaman, S.J., S.P. Fussey, D.J. Danner, O.F. James, D.J. Mutimer, and M.F. Bassendine. *Primary biliary cirrhosis: identification of two major M2 mitochondrial autoantigens*. *Lancet*, 1988. **1**(8594): p. 1067-70.
781. Leung, P.S., R.L. Coppel, A. Ansari, S. Munoz, and M.E. Gershwin. *Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis*. *Semin Liver Dis*, 1997. **17**(1): p. 61-9.
782. Baum, H. *Mitochondrial antigens, molecular mimicry and autoimmune disease*. *Biochim Biophys Acta*, 1995. **1271**(1): p. 111-21.
783. Dubel, L., A. Tanaka, P.S. Leung, J. Van de Water, R. Coppel, T. Roche, C. Johanet, Y. Motokawa, A. Ansari, and M.E. Gershwin. *Autoepitope mapping and reactivity of autoantibodies to the dihydrolipoamide dehydrogenase-binding protein (E3BP) and the glycine cleavage proteins in primary biliary cirrhosis*. *Hepatology*, 1999. **29**(4): p. 1013-8.
784. Palmer, J.M., D.E. Jones, J. Quinn, A. McHugh, and S.J. Yeaman. *Characterization of the autoantibody responses to recombinant E3 binding protein (protein X) of pyruvate dehydrogenase in primary biliary cirrhosis*. *Hepatology*, 1999. **30**(1): p. 21-6.
785. Surh, C.D., T.E. Roche, D.J. Danner, A. Ansari, R.L. Coppel, T. Prindiville, E.R. Dickson, and M.E. Gershwin. *Antimitochondrial autoantibodies in primary biliary cirrhosis recognize cross-reactive epitope(s) on protein X and dihydrolipoamide acetyltransferase of pyruvate dehydrogenase complex*. *Hepatology*, 1989. **10**(2): p. 127-33.
786. Muratori, L., A. Granito, P. Muratori, G. Pappas, and F.B. Bianchi. *Antimitochondrial antibodies and other antibodies in primary biliary cirrhosis: diagnostic and prognostic value*. *Clin Liver Dis*, 2008. **12**(2): p. 261-76; vii.
787. Berg, P.A., R. Klein, and J. Lindenborn-Fotinos. *Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis*. *J Hepatol*, 1986. **2**(1): p. 123-31.
788. Klein, R., G. Kloppel, W. Garbe, V. Fintelmann, and P.A. Berg. *Antimitochondrial antibody profiles determined at early stages of primary biliary cirrhosis differentiate between a benign and a progressive course of the disease. A retrospective analysis of 76 patients over 6-18 years*. *J Hepatol*, 1991. **12**(1): p. 21-7.
789. Joshi, S., K. Cauch-Dudek, E.J. Heathcote, K. Lindor, R. Jorgensen, and R. Klein. *Antimitochondrial antibody profiles: are they valid prognostic indicators in primary biliary cirrhosis?* *Am J Gastroenterol*, 2002. **97**(4): p. 999-1002.
790. Miyakawa, H., A. Tanaka, K. Kikuchi, M. Matsushita, E. Kitazawa, N. Kawaguchi, H. Fujikawa, and M.E. Gershwin. *Detection of antimitochondrial autoantibodies in immunofluorescent AMA-negative patients with primary biliary cirrhosis using recombinant autoantigens*. *Hepatology*, 2001. **34**(2): p. 243-8.
791. Van de Water, J., A. Cooper, C.D. Surh, R. Coppel, D. Danner, A. Ansari, R. Dickson, and M.E. Gershwin. *Detection of autoantibodies to recombinant mitochondrial proteins in patients with primary biliary cirrhosis*. *N Engl J Med*, 1989. **320**(21): p. 1377-80.
792. Gabeta, S., G.L. Norman, C. Liaskos, P.A. Papamichalis, T. Zografos, A. Garagounis, E.I. Rigopoulou, and G.N. Dalekos. *Diagnostic relevance and clinical significance of the new enhanced performance M2 (MIT3) ELISA for*

- the detection of IgA and IgG antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis.* J Clin Immunol, 2007. **27**(4): p. 378-87.
793. Mitchison, H.C., M.F. Bassendine, A. Hendrick, M.K. Bennett, G. Bird, A.J. Watson, and O.F. James. *Positive antimitochondrial antibody but normal alkaline phosphatase: is this primary biliary cirrhosis?* Hepatology, 1986. **6**(6): p. 1279-84.
  794. Metcalf, J.V., H.C. Mitchison, J.M. Palmer, D.E. Jones, M.F. Bassendine, and O.F. James. *Natural history of early primary biliary cirrhosis.* Lancet, 1996. **348**(9039): p. 1399-402.
  795. Van Norstrand, M.D., M. Malinchoc, K.D. Lindor, T.M. Therneau, M.E. Gershwin, P.S. Leung, E.R. Dickson, and H.A. Homburger. *Quantitative measurement of autoantibodies to recombinant mitochondrial antigens in patients with primary biliary cirrhosis: relationship of levels of autoantibodies to disease progression.* Hepatology, 1997. **25**(1): p. 6-11.
  796. Heseltine, L., I.B. Turner, S.P. Fussey, P.J. Kelly, O.F. James, S.J. Yeaman, and M.F. Bassendine. *Primary biliary cirrhosis. Quantitation of autoantibodies to purified mitochondrial enzymes and correlation with disease progression.* Gastroenterology, 1990. **99**(6): p. 1786-92.
  797. Klein, R., H. Pointner, W. Zilly, B. Glassner-Bittner, N. Breuer, W. Garbe, V. Fintelmann, J.F. Kalk, D. Muting, R. Fischer, W. Tittor, J. Pausch, K.P. Maier, and P.A. Berg. *Antimitochondrial antibody profiles in primary biliary cirrhosis distinguish at early stages between a benign and a progressive course: a prospective study on 200 patients followed for 10 years.* Liver, 1997. **17**(3): p. 119-28.
  798. Muratori, L., P. Muratori, A. Granito, R. Ferrari, L. Veronesi, M. Lenzi, and F.B. Bianchi. *The Western immunoblotting pattern of anti-mitochondrial antibodies is independent of the clinical expression of primary biliary cirrhosis.* Dig Liver Dis, 2005. **37**(2): p. 108-12.
  799. Masuda, J., K. Omagari, K. Ohba, H. Hazama, Y. Kadokawa, H. Kinoshita, K. Hayashida, K. Hayashida, H. Ishibashi, Y. Nakanuma, and S. Kohno. *Correlation between histopathological findings of the liver and IgA class antibodies to 2-oxo-acid dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis.* Dig Dis Sci, 2003. **48**(5): p. 932-8.
  800. Omagari, K., Y. Kadokawa, M. Nakamura, S. Akazawa, K. Ohba, K. Ohnita, Y. Mizuta, M. Daikoku, H. Yatsushashi, H. Ishibashi, and S. Kohno. *IgA class antibodies to 2-oxo-acid dehydrogenase complex are not predictive markers of histopathological progression in primary biliary cirrhosis.* Autoimmunity, 2006. **39**(2): p. 107-12.
  801. Kisand, K.E., K.V. Kisand, A.L. Karvonen, M. Vuoristo, J. Mattila, J. Makinen, and R. Uibo. *Antibodies to pyruvate dehydrogenase in primary biliary cirrhosis: correlation with histology.* APMIS, 1998. **106**(9): p. 884-92.
  802. Rigopoulou, E.I., E.T. Davies, D.P. Bogdanos, C. Liaskos, M. Mytilinaiou, G.K. Koukoulis, G.N. Dalekos, and D. Vergani. *Antimitochondrial antibodies of immunoglobulin G3 subclass are associated with a more severe disease course in primary biliary cirrhosis.* Liver Int, 2007. **27**(9): p. 1226-31.
  803. Goudie, R.B., R.N. Macsween, and D.M. Goldberg. *Serological and histological diagnosis of primary biliary cirrhosis.* J Clin Pathol, 1966. **19**(6): p. 527-38.

804. Hadziyannis, S., P.J. Scheuer, T. Feizi, R. Naccarato, D. Doniach, and S. Sherlock. *Immunological and histological studies in primary biliary cirrhosis*. J Clin Pathol, 1970. **23**(2): p. 95-8.
805. Brunner, G. and O. Klinge. [*A chronic destructive non-suppurative cholangitis-like disease picture with antinuclear antibodies (immunocholangitis)*]. Dtsch Med Wochenschr, 1987. **112**(38): p. 1454-8.
806. Ben-Ari, Z., A.P. Dhillon, and S. Sherlock. *Autoimmune cholangiopathy: part of the spectrum of autoimmune chronic active hepatitis*. Hepatology, 1993. **18**(1): p. 10-5.
807. Michieletti, P., I.R. Wanless, A. Katz, P.J. Scheuer, S.J. Yeaman, M.F. Bassendine, J.M. Palmer, and E.J. Heathcote. *Antimitochondrial antibody negative primary biliary cirrhosis: a distinct syndrome of autoimmune cholangitis*. Gut, 1994. **35**(2): p. 260-5.
808. Taylor, S.L., P.J. Dean, and C.A. Riely. *Primary autoimmune cholangitis. An alternative to antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis*. Am J Surg Pathol, 1994. **18**(1): p. 91-9.
809. Lacerda, M.A., J. Ludwig, E.R. Dickson, R.A. Jorgensen, and K.D. Lindor. *Antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 1995. **90**(2): p. 247-9.
810. Goodman, Z.D., P.R. McNally, D.R. Davis, and K.G. Ishak. *Autoimmune cholangitis: a variant of primary biliary cirrhosis. Clinicopathologic and serologic correlations in 200 cases*. Dig Dis Sci, 1995. **40**(6): p. 1232-42.
811. Kinoshita, H., K. Omagari, S. Whittingham, Y. Kato, H. Ishibashi, K. Sugi, M. Yano, S. Kohno, Y. Nakanuma, E. Penner, J. Wesierska-Gadek, S. Reynoso-Paz, M.E. Gershwin, J. Anderson, J.A. Jois, and I.R. Mackay. *Autoimmune cholangitis and primary biliary cirrhosis--an autoimmune enigma*. Liver, 1999. **19**(2): p. 122-8.
812. Kitami, N., T. Komada, H. Ishii, H. Shimizu, H. Adachi, Y. Yamaguchi, T. Kitamura, H. Oide, A. Miyazaki, M. Ishikawa, and et al. *Immunological study of anti-M2 in antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis*. Intern Med, 1995. **34**(6): p. 496-501.
813. Nakajima, M., H. Shimizu, A. Miyazaki, S. Watanabe, N. Kitami, and N. Sato. *Detection of IgA, IgM, and IgG subclasses of anti-M2 antibody by immunoblotting in autoimmune cholangitis: is autoimmune cholangitis an early stage of primary biliary cirrhosis?* J Gastroenterol, 1999. **34**(5): p. 607-12.
814. Nakanuma, Y., K. Harada, K. Kaji, S. Terasaki, K. Tsuneyama, S. Moteki, J. Van de Water, P.S. Leung, and M.E. Gershwin. *Clinicopathological study of primary biliary cirrhosis negative for antimitochondrial antibodies*. Liver, 1997. **17**(6): p. 281-7.
815. Sakauchi, F., M. Mori, M. Zeniya, and G. Toda. *Antimitochondrial antibody negative primary biliary cirrhosis in Japan: utilization of clinical data when patients applied to receive public financial aid*. J Epidemiol, 2006. **16**(1): p. 30-4.
816. Muratori, P., L. Muratori, R. Ferrari, F. Cassani, G. Bianchi, M. Lenzi, L. Rodrigo, A. Linares, D. Fuentes, and F.B. Bianchi. *Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 2003. **98**(2): p. 431-7.
817. Bandin, O., J.C. Courvalin, R. Poupon, L. Dubel, J.C. Homberg, and C. Johanet. *Specificity and sensitivity of gp210 autoantibodies detected using an*

