



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Παθολογική Κλινική και Ομώνυμο Ερευνητικό Εργαστήριο**

**Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

**Διευθυντής: Καθηγητής ΓΕΩΡΓΙΟΣ Ν. ΝΤΑΛΕΚΟΣ**

---

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΩΤΟΤΥΠΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ  
ΕΙΚΟΣΙ (20) ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ  
ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΩΗΠΑΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ**

**ΑΝΔΡΕΑΣ ΛΑΜΠΡΟΥ ΚΟΥΤΣΟΥΜΠΑΣ**

**ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΟΣ**

Διδακτορική Διατριβή που υποβλήθηκε στο Ιατρικό Τμήμα του Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2015

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

© 2015 Ανδρέας Λ. Κουτσούμπας

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

**Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

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

**(Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Επιβλέπουσα)**

**2. Κωνσταντίνος Μακαρίτσης, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Π.Θ.**

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

**4. Γεώργιος Ν. Νταλέκος, Καθηγητής Παθολογίας Π.Θ.**

**5. Λάζαρος Σακκάς, Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας Π.Θ.**

**6. Σπύρος Ποταμιάνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γαστρεντερολογίας Π.Θ.**

**7. Καλλιόπη Ζάχου, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογίας Π.Θ.**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν από την πρώτη ημέρα που την ξεκίνησα μέχρι και τις τελευταίες ώρες πριν τη στείλω για εκτύπωση.

Αυτό που διαπίστωσα από την πρώτη στιγμή ήταν ότι στο εργαστήριο απαιτείται ομαδικό πνεύμα, σκληρή δουλειά και υπομονή.

Θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και κυρίως την κ. Ρηγοπούλου, που με εμπιστεύθηκε και με στήριξε από την πρώτη στιγμή και με βοήθησε να ολοκληρώσω την διατριβή μου παρά τις αντίξοες συνθήκες.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κ. Νταλέκο και κ. Μπόγδανο γιατί το μεγαλύτερο μέρος της διατριβής μου στηρίχθηκε σε ιδέες που προέκυψαν από πολυετή έρευνα που εκπονούν στα εργαστήρια τους.

Η διατριβή μου δε θα μπορούσε να καρποφορήσει εάν δεν είχα την άοκνη συμπαράσταση της Μαρίας Γ. Μυτιλιναίου, του Ted Davies και των υπόλοιπων μελών του Immunology Group στο King's College του Λονδίνου. Θα θυμάμαι για πάντα τα ατέλειωτα βράδια στο εργαστήριο με τη Μαρία και το Δημήτρη και τις αμέτρητες συζητήσεις για τη σπουδαιότητα της εφαρμοσμένης έρευνας (translational research from bench to bedside).

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Diego Vergani και την Giorgina Mieli-Vergani για τα υπέροχα barbeque πάρτυ που γιορτάσαμε μαζί κατά την διάρκεια της πειραματικής δουλειάς, αλλά κυρίως για τη βοήθειά τους και την προσφορά του βιολογικού υλικού που χρειάστηκε για την εκπόνηση των πειραμάτων. Δε θα μπορούσα στις ευχαριστίες μου να μη συμπεριλάβω τους Munther Hussain και Τάσσο Γραμματικόπουλο στο King's και τους Alastair Forbes και Πολυχρόνη Παυλίδη στο UCH.

Σημαντική βοήθεια στο τελικό στάδιο των πειραμάτων δέχθηκα από τον Χρήστο Λιάσκο, και τους άλλους συνεργάτες του κ. Μπόγδανου στο Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσοθεραπείας και Μοριακής Ανοσοδιαγνωστικής στον Βιοιατρικό Τομέα του ΙΕΤΕ Θεσσαλίας.

Είχα την μεγάλη τύχη να έχω απεριόριστη πρόσβαση σε αντιγόνα, αντισώματα, κιτ και αντιδραστήρια και θα ήθελα να ευχαριστήσω για αυτό τους Lars, Gary, Ζακ και Dirk.

Η διατριβή μου εκπονήθηκε με την οικονομική υποστήριξη της ΓΓΕΤ στα πλαίσια του προγράμματος Ηράκλειτος II προς την κ. Ρηγοπούλου. Η υποστήριξη τους ήταν καταλυτική.

Τέλος, η διατριβή αυτή δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί αν δεν είχα την συμπαράσταση των ανθρώπων που με στηρίζουν καθημερινά, της μητέρας μου, του αδελφού μου και της αδελφής μου και των άλλων μελών της οικογένειάς μου.

Στη μνήμη του πατέρα μου Λάμπρου  
& στην οικογένεια μου

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο	Ανδρέας Κουτσούμπας
Ημ/νία γέννησης	23 Δεκεμβρίου 1975
Υπηκοότητα	Ελληνική
Οικογ. κατάσταση	Άγαμος
Διεύθυνση κατοικίας	72-74 Old Road, Oxford OX3 7QS, UK
Τηλέφωνο	+30 6972892964, +447572239367
E-mail	<a href="mailto:andreas_livadia@hotmail.com">andreas_livadia@hotmail.com</a>

### ΤΙΤΛΟΙ/ ΑΔΕΙΕΣ

GMC Specialist Register Entry, UK	26/06/2013
(Gastroenterology)	
Specialty Certificate Examination in Gastroenterology	15/05/2013
Τίτλος ειδικότητας (Γαστρεντερολογία), Ελλάδα	18/01/2013
Άδεια εξάσκησης ιατρικού επαγγέλματος, Ν.Βοιωτίας, Ελλάδα (6409/23-11-2000)	23/11/2000
	13/11/2000
Πτυχίο Ιατρικής Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσ/νίκης Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής Βαθμός Λίαν καλώς	25/06/1993
Απολυτήριο Λυκείου Βαθμός Άριστα (19 και 11/12)	

### ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1ο Γενικό Λύκειο Λιβαδειάς, Βοιωτία	1990-1993
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσ/νίκης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής	1994-2000

<b><u>ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ</u></b>	Ίδρυμα Χριστοπούλου, Ελλάδα	1993
	Ηράκλειτος II, Ελλάδα	2011
	Ελληνική Γαστρεντερολογική Εταιρεία (Υπότροφος Εξωτερικού)	2012

### **ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ**

Σεπ 2014 έως σήμερα	Senior Clinical Fellow in Gastroenterology (HPB/upper GI) Oxford University Hospitals NHS Foundation Trust, Oxford, UK Consultants: Prof B.Braden, A.Bailey, J.East
Αυγ 2013 έως Σεπ 2014	Senior Clinical Fellow in Gastroenterology (lower GI) Oxford University Hospitals NHS Foundation Trust, Oxford, UK Consultants: J.East, Prof S.Travis
Δεκ 2012 έως Αυγ 2013	Research Fellow, University College London and King's College London, UK Supervisors: Prof A.Forbes, Prof DP Bogdanos,
Δεκ 2012 έως Αυγ 2013	Endoscopic Ultrasound Trainee (part-time), University College Hospital, UCLH NHS Trust, London, UK Consultant: S.Pereira
Μάι 2008 έως Νοε 2012	Ειδικευόμενος Γαστρεντερολογίας, Σισμανόγλειο-Παράρτημα (πρώην 1 <sup>ο</sup> Νοσοκομείο ΙΚΑ), Αθήνα Διευθυντής : Dr Β.Τζιάς
Μαρ 2007 έως Δεκ 2007	Clinical Research Fellow in Gastroenterology, Barts and The London NHS Trust, London, UK King's College London, London, UK Supervisors: Dr J.Lindsay, S.Lectr K.Whelan, S Lectr D.P. Bogdanos
Αυγ 2006 έως Φεβ 2007	SHO in Gastroenterology, University College Hospital, UCLH NHS Trust, London, UK Consultant: Prof A.Forbes
Ιαν 2006 έως Αυγ 2006	Research Fellow, King's College London, London, UK Supervisors: S Lectr D.P. Bogdanos, Prof D.Vergani
Μαρ 2004 έως Δεκ 2005	Ειδικευόμενος Παθολογίας, Παθολογική Κλινική, Γ.Ν.Ν. Λιβαδειάς Διευθυντής : Γ.Σαββάκης



