

ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ & ΤΟ ΟΜΩΝΥΜΟ
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Δ/ντής: Καθηγητής Γεώργιος Ν. Νταλέκος

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΧΥΜΙΚΗΣ ΚΑΙ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΕΝΑΝΤΙ
ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΩΝ
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΕΣ
ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΕΣ.**

Ηλίας Σπύρου
Ιατρός

Διδακτορική Διατριβή που υποβλήθηκε στο Ιατρικό Τμήμα του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Λάρισα 2014

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

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Γεώργιος Ν. Νταλέκος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιβλέπων)

Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ειρήνη Ρηγοπούλου, Επίκουρος Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γεώργιος Ν. Νταλέκος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιβλέπων)

Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ειρήνη Ρηγοπούλου, Επίκουρος Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Μπόγδανος, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καλλιόπη Ζάχου, Επίκουρος Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γεώργιος Κουκούλης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κωνσταντίνος Μακαρίτσης, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

| | |
|---|------------|
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ | 5 |
| ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 8 |
| 1. ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ | 9 |
| 1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ..... | 9 |
| 1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ..... | 9 |
| 1.3 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ..... | 11 |
| 1.3.1 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ..... | 11 |
| 1.3.2 ΦΥΣΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ..... | 12 |
| 1.3.3 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ..... | 13 |
| 1.4 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ..... | 14 |
| 1.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ..... | 16 |
| 1.6 ΦΥΣΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΠΧΚ..... | 17 |
| 1.7 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ..... | 18 |
| 2. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΧΟΛΙΚΗΣ ΚΙΡΡΩΣΗΣ | 21 |
| 2.1 ΓΕΝΙΚΑ..... | 21 |
| 2.2 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ..... | 22 |
| 2.2.1 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΣΤΗΝ ΠΧΚ..... | 23 |
| 2.2.2 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΤΟΠΟΙ..... | 24 |
| 2.2.3 ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΗ Χ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΜΟΝΟΣΩΜΙΑ..... | 25 |
| 2.3 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ..... | 26 |
| 2.3.1 ΠΧΚ ΚΑΙ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ..... | 27 |
| 2.3.2 ΠΧΚ ΚΑΙ ΤΟΞΙΝΕΣ..... | 30 |
| 2.4 ΧΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ..... | 31 |
| 2.4.1 ΑΝΤΙΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (ΑΜΑ)..... | 31 |
| 2.4.2 ΑΝΤΙΠΥΡΗΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (ΑΝΑ)..... | 45 |
| 2.5 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ..... | 46 |
| 2.5.1 ΑΡΧΕΓΟΝΗ ΑΝΟΣΙΑ (INNATE IMMUNITY) ΣΤΗΝ ΠΧΚ..... | 47 |
| 2.5.2 ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ ΣΤΗΝ ΠΧΚ..... | 51 |
| 2.6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΠΧΚ..... | 64 |
| 2.7 ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΠΧΚ..... | 67 |
| 2.8 ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΧΟΛΗΦΟΡΩΝ (ΕΚΧ)..... | 69 |
| 2.9 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 72 |
| 3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ | 74 |
| ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 100 |
| 2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | |
| 2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ..... | 107 |
| 2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 108 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 128 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 172 |
| 5. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΥΣΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟ- ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ | 184 |
| 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ | 200 |
| 7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 206 |
| 8. SUMMARY AND CONCLUSIONS | 209 |

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η Πρωτοπαθής Χολική Κίρρωση (ΠΧΚ) είναι μια χρόνια αυτοάνοση χολοστατική νόσος του ήπατος που προσβάλλει κυρίως γυναίκες μέσης ηλικίας και χαρακτηρίζεται από προοδευτική φλεγμονώδη καταστροφή των μικρού μεγέθους ενδοηπατικών χοληφόρων που στη χειρότερη εκδήλωσή της σαν νόσος οδηγεί σε μη αναστρέψιμη κίρρωση και ηπατική ανεπάρκεια.

Ορολογικά, η ΠΧΚ χαρακτηρίζεται από την παρουσία υψηλού τίτλου αντι-μιτοχονδριακών αντισωμάτων (anti-mitochondrial antibody, AMA) και σε πολύ πρώιμα στάδια της νόσου, η παρουσία των AMA μπορεί να αποτελεί το μόνο ουσιαστικό εύρημα (ασυμπτωματικοί ασθενείς με ΠΧΚ με φυσιολογική ηπατική βιοχημεία). Ο βασικός αντιγονικός στόχος των AMA στην ΠΧΚ είναι η E2 υπομονάδα της πυρουβικής δευδρογενάσης (PDC-E2), η οποία και αναγνωρίζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95% των ασθενών. Η ρήξη της ανοσολογικής ανοχής έναντι της PDC-E2 φαίνεται να διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στην παθογενετική εξέλιξη της νόσου. Τα ακριβή αίτια και οι μηχανισμοί που οδηγούν στην απώλεια της ανοσολογικής ανοχής κατά της PDC-E2 στην ΠΧΚ παραμένουν αδιευκρίνιστα.

Παρά τον κατά γενική ομολογία πρωτεύοντα ρόλο της ειδικής έναντι του PDC-E2 CD4⁺ κυτταρικής ανοσολογικής απάντησης στην παθογένεια της νόσου υπάρχει μόνο μια μελέτη σε Ιάπωνες ασθενείς με ΠΧΚ που προσδιορίζει τους CD4⁺ λεμφοκυτταρικούς PDC-E2 επιτόπους. Στην εν λόγω μελέτη από τους Shimoda et al έχει περιγραφεί ως επικρατών επίτοπος το πεπτίδιο της PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆. Παρεμένει ωστόσο άγνωστο αν αυτός ο επίτοπος αναγνωρίζεται και από τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα ασθενών από άλλες πληθυσμιακές ομάδες πλην των Ιαπώνων. Παράλληλα δεν είναι επίσης γνωστό αν ο συγκεκριμένος επίτοπος είναι και ο μοναδικός. Είναι επίσης ενδιαφέρον, ότι στην Ελλάδα δεν υπάρχουν δεδομένα που να αφορούν στη χαρτογράφηση των επιτόπων της PDC-E2 ασθενών με ΠΧΚ σε επίπεδο χυμικής ανοσίας. Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να συμπληρωθούν τα πιο πάνω βιβλιογραφικά κενά όπως: α) Ο χαρακτηρισμός των IgG B κυτταρικών επιτόπων των αντι-PDC-E2 AMA σε μια ομάδα Ελλήνων ασθενών με καλά τεκμηριωμένη ΠΧΚ καθώς δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα σε σχέση με τους γραμμικούς επιτόπους των αντι-PDC-E2 AMA σε Έλληνες ασθενείς β) Η

διερεύνηση αν ο προηγούμενα περιγραφόμενος από τους Shimoda et al επίτοπος των αυτοδραστικών CD4+ T λεμφοκυττάρων αναγνωρίζεται και από Έλληνες ασθενείς με ΠΧΚ γ) Η μελέτη ύπαρξης επιπλέον επιτόπων που αναγνωρίζονται από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα. δ) Τέλος παρουσιάζεται μια ενδιαφέρουσα κλινικοργαστηριακή περίπτωση ασθενούς με ΠΧΚ.

Θα ήθελα να ευχαριστώ όλους όσους είχαν σημαντική συνεισφορά στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης. Ευχαριστώ όλα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για τη βοήθεια που μου παρείχαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής. Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων στον Καθηγητή Γεώργιο Νταλέκο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ουσιαστική του συνεισφορά στο να αγαπήσω την Παθολογία και τη Βασική Έρευνα. Θερμότερες ευχαριστίες θα ήθελα να προσδώσω και στην Επίκουρο Καθηγήτρια Ειρήνη Ρηγοπούλου για την ουσιαστική συμβολή που είχε στο σχεδιασμό των πειραμάτων αλλά και στην κριτική ανάγνωση του συγγράματος και τις διορθώσεις που υποσημείωσε. Ευχαριστώ τον Καθηγητή Αναστάσιο Γερμενή ο οποίος παρείχε ιδιαίτερη βοήθεια στο να μάθω τις βασικές αρχές της κυτταρικής ανοσολογίας στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας αλλά και για τη συμβολή του στο να αγαπήσω την Ανοσολογία.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Δημήτριο Μπόγδανο ο οποίος ήταν ο κύριος καθοδηγητής στο σχεδιασμό της μελέτης και των πειραμάτων αλλά και ο κύριος δάσκαλος μου στο πεδίο της Ανοσολογίας του Ήπατος τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο. Δε θα μπορούσα να μην αναγνωρίσω ότι μου δίδαξε την επιστημονική μέθοδο αναζήτησης της αλήθειας, όχι μέσω δηλώσεων και εκλογικευμένων επαγωγών αλλά μέσω παρατηρήσεων και πειραμάτων που περνάνε μέσα από το φίλτρο της επανάληψης.

Σημαντική βοήθεια στο εργαστήριο πρόσφεραν οι συνάδελφοι υποψήφιοι διδάκτορες Στέλλα Γκαμπέτα, Μαριάννα Μπακαρόζη, Κατερίνα Οικονόμου και ο Δρ Αθανάσιος Μαυρόπουλος τους οποίους ευχαριστώ. Ευχαριστίες οφείλω και στην παρασκευάστρια κ. Ελένη Εξάρχου για τη βοήθεια της στην διεξαγωγή των πειραμάτων, στους ιατρούς Δρ Καλλιόπη Ζάχου, κ. Γεωργία Παπαδάμου, Δρ. Νικόλαο Γατσέλη, τον Ιατρικό Επισκέπτη κ. Κώστα Γαλάνη και τους Ειδικευόμενους Ιατρούς Παθολογίας στον Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας για τη βοήθειά τους στη συλλογή των δειγμάτων αλλά και την κ. Σταυρούλα Καπέτη για την γραμματική υποστήριξη που παρείχε. Ευχαριστίες οφείλω και στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικής Έρευνας και Τεχνολογίας και τα μέλη του για τη πολύπλευρη

βοήθεια που μου πρόσφεραν. Ευχαριστίες οφείλω και στην Ιατρό Δρ Μαρία Μυτιλλιναίου στο King's College of London για την πολύπλευρη βοήθεια που παρείχε.

Ευχαριστώ επίσης το Εμπειρικό Ιδρυμα, το Ιδρυμα Α. Γ. Λεβέντη, το Ιδρυμα Μποδοσάκη και το Ιδρυμα Ωνάση για τη βοήθεια που μου πρόσφεραν ή με τη μορφή υποτροφίας ή με την στήριξη τους για συμμετοχή μου σε σεμινάρια.

Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Σάββα και Ιωάννα για την ανατροφή που μου πρόσφεραν και την στήριξή τους για να πετύχω τους στόχους μου, τα αδέρφια μου Γιώργο και Δέσποινα για την διαρκή στήριξή τους, την αρραβωνιαστικιά μου Μυρτώ της οποίας η υπομονή και η υποστήριξη υπήρξε γενναιόδωρη αλλά και τους δεκάδες φίλους και συγγενείς που με βοήθησαν και με στήριξαν συγγνωστά και ασύγνωστα.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η Πρωτοπαθής Χολική Κίρρωση (ΠΧΚ) είναι ένα βραδέως εξελισσόμενο αυτοάνοσο χολοστατικό νόσημα του ήπατος που προσβάλλει κυρίως γυναίκες μέσης ηλικίας. Τα κύρια συμπτώματα είναι ο κνησμός και η κόπωση, ενώ κατά τον εργαστηριακό έλεγχο παρατηρείται κυρίως αύξηση των χολοστατικών ενζύμων με ήπια ή καθόλου αύξηση των τρανσαμινασών και παρουσία αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων (AMA) σε ποσοστό >95% των ασθενών. Ιστολογικά χαρακτηρίζεται από πυλαία φλεγμονή και καταστροφή των ενδοηπατικών χολαγγείων. Η καταστροφή των χολαγγείων οδηγεί σε ελαττωμένη απέκκριση των χολικών αλάτων και σε κατακράτηση τοξικών για το ήπαρ ουσιών, με αποτέλεσμα να υπάρχει περαιτέρω ηπατική βλάβη, ίνωση, κίρρωση και πυλαία υπέρταση και τελικά ηπατική ανεπάρκεια και θάνατος [1].

1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η ΠΧΚ είναι μια νόσος που προσβάλλει κυρίως γυναίκες μέσης ηλικίας, με το λόγο προσβολής αντρών:γυναικών να είναι περίπου 1:10 ενώ σε κάποιες μελέτες αυτός ο λόγος φαίνεται να είναι μικρότερος μέχρι και 1:2 [2]. Η επίπτωση της νόσου εμφανίζει μια αιχμή στην πέμπτη δεκαετία της ζωής, ενώ η νόσος φαίνεται ότι είναι ασυνήθιστη πριν από την ηλικία των 25 ετών [1]. Παρόλο που η ΠΧΚ θεωρείται σχετικά σπάνια νόσος, δεδομένα που προέρχονται από διάφορες γεωγραφικές περιοχές δείχνουν ότι ο επιπολασμός της νόσου αυξάνεται σημαντικά [3-15] (Πίνακας 1). Οι σημαντικές διαφορές που παρουσιάζονται στον επιπολασμό της νόσου φαίνεται ότι αντικατοπτρίζουν μάλλον διαφορές στη μεθοδολογία κατά την αναζήτηση της νόσου, στην έγκαιρη ανίχνευση του νοσήματος σε ορισμένες χώρες με κέντρα αναφοράς για τη νόσο και στη σημαντική βελτίωση που παρατηρείται στην ανίχνευση των AMA σε ορισμένα κέντρα παρά σε μια πραγματική διαφορά στον επιπολασμό της νόσου [3].

Πίνακας 1. Επιλεγμένες μελέτες που παρουσιάζουν την επίπτωση, τον επιπολασμό, και τη σχέση ανδρών-γυναικών στην ΠΧΚ σε διάφορες περιοχές του κόσμου από το 1984 έως το 2009 (Από: Invernizzi, P., *Geoepidemiology of autoimmune liver diseases*. *J Autoimmun.* **34**: p. J300-6).

| Γεωγραφική περιοχή | Έτος | Αριθμός περιπτώσεων | Επίπτωση (ανά εκατομμύριο) | Επιπολασμός (ανά εκατομμύριο) | Φύλο (Α/Γ) | Αναφορά |
|---------------------|------|---------------------|----------------------------|-------------------------------|------------|---------|
| Ευρώπη | 1984 | 569 | 4 | 23 | 1/10 | [4] |
| Σουηδία | 1985 | 111 | 13.3 | 151 | 1/6 | [5] |
| Newcastle (H.B) | 1989 | 347 | 19 | 154 | 1/9 | [6] |
| Ontario, Καναδάς | 1990 | 225 | 3.26 | 22 | 1/13 | [7] |
| Victoria, Αυστραλία | 1995 | 84 | - | 19 | 1/11 | [8] |
| Εσθονία | 1995 | 69 | 2.27 | 26.9 | 1/22 | [9] |
| Νορβηγία | 1998 | 21 | 16 | 146 | 1/9 | [10] |
| Η.Π.Α. | 2000 | 46 | 27 | 402 | 1/8 | [11] |
| Newcastle (H.B) | 2001 | 770 | 31 | 251 | 1/10 | [12] |
| Victoria, Αυστραλία | 2004 | 249 | - | 51 | 1/10 | [13] |
| Ιαπωνία | 2005 | 9761 | - | 78 | 1/9 | [14] |
| Καναδάς | 2009 | 229 | 30 | 227 | 1/9 | [15] |

A=άνδρες, Γ= γυναίκες

Σε μια μελέτη από τις Η.Π.Α. αναφέρεται ότι η επίπτωση της νόσου είναι 30 περιστατικά ανά εκατομμύριο πληθυσμού με τον επιπολασμό να φτάνει τις 400 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο ανάμεσα στους Καυκάσιους [11]. Στη Βόρεια Αγγλία υπολογίζεται ότι 1 στις 800 γυναίκες άνω των 40 ετών πάσχει από ΠΧΚ [16]. Χαμηλότερη επίπτωση και επιπολασμός έχει παρατηρηθεί σε κάποιες περιοχές όπως ο Καναδάς, η Αυστραλία και η λεκάνη της Μεσογείου [4-9, 12, 14, 15]. Η εμφάνιση της νόσου ενδεχομένως να σχετίζεται με την καταγωγή ενός ατόμου, όπως προκύπτει από μελέτη που διενεργήθηκε στην Αυστραλία, στην οποία φάνηκε ότι μετανάστες από την Ελλάδα, Ιταλία και Αγγλία είχαν αυξημένο επιπολασμό της ΠΧΚ σε σύγκριση με το γηγενή πληθυσμό, γεγονός που υποδεικνύει ότι γενετικοί παράγοντες εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου [13].

1.3 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

1.3.1 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Κόπωση

Η κόπωση είναι το πλέον κοινό σύμπτωμα που εμφανίζεται στους ασθενείς με ΠΧΚ και αναφέρεται σε περίπου 80% των ασθενών [17-19]. Η κόπωση είναι μη ειδικό σύμπτωμα και εκτός από την ΠΧΚ εμφανίζεται σε πολλά νοσήματα συμπεριλαμβανομένου και του υποθυρεοειδισμού που συχνά (20%) συνυπάρχει με την ΠΧΚ [20]. Δε συσχετίζεται με τη σοβαρότητα, το ιστολογικό στάδιο ή τη διάρκεια της νόσου. Η βαρύτητα του συμπτώματος αναφέρεται ότι συμβάλλει στην επιδείνωση της ποιότητας ζωής των ασθενών και μπορεί να συνδέεται με χαμηλότερο προσδόκιμο επιβίωσης [19, 21]. Η αιτιολογία της κόπωσης στην ΠΧΚ δεν έχει διευκρινιστεί, αν και σε μια μελέτη περιγράφεται συνύπαρξη νευροπάθειας του αυτόνομου νευρικού συστήματος και της κόπωσης σε ασθενείς με ΠΧΚ [22].

Κνησμός

Ο κνησμός είναι πιο ειδικό σύμπτωμα για την ΠΧΚ σε σχέση με την κόπωση και εμφανίζεται σε 20%-70% των ασθενών. Στις μέρες μας είναι λιγότερο συχνό σύμπτωμα κατά τη διάγνωση δεδομένου ότι η διάγνωση σε μεγάλη μερίδα των ασθενών προηγείται της εμφάνισης των συμπτωμάτων [23-25]. Ο κνησμός μπορεί να είναι τοπικός ή γενικευμένος με εντονότερα συμπτώματα το βράδυ. Όταν εμφανιστεί σαν σύμπτωμα συνήθως σταδιακά μειώνεται [25] ενώ είναι ασυνήθιστο να εξαφανιστεί χωρίς θεραπεία. Η παθογένεια του κνησμού είναι εν πολλοίς άγνωστη. Έχει προταθεί πως ο κνησμός της χολόστασης επάγεται -έστω και μερικώς- από αυξημένη νευροδιαβίβαση των οπιοειδών [26] ενώ άλλες μελέτες υποστηρίζουν το ρόλο των συστατικών της χολής στην παθογένεια του κνησμού [27].

Άλλα συμπτώματα

Η ΠΧΚ μπορεί να εμφανιστεί με ξηροφθαλμία και ξηροστομία στα πλαίσια ή όχι του συνδρόμου Sjogren, με συμπτωματολογία του συνδρόμου CREST ή με τη συμπτωματολογία άλλου νοσήματος που συνυπάρχει με την ΠΧΚ. Έχουν περιγραφεί περιστατικά ΠΧΚ που διαγνώστηκαν κατά τη διερεύνηση πορφύρας Henoch-Schonlein, ηωσινοφιλίας και οζώδους ερυθήματος [28-30].

Πυλαία υπέρταση

Η πυλαία υπέρταση εμφανίζεται όπως και σε άλλα νοσήματα του ήπατος όψιμα κατά την εξέλιξη της νόσου και μετά την ανάπτυξη της κίρρωσης. Στην ΠΧΚ όμως, πυλαία υπέρταση μπορεί να παρατηρηθεί και νωρίτερα στη φυσική πορεία του νοσήματος σε προκίρρωτικούς ασθενείς. Αυτοί οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν αιμορραγία λόγω ανάπτυξης κισμών στα σημεία αναστόμωσης του πυλαίου και του συστηματικού φλεβικού δικτύου. Η οξώδης αναγεννητική υπερπλασία συνδυάζεται με απόφραξη των ηπατικών φλεβιδίων που ενδεχομένως να οδηγεί στην πυλαία υπέρταση σε κάποιους από αυτούς τους ασθενείς [31, 32]. Αυτοί οι ασθενείς επιβιώνουν για αρκετά χρόνια χωρίς μεταμόσχευση μετά την αιμορραγία των κισμών [32, 33]. Ασκίτης και ηπατική εγκεφαλοπάθεια αναπτύσσονται μόνο στα τελικά στάδια της νόσου και μετά την ανάπτυξη κίρρωσης.

Οστική νόσος στην ΠΧΚ

Η οστεοπόρωση είναι η πιο συχνή οστική νόσος στην ΠΧΚ (αναφέρεται στο 1/3 των ασθενών) [34, 35], ενώ ο σχετικός κίνδυνος για εμφάνιση οστεοπόρωσης ανέρχεται στο 4.4 όταν οι ασθενείς συγκρίνονται με μάρτυρες της ίδιας ηλικίας και φύλου [34, 35]. Η προχωρημένη νόσος με κλινική εικόνα καταγμάτων δεν είναι συνηθέστερη στην ΠΧΚ σε σχέση με το γενικό πληθυσμό [36-38]. Η παθογένεια της οστεοπόρωσης στην ΠΧΚ δεν είναι αποσαφηνισμένη αν και έχει φανεί ότι η ικανότητα δημιουργίας νέου οστού με φυσιολογικό ή χαμηλό ρυθμό αποδόμησης του οστού είναι μειωμένη σε ασθενείς με ΠΧΚ [37, 39, 40]. Ο μεταβολισμός της βιταμίνης D είναι φυσιολογικός σε αυτούς τους ασθενείς εκτός και αν υπάρχει ίκτερος ή η νόσος είναι σε πολύ προχωρημένο στάδιο [41-43].

1.3.2 ΦΥΣΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Στο προκίρρωτικό στάδιο, η αντικειμενική εξέταση μπορεί να μην αναδείξει παθολογικά ευρήματα. Ξανθώματα και ξανθελάσματα μπορεί να εμφανιστούν, όπως και γενικευμένη μελάγχρωση του δέρματος. Στην πορεία της νόσου και κατά την ανάπτυξη κίρρωσης εμφανίζονται τα σημεία της ανεπάρκειας του ήπατος, της υπεριοιστρογοναιμίας και της

πυλαίας υπέρτασης. Ο ίκτερος αποτελεί όψιμο σημείο στην φυσική ιστορία της νόσου και χαρακτηρίζει τα τελικά στάδια αυτής.

1.3.3 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Βιοχημικοί δείκτες ηπατικής λειτουργίας

Οι περισσότεροι ασθενείς με ΠΧΚ παρουσιάζουν διαταραχή της ηπατικής βιοχημείας με κύριο χαρακτηριστικό την αύξηση της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP-alkaline phosphatase) και της γ-γλουταμινικής τρανσφεράσης (γGT- gamma-glutamyltransferase or gamma-glutamyl transpeptidase). Συχνά συνυπάρχει μικρότερου βαθμού αύξηση των αμινοτρανσφερασών (ALT- alanine aminotransferase και AST-aspartate aminotransferase). Οι αλλαγές στην ηπατική βιοχημεία σχετίζονται εν μέρει με το στάδιο της νόσου και τις ιστολογικές βλάβες [44, 45]. Στους ασθενείς που δεν είναι κίρρωτικοί, η αύξηση της ALP σχετίζεται με τη σοβαρότητα της χολαγγειοπενίας και της φλεγμονής. Η αύξηση των αμινοτρανσφερασών και η αύξηση της IgG σχετίζεται με την περιπυλαία λοβιακή νέκρωση και φλεγμονή, ενώ η υπερχολερυθριναιμία σχετίζεται με το μέγεθος της καταστροφής των χοληφόρων. Η αύξηση της χολερυθρίνης, των γ-σφαιρινών και του υαλουρονικού οξέος σε συνδυασμό με τη μείωση της αλβουμίνης του ορού και των αιμοπεταλίων είναι δείκτες ανάπτυξης κίρρωσης και πυλαίας υπέρτασης [44, 45].

Υπερλιπιδαιμία

Τα λιπίδια του ορού στη ΠΧΚ είναι συχνά αυξημένα [46, 47]. Ο μηχανισμός ανάπτυξης της υπερλιπιδαιμίας στην ΠΧΚ είναι διαφορετικός από αυτόν που ευθύνεται για την υπερλιπιδαιμία σε άλλες παθολογικές καταστάσεις. Τα επίπεδα της HDL είναι αυξημένα και πιο σπάνιοι τύποι λιποπρωτεϊνών, όπως η λιποπρωτεΐνη X είναι δυνατόν να συσσωρευτούν [48]. Σε δύο διαφορετικές μελέτες ο μέσος όρος της ολικής χοληστερόλης στους ασθενείς με ΠΧΚ ήταν 370 και 265 mg/dL αντίστοιχα με τα επίπεδα να κυμαίνονται από 120-1775 mg/dL [48, 49]. Η HDL ήταν δυσανάλογα υψηλή σε σχέση με την LDL και ως εκ τούτου οι ασθενείς με ΠΧΚ φαίνεται ότι δεν έχουν αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν αθηρωμάτωση [50].

Ανεπάρκεια βιταμινών

Οι ασθενείς με ΠΧΚ παρουσιάζουν μειωμένη έκκριση χολικών αλάτων που σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για δυσαπορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών Α, D, Ε και Κ. Παρόλα αυτά, κλινικά οι ανεπάρκειες αυτές είναι συνήθως χωρίς πρακτική σημασία [51, 52]. Εξαίρεση αποτελούν οι ασθενείς με παρατεταμένο ίκτερο που είναι υποψήφιοι για μεταμόσχευση ήπατος. Η έλλειψη των βιταμινών Α, D, Ε, και Κ προκαλούν νυχτερινή τύφλωση, οστεομαλακία, νευρολογικές βλάβες και διαταραχές της πήξης του αίματος αντίστοιχα, αλλά αποτελούν πολύ σπάνιες οντότητες στους ασθενείς με ΠΧΚ.

Ανοσολογικά χαρακτηριστικά

Διαταραχές τόσο της χυμικής όσο και της κυτταρικής ανοσίας ανευρίσκονται στην ΠΧΚ. Η ειδική κυτταρική και χυμική ανοσία περιγράφονται λεπτομερώς σε άλλο μέρος του Γενικού Μέρους (Παράγραφος 2.4 και 2.5).

Χαρακτηριστικά της διαταραχής της ανοσολογικής απόκρισης αποτελούν η παρουσία υψηλών τίτλων IgM ανοσοσφαιρίνης [53], η αδυναμία μετατροπής της παραγωγής IgM αντισωμάτων σε IgG σε ορισμένες περιπτώσεις [54], η παρουσία πληθώρας αυτοαντισωμάτων μη ειδικών για τη νόσο, η ύπαρξη ανεργίας σε μερίδα ασθενών, η δημιουργία κοκκιωμάτων και η συνύπαρξη άλλων αυτοανόσων νοσημάτων [55] όπως η θυρεοειδίτιδα Hashimoto, το σύνδρομο Sjogren, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και το σκληρόδερμα.

1.4 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

Το βασικό ιστολογικό χαρακτηριστικό της ΠΧΚ είναι η χρόνια, μη πυώδης χολαγγειίτιδα που προσβάλλει κυρίως τα ενδολοβιακά και διαφραγματικά χολαγγεία. Η φλεγμονώδης διήθηση αποτελείται κυρίως από λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, πολυμορφοπύρρηνα (ιδιαίτερα ηωσινόφιλα στα αρχικά στάδια) και σε κάποιες περιπτώσεις (ιδιαίτερα στα πρώιμα στάδια της νόσου) επιθηλιοειδή κοκκιώματα [1]. Μερικά μόνο αρτηρίδια επηρεάζονται ενώ τα πυλαία φλεβίδια συχνά αποφράσσονται λόγω της φλεγμονώδους αντίδρασης. Η χολαγγειοπενία δεν είναι ασυνήθης και ορίζεται ως η μη ύπαρξη χολαγγείων σε περισσότερα από τα μισά πυλαία διαστήματα. Το μέγεθος της βιοψίας στη διάγνωση της ΠΧΚ και στην ανεύρεση των βλαβών είναι σημαντική παράμετρος. Οι βλάβες στην ΠΧΚ δεν έχουν πάντα διάχυτη κατανομή και η πιθανότητα να

παρατηρηθούν βλάβες συμβατές με ΠΧΚ στη βιοψία αυξάνει ανάλογα με την αύξηση του αριθμού των πυλαίων διαστημάτων που υπάρχουν σε αυτή. Βάσει των παραπάνω, το δείγμα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον 10-15 πυλαία διαστήματα προκειμένου να εκτιμηθεί με σχετική αξιοπιστία το ιστολογικό στάδιο της νόσου, ενώ συχνά συστήνεται η λήψη πολλαπλών δειγμάτων για να αποκλειστεί με βεβαιότητα η ύπαρξη τυπικών βλαβών όπως η χολαγγειίτιδα και χολαγγειοπενία. Σε προχωρημένα στάδια μπορεί να παρατηρηθούν επίσης εναποθέσεις χαλκού περιπυλαία και γύρω από τα διαφραγμάτια, περιπυλαία και περιλοβιακή αφρώδη εκφύλιση των ηπατοκυττάρων (feathery degeneration) με ή χωρίς σωματίδια Mallory-Denk και χολοστατικές ροσέττες. Πραγματική στάση χολής συνήθως δεν παρατηρείται μέχρι τη φάση της μη αντιρροπούμενης κίρρωσης.

Οι ιστολογικές βλάβες ανάλογα με τη μορφολογία τους, κλασσικά ταξινομούνται σε τέσσερα στάδια είτε κατά Scheuer [56] είτε κατά Ludwig [57] που κατά κύριο λόγο είναι παρόμοια με εξαίρεση κάποια ελάσσονα στοιχεία (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Κατάταξη ιστολογικών βλαβών στην ΠΧΚ κατά Scheuer [56] και Ludwig [57].

| Στάδιο | Scheuer | Ludwig |
|--------------------|--|--|
| I (Πυλαία) | Πυλαία φλεγμονή με βλάβη χοληφόρων με ή χωρίς συρρέουσες βλάβες στα χοληφόρα | Πυλαία φλεγμονή με βλάβη χοληφόρων με ή χωρίς συρρέουσες βλάβες στα χοληφόρα |
| II (Περιπυλαία) | Πορική αντίδραση (περιπυλαία ίνωση συνήθως παρούσα) | Πορική αντίδραση (περιπυλαία ίνωση συνήθως παρούσα) |
| III (Διαφραματική) | Γεφυροποιός ίνωση (χολαγγειοπενία συνήθως παρούσα) | Γεφυροποιός ίνωση (χολαγγειοπενία συνήθως παρούσα) |
| IV (Κίρρωση) | Χολική Κίρρωση | Χολική Κίρρωση |

Αναλυτικά, το Στάδιο I χαρακτηρίζεται από πυλαία φλεγμονή με ή χωρίς την παρουσία συρρέουσων βλαβών στα χοληφόρα. Σε αυτό το στάδιο η φλεγμονή παραμένει εντός των πυλαίων διαστημάτων. Η εξέλιξη της νόσου χαρακτηρίζεται από σταδιακή αύξηση των περιπυλαίων διηθήσεων που επεκτείνονται και στο ηπατικό παρέγχυμα με την εμφάνιση χολικής διαβρωτικής νέκρωσης ή χολικής περιπυλαίας ηπατίτιδας (Στάδιο II). Οι περιπυλαίες βλάβες γίνονται σταδιακά ακανόνιστες χαρακτηριζόμενες από κυτταρική νέκρωση και απόπτωση, αποχωρισμό των ηπατοκυττάρων από τα κύτταρα φλεγμονής

και τα μακροφάγα. Υπάρχουν δύο τύποι περιπυλαίας ηπατίτιδας. Ο πρώτος τύπος είναι η λεμφοκυτταρική διαβρωτική νέκρωση, ο συνδυασμός ηπατοκυτταρικής νέκρωσης ή απόπτωσης με λεμφοϊστιοκυτταρικά κύτταρα. Η βλάβη αυτή είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στην αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ). Ο δεύτερος αφορά τη διαβρωτική νέκρωση στα χοληφόρα, η οποία χαρακτηρίζεται από σημαντική φλεγμονώδη αντίδραση στα χολαγγειοκύτταρα, που ενίοτε αναφέρεται και σαν πολλαπλασιασμός των χοληφόρων (ductular proliferation) και συνοδεύεται από οίδημα, διήθηση ουδετεροφίλων, περιχολαγγειακή ίνωση και νέκρωση ηπατοκυττάρων με συνοδό φλεγμονή. Έχει φανεί ότι η βαρύτητα της περιπυλαίας ηπατίτιδας μπορεί να προβλέψει αξιόπιστα την ανάπτυξη σημαντικής ίνωσης [45, 58]. Το Στάδιο III χαρακτηρίζεται από διαταραχή της αρχιτεκτονικής του ήπατος και ποικίλα ινώδη διαφραγμάτια. Κίρρωση με παρουσία αναγεννητικών όζων χαρακτηρίζει το Στάδιο IV. Η οζώδης αναγεννητική υπερπλασία είναι γνωστή επιπλοκή της ΠΧΚ και θα πρέπει να διαφοροδιαγιγνώσκεται από την κίρρωση.

Η αναγκαιότητα διενέργειας βιοψίας ήπατος έχει αμφισβητηθεί από ορισμένους ερευνητές [59]. Ο ισχυρισμός αυτός βασίστηκε κυρίως σε δεδομένα, που δείχνουν ότι ο συνδυασμός της παρουσίας των AMA, που έχουν υψηλή ειδικότητα για την ΠΧΚ, και της αύξησης της ALP πάνω από 1.5 φορές το ανώτερο φυσιολογικό μαζί με αύξηση της AST πάνω από 5 φορές το ανώτερο φυσιολογικό έχουν υψηλή ευαισθησία για τη διάγνωση της νόσου [59]. Κανείς όμως δεν αμφισβητεί τη χρησιμότητα της βιοψίας και τη συμβολή της στη διάγνωση συνοδών παθήσεων του ήπατος όπως η ΑΗ, στον καθορισμό του σταδίου της νόσου και στη διάγνωση της νόσου στους AMA αρνητικούς ασθενείς ή στους ασθενείς που έχουν θετικά AMA χωρίς την παρουσία βιοχημικών δεικτών χολόστασης [45, 58, 60].

1.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Σύμφωνα με τις οδηγίες της Αμερικανικής Εταιρίας Μελέτης του Ήπατος (AASLD) η διάγνωση της ΠΧΚ βασίζεται τουλάχιστον σε δύο εκ των τριών ακόλουθων κριτηρίων: (1) παρουσία χολόστασης, η οποία καταδεινύεται από τα αυξημένα επίπεδα χολοστατικών ενζύμων (κυρίως αύξηση της ALP), (2) την ύπαρξη AMA και (3) την ύπαρξη ιστοπαθολογικών ευρημάτων μη πυώδους χολαγγειίτιδας με καταστροφή των μικρών και μέσου μεγέθους χολαγγείων (Classification: Class I, Level of Evidence: Level B) [61]. Η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει τη φαρμακευτικής αιτιολογίας χολόσταση,

την απόφραξη των χοληφόρων από οποιαδήποτε αιτία, τη σαρκοείδωση και άλλα κοκκιωματώδη νοσήματα του ήπατος, την ΑΗ και την πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ).

1.6 ΦΥΣΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΠΧΚ

Η ΠΧΚ είναι μια ασθένεια που εξελίσσεται σε μεγάλο βάθος χρόνου. Ο ρυθμός εξέλιξης της νόσου διαφέρει μεταξύ των ασθενών. Στην εποχή μας οι ασθενείς είναι πιο πιθανό να διαγνωστούν πριν την εμφάνιση συμπτωμάτων και νωρίς κατά την πορεία της νόσου [62] και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την πρώιμη θεραπευτική παρέμβαση και τελικά την καλύτερη πρόγνωση των ασθενών.

Η καθιερωμένη θεραπεία για την ΠΧΚ είναι το ουρσοδεοξυχολικό οξύ (UrsoDeoxy Cholic Acid - UDCA) [63, 64]. Τα υπάρχοντα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ασθενείς που είχαν διαγνωστεί με ΠΧΚ πριν από δεκαετίες και δεν είχαν λάβει θεραπεία είχαν χειρότερη πρόγνωση. Σύμφωνα με τις πρώτες στο είδος μελέτες περίπου το 1/3 των ασθενών με ΠΧΚ που λαμβάνουν UDCA παρουσιάζουν πλήρη βιοχημική ανταπόκριση με ομαλοποίηση των βιοχημικών παραμέτρων και βελτίωση των ιστολογικών ευρημάτων [65]. Από τους ασθενείς που θεραπεύονται με UDCA, 20% παραμένουν χωρίς εξέλιξη της ιστολογικής εικόνας για πάνω από τέσσερα χρόνια ή ακόμη και πάνω από μια δεκαετία [65]. Σε προχωρημένα στάδια της νόσου (Στάδιο III και IV) η θεραπεία με UDCA δε φαίνεται να αλλάζει την εξέλιξη της νόσου [60]. Σε 770 ασθενείς από τη Βόρειο Αγγλία που διαγνώστηκαν με ΠΧΚ μεταξύ 1987 και 1994, ο διάμεσος χρόνος μέχρι το θάνατο ή μέχρι τη μεταμόσχευση ήταν μόνο 9.3 χρόνια [66]. Το προσδόκιμο επιβίωσης δεν ήταν καλύτερο από αυτό που προβλέπεται από το προγνωστικό μοντέλο της νόσου από την κλινική Mayo για τους ασθενείς που δε λαμβάνουν θεραπεία [67]. Σε αυτή τη μελέτη 261 ασθενείς (34%) θεραπεύονταν με UDCA και δε φάνηκε να έχουν καλύτερη πρόγνωση από αυτούς που δε λάμβαναν θεραπεία. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αντίθετα προς τα αποτελέσματα άλλων μελετών [64, 68]. Φάνηκε επίσης ότι οι ασθενείς που ήταν ασυμπτωματικοί κατά τη διάγνωση δεν είχαν αυξημένο προσδόκιμο επιβίωσης σε σχέση με αυτούς που ήταν συμπτωματικοί στη διάγνωση, αποτέλεσμα που επίσης αντιτίθεται με τα αποτελέσματα άλλων μελετών [69]. Η ύπαρξη ίκτερου, μη αναστρέψιμης απώλειας χοληφόρων, κίρρωσης και άλλου αυτοάνοσου νοσήματος είναι παράγοντες που σχετίζονται με μειωμένη επιβίωση. Σε άλλες δύο μελέτες υπολογίστηκε ότι ο μέσος χρόνος εξέλιξης από το στάδιο 1 ή το στάδιο 2 σε κίρρωση σε ασθενείς που

δε λάμβαναν θεραπεία ήταν 4 έως 6 χρόνια [60, 65]. Σε ασθενείς με κίρρωση το μέσο χρονικό διάστημα που χρειάζεται για να αυξηθεί η χολερυθρίνη στο επίπεδο των 5 mg/dl είναι 5 χρόνια [60, 69]. Τα πιο πάνω δεδομένα δε συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα νεότερων μελετών που δείχνουν τη θετική επίδραση του UDCA στην εξέλιξη της νόσου. Σε μια γερμανική μελέτη φάνηκε ότι οι ασθενείς με πρώιμα στάδια έχουν συγκρίσιμο προσδόκιμο επιβίωσης με αυτό του γενικού πληθυσμού ενώ μεταξύ των ασθενών με ΠΧΚ, αυτοί που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία με UDCA έχουν καλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης σε σχέση με αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία [70]. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τις παρατηρήσεις μιας ισπανικής μελέτης που ανέφερε ότι η ασθενείς που ανταποκρίνονται βιοχημικά στην θεραπεία με UDCA μετά από ένα χρόνο έχουν προσδόκιμο συγκρίσιμο με αυτό του γενικού πληθυσμού [71]. Η θετική επίδραση του UDCA στην εξέλιξη της νόσου τεκμηριώνεται και από μια σχετικά πρόσφατη μελέτη που δείχνει ότι η πρόωρη ανίχνευση και εγκαιρη θεραπεία της νόσου βελτιώνει το προσδόκιμο επιβίωσης [72]. Τόσο η παρουσία, όσο και ο τίτλος των AMA δεν αποτελούν προγνωστικό δείκτη για την εξέλιξη της νόσου, το προσδόκιμο επιβίωσης, αλλά ούτε και για την εξέλιξη της νόσου. Αντίθετα η παρουσία των ειδικών για την ΠΧΚ αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) φαίνεται να σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση [73-75].

1.7 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Κατά περιόδους έχουν μελετηθεί διάφορα φάρμακα για τη θεραπεία της ΠΧΚ. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται συνοπτικά τα φάρμακα που έχουν μελετηθεί ή χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη για τη θεραπεία της ΠΧΚ μαζί με την αποτελεσματικότητά τους και τη συνιστώμενη δόση τους.

Η θεραπεία με UDCA σε δόση 12-15 mg ανά κιλό βάρους σώματος την ημέρα σε δύο διαιρεμένες δόσεις είναι το μόνο φάρμακο που έχει εγκριθεί από το FDA για τη θεραπεία της ΠΧΚ. Ελαττώνει τα επίπεδα της χολερυθρίνης, της ALP, της ALT, της AST, της χοληστερόλης και της IgM [68, 76]. Σε μια ανάλυση που χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από τρεις προηγούμενες μελέτες σε σύνολο 548 ασθενών [68], φάνηκε ότι το UDCA μειώνει σημαντικά την πιθανότητα μεταμόσχευσης ήπατος ή θανάτου μετά από 4 χρόνια θεραπείας [64, 68], καθυστερεί την εξέλιξη της ηπατικής ίνωσης όταν χορηγείται στα πρώιμα στάδια της νόσου [60, 64], καθυστερεί την ανάπτυξη κίρρωσης του οισοφάγου [77], ενώ δεν είναι αποτελεσματικό σε προχωρημένα στάδια της νόσου. Όπως

αναφέρθηκε και πίο πανω, έχει τεκμηριωθεί η θετική επίδραση του UDCA στην εξέλιξη της νόσου όταν η θεραπεία ξεκινά νωρίς και κατά τα πρώιμα στάδια της νόσου [72]. Επιπρόσθετα το UDCA είναι ασφαλές φάρμακο και με πολύ λίγες παρενέργειες. Σε αυτές συγκαταλέγονται η αύξηση βάρους, η απώλεια μαλλιών και ενίοτε γαστρεντερικές διαταραχές

Πίνακας 3. Φάρμακα που χρησιμοποιούνται ή έχουν προταθεί για τη θεραπεία της ΠΧΚ (Τροποποιημένο από Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 2005;353:1261-73).

| Φαρμακευτική ουσία | Σχόλια |
|---|---|
| ΟύρσοΔεόξυ Χολικό Οξύ (UrsoDeoxy Cholic Acid-UDCA) | Το μόνο φάρμακο που εγκρίθηκε από το FDA για τη θεραπεία της ΠΧΚ. Δόση: 12 με 15 mg ανά κιλό βάρους ημερησίως σε δύο δόσεις. Ελαττώνει τα επίπεδα της χολερυθρίνης, των ηπατικών ενζύμων, της χοληστερόλης και της IgM. Αυξάνει την περίοδο επιβίωσης χωρίς μεταμόσχευση ήπατος. Καθυστερεί την εξέλιξη της ίνωσης και την εμφάνιση πτυλαίας υπέρτασης. |
| Κολχικίνη | Χρησιμοποιείται σε ασθενείς με μερική ανταπόκριση στο UDCA. Δόση 0.6mg, δύο φορές την ημέρα. Μειώνει τα ηπατικά ένζυμα και ίσως αυξάνει το προσδόκιμο επιβίωσης. Η αποτελεσματικότητα δεν έχει αποδειχτεί σε διπλές τυφλές μελέτες. |
| Μεθοτρεξάτη | Χρησιμοποιείται σε ασθενείς με μερική ανταπόκριση στο UDCA. Δόση 0.25mg ανά κιλό, ανά εβδομάδα. Μειώνει τα ηπατικά ένζυμα, τη χοληστερόλη, την IgM και βελτιώνει την ιστολογική εικόνα. Η αποτελεσματικότητα δεν έχει αποδειχτεί σε διπλές τυφλές μελέτες. |
| Πρεδνιζόνη | Περιορισμένη -αν υπάρχει- αποτελεσματικότητα. Επιδεινώνει την οστεοπόρωση. |
| Βουδεσονίδη | Δόση: 6mg ημερησίως. Βελτιώνει την ιστολογική εικόνα και τη βιοχημεία του ήπατος όταν χρησιμοποιείται με το UDCA. Δεν υπάρχουν δεδομένα για την αποτελεσματικότητα στην επιβίωση. |
| Κυκλοσπορίνη | Περιορισμένη αποτελεσματικότητα, πολλές παρενέργειες. |
| Αζαθειοπρίνη, Μυκοφαινολάτη | Περιορισμένη αποτελεσματικότητα. |
| Πενικαλλαμίνη | Όχι αποτελεσματικό, σοβαρές παρενέργειες. |
| Χλωραμβουκίλη | Όχι αποτελεσματικότητα αλλά πολλές παρενέργειες. |
| Θαλιδομίδη, malotilate | Όχι αποτελεσματικό σε μικρές μελέτες. |
| Silymarin | Όχι αποτελεσματικό σε πιλοτικές μελέτες. Συστατικό στο γάλα από γαϊδουράγκαθο (milk thistle). Διαθέσιμο σε καταστήματα βιολογικών προϊόντων, χρησιμοποιείται από κάποιους ασθενείς εκτός Ελλάδας χωρίς να συστήνεται από τους γιατρούς. |
| Sulindac, benzafibrate, ταμοξιφένη | Περιορισμένα δεδομένα. Ίσως μειώνουν τα ηπατικά ένζυμα. |

Παρόλα αυτά, δύο μεταanalύσεις έθεσαν υπό ερώτηση τη αποτελεσματικότητα του UDCA. Το βασικό μειονέκτημα των μετα-αναλύσεων αυτών είναι ότι βασίστηκαν σε

δεδομένα που αφορούσαν θεραπεία διάρκειας 2 ετών με UDCA [78, 79]. Το UDCA φαίνεται να μειώνει το ρυθμό ανάπτυξης της νόσου στους περισσότερους ασθενείς και να είναι ισχυρά αποτελεσματικό σε 25-30% των ασθενών [80]. Το προσδόκιμο επιβίωσης στους ασθενείς που θεραπεύονται με UDCA είναι συγκρίσιμο με υγιείς μάρτυρες ίδιου φύλου και ίδιας ηλικίας μετά από τουλάχιστον 20 χρόνια παρακολούθησης [72, 81].

2. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΧΟΛΙΚΗΣ ΚΙΡΡΩΣΗΣ

2.1 ΓΕΝΙΚΑ

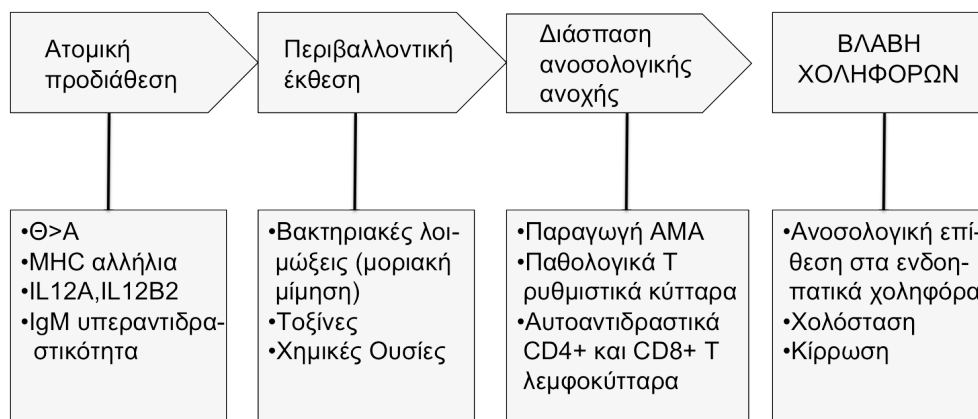
Η ΠΧΚ θεωρείται από ορισμένους πρότυπο αυτοάνοσης νόσου. Αν και έχουν γίνει πολλές μελέτες που αφορούν στη διαλεύκανση της αιτιοπαθογένειας της νόσου, πολλά ερωτήματα παραμένουν ακόμη αναπάντητα [82]. Στον ακόλουθο Πίνακα 4, παραθέτονται χαρακτηριστικά της νόσου που συνηγορούν υπέρ του αυτοανόσου χαρακτήρα του νοσήματος και άλλα που δεν συμβαδίζουν με τη θεωρία αυτή [61, 83-92].

Πίνακας 4. Στοιχεία υπέρ ή εναντίον της αυτοανοσίας σαν κύριου αιτιοπαθογενετικού μηχανισμού στην ΠΧΚ (Τροποποιημένο από *Selmi C, Bowlus CL, Gershwin ME, Coppel RL. Primary biliary cirrhosis. Lancet; 377:1600-9.*)

| Χαρακτηριστικά υπέρ και εναντίον της αυτοανόσου αιτιοπαθογένειας της ΠΧΚ | Αναφορά |
|---|----------|
| Υπέρ της αυτοανοσίας | |
| Ειδικά αυτοαντισώματα | [83, 84] |
| Αυτοδραστικά CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα | [85-88] |
| Εμφάνιση της χολαγγειίτιδας μετά από μεταφορά αυτοδραστικών CD8+T λεμφοκυττάρων σε ποντίκια | [89] |
| Λειτουργικές βλάβες T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων | [90] |
| Υπεροχή γυναικών | [91] |
| Συνύπαρξη άλλων αυτοανόσων νοσημάτων | [61, 92] |
| Συσχετισμός με συγκεκριμένα MHC αλληλόμορφα | [93] |
| Κατά της αυτοανοσίας | |
| Απουσία νόσου μετά από μεταφορά AMA σε ποντίκια | |
| Απουσία συσχέτισης τίτλου των AMA με τη σοβαρότητα της νόσου | [94] |
| Απουσία ανταπόκρισης σε ανοσοκατασταλτική θεραπεία | [61, 92] |

Τρία σημαντικά στοιχεία θέτουν τους άξονες για την ερμηνεία της παθογένειας της νόσου. Το πρώτο είναι η παρουσία των AMA και των αυτοδραστικών T λεμφοκυττάρων που υποδεικνύει διάσπαση της ανοσολογικής ανοχής στα μιτοχονδριακά αντιγόνα και ιδιαίτερα στην E2 υπομονάδα της πυρουβικής αφυδρογονάσης (E2 subunit of Pyruvate Dehydrogenase Complex, PDC-E2). Δεύτερο, παρόλο που τα αντιγόνα στόχοι βρίσκονται σε όλα τα ανθρώπινα κύτταρα, η ανοσολογική βλάβη εμφανίζεται εντοπισμένη στα επιθηλιακά κύτταρα των ενδοηπατικών χοληφόρων και σε λιγότερο βαθμό στους σιελογόνους και δακρυϊκούς αδένες. Τρίτο, η υποτροπή της νόσου μετά

από μεταμόσχευση ήπατος δείχνει ότι η ανοσολογική βλάβη παραμένει έναντι των επιθηλιακών κυττάρων των ενδοηπατικών χολαγγείων. Υπάρχει επίσης οικογενειακή προδιάθεση και πολλοί γενετικοί παράγοντες έχουν συσχετιστεί με τη νόσο [95-97]. Τέλος, διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για τη συμβολή τους στη διάσπαση της ανοσολογικής ανοχής στα μιτοχονδριακά αντιγόνα. Έτσι, το επικρατέστερο μοντέλο προτείνει μια τροποποίηση της ανοσολογικής απάντησης από περιβαλλοντικούς παράγοντες σε ένα υπόστρωμα γενετικά καθορισμένων παραγόντων που προδιαθέτει στη ρήξη της ανοσολογικής ανοχής και τελικά στην ανάπτυξη του κλινικού φαινότυπου της νόσου (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Επικρατέστερο μοντέλο για την ανάπτυξη της ΠΧΚ (Τροποποιημένο από *Selmi C, Bowlus CL, Gershwin ME, Coppel RL. Primary biliary cirrhosis. Lancet; 377:1600-9.*)

2.2 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η επικρατούσα άποψη για την αιτιοπαθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων υποστηρίζει την επίδραση διάφορων περιβαλλοντικών παραγόντων σε ένα υπόστρωμα προδιαθεσικών χαρακτηριστικών, ανάμεσα στους οποίους συγκαταλέγεται και το κατάλληλο γενετικό υπόβαθρο, προκειμένου να οδηγήσει στη ρήξη της ανοσολογικής ανοχής. Πολλά δεδομένα υποστηρίζουν ότι μια τέτοια θεωρία ισχύει για την ΠΧΚ.

Πληθώρα μελετών δείχνουν ότι η νόσος είναι συχνότερη ανάμεσα σε οικογένειες και συγκεκριμένα σε πρώτου βαθμού συγγενείς [95-97] Παράλληλα έχουν περιγραφεί αρκετοί γενετικοί παράγοντες που σχετίζονται με τη νόσο κυρίως από μελέτες συνδυασμού ολόκληρου του γονιδιώματος (genome wide association studies, GWAS) [93].

2.2.1 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΣΤΗΝ ΠΧΚ

Υπάρχει πληθώρα αναφορών που αφορούν στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου ανάμεσα στα μέλη της ίδιας οικογένειας, ενώ τα πιο συχνά ζευγάρια είναι αυτά μητέρας-κόρης, αδερφής-αδερφής και μητέρας αδερφής-κόρης [95-97]. Από κάποιους ερευνητές έχει χρησιμοποιηθεί ο όρος «οικογενής ΠΧΚ» (familial PBC) [54]. Ο επιπολασμός της νόσου ανάμεσα στους συγγενείς των ασθενών με ΠΧΚ ανέρχεται σε 1-2.4% [6, 98-100]. Ο επιπολασμός της νόσου στη Μ. Βρετανία φαίνεται να είναι υψηλότερος (4.3%) [101], ενώ σε άλλη μελέτη από τη Minnesota το ποσοστό είναι χαμηλότερο, αλλά πάντα υψηλότερο από αυτό του γενικού πληθυσμού. Το ποσοστό στην Ιταλία είναι 3.8% [102], στη Σουηδία 4.5% [103] και στην Ιαπωνία 5.1% [104]. Παράλληλα με το παρόμοιο γενετικό υπόβαθρο, σημαντικό ρόλο φαίνεται ότι παίζει και η έκθεση σε κοινούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Συνηγορητικό αυτής της υπόθεσης είναι ο αυξημένος επιπολασμός της νόσου σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές [105] και συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς θύλακες [106].

Η συνύπαρξη ενός αυτοάνοσου νοσήματος μεταξύ των μονοζυγωτικών διδύμων και η σύγκριση του επιπολασμού με αυτή που ανευρίσκεται σε διζυγωτικά δίδυμα είναι μια καλή μέθοδος εκτίμησης της συμβολής του γενετικού υπόβαθρου στην αιτιοπαθογένεια της νόσου. Τα δεδομένα στην ΠΧΚ είναι περιορισμένα. Στη μόνη μελέτη που αφορά στον επιπολασμό της ΠΧΚ σε δίδυμα ζευγάρια, εκ των οποίων 8 ήταν μονοζυγωτικά και 8 διζυγωτικά, η συνύπαρξη της νόσου ήταν 63% και 0%, αντίστοιχα [107]. Το ποσοστό αυτό είναι από τα μεγαλύτερα που έχουν αναφερθεί στα αυτοάνοσα νοσήματα. Όμως παρά την ύπαρξη ταυτόσημου γενετικού υλικού στους μονοζυγωτικούς διδύμους, το ποσοστό συνύπαρξης ενός αυτοάνοσου νοσήματος δεν προσεγγίζει ποτέ το 100% σε κανένα από τα νοσήματα αυτά, γιατί καθοριστικό ρόλο έχει δειχθεί ότι παίζουν επιγενετικές αλλαγές καθώς και έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες [108].

Τόσο οι ασθενείς με ΠΧΚ όσο και οι πρώτου βαθμού συγγενείς χαρακτηρίζονται από αυξημένη συχνότητα και άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων όπως είναι η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, το σύνδρομο Sjogren και το σκληρόδερμα καθώς και AMA [95, 109]. Η συνύπαρξη πολλών αυτοάνοσων νοσημάτων θα μπορούσε να ερμηνευθεί από την παρουσία γενετικών τόπων (genetic loci) που ρυθμίζουν την ανοσολογική ανοχή, την αντιγονοπαρουσίαση, την απόπτωση και την παραγωγή κυτταροκινών.

2.2.2 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΤΟΠΟΙ

Διάφορες μελέτες προσπάθησαν να συσχετίσουν την ύπαρξη γενετικών τόπων με την ΠΧΚ προκειμένου να συνθέσουν το παζλ του γενετικού προφίλ της νόσου. Οι κυριότεροι γενετικοί τόποι που έχουν μελετηθεί είναι αυτοί που κωδικογραφούν μόρια που εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση όπως είναι τα μόρια του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex-MHC), των ιντερλευκινών, των μορίων προσκόλλησης κ.α [110]. Παρακάτω παραθέτονται εν συντομία τα κυριότερα.

Ο συσχετισμός συγκεκριμένων αλληλόμορφων μορίων του MHC και διάφορων αυτοανόσων νοσημάτων έχει προ πολλού αναγνωριστεί. Παρόλο που ο μηχανισμός με τον οποίο συγκεκριμένα μόρια HLA συσχετίζονται με την αυτοανοσία δεν έχει αποσαφηνιστεί, πιστεύεται ότι το ρεπερτόριο των HLA καθορίζει την ποικιλομορφία των υποδοχέων των T λεμφοκυττάρων (T Cell Receptor – TCR), που αποτελούν κυρίαρχο μόριο για την παρουσίαση ιδίων μορίων στα λεμφοκύτταρα που κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα. Στο παρελθόν έχει επίσης μελετηθεί τυχόν συσχέτιση των μορίων HLA τύπου I με την ΠΧΚ χωρίς να βρεθεί κάποια σημαντική συσχέτιση [111, 112]. Η αδυναμία συσχέτισης ενδεχομένως να οφείλεται στην εφαρμοζόμενη μεθοδολογία και τον αριθμό των αρρώστων που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες αυτές. Όσον αφορά στη συσχέτιση των μορίων HLA κλάσης II έχει βρεθεί ότι το αλληλίο HLA-DR8 (DRB1*08) ανευρίσκεται πιο συχνά μεταξύ των Καυκάσιων ασθενών με ΠΧΚ και ότι η ύπαρξή του είναι παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου [113-116]. Σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι η σύζευξη DQA1*0401 αλληλίου και του DR8 - DQB1*0402 απλοτύπου σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου παρά με την αρχική προδιάθεση. Από την άλλη πρέπει να αναφερθεί ότι ποικίλες μελέτες απέτυχαν να επιβεβαιώσουν τη συσχέτιση DR8 με τη νόσο [117-120] ή ακόμη αναφέρουν και συσχέτιση της νόσου με τα DR3 [111, 119] ή το DPB1*0301 [121]. Στον Ιταλικό πληθυσμό βρέθηκε ότι το αλληλόμορφο DRB1*11 έχει προστατευτική δράση στην ανάπτυξη της νόσου ενώ σε τρεις διαφορετικές μελέτες σε Ιαπωνικό πληθυσμό συσχετίστηκαν με την ΠΧΚ τα DR2 [112], DPB1*0501 [122] και DRB1*0803 [123]. Κάνοντας μια κριτική ανάγνωση των πιο πάνω αποτελεσμάτων θα μπορούσε κάποιος ενδεχομένως να τονίσει ότι θα έπρεπε οι συσχετίσεις να αφορούν στο συγκεκριμένο πληθυσμό μελέτης και τα αποτελέσματα να μη γενικεύονται σε πληθυσμιακές ομάδες που δεν συμπεριλαμβάνονται στην μελέτη.

Το γονίδιο του TNF (Tumor Necrosis Factor) με τα αλληλόμορφα γονιδιά του TNF1 και TNF2 έχουν επίσης αποτελέσει αντικείμενο μελέτης στην ΠΧΚ. Έχει αναφερθεί ότι το αλληλόμορφο TNF2 βρίσκεται σε μικρότερη συχνότητα από ότι στο γενικό πληθυσμό

[124], ενώ σε άλλες πληθυσμιακές ομάδες δεν έχει επαληθευτεί καμιά συσχέτιση είτε για το TNF1 είτε για το TNF2 [100, 125]. Είναι επίσης αντικείμενο διαφωνίας κατά πόσο η ομόζυγη κατάσταση TNF1/TNF1 ή η ετερόζυγη κατάσταση TNF1/TNF2 σχετίζεται με πιο προχωρημένη νόσο [100, 126]. Αρκετά δεδομένα έχουν προκύψει επίσης από μελέτες SNPs (single nucleotide polymorphisms).

Φαίνεται ότι το πεδίο της παθογένειας της νόσου θα συνεχίσει να είναι ασαφές αν δεν αναζητηθούν αλλαγές σε γονίδια που κωδικογραφούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη παθογένεια της νόσου. Προς αυτή την κατεύθυνση έχουν συσχετισθεί με την ΠΧΚ αλλαγές στα γονίδια των CTLA-4, IL-1, MBL, NRAMP1, IL-10, υποδοχέα της βιταμίνης D (Vitamin D receptor, VDR) και οστεοποντίνης (Osteopontin), ενώ κάποιες από αυτές τις συσχετίσεις δεν έχουν επαληθευτεί σε μεταγενέστερες μελέτες [110].

Η μεγαλύτερη μέχρι στιγμής μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την ανεύρεση γενετικών τόπων, που σχετίζονται με την ΠΧΚ ήταν μελέτη GWAS [93]. Εξετάστηκαν 2072 Καναδοί και Αμερικανοί (536 ασθενείς και 1536 μάρτυρες) για 300000 SNPs. Στη μελέτη αυτή βρέθηκε συσχέτιση της ΠΧΚ με 13 γενετικούς ή γονιδιακούς τόπους στην περιοχή του HLA κλάσης II. Ο γενετικός τόπος που αντιστοιχεί στο HLA-DQB1 βρέθηκε να έχει την ισχυρότερη συσχέτιση. Ταυτόχρονα ισχυρή συσχέτιση υπήρχε και με δύο SNPs στο γενετικό τόπο της IL12A (κωδικογραφεί την ιντερλευκίνη 12A) και με ένα SNP στον γενετικό τόπο της IL12RB2 (κωδικογραφεί την β2 αλυσίδα του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 12A). Ανάμεσα στους άλλους γενετικούς ή γονιδιακούς τόπους που βρέθηκαν SNPs ήταν αυτά του STAT4 και του CTLA-4 [93].

2.2.3 ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΗ Χ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΜΟΝΟΣΩΜΙΑ

Η μονοσωμία του χρωμοσώματος X είναι χαρακτηριστικό του συνδρόμου Turner [127] και της πρόωρης ανεπάρκειας των ωοθηκών [128]. Και στις δύο αυτές καταστάσεις συχνά ανευρίσκονται στοιχεία αυτοανοσίας και χολόστασης. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στη διενέργεια μιας μελέτης στην οποία αναζητήθηκε η συχνότητα της μονοσωμίας X στα περιφερικά λευκά αιμοσφαίρια ασθενών με ΠΧΚ και υγιών μαρτύρων με τη συχνότητα να είναι στατιστικά σημαντική μεταξύ των ασθενών με ΠΧΚ (5% και 2% αντίστοιχα) [129]. Αυτό το εύρημα σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα αυτοάνοσα νοσήματα εμφανίζονται περισσότερο στις γυναίκες, οδήγησε τους συγγραφείς να προτείνουν ότι το χρωμόσωμα X μπορεί να περιέχει γονίδια που εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση. Αυτά τα αποτελέσματα επιδέχονται κριτική ανάλυση και για την

αποσαφήνιση της σημασίας της μονοσωμίας του χρωμοσώματος X στην επαγωγή της αυτοανοσίας χρειάζονται περαιτέρω μελέτες καθώς δεν έχει επιβεβαιωθεί αυξημένη συχνότητα ΠΧΚ στους ασθενείς με σύνδρομο Turner.

2.3 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν σημαντική συμβολή στην παθογένεια της ΠΧΚ (Πίνακας 5). Σε μια μεγάλη επιδημιολογική μελέτη που διενεργήθηκε στις Η.Π.Α μελετήθηκαν 1032 ασθενείς με ΠΧΚ και 1041 μάρτυρες με συγκρίσιμες ηλικίες, φύλο, καταγωγή και τόπο διαμονής [130]. Ισχυροί παράγοντες κινδύνου για το νόσημα ήταν η ύπαρξη συγγενούς πρώτου βαθμού με ΠΧΚ (adjusted odds ratio, AOR 10.73; 95% CI 4.2-27.2), ιστορικό ουρολοιμώξεων (AOR 1.51; 95% CI 1.19-1.91), ιστορικό καπνίσματος (AOR 1.57; 95% CI 1.29-1.90), ή ιστορικό ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης (AOR 1.55; 95% CI 1.27- 1.88). Η συχνή χρήση βερνικιών για τα νύχια αύξησε επίσης τον κίνδυνο για τη νόσο. Η ύπαρξη άλλου αυτοάνοσου νοσήματος ήταν 32% στην ομάδα των ασθενών με ΠΧΚ ενώ ήταν 13% στους μάρτυρες ($p < 0.0001$).

Πίνακας 5. Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της ΠΧΚ.

| | Risk | OR | 95% CI | <i>p</i> |
|----------------------------------|-----------|--------|---------------|----------|
| Οικογενειακό ιστορικό ΠΧΚ | 1.1868 | 10.736 | 4.227–27.268 | <0.0001 |
| Οικογενειακό ιστορικό ΣΕΛ | 0.4019 | 2.234 | 1.261–3.957 | 0.0059 |
| Ιστορικό Ουρολοιμώξεων | 0.2065 | 1.511 | 1.192–1.915 | 0.0006 |
| Κάπνισμα >100 τσιγάρα | 0.2252 | 1.569 | 1.292–1.905 | <0.0001 |
| Θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης | 0.2185 | 1.548 | 1.273–1.882 | <0.0001 |
| Ηλικία πρώτου τοκετού | (-)0.0470 | 0.9541 | 0.9331–0.9755 | <0.0001 |

ΣΕΛ=Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος, OR=Odd Ratio, CI=Confidence of Interval, p =P value.

Όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 1 η επικρατέστερη προσέγγιση για την ερμηνεία της παθογένειας της ΠΧΚ θέλει πολλαπλούς περιβαλλοντικούς παράγοντες να αλληλεπιδρούν με ένα γενετικά καθοριζόμενο υπόστρωμα με αποτέλεσμα να υπάρχει τροποποίηση της ανοσολογικής απάντησης που διαφεύγει της ανοσολογικής ανοχής με

αποτέλεσμα την εμφάνιση της νόσου. Όπως προαναφέρθηκε ο επιπολασμός της νόσου στους μονοζυγωτικούς διδύμους είναι 63% και όχι 100%, γεγονός που υποδεικνύει ότι το γενετικό υπόστρωμα από μόνο του είναι αναγκαίος αλλά όχι ικανός παράγοντας για την ανάπτυξη της νόσου. Η ύπαρξη γεωγραφικά καθορισμένων θυλάκων της νόσου κοντά σε περιοχές αποχέτευσης τοξικών αποβλήτων στην Νέα Υόρκη [131] και η κατανομή της νόσου σε θυλάκους στη βορειοανατολική Αγγλία [132] υποστηρίζουν και το ρόλο τοξικών παραγόντων, λοιμώξεων ή και των δύο στην ανάπτυξη του κλινικού φαινότυπου της νόσου. Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως είναι χημικές ουσίες ξένες προς τον ανθρώπινο οργανισμό (ξενοβιοτικά - xenobiotics) και μικροβιακοί παράγοντες είναι οι κύριοι ένοχοι που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου μέσα από τους μηχανισμούς της μετατροπής των πρωτεϊνών σε νεοαντιγόνα και της διασταυρούμενης αντίδρασης αντίστοιχα.

2.3.1 ΠΧΚ ΚΑΙ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Διάφορες λοιμώξεις μπορεί να συμβάλουν στην έναρξη ή στην επιδείνωση ενός αυτοανόσου νοσήματος ποικιλοτρόπως. Η εμπλοκή λοιμωδών παραγόντων μπορεί να εξηγηθεί με πολλούς τρόπους, που αναπτύσσονται συνοπτικά στη συνέχεια.

1. Η μοριακή μίμηση έχει προταθεί ως ένα μοντέλο που πιθανότατα εξηγεί την απώλεια της ανοσολογικής ανοχής στα αυτοάνοσα νοσήματα. Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η θεωρία της μοριακής μίμησης είναι ότι κάποιοι λοιμώδεις παράγοντες φέρουν δομικές ή λειτουργικές πρωτεΐνες των οποίων οι αντιγονικοί επίτοποι έχουν κοινά χαρακτηριστικά με κάποιες ανθρώπινες πρωτεΐνες. Σαν αποτέλεσμα αυτών των ομοιοτήτων, η ανοσολογική απόκριση που αναπτύσσεται έναντι αυτών των λοιμωδών παραγόντων στρέφεται και κατά στόχων του ανθρωπίνου οργανισμού [133, 134]
2. Η διασπορά ενός επιτόπου (epitope spreading) είναι ένας μηχανισμός κατά τον οποίο μια λοίμωξη επιταχύνει μια ανοσολογική απόκριση και προκαλεί την υπερδιέγερση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων με αποτέλεσμα να υπερπαρουσιάζονται αντιγόνα, ακόμα και αυτοαντιγόνα [135]
3. Οι ιογενείς λοιμώξεις μπορούν να επάγουν μια πολυκλωνική ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων με αύξηση της παραγωγής αυτοαντισωμάτων ή των ανοσοσυμπλεγμάτων με επακόλουθη ενίσχυση της ιστικής καταστροφής [133]
4. Είναι καλά επιβεβαιωμένο ότι συστατικά στοιχεία των μικροβιακών οργανισμών που ονομάζονται υπεραντιγόνα μπορούν να προκαλέσουν μια μη ειδική διέγερση των Τ λεμφοκυττάρων συνδεδεμένα με τους TCR ή με τα MHC II μόρια [133]

5. Στα πλαίσια της ανοσολογικής απάντησης κατά ενός μικροβιακού παράγοντα παράγονται διαμεσολαβητές της φλεγμονής όπως είναι οι κυτταροκίνες που με τη σειρά τους θα ενισχύσουν τη δράση των ήδη διεγερμένων αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα την επιδείνωση της νόσου [133]

Στην περίπτωση της ΠΧΚ η μοριακή μίμηση είναι αυτή που έχει κυρίως εμπλακεί στην αποσαφήνιση της παθογένειας. Τα περισσότερα στοιχεία προέρχονται κυρίως από εργαστηριακά δεδομένα διασταυρούμενης αντίδρασης των AMA και/ή αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων με πρωτεϊνικά τμήματα μικροβιακών παραγόντων. Η πρωτεΐνη PDC-E2 παρουσιάζει μια καλά συντηρημένη αλληλουχία κατά τη διάρκεια της εξέλιξης ανάμεσα στα διάφορα είδη και έτσι υπάρχει δομική ομοιότητα μεταξύ της ανθρώπινης PDC-E2 και της πρωτεΐνης αυτής στην *Echerichia coli*, το *Helicobacter Pylori*, τον CMV και άλλα παθογόνα [134]. Έτσι, τα AMA αντιδρούν και με την PDC-E2 των μικροβίων ενώ ανευρίσκονται και αντισώματα που στρέφονται κατά των πρωτεϊνών του συμπλέγματος της PDC κατά τη διάρκεια μικροβιακών λοιμώξεων [136, 137].

Η *Echerichia coli* είναι ένα από τα συχνότερα αίτια ουρολοιμώξεων της κοινότητας και 35% των ασθενών με ΠΧΚ εμφανίζουν τουλάχιστον ένα επεισόδιο ουρολοίμωξης κατά τη διάρκεια ενός έτους [138]. Ο εντερικός αποικισμός με τη R (rough) μορφή της *E. coli* έχει καταγραφεί στο 100% των ασθενών με ΠΧΚ, ενώ μεταξύ των υγιών μαρτύρων το ποσοστό αυτό ήταν 5% [139]. Σε ασθενείς με άλλα ηπατικά νοσήματα το ποσοστό αυτό ήταν 25% [139]. Είναι ενδιαφέρον ότι χαμηλοί τίτλοι AMA έχουν βρεθεί σε γυναίκες με ιστορικό υποτροπιαζουσών ουρολοιμώξεων [140].

Με βάση τα ανωτέρω δεδομένα, το εν λόγω βακτηρίδιο έχει θεωρηθεί ως ένας πιθανός αιτιολογικός παράγοντας της νόσου. Έχει δειχθεί ότι τα ανθρώπινα αντι-PDC-E2 αντισώματα έχουν ισχυρή αντιδραστικότητα κατά της PDC-E2 της *E. coli* [141]. Επιπρόσθετα, T κυτταρικοί κλώνοι που επιλέχθηκαν με πεπτίδια από την ανθρώπινη PDC-E2 αντιδρούσαν και με πεπτίδια της PDC-E2 και της E2 υπομονάδας της κετογλουταρικής αφυδρογονάσης (2-oxo-glutarate dehydrogenase complex, OGDC-E2) από την *E. coli* [142] ενώ T κυτταρικοί κλώνοι ειδικόι για την OGDC-E2 της *E. coli* αντιδρούσαν με ανθρώπινα μιτοχονδριακά αυτοαντιγόνα [143].

Το *Chlamydia pneumoniae* είναι ένα κοινό αίτιο πνευμονίας της κοινότητας και έχει εμπλακεί σε χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως η αθηρωμάτωση, η πολλαπλή σκλήρυνση και η σαρκοείδωση [144]. Έχει βρεθεί CP-DNA στο 100% των βιοψιών από ασθενείς με ΠΧΚ ενώ αυτό το ποσοστό σε 105 βιοψίες από μάρτυρες ήταν 8.5% [144]. Εντούτοις, άλλες μελέτες δεν κατέδειξαν σχέση μεταξύ της λοίμωξης από *C. pneumoniae*

και ΠΧΚ [145].

Μοριακή μίμηση σε επίπεδο αντισωμάτων έχει βρεθεί και μεταξύ πεπτιδίων του *H. pylori* και της ανθρώπινης PDC [134]. Αντίθετα, άλλη μελέτη από την ίδια ομάδα δεν επιβεβαίωσε την ύπαρξη διασταυρούμενης αντιδραστικότητας σε Τ κυτταρικό επίπεδο μεταξύ πεπτιδίου του *H. pylori* και της PDC [146]. Επιπρόσθετα κλινική και ορολογική συσχέτιση μεταξύ λοίμωξης από *H. pylori* και ΠΧΚ δεν τεκμηριώθηκε [147]. Δύο άλλες μελέτες απέτυχαν να ταυτοποιήσουν αυξημένα ποσοστά DNA *H. pylori* σε βιοψίες ασθενών με ΠΧΚ [148, 149].

Οι μυκοβακτηριδιακές λοιμώξεις και ειδικά αυτές από το *Mycobacterium gordonae* έχουν προταθεί να έχουν ρόλο στην παθογένεια της ΠΧΚ. Ο ορός ασθενών που έπασχαν από ΠΧΚ αντιδρούσε με εκχύλισμα από το *M. gordonae* όπως επίσης υπήρχε και διασταυρούμενη αντίδραση AMA με την πρωτεΐνη του θερμικού shock (heat-shock protein) του *M. Gordonae* [150]. Αυτό το εύρημα επιβεβαιώθηκε σε ασθενείς με ΠΧΚ από την Ισπανία αλλά όχι από τη Μ. Βρετανία [151]. Αντίθετα, δεν επιβεβαιώθηκε αντιδραστικότητα του ορού ασθενών με ΠΧΚ με μυκοβακτηρίδια ενώ δεν έχει ανιχνευθεί μυκοβακτηριδιακό DNA σε ασθενείς με ΠΧΚ [149, 152].

Βασισμένοι σε διάφορες παρατηρήσεις, το αερόβιο Gram αρνητικό βακτηρίδιο *Novosphingobium aromaticivorans* θεωρήθηκε ότι μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη της ΠΧΚ [153]. Το βακτηρίδιο αυτό βρίσκεται παντού στο περιβάλλον και δεν είναι παθογόνο για τον άνθρωπο. Στη μελέτη αυτή το 100% των ορών από τους αντι-PDC-E2 θετικούς ασθενείς παρουσίασε αντιδραστικότητα κατά δύο πρωτεϊνών, 47 και 50 KDa του μικροβίου, ενώ μεταξύ των AMA αρνητικών αρρώστων με ΠΧΚ το ποσοστό αυτό ήταν μικρότερο. Παράλληλα σε μια άλλη μελέτη ο εμβολιασμός του μικροβίου σε ποντίκια οδήγησε σε ανάπτυξη AMA και χρόνια, διαμεσολαβούμενη από Τ λεμφοκύτταρα φλεγμονώδη αντίδραση κατά των μικρών χοληφόρων [154]. Σε αυτό το μοντέλο φάνηκε ότι ήταν αναγκαία η παρουσία των ΝΚΤ λεμφοκυττάρων για την έναρξη της νόσου αλλά όχι και για τη μεταφορά της σε άλλα ζώα όπου τα CD8+ Τ λεμφοκύτταρα φαίνεται να έχουν τον πρωταγωνιστικό ρόλο [155].

Παρά την ισχυρή συσχέτιση κάποιων μικροβιακών παραγόντων με την ΠΧΚ, τα παραπάνω δεδομένα δεν μπορούν να τεκμηριώσουν ότι οι λοιμώξεις είναι το αρχικό γεγονός που οδηγεί στην γένεση της νόσου ή ότι οι λοιμώξεις από μόνες τους είναι ικανές να οδηγήσουν στη διάσπαση της ανοσολογικής ανοχής και στη συνέχεια στην εμφάνιση της ΠΧΚ [156].

2.3.2 ΠΧΚ ΚΑΙ ΤΟΞΙΝΕΣ

Διάφορες ξενοβιοτικές ουσίες μπορούν να μετατρέψουν τη δομή ιδίων ή ξένων πρωτεϊνών, να αλλάξουν τη χημική τους σύσταση με αποτέλεσμα αλλαγές στην αντιγονικότητά τους. Αυτό το μοντέλο έχει προταθεί για διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα και υποστηρίζεται από διαφορές στην γεοεπιδημιολογική τους κατανομή [157-159]. Ένα παράδειγμα αποτελεί η ανάπτυξη αυτοαντισωμάτων που αναγνωρίζουν την PDC-E2 σε ασθενείς που είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε αλοθάνιο [160]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι πρωτεϊνικές δομές υφίστανται μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις και στη περίπτωση της PDC-E2, το λιποϊκό οξύ που προσκολλάται στην πρωτεΐνη αποτελεί συστατικό στοιχείο του επιτόπου [161]. Το λιποϊκό οξύ βρίσκεται στο εξωτερικό μέρος της πρωτεΐνης, γεγονός που το καθιστά προσβάσιμο σε χημικές μεταβολές [162]. Ο ρόλος των ξενοβιοτικών στην ΠΧΚ υποστηρίζεται από την αντιδραστικότητα του ορού των ασθενών κατά τέτοιων ουσιών όπως είναι το 6-βρωμοεξανοϊκό και το 2-οκτυνοϊκό οξύ, μόρια με δομή παρόμοια με το λιποϊκό οξύ [163]. Αυτές οι ουσίες όταν ενίονται σε ινδικά χοιρίδια [164] και ποντίκια NOD.1101 [165] ή C57BL/6 [166] επάγουν την παραγωγή AMA και αλλοιώσεις παρόμοιες με αυτές της ΠΧΚ αντίστοιχα χωρίς όμως να παρατηρείται εξέλιξη της νόσου. Και στα δύο μοντέλα υπήρξε διάσπαση της ανοσολογικής ανοχής χωρίς να υπάρχει έκθεση στην PDC-E2. Τα αντισώματα που βρίσκονται στον ορό των ασθενών με ΠΧΚ αναγνωρίζουν το 2-οκτυνοϊκό οξύ με υψηλή συγγένεια. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτή η ουσία βρίσκεται σε διάφορα καλλυντικά συμπεριλαμβανομένων και των βερνικιών νυχιών που χρησιμοποιούνται από το γυναικείο πληθυσμό συμβάλλοντας εν μέρει, σύμφωνα με τους συγγραφείς, στην επικράτηση του νοσήματος στις γυναίκες [130].

Οι πρωτεΐνες των υπομονάδων του συμπλέγματος της 2-κετοξικής αφυδρογονάσης (2-oxoacid dehydrogenase complex, 2-OADC) υπόκεινται σε διάφορες μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις ενδογενώς που μπορούν να μεταβάλουν την αντιγονικότητά τους. Ξενοβιοτικές ουσίες που απορροφώνται από το γαστρεντερικό σωλήνα και καταλήγουν στο ήπαρ για να μεταβολιστούν, δυνατόν να συμβάλουν στη δομική αλλαγή των πρωτεϊνών στόχων της ΠΧΚ. Έχουν βρεθεί συγκεκριμένες χημικές ουσίες που προσκολλώνται στα αντιγόνα στόχους των AMA και όταν συμβεί αυτό η συγγένεια των AMA προς τα χημικά μεταβαλλόμενα πλέον αντιγόνα αυξάνεται [167].

Η θεωρία περί συμβολής των ξενοβιοτικών στην επαγωγή της ΠΧΚ είναι συναρπαστική και συνάδει με τη θεώρηση ότι αλλαγές στη τριτοταγή δομή των αντιγόνων μπορεί να αποτελούν ένα τρόπο να υπερκεραστούν τα σημεία ελέγχου και να επιλεγούν κλώνοι

που αναγνωρίζουν αυτά τα νεοαντιγόνα προάγοντας μια κυτταρική και χυμική ανοσολογική απάντηση [168].

2.4 ΧΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

2.4.1 ΑΝΤΙΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (AMA)

Τα AMA είναι το ορολογικό χαρακτηριστικό της ΠΧΚ και ανευρίσκονται σε ποσοστό 90-95% των ασθενών. Ο ρόλος τους στην παθογένεια της νόσου δεν είναι καλά αποσαφηνισμένος [168]. Ενώ η ΠΧΚ ορίστηκε με τη μορφή που ξέρουμε σήμερα το 1950 στο Ινστιτούτο Rockefeller στη Νέα Υόρκη [169], ο ρόλος του ανοσολογικού συστήματος στη νόσο φάνηκε οκτώ χρόνια αργότερα όταν βρέθηκε ότι ο ορός ενός ασθενούς με ΠΧΚ αντιδρούσε με εκχύλισμα ιστών [170]. Αργότερα με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας βρέθηκε ότι τα αυτοαντισώματα δεσμεύονταν στα μιτοχόνδρια [171]. Μόλις το 1987 με τη χρήση μοριακής κλωνοποίησης έγινε κατορθωτό να φανεί ότι τα ειδικά για την ΠΧΚ AMA αντιδρούν σε μια ομάδα αντιγόνων με μοριακά βάρη 48–74 kDa που προηγουμένως είχαν ανευρεθεί με ανοσοαποτύπωση [172]. Η αντιδραστικότητα του ορού των ασθενών με ΠΧΚ βρέθηκε αργότερα ότι στρέφεται κατά των υπομονάδων του συμπλέγματος της 2-OADC [173]. Σήμερα τα AMA, αποτελούν ένα από τα τρία κριτήρια στα οποία βασίζεται η διάγνωση της ΠΧΚ και έχουν υιοθετηθεί στις οδηγίες για τη διάγνωση και αντιμετώπιση της ΠΧΚ από την AASLD [61].

2.4.1.1 Κλινική σημασία των AMA

Τα AMA έχουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα (σε τίτλους $\geq 1/160$) για τη διάγνωση της ΠΧΚ [74]. Εντούτοις, ανιχνεύονται και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα όπως είναι το σύνδρομο Sjogren, το σκληρόδερμα, η ΑΗ [174-178] και κάποια λοιμώδη νοσήματα όπως είναι η φυματίωση και οι ιογενείς ηπατίτιδες [137, 179]. Τα AMA είναι παθογνωμονικά για τη νόσο με την οροθετικότητα μεταξύ του γενικού πληθυσμού να είναι υψηλότερη σε σχέση με τον επιπολασμό της νόσου. Η παρουσία AMA χωρίς συμπτωματολογία είναι ένας καλός προγνωστικός δείκτης ύπαρξης ή μελλοντικής εμφάνισης της νόσου. Μια μικρή μελέτη από το Newcastle του Ηνωμένου Βασιλείου [180] εξέτασε 29 ασυμπτωματικά άτομα που παρουσίαζαν AMA (τίτλοι $>1:40$) αλλά δεν εμφάνιζαν χολόσταση. Στην έναρξη της μελέτης όλοι εκτός από δύο παρουσίαζαν

κάποιου είδους βλάβη στην ιστολογία του ήπατος με 12 από αυτούς να έχουν διαγνωστική εικόνα στη ιστολογική εξέταση του ήπατος. Μετά από 10 χρόνια παρακολούθησης οι 24 από τους 29 παρέμειναν AMA θετικοί ενώ και οι 24 είχαν εμφανίσει χολόσταση και οι 22 από αυτούς είχαν αναπτύξει και συμπτώματα συμβατά με τη νόσο [181]. Ο διάμεσος χρόνος παρακολούθησης των ασθενών αυτών ήταν 17.8 χρόνια, ενώ 1 ασθενής παρέμεινε AMA θετικός χωρίς να πληροί τα υπόλοιπα κριτήρια διάγνωσης της ΠΧΚ για διάστημα παρακολούθησης 23 ετών. Σε αυτή τη μελέτη φάνηκε επίσης ότι η εξέλιξη της νόσου είναι βραδεία και ότι η παρουσία των AMA είναι ισχυρός δείκτης για την μετέπειτα εμφάνιση της νόσου. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η άνευ κριτηρίων εξέταση για την ανεύρεση των AMA σε ασυμπτωματικά άτομα μπορεί να οδηγήσει σε διάγνωση του νοσήματος σε πρώιμα στάδια της νόσου, που ενδεχομένως να μην εξελιχθούν ποτέ σε τελικά στάδια.

Μια άλλη μελέτη από τους Kisanp και συνεργάτες είχε ανάλογα αποτελέσματα καθώς βρέθηκε ότι 8 AMA θετικοί ασθενείς ανέπτυξαν νόσο μετά από 9 χρόνια παρακολούθησης [182].

Μελέτη ορών από ασθενείς με ΠΧΚ που παρακολουθούνταν για περίοδο από 7-28 χρόνια έδειξε ότι ο τίτλος των AMA δεν σχετιζόταν με τη εξέλιξη της νόσου. Επίσης όλες οι μελέτες πλην μιας [183] δείχνουν ότι οι τίτλοι των AMA δεν επηρεάζονται από τη θεραπεία [184-185]. Τα AMA φαίνεται ότι παραμένουν ανιχνεύσιμα έως και 11 χρόνια μετά από μεταμόσχευση ήπατος [185]. Τα AMA δεν είναι οργανοειδικά ή ειδικά για κάθε είδος και μπορεί να είναι κλάσης IgG, IgA ή IgM. Τα IgA AMA σύμφωνα με ορισμένες μελέτες σχετίζονται με πιο προχωρημένη νόσο ενώ άλλες μελέτες απέτυχαν να επιβεβαιώσουν αυτή τη σχέση [186-189]. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα IgG AMA μπορεί να ανήκουν σε διαφορετικές υποτάξεις κάποιες από τις οποίες ενδεχομένως να παίζουν ξεχωριστό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου. Οι ασθενείς που είχαν IgG3 AMA παρουσίαζαν πιο προχωρημένο στάδιο νόσου με αυξημένα ποσοστά κίρρωσης συγκριτικά με αυτούς που ήταν IgG3 AMA αρνητικοί [190]. Επιπλέον στη μελέτη αυτή υπήρχε θετική συσχέτιση μεταξύ του τίτλου των IgG3 AMA και του Mayo risk score [190]. Μια άλλη παλαιότερη μελέτη έδειξε ότι ο τίτλος των IgG AMA σχετίζεται με το ιστολογικό στάδιο και με άλλες βιοχημικές παραμέτρους συμπεριλαμβανομένου των επιπέδων της χολερυθρίνης και της αλβουμίνης [191]. Αυτά τα δεδομένα είναι συμβατά και με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι ο τίτλος των AMA όπως αυτός παρατηρείται στον έμμεσο ανοσοφθορισμό, αυξάνεται με την εξέλιξη της νόσου [192, 193].

Οι Van Nostrand και συνεργάτες ανέλυσαν τη σχέση μεταξύ ενός αξιόπιστου δείκτη εξέλιξης της νόσου όπως είναι το Mayo risk score και τα επίπεδα των AMA χρησιμοποιώντας ως αντιγόνα για καθήλωση των AMA ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες της 2-OADC [194]. Τα επίπεδα των AMA παρουσίαζαν διακύμανση ανάμεσα στους ασθενείς με ΠΧΚ αλλά παρέμεναν σχετικά σταθερά σε κάθε άρρωστο. Παρότι τα επίπεδα των AMA σχετίζονταν θετικά με το Mayo risk score, εντούτοις δεν μπορούσαν να προβλέψουν την εξέλιξη της νόσου σε κάθε άρρωστο ξεχωριστά. Επιπλέον δε βρέθηκε να υπάρχουν σημαντικές διαφορές στους τίτλους των AMA μεταξύ των ασθενών με διαφορετικά ιστολογικά στάδια.

Παρόλο ότι υπάρχουν αρκετά δεδομένα, ο ρόλος των AMA στην εξέλιξη της νόσου παραμένει ακόμη ένα θέμα που πρέπει να αποσαφηνιστεί.

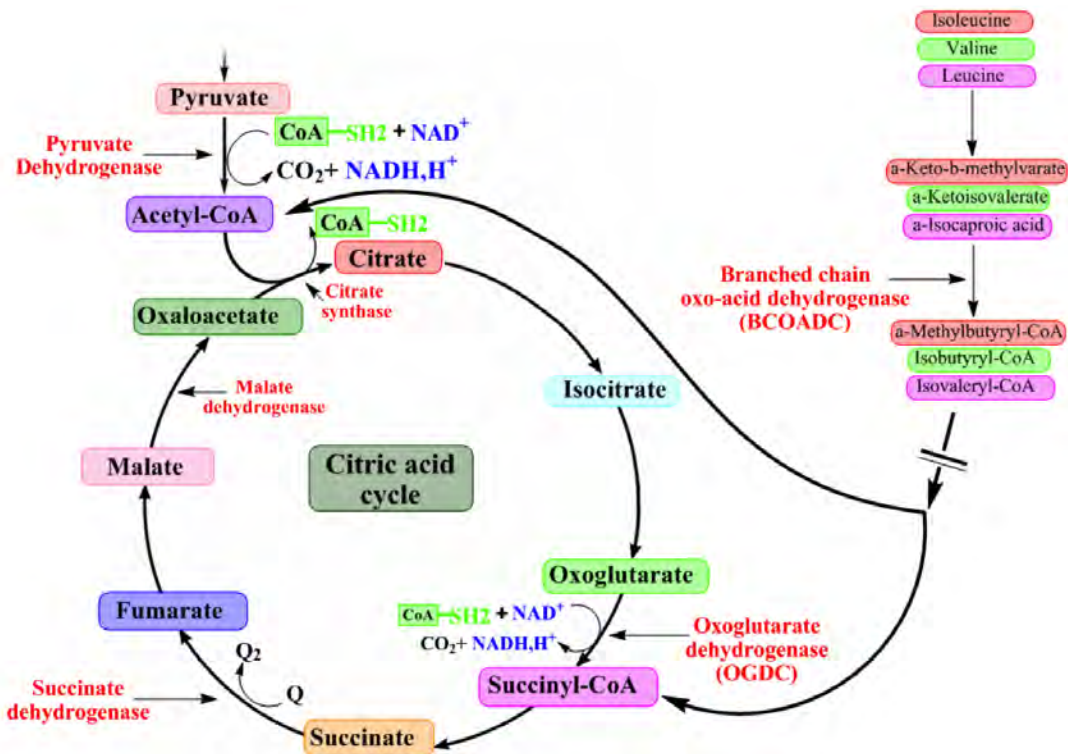
2.4.1.2 Αντιγόνα-στόχοι των AMA και η βιοχημική τους δράση

Για μεγάλο διάστημα ήταν άγνωστο ποια ήταν τα αντιγόνα στόχοι στην ΠΧΚ. Οι εφαρμογές της μοριακής βιολογίας οδήγησαν σε μεγάλη πρόοδο στην κατανόηση της παθογένειας της ΠΧΚ επιτρέποντας την κλωνοποίηση του cDNA που κωδικογραφεί τα κύρια αυτοαντιγόνα-στόχους των AMA, που όπως προαναφέρθηκε είναι οι πρωτεΐνες του συμπλέγματος της 2-OADC. Το σύμπλεγμα ενζύμων της 2-OADC είναι ουσιαστικά μια πολυενζυμική δομή που βρίσκεται στην έσω μεμβράνη των μιτοχονδρίων και συμμετέχει στο μεταβολισμό [195]. Αποτελείται από το σύμπλεγμα της PDC, το σύμπλεγμα της OGDC και το σύμπλεγμα της κετοξικής αφυδρογονάσης των αμινοξέων με διακλαδιζόμενη αλυσίδα (branched chain 2-oxoacid dehydrogenase complex, BCOADC). Το κάθε ένα από αυτά τα ένζυμα συμμετέχει σε μια μη αντιστρεπτή αντίδραση του μεταβολισμού. Τα ένζυμα του συμπλέγματος της 2-OADC έχουν το κοινό ότι αποτελούνται από τρεις υπομονάδες E1, E2 και E3 που κωδικοποιούνται στον πυρήνα. Οι E2 υπομονάδες αποτελούνται από διάφορες λειτουργικές περιοχές: την έσω καταλυτική περιοχή που περιέχει το ενεργό κέντρο του ενζύμου, μια ή περισσότερες λιποϊκές περιοχές που περιέχουν κατάλοιπα λυσίνης στα οποία ο συμπαραάγοντας του λιποϊκού οξέος προσκολλάται και μια E3 περιοχή σύνδεσης. Οι PDC και BCOADC έχουν και E1 υπομονάδες, τις E1α και E1β. Η E1 υπομονάδα της PDC αποκαρβοξυλιώνει το πυροσταφυλικό οξύ χρησιμοποιώντας ως συνένζυμο την πυροφωσφορική θειαμίνη (TTP) απελευθερώνοντας CO₂ και μια ακετυλομάδα ενώ η PDC-E2 μεταφέρει την ακετυλομάδα στο συνένζυμο-α με συμπαραάγοντα ένα μόριο λιποϊκού οξέος, με το παραγόμενο ακετυλοσυνένζυμο-α να εισέρχεται στον κύκλο του Krebs. Η E3 υπομονάδα

που περιέχει FAD (flavin adenine dinucleotide) αναγεννά το δισουλφιδικό δεσμό στην E2 υπομονάδα μέσω της οξειδωσης του λιποϊκού οξέος παράγοντα NADH (reduced nicotina amide adenine dinucleotide). Παρομοίως, η OGDC αποκαρβοξυλιώνει το κετογλουταρικό οξύ σε ηλεκτροσυνένζυμο-A και η BCOADC καταλύει τον καταβολισμό των αλειφατικών αμινοξέων με πλάγιες αλύσους όπως είναι η βαλίνη, η λευκίνη και η ισολευκίνη [196]. Στον Πίνακα 6 παρουσιάζεται η λειτουργία και το μοριακό βάρος του κάθε συνιστώντος στοιχείου της 2-OADC ενώ διαγραμματικά, ο ρόλος των PDC, OGDC και BCOADC φαίνεται στην Εικόνα 2.