- enzyme-linked immunosorbent assay and a synthetic polypeptide in the diagnosis of primary biliary cirrhosis.* Hepatology, 1996. **23**(5): p. 1020-4.
818. Kim, W.R., J.J. Poterucha, R.A. Jorgensen, K.P. Batts, H.A. Homburger, E.R. Dickson, R.A. Krom, R.H. Wiesner, and K.D. Lindor. *Does antimitochondrial antibody status affect response to treatment in patients with primary biliary cirrhosis? Outcomes of ursodeoxycholic acid therapy and liver transplantation.* Hepatology, 1997. **26**(1): p. 22-6.
  819. Gisbert, J.P., E.A. Jones, J.M. Pajares, and R. Moreno-Otero. *Review article: is there an optimal therapeutic regimen for antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis (autoimmune cholangitis)?* Aliment Pharmacol Ther, 2003. **17**(1): p. 17-27.
  820. Sternsdorf, T., K. Jensen, B. Reich, and H. Will. *The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers.* J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12555-66.
  821. Szosteki, C., H.H. Guldner, H.J. Netter, and H. Will. *Isolation and characterization of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis.* J Immunol, 1990. **145**(12): p. 4338-47.
  822. Szosteki, C., H. Will, H.J. Netter, and H.H. Guldner. *Autoantibodies to the nuclear Sp100 protein in primary biliary cirrhosis and associated diseases: epitope specificity and immunoglobulin class distribution.* Scand J Immunol, 1992. **36**(4): p. 555-64.
  823. Zuchner, D., T. Sternsdorf, C. Szosteki, E.J. Heathcote, K. Cauch-Dudek, and H. Will. *Prevalence, kinetics, and therapeutic modulation of autoantibodies against Sp100 and promyelocytic leukemia protein in a large cohort of patients with primary biliary cirrhosis.* Hepatology, 1997. **26**(5): p. 1123-30.
  824. Muratori, P., L. Muratori, F. Cassani, P. Terlizzi, M. Lenzi, L. Rodrigo, and F.B. Bianchi. *Anti-multiple nuclear dots (anti-MND) and anti-SP100 antibodies in hepatic and rheumatological disorders.* Clin Exp Immunol, 2002. **127**(1): p. 172-5.
  825. Wichmann, I., M.A. Montes-Cano, N. Respaldiza, A. Alvarez, K. Walter, E. Franco, J. Sanchez-Roman, and A. Nunez-Roldan. *Clinical significance of anti-multiple nuclear dots/Sp100 autoantibodies.* Scand J Gastroenterol, 2003. **38**(9): p. 996-9.
  826. Sternsdorf, T., H.H. Guldner, C. Szosteki, T. Grotzinger, and H. Will. *Two nuclear dot-associated proteins, PML and Sp100, are often co-autoimmunogenic in patients with primary biliary cirrhosis.* Scand J Immunol, 1995. **42**(2): p. 257-68.
  827. Janka, C., C. Selmi, M.E. Gershwin, H. Will, and T. Sternsdorf. *Small ubiquitin-related modifiers: A novel and independent class of autoantigens in primary biliary cirrhosis.* Hepatology, 2005. **41**(3): p. 609-16.
  828. Granito, A., W.H. Yang, L. Muratori, M.J. Lim, A. Nakajima, S. Ferri, G. Pappas, C. Quarneri, F.B. Bianchi, D.B. Bloch, and P. Muratori. *PML nuclear body component Sp140 is a novel autoantigen in primary biliary cirrhosis.* Am J Gastroenterol, 2010. **105**(1): p. 125-31.
  829. Itoh, S., T. Ichida, T. Yoshida, A. Hayakawa, M. Uchida, T. Tashiro-Itoh, Y. Matsuda, K. Ishihara, and H. Asakura. *Autoantibodies against a 210 kDa glycoprotein of the nuclear pore complex as a prognostic marker in patients*



- with primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*, 1998. **13**(3): p. 257-65.
830. Mattalia, A., B. Luttig, F. Rosina, P.S. Leung, J. Van de Water, M. Bauducci, A. Ciancio, K.H. Boker, H. Worman, R.L. Cooper, M. Manns, A. Ansari, M. Rizzetto, and M.E. Gershwin. *Persistence of autoantibodies against recombinant mitochondrial and nuclear pore proteins after orthotopic liver transplantation for primary biliary cirrhosis*. *J Autoimmun*, 1997. **10**(5): p. 491-7.
  831. Nickowitz, R.E., R.W. Wozniak, F. Schaffner, and H.J. Worman. *Autoantibodies against integral membrane proteins of the nuclear envelope in patients with primary biliary cirrhosis*. *Gastroenterology*, 1994. **106**(1): p. 193-9.
  832. Wesierska-Gadek, J., H. Hohenauer, E. Hitchman, and E. Penner. *Anti-gp210 antibodies in sera of patients with primary biliary cirrhosis. Identification of a 64 kD fragment of gp210 as a major epitope*. *Hum Antibodies Hybridomas*, 1996. **7**(4): p. 167-74.
  833. Lozano, F., A. Pares, L. Borche, M. Plana, T. Gallart, J. Rodes, and J. Vives. *Autoantibodies against nuclear envelope-associated proteins in primary biliary cirrhosis*. *Hepatology*, 1988. **8**(4): p. 930-8.
  834. Lassoued, K., R. Brenard, F. Degos, J.C. Courvalin, C. Andre, F. Danon, J.C. Brouet, Y. Zine-el-Abidine, C. Degott, S. Zafrani, and et al. *Antinuclear antibodies directed to a 200-kilodalton polypeptide of the nuclear envelope in primary biliary cirrhosis. A clinical and immunological study of a series of 150 patients with primary biliary cirrhosis*. *Gastroenterology*, 1990. **99**(1): p. 181-6.
  835. Invernizzi, P., M. Podda, P.M. Battezzati, A. Crosignani, M. Zuin, E. Hitchman, M. Maggioni, P.L. Meroni, E. Penner, and J. Wesierska-Gadek. *Autoantibodies against nuclear pore complexes are associated with more active and severe liver disease in primary biliary cirrhosis*. *J Hepatol*, 2001. **34**(3): p. 366-72.
  836. Miyachi, K., R.W. Hankins, H. Matsushima, F. Kikuchi, T. Inomata, T. Horigome, M. Shibata, Y. Onozuka, Y. Ueno, E. Hashimoto, N. Hayashi, A. Shibuya, S. Amaki, and H. Miyakawa. *Profile and clinical significance of anti-nuclear envelope antibodies found in patients with primary biliary cirrhosis: a multicenter study*. *J Autoimmun*, 2003. **20**(3): p. 247-54.
  837. Wesierska-Gadek, J., E. Penner, P.M. Battezzati, C. Selmi, M. Zuin, E. Hitchman, H.J. Worman, M.E. Gershwin, M. Podda, and P. Invernizzi. *Correlation of initial autoantibody profile and clinical outcome in primary biliary cirrhosis*. *Hepatology*, 2006. **43**(5): p. 1135-44.
  838. Nakamura, M., Y. Shimizu-Yoshida, Y. Takii, A. Komori, T. Yokoyama, T. Ueki, M. Daikoku, K. Yano, T. Matsumoto, K. Migita, H. Yatsushashi, M. Ito, N. Masaki, H. Adachi, Y. Watanabe, Y. Nakamura, T. Saoshiro, T. Sodeyama, M. Koga, S. Shimoda, and H. Ishibashi. *Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis*. *J Hepatol*, 2005. **42**(3): p. 386-92.
  839. Wesierska-Gadek, J., H. Hohenauer, E. Hitchman, and E. Penner. *Autoantibodies against nucleoporin p62 constitute a novel marker of primary biliary cirrhosis*. *Gastroenterology*, 1996. **110**(3): p. 840-7.
  840. Wesierska-Gadek, J., A. Klima, O. Komina, C. Ranftler, P. Invernizzi, and E. Penner. *Characterization of autoantibodies against components of the nuclear*