Σεπ 2002 έως Νοε 2003	Στρατιωτική θητεία ως Ιατρός Άνευ Ειδικότητας Σάμος-Μαυροδένδρι Κοζάνης
Φεβ 2001 έως Ιουν 2002	Υπηρεσία υπαίθρου («αγροτικό»), Π.Ι.Γαλαξειδίου και Παθολογική Κλινική, Γ.Ν.Ν. Άμφισσας Διευθυντές : Απ.Κουτσούμπας, Γ.Αγγελίδης, Ε.Νικολάου

## COURSES

- Train the Colonoscopy Trainers (Brighton & Sussex University Hospitals NHS Trust, June 2015)
- ESGE Advanced Therapeutic Endoscopy Live porcine model Hands-on EMR and ESD (ESGE, 2015)
- ALS (Oxford University Hospitals NHS Trust, June 2015)
- Human Error in Health Services (Oxford University Hospitals NHS Trust, April 2014)
- Good Clinical Practice and Regulatory Requirements for Clinical Trials (Oxford University Hospitals NHS Trust, December 2013)
- Educational Courses for Clinical Trials (Imperial College London, Cambridge University NHS Trust και Ιατρική Σχολή Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα, Μάρτιος-Ιούλιος 2011)
- ALS (Ιωάννινα, Ελλάδα, 2010)
- ATLS (Ιωάννινα, Ελλάδα, 2008)

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΘΕΝΤΑ ΑΡΘΡΑ

1. Owen R, Findlay J, **Koutsoumpas A**, Gillies R, Marshall B, Bailey A, Maynard N, Sgromo B, Braden B. Endoscopic mucosal resection of early oesophageal neoplasia in patients requiring anticoagulation: is it safe? *Surg Endoscopy*. 2015 Aug 26 [Epub ahead of print] (accepted)
2. Anderson JL, Hedin CR, Benjamin JL, **Koutsoumpas A**, Ng SC, Hart AL, Forbes A, Stagg AJ, Lindsay JO, Whelan K. Dietary intake of inulin-type fructans in active and inactive Crohn's disease and healthy controls: a case-control study. *J Crohns Colitis*. 2015 Jul 27. [Epub ahead of print]
3. **Koutsoumpas AL**, Smyk DS, Bogdanos DP. E. coli Induced Experimental Model of Primary Biliary Cirrhosis: At Last. *Int J Hepatol*. 2014;2014:848373. doi: 10.1155/2014/848373. Epub 2014 Dec 16. Review
4. Pavlidis P, Shums Z, **Koutsoumpas AL**, Milo J, Papp M, Umemura T, Lakatos PL, Smyk DS, Bogdanos DP, Forbes A, Norman GL. Diagnostic and clinical significance of Crohn's disease-specific anti-MZGP2 pancreatic antibodies by a novel ELISA. *Clin Chim Acta*.

2015 Feb 20;441:176-81

5. Polymeros D, Tsiamoulos ZP, **Koutsoumpas AL**, Smyk DS, Mytilinaiou MG, Triantafyllou K, Bogdanos DP, Ladas SD. Bioinformatic and immunological analysis reveals lack of support for measles virus related mimicry in Crohn's disease. *BMC Med.* 2014 Aug 28;12:139. doi: 10.1186/s12916-014-0139-9
6. Chrysakopoulos G, Demonakou M, Papasavvas S, **Koutsoumpas A**, Mylonas G, Tzias V. Indolent systemic mastocytosis in a patient with ileocolitis. *Ann Gastroenterol.* 2014;27(3):270-272
7. Smyk DS, **Koutsoumpas AL**, Mytilinaiou MG, Rigopoulou EI, Sakkas LI, Bogdanos DP. Helicobacter pylori and autoimmune disease: cause or bystander. *World J Gastroenterol.* 2014 Jan 21;20(3):613-29
8. **Koutsoumpas AL**, Kriese S, Rigopoulou EI. Popular and unpopular infectious agents linked to primary biliary cirrhosis. *Auto Immun Highlights.* 2012 Oct 23;3(3):95-104
9. Pavlidis P, Romanidou O, Roggenbuck D, Mytilinaiou MG, Al-Sulttan F, Liaskos C, Smyk DS, **Koutsoumpas AL**, Rigopoulou EI, Conrad K, Forbes A, Bogdanos DP. Ileal inflammation may trigger the development of GP2-specific pancreatic autoantibodies in patients with Crohn's disease. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:640835. doi: 10.1155/2012/640835. Epub 2012 Oct 17
10. Smyk DS, Rigopoulou EI, **Koutsoumpas AL**, Kriese S, Burroughs AK, Bogdanos DP. Autoantibodies in autoimmune pancreatitis. *Int J Rheumatol.* 2012;2012:940831. doi: 10.1155/2012/940831. Epub 2012 Jul 12
11. Mytilinaiou MG, Meyer W, Scheper T, Rigopoulou EI, Probst C, **Koutsoumpas AL**, Abeles D, Burroughs AK, Komorowski L, Vergani D, Bogdanos DP. 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
12. Benjamin JL, Hedin CR, **Koutsoumpas A**, Ng SC, McCarthy NE, Prescott NJ, Pessoa-Lopes P, Mathew CG, Sanderson J, Hart AL, Kamm MA, Knight SC, Forbes A, Stagg AJ, Lindsay JO, Whelan K. Smokers with active Crohn's disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 Jun;18(6):1092-100
13. Ng SC, Benjamin JL, McCarthy NE, Hedin CR, **Koutsoumpas A**, Plamondon S, Price CL, Hart AL, Kamm MA, Forbes A, Knight SC, Lindsay JO, Whelan K, Stagg AJ. Relationship between human intestinal dendritic cells, gut microbiota, and disease activity in Crohn's

disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Oct;17(10):2027-37

14. **Koutsoumpas A**, Polymeros D, Tsiamoulos Z, Smyk D, Karamanolis G, Triantafyllou K, Rigopoulou EI, Forbes A, Vergani D, Bogdanos DP, Ladas SD. Peculiar antibody reactivity to human connexin 37 and its microbial mimics in patients with Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2011 Apr;5(2):101-9
15. Benjamin JL, Hedin CR, **Koutsoumpas A**, Ng SC, McCarthy NE, Hart AL, Kamm MA, Sanderson JD, Knight SC, Forbes A, Stagg AJ, Whelan K, Lindsay JO. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of fructo-oligosaccharides in active Crohn's disease. *Gut*. 2011 Jul;60(7):923-9
16. Krystallis C, Kamberoglou D, Pistiolas D, Anifanti C, **Koutsoumbas A**, Doulgeroglou V, Tzias V. A new second-line sequential regimen for the eradication of helicobacter pylori based on levofloxacin: a pilot study. *Dig Dis Sci*. 2010 Dec;55(12):3630-1
17. **Koutsoumpas A**, Mytilinaiou M, Polymeros D, Dalekos GN, Bogdanos DP. Anti-Helicobacter pylori responses specific for VacA do not trigger primary biliary cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009 Oct;21(1):1220
18. Rigopoulou EI, Bogdanos DP, Liaskos C, **Koutsoumpas A**, Baum H, Vergani D, Dalekos GN. 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
19. Sivagnanam P, **Koutsoumpas A**, Forbes A. Respiratory symptoms in patients with inflammatory bowel disease and the impact of dietary salicylates. *Dig Liver Dis*. 2007 Mar;39(3):232-9
20. Bogdanos DP, **Koutsoumpas A**, Baum H, Vergani D. Borrelia Burgdorferi: a new self-mimicking trigger in primary biliary cirrhosis. *Dig Liver Dis*. 2006 Oct; 38(10):781-2
21. Αρβανιτίδου-Βαγιωνά Μ, Γκαμαλούτσος Χ, **Κουτσούμπας Α**, Λαζάρου Δ, Μαυρογιάννη Τ, Χουρπουλιάδης Η. Η συχνότητα διφθερίτιδας, οξείας πολυομυελίτιδας και φυματίωσης στην Ελλάδα κατά τα έτη 1973-1993. *Γαληνός*. 1999;6:162-65