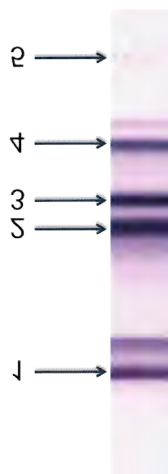
Πίνακας 6. Ένζυμα του συμπλέγματος 2-OADC σε σχέση με τη λειτουργία και το μοριακό βάρος τους.

| Ένζυμα | Μοριακό Βάρος (kDa) | Λειτουργία |
|---|---------------------|---|
| Σύμπλεγμα της Πυροσταφυλικής Αφυδρογονάσης (PDC) | | |
| E1α αποκαρβοξυλάση (E1a decarboxylase) | 41 | Αποκαρβοξυλιώνει το πυροσταφυλικό οξύ χρησιμοποιώντας ως συνένζυμο την πυροφωσφορική θειαμίνη (TTP) |
| E1β αποκαρβοξυλάση (E1b decarboxylase) | 36 | Αποκαρβοξυλιώνει το πυροσταφυλικό χρησιμοποιώντας ως συνένζυμο την πυροφωσφορική θειαμίνη (TTP) |
| E2 ακετυλοτρανσφεράση (E2 acetyltransferase) | 74 | Μεταφέρει την ακετυλομάδα από την E1 στο συνένζυμο A |
| E3 αφυδρογονάση του λιποαμιδίου (E3 lipamide dehydrogenase) | 55 | Αναγεννά το δισουλφιδικό δεσμό στην E2 υπομονάδα μέσω της οξειδωσης του λιποϊκού οξέος |
| E3-συνδετική πρωτεΐνη (E3-binding protein or protein X) | 56 | Συνδέει την E3 στον E2 πυρήνα της Πυροσταφυλικής Αφυδρογονάσης |
| Σύμπλεγμα της 2-Όξο Γλουταρικής Αφυδρογονάσης (OGDC) | | |
| E1 αφυδρογονάση του κετογλουταρικού (E1 oxoglutarate dehydrogenase) | 113 | Αποκαρβοξυλιώνει το α-κετο-γλουταρικό χρησιμοποιώντας ως συνένζυμο την πυροφωσφορική θειαμίνη (TTP) |
| E2 ηλεκτρυλο τρανσφεράση (E2 succinyl transferase) | 48 | Μεταφέρει την ηλεκτρυλο- ομάδα από την E1 στο συνένζυμο A |
| E3 δευδρογενάση του λιποαμιδίου (E3 lipamide dehydrogenase) | 55 | Αναγεννά το δισουλφιδικό δεσμό στην E2 υπομονάδα μέσω της οξειδωσης του λιποϊκού οξέος |
| Σύμπλεγμα της 2-κετοξικής αφυδρογονάσης των αμινοξέων με διακλαδιζόμενη αλυσίδα (BCOADC) | | |
| E1α αποκαρβοξυλάση (E1a decarboxylase) και E1β αποκαρβοξυλάση (E1b decarboxylase) | 46 και 38 | Αποκαρβοξυλιώνουν τα α-κέτο αμινοξέα Λευκίνη, Ισολευκίνη και Βαλίνη με συμπαράγοντα το TTP |
| E2 ακετυλοτρανσφεράση (E2 acetyltransferase) | 52 | Μεταφέρει την ακυλομάδα από την E1 στο συνένζυμο A |
| E3 αφυδρογονάση του λιποαμιδίου (E3 lipamide dehydrogenase) | 55 | Αναγεννά το δισουλφιδικό δεσμό στην E2 υπομονάδα μέσω της οξειδωσης του λιποϊκού οξέος |



Εικόνα 2. Ο ρόλος των ενζύμων PDC, OGDC και BCOADC στο μεταβολισμό. Η PDC συνδέει τη γλυκόλυση με τον κύκλο του Krebs, η OGDC καταλύει αντίδραση εντός του κύκλου του Krebs και η BCOADC καταλύει τη μετατροπή των διακλαδιζόμενων αμινοξέων λευκίνης, βαλίνης και ισολευκίνης σε μορφές μορίων που μπορούν να εισέλθουν για περαιτέρω μεταβολισμό στον κύκλο του Krebs.

Στα αντιγόνα των AMA που εμπλέκονται στην ΠΧΚ περιλαμβάνονται: (1) η PDC-E2 [74, 197, 198] (2) η BCOADC-E2 [198] (3) η OGDC-E2 [199] (4) η πρωτεΐνη X (E3-binding protein ή Protein X) [200] και (5) η E1α υπομονάδα της PDC (PDC-E1α) [201]. Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα πειράματος ανοσοαποτύπωσης σε εκχύλισμα μιτοχονδρίων από ήπαρ ανθρώπου με ορό ασθενούς με ΠΧΚ, που εμφανίζει ταυτόχρονη αντιδραστικότητα σε όλα τα αυτοαντιγόνα.



Εικόνα 3 Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης σε ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένες πρωτεΐνες από εκχύλισμα μιτοχονδρίων από ήπαρ ανθρώπου. Η παρατηρούμενη αντιδραστικότητα είναι κατά των:

1. PDC-E2 (74kDa)
2. E3-BP(55 kDa)
3. BCOADC-E2 (51 kDa)
4. OGDC-E2 (48 kDa)
5. PDC-E1α (41kDa).

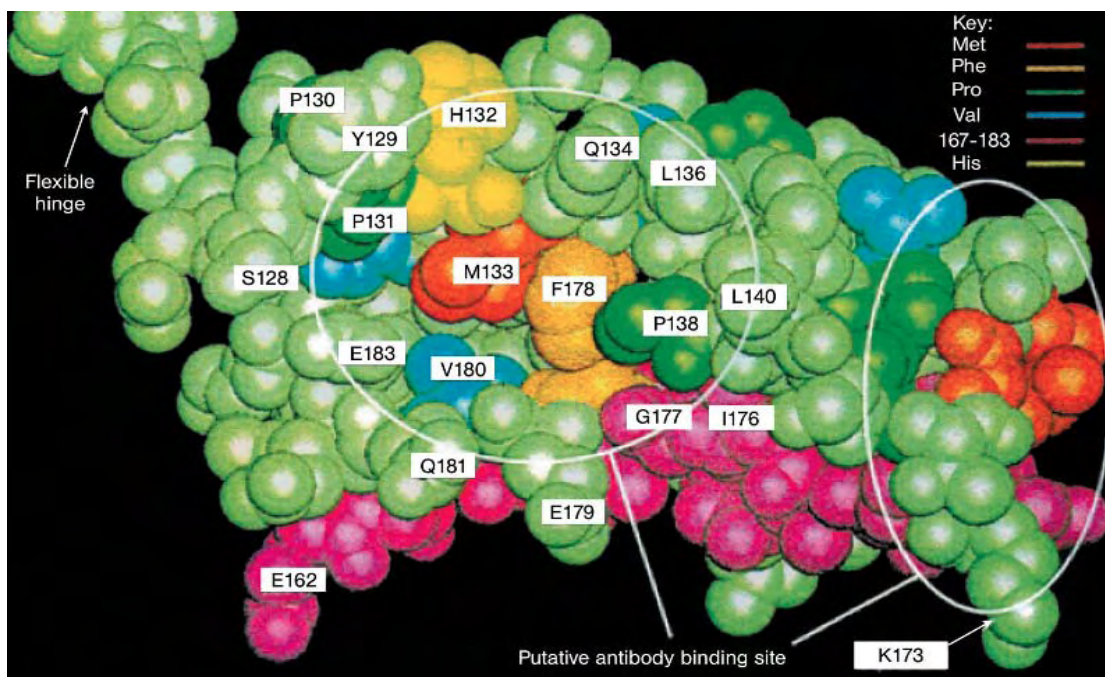
Το πρότυπο αντιδραστικότητας που παρατηρείται είναι διαφορετικό σε κάθε ασθενή με ΠΧΚ

Η αντιδραστικότητα κατά των αυτοαντιγόνων-στόχων των AMA στην ΠΧΚ δεν είναι ταυτόχρονη κατά όλων των πιο πάνω πρωτεϊνών και κάθε ασθενής με ΠΧΚ παρουσιάζει ιδιαίτερο προφίλ αντιδραστικότητας με διαφορές στον αριθμό και την ένταση των ζωνών αντιδραστικότητας που παρατηρούνται. Φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του αριθμού και της έντασης των ζωνών αντιδραστικότητας σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης με τους τίτλους των AMA στον ανοσοφθορισμό [73]. Η αντιδραστικότητα κατά της PDC-E2 και της E3BP είναι η πιο συχνή (προσεγγίζει το 95%) και σχεδόν πάντα ταυτόχρονη. Η αντιδραστικότητα των AMA κατά των άλλων αντιγόνων ποικίλει σε συχνότητα. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αυτοαντιγόνα-στόχοι των AMA στην ΠΧΚ, τα μοριακά τους βάρη, η περιοχή του αντιγόνου στην οποία προσδένονται, οι κύριες κλάσεις των αυτοαντισωμάτων και η δυνατότητα των αυτοαντισωμάτων να αναστέλλουν την ενζυμική δράση του αυτοαντιγόνου-στόχου [168].

| Αντιγόνο | M.B. (kDa) | Συχνότητα (%) στην ΠΧΚ | Λιποϊκή Περιοχή | Επίτοπος AMA | Κύριοι ισότυποι Ig | Αναστολή λειτουργικότητας από τα AMA |
|-----------|------------|------------------------|-----------------|---|--------------------|--------------------------------------|
| PDC-E2 | 74 | 95 | + | Έξω και έσω λιποϊκή περιοχή | IgG3, IgM | + |
| BCOADC-E2 | 51 | 53-55 | + | Λιποϊκή περιοχή | Μη αναφερόμενη | + |
| OGDC-E2 | 48 | 39-88 | + | Λιποϊκή περιοχή | IgG2, IgM | + |
| PDC-E1α | 41 | 41-66 | - | Περιοχή δέσμευσης TTP και φωσφορυλίωσης | Μη αναφερόμενη | + |
| E3BP | 55 | 95 | + | Μη αναφερόμενη | Μη αναφερόμενη | Μη αναφερόμενη |

Πίνακας 7. Αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA) και αυτοαντιγόνα-στόχοι αυτών με τις ιδιότητες τους.

Οι PDC-E2 και E3BP είναι τα κύρια αυτοαντιγόνα κατά των οποίων στρέφονται τα AMA. Για το λόγο αυτό έχει γίνει σημαντική προσπάθεια για τη λεπτομερή αποσαφήνιση της δομής τους. Βρέθηκε ότι οι πρωτεΐνες PDC-E2 και E3BP αναδιπλώνονται μέσω περιοχών που είναι πλούσιες σε κατάλοιπα αλανίνης και προλίνης, αναδίπλωση που είναι κρίσιμη για την καταλυτική λειτουργία των ενζύμων. Επιπλέον και οι δύο πρωτεΐνες περιέχουν ένα κεντρικό πυρήνα στον οποίο συνδέονται και άλλα πολυπεπτίδια. Ο πυρήνας της E2 πρωτεΐνης περιέχει αμινοξέα που είναι κρίσιμα για την ενεργότητα του ενζύμου. Επιπλέον, και τα δύο πολυπεπτίδια περιέχουν στην αλληλουχία των αμινοξέων τους προσκολλημένο τον συμπάραγοντα λιποϊκό οξύ [195]. Η PDC-E2 έχει δύο και η E3BP μόνο μια λιποϊκή περιοχή [202]. Αυτές οι περιοχές με το λιποϊκό οξύ είναι εκτεθειμένες στην επιφάνεια των δύο πρωτεϊνών συμβάλλοντας στην αντιγονικότητα του μορίου. Και στις τρεις περιπτώσεις (δύο για τη PDC-E2 και μια για τη E3BP) η περιοχή αυτή περιέχει ένα μόνο μόριο λιποϊκού οξέος συνδεδεμένο σε ένα κατάλοιπο λυσίνης σε μια κοινή αλληλουχία αμινοξέων DKA. Η τρισδιάστατη δομή της περιοχής αυτής παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 4 [203].



Εικόνα 4. Η τρισδιάστατη δομή της έσω λιποϊκής περιοχής της PDC-E2 βασισμένη σε δεδομένα NMR (nuclear magnetic resonance) [203].

2.4.1.2 Επίτοποι των AMA

Οι E2 υπομονάδες της 2-OADC είναι δομικά παρόμοιες στο τμήμα που το λιποϊκό οξύ προσδένεται σε αυτές, στο τμήμα πρόσδεσης της E3 μονάδας και στο έσω τμήμα της E2 υπομονάδας. Η καλύτερα χαρακτηρισμένη ανοσολογική απόκριση ανάμεσα στα αντιγόνα της 2-OADC είναι αυτή κατά της PDC-E2. Οι αρχικές μελέτες με ολιγοπεπτίδια [197] και ανασυνδυασμένα τμήματα της PDC-E2 [204] έδειξαν ότι ο επίτοπος της PDC-E2 εντοπίζεται στο λιποϊκό τμήμα της πρωτεΐνης και όχι σε άλλα τμήματα αυτής. Σε μια άλλη μελέτη που χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένα πολυπεπτίδια που κάλυπταν ολόκληρο το εύρος της ανθρώπινης PDC-E2 φάνηκε ότι οι οροί ασθενών με ΠΧΚ αναγνωρίζουν συγκεκριμένα πεπτίδια που αντιστοιχούν στο έξω λιποϊκό και το έσω λιποϊκό τμήμα της ανθρώπινης PDC-E2 [205]. Το μεγαλύτερο μέρος της αντιδραστικότητας προσδιορίστηκε κατά της αλληλουχίας των αμινοξέων 128-227 εντός του έσω λιποϊκού τμήματος της PDC-E2. Ένα ανασυνδυασμένο πεπτίδιο που αντιστοιχούσε στα αμινοξέα 160-227 δεν παρουσίαζε αντιδραστικότητα με τα AMA. Απαλοιφή των αμινοξέων μετά το κατάλοιπο 221 στο καρβοξυτελικό άκρο καταργούσε την αντιδραστικότητα των AMA. Το ανασυνδυασμένο πεπτίδιο 146-221 ήταν απαραίτητο για σύνδεση των AMA ενώ η αλληλουχία των αμινοξέων 128-227 ήταν απαραίτητη για

ισχυρή σύνδεση. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός στερεοτακτικά διαμορφούμενου επιτόπου στην αλληλουχία αμινοξέων μεταξύ 128-227. Η μελέτη με τα αλληλεπικαλυπτόμενα πεπτίδια έδειξε ότι το τμήμα μεταξύ των αμινοξέων 167-184 αποτελούσε γραμμικό επίτοπο στη θέση που προσδένεται το λιποϊκό οξύ. Ενώ το τμήμα του καταλυτικού τμήματος δεν περιγραφόταν μέχρι πρόσφατα σαν αντιγονικό τμήμα παρά μόνο στις μελέτες αναστολής της PDC-E2 από τα AMA, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι δύο πεπτίδια εντός αυτής της περιοχής αποτελούν γραμμικούς επιτόπους [206]. Αναλυτικότερα, σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 33 25μερή πεπτίδια που αλληλεπικαλύπτονταν κατά 8 αμινοξέα και κάλυπταν όλο το εύρος της PDC-E2. Τα πεπτίδια 475-499 και 407-431 έδειξαν να αποτελούν γραμμικούς επιτόπους και αντιστοιχούσαν στην περιοχή του καταλυτικού τμήματος της PDC-E2. Ο αναγνωρισμένος από προηγούμενη μελέτη γραμμικός επιτόπος στο τμήμα 167-184 [197] δεν επιβεβαιώθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη.

Η PDC-E1α διαφέρει από την PDC-E2 στο ότι στερείται σημείου σύνδεσης με το λιποϊκό οξύ. Ο επιτόπος της PDC-E1α εντοπίζεται στην περιοχή του ενζυμικού καταλυτικού τμήματος που παράλληλα είναι και η περιοχή που φωσφορυλιώνει και συνδέεται με το TTP [207]. Επίσης, έχουν χαρακτηριστεί τα αντιγονικά τμήματα της BCOADC-E2 και OGDC-E2 χρησιμοποιώντας τμήματα των πρωτεϊνών αυτών. Η αντιδραστικότητα των AMA κατά της BCOADC-E2 έχει χαρτογραφηθεί εντός της αλληλουχίας που καλύπτει τα αμινοξέα 1-115. Εντός αυτής, η αλληλουχία 1-84 παρουσιάζει ασθενέστερη αντιδραστικότητα με τα AMA. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι σε πειράματα αναστολής, μόνο ολόκληρη η πρωτεΐνη (κατάλοιπα 1-421) μπορούσε να εξαλείψει την αντιδραστικότητα του ορού κατά ολόκληρης της BCOADC-E2 [208]. Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο/οι επιτόπος/οι της BCOADC-E2 είναι στερεοτακτικοί (conformational epitopes). Παρομοίως, ένα ελάχιστο τμήμα 81 αμινοξέων (κατάλοιπα 67-147) που αποτελεί το έσω λιποϊκό τμήμα της OGDC-E2 είναι απαραίτητο για την αντιδραστικότητα των αντι-OGDC-E2 αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης [209, 210]. Ο επιτόπος της E3-BP που αναγνωρίζεται από τα AMA έχει ταυτοποιηθεί στην περιοχή δέσμευσης του λιποϊκού οξέος. Η IgM αντιδραστικότητα κατά της E3-BP είναι μειωμένη, γεγονός που πιθανότατα συνηγορεί υπέρ του ότι η ανοσολογική απάντηση κατά της λιποϊκής περιοχής της E3-BP είναι δευτερεύον φαινόμενο που εξηγείται στα πλαίσια της διασποράς του επιτόπου [211]. Είναι άξιο παρατήρησης ότι οι επιτόποι των PDC-E2, OGDC-E2, και BCOADC-E2 είναι όλοι στερεοτακτικοί στην περιοχή δέσμευσης του λιποϊκού οξέος, αλλά τα αντισώματα έναντι μιας πρωτεΐνης δεν παρουσιάζουν

διασταυρούμενη αντίδραση κατά μιας εκ των άλλων δύο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι οι T κυτταρικοί επίτοποι της PDC-E2 που έχουν περιγραφεί εντοπίζονται στην ίδια περιοχή [212].

Μετά το χαρακτηρισμό των κύριων επιτόπων των PDC-E2, OGDC-E2, και BCOADC-E2 ακολούθησε η δημιουργία μιας υβριδικής πρωτεΐνης που περιέχει τα ανοσοεπικρατούντα τμήματα των τριών πιο πάνω πρωτεϊνών. Αυτά είναι τα PDC-E2 (κατάλοιπα 91–228), OGDC-E2 (κατάλοιπα 67–147) και BCOADC-E2 (κατάλοιπα 1–118).

Με τη χρήση της υβριδικής αυτής πρωτεΐνης σε ELISA και ανοσοτύπωση έχει φανεί ότι αυξάνει η αντιδραστικότητα έναντι αυτής σε σχέση με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μελέτη της αντιδραστικότητας έναντι των επιμέρους πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα κατά τη μελέτη 186 ορών ασθενών με ΠΧΚ, αντιδραστικότητας έναντι της υβριδικής πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε σε 171 ορούς (91.9%) σε πειράματα ELISA και ανοσοαποτύπωσης, έναντι 152 (81.7%) ορών, που αντιδρούσαν με την PDC-E2 [213]. Μερίδα ειδικών υποστηρίζει ότι η χρήση της υβριδικής αυτής πρωτεΐνης είτε σε μεθόδους ELISA ή ανοσοαποτύπωσης αποτελεί ισχυρό διαγνωστικό εργαλείο, το οποίο θα μπορούσε να αντικαταστήσει την κλασική μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού σε κατεψυγμένες τομές ήπατος-νεφρών-στομάχου αρουραίων, δεδομένου ότι ανιχνεύει τα AMA σε ποσοστό >95% των ασθενών με ΠΧΚ [83, 188].

Ο ρόλος του λιποϊκού οξέος στην αντιδραστικότητα των AMA πρέπει να αξιολογηθεί κατάλληλα. Σε όλους τους επιτόπους των AMA που περιγράφηκαν πιο πάνω συμπεριλαμβάνεται η αλληλουχία DKA με το λιποϊκό οξύ να δεσμεύεται στη λυσίνη (K). Δεν είναι ξεκάθαρο ποιος είναι ο ρόλος του λιποϊκού οξέος στην αναγνώριση αυτής της περιοχής από τα AMA. Πάντως είναι σαφές ότι τα AMA συνδέονται και στην PDC-E2 που δεν περιέχει το λιποϊκό οξύ και στην πρωτεΐνη που το περιέχει [214], ενώ μπορούν να δεσμευτούν και σε πεπτίδια που περιέχουν το λιποϊκό οξύ χωρίς όμως τα τελευταία να αποτελούν μέρος κάποιας από τις πρωτεΐνες του συμπλέγματος της 2-OADC [161]. Ο ρόλος του λιποϊκού οξέος στη διάσπαση της ανοσολογικής ανοχής κατά της PDC-E2 έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο του ρόλου των ξενοβιοτικών ουσιών. Εν συντομία, η δομή του λιποϊκού οξέος θα μπορούσε να μεταβληθεί από τις ξενοβιοτικές ουσίες με αποτέλεσμα να δημιουργούνται νεοεπίτοποι.

2.4.1.3 Αναστολή ενζύμων από τα AMA

Όπως ήδη αναλύθηκε, τα AMA αναγνωρίζουν διάφορα ένζυμα και τις υπομονάδες του συμπλέγματος της 2-OADC. Διάφορες αλληλουχίες αμινοξέων εντός αυτών των

ενζύμων μπορούν να ευθύνονται για την αντιγονικότητα των μορίων αυτών με αποτέλεσμα η εμφάνιση των AMA να ποικίλει και να μην παρουσιάζει ειδικότητα και παθογενετική συσχέτιση με τη νόσο. Για την αποσαφήνιση των παραπάνω, αρκετοί ερευνητές μελέτησαν την ανασταλτική ικανότητα των AMA στη δράση της PDC-E2 και το αποτέλεσμα της σύνδεσης αυτών των αντισωμάτων στο ένζυμο. Η μεθοδολογία αυτή έδειξε να είναι λιγότερο υποκειμενική στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων [215]. Πράγματι διαπιστώθηκε ότι τα AMA έχουν την ιδιότητα να αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων της 2-OADC και τα περισσότερα αποτελέσματα προέρχονται από τη μελέτη της αναστολής της PDC-E2. Ο τίτλος των AMA φαίνεται να σχετίζεται και με το βαθμό αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου της PDC-E2 [216]. Η διακύμανση του τίτλου των AMA φαίνεται να προσδιορίζεται καλύτερα όταν χρησιμοποιούνται μέθοδοι αναστολής ενζύμου παρά η ανοσοϊστοχημεία με αντιγόνα σε μιτοχόνδρια βοείας προέλευσης. Η διαγνωστική ευαισθησία της μεθόδου ανέρχεται στο 82%, που είναι χαμηλότερη αυτής του έμμεσου ανοσοφθορισμού [217]. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και σε μια μελέτη 71 ορών από ασθενείς με ΠΧΚ που έδειξε επιπλέον ότι το στάδιο της νόσου δεν επηρέαζε την αναστολή της ενζυμικής δράσης [218]. Σημαντικό επίσης στοιχείο είναι ότι τα AMA σε ασθενείς με ΠΧΚ αναστέλλουν την ενζυμική δράση της ανθρώπινης PDC-E2 σε υψηλότερο βαθμό και ποσοστό ασθενών από ότι στην περίπτωση της PDC-E2 από την *E. coli* και τον *Saccharomyces cerevisiae* [219].

2.4.1.4 Ανασυνδιασμένα Αντιγόνα – Πηγές Αντιγόνων

Όπως έχει ήδη περιγραφεί, τα cDNA των PDC-E2 [173, 220], BCOADC-E2 [221, 222], OGDC-E2 [223, 224] και PDC-E1α [225-227] έχουν κλωνοποιηθεί. Ανασυνδιασμένες μορφές των πρωτεϊνών PDC-E2, BCOADC-E2, PDC-E1α με επίτοπο τρανσφεράση S της γλουταθειόνης (GST) εκφράστηκαν και απομόνωθηκαν μέσω στήλης γλουταθειόνης [208, 228]. Εναλλακτικά, η φυσικά εκφραζόμενη 2-OADC μπορεί να καθαριστεί βιοχημικά [229] και εμπορικά διαθέσιμα μορφές PDC και OGDC από καρδιά γουρουνιού είναι διαθέσιμες (Sigma, St. Louis, MO). Οι υπομονάδες της 2-OADC ξεχωριστά δεν είναι εμπορικά διαθέσιμες. Ανασυνδιασμένη PDC-E2 κουνελιού και ανθρώπου [204, 228], βόεια BCOADC-E2 [208], OGDC-E2 αρουραίου και ανθρώπινη PDC-E1α [207] είναι αποτελεσματικές για την ανίχνευση των AMA είτε με ELISA είτε με ανοσοαποτύπωση και τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με αυτά που παράγονται όταν χρησιμοποιούνται εμπορικά διαθέσιμα παρασκευάσματα μιτοχονδρίων ή βιοχημικά απομονωμένων μιτοχονδριακών κλασμάτων [230]. Επειδή το cDNA της πρωτεΐνης X

δεν είναι διαθέσιμο η ανίχνευση των αντι-E3-BP αντισωμάτων βασίζεται μόνο στην ανοσοαποτύπωση ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών από θηλαστικά.

2.4.1.5 Μέθοδοι ανίχνευσης των AMA

Τα AMA μπορούν να ανιχνευθούν με τις πιο κάτω μεθόδους [74]: (1) έμμεσος ανοσοφθορισμός [171], (2) ανοσοαποτύπωση [208], (3) ELISA [231] (4) αναστολή της καταλυτικής δραστηριότητας των ενζύμων [232].

Ο ανοσοφθορισμός είναι η πιο κοινή μέθοδος ανίχνευσης των AMA χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα μονιμοποιημένα καρκινικά κύτταρα HEp-2 (όχι το ιδανικότερο υπόστρωμα λόγω πολλαπλών ψευδών θετικών αποτελεσμάτων) ή προτιμότερα φρέσκες κατεψυγμένες τομές ήπατος, στομάχου και νεφρού από αρουραίο [74]. Ο ανοσοφθορισμός ανιχνεύει την παρουσία ή όχι των AMA, προσδιορίζει ημιποσοτικά τον τίτλο τους αλλά δεν έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει AMA με αντιδραστικότητα κατά εξιδικευμένων αντιγόνων. Η μη ειδική σύνδεση φαίνεται να είναι το πιο κοινό πρόβλημα που παρουσιάζεται σε πειράματα ανοσοφθορισμού. Έτσι, διαδοχικές αραιώσεις του ορού (συνήθως 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 and 1:640) με την κατάλληλη αραιώση του FITC-σημασμένου δεύτερου αντισώματος είναι απαραίτητα. Παράλληλα, με την χρήση του ανοσοφθορισμού είναι δυνατή η παράλληλη ανίχνευση και άλλων αυτοαντισωμάτων που συχνά συνυπάρχουν με την ΠΧΚ και η ανίχνευση και άλλων κλάσεων AMA (διαφορετικών των IgG) ανάλογα με το τι χρησιμοποιείται ως δεύτερο αντίσωμα. Από την άλλη μεριά, η χρήση μοριακών μεθόδων όπως η ELISA και η ανοσοαποτύπωση επιτρέπουν τον προσδιορισμό της αντιδραστικότητας των AMA με τα επί μέρους μιτοχονδριακά αντιγόνα με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ειδικότητα. Επιπλέον, στα πλεονεκτήματα της ELISA συγκαταλέγεται και το ότι δεν χρειάζεται εξειδικευμένο προσωπικό για τη διενέργεια του πειράματος και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων σε αντίθεση με τον έμμεσο ανοσοφθορισμό. Στις μέρες μας κυκλοφορούν διάφορα προτυποποιημένα και εμπορικά διαθέσιμα ELISA kits όπου με τη παράλληλη χρήση πολλαπλών αντιγόνων και τη χρήση τόσο IgA όσο και IgG δεύτερων αντισωμάτων είναι δυνατόν να αυξηθεί η ευαισθησία για την ανίχνευση της νόσου [188, 233, 234]. Η ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιείται μόνο σε εξειδικευμένα κέντρα για σκοπούς διάγνωσης ενώ έχει πρωταγωνιστικό ρόλο στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ELISA και την προτυποποίηση αυτής της μεθόδου [74, 235].

2.4.1.6 Τα AMA στην παθογένεια της νόσου

Τα AMA αποτελούν ένα εξαιρετικό δείκτη για τη διάγνωση της ΠΧΚ, ωστόσο δεν είναι γνωστό αν και κατά πόσο εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου. Σε πειραματικά μοντέλα ο εμβολιασμός των πειραματοζώων με PDC-E2 είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση AMA χωρίς όμως την ανάπτυξη νόσου με ιστολογικές ή βιοχημικές διαταραχές συμβατές με ΠΧΚ [236]. Σε αντίθεση με τα παραπάνω δεδομένα είναι αυτά από δύο νεογέννητα, των οποίων οι μητέρες έπασχαν από ΠΧΚ και τα οποία παρουσίασαν διαταραγμένη ιστοπαθολογία ήπατος για το διάστημα που ανιχνευόντουσαν AMA στον ορό τους, τα οποία είχαν πέρασει παθητικά μέσω του πλακούντος από τη μητέρα στο έμβρυο [237].

Η επικρατούσα άποψη για την παθογένεια της ΠΧΚ είναι ότι η κυτταρική ανοσία πρωταγωνιστεί με τα CD4+ και τα CD8+ T λεμφοκύτταρα να αναγνωρίζουν ως αντιγονικό τόπο την περιοχή που θεωρείται ότι είναι και ο κύριος επίτοπος των AMA [86, 88]. Έτσι, τόσο παράμετροι της κυτταρικής όσο και της χυμικής ανοσίας είναι υπεύθυνοι για την επίθεση κατά των επιθηλιακών κυττάρων των μικρών χοληφόρων.

Οι Кита και συνεργάτες έδειξαν ότι ανοσοσυμπλέγματα μονοκλωνικών αντι-PDC-E2 αντισωμάτων και PDC-E2 ευοδώνουν την γένεση CD8+ T κυτταρικής απόκρισης κατά της PDC-E2 σε συγκεντρώσεις ανοσοσυμπλεγμάτων 100 φορές μικρότερη σε σχέση με την παρουσία μόνο του αντιγόνου [86].

Διαδοχικές τομές ήπατος από ασθενείς με ΠΧΚ παρουσίαζαν θετικά αποτελέσματα ανοσοϊστοχημείας με μια σχεδόν πανομοιότυπη συχνότητα για την παρουσία της PDC-E2 και IgA αντισωμάτων στα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων, στην κορυφή αυτών των κυττάρων, στη μεριά του αυλού των χολαγγείων [238]. Επιπλέον, η παρουσία αντι-PDC-E2 αντισωμάτων στη χολή των ασθενών με ΠΧΚ φαίνεται να είναι συμβατή με κάποιο ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Τα IgA αντισώματα είναι ικανά να δεσμεύουν ενδοκυττάρια μόρια κατά τη μεταφορά τους διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων και τα IgA αντι-PDC-E2 αντισώματα θεωρείται ότι δεσμεύουν την PDC-E2 ενδοκυττάρια έτσι ώστε αυτή να μη μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα να δημιουργείται μεταβολική δυσλειτουργία και θάνατος του κυττάρου. Ενώ αυτή η θεωρία είναι πολύ ελκυστική για να εξηγήσει το ρόλο των IgA AMA στην παθογένεια της ΠΧΚ παραμένει να επιβεβαιωθεί [239].

2.4.2 ΑΝΤΙΠΥΡΗΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (ANA)

Η παρουσία ANA σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με ΠΧΚ με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρονολογείται από τη δεκαετία του 1960 [240]. Δυο δεκαετίες αργότερα έγινε χαρακτηρισμός των ANA σε υπόστρωμα HEp-2 κυττάρων [241, 242]. Υπάρχουν δυο κατηγορίες ANA στην ΠΧΚ ; αυτά που είναι ειδικά για τη νόσο και αυτά που δεν παρουσιάζουν ειδικότητα για τη νόσο όπως είναι τα αντικεντρομεριδιακά, τα αντι-Ro/SSA, τα αντι-La/SSB, τα αντι-Scl-70, και τα αντισώματα κατά ιστονών [74, 243]. Τα ANA παρουσιάζονται σε περίπου 50% των ασθενών με ΠΧΚ ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι AMA ενώ μεταξύ των ασθενών με AMA αρνητική ΠΧΚ το ποσοστό αυτό μπορεί να φθάνει και το 85% [244].

Τα ειδικά πρότυπα ανοσοφθορισμού των ANA σε υπόστρωμα HEp-2 σε ασθενείς με ΠΧΚ είναι δύο. Το πρότυπο των πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων (Multiple Nuclear Dots-MND ANA) και το περιπυρηνικό πρότυπο μεβράνης (-Rim-like Membranous- RLM ANA) [74, 245]. Σε μια μελέτη, που συμπεριέλαβε 492 ασθενείς με ΠΧΚ, 72% είχαν ANA κατά την εξέταση με ανοσοφθορισμό σε HEp-2 υπόστρωμα. Αναλυτικότερα, 12.8% παρουσίασαν περισσότερα από ένα πρότυπο ανοσοφθορισμού με κυριότερα τα αντισώματα RLM, στικτού τύπου και αντικεντρομεριδιακά σε ποσοστά 19%, 20% και 13%, αντίστοιχα [246], ποσοστά συγκρίσιμα με αυτά προηγούμενων μελετών [244, 247, 248].

2.4.2.1 ΑΝΤΙ-MND ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Οι αντιγονικοί στόχοι των αντί-MND ANA είναι διακριτές, εμπύρηνες στικτές δομές διαφορετικές από τους πυρηνίσκους και τα κεντρομερίδια από τα οποία είναι μεγαλύτερες, λιγότερες σε αριθμό χωρίς να είναι διακριτές στη μετάφραση ή στη μίτωση. Αυτοαντισώματα έναντι των πρωτεϊνών sp100 [249, 250] και PML (Promyelocytic Leukemia protein, επειδή υπερεκφράζεται σε κύτταρα της προμυελωτικής λευχαιμίας) [251, 252], αμφότερες πρωτεϊνικές δομές των πυρηνικών σωματιδίων, δίνουν αυτό το προφίλ φθορισμού σε HEp-2 κυτταρικές σειρές.

Τα αντι-sp100 αντισώματα που ανιχνεύονται σε ασθενείς με ΠΧΚ παρουσιάζουν ετερογένεια μεταξύ των ασθενών ως προς τις περιοχές της πρωτεΐνης που αναγνωρίζουν. Έχουν ταυτοποιηθεί 3 περιοχές της πρωτεΐνης που θεωρούνται επικρατούσες ως επίτοποι [250, 253]. Αρκετές μελέτες ως τώρα έχουν δείξει ότι τα αντι-sp100 αντισώματα είναι ειδικά για τη νόσο [74, 245, 249, 251, 254, 255]. Τα αντισώματα

κατά της PML πρωτεΐνης επίσης υπάρχουν συχνά σε ασθενείς με ΠΧΚ αν και είναι δύσκολο να ανιχνευθούν [251, 256].

Τα αντι-Sp140 αντισώματα έχουν επίσης ταυτοποιηθεί ως ειδικά για τη νόσο σχεδόν πάντα (περίπου 95%) με την παρουσία των αντι-sp100 αντισωμάτων [257]. Αντίθετα συνύπαρξή τους με τα αντι-PML ανέρχεται στο 60% των περιπτώσεων [257]. Μια μελέτη ανέδειξε την παρουσία τους σε ποσοστό 15% μεταξύ των ασθενών με ΠΧΚ, αλλά όχι σε ασθενείς με άλλα ηπατικά νοσήματα. Μεγαλύτερη συχνότητα των αντι-Sp140 αντισωμάτων αναφέρεται μεταξύ AMA αρνητικών ασθενών σε σχέση με τους AMA θετικούς (53 vs. 9%, $p < 0.0001$).

2.4.2.2 ANTI-RLM ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Η παρουσία αυτοαντισωμάτων που δίνουν περιφερικό πυρηνικό φθορισμό σε ασθενείς με ΠΧΚ περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1985 [258]. Δύο ξεχωριστές ομάδες ανέφεραν το 1988 ότι τα αντισώματα αυτά αναγνωρίζουν μια πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου, που έχει μέγεθος περίπου 200 KDa [259, 260]. Την ίδια χρονική περίοδο μια τρίτη ερευνητική ομάδα δημοσίευσε ότι το 25% μιας ομάδας 150 ασθενών εμφάνιζε αντιδραστικότητα στον ορό έναντι μιας πρωτεΐνης μεγέθους περίπου 200 KDa [261].

Ως αντιγόνο στόχος ταυτοποιήθηκε αργότερα από τους Cougnalin και συνεργάτες η πρωτεΐνη gp210 που είχε απομονωθεί από την πυρηνική μεμβράνη, μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία αποτελεί συστατικό στοιχείο των πυρηνικών πόρων [262]. Χρησιμοποιώντας gp210 cDNA αρουραίου, βρέθηκε ότι τα αντισώματα των ασθενών με ΠΧΚ αναγνωρίζουν τα τμήματα της gp210 όταν το cDNA εκφράζεται σε βακτήρια [263]. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι μια αλληλουχία 15 αμινοξέων στο καρβόξυ-τελικό άκρο της gp210 αποτελεί τον κύριο αντιγονικό επίτοπο [263, 264] όπως επιβεβαιώθηκε και από άλλες μελέτες [265, 266]. Επίσης έχει δείχθει ότι κάποια αντι-gp210 αντισώματα ίσως να αναγνωρίζουν και γλυκοζυλιωμένους επίτοπους στο άμινο-τελικό άκρο [267]. Αντισώματα που δίνουν παρόμοιο περιπυρηνικό φθορισμό RLM στην ΠΧΚ είναι επίσης τα αντι-p62 και τα αντι-LBR (Lamin B Receptor) [74].

2.5 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

Η ΠΧΚ χαρακτηρίζεται ιστολογικά από την ύπαρξη μη πυώδους χολαγγειίτιδας των μικρών ενδοηπατικών χοληφόρων [1]. Σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες βιοψιών ήπατος ασθενών με ΠΧΚ περιγράφονται στα πυλαία διαστήματα λεμφοκυτταρικές διηθήσεις

[268, 269]. Η ειδικότητα της καταστροφής των πυλαίων διαστημάτων σε συνδυασμό με τη διήθηση των πυλαίων διαστημάτων με ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και την έκφραση από τα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων μορίων HLA [270] καταδεικνύουν ότι τα επιθηλιακά κύτταρα των μικρών χοληφόρων είναι στόχος μιας έντονης και εστιασμένης ανοσολογικής επίθεσης διαμεσολαβούμενης από T λεμφοκύτταρα, παρόλο που τα αντιγόνα στόχοι βρίσκονται σε όλα τα ανθρώπινα κύτταρα [168]. Μελέτες σε μεικτό πληθυσμό λεμφοκυττάρων του αίματος έδειξαν ότι τα περιφερικά λεμφοκύτταρα τόσο των ασθενών με ΠΧΚ όσο και των μαρτύρων (υγιών αλλά και πασχόντων από άλλα νοσήματα) είχαν παρόμοια αντίδραση στο σύμπλεγμα της PDC. Στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανοσολογική απόκριση μεταξύ ασθενών με ΠΧΚ και μαρτύρων βρέθηκε όταν τα λεμφοκύτταρα διεγέρθηκαν με την PDC-E2. Διαφορά δεν καταγράφηκε όταν το αντιγόνο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η PDC-E1 ή η PDC-E3 [271].

2.5.1 ΑΡΧΕΓΟΝΗ ΑΝΟΣΙΑ (INNATE IMMUNITY) ΣΤΗΝ ΠΧΚ

Το ήπαρ σαν όργανο τροφοδοτείται τόσο από αρτηριακό όσο και από φλεβικό αίμα. Ειδικότερα, το αίμα που προέρχεται από την πυλαία φλέβα στο ήπαρ βρίθεται τόσο ουσιών που προσλαμβάνονται με τη διατροφή όσο και μικροοργανισμών από τον εντερικό σωλήνα. Στο ήπαρ επιτελούνται οι λειτουργίες του μεταβολισμού, της κάθαρσης και της αδρανοποίησης των ουσιών και των μικροοργανισμών αυτών χωρίς αυτά να εισέρχονται στη συστηματική κυκλοφορία [272]. Είναι ευνόητο, ότι θα έπρεπε στο ήπαρ αφ' ενός να αποφεύγεται η άσκοπη ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος κατά μη παθογόνων μορίων όπως είναι τα συστατικά της τροφής και οι μη παθογόνοι μικροοργανισμοί, αφ' ετέρου δε θα έπρεπε να υπάρχει μια αποτελεσματική ανοσολογική απόκριση κατά των παθογόνων μικροοργανισμών [273].

Το ήπαρ σαν ανοσοποιητικό όργανο έχει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Μεταξύ άλλων, το ενδοθήλιο του είναι διάτρητο και παρουσιάζει ασυνέχεια. Από τα χάσματα αυτά μπορεί να περάσουν διάφορες ουσίες προς το παρέγχυμα [274]. Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν αντιγονοπαρουσιαστικές ιδιότητες. Σε *in vitro* πειράματα έχει βρεθεί ότι μπορούν να παρουσιάσουν εξωγενή αντιγόνα στα CD4+ T λεμφοκύτταρα χωρίς να έχουν προηγουμένως διεγερθεί με IFN- γ ή TNF- α [275].

Η αρχέγονη ανοσία επιτελείται από κύτταρα, που επιστρατεύονται, δρούν άμεσα και προστατεύουν κατά ένα μη ειδικό τρόπο. Σε αντίθεση με την επίκτητη (ή προσαρμοστική) ανοσία δεν καταλείπει μακροπρόθεσμη ανοσολογική μνήμη. Έτσι, η αρχέγονη ανοσία αποτελεί το πρώτο σκέλος της ανοσολογικής απάντησης που

ενεργοποιείται κατά των παθογόνων όταν διασπαστούν οι φραγμοί και αναγνωρίζει ένα μικρό αριθμό δομών που είναι κοινά σε πολλά παθογόνα. Για μεγάλο διάστημα η επίκτητη και η αρχέγονη ανοσία θεωρούνταν ξεχωριστά, διακριτά και ανεξάρτητα μέρη του ανοσολογικού συστήματος ενώ πρόσφατα δεδομένα απορρίπτουν αυτή την προσέγγιση [276], ειδικά στο πεδίο της αυτοανοσίας [277, 278].

Κάποια από τα κυτταρικά συστατικά της αρχέγονης ανοσίας είναι γνωστά για τη ρυθμιστική τους δράση επί συστατικών στοιχείων της επίκτητης ανοσίας όπως είναι η αντιγονοειδική χυμική και T κυτταρική αντιδραστικότητα. Τα κυτταρικά συστατικά της αρχέγονης ανοσίας όπως είναι τα μονοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK) και τα T κύτταρα φυσικοί φονείς (NKT) είναι γνωστό ότι μεταβάλλουν τη δράση τόσο της κυτταρικής όσο και της χυμικής αντιγονοειδικής ανοσολογικής απόκρισης.

Στοιχεία που συνάδουν με την εμπλοκή της αρχέγονης ανοσίας στην παθογένεια της ΠΧΚ είναι η ύπαρξη κοκκιωμάτων στην ιστολογία της βλάβης [1], η πολυκλωνική αύξηση της IgM ανοσοσφαιρίνης σαν αντίδραση σε βακτηριακά συστατικά όπως το CpG [279-281], ο αυξημένος αριθμός μονοκυττάρων και η αυξημένη ικανότητά τους όταν διεγερθούν, να εκκρίνουν κυτταροκίνες που ευοδώνουν τη φλεγμονή [282], τα αυξημένα επίπεδα των NK κυττάρων στο ήπαρ και στο αίμα, η αυξημένη αντιδραστικότητα αυτών των κυττάρων στις κυτταροκίνες στους ασθενείς με ΠΧΚ σε σχέση με τους μάρτυρες και η αυξημένη ικανότητα κυτταροτοξικότητας που παρουσιάζουν [154, 282-284].

2.5.1.1 Ηπατικά κοκκιώματα στην ΠΧΚ

Τα κοκκιώματα δημιουργούνται από επιθηλιοειδή μακροφάγα. Στην ΠΧΚ τα επιθηλιοειδή κοκκιώματα δυνατόν να παρατηρηθούν σε όλα τα ιστολογικά στάδια της νόσου χωρίς να παρουσιάζουν στοιχεία τυροειδούς νέκρωσης όπως τυπικά ανευρίσκονται στη φυματίωση. Οι μηχανισμοί που οδηγούν στη δημιουργία αυτών των κοκκιωμάτων στη ΠΧΚ είναι εν πολλοίς άγνωστοι και φαίνεται να είναι διαφορετικοί όταν συγκρίνονται με τους μηχανισμούς δημιουργίας κοκκιωμάτων σε αυτοάνοσα νοσήματα που σχετίζονται με ανοσοανεπάρκεια [285]. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι Gram θετικά μικρόβια δυνατόν να πυροδοτούν το φαινόμενο μέσω του λιπιδίου οξέος [286] ενώ η οστεοποντίνη μπορεί να συμβάλλει στην προσέλκυση των μονοκυττάρων [287].

2.5.1.2 Ανοσοσφαιρίνες IgM

Η αυξημένη έκκριση IgM ανοσοσφαιρίνης είναι κοινό φαινόμενο στην ΠΧΚ [1, 170] και είναι ανεξάρτητη από τα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων. Υπερ μιας ενδεχόμενης συσχέτισης μεταξύ αυξημένης IgM ανοσοσφαιρίνης και ΠΧΚ είναι και το γεγονός της μείωσης των επιπέδων της κατά τη διάρκεια επιτυχούς θεραπείας της νόσου [76].

Έχει προταθεί ότι η υπέρ IgM-σφαιριναιμία μπορεί να οφείλεται σε πολυκλωνική διέγερση της αρχέγονης ανοσίας από μη μεθυλιωμένα CpG συστατικά των μικροβίων τα οποία έχουν ανοσοδιεγερτική επίδραση στον άνθρωπο [280, 281]. Μετά από διέγερση περιφερικών μονοκυττάρων με τέτοια ολιγο-δεόξυνουκλεοτίδια βρέθηκε ότι τα κύτταρα των ασθενών με ΠΧΚ εκκρίνουν μεγαλύτερη ποσότητα IgM ανοσοσφαιρίνης σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι η έκφραση του Toll-Like Receptor 9 (TLR9) που είναι ο υποδοχέας των CpG μοτίβων [279], αυξανόταν στην επιφάνεια των κυττάρων και παρουσίαζε συσχέτιση με τα επίπεδα της IgM ανοσοσφαιρίνης [280].

2.5.1.3 Μονοκύτταρα στην ΠΧΚ

Περισσότερα δεδομένα για το ρόλο της αρχέγονης ανοσίας στην παθογένεια της ΠΧΚ έχουν προκύψει από τη μελέτη των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Τα μονοκύτταρα εκφράζουν μια ποικιλία από TLR υποδοχείς οι οποίοι ενεργοποιούνται από επαναλαμβανόμενες μοριακές αλληλουχίες που συνδέονται με τα παθογόνα (pathogen associated molecular pattern-PAMP). Αυτή η ενεργοποίηση επάγει την έκκριση κυτταροκινών φλεγμονής όπως η IL-1, IL-6, IL-18, IL-12 και ο TNF-α, οι οποίες μπορούν να μεσολαβήσουν στον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων κατά των παθογόνων. Σε μια μελέτη, περιφερικά μονοκύτταρα ασθενών με ΠΧΚ και μαρτύρων καλλιεργήθηκαν παρουσία των μορίων που συνδέονται με τους TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 και TLR9 [282]. Οι ασθενείς με ΠΧΚ παρουσίαζαν αυξημένη έκκριση κυτταροκινών, όπως η IL-1, IL-6 και TNF-α σε σύγκριση με τους υγιείς. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν προκύψει και από προγενέστερες μελέτες [288-292]. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι οι υποδοχείς TLR στα μονοκύτταρα των ασθενών με ΠΧΚ είναι πιο ευαίσθητοι όταν συνδέονται με τα PAMPs σε σχέση με τους υποδοχείς στα μονοκύτταρα των μαρτύρων εκκρίνοντας κυτταροκίνες που επάγουν τη φλεγμονή. Δεν έχει εξηγηθεί γιατί συμβαίνει αυτό, αλλά ένα πιθανό σενάριο είναι ότι οι ασθενείς με ΠΧΚ συχνά παρουσιάζουν υποτροπιάζουσες λοιμώξεις από Gram αρνητικά μικρόβια [293]. Τα βακτηριακά δομικά συστατικά

μεταφέρονται στο ήπαρ μέσω της πυλαίας φλέβας, ενεργοποιούν τα μονοκύτταρα που δημιουργούν μέσω των κυτταροκινών που παράγουν ένα περιβάλλον που ευοδώνει τη δράση των ενδοηπατικών T και B λεμφοκυττάρων [294]. Έτσι, ξεκινάει ένας καταρράκτης διαδοχικών γεγονότων παραγωγής και δράσης που οδηγεί σε έκκριση κυτταροκινών από τα NK κύτταρα που εδράζονται στο ήπαρ [284], ενώ τα ενεργοποιημένα CD8+ T λεμφοκύτταρα στο ήπαρ βελτιώνουν την ικανότητα των ηπατοκυττάρων να ενεργοποιούν επιπλέον αριθμό CD8+ T λεμφοκυττάρων [295].

Είναι σημαντικό επίσης να σημειωθεί ότι υπάρχει μια σειρά αρνητικών ρυθμιστικών μορίων της σηματοδότησης και ενεργοποίησης των TLR [296]. Βλάβη σε ένα ή περισσότερους τέτοιους ελεγκτικούς μηχανισμούς ενδέχεται να οδηγεί τα μονοκύτταρα σε έκκριση αυξημένων ποσοτήτων κυτταροκινών.

2.5.1.4 NK και NKT κύτταρα στην ΠΧΚ

Τα NKT κύτταρα έχουν εμπλακεί στην παθογένεια του σακχαρώδη διαβήτη αυτοάνοσης αιτιολογίας, της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας, του πειραματικού μοντέλου της πολλαπλής σκλήρυνσης και το ενδιαφέρον για το ρόλο αυτού του πληθυσμού λεμφοκυττάρων στην παθογένεια των αυτοανόσων νοσημάτων αυξάνεται ολοένα και περισσότερο. Αυτά τα κύτταρα αντιδρούν με αντιγόνα γλυκολιπιδικής φύσης τα οποία παρουσιάζονται μέσω ενός μορίου, σαν τα μόρια MHC I, το CD1, εκκρίνοντας IFN- γ και IL-4 [297]. Η παρουσία των NKT λεμφοκυττάρων έχει φανεί ότι είναι πιο συχνή στους ιστούς που υπάρχει η ανοσολογική βλάβη σε σχέση με το περιφερικό αίμα. Αυτή η συμπεριφορά των NKT έχει περιγραφεί τόσο στους ασθενείς με άλλα νοσήματα του ήπατος όσο και στους υγιείς μάρτυρες. Οι Chuang και συνεργάτες περιέγραψαν αυξημένο αριθμό NKT λεμφοκυττάρων τόσο στο αίμα όσο και στο ήπαρ των ασθενών με ΠΧΚ [283]. Επιπλέον, σε αυτή τη μελέτη φάνηκε ότι η κυτταροτοξική δράση και η έκφραση περφορίνης από απομονωμένα NKT κύτταρα ήταν αυξημένα στους ασθενείς με ΠΧΚ σε σχέση με τους μάρτυρες με ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων IL-8 στο πλάσμα και της έκφρασης του CD128a (υποδοχέα της IL-8) στην επιφάνεια των NKT κυττάρων [283]. Αντίθετα, η ικανότητα παραγωγής των κυτταροκινών IFN- γ , IL-6, και IL-8 από τα NKT κύτταρα στους ασθενείς με ΠΧΚ ήταν μειωμένη σε σχέση με τους μάρτυρες. Σε CD1^{-/-} dnTGF β RII ποντίκια, η ιστολογική βλάβη που παρατηρείται είναι ηπιότερη από ότι στα CD1^{+/-} ποντίκια, με ταυτόχρονη αύξηση της IFN- γ [298].

Όσον αφορά στα NK κύτταρα, σε μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι μέσω της διέγερσης του υποδοχέα TLR-4 τα NK καταστρέφουν αυτόλογα επιθηλιακά κύτταρα των

χοληφόρων παρουσία της IFN-α η οποία εκκρινόταν από μονοκύτταρα που ενεργοποιούνταν μέσω του υποδοχέα TLR3. Η παραγωγή της IFN-α από τα μονοκύτταρα ήταν αυξημένη στους ασθενείς με ΠΧΚ όταν συγκρινόταν με την έκκριση της IFN-α από τα μονοκύτταρα των μαρτύρων. Αυτά τα δεδομένα είναι συμβατά με ανοσοϊστοχημικές μελέτες που δείχνουν αυξημένο πληθυσμό CD3-CD56+ T λεμφοκυττάρων (NK κυττάρων) γύρω από τις βλάβες στους ασθενείς με ΠΧΚ [299].

Παρόλο που αυτές οι αλλαγές στην αρχέγονη ανοσία από μόνες τους δε φαίνεται να είναι ικανές να μεταβάλουν την ισορροπία του ανοσολογικού συστήματος προς τη μεριά της διάσπασης της ανοσολογικής ανοχής, εντούτοις φαίνεται ότι συμβάλουν στην ευόδωση της αυτοάνοσης αντίδρασης που παρουσιάζουν τα συστατικά στοιχεία της επίκτητης ανοσίας.

2.5.2 ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ ΣΤΗΝ ΠΧΚ

2.5.2.1 Αντιγονοπαρουσίαση

Ένα από τα κλειδιά για την αξιολόγηση της αυτοάνοσης δραστηριότητας σε επίπεδο κυτταρικής ανοσίας είναι η ταυτοποίηση των κυτταρικών τύπων που ενεργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και που ευθύνονται για τη έναρξη της ανοσολογικής αυτής απόκρισης. Η ενεργοποίηση των CD4+ T λεμφοκυττάρων απαιτεί αφενός την παρουσίαση του επίτοπου σε ένα μόριο του MHC κλάσης II που συνδέεται στον TCR των λεμφοκυττάρων και αφετέρου την παρουσία ενός συνδιεγερτικού σήματος. Το τελευταίο είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των μορίων της οικογένειας B7 (B7-1 και B7-2 ή CD80 και CD86 αντίστοιχα) που βρίσκονται στην επιφάνεια των ΑΠΚ με τους υποδοχείς τους στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων (CD28 και CTLA-4). Τα επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα –κυρίως τα δενδριτικά κύτταρα- παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη επαγωγή της T κυτταρικής απόκρισης. Σε βιοψίες ήπατος από ασθενείς με ΠΧΚ, δενδριτικά κύτταρα έχουν βρεθεί γύρω από τα κατεστραμμένα χοληφόρα, ενώ σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες φαίνεται να εκφράζουν στην επιφάνειά τους συνδιεγερτικά μόρια της οικογένειας B7 μαζί με MHC II μόρια ή S-100 [300] και CD83+ [301]. Τα ειδικά για την PDC-E2 αυτοδραστικά CD4+ T λεμφοκύτταρα επάγονταν πιο αποτελεσματικά από τα δενδριτικά κύτταρα που προκαλλιεργήθηκαν με την PDC-E2 τεκμηριώνοντας έτσι τον καθοριστικό ρόλο που έχει η αντιγονοπαρουσίαση στην παθογένεια της ΠΧΚ [302].

Τα δενδριτικά κύτταρα γενικά ταξινομούνται ως μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα (myeloid Dcs - mDCs) και πλασματοειδή δενδριτικά κύτταρα (plasmacytoid DCs – pDCs) και ανευρίσκονται στους περιφερικούς ιστούς πολλών οργάνων υπό κανονικές συνθήκες. Τα δενδριτικά κύτταρα δρουν σαν “ανοσολογικοί αισθητήρες” για παθογόνα που εισέρχονται εντός του οργανισμού και αλληλεπιδρούν τόσο με το αρχέγονο όσο και το επίκτητο σκέλος του ανοσολογικού συστήματος. Τα mDCs προέρχονται από προγονικές μορφές κυττάρων του μυελού, που επίσης δίνουν γένεση στη σειρά των μακροφάγων και των μονοκυττάρων και που έχουν τη δυνατότητα να προσλαμβάνουν αντιγονικές δομές. Επειδή τα κύτταρα του Langerhans προέρχονται από τα μονοκύτταρα, ανήκουν στα mDCs [303]. Αντίθετα, τα pDCs παρουσιάζουν πλασματοκυτταρική μορφολογία και προέρχονται από προγονικά κύτταρα που βρίσκονται στο αίμα. Φαινοτυπικά τα mDCs και τα pDCs εκφράζουν τα BDCA-1 (ή CD1c) και BDCA-2 (blood dendritic cell antigen) αντίστοιχα και τα mDCs χαρακτηρίζονται ως BDCA-1+, CD19+ κύτταρα [304, 305]. Η πρωτεΐνη Langerin εκφράζεται στα κύτταρα Langerhans στο δέρμα και στον εντερικό σωλήνα με τα Langerin+ κύτταρα Langerhans να έχουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική επιτήρηση [306]. Στην περιφέρεια τα ανώριμα κύτταρα Langerhans προσλαμβάνουν αντιγόνα και κάτω από την επήρεια φλεγμονωδών σημάτων μεταναστεύουν στους ιστούς. Παρόλο που διάφορες χημειοκίνες έχουν ενοχοποιηθεί για την μετανάστευση των δενδριτικών κυττάρων στους ιστούς η MIP-3a (macrophage inflammatory protein-3a) ή CCL20 είναι η κύρια χημειοκίνη που εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα τα δενδριτικά κύτταρα να μεταναστεύουν στο τόπο της φλεγμονής [307] με τον υποδοχέα της MIP-3a να εκφράζεται στην επιφάνεια των κυττάρων Langerhans [307, 308]. Για να διερευνηθεί αυτός ο μηχανισμός αντιγονοπαρουσίασης στην ΠΧΚ εξετάστηκε η κατανομή και ο φαινότυπος των δενδριτικών κυττάρων που διηθούν τις βλάβες στην ΠΧΚ καθώς και ο μηχανισμός με τον οποίο αυτά τα κύτταρα μεταναστεύουν στις βλάβες [309]. Βρέθηκε ότι τα κύτταρα Langerhans είναι αυτά που κατανέμονται κυρίως γύρω από τις βλάβες και η παρουσία τους εκεί είναι αποτέλεσμα παραγωγής χημειοτακτικών παραγόντων από τα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων (ΕΚΧ) σαν αποτέλεσμα της δράσης των κυτταροκινών που παράγονται στην περιοχή της βλάβης. Συγκεκριμένα, η ανοσοϊστοχημική μελέτη βιοψιών από ασθενείς με ΠΧΚ και μάρτυρες έδειξε ότι τα BDCA-2+ θετικά pDCs βρίσκονταν κυρίως στα πυλαία διαστήματα τόσο στις βιοψίες των ασθενών όσο και στις βιοψίες των μαρτύρων και η κατανομή τους δεν σχετιζόταν με τα χοληφόρα. Τα BDCA-1+ και CD19 mDCs βρίσκονταν επίσης στα πυλαία διαστήματα τόσο στους ασθενείς με ΠΧΚ όσο και

στους μάρτυρες. Τα Langerin+ κύτταρα Langerhans κατανέμονται εντός των επιθηλιακών κυττάρων στα κατεστραμμένα χοληφόρα στις βιοψίες των ασθενών με ΠΧΚ. Κυτταρικές καλλιέργειες ΕΚΧ έδειξαν ότι η παραγωγή MIP-3a από αυτά σχετιζόταν με τη διέγερσή τους με IL-1β, TNF-α και IL-17.

Είναι ενδιαφέρον επίσης το ότι τα κατεστραμμένα ΕΚΧ μπορούν να εκφράζουν μόρια MHC τάξης I και II [310, 311] υποδηλώνοντας ότι μπορούν να παρουσιάζουν αντιγόνα αν εκφράζονται τα ανάλογα συνδιεγερτικά σήματα. Αν δεν υπάρχει το ανάλογο συνδιεγερτικό σήμα τότε η σύνδεση του CD4 μορίου με το σύμπλεγμα CD3-TCR-πεπτιδίο θα οδηγήσει το λεμφοκύτταρο σε ανεργία. Τα αποτελέσματα όσον αφορά στην έκφραση συνδιεγερτικών μορίων είναι αντικρουόμενα όπως περιγράφεται και στο Κεφάλαιο 2.8. Ότι και να ισχύει σε σχέση με την έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων στην επιφάνεια των ΕΚΧ φαίνεται να μην έχει και ιδιαίτερη σημασία στην παθογένεια της νόσου καθώς έχει βρεθεί ότι τα ΕΚΧ είναι ικανά να ενεργοποιούν ανεξάρτητα από συνδιεγερτικά μόρια CD4+CD28- αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα. Αυτά τα CD4+CD28- αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν αντοχή στην επαγόμενη από την ενεργοποίηση απόπτωση και παράγουν υψηλότερα επίπεδα IFN-γ σε σχέση με τα CD4+CD28+ T κύτταρα [312-314]. Η παρουσία των CD4+CD28- κυττάρων στο αίμα και στο ήπαρ των ασθενών με ΠΧΚ είναι συχνότερη σε σχέση με υγιείς μάρτυρες [315].

2.5.2.1 Αυτοδραστικά CD4+ T λεμφοκύτταρα

Τα CD4+ T κύτταρα έχουν ένα κεντρικό ρόλο στην λειτουργία του ανοσολογικού συστήματος. Παρέχουν την απαραίτητη βοήθεια στα B λεμφοκύτταρα για να παράγουν αντισώματα, ευοδώνουν και συντηρούν την ενεργοποίηση των CD8+ T λεμφοκυττάρων, ρυθμίζουν τη λειτουργία των μακροφάγων, ενορχηστρώνουν την ανοσολογική απόκριση έναντι μιας μεγάλης μερίδας παθογόνων μικροοργανισμών και ρυθμίζουν το βαθμό της ανοσολογικής απόκρισης διατηρώντας την ανοσολογική απάντηση έναντι παθογόνων εντός των αποδεκτών ορίων μειώνοντας και τη πιθανότητα αυτοανοσίας. Τα CD4+ T λεμφοκύτταρα είναι σημαντικοί διαμεσολαβητές της ανοσολογικής μνήμης και όταν ο αριθμός τους μειώνεται ή εξαφανίζεται ο οργανισμός καθίσταται ευάλωτος σε μια ποικιλία παθογόνων οργανισμών με κυριότερο και πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτό του ιού της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (HIV).

Τα AMA στην ΠΧΚ ανήκουν είναι κυρίως IgG τάξης υποδηλώνοντας έμμεσα την ενεργοποίηση ενός CD4+ T-κυτταροεξαρτώμενου μηχανισμού, που προσφέρει την αναγκαία βοήθεια στα αντιγονοειδικά πλασματοκύτταρα για την παραγωγή των εν λόγω

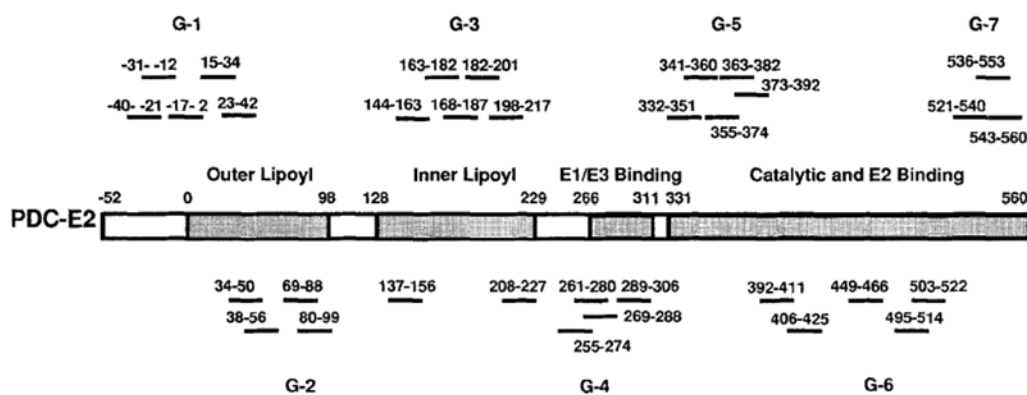
αντισωμάτων [316, 317]. Σε διάφορες μελέτες έχει μετρηθεί η ανοσολογική απόκριση των Τ λεμφοκυττάρων έναντι των μιτοχονδριακών αντιγόνων του συμπλέγματος της OADC-E2. Τα αντιγόνα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της Τ κυτταρικής ανοσίας κατά της PDC-E2 σε διάφορες εργασίες ήταν μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που εκχυλίστηκαν από βόειους ιστούς πλούσιους σε μιτοχονδριακά αντιγόνα (π.χ. καρδιακός ιστός) [271, 318, 319], ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες [319, 320], συνθετικά πεππίδια [88] ή εκχυλίσματα ανθρωπίνων πρωτεϊνών [321]. Το πιο αντιγόνο πρέπει να χρησιμοποιείται στη μελέτη της απάντησης των Τ λεμφοκυττάρων, αλλά και των αντισωμάτων κατά της PDC-E2 δεν έχει αποσαφηνιστεί. Αναπάντητα παραμένουν επίσης τα ακόλουθα ερωτήματα: Είναι σωστό να χρησιμοποιείται η ζωική PDC-E2, παρόλο που η πρωτεΐνη είναι υψηλά συντηρημένη κατά τη διάρκεια της εξέλιξης μεταξύ των ειδών; Πόσο καθαρά είναι τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται; Τα πεππίδια που χρησιμοποιούμε προκύπτουν και μετά από την επεξεργασία και παρουσίαση των αντιγόνων στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα; Πώς η λιπιδίωση (lipolyzation) της PDC-E2 επηρεάζει την ανοσολογική απόκριση; Η ανασυνδυασμένη PDC-E2 επιδέχεται την ίδια μεταμεταφραστική επεξεργασία όπως η PDC-E2 στα επιθηλιακά κύτταρα των μικρών χοληφόρων; Με βάσει αυτά τα δεδομένα η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των διαφόρων μελετών πρέπει να γίνεται με κριτικό βλέμμα εκτιμώντας τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της κάθε μεθόδου.

Σε βιοψίες ήπατος ασθενών με ΠΧΚ οι βλάβες στα πυλαία διαστήματα χαρακτηρίζονται από την παρουσία CD4⁺ TCRαβ⁺, CD8⁺ και NKT, ενώ στις διηθήσεις γύρω από τα πυλαία διαστήματα επικρατούν τα CD8⁺ λεμφοκύτταρα. Τα CD4⁺ λεμφοκύτταρα παράγουν τόσο IFN-γ όσο και IL-4, ενώ τα πρώτα φαίνεται ότι υπερέχουν, υποδεικνύοντας ότι τα Th1 κύτταρα είναι κυρίαρχα [288, 322]. Ανάλογες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει συσχέτιση της έκφρασης του mRNA της IFN-γ με το βαθμό της φλεγμονής στα πυλαία διαστήματα. Η IL-6 επίσης ανευρίσκεται στα πυλαία διαστήματα δείχνοντας ότι και τα Th2 λεμφοκύτταρα συμβάλλουν στη βλάβη [323].

Παρόλο που οι μελέτες μέχρι το 1990 έδειχναν ότι τα Τ λεμφοκύτταρα γύρω από τις βλάβες ήταν ολιγοκλωνικά εντούτοις δεν είχαν αναπτυχθεί αυτοδραστικές, αντιγονοειδικές Τ κυτταρικές σειρές από τη βλάβη [324, 325]. Το 1991 η Van de Water και συνεργάτες ανέπτυξαν αντιγονοειδικές Τ κυτταρικές σειρές που αντιδρούσαν με κεκαθαρμένη βόεια PDC-E2 ή BCOADC-2 από λεμφοκύτταρα που βρίσκονταν στο ήπαρ ασθενών με ΠΧΚ. Τα αυτοδραστικά Τ λεμφοκύτταρα ήταν CD4⁺, TCRαβ⁺ και παρήγαγαν IL-2 όταν διεγείρονταν με τα αντιγόνα [320]. Σε αυτή τη μελέτη

αναπτύχθηκαν επίσης αυτοδραστικοί CD4+ T λεμφοκυτταρικοί κλώνοι από το περιφερικό αίμα που επίσης αναγνώριζαν το ίδιο αντιγόνο. Επιπλέον, ανιχνεύτηκε T κυτταρική αντίδραση στο έξω λιποϊκό τμήμα της PDC-E2 σε ποσοστό 54% και 36% στο έσω λιποϊκό τμήμα της βοείας PDC-E2.

Την ίδια χρονιά περιγράφηκε από μια άλλη ερευνητική ομάδα η δημιουργία έξι CD4+ T κυτταρικών κλώνων που αναγνώριζαν μια αλληλουχία 14 αμινοξέων της PDC-E2 που αντιστοιχούσε στο έσω λιποϊκό τμήμα της PDC-E2 [88]. Η ομάδα αυτή σχεδίασε 33 πεπτίδια που κάλυπταν το μεγαλύτερο μέρος της PDC-E2 και με αυτά διέγειραν τα περιφερικά λεμφοκύτταρα 13 Ιαπώνων ασθενών με ΠΧΚ (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Παρουσίαση των πεπτιδίων με τα οποία διεγέρθηκαν τα περιφερικά λεμφοκύτταρα 13 ασθενών με ΠΧΚ που μελετήθηκαν, οι δεξαμενές στις οποίες χωρίστηκαν και η αντιστοιχία τους με την πρωτεΐνη PDC-E2 [88].

Τα πεπτίδια χωρίστηκαν σε 7 ομάδες και τα περιφερικά λεμφοκύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία τους για διάστημα 2 εβδομάδων. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ως απόκριση στη διέγερση με τα αντιγόνα εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της μέτρησης πρόσληψης ραδιενεργούς θυμιδίνης. T κυτταρική ανοσολογική απόκριση ανιχνεύτηκε σε 3 από τις 7 δεξαμενές πεπτιδίων. Χρησιμοποιώντας αυτές τις τρεις δεξαμενές πεπτιδίων και καλλιεργώντας τα λεμφοκύτταρα για έξι εβδομάδες αναπτύχθηκαν 6 κυτταρικοί κλώνοι από τέσσερις ασθενείς που αντιδρούσαν στα πεπτίδια της τρίτης δεξαμενής. Μετά από μελέτη της ειδικότητας αυτών των κλώνων βρέθηκε ότι η αλληλουχία 163-176 (GDLLAEIETDKATI) της πρωτεΐνης ήταν αυτή που αναγνωριζόταν από τους T κυτταρικούς κλώνους και αντιστοιχούσε στο έσω λιποϊκό τμήμα της PDC-E2. Όλοι αυτοί οι κυτταρικοί κλώνοι αναστέλλονταν από την παρουσία αντισωμάτων κατά του κλάσης II HLA μορίου DR53. Σε αυτή την αλληλουχία τα αμινοξέα που ήταν απαραίτητα για την αναγνώριση του πεπτιδίου ήταν τα E, D, και K στις θέσεις 170, 172, and 173 αντίστοιχα.

Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι το πεπτιδίο 163-176 περιέχει και αλληλουχίες που μπορούν να παρουσιαστούν από τα HLA DR1, DR3, DR7 και DR8. Όλοι οι κλώνοι επίσης αντιδρούσαν με το πεπτιδίο 36-49 (GDLIAEVETDKAT), που επίσης περιέχει την αλληλουχία ExDK [88]. Σε μεταγενέστερη μελέτη αποδείχθηκε ότι αυτοί οι κυτταρικοί κλώνοι αντιδρούσαν και με ολόκληρη την κεκαθαρμένη πρωτεΐνη PDC-E2 γεγονός που δείχνει ότι αυτός ο επίτοπος ή άλλες αλληλουχίες της πρωτεΐνης με παρόμοια στερεοτακτική δομή μπορούν να επεξεργαστούν από τα αυτόλογα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν [326]. Οι κυτταρικοί αυτοί κλώνοι διεγέρθηκαν και με άλλα πεπτιδία με παρόμοια αλληλουχία πεπτιδίων που περιείχαν ή όχι την αλληλουχία ExDK. Ένας από τους έξι αυτούς κλώνους αντέδρασε με πεπτιδίο από την PDC-E2 της *E. coli* που περιέχει την αλληλουχία ExDK ενώ κανένα από αυτούς δεν αντέδρασε με πεπτιδίο που προερχόταν από την BCOADC *P. putida* και που περιείχε την ExDK αλληλουχία. Κανένας επίσης κλώνος δεν αντέδρασε με πεπτιδία από φωσφορυλάση β του γλυκογόνου και πεπτιδία από την α αλυσίδα μορίων DR που μοιράζονται κοινές αλληλουχίες με το πεπτιδίο 163-176 αλλά δεν περιέχουν την αλληλουχία ExDK [88]. Ενδιαφέροντα είναι τα παρακάτω στοιχεία που προκύπτουν από την εν λόγω μελέτη: Το γεγονός ότι μόνο σε 4 από τους 13 ασθενείς αναπτύχθηκαν κυτταρικοί κλώνοι κατά του συγκεκριμένου πεπτιδίου, ότι ενώ υπήρχε κυτταρική αντίδραση σε 3 από τις 7 δεξαμενές πεπτιδίων τελικά κλώνοι αναπτύχθηκαν σε μόλις μια από τις τρεις σειρές καλλιέργειών και ότι όλοι οι κλώνοι αναγνωρίζουν το πεπτιδίο που περιγράφηκε μέσα από το DR53 HLA μόριο. Τα ερωτήματα που αβίαστα τίθενται είναι: α) Ποια είναι τα αντιγόνα στόχοι στους υπόλοιπους 9 από 13 ασθενείς που μελετήθηκαν; β) Γιατί ενώ αναγνωρίζονται περισσότερες από μια περιοχές της πρωτεΐνης τελικά τεκμηριώθηκε αντιδραστικότητα κατά μιας περιοχής; γ) Τι συμβαίνει στους ασθενείς με ΠΧΚ που έχουν HLA αλληλία διαφορετικά από το DR53;

Θα πρέπει κανείς να λάβει υπόψη ότι οι αυτοδραστικοί κλώνοι στη μελέτη που περιγράφηκε πιο πάνω απομονώθηκαν από το περιφερικό αίμα των ασθενών, ενώ η νόσος εντοπίζεται στο ήπαρ. Κλώνοι Τ λεμφοκυττάρων που αναγνωρίζουν ίδια και ξένα αντιγόνα βρίσκονται φυσιολογικά στο ρεπερτόριο των Τ λεμφοκυττάρων σε όλους τους ανθρώπους και δε θα θεωρούσε παράξενο κανείς αν αυτοδραστικοί κλώνοι απομονώνονταν και από μη νοσούντες μάρτυρες. Σε μετέπειτα μελέτη που έγινε από τους ίδιους ερευνητές, Τ κυτταρικοί κλώνοι απομονώθηκαν από το αίμα, το ήπαρ και τους πυλαίους λεμφαδένες από ασθενείς με ΠΧΚ και μάρτυρες και εξετάστηκε η συχνότητα εμφάνισης τους στους εν λόγω ιστούς [326]. Τα αυτοδραστικά κύτταρα

βρίσκονταν σε μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς (εκτός από αυτούς με τελικού σταδίου νόσο) σε σχέση με τους μάρτυρες. Αυτές οι διαφορές εμφάνισης ειδικών για το νόσημα αυτοδραστικών κλώνων βρέθηκαν και στην πολλαπλή σκλήρυνση όπου φάνηκε η μετανάστευση των αυτοδραστικών κλώνων από το αίμα στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα [327]. Τα αυτοδραστικά κύτταρα βρίσκονταν σε μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς (εκτός από αυτούς με τελικού σταδίου νόσο) σε σχέση με τους μάρτυρες. Αυτές οι διαφορές εμφάνισης ειδικών για το νόσημα αυτοδραστικών κλώνων βρέθηκαν και στην πολλαπλή σκλήρυνση όπου τεκμηριώθηκε η μετανάστευση των αυτοδραστικών κλώνων από το περιφερικό αίμα στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα.

Οι TCRs φαίνεται να μην είναι ειδικοί για ένα και μοναδικό πεππίδιο αλλά εμφανίζουν διασταυρούμενη αντιδραστικότητα σε πολλαπλά πεππίδια που μοιράζονται κοινά αμινοξέα ή έχουν παρόμοια τρισδιάστατη δομή με αποτέλεσμα το ρεπερτόριο των T λεμφοκυττάρων που απαιτείται για να αναγνωρίζεται πρακτικά κάθε παθογόνο που εισβάλλει εντός του οργανισμού να μειώνεται αριθμητικά [328-330].

Σε μια μελέτη, T κυτταρικοί κλώνοι που αναγνώριζαν το πεππίδιο 163-176 (GDLLAEIETDKATI) από ασθενείς με ΠΧΚ και μάρτυρες διεγέρθηκαν με παρόμοια με τον περιγραφόμενο επίτοπο πεππίδια μόνο που στην αλληλουχία τους είχε αντικατασταθεί ένα αμινοξύ [331]. Οι CD4+T κυτταρικοί κλώνοι από τους ασθενείς με ΠΧΚ μπορούσαν να διακριθούν σε δύο ομάδες ανάλογα με το μοτίβο των αμινοξέων που ήταν απαραίτητα για την σύνδεση με τον TCR και την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων. Αυτά ήταν τα 170ExDK173 και 168EIExD172 με όπου x είναι ένα τυχαίο αμινοξύ. Το γλουταμινικό οξύ (E) στη θέση 170 ήταν το πλέον απαραίτητο για τη σύνδεση των πεπτιδίων στον TCR και στις δύο ομάδες κλώνων ενώ η λευκίνη (K) στη θέση 173 και το γλουταμινικό οξύ (E) στη θέση 168 ήταν απαραίτητα για τη σύνδεση των πεπτιδίων με τον TCR στην ομάδα των κλώνων που αναγνώριζαν τα μοτίβα ExDK και EIExD αντίστοιχα. Οι κλώνοι της πρώτης ομάδας που αναγνώριζαν το μοτίβο ExDK αντιδρούσαν επίσης και με τα πεππίδια 34-47 της E3BP, 100-113 OGDC-E2 και διάφορα πεππίδια από μικρόβια που περιείχαν την αλληλουχία ExDK. Οι κλώνοι της δεύτερης ομάδας που αναγνώριζαν το μοτίβο EIExD αντιδρούσαν μόνο με το πεππίδιο 34-47 της E3BP που περιείχε το EIExD μοτίβο. Σε μια παρόμοια μελέτη, επτά κυτταρικοί κλώνοι από 5 ασθενείς με ΠΧΚ και έξι κλώνοι από μάρτυρες που δημιουργήθηκαν μετά από επαναλαμβανόμενη καλλιέργεια με περιγραφόμενο επίτοπο και διεγέρθηκαν με 30 πεππίδια από ανθρώπινες και μικροβιακές πρωτεΐνες που περιείχαν την αλληλουχία ExDK [142]. Επτά πεππίδια από διαφορετικούς μικροβιακούς παράγοντες αντιδρούσαν

με τουλάχιστον ένα κυτταρικό κλώνο όπου όλοι είχαν τη δομή LXaXXaExDKXaXXa με το X να είναι οποιοδήποτε πεπτίδιο και όπου a κάποιο από τα αλειφατικά πεπτίδια. Οι επτά κλώνοι από τους ασθενείς και δύο από τους έξι κλώνους από τους μάρτυρες αντιδρούσαν με τουλάχιστον ένα έως έξι πεπτίδια. Δύο από τους έξι κλώνους από τους μάρτυρες δεν αντιδρούσαν με κανένα πεπτίδιο ενώ οι άλλοι δύο αντιδρούσαν με κάποια πεπτίδια πιο ισχυρά από ότι οι κλώνοι που προέρχονταν από τους ασθενείς.

Ένα άλλο θέμα, το οποίο έχει υπάρξει αντικείμενο έρευνας είναι η παραγωγή των ANA στην ΠΧΚ. Από τις τρέχουσες θεωρίες επικρατέστερη είναι αυτή της διασταυρούμενης αντίδρασης μεταξύ AMA και ANA.

Σε μια μελέτη που είχαν επιλέχθει 6 T κυτταρικοί κλώνοι μετά από διέγερση περιφερικών λεμφοκυττάρων από ασθενείς με ΠΧΚ με τον προηγούμενα περιγραφόμενο επίτοπο 163-176 (GDLLAEIETDKATI) της PDC-E2, αναλύθηκε η αντιδραστικότητά τους έναντι πεπτιδίων με παρόμοια αλληλουχία με μιτοχονδριακά και πυρηνικά αντιγόνα της ΠΧΚ [332]. Αυτοί οι κλώνοι παρουσίαζαν διασταυρούμενη αντιδραστικότητα κατά ενός πεπτιδίου από έκαστες τις πρωτεΐνες PDC-E2 (πεπτίδιο 163-176), BCOADC-E2 (πεπτίδιο 90-103), OGDC-E2 (πεπτίδιο 100-113), και E3BP (πεπτίδιο 34-47). Και οι έξι κλώνοι παρουσίαζαν αντιδραστικότητα κατά πέντε πεπτιδίων της gp210 και ενός από την sp100. Αυτά τα αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ της συμβολής της μοριακής μίμησης μεταξύ μιτοχονδριακών και πυρηνικών αντιγόνων για την ανάπτυξη της ανοσολογικής απάντησης κατά των αντιγόνων αυτών, χωρίς όμως η μελέτη να είναι ικανή να εισαγάγει εντός των συμπερασμάτων την έννοια του πρωθύστερου.

Η αντιδραστικότητα που παρουσίαζαν οι ειδικοί για τον επίτοπο 163-176 (GDLLAEIETDKATI) της PDC-E2 κλώνοι κατά των άλλων μιτοχονδριακών αντιγόνων σε συνδυασμό με την εμπλοκή των ουρολοιμώξεων στην παθογένεια της ΠΧΚ, οδήγησε τους ερευνητές να εξετάσουν και το αντίθετο. Έτσι έπρεπε να ερευνηθεί κατά πόσο η δημιουργία αυτοδραστικών κλώνων έναντι μιτοχονδριακών αντιγόνων βακτηριακής προέλευσης θα αντιδρούσε με τον επίτοπο της PDC-E2.

Για να απαντηθεί το παραπάνω ερώτημα οι Miyakawa και συνεργάτες δημιούργησαν 16 κλώνους ειδικούς για το πεπτίδιο 34-47 της OGDC-E2 του βακτηριδίου *E. coli* από μονοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με ΠΧΚ [143]. Από τους κλώνους αυτούς οι τρεις αντιδρούσαν μόνο με το πεπτίδιο 34-47 της OGDC-E2 του βακτηριδίου *E. Coli*, ενώ οι άλλοι 13 κλώνοι αντιδρούσαν με τα ανθρώπινα αντιγόνα των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που ήταν τα πεπτίδια 163-176 της PDC-E2, 34-47 της E3BP, 100-113 της ODGC-E2 και 90-103 της BCOADC-E2 [143].

Η παρουσία των AMA στην ΠΧΚ ήταν το έναυσμα για τη μελέτη της κυτταρικής ανοσίας κατά των μιτοχονδριακών αντιγόνων. Τα AMA ανευρίσκονται σε ποσοστό 90-95% ανάμεσα στους ασθενείς με ΠΧΚ. Κατά πόσο ανιχνεύεται κυτταρική αντίδραση έναντι μιτοχονδριακών αντιγόνων σε ασθενείς με ΠΧΚ με αρνητικά AMA είναι ευνόητο ερώτημα. Στα πλαίσια αυτά μια εργασία θέλησε να ερευνήσει τη συχνότητα της ύπαρξης αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων που αντιδρούσαν στον επικρατούντα επίτοπο της PDC-E2 163–176 τόσο σε AMA θετικούς όσο και σε AMA αρνητικούς ασθενείς με ΠΧΚ [87]. Μετά από διαδοχικές αραιώσεις και διέγερση με το πεππίδιο-αντιγόνο, μετρήθηκε η παραγωγή IFN- γ , IL-10 και IL-4. Βρέθηκε ότι και οι δύο κατηγορίες ασθενών είχαν CD4+ αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα στην περιφέρεια. Επομένως, η αντιδραστικότητα κατά των μιτοχονδριακών αντιγόνων στους ασθενείς με ΠΧΚ μάλλον θα πρέπει να θεωρείται καθολικό φαινόμενο της νόσου.

Τα Τ λεμφοκύτταρα που απελευθερώνονται από το θύμο έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν πολλούς αντιγονικούς τόπους, ενίοτε και αντιγονικές δομές του ίδιου του οργανισμού και δεν προκαλεί έκπληξη η ύπαρξη στο περιφερικό αίμα λεμφοκυττάρων που είναι εν δυνάμει αυτοδραστικά [333]. Ο ρόλος της περιφερικής ανοχής μέσω συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών είναι καλά τεκμηριωμένος και αποτελεί το ανάχωμα για την ανάπτυξη αυτοανόσων φαινομένων από αυτοδραστικούς κλώνους που έχουν ξεφύγει της κεντρικά ρυθμιζόμενης ανοχής, η οποία επιτελείται στο θύμο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ρεπερτορίου των Τ λεμφοκυττάρων [334-336]. Από μελέτες που έχουν γίνει σε αυτοδραστικούς Τ κυτταρικούς κλώνους στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου Ι και στην πολλαπλή σκλήρυνση έχει βρεθεί ότι οι κλώνοι που αναπτύσσονται από αυτούς τους ασθενείς έχουν διαφορετικές λειτουργικές ιδιότητες από τους κλώνους που αναπτύσσονται με τα ίδια αντιγόνα από υγιείς μάρτυρες [337-339]. Παρόμοια μελέτη έχει πραγματοποιηθεί και στην ΠΧΚ όπου εκτιμήθηκαν κλώνοι ειδικοί για το πεππίδιο 163-176 της PDC-E2 και μονοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών και υγιών μαρτύρων όταν αυτά συγκαλλιεργούνταν με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ικανά ή όχι να παρέχουν συνδιεγερτικά σήματα [340]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος που προέρχονταν από ασθενείς με ΠΧΚ παρήγαγαν IFN- γ ανεξάρτητα από το είδος των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ κάτι ανάλογο δεν παρατηρήθηκε στους μάρτυρες. Ένα σημαντικό ποσοστό μονοκυττάρων περιφερικού αίματος από υγιείς μάρτυρες παρήγαγε IFN- γ , υπό την παρουσία αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων ικανών να παρέχουν συνδιεγερτικά σήματα. Επιπλέον, οι κλώνοι που είχαν παραχθεί από μάρτυρες και είχαν

καλλιεργηθεί παρουσία αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων που δεν παρείχαν συνδιεγερτικά σήματα ήταν ανενεργοί και παρήγαγαν IL-10 αλλά όχι IFN- γ . Είχαν επίσης ρυθμιστικές ιδιότητες κατά τρόπο ανεξάρτητο από την παρουσία αντιγόνου, ανεξάρτητο από την επαφή κυττάρου με κύτταρο και μερικώς μεσολαβούμενο από την παραγωγή από αυτούς της IL-10. Συνοψίζοντας, η μελέτη αυτή έδειξε ότι οι κυτταρικοί κλώνοι που αναπτύσσονται από τους ασθενείς με ΠΧΚ είχαν φλεγμονώδεις ιδιότητες ενώ αυτοί που αναπτύσσονται από υγιείς μάρτυρες είχαν ρυθμιστικές ιδιότητες [340].

2.5.2.2 Αυτοαντιδραστικά CD8+ T λεμφοκύτταρα

Ο προσδιορισμός του επίτοπου σε επίπεδο κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων στην ΠΧΚ ήταν ένα σημαντικό βήμα τόσο για την κατανόηση της παθογένειας της νόσου όσο και του μηχανισμού με τον οποίο διαταράσσεται η ανοσολογική ανοχή κατά του αντιγόνου όσο και για την προοπτική που αυτό έδινε για ανάπτυξη νέων θεραπειών. Οι Kita και συνεργάτες περιέγραψαν για πρώτη φορά το πεπτίδιο της PDC-E2₁₅₉₋₁₆₇ που παρουσιαζόταν μέσω των μορίων του τάξης I MHC και που ήταν κοινός αντιγονικός τόπος και για τα CD4+ λεμφοκύτταρα και για τα αντισώματα [86].

Στη μελέτη αυτή το συγκεκριμένο πεπτίδιο οδήγησε στην ανάπτυξη CD8+T λεμφοκυτταρικών κλώνων σε 10 από τους 12 ασθενείς με ΠΧΚ με HLA-A2 MHC I αλληλίο αλλά σε κανένα από τους υγιείς μάρτυρες όταν συγκαλλιεργούνταν με περιφερικά λεμφοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα διεγερόμενα με το αντιγόνο. Τα ειδικά για το πεπτίδιο PDC-E2₁₅₉₋₁₆₇ CD8+ T λεμφοκύτταρα είχαν κυτταροτοξική δράση έναντι κυττάρων στόχων που επάγονται με το πεπτίδιο όπως και κυττάρων που μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένο ιό που εκφράζει την PDC-E2 [86].

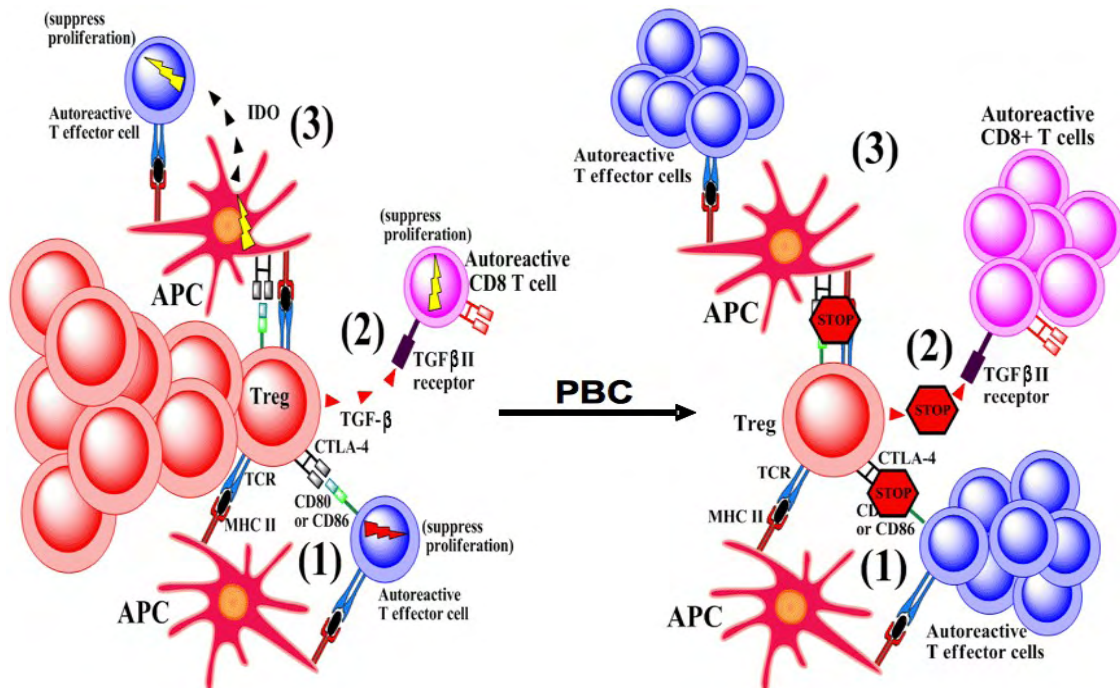
Τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα φαίνεται ότι έχουν σημαντική θέση και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα [341-343]. Σε διάφορες μελέτες έχει βρεθεί ότι αντιγονοειδικά κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα συσσωρεύονται στα σημεία της βλάβης σε διάφορες αυτοάνοσες καταστάσεις [327, 344, 345]. Όταν συγκρίθηκε η ύπαρξη PDC-E2₁₅₉₋₁₆₇ ειδικών αυτοδραστικών T λεμφοκυττάρων στο ήπαρ και στο αίμα των ασθενών με ΠΧΚ με τετραμερή, βρέθηκε ότι αυτά βρίσκονταν σε 10-πλάσια συχνότητα στο ήπαρ σε σχέση με το αίμα αλλά παρουσίαζαν ετερογένεια ως προς την παραγωγή IFN- γ [346]. Η συχνότητα των κυττάρων αυτών στο αίμα ήταν μεγαλύτερη στα αρχικά στάδια της νόσου. Τα ευρήματα αυτά είναι συμβατά και με το τι συμβαίνει σε επίπεδο CD4+ ειδικών αυτοδραστικών T λεμφοκυττάρων [326] όπως περιγράφεται και στην αντίστοιχη παράγραφο (Παράγραφος 2.5.2.1 Γενικού Μέρους).