- pore complexes: high frequency of anti-p62 nucleoporin antibodies. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1109**: p. 519-30.
841. Kraemer, D.M., M.R. Kraus, C. Kneitz, and H.P. Tony. *Nucleoporin p62 antibodies in a case of mixed connective tissue disease*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003. **10**(2): p. 329-31.
  842. Wesierska-Gadek, J., E. Penner, E. Hitchman, and G. Sauermann. *Antibodies to nuclear lamins in autoimmune liver disease*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1988. **49**(1): p. 107-15.
  843. Konstantinov, K., R. Foisner, D. Byrd, F.T. Liu, W.M. Tsai, A. Wiik, and L. Gerace. *Integral membrane proteins associated with the nuclear lamina are novel autoimmune antigens of the nuclear envelope*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1995. **74**(1): p. 89-99.
  844. Fida, S., M.A. Myers, S. Whittingham, M.J. Rowley, S. Ozaki, and I.R. Mackay. *Autoantibodies to the transcriptional factor SOX13 in primary biliary cirrhosis compared with other diseases*. *J Autoimmun*, 2002. **19**(4): p. 251-7.
  845. Agmon-Levin, N., Y. Shapira, C. Selmi, O. Barzilai, M. Ram, M. Szyper-Kravitz, S. Sella, B.S. Katz, P. Youinou, Y. Renaudineau, B. Larida, P. Invernizzi, M.E. Gershwin, and Y. Shoenfeld. *A comprehensive evaluation of serum autoantibodies in primary biliary cirrhosis*. *J Autoimmun*, 2010. **34**(1): p. 55-8.
  846. Zein, C.O., P. Angulo, and K.D. Lindor. *When is liver biopsy needed in the diagnosis of primary biliary cirrhosis?* *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2003. **1**(2): p. 89-95.
  847. Roll, J., J.L. Boyer, D. Barry, and G. Klatskin. *The prognostic importance of clinical and histologic features in asymptomatic and symptomatic primary biliary cirrhosis*. *N Engl J Med*, 1983. **308**(1): p. 1-7.
  848. Ludwig, J., E.R. Dickson, and G.S. McDonald. *Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis)*. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 1978. **379**(2): p. 103-12.
  849. Rubin, E., F. Schaffner, and H. Popper. *Primary Biliary Cirrhosis. Chronic Non-Suppurative Destructive Cholangitis*. *Am J Pathol*, 1965. **46**: p. 387-407.
  850. Scheuer, P. *Primary biliary cirrhosis*. *Proc R Soc Med*, 1967. **60**(12): p. 1257-60.
  851. Popper, H. and F. Schaffner, *Nonsuppurative destructive chronic cholangitis and chronic hepatitis*, in *Progress in liver diseases*, H. Popper and F. Schaffner, Editors. 1970, Grune & Stratton: New York. p. 336-54.
  852. Bedossa, P., D. Dargere, and V. Paradis. *Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C*. *Hepatology*, 2003. **38**(6): p. 1449-57.
  853. Hashimoto, E., K.D. Lindor, H.A. Homburger, E.R. Dickson, A.J. Czaja, R.H. Wiesner, and J. Ludwig. *Immunohistochemical characterization of hepatic lymphocytes in primary biliary cirrhosis in comparison with primary sclerosing cholangitis and autoimmune chronic active hepatitis*. *Mayo Clin Proc*, 1993. **68**(11): p. 1049-55.
  854. Jones, D.E. *Pathogenesis of primary biliary cirrhosis*. *J Hepatol*, 2003. **39**(4): p. 639-48.
  855. Tinmouth, J., M. Lee, I.R. Wanless, F.W. Tsui, R. Inman, and E.J. Heathcote. *Apoptosis of biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis*. *Liver*, 2002. **22**(3): p. 228-34.

856. Tsirikoni, A., D.S. Kyriakou, E.I. Rigopoulou, M.G. Alexandrakis, K. Zachou, F. Passam, and G.N. Dalekos. *Markers of cell activation and apoptosis in bone marrow mononuclear cells of patients with autoimmune hepatitis type I and primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 2005. **42**(3): p. 393-9.
857. Tsuneyama, K., J. Van de Water, P.S. Leung, S. Cha, Y. Nakanuma, M. Kaplan, R. De Lellis, R. Coppel, A. Ansari, and M.E. Gershwin. *Abnormal expression of the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex on the luminal surface of biliary epithelium occurs before major histocompatibility complex class II and BB1/B7 expression*. Hepatology, 1995. **21**(4): p. 1031-7.
858. Gershwin, M.E. and I.R. Mackay. *Primary biliary cirrhosis: paradigm or paradox for autoimmunity*. Gastroenterology, 1991. **100**(3): p. 822-33.
859. Shimoda, S., M. Nakamura, H. Ishibashi, K. Hayashida, and Y. Niho. *HLA DRB4 0101-restricted immunodominant T cell autoepitope of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: evidence of molecular mimicry in human autoimmune diseases*. J Exp Med, 1995. **181**(5): p. 1835-45.
860. Burroughs, A.K., I.J. Rosenstein, O. Epstein, J.M. Hamilton-Miller, W. Brumfitt, and S. Sherlock. *Bacteriuria and primary biliary cirrhosis*. Gut, 1984. **25**(2): p. 133-7.
861. Butler, P., F. Valle, J.M. Hamilton-Miller, W. Brumfitt, H. Baum, and A.K. Burroughs. *M2 mitochondrial antibodies and urinary rough mutant bacteria in patients with primary biliary cirrhosis and in patients with recurrent bacteriuria*. J Hepatol, 1993. **17**(3): p. 408-14.
862. Klein, R., M. Wiebel, S. Engelhart, and P.A. Berg. *Sera from patients with tuberculosis recognize the M2a-epitope (E2-subunit of pyruvate dehydrogenase) specific for primary biliary cirrhosis*. Clin Exp Immunol, 1993. **92**(2): p. 308-16.
863. Vilagut, L., A. Pares, O. Vinas, J. Vila, M.T. Jimenez de Anta, and J. Rodes. *Antibodies to mycobacterial 65-kD heat shock protein cross-react with the main mitochondrial antigens in patients with primary biliary cirrhosis*. Eur J Clin Invest, 1997. **27**(8): p. 667-72.
864. Nilsson, I., S. Lindgren, S. Eriksson, and T. Wadstrom. *Serum antibodies to Helicobacter hepaticus and Helicobacter pylori in patients with chronic liver disease*. Gut, 2000. **46**(3): p. 410-4.
865. Abdulkarim, A.S., L.M. Petrovic, W.R. Kim, P. Angulo, R.V. Lloyd, and K.D. Lindor. *Primary biliary cirrhosis: an infectious disease caused by Chlamydia pneumoniae?* J Hepatol, 2004. **40**(3): p. 380-4.
866. Harada, K., K. Tsuneyama, Y. Sudo, S. Masuda, and Y. Nakanuma. *Molecular identification of bacterial 16S ribosomal RNA gene in liver tissue of primary biliary cirrhosis: is Propionibacterium acnes involved in granuloma formation?* Hepatology, 2001. **33**(3): p. 530-6.
867. Shimoda, S., M. Nakamura, H. Shigematsu, H. Tanimoto, T. Gushima, M.E. Gershwin, and H. Ishibashi. *Mimicry peptides of human PDC-E2 163-176 peptide, the immunodominant T-cell epitope of primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2000. **31**(6): p. 1212-6.
868. Selmi, C., D.L. Balkwill, P. Invernizzi, A.A. Ansari, R.L. Coppel, M. Podda, P.S. Leung, T.P. Kenny, J. Van De Water, M.H. Nantz, M.J. Kurth, and M.E. Gershwin. *Patients with primary biliary cirrhosis react against a ubiquitous xenobiotic-metabolizing bacterium*. Hepatology, 2003. **38**(5): p. 1250-7.

869. Xu, L., Z. Shen, L. Guo, B. Fodera, A. Keogh, R. Joplin, B. O'Donnell, J. Aitken, W. Carman, J. Neuberger, and A. Mason. *Does a betaretrovirus infection trigger primary biliary cirrhosis?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8454-9.
870. Jones, D.E. *Pathogenesis of primary biliary cirrhosis*. Clin Liver Dis, 2008. **12**(2): p. 305-21; viii.
871. Kita, H., S. Matsumura, X.S. He, A.A. Ansari, Z.X. Lian, J. Van de Water, R.L. Coppel, M.M. Kaplan, and M.E. Gershwin. *Analysis of TCR antagonism and molecular mimicry of an HLA-A0201-restricted CTL epitope in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2002. **36**(4 Pt 1): p. 918-26.
872. Gordon, M.A., E. Oppenheim, N.J. Camp, F.S. di Giovine, G.W. Duff, and D. Gleeson. *Primary biliary cirrhosis shows association with genetic polymorphism of tumour necrosis factor alpha promoter region*. J Hepatol, 1999. **31**(2): p. 242-7.
873. Gregory, W.L., A.K. Daly, A.N. Dunn, G. Cavanagh, J.R. Idle, O.F. James, and M.F. Bassendine. *Analysis of HLA-class-II-encoded antigen-processing genes TAP1 and TAP2 in primary biliary cirrhosis*. Q J Med, 1994. **87**(4): p. 237-44.
874. Zappala, F., J. Grove, F.E. Watt, A.K. Daly, C.P. Day, M.F. Bassendine, and D.E. Jones. *No evidence for involvement of the interleukin-10 -592 promoter polymorphism in genetic susceptibility to primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 1998. **28**(5): p. 820-3.
875. Invernizzi, P., M. Miozzo, P.M. Battezzati, I. Bianchi, F.R. Grati, G. Simoni, C. Selmi, M. Watnik, M.E. Gershwin, and M. Podda. *Frequency of monosomy X in women with primary biliary cirrhosis*. Lancet, 2004. **363**(9408): p. 533-5.
876. Zinn, A.R. *The X chromosome and the ovary*. J Soc Gynecol Investig, 2001. **8**(1 Suppl Proceedings): p. S34-6.
877. Bach, N. and F. Schaffner. *Familial primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 1994. **20**(6): p. 698-701.
878. Brind, A.M., G.P. Bray, B.C. Portmann, and R. Williams. *Prevalence and pattern of familial disease in primary biliary cirrhosis*. Gut, 1995. **36**(4): p. 615-7.
879. Tsuji, K., Y. Watanabe, J. Van De Water, T. Nakanishi, G. Kajiyama, A. Parikh-Patel, R. Coppel, and M.E. Gershwin. *Familial primary biliary cirrhosis in Hiroshima*. J Autoimmun, 1999. **13**(1): p. 171-8.
880. Jones, D.E., F.E. Watt, J.V. Metcalf, M.F. Bassendine, and O.F. James. *Familial primary biliary cirrhosis reassessed: a geographically-based population study*. J Hepatol, 1999. **30**(3): p. 402-7.
881. Christensen, E., J. Neuberger, J. Crowe, D.G. Altman, H. Popper, B. Portmann, D. Doniach, L. Ranek, N. Tygstrup, and R. Williams. *Beneficial effect of azathioprine and prediction of prognosis in primary biliary cirrhosis. Final results of an international trial*. Gastroenterology, 1985. **89**(5): p. 1084-91.
882. Dickson, E.R., P.M. Grambsch, T.R. Fleming, L.D. Fisher, and A. Langworthy. *Prognosis in primary biliary cirrhosis: model for decision making*. Hepatology, 1989. **10**(1): p. 1-7.
883. Heuman, D.M. and R. Bajaj. *Ursodeoxycholate conjugates protect against disruption of cholesterol-rich membranes by bile salts*. Gastroenterology, 1994. **106**(5): p. 1333-41.