## **BIBΛΙΑ**

1. Eddama Mohammad, **Koutsoumpas Andreas**, Forbes Alastair. Microscopic Colitis. In: Recent Advances in Gastroenterology, ed Chris Probert. 2014, JP Medical, London

## ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

1. **Koutsoumpas A**, Palmer R, Ket S, Reddy S, Silva M, Soonawalla Z, Braden B. EUS guided insertion of self-expandable metal stents provides access for endoscopic necrosectomy in walled-off necroses. (DDF 2015, London, UK )
2. **Koutsoumpas A**, Wang LM, Bailey A, Gillies R, Marshall R, Sgromo B, Maynard N, Braden B. Finding the dysplastic lesion: Outcome of endoscopic mucosal resection after detecting dysplasia on biopsies in Barrett's esophagus. (DDF 2015, London, UK)
3. **Koutsoumpas A**, Wang LM, Bailey AA, Marshall R, Sgromo B, Maynard N, Braden B. Non-radical stepwise endoscopic ablation of Barrett's epithelium in short segment Barrett's esophagus has low stricture rate. *Gut 2014; 63 (SupplIII) A47* (BSG 2014, Manchester, UK)
4. Rigopoulou EI, **Koutsoumpas AL**, Smyk DS, Mytilinaiou MG, Forbes A, Vergani D, Conrad K, Bogdanos DP. Molecular mimicry and immunological cross-reactivity between enteroviral and pancreatic autoantigens: Implication for the pathogenesis of type I diabetes. (Oral Presentetion, 8<sup>th</sup> International Congress on Autoimmunity, Granada, Spain, May 2012)
5. Pavlidis C, Romanidou O, Roggenbuck D, Mytilinaiou MG, **Koutsoumpas AL**, Al-Sulttan F, Conrad K, Forbes A, Bogdanos DP. Ileal inflammation as a prerequisite for the development of GP-2 specific autoantibodies in patients with Crohn's Disease. ( 8<sup>th</sup> International Congress on Autoimmunity, Granada, Spain, May 2012 and DDW 2012)
6. **Koutsoumpas AL**, Mytilinaiou MG, Pavlides P, Rigopoulou EI, Dalekos G, Vergani D, Bogdanos DP. Molecular mimicry between herpes simplex virus type I and PML, a primary biliary cirrhosis specific nuclear autoantigen. (Oral Presentation, 7<sup>th</sup> International Congress on Autoimmunity, Ljubljana, Slovenia, May 2010)
7. **Koutsoumpas AL**, Polymeros D, Tsiamoulos Z, Ladas SD, Bogdanos DP. Human connexin 37 as a molecular mimicry target in patients with Crohn's Disease. (Oral Presentetion, 7<sup>th</sup> International Congress on Autoimmunity, Ljubljana, Slovenia, May 2010)
8. **Koutsoumpas AL**, Polymeros D, Tsiamoulos Z, Karamanolis G, Triantafyllou K, Bogdanos DP, Ladas SD. Measles virus as a molecular mimicry trigger of Crohn's Disease. (Oral Presentetion, 7<sup>th</sup> International Congress on Autoimmunity, Ljubljana, Slovenia, May 2010)

9. **Koutsoumpas AL**, Pavlides P, Mytilinaiou MG, Rigopoulou EI, Vergani D, Bogdanos DP. Herpes simplex virus type 1 as a trigger of disease-specific anti-nuclear responses in patients with primary biliary cirrhosis. *Gut 2009; 58 (Suppl II)* A343 (UEGW 2009)
10. **Koutsoumpas A**, Polymeros D, Tsiamoulos Z, Karamanolis, G, Kali T, Triantafyllou K, Bogdanos DP, Ladas SD. Peculiar antibody reactivity to human connexin 37 and its microbial mimics in patients with Crohn's Disease. *Gut 2009; 58 (Suppl II)* A308 (UEGW 2009, London, UK)
11. Benjamin JL, **Koutsoumpas A**, Hedin CRH, Ng NC, Kamm MA, Hart AL, Sanderson JD, Knight SC, Stagg AJ, Forbes A, Lindsay JO, Whelan K. The luminal microbiota in patients with active Crohn's Disease is composed of higher pro-inflammatory bacteroides and lower immune-regulatory faecal bacterium prausnitzii in both smokers and those with ileal involvement. *Gut 2009; 58 (Suppl II)* A450 (UEGW 2009, London, UK)
12. Tsiamoulos Z, Polymeros D, **Koutsoumpas A**, Karamanolis, G, Triantafyllou K, Bogdanos DP, Ladas SD. Molecular mimicry and immunological crossreactivity between measles virus and human intestinal proteins is not a feature of Crohn's Disease. *Gut 2009; 58 (Suppl II)* A154 (UEGW, London, UK and HSG 2009, Αθήνα, Ελλάδα)
13. Ng SC, Benjamin JL, **Koutsoumpas A**, McCarthy NE, Hedin CRH, Plamondon S, Price C, Hart AL, Forbes A, Kamm MA, Knight SC, , Whelan K, Lindsay JO, Stagg AJ. Altered intestinal dendritic cell function in patients with active Crohn's Disease is associated with an imbalance in pro- and anti-inflammatory faecal microbiota. *Gut 2009; 58 (Suppl II)* A306 (UEGW 2009, London, UK)
14. Benjamin JL, Hedin CRH, **Koutsoumpas A**, Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Sanderson J, Knight SC, Forbes A, Stagg AJ, Whelan K, Lindsay JO. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial investigating the clinical, microbiological and immunological impact of fructo-oligosaccharides in patients with active Crohn's Disease. *Gut 2009; 58 (Suppl II)* A323 (UEGW 2009, London, UK)
15. Krystallis C, Kamberoglou D, Pistiolas D, Anyfanti C, **Koutsoumpas A**, Tzias V. A new second-line sequential regimen for Helicobacter pylori eradication based on levofloxacin. *Gut 2009; 58 (Suppl II)* A256 (UEGW 2009 and HSG 2009)
16. Ng SC, McCarthy NE, Plamondon S, Benjamin JL, Hedin CRH, **Koutsoumpas A**, Hart AL, , Kamm MA, Forbes A, Whelan K, Knight SC, Lindsay JO, Stagg AJ. Expression of toll-like receptor 4 and production of interleukin-6 by intestinal dendritic cells correlate with disease activity and c-reactive protein in active Crohn's Disease. *Gut 2009; 58 (Suppl II)* A306 (UEGW 2009)