Εκτός από ένα συγκεκριμένο πεπτίδιο που παρουσιάζεται από MHC μόρια, τα κυτταροτοξικά αλλά και τα CD4+ αντιγονοειδικά T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν και άλλα πεπτίδια με παρόμοια αλληλουχία. Ορισμένα από αυτά έχουν την ιδιότητα όταν συνδέονται με τους TCR να αλλάζουν τη λειτουργία τους ή ακόμη και να προκαλούν ανεργία [347-353]. Τέτοια πεπτίδια με αντικατάσταση ενός αμινοξέος με αλανίνη χρησιμοποιήθηκαν για να διερευνηθούν πιθανές αλλαγές που μπορεί να προκληθούν στους αυτοδραστικούς T λεμφοκυτταρικούς κλώνους [354]. Η αντικατάσταση στη θέση 5 του αμινοξέος PDC-E2 159-167 βρέθηκε ότι προκαλούσε μείωση της δραστηριότητας των αυτοδραστικών κλώνων συμπεριλαμβανομένης της κυτταροτοξικότητας και της παραγωγής IFN-γ. Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν την προοπτική θεραπευτικής χορήγησης πεπτιδίων παρόμοιων με τον κύριο επίτοπο (altered peptide ligands) με σκοπό να μεταβληθεί η CD8+ T κυτταρική απόκριση.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι τα αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα αναγνωρίζαν και πεπτίδια που προέρχονταν από πρωτεΐνες της *Pseudomonas aeruginosa* ενισχύοντας το ρόλο της μοριακής μίμησης στην παθογένεια της νόσου [86].

2.5.2.3 T ρυθμιστικά κύτταρα (T regulatory cells)

Τα CD4+CD25+FoxP3+ T λεμφοκύτταρα είναι ένας ιδιαίτερος υπότυπος των CD4+ T λεμφοκυττάρων που εκφράζουν στην επιφάνειά τους υψηλές συγκεντρώσεις CD25 μορίων και φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής στην περιφέρεια και την πρόληψη των αυτοανόσων αποκρίσεων. Αυτά τα CD4+CD25^{high} κύτταρα που εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα FoxP3 ονομάζονται T ρυθμιστικά κύτταρα (T regulatory cells –Tregs). Η δράση αυτών των κυττάρων συνοψίζεται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6. Μηχανισμοί δράσεις των CD4+CD25+ Tregs. Τα Tregs καταστέλλουν τα αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα. Τα Tregs και τα δραστικά T λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν μέσω των μορίων CTLA-4 και CD80 ή CD86 αντίστοιχα (οδός 1) οδηγώντας σε ένα ενδοκυττάριο σήμα που έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της δυνατότητας πολλαπλασιασμού των αυτοδραστικών κυττάρων. Τα Tregs παράγουν επίσης TGF-β που προσδέεται στο μεμβρανικό υποδοχέα TGFβII των CD8+ T λεμφοκυττάρων (οδός 2). Το ενδοκυττάριο σήμα που παράγεται καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών. Τα Tregs αλληλεπιδρούν επίσης με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) μέσω των μορίων CD80 ή CD86 και CTLA-4 αντίστοιχα με αποτέλεσμα τα τελευταία να εκκρίνουν την ουσία IDO (indoleamine 2,3 deoxygenase) η οποία οδηγεί τοπικά σε καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης ως αποτέλεσμα της ελάττωσης της τρυπτοφάνης και της παραγωγής μεταβολιτών που επάγουν απόπτωση (οδός 3). Στην ΠΧΚ και οι τρεις αυτοί μηχανισμοί φαίνεται να είναι ελλειματικοί ως αποτέλεσμα της μειωμένης παρουσίας των Tregs σε ασθενείς με ΠΧΚ και χωρίς να υπάρχει λειτουργική ανεπάρκεια των Tregs.

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος των Tregs στην παθογένεια της ΠΧΚ μελετήθηκαν 91 ασθενείς, 28 συγγενείς πρώτου βαθμού και 41 υγιείς μάρτυρες [90]. Η συχνότητα των CD4+CD25^{high} T λεμφοκυττάρων προσδιορίστηκε ανάμεσα στα CD4+, TCRαβ+ T λεμφοκύτταρα. Η συχνότητα των Tregs ήταν ελαττωμένη στους ασθενείς με ΠΧΚ συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες. Είναι ενδιαφέρον ότι ελαττωμένη ήταν και η συχνότητα των Tregs τόσο στις αδελφές όσο και στις κόρες των ασθενών με ΠΧΚ όταν συγκρίνονταν με τους υγιείς μάρτυρες [90]. Στην ίδια μελέτη, στην οποία συμπεριλήφθηκαν 52 ασθενείς με ΠΧΚ, 30 με χρόνια ηπατίτιδα C και 8 με ΑΗ, έγινε προσπάθεια καθορισμού της συχνότητας των FoxP3+ Tregs στο ηπατικό παρέγχυμα. Στους ασθενείς με ΠΧΚ η συχνότητα των FoxP3+ Tregs στα πυλαία διαστήματα ήταν σημαντικά ελαττωμένη σε σχέση με τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C και ΑΗ [90]. Στα όψιμα στάδια της ΠΧΚ ο λόγος CD8+/Tregs στις βιοψίες ήπατος είναι υψηλότερος σε σχέση με τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C και τους ασθενείς με πρώιμες μορφές ΑΗ [90]. Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ πασχόντων και μαρτύρων ως προς τη λειτουργική ικανότητα των Tregs [90]. Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι ο αριθμός των FoxP3+Tregs στα φλεγμαίνοντα πυλαία διαστήματα δεν ήταν μειωμένος στους ασθενείς με ΠΧΚ [355]. Τα FoxP3+Tregs δεν παρουσίαζαν λειτουργική βλάβη και τα επίπεδα mRNA των FoxP3, IL-10 και TGF-β στα κύτταρα αυτά ήταν υψηλότερα στους ασθενείς με ΠΧΚ σε σχέση με τους μάρτυρες [355]. Έχει επίσης διαπιστωθεί διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των Th17 και των Tregs στους ασθενείς με ΠΧΚ. Η παραγωγή των Th17 σε βάρος των Tregs και ο αυξημένος λόγος Th17/Tregs και των κυτταροκινών τους χαρακτήριζαν τους ασθενείς με ΠΧΚ όταν αυτοί συγκρίνονταν με παθολογικούς και υγιείς μάρτυρες [356].

Παράλληλα με την ύπαρξη των CD4+ Tregs υπάρχει και ένας άλλος πληθυσμός ρυθμιστικών κυττάρων που εκφράζουν στην επιφάνεια τους το μόριο CD8+ χωρίς όμως να εκφράζουν το συνδιεγερτικό μόριο CD28 [357]. Αυτά τα CD8+CD28- Tregs έχουν μελετηθεί και στην ΠΧΚ και βρέθηκε ότι εκφράζουν μεγάλες συγκεντρώσεις CD127 ενώ παρουσίαζαν και ελαττωμένη έκφραση του μορίου CD39 [357]. Τα κύτταρα αυτά ενώ ανιχνεύονταν σε συγκρίσιμους αριθμούς στους ασθενείς με ΠΧΚ σε σχέση με τους μάρτυρες, εντούτοις δεν ήταν λειτουργικά και παρουσίαζαν ελαττωμένη κατασταλτική δράση [357]. Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα που εμπλέκουν τα Tregs στην παθογένεια της ΠΧΚ περιγράφονται αναλυτικότερα στο Κεφάλαιο 2.6.

2.6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΠΧΚ

Συχνά διάφοροι πρακτικοί και ηθικοί φραγμοί προκύπτουν στη μελέτη της παθογένειας των ασθενειών και ως προς αυτό η ΠΧΚ δε θα μπορούσε να αποτελέσει εξαίρεση. Η αδυναμία της εξεύρεσης ασθενών στα πολύ πρώιμα στάδια της νόσου, η δημογραφική ετερογένεια της νόσου, η ετερογένεια του γενετικού υποστρώματος ανάμεσα στους ασθενείς, οι περιορισμοί πρόσβασης σε βιολογικά υλικά και ιστούς και τέλος η ετερογένεια του σταδίου της νόσου ανάμεσα στους ασθενείς καθιστούν τη μελέτη πειραματικών ζωικών μοντέλων απαραίτητη.

Διάφορα μοντέλα έχουν προταθεί ως πειραματικά μοντέλα της ΠΧΚ και υπάρχουν κάποια που αναπτύσσουν αυτόματα νόσο ενώ σε άλλα η νόσος επάγεται μετά από πειραματικούς χειρισμούς. Ωστόσο, κανένα μοντέλο μέχρι αυτή τη στιγμή δεν μπόρεσε να αναπαράγει όλα τα χαρακτηριστικά της ΠΧΚ. Η ύπαρξη μη πυώδους χολαγγειίτιδας και/ή η ύπαρξη ορολογικών χαρακτηριστικών της ΠΧΚ όπως τα AMA, τα ειδικά για τη νόσο ANA, η ALP και η χολόσταση είναι κάποια από τα χαρακτηριστικά που αξιολογούνται για να καθοριστεί αν ένα πειραματικό μοντέλο αποτελεί μοντέλο της ΠΧΚ. Σε αυτό το κεφάλαιο και μετά από μια σύντομη ιστορική αναδρομή θα αναφερθούμε στα κυριότερα μοντέλα που εμπλέκονται στην συμβολή της Τ κυτταρικής ανοσίας στην παθογένεια της ΠΧΚ.

Για πρώτη φορά οι Tison και συνεργάτες περιέγραψαν την αυτόματη ανάπτυξη μη πυώδους χολαγγειίτιδας σε κουνέλια από την Faenza, περιοχή της Ιταλίας [358]. Τα μισά από αυτά τα ζώα εμφάνισαν AMA αλλά δεν είχαν την ειδικότητα του επίτοπου που παρουσιάζουν τα AMA στην ΠΧΚ. Αυτό το μοντέλο δε χρησιμοποιήθηκε ξανά και παρουσιάζει σήμερα μόνο ιστορικό ενδιαφέρον.

Το 1989 περιγράφηκαν ποντίκια C57B1/6 που ανέπτυσαν μη πυώδη χολαγγειίτιδα [359]. Φλεγμονώδης αντίδραση και εκτός χοληφόρων επίσης περιγράφηκε σε αυτά τα ποντίκια. Ο ρόλος των Th1 κυτταροκινών στην επαγωγή της αυτοανοσίας φάνηκε μετά από τη χορήγηση του polyinosinic polycytidylic οξέος (poly I:C) στα θηλυκά C57BL/6 ποντίκια. Το poly I:C προάγει την παραγωγή των τύπου 1 ιντερφερονών με αποτέλεσμα την επαγωγή αυτοάνοσης χολαγγειίτιδας σε αυτά τα ποντίκια [360].

Τα ποντίκια NOD.c3c4 αναπτύσσουν αυτόματα αυτοάνοση νόσο των χοληφόρων και αυτοαντισώματα κατά της PDC-E2 τα οποία είναι ειδικά για το έσω λιποϋλικό τμήμα της πρωτεΐνης [361]. Αντίθετα με την ΠΧΚ, προσβάλλονται τόσο τα ενδοηπατικά όσο και τα

εξωηπατικά τμήματα του χοληφόρου δένδρου. Αυτές οι περιοχές χαρακτηρίζονται από διήθηση από CD3+CD4+ και CD3+CD8+ T λεμφοκύτταρα. Η θεραπεία των ποντικών NOD.c3c4 με αντι-CD3 μονοκλωνικά αντισώματα φαίνεται ότι προστατεύει τα ποντίκια από την ανάπτυξη της νόσου και μειώνει τον αριθμό των CD69+ T λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, η μεταφορά των κυττάρων του σπλήνα ή CD4+ T κυττάρων από αυτά τα ποντίκια σε υγιή ποντίκια επάγει τη νόσο εμπλέκοντας τα T λεμφοκύτταρα στην παθογένεια της νόσου [361].

Οι Kanda και συνεργάτες μελέτησαν τα ποντίκια C57BL/6NC η και βρήκαν χρόνια μη πυώδη χολαγγειίτιδα στο 23% αυτών [362]. Οι βλάβες χαρακτηρίζονταν από στρογγυλές κυτταρικές διηθήσεις γύρω από τις πυλαίες περιοχές και τα CD8+ T λεμφοκύτταρα συχνά δημιουργούσαν ευρείες ζώνες γύρω από τα επιθηλιακά κύτταρα [362]. Τα ποντίκια με έλλειψη του Fas (Fas-deficient MRL/MP-lpr/lpr ή MRL/lpr) αναπτύσσουν σοβαρά αυτοάνοσα νοσήματα. Σε αυτό το μοντέλο η πυλαία διήθηση συνδυάζεται με χολαγγειίτιδα των μικρών ενδοηπατικών χολαγγείων. Στις περιοχές της φλεγμονής έχουν περιγραφεί CD4+ T λεμφοκύτταρα. Τα CD8+ T λεμφοκύτταρα ήταν ή απόντα ή λίγα σε αριθμό. Σε τέτοιο μοντέλο έχουν ανιχνευτεί AMA με ανοσοφθορισμό σε HEp-2 υπόστρωμα.

Από την εποχή που έχει περιγραφεί η PDC-E2 ως το κύριο αντιγόνο στόχος στην ΠΧΚ πολλά ζώα εμβολιάστηκαν με την PDC σε μια προσπάθεια να διαπιστωθεί αν αναπτύσσουν μη πυώδη χολαγγειίτιδα. Κάποια ζώα ανέπτυξαν τίτλους AMA χωρίς να αναπτύξουν μη πυώδη χολαγγειίτιδα [236] ενώ σε κάποια άλλα η μη πυώδης χολαγγειίτιδα ήταν παρούσα [363]. Ο εμβολιασμός κάποιων ζώων με επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μη πυώδους χολαγγειίτιδας και αντισωμάτων έναντι των επιθηλιακών αυτών κυττάρων [364]. Είναι ενδιαφέρον ότι μεταφορά κυττάρων από το σπλήνα σε ζώα που δεν έτυχαν πειραματικών χειρισμών είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη μη πυώδους χολαγγειίτιδας και είχαν κυτταροτοξική δράση σε χολαγγειοκύτταρα αλλά όχι ηπατοκύτταρα σε καλλιέργειες. Σε ποντίκια A/J που αφερείτο ο θύμος σε νεογνική ηλικία (neonataly thymectomized -NTx- A/J mice) και εμβολιάζονταν με ενδοηπατικά χολαγγειοκύτταρα χοίρειας προέλευσης, αυτά ανέπτυσαν πυλαία φλεγμονή με παράλληλη ανίχνευση B και T λεμφοκυττάρων [365]. Τα επιθηλιακά κύτταρα στις βλάβες έκφραζαν στην επιφάνειά τους τάξης II MHC μόρια και 42% από αυτά τα ποντίκια παρήγαγαν AMA.

Τα διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία γίνεται απάλειψη γονιδίων (knockout mice) είναι συχνά ένα καλό εργαλείο για να μελετηθεί η δράση των εκφραζόμενων πρωτεϊνών σε

παθογενετικούς μηχανισμούς. Τέτοια μοντέλα έχουν χρησιμοποιηθεί και στην ΠΧΚ. Ποντίκια που δεν εκφράζουν την IL-2 (IL-2^{-/-}) διασταυρώθηκαν με BALB/c ποντίκια και οι γόνοι τους ανέπτυξαν αυτοάνοση πολυοργανοπάθεια συμπεριλαμβανομένης και της μη πυώδους χολαγγειίτιδας [366]. Η θεραπεία αυτών των ποντικίων με αντι-gr39 (CD40 ligand) αντισώματα είχε προστατευτική δράση καθώς η νόσος δεν εκδηλωνόταν. Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ότι η εμφάνιση ενεργοποιημένων CD4⁺ T λεμφοκυττάρων (CD44^{high}, CD69⁻) είναι η πρώτη αλλαγή στο ανοσολογικό σύστημα στα IL-2^{-/-} ποντίκια.

Η περιγραφή ενός παιδιού με ανεπάρκεια του υποδοχέα α της IL-2 (IL-2 receptor α, IL-2Rα) που εμφάνισε νόσο πολύ παρόμοια με την ΠΧΚ, οδήγησε τους Wakabayashi και συνεργάτες να αναπτύξουν IL-2Rα^{-/-} ποντίκια διασταυρώνοντας IL-2Rα^{+/-} ποντίκια μεταξύ τους [367]. Τα IL-2Rα^{-/-} ποντίκια ανέπτυξαν πυλαία φλεγμονή και βλάβη παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στην ΠΧΚ. Στις περιοχές της φλεγμονής τα CD4⁺ και τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα επικρατούσαν με ένα χαμηλό λόγο CD4\CD8. Σε αντίθεση με τις βλάβες στον άνθρωπο, ηωσινόφιλα και κοκκιώματα δεν παρατηρήθηκαν. Τα επίπεδα των κυτταροκινών που εκκρίνονται από τα Th1 CD4⁺ λεμφοκύτταρα όπως είναι οι IFN-γ, TNF-α, IL-2 and IL-12p40 ήταν αυξημένα. AMA ανιχνεύθηκαν σε όλα τα ποντίκια και ANA σε 80% από αυτών [367]. Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν τη συμβολή των Tregs στην παθογένεια της νόσου αλλά και στην αυτοανοσία γενικότερα. Προχωρώντας ακόμη παραπέρα, βρέθηκε ότι τα IL-2Rα^{-/-}-CD4^{-/-} ποντίκια αναπτύσσουν τη φλεγμονώδη νόσο των χολαγγείων, ενώ τα IL-2Rα^{-/-}-CD8^{-/-} φλεγμονώδη νόσο του εντέρου. Άλλο ενδιαφέρον στοιχείο είναι ότι τα IL-2Rα^{-/-}-TGFβ^{-/-} ποντίκια όπως και τα IL-2Rα^{-/-}-dnTGFβ^{RII} (dominant negative TGF-beta receptor type II - dnTGFβ^{RII}) ποντίκια δεν αναπτύσσουν τη νόσο.

Ο ρόλος των Tregs λεμφοκυττάρων, που διαφοροποιούνται, συντηρούνται και αναπτύσσουν τις λειτουργίες τους μέσω του μεταγραφικού παράγοντα forkhead box 3 (Foxp3) [368, 369], μελετήθηκε περαιτέρω μέσω των ποντικίων Scurfy. Τα ποντίκια Scurfy έχουν μια μετάλλαξη στο γονίδιο του Foxp3 και έχουν ελαττωματικά ή μειωμένα Tregs [370, 371]. Αυτά τα ποντίκια παρουσιάζουν ορολογικά και ιστολογικά ευρήματα όπως και προφίλ κυτταροκινών χαρακτηριστικά της ΠΧΚ. Αυξημένος είναι επίσης και ο αριθμός των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων. Καταστροφή των χολαγγείων έχει φανεί στο 90% αυτών των ποντικίων [372]. Υποστηρίζεται έτσι και με αυτό το μοντέλο ότι η απουσία των περιφερικών ρυθμιστικών κυττάρων, που συντηρούν την ανοσολογική ανοχή, επάγει την CD8⁺ διαμεσολαβούμενη φλεγμονώδη καταστροφή στα χοληφόρα.

Ένα άλλο ενδιαφέρον μοντέλο είναι ένα διαγονιδιακό ποντίκι που εκφράζει τον τύπου II υποδοχέα του TGF-β (dnTGFbetaRII) του οποίου ενώ το εξωκυττάριο τμήμα εκφράζεται κανονικά, το ενδοκυττάριο δεν υπάρχει με αποτέλεσμα να μη μεταφέρεται ενδοκυττάρια το σήμα όταν ο TGF-β συνδέεται στον υποδοχέα του. Αυτό το μοντέλο επεμβαίνει στο σηματοδοτικό μονοπάτι αλληλεπίδρασης των Tregs με τα T δραστικά κύτταρα μέσω της παραγωγής από τα πρώτα του TGF-β [373] ή μέσω της διέγερσης των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων για παραγωγή TGF-β [374]. Όλα αυτά τα ποντίκια παρήγαγαν AMA κατά των PDC-E2, BCOADC-E2 and OGDC-E2. Τα πυλαία διαστήματα είχαν φλεγμονώδεις διηθήσεις και τα T λεμφοκύτταρα ήταν αυτά που ανευρίσκονταν στα ποντίκια IL-2Rα^{-/-} με επιπλέον την παρουσία B λεμφοκυττάρων. Σε αυτά τα ποντίκια βρέθηκαν υψηλότεροι τίτλοι Th1 κυτταροκινών από ότι στους μάρτυρες. Μεταφορά CD8⁺ αλλά όχι CD4⁺ T λεμφοκυττάρων (τα οποία όταν μεταφέρονταν σε Rag1^{-/-} ποντίκια προκαλούσαν φλεγμονώδη νόσο του εντέρου) από dnTGFbetaRII σε Rag1^{-/-} ποντίκια (που δεν παράγουν CD8⁺ και CD4⁺ T λεμφοκύτταρα) προκάλεσε παθολογία στο ήπαρ παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στην ΠΧΚ προτείνοντας έτσι ότι τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα είναι αυτά που συμβάλλουν κυρίως στην καταστροφή των χολαγγείων [89].

Τα NKT είναι τα κύτταρα που γεφυρώνουν την αρχέγονη και την επίκτητη ανοσολογική απόκριση παρουσιάζοντας τόσο ανοσορρυθμιστικές όσο και δραστικές ιδιότητες [375, 376]. Τα NKT κύτταρα επάγονται προς φλεγμονώδεις ή αντιφλεγμονώδεις φαινοτύπους από τις κυτταροκίνες IL-12 or IL-10 αντίστοιχα, που παράγονται από τα δενδριτικά κύτταρα [377]. Σε μια μελέτη που χρησιμοποίησε το μοντέλο dnTGFbetaRII οι ερευνητές σε αυτά τα ποντίκια απάλειψαν το γονίδιο CD1d δημιουργώντας CD1d^{-/-}-dnTGFbetaRII ποντίκια με αποτέλεσμα να επέμβουν στην δράση των NKT λεμφοκυττάρων. Οι διηθήσεις στο ήπαρ ήταν εμφανώς μικρότερες και οι βλάβες ηπιότερες σε σχέση με τα CD1d^{+/-}-dnTGFbetaRII ποντίκια [298]. Ο ρόλος των NKT λεμφοκυττάρων είναι εμφανής μέσα από αυτό το μοντέλο και τα αποτελέσματα είναι συμβατά και με μια άλλη μελέτη όπου επάγεται αυτοάνοση χολαγγειίτιδα μετά από λοίμωξη [154].

2.7 ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΠΧΚ

Η απόπτωση είναι μια ενεργός διαδικασία μορφολογικών και βιοχημικών μεταβολών που οδηγούν προγραμματισμένα το κύτταρο στο θάνατο [378]. Τα αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα που πεθαίνουν στο θύμο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των λεμφοκυττάρων με μηχανισμούς απόπτωσης συνιστούν πηγές ιδίων αντιγόνων που

συμβάλλουν στην επιλογή μη αυτοδραστικών κλώνων [379]. Σε άλλες μελέτες φαίνεται ότι τα αποπτωτικά σωματίδια προσλαμβάνονται από τα δενδριτικά κύτταρα, επεξεργάζονται και παρουσιάζονται κατά τρόπο που επάγουν την περιφερική ανοσολογική ανοχή [380, 381] ενώ τέλος τα αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα που ξέφυγαν από τους μηχανισμούς της αρνητικής επιλογής στο θύμο πεθαίνουν στην περιφέρεια δια μέσου των μηχανισμών απόπτωσης [382]. Αυτά τα γεγονότα δείχνουν ότι η απόπτωση κατέχει, ως μηχανισμός, σημαντική θέση στην επαγωγή της ανοσολογικής ανοχής και ότι διαταραχές σε αυτές τις διαδικασίες μπορούν να επάγουν αυτοανοσία [383-386].

Σε πολλά αυτοάνοσα νοσήματα παραμένει μυστήριο πώς ενώ τα αυτοαντιγόνα στόχοι συνιστούν δομές που βρίσκονται εντός της κυτταρικής μεμβράνης, αυτά έρχονται σε επαφή με το ανοσολογικό σύστημα. Η παρατήρηση ότι μοριακές δομές που αποτελούν στόχους αυτοάνοσης φλεγμονώδους αντίδρασης βρίσκονται εντός των αποπτωτικών σωματιδίων καθιστούν τη διαδικασία της απόπτωσης πολύ ελκυστική για την εμπλοκή της στην παθογένεια των αυτοανόσων νοσημάτων [387]. Διαταραχές στην κάθαρση των αποπτωτικών σωματιδίων έχουν εμπλακεί στη έναρξη της παθογένειας της αυτοανοσίας [384, 388, 389].

Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης μέσω βιοχημικών διαδικασιών, που αποτελούν συστατικά στοιχεία της απόπτωσης, αλλάζει η δομή κάποιων ιδίων πρωτεϊνών γεγονός που τις καθιστά ικανές να επάγουν ανοσολογική απόκριση καθώς το ανοσολογικό σύστημα δεν ήρθε σε επαφή μαζί τους κατά τη διάρκεια της αρνητικής επιλογής. Μεταμεταφραστικές διαδικασίες που γίνονται στα αντιγόνα με τρόπο που αυτά να καθίστανται νεοεπίτοποι είναι η πρωτεόλυση (από κασπάσες ή το granzyme B), η φωσφορυλίωση ή η αποφωσφορυλίωση, η τρανσγλουταμίνωση ή η απαμίνωση [390]. Αντιστρόφως, οι διαδικασίες μεταβολής της δομής ιδίων πρωτεϊνών ενδεχομένως να συμβάλλει στην διάσπαση ή τη μεταβολή τους κατά τρόπο που αυτές χάνουν την αντιγονικότητά τους. Τα αυτοαντιγόνα κατά αυτό τον τρόπο διασπώνται από κασπάσες και ειδικές για την απόπτωση πρωτεάσες κυστεΐνης (apoptosis-specific cysteine proteases) [391, 392] και συγκεντρώνονται στα αποπτωτικά σωματίδια [387]. Οι μεταβολική επεξεργασία της PDC-E2 κατά την απόπτωση έχει μελετηθεί από τους Odín και συνεργάτες [393]. Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη, όπου χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα κατά της PDC-E2 σε πειράματα ανοσοφθορισμού, η PDC-E2 παρέμενε ανοσολογικά ενεργός μετά από την απόπτωση στα ΕΚΧ ενώ αυτό δεν συνέβει σε άλλες κυτταρικές σειρές. Επιπλέον η PDC-E2 δεν διασπώταν από τις κασπάσες ή το granzyme B αλλά η απώλεια της αντιγονικότητας της PDC-E2 οφειλόταν σε μια ομοιοπολική τροποποίηση

μιας σουλφιδικής ομάδας της PDC-E2 από τη γλουταθειόνη που σχημάτιζε ένα δισουλφίδιο. Η υπερέκφραση του Bcl-2 και η καταστολή της γλουταθειόνης πριν την επαγωγή της απόπτωσης συντηρούσαν την αναγνώριση της PDC-E2 από τα αντισώματα υποστηρίζοντας ότι η διαδικασία της δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ σουλφιδικών ομάδων (glutathiolation) παρά η αποδόμηση της PDC-E2 ήταν υπεύθυνη για την απώλεια του φθορισμού [393]. Σε μια άλλη μελέτη έχει φανεί ότι η PDC-E2 είναι ανοσολογικά ενεργής στα ΕΚΧ μετά την απόπτωση, βρίσκεται επί των αποπτωτικών σωματιδίων και αναγνωρίζεται από τα AMA [394]. Ο μηχανισμός όμως που μεταφέρει την PDC-E2 στη μεμβράνη δεν έχει διευκρινιστεί. Πρόσφατα δεδομένα καταδεικνύουν μια έντονη παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών όταν συνυπάρχουν τα αποπτωτικά σωματίδια από τα ΕΚΧ, τα μακροφάγα ασθενών με ΠΧΚ και τα AMA [395]. Η έκκριση αυτή των κυτταροκινών αναστέλλεται παρουσία αντι-CD16 αντισωμάτων και δεν οφείλεται σε διαφορές στη πρόσληψη των αποπτωτικών σωματιδίων. Επιπλέον, τα μακροφάγα από ασθενείς με ΠΧΚ όταν καλλιεργούνται με αυτά τα αποπτωτικά σωματίδια παρουσία των AMA παρουσίαζαν αυξημένη έκφραση του TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) το οποίο επάγει την απόπτωση στα ΕΚΧ [396]. Η κυτταροτοξικότητα μπορεί επίσης να επάγει απόπτωση μέσω και άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών όπως αυτά του CD95 (Fas)/CD152 (FasL) και perforin/granzyme. Τα ΕΚΧ οδηγούνται σε απόπτωση παρουσία κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων [397]. Δεν ξενίζει η αυξημένη έκφραση στα ΕΚΧ των perforin, granzymes και του επιφανειακού αντιγόνου CD95(Fas) που συνδυάζεται με την παρουσία διηθήσεων από κύτταρα φλεγμονής που εκφράζουν CD152(Fas-L) [397-399]. Επιπλέον, τα ΕΚΧ χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός επιφανειακού δείκτη (ο υποδοχέας του μονοκλωνικού Απο 2.7) που σχετίζεται με την απόπτωση. Έχει φανεί ότι η προς τα κάτω ρύθμιση των αντιαποπτωτικών μορίων bcl-2, mcl-1 και bcl-XL οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία στα αποπτωτικά σήματα και την καταστροφή των χοληφόρων στην ΠΧΚ [398, 400-402].

2.8 ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΧΟΛΗΦΟΡΩΝ (ΕΚΧ)

Τα ΕΚΧ αποτελούν τα κύτταρα που βλάπτονται στην ΠΧΚ. Προκαλεί εντύπωση ότι ενώ ΕΚΧ βρίσκονται σε όλη τη διαδρομή του χοληφόρου δένδρου αυτά που βλάπτονται στην ΠΧΚ εντοπίζονται ενδοηπατικά και συγκεκριμένα στα μικρού και μέσου μεγέθους χολαγγεία. Παρόμοια με το ενδοθήλιο, έτσι και με τα ΕΚΧ υπάρχει ετερογένεια τόσο λειτουργική αλλά και ανατομική ανάλογα με τη περιοχή του χοληφόρου δέντρου που

βρίσκονται [403]. Στα ΕΚΧ ασθενών με ΠΧΚ βρέθηκε ότι εκφράζονται μόρια που συμμετέχουν στη φλεγμονή και αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να υποστηριχτεί από πολλούς η υπόθεση ότι τα ΕΚΧ αποτελούν μέρος της διαδικασίας καταστροφής τους και δεν είναι αθώα θύματα της νόσου [404]. Προς αυτή την κατεύθυνση συνηγορούν η ύπαρξη στην επιφάνειά τους ΕΚΧ μορίων που μοιάζουν με την PDC-E2, μορίων προσκόλλησης, μορίων συνδιέγερσης, υποδοχέων κυτταροκινών και το γεγονός ότι και τα ίδια εκκρίνουν κυτταροκίνες. Τα μόρια αυτά επάγονται και από τη φλεγμονή και ανευρίσκονται και σε άλλα νοσήματα του ήπατος και των χοληφόρων. Παράλληλα, ο τρόπος με τον οποίο τα ΕΚΧ πεθαίνουν με διαδικασίες απόπτωσης συμβάλλει στη καταστροφή τους.

Τα τάξης II MHC μόρια εκφράζονται στην επιφάνεια των ΕΚΧ [270, 405, 406] και φαίνεται ότι η IFN- γ ή η IFN- γ σε συνδυασμό με τον TNF- α είναι οι κυτταροκίνες που επάγουν την έκφραση αυτών των μορίων, τουλάχιστον σε κυτταρικές καλλιέργειες ΕΚΧ. Η φλεγμονή επάγει την έκφραση αυτών των μορίων σε μια ποικιλία νοσημάτων του ήπατος. Η IFN- γ μπορεί να επάγει την έκφραση MHC II στα αστροκύτταρα στην πολλαπλή σκλήρυνση επιτρέποντας σε αυτά τα κύτταρα να παρουσιάζουν τα αντιγόνα της μυελίνης στα αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα [407]. Τα ενδοηπατικά ΕΚΧ εκφράζουν επίσης ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) ή CD54 και LFA-3 (function-associated antigen) ή CD58 [405]. Η έκφραση του CD54 στα ΕΚΧ βοηθά την προσκόλληση των κυτταροτοξικών T και των CD4+ λεμφοκυττάρων μέσω της αλληλεπίδρασης με το LFA-1 (CD18/CD11a). Η έκφραση του CD54 στα ΕΚΧ βοηθά την προσκόλληση των κυτταροτοξικών T και των CD4+ λεμφοκυττάρων μέσω της αλληλεπίδρασης με το LFA-1 (CD18/CD11a). Η έκφραση του CD58 οδηγεί σε κυτταροτοξικότητα μέσω της αλληλεπίδρασης με το CD2, ένα μόριο που φυσιολογικά εκφράζεται στα κυτταροτοξικά T και NK λεμφοκύτταρα [408]. Το CD40 επίσης εκφράζεται στα ΕΚΧ υποστηρίζοντας αλληλεπίδραση με το CD154 (CD40 ligand) και ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Τα λεμφοκύτταρα για να ενεργοποιηθούν χρειάζονται αλληλεπίδραση των TCR τους με αντιγόνα που παρουσιάζονται μέσα από MHC μόρια και ένα δεύτερο συνδιεγερτικό σήμα μέσω της αλληλεπίδρασης μεταξύ του CD28 και του B7-1 (CD80) ή του B7-2 (CD86). Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα εκφράζουν MHC και CD80 ή CD86. Είναι γνωστό ότι τα ΕΚΧ εκφράζουν MHC I και II μόρια αλλά υπάρχει μια διαφωνία κατά πόσο εκφράζουν CD80/86 γεγονός που θα τα καθιστούσε ικανά για αντιγονοπαρουσίαση. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν την έκφραση των CD80 και CD86 [236, 409], ενώ αντίθετα άλλες μελέτες απέτυχαν να ανιχνεύσουν CD80 ή CD86 mRNA ή πρωτεΐνη σε καλλιέργειες ΕΚΧ. Ότι και να συμβαίνει μάλλον δεν αποτελεί καθοριστικό γεγονός για την

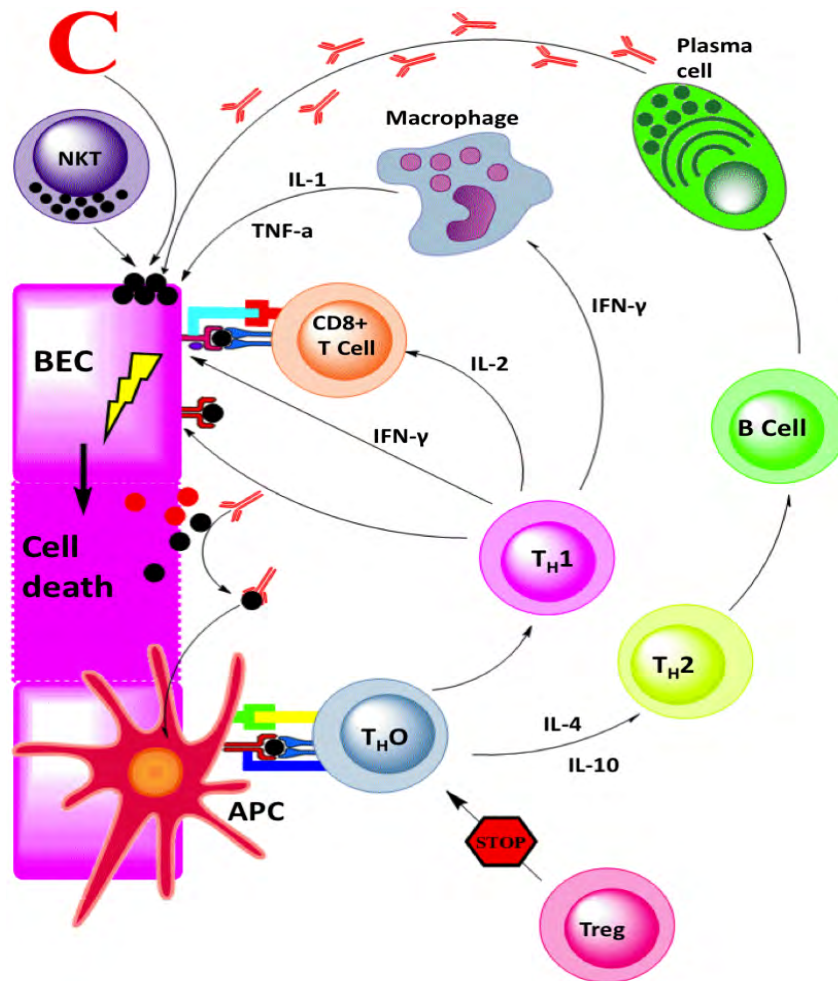
εξέλιξη της νόσου μιας και έχουν αναπτυχθεί αυτοδραστικοί κλώνοι κατά της PDC-E2 στην ΠΧΚ CD4+CD28- που δεν εξαρτώνται από συνδιεγερτικά σήματα [315]. Είναι ενδιαφέρον ότι ούτε οι CD4+CD28- ούτε οι CD4+CD28+ κλώνοι πολλαπλασιάζονταν στην παρουσία B7 αρνητικών ΕΚΧ που καλλιιεργήθηκαν με το πεπτιδίιο 163-176 της PDC-E2 που αποτελούσε το αντιγόνο των κυτταρικών κλώνων. Και οι δύο όμως κλώνοι πρόσφεραν υπόβαθρο για ανάπτυξη κυτταροτοξικότητας κατά των ΕΚΧ. Όταν οι CD4+CD28- και οι CD4+CD28+ κυτταρικοί κλώνοι συνκαλλιιεργήθηκαν με τα ΕΚΧ οι πρώτοι δεν περιήλθαν σε ανεργία σε αντίθεση με τους δεύτερους. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα ΕΚΧ επάγουν ανεργία στα αυτοδραστικά, εξαρτώμενα από συνδιεγερτικά μόρια λεμφοκύτταρα.

Στην ΠΧΚ ο TNF-α, η IL-6 και οι υποδοχείς τους υπερεκφράζονται, ενώ αντίθετα αυτό δεν φαίνεται να συμβαίνει σε άλλα νοσήματα του ήπατος και των χοληφόρων [323]. Έτσι, ο TNF-α και η IL-6 έχουν αυτοκρινή δράση επάγοντας την έκφραση μορίων προσκόλλησης και μορίων MHC II. Επιπρόσθετα, ο TNF-α και η IL-6 καταστρέφουν το φραγμό των χολικών αλάτων και επιδρούν στον πολλαπλασιασμό, την ωρίμανση, τη ρύθμιση και τη δραστηριότητα των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων.

Είναι αξιοσημείωτο ότι σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν βρεθεί στη επιφάνεια των ΕΚΧ η PDC-E2 και η E3BP [410-412]. Αυτό θα μπορούσε εν μέρει να εξηγήσει τον τρόπο με τον οποίο το ανοσολογικό σύστημα έρχεται σε επαφή με αυτά τα αυτοαντιγόνα. Αυτά τα μόρια εμφανίζονται στην επιφάνεια των ΕΚΧ νωρίς κατά τη φυσική πορεία της νόσου προσδίδοντάς τους σημαντικό ρόλο στην παθογένεια και/ή στην εξέλιξη της νόσου. Δεν είναι ακόμη γνωστό πώς επάγεται η έκφραση αυτών των μορίων στην επιφάνεια των ΕΚΧ. Πιθανές ερμηνείες για τον εντοπισμό αυτών των μορίων στην κορυφή των ΕΚΧ αποτελούν: α) η αυξημένη σύνθεση β) η ανεπαρκής αποδόμηση και γ) η παθολογική σηματοδότηση αυτών των μορίων [168]. Παράλληλα, η φύση αυτού του μορίου που αντιδρά με τα αντισώματα στις υπάρχουσες ανοσοϊστοχημικές μελέτες δεν είναι γνωστή. Επίσης από τις υπάρχουσες μελέτες δεν είναι γνωστό κατά πόσο τα μόρια αυτά θα μπορούσε να είναι ολόκληρη η PDC-E2 πρωτεΐνη, μέρος αυτής, ή είναι ένα μόριο που απλώς εμφανίζει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με την PDC-E2. Δύο μελέτες υποστηρίζουν το τελευταίο σενάριο [238, 413].

2.9 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ΠΧΚ είναι μια αυτοάνοση χολοστατική νόσος του ήπατος πολυπαραγοντικής αιτιολογίας. Ο ρόλος του ανοσολογικού συστήματος στην παθογένεια της νόσου είναι πολύ καλά τεκμηριωμένος και φαίνεται ότι το κάθε τμήμα του συμμετέχει στην παθογένεια της νόσου (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Το επικρατέστερο μοντέλο για την παθογένεια της ΠΧΚ υποστηρίζει την πολυπαραγοντική αιτιολογία της νόσου. Τα παύει CD4+ T λεμφοκύτταρα (T_H0) που φέρουν υποδοχείς (TCR) ικανούς να αναγνωρίζουν τα αυτοαντιγόνα της ΠΧΚ που παρουσιάζονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC), διαφοροποιούνται ή σε T_H1 ή σε T_H2 CD4+ T λεμφοκύτταρα ανάλογα με το περιβάλλον κυτταροκινών στο οποίο θα βρεθούν και εκκρίνουν κυτταροκίνες που χαρακτηρίζουν το είδος των CD4+ T λεμφοκυττάρων. Στη συνέχεια, τα T_H1 και T_H2 CD4+ T λεμφοκύτταρα δίνουν την απαραίτητη βοήθεια στα CD8+ T λεμφοκύτταρα ή B λεμφοκύτταρα για την επαγωγή της κυτταροτοξικότητας ή την παραγωγή αντισωμάτων αντίστοιχα. Παράλληλα, τα NKT και NK λεμφοκύτταρα φαίνεται ότι συμβάλουν και αυτά στην καταστροφή των χοληγγείων. Τα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων (Biliary Epithelial Cells – BEC) φαίνεται ότι

συμμετέχουν και τα ίδια στην καταστροφή τους εκφράζοντας μόρια στην επιφάνειά τους στα οποία τα αντισώματα κατά της PDC-E2 μπορούν να προσδεθούν. Επίσης κατά τη διαδικασία της απόπτωσης στην ΠΧΚ έχει φανεί ότι τα αποπτωτικά σωμάτια περιέχουν ανοσολογικά ενεργά μόρια της PDC-E2, τα οποία αφού συνδεθούν με IgA αντι-PDC-E2 αντισώματα, μπορούν να φαγοκυτταρωθούν από τα APC και να ενισχύσουν επιπλέον την αντιγονοπαρουσίαση. Στην εικόνα αυτή δεν παρουσιάζεται ο ρόλος της φυσικής ανοσίας, της μοριακής μίμησης, των ξενοβιοτικών και των γενετικών παραγόντων στην παθογένεια της νόσου.

Με βάση τα στοιχεία που παρουσιάστηκαν η παθογένεια της νόσου θεωρείται πολυπαραγοντική.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η προσπάθεια συμπλήρωσης «βιβλιογραφικών κενών» όπως:

- α. Ο χαρακτηρισμός των IgG B κυτταρικών επιτόπων των αντι-PDC-E2 AMA σε μια ομάδα Ελλήνων ασθενών με καλά τεκμηριωμένη ΠΧΚ καθώς δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα σε σχέση με τους γραμμικούς επιτόπους των αντι-PDC-E2 AMA σε Έλληνες ασθενείς
- β. Η διερεύνηση αν ο προηγούμενα περιγραφόμενος από τους Shimoda et al επίτοπος των αυτοδραστικών CD4+ T λεμφοκυττάρων αναγνωρίζεται και από Έλληνες ασθενείς με ΠΧΚ και
- γ. Η μελέτη ύπαρξης επιπλέον επιτόπων που αναγνωρίζονται από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα.
- δ. Τέλος παρουσιάζεται μια ενδιαφέρουσα κλινικοεργαστηριακή περίπτωση ασθενούς με ΠΧΚ.

3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

- [1] Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(12):1261-73.
- [2] Moroni L, Jepsen P, Battezzati PM, Morengi E, Lleo A, Podda M, et al. 966 PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS IN LOMBARDIA, ITALY: A LOWER THAN EXPECTED FEMALE-TO-MALE INCIDENCE RATIO WITH HIGHER MORTALITY IN MEN. *Journal of Hepatology*. 2012;56, Supplement 2(0):S378.
- [3] Invernizzi P. Geoepidemiology of autoimmune liver diseases. *J Autoimmun*. May;34(3):J300-6.
- [4] Triger DR, Berg PA, Rodes J. Epidemiology of primary biliary cirrhosis. *Liver*. 1984;4(3):195-200.
- [5] Lofgren J, Jarnerot G, Danielsson D, Hemdal I. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis in a defined population in Sweden. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1985;20(5):647-50.
- [6] Myszor M, James OFW. The epidemiology of primary biliary cirrhosis in North-east England: An increasingly common disease? *Quarterly Journal of Medicine*. 1990;75(276):377-85.
- [7] Witt-Sullivan H, Heathcote J, Cauch K, Blendis L, Ghent C, Katz A, et al. The demography of primary biliary cirrhosis in Ontario, Canada. *Hepatology*. 1990;12(1):98-105.
- [8] Watson RGP, Angus PW, Dewar M, Goss B, Sewell RB, Smallwood RA. Low prevalence of primary biliary cirrhosis in Victoria, Australia. *Gut*. 1995;36(6):927-30.
- [9] Rimmel T, Rimmel H, Uibo R, Salupere V. Primary biliary cirrhosis in Estonia. With special reference to incidence, prevalence, clinical features, and outcome. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1995;30(4):367-71.
- [10] Boberg KM, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N, Stiris M, Bell H. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a norwegian population. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1998;33(1):99-103.
- [11] Kim WR, Lindor KD, Locke GR, Therneau TM, Homburger HA, Batts KP, et al. Epidemiology and natural history of primary biliary cirrhosis in a U.S. community. *Gastroenterology*. 2000;119(6):1631-6.
- [12] Prince MI, Chetwynd A, Diggle P, Jarner M, Metcalf JV, James OFW. The geographical distribution of primary biliary cirrhosis in a well-defined cohort. *Hepatology*. 2001;34(6):1083-8.
- [13] Sood S, Gow PJ, Christie JM, Angus PW. Epidemiology of primary biliary cirrhosis in Victoria, Australia: High prevalence in migrant populations. *Gastroenterology*. 2004;127(2):470-5.
- [14] Sakauchi F, Mori M, Zeniya M, Toda G. A cross-sectional study of primary biliary cirrhosis in Japan: Utilization of clinical data when patients applied to receive public financial aid. *Journal of Epidemiology*. 2005;15(1):24-8.
- [15] Myers RP, Shaheen AAM, Fong A, Burak KW, Wan A, Swain MG, et al. Epidemiology and natural history of primary biliary cirrhosis in a Canadian Health Region: A population-based study. *Hepatology*. 2009;50(6):1884-92.

- [16] James OF, Bhopal R, Howel D, Gray J, Burt AD, Metcalf JV. Primary biliary cirrhosis once rare, now common in the United Kingdom? *Hepatology*. 1999 Aug;30(2):390-4.
- [17] Forton DM, Patel N, Prince M, Oatridge A, Hamilton G, Goldblatt J, et al. Fatigue and primary biliary cirrhosis: Association of globus pallidus magnetisation transfer ratio measurements with fatigue severity and blood manganese levels. *Gut*. 2004;53(4):587-92.
- [18] Goldblatt J, Taylor PJS, Lipman T, Prince MI, Baragiotta A, Bassendine MF, et al. The true impact of fatigue in primary biliary cirrhosis: A population study. *Gastroenterology*. 2002;122(5):1235-41.
- [19] Newton JL, Gibson GJ, Tomlinson M, Wilton K, Jones D. Fatigue in primary biliary cirrhosis is associated with excessive daytime somnolence. *Hepatology*. 2006;44(1):91-8.
- [20] Elta GH, Sepersky RA, Goldberg MJ. Increased incidence of hypothyroidism in primary biliary cirrhosis. *Digestive Diseases and Sciences*. 1983;28(11):971-5.
- [21] Poupon RE, Chrétien Y, Chazouillères O, Poupon R, Chwalow J. Quality of life in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2004;40(2):489-94.
- [22] Bergasa NV, Mason A, Floreani A, Heathcote J, Swain MG, Jones DEJ, et al. Primary biliary cirrhosis: Report of a focus study group. *Hepatology*. 2004;40(4):1013-20.
- [23] Pares A, Rodes J. Natural history of primary biliary cirrhosis. *Clinics in Liver Disease*. 2003;7(4):779-94.
- [24] Prince MI, Chetwynd A, Craig WL, Metcalf JV, James OFW. Asymptomatic primary biliary cirrhosis: Clinical features, prognosis, and symptom progression in a large population based cohort. *Gut*. 2004;53(6):865-70.
- [25] Talwalkar JA, Souto E, Jorgensen RA, Lindor KD. Natural history of pruritus in primary biliary cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2003;1(4):297-302.
- [26] Jones EA, Bergasa NV. The pruritus of cholestasis: from bile acids to opiate agonists. *Hepatology*. 1990 May;11(5):884-7.
- [27] Ng VL, Ryckman FC, Porta G, Miura IK, De Carvalho E, Servidoni MF, et al. Long-term outcome after partial external biliary diversion for intractable pruritus in patients with intrahepatic cholestasis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2000;30(2):152-6.
- [28] Gatselis NK, Stefanos A, Gioti C, Rigopoulou EI, Dalekos GN. Primary biliary cirrhosis and Henoch-Schonlein purpura: report of two cases and review of the literature. *Liver Int*. 2007 Mar;27(2):280-3.
- [29] Gatselis NK, Zachou K, Dalekos GN. Early primary biliary cirrhosis: a new association with erythema nodosum of unknown origin. *Gastroenterol Res Pract*. 2010.
- [30] Zachou K, Rigopoulou E, Liaskos C, Patsiaoura K, Makri E, Stathakis N, et al. Primary biliary cirrhosis presented as peripheral eosinophilia in asymptomatic women with or without elevated alkaline phosphatase. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004 Apr;16(4):425-8.
- [31] Colina F, Pinedo F, Solis JA, Moreno D, Nevado M. Nodular regenerative hyperplasia of the liver in early histological stages of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 1992;102(4):1319-24.
- [32] Thornton JR, Triger DR, Losowsky MS. Variceal bleeding is associated with reduced risk of severe cholestasis in primary biliary cirrhosis. *Quarterly Journal of Medicine*. 1989;71(265):467-71.
- [33] Boyer TD, Kokenes DD, Hertzler G, Kutner MH, Henderson JM. Effect of distal splenorenal shunt on survival of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1994;20(6):1482-6.

- [34] Menon KVN, Angulo P, Weston S, Dickson ER, Lindor KD. Bone disease in primary biliary cirrhosis: Independent indicators and rate of progression. *Journal of Hepatology*. 2001;35(3):316-23.
- [35] Springer JE, Cole DEC, Rubin LA, CauchDudek K, Harewood L, Evrovski J, et al. Vitamin D-receptor genotypes as independent genetic predictors of decreased bone mineral density in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2000;118(1):145-51.
- [36] Boulton-Jones JR, Fenn RMF, West J, Logan RFA, Ryder SD. Fracture risk of women with primary biliary cirrhosis: No increase compared with general population controls. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2004;20(5):551-7.
- [37] Guanabens N, Pares A, Ros I, Caballeria L, Pons F, Vidal S, et al. Severity of cholestasis and advanced histological stage but not menopausal status are the major risk factors for osteoporosis in primary biliary cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2005;42(4):573-7.
- [38] Ormarsdottir S, Ljunggren O, Mallmin H, Olsson R, Prytz H, Loof L. Longitudinal bone loss in postmenopausal women with primary biliary cirrhosis and well-preserved liver function. *Journal of Internal Medicine*. 2002;252(6):537-41.
- [39] Hodgson SF, Dickson ER, Wahner HW. Bone loss and reduced osteoblast function in primary biliary cirrhosis. *Annals of Internal Medicine*. 1985;103(6 I):855-60.
- [40] Janes CH, Dickson ER, Okazaki R, Bonde S, McDonagh AF, Riggs BL. Role of hyperbilirubinemia in the impairment of osteoblast proliferation associated with cholestatic jaundice. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;95(6):2581-6.
- [41] Eastell R, Dickson ER, Hodgson SF, Wiesner RH, Porayko MK, Wahner HW, et al. Rates of vertebral bone loss before and after liver transplantation in women with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1991;14(2):296-300.
- [42] Kaplan MM, Elta GH, Furie B, Sadowski JA, Russell RM. Fat-soluble vitamin nutriture in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 1988;95(3):787-92.
- [43] Matloff DS, Kaplan MM, Neer RM. Osteoporosis in primary biliary cirrhosis: Effects of 25-hydroxyvitamin D3 treatment. *Gastroenterology*. 1982;83(1 I):97-102.
- [44] Corpechot C, Poujol-Robert A, Wendum D, Galotte M, ChreÄÄtien Y, Poupon RE, et al. Biochemical markers of liver fibrosis and lymphocytic piecemeal necrosis in UDCA-treated patients with primary biliary cirrhosis. *Liver International*. 2004;24(3):187-93.
- [45] Degott C, Zafrani ES, Callard P, Balkau B, Poupon RE, Poupon R. Histopathological study of primary biliary cirrhosis and the effect of ursodeoxycholic acid treatment on histology progression. *Hepatology*. 1999;29(4):1007-12.
- [46] Gregory WL, Game FL, Farrer M, Idle JR, Laker MF, James OFW. Reduced serum lipoprotein(a) levels in patients with primary biliary cirrhosis. *Atherosclerosis*. 1994;105(1):43-50.
- [47] Longo M, Crosignani A, Battezzati PM, Squarcia Giussani C, Invernizzi P, Zuin M, et al. Hyperlipidaemic state and cardiovascular risk in primary biliary cirrhosis. *Gut*. 2002;51(2):265-9.
- [48] Jahn CE, Schaefer EJ, Taam LA. Lipoprotein abnormalities in primary biliary cirrhosis. Association with hepatic lipase inhibition as well as altered cholesterol esterification. *Gastroenterology*. 1985;89(6):1266-78.
- [49] Crippin JS, Lindor KD, Jorgensen R, Kottke BA, Harrison JM, Murtaugh PA, et al. Hypercholesterolemia and atherosclerosis in primary biliary cirrhosis: What is the risk? *Hepatology*. 1992;15(5):858-62.
- [50] Allocca M, Crosignani A, Gritti A, Ghilardi G, Gobatti D, Caruso D, et al. Hypercholesterolaemia is not associated with early atherosclerotic lesions in primary biliary cirrhosis. *Gut*. 2006;55(12):1795-800.

- [51] Lanspa SJ, Chan ATH, Bell III JS. Pathogenesis of steatorrhea in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1985;5(5):837-42.
- [52] Phillips JR, Angulo P, Petterson T, Lindor KD. Fat-soluble vitamin levels in patients with primary biliary cirrhosis. *American Journal of Gastroenterology*. 2001;96(SUPPL.):2745-50.
- [53] Lindgren S, Eriksson S. IgM in primary biliary cirrhosis. Physicochemical and complement activating properties. *J Lab Clin Med*. 1982 May;99(5):636-45.
- [54] Tanaka A, Borchers AT, Ishibashi H, Ansari AA, Keen CL, Gershwin ME. Genetic and familial considerations of primary biliary cirrhosis. *American Journal of Gastroenterology*. 2001;96(1):8-15.
- [55] Culp KS, Fleming CR, Duffy J, Baldus WP, Dickson ER. Autoimmune associations in primary biliary cirrhosis. *Mayo Clin Proc*. 1982 Jun;57(6):365-70.
- [56] Scheuer P. Primary biliary cirrhosis. *Proc R Soc Med*. 1967 Dec;60(12):1257-60.
- [57] Ludwig J, Dickson ER, McDonald GS. Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1978 Aug 22;379(2):103-12.
- [58] Corpechot C, Carrat F, Poupon R. Primary biliary cirrhosis: Incidence and predictive factors of cirrhosis development in ursodiol-treated patients. *Gastroenterology*. 2002;122(3):652-8.
- [59] Zein CO, Angulo P, Lindor KD. When is liver biopsy needed in the diagnosis of primary biliary cirrhosis? *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2003;1(2):89-95.
- [60] Corpechot C, Carrat F, Bahr A, Chrétien Y, Poupon RE, Poupon R. The effect of ursodeoxycholic acid therapy on the natural course of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2005;128(2):297-303.
- [61] Lindor KD, Gershwin ME, Poupon R, Kaplan M, Bergasa NV, Heathcote EJ. Primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2009 Jul;50(1):291-308.
- [62] Prince MI, James OF. The epidemiology of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis*. 2003 Nov;7(4):795-819.
- [63] Poupon R. Trials in primary biliary cirrhosis: need for the right drugs at the right time. *Hepatology*. 2004 Apr;39(4):900-2.
- [64] Poupon RE, Lindor KD, Parés A, Chazouillères O, Poupon R, Heathcote EJ. Combined analysis of the effect of treatment with ursodeoxycholic acid on histologic progression in primary biliary cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2003;39(1):12-6.
- [65] Locke GR 3rd, Therneau TM, Ludwig J, Dickson ER, Lindor KD. Time course of histological progression in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1996 Jan;23(1):52-6.
- [66] Prince M, Chetwynd A, Newman W, Metcalf JV, James OFW. 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):1044-51.
- [67] Therneau TM, Grambsch PM. *Modeling survival data : extending the Cox model*. New York: Springer 2000.
- [68] Heathcote EJ, Cauch-Dudek K, Walker V, Bailey RJ, Blendis LM, Ghent CN, et al. The Canadian multicenter double-blind randomized controlled trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1994;19(5):1149-56.
- [69] Springer J, Cauch-Dudek K, O'Rourke K, Wanless IR, Heathcote EJ. Asymptomatic primary biliary cirrhosis: A study of its natural history and prognosis. *American Journal of Gastroenterology*. 1999;94(1):47-53.
- [70] Kuiper EM, Hansen BE, de Vries RA, den Ouden-Muller JW, van Ditzhuijsen TJ, Haagsma EB, et al. Improved prognosis of patients with primary biliary cirrhosis that have a biochemical response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology*. 2009 Apr;136(4):1281-7.

- [71] Pares A, Caballeria L, Rodes J. Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic Acid. *Gastroenterology*. 2006 Mar;130(3):715-20.
- [72] Floreani A, Caroli D, Variola A, Rizzotto ER, Antoniazzi S, Chiaramonte M, et al. A 35-year follow-up of a large cohort of patients with primary biliary cirrhosis seen at a single centre. *Liver Int*. 2011 Mar;31(3):361-8.
- [73] Rigopoulou EI, Bogdanos DP, Liaskos C, Koutsoumpas A, Baum H, Vergani D, et al. Anti-mitochondrial antibody immunofluorescent titres correlate with the number and intensity of immunoblot-detected mitochondrial bands in patients with primary biliary cirrhosis. *Clin Chim Acta*. 2007 May 1;380(1-2):118-21.
- [74] Rigopoulou EI, Dalekos GN. Molecular diagnostics of primary biliary cirrhosis. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*. 2008 16;2(6):621-34.
- [75] Invernizzi P, Selmi C, Ranftler C, Podda M, Wesierska-Gadek J. Antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis*. 2005 Aug;25(3):298-310.
- [76] Parés A, Caballería L, Rodés J, Bruguera M, Rodrigo L, García-Plaza A, et al. Long-term effects of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: Results of a double-blind controlled multicentric trial. *Journal of Hepatology*. 2000;32(4):561-6.
- [77] Lindor KD, Jorgensen RA, Therneau TM, Malinchoc M, Dickson ER. Ursodeoxycholic acid delays the onset of esophageal varices in primary biliary cirrhosis. *Mayo Clin Proc*. 1997 Dec;72(12):1137-40.
- [78] Glud C, Christensen E. Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002(1):CD000551.
- [79] Goulis J, Leandro G, Burroughs AK. Randomised controlled trials of ursodeoxycholic-acid therapy for primary biliary cirrhosis: A meta-analysis. *Lancet*. 1999;354(9184):1053-60.
- [80] Leuschner M, Dietrich CF, You T, Seidl C, Raedle J, Herrmann G, et al. Characterisation of patients with primary biliary cirrhosis responding to long term ursodeoxycholic acid treatment. *Gut*. 2000 Jan;46(1):121-6.
- [81] Corpechot C, Carrat F, Bahr A, Poupon RE, Poupon R. The impact of ursodeoxycholic (UDCA) therapy with or without liver transplantation (OLT) on long-term survival in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2003;34.
- [82] Selmi C, Bowlus CL, Gershwin ME, Coppel RL. Primary biliary cirrhosis. *Lancet*. May 7;377(9777):1600-9.
- [83] Miyakawa H, Tanaka A, Kikuchi K, Matsushita M, Kitazawa E, Kawaguchi N, et al. Detection of antimitochondrial autoantibodies in immunofluorescent AMA-negative patients with primary biliary cirrhosis using recombinant autoantigens. *Hepatology*. 2001 Aug;34(2):243-8.
- [84] Oertelt S, Rieger R, Selmi C, Invernizzi P, Ansari AA, Coppel RL, et al. A sensitive bead assay for antimitochondrial antibodies: Chipping away at AMA-negative primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2007 Mar;45(3):659-65.
- [85] Kita H. Autoreactive CD8-specific T-cell response in primary biliary cirrhosis. *Hepatology Res*. 2007 Oct;37 Suppl 3:S402-5.
- [86] Kita H, Lian ZX, Van de Water J, He XS, Matsumura S, Kaplan M, et al. Identification of HLA-A2-restricted CD8(+) cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis: T cell activation is augmented by immune complexes cross-presented by dendritic cells. *J Exp Med*. 2002 Jan 7;195(1):113-23.
- [87] Shimoda S, Miyakawa H, Nakamura M, Ishibashi H, Kikuchi K, Kita H, et al. CD4 T-cell autoreactivity to the mitochondrial autoantigen PDC-E2 in AMA-negative primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*. 2008 Sep;31(2):110-5.
- [88] Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Hayashida K, Niho Y. HLA DRB4 0101-restricted immunodominant T cell autoepitope of pyruvate dehydrogenase complex in

- primary biliary cirrhosis: Evidence of molecular mimicry in human autoimmune diseases. *Journal of Experimental Medicine*. 1995;181(5):1835-45.
- [89] Yang GX, Lian ZX, Chuang YH, Moritoki Y, Lan RY, Wakabayashi K, et al. Adoptive transfer of CD8(+) T cells from transforming growth factor beta receptor type II (dominant negative form) induces autoimmune cholangitis in mice. *Hepatology*. 2008 Jun;47(6):1974-82.
- [90] Lan RY, Cheng C, Lian ZX, Tsuneyama K, Yang GX, Moritoki Y, et al. Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2006 Apr;43(4):729-37.
- [91] Lleo A, Battezzati PM, Selmi C, Gershwin ME, Podda M. Is autoimmunity a matter of sex? *Autoimmunity Reviews*. 2008;7(8):626-30.
- [92] EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol*. 2009 Aug;51(2):237-67.
- [93] Hirschfield GM, Liu X, Xu C, Lu Y, Xie G, Gu X, et al. Primary biliary cirrhosis associated with HLA, IL12A, and IL12RB2 variants. *N Engl J Med*. 2009 Jun 11;360(24):2544-55.
- [94] Invernizzi P, Crosignani A, Battezzati PM, Covini G, De Valle G, Larghi A, et al. Comparison of the clinical features and clinical course of antimitochondrial antibody-positive and -negative primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1997 May;25(5):1090-5.
- [95] Zografos TA, Gatselis N, Zachou K, Liaskos C, Gabeta S, Koukoulis GK, et al. Primary biliary cirrhosis-specific autoantibodies in first degree relatives of Greek primary biliary cirrhosis patients. *World J Gastroenterol*. 2012 Sep 14;18(34):4721-8.
- [96] Selmi C, Mayo MJ, Bach N, Ishibashi H, Invernizzi P, Gish RG, et al. Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology*. 2004 Aug;127(2):485-92.
- [97] Watt FE, James OF, Jones DE. Patterns of autoimmunity in primary biliary cirrhosis patients and their families: a population-based cohort study. *QJM*. 2004 Jul;97(7):397-406.
- [98] Brind AM, Bray GP, Portmann BC, Williams R. Prevalence and pattern of familial disease in primary biliary cirrhosis. *Gut*. 1995;36(4):615-7.
- [99] Hamlyn AN, Macklon AF, James O. Primary biliary cirrhosis: Geographical clustering and symptomatic onset seasonality. *Gut*. 1983;24(10):940-5.
- [100] Jones DEJ, Watt FE, Metcalf JV, Bassendine MF, James OFW. Familial primary biliary cirrhosis reassessed: A geographically-based population study. *Journal of Hepatology*. 1999;30(3):402-7.
- [101] Bach N, Schaffner F. Familial primary biliary cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 1994;20(6):698-701.
- [102] Floreani A, Naccarato R, Chiamonte M. Prevalence of familial disease in primary biliary cirrhosis in Italy [1]. *Journal of Hepatology*. 1997;26(3):737-8.
- [103] Danielsson A, Boqvist L, Uddenfeldt P. Epidemiology of primary biliary cirrhosis in a defined rural population in the northern part of Sweden. *Hepatology*. 1990;11(3):458-64.
- [104] Tsujinaka T, Kishibuchi M, Iijima S, Yano M, Monden M. Nucleotides and intestine. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1999 Sep-Oct;23(5 Suppl):S74-7.
- [105] Parikh-Patel A, Gold E, Mackay IR, Gershwin ME. The geoepidemiology of primary biliary cirrhosis: Contrasts and comparisons with the spectrum of autoimmune diseases. *Clinical Immunology*. 1999;91(2):206-18.
- [106] Abu-Mouch S, Selmi C, Benson GD, Kenny TP, Invernizzi P, Zuin M, et al. Geographic Clusters of Primary Biliary Cirrhosis. *Clinical and Developmental Immunology*. 2003;10(2-4):127-31.

- [107] Selmi C, Mayo MJ, Bach N, Ishibashi H, Invernizzi P, Gish RG, et al. Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: Genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology*. 2004;127(2):485-92.
- [108] Bogdanos DP, Smyk DS, Rigopoulou EI, Mytilinaiou MG, Heneghan MA, Selmi C, et al. Twin studies in autoimmune disease: Genetics, gender and environment. *J Autoimmun*. 2011 Dec 14.
- [109] Talwalkar JA, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis. *Lancet*. 2003;362(9377):53-61.
- [110] Invernizzi P, Selmi C, Mackay IR, Podda M, Gershwin ME. From bases to basis: linking genetics to causation in primary biliary cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005 May;3(5):401-10.
- [111] Ercilla G, Pares A, Arriaga F. Primary biliary cirrhosis associated with HLA-DRw3. *Tissue Antigens*. 1979;14(5):449-52.
- [112] Miyamori H, Kato Y, Kobayashi K, Hattori N. HLA antigens in Japanese patients with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Digestion*. 1983;26(4):213-7.
- [113] Begovich AB, Klitz W, Moonsamy PV, Van De Water J, Peltz G, Gershwin ME. Genes within the HLA class II region confer both predisposition and resistance to primary biliary cirrhosis. *Tissue Antigens*. 1994;43(2):71-7.
- [114] Gores GJ, Moore SB, Fisher LD. Primary biliary cirrhosis: Associations with Class II major histocompatibility complex antigens. *Hepatology*. 1987;7(5):889-92.
- [115] Manns MP, Kruger M. Immunogenetics of chronic liver diseases. *Gastroenterology*. 1994;106(6):1676-97.
- [116] Wassmuth R, Depner F, Danielsson A, Hultcrantz R, Lööf L, Olson R, et al. HLA class ii markers and clinical heterogeneity in Swedish patients with primary biliary cirrhosis. *Tissue Antigens*. 2002;59(5):381-7.
- [117] Bassendine MF, Dewar PJ, James OFW. HLA-DR antigens in primary biliary cirrhosis: Lack of association. *Gut*. 1985;26(6):625-8.
- [118] Invernizzi P, Maria Battezzati P, Crosignani A, Perego F, Poli F, Morabito A, et al. Peculiar HLA polymorphisms in Italian patients with primary biliary cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2003;38(4):401-6.
- [119] Morling N, Dalhoff K, Fugger L, Georgsen J, Jakobsen B, Ranek L, et al. DNA polymorphism of HLA class II genes in primary biliary cirrhosis. *Immunogenetics*. 1992;35(2):112-6.
- [120] Zhang L, Weetman AP, Bassendine M, Oliveira DBG. Major histocompatibility complex class-II alleles in primary biliary cirrhosis. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1994;39(1):104-6.
- [121] Mella JG, Roschmann E, Maier KP, Volk BA. Association of primary biliary cirrhosis with the allele HLA-DPB1*0301 in a German population. *Hepatology*. 1995;21(2):398-402.
- [122] Seki T, Kiyosawa K, Ota M, Furuta S, Fukushima H, Tanaka E, et al. Association of primary biliary cirrhosis with human leukocyte antigen DPB1*0501 in Japanese patients. *Hepatology*. 1993;18(1):73-8.
- [123] Onishi S, Sakamaki T, Maeda T, Iwamura S, Tomita A, Saibara T, et al. DNA typing of HLA class II genes; DRB1*0803 increases the susceptibility of Japanese to primary biliary cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 1994;21(6):1053-60.
- [124] Gordon MA, Oppenheim E, Camp NJ, Giovine FSD, Duff GW, Gleeson D. Primary biliary cirrhosis shows association with genetic polymorphism of tumour necrosis factor alpha promoter region. *Journal of Hepatology*. 1999;31(2):242-7.
- [125] Tanaka A, Quaranta S, Mattalia A, Coppel R, Rosina F, Manns M, et al. The tumor necrosis factor-alpha promoter correlates with progression of primary biliary cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 1999;30(5):826-9.

- [126] Dickson ER, Grambsch PM, Fleming TR, Fisher LD, Langworthy A. Prognosis in primary biliary cirrhosis: Model for decision making. *Hepatology*. 1989;10(1):1-7.
- [127] Ranke MB, Saenger P. Turner's syndrome. *Lancet*. 2001;358(9278):309-14.
- [128] Davis CJ, Davison RM, Payne NN, Rodeck CH, Conway GS. Female sex preponderance for idiopathic familial premature ovarian failure suggests an X chromosome defect. *Human Reproduction*. 2000;15(11):2418-22.
- [129] Invernizzi P, Miozzo M, Battezzati PM, Bianchi I, Grati FR, Simoni G, et al. Frequency of monosomy X in women with primary biliary cirrhosis. *Lancet*. 2004 Feb 14;363(9408):533-5.
- [130] Gershwin ME, Selmi C, Worman HJ, Gold EB, Watnik M, Utts J, et al. Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: a controlled interview-based study of 1032 patients. *Hepatology*. 2005 Nov;42(5):1194-202.
- [131] Ala A, Stanca CM, Bu-Ghanim M, Ahmado I, Branch AD, Schiano TD, et al. Increased prevalence of primary biliary cirrhosis near Superfund toxic waste sites. *Hepatology*. 2006 Mar;43(3):525-31.
- [132] McNally RJ, Ducker S, James OF. Are transient environmental agents involved in the cause of primary biliary cirrhosis? Evidence from space-time clustering analysis. *Hepatology*. 2009 Oct;50(4):1169-74.
- [133] Barzilai O, Ram M, Shoenfeld Y. Viral infection can induce the production of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol*. 2007 Nov;19(6):636-43.
- [134] Bogdanos DP, Baum H, Grasso A, Okamoto M, Butler P, Ma Y, et al. Microbial mimics are major targets of crossreactivity with human pyruvate dehydrogenase in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 2004 Jan;40(1):31-9.
- [135] Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature*. 1992 Jul 9;358(6382):155-7.
- [136] Baum H. Mitochondrial antigens, molecular mimicry and autoimmune disease. *Biochim Biophys Acta*. 1995 May 24;1271(1):111-21.
- [137] Klein R, Wiebel M, Engelhart S, Berg PA. Sera from patients with tuberculosis recognize the M2a-epitope (E2-subunit of pyruvate dehydrogenase) specific for primary biliary cirrhosis. *Clinical and Experimental Immunology*. 1993;92(2):308-16.
- [138] Burroughs AK, Rosenstein IJ, Epstein O, Hamilton-Miller JM, Brumfitt W, Sherlock S. Bacteriuria and primary biliary cirrhosis. *Gut*. 1984 Feb;25(2):133-7.
- [139] Hopf U, Moller B, Stemerowicz R, Lobeck H, Rodloff A, Freudenberg M, et al. Relation between *Escherichia coli* R(rough)-forms in gut, lipid A in liver, and primary biliary cirrhosis. *Lancet*. 1989 Dec 16;2(8677):1419-22.
- [140] Butler P, Valle F, Hamilton-Miller JM, Brumfitt W, Baum H, Burroughs AK. M2 mitochondrial antibodies and urinary rough mutant bacteria in patients with primary biliary cirrhosis and in patients with recurrent bacteriuria. *J Hepatol*. 1993 Mar;17(3):408-14.
- [141] Miyakawa H, Tanaka A, Selmi C, Hosoya N, Matakai N, Kikuchi K, et al. Serum reactivity against bacterial pyruvate dehydrogenase: increasing the specificity of anti-mitochondrial antibodies for the diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Clin Dev Immunol*. 2006 Jun-Dec;13(2-4):289-94.
- [142] Shimoda S, Nakamura M, Shigematsu H, Tanimoto H, Gushima T, Gershwin ME, et al. Mimicry peptides of human PDC-E2 163-176 peptide, the immunodominant T-cell epitope of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2000 Jun;31(6):1212-6.
- [143] Tanimoto H, Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Kawano A, Kamihira T, et al. Promiscuous T cells selected by *Escherichia coli*: OGDC-E2 in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*. 2003 May;20(3):255-63.

- [144] Abdulkarim AS, Petrovic LM, Kim WR, Angulo P, Lloyd RV, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis: an infectious disease caused by *Chlamydia pneumoniae*? *J Hepatol*. 2004 Mar;40(3):380-4.
- [145] Taylor-Robinson D, Sharif AW, Dhanjal NS, Taylor-Robinson SD. *Chlamydia pneumoniae* infection is an unlikely cause of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 2005 May;42(5):779-80.
- [146] Bogdanos DP, Baum H, Gunsar F, Arioli D, Polymeros D, Ma Y, et al. Extensive homology between the major immunodominant mitochondrial antigen in primary biliary cirrhosis and *Helicobacter pylori* does not lead to immunological cross-reactivity. *Scand J Gastroenterol*. 2004 Oct;39(10):981-7.
- [147] Durazzo M, Rosina F, Premoli A, Morello E, Fagoonee S, Innarella R, et al. Lack of association between seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection and primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2004 Nov 1;10(21):3179-81.
- [148] Boomkens SY, de Rave S, Pot RG, Egberink HF, Penning LC, Rothuizen J, et al. The role of *Helicobacter* spp. in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005 May 1;44(2):221-5.
- [149] Tanaka A, Prindiville TP, Gish R, Solnick JV, Coppel RL, Keeffe EB, et al. Are infectious agents involved in primary biliary cirrhosis? A PCR approach. *J Hepatol*. 1999 Oct;31(4):664-71.
- [150] Vilagut L, Pares A, Vinas O, Vila J, Jimenez de Anta MT, Rodes J. 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 Aug;27(8):667-72.
- [151] Bogdanos DP, Pares A, Baum H, Caballeria L, Rigopoulou EI, Ma Y, et al. Disease-specific cross-reactivity between mimicking peptides of heat shock protein of *Mycobacterium gordonae* and dominant epitope of E2 subunit of pyruvate dehydrogenase is common in Spanish but not British patients with primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*. 2004 Jun;22(4):353-62.
- [152] O'Donohue J, McFarlane B, Bomford A, Yates M, Williams R. Antibodies to atypical mycobacteria in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 1994 Nov;21(5):887-9.
- [153] Kaplan MM. *Novosphingobium aromaticivorans*: a potential initiator of primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2004 Nov;99(11):2147-9.
- [154] Mattner J, Savage PB, Leung P, Oertelt SS, Wang V, Trivedi O, et al. Liver autoimmunity triggered by microbial activation of natural killer T cells. *Cell Host Microbe*. 2008 May 15;3(5):304-15.
- [155] Ehlers M, Ravetch JV. Opposing effects of Toll-like receptor stimulation induce autoimmunity or tolerance. *Trends Immunol*. 2007 Feb;28(2):74-9.
- [156] Agmon-Levin N, Katz BS, Shoenfeld Y. Infection and primary biliary cirrhosis. *Isr Med Assoc J*. 2009 Feb;11(2):112-5.
- [157] Burek CL, Talor MV. Environmental triggers of autoimmune thyroiditis. *J Autoimmun*. 2009 Nov-Dec;33(3-4):183-9.
- [158] Cooper GS, Bynum ML, Somers EC. Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *J Autoimmun*. 2009 Nov-Dec;33(3-4):197-207.
- [159] Tobon GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. Aug;35(1):10-4.
- [160] Christen U, Jenö P, Gut J. Halothane metabolism: the dihydrolipoamide acetyltransferase subunit of the pyruvate dehydrogenase complex molecularly mimics trifluoroacetyl-protein adducts. *Biochemistry*. 1993 Feb 16;32(6):1492-9.
- [161] Bruggraber SF, Leung PS, Amano K, Quan C, Kurth MJ, Nantz MH, et al. Autoreactivity to lipoate and a conjugated form of lipoate in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2003 Dec;125(6):1705-13.

- [162] Walden HR, Kirby JA, Yeaman SJ, Gray J, Jones DE, Palmer JM. Xenobiotic incorporation into pyruvate dehydrogenase complex can occur via the exogenous lipoylation pathway. *Hepatology*. 2008 Dec;48(6):1874-84.
- [163] Rieger R, Leung PS, Jeddloh MR, Kurth MJ, Nantz MH, Lam KS, et al. Identification of 2-nonynoic acid, a cosmetic component, as a potential trigger of primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*. 2006 Aug;27(1):7-16.
- [164] Leung PS, Park O, Tsuneyama K, Kurth MJ, Lam KS, Ansari AA, et al. Induction of primary biliary cirrhosis in guinea pigs following chemical xenobiotic immunization. *J Immunol*. 2007 Aug 15;179(4):2651-7.
- [165] Wakabayashi K, Yoshida K, Leung PS, Moritoki Y, Yang GX, Tsuneyama K, et al. Induction of autoimmune cholangitis in non-obese diabetic (NOD).1101 mice following a chemical xenobiotic immunization. *Clin Exp Immunol*. 2009 Mar;155(3):577-86.
- [166] Wakabayashi K, Lian ZX, Leung PS, Moritoki Y, Tsuneyama K, Kurth MJ, et al. Loss of tolerance in C57BL/6 mice to the autoantigen E2 subunit of pyruvate dehydrogenase by a xenobiotic with ensuing biliary ductular disease. *Hepatology*. 2008 Aug;48(2):531-40.
- [167] Long SA, Quan C, Van de Water J, Nantz MH, Kurth MJ, Barsky D, et al. Immunoreactivity of organic mimeotopes of the E2 component of pyruvate dehydrogenase: connecting xenobiotics with primary biliary cirrhosis. *J Immunol*. 2001 Sep 1;167(5):2956-63.
- [168] Gershwin ME, Ansari AA, Mackay IR, Nakanuma Y, Nishio A, Rowley MJ, et al. Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells. *Immunol Rev*. 2000 Apr;174:210-25.
- [169] Ahrens EH, Jr., Payne MA, Kunkel HG, Eisenmenger WJ, Blondheim SH. Primary biliary cirrhosis. *Medicine (Baltimore)*. 1950 Dec;29(4):299-364.
- [170] Mackay IR. Primary biliary cirrhosis showing a high titer of autoantibody; report of a case. *N Engl J Med*. 1958 Jan 23;258(4):185-8.
- [171] Walker JG, Doniach D, Roitt IM, Sherlock S. Serological Tests in Diagnosis of Primary Biliary Cirrhosis. *Lancet*. 1965 Apr 17;1(7390):827-31.
- [172] Frazer IH, Mackay IR, Jordan TW, Whittingham S, Marzuki S. Reactivity of anti-mitochondrial autoantibodies in primary biliary cirrhosis: definition of two novel mitochondrial polypeptide autoantigens. *J Immunol*. 1985 Sep;135(3):1739-45.
- [173] Gershwin ME, Mackay IR, Sturgess A, Coppel RL. Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis. *J Immunol*. 1987 May 15;138(10):3525-31.
- [174] Chung L, Utz PJ. Antibodies in scleroderma: direct pathogenicity and phenotypic associations. *Current rheumatology reports*. 2004;6(2):156-63.
- [175] O'Brien C, Joshi S, Feld JJ, Guindi M, Dienes HP, Heathcote EJ. Long-term follow-up of antimitochondrial antibody-positive autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2008;48(2):550-6.
- [176] Liaskos C, Bogdanos DP, Rigopoulou EI, Dalekos GN. Development of antimitochondrial antibodies in patients with autoimmune hepatitis: art of facts or an artifact? *J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Mar;22(3):454-5.
- [177] Montano-Loza AJ, Carpenter HA, Czaja AJ. Frequency, behavior, and prognostic implications of antimitochondrial antibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2008;42(9):1047-53.
- [178] Nardi N, Brito-Zerón P, Ramos-Casals M, Aguiló S, Cervera R, Ingelmo M, et al. Circulating auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens in primary Sjögren's syndrome. *Clinical Rheumatology*. 2006;25(3):341-6.

- [179] Ramos-Casals M, Pares A, Jara LJ, Solans R, Viñas O, Vázquez P, et al. Antimitochondrial antibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection: Description of 18 cases and review of the literature. *Journal of Viral Hepatitis*. 2005;12(6):648-54.
- [180] Mitchison HC, Bassendine MF, Hendrick A. Positive antimitochondrial antibody but normal alkaline phosphatase: Is this primary biliary cirrhosis? *Hepatology*. 1986;6(6):1279-84.
- [181] Metcalf JV, Mitchison HC, Palmer JM, Jones DE, Bassendine MF, James OFW. Natural history of early primary biliary cirrhosis. *Lancet*. 1996;348(9039):1399-402.
- [182] Kisand KE, Metsküla K, Kisand KV, Kivik T, Gershwin ME, Uibo R. The follow-up of asymptomatic persons with antibodies to pyruvate dehydrogenase in adult population samples. *Journal of Gastroenterology*. 2001;36(4):248-54.
- [183] Poupon RE, Balkau B, Eschwege E, Poupon R. A multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. *New England Journal of Medicine*. 1991;324(22):1548-54.
- [184] Benson GD, Kikuchi K, Miyakawa H, Tanaka A, Watnik MR, Gershwin ME. Serial analysis of antimitochondrial antibody in patients with primary biliary cirrhosis. *Clinical and Developmental Immunology*. 2004;11(2):129-33.
- [185] Luettig B, Boeker KHW, Schoessler W, Will H, Loges S, Schmidt E, et al. The antinuclear autoantibodies Sp100 and gp210 persist after orthotopic liver transplantation in patients with primary biliary cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 1998;28(5):824-8.
- [186] Omagari K, Kadokawa Y, Nakamura M, Akazawa S, Ohba K, Ohnita K, et al. IgA class antibodies to 2-oxo-acid dehydrogenase complex are not predictive markers of histopathological progression in primary biliary cirrhosis. *Autoimmunity*. 2006 Mar;39(2):107-12.
- [187] Tanaka A, Nezu S, Uegaki S, Mikami M, Okuyama S, Kawamura N, et al. The clinical significance of IgA antimitochondrial antibodies in sera and saliva in primary biliary cirrhosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007:259-70.
- [188] Gabeta S, Norman GL, Liaskos C, Papamichalis PA, Zografos T, Garagounis A, et al. Diagnostic relevance and clinical significance of the new enhanced performance M2 (MIT3) ELISA for the detection of IgA and IgG antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *J Clin Immunol*. 2007 Jul;27(4):378-87.
- [189] Gatselis NK, Zachou K, Norman GL, Gabeta S, Papamichalis P, Koukoulis GK, et al. Clinical significance of the fluctuation of primary biliary cirrhosis-related autoantibodies during the course of the disease. *Autoimmunity*. 2013 Nov;46(7):471-9.
- [190] Rigopoulou EI, Davies ET, Bogdanos DP, Liaskos C, Mytilinaiou M, Koukoulis GK, et al. Antimitochondrial antibodies of immunoglobulin G3 subclass are associated with a more severe disease course in primary biliary cirrhosis. *Liver International*. 2007;27(9):1226-31.
- [191] Heseltine L, Turner IB, Fussey SPM, Kelly PJ, James OFW, Yeaman SJ, et al. Primary biliary cirrhosis: Quantitation of autoantibodies to purified mitochondrial enzymes and correlation with disease progression. *Gastroenterology*. 1990;99(6):1786-92.
- [192] Christensen E, Crowe J, Doniach D. Clinical pattern and course of disease in primary biliary cirrhosis based on an analysis of 236 patients. *Gastroenterology*. 1980;78(2):236-46.
- [193] Roll J, Boyer JL, Barry D, Klatskin G. The prognostic importance of clinical and histologic features in asymptomatic and symptomatic primary biliary cirrhosis. *New England Journal of Medicine*. 1983;308(1):1-7.
- [194] Van Norstrand MD, Malinchoc M, Lindor KD, Therneau TM, Gershwin ME, Leung PSC, et al. Quantitative measurement of autoantibodies to recombinant mitochondrial

antigens in patients with primary biliary cirrhosis: Relationship of levels of autoantibodies to disease progression. *Hepatology*. 1997;25(1):6-11.

[195] Reed LJ, Hackert ML. Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. *J Biol Chem*. 1990 Jun 5;265(16):8971-4.

[196] Gershwin ME, Mackay IR. Primary biliary cirrhosis: paradigm or paradox for autoimmunity. *Gastroenterology*. 1991 Mar;100(3):822-33.

[197] Van de Water J, Gershwin ME, Leung P, Ansari A, Coppel RL. The autoepitope of the 74-kD mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis corresponds to the functional site of dihydrolipoamide acetyltransferase. *J Exp Med*. 1988 Jun 1;167(6):1791-9.

[198] Yeaman SJ, Fussey SP, Danner DJ, James OF, Mutimer DJ, Bassendine MF. Primary biliary cirrhosis: identification of two major M2 mitochondrial autoantigens. *Lancet*. 1988 May 14;1(8594):1067-70.

[199] Fussey SP, Guest JR, James OF, Bassendine MF, Yeaman SJ. Identification and analysis of the major M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Nov;85(22):8654-8.

[200] Surh CD, Danner DJ, Ahmed A, Coppel RL, Mackay IR, Dickson ER, et al. Reactivity of primary biliary cirrhosis sera with a human fetal liver cDNA clone of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase dihydrolipoamide acyltransferase, the 52 kD mitochondrial autoantigen. *Hepatology*. 1989 Jan;9(1):63-8.

[201] Fregeau DR, Roche TE, Davis PA, Coppel R, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. Inhibition of pyruvate dehydrogenase complex activity by autoantibodies specific for E1 alpha, a non-lipoic acid containing mitochondrial enzyme. *J Immunol*. 1990 Mar 1;144(5):1671-6.

[202] Neagle J, De Marcucci O, Dunbar B, Lindsay JG. Component X of mammalian pyruvate dehydrogenase complex: structural and functional relationship to the lipoate acetyltransferase (E2) component. *FEBS Lett*. 1989 Aug 14;253(1-2):11-5.

[203] Howard MJ, Fuller C, Broadhurst RW, Perham RN, Tang JG, Quinn J, et al. Three-dimensional structure of the major autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 1998 Jul;115(1):139-46.

[204] Surh CD, Coppel R, Gershwin ME. Structural requirement for autoreactivity on human pyruvate dehydrogenase-E2, the major autoantigen of primary biliary cirrhosis. Implication for a conformational autoepitope. *J Immunol*. 1990 May 1;144(9):3367-74.

[205] Surh CD, Ahmed-Ansari A, Gershwin ME. Comparative epitope mapping of murine monoclonal and human autoantibodies to human PDH-E2, the major mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis. *J Immunol*. 1990 Apr 1;144(7):2647-52.

[206] Braun S, Berg C, Buck S, Gregor M, Klein R. Catalytic domain of PDC-E2 contains epitopes recognized by antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol*. Feb 28;16(8):973-81.

[207] Iwayama T, Leung PS, Coppel RL, Roche TE, Patel MS, Mizushima Y, et al. Specific reactivity of recombinant human PDC-E1 alpha in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*. 1991 Oct;4(5):769-78.

[208] Leung PS, Chuang DT, Wynn RM, Cha S, Danner DJ, Ansari A, et al. Autoantibodies to BCOADC-E2 in patients with primary biliary cirrhosis recognize a conformational epitope. *Hepatology*. 1995 Aug;22(2):505-13.

[209] Moteki S, Leung PS, Dickson ER, Van Thiel DH, Galperin C, Buch T, et al. Epitope mapping and reactivity of autoantibodies to the E2 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis using recombinant 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Hepatology*. 1996 Mar;23(3):436-44.

- [210] Palmer JM, Jones DE, Quinn J, McHugh A, Yeaman SJ. Characterization of the autoantibody responses to recombinant E3 binding protein (protein X) of pyruvate dehydrogenase in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1999 Jul;30(1):21-6.
- [211] Dubel L, Tanaka A, Leung PS, Van de Water J, Coppel R, Roche T, et al. Autoepitope mapping and reactivity of autoantibodies to the dihydrolipoamide dehydrogenase-binding protein (E3BP) and the glycine cleavage proteins in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1999 Apr;29(4):1013-8.
- [212] Ishibashi H, Nakamura M, Shimoda S, Gershwin ME. T cell immunity and primary biliary cirrhosis. *Autoimmun Rev*. 2003 Jan;2(1):19-24.
- [213] Moteki S, Leung PS, Coppel RL, Dickson ER, Kaplan MM, Munoz S, et al. Use of a designer triple expression hybrid clone for three different lipoyl domain for the detection of antimitochondrial autoantibodies. *Hepatology*. 1996 Jul;24(1):97-103.
- [214] Quinn J, Diamond AG, Palmer JM, Bassendine MF, James OF, Yeaman SJ. Lipoylated and unlipooylated domains of human PDC-E2 as autoantigens in primary biliary cirrhosis: significance of lipoate attachment. *Hepatology*. 1993 Dec;18(6):1384-91.
- [215] Jensen WA, Jois JA, Murphy P, De Giorgio J, Brown B, Rowley MJ, et al. Automated enzymatic mitochondrial antibody assay for the diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Clin Chem Lab Med*. 2000 Aug;38(8):753-8.
- [216] Hazama H, Omagari K, Masuda J, Kinoshita H, Ohba K, Sakimura K, et al. Serial changes in enzyme inhibitory antibody to pyruvate dehydrogenase complex during the course of primary biliary cirrhosis. *J Clin Lab Anal*. 2000;14(5):208-13.
- [217] Jois J, Omagari K, Rowley MJ, Anderson J, Mackay IR. Enzyme inhibitory antibody to pyruvate dehydrogenase: diagnostic utility in primary biliary cirrhosis. *Ann Clin Biochem*. 2000 Jan;37 (Pt 1):67-73.
- [218] Teoh KL, Rowley MJ, Zafirakis H, Dickson ER, Wiesner RH, Gershwin ME, et al. Enzyme inhibitory autoantibodies to pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: applications of a semiautomated assay. *Hepatology*. 1994 Nov;20(5):1220-4.
- [219] Teoh KL, Mackay IR, Rowley MJ, Fussey SP. Enzyme inhibitory autoantibodies to pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis differ for mammalian, yeast and bacterial enzymes: implications for molecular mimicry. *Hepatology*. 1994 Apr;19(4):1029-33.
- [220] Thekkumkara TJ, Jesse BW, Ho L, Raefsky C, Pepin RA, Javed AA, et al. Isolation of a cDNA clone for the dihydrolipoamide acetyltransferase component of the human liver pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987 Jun 15;145(2):903-7.
- [221] Griffin TA, Wynn RM, Chuang DT. Expression and assembly of mature apotransacylase (E2b) of bovine branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex in *Escherichia coli*. Demonstration of transacylase activity and modification by lipoylation. *J Biol Chem*. 1990 Jul 15;265(20):12104-10.
- [222] Lau KS, Griffin TA, Hu CW, Chuang DT. Conservation of primary structure in the lipoyl-bearing and dihydrolipoyl dehydrogenase binding domains of mammalian branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex: molecular cloning of human and bovine transacylase (E2) cDNAs. *Biochemistry*. 1988 Mar 22;27(6):1972-81.
- [223] Nakano K, Matuda S, Sakamoto T, Takase C, Nakagawa S, Ohta S, et al. Human dihydrolipoamide succinyltransferase: cDNA cloning and localization on chromosome 14q24.2-q24.3. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Dec 14;1216(3):360-8.
- [224] Nakano K, Matuda S, Yamanaka T, Tsubouchi H, Nakagawa S, Titani K, et al. Purification and molecular cloning of succinyltransferase of the rat alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex. Absence of a sequence motif of the putative E3 and/or E1 binding site. *J Biol Chem*. 1991 Oct 5;266(28):19013-7.