884. Hillaire, S., E. Boucher, Y. Calmus, P. Gane, F. Ballet, D. Franco, M. Moukthar, and R. Poupon. *Effects of bile acids and cholestasis on major histocompatibility complex class I in human and rat hepatocytes*. Gastroenterology, 1994. **107**(3): p. 781-8.
885. Yoshikawa, M., T. Tsujii, K. Matsumura, J. Yamao, Y. Matsumura, R. Kubo, H. Fukui, and S. Ishizaka. *Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immune responses*. Hepatology, 1992. **16**(2): p. 358-64.
886. Rodrigues, C.M. and C.J. Steer. *Mitochondrial membrane perturbations in cholestasis*. J Hepatol, 2000. **32**(1): p. 135-41.
887. Combes, B., R.L. Carithers, Jr., W.C. Maddrey, D. Lin, M.F. McDonald, D.E. Wheeler, E.H. Eigenbrodt, S.J. Munoz, R. Rubin, G. Garcia-Tsao, and et al. *A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1995. **22**(3): p. 759-66.
888. Heathcote, E.J., K. Cauch-Dudek, V. Walker, R.J. Bailey, L.M. Blendis, C.N. Ghent, P. Michieletti, G.Y. Minuk, S.C. Pappas, L.J. Scully, and et al. *The Canadian Multicenter Double-blind Randomized Controlled Trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1994. **19**(5): p. 1149-56.
889. Lindor, K.D., E.R. Dickson, W.P. Baldus, R.A. Jorgensen, J. Ludwig, P.A. Murtaugh, J.M. Harrison, R.H. Wiesner, M.L. Anderson, S.M. Lange, and et al. *Ursodeoxycholic acid in the treatment of primary biliary cirrhosis*. Gastroenterology, 1994. **106**(5): p. 1284-90.
890. Pares, A., L. Caballeria, J. Rodes, M. Bruguera, L. Rodrigo, A. Garcia-Plaza, J. Berenguer, D. Rodriguez-Martinez, J. Mercader, and R. Velicia. *Long-term effects of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a double-blind controlled multicentric trial. UDCA-Cooperative Group from the Spanish Association for the Study of the Liver*. J Hepatol, 2000. **32**(4): p. 561-6.
891. Poupon, R.E., B. Balkau, E. Eschwege, and R. Poupon. *A multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. UDCA-PBC Study Group*. N Engl J Med, 1991. **324**(22): p. 1548-54.
892. Leuschner, M., C.F. Dietrich, T. You, C. Seidl, J. Raedle, G. Herrmann, H. Ackermann, and U. Leuschner. *Characterisation of patients with primary biliary cirrhosis responding to long term ursodeoxycholic acid treatment*. Gut, 2000. **46**(1): p. 121-6.
893. Goulis, J., G. Leandro, and A.K. Burroughs. *Randomised controlled trials of ursodeoxycholic-acid therapy for primary biliary cirrhosis: a meta-analysis*. Lancet, 1999. **354**(9184): p. 1053-60.
894. Poupon, R.E. *Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis: lessons from the past--issues for the future*. J Hepatol, 2000. **32**(4): p. 685-8.
895. Mitchison, H.C., J.M. Palmer, M.F. Bassendine, A.J. Watson, C.O. Record, and O.F. James. *A controlled trial of prednisolone treatment in primary biliary cirrhosis. Three-year results*. J Hepatol, 1992. **15**(3): p. 336-44.
896. Crowe, J., E. Christensen, M. Smith, M. Cochrane, L. Ranek, G. Watkinson, D. Doniach, H. Popper, N. Tygstrup, and R. Williams. *Azathioprine in primary biliary cirrhosis: a preliminary report of an international trial*. Gastroenterology, 1980. **78**(5 Pt 1): p. 1005-10.
897. Lombard, M., B. Portmann, J. Neuberger, R. Williams, N. Tygstrup, L. Ranek, H. Ring-Larsen, J. Rodes, M. Navasa, C. Trepo, and et al. *Cyclosporin A*

- treatment in primary biliary cirrhosis: results of a long-term placebo controlled trial.* Gastroenterology, 1993. **104**(2): p. 519-26.
898. Wiesner, R.H., J. Ludwig, K.D. Lindor, R.A. Jorgensen, W.P. Baldus, H.A. Homburger, and E.R. Dickson. *A controlled trial of cyclosporine in the treatment of primary biliary cirrhosis.* N Engl J Med, 1990. **322**(20): p. 1419-24.
  899. Hendrickse, M.T., E. Rigney, M.H. Gjaffer, I. Soomro, D.R. Triger, J.C. Underwood, and D. Gleeson. *Low-dose methotrexate is ineffective in primary biliary cirrhosis: long-term results of a placebo-controlled trial.* Gastroenterology, 1999. **117**(2): p. 400-7.
  900. Kaplan, M.M. and T.A. Knox. *Treatment of primary biliary cirrhosis with low-dose weekly methotrexate.* Gastroenterology, 1991. **101**(5): p. 1332-8.
  901. Vogel, A., H. Wedemeyer, M.P. Manns, and C.P. Strassburg. *Autoimmune hepatitis and overlap syndromes.* J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17 Suppl 3**: p. S389-98.
  902. Boberg, K.M., R.W. Chapman, G.M. Hirschfield, A.W. Lohse, M.P. Manns, and E. Schrumpf. *Overlap syndromes: the International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) position statement on a controversial issue.* Journal of Hepatology, 2011. **54**(2): p. 374-85.
  903. Poupon, R. *Autoimmune overlapping syndromes.* Clin Liver Dis, 2003. **7**(4): p. 865-78.
  904. Talwalkar, J.A., J.C. Keach, P. Angulo, and K.D. Lindor. *Overlap of autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis: an evaluation of a modified scoring system.* Am J Gastroenterol, 2002. **97**(5): p. 1191-7.
  905. Joshi, S., K. Cauch-Dudek, I.R. Wanless, K.D. Lindor, R. Jorgensen, K. Batts, and E.J. Heathcote. *Primary biliary cirrhosis with additional features of autoimmune hepatitis: response to therapy with ursodeoxycholic acid.* Hepatology, 2002. **35**(2): p. 409-13.
  906. Czaja, A.J. *Frequency and nature of the variant syndromes of autoimmune liver disease.* Hepatology, 1998. **28**(2): p. 360-5.
  907. Chazouilleres, O., D. Wendum, L. Serfaty, S. Montembault, O. Rosmorduc, and R. Poupon. *Primary biliary cirrhosis-autoimmune hepatitis overlap syndrome: clinical features and response to therapy.* Hepatology, 1998. **28**(2): p. 296-301.
  908. Corpechot, C., F. Carrat, A. Bahr, Y. Chretien, R.E. Poupon, and R. Poupon. *The effect of ursodeoxycholic acid therapy on the natural course of primary biliary cirrhosis.* Gastroenterology, 2005. **128**(2): p. 297-303.
  909. Pares, A., L. Caballeria, and J. Rodes. *Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic Acid.* Gastroenterology, 2006. **130**(3): p. 715-20.
  910. Gershwin, M.E. and I.R. Mackay. *The causes of primary biliary cirrhosis: Convenient and inconvenient truths.* Hepatology, 2008. **47**(2): p. 737-45.
  911. Gershwin, M.E., C. Selmi, H.J. Worman, E.B. Gold, M. Watnik, J. Utts, K.D. Lindor, M.M. Kaplan, and J.M. Vierling. *Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: a controlled interview-based study of 1032 patients.* Hepatology, 2005. **42**(5): p. 1194-202.
  912. Selmi, C. and M.E. Gershwin. *The role of environmental factors in primary biliary cirrhosis.* Trends Immunol, 2009. **30**(8): p. 415-20.
  913. Selmi, C., M.J. Mayo, N. Bach, H. Ishibashi, P. Invernizzi, R.G. Gish, S.C. Gordon, H.I. Wright, B. Zweiban, M. Podda, and M.E. Gershwin. *Primary*