17. Pavlides P, Mytilinaiou MG, **Koutsoumpas A**, Rigopoulou EI, Vergani D, Bogdanos DP. The role of herpes simplex virus type 1 in the induction of promyeocytic leukaemia specific responses in primary biliary cirrhosis. (AASLD 2009)
18. Polymeros D, **Koutsoumpas A**, Vergani D, Bogdanos DP. Helicobacter pylori specific antibody responses in patients with primary biliary cirrhosis. (UEGW 2008)
19. **Koutsoumpas A**, Hedin CR, Ng SC, Kamm MA, Sanderson JD, Knight SC, Stagg AJ, Forbes A, Lindsay JO, Whelan K. Smokers with active Crohn's disease have faecal microbiota with differences in the concentration and proportion of key bacterial groups. (DDW 2008 and BSG 2008)
20. Ng SC, **Koutsoumpas A**, Hedin CR, McCarthy NE, Plamondon S, Kamm MA, Knight SC, Forbes A, Lindsay JO, Whelan K, Stagg AJ. Production of IL-10 by colonic dendritic cells is associated with higher concentrations of faecal microbiota in patients with active Crohn's disease. (DDW 2008 and BSG 2008)
21. Hedin CR, **Koutsoumpas A**, Forbes A, Sanderson JD, Stagg AJ, Knight SC, Whelan K, Lindsay JO. Factors that limit recruitment to clinical trials in Crohn's disease. (BSG 2008)
22. **Koutsoumpas A**, Liaskos C, Pares A, Bogdanos DP, Caballeria L, Norman G, Rodes J, Vergani D. Primary biliary cirrhosis specific antibodies predict disease severity, but not outcome. (Falk Symposium 157, Freiburg, Germany, 2006)
23. Birbilis H, **Koutsoumpas A**, Roussou P, Savvakis G. Painful crises in adults with sickle cell syndromes: experience of the Internal Medicine department of a provincial hospital. (XXXth World Congress of the International Society of Haematology. Istanbul, Turkey, 2005)
24. Birbilis H, Rigoni F, **Koutsoumpas A**, Savvakis G. Causes of epileptic seizures in elderly. (3rd Greek-Jordan Medical Congress, Amman, Syria, 2005)
25. Μπιρμπίλης Χ, Σολουκίδης Α, **Κουτσούμπας Α**, Σαράντη Μ, Περγαντά Γ, Σαββάκης Γ. Η συχνότητα αναπνευστικών νοσημάτων στους ηλικιωμένους καταδεικνύει τη σημασία του αντιγριπτικού και αντιπνευμοκοκκικού εμβολιασμού. (5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Προληπτικής Ιατρικής, Αθήνα, 2005)
26. Μπιρμπίλης Χ, **Κουτσούμπας Α**, Σολουκίδης Α, Ρουσσάκη Π, Δημητρέλος Η, Τσιλίκη Γ, Σαββάκης Γ. Ο ρόλος του παθολόγου στην πρόληψη ασθενειών που ενδημούν στις χώρες προορισμού των ταξιδιωτών. (5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Προληπτικής Ιατρικής, Αθήνα, 2005)

27. Μπιρμπίλης Χ, Σολουκίδης Α, **Κουτσούμπας Α**, Περγαντά Γ, Γαροφαλάκη Τ, Σαββάκης Γ. Σοβαρή έλλειψη βιταμίνης D: επ' ευκαιρία περιστατικού. (10<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Εσωτερικής Παθολογίας, Αθήνα, 2004)
28. Μπιρμπίλης Χ, Σολουκίδης Α, **Κουτσούμπας Α**, Σφήκας Π, Κορογιάννος Α, Σαββάκης Γ. Βρουκέλλωση: η εμπειρία μας στο Γενικό Νομαρχιακό Νοσοκομείο Λιβαδειάς. (10<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Εσωτερικής Παθολογίας, Αθήνα, 2004)

### **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

Άριστο επίπεδο Αγγλικής και Γαλλικής γλώσσας (Cambridge Proficiency in English, Sorbonne II αντίστοιχα)

**«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΩΤΟΤΥΠΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ  
ΕΙΚΟΣΙ (20) ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ  
ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΩΗΠΑΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ»**

**ΑΝΔΡΕΑΣ Λ. ΚΟΥΤΣΟΥΜΠΑΣ**  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2015

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Ειρήνη Ι. Ρηγοπούλου**, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογίας Π.Θ  
(Επιβλέπουσα)

**Κωνσταντίνος Μακαρίτσης** Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Π.Θ

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



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ –ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>21</b>
1.1 Αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος	21
1.2 Πρωτοπαθής χολική κίρρωση (ΠΧΚ)	22
1.2.1 Γενικά	22
1.2.2 Επιδημιολογία ΠΧΚ	23
1.2.3 Παθογένεια της ΠΧΚ	25
1.2.4 Αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA)	28
1.2.4.1 Ιστορική αναδρομή	29
1.2.4.2 Τα AMA σαν προγνωστικοί δείκτες της ΠΧΚ	34
1.2.5 Κλινική εικόνα ΠΧΚ	35
1.2.5.1 Φυσική εξέταση	37
1.2.6 Εργαστηριακά ευρήματα ΠΧΚ	37
1.2.7 Διάγνωση ΠΧΚ	38
1.2.8 Μέθοδοι ανίχνευσης των AMA	38
1.2.9 Αντιπυρηνικά αντισώματα στην ΠΧΚ	45
1.2.9.1 Αντί-MND αντισώματα	48
1.2.9.2 Αντί-RLM αντισώματα	50
1.2.10 Ιστολογικά ευρήματα ΠΧΚ	53
1.2.11 Φυσική ιστορία ΠΧΚ και θεραπεία ΠΧΚ	56
1.2.12 Θεραπεία με ουρσοδεοξυχολικό οξύ	58
1.2.13 Άλλες θεραπείες	60
1.3 Αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ)	62
1.3.1 Γενικά	62
1.3.2 Ιστορική αναδρομή	62
1.3.3 Επιδημιολογία ΑΗ	63
1.3.4 Παθογένεια ΑΗ	64
1.3.5 Ταξινόμηση ΑΗ	67
1.3.6 Κλινική εικόνα ΑΗ	68
1.3.7 Διάγνωση ΑΗ	70
1.3.8 Εργαστηριακά ευρήματα ΑΗ	73
1.3.9 Διαγνωστικά αυτοαντισώματα	75
1.3.10 Ιστολογικά ευρήματα ΑΗ	84
1.3.11 Θεραπεία ΑΗ	85
1.4 Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ)	88
1.4.1 Γενικά	88
1.4.2 Επιδημιολογία ΠΣΧ	89
1.4.3 Παθογένεια ΠΣΧ	90
1.4.4 Κλινική εικόνα ΠΣΧ	93
1.4.5 Διάγνωση ΠΣΧ	94
1.4.6 Εργαστηριακά ευρήματα ΠΣΧ	94
1.4.7 Αυτοαντισώματα στην ΠΣΧ	95
1.4.8 Απεικονιστικά ευρήματα ΠΣΧ	97
1.4.9 Ιστολογικά ευρήματα ΠΣΧ	97
1.4.10 Επιπλοκές	98
1.4.11 Θεραπεία ΠΣΧ	101

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	104
<b>2.Μέθοδοι ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων</b>	104
<b>2.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός (Indirect Immunofluorescence, IIF)</b>	104
<b>2.2 Ενζυμικά συνδεδεμένος ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (Enzyme Linked Immunosorbent assay)</b>	110
<b>2.3 Ανοσοαποτύπωση Western (Western blotting)</b>	116
<b>2.4 Γραμμικός Ανοσοπροσδιορισμός (Line Immunoassay) ή Ανοσοπροσδιορισμός κουκκίδας (Dot immunoassay)</b>	118
<b>2.5 Ραδιοανοσοπροσροφητική μέθοδος (Radioimmunosorbent assay, RIA)</b>	119
<b>2.6 Ανάπτυξη πολυμετρικών μεθόδων ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων</b>	120
<b>2.7 Κλινικοεργαστηρική ερμηνεία αποτελεσμάτων ελέγχου αυτοαντισωμάτων</b>	123
<b>2.8 Σκοπός της διατριβής</b>	130
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	131
<b>3.1 Ασθενείς</b>	131
<b>3.2 Διαδικασία Συντήρησης &amp; Αποθήκευσης Δειγμάτων</b>	135
<b>3.3 Μέθοδοι</b>	135
<b>3.3.1 Υλικά</b>	135
<b>3.3.1.1 Χημικά</b>	135
<b>3.3.1.2 Αντισώματα-Αντιοροί</b>	137
<b>3.3.1.3 Αντιγόνα</b>	137
<b>3.3.2 Εμπορικά διαθέσιμες μέθοδοι</b>	13 8
<b>3.3.2.1 IFL</b>	138
<b>3.3.2.2 ELISA</b>	138
<b>3.3.2.3 Immunoblot και Line Assay</b>	139
<b>3.3.2.4 Western Blot buffers και διαλύματα</b>	139
<b>3.3.3 Αντιδραστήρια</b>	140
<b>3.3.4 Όργανα- εξοπλισμός</b>	140
<b>3.4 Πρωτόκολλα τεχνικών</b>	141
<b>3.4.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός</b>	142
<b>3.4.2 <i>In house</i> ELISA για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων</b>	144
<b>3.4.3 Ανοσοαποτύπωση</b>	145
<b>3.4.4 Πολυμετρικός γραμμικός ανοσοπροσδιορισμός</b>	147
<b>3.4.5 Πολυμετρικές προφίλ ELISA</b>	148
<b>3.4.6 Πολυπλεξία σήματος με φωτοβολία</b>	148
<b>3.5 Στατιστική ανάλυση</b>	148
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	150
<b>4.1 <i>In house</i> ELISA για ταυτόχρονη ανίχνευση μιτοχονδριακών αυτοαντιγόνων στην ΠΧΚ</b>	150
<b>4.1.1 Ανάπτυξη <i>in house</i> ELISA για αντι-μιτοχονδριακά αντισώματα: Έλεγχος AMA θετικών ασθενών με ΠΧΚ</b>	153
<b>4.1.2 Ανάπτυξη <i>in house</i> ELISA για αντι-μιτοχονδριακά αντισώματα: Έλεγχος AMA αρνητικών ασθενών με ΠΧΚ</b>	160