- [225] Dahl HH, Hunt SM, Hutchison WM, Brown GK. The human pyruvate dehydrogenase complex. Isolation of cDNA clones for the E1 alpha subunit, sequence analysis, and characterization of the mRNA. *J Biol Chem*. 1987 May 25;262(15):7398-403.
- [226] De Meirleir L, MacKay N, Lam Hon Wah AM, Robinson BH. Isolation of a full-length complementary DNA coding for human E1 alpha subunit of the pyruvate dehydrogenase complex. *J Biol Chem*. 1988 Feb 5;263(4):1991-5.
- [227] Koike K, Ohta S, Urata Y, Kagawa Y, Koike M. Cloning and sequencing of cDNAs encoding alpha and beta subunits of human pyruvate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jan;85(1):41-5.
- [228] Leung PS, Iwayama T, Coppel RL, Gershwin ME. Site-directed mutagenesis of lysine within the immunodominant autoepitope of PDC-E2. *Hepatology*. 1990 Dec;12(6):1321-8.
- [229] Roche TE, Cate RL. Purification of porcine liver pyruvate dehydrogenase complex and characterization of its catalytic and regulatory properties. *Arch Biochem Biophys*. 1977 Oct;183(2):664-77.
- [230] Provenzano G, Diquattro O, Craxi A, Almasio P, Pinzello G, Marino L, et al. Immunoblotting as a confirmatory test for antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *Gut*. 1993 Apr;34(4):544-8.
- [231] Charles PJ, van Venrooij WJ, Maini RN. The Consensus Workshops for the Detection of Autoantibodies to Intracellular Antigens in Rheumatic Diseases: 1989-1992. *Clin Exp Rheumatol*. 1992 Sep-Oct;10(5):507-11.
- [232] Teoh KL, Rowley MJ, Mackay IR. An automated microassay for enzyme inhibitory effects of M2 antibodies in primary biliary cirrhosis. *Liver*. 1991 Oct;11(5):287-91.
- [233] Dahnrich C, Pares A, Caballeria L, Rosemann A, Schlumberger W, Probst C, et al. New ELISA for detecting primary biliary cirrhosis-specific antimitochondrial antibodies. *Clin Chem*. 2009 May;55(5):978-85.
- [234] Liu H, Norman GL, Shums Z, Worman HJ, Krawitt EL, Bizzaro N, et al. PBC screen: an IgG/IgA dual isotype ELISA detecting multiple mitochondrial and nuclear autoantibodies specific for primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*. 2010 Dec;35(4):436-42.
- [235] Bogdanos DP, Komorowski L. Disease-specific autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Clin Chim Acta*. Mar 18;412(7-8):502-12.
- [236] Krams SM, Surh CD, Coppel RL, Ansari A, Ruebner B, Gershwin ME. Immunization of experimental animals with dihydrolipoamide acetyltransferase, as a purified recombinant polypeptide, generates mitochondrial antibodies but not primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1989 Mar;9(3):411-6.
- [237] Hannam S, Bogdanos DP, Davies ET, Hussain MJ, Portmann BC, Mieli-Vergani G, et al. Neonatal liver disease associated with placental transfer of anti-mitochondrial antibodies. *Autoimmunity*. 2002 Dec;35(8):545-50.
- [238] Van de Water J, Turchany J, Leung PS, Lake J, Munoz S, Surh CD, et al. Molecular mimicry in primary biliary cirrhosis. Evidence for biliary epithelial expression of a molecule cross-reactive with pyruvate dehydrogenase complex-E2. *J Clin Invest*. 1993 Jun;91(6):2653-64.
- [239] Lleo A, Invernizzi P, Mackay IR, Prince H, Zhong RQ, Gershwin ME. Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2008 Jun 7;14(21):3328-37.
- [240] Doniach D, Roitt IM, Walker JG, Sherlock S. Tissue antibodies in primary biliary cirrhosis, active chronic (lupoid) hepatitis, cryptogenic cirrhosis and other liver diseases and their clinical implications. *Clin Exp Immunol*. 1966 Jul;1(3):237-62.

- [241] Bernstein RM, Neuberger JM, Bunn CC, Callender ME, Hughes GR, Williams R. Diversity of autoantibodies in primary biliary cirrhosis and chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol.* 1984 Mar;55(3):553-60.
- [242] Kurki P, Gripenberg M, Teppo AM, Salaspuro M. Profiles of antinuclear antibodies in chronic active hepatitis, primary biliary cirrhosis and alcoholic liver disease. *Liver.* 1984 Apr;4(2):134-8.
- [243] Agmon-Levin N, Shapira Y, Selmi C, Barzilai O, Ram M, Szyper-Kravitz M, et al. A comprehensive evaluation of serum autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* Feb;34(1):55-8.
- [244] Muratori P, Muratori L, Ferrari R, Cassani F, Bianchi G, Lenzi M, et al. Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2003 Feb;98(2):431-7.
- [245] Granito A, Muratori P, Quarneri C, Pappas G, Cicola R, Muratori L. Antinuclear antibodies as ancillary markers in primary biliary cirrhosis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2012 Jan;12(1):65-74.
- [246] Yang WH, Yu JH, Nakajima A, Neuberger D, Lindor K, Bloch DB. Do antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis patients identify increased risk for liver failure? *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004 Dec;2(12):1116-22.
- [247] Marasini B, Gagetta M, Rossi V, Ferrari P. Rheumatic disorders and primary biliary cirrhosis: an appraisal of 170 Italian patients. *Ann Rheum Dis.* 2001 Nov;60(11):1046-9.
- [248] Rimmel T, Piirsoo A, Koiveer A, Rimmel H, Uibo R, Salupere V. Clinical significance of different antinuclear antibodies patterns in the course of primary biliary cirrhosis. *HepatoGastroenterology.* 1996 Sep-Oct;43(11):1135-40.
- [249] Szostecki C, Guldner HH, Netter HJ, Will H. Isolation and characterization of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. *J Immunol.* 1990 Dec 15;145(12):4338-47.
- [250] Szostecki C, Will H, Netter HJ, Guldner HH. Autoantibodies to the nuclear Sp100 protein in primary biliary cirrhosis and associated diseases: epitope specificity and immunoglobulin class distribution. *Scand J Immunol.* 1992 Oct;36(4):555-64.
- [251] Sternsdorf T, Guldner HH, Szostecki C, Grotzinger T, Will H. Two nuclear dot-associated proteins, PML and Sp100, are often co-autoimmunogenic in patients with primary biliary cirrhosis. *Scand J Immunol.* 1995 Aug;42(2):257-68.
- [252] Szostecki C, Guldner HH, Will H. Autoantibodies against "nuclear dots" in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis.* 1997 Feb;17(1):71-8.
- [253] Bluthner M, Schafer C, Schneider C, Bautz FA. Identification of major linear epitopes on the sp100 nuclear PBC autoantigen by the gene-fragment phage-display technology. *Autoimmunity.* 1999;29(1):33-42.
- [254] Evans J, Reuben A, Craft J. PBC 95k, a 95-kilodalton nuclear autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Arthritis Rheum.* 1991 Jun;34(6):731-6.
- [255] Rigopoulou EI, Davies ET, Pares A, Zachou K, Liaskos C, Bogdanos DP, et al. Prevalence and clinical significance of isotype specific antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Gut.* 2005 Apr;54(4):528-32.
- [256] Zuchner D, Sternsdorf T, Szostecki C, Heathcote EJ, Cauch-Dudek K, Will H. Prevalence, kinetics, and therapeutic modulation of autoantibodies against Sp100 and promyelocytic leukemia protein in a large cohort of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 1997 Nov;26(5):1123-30.
- [257] Granito A, Yang WH, Muratori L, Lim MJ, Nakajima A, Ferri S, et al. PML nuclear body component Sp140 is a novel autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2010 Jan;105(1):125-31.

- [258] Ruffatti A, Arslan P, Floreani A, De Silvestro G, Calligaro A, Naccarato R, et al. Nuclear membrane-staining antinuclear antibody in patients with primary biliary cirrhosis. *J Clin Immunol*. 1985 Sep;5(5):357-61.
- [259] Lassoued K, Guilly MN, Andre C, Paintrand M, Dhumeaux D, Danon F, et al. Autoantibodies to 200 kD polypeptide(s) of the nuclear envelope: a new serologic marker of primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol*. 1988 Nov;74(2):283-8.
- [260] Lozano F, Pares A, Borche L, Plana M, Gallart T, Rodes J, et al. Autoantibodies against nuclear envelope-associated proteins in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1988 Jul-Aug;8(4):930-8.
- [261] Lassoued K, Brenard R, Degos F, Courvalin JC, Andre C, Danon F, et al. Antinuclear antibodies directed to a 200-kilodalton polypeptide of the nuclear envelope in primary biliary cirrhosis. A clinical and immunological study of a series of 150 patients with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 1990 Jul;99(1):181-6.
- [262] Courvalin JC, Lassoued K, Bartnik E, Blobel G, Wozniak RW. The 210-kD nuclear envelope polypeptide recognized by human autoantibodies in primary biliary cirrhosis is the major glycoprotein of the nuclear pore. *J Clin Invest*. 1990 Jul;86(1):279-85.
- [263] Nickowitz RE, Wozniak RW, Schaffner F, Worman HJ. Autoantibodies against integral membrane proteins of the nuclear envelope in patients with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 1994 Jan;106(1):193-9.
- [264] Nickowitz RE, Worman HJ. Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis recognize a restricted region within the cytoplasmic tail of nuclear pore membrane glycoprotein Gp210. *J Exp Med*. 1993 Dec 1;178(6):2237-42.
- [265] Bandin O, Courvalin JC, Poupon R, Dubel L, Homberg JC, Johanet C. 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 May;23(5):1020-4.
- [266] Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y, Komori A, Yokoyama T, Ueki T, et al. Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 2005 Mar;42(3):386-92.
- [267] Wesierska-Gadek J, Hohenauer H, Hitchman E, Penner E. Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis preferentially react with the amino-terminal domain of nuclear pore complex glycoprotein gp210. *J Exp Med*. 1995 Oct 1;182(4):1159-62.
- [268] Bjorkland A, Festin R, Mendel-Hartvig I, Nyberg A, Loof L, Totterman TH. Blood and liver-infiltrating lymphocytes in primary biliary cirrhosis: Increase in activated T and natural killer cells and recruitment of primed memory T cells. *Hepatology*. 1991;13(6):1106-11.
- [269] Floreani A, Bennett MK, Mitchison HC, McLachlan SM, Bassendine MF, James OF. Progression of autoimmune damage in primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical study. *Autoimmunity*. 1989;2(4):311-21.
- [270] Van den Oord JJ, Sciort R, Desmet VJ. Expression of MHC products by normal and abnormal bile duct epithelium. *J Hepatol*. 1986;3(3):310-7.
- [271] Jones DE, Palmer JM, James OF, Yeaman SJ, Bassendine MF, Diamond AG. T-cell responses to the components of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1995 Apr;21(4):995-1002.
- [272] Selmi C, Mackay IR, Gershwin ME. The immunological milieu of the liver. *Seminars in Liver Disease*. 2007;27(2):129-39.
- [273] Racanelli V, Rehmann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology*. 2006;43(2 SUPPL. 1):S54-S62.
- [274] Wisse E. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *Journal of Ultrastructure Research*. 1970;31(1-2):125-50.

- [275] Knolle PA, Limmer A. Neighborhood politics: The immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells. *Trends in Immunology*. 2001;22(8):432-7.
- [276] Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: Linking innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection*. 2004;6(15):1382-7.
- [277] Lang KS, Burow A, Kurrer M, Lang PA, Recher M. The role of the innate immune response in autoimmune disease. *Journal of Autoimmunity*. 2007;29(4):206-12.
- [278] Papadimitraki ED, Bertias GK, Boumpas DT. Toll like receptors and autoimmunity: A critical appraisal. *Journal of Autoimmunity*. 2007;29(4):310-8.
- [279] Agrawal S, Kandimalla ER. Modulation of Toll-like Receptor 9 Responses through Synthetic Immunostimulatory Motifs of DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003:30-42.
- [280] Kikuchi K, Lian ZX, Yang GX, Ansari AA, Ikehara S, Kaplan M, et al. Bacterial CpG induces hyper-IgM production in CD27+ memory B cells in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2005;128(2):304-12.
- [281] Moritoki Y, Lian ZX, Wulff H, Yang GX, Chuang YH, Lan RY, et al. AMA production in primary biliary cirrhosis is promoted by the TLR9 ligand CpG and suppressed by potassium channel blockers. *Hepatology*. 2007;45(2):314-22.
- [282] Mao TK, Lian ZX, Selmi C, Ichiki Y, Ashwood P, Ansari AA, et al. Altered monocyte responses to defined TLR ligands in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2005;42(4):802-8.
- [283] Chuang YH, Lian ZX, Tsuneyama K, Chiang BL, Ansari AA, Coppel RL, et al. Increased killing activity and decreased cytokine production in NK cells in patients with primary biliary cirrhosis. *Journal of Autoimmunity*. 2006;26(4):232-40.
- [284] Salazar-Mather TP, Hokeness KL. Calling in the troops: Regulation of inflammatory cell trafficking through innate cytokine/chemokine networks. *Viral Immunology*. 2003;16(3):291-306.
- [285] Knight AK, Cunningham-Rundles C. Inflammatory and autoimmune complications of common variable immune deficiency. *Autoimmun Rev*. 2006 Feb;5(2):156-9.
- [286] Tsuneyama K, Harada K, Kono N, Hiramatsu K, Zen Y, Sudo Y, et al. Scavenger cells with Gram-positive bacterial lipoteichoic acid infiltrate around the damaged interlobular bile ducts of primary biliary cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2001;35(2):156-63.
- [287] Harada K, Isse K, Tsuneyama K, Ohta H, Nakanuma Y. Accumulating CD57+CD3+ natural killer T cells are related to intrahepatic bile duct lesions in primary biliary cirrhosis. *Liver International*. 2003;23(2):94-100.
- [288] Harada K, Van De Water J, Leung PSC, Coppel RL, Ansari A, Nakanuma Y, et al. In situ nucleic acid hybridization of cytokines in primary biliary cirrhosis: Predominance of the Th1 subset. *Hepatology*. 1997;25(4):791-6.
- [289] Lohr HF, Schlaak JF, Gerken G, Fleischer B, Dienes HP, Meyer zum Buschenfelde KH. Phenotypical analysis and cytokine release of liver-infiltrating and peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis of different etiology. *Liver*. 1994;14(3):161-6.
- [290] Martinez OM, Villanueva JC, Gershwin ME, Krams SM. Cytokine patterns and cytotoxic mediators in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1995;21(1):113-9.
- [291] Nagano T, Yamamoto K, Matsumoto S, Okamoto R, Tagashira M, Ibuki N, et al. Cytokine profile in the liver of primary biliary cirrhosis. *Journal of Clinical Immunology*. 1999;19(6):422-7.
- [292] Shindo M, Mullin GE, Braun-Elwert L, Bergasa NV, Jones EA, James SP. Cytokine mRNA expression in the liver of patients with primary biliary cirrhosis (PBC)

- and chronic hepatitis B (CHB). *Clinical and Experimental Immunology*. 1996;105(2):254-9.
- [293] Parikh-Patel A, Gold EB, Worman H, Krivy KE, Gershwin ME. Risk factors for primary biliary cirrhosis in a cohort of patients from the United States. *Hepatology*. 2001;33(1):16-21.
- [294] Matsuno K, Ezaki T. Dendritic cell dynamics in the liver and hepatic lymph. *International Review of Cytology* 2000:83-136.
- [295] Dikopoulos N, Wegenka U, Krüger A, Hauser H, Schirmbeck R, Reimann J. Recently Primed CD8+ T Cells Entering the Liver Induce Hepatocytes to Interact with naïve CD8+ T Cells in the Mouse. *Hepatology*. 2004;39(5):1256-66.
- [296] Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LAJ. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(6):446-58.
- [297] Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297-336.
- [298] Chuang YH, Lian ZX, Yang GX, Shu SA, Moritoki Y, Ridgway WM, et al. Natural killer T cells exacerbate liver injury in a transforming growth factor beta receptor II dominant-negative mouse model of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2008;47(2):571-80.
- [299] Shimoda S, Harada K, Niino H, Shirabe K, Taketomi A, Maehara Y, et al. Interaction between Toll-like receptors and natural killer cells in the destruction of bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. Apr;53(4):1270-81.
- [300] Tsuneyama K, Van de Water J, Leung PS, Cha S, Nakanuma Y, Kaplan M, et al. 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 Apr;21(4):1031-7.
- [301] Tanimoto K, Akbar F, Michitaka K, Onji M. Immunohistochemical localization of antigen presenting cells in liver from patients with primary biliary cirrhosis; Highly restricted distribution of CD83-positive activated dendritic cells. *Pathology Research and Practice*. 1999;195(3):157-62.
- [302] Akbar SMF, Yamamoto K, Miyakawa H, Ninomiya T, Abe M, Hiasa Y, et al. Peripheral blood T-cell responses to pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: Role of antigen-presenting dendritic cells. *European Journal of Clinical Investigation*. 2001;31(7):639-46.
- [303] Silberberg I, Baer RL, Rosenthal SA. The role of Langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pigs. *J Invest Dermatol*. 1976 Apr;66(4):210-7.
- [304] Boor PP, Ijzermans JN, van der Molen RG, Binda R, Mancham S, Metselaar HJ, et al. Immunomagnetic selection of functional dendritic cells from human lymph nodes. *Immunol Lett*. 2005 Jul 15;99(2):162-8.
- [305] Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med*. 2001 Dec 17;194(12):1823-34.
- [306] de Witte L, Nabatov A, Pion M, Fluittsma D, de Jong MA, de Gruijl T, et al. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med*. 2007 Mar;13(3):367-71.
- [307] Dieu-Nosjean MC, Massacrier C, Homey B, Vanbervliet B, Pin JJ, Vicari A, et al. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med*. 2000 Sep 4;192(5):705-18.

- [308] Liao F, Rabin RL, Smith CS, Sharma G, Nutman TB, Farber JM. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *J Immunol.* 1999 Jan 1;162(1):186-94.
- [309] Harada K, Shimoda S, Ikeda H, Chiba M, Hsu M, Sato Y, et al. Significance of periductal Langerhans cells and biliary epithelial cell-derived macrophage inflammatory protein-3alpha in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Liver Int.* Feb;31(2):245-53.
- [310] Nakanuma Y, Kono N. Expression of HLA-DR antigens on interlobular bile ducts in primary biliary cirrhosis and other hepatobiliary diseases: an immunohistochemical study. *Hum Pathol.* 1991 May;22(5):431-6.
- [311] Spengler U, Leifeld L, Braunschweiger I, Dumoulin FL, Lechmann M, Sauerbruch T. Anomalous expression of costimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28 in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 1997 Jan;26(1):31-6.
- [312] Markovic-Plese S, Cortese I, Wandinger KP, McFarland HF, Martin R. CD4+CD28- costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2001 Oct;108(8):1185-94.
- [313] Schirmer M, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. Resistance to apoptosis and elevated expression of Bcl-2 in clonally expanded CD4+CD28- T cells from rheumatoid arthritis patients. *J Immunol.* 1998 Jul 15;161(2):1018-25.
- [314] Vallejo AN, Schirmer M, Weyand CM, Goronzy JJ. Clonality and longevity of CD4+CD28null T cells are associated with defects in apoptotic pathways. *J Immunol.* 2000 Dec 1;165(11):6301-7.
- [315] Kamihira T, Shimoda S, Harada K, Kawano A, Handa M, Baba E, et al. Distinct costimulation dependent and independent autoreactive T-cell clones in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology.* 2003 Nov;125(5):1379-87.
- [316] Vergani D, Bogdanos DP, Baum H. Unusual suspects in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2004 Jan;39(1):38-41.
- [317] Vergani D, Choudhuri K, Bogdanos DP, Mieli-Vergani G. Pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Clin Liver Dis.* 2002 Aug;6(3):727-37.
- [318] Lohr H, Fleischer B, Gerken G, Yeaman SJ, Meyer zum Buschenfelde KH, Manns M. Autoreactive liver-infiltrating T cells in primary biliary cirrhosis recognize inner mitochondrial epitopes and the pyruvate dehydrogenase complex. *J Hepatol.* 1993 Jul;18(3):322-7.
- [319] Van De Water J, Ansari A, Prindiville T, Coppel RL, Ricalton N, Kotzin BL, et al. Heterogeneity of autoreactive T cell clones specific for the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis. *Journal of Experimental Medicine.* 1995;181(2):723-33.
- [320] Van De Water J, Ansari AA, Surh CD, Coppel R, Roche T, Bonkovsky H, et al. Evidence for the targeting by 2-oxo-dehydrogenase enzymes in the T cell response of primary biliary cirrhosis. *Journal of Immunology.* 1991;146(1):89-94.
- [321] Jones DE, Palmer JM, Yeaman SJ, Bassendine MF, Diamond AG. T cell responses to natural human proteins in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol.* 1997 Mar;107(3):562-8.
- [322] Berg PA, Klein R, Röcken M. Cytokines in primary biliary cirrhosis. *Seminars in Liver Disease.* 1997;17(2):115-23.
- [323] Yasoshima M, Kono N, Sugawara H, Katayanagi K, Harada K, Nakanuma Y. Increased expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in pathologic biliary epithelial cells: in situ and culture study. *Lab Invest.* 1998 Jan;78(1):89-100.

- [324] Hoffmann RM, Pape GR, Spengler U, Rieber EP, Eisenburg J, Dohrmann J, et al. Clonal analysis of liver-derived T cells of patients with primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol*. 1989 May;76(2):210-5.
- [325] Moebius U, Manns M, Hess G, Kober G, Meyer zum Buschenfelde KH, Meuer SC. T cell receptor gene rearrangements of T lymphocytes infiltrating the liver in chronic active hepatitis B and primary biliary cirrhosis (PBC): oligoclonality of PBC-derived T cell clones. *Eur J Immunol*. 1990 Apr;20(4):889-96.
- [326] Shimoda S, Van de Water J, Ansari A, Nakamura M, Ishibashi H, Coppel RL, et al. Identification and precursor frequency analysis of a common T cell epitope motif in mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest*. 1998 Nov 15;102(10):1831-40.
- [327] Chou YK, Bourdette DN, Offner H, Whitham R, Wang RY, Hashim GA, et al. Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 1992;38(1-2):105-14.
- [328] Cohen IR, Hershberg U, Solomon S. Antigen-receptor degeneracy and immunological paradigms. *Mol Immunol*. 2004 Feb;40(14-15):993-6.
- [329] Holler PD, Kranz DM. T cell receptors: affinities, cross-reactivities, and a conformer model. *Mol Immunol*. 2004 Feb;40(14-15):1027-31.
- [330] Mason D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today*. 1998 Sep;19(9):395-404.
- [331] Shigematsu H, Shimoda S, Nakamura M, Matsushita S, Nishimura Y, Sakamoto N, et al. Fine specificity of T cells reactive to human PDC-E2 163-176 peptide, the immunodominant autoantigen in primary biliary cirrhosis: implications for molecular mimicry and cross-recognition among mitochondrial autoantigens. *Hepatology*. 2000 Nov;32(5):901-9.
- [332] Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Kawano A, Kamihira T, Sakamoto N, et al. Molecular mimicry of mitochondrial and nuclear autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2003 Jun;124(7):1915-25.
- [333] Gallegos AM, Bevan MJ. Central tolerance: good but imperfect. *Immunol Rev*. 2006 Feb;209:290-6.
- [334] Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006 Apr;6(4):295-307.
- [335] Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:139-76.
- [336] Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-62.
- [337] Scholz C, Patton KT, Anderson DE, Freeman GJ, Hafler DA. Expansion of autoreactive T cells in multiple sclerosis is independent of exogenous B7 costimulation. *J Immunol*. 1998 Feb 1;160(3):1532-8.
- [338] Lovett-Racke AE, Trotter JL, Lauber J, Perrin PJ, June CH, Racke MK. Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28-mediated costimulation in multiple sclerosis patients. A marker of activated/memory T cells. *J Clin Invest*. 1998 Feb 15;101(4):725-30.
- [339] Viglietta V, Kent SC, Orban T, Hafler DA. GAD65-reactive T cells are activated in patients with autoimmune type 1a diabetes. *J Clin Invest*. 2002 Apr;109(7):895-903.
- [340] Shimoda S, Ishikawa F, Kamihira T, Komori A, Niuro H, Baba E, et al. Autoreactive T-cell responses in primary biliary cirrhosis are proinflammatory whereas those of controls are regulatory. *Gastroenterology*. 2006 Aug;131(2):606-18.

- [341] Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlén C, Goverman J. A pathogenic role for myelin-specific CD8+ T cells in a model for multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*. 2001;194(5):669-76.
- [342] Sun D, Whitaker JN, Huang Z, Liu D, Coleclough C, Wekerle H, et al. Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *Journal of Immunology*. 2001;166(12):7579-87.
- [343] Wong FS, Karttunen J, Dumont C, Wen L, Visintin I, Pilip IM, et al. Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nature Medicine*. 1999;5(9):1026-31.
- [344] Link H, Sun JB, Wang Z, Xu Z, Love A, Fredrikson S, et al. Virus-reactive and autoreactive T cells are accumulated in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 1992;38(1-2):63-74.
- [345] Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, Raus J, Weiner HL, Hafler DA. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*. 1994;179(3):973-84.
- [346] Kita H, Matsumura S, He XS, Ansari AA, Lian ZX, Van de Water J, et al. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest*. 2002 May;109(9):1231-40.
- [347] Brocke S, Gijbels K, Allegretta M, Ferber I, Piercy C, Blankenstein T, et al. Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein. *Nature*. 1996;379(6563):343-6.
- [348] Kubota R, Soldan SS, Martin R, Jacobson S. An altered peptide ligand antagonizes antigen-specific T cells of patients with human T lymphotropic virus type I-associated neurological disease. *Journal of Immunology*. 2000;164(10):5192-8.
- [349] Kuchroo VK, Greer JM, Kaul D, Ishioka G, Franco A, Sette A, et al. A single TCR antagonist peptide inhibits experimental allergic encephalomyelitis mediated by a diverse T cell repertoire. *Journal of Immunology*. 1994;153(7):3326-36.
- [350] Nicholson LB, Greer JM, Sobel RA, Lees MB, Kuchroo VK. An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*. 1995;3(4):397-405.
- [351] Sloan-Lancaster J, Allen PM. Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: Molecular mechanisms and role in T cell biology. *Annual Review of Immunology* 1996:1-27.
- [352] Vergelli M, Hemmer B, Utz U, Vogt A, Kalbus M, Tranquill L, et al. Differential activation of human autoreactive T cell clones by altered peptide ligands derived from myelin basic protein peptide (87-99). *European Journal of Immunology*. 1996;26(11):2624-34.
- [353] Windhagen A, Scholz C, Hollsberg P, Fukaura H, Sette A, Hafler DA. Modulation of cytokine patterns of human autoreactive T cell clones by a single amino acid substitution of their peptide ligand. *Immunity*. 1995;2(4):373-80.
- [354] Kita H, Matsumura S, He XS, Ansari AA, Lian ZX, Van de Water J, et al. Analysis of TCR antagonism and molecular mimicry of an HLA-A0201-restricted CTL epitope in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2002 Oct;36(4 Pt 1):918-26.
- [355] Sasaki M, Ikeda H, Sawada S, Sato Y, Nakanuma Y. Naturally-occurring regulatory T cells are increased in inflamed portal tracts with cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *J Clin Pathol*. 2007 Oct;60(10):1102-7.
- [356] Rong G, Zhou Y, Xiong Y, Zhou L, Geng H, Jiang T, et al. Imbalance between T helper type 17 and T regulatory cells in patients with primary biliary cirrhosis: the serum cytokine profile and peripheral cell population. *Clin Exp Immunol*. 2009 May;156(2):217-25.

- [357] Bernuzzi F, Fenoglio D, Battaglia F, Fravega M, Gershwin ME, Indiveri F, et al. Phenotypical and functional alterations of CD8 regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* Nov;35(3):176-80.
- [358] Tison V, Callea F, Morisi C, Mancini AM, Desmet VJ. Spontaneous "primary biliary cirrhosis" in rabbits. *Liver.* 1982 Jun;2(2):152-61.
- [359] Hayashi Y, Utsuyama M, Kurashima C, Hirokawa K. Spontaneous development of organ-specific autoimmune lesions in aged C57BL/6 mice. *Clin Exp Immunol.* 1989 Oct;78(1):120-6.
- [360] Okada C, Akbar SM, Horiike N, Onji M. Early development of primary biliary cirrhosis in female C57BL/6 mice because of poly I:C administration. *Liver Int.* 2005 Jun;25(3):595-603.
- [361] Irie J, Wu Y, Wicker LS, Rainbow D, Nalesnik MA, Hirsch R, et al. NOD.c3c4 congenic mice develop autoimmune biliary disease that serologically and pathogenetically models human primary biliary cirrhosis. *J Exp Med.* 2006 May 15;203(5):1209-19.
- [362] Kanda K, Onji M, Ohta Y. Spontaneous occurrence of autoimmune cholangitis in senescent mice. *J Gastroenterol Hepatol.* 1993 Jan-Feb;8(1):7-14.
- [363] Macdonald P, Palmer J, Kirby JA, Jones DE. Apoptosis as a mechanism for cell surface expression of the autoantigen pyruvate dehydrogenase complex. *Clin Exp Immunol.* 2004 Jun;136(3):559-67.
- [364] Ueno Y, Phillips JO, Ludwig J, Lichtman SN, LaRusso NF. Development and characterization of a rodent model of immune-mediated cholangitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jan 9;93(1):216-20.
- [365] Kobashi H, Yamamoto K, Yoshioka T, Tomita M, Tsuji T. Nonsuppurative cholangitis is induced in neonatally thymectomized mice: a possible animal model for primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 1994 Jun;19(6):1424-30.
- [366] Sadlack B, Lohler J, Schorle H, Klebb G, Haber H, Sickel E, et al. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 1995 Nov;25(11):3053-9.
- [367] Wakabayashi K, Lian ZX, Moritoki Y, Lan RY, Tsuneyama K, Chuang YH, et al. IL-2 receptor alpha(-/-) mice and the development of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2006 Nov;44(5):1240-9.
- [368] Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* 2000 May 26;101(5):455-8.
- [369] Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jul;8(7):523-32.
- [370] Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):68-73.
- [371] Godfrey VL, Wilkinson JE, Russell LB. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am J Pathol.* 1991 Jun;138(6):1379-87.
- [372] Zhang W, Sharma R, Ju ST, He XS, Tao Y, Tsuneyama K, et al. Deficiency in regulatory T cells results in development of antimicrobial antibodies and autoimmune cholangitis. *Hepatology.* 2009 Feb;49(2):545-52.
- [373] Green EA, Gorelik L, McGregor CM, Tran EH, Flavell RA. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 16;100(19):10878-83.
- [374] Chuang YH, Lian ZX, Cheng CM, Lan RY, Yang GX, Moritoki Y, et al. Increased levels of chemokine receptor CXCR3 and chemokines IP-10 and MIG in patients with

primary biliary cirrhosis and their first degree relatives. *J Autoimmun.* 2005 Sep;25(2):126-32.

[375] Furlan R, Bergami A, Cantarella D, Brambilla E, Taniguchi M, Dellabona P, et al. Activation of invariant NKT cells by alphaGalCer administration protects mice from MOG35-55-induced EAE: critical roles for administration route and IFN-gamma. *Eur J Immunol.* 2003 Jul;33(7):1830-8.

[376] Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Mi QS, Sondhi J, Naidenko OV, et al. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat Med.* 2001 Sep;7(9):1057-62.

[377] Taniguchi M, Tashiro T, Dashtsoodol N, Hongo N, Watarai H. The specialized iNKT cell system recognizes glycolipid antigens and bridges the innate and acquired immune systems with potential applications for cancer therapy. *Int Immunol.* Jan;22(1):1-6.

[378] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):770-6.

[379] Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature.* 1994 Nov 3;372(6501):100-3.

[380] Huang FP, Platt N, Wykes M, Major JR, Powell TJ, Jenkins CD, et al. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med.* 2000 Feb 7;191(3):435-44.

[381] Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med.* 2000 Feb 7;191(3):423-34.

[382] Miller JF, Kurts C, Allison J, Kosaka H, Carbone F, Heath WR. Induction of peripheral CD8+ T-cell tolerance by cross-presentation of self antigens. *Immunol Rev.* 1998 Oct;165:267-77.

[383] Mahoney JA, Rosen A. Apoptosis and autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2005 Dec;17(6):583-8.

[384] Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell.* Mar 5;140(5):619-30.

[385] Ravichandran KS, Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol.* 2007 Dec;7(12):964-74.

[386] Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2002 Dec;2(12):965-75.

[387] Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med.* 1994 Apr 1;179(4):1317-30.

[388] Cheken FB, Ravichandran KS. The role of nucleotides in apoptotic cell clearance: implications for disease pathogenesis. *J Mol Med.* Jan;89(1):13-22.

[389] Munoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol.* May;6(5):280-9.

[390] Utz PJ, Gensler TJ, Anderson P. Death, autoantigen modifications, and tolerance. *Arthritis Res.* 2000;2(2):101-14.

[391] Casciola-Rosen LA, Anhalt GJ, Rosen A. DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis. *J Exp Med.* 1995 Dec 1;182(6):1625-34.

[392] Casiano CA, Martin SJ, Green DR, Tan EM. Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis. *J Exp Med.* 1996 Aug 1;184(2):765-70.

- [393] Odin JA, Huebert RC, Casciola-Rosen L, LaRusso NF, Rosen A. Bcl-2-dependent oxidation of pyruvate dehydrogenase-E2, a primary biliary cirrhosis autoantigen, during apoptosis. *J Clin Invest*. 2001 Jul;108(2):223-32.
- [394] Lleo A, Selmi C, Invernizzi P, Podda M, Coppel RL, Mackay IR, et al. Apoptoses and the biliary specificity of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2009 Mar;49(3):871-9.
- [395] Lleo A, Bowlus CL, Yang GX, Invernizzi P, Podda M, Van de Water J, et al. Biliary apoptoses and anti-mitochondrial antibodies activate innate immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. Sep;52(3):987-98.
- [396] Takeda K, Kojima Y, Ikejima K, Harada K, Yamashina S, Okumura K, et al. Death receptor 5 mediated-apoptosis contributes to cholestatic liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 5;105(31):10895-900.
- [397] Harada K, Ozaki S, Gershwin ME, Nakanuma Y. Enhanced apoptosis relates to bile duct loss in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1997 Dec;26(6):1399-405.
- [398] Kuroki T, Seki S, Kawakita N, Nakatani K, Hisa T, Kitada T, et al. Expression of antigens related to apoptosis and cell proliferation in chronic nonsuppurative destructive cholangitis in primary biliary cirrhosis. *Virchows Arch*. 1996 Oct;429(2-3):119-29.
- [399] Yasoshima M, Tsuneyama K, Harada K, Sasaki M, Gershwin ME, Nakanuma Y. Immunohistochemical analysis of cell-matrix adhesion molecules and their ligands in the portal tracts of primary biliary cirrhosis. *J Pathol*. 2000 Jan;190(1):93-9.
- [400] Graham AM, Dollinger MM, Howie SE, Harrison DJ. Bile duct cells in primary biliary cirrhosis are 'primed' for apoptosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1998 Jul;10(7):553-7.
- [401] Iwata M, Harada K, Kono N, Kaneko S, Kobayashi K, Nakanuma Y. Expression of Bcl-2 familial proteins is reduced in small bile duct lesions of primary biliary cirrhosis. *Hum Pathol*. 2000 Feb;31(2):179-84.
- [402] Tinmouth J, Lee M, Wanless IR, Tsui FW, Inman R, Heathcote EJ. Apoptosis of biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Liver*. 2002 Jun;22(3):228-34.
- [403] Marzioni M, Glaser SS, Francis H, Phinzy JL, LeSage G, Alpini G. Functional heterogeneity of cholangiocytes. *Semin Liver Dis*. 2002 Aug;22(3):227-40.
- [404] Adams DH. Biliary epithelial cells: innocent victims or active participants in immune-mediated liver disease? *J Lab Clin Med*. 1996 Dec;128(6):528-30.
- [405] Adams DH, Hubscher SG, Shaw J, Johnson GD, Babbs C, Rothlein R, et al. Increased expression of intercellular adhesion molecule 1 on bile ducts in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*. 1991 Sep;14(3):426-31.
- [406] Ballardini G, Mirakian R, Bianchi FB, Pisi E, Doniach D, Bottazzo GF. Aberrant expression of HLA-DR antigens on bile duct epithelium in primary biliary cirrhosis: relevance to pathogenesis. *Lancet*. 1984 Nov 3;2(8410):1009-13.
- [407] Fierz W, Endler B, Reske K, Wekerle H, Fontana A. Astrocytes as antigen-presenting cells. I. Induction of Ia antigen expression on astrocytes by T cells via immune interferon and its effect on antigen presentation. *J Immunol*. 1985 Jun;134(6):3785-93.
- [408] Hahn WC, Burakoff SJ, Bierer BE. Signal transduction pathways involved in T cell receptor-induced regulation of CD2 avidity for CD58. *J Immunol*. 1993 Apr 1;150(7):2607-19.
- [409] Dienes HP, Lohse AW, Gerken G, Schirmacher P, Gallati H, Lohr HF, et al. Bile duct epithelia as target cells in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Virchows Arch*. 1997 Aug;431(2):119-24.
- [410] Allina J, Hu B, Sullivan DM, Fiel MI, Thung SN, Bronk SF, et al. T cell targeting and phagocytosis of apoptotic biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*. 2006 Dec;27(4):232-41.

- [411] Joplin R, Lindsay JG, Hubscher SG, Johnson GD, Shaw JC, Strain AJ, et al. Distribution of dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) in the liver and portal lymph nodes of patients with primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical study. *Hepatology*. 1991 Sep;14(3):442-7.
- [412] Joplin RE, Johnson GD, Matthews JB, Hamburger J, Lindsay JG, Hubscher SG, et al. Distribution of pyruvate dehydrogenase dihydrolipoamide acetyltransferase (PDC-E2) and another mitochondrial marker in salivary gland and biliary epithelium from patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1994 Jun;19(6):1375-80.
- [413] Cha S, Leung PS, Coppel RL, Van de Water J, Ansari AA, Gershwin ME. Heterogeneity of combinatorial human autoantibodies against PDC-E2 and biliary epithelial cells in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1994 Sep;20(3):574-83.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Πρωτοπαθής Χολική Κίρρωση (ΠΧΚ) είναι μια χρόνια αυτοάνοση χολοστατική νόσος του ήπατος που χαρακτηρίζεται από προοδευτική φλεγμονώδη καταστροφή των μικρού μεγέθους ενδοηπατικών χοληφόρων που οδηγεί σε μη αναστρέψιμη κίρρωση και ηπατική ανεπάρκεια [1]. Τόσο τα κύρια κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά της νόσου όσο και οι τρέχουσες απόψεις για την παθογένεια περιγράφηκαν στο Γενικό Μέρος της παρούσας διατριβής.

Ορολογικά, η ΠΧΚ χαρακτηρίζεται από την παρουσία υψηλού τίτλου αντι-μιτοχονδριακών αντισωμάτων (anti-mitochondrial antibody, AMA) [2]. Σε πολύ πρώιμα στάδια της νόσου, η παρουσία των AMA μπορεί να αποτελεί το μόνο ουσιαστικό εύρημα (ασυμπτωματικοί ασθενείς με ΠΧΚ με φυσιολογική ηπατική βιοχημεία) [3]. Ο βασικός αντιγονικός στόχος των AMA στην ΠΧΚ είναι η E2 υπομονάδα της πυρουβικής δευδρογενάσης (PDC-E2), η οποία και αναγνωρίζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95% των ασθενών [2].

Η ρήξη της ανοσολογικής ανοχής έναντι της PDC-E2 φαίνεται να διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στην παθογενετική εξέλιξη της νόσου [2, 4]. Αυτό υποστηρίζουν δεδομένα προοπτικών μελετών που αποδεικνύουν ότι η παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι της PDC-E2 χωρίς συνοδό ηπατική διαταραχή αργά ή γρήγορα συνοδεύεται από την πλήρη κλινική και εργαστηριακή ανάπτυξη της νόσου [5-7]. Τα ακριβή αίτια και οι μηχανισμοί που οδηγούν στην απώλεια της ανοσολογικής ανοχής κατά της PDC-E2 στην ΠΧΚ παραμένουν αδιευκρίνιστα.

Το γεγονός ότι τα αυτοαντισώματα έναντι της PDC-E2 στην ΠΧΚ ανήκουν κυρίως στην IgG τάξη υποδηλώνει έμμεσα την ενεργοποίηση ενός CD4⁺ T-κυτταροεξαρτώμενου μηχανισμού, που προσφέρει την αναγκαία βοήθεια στα αντιγονοειδικά πλασματοκύτταρα για την παραγωγή των εν λόγω αντισωμάτων [8, 9].

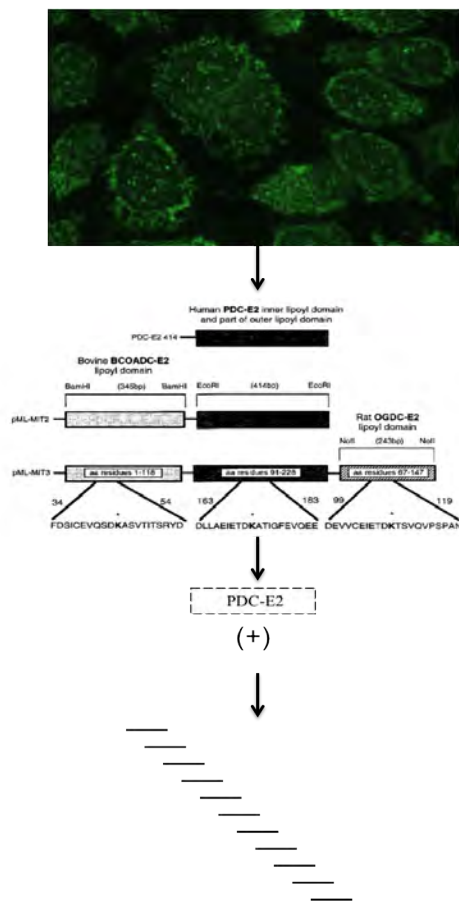
Παλαιότερες μελέτες που μελέτησαν τη χαρτογράφηση των επιτόπων της PDC-E2 έδειξαν την παρουσία τόσο στερεοτακτικών όσο και γραμμικών επιτόπων όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.4.1 του Γενικού Μέρους. Παρά τον κατά γενική ομολογία πρωτεύοντα ρόλο της ειδικής έναντι του PDC-E2 CD4⁺ κυτταρικής ανοσολογικής απάντησης στην παθογένεια της νόσου υπάρχει μόνο μια μελέτη σε Ιάπωνες ασθενείς με ΠΧΚ που προσδιορίζει τους CD4⁺ λεμφοκυτταρικούς PDC-E2 επιτόπους [10]. Στην εν λόγω μελέτη έχει περιγραφεί ως επικρατών επίτοπος το πεπτίδιο της PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆. Παρεμένει ωστόσο άγνωστο αν αυτός ο επίτοπος

αναγνωρίζεται και από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα ασθενών από άλλες πληθυσμιακές ομάδες πλην των Ιαπώνων. Παράλληλα δεν είναι επίσης γνωστό αν ο συγκεκριμένος επίτοπος είναι και ο μοναδικός. Είναι επίσης ενδιαφέρον, ότι στη χώρα μας δεν υπάρχουν δεδομένα που να αφορούν στη χαρτογράφηση των επιτόπων της PDC-E2 ασθενών με ΠΧΚ σε επίπεδο χυμικής ανοσίας.

Στην παρούσα διατριβή επιχειρήσαμε να συμπληρωθούν τα παραπάνω βιβλιογραφικά κενά. Τέλος και μετά τη συζήτηση των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής παρουσιάζεται μια περίπτωση ασθενούς με κλινικοεργαστηριακό ενδιαφέρον ως ξεχωριστό τμήμα.

1.1 Χαρακτηρισμός Αντιμιτοχονδριακών Αντισωμάτων (AMA)

Τα AMA είναι μια ομάδα αυτοαντισωμάτων που χαρακτηρίζουν την ΠΧΚ και που περισσότερες λεπτομέρειες για τη φύση τους, τη σημασία τους και τις μεθόδους χαρακτηρισμού τους περιγράφονται στην Παράγραφο 2.4.1 του Γενικού Μέρους. Περιληπτικά, τα AMA ανιχνεύονται με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού (ΕΑΦ) σε υποστρώματα στομάχου-νεφρού-ήπατος αρουραίων ή/και σειράς καρκινικών κυττάρων HEp-2 [11]. Παράλληλα μοριακές τεχνικές όπως είναι η ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) και η ανοσοαποτύπωση μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της αντιδραστικότητας των AMA έναντι κάθε αντιγόνου [12]. Στην πρώτη φάση της διατριβής, για να χαρακτηρίσουμε την αντιδραστικότητα των AMA έγιναν αρχικά πειράματα ΕΑΦ. Στη συνέχεια η παρουσία των AMA επιβεβαιώθηκε με εμπορικά διαθέσιμη ELISA που χρησιμοποιεί ως αντιγόνο μια υβριδική πρωτεΐνη που περιέχει τα ανοσοεπικρατούντα τμήματα των πρωτεϊνών PDC-E2, OGDC-E2 και BCOADC-E2 [13]. Ακολούθησαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης όπου χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που καλύπτει πλήρως το έσω λιποϋλικό τμήμα της PDC-E2 προκειμένου να τεκμηριωθεί η αντιδραστικότητα των AMA κατά του συγκεκριμένου τμήματος της PDC-E2 καθώς τα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι τόσο ο ανοσοεπικρατής επίτοπος τόσο για τα AMA όσο και για τα ειδικά για τη νόσο CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα βρίσκεται εντός του συγκεκριμένου τμήματος της πρωτεΐνης. Σε κάθε επόμενο βήμα που ακολούθησε δηλαδή στην πιο πάνω μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα σταδιακά μικρότερα κλάσματα του συνόλου των αντιγόνων που αποτελούν στόχους για τα AMA. Ασθενείς που παρουσίαζαν αντι-PDC-E2 αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα μελέτης για το χαρακτηρισμό των B και CD4+ κυτταρικών επιτόπων της PDC-E2. Διαγραμματικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Χαρακτηρισμός των αντι-PDC-E2 αντισωμάτων.

- 1 Για το χαρακτηρισμό της αντιδραστικότητας του ορού των ασθενών και των μαρτύρων στην PDC-E2 έγιναν πειράματα ανοσοφθορισμού (1), ακολούθησαν μοριακές τεχνικές όπως ήταν ο χαρακτηρισμός της αντιδραστικότητας των AMA κατά της υβριδικής πρωτεΐνης MIT-3 με ELISA (2) και ακολούθως ο χαρακτηρισμός της αντιδραστικότητας του ορού κατά της PDC-E2 με πειράματα ανοσοαποτύπωσης (3). Οι ασθενείς με αντι-PDC-E2 αντισώματα επιλέχθηκαν για να αποτελέσουν την ομάδα μελέτης για τον καθορισμό των επιτόπων της PDC-E2 σε χυμικό και CD4+ κυτταρικό επίπεδο με τη χρήση πεπτιδίων που καλύπτουν ολόκληρο το φάσμα της PDC-E2 (4). Με αυτή τη διαδικασία (Στάδια 1, 2 και 3) αποκλείστηκε και η ύπαρξη αντι-PDC-E2 αντισωμάτων στους υγιείς και πάσχοντες μάρτυρες.
- 2
- 3
- 4

1.2 Σχεδιασμός, δημιουργία και αποθήκευση πεπτιδίων

Οι μελέτες για χαρτογράφηση των επιτόπων της PDC-E2 σε πειράματα χυμικής ανοσίας, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.4.1.2 του Γενικού Μέρους, έδειξαν ότι ο επίτοπος των AMA είναι τόσο στερεοτακτικοί όσο και γραμμικοί. Ο επίτοπος των CD4+ T λεμφοκυττάρων είναι το πεπτίδιο GDLLAEIETDKATI της PDC-E2 στο έσω λιποϋλικό τμήμα της πρωτεΐνης και που δημοσιευμένα δεδομένα υποστηρίζουν ότι δυνατόν να μην είναι και ο μοναδικός [10, 14]. Με σκοπό να προσεγγίσουμε το θέμα της αναζήτησης των CD4+ λεμφοκυτταρικών επιτόπων επιλέξαμε να ακολουθήσουμε την ακόλουθη διαδικασία: 1) Μελέτη κατά πόσο το προηγούμενα περιγραφόμενο πεπτίδιο-επίτοπος αναγνωρίζεται από τα λεμφοκύτταρα των Ελλήνων ασθενών με ΠΧΚ, και αν ναι, σε πιο ποσοστό συμβαίνει αυτό 2) Αν τα δεδομένα αποδείκνυαν ότι τα λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΠΧΚ δεν αναγνώριζαν τον προηγούμενα χαρακτηρισμένο επίτοπο σε υψηλό ποσοστό, θα σχεδιάζαμε πεπτίδια με βάση τα αλλήλια HLA των ασθενών μας και την πρόγνωση που θα είχαν αυτά να είναι επίτοποι της PDC-E2. Τα πειράματα έδειξαν ότι έπρεπε να διευρύνουμε την αναζήτηση των πιθανών επιτόπων και εστιαστήκαμε στη

δημιουργία πεπτιδίων που αποτελούν πιθανούς επιτόπους στην PDC-E2 όταν ο ασθενής έχει το DR8 αλληλόμορφο HLA καθώς έχει περιγραφεί σύνδεση του DR8 με την ΠΧΚ [15-17] με τα πεπτίδια να έχουν και καλό προγνωστικό σκορ και για τα HLA των ασθενών μας 3) Αν τα αποτελέσματα έδειχναν πιθανούς επιτόπους πέραν του περιγραφόμενου επιτόπου για τα CD4+ λεμφοκύτταρα θα γινόταν μια πιο συστηματική μελέτη με δημιουργία αλληλεπικαλυπτόμενων πεπτιδίων που θα κάλυπταν ολόκληρη την αλληλουχία της PDC-E2.

Το κάθε μόριο HLA στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μπορεί να παρουσιάσει πολλά πεπτίδια που μοιράζονται κοινές αλληλουχίες ή έχουν παρόμοια στερεοτακτική δομή και επιφάνεια όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.5.2.1 του Ειδικού Μέρους. Συγκεκριμένα μοτίβα αλληλουχιών αμινοξέων έχουν περιγραφεί κατά περιόδους να έχουν τη δυνατότητα να συνδέονται με συγκεκριμένα MHC μόρια. Τα RankPep και SYFPEITHI είναι βάσεις δεδομένων που όταν καταχωρηθεί μια πρωτεϊνική αλληλουχία μπορούν με βάση τα δημοσιευμένα δεδομένα επεξεργασίας και παρουσίασης αντιγονικών τόπων ή την αλληλουχία αμινοξέων που αποτελεί τη δομή του MHC μορίου στο οποίο θα συνδεθεί το πεπτίδιο, να προβλέψουν πιθανούς επιτόπους εντός της αλληλουχίας που δύνανται να επεξεργαστούν και να παρουσιαστούν από συγκεκριμένο αλληλόμορφο HLA [18-20]. Αυτές οι αλληλουχίες που περιγράφηκαν και που μπορούν να συνδεθούν με κάποια HLA μόρια θα αποτελούσαν ένα πολύ απλοποιημένο μοτίβο πρόγνωσης των επιτόπων καθώς η πολυπλοκότητα της διαμόρφωσης του κάθε πεπτιδίου αυξάνεται σε σχέση και με την παρουσία άλλων αμινοξέων εντός της αλληλουχίας, με αποτέλεσμα την αλλαγή της τριτοταγούς δομής και τον τρόπο που αυτές δυνατόν να αλληλεπιδρούν με τις περιοχές σύνδεσης των MHC μορίων. Το RANKPEP λαμβάνει υπόψη τη δομή της μήτρας σύνδεσης στο MHC μόριο για να προβλέψει την ικανότητα σύνδεσης ενός πεπτιδίου (Position Specific Scoring Matrices - PSSMs). Χρησιμοποιεί επίσης δεδομένα από γραμμικές αλληλουχίες πεπτιδίων που είναι γνωστό ότι συνδέονται με κάποια μόρια MHC. Έτσι με αυτά τα δεδομένα σχεδιάστηκαν τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

1.3 Χαρακτηρισμός γραμμικών επιτόπων των αντι-PDC-E2 αυτοαντισωμάτων.

Στην Παράγραφο 2.4.1 του Γενικού Μέρους περιγράφεται η σημασία των AMA στην παθογένεια της νόσου, η κλινική χρησιμότητα αυτών των αυτοαντισωμάτων, οι μέθοδοι ανίχνευσής τους όπως και οι αντιγονικές δομές που αναγνωρίζουν αυτά τα αντισώματα [11].

Η καλύτερα χαρακτηρισμένη ανοσολογική αντίδραση ανάμεσα στα αντιγόνα της 2-OADC είναι αυτή κατά της PDC-E2. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τον καλύτερο

χαρακτηρισμό της αντιδραστικότητας των AMA κατά της PDC-E2, κατά τις οποίες χρησιμοποιήθηκαν είτε ολιγοπεπτίδια [21] είτε ανασυνδυασμένα τμήματα της PDC-E2 [22] έδειξαν ότι ο επίτοπος της PDC-E2 εντοπίζεται στο λιποϊκό τμήμα της πρωτεΐνης. Μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν διάφορα ανασυνδυασμένα πεπτίδια που κάλυπταν ολόκληρο το εύρος της ανθρώπινης PDC-E2 έδειξαν ότι οροί ασθενών με ΠΧΚ αναγνωρίζουν συγκεκριμένα πεπτίδια που αντιστοιχούν στο έξω λιποϊκό τμήμα και το έσω λιποϊκό τμήμα της ανθρώπινης PDC-E2 [23]. Η μεγαλύτερη αντιδραστικότητα ανιχνεύθηκε έναντι της αλληλουχίας αμινοξέων 128-227 στο έσω λιποϊκό τμήμα της PDC-E2. Ένα ανασυνδυασμένο πεπτίδιο που αντιστοιχούσε στα αμινοξέα 160-227 δεν παρουσίαζε αντιδραστικότητα σε AMA θετικούς ασθενείς. Πειράματα στα οποία είχαν αφαιρεθεί τα αμινοξέα μετά το κατάλοιπο 221 στο καρβόξυ-τελικό άκρο καταργούσε την υπάρχουσα αντιδραστικότητα σε AMA θετικούς ασθενείς. Επιπρόσθετα, το ανασυνδυασμένο πεπτίδιο 146-221 ήταν απαραίτητο για την παρουσία αντιδραστικότητας έναντι των AMA, ενώ η αλληλουχία των αμινοξέων 128-227 ήταν απαραίτητη για ισχυρή αντιδραστικότητα [22]. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός στερεοτακτικά διαμορφούμενου επιτόπου στο τμήμα της πρωτεΐνης μεταξύ των αμινοξέων 128 και 227 [22]. Τα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν αλληλεπικαλυπτόμενα πεπτίδια έδειξαν ότι το τμήμα μεταξύ των αμινοξέων 167-184 αποτελεί γραμμικό επίτοπο στη θέση που προσδένεται το λιποϊκό οξύ.

Μέχρι πρόσφατα δεν είχαν περιγραφεί αντιγονικοί επίτοποι στο καταλυτικό τμήμα (catalytic domain) της PDC-E2, παρά μόνο σε μελέτες αναστολής της PDC-E2 από τα AMA. Οι Braun και συνεργάτες παρουσίασαν πρόσφατα δεδομένα στα οποία φάνηκε ότι 2 πεπτίδια από το καταλυτικό τμήμα αποτελούν γραμμικούς επιτόπους [24]. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 33 25μερή πεπτίδια που αλληλοεπικαλύπτονταν κατά 8 αμινοξέα και κάλυπταν όλο το εύρος της PDC-E2. Τα πεπτίδια 475-499 και 407-431, που αντιστοιχούν στην περιοχή του καταλυτικού τμήματος της PDC-E2 φάνηκαν ότι αποτελούν γραμμικούς επιτόπους [24]. Η αλληλουχία αμινοξέων 167-184 δεν φάνηκε να αποτελεί γραμμικό επίτοπο σε αυτή τη μελέτη, όπως είχε περιγραφεί προηγουμένως [21].

Τα μέχρι τώρα δεδομένα για τον προσδιορισμό των επιτόπων των αντι-PDC-E2 αντισωμάτων προέρχονται από διάφορες μελέτες που δεν περιλάμβαναν ασθενείς από την Ελλάδα οπότε παραμένει άγνωστο το τι συμβαίνει στους Έλληνες ασθενείς με ΠΧΚ. Στην μελέτη των Braun και συν [24] χρησιμοποιήθηκαν 33 25μερή πεπτίδια που αλληλοεπικαλύπτονταν κατά 8 αμινοξέα. Με αυτό τον τρόπο πιθανοί επίτοποι που βρίσκονται στις περιοχές επικάλυψης δυνατόν να ξεφύγουν. Μια πιο συστηματική προσέγγιση με 20μερή πεπτίδια που επικαλύπτονται κατά 8 αμινοξέα δυνατόν να φέρει

στην επιφάνεια επιτόπου που η αναφερόμενη μελέτη πιθανόν να παρέβλεπε. Για τους λόγους αυτούς στο παρόν κεφάλαιο μελετήσαμε την αντιδραστικότητα των ορών ασθενών με ΠΧΚ κατά συνθετικών 20μερών πεπτιδίων που καλύπτουν ολόκληρο το μήκος της PDC-E2 σε Έλληνες ασθενείς αφού προηγουμένως τεκμηριώσαμε την παρουσία αντι-PDC-E2 αντισωμάτων κατά της έσω λιποϋλικής περιοχής.

1.4 Προσδιορισμός της αντιδραστικότητας των CD4+ T λεμφοκυττάρων κατά του προηγουμένου περιγραφόμενου ανοσοεπικρατούς αντιγόνου PDC-E2¹⁶³⁻¹⁷⁶

Στο Κεφάλαιο 2.5.2.1 στο Γενικό Μέρος έχουν περιγραφεί οι 2 κυριότερες μελέτες που αφορούν στη χαρτογράφηση των επιτόπων που αναγνωρίζουν τα CD4+ T λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με ΠΧΚ [10, 25]. Σε αυτές τις μελέτες το πεπτίδιο της PDC-E2¹⁶³⁻¹⁷⁶ GDLLAEIETDKATI παρουσιάζεται ως ο κύριος αντιγονικός επίτοπος σε Ιάπωνες ασθενείς, αλλά η παρουσία του περιγραφόμενου επίτοπου δεν έχει επιβεβαιωθεί σε άλλες πληθυσιακές ομάδες. Η μελέτη του προαναφερόμενου επίτοπου και ο καθορισμός της συχνότητας αναγνώρισής του από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα κρίνεται απαραίτητο να πραγματοποιηθεί για τους παρακάτω λόγους:

- 1) Ο επίτοπος φαίνεται ότι παρουσιάζεται από το κλάσης II HLA-DR53, ενώ είναι σαφές ότι όλοι οι ασθενείς με ΠΧΚ δεν είναι HLA-DR53 θετικοί.
- 2) Στη μελέτη στην οποία περιγράφηκε το συγκεκριμένο πεπτίδιο ως αντιγονικός επίτοπος, χρησιμοποιήθηκαν έξι ειδικοί για το πεπτίδιο κλώνοι από 4 ασθενείς από μια ομάδα 13 ατόμων με ΠΧΚ, που αντιστοιχεί στο 30.7% του συνόλου [25]. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν την ανάγκη για μελέτη του συγκεκριμένου επίτοπου και σε άλλες πληθυσμιακές ομάδες προκειμένου να εξακριβωθεί η συχνότητα της αντιδραστικότητας έναντι αυτού.
- 3) Μελέτες χαρτογράφησης T λεμφοκυτταρικών επιτόπων σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος έδειξαν ότι συνήθως η απόκριση είναι πολυκλωνική και χαρακτηρίζει τον κάθε άρρωστο [26].

1.5 Προσδιορισμός αντιδραστικότητας των T λεμφοκυττάρων σε επιλεγμένα πεπτίδια της PDC-E2.

Αντιδραστικότητα των μονοπύρηνων του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear cells, PBMCs) έναντι του πεπτιδίου που είχε προηγούμενα χαρακτηριστεί ως ανοσοκυρίαρχος επίτοπος στην ΠΧΚ ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 8.57% (3 σε σύνολο 35 ασθενείς) των Ελλήνων ασθενών με ΠΧΚ που μελετήθηκαν, όπως θα περιγραφεί

αργότερα εντός της παρούσας διατριβής. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να γίνει μια πιο διευρυσμένη προσπάθεια να αναζητηθούν πιθανοί λεμφοκυτταρικοί επίτοποι της PDC-E2.

Η PDC-E2 είναι μια πρωτεΐνη με αλληλουχία 614 αμινοξέων. Η δημιουργία 15μερών έως και 20μερών πεπτιδίων που θα κάλυπταν όλη την αλληλουχία της πρωτεΐνης θα οδηγούσε σε μεγάλο όγκο πεπτιδίων, ανάγκη για μεγάλες ποσότητες βιολογικού υλικού που δεν είναι πάντα διαθέσιμα και τελικά πολύπλοκο σχεδιασμό πειραμάτων.

Για τους παραπάνω λόγους επιλέξαμε να σχεδιάσουμε πεπτίδια βασιζόμενοι σε γνωστές αλληλουχίες που έχουν περιγραφεί στο παρελθόν που συνδέονται και παρουσιάζονται αποτελεσματικά από συγκεκριμένα HLA-II μόρια.

Υπάρχουν βάσεις δεδομένων που μπορούν να προβλέψουν την ικανότητα συγκεκριμένων αλληλουχιών που βρίσκονται σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα να συνδέονται επαρκώς με κάποιο HLA μόριο βασιζόμενοι στις χημικές ιδιότητες των πεπτιδίων που συνδέουν τις πεπτιδικές αλληλουχίες, τις ιδιότητες των πεπτιδίων με χημική ή δομική συγγένεια με τα αμινοξέα που περιέχονται στον περιγραφόμενο επίτοπο και τη δομή της θέσης σύνδεσης του επίτοπου (groove) στο HLA-II μόριο. Τέτοια προγράμματα πρόγνωσης επιτόπων είναι τα RankPep και SYFPEITHI.

Για το χαρακτηρισμό της αντιδραστικότητας των T λεμφοκυττάρων έναντι πεπτιδίων της PDC-E2 σχεδιάστηκαν τελικά 26 πεπτίδια. Αυτά με τη σειρά τους χωρίστηκαν σε 5 δεξαμενές πεπτιδίων και αναζητήθηκε τυχόν αντιδραστικότητα έναντι αυτών των πεπτιδίων με τη μέθοδο της IFN- γ ELISpot (Enzyme-linked immunosorbent spot).

1.6 Προσδιορισμός αντιδραστικότητας των T λεμφοκυττάρων σε αλληλεπικαλυπτόμενα πεπτίδια της PDC-E2.

Η μελέτη της αντιδραστικότητας των λεμφοκυττάρων έναντι συγκεκριμένων πεπτιδίων που σχεδιάστηκαν με βάση τα μοντέλα πρόγνωσης επιτόπων RankPep και SYFPEITHI κατέδειξαν ότι δυνατόν να υπάρχουν πολλαπλοί αντιγονικοί λεμφοκυτταρικοί τόποι εντός της πρωτεΐνης PDC-E2. Εκ πρώτης όψεως, φάνηκε επίσης ότι η κυτταρική ανοσολογική απάντηση έναντι της PDC-E2 είναι ετερογενής και κάθε ασθενής αντιδρά σε διαφορετικό τμήμα της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδήγησαν στο σχεδιασμό πειραμάτων για την πιο συστηματική αναζήτηση πιθανών επιτόπων με μεγαλύτερο αριθμό πεπτιδίων που καλύπτουν ολόκληρο το φάσμα της PDC-E2.

2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Ογδόντα επτά (87) ασθενείς με ΠΧΚ [2 με σύνδρομο επικάλυψης Αυτοάνοσης Ηπατίτιδας (ΑΗ)- ΠΧΚ], 8 ασθενείς με ΑΗ-τύπου 1, 4 ασθενείς με ΑΗ-τύπου 2 και 8 ασθενείς με χρόνια ΗCV λοίμωξη καθώς και 12 υγιείς μάρτυρες εξετάστηκαν για την παρουσία AMA και αντι-PDC-E2 αντισωμάτων κατά του έσω λιποϋλικού τμήματος της πρωτεΐνης στον ορό τους με τη μεθοδολογία που παρουσιάζεται στην Εικόνα 1. Όλοι οι παραπάνω ασθενείς παρακολουθούνταν στο Εξωτερικό Ηπατολογικό Ιατρείο της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα κλινικά και τα γενικά χαρακτηριστικά των 87 ασθενών με ΠΧΚ που εξετάστηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά του πληθυσμού μελέτης (n=87).

| | | Μέση Τιμή ± Σταθερή απόκλιση | Διάμεση Τιμή (Εύρος) |
|---------------------------------|------------|------------------------------|----------------------|
| Ηλικία (έτη) | | 57.80 ± 13.75 | 57.68 (23-88) |
| Άνδρες/Γυναίκες | 9/78 | | |
| Μη Κιρρωτικοί/Κιρρωτικοί | 76/11 | | |
| Ηλικία έναρξης νόσου (έτη) | | 54.45 ± 13.59 | 54.00 (17-87) |
| Ηλικία διάγνωσης (έτη) | | 56.42 ± 13.53 | 56.00 (17-87) |
| Διάρκεια νόσου (μήνες) | | 67.68 ± 61.07 | 56.00 (1-227) |
| Χολερυθρίνη (<1.1 mg/dL) | | 0.70 ± 0.36 | 0.61 (0.18-2.1) |
| Αλβουμίνη (3.5-5.2 g/dL) | | 4.07 ± 0.48 | 4.10 (2.5-5.1) |
| Ολικές πρωτεΐνες (6.4-8.3 g/dL) | | 7.71 ± 0.66 | 7.60 (6.11-9.7) |
| Χρόνος προθρομβίνης (sec.) | | 13.91 ± 2.17 | 12.13 (8.31-25) |
| INR | | 1.06 ± 0.25 | 1.00 (0.78-2.64) |
| AST (10-40 IU/L) | | 31.11 ± 22.49 | 25.00 (11-147) |
| ALT (10-40 IU/L) | | 33.98 ± 27.12 | 26.00 (8-170) |
| ALP (35-104 IU/L) | | 121.68 ± 78.77 | 102.00 (32-445) |
| γGT (9-40 IU/L) | | 66.07 ± 73.54 | 38.00 (11-362) |
| Ολική χοληστερόλη (mg/dL) | | 211.83 ± 50.45 | 207.00 (96-319) |
| HDL χοληστερόλη (mg/dL) | | 59.02 ± 21.88 | 56.00 (18-155) |
| LDL χοληστερόλη (mg/dL) | | 131.63 ± 35.88 | 125.00 (60-219) |
| Τριγλυκερίδια (40-160 mg/dL) | | 129.28 ± 80.43 | 104.00 (41-521) |
| IgG (847-1690 mg/dL) | | 1580.45 ± 576.56 | 1420.00 (891-3530) |
| IgM (64-249 mg/dL) | | 292.42 ± 294.64 | 218.00 (48-1725) |
| IgA (99-300 mg/dL) | | 279.45 ± 145.17 | 250.00 (21-802) |
| Ιστολογικό στάδιο 1/2/3/4* | 22/14/6/10 | | |

*Δεδομένα από βιοψίες υπήρχαν σε 52 ασθενείς.

Από αυτή τη δεξαμενή ασθενών έγινε επιλογή με βάση την οροθετικότητα κατά της PDC-E2 για τον καθορισμό της αντιδραστικότητας των AMA κατά των

αλληλοεπικαλυπτομένων πεπτιδίων της PDC-E2 (Παράγραφος 3.3) και τον καθορισμό της CD4+ T λεμφοκυτταρικής αντιδραστικότητας κατά του προηγούμενα περιγραφόμενου επιτόπου (Παράγραφος 3.4), συγκεκριμένων πεπτιδίων της PDC-E2 (Παράγραφος 3.5) και αλληλοεπικαλυπτομένων πεπτιδίων που καλύπτουν ολόκληρη τη PDC-E2 πρωτεΐνη (Παράγραφος 3.6). Τα κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά του υποσυνόλου που εξετάστηκε σε κάθε φάση της μελέτης παρουσιάζεται στο αντίστοιχο τμήμα των αποτελεσμάτων.

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Έμμεσος Ανοσοφθορισμός (ΕΑΦ)

Σχεδόν στην ολότητά τους τα πειράματα του ΕΑΦ έγιναν στα πλαίσια του διαγνωστικού ελέγχου ρουτίνας που γίνεται στο Ερευνητικό Εργαστήριο Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τα αποτελέσματα ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων του εργαστηρίου. Οι οροί ελέγχθηκαν για οργανοειδικά αυτοαντισώματα που σχετίζονται με ηπατοπάθειες με τη μέθοδο του ΕΑΦ σε υποστρώματα τομών ήπατος, στομάχου και νεφρού αρουραίων όπως περιγράφεται σε παλαιότερες μελέτες [27, 28]. Αναλυτικότερα, μετά την αφαίρεση του ήπατος, των νεφρών και του στομάχου των αρουραίων οι ιστοί ψύχθηκαν στους -20°C , κόπηκαν σε κρουτόμο (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany) με τομές πάχους 7 μm και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες και φυλάχτηκαν μέχρι τη χρήση τους στους -20°C . Ο έλεγχος των ορών των ασθενών με ΠΧΚ και των μαρτύρων πραγματοποιήθηκε σε διαδοχικές αραιώσεις (αρχικά 1/40 και στη περίπτωση θετικού δείγματος 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560, 1/5120 και 1/10240) σε αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.15 mol/L, pH 7.4 (phosphate buffer saline, PBS). Μετά από επώαση 30 min σε σκοτεινό-υγρό περιβάλλον και θερμοκρασία δωματίου, οι πλάκες πλύθηκαν δύο φορές με PBS. Η αποκάλυψη των ανοσοσυμπλεγμάτων αντιγόνου-αντισώματος έγινε μετά από επώαση των πλακών για 35 min σε διάλυμα αντι-ανθρώπινου ολικού αντιορού (IgG, IgA, IgM) ή IgG συνδεδεμένης με φλουροσκεΐνη (FITC conjugate, DAKO) σε αραιώση 1/50, ακολούθησε πλύσιμο (4 φορές), εναπόθεση γλυκερόλης και τοποθέτηση καλυπτρίδας. Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού (Axiostar Zeiss, Germany).

Η ανίχνευση των AMA και άλλων αυτοαντισωμάτων έγινε επίσης και με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων πλακιδίων μονιμοποιημένων κυττάρων λαρυγγικού καρκινώματος ανθρώπου (NOVA Lite, HEp2 ANA kit, INOVA Diagnostics). Αρχικά τοποθετούνταν στις θέσεις του πλακιδίου τα δείγματα των θετικών και αρνητικών μαρτύρων και των υπό

εξέταση ορών σε αραιώσεις 1:40 και 1:80 και επωάζονταν για 30 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στο σκοτάδι σε υγρό περιβάλλον. Στη συνέχεια γινόταν πλύσιμο των πλακιδίων με PBS (δύο φορές για 10 min) και τοποθέτηση μίας σταγόνας ανά θέση (~50 μl) αντι-ανθρώπινης IgG συνδεδεμένης με φλουροσκεΐνη (FITC conjugate). Μετά από νέα επώαση, στις παραπάνω συνθήκες, για 30 min και επανάληψη του πλυσίματος, γινόταν εκτίμηση των αποτελεσμάτων σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού (AxioLab, 35 mm SLR Cameras, Zeiss).

2.2.2 Εμπορικά διαθέσιμη ELISA

Η περαιτέρω ειδικότητα των AMA στον ορό των ασθενών προσδιορίστηκε και με εμπορικά διαθέσιμη ELISA (QUANTA Lite™ M2 EP-MIT 3-, INOVA Diagnostics, San Diego, USA). Η πλάκα πολυστερυνίου είναι επικαλυμμένη με κεκαθαρμένο ανασυνδυασμένο αντιγόνο (MIT-3) που περιέχει τα ανοσοκυρίαρχα μέρη της PDC-E2, BCOADC-E2 και OGDC-E2 [13]. Αραιωμένοι οροί από υγιείς μάρτυρες και αραιωμένοι οροί ασθενών προστέθηκαν σε ξεχωριστά πηγαδάκια, επιτρέποντας στα παρόντα μιτοχονδριακά αυτοαντισώματα να δεσμευθούν στο ακινητοποιημένο αντιγόνο. Τα μη αντιδρώντα αντισώματα ξεπλύθηκαν και ακολουθούσε προσθήκη αντι-ανθρώπινου IgG αντίσωματος συνδεδεμένου με ένζυμο. Η δεύτερη επώαση επέτρεπε την σύνδεση του αντι-ανθρώπινου IgG αντισώματος με τα σχηματισμένα συμπλέγματα αντισώματος – ακινητοποιημένου αντιγόνου. Στη συνέχεια η προσθήκη υποστρώματος υπεροξειδάσης προκάλεσε χρωματική αλλαγή ανάλογη με τη συγκέντρωση των αντισωμάτων. Μετά τη διακοπή της ενζυματικής παραγωγής χρώματος, η παρουσία ή η απουσία αντισωμάτων συγκρίθηκε με την οπτική πυκνότητα των πρότυπων αναφοράς.

Αναλυτικότερα, όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου (20 – 26°C) και αναδεύτηκαν καλά. Το συμπυκνωμένο HRP διάλυμα πλύσεων διαλύθηκε σε αραιώση 1:40. Τα υπό εξέταση δείγματα αραιώθηκαν σε αναλογία 1:101 σε αραιωτικό δείγματος. Ο θετικός και ο αρνητικός πρότυπος ορός που εμπεριέχονταν στη συσκευασία δεν αραιώθηκαν καθώς ήταν έτοιμοι για χρήση.

Ο απαραίτητος αριθμός πηγαδιών που απαιτούνταν τοποθετήθηκαν στο ειδικό πλαίσιο (μικροπλάκα). Εκατό (100) μl πρότυπων ορών ελέγχου, υψηλού (high positive), χαμηλού (low positive), αρνητικού (negative control) και των υπό έλεγχο αραιωμένων δειγμάτων προστέθηκαν στις προκαθορισμένες θέσεις εις διπλούν. Ο πρότυποι οροί ελέγχου, υψηλού, χαμηλού, αρνητικού τοποθετούνταν για να γίνει επιβεβαίωση ότι όλα τα στάδια έγιναν σωστά και χρησιμοποιήθηκαν σωστά τα αντιδραστήρια ενώ ο πρότυπος ορός με τη χαμηλή αντιδραστικότητα χρησιμοποιήθηκε για να γίνει η μετατροπή της απορρόφησης σε μονάδες αντιδραστικότητας (βλέπε πιο κάτω). Αφού τοποθετήθηκαν οι

οροί, η μικροπλάκα καλύφθηκε και επωάστηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Με το πέρας των 30 λεπτών η μικροπλάκα αναποδογυρίστηκε και τινάχθηκε σε ειδικό απορροφητικό υλικό για να αφαιρεθεί το εναπομένον περιεχόμενο. Ακολουθούσε η προσθήκη 200μl αραιωμένου ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης HRP σε όλα τα πηγαδάκια και η πλάκα ξεπλύθηκε και τινάχθηκε στο ειδικό απορροφητικό υλικό. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για δύο ακόμα φορές, για τρεις πλύσεις συνολικά. Ακολουθούσε η προσθήκη 100μl HRP IgG ή IgA συζεύγματος σε όλα τα πηγαδάκια. Η μικροπλάκα καλύφθηκε, τοποθετήθηκε στο shaker και επωάστηκε για 30 λεπτά, όπως προαναφέρθηκε. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω. Εν συνεχεία έγινε η προσθήκη 100μl TMB χρωμογόνου. Η μικροπλάκα επωάστηκε για 30 λεπτά σε σκοτεινό μέρος (καλυπτόμενη με αλουμινόχαρτο) υπό συνεχή ανάδευση. Με την προσθήκη 100μl διαλύματος διακοπής αντίδρασης (HRP Stop Solution) σε κάθε πηγαδάκι και το ελαφρό τίνιγμα της μικροπλάκας για να αναμιχθούν εκτενώς τα πηγαδάκια, ακολούθησε η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων σε φωτόμετρο (Opsys MR™ Microplate Reader, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA) στα 450nm με φίλτρο αναφοράς 620nm [28-30]. Η αντιδραστικότητα των IgG για κάθε δείγμα υπολογίστηκε διαιρώντας το μέσο όρο απορροφητικότητας του δείγματος με το μέσο όρο απορροφητικότητας του M2 EP (MIT3) ELISA Low και πολλαπλασιάζοντας το αποτέλεσμα με την τιμή του M2 EP (MIT3) ELISA Low (25 Units). Σύμφωνα με την κατασκευάστρια εταιρεία τα δείγματα με τιμές μεγαλύτερες από 25 Units θα πρέπει να θεωρούνται θετικά, αρνητικά αυτά με τιμές κάτω των 20 Units ενώ σε γκριζα ζώνη τα δείγματα με τιμές μεταξύ 20 και 25 Units. Υπάρχουν δημοσιευμένα δεδομένα που αποδεικνύουν ότι τιμές αντιδραστικότητας ακόμη και κάτω από 20 Units στον Ελληνικό πληθυσμό μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως cut-off [29]. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως cut-off τα 20 Units γιατί σκοπός ήταν να τεκμηριωθεί η αντιδραστικότητα κατά των μιτοχονδριακών αντιγόνων με τη μέγιστη δυνατή ειδικότητα, θυσιάζοντας για αυτό το λόγο την ευαισθησία. Η αντιδραστικότητα των IgA AMA θεωρήθηκε θετική όταν ήταν πάνω 0.217 O.D, δηλαδή τέσσερεις σταθερές αποκλίσεις πάνω από τη μέση τιμή της αντιδραστικότητας ορών από υγιείς με βάση δημοσιευμένα δεδομένα στον ίδιο πληθυσμό [29].

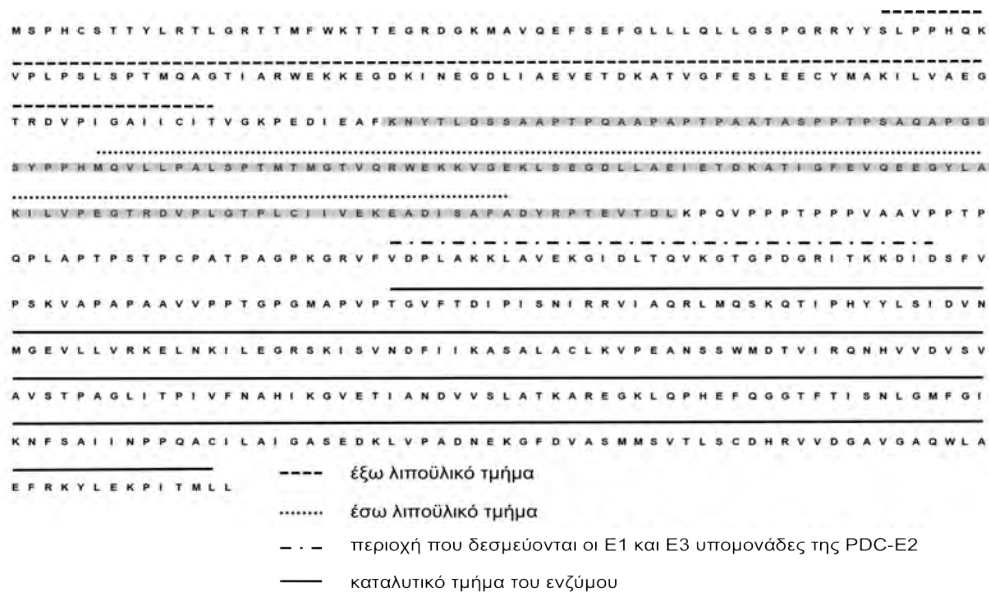
2.2.3 Κλωνοποίηση του έσω λιποϋλικού τμήματος της πρωτεΐνης PDC-E2

Η πρωτεΐνη PDC-E2 ήταν μια ευγενική χορηγία του Δρ Μπόγδανου Δημήτριου (King's College of London) και κλωνοποιήθηκε στα εργαστήρια της εταιρείας EUROIMMUN (EUROIMMUN, Luebeck, Germany). Περιληπτικά, το προϊόν cDNA που κωδικοποιεί το λιποϊκό τμήμα της PDC-E2 (Swiss-Prot Accession-Number: P10515) εγχύθηκε,

κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε σε προκαρυωτικό σύστημα (*E.coli*). Συνοπτικά, το θραύσμα αποκτήθηκε με PCR σε cDNA IMAGp998E1913461Q (Acc-No.:BU159332) χρησιμοποιώντας εκκινητή από την εταιρεία MWG Biotech (Germany) εισάγοντας τις κατάλληλες θέσεις περιορισμού. Οι αντιδράσεις της ενίσχυσης (PCR) πραγματοποιήθηκαν σε κυκλικό εναλλάκτη θερμότητας DNA Engine (PTC-200) (Bio-Rad Laboratories, Germany). Οι συνθήκες ενίσχυσης ήταν: 30 κύκλοι διάρκειας 30 δευτερολέπτων (ανά κύκλο) αποδιάταξης του DNA στους 94°C, 45 δευτερόλεπτα πρόσδεσης του ζεύγους των ολιγονουκλεοτιδίων - εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA (annealing) στους 56°C, 60 δευτερόλεπτα επιμήκυνσης του ανασυνδυασμένου ολιγονουκλεοτιδίου από την πολυμεράση στους 72°C και τέλος 5 λεπτά επιπλέον επιμήκυνσης για το τελευταίο κύκλο. Το τελικό προϊόν κλωνοποιήθηκε σε ευθυγραμμισμένη πλασμιδική κατασκευή pET24d-N για καλύτερη *in vitro* μεταγραφή πέπτοντας τα πλασμίδια με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού NcoI and XhoI όπως περιγράφουν αναλυτικά οι Sitaru et al [31].

Έκφραση και παραγωγή του συνδυασμένου αντιγόνου της PDC-E2 έγινε με μεθόδους που περιγράφονται αλλού [32]. Η μέτρηση της συγκέντρωσης του τελικού προϊόντος (PDC-E2) έγινε με μέτρηση της απορροφητικότητας στα 280 nm (spectrophotometer (Eppendorf, Germany) και ανάλυση της τελικής έκφρασής της με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση (anti-hexahistidine monoclonal antibody, Merck, UK).

Το τμήμα της πρωτεΐνης που κλωνοποιήθηκε παρουσιάζεται στην Εικόνα 2, αντιστοιχεί στα αμινοξέα 124-281 και έχει μοριακό βάρος 16,8KDa. Αυτό το τμήμα καλύπτει ολόκληρο το έσω λιποϋλικό τμήμα της PDC-E2 και κομμάτια πριν και μετά το έσω λιποϋλικό τμήμα.



Εικόνα 2. Η αλληλουχία των 614 αμινοξέων της PDC-E2 παρουσιάζεται σε 11 γραμμές. Η κάθε μια από τις 10 πρώτες γραμμές περιλαμβάνει 60 αμινοξέα ενώ η τελευταία

περιλαμβάνει 14 αμινοξέα. Η πρωτεΐνη PDC-E2 αποτελείται από ένα έξω λιποϋλικό τμήμα, ένα έσω λιποϋλικό τμήμα, μια περιοχή που δεσμεύονται οι E1 και E3 υπομονάδες της PDC-E2 και το καταλυτικό τμήμα του ενζύμου όπως παρουσιάζονται στην εικόνα. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη περιλαμβάνει την αλληλουχία που παρουσιάζεται σε γκριζο χρώμα και καλύπτει ολόκληρο το έσω λιποϋλικό τμήμα της PDC-E2.

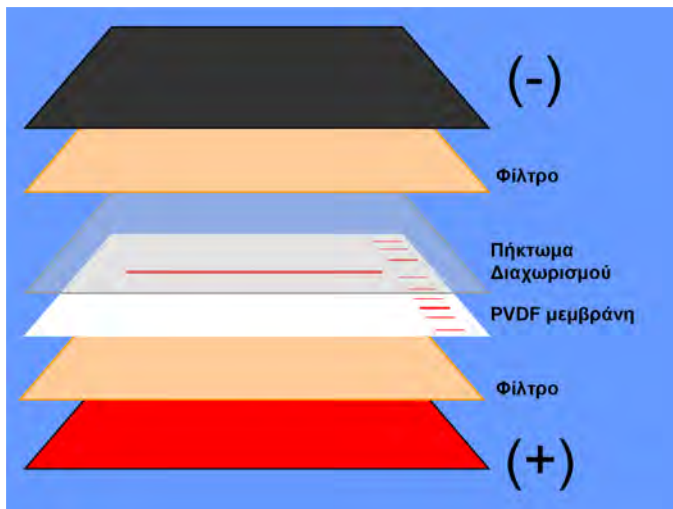
2.2.4 Ανοσοαποτύπωση

Η ανίχνευση των αντισωμάτων αντι-PDC-E2 έγινε και με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιήθηκαν πήγματα (ύψος 7cm, πλάτος 8cm και πάχος 1.5mm), αποτελούμενα κατά το ¼ από το πήγμα επιστοιβάξης (stacking gel) και κατά τα ¾ από το πήγμα διαχωρισμού (separating gel). Το πήγμα επιστοιβάξης περιείχε τελική συγκέντρωση 10% ακρυλαμιδίου, 0.1% SDS, 0.125M TRIS-HCl pH 6.8, με κύριο ρόλο του να επιστοιβάξει τις πρωτεΐνες του ηλεκτροφορούμενου δείγματος έτσι ώστε να εισέλθουν στο πήγμα διαχωρισμού το δυνατόν ταυτόχρονα. Το πήγμα διαχωρισμού περιείχε συγκέντρωση 12% ακρυλαμιδίου, 0.1% SDS, 0.375M TRIS-HCl pH 8.8 και διαχώρισε την PDC-E2 από βακτηριακά προϊόντα που πιθανά να βρίσκονταν στο διάλυμα της πρωτεΐνης σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Και για τα δύο πήγματα χρησιμοποιήθηκε αναλογία ακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου 37/1, ενώ ο συν-πολυμερισμός τους έγινε με την προσθήκη τετραμεθυλο-αιθυλενοδιαμίνης (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine-TEMED) και υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate-APS), σε ποσότητες 1.5μl και 1mg ανά ml διαλύματος ακρυλαμιδίου αντίστοιχα.

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε συσκευή BioRad (Mini-P Tetra cell, Biorad, Hercules, CA) σε θερμοκρασία δωματίου και ηλεκτροφορητικό διάλυμα που περιείχε 0,025M Tris, 0,2M γλυκίνη και 0,1% SDS. Επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί τέτοια συγκέντρωση πρωτεΐνης ώστε να βρίσκεται σε ποσότητα 0.1-1μg/strip για τους λόγους που θα περιγραφούν πιο κάτω. Πριν την ηλεκτροφόρηση, τα δείγματα ήρθαν σε βρασμό στους 95°C για 5 λεπτά αφού είχαν διαλυθεί σε διάλυμα το οποίο περιείχε 0,0625M Tris-HCl, pH 6,8, 20% γλυκερόλη, 2% SDS και 0,001% κυανού της βρωμοφαινόλης. Το περιεχόμενο σε όλα τα δείγματα SDS είναι μόριο με μια υδρόφοβη αλυσίδα και μια αρνητικά φορτισμένη κεφαλή. Ο ρόλος του στη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης είναι να αποδιατάξει τα πρωτεϊνικά μόρια και να προσδώσει σε αυτά ίδια πυκνότητα αρνητικού φορτίου, έτσι ώστε η κινητικότητά τους στα πήγματα λόγω της επίδρασης ηλεκτρικού πεδίου, να εξαρτάται αποκλειστικά από το μοριακό τους βάρος. Το μοριακό βάρος των ηλεκτροφορημένων πρωτεϊνών υπολογίστηκε με βάση την κινητική τους συμπεριφορά, συγκριτικά με πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους (molecular markers, Rainbow

marker: Invitrogen, Bench Marker Protein Ladder). Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων και των μοριακών δεικτών στο πήγμα επιστοίβαξης, εφαρμόστηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης σταθερή τάση ηλεκτρικού ρεύματος 125 V. Το τέλος της ηλεκτροφόρησης καθορίστηκε από τη στιγμή που η χρωστική των δειγμάτων εμφανίστηκε στο κατώτερο όριο του πήγματος διαχωρισμού.

Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών με το σύστημα SDS-PAGE, ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά αυτών (transfer) από το πήγμα διαχωρισμού σε μεμβράνη PVDF. Τα πήγματα διαχωρισμού μετά την απομάκρυνσή τους από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης πλύθηκαν σε κρύο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (transfer buffer) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ η PVDF μεμβράνη εμβυθίστηκε σε μεθανόλη προκειμένου να ενεργοποιηθεί. Μετά και την έκπλυση της μεμβράνης στο κρύο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς, συναρμολογήθηκε το σύμπλεγμα ηλεκτρομεταφοράς (η πήκτη και η μεμβράνη τοποθετήθηκαν ανάμεσα σε διηθητικά χαρτιά) όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 3 και εμβυθίστηκε στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς, μέσα στην ειδική συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (Criterion Blotter, Biorad, Hercules, CA).



Εικόνα 3.

Στην εικόνα παρουσιάζεται η διάταξη για τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Για εικαστικούς λόγους, στην παρούσα εικόνα παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες και οι δείκτες πρωτεϊνικού βάρους στην PVDF μεμβράνη με κόκκινο χρώμα. Αυτή είναι μορφή που έχει η PVDF μεμβράνη μόνο αφού γίνει η ηλεκτρομεταφορά, αποδιαταχθεί το σύστημα ηλεκτρομεταφοράς και γίνει χρώση της μεμβράνης με τη χρωστική Ponceau-S.

Στη συσκευή εφαρμόστηκε σταθερή τάση ρεύματος 25V για 2 ώρες. Μετά το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς η μεμβράνη χρωματίστηκε με χρωστική Ponceau S για 5-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να εμφανιστούν πρωτεϊνικές ζώνες στη μεμβράνη, προκειμένου να διαπιστωθεί η πλήρης μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήγμα διαχωρισμού στη μεμβράνη.

Μετά και την διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη κόπηκε σε λωρίδες (test strips) οι οποίες τοποθετήθηκαν σε πολυκάναλα δοχεία προκειμένου να γίνει η

αποτύπωση της αντιδραστικότητας επιλεγμένων ορών. Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκε η κάλυψη των ελεύθερων θέσεων δέσμησης της μεμβράνης (blocking step), ώστε να αποφευχθεί η μη-ειδική δέσμηση των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιούνταν στα επόμενα στάδια. Αυτό επιτεύχθηκε με την επώαση της μεμβράνης, υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε διάλυμα PBS 0,5% Tween 20 με 5% σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος. Η επώαση διήρκεσε 1 ώρα. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης υπό ανάδευση, για 1,5 ώρα με το πρώτο αντίσωμα (ανθρώπινος ορός σε αραιώση 1/100). Σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε εκτός από ορός με γνωστή αντιδραστικότητα και μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πολυϊστιδιωμένης περιοχής της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης (anti-His-Taq). Ακολούθησε η πλύση της μεμβράνης με διάλυμα PBS 0.5% Tween 20 3 φορές και για 5 λεπτά και ακολούθησε η επώαση με το συνδεδεμένο με HRP (Horse Peroxidase) δευτερογενές αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση (1:1000) και κατόπιν πλύση της μεμβράνης όπως περιγράφηκε πιο πάνω. Στη συνέχεια η εμφάνιση των προϊόντων σύνδεσης αντιγόνου-αυτοαντισώματος-δεύτερου αντισώματος έγινε με χρωματομετρική μέθοδο και χρήση αντιδραστήριου ειδικού για την αποκάλυψη (diaminobenzidine-DAB με υπεροξείδιο), ενώ η προκύπτουσα αντιδραστικότητα που εμφανίστηκε με τη μορφή μπαντών αξιολογήθηκε ως προς το μοριακό βάρος και την πυκνότητά της.

2.2.5 Σχεδιασμός του προηγούμενα χαρακτηρισμένου CD4 T λεμφοκυτταρικού επιτόπου

Το πεπτίδιο GDLLAEIETDKATI της PDC-E2 έχει περιγραφεί ότι είναι ο ανοσοκυρίαρχος επίτοπος των CD4+ T λεμφοκυττάρων [10]. Σε αυτή τη μελέτη περιγράφεται ότι το πεπτίδιο βρίσκεται στη θέση 163-176 (PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆). Οι ερευνητές στη μελέτη που περιγράφει τον επίτοπο ξεκίνησαν την αρίθμηση της πρωτεΐνης από το πρώτο αμινοξύ του έξω λιποϋλικού τμήματος της PDC-E2 ως εκ τούτου περιγράφουν το πεπτίδιο στη θέση αυτή. Όταν μελετήσαμε την αλληλουχία της PDC-E2 (UniProtKB/Swiss-Prot entry P10515), το πεπτίδιο αυτό βρισκόταν στη θέση 216-229. Έτσι είτε το πεπτίδιο περιγράφεται ως PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆ είτε ως PDC-E2₂₁₆₋₂₂₉ στην ουσία θα πρόκειται για το ίδιο τμήμα της πρωτεΐνης. Για λόγους συνέχειας, το εν λόγω πεπτίδιο θα αναφέρεται ως PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆.

2.2.6 Αναζήτηση επιτόπων στο RankPep

Έγινε εισαγωγή της αλληλουχίας της PDC-E2 (UniProtKB/Swiss-Prot entry P10515) στη μηχανή πρόγνωσης επιτόπων <http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html> και έγινε ανάλυση της πρόγνωσης για το κάθε ένα από τα MHC II αλληλόμορφα που

εμφανίζονταν πιο συχνά στην ομάδα μελέτης. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στα πεπτιδία που είχαν καλό προγνωστικό σκορ να συνδέονται με το HLA DR8 αφού το συγκεκριμένο αλληλόμορφο φαίνεται να συνδέεται με τη νόσο στους Καυκάσιους [15]. Αφού έγινε μια λίστα πεπτιδίων ακολουθήθηκε και η αντίστροφη διαδικασία. Έγινε δηλαδή εισαγωγή του κάθε πεπτιδίου από αυτά που σχεδιάσαμε ξεχωριστά και υπολογίσαμε την ικανότητά του να συνδέεται ή όχι με το έκαστο μόριο MHC II από αυτά που παρουσιάζονταν πιο συχνά μεταξύ του υπό μελέτη πληθυσμού. Παράλληλα σχεδιάστηκε και το πεπτιδίο που αποτελεί τον προηγούμενα περιγραφόμενα επίτοπο [10]. Ανάλογη μελέτη έγινε και με τη μηχανή αναζήτησης επιτόπων SYFPEITHI.