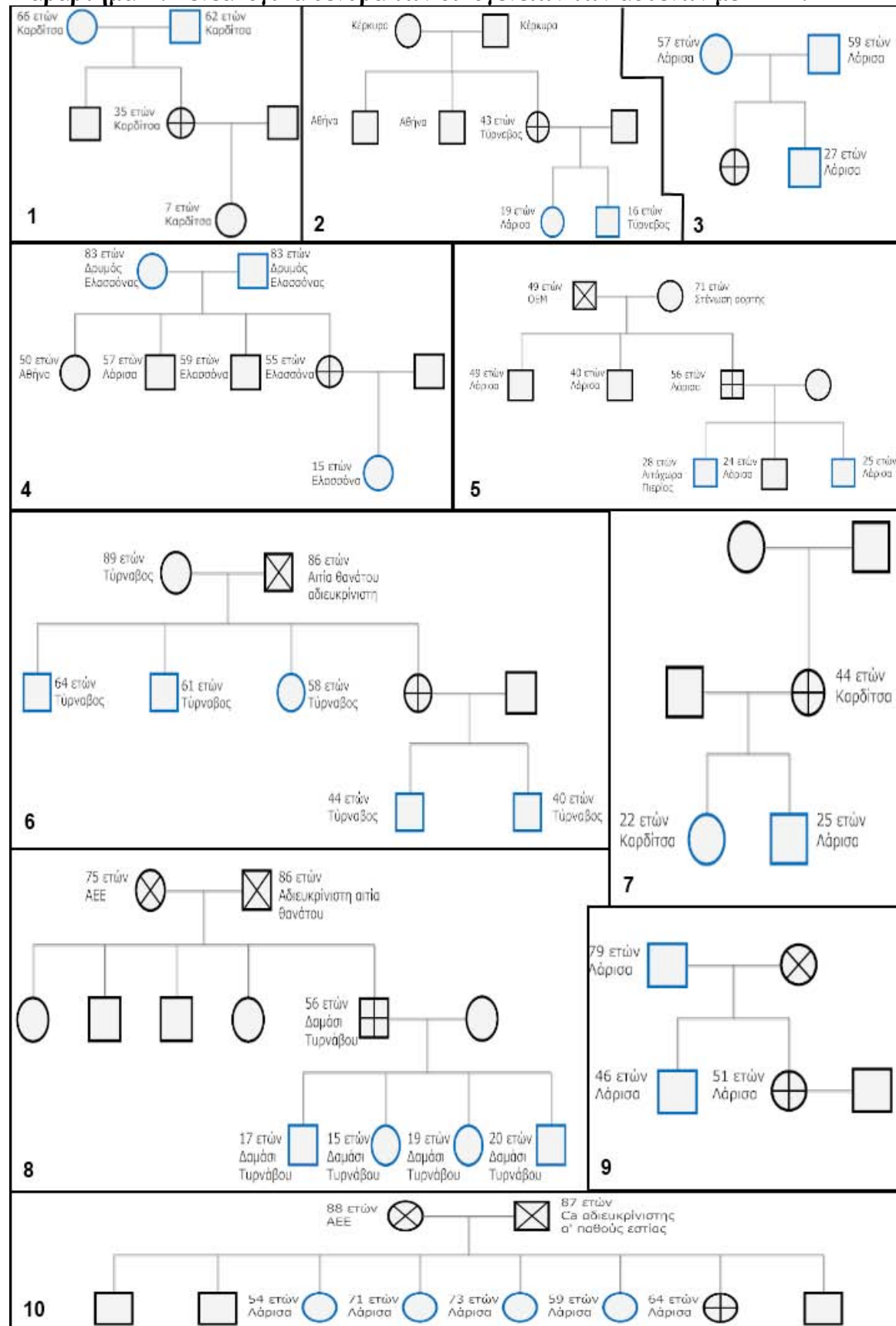
- biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment.* Gastroenterology, 2004. **127**(2): p. 485-92.
914. Watt, F.E., O.F. James, and D.E. Jones. *Patterns of autoimmunity in primary biliary cirrhosis patients and their families: a population-based cohort study.* QJM, 2004. **97**(7): p. 397-406.
  915. Floreani, A., R. Naccarato, and M. Chiaramonte. *Prevalence of familial disease in primary biliary cirrhosis in Italy.* J Hepatol, 1997. **26**(3): p. 737-8.
  916. Lazaridis, K.N., B.D. Juran, G.M. Boe, J.P. Slusser, M. de Andrade, H.A. Homburger, K. Ghosh, E.R. Dickson, K.D. Lindor, and G.M. Petersen. *Increased prevalence of antimitochondrial antibodies in first-degree relatives of patients with primary biliary cirrhosis.* Hepatology, 2007. **46**(3): p. 785-92.
  917. Yanagisawa, M., H. Takagi, H. Takahashi, M. Uehara, T. Otsuka, K. Yuasa, K. Hosonuma, and M. Mori. *Familial Clustering and Genetic Background of Primary Biliary Cirrhosis in Japan.* Dig Dis Sci, 2009. **55**(9): p. 2651-8.
  918. Bittencourt, P.L., A.Q. Farias, C.P. Abrantes-Lemos, L.L. Goncalves, P.L. Goncalves, E.P. Magalhaes, F.J. Carrilho, A.A. Laudanna, and E.L. Cancado. *Prevalence of immune disturbances and chronic liver disease in family members of patients with primary biliary cirrhosis.* J Gastroenterol Hepatol, 2004. **19**(8): p. 873-8.
  919. Caldwell, S.H., P.S. Leung, J.R. Spivey, T. Prindiville, M. de Medina, T. Saicheur, M. Rowley, K.R. Reddy, R. Coppel, L.J. Jeffers, and et al. *Antimitochondrial antibodies in kindreds of patients with primary biliary cirrhosis: antimitochondrial antibodies are unique to clinical disease and are absent in asymptomatic family members.* Hepatology, 1992. **16**(4): p. 899-905.
  920. Feizi, T., R. Naccarato, S. Sherlock, and D. Doniach. *Mitochondrial and other tissue antibodies in relatives of patients with primary biliary cirrhosis.* Clin Exp Immunol, 1972. **10**(4): p. 609-22.
  921. Galbraith, R.M., M. Smith, R.M. Mackenzie, D.E. Tee, D. Doniach, and R. Williams. *High prevalence of seroimmunologic abnormalities in relatives of patients with active chronic hepatitis or primary biliary cirrhosis.* N Engl J Med, 1974. **290**(2): p. 63-9.
  922. Jiang, X.H., R.Q. Zhong, X.Y. Fan, Y. Hu, F. An, J.W. Sun, and X.T. Kong. *Characterization of M2 antibodies in asymptomatic Chinese population.* World J Gastroenterol, 2003. **9**(9): p. 2128-31.
  923. Mattalia, A., S. Quaranta, P.S. Leung, M. Bauducci, J. Van de Water, P.L. Calvo, F. Danielle, M. Rizzetto, A. Ansari, R.L. Coppel, F. Rosina, and M.E. Gershwin. *Characterization of antimitochondrial antibodies in health adults.* Hepatology, 1998. **27**(3): p. 656-61.
  924. Shibata, M., Y. Onozuka, T. Morizane, H. Koizumi, N. Kawaguchi, H. Miyakawa, M. Kako, and K. Mitamura. *Prevalence of antimitochondrial antibody in Japanese corporate workers in Kanagawa prefecture.* J Gastroenterol, 2004. **39**(3): p. 255-9.
  925. Turchany, J.M., R. Uibo, T. Kivik, J. Van de Water, T. Prindiville, R.L. Coppel, and M.E. Gershwin. *A study of antimitochondrial antibodies in a random population in Estonia.* Am J Gastroenterol, 1997. **92**(1): p. 124-6.
  926. Parikh-Patel, A., E.B. Gold, H. Worman, K.E. Krivy, and M.E. Gershwin. *Risk factors for primary biliary cirrhosis in a cohort of patients from the united states.* Hepatology, 2001. **33**(1): p. 16-21.
  927. Bogdanos, D.P., H. Baum, A. Grasso, M. Okamoto, P. Butler, Y. Ma, E. Rigopoulou, P. Montalto, E.T. Davies, A.K. Burroughs, and D. Vergani.

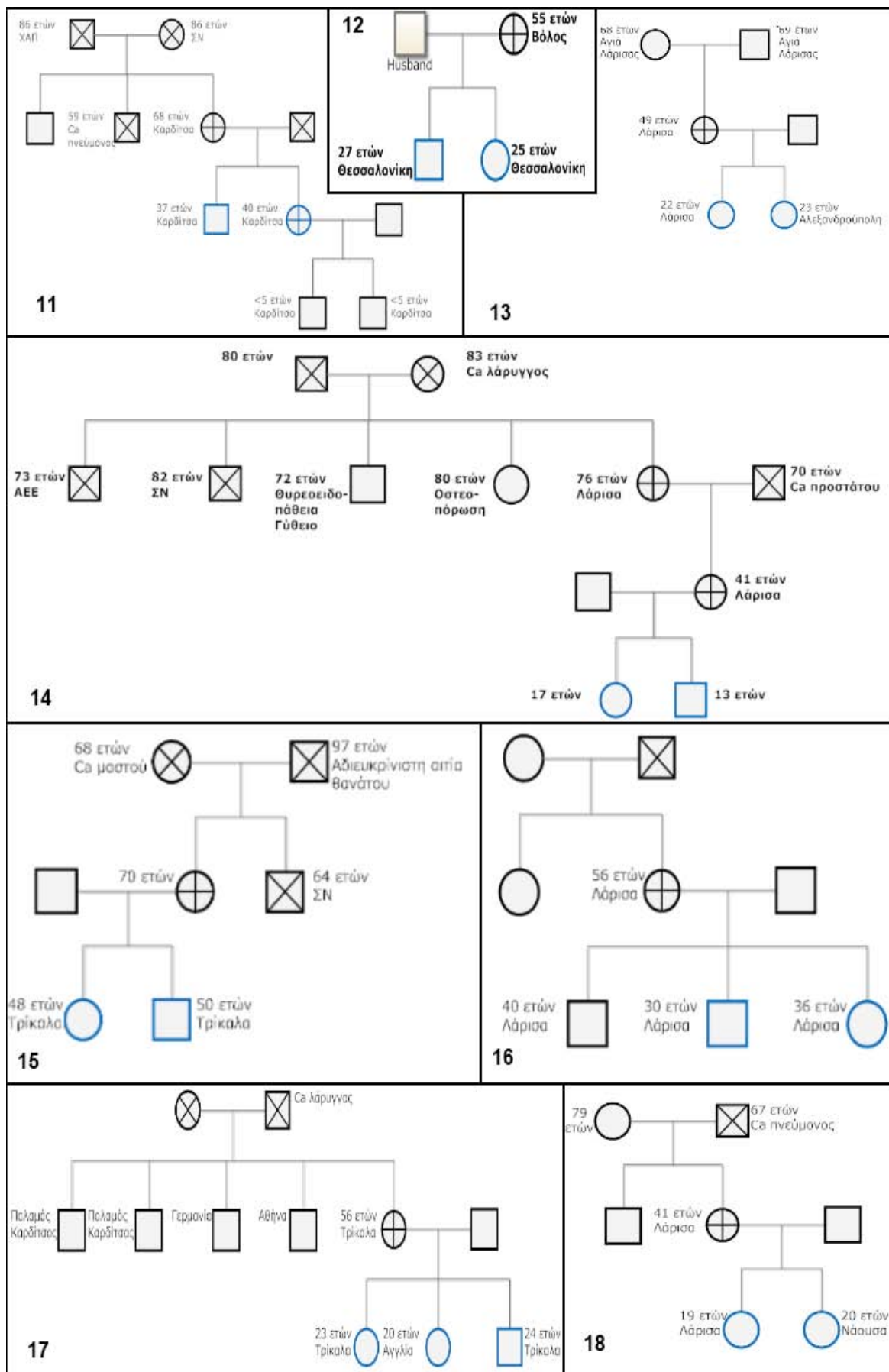
- Microbial mimics are major targets of crossreactivity with human pyruvate dehydrogenase in primary biliary cirrhosis.* J Hepatol, 2004. **40**(1): p. 31-9.
928. Weston, S.R., R.A. Jorgensen, E.R. Dickson, and K.D. Lindor. *Is routine cholangiography useful in men with suspected primary biliary cirrhosis?* J Clin Gastroenterol, 1999. **29**(1): p. 68-70.