<b>4.2 In house ELISA για ταυτόχρονη ανίχνευση ειδικών για την ΠΧΚ ANA</b>	163
<b>4.3 Πολυμετρική μέθοδος ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων με φωτοβολία σήματος (xMAP Luminex)</b>	175
<b>4.4 Πολυμετρική ανίχνευση αυτοαντισωμάτων σχετιζόμενων με την αυτοάνοση ηπατίτιδα</b>	176
<b>4.5 Ανάπτυξη πρότυπης μεθόδου για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων σχετιζόμενων με την πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα</b>	182
<b>4.6. Κύρια χαρακτηριστικά της πρότυπης πολυμετρικής ELISA για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων στο αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος</b>	187
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5:</b>	191
<b>5.1 Γενική συζήτηση</b>	191
<b>5.2 Ειδική συζήτηση</b>	195
<b>Βιβλιογραφία</b>	199
<b>Περίληψη</b>	211
<b>Summary</b>	212

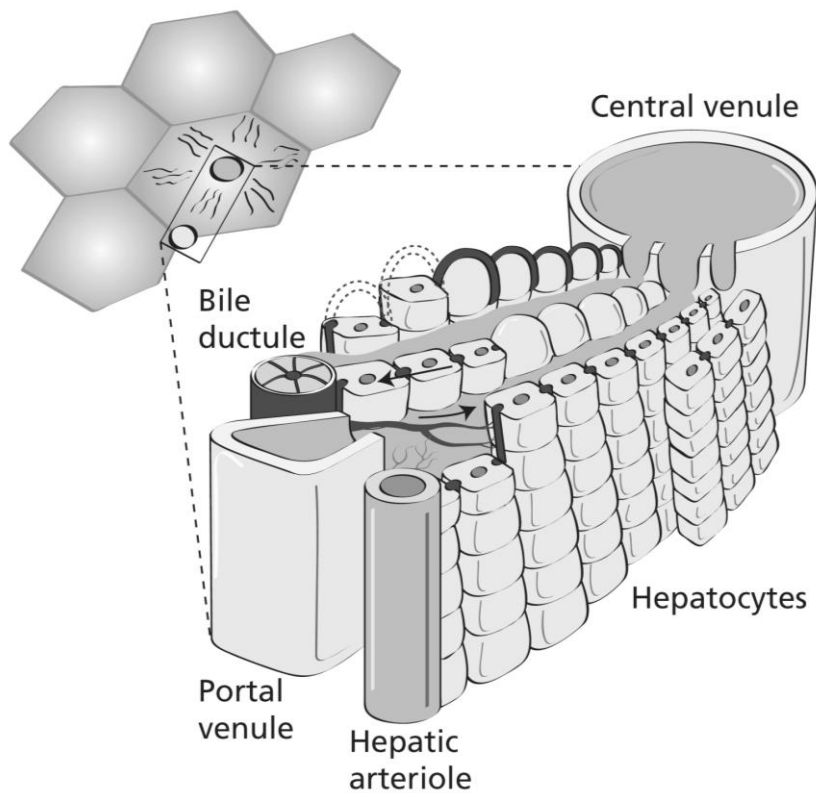
## **ΓΕΝΙΚΟΣ ΜΕΡΟΣ**

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1.1 Αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος

Τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος αποτελούν μια ετερογενή ομάδα νοσημάτων με διακριτές ομοιότητες και διαφορές. Διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: σε αυτά που αφορούν στην αυτοάνοση καταστροφή του ηπατοκυττάρου (Αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1, ΑΗ-1 και τύπου 2, ΑΗ-2) και σε εκείνα τα οποία χαρακτηρίζονται από καταστροφή των χολαγγειοκυττάρων (Πρωτοπαθής Χολική Κίρρωση, ΠΧΚ και Πρωτοπαθής Σκληρυντική Χολαγγειίτιδα, ΠΣΧ).



*Εικόνα 1.1 Σχηματική απεικόνιση της αρχιτεκτονικής δομής του ήπατος και των χοληφόρων, κύρια συστατικά των οποίων είναι τα ηπατοκύτταρα και τα χολαγγειοκύτταρα που καταστρέφονται από την αυτοανοσιακή απόκριση.*

## **1.2 Πρωτοπαθής χολική κίρρωση**

### **1.2.1 Γενικά**

Η Πρωτοπαθής Χολική Κίρρωση (ΠΧΚ) είναι χρόνια αυτοάνοσο χολοστατικό νόσημα του ήπατος, που χαρακτηρίζεται από φλεγμονώδη διήθηση και προοδευτική καταστροφή των μικρών ενδοηπατικών χοληφόρων που οδηγεί σε κίρρωση και ηπατική ανεπάρκεια στα τελικά στάδια της νόσου [1-2]. Το νόσημα προσβάλλει κυρίως γυναίκες στην πλειονότητά τους μέσης ηλικίας [3-5].

Ιστορικά η πρώτη περιγραφή της νόσου έγινε το 1851 από τους Thomas Addison και William Gull στην επιστημονική επιθεώρηση *Guys Hospital Report* σε άρθρο με τίτλο: «On a certain affection of the Skin-Vitiligoidea- a plana, β tuberculosis» . Η ονομασία της νόσου αποδίδεται στον Ahrens EH το 1950. Πρόσφατα έχει προταθεί νέα ορολογία της ονομασίας της από primary biliary cirrhosis σε primary biliary cholangitis [6].

Ο κλινικός φαινότυπος της νόσου εμφανίζει πολύ μεγάλη ετερογένεια [3]. Αρκετοί ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί και από τον εργαστηριακό έλεγχο παρουσιάζουν χολόσταση [7-8]. Συμπτωματικοί ασθενείς παρουσιάζουν συνήθως κνησμό, κόπωση και αρθραλγίες, ενώ με την εξέλιξη του νοσήματος οι ασθενείς εμφανίζουν

συμπτώματα που σχετίζονται με την παρουσία πυλαίας υπέρτασης, όπως ασκίτη, εγκεφαλοπάθεια και αιμορραγία πεπτικού [3, 7, 9].