2.2.7 Σχεδιασμός αλληλοεπικαλυπτόμενων πεπτιδίων που καλύπτουν όλη την PDC-E2.

Επειδή τα αποτελέσματα από τη μελέτη επιλεγμένων πεπτιδίων της PDC-E2 υποδείκνυαν ότι υπάρχουν πιθανοί επίτοποι πέραν του περιγραφόμενου από τους Shimoda et al [10], αποφασίστηκε να γίνει μια πιο συστηματική προσέγγιση στη μελέτη της ύπαρξης πιθανών επιτόπων. Το ιδανικό θα ήταν να σχεδιαστούν πεπτιδία τα οποία θα κάλυπταν ολόκληρη την PDC-E2 και θα αλληλεπικαλύπτονταν με διαφορά μόνο ενός αμινοξέως (<http://www.thinkpeptides.com/librarydesign.html>). Πρακτικά αυτό θα δημιουργούσε ένα μεγάλο πληθυσμό πεπτιδίων που για να γίνει μια συστηματική μελέτη της αντιδραστικότητας κατά αυτών θα απαιτούνταν πολύπλοκα, χρονοβόρα μεγάλα πειράματα αλλά και μεγάλος αριθμός λεμφοκυττάρων που δεν είναι πάντα διαθέσιμα. Τα πρακτικά αυτά προβλήματα μας οδήγησαν να σχεδιάσουμε πεπτιδία είκοσι αμινοξέων με διαφορά του κάθε ενός από το επόμενο του οκτώ αμινοξέων και αλληλεπικάλυψη δώδεκα αμινοξέων. Τα εικοσαμερή πεπτιδία είναι κατάλληλα τόσο για τη χαρτογράφηση επιτόπων αντισωμάτων όσο και για τη χαρτογράφηση CD4 λεμφοκυτταρικών επιτόπων. Ενώ τα εικοσαμερή πεπτιδία πολυ σωστά θα περίμενε κανείς να είναι ακατάλληλα για τη μελέτη CD8+ κυτταρικής αντίδρασης επειδή τα MHC μόρια κλάσης I έχουν κλειστή από τα δύο άκρα την περιοχή σύνδεσης του πεπτιδίου στο MHC μόριο, κάτι τέτοιο δεν αποτελεί πρόβλημα για τη μελέτη της CD4+ κυτταρικής ανοσιακής απόκρισης μιας και τα μόρια MHC κλάσης II έχουν ανοικτή την περιοχή σύνδεσης του πεπτιδίου και από τα δύο άκρα με αποτέλεσμα να μπορούν 20μερή πεπτιδία να συνδέονται σε αυτά [33, 34].

2.2.8 Σύνθεση πεπτιδίων

Μη βιοτινυλιωμένα συνθετικά πεπτιδία κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο της f-moc από την εταιρεία Mimotopes (Victoria, Australia). Η καθαρότητα των πεπτιδίων ήταν πάνω από 90% όπως φάνηκε με HPLC (reverse phase high-performance liquid chromatography).

2.2.9 Διάλυση και φύλαξη πεπτιδίων

Το κάθε ένα από τα πεπτίδια που δημιουργήθηκαν όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 3.2.1 παραλήφθηκε σε ποσότητα ενός γραμμαρίου και διαλύθηκε σε 40% ακετονιτρίλιο (40% acetonitrile) σε όγκο 200, 400 ή 600 μl με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν διαλύματα πεπτιδίων 5mg/ml, 2,5mg/ml ή 1,67mg/ml αντίστοιχα. Το κάθε ένα από τα πεπτίδια που περιγράφονται στην Παράγραφο 3.2.2 είχε μάζα 5g το καθένα και διαλύθηκε σε όγκο 2400 ή 2000 ή 1200 ή 800 ή 600 ή 400 μl με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν διαλύματα πεπτιδίων 2083 ή 2500 ή 4166 ή 6250 ή 8333 ή 12500 μg/ml αντίστοιχα. Ο όγκος των πεπτιδίων χωρίστηκε σε aliquots και τοποθετήθηκαν στους -80°C (stock solutions). Από αυτά δημιουργούνταν διαλύματα εργασίας (working solutions) τα οποία αραιώνονταν σε δεξαμενές πεπτιδίων (peptide pools) ή ξεχωριστά ώστε τελική συγκέντρωση του κάθε πεπτιδίου να είναι 10μg/ml. Τα διαλύματα εργασίας τοποθετούνταν στους -20 °C.

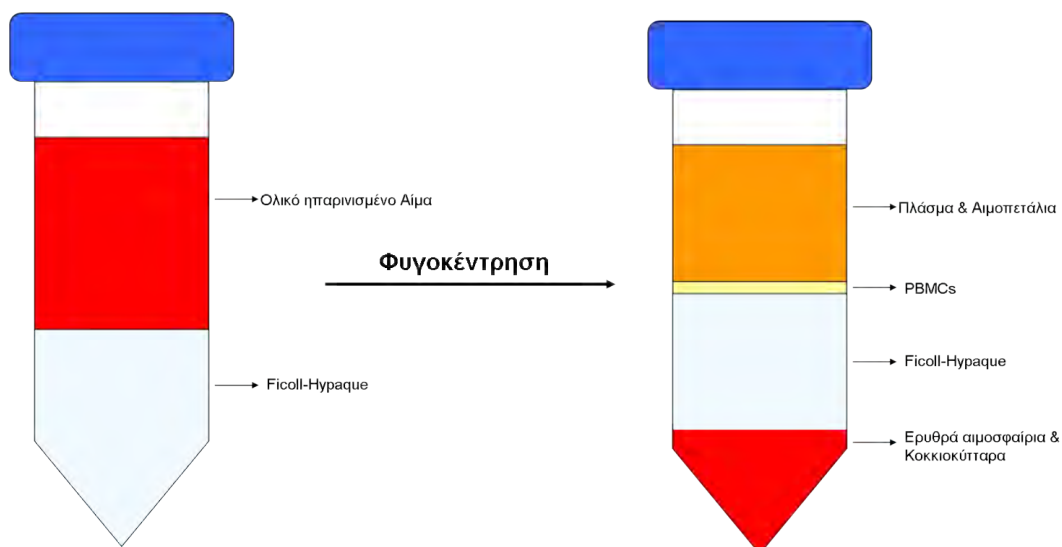
2.2.9 *In house ELISA για το χαρακτηρισμό των αντι-PDC-E2 γραμμικών επιτόπων των AMA*

Το κάθε πεπτίδιο από τη δεξαμενή πεπτιδίων που καλύπτουν ολόκληρη την αλληλουχία της πρωτεΐνης PDC-E2 αραιώθηκε σε PBS σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml. Σε ένα πιάτο 96 θέσεων για ELISA (MaxiSorb 96 microwell plate, Nunc) τοποθετήθηκαν σε κάθε πηγαδάκι 200 μl πεπτιδίου, PBS και το έσω λιποϊκό τμήμα της PDC-E2 σε συγκέντρωση 1μg/ml. Το πιάτο επώαστηκε για 1 ώρα στους 37°C προκειμένου να επικαλυφθεί το πηγαδάκι με το αντιγόνο. Μετά από την απομάκρυνση του διαλύματος του αντιγόνου ακολούθησαν 3 πλύσεις με 250μl PBS με 0.1% Tween 20 (Sigma, USA) και η μη ειδική σύνδεση περιορίστηκε με την επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση (shaker) με 2% αλβουμίνης ορού αγελάδας (bovine serum albumin-BSA, Sigma, USA) σε PBS. Με το πέρας της επώασης και μετά το άδειασμα του περιεχομένου του πιάτου ακολούθησε πλύσιμο με PBS-0.1% Tween 20. Ακολούθως τοποθετήθηκε 100μl ορός του ασθενούς σε αραιώση 1/100 σε PBS και επώαστηκε για 1.5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Εν συνεχεία, το πιάτο πλύθηκε 3 φορές με 250μl PBS με 0.1% Tween 20 και δύο φορές με 250μl PBS, τοποθετήθηκαν 100μl αντι-ανθρώπινου IgG δεύτερου αντισώματος συνδεδεμένου με HRP (sheep anti-human IgG horseradish peroxidase-HRP, Inova, San Diego, USA) και επώαστηκε για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθησαν 3 πλύσεις με 250μl PBS- 0.1% Tween 20 και δύο πλύσεις με 250μl PBS.

Τοποθετήθηκαν 100μl χρωμογόνου (3-30,5,50-tetramethylbenzidine-TMB, Inova, San Diego, USA) και μετά από επώαση 30 λεπτών υπό συνεχή ανάδευση η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη 100μl διαλύματος θειικού οξέος (Stop solution, Inova, San Diego, USA). Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 450nm με φωτόμετρο (Opsys MR™ Microplate Reader, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA) με φίλτρο αναφοράς τα 620nm. Αφού αφαιρέθηκε από όλα τα δείγματα η μη ειδική απορρόφηση (background) το όριο θετικότητας (cut-off) ορίστηκε σαν ο μέσος όρος απορρόφησης (O.D) όλων των πεπτιδίων, από όλους τους υγιείς μάρτυρες (Mean) συν δύο σταθερές αποκλίσεις (SD) όπως περιγράφεται και σε άλλες μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία [35, 36].

2.2.10 Απομόνωση, Ψύξη και Απόψυξη PBMCs

Η απομόνωση των PBMCs έγινε με τη μέθοδο της φυγοκέντρησης υπό κλίση πυκνότητας σε Ficoll-Hyraque (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Germany). Η λογική της μεθόδου αυτής στηρίζεται στο γεγονός ότι τα PBMCs (μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα) έχουν διαφορετική πυκνότητα από τα ερυθρά αιμοσφαίρια και από τα κοκκιοκύτταρα. Αποτέλεσμα αυτής της ιδιότητας είναι μετά τη φυγοκέντρηση τα μονοπύρνα να σχηματίζουν ένα νέφωμα πάνω από τη φικόλη, το πλάσμα και τα αιμοπετάλια να βρίσκονται ακριβώς πιο πάνω ενώ τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα κοκκιοκύτταρα να καθιζάνουν κάτω από τη φικόλη (βλέπε Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Διαχωρισμός συστατικών αίματος μετά από φυγοκέντρηση υπό κλίση πυκνότητας. Με το πέρας της φυγοκέντρησης, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα κοκκιοκύτταρα καθιζάνουν κάτω από τη φικόλη, τα PBMCs σχηματίζουν μια στοιβάδα ακριβώς πάνω από τη φικόλη και τέλος, το πλάσμα και τα αιμοπετάλια βρίσκονται ακριβώς από πάνω.

Αναλυτικότερα, η αιμοληψία γινόταν σε σύριγγες 20ml ή φιαλίδια τα οποία περιείχαν

ηπαρίνη σε τέτοια ποσότητα, που με το πέρας της αιμοληψίας να αντιστοιχούν 5 units ηπαρίνης σε 1ml ολικού αίματος. Στη συνέχεια, σε θάλαμο νηματικής ροής, το αίμα στοιβαζόταν μέσα σε μπουκαλάκια τύπου Falcon (Corning® Centrifuge Tubes) σε φικόλη έτσι ώστε η αναλογία φικόλης προς το αίμα να είναι 1:1 έως 1:1.5. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές ανά λεπτό (800 g) για 20 λεπτά χωρίς φρένο στους 20°C. Με το πέρας της φυγοκέντρησης υπήρχαν οι διακριτές στοιβάδες που απεικονίζονται στην Εικόνα 4. Η στοιβάδα των PBMCs συλλεγόταν προσεχτικά με πουάρ προσέχοντας να μην γίνεται αναρρόφηση φικόλης και μεταφερόταν σε άλλο Falcon. Στο Falcon γινόταν προσθήκη RPMI 1640 (RPMI 1640 with L-Glutamine, with Phenol Red, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Germany) μέχρι να γεμίσει. Ακολουθούσαν δύο πλύσεις στις 1800rpm για 8 λεπτά και 1700rpm για 7 λεπτά αντίστοιχα. Πριν από κάθε πλύση το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυόταν σε RPMI 1640. Μεταξύ πρώτης και δεύτερης πλύσης τα PBMCs μετρούνταν. Με το πέρας της δεύτερης πλύσης, η εκ νέου διάλυση του ιζήματος γινόταν σε διάλυμα που περιέχει 75% Fetal Calf Serum, 15% RPMI 1640 και 10% DMSO (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Germany). Ο όγκος που διαλύονταν τα κύτταρα ήταν τέτοιος, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι $5-10 \times 10^6$ κύτταρα/ml. Σε κάθε κρυσταλλίδιο (Corning® 1.2mL External Threaded Polypropylene Cryogenic Vial) μεταφερόταν 1ml ($5-10 \times 10^6$ κύτταρα) και αναγράφονταν όλα τα στοιχεία του ασθενούς. Τα κρυσταλλίδια στη συνέχεια τοποθετούνταν σε ειδικά δοχεία (Freezing container, Nalgene® Mr. Frosty) που περιέχουν ισοπροπανόλη (Sigma) και τοποθετούνταν για 20-24 ώρες στους -80°C. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη προκειμένου να επιτευχθεί σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας των κυττάρων [37, 38]. Στη συνέχεια ακολουθούσε η μεταφορά τους στο υγρό άζωτο (-210 °C)

Κατά τη διαδικασία της απόψυξης τα PBMCs μεταφέρονταν από το υγρό άζωτο στο δωμάτιο κυτταροκαλλιεργειών σε δοχείο που περιείχε μικρή ποσότητα υγρού αζώτου. Το κρυσταλλίδιο έμπαινε στη συνέχεια σε υδατόλουτρο στους 37°C και με μικρές κυκλικές κινήσεις παρέμενε στο νερό μέχρι να λιώσει το περιεχόμενο και να παραμείνει μια μικρή ποσότητα πάγου στο κρυσταλλίδιο. Το κρυσταλλίδιο αφού ψεκαζόταν με 70% αιθανόλη μεταφερόταν στο θάλαμο νηματικής ροής και καλλιεργητικό υλικό το οποίο βρισκόταν στους 37°C μεταφερόταν σταγόνα-σταγόνα στο κρυσταλλίδιο μέχρι αυτό να γεμίσει. Ως καλλιεργητικό υλικό χρησιμοποιήθηκε RPMI 1640 (RPMI 1640 with L-Glutamine, with Phenol Red, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Germany) που περιείχε φιλτραρισμένο 5% FBS (FBS "Gold", Heat Inactivated, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Germany), πενικιλίνη 1000 Units/ml και στρεπτομυκίνη 0.1mg/ml (Penicillin/Streptomycin -100x-, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Germany). Το περιεχόμενο του κρυσταλλιδίου στη

συνέχεια μεταφερόταν σταγόνα-σταγόνα σε ένα Falcon 50ml που περιείχε καλλιεργητικό υλικό στους 37°C. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 1800rpm για 8 λεπτά. Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου και την επαναδιάλυση του ιζήματος σε καλλιεργητικό υλικό, ακολουθούσε δεύτερο πλύσιμο και φυγοκέντρηση στις 1700rpm για 7 λεπτά. Στη συνέχεια το ίζημα επαναδιαλύοταν σε μικρή ποσότητα καλλιεργητικού υλικού ανάλογα με το αριθμό των αναμενόμενων PBMCs. Μικρή ποσότητα εναιωρήματος κυττάρων αναδεύοταν με Trypan Blue και ακολουθούσε μέτρηση του συνολικού αριθμού των PBMCs και υπολογισμός της βιωσιμότητάς τους η οποία ήταν σε όλες τις περιπτώσεις μεγαλύτερη από 95%. Στη συνέχεια τα PBMCs διαλύονταν εκ νέου σε όγκο τέτοιο καλλιεργητικού υλικού προκειμένου να επιτύχουμε συγκέντρωση κυττάρων 10⁶/ml.

2.2.11 IFN- γ ELISpot

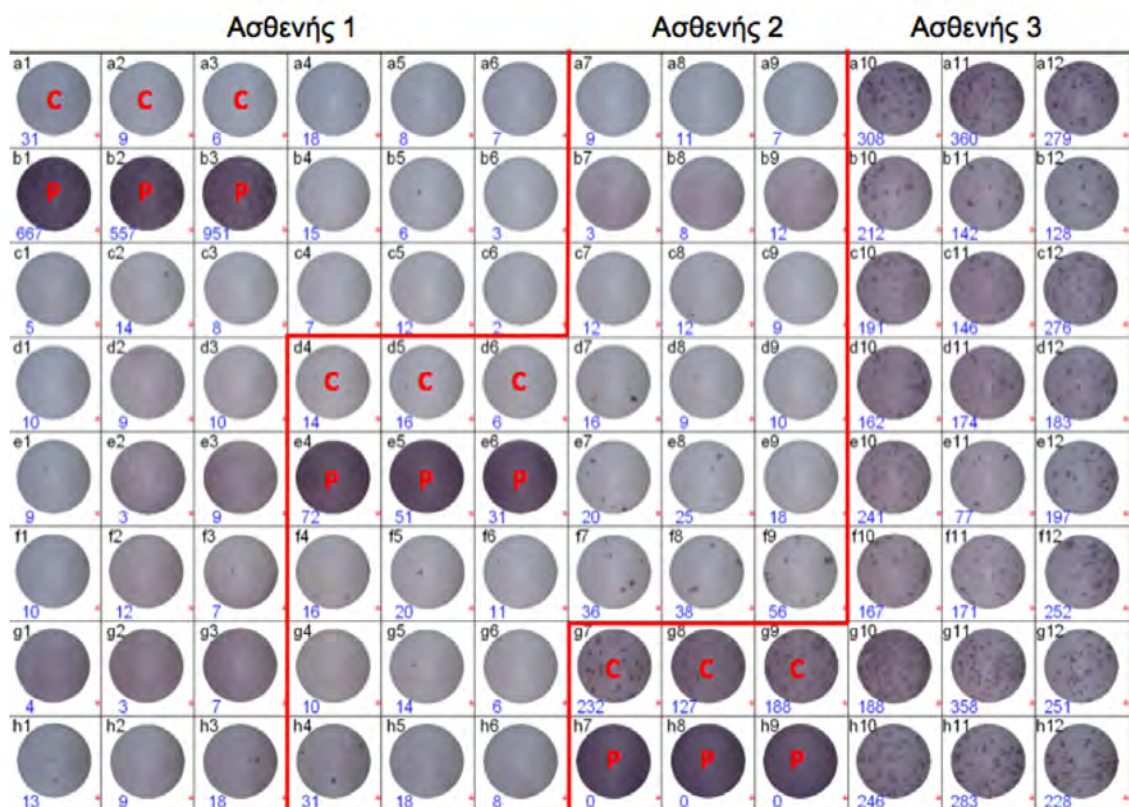
Σε πιάτο κυτταροκαλλιεργείων 96U (Multiple Well Cluster Plate, 96 Well, Round, TC-Treated, Sterile, Corning) τοποθετούνταν 200×10³ PBMCs (200μl) ανά πηγαδάκι και εν συνεχεία διεγείρονταν με το προς εξέταση πεπτιδίδιο ή δεξαμενή πεπτιδίων τα οποία βρίσκονταν σε συγκέντρωση 10μg/ml [39]. Παράλληλα PBMCs καλλιεργούνταν παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού (RPMI 1640 και 10% ακτινοβολημένο Fetal Bovine Serum - FBS), ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιούνταν PHA (Phytohaemagglutinin, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Germany) σε συγκέντρωση 2μg/ml ή/και διαλυτό anti-CD3 αντίσωμα (Mabtech) σε αραιώση 1:1000. Για κάθε συνθήκη χρησιμοποιούνταν τουλάχιστον 3 πηγαδάκια. Το πιάτο έμπαινε σε επωαστήρα με συνθήκες εφύγρανσης, στους 37 °C και με ατμόσφαιρα 5% CO₂ (Thermo Scientific Forma Series II Water Jacketed CO₂ Incubators).

Αργότερα την ίδια μέρα ένα 96 θέσεων πιάτο επικαλυπτόμενο με PVDF (Mabtech, Sweden) ενεργοποιούνταν για 2 λεπτά με αιθανόλη 70% και ακολουθούσαν 5 πλύσεις με PBS. Με το πέρας και της τελευταίας πλύσης προσθέτονταν 100μl μονοκλωνικού αντισώματος κατά της IFN- γ (Mabtech, Sweden) σε συγκέντρωση 15μg/ml και το πιάτο παρέμενε σε θερμοκρασία 4 °C όλη τη νύχτα.

Την επόμενη μέρα και αφού είχαν περάσει 24 ώρες από το πέρας της διέγερσης των PBMC το PVDF πιάτο ξεπλενόταν 5 φορές με PBS και τοποθετούνταν 200μl καλλιεργητικό υλικό για 30 λεπτά για την αποφυγή της μη ειδικής σύνδεσης πρωτεϊνών στα αντισώματα (blocking step). Ακολούθως μεταφερόταν το περιεχόμενο του 96U πιάτου της κυτταροκαλλιέργειας στο πιάτο της ELISpot κατ' αντιστοιχία. Τελικά, το πιάτο μεταφερόταν στον επωαστήρα για άλλες 24 ώρες.

Στις 48 ώρες από την έναρξη της κυτταροκαλλιέργειας και στις 24 ώρες από την

μεταφορά των διεγερμένων PBMCs στο PVDF πιάτο, το περιεχόμενο αναρροφόταν και γίνονταν 5 πλύσεις με PBS. Η προσθήκη 100μl βιοτινιλυομένου αντι-IFN-γ αντισώματος (1 μg/ml) (Mabtech, Sweden) ήταν το επόμενο βήμα και ακολουθούσε επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια και αφού μεσολαβούσαν 5 πλυσίματα με PBS, γινόταν η προσθήκη 100μl αλκαλικής φωσφατάσης συνδεδεμένης με στρεπταβιδίνη (Mabtech, Sweden) και το πιάτο επωαζόταν για άλλη 1 ώρα στο σκοτάδι. Μετά και την απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου διαλύματος και 5 πλύσεις με PBS ακολουθούσε η προσθήκη στο πιάτο του υπόστρωματος NBT/BCIP (Mabtech, Sweden). Η αντίδραση σταματούσε όταν άρχιζαν να εμφανίζονται κηλίδες στις θέσεις με το αντιγόνο που χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας (PHA). Οι κηλίδες μετρούνταν με τη βοήθεια ενός αυτοματοποιημένου μετρητή ELISPOT (AID EliSpot Reader classic, AID, Germany) όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5. Παράδειγμα IFN-γ ELISPOT assay όπως αυτό διαβάστηκε από τον αυτόματο αναλυτή ELISPOT (AID EliSpot Reader classic, AID, Germany). Τα λεμφοκύτταρα διεγείρονταν εις τριπλούν με PHA [θετικός μάρτυρας – positive control (P)] με κάθε έκαστη δεξαμενή πεπτιδίων ή πεπτιδίο και παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού [control – (C)]. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν αριθμός ειδικών προς το αντιγόνο CD4+ T λεμφοκυττάρων που παράγουν κηλίδες (Ag Specific Spot Forming Units - AgSpSFU) ανά εκατομμύριο PBMCs. Αυτά υπολογίζονται από τη διαφορά της μέσης τιμής του αριθμού των ειδικών CD4+ T λεμφοκυττάρων που παράγουν κηλίδες σαν απάντηση σε ένα αντιγόνο/πεπτιδίο και της μέσης τιμής του αριθμού των CD4+ T λεμφοκυττάρων που παράγουν κηλίδες παρουσία μόνο του υγρού της καλλιέργειας

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν αριθμός ειδικών προς το αντιγόνο CD4+ T λεμφοκυττάρων που παράγουν κηλίδες (Ag Specific Spot Forming Units - AgSpSFU) ανά εκατομμύριο PBMCs. Αυτά υπολογίζονται από τη διαφορά της μέσης τιμής του αριθμού των ειδικών CD4+ T λεμφοκυττάρων που παράγουν κηλίδες σαν απάντηση σε ένα αντιγόνο/πεπτιδίο και της μέσης τιμής του αριθμού των CD4+ T λεμφοκυττάρων που παράγουν κηλίδες παρουσία μόνο του υγρού της καλλιέργειας. Εκεί όπου το αποτέλεσμα ήταν μεγαλύτερο του μηδενός (δηλαδή $\text{AgSpSFU}/10^6 > 0$) ακολούθησε σύγκριση των τιμών των SFU σε συνθήκες καλλιέργειας χωρίς αντιγόνο με τις τιμές των SFU σε συνθήκες παρουσίας του αντιγόνου. Η σύγκριση γινόταν με t tests όταν οι τιμές είχαν κανονική κατανομή (unpaired Student t tests) και Mann-Whitney test αν οι τιμές δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Τιμές p value <0.05 θεωρούνταν στατιστικά σημαντικές.

2.2.12 Μελέτη της ενδοκυττάριας παραγωγής IFN- γ από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα με κυτταρομετρία ροής

Τα PBMCs των ασθενών και των μαρτύρων αφού ξεπαγώνονταν και μετρούνταν έρχονταν σε συγκέντρωση $10^6/\text{ml}$. Στη συνέχεια τα PBMCs τοποθετούνταν σε πιάτο κυτταροκαλλιέργειών 24 θέσεων σε συγκέντρωση 500×10^3 PBMCs (500 μl) ανά πηγαδάκι. Ακολουθούσε η διέγερση με 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ πεπτιδίου. Παράλληλα κύτταρα καλλιεργούνταν παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού, ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιούνταν PHA (σε συγκέντρωση 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ή/και διαλυτό anti-CD3 αντίσωμα (Mabtech) σε αραιώση 1:1000. Το πιάτο έμπαινε σε επωαστήριο με συνθήκες εφύγρανσης, στους 37°C και με ατμόσφαιρα 5% CO₂ και παρέμενε 7 ημέρες. Στο διάστημα αυτό και ανά τρίτη ημέρα αξιολογούνταν η ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων και γινόταν εκτίμηση του ενδεχομένου πιθανής επιμόλυνσης σε ανάστροφο μικροσκόπιο (Carl Zeiss Inc, Germany). Στις έξι ημέρες και 8-10 ώρες πριν την μονιμοποίηση των λεμφοκυττάρων τοποθετούνταν σε κάθε πηγαδάκι 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ αναστολέας της ενδοκυττάριας μεταφοράς των πρωτεϊνών που περιείχε Brefeldin A (GolgiPlug™, BD Biosciences) με σκοπό την ενδοκυττάρια παραμονή της παραγόμενης IFN- γ . Την έβδομη ημέρα ακολουθούσε η συλλογή των λεμφοκυττάρων και η τοποθέτησή τους σε φιαλίδια erpendorfs και στη συνέχεια φυγοκέντρησή τους σε 6000rpm για 90 δευτερόλεπτα και αναρρόφηση και φύλαξη του υπερκλειμένου καλλιεργητικού υλικού. Ακολουθούσε επαναδιάλυση των κυττάρων σε 500 μl κρύο 0.1%NaN₃, 2%BSA PBS και η δεύτερη φυγοκέντρωση σε 6000rpm για 90 δευτερόλεπτα. Ακολουθούσε η αναρρόφηση του υπερκλειμένου και η επαναδιάλυση των κυττάρων σε 100 μl 0.1%NaN₃, 2%BSA PBS.

Ακολουθούσε η προσθήκη αντι-CD4 φθορίζοντος αντισώματος anti-CD4 Alexa647 ή anti-CD4 FITC (BD Biosciences) σε ποσότητα 1μl ή 8μl αντίστοιχα. Η συγκέντρωση των αντισωμάτων καθορίστηκε σε προκαταρκτικά πειράματα με σκοπό να χρησιμοποιείται ποσότητα αντισώματος τέτοια που θα ήταν ικανό να συνδέεται με τα κύτταρα χωρίς να γίνεται σπατάλη αντισωμάτων. Ακολουθούσε επώαση για τριάντα λεπτά στον πάγο και σε σκοτεινές συνθήκες. Με το πέρας της επώασης άλλα 300μl κρύο 0.1% NaN₃, 2% BSA PBS τοποθετούνταν σε κάθε φιαλίδιο για το ξέπλυμα των κυττάρων και ακολουθούσε φυγοκέντρηση για 90 δευτερόλεπτα στις 6000rpm. Μετά την αναρρόφηση του υπερκειμένου τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε 100μl διαλύματος που προκαλούσε μονιμοποίηση και διάτρηση της μεμβράνης των κυττάρων και περιείχε <15% φορμαδεύδη και <50% αιθυλενική γλυκόλη (BD FACS™ Permeabilizing Solution 2), αναδεύονταν καλά και επωάζονταν σε πάγο και σε σκοτεινό μέρος για 10 λεπτά. Ακολουθούσε η προσθήκη 1μl anti-IFN-γ FITC (BD Biosciences) ή anti-IFN-γ APC (BD Biosciences) ανάλογα αν είχε χρησιμοποιηθεί προηγουμένως αντίσωμα anti-CD4 Alexa647 ή anti-CD4 FITC αντίστοιχα. Ακολουθούσε και πάλι επώαση 30 λεπτών σε πάγο και σκοτεινό μέρος. Μετά τα 30 λεπτά, 300μl κρύο 0.1% NaN₃, 2% BSA PBS τοποθετούταν σε κάθε φιαλίδιο erpendorf, ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 6000rpm για 90 δευτερόλεπτα, αναρρόφηση του υπερκειμένου, επαναδιάλυση των κυττάρων σε 150μl κρύου 0.1% NaN₃, 2% BSA PBS και προσθήκη 75μl διαλύματος μονιμοποίησης (Fix Buffer, Miltenyi, Germany). Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρονταν σε φιαλίδια κυτταρομετρίας ροής. Η ανάλυση των δειγμάτων γινόταν σε κυτταρόμετρο BD (BD FACSCalibur) και η ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση των λογισμικών BD CellQuest™ Pro software και FlowJo. Σε όσους ασθενείς και σε συνθήκες διέγερσης η ποσοστιαία αναλογία πληθυσμού των CD4+IFNγ+ με το αντιγόνο ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη ποσοστιαία αναλογία σε συνθήκες καλλιέργειας σε μόνο καλλιεργητικό υλικό, ακολουθούσε σύγκριση των πληθυσμών με τα Super Enhanced D-Max, Overton Subtraction και Probability Binning Comparison tests με την πλατφόρμα σύγκρισης πληθυσμών του προγράμματος FlowJo (FlowJo's Population Comparison platform) για την ανεύρεση της στατιστικής σημαντικότητας [40-42].

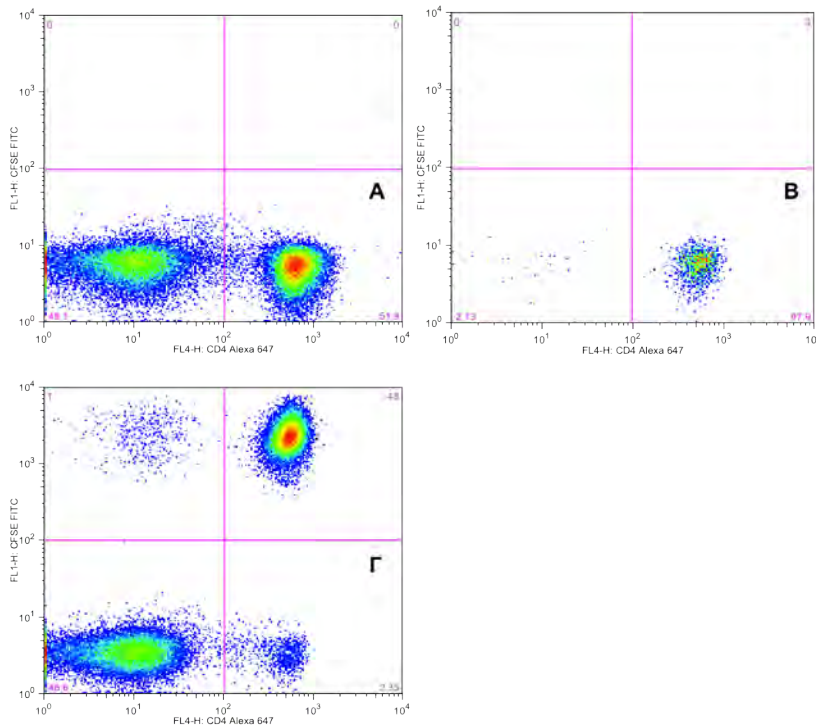
2.2.13 Ταυτόχρονη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της παραγωγής IFN-γ από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα με κυτταρομετρία ροής

Για το διαχωρισμό των CD4+ λεμφοκυττάρων έγινε μαγνητικός διαχωρισμός με τη χρήση του πακέτου διαχωρισμού CD4+ T Cell Isolation Kit II-human (Miltenyi, Germany) (<https://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001900/IM0001983.a>

shx). Αναλυτικότερα, τα PBMCs αφού ξεπαγώνονταν και μετρούνταν όπως περιγράφεται πιο πάνω φυγοκεντρούνταν για 7 λεπτά στις 1700rpm, επαναδιαλύονταν σε 5ml παγωμένο (4°C) 0.5%BSA PBS που περιείχε 2mM EDTA (buffer) και φυγοκεντρούνταν και πάλι στις 1200rpm για 10 λεπτά. Μετά την αναρρόφηση του υπερκείμενου τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε 40ml buffer για κάθε 10^7 λεμφοκύτταρα και γινόταν η προσθήκη του διαλύματος αντισωμάτων επικαλυμένα με βιοτίνη (Biotin-Antibody Cocktail) της κατασκευάστριας εταιρίας κατά των επιφανειακών μορίων CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ και Glycophorin A σε ποσότητα 10μl ανά 10^7 λεμφοκύτταρα. Ακολουθούσε καλή ανάδευση και το διάλυμα τοποθετούνταν στους 4°C για 15 λεπτά. Μετά την επώαση ακολουθούσε η προσθήκη επιπλέον 30ml buffer ανά 10^7 λεμφοκύτταρα και ακολούθως γινόταν η προσθήκη 20ml ανά 10^7 λεμφοκύτταρα μεταλλικών μικροσφαιριδίων συνδεδεμένα με αντισώματα κατά της βιοτίνης (Anti-Biotin MicroBeads). Μετά από καλή ανάδευση ακολουθούσε επώαση για επιπλέον 15 λεπτά στους 4-8 °C. Με το πέρας της επώασης γινόταν προσθήκη buffer σε όγκο 10-20x σε σχέση με τον τελικό όγκο. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 1200rpm για 10 λεπτά, το υπερκείμενο στη συνέχεια αναρροφόνταν πλήρως και γινόταν ανάδευση των κυττάρων (μέχρι 10^8) σε 500 ml buffer. Ακολουθούσε ο μαγνητικός διαχωρισμός σε στήλες MS με MiniMACS™ Separator (Miltenyi, Germany). Αναλυτικότερα, αφού συνδέονταν οι στήλες διαχωρισμού MS στον μαγνήτη, η στήλη ετοιμαζόταν να δεκτεί τον συνδεδεμένο ή μη με μεταλλικά μικροσωματίδια κυτταρικό πληθυσμό με το δις πέρασμα 500ml buffer. Ακολούθως το εναιώρημα των κυττάρων περνούσε σταγόνα-σταγόνα από τη στήλη και τα μη συνδεδεμένα με μικροσφαιρίδια κύτταρα (CD4+ T βοηθητικά λεμφοκύτταρα) συλλέγονταν στην έξοδο της στήλης. Ακολούθησε η έκπλυση της στήλης τρις με 300ml buffer με τη συλλογή των εναπομείναντων στη στήλη CD4+ T βοηθητικών λεμφοκυττάρων. Ακολούθως και ενώ η στήλη απομακρυνόταν από το μαγνήτη και κατά συνέπεια από το μαγνητικό πεδίο, η στήλη ξεπλενόταν δύο φορές με 1ml buffer για να συλλεγεί σε διαφορετικό falcon ο μη CD4+ T λεμφοκυτταρικός πληθυσμός. Δείγμα κυττάρων πριν και μετά το μαγνητικό διαχωρισμό αναλυόταν σε σχέση με το ποσοστό ύπαρξης CD4+ T βοηθητικών λεμφοκυττάρων με κυτταρομετρία ροής. Οι δύο κυτταρικοί πληθυσμοί φυγοκεντρούνταν και τα μεν μη CD4+ T βοηθητικά λεμφοκύτταρα επαναδιαλύονταν σε καλλιεργητικό υλικό σε συγκέντρωση 10^6 /ml, ενώ τα CD4+ T βοηθητικά λεμφοκύτταρα προετοιμαζόνταν για να σημανθούν με τη χρωστική CFSE με σκοπό τη μελέτη του πολλαπλασιασμού τους. Η ουσία CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) είναι μια φθορίζουσα ουσία που διεγείρεται και εκπέμπει σε φάσμα 492 nm και 517 nm αντίστοιχα. Διαχέεται παθητικά εντός των κυττάρων και μεταφέρεται ισόποσα στα θυγατρικά κύτταρα κατά τον

κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Δεν έχει κάποιο χρώμα και δεν φθορίζει μέχρι οι οξικές ομάδες να διασπαστούν από ενδοκυττάρια εστεράσες και να δημιουργηθεί ένα παράγωγο το οποίο αντιδρά με ενδοκυττάρια αμίνες σχηματίζοντας φθορίζοντα σύμπλοκα. Η περίσσεια της χρωστικής διαχέεται και πάλι στον εξωκυττάριο χώρο όπου ξεπλένεται. Η ενδοκυττάρια χρωστική μετά από διαίρεση του κυττάρου μεταφέρεται χωρίς απώλειες στα θυγατρικά κύτταρα ή στο κύτταρο που θα δημιουργηθεί μετά από σύντηξη και χωρίς να μεταφέρεται σε γειτονικά κύτταρα [43]. Λόγω της ικανότητας φθορισμού της ουσίας, το κύτταρο που την περιέχει μπορεί να ανιχνευτεί με κυτταρομετρία ροής. Η ένταση του φθορισμού ελαττώνεται ολοένα και περισσότερο σε κάθε επόμενο κυτταρικό κύκλο επιτρέποντάς μας να υπολογίσουμε τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών.

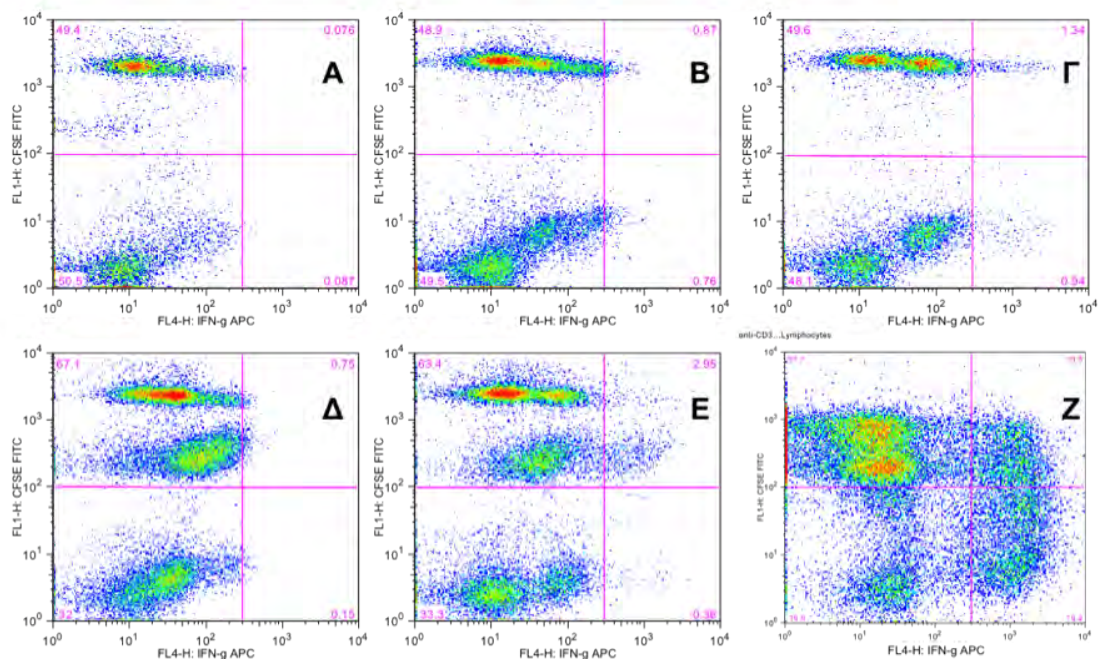
Η χρωστική CFSE (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, Molecular Probes, Inc) διαλύονταν σε DMSO σε συγκέντρωση 5mM. Τα CD4+ T βοηθητικά λεμφοκύτταρα επαναδιαλύονταν σε συγκέντρωση 10^6 /ml σε προθερμαινόμενο στους 37°C 0.1%BSA PBS και ακολουθούσε η προσθήκη 2ml διαλύματος χρωστικής ανά ml έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 10μM. Με το πέρας μιας δεκάλεπτης επώασης στους 37°C γινόταν η προσθήκη πενταπλάσιου όγκου παγωμένου καλλιεργητικού υλικού. Ακολουθούσε επώαση 5 λεπτών στον πάγο. Εν συνεχεία το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρούνταν στις 1700rpm για 7 λεπτά και το ίζημα επαναδιαλυόταν σε καλλιεργητικό υλικό, διαδικασία που γινόταν μέχρι να επιτευχθεί ο αριθμός των 3 πλύσεων. Αφού γινόταν και πάλι μέτρηση των κυττάρων, οι δύο κυτταρικοί πληθυσμοί αναμειγνύονταν έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των κυττάρων να είναι 10^6 /ml. Μικρός πληθυσμός από τα αναμειγμένα λεμφοκύτταρα αναλυόταν και πάλι με κυτταρομετρία ροής για να φανεί ο τρόπος με τον οποίο έγινε η σήμανση των λεμφοκυττάρων με τη χρωστική (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Α. Ο αρχικός πληθυσμός των PBMCs βαφόταν με αντι-CD4 φθορίζον αντίσωμα έτσι ώστε να εκτιμηθεί η αρχική αναλογία των CD4+ λεμφοκυττάρων. Β. Ακολουθούσε ο μαγνητικός διαχωρισμός όπου επιτυγχανόταν καθαρότητα του πληθυσμού των CD4+ λεμφοκυττάρων σε ποσοστό >95% σε όλες τις περιπτώσεις. Τα CD4+ λεμφοκύτταρα που περνούσαν από τις σήλες ποτέ δεν υπερέβαιναν το 2.5%. Γ. Όταν το κλάσμα των CD4+ T λεμφοκυττάρων βαφόταν με τη χρωστική CFSE, αναμειγνύονταν οι πληθυσμοί και το σύνολο των κυττάρων βαφόταν με αντι-CD4 Alexa 647 αντίσωμα φαινόταν ότι ποσοστό >95% των CD4+ λεμφοκυττάρων στο συνολικό πληθυσμό ήταν CFSE+.

Ακολούθως 0.5×10^6 PBMCs (500μl) από τον αναμειγμένο πληθυσμό μοιράζονταν σε πιάτο κυτταροκαλλιεργειών 24 θέσεων πιάτο μαζί με το πεπτικό (τελική συγκέντρωση 10μg/ml). Κύτταρα καλλιεργούνταν παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιούνταν PHA (σε συγκέντρωση 2μg/ml ή διαλυτό anti-CD3 αντίσωμα (Mabtech) σε αραιώση 1:1000). Το πιάτο των κυτταροκαλλιεργειών τοποθετούνταν σε επωαστήριο με συνθήκες εφύγρανσης, στους 37 °C και με ατμόσφαιρα 5% CO₂ και παρέμενε για 7 ημέρες. Ανά τρίτη ημέρα αξιολογούνταν η ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων και γινόταν εκτίμηση του ενδεχομένου επιμόλυνσης σε ανάστροφο μικροσκόπιο (Carl Zeiss Inc, Germany). Στις έξι ημέρες και 8-10 ώρες πριν την μονιμοποίηση των λεμφοκυττάρων τοποθετούνταν σε κάθε πηγαδάκι 1μl/ml αναστολέας της ενδοκυττάριας μεταφοράς των πρωτεϊνών που περιείχε Brefeldin A (GolgiPlug™, BD Biosciences) με σκοπό την ενδοκυττάρια παραμονή της οποίας παραγόμενης IFN-γ. Την έβδομη ημέρα ακολουθούσε η συλλογή των λεμφοκυττάρων και η τοποθέτησή τους σε φιαλίδια erpendorfs, η φυγοκέντρωσή τους σε 6000rpm για 90 δευτερόλεπτα, ή

αναρρόφηση και φύλαξη του υπερκειμένου καλλιεργητικού υλικού, η επαναδιάλυση των κυττάρων σε 500μl κρύο 0.1%NaN₃, 2%BSA PBS και η δεύτερη φυγοκέντρηση σε 6000rpm για 90 δευτερόλεπτα. Μετά την αναρρόφηση του υπερκειμένου τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε 100μl διαλύματος που προκαλούσε μονιμοποίηση και διάτρηση της μεμβράνης των κυττάρων και περιείχε <15% φορμαδεΰδη και <50% αιθυλενική γλυκόλη (BD FACSTM Permeabilizing Solution 2), αναδεύονταν καλά και επωάζονταν σε πάγο και σε σκοτεινό μέρος για 10 λεπτά. Ακολουθούσε η προσθήκη anti-IFN-γ APC (BD Biosciences). Ακολουθούσε και πάλι επώαση 30 λεπτών σε πάγο και σε σκοτεινό μέρος. Μετά τα 30 λεπτά, 300μl κρύο 0.1% NaN₃, 2% BSA PBS τοποθετούνταν σε κάθε φιαλίδιο erpendorf, ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 6000rpm για 90 δευτερόλεπτα, αναρρόφηση του υπερκειμένου, επαναδιάλυση των κυττάρων σε 150μl κρύου 0.1% NaN₃, 2% BSA PBS και προσθήκη 75μl διαλύματος μονιμοποίησης (Fix Buffer, Miltenyi, Germany). Τα κύτταρα μεταφέρονταν σε φιαλίδια κυτταρομετρίας ροής και η ανάλυση των δειγμάτων γινόταν σε κυτταρόμετρο BD (BD FACSCalibur). Έτσι, με το πέρας της διαδικασίας τα CD4+ λεμφοκύτταρα ήταν σημασμένα με τη χρωστική CFSE. Με τη διαδικασία της ενδοκυττάριας σήμανσης με αντισώμα αντι-IFN-γ Alexa647 γινόταν δυνατή η ταυτόχρονη μελέτη τόσο της ικανότητας πολλαπλασιασμού των CD4+ T λεμφοκυττάρων παρουσία του αντιγόνου όσο ή/και η δυνατότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών παρουσία του πεπτιδίου. Κάποια παραδείγματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 7.



Εικόνα 7. Τα CD4+ T λεμφοκύτταρα επιλέχθηκαν με τη μέθοδο του μαγνητικού διαχωρισμού και στη συνέχεια σημάνθηκαν με τη χρωστική CFSE, έτσι ώστε τα CFSE+ κύτταρα να είναι CD4+ T λεμφοκύτταρα. Μετά από καλλιέργεια μιας εβδομάδας παρουσία ή όχι πεπτιδίων αξιολογούνταν ταυτόχρονα ο πολλαπλασιασμός των CD4+ T λεμφοκυττάρων και η ικανότητά τους να εκκρίνουν IFN-γ. Παραδείγματα από όλα τα πιθανά αποτελέσματα παρουσιάζονται σε αυτή την εικόνα

A. CD4+ T λεμφοκύτταρα, τα οποία καλλιεργήθηκαν μόνο με καλλιεργητικό υλικό δεν πολλαπλασιάζονταν ούτε παρουσίαζαν έκκριση IFN-γ

B. CD4+ T λεμφοκύτταρα, τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία κάποιων αντιγόνων τα οποία δεν αναγνωρίζονταν από το λεμφοκυτταρικό πληθυσμό δεν πολλαπλασιάζονταν ούτε παρουσίαζαν έκκριση IFN-γ

Γ. Τα CD4+ T λεμφοκύτταρα είναι δυνατόν να παράγουν IFN-γ χωρίς όμως τον απαραίτητο κυτταρικό πολλαπλασμό.

Δ. CD4+ T λεμφοκύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν κυτταρικό πολλαπλασιασμό χωρίς όμως να συνοδεύεται από έκκριση IFN-γ.

E. CD4+ T λεμφοκύτταρα τα οποία παρουσιάζουν ταυτόχρονα κυτταρικό πολλαπλασιασμό και παραγωγή IFN-γ

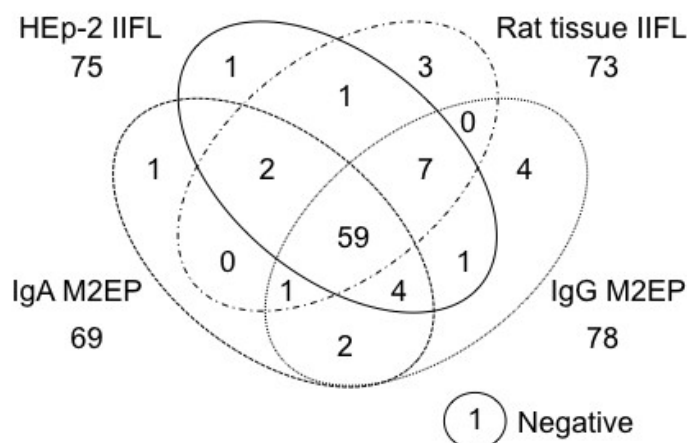
Z. CD4+ T λεμφοκύτταρα, τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία ενός ισχυρού μιτογόνου (π.χ. PHA) παρουσιάζουν σημαντικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό και παράλληλα έκκριση IFN-γ.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Χαρακτηρισμός AMA

3.1.1 Ανοσοφθορισμός - ELISA

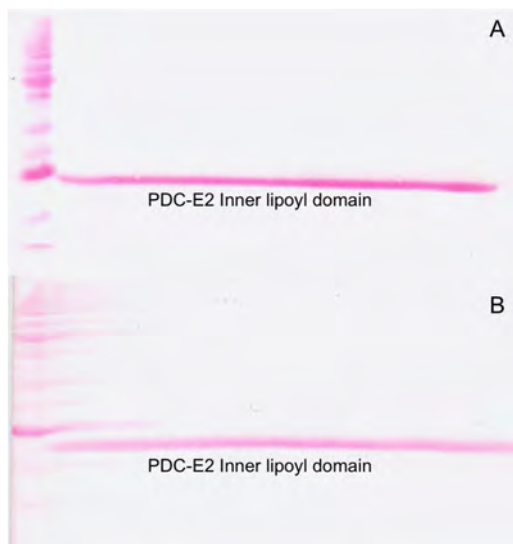
Ανάμεσα σε 87 ασθενείς με ΠΧΚ (2 με σύνδρομο επικάλυψης ΑΙΗ-ΠΧΚ) παρατηρήθηκε η ύπαρξη AMA με την μέθοδο του ΕΑΦ σε υπόστρωμα ΗΕρ-2 στους 75 (86.2%, διάμεση τιμή 1/320, εύρος 1/40-1/1280), σε υπόστρωμα ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου σε 73 ασθενείς (83.9%, διάμεση τιμή 1/320, εύρος 1/40-1/5120) ενώ 79 (90,1%) ελέγχθηκαν θετικοί για την παρουσία AMA σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε τουλάχιστον ένα υπόστρωμα. Με την μέθοδο της ELISA με την υβριδική πρωτεΐνη MIT-3 τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν για τα μεν IgG 89.6% (78 ασθενείς), τα δε IgA 79.3% (69 ασθενείς) ενώ το ποσοστό αυτό όταν μια από τις δύο αυτές κλάσεις ή και οι δύο ήταν θετικές ήταν 93.1% (81 ασθενείς). Ογδόντα έξι ασθενείς (98.85%) ελέγχθηκαν θετικοί για την παρουσία AMA με τουλάχιστον μια από τις 4 μεθόδους. Υπήρχε μια ασθενής με σταδίου IV ΠΧΚ που ήταν AMA αρνητική με όλες τις μεθόδους (ΕΑΦ και ELISA). Τα δύο τρίτα των ασθενών (67.8%) βρέθηκαν θετικά για την παρουσία AMA και με τις τέσσερις προαναφερθείσες μεθόδους. Η κατανομή των ασθενών βάσει της θετικότητας των AMA ανά μέθοδο παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 1.



Διάγραμμα 1. Κατανομή των ασθενών με ΠΧΚ σε υποσύνολα σε διάγραμμα Vent ανάλογα με το αποτέλεσμα για την ανίχνευση των AMA σε κάθε μια από τις εξής μεθόδους: ΕΑΦ σε υποστρώματα ΗΕρ-2 (ΗΕρ-2 IIFL) και τομών από Ήπαρ-Νεφρό-Στομάχι αρουραίου (Rat tissue IIFL) και ELISA με αντιανθρώπινο αντίσωμα συνδεδεμένο με HRP κατά των αντισωμάτων κλάσης IgA ή IgG. Υπήρχε μόνο 1 ασθενής στην οποία δεν ανιχνεύθηκαν AMA με καμιά μέθοδο.

3.1.2 Ανοσοαποτύπωση

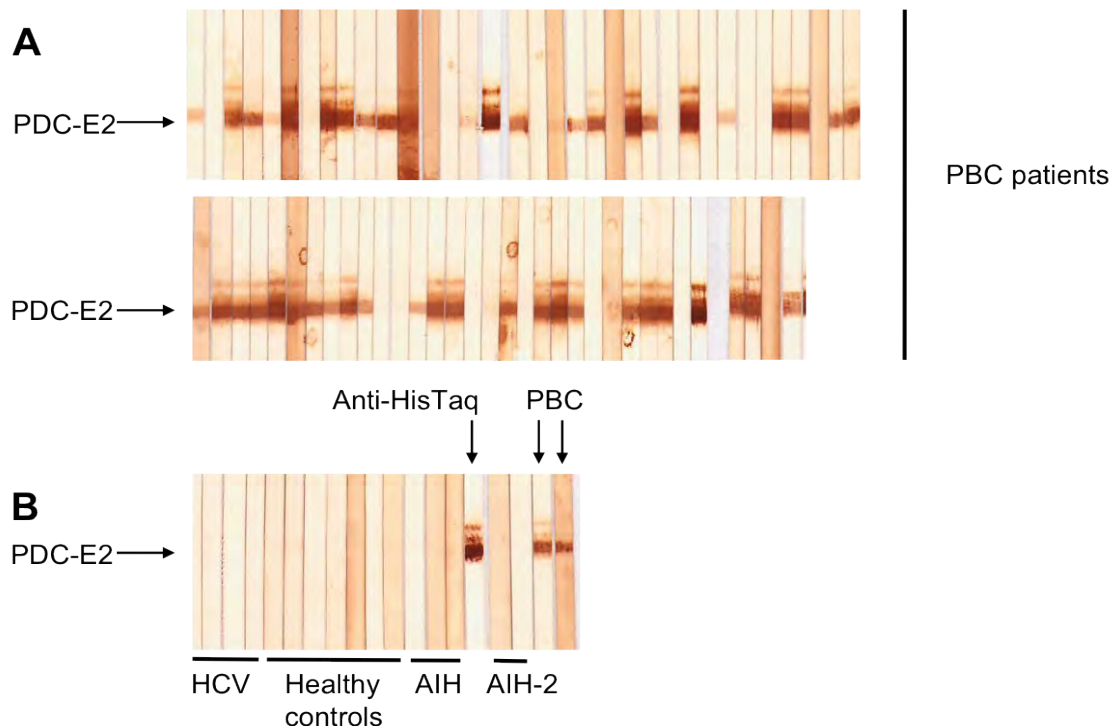
Η πρωτεΐνη PDC-E2 μετά τη μεταφορά της στην PVDF μεμβράνη βαφόταν με χρωστική Ronceau-S με ικανοποιητική μεταφορά της πρωτεΐνης όπως φαίνεται και στην Εικόνα 8.



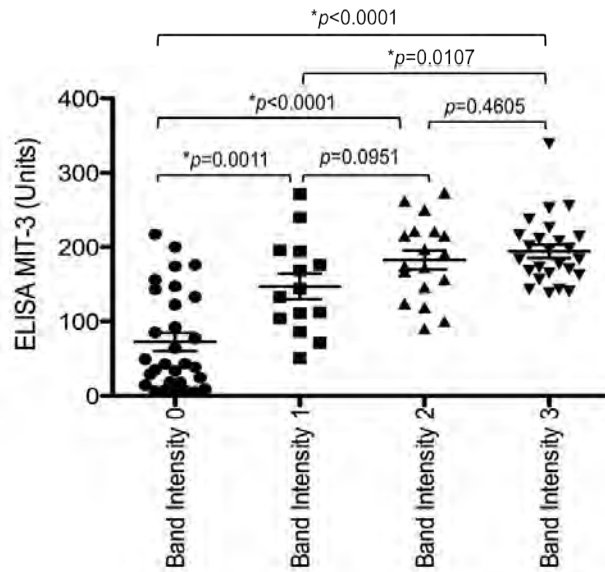
Εικόνα 8. Η 16.8 KDa πρωτεΐνη που αντιστοιχεί στο έσω λιποϋλικό τμήμα της PDC-E2 (PDC-E2 Inner Lipoyl Domain) μεταφέρθηκε σε PVDF μεμβράνη και ακολούθως έγινε χρώση με Ronceau S. Τόσο η πρωτεΐνη όσο και οι πρωτεϊνικοί δείκτες βάφονταν ικανοποιητικά καταδεικνύοντας ότι η μεταφορά από την πηκτή διαχωρισμού στη μεμβράνη γινόταν με τρόπο αποτελεσματικό και ικανοποιητικό.

Για τον καθορισμό της ποσότητας της πρωτεΐνης που έπρεπε να μεταφερθεί στην PVDF μεμβράνη πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα σύμφωνα με τα οποία η ποσότητα των 0.1-1μg θεωρήθηκε η κατάλληλη προκειμένου να μην παρουσιάζεται αμφίβολο αποτέλεσμα σε υγιείς και παθολογικούς μάρτυρες. Η χρήση ποσότητας αντιγόνου μεγαλύτερης από 1μg/strip έδινε αμφίβολα θετικά αποτελέσματα σε υγιείς και παθολογικούς μάρτυρες λόγω μη ειδικής σύνδεσης ενώ ποσότητα αντιγόνου μικρότερη από 0.1μg/strip έδινε θετικά αποτελέσματα σε μικρό ποσοστό ασθενών ενώ όλοι οι μάρτυρες παρουσίαζαν αρνητικά αποτελέσματα. Βάσει των προαναφερθέντων αποτελεσμάτων επιλέχθηκε η ποσότητα της 0.1-1μg/strip για τα πειράματα και με αυτή τη συγκέντρωση πρωτεΐνης κανένας από τους υγιείς και παθολογικούς μάρτυρες δεν παρουσίασε αντιδραστικότητα έναντι της PDC-E2. Ο σκοπός του προσδιορισμού της παρουσίας των αντι-PDC-E2 αντισωμάτων ήταν να τεκμηριωθεί η παρουσία ανοσολογικής απόκρισης έναντι της πρωτεΐνης προκειμένου στη συνέχεια να ακολουθήσει προσδιορισμός των επιτόπων σε αυτούς με αντι-PDC-E2 αντιδραστικότητα. Σε αυτή τη μορφή μελέτης η ειδικότητα της αντιδραστικότητας έναντι της PDC-E2 ήταν καθοριστικής σημασίας και για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν οι συνθήκες εκείνες που θα αύξαναν σημαντικά την ειδικότητα εις βάρος της ευαισθησίας.

Μεταξύ των 87 ασθενών που μελετήθηκαν, 57 ασθενείς (65.5%) παρουσίασαν αντιδραστικότητα κατά της PDC-E2 ενώ κανένας από τους μάρτυρες δεν παρουσίασε αντιδραστικότητα κατά της PDC-E2. Η αξιολόγηση της ανοσοαποτύπωσης έγινε με ένα εμπειρικό ημιποσοτικό τρόπο και τα αποτελέσματα ανάλογα με την ένταση της παρατηρούμενης μπάντας αξιολογήθηκαν ως αρνητικά (0), θετικά (1+), μέτρια θετικά (2+) και έντονα θετικά (3+). Παραδείγματα από πειράματα ανοσοαποτύπωσης παρουσιάζονται στην Εικόνα 9 ενώ στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζεται πως σχετίζονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης με τα αποτελέσματα της M2EP ELISA.



Εικόνα 9. Ενδεικτικά αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης για την ανίχνευση των αντι-PDC-E2 αντισωμάτων σε ασθενείς (A) και μάρτυρες (B). Ενώ 65.5% των ασθενών με ΠΧΚ έδωσε θετικά αποτελέσματα για IgG anti-PDC-E2 αντισώματα, το ποσοστό αυτό ήταν 0% μεταξύ παθολογικών και υγιών μαρτύρων.



Διάγραμμα 2.

Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης ανάλογα με την ένταση της παρατηρούμενης μπάντας αξιολογήθηκαν ως αρνητικά-0 (Band Intensity 0), θετικά-1+ ((Band Intensity 1), μέτρια θετικά-2+ (Band Intensity 2) και έντονα θετικά-3+(Band Intensity 3). Όσο πιο έντονη ήταν η μπάντα στα πειράματα της ανοσοαποτύπωσης, τόσο πιο θετικά ήταν και τα αποτελέσματα στην ELISA που χρησιμοποίησε ως καθηλωμένο αντιγόνο την υβριδική πρωτεΐνη MIT-3 χωρίς όμως να είναι σημαντική η διαφορά ανάμεσα στην ομάδα 1+ και 2+ και μεταξύ της ομάδας 2+ και 3+. Τα αποτελέσματα αναφέρονται σε IgG αυτοαντισώματα. Με αστερίσκο παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές.

3.2 Σχεδιασμός, δημιουργία και αποθήκευση πεπτιδίων

3.2.1 Δημιουργία πεπτιδίων με βάση τα προγνωστικά σκορ στο RankPeP

Η εισαγωγή της αλληλουχίας της πρωτεΐνης στο πρόγραμμα RankPeP και η πρόγνωση των επιτόπων για το αλληλίο του DR8 έδωσε καλό προγνωστικό σκορ για τα πεπτίδια που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Για κάθε αλληλόμορφο HLA μόριο το πρόγραμμα διαθέτει μια περιγραφόμενη αλληλουχία που συνδέεται επαρκώς με το συγκεκριμένο μόριο HLA. Υπολογίστηκε με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα πως θα συνδεόταν το κάθε πεπτίδιο της PDC-E2 με το DR8 και συγκρίθηκε με την ιδανική ικανότητα σύνδεσης του πρότυπου πεπτιδίου με το DR8 και το όριο σύνδεσης (binding threshold). Ανάλογη διαδικασία ακολουθήθηκε για όλα τα HLA μόρια που έφεραν οι υπό μελέτη ασθενείς και αποφασίσθηκε να δημιουργηθούν τα πεπτίδια που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Σε αυτά τα πεπτίδια περιέχονται και οι αλληλουχίες που περιγράφηκαν παλαιότερα ως επίτοποι των AMA (Pept. 12) ή των CD4 λεμφοκυττάρων (Pept. 10).

Πίνακας 2. Αποτελέσματα πρόγνωσης των 20 καλύτερων πεπτιδίων της PDC-E2 που θα συνδέονταν με το HLA μόριο DR8. Για κάθε αλληλόμορφο HLA μόριο το πρόγραμμα διαθέτει μια περιγραφόμενη αλληλουχία που συνδέεται επαρκώς με το συγκεκριμένο μόριο HLA. Υπολογίσθηκε με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα πως θα συνδεόταν το κάθε πεπτίδιο της PDC-E2 με το DR8 και συγκρίθηκε με την ιδανική ικανότητα σύνδεσης του πρότυπου πεπτιδίου με το DR8 και το όριο σύνδεσης (binding threshold).

| RANK | POS. | N | SEQUENCE | C | MW (Da) | SCORE | % OPT. |
|------|------|-----|-----------|-----|---------|--------|--------|
| 1 | 108 | ESL | EECYMAKIL | VAE | 1081.32 | 15.119 | 31.99% |
| 2 | 600 | QWL | AEFRKYLEK | PIT | 1165.37 | 11.569 | 24.48% |
| 3 | 528 | FQG | GTFTISNLG | MFG | 890.98 | 10.132 | 21.44% |
| 4 | 595 | GAV | GAQWLAEFR | KYL | 1036.2 | 10.069 | 21.31% |
| 5 | 321 | PKG | RVFVDPLAK | KLA | 1026.25 | 10.038 | 21.24% |
| 6 | 50 | SPG | RRYYSLPPH | QKV | 1170.36 | 9.772 | 20.68% |
| 7 | 195 | ALS | PTMTMGTVQ | RWE | 947.11 | 9.347 | 19.78% |
| 8 | 603 | AEF | RKYLEKPIT | MLL | 1129.37 | 9.168 | 19.40% |
| 9 | 17 | GRT | TMFWKTTEG | RDG | 1059.22 | 8.894 | 18.82% |
| 10 | 235 | EVQ | EEGYLAKIL | VPE | 1017.2 | 8.589 | 18.18% |
| 11 | 59 | PPH | QKVPLPSLS | PTM | 950.15 | 8.103 | 17.15% |
| 12 | 270 | ISA | FADYRPTEV | TDL | 1079.19 | 7.457 | 15.78% |
| 13 | 562 | ASE | DKLVPADNE | KGF | 982.06 | 7.328 | 15.51% |
| 14 | 186 | PPH | MQVLLPALS | PTM | 953.21 | 7.215 | 15.27% |
| 15 | 255 | PLG | TPLCIIVEK | EAD | 997.26 | 7.183 | 15.20% |
| 16 | 579 | ASM | MSVTLSCDH | RVV | 974.11 | 7.181 | 15.20% |
| 17 | 563 | SED | KLVPADNEK | GFD | 995.14 | 6.935 | 14.68% |
| 18 | 462 | PEA | NSSWMDTVI | RQN | 1011.14 | 6.794 | 14.38% |
| 19 | 6 | PHC | STTYLRTLK | RTT | 993.12 | 6.416 | 13.58% |
| 20 | 49 | GSP | GRRYYSLPP | HQK | 1090.27 | 6.316 | 13.37% |

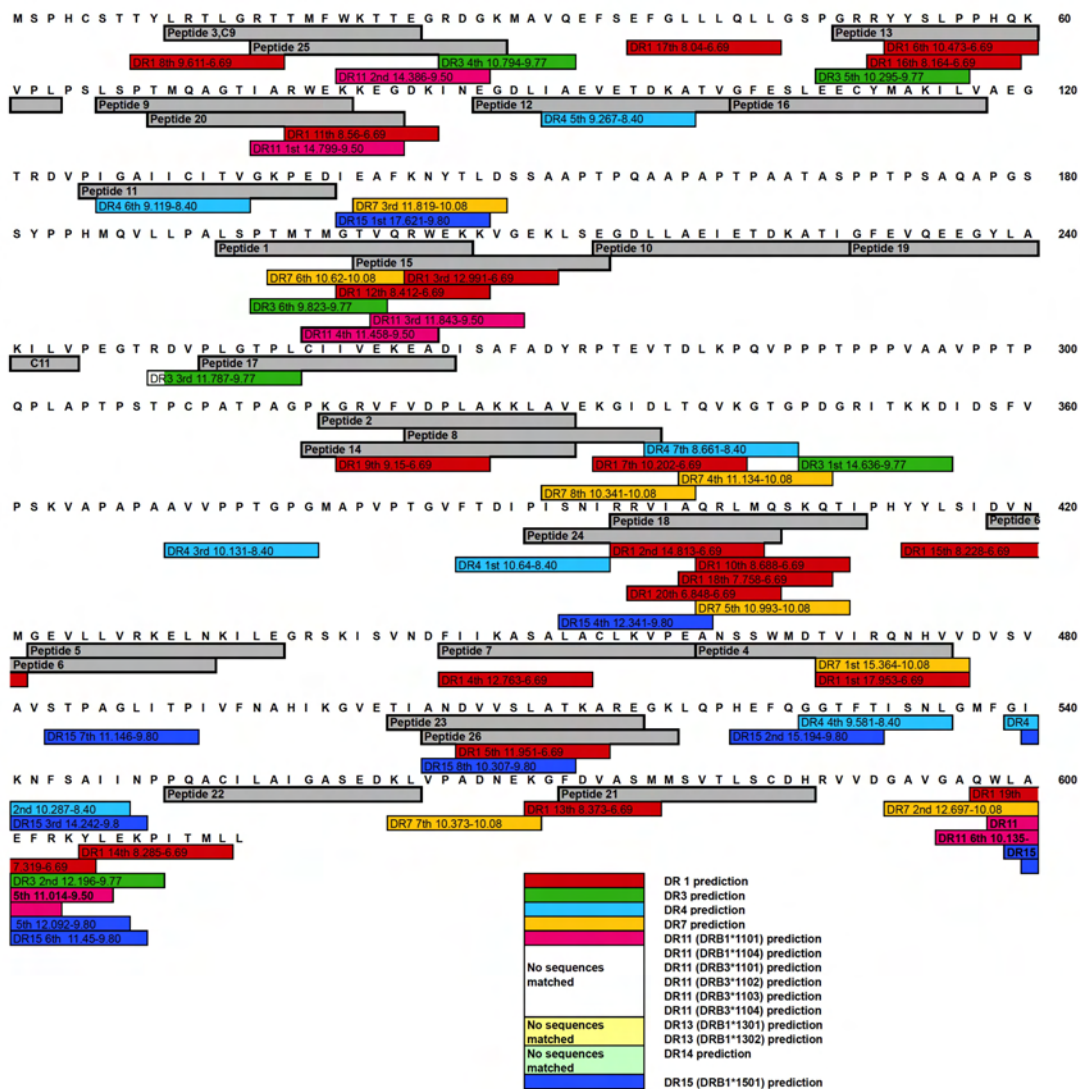
Matrix: HLA_DR8oDRB1s0801c.p.mtx
Optimal Score: 47.256

Consensus: WQMWMHCNK
Binding Threshold: 10.80

Πίνακας 3. Συντιθέμενα πεπτίδια με βάση την πρόγνωση για τη σύνδεσή τους με τα κυριότερα HLA μόρια που εμφανίζονταν μεταξύ των ασθενών με ΠΧΚ

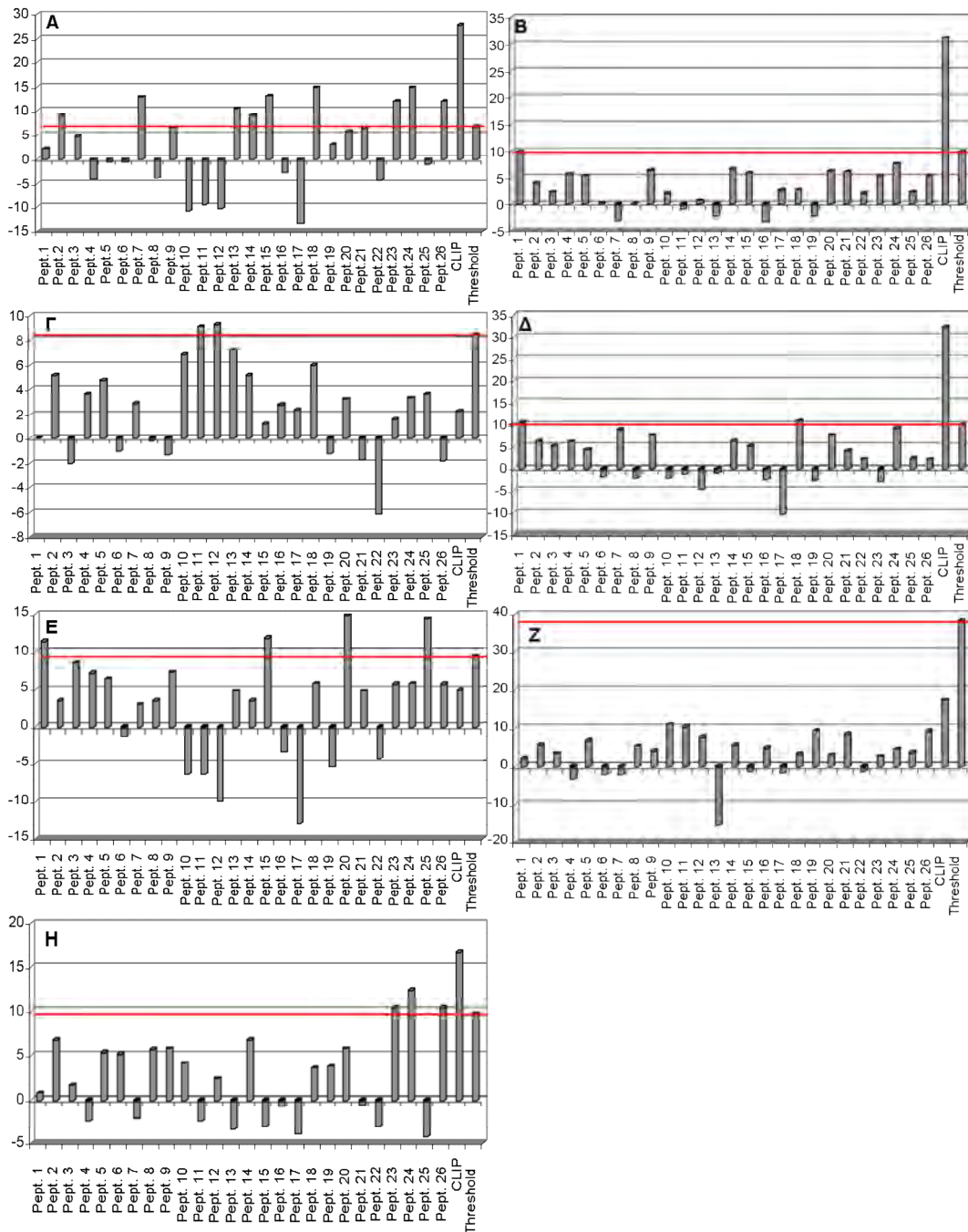
| Πεπτίδιο | Αλληλουχία Αμινοξέων | Θέση |
|----------|----------------------|------------|
| Pept. 1 | LSPTMTMGTVQRWEK | αα 192-207 |
| Pept. 2 | KGRVFVDPLAKKLAV | αα 319-333 |
| Pept. 3 | LRTLGRTTMFWKTTE | αα 9-24 |
| Pept. 4 | ANSSWMDTVIRQNHV | αα 461-475 |
| Pept. 5 | GEVLLVRKELNKILE | αα 422-436 |
| Pept. 6 | DVNMGEVLLVRKELN | αα 418-432 |
| Pept. 7 | FIKASALACLKYPE | αα 446-460 |
| Pept. 8 | VDPLAKKLAVEKGID | αα 324-338 |
| Pept. 9 | LSPTMQAGTIARWEK | αα 60-80 |
| Pept. 10 | GDLLAEIETDKATI | αα 216-229 |
| Pept. 11 | PIGAIICITVGKPED | αα 125-139 |
| Pept. 12 | EGDLIAEVETDKATV | αα 78-102 |
| Pept. 13 | GRRYYSLPPHQKVP | αα 49-64 |
| Pept. 14 | PKGRVFVDPLAKKLA | αα 318-333 |
| Pept. 15 | TVQRWEKKVGEKLSE | αα 201-215 |
| Pept. 16 | GFESLEECYMAKILV | αα 103-117 |
| Pept. 17 | PLGTPLCIIVEKEAD | αα 252-266 |
| Pept. 18 | RRVIAQRLMQSKQTI | αα 396-410 |
| Pept. 19 | GFEVQEEGYLAKILV | αα 230-244 |
| Pept. 20 | TMQAGTIARWEKKEG | αα 69-83 |
| Pept. 21 | FDVASMMSVTLSCDH | αα 473-487 |
| Pept. 22 | PQACILAIGASEDKL | αα 550-564 |
| Pept. 23 | TIANDVVSLATKARE | αα 503-517 |
| Pept. 24 | PISNIRRVIAQRLMQ | αα 391-405 |
| Pept. 25 | RTTMFWKTTEGRDGK | αα 14-29 |
| Pept. 26 | ANDVVSLATKAREGK | αα 505-519 |

Αυτά τα πεπτίδια (Πίνακας 3) σχεδιάσθηκαν με προτεραιότητα να έχουν καλό προγνωστικό σκορ για τη σύνδεση με το HLA DR8. Η πλειονότητα των σχεδιαζόμενων πεπτιδίων είχε καλή συσχέτιση με τις αλληλουχίες που έδιναν καλό προγνωστικό σκορ για τα κυριότερα HLA ανάμεσα στον υπό εξέταση πληθυσμό. Η Εικόνα 10 παρουσιάζει για τα αλληλία HLA που χρησιμοποιήθηκαν στη βάση δεδομένων, ποια τμήματα της πρωτεΐνης PDC-E2 θα είχαν την δυνατότητα να προσδεθούν ικανοποιητικά σε αυτά.



Εικόνα 10. Τα πεπτιδία που απεικονίζονται με γκριζο χρώμα είναι τα πεπτιδία που δημιουργήθηκαν (Πίνακας 3) ενώ με χρώμα απεικονίζονται τα πεπτιδία που θεωρούνταν ότι θα συνδέονταν επαρκώς με το αντίστοιχο MHC κλάσης II μόριο. Σε κάθε πεπτιδίο αναγράφεται η βέλτιστη τιμή σύνδεσης και η υπολογιζόμενη από το πρόγραμμα αντίστοιχα.

Για το καθένα από τα δημιουργούμενα πεπτιδία υπολογίστηκε και η πρόγνωση αν μπορούν να συνδεθούν με τα DR των ασθενών (Διάγραμμα 3). Ουσιαστικά αυτά τα αποτελέσματα αποτελούν μια άλλη σχηματική απεικόνιση για τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 10. Είναι άξιο παρατήρησης ότι ο περιγραφόμενος επίτοπος (πεπτιδίο 12) δεν προβλέπεται από το πρόγραμμα να έχει καλές πιθανότητες σύνδεσης με τα HLA κλάσης II μόρια που κυριαρχούν στην ομάδα πληθυσμού.



Διάγραμμα 3. Σχηματική παρουσίαση για το προγνωστικό σκόρ σύνδεσης του πεπτιδίου που έδωσε το πρόγραμμα RankPeP για τα κυριότερα HLA DR αλληλόμορφα που επικρατούσαν στον υπό μελέτη πληθυσμό (A.DR1 B.DR3 Γ.DR4 Δ.DR7 E.DR11-DRB1*1101 Z.DR13 H.DR15). Η κόκκινη γραμμή παρουσιάζει το ελάχιστο σκορ σύνδεσης (threshold) που πρέπει να έχει το κάθε πεπτίδιο για να συνδέεται επαρκώς με το μόριο HLA. Το πεπτίδιο Clip χρησιμοποιήθηκε ως πεπτίδιο σύγκρισης.

3.2.2 Δημιουργία πεπτιδίων που καλύπτουν ολόκληρη την αλληλουχία της PDC-E2

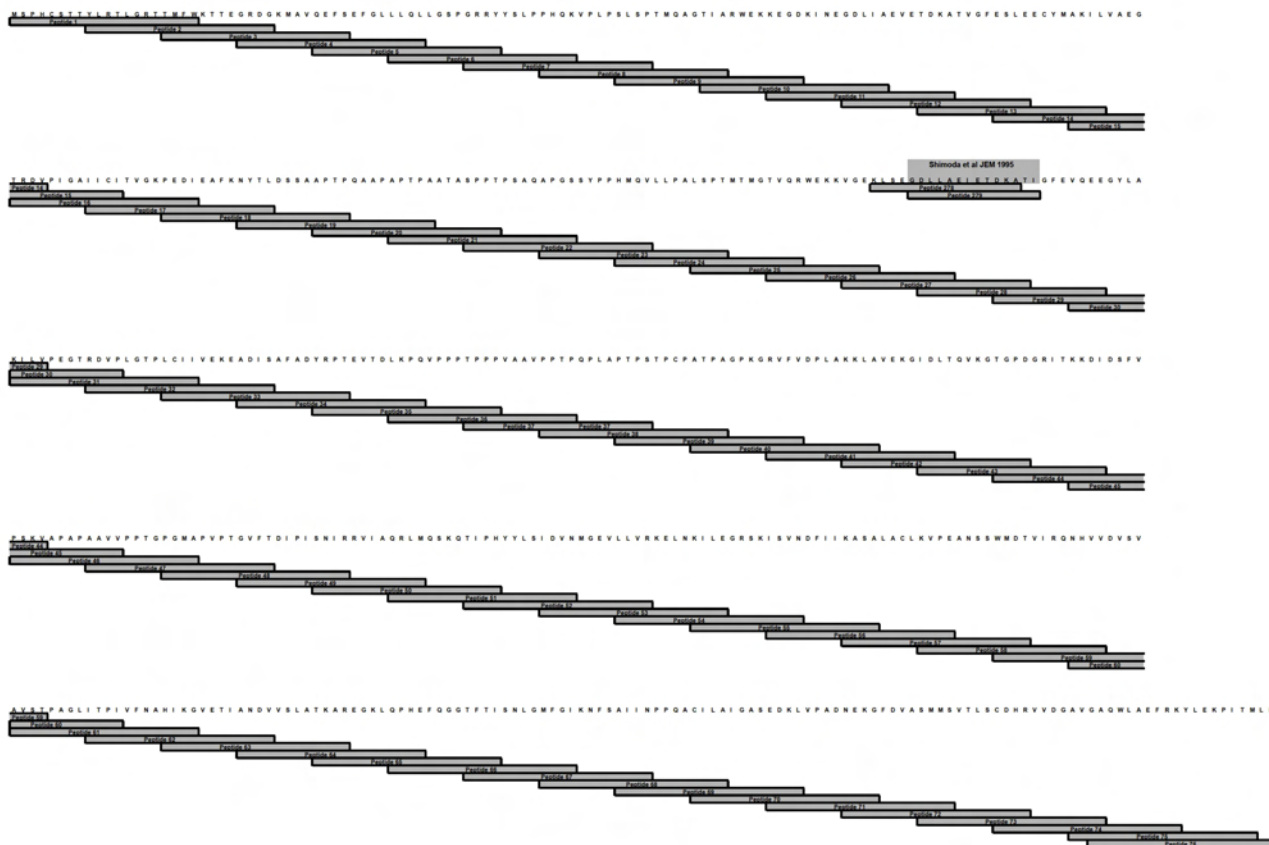
Τα πεπτίδια που σχεδιάστηκαν να καλύψουν ολόκληρη την αλληλουχία της PDC-E2 παρουσιάζονται στον Πίνακα 4 και σχηματικά στην Εικόνα 11. Τα πεπτίδια σχεδιάστηκαν εικοσαμερή για να χρησιμοποιηθούν τόσο σε πειράματα μελέτης της

χυμικής όσο και της CD4 κυτταρικής αντιδραστικότητας.

Πίνακας 4. Σύνθεση πεπτιδίων που καλύπτουν ολόκληρη την αλληλουχία της PDC-E2. Η αλληλουχία των πεπτιδίων αναγράφεται από το άμινο-τελικό προς το καρβόξυ-τελικό άκρο.

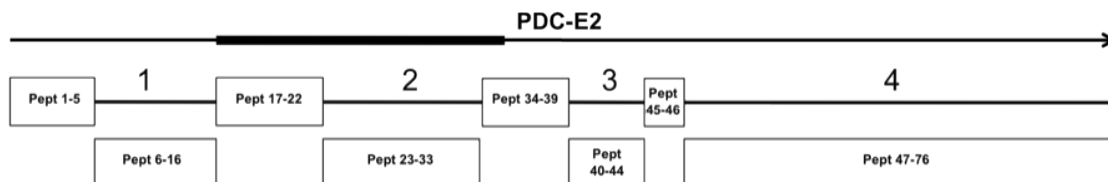
| Πεπτίδιο | Αλληλουχία αμινοξέων | Θέση | Πεπτίδιο | Αλληλουχία αμινοξέων | Θέση |
|----------|-----------------------|------------|-----------|-----------------------|------------|
| Pept. 1 | MSPHCSTTYLRTLGRITMFW | αα 1-20 | Pept. 40 | ATPAGPKGRVFDPLAKKLA | αα 313-332 |
| Pept. 2 | YLRTLGRITMFWKTTEGRDG | αα 9-28 | Pept. 41 | RVFVDPLAKKLAVEKIDLT | αα 321-340 |
| Pept. 3 | TMFWKTTEGRDGKMAVQEFS | αα 17-36 | Pept. 42 | KKLAVEKIDLTQVKGTGPD | αα 329-348 |
| Pept. 4 | GRDGKMAVQEFSEFGLLQL | αα 25-44 | Pept. 43 | IDLTQVKGTGPDGRITKKDI | αα 337-356 |
| Pept. 5 | QEFSEFGLLQLLGGSPGRRY | αα 33-52 | Pept. 44 | TGPDGRITKKDIDSFVPSKV | αα 345-364 |
| Pept. 6 | LLQLLGGSPGRRYSLPPHQK | αα 41-60 | Pept. 45 | KKDIDSFVPSKVAPAAVV | αα 353-372 |
| Pept. 7 | GRRYSLPPHQKVLPLSLSP | αα 49-68 | Pept. 46 | PSKVAPAAVVPPTGPGMA | αα 361-380 |
| Pept. 8 | PHQKVLPLSLSPTMQAGTIA | αα 57-76 | Pept. 47 | AAVVPPTGPGMAPVPTGVFT | αα 369-388 |
| Pept. 9 | SLSPTMQAGTIARWEKKEGD | αα 65-84 | Pept. 48 | PGMAPVPTGVFTDIPISNIR | αα 377-396 |
| Pept. 10 | GTIARWEKKEGDKINEGDLI | αα 73-92 | Pept. 49 | GVFTDIPISNIRRVIAQRLM | αα 385-404 |
| Pept. 11 | KEGDKINEGLIAEVETDKA | αα 81-100 | Pept. 50 | SNIRRVIAQRLMQSKQTIPH | αα 393-412 |
| Pept. 12 | GDLIAEVETDKATVGFESLE | αα 89-108 | Pept. 51 | QRLMQSKQTIPHYLSIDVN | αα 401-420 |
| Pept. 13 | TDKATVGFESLEECYMAKIL | αα 97-116 | Pept. 52 | TIPHYLSIDVNMGEVLLVR | αα 409-428 |
| Pept. 14 | ESLEECYMAKILVAEGTRDV | αα 105-124 | Pept. 53 | IDVNMGEVLLVRKELNKILE | αα 417-436 |
| Pept. 15 | AKILVAEGTRDVPIGAIICI | αα 113-132 | Pept. 54 | LLVRKELNKILEGRSKISVN | αα 425-444 |
| Pept. 16 | TRDVPIGAIICITVGKPEDI | αα 121-140 | Pept. 55 | KILEGRSKISVNDFIKASA | αα 433-452 |
| Pept. 17 | IICITVGKPEDIEAFKNYTL | αα 129-148 | Pept. 56 | ISVNDFIKASALACLKVEPE | αα 441-460 |
| Pept. 18 | PEDIEAFKNYTLDSAAPTP | αα 137-156 | Pept. 57 | KASALACLKVEANSSWMDT | αα 449-468 |
| Pept. 19 | NYTLDSAAPTPQAAPPTP | αα 145-164 | Pept. 58 | KVPEANSSWMDTVIRQNHVV | αα 457-476 |
| Pept. 20 | APTQAAPPTPAATASPT | αα 153-172 | Pept. 59 | WMDTVIRQNHVVVDVAVST | αα 465-484 |
| Pept. 21 | APTPAATASPTPSAQAPGS | αα 161-180 | Pept. 60 | NHVVDVAVVSTPAGLITPI | αα 473-492 |
| Pept. 22 | SPPTPSAQAPGSSYPHMQV | αα 169-188 | Pept. 61 | AVSTPAGLITPIVFNHAIKIG | αα 481-500 |
| Pept. 23 | APGSSYPHMQVLLPALSPT | αα 177-196 | Pept. 62 | ITPIVFNHAIKIGVETIANDV | αα 489-508 |
| Pept. 24 | HMQVLLPALSPTMTMGTVQR | αα 185-204 | Pept. 63 | HIKGVETIANDVSLATKAR | αα 497-516 |
| Pept. 25 | LSPTMTMGTVQRWEKKVGEK | αα 193-212 | Pept. 64 | ANDVSLATKAREGKLPHE | αα 505-524 |
| Pept. 26 | TVQRWEKKVGEKLGEDLLA | αα 201-220 | Pept. 65 | TKAREGKLPHEFQGGTFTI | αα 513-532 |
| Pept. 27 | VGEKLGEDLLAEIETDKAT | αα 209-228 | Pept. 66 | QPHEFQGGTFTISNLGMFGI | αα 521-540 |
| Pept. 28 | DLLAEIETDKATIGFEVQEE | αα 217-236 | Pept. 67 | TFTISNLGMFGIKNFSAIIN | αα 529-548 |
| Pept. 29 | DKATIGFEVQEEGYLAKILV | αα 225-244 | Pept. 68 | MFGIKNFSAIINPPQACILA | αα 537-556 |
| Pept. 30 | VQEEGYLAKILVPEGTRDVP | αα 233-252 | Pept. 69 | AIINPPQACILAIGASEDKL | αα 545-564 |
| Pept. 31 | KILVPEGTRDVPPLGTPLCII | αα 241-260 | Pept. 70 | CILAIGASEDKLVPADNEKG | αα 553-572 |
| Pept. 32 | RDVPLGTPLCIIIVEKEADIS | αα 249-268 | Pept. 71 | EDKLVADNEKGFVDVAMMS | αα 561-580 |
| Pept. 33 | LCIIIVEKEADISAFADYRPT | αα 257-276 | Pept. 72 | NEKGFVDVAMMSVTLSCDHR | αα 569-588 |
| Pept. 34 | ADISAFADYRPTVTDLKPQ | αα 265-284 | Pept. 73 | SMMSVTLSCDHRVVDGAVGA | αα 577-596 |
| Pept. 35 | YRPTVTDLKPQVPPPTPPP | αα 273-292 | Pept. 74 | CDHRVVDGAVGAQWLAEFRK | αα 585-604 |
| Pept. 36 | LKPQVPPPTPPPVAAPPTP | αα 281-300 | Pept. 75 | AVGAQWLAEFRKYLEKPITM | αα 593-612 |
| Pept. 37 | TPPPVAAPPTPQPLAPTPS | αα 289-308 | Pept. 76 | GAQWLAEFRKYLEKPITMLL | αα 595-614 |
| Pept. 38 | PPTPQPLAPTPSTPCPATPA | αα 297-316 | Pept. 278 | KLSEGDLLEIETDKA | αα 212-227 |
| Pept. 39 | PTPSTPCPATPAGPKGRVFD | αα 305-324 | Pept. 279 | GDLLAEIETDKATI | αα 216-229 |

Ο κύριος επίτοπος των CD4+ T λεμφοκυτάρων εμπιέχεται με διαφορά ενός αμινοξέου στα πεπτίδια 27 και 28. Σχεδιάστηκε επίσης αυτούσιο το πεπτίδιο (πεπτίδιο 279) όπως επίσης και ένα πεπτίδιο που προηγείται του περιγραφόμενου επιτόπου κατά 4 αμινοξέα (πεπτίδιο 278).



Εικόνα 11. Στην εικόνα παρουσιάζεται η αλληλουχία της PDC-E2 καθώς και τα εικοσαμερή πεπτιδία που καλύπτουν την πρωτεΐνη. Ο περιγραφόμενος επίτοπος παρουσιάζεται επίσης σε γκριζο

Το ένζυμο της PDC-E2 αποτελείται από κάποια διακριτά τμήματα όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.4.1.2 του Γενικού Μέρους. Αυτά είναι το έξω λιποϊκό τμήμα (outer lipoyl domain), το έσω λιποϊκό τμήμα (inner lipoyl domain), το τμήμα που προσδέονται οι E1 και E3 υπομονάδες του ενζύμου (E1/E3 binding site) και το καταλυτικό τμήμα (catalytic domain). Η αντιστοιχία των πεπτιδίων που δημιουργήσαμε με τα τμήματα του ενζύμου παρουσιάζονται στην Εικόνα 12.



Εικόνα 12. Η πρωτεΐνη PDC-E2 έχει ένα έξω λιποϋλικό τμήμα (1), ένα έσω λιποϋλικό τμήμα (2), μια περιοχή που δεσμεύονται οι E1 και E3 υπομονάδες της PDC-E2 (3) και το καταλυτικό τμήμα του ενζύμου (4). Τα πεπτιδία που σχεδιάσαμε και οι αντιστοιχία τους με τα διάφορα τμήματα του ενζύμου PDC-E2 παρουσιάζονται σε αυτή την εικόνα. Το έντονα μαύρο στο τμήμα της γραμμής της PDC-E2 αντιστοιχεί στο τμήμα που καλύπτει η ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε για να χαρακτηριστεί η αντι-PDC-E2 αντιδραστικότητα στους ασθενείς με ΠΧΚ.