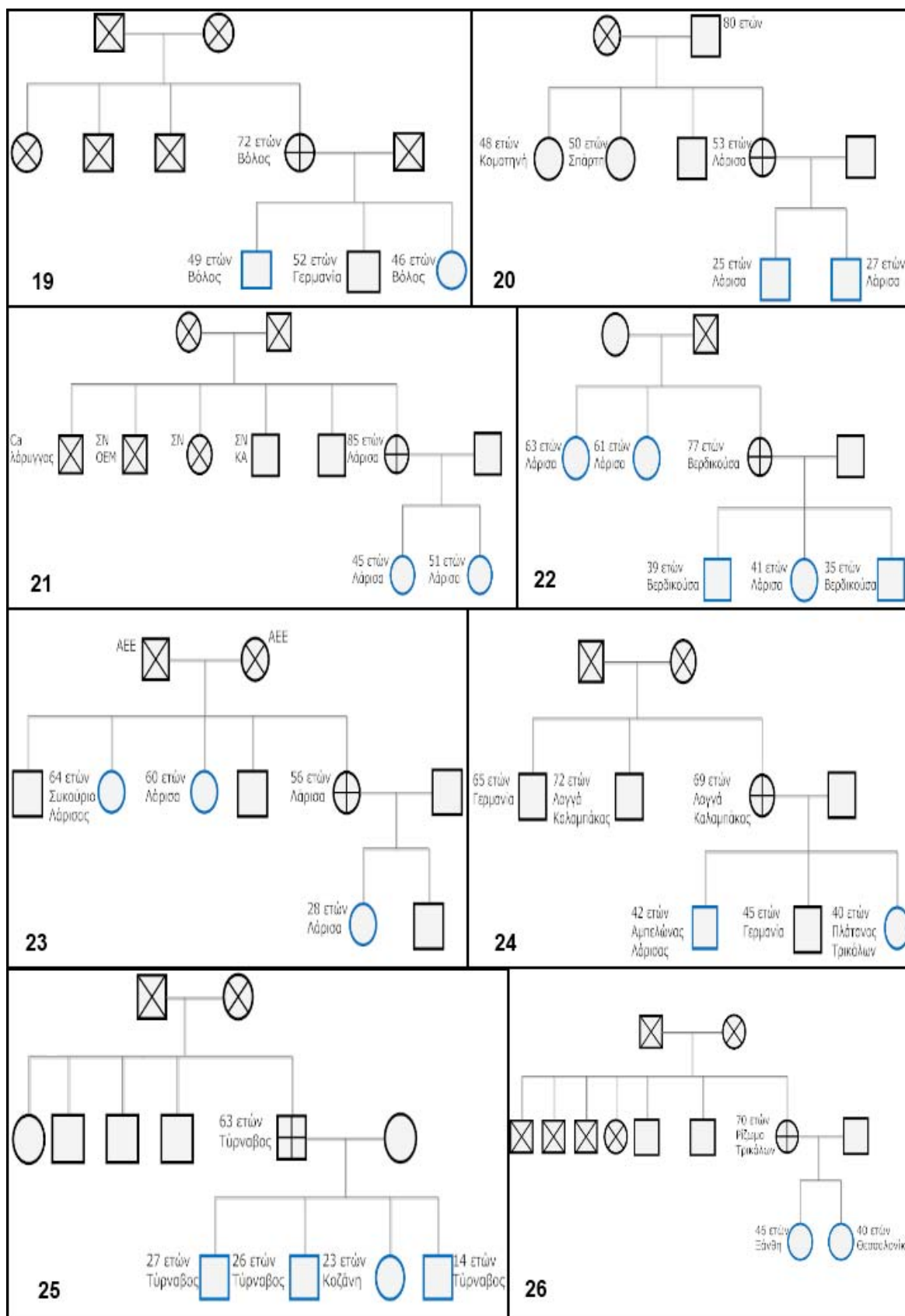


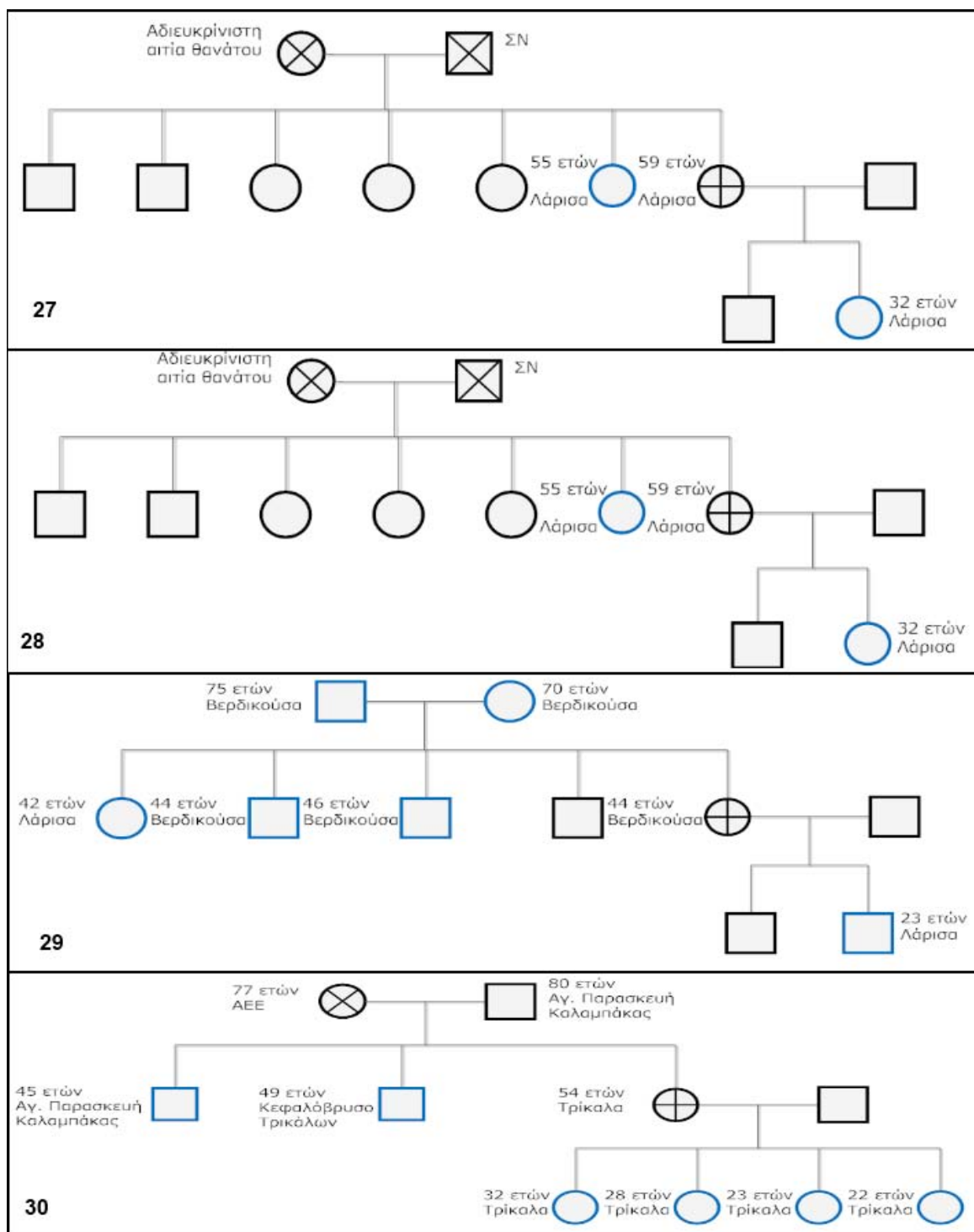
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

### Παράρτημα Α. Γενεαλογικά δένδρα των οικογενειών των ασθενών με ΠΧΚ.









Παράρτημα Α. Γενεαλογικά δένδρα των οικογενειών των 30 ασθενών με ΠΧΚ, για τους οποίους περισσότεροι του ενός πρώτου βαθμού συγγενείς συμμετείχαν στη μελέτη. Τα δένδρα χρησιμοποιήθηκαν στη συλλογή πληροφοριών για το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών και την εκτίμηση των αποτελεσμάτων του ανοσολογικού ελέγχου.