### **1.2.2 Επιδημιολογία**

Από την πρώτη περιγραφή ασθενούς με ΠΧΚ το 1851, η μελέτη της επιδημιολογίας της νόσου έχει συμβάλει σημαντικά στην αποσαφήνιση της φυσικής ιστορίας της [10]. Το 1974 η ΠΧΚ θεωρείτο σπάνιο νόσημα με προκαθορισμένη έκβαση το θάνατο. Η πρώτη επιδημιολογική προσέγγιση της νόσου το 1974 αφορούσε στον υπολογισμό της θνησιμότητας από την ΠΧΚ βασιζόμενη στην καταμέτρηση θανάτων από την νόσο στην Αγγλία και την Ουαλία [11]. Τα τελευταία 40 χρόνια έχουν σημειωθεί σημαντικές πρόοδοι ως αναφορά στη γνώση μας για τη φυσική ιστορία της νόσου και αυτό οφείλεται σε επιδημιολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο διάστημα αυτό [12-13]. Οι περισσότερες είναι πληθυσμιακές μελέτες (population-based studies), οι οποίες έδειξαν ότι έχει σημειωθεί σημαντική αύξηση της επίπτωσης και του επιπολασμού στο διάστημα αυτό. Χαρακτηριστικά παραδείγματα προέρχονται από την Αγγλία, όπως η περιοχή του Sheffield, όπου η επίπτωση της ΠΧΚ ήταν 5.8 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο στα τέλη της δεκαετίας του 70 και αυξήθηκε σε 20.5 περιπτώσεις σε μια δεκαετία. Αντίστοιχα, αύξηση παρουσίασε ο επιπολασμός της νόσου από 54 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο το 1977 σε 238 το 1999 [14]. Ανάλογα είναι και τα ευρήματα από την περιοχή του Newcastle στη Βορειοανατολική Αγγλία, όπου σημειώθηκε σημαντική αύξηση της επίπτωσης από το 1976 έως το 1994 (11 και 32 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο

αντίστοιχα) με ακόμα μεγαλύτερη αύξηση του επιπολασμού την ίδια χρονική περίοδο (154 και 251 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο αντίστοιχα) [15-16].

Παράλληλα έχει διαπιστωθεί ευρεία διακύμανση στην επίπτωση της νόσου μεταξύ των διαφόρων περιοχών σε παγκόσμια κλίμακα, με κύριο χαρακτηριστικό την αυξημένη συχνότητα της ΠΧΚ στο Βορρά (Σκανδιναβία, Μ. Βρετανία) και χαμηλότερη στο Νότο (Αυστραλία) (north-south gradient) [17]. Συγκεκριμένα ο επιπολασμός κυμαίνεται από 30 περιστατικά ανά 100000 πληθυσμού και ειδικότερα 1 ανά 1500 γυναίκες άνω των 40 σε περιοχές αυξημένου επιπολασμού, όπως στην περιοχή του Newcastle της Μεγάλης Βρετανίας, σε λιγότερο από 25 περιστατικά ανά εκατομμύριο κατοίκων στον Καναδά και Αυστραλία και σχεδόν κανένα περιστατικό στην υπο-Σαχάρια Αφρική και Ινδία [18-19]. Πρόσφατα επιδημιολογική μελέτη από την Ολλανδία που αφορούσε σχεδόν στο 50% του πληθυσμού της χώρας αναφέρει επιπολασμό της νόσου στο 13.2 ανά 100000 κατοίκους [20]. Η συγκεκριμένη, όπως και άλλες 2 μελέτες από την Ισπανία και το Ισραήλ έδειξαν αύξηση τόσο της επίπτωσης όσο και του επιπολασμού της νόσου τα τελευταία χρόνια [20-22].

Παραμένει ασαφές το κατά πόσο οι διαφορές στην γεωεπιδημιολογία της νόσου είναι πραγματικές ή οφείλονται σε διαφορές που αφορούν στην εξειδίκευση και ενημέρωση του ιατρικού προσωπικού και στην προσβασιμότητα στην παρεχόμενη υγεία σε κάποιες περιοχές [16, 23]. Το πιο πιθανό είναι ότι αναφερόμενες διαφορές στην γεωεπιδημιολογία της ΠΧΚ οφείλονται κυρίως στην ετερογένεια των μεθόδων που χρησιμοποιούνται στις διάφορες μελέτες. Είναι γεγονός ότι η χρήση πολλαπλών μεθόδων, όπως η καταγραφή των ασθενών από ιδιώτες ή γενικούς γιατρούς, η



διαθεσιμότητα εξιτηρίων και πιστοποιητικών θανάτου και η ευρύτερη χρήση των AMA για τη διάγνωση της νόσου, έχει συμβάλει σημαντικά τα τελευταία χρόνια στην ανίχνευση περιστατικών με ΠΧΚ [23].

Η αύξηση στον επιπολασμό της ΠΧΚ τις τελευταίες δεκαετίες συνάδει με την αναφερόμενη αύξηση του επιπολασμού των αυτοάνοσων νοσημάτων τα τελευταία 40 χρόνια. Περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως ξενοβιοτικά, το κάπνισμα κ. ά. ή λοιμώδεις παράγοντες, όπως προκύπτει από ιστορικό υποτροπιαζουσών ουρολοιμώξεων σε αρκετές γυναίκες με ΠΧΚ, έχουν αναφερθεί ότι μπορεί να σχετίζονται με αυτή την αύξηση [24-25]. Όμως, οι ακριβείς μηχανισμοί που συντελούν τελικά στην εμφάνιση της ΠΧΚ απομένει να αποσαφηνιστούν [26].

### **1.2.3 Παθογένεια της ΠΧΚ**

Η ΠΧΚ θεωρείται από πολλούς αυτοάνοσο νόσημα, αν και αρκετά χαρακτηριστικά ασθενών με τη νόσο δεν συνάδουν με τον παραπάνω ισχυρισμό [27]. Στοιχεία υπέρ του αυτοάνοσου χαρακτήρα της ΠΧΚ είναι: η παρουσία ειδικών για τη νόσο αυτοαντισωμάτων, των αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων (AMA), η υπεροχή των γυναικών, όπως και στα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα, η συχνή συνύπαρξη άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων, η συσχέτιση με γονίδια του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (MHC), η παρουσία T αυτοδραστικών κυττάρων στην περιοχή της βλάβης, η λειτουργική διαταραχή των T ρυθμιστικών κυττάρων και η εμφάνιση χολαγγειίτιδας σε πειραματικό μοντέλο ποντικού μετά από μεταφορά CD8 T αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων [για ανασκόπηση δεξ Selmi et al [28] ]. Κατά του αυτοάνοσου χαρακτήρα της νόσου είναι η αδυναμία πρόκλησης της νόσου μετά

από μεταφορά αυτοαντισωμάτων σε πειραματικό μοντέλο, η μη συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με τον τίτλο των AMA και η μη ανταπόκριση των ασθενών στη χορήγηση ανοσοκατασταλτικής αγωγής [28].

#### 1.2.3.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες και λοιμώξεις

Δεδομένα από μελέτες των τελευταίων δεκαετιών δείχνουν ότι για την έναρξη και εξέλιξη της ΠΧΚ είναι απαραίτητη η δράση περιβαλλοντικών παραγόντων σε κατάλληλο γενετικό υπόβαθρο [1, 25, 28]. Πιθανοί προτεινόμενοι μηχανισμοί διαμέσου των οποίων μπορεί να δρουν επιδημιολογικοί παράγοντες και να οδηγούν σε απώλεια της ανοσολογικής ανοχής στο σύμπλεγμα της πυρουβικής δεϋδρογενάσης, που είναι ο βασικός αντιγονικός επίτοπος των AMA, είναι η μοριακή μίμηση και οι χημικές επιδράσεις μετά από έκθεση σε ξενοβιοτικά [29-30].