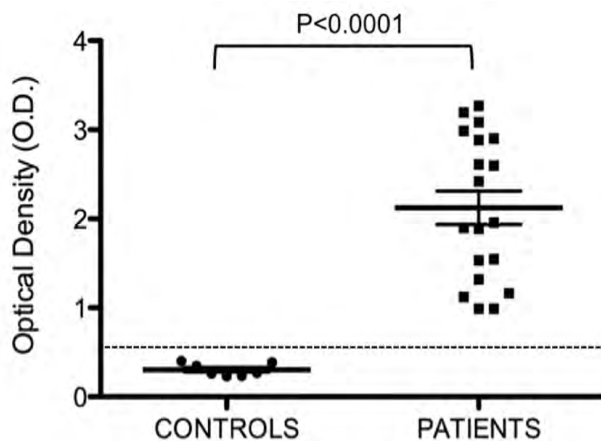
3.3 Χαρακτηρισμός γραμμικών επιτόπων των αντι-PDC-E2 αυτοαντισωμάτων

Συνολικά 19 ασθενείς ελέγχθηκαν για την αντιδραστικότητα έναντι του έσω λιποϋλικού τμήματος της PDC-E2 και των αλληλοεπικαλυπτομένων πεπτιδίων που καλύπτουν ολόκληρη την πρωτεΐνη PDC-E2. Οι 19 αυτοί ασθενείς ήταν υποσύνολο των ασθενών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 και τα κλινικοεργαστηριακά τους χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά των 19 ασθενών με ΠΧΚ που χρησιμοποιήθηκαν ως πληθυσμός μελέτης για τον καθορισμό των Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων της PDC-E2

| | | Μέση Τιμή ± Σταθερή απόκλιση | Διάμεση Τιμή (Εύρος) |
|---------------------------------|---------|------------------------------|----------------------|
| Ηλικία (έτη) | | 57.15 ± 8.19 | 56.00 (46-75) |
| Άνδρες/Γυναίκες | 3/16 | | |
| Κιρρωτικοί/Μη Κιρρωτικοί | 2/17 | | |
| Ηλικία έναρξης νόσου (έτη) | | 50.33 ± 7.91 | 48.00 (40-67) |
| Ηλικία διάγνωσης (έτη) | | 53.01 ± 8.39 | 53.00 (40-71) |
| Διάρκεια Νόσου (μήνες) | | 93.67 ± 52.41 | 83.00 (12-212) |
| Χολερυθρίνη (<1.1 mg/dL) | | 0.84 ± 0.51 | 0.80 (0.32-2.1) |
| Αλβουμίνη (3.5-5.2 g/dL) | | 4.21 ± 0.66 | 4.20 (2.5-5.1) |
| Ολικές πρωτεΐνες (6.4-8.3 g/dL) | | 7.69 ± 0.66 | 7.66 (6-8.7) |
| Χρόνος προθρομβίνης (sec.) | | 12.07 ± 1.59 | 12.15 (8.31-14.6) |
| INR | | 1.05 ± 0.20 | 1.01 (0.78-1.53) |
| AST (10-40 IU/L) | | 37.73 ± 36.70 | 24.00 (16-147) |
| ALT (10-40 IU/L) | | 40.07 ± 39.06 | 31.00 (12-170) |
| ALP (35-104 IU/L) | | 163.73 ± 109.71 | 119.00 (70-445) |
| γGT (9-40 IU/L) | | 87.40 ± 90.53 | 52.00 (13-327) |
| Ολική χοληστερόλη (mg/dL) | | 204.47 ± 64.70 | 183.00 (104-319) |
| HDL χοληστερόλη (mg/dL) | | 62.83 ± 34.16 | 47.00 (35-115) |
| LDL χοληστερόλη (mg/dL) | | 127.03 ± 40.04 | 119.00 (75-207) |
| Τριγλυκερίδια (40-160 mg/dL) | | 93.40 ± 41.06 | 91.00 (41-176) |
| IgG (847-1690 mg/dL) | | 1428.53 ± 665.82 | 1280.00 (910-3530) |
| IgM (64-249 mg/dL) | | 292.73 ± 186.79 | 240.00 (112-788) |
| IgA (99-300 mg/dL) | | 250.26 ± 88.71 | 234.00 (92-507) |
| Ιστολογικό στάδιο 1/2/3/4* | 4/7/6/2 | | |

Σε πρώτη φάση αναζητήθηκε η παρουσία αντιδραστικότητας έναντι της PDC-E2 τόσο στον ορό των 19 ασθενών με ΠΧΚ όσο και στους υγιείς μάρτυρες. Θετική αντιδραστικότητα έναντι της PDC-E2 θεωρήθηκε ότι είχαν οι ασθενείς που παρουσίασαν απορρόφηση μεγαλύτερη από το μέσο όρο συν 2 σταθερές αποκλίσεις (mean+2SD) από την απορρόφηση που ανιχνεύθηκε στους υγιείς μάρτυρες. Βάσει των ανωτέρω, ασθενείς με O.D. μεγαλύτερη από 0.452 θεωρήθηκαν ότι έχουν αντιδραστικότητα έναντι της PDC-E2. Αντι-PDC-E2 αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε όλους τους ασθενείς με ΠΧΚ. Στο Διάγραμμα 4.3.1 παρουσιάζεται η κατανομή της αντιδραστικότητας κατά της PDC-E2 στους 19 ασθενείς με ΠΧΚ και στους 7 υγιείς μάρτυρες με τη μέθοδο ELISA.

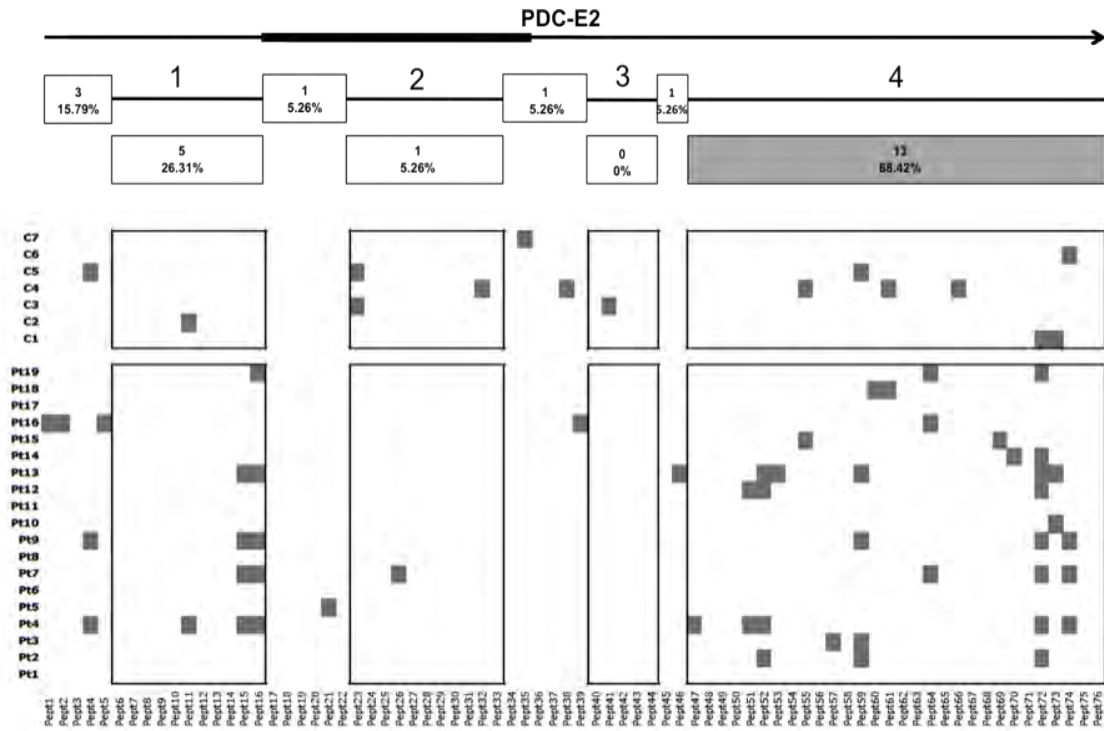


Διάγραμμα 4.

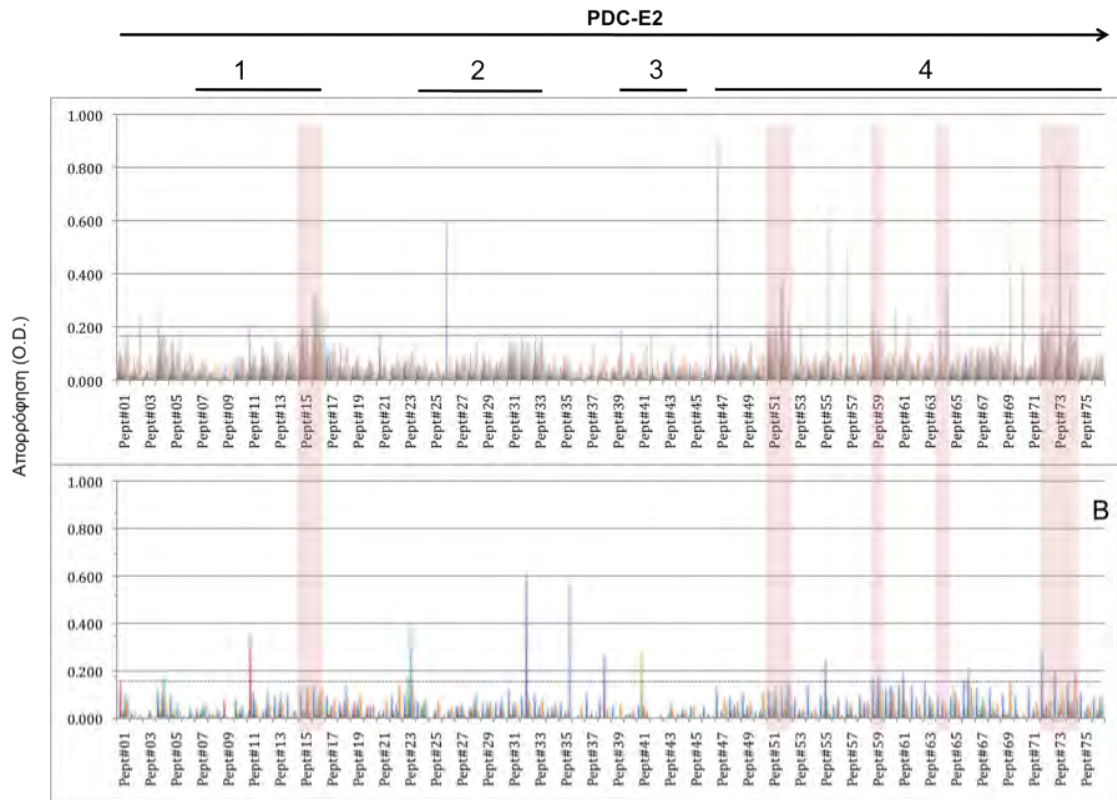
Αντιδραστικότητα έναντι της PDC-E2 με τη μέθοδο ELISA σε 19 ασθενείς με ΠΧΚ και 7 υγιείς μάρτυρες. Οι ασθενείς παρουσίασαν μεγαλύτερη αντιδραστικότητα σε σχέση με τους μάρτυρες (mean±SD= 2.125±0.1859 vs 0.3051±0.02782, p value<0.0001). Θετική αντιδραστικότητα έναντι της PDC-E2 θεωρήθηκε αυτή με O.D. > 0.452 (mean+2SD της O.D. που ανιχνεύτηκε στους υγιείς μάρτυρες).

Με βάση τα αποτελέσματα της αντιδραστικότητας στα πεπτίδια στους υγιείς μάρτυρες καθορίσαμε το cut-off. Συγκεκριμένα, αφού αφαιρέθηκε το background από τις απορροφήσεις, υπολογίστηκε ο μέσος όρος της απορρόφησης από όλα τα πεπτίδια από όλους τους μάρτυρες και υπολογίστηκε και η σταθερή απόκλιση (SD). Το cut-off ορίστηκε στα 0.173 O.D που αντιστοιχεί στο μέσο όρο απορρόφησης συν 2 σταθερές αποκλίσεις (mean + 2SD). Το background αφαιρέθηκε και από τα δεδομένα που πήραμε από την ομάδα πληθυσμού.

Σε σύνολο 19 ασθενών οι 14 (73.68%) παρουσίασαν αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον ένα πεπτίδιο ενώ 4 από τους υγιείς μάρτυρες (57.14%) παρουσίασαν αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον ένα πεπτίδιο. Αντιδραστικότητα κατά του έξω λιποϋλικού τμήματος (outer lipoyl domain) παρουσίασαν 5 ασθενείς (26.31%), στο έσω λιποϋλικό τμήμα (inner lipoyl domain) 1 ασθενής (5.26%), στο τμήμα που προσδένονται οι E1 και E3 υπομονάδες του ενζύμου (E1/E3 binding site) κανένας ασθενής (0%) και στο καταλυτικό τμήμα (catalytic domain) 13 ασθενείς (68.42%). Τέσσερις ασθενείς παρουσίασαν αντιδραστικότητα στα τμήματα που συνδέουν αυτές τις περιοχές. Στους υγιείς μάρτυρες, 1 αντέδρασε με πεπτίδιο από το έξω λιποϋλικό τμήμα, 3 με πεπτίδια από το έσω λιποϋλικό τμήμα, 1 με πεπτίδιο από το τμήμα σύνδεσης των E1 και E3 υπομονάδων και 4 με το καταλυτικό τμήμα της πρωτεΐνης. Η κατανομή της αντιδραστικότητας στα διάφορα τμήματα της πρωτεΐνης στους ασθενείς παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 5. Η πληροφορία που παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 5 με ποιοτικά χαρακτηριστικά παρουσιάζεται και στο Διάγραμμα 6 κατα τρόπο που φαίνεται και η αντιδραστικότητα (O.D).



Διάγραμμα 5. Κατανομή της αντιδραστικότητας των ορών των 19 ασθενών (Pt) με ΠΧΚ και των 7 υγιών μαρτύρων (C) έναντι των πεπτιδίων που καλύπτουν το έξω λιποϋλικό τμήμα (1), έσω λιποϋλικό τμήμα (2), θέση σύνδεσης των υπομονάδων E1/E3 (3) και το καταλυτικό τμήμα (4) του ενζύμου PDC-E2. Οι γκριζες περιοχές στο κάτω τμήμα του σχεδιαγράμματος αντιπροσωπεύουν τις περιπτώσεις εκείνες που η αντιδραστικότητα του ορού του ασθενούς ή του μάρτυρα ήταν μεγαλύτερη από 0.173 O.D (cut-off) στο αντίστοιχο πεπτίδιο. Οι αριθμοί και τα ποσοστά που αναγράφονται στα κουτιά στο άνω τμήμα του διαγράμματος παρουσιάζουν τον αριθμό των ασθενών που αντέδρασαν σε πεπτίδια στο αντίστοιχο τμήμα της πρωτεΐνης και το ποσοστό. Το έντονα μαύρο στο τμήμα της γραμμής της PDC-E2 αντιστοιχεί στο τμήμα που καλύπτει η ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε για να χαρακτηριστεί η αντι-PDC-E2 αντιδραστικότητα στους ασθενείς με ΠΧΚ.



Διάγραμμα 6. Στο πάνω μέρος μέρος του διαγράμματος παρουσιάζονται οι τιμές της αντιδραστικότητας (O.D) σε κάθε ένα από τους 19 ασθενείς στα 76 πεπτιδία που καλύπτουν όλο το φάσμα της PDC-E2 ενώ στο κάτω μέρος (B) παρουσιάζεται αυτή η πληροφορία για τους 7 υγιείς μάρτυρες. Οι περιοχές 1, 2, 3 και 4 αντιστοιχούν στο έσω λιπούλικό τμήμα, έξω λιπούλικό τμήμα, στην περιοχή σύνδεσης των E1/E3 υπομονάδων και στο καταλυτικό τμήμα της πρωτεΐνης αντίστοιχα. Μια περιοχή στο έξω λιπούλικό τμήμα (πεπτιδία 15 και 16) και τέσσερις περιοχές στο καταλυτικό τμήμα του ενζύμου (πεπτιδίδια 51 και 52, πεπτιδίδια 59, πεπτιδίδια 64 και πεπτιδία 72-74) παρουσίασαν συγκριτικά μεγαλύτερη αντιδραστικότητα στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.

3.4 Προσδιορισμός της αντιδραστικότητας των CD4+ T λεμφοκυττάρων κατά του προηγούμενα περιγραφόμενου ανοσοεπικρατούντος αντιγόνου PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆

Για τη μελέτη της αντιδραστικότητας των PBMCs κατά του πεπτιδίου PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆ GDLLAEIETDKATI μελετήθηκαν τριάντα επτά (37) ασθενείς με ΠΧΚ που είναι υποσύνολο των ασθενών που παρουσιάστηκαν στον Πίνακα 1. Τα κύρια κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Η αντιδραστικότητα κατά του πεπτιδίου PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆ μελετήθηκε με 3 διαφορετικές μεθόδους. Σε 35 ασθενείς με ΠΧΚ και 6 υγιείς μάρτυρες η αντιδραστικότητα στον εν λόγω επίτοπο μελετήθηκε με τη μέθοδο της ELISpot (Enzyme-linked immunosorbent spot) για την εκτίμηση της παραγωγής IFN- γ . Παράλληλα, σε 32 ασθενείς με ΠΧΚ και 6

υγιείς μάρτυρες μελετήθηκε η αντιδραστικότητα έναντι του συγκεκριμένου επιτόπου ως προς την παραγωγή IFN-γ από τα CD4+ λεμφοκύτταρα με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Τέλος σε 10 ασθενείς με ΠΧΚ και 4 υγιείς μάρτυρες ελέγχθηκε η ικανότητα κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετά από διέγερση με το ίδιο πεπτίδιο με τη μέθοδο χρώσης με CFSE.

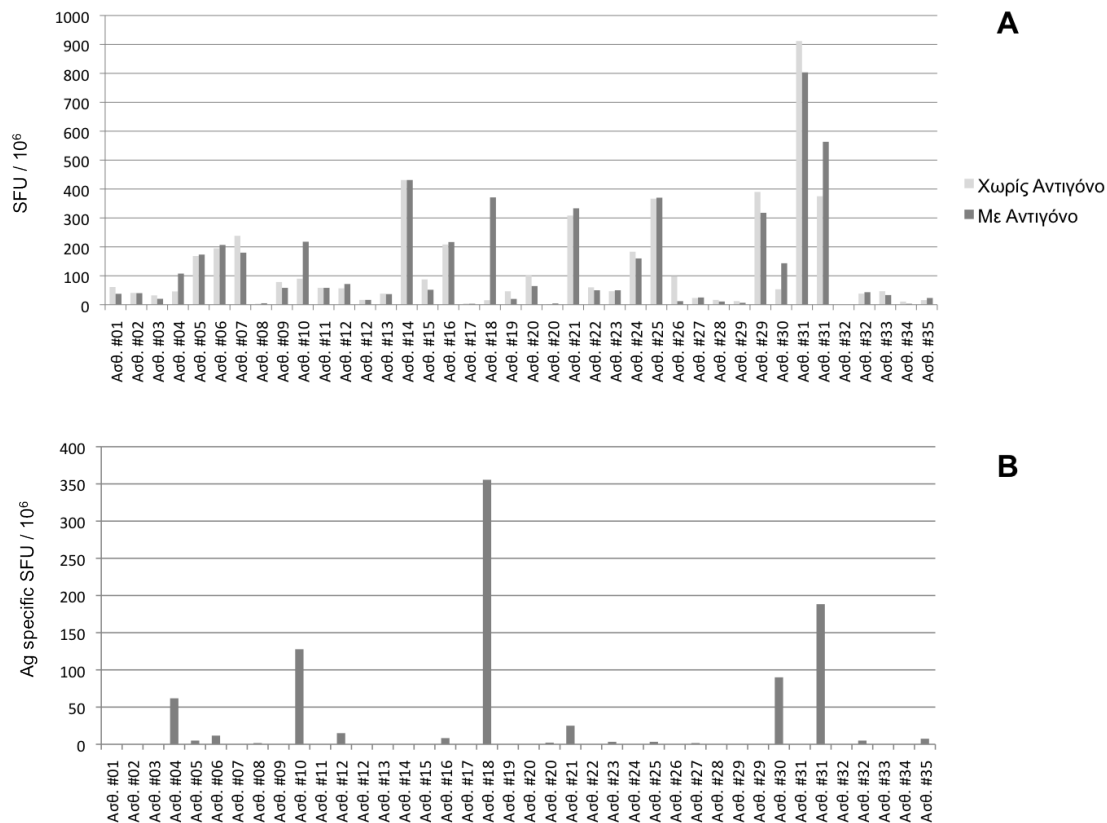
Πίνακας 6. Κλινικοεργαστηριακά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών (n=35) που χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθεί η αντιδραστικότητα των CD4+ T λεμφοκυττάρων κατά του προηγούμενα χαρακτηρισμένου επιτόπου PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆ GDLLAEIETDKATI.

| | | Μέση Τιμή ± Σταθερή απόκλιση | Διάμεση Τιμή (Εύρος) |
|---------------------------------|---------|------------------------------|----------------------|
| Ηλικία (έτη) | | 58.90 ± 10.72 | 57.00 (39-77) |
| Άνδρες/Γυναίκες | 4/31 | | |
| Κιρρωτικοί/Μη Κιρρωτικοί | 5/30 | | |
| Ηλικία έναρξης νόσου (έτη) | | 52.83 ± 11.36 | 49.00 (38-78) |
| Ηλικία διάγνωσης (έτη) | | 54.34 ± 10.83 | 53.00 (38-77) |
| Χολερυθρίνη (<1.1 mg/dL) | | 0.63 ± 0.19 | 0.60 (0.18-1.02) |
| Αλβουμίνη (3.5-5.2 g/dL) | | 4.09 ± 0.55 | 4.15 (2.7-5.1) |
| Ολικές πρωτεΐνες (6.4-8.3 g/dL) | | 7.70 ± 0.44 | 7.65 (7-8.8) |
| Χρόνος προθρομβίνης (sec.) | | 12.66 ± 2.95 | 12.43 (8.31-25) |
| INR | | 1.07 ± 0.34 | 1.00 (0.76-2.64) |
| AST (10-40 IU/L) | | 30.14 ± 15.60 | 23.50 (15.2-77) |
| ALT (10-40 IU/L) | | 38.43 ± 32.38 | 31.00 (12-140) |
| ALP (35-104 IU/L) | | 147.79 ± 88.44 | 112.00 (57-395) |
| γGT (9-40 IU/L) | | 80.48 ± 89.86 | 44.00 (12-362) |
| Ολική χοληστερόλη (mg/dL) | | 210.89 ± 52.14 | 202.50 (126-311) |
| HDL χοληστερόλη (mg/dL) | | 64.63 ± 30.41 | 56.00 (31-155) |
| LDL χοληστερόλη (mg/dL) | | 124.06 ± 38.57 | 122.00 (70-219) |
| Τριγλυκερίδια (40-160 mg/dL) | | 112.00 ± 74.50 | 94.50 (38-319) |
| IgG (847-1690 mg/dL) | | 1448.00 ± 522.55 | 1380.00 (910-3530) |
| IgM (64-249 mg/dL) | | 329.46 ± 317.10 | 252.00 (74-1725) |
| IgA (99-300 mg/dL) | | 317.88 ± 181.60 | 261.50 (126-802) |
| Ιστολογικό στάδιο 1/2/3/4* | 7/7/9/4 | | |

*Δεδομένα από βιοψίες υπήρχαν σε 27 ασθενείς.

3.4.1 IFN-γ ELISpot

Σε 35 ασθενείς που μελετήθηκαν για την παραγωγή IFN-γ μετά από διέγερση με τον επίτοπο PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆ GDLLAEIETDKATI με τη μέθοδο της ELISpot, οι 14 (40%) παρουσίασαν παραγωγή IFN-γ (AgSpSFU/10⁶>0) (mean±SD: 22.83± 10.45) έναντι 1 από τους 6 (16.6%) μάρτυρες (mean±SD: 1.11 ± 1.11). Η διαφορά μεταξύ ασθενών με ΠΧΚ και υγιών ως προς τον αριθμό των AgSpSFU δεν ήταν στατιστικά σημαντική (p=0.2149). Τα δεδομένα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 7. Η αντιδραστικότητα σε κάθε ασθενή παρουσιάζεται και στο Διάγραμμα 8.



Διάγραμμα 8. Αποτελέσματα της αντιδραστικότητας έναντι του προηγούμενα χαρακτηριζόμενου πεπτιδικού επιτόπου PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆ GDLLAEIETDKATI σε κάθε ασθενή με ΠΧΚ (μελέτη με IFN- γ ELISpot).

A) Αριθμός ειδικών για το πεπτιδίιο T λεμφοκυττάρων που παράγουν IFN- γ ανά εκατομμύριο (SFU/10⁶). Οι ανοιχτόχρωμες μπάρες αντιπροσωπεύουν τις SFU/10⁶ παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού ενώ οι σκουρόχρωμες μπάρες αντιπροσωπεύουν τις SFU/10⁶ με την παρουσία 10 μ g/ml πεπτιδίου στο καλλιεργητικό υλικό.

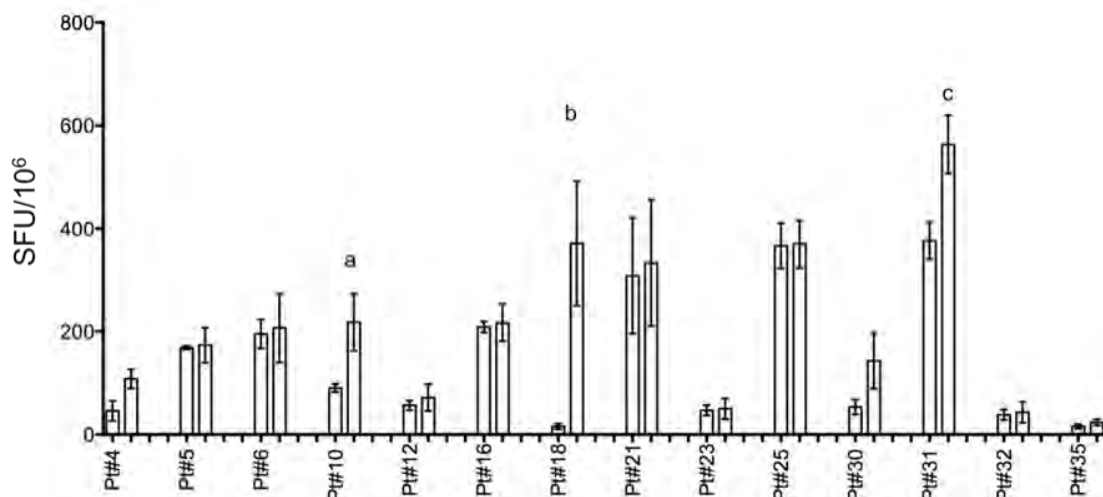
B) Αριθμός ειδικών για το πεπτιδίιο T λεμφοκυττάρων που παράγουν IFN- γ ανά εκατομμύριο (SFU/10⁶), που προκύπτει μετά από αφαίρεση των SFU που σχηματίσθηκαν απουσία πεπτιδίου από τις SFU που σχηματίσθηκαν παρουσία του πεπτιδίου.

Σε 14 από τους 35 ασθενείς με ΠΧΚ ο μέσος αριθμός των κηλίδων που σχηματίσθηκαν παρουσία του πεπτιδίου ήταν μεγαλύτερος από το μέσο αριθμό των κηλίδων που σχηματίσθηκαν απουσία του πεπτιδίου (AgSpSFU>0).

Στην πλειονότητα των ασθενών που η αντιδραστικότητα στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία του πεπτιδίου ήταν μεγαλύτερη από την αντιδραστικότητα στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν μόνο παρουσία καλλιεργητικού υλικού, η διαφορά ήταν οριακή ή οφειλόταν στην παρουσία ακραίων τιμών ανάμεσα στα αποτελέσματα ή στη χαμηλή αντιδραστικότητα και στις δύο ομάδες. Για να τεκμηριωθεί κατά πόσο η αντιδραστικότητα στο εν λόγω πεπτιδίιο ήταν στατιστικά σημαντική στους ασθενείς με ΠΧΚ, συγκρίναμε στη συνέχεια την αντιδραστικότητα των T λεμφοκυττάρων παρουσία του πεπτιδίου με εκείνη χωρίς πεπτιδίιο. Από αυτή τη σύγκριση προέκυψε ότι μόνο 3 στους 35 (8.57%) ασθενείς με ΠΧΚ παρουσίασαν αντιδραστικότητα κατά του

προηγούμενα περιγραφόμενα επιτόπου (Διάγραμμα 9).

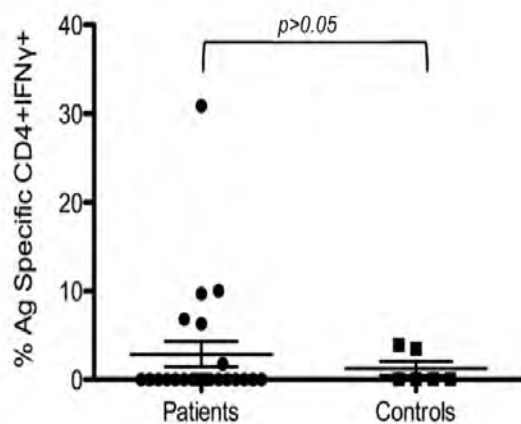
Από τους 14 ασθενείς με ΠΧΚ που είχαν $AgSpSFU > 0$ μόνο σε τρεις (Pt#10, Pt#18 και Pt#31) βρέθηκε σημαντική διαφορά της αντιδραστικότητας μεταξύ κυτάρων που καλλιεργήθηκαν παρουσία του πεπτιδίου έναντι αυτής παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού.



Διάγραμμα 9. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται μόνο τα αποτελέσματα στους ασθενείς με θετική αντιδραστικότητα ($AgSpSFU/10^6 > 0$) σαν μέση τιμή (mean) και standard error of the mean (SEM). Σε κάθε ασθενή η αριστερή μπάρα αντιστοιχεί στην αντιδραστικότητα των PBMCs παρουσία μόνο υλικού καλλιέργειας και η δεξιά μπάρα στην αντιδραστικότητα των PBMCs όταν στο καλλιεργητικό υλικό υπήρχε και πεπτίδιο. Από τους 14 ασθενείς (Pt) με ΠΧΚ που είχαν $AgSpSFU > 0$ μόνο σε τρεις (Pt#10, Pt#18 και Pt#31) η διαφορά της αντιδραστικότητας ανάμεσα στις 2 προαναφερόμενες συνθήκες ήταν στατιστικά σημαντική (Pt#10 (a): $p=0.0238$, Pt#18 (b): $p=0.0275$ και Pt#31(c): $p=0.0476$).

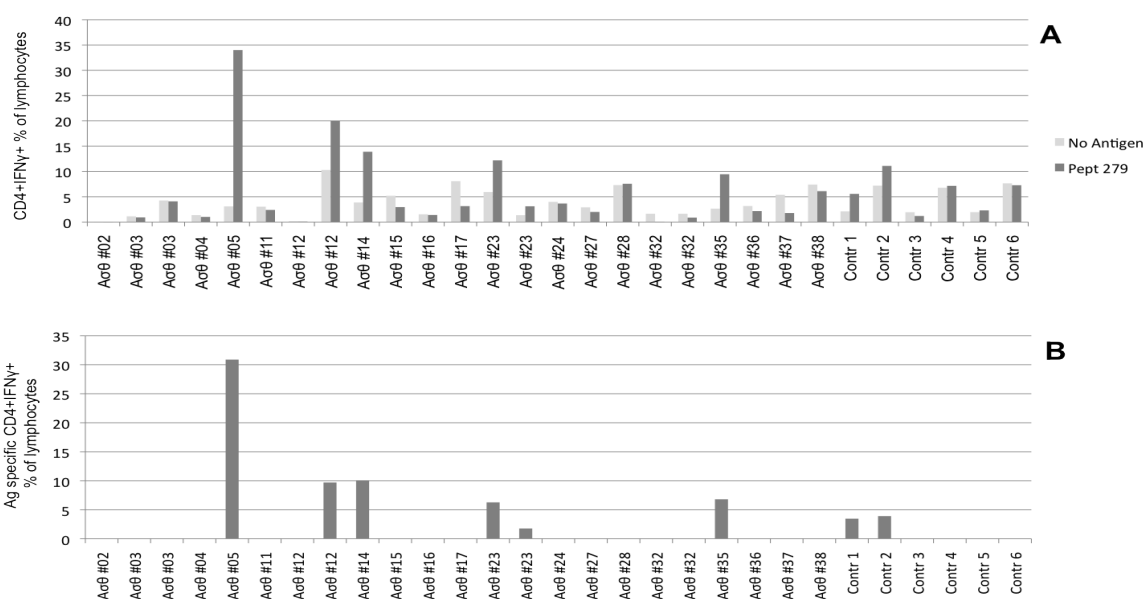
3.4.2 Μελέτη της ενδοκυττάριας παραγωγής $IFN-\gamma$ από τα $CD4+$ Τ λεμφοκύτταρα με κυτταρομετρία ροής

Στα πειράματα κυτταρομετρίας ροής μελετήθηκαν 21 ασθενείς με ΠΧΚ και έξι υγιείς μάρτυρες. Η ειδική για το πεπτίδιο έκκριση $IFN-\gamma$ από τα $CD4+$ λεμφοκύτταρα ορίστηκε ως η διαφορά της αντιδραστικότητας παρουσία αντιγόνου σε σχέση με την παραγωγή $IFN-\gamma$ απουσία αντιγόνου: Αντιγονοειδική έκκριση $IFN-\gamma$ = (Ποσοστό $CD4+$ λεμφοκυττάρων που παράγουν $IFN-\gamma$ παρουσία αντιγόνου) – (Ποσοστό $CD4+$ λεμφοκυττάρων που παράγουν $IFN-\gamma$ παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού). Ακολούθως αυτή συγκρίθηκε με την ειδική για το πεπτίδιο έκκριση $IFN-\gamma$ από τα $CD4+$ Τ λεμφοκύτταρα των μαρτύρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 10.



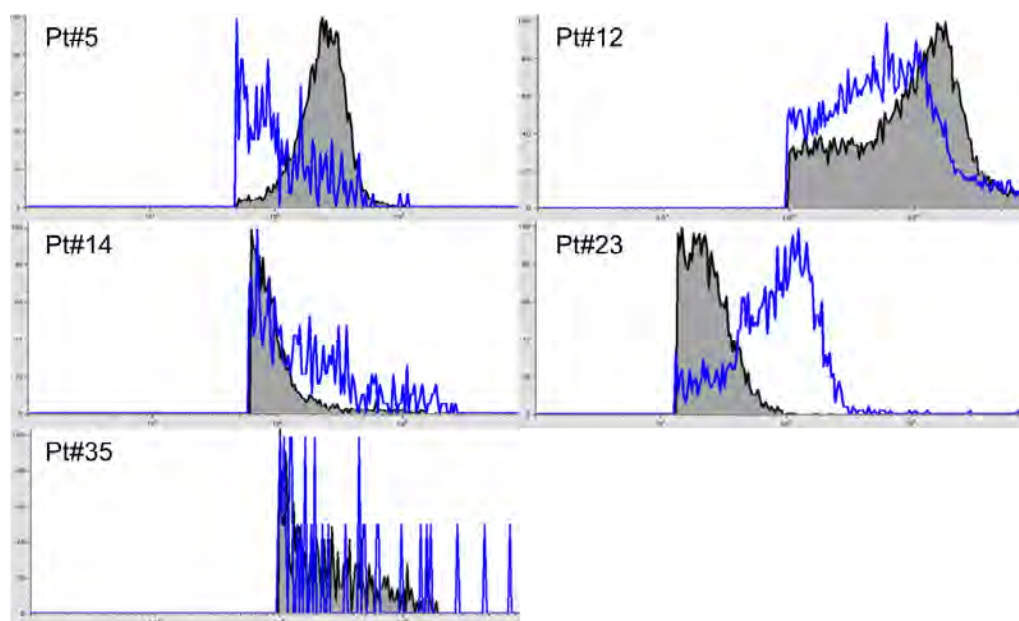
Διάγραμμα 10. Σύγκριση του ποσοστού των ειδικών για το πεπτιδίο CD4+IFN- γ στο σύνολο των λεμφοκυττάρων (%Ag Specific CD4+IFN γ +) μεταξύ 21 ασθενών (Patients) με ΠΧΚ και 6 υγιών μαρτύρων (Controls). Οι ασθενείς παρουσίαζαν υψηλότερη μέση τιμή παραγωγής IFN- γ από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα μετά από διέγερση με το πεπτιδίο (2.846 ± 1.442) σε σχέση με τους μάρτυρες (1.226 ± 1.442), εντούτοις αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.5793$)

Είναι όμως σημαντικό να σημειωθεί ότι σε σύνολο 21 ασθενών με ΠΧΚ 5 παρουσίασαν υψηλότερα ποσοστά CD4+IFN γ + λεμφοκυττάρων (23.8%) όταν καλλιεργούνταν με το πεπτιδίο σε σχέση με το ποσοστό των CD4+IFN γ + λεμφοκυττάρων όταν αυτά καλλιεργούνταν μόνο παρουσία καλλιεργητικού υλικού (Διάγραμμα 11). Ανάμεσα στους υγιείς μάρτυρες το ποσοστό αυτό ήταν 33.3% (2 από σύνολο 6).



Διάγραμμα 11. PBMCs από 21 ασθενείς με ΠΧΚ και 6 υγιείς μάρτυρες καλλιεργήθηκαν για μια εβδομάδα παρουσία ή όχι του πεπτιδίου που προηγουμένως είχε χαρακτηριστεί ως επίτοπος των CD4+ λεμφοκυττάρων στην ΠΧΚ. Στο άνω μέρος του διαγράμματος (A) παρουσιάζεται το ποσοστό των CD+IFN γ + λεμφοκυττάρων όταν τα PBMCs καλλιεργήθηκαν παρουσία (σκουρόχρωμες μπάρες) και απουσία του πεπτιδίου (ανοιχτόχρωμες μπάρες) τόσο στους ασθενείς με ΠΧΚ (Ασθ.) όσο και στους μάρτυρες (Contr). Στο κάτω μέρος του διαγράμματος (B) παρουσιάζεται το ποσοστό των ειδικών CD4+IFN γ + λεμφοκυττάρων για ένα πεπτιδίο που προκύπτει με την αφαίρεση του αριθμού των ειδικών CD4+IFN γ + λεμφοκυττάρων που σχηματίζονται απουσία του πεπτιδίου.

Προκειμένου να εκτιμηθεί κατά πόσο η διαφορά στην έκκριση IFN-γ παρουσία ή όχι του αντιγόνου ήταν σημαντική ακολούθησε η σύγκριση των δύο CD4+IFNγ+ πληθυσμών (καλλιέργεια με ή χωρίς αντιγόνο) με τα Super Enhanced D-Max, Overton Subtraction και Probability Binning Comparison tests με την πλατφόρμα σύγκρισης πληθυσμών του προγράμματος FlowJo (FlowJo's Population Comparison platform). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Εικόνα 13. Συνοπτικά, μόνο σε 2 από τους 21 ασθενείς (9.52%) παρατηρήθηκε σημαντική παραγωγή IFN-γ από τα CD4+ λεμφοκύτταρα σαν ανταπόκριση στην παρουσία του προηγούμενα περιγραφόμενου επιτόπου.



| | SED Enhanced D-Max (SED %Positive) | Overton Subtraction (%Positive) | Probability Binning Comparison T(X) |
|---------|---------------------------------------|------------------------------------|--|
| Pt # 5 | 90.6 | 55.57 | 23.1 |
| Pt # 12 | 31.1 | 18.825 | 111 |
| Pt # 14 | 0.19 | 0.1857 | 15 |
| Pt # 23 | 0.097 | 0.09718 | 315 |
| Pt # 35 | 15.4 | 6.0662 | 0 |

Εικόνα 13. Στους ασθενείς που παρουσίαζαν θετικό ποσοστό των ειδικών CD4+IFNγ+ λεμφοκυττάρων για το αντιγόνο, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των CD4+IFNγ+ λεμφοκυττάρων παρουσία ή όχι του αντιγόνου για να διαπιστωθεί κατά πόσο αυτές οι διαφορές στα ποσοστά ήταν και ποιοτικές και στατιστικά σημαντικές. Χρησιμοποιήθηκε το FlowJo's Population Comparison platform και συγκρίθηκαν τα CD4+ λεμφοκύτταρα που παρήγαγαν IFN-γ παρουσία του αντιγόνου (γκρι διάγραμμα) σε σχέση με τα CD4+ λεμφοκύτταρα που παρήγαγαν IFN-γ παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού (μπλε διάγραμμα). Για να θεωρηθεί σημαντική η διαφορά έπρεπε το Super Enhanced D-Max test και Overton Subtraction test να είναι πάνω από 1 και το T(X) στο Probability Binning Comparison test να είναι πάνω από 2. Με αυτά τα κριτήρια μόνο στους ασθενείς #5 και #12 τα CD4+ λεμφοκύτταρα είχαν στατιστικά σημαντική παραγωγή IFN-γ στην παρουσία του επιτόπου.

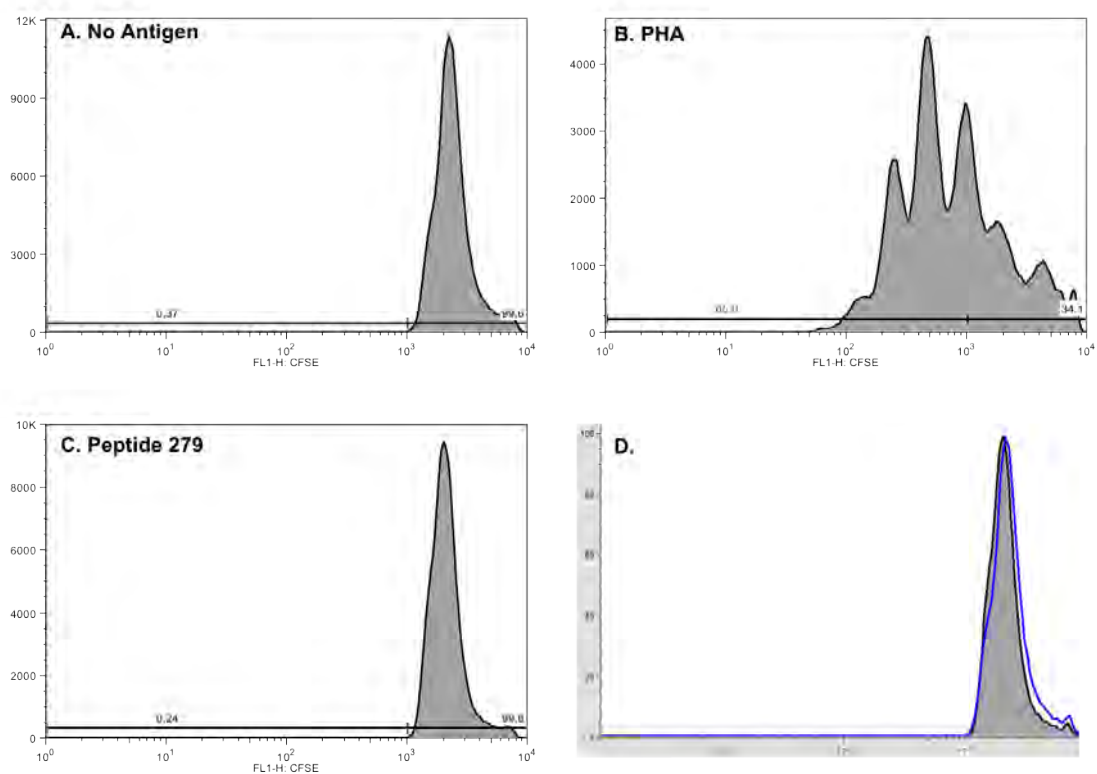
3.4.3 Μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων παρουσία του αντιγονικού επιτόπου

Όπως προαναφέρθηκε χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χρώσης με CFSE προκειμένου να μελετηθεί το κατά πόσο το εν λόγω πεπτιδίο μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μελετήθηκαν 10 ασθενείς με ΠΧΚ και 4 υγιείς μάρτυρες. Στατιστικά σημαντικά κυτταρικός πολλαπλασιασμός παρουσία του πεπτιδίου δεν παρατηρήθηκε σε κανέναν από τους 10 ασθενείς και τους 4 υγιείς μάρτυρες. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα αυτά συνοψίζονται στον Πίνακα 7. Αποτελέσματα από ένα τέτοιο πείραμα παρουσιάζονται στην Εικόνα 14. Ο κυτταρικός πληθυσμός που καλλιεργήθηκε παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για να καθορισθεί το όριο θετικότητας (gate), ενώ ο κυτταρικός πληθυσμός που καλλιεργήθηκε παρουσία ΡΗΑ χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα από τη μελέτη 10 ασθενών με ΠΧΚ και 4 υγιών μαρτύρων με τη μέθοδο χρώσης με CFSE για την εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε απάντηση στο πεπτιδίου 279 που έχει χαρακτηριστεί προηγούμενα ως επίτοπος των CD4+ λεμφοκυττάρων.

| | NoAgCFSE+ (%) | NoAgCFSE-(%) | AgCFSE+(%) | AgCFSE-(%) |
|---------|---------------|--------------|------------|------------|
| Contr#1 | 98.30 | 1.70 | 95.60 | 4.40 |
| Contr#2 | 98.04 | 1.96 | 98.30 | 1.70 |
| Contr#3 | 99.80 | 0.20 | 96.70 | 3.30 |
| Contr#4 | 99.50 | 0.50 | 98.80 | 1.20 |
| Pt#03 | 99.10 | 0.90 | 98.20 | 1.80 |
| Pt#11 | 96.30 | 3.70 | 96.50 | 3.50 |
| Pt#12 | 99.60 | 0.40 | 99.70 | 0.30 |
| Pt#12 | 99.30 | 0.70 | 99.10 | 0.90 |
| Pt#14 | 99.70 | 0.30 | 99.90 | 0.10 |
| Pt#16 | 97.00 | 3.00 | 99.20 | 0.80 |
| Pt#16 | 99.60 | 0.40 | 99.58 | 0.42 |
| Pt#21 | 99.98 | 0.02 | 99.90 | 0.10 |
| Pt#28 | 99.80 | 0.20 | 99.50 | 0.50 |
| Pt#30 | 99.80 | 0.20 | 99.80 | 0.20 |
| Pt#31 | 97.60 | 4.40 | 96.20 | 3.80 |
| Pt#32 | 97.50 | 2.50 | 97.50 | 2.50 |
| Pt#38 | 93.80 | 6.20 | 94.40 | 5.60 |

Στην πρώτες δύο στήλες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα πειράματα για την εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων τα οποία καλλιεργήθηκαν χωρίς την παρουσία του πεπτιδίου στο υγρό της καλλιέργειας. Στην πρώτη στήλη παρουσιάζεται η εκατοστιαία αναλογία των CD4+ λεμφοκυττάρων που δεν πολλαπλασιάστηκαν στην παρουσία του πεπτιδίου (NoAgCFSE+ %) στο σύνολο των CD4+ T λεμφοκυττάρων ενώ στη δεύτερη στήλη παρουσιάζεται η εκατοστιαία αναλογία των CD4+ T λεμφοκυττάρων που πολλαπλασιάστηκαν χωρίς την παρουσία του αντιγόνου στο σύνολο των CD4+ T λεμφοκυττάρων (NoAgCFSE- %). Η τρίτη και η τέταρτη στήλη κατά αντιστοιχία παρουσιάζουν τον πληθυσμό των CD4+ T λεμφοκυττάρων που πολλαπλασιάστηκαν (AgCFSE- %) ή όχι στην παρουσία του πεπτιδίου στο υγρό των κυτταροκαλλιιεργειών (AgCFSE+ %).



Εικόνα 14. Παράδειγμα από πείραμα με PBMCs ασθενούς με ΠΧΚ κατά το οποίο μελετήθηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μετά από χρώση των λεμφοκυττάρων με τη χρωστική CFSE.

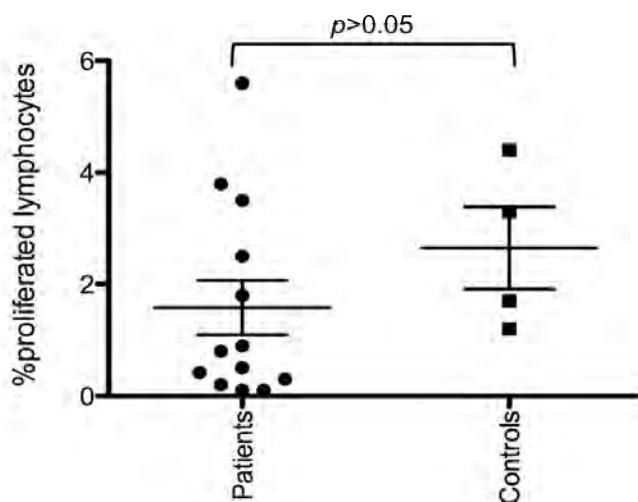
A. Κυτταρικός πληθυσμός που καλλιεργήθηκε παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού και δεν πολλαπλασιάστηκε. Ο πληθυσμός αυτός χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για να τοποθετηθεί το όριο ανιδραστικότητας (gate) και να καθορισθεί τι είναι CFSE+ (μη πολλαπλασιαζόμενος πληθυσμός) και τι είναι CFSE- (πολλαπλασιαζόμενος πληθυσμός).

B. Κυτταρικός πληθυσμός που πολλαπλασιάστηκε παρουσία PHA.

C. Κυτταρικός πληθυσμός που καλλιεργήθηκε παρουσία του πεπτιδίου 279 αλλά δεν πολλαπλασιάστηκε.

D. Σύγκριση κυτταρικού πληθυσμού που καλλιεργήθηκε μόνο παρουσία καλλιεργητικού υλικού (μπλε) και παρουσία αντιγόνου (γκρι).

Όταν συγκρίθηκε ο τρόπος πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων παρουσία του αντιγόνου μεταξύ ασθενών ($1.578\% \pm 0.4882$) και μαρτύρων ($2.650\% \pm 0.7354$), παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών (Βλέπε Διάγραμμα 12).



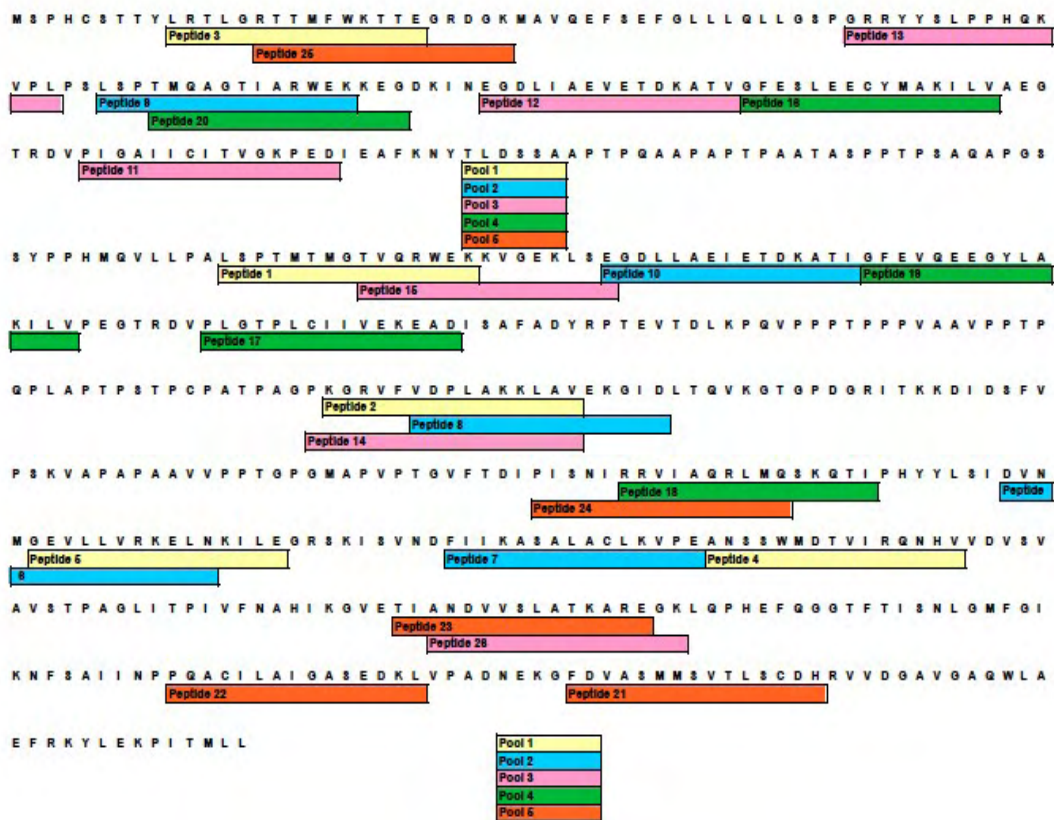
Διάγραμμα 12.

Σύγκριση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων μεταξύ πασχόντων με ΠΧΚ και υγιών μαρτύρων. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ασθενείς με ΠΧΚ ($1.578\% \pm 0.4882$) και τους μάρτυρες ($2.650\% \pm 0.7354$). p value=0.2894

3.5 Προσδιορισμός αντιδραστικότητας των T λεμφοκυττάρων σε επιλεγμένα πεπτιδία της PDC-E2

PBMCs από 21 ασθενείς με ΠΧΚ (οι δύο με σύνδρομο αλληλεπικάλυψης ΠΧΚ και ΑΗ) και 5 υγιείς μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα IFN- γ ELISpot στα οποία διεγέρθηκαν με 5 δεξαμενές πεπτιδίων προκειμένου να μελετηθεί η παρουσία αντιδραστικότητας έναντι αυτών. Τα πεπτιδία διαλύονταν σε RPMI-1640 έτσι το κάθε πεπτιδίο να βρίσκεται σε τελική συγκέντρωση εντός του καλλιεργητικού υλικού 10 μ g/ml. Δημιουργήθηκαν 5 δεξαμενές πεπτιδίων (Pools). Ποιά πεπτιδία βρίσκονταν σε κάθε δεξαμενή παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 15 και αναλυτικά στον Πίνακα 8.

Οι ασθενείς #5, #16 και #19 ελέχθηκαν εις διπλούν καθώς τα αποτελέσματα σε τουλάχιστον μια δεξαμενή πεπτιδίων ήταν οριακά ως προς τη στατιστική σημαντικότητα. Τα κύρια κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 9. Οι ασθενείς αυτοί αποτελούν υποσύνολο του πληθυσμού που περιγράφεται στον Πίνακα 1. Τα αποτελέσματα σε αυτή τη φάση της μελέτης παρατίθενται με 2 τρόπους. Αρχικά παρουσιάζεται ο τρόπος με τον οποίο τα λεμφοκύτταρα των ασθενών αντέδρασαν σε κάθε δεξαμενή πεπτιδίων με τη μέθοδο της IFN- γ ELISpot και ακολούθως παρατίθενται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα.



Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση των πεπτιδίων που σχεδιάστηκαν. Τα 26 πεπτίδια που δημιουργήθηκαν διαλύθηκαν σε 5 δεξαμενές έτσι ώστε το κάθε πεπτίδιο να βρίσκεται σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml. Η αλληλουχία του κάθε πεπτιδίου είναι με το ανάλογο χρώμα που αντιστοιχεί στη δεξαμενή στην οποία διαλύθηκε. Εδώ παρουσιάζεται η αλληλουχία των αμινοξέων της PDC-E2 και η θέση που αντιστοιχεί το κάθε πεπτίδιο στην αλληλουχία της PDC-E2. Κάθε σειρά αποτελείται από 60 αμινοξέα.

Πίνακας 8. Αριθμός του κάθε πεπτιδίου που χρησιμοποιήθηκε, η θέση του στην αλληλουχία της πρωτεΐνης PDC-E2, η αλληλουχία του και ο αριθμός δεξαμενής πεπτιδίων που διαλύθηκε.

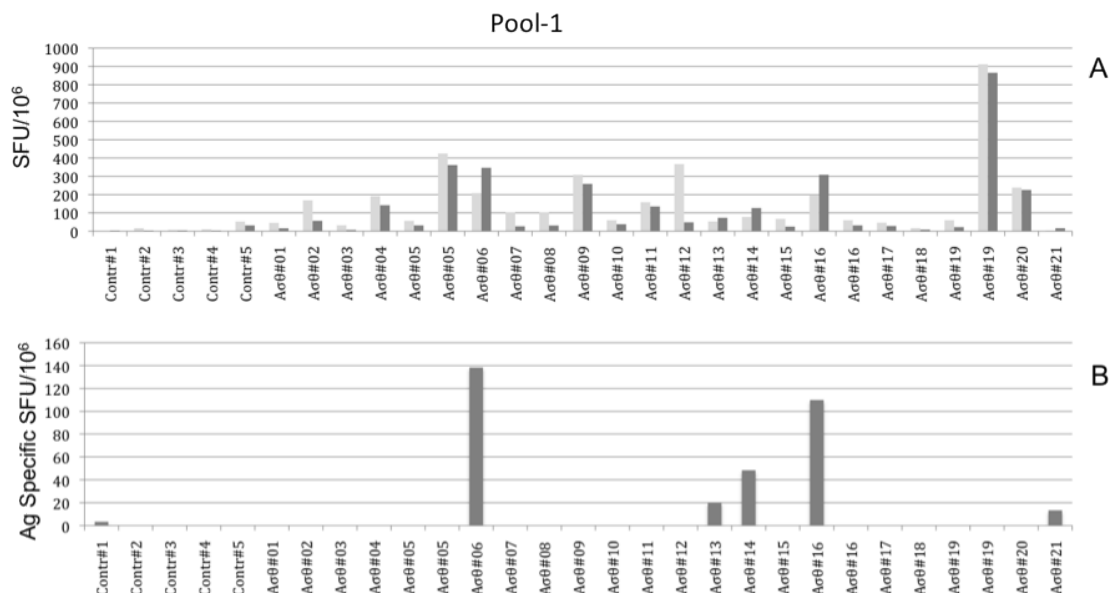
| Peptide No | Θέση | Αλληλουχία | Pool |
|------------|------------|--------------------------|------|
| 1 | αα 192-207 | H- LSPTMTMGTVQRWEK -NH2 | 1 |
| 2 | αα 319-333 | H- KGRVFDPLAKKLAV -NH2 | |
| 3 | αα 9-24 | H- LRTLGRITTFWKTTE -NH2 | |
| 4 | αα 461-475 | H- ANSSWMDTVIRQNHV -NH2 | |
| 5 | αα 422-436 | H- GEVLLVRKELNKILE -NH2 | |
| 6 | αα 418-432 | H- DVNMGEVLLVRKELN -NH2 | 2 |
| 7 | αα 446-460 | H- FIIKASALACLKYPE -NH2 | |
| 8 | αα 324-338 | H- VDPLAKKLAVEKGID -NH2 | |
| 9 | αα 60-80 | H- LSPTMQAGTIARWEK -NH2 | |
| 10 | αα 215-229 | H- EGDLLAEIETDKATI -NH2 | |
| 11 | αα 125-139 | H- PIGAIICITVGKPED -NH2 | 3 |
| 12 | αα 78-102 | H- EGDLIAEVETDKATV -NH2 | |
| 13 | αα 49-64 | H- GRRYSLPPHQKVNPL -NH2 | |
| 14 | αα 318-333 | H- PKGRVFDPLAKKLA -NH2 | |
| 15 | αα 201-215 | H- TVQRWEKKVGEKLSSE -NH2 | |
| 16 | αα 103-117 | H- GFESLEECYMAKILV -NH2 | 4 |
| 17 | αα 252-266 | H- PLGTPLCIIVEKEAD -NH2 | |
| 18 | αα 396-410 | H- RRVIAQRLMQSKQTI -NH2 | |
| 19 | αα 230-244 | H- GFEVQEEGYLAKILV -NH2 | |
| 20 | αα 69-83 | H- TMQAGTIARWEKKEG -NH2 | |
| 21 | αα 473-487 | H- FDVASMMSVTLSCDH -NH2 | 5 |
| 22 | αα 550-564 | H- PQACILAIGASEDKL -NH2 | |
| 23 | αα 503-517 | H- TIANDVVSLATKARE -NH2 | |
| 24 | αα 391-405 | H- PISNIRRVIAQRLMQ -NH2 | |
| 25 | αα 14-29 | H- RTTMFWKTTEGRDGK -NH2 | |
| 26 | αα 505-519 | H- ANDVVSLATKAREGK -NH2 | |
| | | | 3 |

Πίνακας 9. Κύρια κλινικοεργαστηριακά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΠΧΚ που ελέγχθηκαν σε αυτή τη φάση της μελέτης (n=21).

| | | Μέση Τιμή ± Σταθερή απόκλιση | Διάμεση Τιμή (Εύρος) |
|---------------------------------|---------|------------------------------|----------------------|
| Ηλικία (έτη) | | 55.38 ± 11.43 | 55.00 (23-73) |
| Άνδρες/Γυναίκες | 2/19 | | |
| Κιρρωτικοί/Μη Κιρρωτικοί | 2/19 | | |
| Ηλικία έναρξης νόσου (έτη) | | 49.19 ± 11.50 | 48.00 (16-69) |
| Ηλικία διάγνωσης (έτη) | | 51.71 ± 11.49 | 52.00 (16-70) |
| Διάρκεια νόσου (μήνες) | | 72.48 ± 44.65 | 77.00 (2-181) |
| Χολερυθρίνη (<1.1 mg/dL) | | 0.75 ± 0.37 | 0.70 (0.32-2.10) |
| Αλβουμίνη (3.5-5.2 g/dL) | | 4.24 ± 0.56 | 4.20 (2.50-5.10) |
| Ολικές Πρωτεΐνες (6.4-8.3 g/dL) | | 7.76 ± 0.57 | 7.76 (6.60-8.90) |
| Χρόνος προθρομβίνης (sec.) | | 11.71 ± 1.30 | 11.90 (8.31-14.20) |
| INR | | 1.02 ± 0.18 | 1 (0.78-1.53) |
| AST (10-40 IU/L) | | 34.06 ± 32.93 | 24 (10-147) |
| ALT (10-40 IU/L) | | 38.94 ± 39.33 | 28 (10-170) |
| ALP (35-104 IU/L) | | 153.90 ± 114.24 | 102 (57-445) |
| γGT (9-40 IU/L) | | 80.67 ± 103.46 | 48(10-362) |
| Ολική χοληστερόλη (mg/dL) | | 214.95 ± 53.45 | 202 (130-319) |
| HDL χοληστερόλη | | 61.30 ± 23.34 | 56 (35-120) |
| LDL χοληστερόλη | | 132.60 ± 40.64 | 129 (75-219) |
| IgG (847-1690 mg/dL) | | 1431.29 ± 574.51 | 1360 (860-3530) |
| IgM (64-249 mg/dL) | | 266.71 ± 177.83 | 217 (73-788) |
| IgA (99-300 mg/dL) | | 289.90 ± 145.65 | 254 (130-802) |
| Ιστολογικό στάδιο 1/2/3/4 | 4/7/8/2 | | |

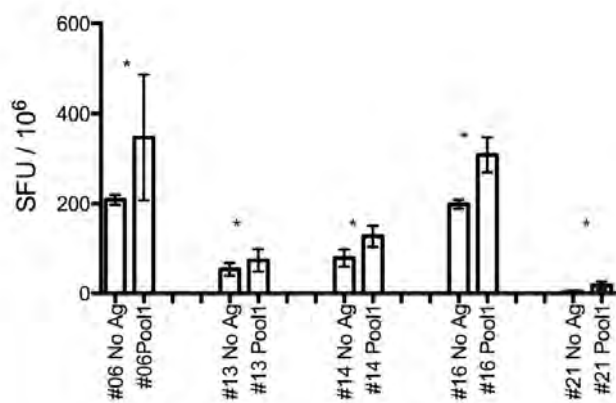
3.5.1 Αντιδραστικότητα στη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-1

Η αντιδραστικότητα του κάθε ασθενούς και του κάθε υγιούς μάρτυρα στη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-1 παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 13.



Διάγραμμα 13. Αντιδραστικότητα υγιών μαρτύρων (Contr) και ασθενών (Ασθ) στην Pool-1. Τα αποτελέσματα στο άνω τμήμα του διαγράμματος (A) παρουσιάζονται ως αριθμός λεμφοκυττάρων που παράγουν IFN-γ ανά εκατομμύριο (SFU/10⁶). Οι ανοιχτόχρωμες μπάρες αντιπροσωπεύουν τις SFU/10⁶ παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού ενώ οι σκουρόχρωμες μπάρες αντιπροσωπεύουν τις SFU/10⁶ με την παρουσία 10μg/ml πεπτιδίου στο καλλιεργητικό υλικό. Στο κάτω μέρος του διαγράμματος (B) παρουσιάζονται οι ειδικές για το αντιγόνο SFU/10⁶ (Ag Specific SFU) που προκύπτουν μετά από αφαίρεση των SFU που δημιουργήθηκαν απουσία αντιγόνου από τις SFU που δημιουργήθηκαν παρουσία του αντιγόνου. Σε σύνολο 21 ασθενών που εξετάστηκαν οι 5 έδειξαν θετικό AgSpSFU και ακολούθως μελετήθηκε κατά πόσο αυτή η αντιδραστικότητα είναι και στατιστικά σημαντική.

Στη συνέχεια εκτιμήθηκε το κατά πόσο η αντιδραστικότητα που έδειξε ο καθένας από αυτούς τους 5 ασθενείς στη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-1 είναι στατιστικά σημαντική. Η διαφορά στην αντιδραστικότητα δεν ήταν σημαντική σε κανένα από αυτούς στους ασθενείς όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 14. Συμπερασματικά, κανείς εκ των 21 ασθενών με ΠΧΚ που μελετήθηκαν δεν είχε σημαντική αντιδραστικότητα στην Pool-1.

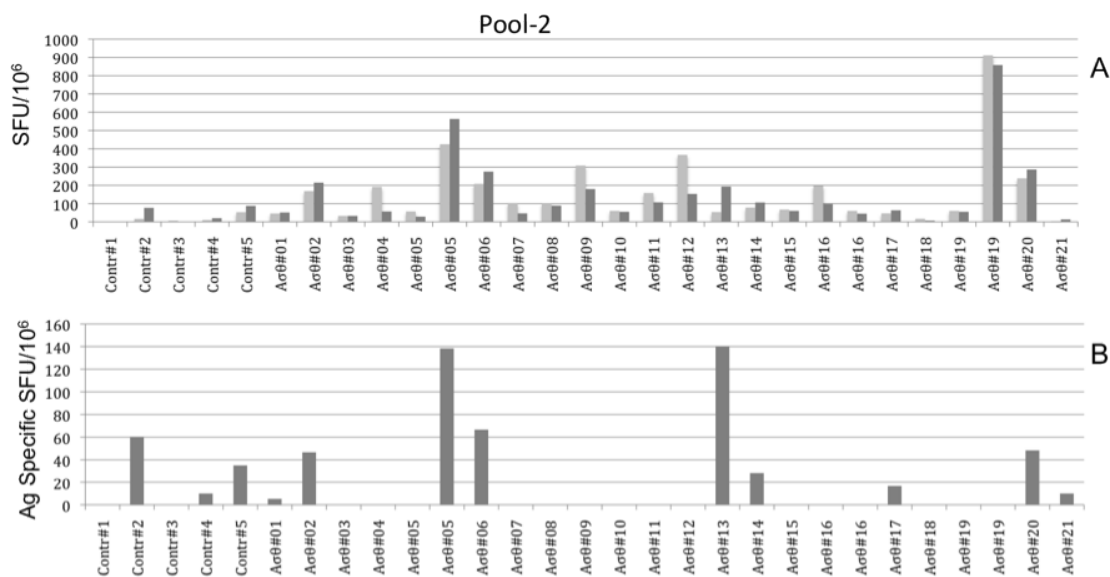


Διάγραμμα 14.

Σύγκριση της αντιδραστικότητας έναντι της δεξαμενής πεπτιδίων Pool-1 με αυτή που ανιχνεύθηκε παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού σε 5 ασθενείς με ΠΧΚ, στους οποίους είχε διαπιστωθεί θετικό AgSpSFU. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν μέση τιμή (mean ± SEM). Η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική σε κάποιον από τους ασθενείς αυτούς (* $p>0.05$).

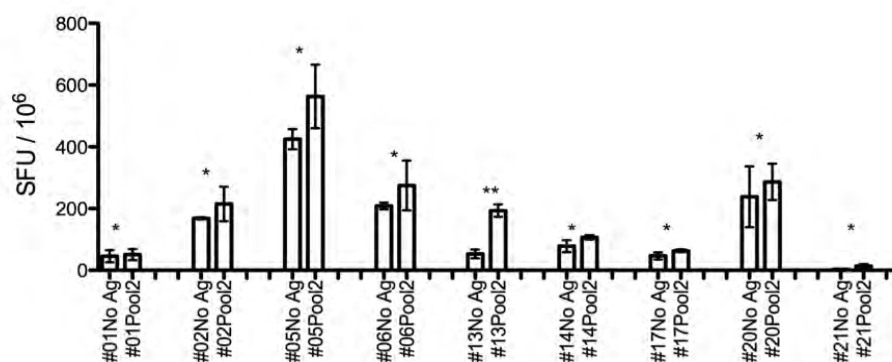
3.5.2 Αντιδραστικότητα στη δεξαμενή Pool-2

Ανάλογη ήταν και η προσέγγισή μας στη μελέτη της αντιδραστικότητας έναντι της δεξαμενής πεπτιδίων Pool-2. Συγκρίθηκε δηλαδή η αντιδραστικότητα των PBMCs που καλλιεργήθηκαν μόνο σε καλλιεργητικό υλικό με την αντιδραστικότητα των PBMCs που καλλιεργήθηκαν παρουσία της δεξαμενής πεπτιδίων Pool-2. Από τους 21 ασθενείς με ΠΧΚ οι 9 έδειξαν θετικό AgSpSFU (Διάγραμμα 15), αλλά μόνο σε 1 από τους 25 ασθενείς (4.76%) η διαφορά αυτή ήταν οριακά στατιστικά σημαντική (Διάγραμμα 16).



Διάγραμμα 15. Αντιδραστικότητα υγιών μαρτύρων (Contr) και ασθενών (Asθ) στη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-2. Τα αποτελέσματα στο άνω τμήμα του διαγράμματος (A) παρουσιάζονται ως αριθμός λεμφοκυττάρων που παράγουν IFN- γ ανά εκατομμύριο (SFU/10⁶). Οι ανοιχτόχρωμες μπάρες αντιπροσωπεύουν τις SFU/10⁶ παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού ενώ οι σκουρόχρωμες μπάρες αντιπροσωπεύουν τις SFU/10⁶ παρουσία 10 μ g/ml πεπτιδίου στο καλλιεργητικό υλικό. Στο κάτω μέρος του διαγράμματος (B) παρουσιάζονται οι ειδικές για το αντιγόνο SFU/10⁶ (Ag Specific SFU) που προκύπτουν μετά από αφαίρεση των SFU που δημιουργήθηκαν απουσία αντιγόνου από τις SFU που δημιουργήθηκαν παρουσία του αντιγόνου. Σε σύνολο 21 ασθενών που εξετάστηκαν οι 9 έδειξαν θετικό AgSpSFU και ακολούθως μελετήθηκε κατά πόσο αυτή η αντιδραστικότητα είναι στατιστικά σημαντική. Από τους 5 μάρτυρες οι 3 έδειξαν θετικό

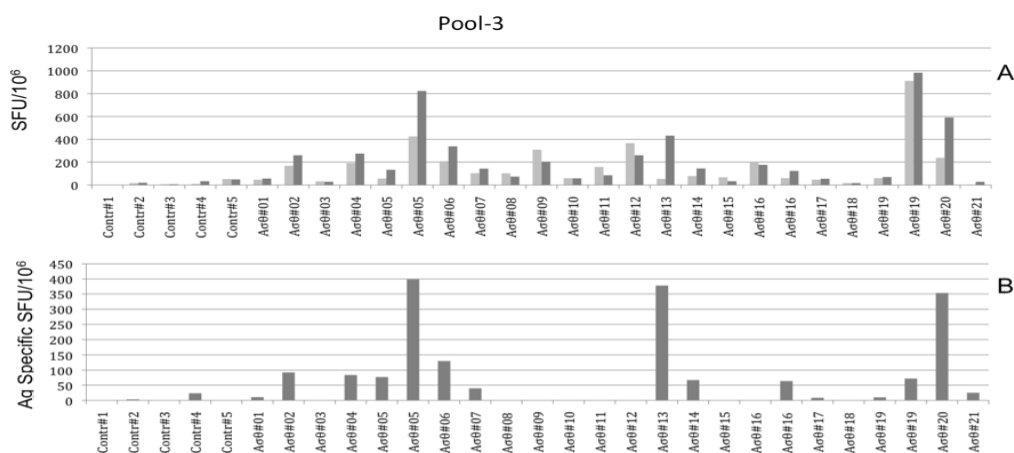
AgSpSFU.



Διάγραμμα 16. Σύγκριση της αντιδραστικότητας έναντι της δεξαμενής πεπτιδίων Pool-2 με αυτή που ανιχνεύθηκε παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού σε 9 ασθενείς με ΠΧΚ, στους οποίους είχε διαπιστωθεί θετικό AgSpSFU. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν μέση τιμή (mean ± SEM). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους ασθενείς (* $p > 0.05$), με εξαίρεση τον ασθενή #13 (SFU/10⁶ παρουσία της Pool-3 vs SFU/10⁶ με καλλιεργητικό υλικό, 193.30 ± 20.28 vs 53.33 ± 14.53 αντίστοιχα, $**p = 0.050$).

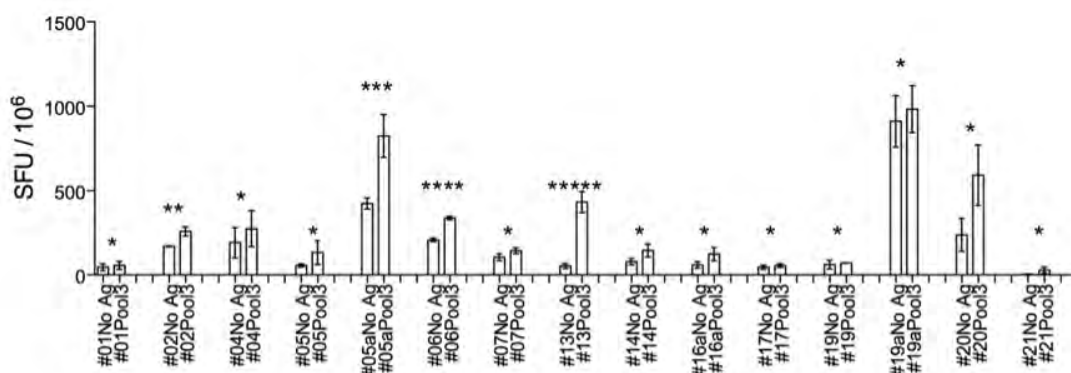
3.5.3 Αντιδραστικότητα στη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-3

Ακολουθήθηκε η ίδια μεθοδολογία για την ανάδειξη της αντιδραστικότητας στη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-3 όπως και στις δύο προηγούμενες περιπτώσεις. Η αντιδραστικότητα των ασθενών και των μαρτύρων φαίνεται στο Διάγραμμα 17. Δεκατρείς ασθενείς παρουσίασαν αριθμό λεμφοκυττάρων που έκκρινε IFN- γ παρουσία των πεπτιδίων της δεξαμενής Pool-3 μεγαλύτερο από αυτό όταν αυτά καλλιεργήθηκαν μόνο παρουσία καλλιεργητικού υλικού.



Διάγραμμα 17. Αντιδραστικότητα υγιών μαρτύρων (Contr) και ασθενών (Ασθ) στη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-3. Τα αποτελέσματα στο άνω τμήμα του διαγράμματος (A) παρουσιάζονται ως αριθμός λεμφοκυττάρων που παράγουν IFN- γ ανά εκατομμύριο (SFU/10⁶). Οι ανοιχτόχρωμες μπάρες αντιπροσωπεύουν τις SFU/10⁶ παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού ενώ οι σκουρόχρωμες μπάρες αντιπροσωπεύουν τις SFU/10⁶ παρουσία 10 μ g/ml πεπτιδίου στο καλλιεργητικό υλικό. Στο κάτω μέρος του διαγράμματος (B) παρουσιάζονται οι ειδικές για το αντιγόνο SFU/10⁶ (Ag Specific SFU) που προκύπτουν μετά από αφαίρεση των SFU που δημιουργήθηκαν απουσία αντιγόνου από τις SFU που δημιουργήθηκαν παρουσία του αντιγόνου. Σε σύνολο 21 ασθενών (οι

ασθενείς #05, #16 και #19 ελέχθηκαν σε 2 πειράματα) που εξετάστηκαν οι 13 έδειξαν θετικό AgSpSFU και ακολούθως μελετήθηκε κατά πόσο αυτή η αντιδραστικότητα είναι στατιστικά σημαντική. Από τους 5 μάρτυρες οι 2 έδειξαν θετικό AgSpSFU.

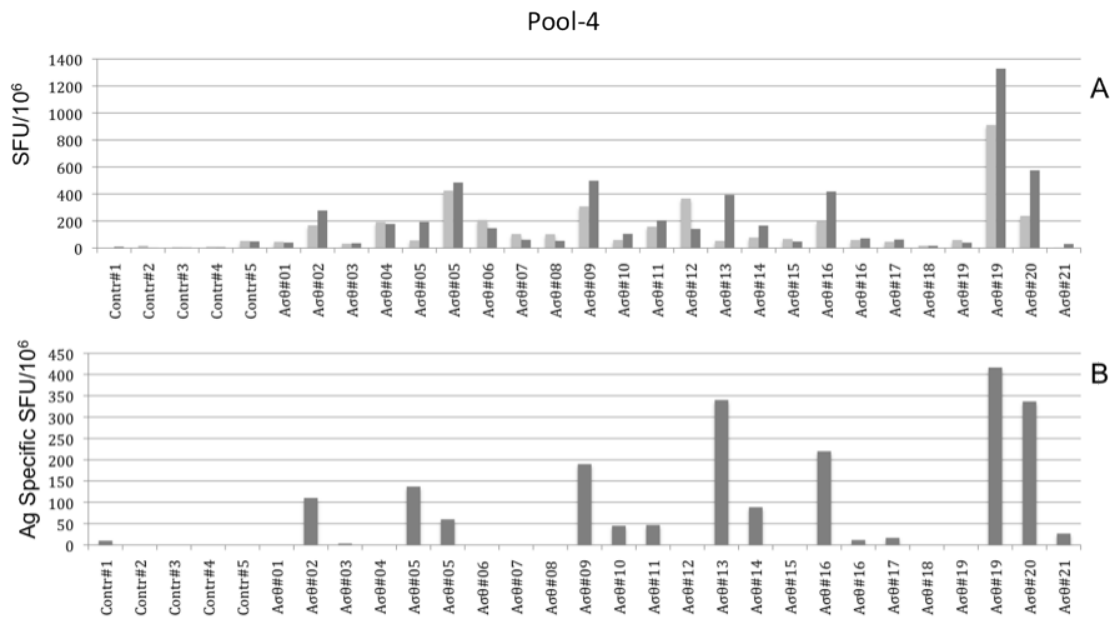


Διάγραμμα 18. Σύγκριση της αντιδραστικότητας έναντι της δεξαμενής πεπτιδίων Pool-3 με αυτή που ανιχνεύθηκε παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού σε 13 ασθενείς με ΠΧΚ, στους οποίους είχε διαπιστωθεί θετικό AgSpSFU. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν μέση τιμή (mean) ± SEM). Στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε σε 9 στους 13 ασθενείς (* $p > 0.05$). Η διαφορά στην αντιδραστικότητα ήταν στατιστικά σημαντική στους ασθενείς #02 (260.0±27.54 vs 168.3±3.33, ** $p = 0.0298$), #05 (823.3±126.8 vs 425.0±32.79 *** $p = 0.0384$), #06 (338.3±10.14 vs 208.3±10.93, **** $p = 0.0010$) και #13 (431.7±62.87 vs 53.33±14.53, **** $p = 0.0042$).

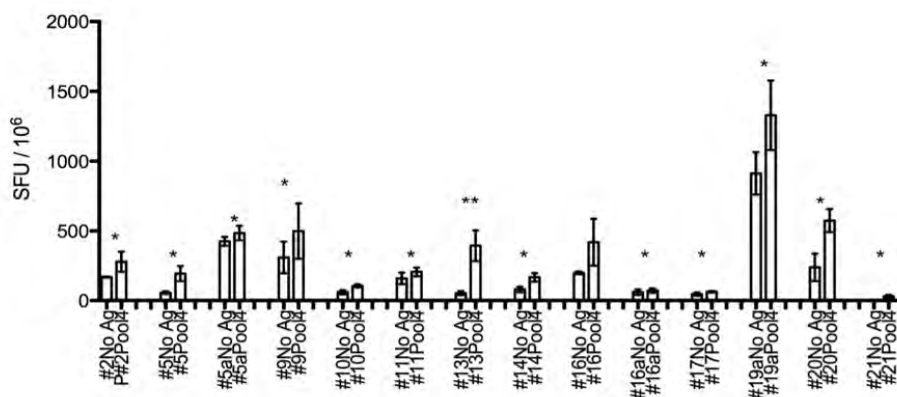
Από τους 13 ασθενείς που παρουσίασαν θετικό αριθμό AgSpSFU μόνο στους 4 φάνηκε ότι αυτή η διαφορά ήταν και στατιστικά σημαντική. Έτσι, σε σύνολο 21 ασθενών οι 4 (19.05%) παρουσίασαν σημαντική αντίδραση στα πεπτίδια που αποτελούσαν τη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-3.

3.5.4 Αντιδραστικότητα στη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-4

Η αντιδραστικότητα των ασθενών και των μαρτύρων φαίνεται στο Διάγραμμα 19. Δώδεκα ασθενείς παρουσίασαν αριθμό λεμφοκυττάρων που έκκρινε IFN- γ παρουσία των πεπτιδίων της δεξαμενής Pool-4 μεγαλύτερο από αυτό όταν αυτά καλλιεργήθηκαν μόνο παρουσία καλλιεργητικού υλικού. Από τους 12 ασθενείς που παρουσίασαν θετικό αριθμό AgSpSFU μόνο σε έναν (#13) φάνηκε ότι αυτή η διαφορά ήταν και στατιστικά σημαντική (393.30 ±111.3 vs 53.33 14.53 SFU/10⁶, $p = 0.0388$). Έτσι, σε σύνολο 21 ασθενών μόνο ένας (4.76%) είχε στατιστικά σημαντική θετική αντίδραση στα πεπτίδια που αποτελούσαν τη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-4.



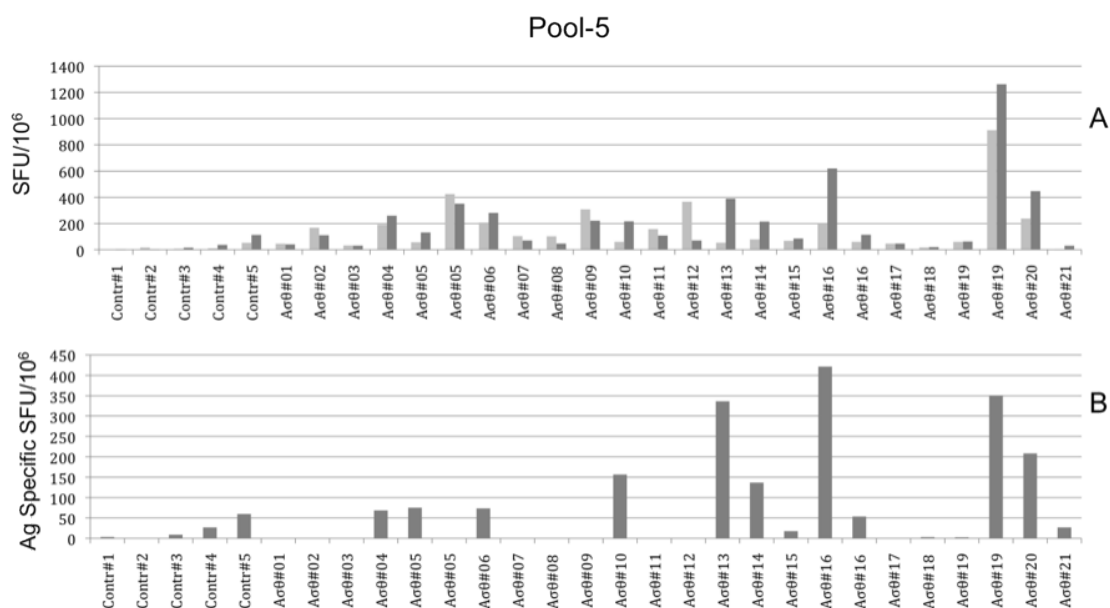
Διάγραμμα 19. Αντιδραστικότητα υγιών μαρτύρων (Contr) και ασθενών (Ασθ) στη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-4. Τα αποτελέσματα στο άνω τμήμα (A) παρουσιάζονται ως αριθμός λεμφοκυττάρων που παράγουν IFN-γ ανά εκατομμύριο κυττάρων (SFU/10⁶). Οι ανοιχτόχρωμες μπάρες αντιπροσωπεύουν τις SFU/10⁶ παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού ενώ οι σκουρόχρωμες αντιπροσωπεύουν τις SFU/10⁶ παρουσία 10μg/ml από κάθε πεπτιδίδιο της Pool-4 στο καλλιεργητικό υλικό. Στο κάτω μέρος του διαγράμματος (B) παρουσιάζονται οι ειδικές για το αντιγόνο SFU/10⁶ (Ag Specific SFU) που προκύπτουν μετά από αφαίρεση των SFU που δημιουργήθηκαν απουσία αντιγόνου από τις SFU που δημιουργήθηκαν παρουσία των πεπτιδίων. Σε σύνολο 21 ασθενών (οι ασθενείς #05, #16 και #19 ελέχθηκαν σε 2 πειράματα) που εξετάστηκαν οι 14 έδειξαν θετικό AgSpSFU (ο ασθενής #5 σε 2 πειράματα). Από τους 5 μάρτυρες μόνο 1 έδειξε θετικό AgSpSFU.



Διάγραμμα 20. Σύγκριση της αντιδραστικότητας έναντι της δεξαμενής πεπτιδίων Pool-4 με αυτή που ανιχνεύθηκε παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού σε 12 ασθενείς με ΠΧΚ, στους οποίους είχε διαπιστωθεί θετικό AgSpSFU. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν μέση τιμή (mean) ± SEM). Στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε σε 11 στους 12 ασθενείς (* $p > 0.05$). Η διαφορά στην αντιδραστικότητα ήταν στατιστικά σημαντική μόνο στον ασθενή #13 (393.30 ± 111.3 vs 53.33 ± 14.53 SFU/10⁶, ** $p = 0.0388$).

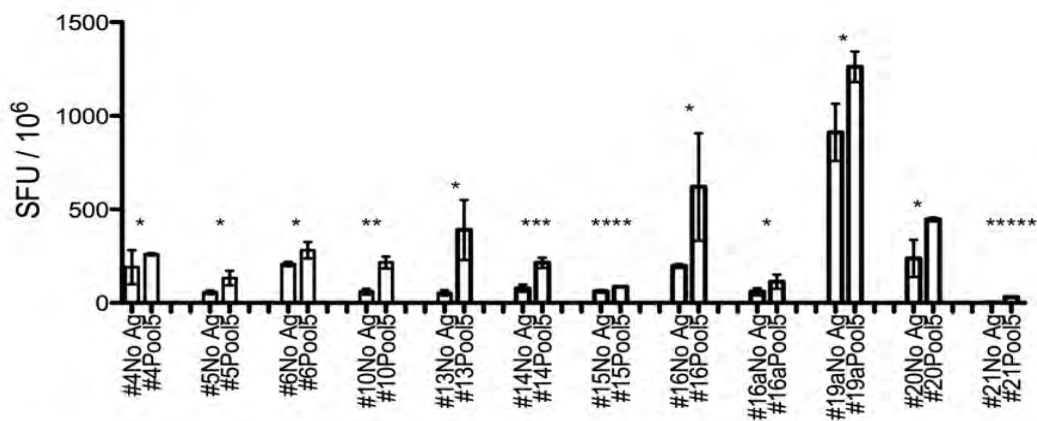
3.5.5 Αντιδραστικότητα στη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-5

Η αντιδραστικότητα των ασθενών και των μαρτύρων στη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-5 φαίνεται στο Διάγραμμα 21. Έντεκα ασθενείς (ο ασθενής #16 εις διπλούν) παρουσίασαν αριθμό λεμφοκυττάρων που έκκρινε IFN- γ παρουσία των πεπτιδίων της δεξαμενής Pool-5 μεγαλύτερο από αυτό όταν αυτά καλλιεργήθηκαν μόνο παρουσία καλλιεργητικού υλικού.



Διάγραμμα 21. Αντιδραστικότητα υγιών μαρτύρων (Contr) και ασθενών (Ασθ) στη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-5. Τα αποτελέσματα στο άνω τμήμα (A) παρουσιάζονται ως αριθμός λεμφοκυττάρων που παράγουν IFN- γ ανά εκατομμύριο κυττάρων (SFU/10⁶). Οι ανοιχτόχρωμες μπάρεες αντιπροσωπεύουν τις SFU/10⁶ παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού ενώ οι σκουρόχρωμες αντιπροσωπεύουν τις SFU/10⁶ με την παρουσία 10μg/ml από κάθε πεπτίδιο της δεξαμενής Pool-5 στο καλλιεργητικό υλικό. Στο κάτω μέρος του διαγράμματος (B) παρουσιάζονται οι ειδικές για το αντιγόνο SFU/10⁶ (Ag Specific SFU) που προκύπτουν μετά από αφαίρεση των SFU που δημιουργήθηκαν απουσία αντιγόνου από τις SFU που δημιουργήθηκαν παρουσία των πεπτιδίων. Σε σύνολο 21 ασθενών (οι ασθενείς #05, #16 και #19 ελέχθηκαν σε 2 πειράματα) που εξετάστηκαν οι 11 έδειξαν θετικό AgSpSFU. Από τους 5 μάρτυρες, 4 έδειξαν θετικό AgSpSFU.

Από τους 11 ασθενείς που παρουσίασαν θετικό αριθμό AgSpSFU στους 4 φάνηκε ότι η διαφορά αυτή στην αντιδραστικότητα ήταν και στατιστικά σημαντική (Διάγραμμα 22). Έτσι, σε σύνολο 21 ασθενών 4 (19.05%) είχαν στατιστικά σημαντική θετική αντιδραστικότητα στα πεπτίδια που αποτελούσαν τη δεξαμενή Pool-5.



Διάγραμμα 22. Σύγκριση της αντιδραστικότητας έναντι της δεξαμενής πεπτιδίων Pool-5 με αυτή που ανιχνεύθηκε παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού σε 11 ασθενείς με ΠΧΚ, στους οποίους είχε διαπιστωθεί θετικό AgSpSFU. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν μέση τιμή (mean) ± SEM). Στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε σε 7 στους 11 ασθενείς (* $p > 0.05$). Η διαφορά στην αντιδραστικότητα ήταν στατιστικά σημαντική στους ασθενείς #10 (216.70 ± 31.8 vs 60 ± 15.28 SFU/10⁶, ** $p = 0.0113$), #14 (215 ± 26.46 vs 78.33 ± 19.22 SFU/10⁶, *** $p = 0.0139$), #15 (85 ± 0.5774 vs 61.67 ± 7.265 SFU/10⁶, **** $p = 0.0328$) και #21 (30 ± 2.887 vs 3.33 ± 1.667 SFU/10⁶, ***** $p = 0.013$)

3.5.6 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα

Σε σύνολο 21 ασθενών, των οποίων τα PBMCs καλλιεργήθηκαν με τις 5 δεξαμενές πεπτιδίων (Pools 1-5), 8 ασθενείς (38.09%) παρουσίασαν αντιδραστικότητα έναντι τουλάχιστον μιας δεξαμενής πεπτιδίων. Αντιδραστικότητα έναντι περισσότερων της μιας δεξαμενής πεπτιδίων παρουσίασε μόνο ένας ασθενής (4.76%). Είναι επίσης ενδιαφέρον το γεγονός ότι σε 19 από τους 21 ασθενείς υπήρχε σχηματισμός ειδικών για τα αντιγόνα μονάδων παραγωγής IFN- γ (Antigen Specific Spot Forming Units-AgSpSFU) για τουλάχιστον μια δεξαμενή πεπτιδίων αλλά σε μόνο 8 ασθενείς η παραγωγή αυτή ήταν στατιστικά σημαντική για τουλάχιστον μια δεξαμενή πεπτιδίων.

Αναλυτικά, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική παραγωγή IFN- γ σε κανέναν ασθενή (0%) παρουσία των πεπτιδίων της δεξαμενής Pool-1. Αντίθετα, η αντιδραστικότητα έναντι των πεπτιδίων των δεξαμενών Pool-2, Pool-3, Pool-4 και Pool-5 ήταν 4,76% (1/21), 19.05% (4/21), 4.76% (1/21) και 19.05% (4/21), αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Αντιδραστικότητα των ασθενών για την κάθε δεξαμενή πεπτιδίων (Pool).