**Παράρτημα Β.****ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΠΡΩΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΣΥΓΓΕΝΩΝ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ  
ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ**

Όνομα:			
Επώνυμο:			
Συγγένεια με τον ασθενή (όν. ασθενούς):			
Βαθμός συγγένειας:	Γονέας	Τέκνο	Αδελφός/Αδελφή
Ημερομηνία γέννησης:			
Τόπος κατοικίας:			
Τόπος καταγωγής:			
Επάγγελμα:			
Εκπαίδευση:	Κατώτερη:	(Αναλυτικά)	
	Μέση:		
	Ανώτερη-Ανώτατη:		
Βάρος:			
Ύψος:			

**Ατομικό αναμνηστικό**

Γυναικολογικό		
Ηλικία που ξεκίνησε η περίοδός σας:		
Ηλικία που σταμάτησε η περίοδός σας:		
Αριθμός κυήσεων:		
Αριθμός τοκετών:		
Αριθμός τεχνητών διακοπών κύησης:		
Αριθμός αποβολών:		
Παρουσιάσατε κνησμό σε κάποια κύηση;	Ναι	Όχι
Έχετε λάβει αντισυλληπτικά χάπια;	Ναι	Όχι
Χρονικό διάστημα λήψης αντισυλληπτικών:		
Είχατε ή έχετε κάποια γυναικολογική πάθηση;		
(Αναλυτικά)		
Έχετε υποβληθεί σε κάποια γυναικολογική επέμβαση;		
(Αναλυτικά)		
Είχατε ή έχετε κάποια γυναικολογική λοίμωξη; Πόσα επεισόδια και σε ποια ηλικία;		
(Αναλυτικά)		

Ουρολογικό		
Σας έχει διαγνωστεί ποτέ ουρολοίμωξη;	Ναι	Όχι
Εάν ναι, γνωρίζετε το μικρόβιο;		

*Συνέχεια στην επόμενη σελίδα*

Είχατε ποτέ συμπτώματα ουρολοίμωξης χωρίς διάγνωση; (π.χ. συχνουρία, τσούξιμο, πόνος χαμηλά στην κοιλιά, και δύσσοσμα ή αιματηρά ούρα)	Ναι	Όχι
Αριθμός επεισοδίων ουρολοίμωξης:		
Ηλικία πρώτου επεισοδίου:		
Ηλικία πλέον πρόσφατου επεισοδίου:		

Χειρουργικό		
Έχετε υποβληθεί σε αμυγδαλεκτομή; Εάν ναι, σε ποια ηλικία;	Ναι	Όχι
Έχετε υποβληθεί σε σκωληκοειδεκτομή; Εάν ναι, σε ποια ηλικία;	Ναι	Όχι
Έχετε υποβληθεί σε άλλες επεμβάσεις; (Ηλικία και είδος επέμβασης αναλυτικά)		

Άλλα νοσήματα		
Σας έχει διαγνωστεί συνδρ. Sjogren;	Ναι	Όχι
Νιώθετε το στόμα σας ξηρό;	Ναι	Όχι
Νιώθετε τα μάτια σας ξηρά, χωρίς δάκρυα;	Ναι	Όχι
Έχετε διαγνωσμένο φαινόμενο Raynaud;	Ναι	Όχι
Μετά από έκθεση σε ψύχος, μελανιάζουν τα χέρια σας; (αλλαγή από λευκό σε κυανό και μετά σε ερυθρό)	Ναι	Όχι
Έχετε ή είχατε προβλήματα του θυρεοειδούς; (Αναφέρετε αναλυτικά την πάθηση και το χρόνο διάγνωσης)	Ναι	Όχι
Άλλα νοσήματα;  (Αναλυτικά)		

Αλλεργίες	
Έχετε αλλεργία σε κάποιες τροφές;	
Έχετε αλλεργία σε κάποια φάρμακα;	
Παρουσιάζετε εποχιακές αλλεργίες, αλλεργική ρινίτιδα ή επιπεφυκίτιδα;	

Συνέχεια στην επόμενη σελίδα

Λήψη φαρμάκων	
Λαμβάνετε τώρα κάποια φάρμακα; (Για πόσο καιρό;)	
Έχετε λάβει χρονίως (>6 μήνες) κάποια φάρμακα; (Για πόσο καιρό;)	

Κάπνισμα	
Είστε καπνιστής;	
Ήσασταν καπνιστής;	
Πόσα τσιγάρα καπνίζετε/καπνίζατε ανά ημέρα;	
Για πόσα χρόνια;	
Αν ήσασταν καπνιστής, πριν πόσα χρόνια κόψατε το κάπνισμα;	

Διατροφή (βάλτε Χ σε αυτό που σας εκφράζει περισσότερο)	
Πόσο συχνά καταναλώνετε φαγητό που ετοιμάστηκε εκτός σπιτιού;	
Συχνότερα από 1 φορά την εβδομάδα	
Συχνότερα από 1 φορά το μήνα	
Σπανιότερα από 1 φορά το μήνα	
Το φαγητό που ετοιμάστηκε εκτός σπιτιού ήταν συχνότερα:	
Κρέας	
Πίτσα	
Ζυμαρικά	
Κατά το τελευταίο έτος πόσο συχνά καταναλώνετε λαχανικά	
Κάθε ημέρα	
Συχνότερα από 3 φορές την εβδομάδα	
Σπανιότερα από 3 φορές την εβδομάδα	
Σπανιότερα από 1 φορά την εβδομάδα	
Σπανιότερα από 1 φορά το μήνα	
Πόσο συχνά καταναλώνετε πουλερικά;	
Συχνότερα από 1 φορά την εβδομάδα	
Συχνότερα από 1 φορά το μήνα	
Σπανιότερα από 1 φορά το μήνα	
Πόσο συχνά τρώτε κρέας (χοιρινό, μοσχάρι, αρνί/κατσίκι)	
Κάθε ημέρα	
Συχνότερα από 3 φορές την εβδομάδα	
Σπανιότερα από 3 φορές την εβδομάδα	
Σπανιότερα από 1 φορά την εβδομάδα	
Σπανιότερα από 1 φορά το μήνα	

Συνέχεια στην επόμενη σελίδα

Τι είδος κρέατος καταναλώνετε συχνότερα;	
Χοιρινό	
Μοσχάρι	
Αρνί/κατσίκι	
Όταν τρώτε κρέας, πόσο συχνά τρώτε το ορατό λίπος;	
Ποτέ	
Σπάνια	
Συχνά	
Πάντα	
Πόσο συχνά πίνετε γάλα;	
Κάθε ημέρα	
Συχνότερα από 3 φορές την εβδομάδα	
Σπανιότερα από 3 φορές την εβδομάδα	
Σπανιότερα από 1 φορά την εβδομάδα	
Σπανιότερα από 1 φορά το μήνα	
Τι είδους γάλα καταναλώνετε συνήθως;	
Παστεριωμένο πλήρες	
Παστεριωμένο με λίγα λιπαρά	
Εβαπορέ	
Εβαπορέ με λίγα λιπαρά	
Φρέσκο	
Πόσο συχνά καταναλώνετε γάλα κατά την παιδική ηλικία;	
Ποτέ	
Σπανιότερα από 1 φορά την εβδομάδα	
Συχνότερα από 1 φορά την εβδομάδα, αλλά σπανιότερα από 1 φορά την ημέρα	
Κάθε ημέρα	
Πόσο συχνά καταναλώνετε γάλα κατά την εφηβική ηλικία;	
Ποτέ	
Σπανιότερα από 1 φορά την εβδομάδα	
Συχνότερα από 1 φορά την εβδομάδα, αλλά σπανιότερα από 1 φορά την ημέρα	
Κάθε ημέρα	
Έχετε θηλάσει;	
Έχετε θηλάσει > 6 μήνες;	
Πόσο συχνά καταναλώνετε τυρί;	
Κάθε ημέρα	
Συχνότερα από 3 φορές την εβδομάδα	
Σπανιότερα από 3 φορές την εβδομάδα	
Σπανιότερα από 1 φορά την εβδομάδα	
Σπανιότερα από 1 φορά το μήνα	
Τι είδους τυρί καταναλώνετε κυρίως;	
Φέτα	
Κίτρινα τυριά	
Και τα δύο το ίδιο συχνά	



Πόσο συχνά καταναλώνετε τυρί κατά την παιδική ηλικία;	
Ποτέ	
Σπανιότερα από 1 φορά την εβδομάδα	
Συχνότερα από 1 φορά την εβδομάδα, αλλά σπανιότερα από 1 φορά την ημέρα	
Κάθε ημέρα	
Πόσο συχνά καταναλώνετε τυρί κατά την εφηβική ηλικία;	
Ποτέ	
Σπανιότερα από 1 φορά την εβδομάδα	
Συχνότερα από 1 φορά την εβδομάδα, αλλά σπανιότερα από 1 φορά την ημέρα	
Κάθε ημέρα	

Αλκοόλ		
Τι ποσότητα μπύρας καταναλώνετε ανά μήνα;	Ποτήρια	Μπουκάλια
Τι ποσότητα κρασιού καταναλώνετε ανά μήνα;	Ποτήρια	Μπουκάλια
Τι ποσότητα αποσταγμάτων (ούζο, τσίπουρο, ουίσκι, βότκα) καταναλώνετε ανά μήνα;	Ποτήρια	Μπουκάλια

Αύξων αριθμός ασθενούς:			
Ευρήματα αντικειμενικής εξέτασης			
Γενική αίματος		Βιοχημικό	
Ορός			

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η πρωτοπαθής χολική κίρρωση (ΠΧΚ) είναι μία χρόνια χολοστατική νόσος αγνώστου αιτιολογίας που χαρακτηρίζεται από την άνοσο-επαγόμενη καταστροφή των ενδοηπατικών χοληφόρων που προοδευτικά οδηγεί σε ίνωση, κίρρωση και ηπατική ανεπάρκεια.

Η νόσος διαγιγνώσκεται πλέον νωρίτερα και σε πρωιμότερα κλινικά στάδια, καθώς το 60% των ασθενών που πρωτοδιαγιγνώσκονται με ΠΧΚ σήμερα είναι ασυμπτωματικοί, έναντι 40% προ μίας δεκαετίας. Η πρώιμη διάγνωση της ΠΧΚ έχει ιδιαίτερη σημασία, διότι ακόμη και οι ασυμπτωματικοί ασθενείς έχουν μειωμένη επιβίωση, ενώ η έγκαιρη έναρξη θεραπείας μπορεί να επαναφέρει το προσδόκιμο επιβίωσης σε φυσιολογικά επίπεδα.

Παρότι η παθογένεια της νόσου δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, θεωρείται ως συνισταμένη γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Οι παρατηρούμενες διαφορές στον επιπολασμό της νόσου μεταξύ πληθυσμών που ζουν σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές αλλά μοιράζονται κοινό γενετικό υπόβαθρο συνηγορούν υπέρ της σημαντικής επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων. Επιδημιολογικά δεδομένα συνδέουν δε την εμφάνιση ΠΧΚ με διάφορους μη γενετικούς παράγοντες όπως είναι οι επανειλημμένες ουρολοιμώξεις, το κάπνισμα και η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης.