Πληθυσμιακές μελέτες έχουν συσχετίσει την ΠΧΚ με το κάπνισμα, υποτροπιάζουσες ουρολοιμώξεις καθώς και κάποια χημικά (όπως οι βαφές μαλλιών και νυχιών) [31-34]. Επίσης η συρροή περιστατικών με ΠΧΚ σε περιοχές κοντά σε τοξικά απόβλητα, όπως και η συρροή περιστατικών σε συγκεκριμένες εποχές του χρόνου, υποδεικνύει ότι τόσο χημικοί όσο και λοιμογόνοι παράγοντες μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου [35-36]. Συνηγορητικά στοιχεία υπέρ της συμβολής διαφόρων λοιμώξεων στην παθογένεια της ΠΧΚ προέρχονται από μελέτες που δείχνουν σημαντικά υψηλότερο επιπολασμό λοιμώξεων σε ασθενείς με ΠΧΚ [37]. Σε πειραματικό επίπεδο έχει φανεί ότι υπάρχει σημαντική ομοιότητα σε αλληλουχία αμινοξέων ανάμεσα σε μικροβιακές πρωτεΐνες του *E. Coli*, που είναι ο συχνότερος αιτιολογικός παράγοντας για τις λοιμώξεις του ουροποιητικού, και της E2

υπομονάδας του συμπλέγματος της πυρουβικής δεϋδρογονάσης (PDC-E2), υποστηρίζοντας την εμπλοκή του μηχανισμού της μοριακής μίμησης μεταξύ του PDC-E2 και μικροβιακών παραγόντων στην παθογένεια της ΠΧΚ [29, 38]. Η μεγαλύτερη ομολογία αμινοξέων που έχει μέχρι στιγμής αναφερθεί μεταξύ του PDC-E2 και μικροβιακού παράγοντα αφορά σε πρωτεΐνη του *Gram-  
Novosphingobium aromaticivorans*, το οποίο δεν είναι παθογόνο για τον άνθρωπο [39]. Επίσης σημαντικό για τον εν λόγω παράγοντα είναι ότι μπορεί να μεταβολίσει οργανικά μόρια και οιστρογόνα τροποποιώντας την αντιγονική τους δομή. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο *Novosphingobium aromaticivorans* εμφανίζει πολύ έντονη αντιδραστικότητα (έως και 1000 φορές μεγαλύτερη απ' ότι το *E. Coli*) με τον ορό ασθενών με ΠΧΚ, αλλά καμία με τον ορό υγείων μαρτύρων [39]. Άλλα βακτήρια που έχουν ενοχοποιηθεί είναι τα ακόλουθα: *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella minnesota*, *Mycobacterium gordonae* και *Trypanosoma brucei* [40].

### 1.2.3.2 Γενετικοί παράγοντες

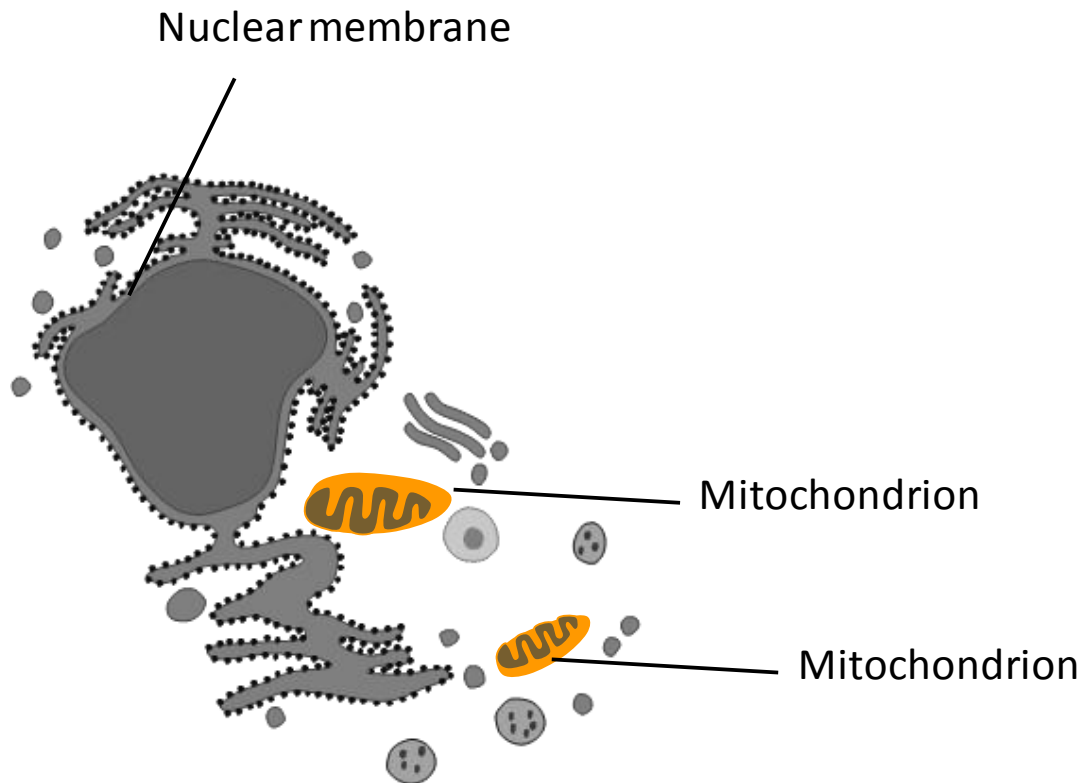
Περιγραφικές επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει σημαντική γενετική προδιάθεση για την ΠΧΚ. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί αυξημένη συχνότητα ανίχνευσης των AMA σε συγγενείς 1<sup>ου</sup> βαθμού ασθενών με ΠΧΚ, 63% πιθανότητα εμφάνισης ΠΧΚ σε μονοζυγωτικούς διδύμους, ενώ είναι αυξημένος ο επιπολασμός της νόσου και σε άλλους 1<sup>ου</sup> βαθμού συγγενείς [41-42]. Μια πρόσφατη μελέτη που αφορούσε σε συνδυασμό ολόκληρου του γονιδιώματος [genome-wide association studies (GWAS)] έδειξε συσχέτιση της νόσου με τα αλληλία IL12A and IL12RB2 [43], γεγονός που υποδεικνύει ότι ο άξονας της IL-12 μπορεί να εμπλέκεται στην

παθογένεια της νόσου. Παλαιότερα είχε αναφερθεί συσχέτιση της νόσου με γονίδια του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας τάξης II DRB1\*08, ειδικότερα το DRB1\*0801 στους Καυκάσιους της Ευρώπης και της Νότιας Αμερικής [44] και τα DRB1\*0803 στους Ιάπωνες [45].

Έχει βρεθεί συσχέτιση και με άλλα αλληλία γονιδίων ή αλληλία που έχουν εμπλακεί και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (όπως *IRF5*, *MME11*, *SPIB* και *17q12.21*). Αν και οι συσχετίσεις αυτές δεν μπορούν να εξηγήσουν πλήρως τη νόσο, οι GWAS δείχνουν ξεκάθαρα ότι ανοσορυθμιστικοί μηχανισμοί είναι σημαντικοί στην παθογένεια της ΠΧΚ. Το τελευταίο υποστηρίζεται και από διάφορα πειραματικά μοντέλα αυτοάνοσης χολαγγειίτιδας, όπως ποντίκι με εξάλειψη του υποδοχέα της IL-2 [46].

#### **1.2.4 Αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA)**

Η ΠΧΚ χαρακτηρίζεται από την παρουσία αντισωμάτων που στοχεύουν αντιγόνα που βρίσκονται στην εσωτερική επιφάνεια των μιτοχονδρίων [1, 47-48]. Τα AMA ανιχνεύονται στο 90 – 95% των ασθενών με ΠΧΚ και για το λόγο αυτό θεωρούνται σήμα κατατεθέν για την νόσο.