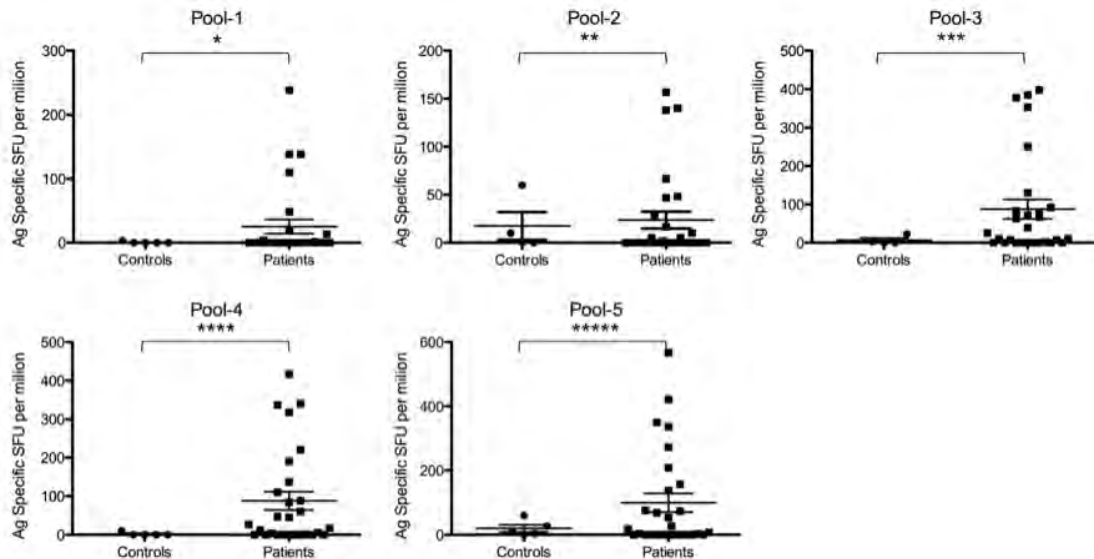
| | Pool1 | Pool2 | Pool3 | Pool4 | Pool5 | | Pool1 | Pool2 | Pool3 | Pool4 | Pool5 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--|--------|--------|--------|-------|--------|
| Ασθ#01 | 0.0 | 5.3 | 10.6 | 0.0 | 0.0 | | | | | | |
| Ασθ#02 | 0.0 | 46.7 | 91.7 | 110.0 | 0.0 | | | 0.0298 | | | |
| Ασθ#03 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.4 | 0.0 | | | | | | |
| Ασθ#04 | 0.0 | 0.0 | 83.3 | 0.0 | 68.3 | | | | | | |
| Ασθ#05 | 0.0 | 0.0 | 76.7 | 136.7 | 75.0 | | | | | | |
| Ασθ#05α | 0.0 | 138.3 | 398.3 | 60.0 | 0.0 | | | 0.0384 | | | |
| Ασθ#06 | 138.3 | 66.7 | 130.0 | 0.0 | 73.3 | | | 0.0010 | | | |
| Ασθ#07 | 0.0 | 0.0 | 39.6 | 0.0 | 0.0 | | | | | | |
| Ασθ#08 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | | | | | | |
| Ασθ#09 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 190.0 | 0.0 | | | | | | |
| Ασθ#10 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 45.0 | 156.7 | | | | | | 0.0113 |
| Ασθ#11 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 46.7 | 0.0 | | | | | | |
| Ασθ#12 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | | | | | | |
| Ασθ#13 | 20.0 | 140.0 | 378.3 | 340.0 | 336.7 | | 0.0050 | 0.0042 | 0.0388 | | |
| Ασθ#14 | 48.3 | 28.3 | 66.7 | 88.3 | 136.7 | | | | | | 0.0139 |
| Ασθ#15 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 17.5 | | | | | | 0.0328 |
| Ασθ#16 | 110.0 | 0.0 | 0.0 | 220.0 | 421.7 | | | | | | |
| Ασθ#16α | 0.0 | 0.0 | 63.3 | 11.7 | 53.3 | | | | | | |
| Ασθ#17 | 0.0 | 16.7 | 8.3 | 16.7 | 0.0 | | | | | | |
| Ασθ#18 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.0 | | | | | | |
| Ασθ#19 | 0.0 | 0.0 | 10.0 | 0.0 | 2.5 | | | | | | |
| Ασθ#19α | 0.0 | 0.0 | 71.7 | 416.7 | 350.0 | | | | | | |
| Ασθ#20 | 0.0 | 48.3 | 353.3 | 336.7 | 208.3 | | | | | | |
| Ασθ#21 | 13.3 | 10.0 | 25.0 | 26.7 | 26.7 | | | | | | 0.0130 |

Στο αριστερό μέρος του πίνακα εκφράζονται οι ειδικές για τα αντιγόνα μονάδες παραγωγής IFN- γ σε κάθε εκατομμύριο κυττάρων (Antigen Specific Spot Forming Units-AgSpSFU/ 10^6). Σε γκρι είναι όσα αποτελέσματα ήταν θετικά (AgSpSFU/ $10^6 > 0$) αλλά η διαφορά αυτή δεν άγγιξε τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας ($p > 0.05$), ενώ με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται αυτά όπου η διαφορά στην αντιδραστικότητα παρουσία και απουσία των αντιγόνων ήταν θετική, αλλά και στατιστικά σημαντική (AgSpSFU/ $10^6 > 0$ και $p < 0.05$). Στο δεξιό μέρος του πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές των p values, για τις περιπτώσεις εκείνες που η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική (αποτελέσματα με κόκκινο χρώμα).

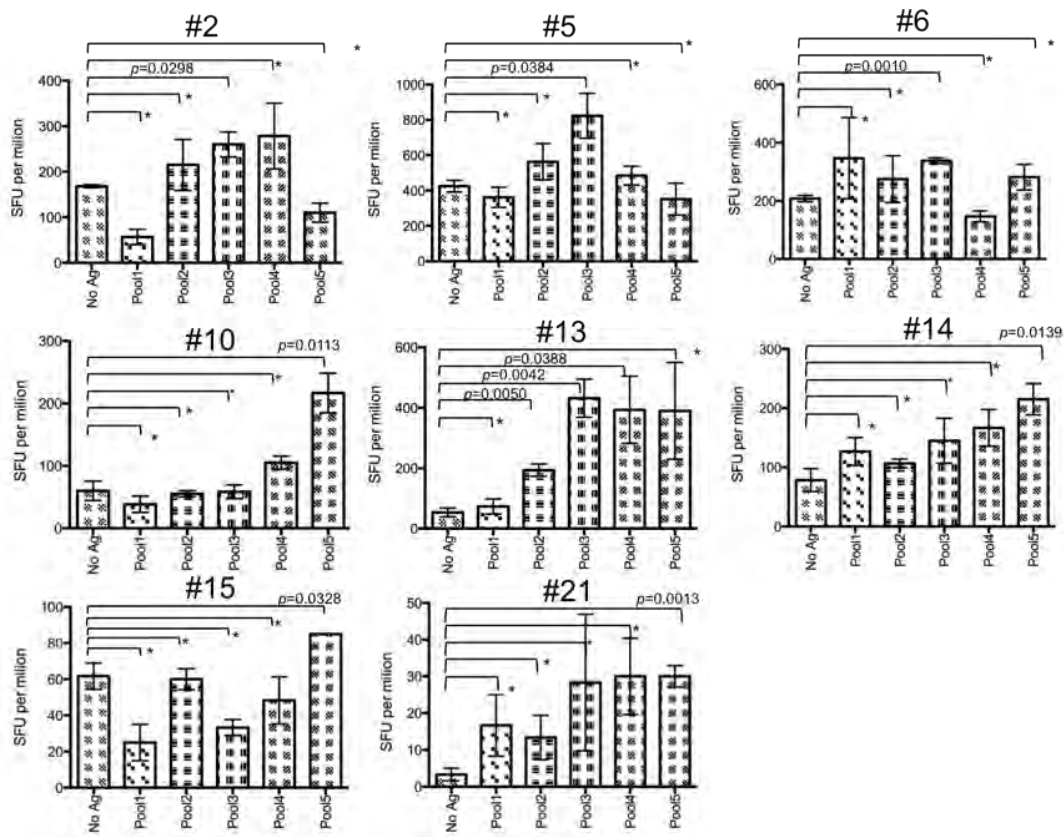
Δεδομένου ότι αντιδραστικότητα έναντι κάποιων δεξαμενών πεπτιδίων ανιχνεύθηκε και σε υγιείς μάρτυρες που μελετήθηκαν, στη συνέχεια συγκρίθηκε η αντιδραστικότητα στις δεξαμενές πεπτιδίων μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων, προκειμένου να δείξουμε κατά πόσο η απάντηση ήταν ειδική για τη νόσο. Η διαφορά της αντιδραστικότητας μεταξύ των δυο ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντική για καμιά από τις 5 δεξαμενές πεπτιδίων. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 23.

Τα αποτελέσματα για τους οκτώ ασθενείς που αντέδρασαν σε τουλάχιστον μια δεξαμενή

πεπτιδίων εκτός από τον Πίνακα 10 παρουσιάζονται και στο Διάγραμμα 24.



Διάγραμμα 23. Σύγκριση της αντιδραστικότητας στα Pools πεπτιδίων μεταξύ 21 ασθενών με ΠΧΚ (Patients) και 5 υγιών μαρτύρων (Controls). Συγκρίθηκαν οι ειδικές για τα αντιγόνα μονάδες παραγωγής IFN- γ σε κάθε εκατομμύριο κυττάρων (Antigen Specific Spot Forming Units-AgSpSFU/ 10^6). Στο κάθε διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση τιμή αντιδραστικότητας \pm SEM (Mean \pm SEM). Η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική για καμία από τις δεξαμενές πεπτιδίων ($p > 0.05$). Αναλυτικότερα, τα αποτελέσματα από τη σύγκριση της αντιδραστικότητας μεταξύ ασθενών και υγιών είναι για τη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-1: 25.45 ± 11.04 vs 0.660 ± 0.660 AgSpSFU / 10^6 , * $p=0.3564$, για τη δεξαμενή Pool-2: 23.71 ± 8.739 vs 17.50 ± 14.36 AgSpSFU / 10^6 , ** $p=0.7970$, για τη δεξαμενή Pool-3: 87.60 ± 25.12 vs 5.332 ± 4.545 AgSpSFU / 10^6 , *** $p=0.1819$, για τη δεξαμενή Pool-4: 87.70 ± 23.78 vs 20 ± 20 AgSpSFU / 10^6 , **** $p=0.14299$, και για τη δεξαμενή Pool-5: 99.13 ± 29.09 vs 19.71 ± 10.99 AgSpSFU / 10^6 , ***** $p=0.1819$.



Διάγραμμα 24. Παρουσίαση της αντιδραστικότητας 8 εκ των 21 ασθενών που μελετήθηκαν με σημαντική αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον μια δεξαμενή πεπτιδίων. Η αντιδραστικότητα παρουσιάζεται σαν μέση τιμή \pm SEM (Standard Error of the Mean) παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού ή των δεξαμενών πεπτιδίων. Στις περισσότερες περιπτώσεις η διαφορά μεταξύ της αντιδραστικότητας των PBMCs παρουσία των δεξαμενών πεπτιδίων και αυτής μόνο παρουσία του καλλιεργητικού υλικού δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($*p > 0.05$). Στις περιπτώσεις που υπήρχε σημαντική διαφορά αναγράφεται και η τιμή του p .

Στη συνέχεια προσπαθήσαμε να δείξουμε αν κάποια από τις δεξαμενές πεπτιδίων, στις οποίες παρουσίαζαν αντιδραστικότητα κάθε ένας από τους 8 ασθενείς περιείχαν πεπτιδίδια, που είχαν καλό σκορ σύνδεσης με τα HLA κλάσης II του ασθενούς. Στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται τα HLA των 8 ασθενών που παρουσίασαν αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον μια δεξαμενή πεπτιδίων.

Πίνακας 11. Κατανομή των HLA ασθενών με ΠΧΚ που παρουσίασαν αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον μια δεξαμενή πεπτιδίων.

| Pt# | HLA-A* (1) | HLA-A* (2) | HLA-B* (1) | HLA-B* (2) | HLA-DRB1* (1) | HLA-DRB1* (2) |
|-----|------------|------------|------------|------------|---------------|---------------|
| #02 | 2 | 3 | 18 | 35 | 4 | 16 |
| #05 | 2 | 24 | 18 | 39 | 4 | 12 |
| #06 | 2 | x | 18 | 51 | 1 | 16 |
| #10 | 3 | 30 | 8 | 39 | 3 | 7 |
| #13 | 2 | x | 18 | 55 | 14 | 16 |
| #14 | 2 | 24 | 51 | 57 | 3 | 11 |
| #15 | 2 | 68 | 51 | X | 11 | 11 |
| #21 | 1 | x | 27 | 47 | 1 | 13 |

Στην Παράγραφο 3.2.1 του Ειδικού Μέρους παρουσιάσαμε τα πεπτίδια που μπορούσαν να συνδεθούν με τα HLA II μόρια των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, όπως προβλέφθηκε από τις βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιήσαμε.

Κατά αυτό τον τρόπο θα μπορούσαμε να διασταυρώσουμε τα δεδομένα μας, που αφορούν στα HLA κλάσης II αλληλία των ασθενών, που έδειξαν αντιδραστικότητα σε κάποιες δεξαμενές πεπτιδίων και ειδικά στα πεπτίδια που περιέχονται σε αυτές με τις πληροφορίες, που προέρχονται από τις βάσεις δεδομένων, που προβλέπουν τα πεπτίδια που θα μπορούσαν να παρουσιαστούν από τα HLA μόρια των ασθενών μας.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 12. Σε 7 από τους 8 ασθενείς υπήρχε τουλάχιστον ένα πεπτίδιο από τη δεξαμενή που αντιδρούσε, που επικαλυπτόταν με κάποια από τις αλληλουχίες που σύμφωνα με τα προγράμματα πρόγνωσης των επιτόπων θα συνδεόταν επαρκώς με τα HLA κλάσης II μόρια του ασθενούς.

παρουσίασε αντιδραστικότητα όταν τα PBMCs του διεγείρονταν με τη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-5. Το πεπτίδια#25 που περιέχεται στη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-5 περιλαμβάνει αλληλουχίες που με βάση το πρόγραμμα πρόγνωσης επιτόπων RankPeP μπορούν να συνδεθούν επαρκώς με το DR11 (Πίνακας 12 ΣΤ). Ο ασθενής#14 που ήταν DR3+ και DR11+ παρουσιάστηκε αντιδραστικότητα όταν τα PBMCs του διεγείρονταν με τη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-5. Το πεπτίδια#25 που περιλαμβάνεται στη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-5 περιέχει αλληλουχίες που με βάση το πρόγραμμα πρόγνωσης επιτόπων RankPeP μπορεί να συνδεθεί επαρκώς με το DR11 (Πίνακας 12 Ζ). Ο ασθενής#13 που ήταν DR14+ και DR16+ παρουσιάστηκε αντιδραστικότητα όταν τα PBMCs του διεγείρονταν με τις δεξαμενές πεπτιδίων Pool-2, 3 και 4. Ενώ με βάση το πρόγραμμα πρόγνωσης επιτόπων για τα HLA-II δε θα περίμενε κανείς να παρουσιαστεί αντιδραστικότητα σε αυτό τον ασθενή εντούτοις παρουσιάστηκε αντιδραστικότητα σε 3 διαφορετικές δεξαμενές πεπτιδίων (Πίνακας 12 Η).

3.6 Προσδιορισμός αντιδραστικότητας των T λεμφοκυττάρων σε αλληλεπικαλυπτόμενα πεπτίδια της PDC-E2.

3.6.1 Μελέτη της ενδοκυττάριας παραγωγής IFN- γ από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα με κυτταρομετρία ροής

Σε 22 ασθενείς με ΠΧΚ και στους 4 υγιείς μάρτυρες εκτιμήθηκε η παραγωγή IFN- γ από τα CD4+ λεμφοκύτταρα με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Τα κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών που αποτελούν υποσύνολο των ασθενών που περιγράφονται στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται στον Πίνακα 13. Τα ποσοστά των CD4+IFN- γ + λεμφοκυττάρων επί του συνόλου των λεμφοκυττάρων στους ασθενείς και στους μάρτυρες ανάλογα με τη συνθήκη καλλιέργειας παρουσιάζονται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 13. Κύρια κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών των οποίων τα PBMCs καλλιιεργήθηκαν παρουσία πεπτιδίων που κάλυπταν ολόκληρη την PDC-E2

| | | Μέση Τιμή ± Σταθερή Απόκλιση | Διάμεση Τιμή (Εύρος) |
|---------------------------------|---------|------------------------------|----------------------|
| Ηλικία (έτη) | | 57.00 ± 10.77 | 57.00 (39-77) |
| Άνδρες/Γυναίκες | 1/21 | | |
| Κιρρωτικοί/Μη Κιρρωτικοί | 4/18 | | |
| Ηλικία έναρξης νόσου (έτη) | | 50.60 ± 12.09 | 47.50 (38-77) |
| Ηλικία διάγνωσης (έτη) | | 53.05 ± 11.86 | 51.50 (39-77) |
| Διάρκεια νόσου (μήνες) | | 76.50 ± 83.46 | 55.00 (1-261) |
| Χολερυθρίνη (<1.1 mg/dL) | | 0.70 ± 0.37 | 0.61 (0.32-2.1) |
| Αλβουμίνη (3.5-5.2 g/dL) | | 4.15 ± 0.61 | 4.10 (2.5-5.1) |
| Ολικές Πρωτεΐνες (6.4-8.3 g/dL) | | 7.55 ± 0.62 | 7.50 (6-8.7) |
| Χρόνος προθρομβίνης (sec.) | | 12.29 ± 1.34 | 12.45 (10.2-15.4) |
| INR | | 1.04 ± 0.18 | 1.02 (0.78-1.53) |
| AST (10-40 IU/L) | | 37.10 ± 33.28 | 26.00 (15-147) |
| ALT (10-40 IU/L) | | 38.52 ± 33.93 | 31.00 (11-170) |
| ALP (35-104 IU/L) | | 144.52 ± 100.33 | 103.00 (57-445) |
| γGT (9-40 IU/L) | | 75.62 ± 81.63 | 43.00 (8-327) |
| Ολική χοληστερόλη (mg/dL) | | 195.57 ± 50.87 | 188.00 (104-319) |
| HDL χοληστερόλη (mg/dL) | | 50.69 ± 20.34 | 41.40 (31-120) |
| LDL χοληστερόλη (mg/dL) | | 129.45 ± 35.45 | 124.00 (79-207) |
| Τριγλυκερίδια (40-160 mg/dL) | | 106.71 ± 38.09 | 114.00 (41-172) |
| IgG (847-1690 mg/dL) | | 1612.19 ± 643 | 1360.00 (910-3530) |
| IgM (64-249 mg/dL) | | 387.29 ± 370.88 | 320.00 (102-1725) |
| IgA (99-300 mg/dL) | | 259.62 ± 126.83 | 236.00 (126-672) |
| Ιστολογικό στάδιο 1/2/3/4 | 4/9/4/5 | | |

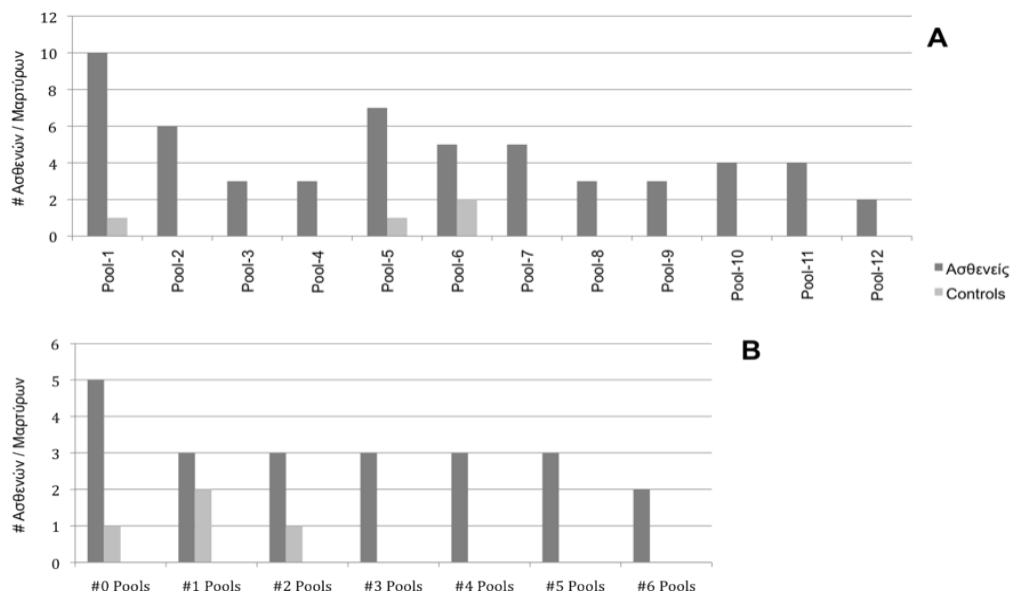
Πίνακας 14. Συχνότητα (%) των CD4+IFN-γ+ θετικών λεμφοκυττάρων στο σύνολο των λεμφοκυττάρων που καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία (NoAg) κάποιας δεξαμενής πεπτιδίων.

| | No Ag | Pool-1 | Pool-2 | Pool-3 | Pool-4 | Pool-5 | Pool-6 | Pool-7 | Pool-8 | Pool-9 | Pool-10 | Pool-11 | Pool-12 |
|----------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| Ασθ#01 | 2.65 | 4.5 | 1.36 | 2.28 | 5.01 | 5.09 | 1.89 | 2.33 | 3.4 | 0.89 | 2.83 | 1.96 | 1.77 |
| Ασθ#02 | 1.37 | 2.02 | 0.72 | 1.22 | 0.95 | 3.18 | 0.63 | 1.38 | 0.84 | 1.02 | 1.87 | 1.1 | 0.92 |
| Ασθ#03 | 3.10 | 1.81 | 1.78 | 1.69 | 1.26 | 4.89 | 0.62 | 1.24 | 1.84 | 1.66 | 28.3 | 23.4 | 29.6 |
| Ασθ#04 | 3.17 | 3.53 | 4.64 | 2.8 | 3.53 | 3.5 | 5.47 | 2.2 | 2.01 | 2.52 | 1.12 | 1.6 | 3.26 |
| Ασθ#05 | 4.26 | 3.93 | 3.06 | 4.72 | 3.67 | 3.31 | 4.65 | 4.29 | 3.39 | 4.84 | 3.26 | 2.84 | 3.86 |
| Ασθ#06 | 5.4 | 8.64 | 8.23 | 1.51 | 5.05 | 5.11 | 5.23 | 6.18 | 6.39 | 1.07 | 0.75 | 1.66 | 3.39 |
| Ασθ#07 | 3.05 | 7.42 | 3.03 | 4.87 | 3.42 | 4.21 | 2.88 | 2.14 | 2.96 | 3.94 | 3.35 | 3.2 | 2.93 |
| Ασθ#08 | 10.3 | 15.2 | 19.6 | 13 | 9.25 | 9.6 | 19.5 | 15.5 | 0.73 | 12.6 | 17.6 | 16 | 12.6 |
| Ασθ#09 | 8.8 | 5.49 | 7.68 | 12.5 | 4.4 | 3.43 | 5.84 | 5.09 | 10.2 | 9.84 | 4.76 | 3.22 | 9.66 |
| Ασθ#10 | 3.87 | 9.41 | 33.9 | 11.8 | 0.68 | 1.48 | 4.07 | 2.81 | 1.3 | 3.24 | 5.55 | 12.5 | 7.96 |
| Ασθ#11 | 5.2 | 4.66 | 6.19 | 3.19 | 1.78 | 7.51 | 3.97 | 4.33 | 2.38 | 3.55 | 2.74 | 2.23 | 3.13 |
| Ασθ#12 | 1.53 | 2.19 | 4.16 | 5.82 | 2.94 | 8.73 | 4.76 | 2.14 | 1.41 | 1.91 | 3.96 | 1.67 | 3.21 |
| Ασθ#13 | 8.08 | 2.32 | 3.29 | 2.82 | 2.68 | 1.89 | 1.94 | 2.79 | 2.77 | 3.19 | 3.19 | 2.71 | 4.13 |
| Ασθ#14 | 4.42 | 2.37 | 2.16 | 3.5 | 2.73 | 2.79 | 4.6 | 1.89 | 1.45 | 2.76 | 1.62 | 4.63 | 5 |
| Ασθ#15 | 4.46 | 11.1 | 5.54 | 13.5 | 7.4 | 8.49 | 5.06 | 2.61 | 5.29 | 4.07 | 1.23 | 7.02 | 5.23 |
| Ασθ#16 | 2.91 | 1.42 | 0.94 | 0.96 | 2.5 | 3.34 | 1.48 | 1.16 | 1.08 | 1.13 | 1.43 | 1.53 | 5.15 |
| Ασθ#17 | 8.31 | 7.22 | 10.8 | 8.40 | 8.05 | 10.10 | 9.87 | 7.47 | 6.26 | 6.07 | 7.95 | 6.68 | 4.18 |
| Ασθ#18 | 7.31 | 5.65 | 4.52 | 3.98 | 4.84 | 5.75 | 11.7 | 7.39 | 5.95 | 15.4 | 6.61 | 9.62 | 5.11 |
| Ασθ#19 | 1.63 | 2.02 | 11.8 | 0.82 | 2.17 | 1.19 | 3.06 | 3.09 | 1.38 | 0.51 | 0.22 | 0.49 | 0.34 |
| Ασθ#20 | 1.13 | 3.27 | 1.35 | 2.4 | 1.3 | 2.38 | 3.4 | 2.94 | 1.86 | 0.076 | 3.66 | 1.72 | 0.83 |
| Ασθ#21 | 0.54 | 0.1 | 0.019 | 0.17 | 0.057 | 0.15 | 0.73 | 3.81 | 0.06 | 0.38 | 0.54 | 0.052 | 0.049 |
| Ασθ#22 | 5.93 | 9.79 | 4.43 | 1.26 | 5.1 | 2.68 | 5.13 | 10.2 | 7.24 | 13.1 | 43 | 8.71 | 10.2 |
| Contr#01 | 6.78 | 6.74 | 6.48 | 7.7 | 7.02 | 5.8 | 7.21 | 6.1 | 5.5 | 5.7 | 7.19 | 5.7 | 6.17 |
| Contr#02 | 1.94 | 0.36 | 0.19 | 0.17 | 0.36 | 0.33 | 0.13 | 0.028 | 0.18 | 0.16 | 0.035 | 0.03 | 0.18 |
| Contr#03 | 7.65 | 4.13 | 3.04 | 12.7 | 4.99 | 21.3 | 14 | 3.73 | 5.61 | 8.62 | 4.46 | 7.07 | 4 |
| Contr#04 | 11.14 | 51.3 | 5.74 | 3.47 | 4.29 | 4.64 | 3.45 | 5.07 | 7.68 | 11.2 | 15.3 | 4.62 | 4.93 |

Με γκριζό χρώμα παρουσιάζονται τα ποσοστά των CD4+IFN-γ+ λεμφοκυττάρων τόσο σε ασθενείς (Ασθ.) όσο και σε υγιείς μάρτυρες (Contr), που ήταν μεγαλύτερα όταν τα λεμφοκύτταρα καλλιεργήθηκαν με κάποια δεξαμενή πεπτιδίων (Pool) σε σχέση με αυτά που καλλιεργήθηκαν μόνο παρουσία καλλιεργητικού υλικού, χωρίς όμως η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται οι περιπτώσεις εκείνες όπου η παραγωγή IFN-γ από τα CD4+ λεμφοκύτταρα ήταν στατιστικά σημαντική όταν τα PBMCs καλλιεργούνταν παρουσία πεπτιδίων συγκριτικά με την παραγωγή IFN-γ παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε κάποιες περιπτώσεις η εκατοστιαία αναλογία των CD4+IFN-γ+ λεμφοκυττάρων ήταν μικρότερη όταν τα PBMCs καλλιεργούνταν παρουσία των πεπτιδίων σε σχέση με το αν καλλιεργούνταν παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού αλλά τα λεμφοκύτταρα σε αυτές τις περιπτώσεις παράγαγαν αρκετά σημαντική ποσότητα IFN-γ καθιστώντας την παραγωγή IFN-γ στατιστικά σημαντική.

Σε 17 από τους 22 (77.27%) ασθενείς με ΠΧΚ παρατηρήθηκε αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον μια από τις δεξαμενές πεπτιδίων. Οι 3 από τους 22 ασθενείς αντέδρασαν σε μόνο μια δεξαμενή πεπτιδίων ενώ οι υπόλοιποι αντέδρασαν σε 2 έως 6 δεξαμενές πεπτιδίων. Αναλυτικά ο αριθμός των ασθενών και των υγιών μαρτύρων, που εμφάνισε αντιδραστικότητα στις δεξαμενές πεπτιδίων καθώς και ο αριθμός των δεξαμενών, στις

οποίες παρουσίασαν αντιδραστικότητα οι ασθενείς παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 25 (A και B αντίστοιχα).



Διάγραμμα 25. Αριθμός ασθενών με ΠΧΚ και υγιών μαρτύρων που παρουσίασαν αντιδραστικότητα στις 12 δεξαμενές πεπτιδίων, που σχεδιάσθηκαν. Στο διάγραμμα A παρουσιάζεται ο αριθμός των ασθενών και των υγιών μαρτύρων που παρουσίασαν αντιδραστικότητα ανά δεξαμενή. Συνοπτικά, 17 στους 22 ασθενείς αντέδρασαν σε τουλάχιστον μια δεξαμενή πεπτιδίων. Αναλυτικά, 10 εμφάνισαν αντιδραστικότητα στη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-1, 6 στην Pool-2, 3 στην Pool-3, 3 στην Pool-4, 7 στην Pool-5, 5 στην Pool-6, 5 στην Pool-7, 3 στην Pool-8, 3 στην Pool-9, 4 στην Pool-10, 4 στην Pool-11 και 2 στην Pool-12. Αντίστοιχα 3 στους 4 υγιείς μάρτυρες αντέδρασαν σε τουλάχιστον 1 Pool πεπτιδίων. Αντιδραστικότητα στην Pool-1 ανιχνεύθηκε σε 1 υγιή μάρτυρα, στην Pool-5 σε 1, ενώ ένας υγιής μάρτυρας εμφάνισε αντιδραστικότητα τόσο στην Pool-5 όσο και με την Pool-6. Στο διάγραμμα B παρουσιάζεται η κατανομή των 17 ασθενών που εμφάνισαν σημαντική αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον μια δεξαμενή πεπτιδίων, ανάλογα με τον αριθμό των δεξαμενών πεπτιδίων, στις οποίες είχαν αντιδραστικότητα. Αναλυτικά, φαίνεται ότι 3 έδειξαν αντιδραστικότητα σε 1 δεξαμενή, 3 σε 2, 3 σε 3, 3 σε 4, 3 σε 5 ενώ 2 ασθενείς παρουσίασαν αντιδραστικότητα σε 6 διαφορετικές δεξαμενές πεπτιδίων.

3.6.2 Μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

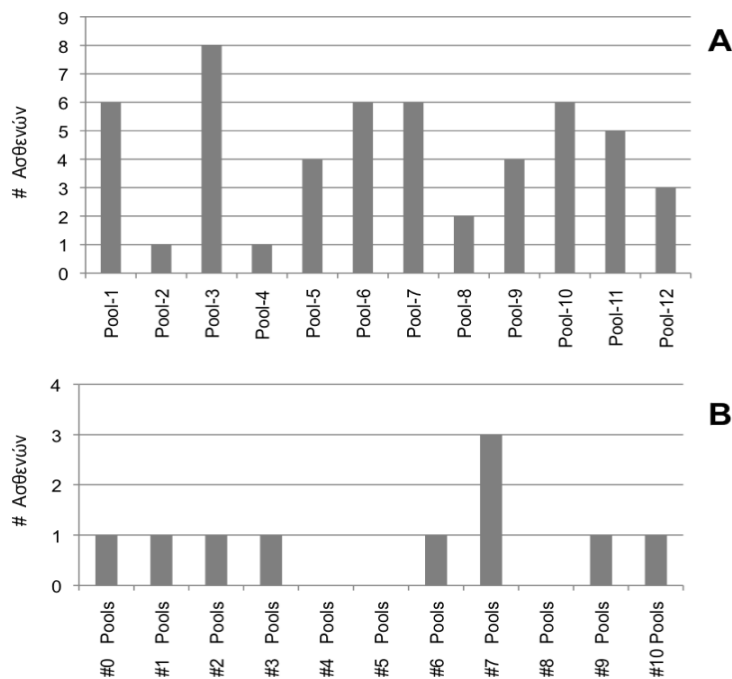
Τα CD4+ T λεμφοκύτταρα αφού επιλέχθηκαν με μαγνητικό διαχωρισμό σημάνθηκαν με τη χρωστική CFSE έτσι ώστε τα CFSE+ κύτταρα να είναι CD4+ λεμφοκύτταρα. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατόν να ανιχνευθούν υποπληθυσμοί κυττάρων και συγκεκριμένα: κύτταρα στα οποία δεν παρατηρείται κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ενώ δεν εκκρίνουν ούτε IFN- γ , κύτταρα που παράγουν μικρή ποσότητα IFN- γ χωρίς τον απαραίτητο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κύτταρα που πολλαπλασιάζονται χωρίς έκκριση IFN- γ και κύτταρα που πολλαπλασιάζονται με παραγωγή IFN- γ . Τέτοια παραδείγματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 7. Τα αποτελέσματα του πολλαπλασιασμού των CD4+ T λεμφοκυττάρων παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των CD4+ T λεμφοκυττάρων απουσία αντιγόνου (NoAg) και παρουσία των 12 δεξαμενών πεπτιδίων (Pools 1 έως 12) σε 10 ασθενείς με ΠΧΚ και 1 υγιή μάρτυρα.

| | | NoAg | Pool 1 | Pool 2 | Pool 3 | Pool 4 | Pool 5 | Pool 6 | Pool 7 | Pool 8 | Pool 9 | Pool 10 | Pool 11 | Pool 12 |
|---------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| Ασθ#02 | CFSE+ | 99.51 | 99.14 | 99.5 | 98.7 | 99.5 | 99.1 | 99.3 | 99.4 | 99.34 | 98.48 | 97.7 | 99.44 | 99.1 |
| Ασθ#02 | CFSE- | 0.49 | 0.86 | 0.50 | 1.30 | 0.5 | 0.9 | 0.7 | 0.6 | 0.66 | 1.52 | 2.3 | 0.57 | 0.9 |
| Ασθ#05 | CFSE+ | 98.9 | 81.9 | 99.55 | 92.12 | 99.2 | 98.51 | 95.53 | 94.2 | 98.87 | 99.24 | 97.34 | 90 | 97.22 |
| Ασθ#05 | CFSE- | 1.1 | 18.1 | 0.45 | 7.88 | 0.8 | 1.49 | 4.47 | 5.8 | 1.13 | 0.76 | 2.66 | 10 | 2.78 |
| Ασθ#07 | CFSE+ | 96.3 | 93.8 | 96.45 | 89.1 | 95.44 | 93.24 | 95.9 | 95.84 | 95.54 | 95.05 | 92.9 | 95.75 | 94.82 |
| Ασθ#07 | CFSE- | 3.7 | 6.2 | 3.55 | 10.9 | 4.56 | 6.76 | 4.1 | 4.16 | 4.46 | 4.95 | 7.1 | 4.25 | 5.18 |
| Ασθ#08 | CFSE+ | 99.03 | 99.05 | 99.08 | 99.2 | 99.05 | 99.1 | 99.5 | 99.6 | 99.22 | 99.44 | 99.4 | 99.24 | 99.07 |
| Ασθ#08 | CFSE- | 0.97 | 0.95 | 0.92 | 0.8 | 0.95 | 0.9 | 0.5 | 0.4 | 0.78 | 0.56 | 0.6 | 0.76 | 1.03 |
| Ασθ#12 | CFSE+ | 97.41 | 91.41 | 99.25 | 69.4 | 98 | 70.6 | 87.7 | 90.89 | 99.6 | 98.63 | 71.4 | 95.51 | 99.41 |
| Ασθ#12 | CFSE- | 2.59 | 8.59 | 0.75 | 30.6 | 2 | 29.4 | 12.3 | 9.11 | 0.4 | 1.37 | 28.6 | 4.49 | 0.59 |
| Ασθ#14 | CFSE+ | 99.71 | 99.81 | 99.4 | 99.21 | 99.6 | 99.32 | 99.43 | 99.8 | 99.6 | 99.6 | 99.44 | 99.9 | 98.4 |
| Ασθ#14 | CFSE- | 0.29 | 0.19 | 0.6 | 0.79 | 0.4 | 0.68 | 0.57 | 0.2 | 0.4 | 0.4 | 0.56 | 0.1 | 1.54 |
| Ασθ#17 | CFSE+ | 94.1 | 88.4 | 88.6 | 77.5 | 94.3 | 90.5 | 82 | 86.8 | 93 | 89.8 | 92.45 | 90.9 | 94.4 |
| Ασθ#17 | CFSE- | 5.9 | 11.6 | 11.4 | 22.5 | 5.7 | 9.5 | 18 | 13.2 | 7 | 10.2 | 7.55 | 9.1 | 5.6 |
| Ασθ#18 | CFSE+ | 99.5 | 93.3 | 98.2 | 86.9 | 95.41 | 77.9 | 93.6 | 85.3 | 99.45 | 87.7 | 79.3 | 91.6 | 92 |
| Ασθ#18 | CFSE- | 0.5 | 6.7 | 1.8 | 13.1 | 4.59 | 22.1 | 6.4 | 14.7 | 0.55 | 12.3 | 20.7 | 8.4 | 8 |
| Ασθ#19 | CFSE+ | 99.6 | 94.5 | 99.9 | 96.8 | 99.6 | 92.15 | 76.3 | 85.3 | 95.3 | 99.2 | 99.2 | 97.53 | 99.3 |
| Ασθ#19 | CFSE- | 0.4 | 5.5 | 0.1 | 3.2 | 0.4 | 7.85 | 23.7 | 14.7 | 4.7 | 0.8 | 0.8 | 2.47 | 0.7 |
| Ασθ#20 | CFSE+ | 98.5 | 65.1 | 97.85 | 94.7 | 98.5 | 72.7 | 75.8 | 52.4 | 90.6 | 93.3 | 62.6 | 91.42 | 98.7 |
| Ασθ#20 | CFSE- | 1.5 | 34.9 | 2.15 | 5.3 | 1.5 | 27.3 | 24.2 | 47.6 | 9.4 | 6.7 | 37.4 | 8.58 | 1.3 |
| Cont#03 | CFSE+ | 99.1 | 98.6 | 98.6 | 94.8 | 98.7 | 98.7 | 97.7 | 98.3 | 99 | 96.7 | 95.9 | 98.41 | 98.34 |
| Cont#03 | CFSE- | 0.9 | 1.4 | 1.4 | 5.2 | 1.3 | 1.34 | 2.26 | 1.7 | 1 | 3.3 | 4.1 | 1.59 | 1.66 |

Σε κάθε περίπτωση παρουσιάζεται το ποσοστό των CD4+ T λεμφοκυττάρων που δεν πολλαπλασιάστηκαν (CFSE+) και το ποσοστό των CD4+ T λεμφοκυττάρων που πολλαπλασιάστηκαν (CFSE-). Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται οι περιπτώσεις εκείνες που ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός παρουσία κάποιας δεξαμενής πεπτιδίου ήταν στατιστικά σημαντικός.

Από τους 10 ασθενείς με ΠΧΚ οι 9 (90%) έδειξαν να έχουν στατιστικά σημαντικό ποσοστό CD4+ T λεμφοκυττάρων που πολλαπλασιάζονταν παρουσία τουλάχιστον μιας δεξαμενής πεπτιδίων σε σχέση με το πολλαπλασιασμό που παρατηρούταν όταν τα κύτταρα καλλιεργούνταν απουσία αντιγόνου. Η αντιδραστικότητα στη δεξαμενή πεπτιδίων Pool-3 ήταν σε ποσοστό 80% (8/10) ενώ ακολουθούσαν οι δεξαμενές πεπτιδίων 1, 6, 7 και 10 με ποσοστό 60% (6/10). Η ετερογένεια της αντιδραστικότητας καταδεικνύεται και από το γεγονός ότι οι ασθενείς παρουσίασαν CD4 κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε διαφορετικό αριθμό δεξαμενών πεπτιδίων. Ένας ασθενής δεν παρουσίασε αντιδραστικότητα σε κάποια δεξαμενή πεπτιδίων ενώ υπήρχε ασθενής που παρουσίασε αντιδραστικότητα σε 10 διαφορετικές δεξαμενές. Αναλυτικά, πόσοι ασθενείς παρουσίασαν CD4 κυτταρικό πολλαπλασιασμό παρουσία της κάθε δεξαμενής πεπτιδίων και σε πόσες διαφορετικές δεξαμενές αντέδρασε ο κάθε ασθενής παρουσιάζεται γραφικά στο Διάγραμμα 26.



Διάγραμμα 26 A. Στο διάγραμμα A παρουσιάζεται ο αριθμός των ασθενών που παρουσίασαν στατιστικά σημαντικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό των CD4+ T λεμφοκυττάρων σε κάθε έκαστη δεξαμενή (Pool). Παρουσία της δεξαμενής πεπτιδίων Pool-3 στο καλλιεργητικό υλικό, 8 ασθενείς παρουσίασαν στατιστικά σημαντικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό των CD4+ T λεμφοκυττάρων. **B.** Στο διάγραμμα B παρουσιάζεται η ετερογένεια στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό που έδειξαν οι 10 ασθενείς που μελετήθηκαν. Ένας ασθενής δεν παρουσίασε αντιδραστικότητα σε κάποια δεξαμενή ενώ υπήρχε ασθενής που παρουσίασε αντιδραστικότητα σε 10 διαφορετικές δεξαμενές πεπτιδίων.

Οι 10 αυτοί ασθενείς όταν μελετήθηκαν στις ίδιες συνθήκες (πρακτικά στο ίδιο πείραμα) κατά πόσο τα CD4+ T λεμφοκύτταρά τους παράγααν στατιστικά σημαντική ποσότητα IFN- γ το ποσοστό αυτό ήταν 70% (7 στους 10 δηλαδή ασθενείς αντέδρασαν σε τουλάχιστον μια δεξαμενή πεπτιδίων). Μια σύντηξη από τους πίνακες 14 και 15, με ποιοτική περιγραφή της αντιδραστικότητας, είναι ο Πίνακας 16, στον οποίο παρουσιάζεται στην παρουσία ποιών δεξαμενών πεπτιδίων οι 10 αυτοί ασθενείς παρουσίασαν θετικό αποτέλεσμα όταν η αντιδραστικότητα υπολογιζόταν ως παραγωγή IFN- γ ή κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Είναι άξιο παρατήρησης το γεγονός ότι με τη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των CD4+ T λεμφοκυττάρων περισσότερες δεξαμενές πεπτιδίων αναγνωρίζεται ότι διεγείρουν τα CD4+ λεμφοκύτταρα (εξαίρεση αποτελεί ο ασθενής #8). Οι 10 ασθενείς που μελετήθηκαν παρουσίασαν αντιδραστικότητα σε 52 δεξαμενές πεπτιδίων συνολικά (μέσος όρος 5.2) όταν η αντιδραστικότητα υπολογιζόταν ως κυτταρικός πολλαπλασιασμός των CD4+ T

λεμφοκυττάρων, ενώ όταν η αντιδραστικότητα υπολογιζόταν ως παραγωγή IFN-γ, φάνηκε αντιδραστικότητα σε συνολικά 20 δεξαμενές πεπτιδίων (μέσος όρος 2). Στις 52 περιπτώσεις που φάνηκε πολλαπλασιασμός των CD4+ T λεμφοκυττάρων, σε μόνο 10 περιπτώσεις υπήρχε και ταυτόχρονη σημαντική παραγωγή IFN-γ.

Πίνακας 16. Αντιδραστικότητα των PBMCs των ασθενών μετά από καλλιέργεια μιας εβδομάδας, παρουσία των δεξαμενών πεπτιδίων, όταν η αντιδραστικότητα υπολογιζόταν ως κυτταρικός πολλαπλασιασμός των CD4+ T λεμφοκυττάρων (A) ή ως παραγωγή IFN-γ από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα (B).

| | Pool-1 | Pool-2 | Pool-3 | Pool-4 | Pool-5 | Pool-6 | Pool-7 | Pool-8 | Pool-9 | Pool-10 | Pool-11 | Pool-12 |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| Ασθ#02 A | + | | | | | | | | + | + | | |
| Ασθ#02 B | | | | | | | | | | | | |
| Ασθ#05 A | + | | + | | | + | + | | | + | + | + |
| Ασθ#05 B | + | | + | + | | | | + | + | | | |
| Ασθ#07 A | | | + | | | | | | | + | | |
| Ασθ#07 B | + | | | | | | | | | | | |
| Ασθ#08 A | | | | | | | | | | | | |
| Ασθ#08 B | + | + | | | | + | + | | | + | + | |
| Ασθ#12 A | + | | + | | + | + | | | | + | | |
| Ασθ#12 B | | | | | + | + | | | | | | |
| Ασθ#14 A | | | | | | | | | | | | + |
| Ασθ#14 B | | | | | | | | | | | | |
| Ασθ#17 A | + | + | + | | | + | + | | + | | + | |
| Ασθ#17 B | | + | + | | + | + | | | | | | |
| Ασθ#18 A | + | | + | + | + | + | + | | + | + | + | + |
| Ασθ#18 B | | | | | | | | | | | | |
| Ασθ#19 A | + | | + | | + | + | + | + | | | + | |
| Ασθ#19 B | | + | | | | | | + | | | | |
| Ασθ#20 A | + | | + | | + | + | + | + | + | + | + | |
| Ασθ#20 B | + | | | | | + | | | + | + | | |

Σε κόκκινο φόντο παρουσιάζονται οι περιπτώσεις εκείνες που η αντιδραστικότητα σε μια δεξαμενή πεπτιδίων επιβεβαιώθηκε τόσο με τη μελέτη της παραγωγής IFN-γ από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα όσο και από τη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των CD4+ T λεμφοκυττάρων (CD4+ Th-1 T λεμφοκύτταρα).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Χαρακτηρισμός AMA

Ο καθορισμός των επιτόπων της PDC-E2 τόσο σε χυμικό όσο και σε κυτταρικό επίπεδο είχε σαν προϋπόθεση ότι κάθε ασθενής που θα ήταν στην ομάδα μελέτης θα παρουσίαζε τεκμηριωμένη ανοσολογική απόκριση κατά της πρωτεΐνης. Ο πλέον εύκολος τρόπος για να απαντηθεί κατά πόσο υπήρχε αυτή η ανοσολογική απόκριση ήταν να χαρακτηριστεί η χυμική απόκριση αν και δεδομένα τεκμηριώνουν ότι δυνατόν να υπάρχει κυτταρική ανοσολογική απάντηση κατά της PDC-E2 απουσία των AMA και των αντι-PDC-E2 αντισωμάτων ειδικότερα [25]. Σε πρώτη φάση έπρεπε να διαχωρισθούν οι ασθενείς σε AMA θετικούς και AMA αρνητικούς και ακολούθως να αναζητηθεί η πιθανή αντιδραστικότητα κατά της PDC-E2. Ο ΕΑΦ και η ELISA με την υβριδική πρωτεΐνη MIT-3 δεν μπορούσε να δώσει απάντηση αν τα θετικά αποτελέσματα οφείλονταν στην παρουσία αντι-PDC-E2 αντισωμάτων ή αντισωμάτων έναντι των άλλων μιτοχονδρικών αντιγόνων. Από την άλλη, αν προχωρούσαμε μόνο σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας το έσω λιποϋλικό τμήμα της PDC-E2 τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων δε θα μπορούσαν να διαχωρίσουν τους ασθενείς σε AMA θετικούς και AMA αρνητικούς καθώς ένα αρνητικό αποτέλεσμα δε θα μπορούσε να αποκλείσει την ύπαρξη των AMA. Έτσι, ο αλγόριθμος χαρακτηρισμού των AMA που ακολουθήσαμε είχε το χαρακτήρα της ολοένα και πιο αποσαφηνισμένης απάντησης κατά πόσο ήταν παρόντα τα αντι-PDC-E2 αντισώματα (Εικόνα 1).

Στα πειράματα για το χαρακτηρισμό των AMA με πειράματα ΕΑΦ θετικά ελέγχθηκαν 86.2% σε υπόστρωμα HEp-2 ενώ αυτό το ποσοστό σε υπόστρωμα ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου ήταν 83.9%. Θετικοί για την παρουσία AMA σε πειράματα ΕΑΦ σε τουλάχιστον ένα υπόστρωμα ήταν το 90,1% των ασθενών με ΠΧΚ. Με την μέθοδο της ELISA με την υβριδική πρωτεΐνη MIT-3 τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν για τα μεν IgG 89.6% τα δε IgA 79.3% (69 ασθενείς) ενώ το ποσοστό αυτό όταν μια από τις δύο αυτές κλάσεις ή και οι δύο ήταν θετικές ήταν 93.1% (81 ασθενείς). Ογδόντα έξι ασθενείς (98.85%) ελέγχθηκαν θετικοί για την παρουσία AMA με τουλάχιστον μια από τις 4 μεθόδους. Φαίνεται ότι ο συνδιασμός ELISA και ΕΑΦ είναι η πιο αποτελεσματική προσέγγιση για την ανίχνευση των AMA. Αν εφαρμόζαμε μόνο τη μέθοδο του ΕΑΦ τότε 7 επιπλέον ασθενείς θα ελέγχονταν αρνητικοί για την παρουσία AMA. Αν εφαρμόζαμε μόνο τη μέθοδο της ELISA με υπόστρωμα την υβριδική πρωτεΐνη τότε 5 επιπλέον

ασθενείς θα ελέγχονταν αρνητικοί για την παρουσία AMA. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τη σημασία που έχει η αξιολόγηση της ύπαρξης των AMA με πολλαπλές μεθόδους από εξειδικευμένα κέντρα [11, 13, 29].

Ενώ στη διεθνή βιβλιογραφία περιγράφεται η ύπαρξη των αντι-PDC-E2 σε ποσοστό μέχρι και 95% [44] ανάμεσα στους ασθενείς με ΠΧΚ στην παρούσα μελέτη το ποσοστό αυτό ήταν 65.5% σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης. Αυτά τα δεδομένα μπορεί να είναι ενδεικτικά μιας διαφορετικής ανοσολογικής απάντησης ανάμεσα στους Έλληνες ασθενείς με ΠΧΚ ή να οφείλονται στις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην εφαρμογή του πρωτοκόλλου με σκοπό να αυξηθεί η ειδικότητα. Τα ποσοστά αυτά μπορούν να ερμηνευτούν και από το γεγονός ότι για τα πειράματα της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιήθηκε μόνο το ανοσοεπικρατούν τμήμα της πρωτεΐνης και όχι ολόκληρη η πρωτεΐνη PDC-E2. Σε παλαιότερες μελέτες που έγιναν, το ποσοστό αντιδραστικότητας έναντι αντίστοιχου τμήματος της PDC-E2 ήταν 81.7% [13] και 88.5% [22], ποσοστά σαφώς μεγαλύτερα από τη συχνότητα που παρατηρήθηκε σε αυτή τη μελέτη. Έτσι, επάγεται το συμπέρασμα ότι το μέγεθος τη πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ΕΑΦ από μόνο του δεν μπορεί να ευθύνεται για το χαμηλότερο ποσοστό αντιδραστικότητας που βρέθηκε.

Στα πειράματα που διενεργήθηκαν στην παρούσα μελέτη η χυμική απόκριση έναντι στην PDC-E2 καθορίστηκε με τη χρήση τμήματος μόνο της PDC-E2 ενώ στα πειράματα που ακολούθησαν για το χαρακτηρισμό των B και CD4+ λεμφοκυτταρικών επιτόπων χρησιμοποιήθηκαν πεπτίδια που καλύπτουν ολόκληρη την πρωτεΐνη. Ακολουθήθηκε αυτή η προσέγγιση μιας και η χρήση της συγκεκριμένης περιοχής της PDC-E2 φαίνεται να έχει υψηλή ειδικότητα για το χαρακτηρισμό την χυμικής ανοσολογικής απάντησης [13, 22]. Η ύπαρξη αντισωμάτων κατά της έσω λιποϋλικής περιοχής δεν αποκλείει και την ύπαρξη αντισωμάτων που αναγνωρίζουν επιτόπους σε άλλες περιοχές της πρωτεΐνης [24]. Έτσι στην ανάλυση των αποτελεσμάτων στα πειράματα που ακολούθησαν είχαμε κατά νου τη πιθανότητα ύπαρξης συστηματικού λάθους με βάση τον τρόπο που επιλέξαμε να χαρακτηρίσουμε την ανοσολογική απάντηση κατά της PDC-E2 και με αυτό τον τρόπο να καθορίσουμε τον πληθυσμό μελέτης.

Ενδιαφέρον επίσης αποτελεί το γεγονός ότι με την αύξηση του τίτλου των AMA στην M2-EP ELISA αυξάνεται και η ένταση της παρατηρούμενης μπάντας σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας το έσω λιποϋλικό τμήμα της PDC-E2. Υπάρχουν ορισμένοι ασθενείς που ενώ παρουσιάζουν υψηλή αντιδραστικότητα έναντι της υβριδικής πρωτεΐνης MIT-3 στην ELISA δεν παρουσιάζουν αντιδραστικότητα στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης με αντιγόνο το PDC-E2 τμήμα της υβριδικής πρωτεΐνης. Πειράματα ανοσοαποτύπωσης με τα αντιγόνα BCOADC-E2 και OGDC-E2 σε κάποιους

ασθενείς με υψηλούς τίτλους AMA κατά της υβριδικής πρωτεΐνης MIT-3 πιθανότατα να εξηγήσουν γιατί ενώ οι τίτλοι των αντισωμάτων στην M2EP ELISA είναι υψηλοί, δεν παρατηρείται αντιδραστικότητα κατά της PDC-E2.

4.2 Σχεδιασμός, δημιουργία και αποθήκευση πεπτιδίων

Η αναζήτηση επιτόπων των βοηθητικών και των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων σε μια πρωτεΐνη γνωστής αλληλουχίας με τη χρήση αλληλεπικαλυπτόμενων συνθετικών πεπτιδίων είναι ο πιο γρήγορος και ο πιο αποτελεσματικός τρόπος [45] και μπορεί να γίνει με διέγερση κλώνων, κυτταρικών σειρών ή απομονωμένων ex-vivo λεμφοκυττάρων.

Ο μεγάλος βαθμός ποικιλομορφίας των MHC μορίων είναι υπεύθυνος για την ετερογένεια που παρατηρείται στην επεξεργασία και την παρουσίαση των επιτόπων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας στα MHC μόρια και το πώς αυτά φέροντας τον επίτοπο συνδέονται με τους TCR των T λεμφοκυττάρων. Έτσι μια πρωτεΐνη μπορεί να έχει πολλές διαφορετικές πεπτιδικές αλληλουχίες που μπορούν να επεξεργαστούν και να παρουσιαστούν από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (ΑΠΚ) ανάλογα με την ποικιλία των MHC μορίων του κάθε ανθρώπου. Με την πληροφορία για το ποιές αλληλουχίες δυνατόν να επεξεργαστούν και να παρουσιαστούν ανάλογα με το αλληλόμορφο που μελετάται να αυξάνεται καθημερινά, είναι δυνατόν να προβλεφθούν εν μέρει ποιές αλληλουχίες δυνατόν να μπορούν να επεξεργαστούν και να παρουσιαστούν από πολλά MHC μόρια [18-20]. Παρ' όλα αυτά δεν είναι δυνατόν να γίνει ακριβής πρόβλεψη για το ποιά πεπτίδια θα επεξεργαστούν και θα παρουσιαστούν από μια πρωτεΐνη σε μια ανοσολογική απόκριση [46, 47]. Έτσι, ο σωστότερος τρόπος για να πάρουμε αυτή την πληροφορία είναι πειραματικά, με λειτουργικές δοκιμασίες υπό ελεγχόμενες συνθήκες όπως η διέγερση των T λεμφοκυττάρων με επιμολυσμένα ΑΠΚ [48] ή ΑΠΚ που θα παρουσιάζουν συγκεκριμένα πεπτίδια [47, 49] που θα αντιπροσωπεύουν αλληλουχίες της υπό εξέταση πρωτεΐνης [50-54]. Τα T λεμφοκύτταρα διεγείρονται από τα ΑΠΚ στην παρουσία δεξαμενών (pools) ή μεμονωμένων πεπτιδίων.

Το μέγεθος των πεπτιδίων που θα χρησιμοποιηθούν είναι επίσης καθοριστικής σημασίας για την έκβαση των αποτελεσμάτων. Η χαρτογράφηση των επιτόπων των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων έχει γίνει κατά περιόδους με τη χρήση αλληλουχιών 12μερών πεπτιδίων [55] έως και πολύ μεγάλων πεπτιδίων με πάνω από 100 αμινοξέα [56]. Η χρήση πολύ μικρών πεπτιδίων ενέχει το κίνδυνο της απώλειας ταυτοποίησης του/ων επιτόπου/ων μιας και τα κρίσιμα για το καθορισμό του επιτόπου αμινοξέα καλό είναι να βρίσκονται κεντρικά στην αλληλουχία παρά στα άκρα [57]. Η χρήση μεγάλων αλληλουχιών από την άλλη δεν εξασφαλίζει ότι πιθανή επεξεργασία στο φυσιολογικό για

τα βοηθητικά λεμφοκύτταρα μέγεθος του επιτόπου θα δημιουργήσει ικανή συγκέντρωση πεπτιδίου για να επάγει κυτταρική αντίδραση. Έτσι προτείνεται η χρήση αλληλουχιών μέγεθος 13-25 αμινοξέα που είναι και το καταλληλότερο μέγεθος πεπτιδίου για τη σύνδεση με τα κλάσης II MHC μόρια. Με αυτά τα δεδομένα τα πεπτίδια που σχεδιάστηκαν δεν ήταν μικρότερα των 13 αμινοξέων αλλά ούτε και μεγαλύτερα των 25 αμινοξέων. Επιπλέον, η δημιουργία 20μερών πεπτιδίων που επικαλύπτονται κατά 12 αμινοξέα είχε τα εξής πλεονεκτήματα: 1) Τα πεπτίδια είχαν το κατάλληλο μέγεθος για τη μελέτη τόσο της ειδικής CD4 κυτταρικής αντίδρασης όσο και της μελέτης της χυμικής αντιδραστικότητας 2) Η επικάλυψη των πεπτιδίων κατά 12 αμινοξέα έφερε το καρβόξυ-τελικό άκρο του κάθε πεπτιδίου να είναι το κεντρικό τμήμα του επόμενου πεπτιδίου, γεγονός που ευνοεί την σύνδεση του πιθανού επιτόπου με το MHC μόριο 3) Ο αριθμός των πεπτιδίων που δημιουργήθηκαν δεν ήταν υπερβολικά μεγάλος και ευνοούσε μια συστηματική μελέτη της κυτταρικής αντιδραστικότητας χωρίς την ανάγκη χρήσης μεγάλου αριθμού λεμφοκυττάρων.

4.3 Χαρακτηρισμός γραμμικών επιτόπων των αντι-PDC-E2 αυτοαντισωμάτων

Το έσω λιποϋλικό τμήμα της PDC-E2 και ειδικά το πεπτίδιο με αλληλουχία GDLLAEIETDKATI έχουν θεωρηθεί στο παρελθόν ως οι επικρατούντες επίτοποι των AMA παρόλο που δεν υπάρχει γενική αποδοχή [21, 58-63]. Σε κάποιες από αυτές τις μελέτες οι οροί των ασθενών με ΠΧΚ όταν επωάζονταν με το ανοσοκυρίαρχο πεπτίδιο υπήρχε εξάλειψη της αντι-M2 αντιδραστικότητας έστω και αν αυτό συνέβαινε σε μεγάλες αραιώσεις των ορών (1:80 000). Σε κάποιες άλλες μελέτες, όταν χρησιμοποιούνταν τμήματα της πρωτεΐνης που περιείχαν το ανοσοκυρίαρχο πεπτίδιο ως αντιγόνο οι οροί από του ασθενείς με ΠΧΚ έδιναν αντιδραστικότητα σε πειράματα ELISA. Στις ίδιες μελέτες, οι ίδιοι οροί δεν παρουσίαζαν σημαντική αντιδραστικότητα όταν το ανοσοκυρίαρχο πεπτίδιο χρησιμοποιούταν ως αντιγόνο σε πειράματα ELISA [64, 65]. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η αντιγονικότητα του πεπτιδίου μπορεί να βελτιωθεί όταν συνδεθεί με οβαλβουμίνη (ovalbumin) ή λιποϊκό οξύ στο κατάλοιπο της λυσίνης στη θέση 137 (K137) [64] αλλά και αυτό το δεδομένο παραμένει ακόμα υπό αμφισβήτηση. Με βάση τα πιο πάνω δεδομένα ορισμένοι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι ο επίτοπος στο έσω λιποϋλικό τμήμα μάλλον είναι στερεοτακτικός και όχι γραμμικός [22, 62].

Σε αυτό το στάδιο της μελέτης χρησιμοποιήσαμε ορούς από 19 ασθενείς με ΠΧΚ, με τεκμηριωμένη παρουσία AMA και ειδικότερα αντι-PDC-E2 αντισωμάτων κατά της έσω λιποϋλικής περιοχής της PDC-E2, με σκοπό να μελετήσουμε κατά πόσο υπάρχουν γραμμικοί επίτοποι που αναγνωρίζονται από τα αντι-PDC-E2 αντισώματα. Οι ασθενείς με ΠΧΚ που αποτέλεσαν τον πληθυσμό μελέτης είχαν τεκμηριωμένη παρουσία αντι-

PDC-E2 αντισωμάτων σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης (Παράγραφος 3.2).

Η παρουσία αντι-PDC-E2 αντισωμάτων στους ασθενείς αυτούς επιβεβαιώθηκε με πειράματα ELISA χρησιμοποιώντας ως αντιγόνο και πάλι το έσω λιποϋλικό τμήμα της πρωτεΐνης. Όλοι οι ασθενείς που είχαν επιλεγεί έδειξαν αντιδραστικότητα κατά της PDC-E2 (Διάγραμμα 4). Τα αποτελέσματα αυτά απλά επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης. Έτσι τεκμηριώθηκε εις διπλούν η ύπαρξη αντι-PDC-E2 αντισωμάτων κατά του έσω λιποϋλικού τμήματος της πρωτεΐνης.

Ακολούθως, με πειράματα ELISA χρησιμοποιώντας ως καθηλωμένα αντιγόνα 76 20μερή, αλληλεπικαλυπτόμενα κατά 8 αμινοξέα πεπτίδια που καλύπτουν ολόκληρο το εύρος της PDC-E2 αναζητήθηκε η αντιδραστικότητα των ορών των ασθενών με ΠΧΚ έναντι γραμμικών επιτόπων στα διάφορα τμήματα της πρωτεΐνης.

Αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον ένα από τα πεπτίδια που αντιστοιχούν στο έξω λιποϋλικό τμήμα της PDC-E2 παρουσίασαν 5 ασθενείς (26.31%) και 1 μάρτυρας. Τα πεπτίδια που τουλάχιστον ένας ασθενής παρουσίασε αντιδραστικότητα ήταν τα 11, 15 και 16. Η αντιδραστικότητα κατά του πεπτιδίου 11 ήταν μη ειδική καθώς θετική απόκριση έδωσαν τόσο ένας ασθενής όσο και ένας μάρτυρας. Αντιδραστικότητα κατά του πεπτιδίου 15 και 16 είχαν 4 (21.05%) και 5 (26.31%) ασθενείς αντίστοιχα ενώ κανένας μάρτυρας δεν παρουσίασε αντιδραστικότητα κατά αυτών των πεπτιδίων. Επίτοπος στην έξω λιποϋλική περιοχή της PDC-E2 έχει περιγραφεί και στο παρελθόν [21, 22, 66]. Ο επίτοπος αυτός είναι ένα πεπτίδιο 14 αμινοξέων με αλληλουχία GDLIAEVETDKATV που αποτελεί τμήμα του πεπτιδίου 12 που χρησιμοποιήσαμε. Έτσι, ενώ δεν επιβεβαιώνουμε με αυτά τα πρώτα αποτελέσματα τον επίτοπο που έχει περιγραφεί στο έξω λιποϋλικό τμήμα, έχουμε ενδείξεις ότι τα πεπτίδια 15 και 16 δυνατόν να αποτελούν γραμμικούς επιτόπους στο έξω λιποϋλικό τμήμα.

Το έσω λιποϋλικό τμήμα της PDC-E2 αποτελεί τμήμα της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των αντι-PDC-E2 αντισωμάτων στον ορό των ασθενών με ΠΧΚ που αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης. Ενώ όλοι οι ασθενείς ελέγχθηκαν θετικά για την παρουσία αντισωμάτων κατά της έσω λιποϋλικής περιοχής τόσο με πειράματα ανοσοαποτύπωσης όσο και με πειράματα ELISA, μόνο ένας ασθενής παρουσίασε αντιδραστικότητα σε ένα πεπτίδιο (πεπτίδιο 26) που αντιστοιχεί στο έσω λιποϋλικό τμήμα της PDC-E2. Τρεις υγιείς μάρτυρες παρουσίασαν αντιδραστικότητα σε κάποιο από τα πεπτίδια που αντιστοιχούν στο έσω λιποϋλικό τμήμα. Η έλλειψη αντιδραστικότητας κατά των πεπτιδίων από ορούς που αντιδρούν με το έσω λιποϋλικό τμήμα της PDC-E2 δυνατόν να συμβαίνει επειδή ο επίτοπος των AMA στο έσω λιποϋλικό τμήμα είναι στερεοτακτικός, γεγονός που υποστηρίζεται και από άλλους ερευνητές όπως προαναφέρθηκε [22, 67]. Σε προηγούμενες μελέτες είχαν χαρακτηριστεί

και γραμμικοί επίτοποι στο έσω λιπούλικό τμήμα της PDC-E2 και πιο συγκεκριμένα, τα πεπτίδια AEIETDKATIGFEVQEEG [21] (περιέχεται στο πεπτίδιο 28 που χρησιμοποιήσαμε) και το πεπτίδιο LLAEIETDKATIGF (που επίσης περιέχεται στο πεπτίδιο 28) [62]. Στην παρούσα μελέτη, κανένας από τους Έλληνες ασθενείς με ΠΧΚ δεν παρουσίασε αντιδραστικότητα σε αυτό το πεπτίδιο υποστηρίζοντας τα δεδομένα προηγούμενης μελέτης [24].

Το ποσοστό αντιδραστικότητας κατά της θέσης σύνδεσης των υπομονάδων E1/E3 ήταν 0% ανάμεσα στους ασθενείς με ΠΧΚ. Η τελευταία μελέτη που αναζήτησε γραμμικούς επιτόπους στην PDC-E2 απέτυχε επίσης να αποδείξει την ύπαρξη επιτόπων σε αυτό το τμήμα της πρωτεΐνης [24].

Η περιοχή που αντιστοιχεί στο καταλυτικό κομμάτι της PDC-E2 ήταν η πλέον ενδιαφέρουσα από πλευράς αντιδραστικότητας. Συνολικά 13 ασθενείς (68.42%) παρουσίασαν αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον ένα πεπτίδιο που αντιστοιχεί στο καταλυτικό τμήμα της πρωτεΐνης. Συνολικά 4 περιοχές φαίνεται να ξεχωρίζουν ως προς την αντιδραστικότητα σε σχέση με τους μάρτυρες: οι περιοχές που καλύπτονται από τα πεπτίδια 51 και 52, 59, 64, 72 και 74 (Διάγραμμα 4). Μεταξύ αυτών των πεπτιδίων η μεγαλύτερη αντιδραστικότητα παρουσιάστηκε έναντι του πεπτιδίου 72 μιας και οι οροί από 8 ασθενείς (42.1%) αντιδρούσαν κατά του πεπτιδίου αυτού. Καμία από τις περιοχές που παρουσιάζουν αντιδραστικότητα σε αυτή την ομάδα πληθυσμού δεν επιβεβαιώνουν τους γραμμικούς επιτόπους που περιγράφηκαν σε Γερμανούς ασθενείς [24]. Ένα επιπλέον ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι ο κάθε ασθενής έχει το δικό του ιδιαίτερο μοτίβο αντιδραστικότητας και στις περισσότερες περιπτώσεις ο ορός του κάθε ασθενούς αντιδρά σε περισσότερα από ένα πεπτίδια (Διάγραμμα 4).

Οι προσπάθειες που έγιναν στο παρελθόν να χαρακτηριστούν οι γραμμικοί επίτοποι των αντι-PDC-E2 αντισωμάτων έδειξαν μια ετερογένεια αποτελεσμάτων [21-24, 58-60, 62]. Η κάθε μελέτη χρησιμοποιεί πεπτίδια ή τμήματα της πρωτεΐνης άλλοτε άλλου μεγέθους. Η προσθήκη ή η απαιεφί ενός και μόνο αμινοξέος μπορεί να αλλάξει τη στερεοτακτική διαμόρφωση του επιτόπου και να επηρεάσει αρνητικά την ικανότητα σύνδεσης αντισώματος-αντιγόνου [68, 69] καθώς για τη σύνδεση αντιγόνου αντισώματος είναι απαραίτητη τόσο η δομική όσο και χημική συμπληρωματικότητα [70-73].

Παρόλο που τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι ο/οι επίτοπος/οι στο έσω λιπούλικό τμήμα είναι στερεοτακτικός/οί και στο καταλυτικό τμήμα γραμμικοί εντούτοις πρέπει να γίνουν περισσότερα πειράματα μιας και είναι περιορισμένος ο αριθμός των ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη φάση της μελέτης.

4.4 Προσδιορισμός της αντιδραστικότητας των CD4+ T λεμφοκυττάρων κατά του προηγούμενα περιγραφόμενου ανοσοεπικρατούντος αντιγόνου PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆

Σε προηγούμενες μελέτες έχουν αναπτυχθεί CD4+ T λεμφοκυτταρικοί κλώνοι που αναγνωρίζουν ως επίτοπο το πεπτίδιο της PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆ GDLLAEIETDKATI [10, 74-78]. Αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αντίδρασης των CD4+ T λεμφοκυττάρων Ελλήνων ασθενών με ΠΧΚ έναντι του εν λόγω πεπτιδίου. Η προσέγγιση του θέματος έγινε με τη χρήση 3 διαφορετικών μεθόδων.

Αρχικά μελετήσαμε την αντιδραστικότητα των λεμφοκυττάρων κατά του επιτόπου εκτιμώντας την ικανότητα των κυττάρων να παράγουν IFN-γ παρουσία του πεπτιδίου με τη χρήση της μεθόδου ELISpot. Με αυτή την προσέγγιση και διεγείροντας τα κύτταρα για 48 ώρες με το προς εξέταση αντιγόνο ανιχνεύεται η ύπαρξη T λεμφοκυττάρων τα οποία είχαν προηγουμένως διεγερθεί με το αντιγόνο (antigen-primed T cells). Τα λεμφοκύτταρα που δεν έχουν έρθει προηγουμένως σε επαφή με το αντιγόνο διαμέσου αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (naïve T cells), αλλά φέρουν τους κατάλληλους TCR και μπορούν δυνητικά να αναγνωρίσουν το αντιγόνο χρειάζεται να διεγερθούν για τουλάχιστον 3-5 ημέρες [79].

Με αυτή τη μέθοδο (ELISpot) ανιχνεύονται και άλλα κύτταρα πλην των CD4+ T λεμφοκυττάρων, που έχουν την ικανότητα να παράγουν IFN-γ σαν απάντηση σε ένα αντιγόνο, όπως είναι για παράδειγμα τα CD8+ T λεμφοκύτταρα. Αντίθετα, με αυτή τη μέθοδο δεν μπορούν να ανιχνευθούν Th-2 βοηθητικά CD4+ λεμφοκύτταρα που αφενός μπορεί να αναγνωρίζουν το πεπτίδιο ως αντιγόνο αλλά δεν έχουν τη δυνατότητα να εκκρίνουν IFN-γ.

Προκειμένου να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο ύπαρξης naïve T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΠΧΚ που αναγνωρίζουν τον επίτοπο προχωρήσαμε και σε καλλιέργειες 7 ημερών. Η ανάλυση της ικανότητας έκκρισης IFN-γ με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής μετά από κυτταροκαλλιέργειες 7 ημερών είναι επίσης κατάλληλη για να διαπιστωθεί κατά πόσο υπάρχουν στο αίμα λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν τα πεπτίδια ως επιτόπους και που βρίσκονται σε χαμηλή συχνότητα στο αίμα. Έτσι, η ανάλυση της αντιδραστικότητας των λεμφοκυττάρων μετά από καλλιέργεια 7 ημερών έγινε με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Με το πέρας της καλλιέργειας τα κύτταρα βάφονταν με αντισώματα κατά του επιφανειακού αντιγόνου CD4 και με αντισώματα κατά της ενδοκυττάριας IFN-γ και αναλύονταν με κυτταρομετρία ροής. Με αυτή τη μέθοδο θα διαπιστωνόταν κατά πόσο υπήρχαν CD4+ naïve λεμφοκύτταρα που αναγνώριζαν το αντιγόνο-στόχο και μετατρέπονταν σε Th-1 CD4+ λεμφοκύτταρα, πληροφορία που δε θα λαμβάναμε αν εξεταζόταν μόνο με τη μέθοδο της ELISpot αν ο επίτοπος αναγνωρίζεται

ή όχι. Επίσης με την κυτταρομετρία ροής θα λαμβάναμε και την πληροφορία κατά πόσο τα Th-1 CD4+ T λεμφοκύτταρα στο περιφερικό αίμα έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν τα πεπτιδία με τα οποία διεγέρθηκαν και να εκκρίνουν IFN- γ , πληροφορία που δε θα είχαμε αν χρησιμοποιούσαμε μόνο τη μέθοδο της ELISpot μιας και με τη τελευταία δεν μπορεί να διαπιστωθεί αν η παραγώμενη IFN- γ προέρχεται από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα ή άλλους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς.

Η αρχική μελέτη που έγινε και κατέδειξε ότι το πεπτιδίο PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆ GDLLAEIETDKATI είναι αντιγονικός τύπος που αναγνωρίζεται από τα CD4+ είχαν πραγματοποιηθεί πειράματα ανίχνευσης πολλαπλασιασμού λεμφοκυττάρων με τη χρήση ραδιενεργά σημασμένης θυμιδίνης (proliferation assays) [10]. Με αυτό τον τρόπο, όλοι οι πιθανοί υπότυποι CD4+ T λεμφοκυττάρων (και άλλων λεμφοκυτταρικών υποτύπων) που δυνητικά θα μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν παρουσία αντιγόνου μπορούσαν να ανιχνευθούν. Για να αποκλείσουμε ότι τα όποια αρνητικά αποτελέσματα που θα είχαμε θα οφείλονταν στο ότι δε μελετήσαμε την ικανότητα πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων, κάναμε και πειράματα για τη μελέτη πολλαπλασιασμού των CD4+ λεμφοκυττάρων με τη χρήση της χρωστικής CFSE.

Σε σύνολο 35 ασθενών που μελετήθηκε η παραγωγή IFN- γ σαν απάντηση στη διέγερση με το πεπτιδίο PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆ μόνο 3 (8.57%) παρουσίασαν στατιστικά σημαντική παραγωγή IFN- γ και είναι η πρώτη φορά που περιγράφεται ποσοστό αναγνώρισης του προηγούμενα χαρακτηριζόμενου επιτόπου σε Καυκάσιους ασθενείς. Στα πειράματα κυτταρομετρίας ροής που έγιναν, σημαντική παραγωγή IFN- γ από τα CD4+ λεμφοκύτταρα παρατηρήθηκε μόνο σε 2 από τους 21 ασθενείς (9.52%), κανένας (0%) από τους 10 ασθενείς δεν παρουσίασε κυτταρικό πολλαπλασιασμό όταν έγινε μελέτη του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων παρουσία αντιγόνου με τη χρήση της χρωστικής CFSE. Η περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων τόσο σε ασθενείς με ΠΧΚ όσο και σε υγιείς μάρτυρες έδειξε ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ανοσολογικής απόκρισης μεταξύ των 2 ομάδων, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ανιχνευόμενη ανοσολογική απόκριση δεν ήταν ειδική για τη νόσο.

Η προηγούμενη μελέτη για καθορισμό των CD4 κυτταρικών επιτόπων έγινε αφού μελετήθηκε πρώτα η ικανότητα των λεμφοκυττάρων να πολλαπλασιάζονται όταν καλλιεργούνται με κάποια από τις 7 δεξαμενές πεπτιδίων που κάλυπταν το μεγαλύτερο μέρος της PDC-E2 [10]. Ακολούθως τα λεμφοκύτταρα καλλιεργήθηκαν με μια από τις τρεις καλύτερες δεξαμενές πεπτιδίων με μακράς διάρκειας καλλιέργειες. Ακολούθησε κλωνοποίηση των κυττάρων με τα πεπτιδία και δημιουργήθηκαν 6 κυτταρικοί κλώνοι από ένα σύνολο 14 ασθενών. Δεδομένης της ικανότητας του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίζει δυνητικά το κάθε ξένο αντιγόνο, δεν προκαλεί έκπληξη που

σε μετέπειτα μελέτες αναπτύχθηκαν T λεμφοκυτταρικοί κλώνοι ειδικοί για το πεπτιδίο PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆ και από άλλους ασθενείς αλλά και από υγιείς μάρτυρες [75]. Με αυτά τα δεδομένα αιτιολογείται και το γεγονός ότι τα λεμφοκύτταρα σε 2 από τους 6 μάρτυρες παρουσίαζαν μεγαλύτερη έκκριση IFN-γ όταν καλλιεργούνταν παρουσία του πεπτιδίου συγκρινόμενα με την έκκριση IFN-γ που παρουσίασαν όταν καλλιεργήθηκαν μόνο παρουσία καλλιεργητικού υλικού.

Σε άλλες μελέτες χαρτογράφησης επιτόπων φάνηκε ότι τα λεμφοκύτταρα ασθενών με ένα νόσημα δύνανται να αναγνωρίζουν περισσότερα από ένα πεπτιδία σαν επιτόπους λόγω πολυκλωνικής διέγερσης [26] οπότε μια προσέγγιση χαρτογράφησης των πιθανών επιτόπων μέσα από την ανάπτυξη λεμφοκυτταρικών κλώνων να μην είναι και η ενδεδειγμένη προσέγγιση στο πρόβλημα της χαρτογράφησης λεμφοκυτταρικών επιτόπων.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα οδηγούν στην ανάγκη μιας πιο συστηματικής προσέγγισης στο θέμα της χαρτογράφησης των επιτόπων της PDC-E2 στα CD4+ T λεμφοκυττάρια.

4.5 Προσδιορισμός αντιδραστικότητας των T λεμφοκυττάρων σε επιλεγμένα πεπτιδία της PDC-E2.

Σε αυτή τη φάση της μελέτης ερευνήσαμε κατά πόσο υπάρχουν πεπτιδία που διεγείρουν κατά ειδικό τρόπο τα PBMCs των ασθενών με ΠΧΚ. Τα 26 πεπτιδία που δημιουργήθηκαν χωρίστηκαν σε ομάδες και δημιουργήθηκαν 5 δεξαμενές πεπτιδίων (Pools). Τα PBMCs 21 ασθενών με ΠΧΚ και 5 υγιών μαρτύρων καλλιεργήθηκαν με τις 5 αυτές δεξαμενές πεπτιδίων. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της IFN-γ ELISpot, στην οποία εκτιμάται η ικανότητα των T λεμφοκυττάρων να εκκρίνουν IFN-γ σαν απάντηση σε ένα αντιγόνο.

Όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 10 οι 19 από τους 21 ασθενείς έδειξαν μεγαλύτερη αντιδραστικότητα όταν τα PBMCs τους καλλιεργήθηκαν με κάποια από τις δεξαμενές πεπτιδίων σε σχέση με την αντιδραστικότητα που παρουσίασαν όταν καλλιεργήθηκαν παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού. Στατιστικά σημαντική αντιδραστικότητα ανιχνεύθηκε μόνο σε 8 (38.1%) ασθενείς με ΠΧΚ σαν απάντηση σε κάποια από τις 5 δεξαμενές πεπτιδίων.

Αναλυτικότερα, σε 3 ασθενείς ανιχνεύθηκε αντιδραστικότητα στα πεπτιδία της δεξαμενής Pool-3, σε 4 ασθενείς ανιχνεύθηκε αντιδραστικότητα στα πεπτιδία της δεξαμενής Pool-5, ενώ 1 ασθενής παρουσίασε αντιδραστικότητα στα πεπτιδία των δεξαμενών Pools-2, 3 και 4. Αξιοσημείωτο είναι ότι ο μοναδικός ασθενής που δεν παρουσίασε θετικά

AgSpSFU σε κάποια από τις δεξαμενές πεπτιδίων (Ασθ#08) δεν είχε ούτε αντι-PDC-E2 αντισώματα με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (Πίνακας 10). Αξίζει να σημειωθεί ότι το ποσοστό στο οποίο παρατηρείται αντιδραστικότητα όταν τα PBMCs των ασθενών διεγερθούν μόνο με τον προηγούμενα χαρακτηρισμένο επίτοπο είναι μόλις 8.57% με την ίδια μεθοδολογία. Από τα αποτελέσματά μας προκύπτει ότι η χρήση περισσότερων πεπτιδίων κατά τη μελέτη της αντιδραστικότητας έναντι αντιγόνων της PDC-E2 αύξησε το ποσοστό αντιδραστικότητας.

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων μας με αυτά που είχαν προκύψει από την έρευνα των βάσεων δεδομένων για την πρόβλεψη πιθανών επιτόπων βάσει του HLA των ασθενών [18, 20], έδειξε ότι σε 7 από τους 8 ασθενείς με σημαντική αντιδραστικότητα βρέθηκε τουλάχιστον 1 πεπτίδιο που θα μπορούσε να αποτελέσει ένα τέτοιο επίτοπο για τον κάθε ασθενή.

Σε μια ασθενή, που παρουσίασε αντιδραστικότητα σε 3 διαφορετικές δεξαμενές πεπτιδίων, το πρόγραμμα πρόγνωσης επιτόπων δεν είχε υποδείξει κάποιους πιθανούς επιτόπους βάσει του HLA της ασθενούς. Αυτό δεν πρέπει να μας κάνει εντύπωση, δεδομένου ότι το RankPer κάνει απλά προγνώσεις για τους πιθανούς επιτόπους χωρίς να μπορεί να αποκλείσει ότι πιθανοί επιτόποι δεν ξεφεύγουν από τη διασταύρωση των δεδομένων που χρησιμοποιεί το πρόγραμμα ή ότι οι επίτοποι που προηγογνώσει ως πιθανούς θα αποτελέσουν και στην πραγματικότητα επιτόπους [20]. Επίσης δεν είναι τυχαίο το γεγονός ότι βάση των HLA-II αλληλίων των 17 ασθενών που δεν έδειξαν κάποια αντιδραστικότητα στις χρησιμοποιούμενες δεξαμενές πεπτιδίων, οι 14 θα έπρεπε να παρουσιάσουν σημαντική αντιδραστικότητα σε κάποιο πεπτίδιο, όπως είχε προβλέψει το πρόγραμμα πρόγνωσης επιτόπων (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Όταν ερευνήθηκε κατά πόσο η αντιδραστικότητα (AgSpSFU) ήταν ειδική για τη νόσο φάνηκε ότι στις 4 από τις 5 δεξαμενές πεπτιδίων (Pools 1, 3, 4 και 5) η μέση αντιδραστικότητα ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς με ΠΧΚ αλλά αυτή η αντιδραστικότητα δεν άγγιξε τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στο μικρό μέγεθος του δείγματος. Παρ' όλο που η αντιδραστικότητα δε φαίνεται να είναι ειδική για τη νόσο με βάση τα αποτελέσματά μας, δεν πρέπει να παραβλέπεται το γεγονός ότι τα λεμφοκύτταρα σε κάποιους από τους ασθενείς είχαν σημαντική παραγωγή IFN-γ όταν αυτά διεγείρονταν με τα πεπτίδια (Διάγραμμα 23).

Σημαντικό είναι επίσης και το γεγονός ότι κάποιοι από τους υγιείς μάρτυρες είχαν ειδικά προς το αντιγόνο T λεμφοκύτταρα που παράγουν κηλίδες (Ag Specific Spot Forming Units- AgSpSFU) ανά εκατομμύριο κυττάρων. Σε καμία από αυτές τις περιπτώσεις η παραγωγή IFN-γ δεν άγγιξε τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Δεν πρέπει να ξενίζει το γεγονός ότι ο οποιοσδήποτε οργανισμός

περιέχει στο ρεπερτόριο των λεμφοκυττάρων του T λεμφοκύτταρα που ο TCR τους μπορεί να αναγνωρίσει ακόμη και αυτοαντιγόνα μιας και κατά την επιλογή των T λεμφοκυττάρων στο θύμο αδένι δυνατόν να εισέλθουν στην περιφέρεια και αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα [80].

Αυτά τα δεδομένα παραπέμπουν στην ανάγκη μιας πιο συστηματικής προσέγγισης για την αναζήτηση των πιθανών επιτόπων γιατί από ότι φαίνεται η αντιδραστικότητα είναι ετερογενής (διαφορετική από ασθενή σε ασθενή).

4.6 Προσδιορισμός αντιδραστικότητας των T λεμφοκυττάρων σε αλληλεπικαλυπτόμενα πεπτιδία της PDC-E2.

Στην παρούσα φάση της μελέτης αναζητήθηκαν πιθανοί επίτοποι των CD4+ T λεμφοκυττάρων με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Οι δύο διαφορετικές παράμετροι αντιδραστικότητας των CD4+ T λεμφοκυττάρων που μελετήθηκαν ήταν η έκκριση IFN-γ και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός των CD4+ T λεμφοκυττάρων παρουσία των πεπτιδίων στο καλλιεργητικό υλικό. Οι δύο αυτές διαφορετικές προσεγγίσεις στον τρόπο αναζήτησης της αντιδραστικότητας θα έδιναν και διαφορετικές πληροφορίες για το πώς τα Th-1 λεμφοκύτταρα αλλά και τα CD4+ T λεμφοκύτταρα στο σύνολο τους παρουσιάζουν αντιδραστικότητα παρουσία των δεξαμενών πεπτιδίων.

Στην παρούσα φάση της μελέτης, 22 ασθενείς με ΠΧΚ διεγέρθηκαν με τις 12 δεξαμενές πεπτιδίων που δημιουργήσαμε και ελέγχθηκε κατά πόσο τα CD4+ T λεμφοκύτταρά τους παράγουν IFN-γ παρουσία των αντιγόνων. Παράλληλα, στους 10 από αυτούς τους 22 ασθενείς μελετήθηκε πώς τα CD4+ T λεμφοκύτταρά τους πολλαπλασιάζονται όταν καλλιεργηθούν με τις 12 δεξαμενές πεπτιδίων που δημιουργήσαμε. Σε σύνολο 22 ασθενών, οι 17 (77.27%) παρουσίασαν στατιστικά σημαντική παραγωγή IFN-γ από τα CD4+ T λεμφοκύτταρά τους σε τουλάχιστον μια δεξαμενή πεπτιδίων όταν τα PBMCs καλλιεργούνταν παρουσία των δεξαμενών πεπτιδίων. Η αναζήτηση κυτταρικού CD4+ T λεμφοκυτταρικού πληθυσμού που θα παράγει IFN-γ παρουσία αντιγόνων μόνο εν μέρει μπορεί να δώσει απαντήσεις για το πώς τα CD4+ T λεμφοκύτταρα αντιδρούν παρουσία των πεπτιδίων που περιέχονται στην PDC-E2 καθώς διάφοροι υπότυποι CD4+ T λεμφοκυττάρων (TH1, TH2, Tregs, TH17 κτλ) παρουσιάζουν το δικό τους προφίλ αντιδραστικότητας.

Η αντιδραστικότητα των CD4 λεμφοκυττάρων όπως παρουσιάζεται στους πίνακες 14 και 15 καταδεικνύει ότι η αντιδραστικότητα των CD4+ T λεμφοκυττάρων είναι ετερογενής και πολυκλωνική. Ετερογένεια και πολυκλωνικότητα στον τρόπο αντιδραστικότητας και στην ειδικότητα των CD4 T λεμφοκυττάρων ανάλογα με το χρόνο ελέγχου κατά τη διάρκεια της νόσου και ανάλογα με τις συνθήκες των πειραμάτων έχει αναφερθεί στο παρελθόν

σε ασθενείς με Πολλαπλή Σκλήρυνση [81]. Οι Mazza και συν απέδειξαν ότι η αντιδραστικότητα των Τ λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με Πολλαπλή Σκλήρυνση έναντι της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης (Myelin Basic Protein – MBP) δεν παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της νόσου. Κατά την εξέλιξη των αυτοανόσων νοσημάτων συχνά παρατηρείται διασπορά του επιτόπου (epitope spreading) με αποτέλεσμα στην αντιδραστικότητα έναντι του αρχικού επιτόπου να προστίθεται και η αντιδραστικότητα των Τ λεμφοκυττάρων έναντι νέων περιοχών της πρωτεΐνης στόχου. Έχει επίσης παρατηρηθεί σε άλλα νοσήματα ότι η Τ κυτταρική αντιδραστικότητα κατά την περίοδο της έξαρσης του νοσήματος είναι πολυκλωνική με πολλούς επιτόπους να αναγνωρίζονται σε ένα και μόνο ασθενή [26].

Πολυκλωνικότητα στην αντιδραστικότητα των CD4 Τ λεμφοκυττάρων έχει παρατηρηθεί και σε άλλα νοσήματα, κυρίως λοιμώδη, όπως η ηπατίτιδα C και η λοίμωξη από τον HIV [82, 83]. Οι μελέτη της κυτταρικής ανοσίας με Τ κυτταρικές σειρές και/ή κλώνους ή ακόμη και με ex-vivo μελέτες δεν μπορεί να δώσει συνολική εικόνα καθώς η αντιδραστικότητα που λαμβάνεται αντικατοπτρίζει μόνο το τι συμβαίνει στο περιφερικό αίμα κατά τη στιγμή της αιμοληψίας και μόνο στον όγκο του αίματος που λαμβάνεται [84].

Με βάση τα δεδομένα μας θεωρούμε ότι είναι ασφαλής η εξαγωγή του συμπεράσματος ότι η CD4+ Τ κυτταρική αντιδραστικότητα στην ΠΧΚ είναι πολυκλωνική, ετερογενής και δεν περιορίζεται σε ένα και μοναδικό πεπτίδιο όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί [10].

5. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΥΣΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

5.1 Εισαγωγή

Τα AMA αποτελούν το ορολογικό δείκτη της ΠΧΚ και όπως περιγράφηκε λεπτομερώς στο Γενικό Μέρος της παρούσας διατριβής οι πρωτεΐνες στόχοι των AMA είναι: (1) η E2 υπομονάδα της Πυροσταφυλικής Αφυδρογονάσης (E2 subunit of pyruvate dehydrogenase, PDC-E2) (2) η E2 υπομονάδα του συμπλέγματος της κετοξικής αφυδρογονάσης των διακλαδιζομένων αμινοξέων (E2 subunit of branched chain 2-oxo acid dehydrogenase complex, BCOADC-E2) (3) η E2 υπομονάδα της αφυδρογονάσης του κετογλουταρικού (E2 subunit of 2-oxo-glutarate dehydrogenase complex, OGDH-E2) (4) η πρωτεΐνη X (E3-binding protein ή Protein X) και (5) η E1α υπομονάδα της Πυροσταφυλικής Αφυδρογονάσης (PDC-E1α) [2]. Τα AMA είναι κυρίως IgG κλάσης. Ο τίτλος των IgG AMA δεν φαίνεται να σχετίζεται με την σοβαρότητα της νόσου, την εξέλιξη της νόσου ή την ανταπόκριση στη θεραπεία. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα IgA AMA συνυπάρχουν με τα IgG AMA [29, 85]. Ενώ κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι τα IgA AMA σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου, κάποιες άλλες μελέτες απέτυχαν να αποδείξουν αυτή τη συσχέτιση [86, 87]. Έτσι, δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο αν τα IgA AMA πρέπει να χρησιμοποιούνται ως δείκτης εξέλιξης της νόσου. Σε προχωρημένα στάδια της νόσου, έχει βρεθεί ότι τα IgA AMA βρίσκονται στον ορό των ασθενών σε υψηλότερους τίτλους και σχετίζονται με πιο προχωρημένη νόσο με βάση το Scheuer's σύστημα σταδιοποίησης της νόσου [87]. Τα IgA-αντι-PDC-E2 AMA βρίσκονται σε προχωρημένα στάδια της νόσου αλλά δεν έχουν ακόμη περιγραφεί οι επίτοποι αυτών των αντισωμάτων.

Τα ANA κατά των πρωτεϊνών Sp100 και Gp210 αναφέρονται και ως ειδικά για την ΠΧΚ ANA, είναι θετικά στο 25% των ασθενών με ΠΧΚ [88] και είναι εξαιρετικά χρήσιμα στη διάγνωση AMA αρνητικών περιπτώσεων ΠΧΚ [89]. Ο τίτλος τους φαίνεται να είναι σταθερός κατά την εξέλιξη της νόσου και παραμένουν θετικά ακόμη και μετά τη μεταμόσχευση ήπατος [90, 91]. Οι ασθενείς με ΠΧΚ που ελέγχονται θετικοί στα ειδικά για την ΠΧΚ ANA φαίνεται να έχουν να έχουν χειρότερη εξέλιξη [92, 93]. Η αντιδραστικότητα των anti-Sp100 αντισωμάτων κατά της πρωτεΐνης φαίνεται να είναι ετερογενής και πολυ-ειδική με τον κυριότερο όμως αντιγονικό επίτοπο να εντοπίζεται στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης [94, 95]. Πληθώρα άλλων αυτοαντισωμάτων ελέγχονται θετικά στην ΠΧΚ στα πλαίσια συνυπάρχοντος αυτοάνοσου νοσήματος ή μη

[96].

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζουμε μια ασθενή με ΠΧΚ με θετικά τόσο τα IgG όσο και τα IgA AMA. Τα επίπεδα των IgG AMA παραμένουν σταθερά ενώ ο τίτλος των IgA AMA αυξάνεται κατά την πορεία της νόσου. Ο τίτλος επίσης των αντι-Gp210 και αντι-Sp100 παρουσιάζει ενδιαφέρον ανάλογα με τη μέθοδο που ελέγχονται αυτά τα αντισώματα. Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφεται πώς ταυτοποιήσαμε δυο γραμμικούς επιτόπους των IgA αντι-PDC-E2 αντισωμάτων. Μελετήθηκε επίσης η κινητική των αντι-Sp100 και αντι-Gp210 και δείξαμε πως η θεραπεία με UDCA έχει μεταβάλει την πολυκλωνική B κυτταρική απόκριση κατά του αντιγόνου της πρωτεΐνης Sp100.