Αντιθέτως, ο ρόλος των γενετικών παραγόντων όπως τεκμηριώνεται από την υψηλή επίπτωση της ΠΧΚ σε ζεύγη μονοζυγωτικών διδύμων και σε συγγενείς ασθενών, αλλά και τον αυξημένο επιπολασμό άλλων αυτοάνοσων διαταραχών στους συγγενείς ασθενών, φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντικός.

Την τελευταία δεκαετία, διάφορες μελέτες έχουν υπολογίσει τον επιπολασμό της οικογενούς ΠΧΚ να ανέρχεται μεταξύ 1.3% και 9%. Πέραν όμως από τον

αυξημένο επιπολασμό της νόσου στις οικογένειες ασθενών, έχει αναφερθεί η ανίχνευση αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων (AMA) στο 1% έως 13.1% των συγγενών.

Πέραν των AMA, η ανίχνευση αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) με εικόνα πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων (MND) ή περιπυρηνικού φθορισμού (RL/M) στον έμμεσο ανοσοφθορισμό (ΕΑΦ) χαρακτηρίζει το 25% των ασθενών με ΠΧΚ και έχει αυξημένη ειδικότητα, αλλά και προγνωστική αξία.

Παρότι διάφορες μελέτες έχουν υπολογίσει τον επιπολασμό των AMA σε πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ, οι μελέτες αυτές παρουσιάζουν σημαντικές διακυμάνσεις ανάλογα με τον υπό μελέτη πληθυσμό και η σχέση των AMA με την έκθεση των ατόμων αυτών σε προδιαθεσικούς παράγοντες για τη νόσο δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς. Ο επιπολασμός δε των ειδικών για τη νόσο ANA στους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ δεν έχει επαρκώς προσδιοριστεί.

Ως εκ τούτου, σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν ο προσδιορισμός του επιπολασμού των AMA και ANA σε πρώτου βαθμού συγγενείς με ΠΧΚ και η διερεύνηση συσχετίσεών τους με συνυπάρχοντα νοσήματα και γνωστούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ΠΧΚ.

Στη μελέτη συμμετείχαν 101 συγγενείς πρώτου βαθμού 44 ασθενών με ΠΧΚ (8 εκ των οποίων είχαν AMA-αρνητική ΠΧΚ). Η ομάδα ελέγχου απαρτιζόταν από 40 πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα-1 (ΑΗ-1) ή πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ) και 40 εθελοντές αιμοδότες με ελεύθερο ατομικό αναμνηστικό, αντίστοιχης ηλικίας.

Χρησιμοποιώντας έμμεσο ανοσοφθορισμό, AMA ανιχνεύτηκαν στο 24.1% των συγγενών (27.7% για τους συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ και 15% για τους συγγενείς ασθενών με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος) και σε κανέναν εκ των υγιών

μαρτύρων. Χρησιμοποιώντας την MIT3- M2 ELISA, 11.9% των συγγενών ασθενών με ΠΧΚ ήταν θετικοί για IgG AMA, έναντι κανενός εκ των ομάδων ελέγχου.

Αντίστοιχα θετικά ANA ανιχνεύθηκαν στο 4% των συγγενών ασθενών με ΠΧΚ έναντι του 12.5% των συγγενών με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος σε ΕΑΦ σε τομές ήπατος-νεφρού-στομάχου. Φθορισμός RL/M παρατηρήθηκε στο 15.8% των συγγενών ασθενών με ΠΧΚ, έναντι ενός συγγενούς ασθενούς με ΠΣΧ και κανενός εκ των υγιών αιμοδοτών ( $p<0.05$  και  $p<0.01$ , αντίστοιχα). Φθορισμός MND παρατηρήθηκε σε σημαντικά περισσότερους συγγενείς ασθενών με ΑΗ-1/ΠΣΧ παρά σε συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ (27.5% έναντι 12.9%), ενώ δεν παρατηρήθηκε σε κανέναν υγιή αιμοδότη. Χρησιμοποιώντας anti-grp210 και anti-sp100 ELISA, μόνο σε έναν συγγενή ασθενούς με ΠΣΧ διαπιστώθηκαν anti-sp100 αντισώματα, ενώ όλα τα υπόλοιπα δείγματα ήταν αρνητικά.

Το κυριότερο εύρημα της παρούσης μελέτης είναι ότι οι πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ εμφανίζουν αυξημένο επιπολασμό AMA και ειδικών για τη νόσο ANA σε σχέση με υγιείς μάρτυρες, ενώ ασθενείς με AMA-αρνητική ΠΧΚ μπορεί να έχουν AMA-θετικούς συγγενείς πρώτου βαθμού. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, ο επιπολασμός των AMA σε συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ κυμαίνεται μεταξύ 4.9% και 7.5%., με την εξαίρεση μιας πρόσφατης μελέτης στις ΗΠΑ που υπολόγισε τον επιπολασμό ως 1% στο γενικό πληθυσμό και 13.1% στους πρώτου βαθμού συγγενείς, ποσοστό άμεσα συγκρίσιμο με τα ευρήματά μας.

Σε συμφωνία με προηγούμενα δεδομένα από επιδημιολογικές μελέτες, διαπιστώθηκε ότι ορισμένοι εκ των συγγενών εμφάνιζαν αυξημένη συχνότητα AMA, ιδίως ανάλογα με επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά τους, όπως είναι το ιστορικό επεισοδίων ουρολοιμώξεων και τα επιπέδα ηωσινοφίλων στη γενική αίματος.

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή καταγράφει για πρώτη φορά στον Ελλαδικό χώρο δεδομένα για την οικογενή εμφάνιση ανοσολογικών χαρακτηριστικών συμβατών με ΠΧΚ και για τους προδιαθεσικούς παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν την εκδήλωση αυτών των χαρακτηριστικών.

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

Primary biliary cirrhosis (PBC) is a chronic cholestatic liver disease of unknown cause characterized by immune-mediated destruction of the intrahepatic bile ducts, gradually leading to fibrosis, cirrhosis, and eventually, liver failure.

Early detection of PBC is important, since patients with PBC, albeit asymptomatic, have reduced overall survival compared to controls, while timely treatment with ursodeoxycholic acid before the development of late-stage disease normalizes life expectancy.

The observed differences in PBC prevalence between populations living in different geographical regions but sharing similar genetic background support that environmental factors play a pivotal role in disease etiology. Epidemiologic evidence suggests several non-genetic risk factors to be associated with PBC, including a history of urinary tract infections (UTI), past smoking and use of hormone replacement therapy.

Conversely, genetic factors also play an important role in conferring susceptibility to PBC, as indicated by the high concordance rate among monozygotic twins and the increased prevalence of PBC and other autoimmune disorders in patients' families. During the past 15 years, several studies have reported familial PBC prevalence to range between 1.3% and 9%. In addition to clustering of PBC and other autoimmune diseases in the families of PBC patients, the presence of antimitochondrial antibodies (AMA) aggregates in first-degree relatives of afflicted individuals as well, with AMA prevalence ranging between 1 and 13.1%.

In addition to AMA, previous studies have shown that antinuclear antibodies (ANA) giving a multiple nuclear dot (MND) and a rim-lime/membranous (RL/M) pattern by

indirect immunofluorescence (IIF) are found in up to 25% of PBC patients and are shown to be disease specific and have prognostic significance.

Although several studies have estimated AMA prevalence in first-degree relatives (FDRs) of PBC patients, little is known about the association of AMA with exposure to risk factors for PBC or prevalence of disease specific ANA in this population. Furthermore, significant variation in AMA prevalence in FDRs exists according to the population tested and the method used for AMA detection.

The aim of the present study was to determine the prevalence of AMA and ANA in FDRs of patients with PBC and investigate their association with known comorbidities and reported risk factors for PBC.

A total of 101 FDRs of 44 PBC patients (8 of them with AMA-negative PBC) agreed to participate in the study. The control group consisted of 40 FDRs of patients with autoimmune hepatitis-1 (AIH-1) or primary sclerosing cholangitis (PSC) and 40 blood donors with unremarkable medical history, who were age-matched to the FDR group.

Using IIF, AMA were detected in 24.1% of the FDRs and none of the controls. The prevalence of AMA was 27.7% in FDRs of patients with PBC and 15% in FDRs of patients with AIH-1 or PSC, however this difference was not statistically significant. PBC FDRs had significantly increased AMA-positivity compared to healthy controls. IgG AMA were detected in 11.9% of the PBC FDRs by the MIT3-based M2 Elisa, whereas none of the AIH-1/PSC FDRs or the healthy controls were positive for AMA. On rat multiorgan substrate, ANA positivity was observed in 4% of PBC relatives compared to 12.5% of AIH-1/PSC relatives, however this difference was not statistically significant. Antibodies causing a RLM pattern on Hep-2 cells, were observed in 15.8% of PBC FDRs. A RLM pattern was, also, observed in one PSC FDR and in none of the controls ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively). All serum

samples were further evaluated with an anti-gp210 ELISA, however anti-gp210 reactivity was not observed.

Notably, a MND pattern was observed in significantly more AIH-1/PSC FDRs than PBC FDRs (27.5% vs. 12.9%). Nevertheless, the prevalence of MND pattern was significantly higher in FDRs of PBC patients than healthy controls (12.9% vs. 0%,  $p < 0.05$ ). Using an ELISA assay, anti-sp100 positivity was observed in one PSC FDR, whereas the remaining study population were anti-sp100 negative.

The PBC FDR group included 20 FDRs of probands with AMA-negative PBC. There was no significant difference in the prevalence of AMA between FDRs of patients with AMA-negative PBC and FDRs of patients with AMA-positive PBC (20% vs. 29.6%,  $p = 0.389$ ).

The data reported herein demonstrate that FDRs of patients with PBC have increased prevalence of AMA and disease-specific ANA compared to healthy controls. We have also provided evidence that AMA positivity may be present in FDRs of PBC patients with AMA-negative PBC.

In the studies investigating autoantibody prevalence in relatives of PBC patients, AMA were reported ranging between 4.9% and 7.5% of the screened relatives, with the exception of a study from Brazil which estimated AMA prevalence in FDRs to be 1%. In the most comprehensive study of FDRs of PBC patients, Lazaridis et al reported AMA positivity in 13.1% of the FDRs and 1% of the healthy controls. Using a M2 ELISA, we have observed similar rates of AMA positivity (11.9%) in our study population.