5.2 Κλινικοεργαστηριακή Παρουσίαση

Ασθενής 56 ετών με καταγωγή από την Ουκρανία παραπέμφθηκε στο Ηπατολογικό Ιατρείο του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας λόγω χολοστατικού συνδρόμου (χολόσταση και υπερχοληστρολαιμία) που εντοπίστηκε στα πλαίσια διερεύνησης αδιευκρίνιστου πόνου στο δεξιό υποχόνδριο. Ο πόνος υποχώρησε χωρίς περαιτέρω φαρμακευτική αγωγή. Η ασθενής αναφέρει ότι ο ιατρός της στην Ουκρανία διαπίστωσε στο παρελθόν ότι πιθανόν να έχει κάποια μορφής ηπατική νόσο αλλά η ίδια δεν μπορούσε να δώσει περαιτέρω λεπτομέρειες ενώ δεν προσκόμισε προηγούμενα ιατρικά πιστοποιητικά. Η ασθενής είναι υπέρτασική και λαμβάνει AMEA. Η ασθενής έχει επίσης χειρουργικό ιστορικό θετικό για ολική υστερεκτομή το 1989 λόγω μαζικής αιμορραγίας που αντιμετωπίστηκε με ολική υστερεκτομή και μετάγγιση αίματος. Το οικογενειακό ιστορικό είναι αρνητικό για καρκίνο, καρδιαγγειακή νόσο και αυτοάνοσα νοσήματα. Η ασθενής εργάζεται ως κτηνοτρόφος, είναι πρώην καπνίστρια και δεν κάνει χρήση αλκοόλ. Στο γυναικολογικό ιστορικό αναφέρει εκτός από την υστερεκτομή, 2 τελειόμηνες κυήσεις και 2 αποβολές και 5 εκτρώσεις. Στην ανασκόπηση των συστημάτων δεν αναφέρει κνησμό ή κόπωση. Η φυσική εξέταση ήταν φυσιολογική με εξαίρεση την ύπαρξη ήπιας ηπατομεγαλίας και ήπιας σπληνομεγαλίας. Το ηπερηχογράφημα έδειξε ετερογενές ηπατικό παρέγχυμα χωρίς χολολιθίαση ή χοληδοχολιθίαση ή διάταση των εξωηπατικών χοληφόρων (κοινός χοληδόχος πόρος 4mm)

Ο αρχικός εργαστηριακός έλεγχος έδειξε αυξημένη αλκαλική φωσφατάση 600 IU/L (ανώτερη φυσιολογική τιμή<104 IU/L), γ-GT 722 IU/L (ανώτερη φυσιολογική τιμή<40 IU/L), AST 106 IU/L (ανώτερη φυσιολογική τιμή< 40 IU/L) και ALT 135 IU/L (ανώτερη φυσιολογική τιμή<40 IU/L). Ο ορολογικός έλεγχος για ιογενείς ηπατίτιδες ήταν θετικός για IgG αντισώματα κατά του ιού της ηπατίτιδας A και αρνητικός για παρούσα ή προηγούμενη λοίμωξη από HBV ή HCV. Τα AMA με τη μέθοδο του ΕΑΦ σε υπόστρωμα

ήπατος/νεφρού /στομάχου αουραίου ήταν θετικά (AMA, 1:640) αλλά τα SMA και PCA ήταν αρνητικά. Ο ΕΑΦ σε υπόστρωμα Hep-2 έδειξε MND (multiple nuclear dots ANA) και RLM ANA (rim-like membranous ANA). Η βιοψία ήπατος έδειξε πυλαία διαστήματα με φλεγμονή και ίνωση, πυλαία/περιπυλαία ηπατιπδική δραστηριότητα με περιπυλαίες αλλοιώσεις χολοστατικού τύπου. Η ασθενής ξεκίνησε θεραπευτική αγωγή με UDCA 1250 mg/ημέρα (15 mg/kg/d). Η ασθενής επισκεύθηκε τα εξωτερικά ιατρεία μετά από 6, 13 και 23 μήνες. Η κάθε επίσκεψη συνοδευόταν και από αιμοληψία και έλεγχο των τρανσαμινασών και των χολοστατικών ενζύμων (Πίνακας 17). Ο ορός φυλασσόταν στους -20°C.

Πίνακας 17. Βιοχημικοί δείκτες σε σχέση με την ανώτερη φυσιολογική τιμή (N = upper limit of normal) κατά την πρώτη επίσκεψη και 6, 13 και 23 μήνες μετά τη θεραπεία.

| | Πριν τη θεραπεία | 6 μήνες μετά τη θεραπεία (UDCA) | 13 μήνες μετά τη θεραπεία (UDCA) | 23 μήνες μετά τη θεραπεία (UDCA) |
|-------------------------|---------------------|---------------------------------------|--|--|
| Χολερυθρίνη(xN) | 0.76 | 0.57 | 0.82 | 0.89 |
| Αλκαλική φωσφατάση (xN) | 5.76 | 1.88 | 1.74 | 1.48 |
| γ-GT (xN) | 18.05 | 2.5 | 2.3 | 1.58 |
| ALT (xN) | 2.7 | 0.82 | 0.68 | 0.58 |
| AST (xN) | 2.12 | 0.66 | 0.88 | 0.56 |

5.3. Μέθοδοι

5.3.1. Χαρακτηρισμός Αυτοαντισωμάτων

5.3.1.α Έμμεσος Ανοσοφθορισμός (ΕΑΦ)

Τα πειράματα ΕΑΦ σε υπόστρωμα ήπατος/νεφρού/στομάχου αουραίου και Hep-2 έγιναν όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.1 του Ειδικού μέρους.

5.3.1.β Χαρακτηρισμός αυτοαντισωμάτων με ELISA

Ο χαρακτηρισμός των αυτοαντισωμάτων έγινε περαιτέρω με τη μέθοδο της ELISA όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.2 του Ειδικού Μέρους χρησιμοποιώντας ELISA kit INOVA, San Diego, CA, USA [13]. Για τον καθορισμό των AMA με την M2-EP ELISA χρησιμοποιήθηκαν anti-Human IgG και anti-Human IgA για την ανίχνευση τόσο των IgG όσο και IgA AMA [29]. Αριθμός ELISA έγινε για την ανίχνευση τόσο IgG [αντισώματα κατά ιστονών (anti-Histones), κατά της χρωματίνης (anti-Chromatin), κατά της διπλής έλικας DNA (anti-dsDNA), κατά της μονής έλικας DNA (anti-ssDNA), κατά της P

πρωτεΐνης των ριβοσωμάτων (anti-Ribosome-P), κατά εκχυλισμένων πυρηνικών αντιγόνων (anti-ENA-5) και κατά του Μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (anti-ASCA)] όσο και IgA [αντισώματα κατά της F-ακτίνης (anti-F-actin), κατά της ανθρώπινης ιστικής τρανσλουταμινάσης (anti-htTG), κατά της γλιαδίνης (anti-Gliadin), κατά της β2-γλυκοπρωτεΐνης (anti-β2GPI), καρδιολιπιδικά αντισώματα (anti-ACA) και κατά του Μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (anti-ASCA)] αυτοαντισωμάτων. Δεδομένου ότι δεν είχαμε αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού ανοσοσφαιρινών (έμμεση ένδειξη για ύπαρξη ήπιας υπεργαμμασφαιριναιμίας καθώς η διαφορά μεταξύ ολικών πρωτεϊνών και αλβουμίνης υπολογίστηκε σε 4.2mg/dl) , προχωρήσαμε με αυτά τα ELISA τεστ για να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο η όποια διακύμανση των IgG ή IgA AMA ή Sp100 και Grp210 αντισωμάτων οφειλόταν σε μη ειδική σύζευξη πολυκλωνικών αντισωμάτων λόγω υπεργαμμασφαιριναιμίας.

5.3.1.γ Anti- HEp-2 cell Antigen Euroline-Western Blot.

Για τον περαιτέρω προσδιορισμό των ANA (κυρίως για την επιβεβαίωση της ύπαρξης των αντικεντρομεριδιακών αντισωμάτων με μοριακή μέθοδο) χρησιμοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση από ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένο εκχύλισμα καρκινικών σειρών λάρυγγα HEp-2. Το κύριο χαρακτηριστικό των HEp-2 είναι ότι έχουν μεγάλο πυρήνα και κατά συνέπεια τα πυρηνικά αντιγόνα υπερεκφράζονται καθιστώντας αυτά τα κύτταρα ιδανικό υπόστρωμα για την ανίχνευση των όποιων πυρηνικών αντιγόνων. Επειδή όμως πρόκειται για ολικό εκχύλισμα κυττάρων, δυνατόν να ανιχνεύονται και αντισώματα κατά μη πυρηνικών αντιγόνων. Επιπλέον σε κάθε strip υπάρχουν τοποθετημένα σε μεμβρανικό chip ανασυνδυασμένο CEN-B αντιγόνο, φυσικό SS-A (60 kDa) και ανασυνδυασμένο Ro-52 ξεχωριστά. Συγκεκριμένα, αφού τοποθετήθηκε ο ανάλογος αριθμός ταινιών σε πλαστικά κανάλια (trays) προστέθηκε 1,5ml universal bufferPlus 1X και έγινε επώαση υπό συνεχόμενη ανάδευση (όπως όλες οι επώσεις) για 15 λεπτά για το μπλοκάρισμα των θέσεων μη ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων του ορού. Στη συνέχεια, αναρροφήθηκε το περιεχόμενο του καναλιού, έγινε η προσθήκη αραίωσης 1:101 ορού ασθενούς και ακολούθησε επώαση για 60 λεπτά. Μετά από 3 πλυσίματα των 5 λεπτών με universal bufferPlus 1,5ml conjugate 1X προστέθηκε σε κάθε κανάλι. Ακολούθησε και πάλι επώαση 60 λεπτών, 3 πλύσεις όπως πιο πάνω και η τοποθέτηση του υποστρώματος. Μετά από δεκάλεπτη περίπου επώαση σταμάτησε η αντίδραση με την προσθήκη αποσταγμένου νερού και το πλύσιμο των ταινιών με επίσης αποσταγμένο νερό. Όταν στέγνωσαν οι ταινίες προσδιορίστηκε υπό λάμπα λευκού φωτισμού η εμφάνιση και η ένταση ζωνών που αναλογούσαν σε ζώνες της ταινίας αναφοράς.

5.3.1.δ *Line Immunoassay.*

Αξιοποιώντας το πλεονέκτημα που μας έδινε ένα εμπορικά διαθέσιμο kit που περιείχε πολλαπλά μεμβρανικά chip αντιγόνων (εκχυλίσματα ή ανασυνδιασμένα αντιγόνα), ελέγξαμε την αντιδραστικότητα των ορών και με αυτή τη μέθοδο (Profile Autoimmune Liver Diseases EUROline, EUROIMMUN, Lumbeck, Germany). Ο λόγος που επιλέξαμε και αυτή τη μέθοδο ήταν το μέγεθος των ανασυνδιασμένων Sp100 και Gr210 πρωτεϊνών. Αναλυτικότερα, τα Sp100 και Gr210 αντιγόνα που χρησιμοποιούνται από την συγκεκριμένη εταιρεία είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος σε σχέση με τα καθηλωμένα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται στα kit της ELISA που χρησιμοποιήσαμε. Αναλυτικότερα, κάθε strip περιέχει τα εξής αντιγόνα σε κάθε chip: AMA-M2, M2-3E(BPO), sp100, PML, gr210, LKM-1, LC-1, SLA and Ro-52. Αφού τοποθετήθηκε ο ανάλογος αριθμός ταινιών σε πλαστικά κανάλια (trays) προστέθηκε 1,5ml sample buffer και έγινε επώαση υπό συνεχόμενη ανάδευση (όπως όλες οι επώσεις) για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, αναρροφήθηκε το περιεχόμενο του καναλιού, έγινε η προσθήκη αραίωσης 1:101 ορού και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά. Μετά από 3 πλύσιμα των 5 λεπτών με wash buffer, 1,5ml conjugate προστέθηκε σε κάθε κανάλι. Ακολούθησε και πάλι επώαση 30 λεπτών, 3 πλύσεις όπως πιο πάνω και η τοποθέτηση του υποστρώματος. Μετά από δεκάλεπτη περίπου επώαση σταμάτησε η αντίδραση με το πλύσιμο των ταινιών με αποσταγμένο νερό. Όταν στέγνωσαν οι ταινίες υπολογίστηκε η αντιδραστικότητα του ορού του κάθε ασθενούς έναντι των αντιγόνων. Για αυτούς τους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα της εταιρίας "EUROLineScan, EUROIMMUN, Lumbeck, Germany".

5.3.1.ε *Ταυτοποίηση αντιδραστικότητας των IgG και IgA αντι-PDC-E2, αντι-BCOADC-E2, αντι-OGDC-E2 και αντι-M2-3E(BPO) με in house ELISA*

Η M2-3E υβριδική πρωτεΐνη, ή M2-3E ή BPO όπως επίσης λέγεται, περιέχει τα ανοσοεπικρατή τμήματα των PDC-E2, ODGC-E2 and BCOADC-E2 πρωτεϊνών. Με μια *in house* ELISA χαρακτηρίσαμε την αντιδραστικότητα κατά της υβριδικής πρωτεΐνης αλλά και την αντιδραστικότητα του ορού στα επί μέρους τμήματα της πρωτεΐνης. Σε πρόδρομα πειράματα που έγιναν για καθορισμό της συγκέντρωσης του αντιγόνου που πρέπει να καθλωθεί στα πηγαδάκια της ELISA καταλήξαμε στις συγκεντρώσεις 1μg πρωτεΐνης/πηγαδάκι για τη PDC-E2 και OGDC-E2 και 2,5μg πρωτεΐνης/πηγαδάκι τη BCOADC-E2 και 3E(BPO). Τα ανασυνδιασμένα αντιγόνα σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν στην εταιρεία EUROIMMUN (EUROIMMUN, Lumbeck, Germany). Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.9 στο Κεφάλαιο 2 του ειδικού μέρους της παρούσας διατριβής. Έγιναν τόσο πειράματα με IgG όσο και με IgA

σημασμένο με horseradish peroxidase (HRP, Inova, San Diego, USA) δεύτερο αντίσωμα. Τα όρια αντιδραστικότητας (cut-off) ορίστηκαν ως η μέση απορρόφηση σε υγιείς μάρτυρες + 4 σταθερές αποκλίσεις (mean + 4SD) και για τα IgG αντισώματα ήταν τα εξής: 3E(BPO):0.620 OD, PDC-E2: 0.530 OD, OGDC-E2: 0.385 OD και BCOADC-E2: 0.450 OD. Για τα IgA αντισώματα ήταν τα εξής: 3E(BPO):0.210 OD, PDC-E2: 0.302 OD, OGDC-E2: 0.280 OD και BCOADC-E2: 0.310 OD.

5.3.1.στ Χαρακτηρισμός των αντι-PDC-E2 αυτοαντισωμάτων με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης.

Ο χαρακτηρισμός των IgG και IgA αντι-PDC-E2 αυτοαντισωμάτων έγινε και με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης για να διαπιστωθεί αν τα αποτελέσματα της ELISA αποτελούσαν πραγματική αντιδραστικότητα κατά της PDC-E2 και όχι κατά πρωτεϊνών της *E. coli* που πιθανόν να επιμόλυναν την πρωτεΐνη κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης. Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.4 του ειδικού μέρους της παρούσας διατριβής. Σαν δεύτερα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν HRP-conjugated goat anti-human IgG (γ-chain specific) (Sigma, USA) ή HRP-conjugated goat anti-human IgA (Sigma, USA).

5.3.2. Χαρτογράφηση επιτόπου των αντι-IgA PDC-E2 αντισωμάτων με *in house* ELISA

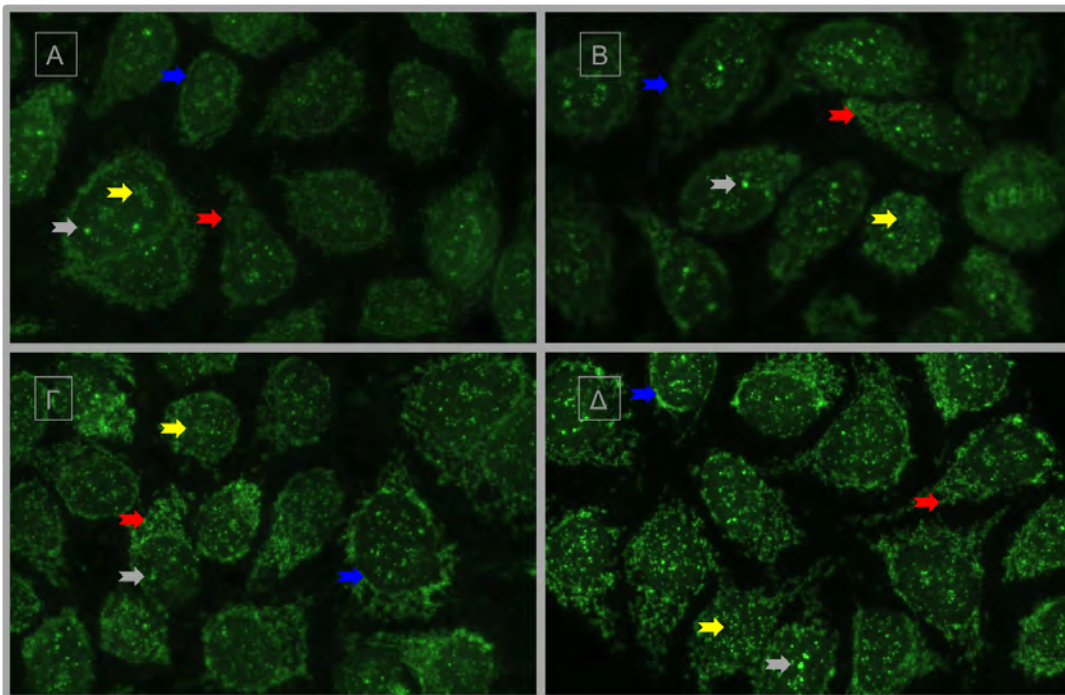
Ο αυξανόμενος τίτλος των IgA αντι-PDC-E2 αντισωμάτων σε διάστημα περίπου 2 ετών ήταν ένα καλό μοντέλο για να μελετήσουμε κατά πόσο υπάρχουν IgA γραμμικοί επιτόποι που εμφανίζονται κατά την πορεία της νόσου. Όπως έχει αναφερθεί, έχουν περιγραφεί γραμμικοί επιτόποι των IgG αντι-PDC-E2 αντισωμάτων [97] αλλά παραμένει άγνωστο κατά πόσο υπάρχουν γραμμικοί επιτόποι κατά των οποίων να στρέφονται τα IgA αντι-PDC-E2 αντισώματα. Η μεθοδολογία που ακολουθήσαμε περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.9 του Ειδικού Μέρους της διατριβής. Σε αυτά τα πειράματα ως δεύτερο αντίσωμα (conjugate) χρησιμοποιήσαμε IgA HRP αντίσωμα (Inova, San Diego, USA). Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 450 nm όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.9. Η αντιδραστικότητα του ορού στα πεπτίδια εκφράστηκε ως ο λόγος της αντιδραστικότητας στο πεπτίδιο προς την αντιδραστικότητα του ορού σε ένα πεπτίδιο ελέγχου (control peptide), $(OD)^{test}/OD^{control\ peptide}$, για την αποφυγή λανθασμένων αποτελεσμάτων λόγω μη ειδικής σύνδεσης (background).

5.4 Αποτελέσματα

5.4.1. Χαρακτηρισμός αντισωμάτων

5.4.1.α Έμμεσος Ανοσοφθορισμός (ΕΑΦ)

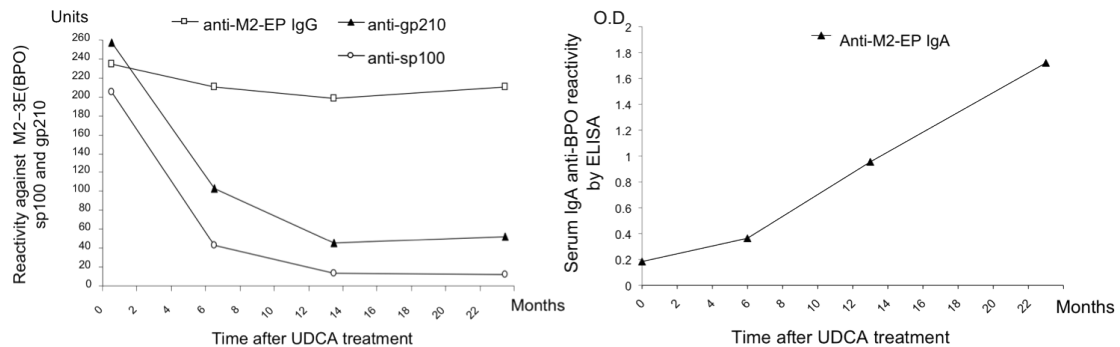
Τα AMA ανιχνεύθηκαν με την μέθοδο του ΕΑΦ τόσο σε υπόστρωμα νεφρού/στομάχου/ήπατος αρουραίου όσο και σε υπόστρωμα HEp-2 σε τίτλους 1:640. Στο υπόστρωμα HEp-2 ανιχνεύθηκαν επίσης ANA με τρία διαφορετικά πρότυπα φθορισμού (Αντικεντρομεριδιακά – anticentromere-, πολλαπλές πυρηνικές κηλίδες – multiple nuclear dots, MND ANA- και αντισώματα κατά της πυρηνικής μεμβράνης –rim like membranous, RLM ANA) όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 16. Τα αντισώματα αυτά παρέμειναν θετικά με τη μέθοδο του ΕΑΦ κατά τη πορεία της νόσου.



Εικόνα 16. Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε υπόστρωμα καρκινικής σειράς HEp2 πριν τη θεραπεία (Α), καθώς και 6 μήνες (Β), 13 μήνες (Γ) και 23 μήνες (Δ) μετά τη θεραπεία με UDCA. Με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού ελέγχονται θετικά τα AMA (κόκκινο βέλος) όσο και Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) με τρία διαφορετικά πρότυπα φθορισμού: αντισώματα κατά της πυρηνικής μεμβράνης (RLM – μπλε βέλος) και δύο διαφορετικά είδη πυρηνικών κηλίδων (γκρίζο και κίτρινο βέλος) που φανερώνει την ύπαρξη δύο διαφορετικών αντισωμάτων (Αντικεντρομεριδιακά- anticentromere και πολλαπλές πυρηνικές κουκκίδες - MND).

5.4.1.β Αποτελέσματα ελέγχου αυτοαντισωμάτων με εμπορικά διαθέσιμη ELISA

AMA τόσο κλάσης IgG όσο και κλάσης IgA ανιχνεύθηκαν με εμπορικά διαθέσιμη (M2-3E) ELISA που έχει σαν καθηλωμένο αντιγόνο την υβριδική πρωτεΐνη που περιέχει τους ανοσοεπικρατείς επιτόπους των PDC-E2, ODGC-E2 και BCOADC-E2. Οι τίτλοι των IgG AMA κατά την πρώτη επίσκεψη, 6, 13 και 23 μήνες μετά ήταν 235 RU/ml, 211 RU/ml, 198 RU/ml και 211 RU/ml αντίστοιχα (Διάγραμμα 27).



Διάγραμμα 27. Αντιδραστικότητα ορού της ασθενούς κατά των μιτοχονδριακών αντιγόνων της υβριδικής πρωτεΐνης (M2-3E), τμήματος της πρωτεΐνης Grp-210 και του ανοσοεπικρατούντος πεπτιδίου της πρωτεΐνης Sp-100 κατά την πρώτη επίσκεψη και ακολούθως 6, 13 και 23 μήνες μετά αγωγή με UDCA (Δεξιά). Η αντιδραστικότητα εκφράζεται ως Relative Units ανά ml (RU/ml). Αντιδραστικότητα μεγαλύτερη από 25 RU/ml θεωρείται θετική σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στο αριστερό μέρος παρουσιάζεται η αντιδραστικότητα των IgA AMA κατά της υβριδικής πρωτεΐνης M2-3E κατά την πρώτη επίσκεψη και ακολούθως 6, 13 και 23 μήνες μετά αγωγή με UDCA. Η αντιδραστικότητα εκφράζεται ως οπτική πυκνότητα (Optical Density, O.D). Αντιδραστικότητα μεγαλύτερη από 0.217 O.D θεωρείται θετική.

Τα IgA AMA ελέγχθηκαν αρνητικά στην πρώτη επίσκεψη της ασθενούς αλλά η αντιδραστικότητα αυξήθηκε κατά την πορεία της νόσου με αποτέλεσμα αυτά να ελέγχονται θετικά 6, 13 και 23 μήνες μετά την παρουσίαση της ασθενούς στο ιατρείο. Συγκεκριμένα η αντιδραστικότητα ελέγχθηκε ως οπτική πυκνότητα (Optical Density, O.D) και κατά την παρουσίαση, 6, 13 και 23 μήνες μετά ήταν 0.184 O.D, 0.364 O.D, 0.955 O.D και 1.720 O.D αντίστοιχα (Διάγραμμα 27). Αντιδραστικότητα μεγαλύτερη από 0.217 O.D (μέσος όρος αντιδραστικότητας υγιών μαρτύρων συν 4X σταθερή απόκλιση) θεωρείται θετική όπως αυτή περιγράφεται σε προηγούμενη μελέτη [29]. Τα αντι-Grp210 και αντι-Sp100 ελέγχθηκαν θετικά κατά την πρώτη επίσκεψη της ασθενούς αλλά ο τίτλος τους μειώθηκε κατά την πορεία της νόσου και μετά την έναρξη της ασθενούς σε θεραπεία με UDCA. Ο τίτλος των ΠΧΚ ειδικών αντισωμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 18 αλλά και γραφικά στο Διάγραμμα 27. Κανένα από τα αυτοαντισώματα κλάσης IgA αλλά και κλάσης IgG που ελέγχθηκαν κατά την πορεία της νόσου και που παρουσιάζονται στον Πίνακα 18 δεν παρουσίασε την τάση αύξησης ή μείωσης που παρουσίασαν τα IgA AMA και τα IgG ΠΧΚ ειδικά ANA αντίστοιχα, γεγονός που μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι τάσεις αυτές δεν οφείλονταν σε αυξομειώσεις των IgA ή IgG ανοσοσφαιρινών.

Πίνακας 18. Μεταβολές τίτλου αντισωμάτων κατά την πορεία παρακολούθησης.

| | Πριν τη θεραπεία | 6 μήνες μετά τη θεραπεία (UDCA) | 13 μήνες μετά τη θεραπεία (UDCA) | 23 μήνες μετά τη θεραπεία (UDCA) |
|---------------------|---------------------|---------------------------------------|--|--|
| anti-sp100 IgG | 204.4 | 43,4 | 13 | 11,7 |
| anti-gp210 IgG | 257.9 | 103,1 | 45,5 | 51,7 |
| anti-Histones IgG | 20.1 | 18.9 | 21.6 | 15.9 |
| anti-Chromatin IgG | 16.3 | 13.6 | 15.3 | 11.3 |
| anti-dsDNA IgG | 15.6 | 12.2 | 10.5 | 10 |
| anti-ssDNA IgG | 18.9 | 16.5 | 24 | 17.7 |
| anti-ENA 5 IgG | 10.4 | 9.3 | 8.8 | 8.6 |
| anti-ACA IgG | 12.94 | 12.27 | 14.44 | 11.76 |
| anti-ASCA IgG | 10.73 | 9.42 | 10.24 | 9.56 |
| anti-Ribosome P IgG | 7.6 | 7.1 | 6.8 | 6.6 |
| anti-F actin IgA | 18.4 | 17.7 | 11.1 | 8.7 |
| anti-htTG IgA | 11.6 | 11.5 | 8.7 | 8.5 |
| anti-Gliadin IgA | 15.2 | 12.8 | 10.5 | 9.4 |
| anti-β2GPI IgA | 26.85 | 29.16 | 27.74 | 25.07 |
| anti-ACA IgA | 4.25 | 4.25 | 3.86 | 3.16 |
| anti-ASCA IgA | 10.26 | 9 | 8.9 | 8.6 |

Ο τίτλος των πιο πάνω αντισωμάτων ελέγχθηκε κατά την πορεία της νόσου για να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο η όποια διακύμανση των IgG ή IgA AMA ή Sp100 και Gp210 αντισωμάτων οφειλόταν σε μη ειδική σύζευξη πολυκλωνικών αντισωμάτων λόγω υπεργαμμασφαιριναιμίας δεδομένου ότι δεν είχαμε αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού ανοσοσφαιρινών. Η αντιδραστικότητα εκφράζεται ως Relative Units ανά ml (RU/ml). Αντιδραστικότητα μεγαλύτερη από 25 RU/ml θεωρείται θετική σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα IgA anti-β2GPI θεωρήθηκαν θετικά για τιμή μεγαλύτερη από 38 RU/ml όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη μελέτη [98].

5.4.1.γ Αντι-HEp-2 cell Antigen Euroline-Western Blot.

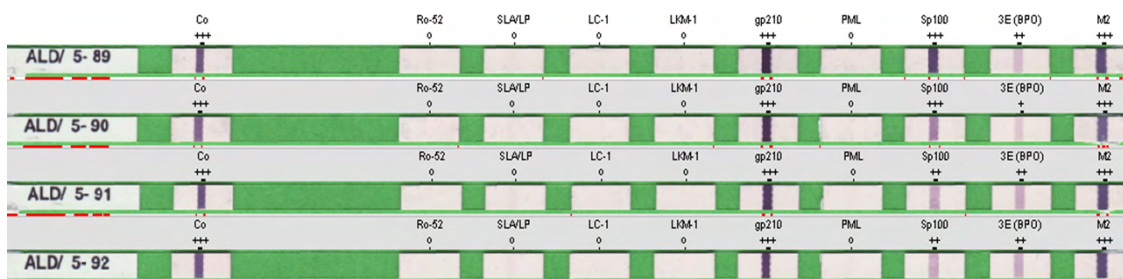


Ορατές ζώνες αντιδραστικότητας κατά των πρωτεϊνών CENP-A και CENP-B αλλά και κατά της PDC-E2 (M2 74KDa) παρατηρήθηκαν τόσο στην πρώτη επίσκεψη όσο και κατά την πορεία της νόσου. Αντισώματα κατά της PDC-E2 ανιχνεύθηκαν και με αυτή τη μέθοδο.

Εικόνα 17. Ορατές ζώνες αντιδραστικότητας κατά της ανοσοκαθλωμένης πρωτεΐνης CENP B και των ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένων πρωτεϊνών PDC-E2 (M2 74) και CENP A παρατηρήθηκαν τόσο κατά την πρώτη επίσκεψη (α) όσο και 6 (β), 13 (γ) και 23 (μηνες) μετά την έναρξη της θεραπείας.

5.4.1.δ Line Immunoassay

Η ύπαρξη IgG AMA, αντι-Sp100 και αντι-gp210 επιβεβαιώθηκε και με τη μέθοδο Line Immunoassay τόσο πριν όσο και μετά τη θεραπεία. Ενδιαφέρον στοιχείο αυτού του πειράματος είναι το γεγονός ότι τα αντι-Sp100 αντισώματα ενώ παρουσιάζουν φθίνουσα πορεία, εντούτοις παραμένουν θετικά σε αντίθεση με τα αποτελέσματα τιτλοποίησης των αντι-Sp100 αντισωμάτων με τη μέθοδο της ELISA (Βλέπε παράγραφο 5.4.1.β). Τα αποτελέσματα Line Immunoassay παρουσιάζονται στην Εικόνα 18 ενώ ο ημιποσοτικός προσδιορισμός με βάση την ένταση της παρατηρούμενης μπάντας παρουσιάζεται στον Πίνακα 19.



Εικόνα 18. Ορατές ζώνες αντιδραστικότητας κατά των ανοσοκαθληλωμένων πρωτεϊνών, gp210, Sp100, εκχυλίσματος μιτοχονδριακών αντιγόνων (M2), 3E (BPO) κατά την πρώτη επίσκεψη (ALD/5-89) όσο και 6 (ALD/5-90), 13 (ALD/5-91) και 23 (ALD/5-92) μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας.

Πίνακας 19. Αποτελέσματα ημιποσοτικού προσδιορισμού αντιδραστικότητας των ανοσοκαθληλωμένων πρωτεϊνών, gp210, Sp100, εκχυλίσματος μιτοχονδριακών αντιγόνων (M2), 3E (BPO) κατά την πρώτη επίσκεψη όσο και 6, 13 και 23 μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας.

| Χρόνος μετά τη θεραπεία (μήνες) | M2-AMA (RI) | M2-3E (BPO) (RI) | Sp100 (RI) | Gp210 (RI) |
|------------------------------------|-------------|------------------|------------|------------|
| 0 | 144 | 27 | 157 | 192 |
| 6 | 124 | 19 | 81 | 186 |
| 13 | 148 | 42 | 48 | 174 |
| 23 | 150 | 39 | 43 | 163 |

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως Relative Intensities (RI) με βάση της ένταση της παρατηρούμενης μπάντας όπως αυτή υπολογίστηκε από το πρόγραμμα EUROLiScan της κατασκευάστριας εταιρίας Euroimmun. Αποτελέσματα με $RI \leq 5$ θεωρούνται αρνητικά, $6 \leq RI \leq 10$ θεωρούνται αμφίβολα ενώ $RI \geq 11$ θεωρούνται θετικά. Τα αντι-Sp100 και αντι-gp210 Παρέμειναν θετικά αν και είχαν φθίνουσα πορεία, τα AMA παρέμειναν θετικά σε σταθερούς τίτλους ενώ τα αντι-PML, αντι-LKM-1, αντι-LC-1, αντι-SLA και αντι-Ro-52 ελέγχθηκαν αρνητικά (βλέπε εικόνα 18).

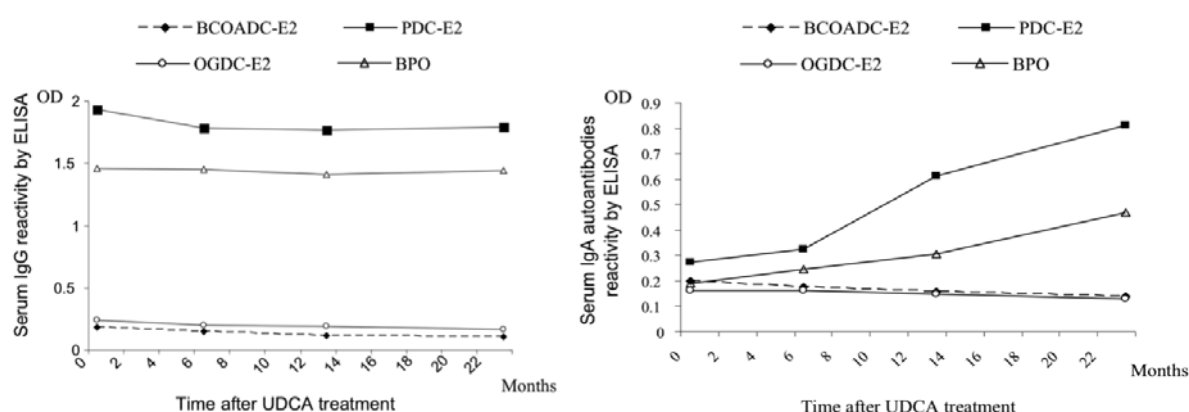
5.4.1.ε Έλεγχος αντιδραστικότητας κατά των PDC-E2, BCOADC-E2, OGDC-E2 και M2-3E(BPO) με *in house* ELISA

Όλοι οι οροί ελέγχθηκαν θετικοί για IgG αυτοαντισώματα κατά των M2-3E (BPO) και PDC-E2 αλλά όχι κατά των BCOADC-E2 και OGDC-E2 όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 28 και ο τίτλος των αντισωμάτων ήταν σταθερός κατά την πορεία της νόσου. Αντίθετα, τα IgA anti-BPO αντισώματα ελέγχθηκαν αρνητικά κατά την πρώτη επίσκεψη ενώ ελέγχθηκαν θετικά 6 μήνες μετά με τον τίτλο να αυξάνεται κατά την πορεία της νόσου. Παράλληλη πορεία είχαν και τα IgA αντι-PDC-E2 αντισώματα (Διάγραμμα 28). Η αντιδραστικότητα των ορών στα 4 αντιγόνα παρουσιάζεται στον Πίνακα 20.

Πίνακας 20. Αντιδραστικότητα ορών κατά των αντιγόνων M2-3E (BPO), PDC-E2, BCOADC-E2 και OGDC-E2 κατά την πορεία της νόσου όπως αυτά ελέγχθηκαν με *in house* ELISA.

| Μήνες μετά τη θεραπεία | IgG | | | | IgA | | | |
|------------------------|-----------|--------|---------|--------|-----------|--------|---------|--------|
| | BCOADC-E2 | PDC-E2 | OGDC-E2 | BPO | BCOADC-E2 | PDC-E2 | OGDC-E2 | BPO |
| 0 | 0.185 | 1.9305 | 0.242 | 1.464 | 0.2 | 0.274 | 0.1645 | 0.1895 |
| 6 | 0.1505 | 1.7835 | 0.2 | 1.4535 | 0.1775 | 0.3235 | 0.164 | 0.244 |
| 13 | 0.117 | 1.77 | 0.192 | 1.411 | 0.159 | 0.611 | 0.1485 | 0.308 |
| 23 | 0.107 | 1.796 | 0.1685 | 1.445 | 0.137 | 0.81 | 0.131 | 0.467 |

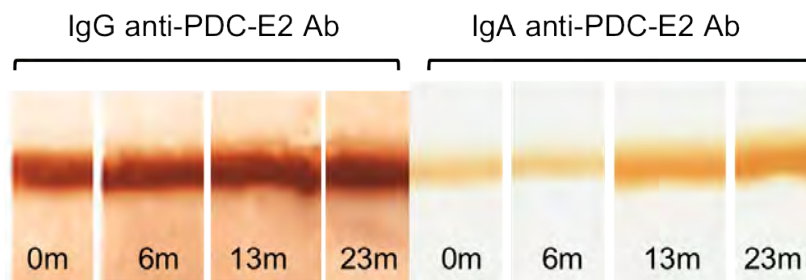
Διάγραμμα 28. IgG και IgA αντιδραστικότητα ορών κατά των αντιγόνων M2-3E (BPO), PDC-E2, BCOADC-E2 και OGDC-E2 κατά την πορεία της νόσου όπως αυτά ελέγχθηκαν με *in house* ELISA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως οπτική πυκνότητα (OD)



5.4.1.στ IgA και IgG αντι-PDC-E2 αντιδραστικότητα με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης.

Ο ορός της ασθενούς βρέθηκε θετικός τόσο για IgA όσο και για IgG αντι-PDC-E2 αντισώματα όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 19. Η παρατηρούμενη μπάντα των IgA

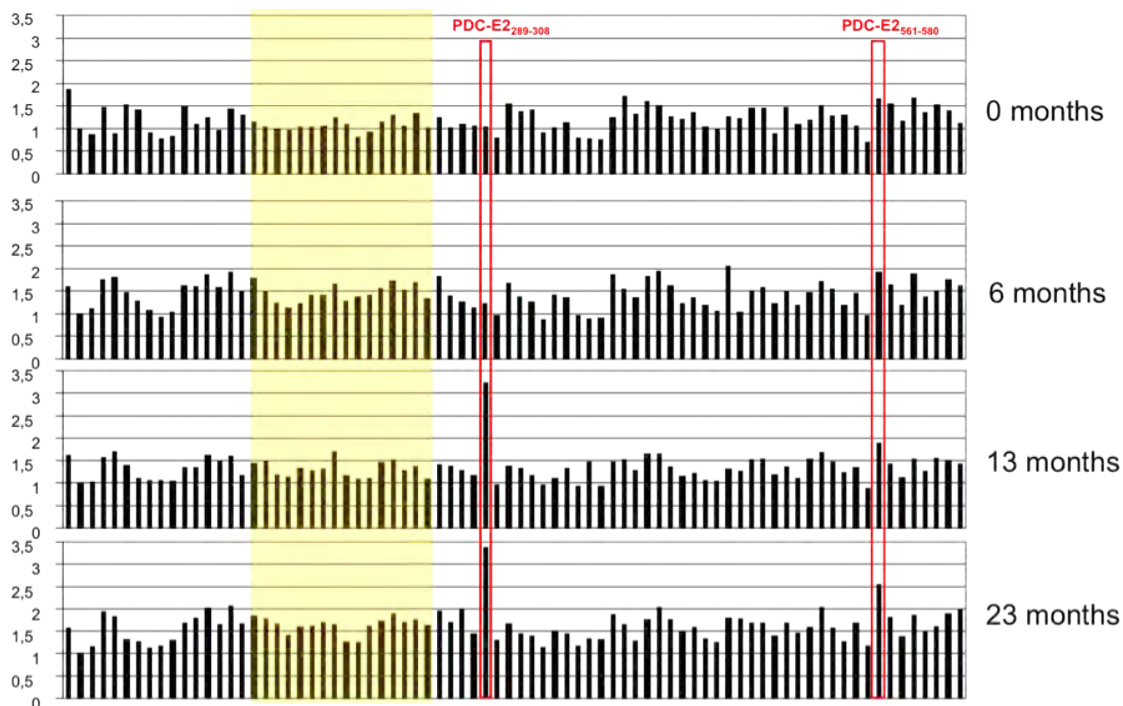
αντι-PDC-E2 αντισωμάτων αυξανόταν σε ένταση κατά την πορεία τη νόσου γεγονός που επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα του πειράματος της ELISA.



Εικόνα 19. Αποτελέσματα πειράματος ανοσοαποτύπωσης κατά του ανοσοεπικρατούντος τμήματος της PDC-E2. Αριστερά διακρίνονται οι παρατηρούμενες μπάντες όταν το συζευκτικό αντίσωμα ήταν κατά των IgG αντισωμάτων και δεξιά όταν αυτό στρεφόταν κατά των IgA αντισωμάτων.

5.4.2 Χαρτογράφηση anti-IgA PDC-E2 επιτόπων

Τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού των IgA αντι-PDC-E2 αντισωμάτων κατέδειξαν ότι ο τίτλος τους σε αυτή την ασθενή αυξάνεται κατά την πορεία της νόσου. Η αντιδραστικότητα του ορού κατά πεπτιδίων που καλύπτουν ολόκληρη την αλληλουχία της πρωτεΐνης PDC-E2 (βλέπε Πίνακα 4 και Εικόνα 11 στο Κεφάλαιο 3 του ειδικού μέρους) μελετήθηκε τόσο κατά την αρχική πρώτη επίσκεψη της ασθενούς στην κλινική όσο και 6, 13 και 23 μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας με UDCA. Όπως παρουσιάζεται γραφικά στο Διάγραμμα 29, κατά την πορεία της νόσου η αντιδραστικότητα κατά των πεπτιδίων PDC-E2₂₈₉₋₃₀₈ (TPPPVAAVPPTPQPLAPTPS) και PDC-E2₅₆₁₋₅₈₀ (EDKLV PADNEKGF DVASMMS) έβαινε σταδιακά αυξανόμενη. Τα πεπτίδια αυτά δεν αποτελούν μέρος του τμήματος της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της ανοσοαποτύπωσης όπως αυτά παρουσιάζονται στην Παράγραφο 5.4.1.στ.



Διάγραμμα 29. Αντιδραστικότητα του ορού κατά πεπτιδίων που καλύπτουν ολόκληρη την αλληλουχία της πρωτεΐνης PDC-E2 τόσο κατά την πρώτη επίσκεψη της ασθενούς στην κλινική όσο και 6, 13 και 23 μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας. Η αντιδραστικότητα εκφράσθηκε ως ο λόγος της οπτικής πυκνότητας που παρατηρήθηκε κατά του ελεγχόμενου πεπτιδίου σε σχέση με την οπτική πυκνότητα που παρατηρήθηκε κατά του control πεπτιδίου ($OD^{test}/OD^{control\ peptide}$). Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, δύο πεπτιδίδια παρουσίασαν αυξανόμενη αντιδραστικότητα κατά την πορεία της νόσου. Σε κίτρινο φόντο παρουσιάζεται το τμήμα εκείνο της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της ανοσοαποτύπωσης.

5.5. Συζήτηση

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζουμε μια περίπτωση ασθενούς με ΠΧΚ που διαγνώσθηκε μετά από ένα επεισόδιο κοιλιακού άλγους και όπου οι ηπατικοί δείκτες (κυρίως τα χολοστατικά ένζυμα) ήταν παθολογικοί. Η ασθενής βρέθηκε θετική τόσο για IgG όσο και για IgA AMA όσο και για ANA ειδικά για την ΠΧΚ (anti-sp100, anti-gr210) καθώς και για ANA μη ειδικά της ΠΧΚ (anticentromere A και B).

Τα ειδικά για τη νόσο ANA ελέγχθηκαν θετικά με τη μέθοδο του ΕΑΦ (πρότυπα Multiple Nuclear Dots και Rim Like Membranous). Τα anti-sp100 και anti-gr210 επιβεβαιώθηκαν θετικά σε υψηλούς τίτλους κατά την πρώτη επίσκεψη. Με ΕΑΦ βρέθηκαν επίσης θετικά τα αντικεντρομεριδιακά αντισώματα και η παρουσία τους επιβεβαιώθηκε με μοριακές μεθόδους (Anti-HEp-2 cell Antigen Euroline-Western Blot). Τα ειδικά για την ΠΧΚ ANA (anti-sp100 και anti-gr210) σχετίζονται με χειρότερη εξέλιξη της νόσου [92, 93] και για αυτό το λόγο παρακολουθήσαμε τους τίτλους κατά την κλινική πορεία. Ο τίτλος τόσο των anti-sp100 όσο και των anti-gr210 μειωνόταν κατά την πορεία της νόσου και μετά την έναρξη της θεραπείας με UDCA με τα δε anti-Sp100 να αρνητικοποιούνται 13 και 23

μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας όταν αυτά ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της ELISA. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η αντιδραστικότητα των αντι-Sp100, όταν αυτή ελέγχθηκε με Line Immunoassay, έδειξε επίσης παρόμοια συμπεριφορά αλλά ο τίτλος των αντι-Sp100 αντισωμάτων ποτέ δεν αρνητικοποιήθηκε υποδεικνύοντας μια πολυκλωνική χυμική απάντηση όπως θα συζητηθεί πιο κάτω. Τα ΠΧΚ ειδικά ANA δυνατόν να αυξομειώνονται κατά την πορεία της νόσου αλλά σπάνια αρνητικοποιούνται, ακόμα και μετά τη μεταμόσχευση ήπατος [91]. Οι Szosteck *et al* έχουν χρησιμοποιήσει πολλαπλά ανασυνδισμένα τμήματα της Sp100 πρωτεΐνης για να χαρτογραφήσουν τους επιτόπους που εμπλέκονται στην anti-Sp100 χυμική ανοσολογική απόκριση. Οι οροί 55 αντι-sp100 θετικών αρρώστων με ΠΧΚ έδειξαν μια ετερογενή και πολυ-ειδική ανοσολογική απόκριση. Ο ορός κάθε ασθενούς παρουσίασε αντιδραστικότητα κατά τουλάχιστον δύο ή τριών αντιγονικών τόπων υποδηλώνοντας ότι περισσότεροι από ένας Β κυτταρικοί κλώνοι εμπλέκονται στην παραγωγή αυτών των αντισωμάτων ή ότι υπάρχει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ ενός ή περισσότερων επικρατούντων αντιγονικών τόπων με άλλα τμήματα της πρωτεΐνης. Σε αυτή την μελέτη ο κύριος αντιγονικός επίτοπος εντοπίστηκε στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης ενώ και άλλοι επίτοποι εντοπίστηκαν σε σχεδόν κάθε δυνατό τμήμα της πρωτεΐνης. Η αντιδραστικότητα κάποιων ορών δε, υποδήλωνε και την παρουσία στερεοτακτικών επιτόπων [95]. Εφτά χρόνια αργότερα οι Blüthner *et al* χαρακτήρισαν μια γραμμική πεπτιδική δομή 16 αμινοξέων στη θέση 296-311 ως τον κύριο αντιγονικό επίτοπο του sp100 αυτοαντιγόνου [94]. Η εμπορικά διαθέσιμη ELISA που χρησιμοποιήσαμε για την ανίχνευση των αντι-Sp100 (Quanta Lite Sp100 kit, INOVA Diagnostics) έχει ως καθηλωμένο αντιγόνο διάφορα πολυπεπτιδικά τμήματα που περιέχονται εντός της 240–474 περιοχής της πρωτεΐνης [99]. Το καθηλωμένο Sp-100 αντιγόνο στην γραμμική ανοσοαποτύπωση- Line Immunoassay (Profile Autoimmune Liver Diseases EUROline, EUROIMMUN, Lumbeck, Germany) από την άλλη, είναι μια κλωνοποιημένη και εκφραζόμενη σε *E. coli* πρωτεϊνική δομή 422 αμινοξέων (1-421αα) [100]. Κατά την πορεία της νόσου στη συγκεκριμένη ασθενή η αντιδραστικότητα έναντι του τμήματος 240-474αα εξασθένησε και αρνητικοποιήθηκε ενώ η αντιδραστικότητα κατά του τμήματος 1-421αα της πρωτεΐνης εξασθένησε αλλά παρέμεινε θετική. Παρόλο που δεν μπορούν να συγκριθούν με ασφάλεια ποσοτικές με ημιποσοτικές (ποιοτικές) μεθόδους, η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να ερμηνευθεί στα πλαίσια μιας πολυκλωνικής Β-κυτταρικής αντιδραστικότητας η οποία, κατά την πορεία της νόσου και μετά την έναρξη της θεραπείας, τροποποιήθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε Β-λεμφοκυτταρικοί κλώνοι που αναγνώριζαν το τμήμα 240-474αα περιήλθαν σε ανεργία ενώ Β-κυτταρικοί κλώνοι που αναγνώριζαν το τμήμα 1-239αα ή/και το τμήμα 422-474 παρέμειναν ενεργοί. Η ύπαρξη

ενός στερεοτακτικού επιτόπου επίσης δεν θα μπορούσε να αποκλειστεί. Προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η αυτοάνοση αντιδραστικότητα κατά συγκεκριμένων επιτόπων εντός της Sp100 πρωτεΐνης δυνατόν να αλλάξει κατά την εξέλιξη της νόσου, ακόμη και εντός 12 μηνών μετά την έναρξη της θεραπείας με UDCA και το πρότυπο της αλλαγής της αντιδραστικότητας διαφέρει από ασθενή σε ασθενή [101]. Η αντιδραστικότητα όμως κατά ολόκληρης της πρωτεΐνης δε διαφοροποιείται. Με αυτά τα δεδομένα, μια αλλαγή στην ανοσολογική απόκριση λόγω της θεραπείας με UDCA (immunomodulatory effect of UDCA) [102-107] θα μπορούσε να εξηγήσει πώς κάποιοι B κυτταρικοί κλώνοι που παράγουν IgG αντισώματα κατά συγκεκριμένων αλληλουχιών αμινοξέων εντός των πρωτεϊνών Sp100 και gp210 καθίστανται ανενεργοί [104] και παρατηρούνται οι περιγραφόμενες αλλαγές στην αντιδραστικότητα των αντι-Sp100 και αντι-gp210 όταν αυτές ελέγχονται με ELISA ή με line immunoassay.

Κατά την πορεία της νόσου σε αυτή την ασθενή παρακολουθήσαμε την εξέλιξη τόσο των IgA όσο και των IgG AMA και παρατηρήσαμε προοδευτικά αυξανόμενους τίτλους IgA AMA σε μια περίοδο 23 μηνών. Η αυξανόμενη αυτή αντιδραστικότητα οφειλόταν στους αυξανόμενους τίτλους των αντι-PDC-E2 αντισωμάτων αλλά όχι των αντι-OGDC-E2 ή αντι-BCOADC-E2. Οι αυξανόμενοι τίτλοι των IgA AMA προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας μια υβριδική πρωτεΐνη που περιέχει τα ανοσοεπικρατή τμήματα των PDC-E2, BCOADC-E2 και OGDC-E2 πρωτεϊνών [13] όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί [29]. Η αντιδραστικότητα κατά τμημάτων των επιμέρους πρωτεϊνών PDC-E2, BCOADC-E2 και OGDC-E2 με μια *in house* ELISA έδειξε ότι η αντιδραστικότητα των IgA AMA αυξάνεται λόγω των αυξανόμενων τίτλων των αντι-PDC-E2 αντισωμάτων. Ο αυξανόμενος τίτλος των IgA αντι-PDC-E2 αντισωμάτων επιβεβαιώθηκε και με ανοσοαποτύπωση. Με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης και οι τέσσερις οροί ελέγχθηκαν θετικοί με σταδιακά αυξανόμενη αντιδραστικότητα. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδήγησαν στην αναζήτηση γραμμικών επιτόπων με τη χρήση αλληλοεπικαλυπτόμενων πεπτιδίων που καλύπτουν ολόκληρη την PDC-E2 πρωτεΐνη. Γραμμικοί IgA επιτόποι έχουν επίσης αναγνωρισθεί σε ασθενείς με κοιλιοκάκη [108]. Στα πειράματα αναζήτησης αντιδραστικότητας έναντι γραμμικών επιτόπων παρατηρήθηκε προοδευτικά αυξανόμενη αντιδραστικότητα κατά των πεπτιδίων PDC-E2₂₈₉₋₃₀₈ (TRPPVAAVPPTPQPLAPTPS) και PDC-E2₅₆₁₋₅₈₀ (EDKLV PADNEKGF DVASMMS). Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι τα δύο αυτά πεπτίδια δεν περιέχονται στο τμήμα της PDC-E2 πρωτεΐνης που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης και ELISA. Η αντιδραστικότητα σε κανένα από τα πεπτίδια που περιέχονται σε αυτό το τμήμα της πρωτεΐνης δεν αυξήθηκε κατά την πορεία της νόσου οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι ο επίτοπος στο έσω λιποϋλικό τμήμα της PDC-E2 είναι στερεοτακτικός

ενώ υπάρχουν γραμμικοί επίτοποι στο καταλυτικό τμήμα της πρωτεΐνης.

Τα αποτελέσματα αυτά προέρχονται από τη μελέτη ορών μόνο μιας ασθενούς. Μελέτες με ορούς από περισσότερους αρρώστους με ΠΧΚ χρειάζονται για το μελλοντικό χαρακτηρισμό των IgA αντι-PDC-E2 αντισωμάτων.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

- [1] Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med*. 2005 Sep 22;353(12):1261-73.
- [2] Bogdanos DP, Baum H, Vergani D. Antimitochondrial and other autoantibodies. *Clin Liver Dis*. 2003 Nov;7(4):759-77, vi.
- [3] Neuberger J. Primary biliary cirrhosis. *Lancet*. 1997 Sep 20;350(9081):875-9.
- [4] Gershwin ME, Mackay IR. Primary biliary cirrhosis: paradigm or paradox for autoimmunity. *Gastroenterology*. 1991 Mar;100(3):822-33.
- [5] Mitchison HC, Bassendine MF, Hendrick A, Bennett MK, Bird G, Watson AJ, et al. Positive antimitochondrial antibody but normal alkaline phosphatase: is this primary biliary cirrhosis? *Hepatology*. 1986 Nov-Dec;6(6):1279-84.
- [6] Metcalf JV, Mitchison HC, Palmer JM, Jones DE, Bassendine MF, James OFW. Natural history of early primary biliary cirrhosis. *Lancet*. 1996;348(9039):1399-402.
- [7] Prince M, Chetwynd A, Newman W, Metcalf JV, James OFW. 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):1044-51.
- [8] Vergani D, Choudhuri K, Bogdanos DP, Mieli-Vergani G. Pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Clin Liver Dis*. 2002 Aug;6(3):727-37.
- [9] Tsuneyama K, Van de Water J, Leung PS, Cha S, Nakanuma Y, Kaplan M, et al. 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 Apr;21(4):1031-7.
- [10] Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Hayashida K, Niho Y. HLA DRB4 0101-restricted immunodominant T cell autoepitope of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: Evidence of molecular mimicry in human autoimmune diseases. *Journal of Experimental Medicine*. 1995;181(5):1835-45.
- [11] Rigopoulou EI, Dalekos GN. Molecular diagnostics of primary biliary cirrhosis. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*. 2008 2011/05/16;2(6):621-34.
- [12] Rigopoulou EI, Bogdanos DP, Liaskos C, Koutsoumpas A, Baum H, Vergani D, et al. Anti-mitochondrial antibody immunofluorescent titres correlate with the number and intensity of immunoblot-detected mitochondrial bands in patients with primary biliary cirrhosis. *Clin Chim Acta*. 2007 May 1;380(1-2):118-21.
- [13] Moteki S, Leung PS, Coppel RL, Dickson ER, Kaplan MM, Munoz S, et al. Use of a designer triple expression hybrid clone for three different lipoyl domain for the detection of antimitochondrial autoantibodies. *Hepatology*. 1996 Jul;24(1):97-103.
- [14] Van De Water J, Ansari A, Prindiville T, Coppel RL, Ricalton N, Kotzin BL, et al. Heterogeneity of autoreactive T cell clones specific for the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis. *Journal of Experimental Medicine*. 1995;181(2):723-33.
- [15] Begovich AB, Klitz W, Moonsamy PV, Van De Water J, Peltz G, Gershwin ME. Genes within the HLA class II region confer both predisposition and resistance to primary biliary cirrhosis. *Tissue Antigens*. 1994;43(2):71-7.
- [16] Gores GJ, Moore SB, Fisher LD. Primary biliary cirrhosis: Associations with Class II major histocompatibility complex antigens. *Hepatology*. 1987;7(5):889-92.
- [17] Manns MP, Kruger M. Immunogenetics of chronic liver diseases. *Gastroenterology*. 1994;106(6):1676-97.
- [18] Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 1999 Nov;50(3-4):213-9.
- [19] Reche PA, Glutting JP, Reinherz EL. Prediction of MHC class I binding peptides using profile motifs. *Hum Immunol*. 2002 Sep;63(9):701-9.
- [20] Reche PA, Glutting JP, Zhang H, Reinherz EL. Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles. *Immunogenetics*. 2004 Sep;56(6):405-19.

- [21] Van de Water J, Gershwin ME, Leung P, Ansari A, Coppel RL. The autoepitope of the 74-kD mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis corresponds to the functional site of dihydrolipoamide acetyltransferase. *J Exp Med*. 1988 Jun 1;167(6):1791-9.
- [22] Surh CD, Coppel R, Gershwin ME. Structural requirement for autoreactivity on human pyruvate dehydrogenase-E2, the major autoantigen of primary biliary cirrhosis. Implication for a conformational autoepitope. *J Immunol*. 1990 May 1;144(9):3367-74.
- [23] Surh CD, Ahmed-Ansari A, Gershwin ME. Comparative epitope mapping of murine monoclonal and human autoantibodies to human PDH-E2, the major mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis. *J Immunol*. 1990 Apr 1;144(7):2647-52.
- [24] Braun S, Berg C, Buck S, Gregor M, Klein R. Catalytic domain of PDC-E2 contains epitopes recognized by antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2010 Feb 28;16(8):973-81.
- [25] Shimoda S, Miyakawa H, Nakamura M, Ishibashi H, Kikuchi K, Kita H, et al. CD4 T-cell autoreactivity to the mitochondrial autoantigen PDC-E2 in AMA-negative primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*. 2008 Sep;31(2):110-5.
- [26] Ma Y, Bogdanos DP, Hussain MJ, Underhill J, Bansal S, Longhi MS, et al. Polyclonal T-cell responses to cytochrome P450IID6 are associated with disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Gastroenterology*. 2006 Mar;130(3):868-82.
- [27] Gatselis NK, Georgiadou SP, Koukoulis GK, Tassopoulos N, Zachou K, Liaskos C, et al. Clinical significance of organ- and non-organ-specific autoantibodies on the response to anti-viral treatment of patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006 Dec;24(11-12):1563-73.
- [28] Zografos TA, Gatselis N, Zachou K, Liaskos C, Gabeta S, Koukoulis GK, et al. Primary biliary cirrhosis-specific autoantibodies in first degree relatives of Greek primary biliary cirrhosis patients. *World J Gastroenterol*. 2012 Sep 14;18(34):4721-8.
- [29] Gabeta S, Norman GL, Liaskos C, Papamichalis PA, Zografos T, Garagounis A, et al. Diagnostic relevance and clinical significance of the new enhanced performance M2 (MIT3) ELISA for the detection of IgA and IgG antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *J Clin Immunol*. 2007 Jul;27(4):378-87.
- [30] Gatselis NK, Zachou K, Norman GL, Gabeta S, Papamichalis P, Koukoulis GK, et al. Clinical significance of the fluctuation of primary biliary cirrhosis-related autoantibodies during the course of the disease. *Autoimmunity*. 2013 Nov;46(7):471-9.
- [31] Sitaru C, Dahnrich C, Probst C, Komorowski L, Blocker I, Schmidt E, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. *Exp Dermatol*. 2007 Sep;16(9):770-7.
- [32] Dahnrich C, Pares A, Caballeria L, Rosemann A, Schlumberger W, Probst C, et al. New ELISA for detecting primary biliary cirrhosis-specific antimitochondrial antibodies. *Clin Chem*. 2009 May;55(5):978-85.
- [33] Rist MJ, Theodosis A, Croft NP, Neller MA, Welland A, Chen Z, et al. HLA peptide length preferences control CD8+ T cell responses. *J Immunol*. 2013 Jul 15;191(2):561-71.
- [34] Malherbe L. T-cell epitope mapping. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2009 Jul;103(1):76-9.
- [35] Heuzenroeder MW, Barton MD, Vanniasinkam T, Phumoonna T. Linear B-cell epitope mapping using enzyme-linked immunosorbent assay for libraries of overlapping synthetic peptides. *Methods Mol Biol*. 2009;524:137-44.
- [36] Kerkar N, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdanos DP, Muratori L, et al. Cytochrome P4502D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol*. 2003 Feb 1;170(3):1481-9.
- [37] Grout B, Morris J, McLellan M. Cryopreservation and the maintenance of cell lines. *Trends Biotechnol*. 1990 Oct;8(10):293-7.
- [38] Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*. 1977 Jun;14(3):251-72.
- [39] Sedgwick JD, Holt PG. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*. 1983 Feb 25;57(1-3):301-9.
- [40] Overton WR. Modified histogram subtraction technique for analysis of flow cytometry data. *Cytometry*. 1988 Nov;9(6):619-26.
- [41] Roederer M, Treister A, Moore W, Herzenberg LA. Probability binning comparison: a metric for quantitating univariate distribution differences. *Cytometry*. 2001 Sep 1;45(1):37-46.
- [42] Cox C, Reeder JE, Robinson RD, Suppes SB, Wheelless LL. Comparison of frequency

- distributions in flow cytometry. *Cytometry*. 1988 Jul;9(4):291-8.
- [43] Lyons AB, Doherty KV. Flow cytometric analysis of cell division by dye dilution. *Curr Protoc Cytom*. 2004 Feb;Chapter 9:Unit 9 11.
- [44] Gershwin ME, Mackay IR, Sturgess A, Coppel RL. Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis. *J Immunol*. 1987 May 15;138(10):3525-31.
- [45] Rodda SJ. Peptide libraries for T cell epitope screening and characterization. *J Immunol Methods*. 2002 Sep 1;267(1):71-7.
- [46] Andersen MH, Tan L, Sondergaard I, Zeuthen J, Elliott T, Haurum JS. Poor correspondence between predicted and experimental binding of peptides to class I MHC molecules. *Tissue Antigens*. 2000 Jun;55(6):519-31.
- [47] Goulder PJ, Addo MM, Altfeld MA, Rosenberg ES, Tang Y, Govender U, et al. Rapid definition of five novel HLA-A*3002-restricted human immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte epitopes by elispot and intracellular cytokine staining assays. *J Virol*. 2001 Feb;75(3):1339-47.
- [48] Chen M, Shirai M, Liu Z, Arichi T, Takahashi H, Nishioka M. Efficient class II major histocompatibility complex presentation of endogenously synthesized hepatitis C virus core protein by Epstein-Barr virus-transformed B-lymphoblastoid cell lines to CD4(+) T cells. *J Virol*. 1998 Oct;72(10):8301-8.
- [49] Janetzki S, Song P, Gupta V, Lewis JJ, Houghton AN. Insect cells as HLA-restricted antigen-presenting cells for the IFN-gamma elispot assay. *J Immunol Methods*. 2000 Feb 3;234(1-2):1-12.
- [50] Van der Zee R, Van Eden W, Meloen RH, Noordzij A, Van Embden JD. Efficient mapping and characterization of a T cell epitope by the simultaneous synthesis of multiple peptides. *Eur J Immunol*. 1989 Jan;19(1):43-7.
- [51] Brett SJ, Blau J, Hughes-Jenkins CM, Rhodes J, Liew FY, Tite JP. Human T cell recognition of influenza A nucleoprotein. Specificity and genetic restriction of immunodominant T helper cell epitopes. *J Immunol*. 1991 Aug 1;147(3):984-91.
- [52] Reece JC, Geysen HM, Rodda SJ. Mapping the major human T helper epitopes of tetanus toxin. The emerging picture. *J Immunol*. 1993 Dec 1;151(11):6175-84.
- [53] Harris DP, Vordermeier HM, Arya A, Moreno C, Ivanyi J. Permissive recognition of a mycobacterial T-cell epitope: localization of overlapping epitope core sequences recognized in association with multiple major histocompatibility complex class II I-A molecules. *Immunology*. 1995 Apr;84(4):555-61.
- [54] Chen Y, Boros DL. Identification of the immunodominant T cell epitope of p38, a major egg antigen, and characterization of the epitope-specific Th responsiveness during murine schistosomiasis mansoni. *J Immunol*. 1998 Jun 1;160(11):5420-7.
- [55] Reece JC, McGregor DL, Geysen HM, Rodda SJ. Scanning for T helper epitopes with human PBMC using pools of short synthetic peptides. *J Immunol Methods*. 1994 Jun 24;172(2):241-54.
- [56] Perlaza BL, Sauzet JP, Balde AT, Brahimi K, Tall A, Corradin G, et al. Long synthetic peptides encompassing the Plasmodium falciparum LSA3 are the target of human B and T cells and are potent inducers of B helper, T helper and cytolytic T cell responses in mice. *Eur J Immunol*. 2001 Jul;31(7):2200-9.
- [57] Carson RT, Desai DD, Vignali KM, Vignali DA. Immunoregulation of Th cells by naturally processed peptide antagonists. *J Immunol*. 1999 Jan 1;162(1):1-4.
- [58] Amano K, Leung PS, Rieger R, Quan C, Wang X, Marik J, et al. Chemical xenobiotics and mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis: identification of antibodies against a common environmental, cosmetic, and food additive, 2-octynoic acid. *J Immunol*. 2005 May 1;174(9):5874-83.
- [59] Bellucci R, Oertelt S, Gallagher M, Li S, Zorn E, Weller E, et al. Differential epitope mapping of antibodies to PDC-E2 in patients with hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and primary biliary cirrhosis. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):2001-7.
- [60] Fussey SP, Ali ST, Guest JR, James OF, Bassendine MF, Yeaman SJ. Reactivity of primary biliary cirrhosis sera with Escherichia coli dihydrolipoamide acetyltransferase (E2p): characterization of the main immunogenic region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 May;87(10):3987-91.
- [61] Gershwin ME, Ansari AA, Mackay IR, Nakanuma Y, Nishio A, Rowley MJ, et al. Primary biliary cirrhosis: An orchestrated immune response against epithelial cells. *Immunological*

Reviews. 2000;174:210-25.

- [62] Koike K, Ishibashi H, Koike M. Immunoreactivity of porcine heart dihydrolipoamide acetyl- and succinyl-transferases (PDC-E2, OGDC-E2) with primary biliary cirrhosis sera: characterization of the autoantigenic region and effects of enzymatic delipoylation and relipoylation. *Hepatology*. 1998 Jun;27(6):1467-74.
- [63] Yeaman SJ, Fussey SP, Danner DJ, James OF, Mutimer DJ, Bassendine MF. Primary biliary cirrhosis: identification of two major M2 mitochondrial autoantigens. *Lancet*. 1988 May 14;1(8594):1067-70.
- [64] Tuailon N, Andre C, Briand JP, Penner E, Muller S. A lipoyl synthetic octadecapeptide of dihydrolipoamide acetyltransferase specifically recognized by anti-M2 autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *J Immunol*. 1992 Jan 15;148(2):445-50.
- [65] Mackay IR, Whittingham S, Fida S, Myers M, Ikuno N, Gershwin ME, et al. The peculiar autoimmunity of primary biliary cirrhosis. *Immunol Rev*. 2000 Apr;174:226-37.
- [66] Gershwin ME, Ansari AA, Mackay IR, Nakanuma Y, Nishio A, Rowley MJ, et al. Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells. *Immunol Rev*. 2000 Apr;174:210-25.
- [67] Koike K, Ohta S, Urata Y, Kagawa Y, Koike M. Cloning and sequencing of cDNAs encoding alpha and beta subunits of human pyruvate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jan;85(1):41-5.
- [68] Janeway C. *Immunobiology : the immune system in health and disease*. 6th ed. New York: Garland Science 2005.
- [69] Pollard KM. *Autoantibodies and autoimmunity : molecular mechanisms in health and disease*. Weinheim: Wiley-VCH 2006.
- [70] Lo Conte L, Chothia C, Janin J. The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol*. 1999 Feb 5;285(5):2177-98.
- [71] MacCallum RM, Martin AC, Thornton JM. Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol*. 1996 Oct 11;262(5):732-45.
- [72] Rini JM, Schulze-Gahmen U, Wilson IA. Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition. *Science*. 1992 Feb 21;255(5047):959-65.
- [73] Stanfield RL, Fieser TM, Lerner RA, Wilson IA. Crystal structures of an antibody to a peptide and its complex with peptide antigen at 2.8 Å. *Science*. 1990 May 11;248(4956):712-9.
- [74] Kamihira T, Shimoda S, Harada K, Kawano A, Handa M, Baba E, et al. Distinct costimulation dependent and independent autoreactive T-cell clones in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2003 Nov;125(5):1379-87.
- [75] Shimoda S, Ishikawa F, Kamihira T, Komori A, Niiro H, Baba E, et al. Autoreactive T-cell responses in primary biliary cirrhosis are proinflammatory whereas those of controls are regulatory. *Gastroenterology*. 2006 Aug;131(2):606-18.
- [76] Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Kawano A, Kamihira T, Sakamoto N, et al. Molecular mimicry of mitochondrial and nuclear autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2003 Jun;124(7):1915-25.
- [77] Shimoda S, Nakamura M, Shigematsu H, Tanimoto H, Gushima T, Gershwin ME, et al. Mimicry peptides of human PDC-E2 163-176 peptide, the immunodominant T-cell epitope of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2000 Jun;31(6):1212-6.
- [78] Shimoda S, Van de Water J, Ansari A, Nakamura M, Ishibashi H, Coppel RL, et al. Identification and precursor frequency analysis of a common T cell epitope motif in mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest*. 1998 Nov 15;102(10):1831-40.
- [79] Kalyuzhny AE. *Handbook of elispot : methods and protocols*. New York: Springer 2011.
- [80] Gallegos AM, Bevan MJ. Central tolerance: good but imperfect. *Immunol Rev*. 2006 Feb;209:290-6.
- [81] Mazza G, Ponsford M, Lowrey P, Campbell MJ, Zajicek J, Wraith DC. Diversity and dynamics of the T-cell response to MBP in DR2+ve individuals. *Clin Exp Immunol*. 2002 Jun;128(3):538-47.
- [82] Kaufmann DE, Bailey PM, Sidney J, Wagner B, Norris PJ, Johnston MN, et al. Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4 responses reveals marked immunodominance of gag and nef and the presence of broadly recognized peptides. *J Virol*. 2004 May;78(9):4463-77.
- [83] Lauer GM, Barnes E, Lucas M, Timm J, Ouchi K, Kim AY, et al. High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 2004 Sep;127(3):924-36.
- [84] Mazzanti B, Hemmer B, Traggiai E, Ballerini C, McFarland HF, Massacesi L, et al.

Deciphering the spectrum of antigen-specific T-cell responses: the avidity repertoire of MBP-specific T-cells. *J Neurosci Res.* 2000 Jan 1;59(1):86-93.

[85] Liu H, Norman GL, Shums Z, Worman HJ, Krawitt EL, Bizzaro N, et al. PBC screen: an IgG/IgA dual isotype ELISA detecting multiple mitochondrial and nuclear autoantibodies specific for primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* Dec;35(4):436-42.

[86] Omagari K, Kadokawa Y, Nakamura M, Akazawa S, Ohba K, Ohnita K, et al. IgA class antibodies to 2-oxo-acid dehydrogenase complex are not predictive markers of histopathological progression in primary biliary cirrhosis. *Autoimmunity.* 2006 Mar;39(2):107-12.

[87] Tanaka A, Nezu S, Uegaki S, Mikami M, Okuyama S, Kawamura N, et al. The clinical significance of IgA antimitochondrial antibodies in sera and saliva in primary biliary cirrhosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Jun;1107:259-70.

[88] Worman HJ. Nuclear envelope protein autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res.* 2007 Oct;37 Suppl 3:S406-11.

[89] Lassoued K, Brenard R, Degos F, Courvalin JC, Andre C, Danon F, et al. Antinuclear antibodies directed to a 200-kilodalton polypeptide of the nuclear envelope in primary biliary cirrhosis. A clinical and immunological study of a series of 150 patients with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology.* 1990 Jul;99(1):181-6.

[90] Lozano F, Pares A, Borche L, Plana M, Gallart T, Rodes J, et al. Autoantibodies against nuclear envelope-associated proteins in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 1988 Jul-Aug;8(4):930-8.

[91] Luettig B, Boeker KH, Schoessler W, Will H, Loges S, Schmidt E, et al. The antinuclear autoantibodies Sp100 and gp210 persist after orthotopic liver transplantation in patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 1998 May;28(5):824-8.

[92] Nakamura M, Kondo H, Mori T, Komori A, Matsuyama M, Ito M, et al. Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2007 Jan;45(1):118-27.

[93] Rigopoulou EI, Davies ET, Pares A, Zachou K, Liaskos C, Bogdanos DP, et al. Prevalence and clinical significance of isotype specific antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Gut.* 2005 Apr;54(4):528-32.

[94] Bluthner M, Schafer C, Schneider C, Bautz FA. Identification of major linear epitopes on the sp100 nuclear PBC autoantigen by the gene-fragment phage-display technology. *Autoimmunity.* 1999;29(1):33-42.

[95] Szostecki C, Will H, Netter HJ, Guldner HH. Autoantibodies to the nuclear Sp100 protein in primary biliary cirrhosis and associated diseases: epitope specificity and immunoglobulin class distribution. *Scand J Immunol.* 1992 Oct;36(4):555-64.

[96] Agmon-Levin N, Shapira Y, Selmi C, Barzilai O, Ram M, Szyper-Kravitz M, et al. A comprehensive evaluation of serum autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* Feb;34(1):55-8.

[97] Braun S, Berg C, Buck S, Gregor M, Klein R. Catalytic domain of PDC-E2 contains epitopes recognized by antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol.* Feb 28;16(8):973-81.

[98] Gabeta S, Norman GL, Gatselis N, Liaskos C, Papamichalis PA, Garagounis A, et al. IgA anti-b2GPI antibodies in patients with autoimmune liver diseases. *J Clin Immunol.* 2008 Sep;28(5):501-11.

[99] Manuel Lucena J, Montes Cano M, Luis Caro J, Respaldiza N, Alvarez A, Sanchez-Roman J, et al. Comparison of two ELISA assays for anti-Sp100 determination. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Aug;1109:203-11.

[100] Mytilinaiou MG, Meyer W, Scheper T, Rigopoulou EI, Probst C, Koutsoumpas AL, et al. Diagnostic and clinical utility of antibodies against the nuclear body promyelocytic leukaemia and Sp100 antigens in patients with primary biliary cirrhosis. *Clin Chim Acta.* 2012 Aug 16;413(15-16):1211-6.

[101] Zuchner D, Sternsdorf T, Szostecki C, Heathcote EJ, Cauch-Dudek K, Will H. Prevalence, kinetics, and therapeutic modulation of autoantibodies against Sp100 and promyelocytic leukemia protein in a large cohort of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 1997 Nov;26(5):1123-30.

[102] Calmus Y, Gane P, Rouger P, Poupon R. Hepatic expression of class I and class II major histocompatibility complex molecules in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid. *Hepatology.* 1990 Jan;11(1):12-5.

[103] Calmus Y, Guechot J, Podevin P, Bonnefis MT, Giboudeau J, Poupon R. Differential effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on interleukin 1, interleukin 6 and tumor

- necrosis factor-alpha production by monocytes. *Hepatology*. 1992 Sep;16(3):719-23.
- [104] Kisand KE, Karvonen AL, Vuoristo M, Farkkila M, Lehtola J, Inkovaara J, et al. Ursodeoxycholic acid treatment lowers the serum level of antibodies against pyruvate dehydrogenase and influences their inhibitory capacity for the enzyme complex in patients with primary biliary cirrhosis. *J Mol Med*. 1996 May;74(5):269-72.
- [105] Lacaille F, Paradis K. The immunosuppressive effect of ursodeoxycholic acid: a comparative in vitro study on human peripheral blood mononuclear cells. *Hepatology*. 1993 Jul;18(1):165-72.
- [106] Tanaka H, Makino Y, Miura T, Hirano F, Okamoto K, Komura K, et al. Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by ursodeoxycholic acid. Repression of IFN-gamma-induced MHC class II gene expression via a glucocorticoid receptor-dependent pathway. *J Immunol*. 1996 Feb 15;156(4):1601-8.
- [107] Yoshikawa M, Tsujii T, Matsumura K, Yamao J, Matsumura Y, Kubo R, et al. Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immune responses. *Hepatology*. 1992 Aug;16(2):358-64.
- [108] Bateman EA, Ferry BL, Hall A, Misbah SA, Anderson R, Kelleher P. IgA antibodies of coeliac disease patients recognise a dominant T cell epitope of A-gliadin. *Gut*. 2004 Sep;53(9):1274-8.

7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η Πρωτοπαθής Χολική Κίρρωση (ΠΧΚ) είναι μια χρόνια αυτοάνοση χολοστατική νόσος του ήπατος που χαρακτηρίζεται από προοδευτική φλεγμονώδη καταστροφή των μικρού μεγέθους ενδοηπατικών χοληφόρων που οδηγεί σε μη αναστρέψιμη κίρρωση και ηπατική ανεπάρκεια. Ορολογικά, η ΠΧΚ χαρακτηρίζεται από την παρουσία υψηλού τίτλου αντι-μιτοχονδριακών αντισωμάτων (anti-mitochondrial antibody, AMA). Ο βασικός αντιγονικός στόχος των AMA στην ΠΧΚ είναι η E2 υπομονάδα της πυρουβικής δευδρογενάσης (PDC-E2), η οποία και αναγνωρίζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95% των ασθενών. Παλαιότερες μελέτες έχουν καταδείξει τη σημασία της κυτταρικής ανοσίας στην παθογένεια της νόσου.

Παρά τον κατά γενική ομολογία πρωτεύοντα ρόλο της ειδικής έναντι του PDC-E2 CD4⁺ κυτταρικής ανοσολογικής απάντησης στην παθογένεια της νόσου υπάρχει μόνο μια μελέτη σε Ιάπωνες ασθενείς με ΠΧΚ που προσδιορίζει τους CD4⁺ λεμφοκυτταρικούς PDC-E2 επιτόπους. Στην εν λόγω μελέτη έχει περιγραφεί ως επικρατών επίτοπος το πεπτιδίδιο της PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆. Παρεμένει ωστόσο άγνωστο αν αυτός ο επίτοπος αναγνωρίζεται και από τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα ασθενών από άλλες πληθυσμιακές ομάδες πλην των Ιαπώνων. Παράλληλα δεν είναι επίσης γνωστό αν ο συγκεκριμένος επίτοπος είναι και ο μοναδικός. Είναι επίσης ενδιαφέρον, ότι στη χώρα μας δεν υπάρχουν δεδομένα που να αφορούν στη χαρτογράφηση των επιτόπων της PDC-E2 ασθενών με ΠΧΚ σε επίπεδο χυμικής ανοσίας. Στην παρούσα διατριβή επιχειρήσαμε να συμπληρωθούν τα παραπάνω βιβλιογραφικά κενά.

Από τη μελέτη και το χαρακτηρισμό των AMA προέκυψε το συμπέρασμα ότι η ταυτοποίηση των αυτοαντισωμάτων αυτών με πολλαπλές και παράλληλες μεθόδους αυξάνει την ευαισθησία για την ανίχνευσή τους. Αναλυτικότερα, στα πειράματα για το χαρακτηρισμό των AMA με πειράματα ανοσοφθορισμού θετικά ελέχθηκαν 86.2% σε υπόστρωμα HEp-2 ενώ αυτό το ποσοστό σε υπόστρωμα ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου ήταν 83.9%. Θετικοί για την παρουσία AMA σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε τουλάχιστον ένα υπόστρωμα ήταν το 90,1% των ασθενών με ΠΧΚ. Με την μέθοδο της ELISA με την υβριδική πρωτεΐνη MIT-3 τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν για τα μεν IgG 89.6% τα δε IgA 79.3% (69 ασθενείς) ενώ το ποσοστό αυτό όταν μια από τις δύο αυτές κλάσεις ή και οι δύο ήταν θετικές ήταν 93.1% (81 ασθενείς). Ογδόντα έξι ασθενείς (98.85%) ελέγχθηκαν θετικοί για την παρουσία AMA με τουλάχιστον μια από τις 4 μεθόδους. Φαίνεται ότι ο συνδιασμός ELISA και ΕΑΦ είναι η πιο αποτελεσματική

προσέγγιση για την ανίχνευση των AMA.

Για το χαρακτηρισμό της χυμικής ανοσολογικής απόκρισης έναντι 76 20μερών, αλληλεπικαλυπτομένων κατά 8 αμινοξέα πεπτιδίων που καλύπτουν ολόκληρο το εύρος της PDC-E2 χρησιμοποιήσαμε ορούς από 19 ασθενείς με ΠΧΚ με τεκμηριωμένη παρουσία AMA και ειδικότερα αντι-PDC-E2 αντισωμάτων κατά της έσω λιποϋλικής περιοχής της PDC-E2. Αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον ένα από τα πεπτίδια που αντιστοιχούν στο έξω λιποϋλικό τμήμα της PDC-E2 παρουσίασαν 5 ασθενείς (26.31%) και 1 μάρτυρας. Τα πεπτίδια που τουλάχιστον ένας ασθενής παρουσίασε αντιδραστικότητα ήταν τα 11, 15 και 16. Η αντιδραστικότητα κατά του πεπτιδίου 11 ήταν μη ειδική καθώς θετική απόκριση έδωσαν τόσο ένας ασθενής όσο και ένας μάρτυρας. Αντιδραστικότητα κατά του πεπτιδίου 15 και 16 είχαν 4 (21.05%) και 5 (26.31%) ασθενείς αντίστοιχα ενώ κανένας μάρτυρας δεν παρουσίασε αντιδραστικότητα κατά αυτών των πεπτιδίων. Ενώ όλοι οι ασθενείς ελέγχθηκαν θετικά για την παρουσία αντισωμάτων κατά της έσω λιποϋλικής περιοχής τόσο με πειράματα ανοσοαποτύπωσης όσο και με πειράματα ELISA, μόνο ένας ασθενής παρουσίασε αντιδραστικότητα σε ένα πεπτίδιο (πεπτίδιο 26) που αντιστοιχεί στο έξω λιποϋλικό τμήμα της PDC-E2. Τρεις υγιείς μάρτυρες παρουσίασαν αντιδραστικότητα σε κάποιο από τα πεπτίδια που αντιστοιχούν στο έξω λιποϋλικό τμήμα. Η έλλειψη αντιδραστικότητας κατά των πεπτιδίων από ορούς που αντιδρούν με το έξω λιποϋλικό τμήμα της PDC-E2 δυνατόν να συμβαίνει επειδή ο επίτοπος των AMA στο έξω λιποϋλικό τμήμα είναι στερεοτακτικός. Το ποσοστό αντιδραστικότητας κατά της θέσης σύνδεσης των υπομονάδων E1/E3 ήταν 0% ανάμεσα στους ασθενείς με ΠΧΚ. Η περιοχή που αντιστοιχεί στο καταλυτικό κομμάτι της PDC-E2 ήταν η πλέον ενδιαφέρουσα από πλευράς αντιδραστικότητας. Συνολικά 13 ασθενείς (68.42%) παρουσίασαν αντιδραστικότητα σε τουλάχιστον ένα πεπτίδιο που αντιστοιχεί στο καταλυτικό τμήμα της πρωτεΐνης. Συνολικά 4 περιοχές φαίνεται να ξεχωρίζουν ως προς την αντιδραστικότητα σε σχέση με τους μάρτυρες: οι περιοχές που καλύπτονται από τα πεπτίδια 51 και 52, 59, 64, 72 και 74.

Σε σύνολο 35 ασθενών που μελετήθηκε η ειδική T λεμφοκυτταρική ανοσολογική απάντηση ως παραγωγή IFN- γ σαν απάντηση στη διέγερση με το πεπτίδιο PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆ (προηγούμενα περιγραφόμενος επίτοπος) μόνο 3 (8.57%) παρουσίασαν στατιστικά σημαντική παραγωγή IFN- γ και είναι η πρώτη φορά που περιγράφεται ποσοστό αναγνώρισης του προηγούμενα χαρακτηριζόμενου επιτόπου σε Καυκάσιους ασθενείς. Στα πειράματα κυτταρομετρίας ροής που έγιναν, σημαντική παραγωγή IFN- γ από τα CD4+ λεμφοκύτταρα παρατηρήθηκε μόνο σε 2 από τους 21 ασθενείς (9.52%). Η περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων τόσο σε ασθενείς με ΠΧΚ όσο και σε υγιείς

μάρτυρες έδειξε ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ανοσολογικής απόκρισης μεταξύ των 2 ομάδων. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι ο επίτοπος αυτός δεν είναι ο επικρατούν ανάμεσα στους Έλληνες ασθενείς με ΠΧΚ και έτσι έγινε μια πιο συστηματική προσέγγιση στη μελέτη της κυτταρικής ανοσολογικής απάντησης.

Το επόμενο βήμα ήταν η μελέτη της ειδικής ανοσολογικής απόκρισης της Τ κυτταρικής ανοσίας σε 21 ασθενείς με ΠΧΚ και 5 υγιείς μάρτυρες έναντι 26 πεπτιδίων που δημιουργήθηκαν και χωρίστηκαν σε 5 δεξαμενές πεπτιδίων (Pools) με τη μέθοδο της IFN- γ ELISpot. Οι 19 από τους 21 ασθενείς έδειξαν μεγαλύτερη αντιδραστικότητα όταν τα PBMCs τους καλλιεργήθηκαν με κάποια από τις Pools σε σχέση με την αντιδραστικότητα που παρουσίασαν όταν καλλιεργήθηκαν παρουσία μόνο καλλιεργητικού υλικού. Στατιστικά σημαντική αντιδραστικότητα ανιχνεύθηκε μόνο σε 8 (38.1%) ασθενείς με ΠΧΚ σαν απάντηση σε κάποια από τις 5 Pools πεπτιδίων.

Στην επόμενη και τελική φάση της μελέτης αναζητήθηκαν πιθανοί επίτοποι των CD4+ Τ λεμφοκυττάρων ανάμεσα σε 22 ασθενείς με ΠΧΚ με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, χρησιμοποιώντας 76 20μερή πεπτίδια που κάλυπτουν ολόκληρη την αλληλουχία της PDC-E2 και που χωρίστηκαν σε 12 δεξαμενές πεπτιδίων. Παράλληλα, στους 10 από αυτούς τους 22 ασθενείς μελετήθηκε πώς τα CD4+ Τ λεμφοκύτταρα τους πολλαπλασιάζονται όταν καλλιεργηθούν με τις 12 Pools πεπτιδίων που δημιουργήσαμε. Σε σύνολο 22 ασθενών, οι 17 (77.27%) παρουσίασαν στατιστικά σημαντική παραγωγή IFN- γ από τα CD4+ Τ λεμφοκύτταρα τους σε τουλάχιστον μια δεξαμενή όταν τα PBMCs καλλιεργούνταν παρουσία των δεξαμενών πεπτιδίων. Ο κάθε έκαστος ασθενής παρουσίαζε αντιδραστικότητα σε διαφορετικές δεξαμενές πεπτιδίων ενώ η πλειονότητα των ασθενών παρουσίασε αντιδραστικότητα σε περισσότερες της μιας δεξαμενές πεπτιδίων. Όταν μελετήθηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, από τους 10 ασθενείς με ΠΧΚ οι 9 (90%) έδειξαν να έχουν στατιστικά σημαντικό ποσοστό CD4+ Τ λεμφοκυττάρων που πολλαπλασιάζονταν παρουσία τουλάχιστον μιας δεξαμενής πεπτιδίων σε σχέση με το πολλαπλασιασμό που παρατηρούταν όταν τα κύτταρα καλλιεργούνταν απουσία αντιγόνου. Τα λεμφοκύτταρα των 10 αυτών ασθενών παρουσίασαν κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε περισσότερες της μιας δεξαμενής πεπτιδίων (μέσος όρος 5.2). Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι η ειδική Τ κυτταρική ανοσολογική απόκριση σε Έλληνες ασθενείς με ΠΧΚ είναι ετερογενής και πολυκλωνική.

8. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Primary Biliary Cirrhosis (PBC) is an autoimmune liver disease characterized by progressive inflammatory destruction of the small intrahepatic biliary ducts leading to cirrhosis and liver failure. The serologic hallmark of PBC is the presence of antimitochondrial antibodies (AMA). The main antigenic target of AMA is the E2 subunit of Pyruvate Dehydrogenase Complex (PDC-E2). Previous studies have addressed the central role of cellular immunity in the pathogenesis of the disease. Despite the evidence on the central role of cellular immunity against the PDC-E2 protein in the pathogenesis of PBC, so far, only one study by Shimota et al has addressed the CD4⁺ T cell epitopes of PDC-E2. In this study, the dominant epitope was described as a peptide within the inner lipoyl domain of the protein from amino acid 163 to amino acid 176 (PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆). However, it is unknown whether this epitope is dominant in PBC populations outside Japan. Moreover, it is unknown whether this peptide, is the only single epitope within the protein. To date, there is lack of information of the T and B- cell PDC-E2 epitopes in Caucasians and in particular among Greek PBC patients. Accordingly, our studies aimed to address the above questions.

We initially characterize the AMA reactivity in 87 PBC patients showing that using multiple techniques for the detection of AMA the sensitivity is close to 100%. Eighty six percent (86.2%) of the patients were tested positive for IgG AMA using HEp-2 commercial substrate by indirect immunofluorescence (IIF) whereas 83.9% of the patients were tested positive for AMA by IIF on rat liver, kidney and stomach sections. AMA positivity was found in 90.1% of the PBC patients with either IIF method. Using a commercial MIT-3 ELISA, 89.6% of the patients were tested positive for IgG AMA whereas 79.3% were tested positive for IgA AMA using the same substrate. A total of 93.1% of the patients showed positive reaction for either IgG or IgA AMA using the MIT-3 ELISA kit. Interestingly, 98.85% (86/87) of the patients tested positive for AMA for IIF and/or ELISA, indicating that the combination of these methods is the most effective way to detect AMA.

To further identify immunodominant peptides of the PDC-E2 recognized by AMA in PBC, we initially used a recombinant part of the PDC-E2 containing the inner lipoyl domain to characterize humoral anti-PDC-E2 reactivity by western blot and *in house* ELISA. Sera from 19 PBC patients tested positive by ELISA against 76 synthetic overlapping peptides (20 amino acids; aa) covering the entire length of the PDC-E2. Humoral specific

reactivity against the peptides 15 and 16 within the PDC-E2 outer lipoyl domain, was seen in 4 (21.05%) and 5 (26.31%) patients respectively. None of the controls tested positive against these peptides. Serum for only one patient showed reactivity against a peptide (peptide 26) within the PDC-E2 inner lipoyl domain. None of the sera showed reactivity against the peptides spanning the PDC-E2 E1/E3 binding domain. Sera from 13 out of 19 patients (68.42%) showed reactivity against at least one peptide within the catalytic domain. Four clusters of epitopes were recognized within the catalytic domain (peptides 51 and 52, 59, 64 and 72-74). The above results suggest a conformational epitope within the PDC-E2 inner lipoyl domain as 100% of the patients showed reactivity against the protein containing the PDC-E2 inner lipoyl domain whereas only one patient reacted to a peptide within the inner lipoyl domain. However, the epitopes within the catalytic domain seem to be multiple and linear.

Thirty five patients with PBC were studied to characterize the PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆ specific T cell immune response with IFN- γ ELISpot. Only 3/35 (8.57%) showed statistically significant T cell reactivity against PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆. The CD4+ T cell response against the PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆ was furthermore studied with flow cytometry after stimulating with the previously characterized epitope for 7 days Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) from 21 patients. Two out of 21 patients (9.52%) showed statistically significant IFN- γ production. The differences of reactivity between patients and healthy controls was not statistically significant.

Our data suggest that peptide PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆ is a subdominant epitope among Greek patients with PBC and a more systemic approach was necessary to identify the CD4+ T cell epitopes in this population. For this reason we used T-cell epitope prediction databases (SYFPEITHI) and programs that predict MHCI- and MHCII-peptide binders from protein sequence or sequence alignments using Position Specific Scoring Matrices (Rankpep) to design 26 peptides according to our patient's HLAs. These peptides were divided in 5 pools of peptides. Peripheral Blood Mononuclear Cells from 21 patients and 5 healthy controls were stimulated with these pools and the T cell immune response was measured as antigen specific IFN- γ production using an IFN- γ ELISpot assay. Statistically significant IFN- γ production was identified in 8 patients (38.1%). Seven of these 8 patients showed reactivity against one pool and 1 showed reactivity against 3 pools. These results indicated that the larger the numbers of peptides used, the wider the identified reactivity is. For this reason, we aimed to create overlapping peptides spanning the entire PDC-E2 protein.

CD4+ T cell reactivity among 22 patients was evaluated with flow cytometry detecting the antigen specific response after stimulating PBMCs with 12 pools of 76, 20aa

overlapping peptides spanning the entire PDC-E2. CD4 antigen specific proliferation was also studied in 10 patients after stimulating their CFSE stained, antigen stimulated CD4+ T cells. CD4+ T lymphocytes from 17 out of 22 patients (77.27%) showed statistically significant production of IFN- γ after stimulation with at least one pool. Each patient showed a distinct pattern of reactivity against different pools of peptides with the majority of patients reacting against to more than one pools. The CD4+ T lymphocytes of nine out of 10 patients also showed statistically significant antigen specific proliferation after being stimulated with at least one pool. The majority of patients showed significant antigen specific proliferation against multiple pools (mean 5.2). Our results indicate that the CD4+ T cell immune reactivity among Greek patients with PBC is heterogenous and polyclonal.