*Εικόνα 2. Πρότυπο πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων σε ανοσοφθορισμό σε κύτταρα Her2 με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού σε ασθενή με πρωτοπαθή χολική κίρρωση*

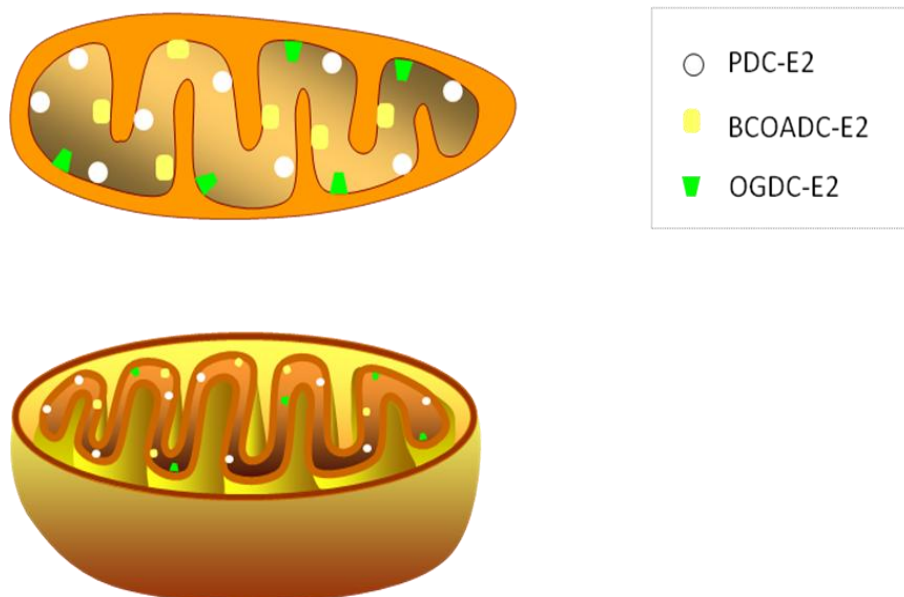
Στο 5%-10% των ασθενών με ΠΧΚ δεν ανιχνεύονται AMA, αλλά η νόσος φαίνεται να έχει παρόμοια κλινικά, βιοχημικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά με αυτούς που έχουν AMA [49].

#### **1.2.4.1 Ιστορική αναδρομή**

Η παρατήρηση των Walker, Doniach, Roitt και Sherlock το 1965 ότι τα AMA ανιχνεύονται μόνο στους ασθενείς με ΠΧΚ και σε κανένα από τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου, συμπεριλαμβανομένων ασθενών με εξωηπατική χολόσταση,

χολόσταση σχετιζόμενη με φάρμακα και ιογενείς ηπατίτιδες αποτέλεσε ορόσημο για την ηπατολογία [50]. Αυτή η ισχυρή συσχέτιση των AMA με την ΠΧΚ οδήγησε στην ευρεία χρήση τους ως εργαλείο για τη διάγνωση της νόσου. Το 1967 ο Berg και συνεργάτες έδειξαν ότι οροί ασθενών με ΠΧΚ αντιδρούσαν *in vitro* με απομονωμένα μιτοχόνδρια. Τα AMA που σχετίζονται με την ΠΧΚ ονομάστηκαν M2 (μιτοχονδριακά αντισώματα τύπου 2) και φάνηκαν να αντιδρούν με αντιγόνα στην εσωτερική επιφάνεια όλων των μιτοχονδρίων [51]. Το 1987 έγινε εφικτή η ταυτοποίηση των αυτοαντιγόνων στόχων των AMA με τη τεχνική της μοριακής κλωνοποίησης. Συγκεκριμένα, αναγνωρίστηκε αντιδραστικότητα έναντι μιας ομάδας μιτοχονδριακών αντιγόνων με μοριακό βάρος 36-74 kDa [52]. Λίγα χρόνια αργότερα βρέθηκε ότι τα M2 αντιγόνα αποτελούν πρωτεΐνες του συμπλέγματος της 2-κετοξικής δεϋδρογενάσης (2-oxoacid dehydrogenase complex, 2-OADC), μια πολυενζυμική δομή στην εσωτερική επιφάνεια των μιτοχονδρίων [53]. Αναλυτικά αποτελείται από το σύμπλεγμα της πυρουβικής δεϋδρογενάσης (pyruvate dehydrogenase, PDC), το σύμπλεγμα της 2-οξογλουταρικής δεϋδρογενάσης (2-oxoglutarate, OGDC) και το σύμπλεγμα της κετοξικής δεϋδρογενάσης των αμινοξέων με διακλαδιζόμενη αλυσίδα (branched chain 2-oxoacid dehydrogenase complex, BCOADC) (Εικόνα 3).

### Μιτοχόνδριο



**Εικόνα 3.** Σχηματική απεικόνιση των μιτοχονδριακών αντιγόνων στην εσωτερική επιφάνεια των μιτοχονδρίων. Τα μιτοχονδριακά αντιγόνα είναι πρωτεΐνες του συμπλέγματος της 2-OADC (2-oxoacid dehydrogenase complex: PDC-E2 (pyruvate dehydrogenase), OGDC-E2 (2-oxoglutarate) και BCOADC-E2 (branched chain 2-oxoacid dehydrogenase complex)).

Υπάρχει σημαντική ομολογία αμινοξέων μεταξύ των κύριων μιτοχονδριακών αντιγόνων. Τα κύρια μιτοχονδριακά αντιγόνα με το αντίστοιχο μοριακό βάρος τους στην ΠΧΚ παρουσιάζονται στον πίνακα 1.1.

**Πίνακας 1.1** Κύρια μιτοχονδριακά αυτοαντιγόνα στην ΠΧΚ

<b>Μιτοχονδριακά αντιγόνα</b>	<b>Μοριακό βάρος (kDa)</b>
E2 υποομάδα του συμπλέγματος της πυρουβικής δεϋδρογενάσης (PDC-E2)	<b>74</b>
E2 υποομάδα του συμπλέγματος της κετοξικής δεϋδρογενάσης των αμινοξέων με διακλαδιζόμενη αλυσίδα (BCOADC-E2)	<b>51</b>
E2 υποομάδα του συμπλέγματος της 2-οξογλουταρικής δεϋδρογενάσης (OGDC-E2)	<b>48</b>
E3 συνδετική πρωτεΐνη (E3BP) της PDC*	<b>55</b>
E1a υποομάδα της PDC (PDC-E1a)*	<b>41</b>
E1b υποομάδα της PDC (PDC-E1b)*	<b>36</b>

\*συνήθως αντιδραστικότητα έναντι αυτών των αυτοαντιγόνων ανευρίσκεται ταυτόχρονα με αντιδραστικότητα έναντι της PDC-E2

Περίπου 10% των ασθενών με ΠΧΚ παρουσιάζουν αντιδραστικότητα μόνο έναντι του BCOADC-E2 και/ή του OGDC-E2 [48]. Αυτό έχει μεγάλη σημασία στην κλινική πράξη, γιατί η χρήση μεθόδων βασιζόμενων μόνο στην ανίχνευση AMA έναντι του PDC-E2 θα οδηγούσε σε χαμηλή ευαισθησία της συγκριμένης μεθόδου. AMA που αντιδρούν έναντι των υπολοίπων υπομονάδων του 2-OADC, φαίνεται να έχουν μικρή διαγνωστική αξία δεδομένου ότι πολύ σπάνια καταγράφεται αντιδραστικότητα έναντι αυτών χωρίς παράλληλη αντιδραστικότητα έναντι του PDC-E2. Καθένα από αυτά τα συμπλέγματα συμμετέχει σε μια σειρά από αντιδράσεις και αποτελεί κλειδί στον ενεργειακό μεταβολισμό του κυττάρου.

Τα ένζυμα του συμπλέγματος της 2-OADC έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό ότι αποτελούνται από τρεις υπομονάδες, την E1, E2 και E3, που κωδικογραφούνται 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



προσκολλάται ο συμπαράγοντας του λιποϊκού οξέος και μια E3 περιοχή σύνδεσης [48].

Μετά την ταυτοποίηση των αυτοαντιγόνων στόχων στην ΠΧΚ, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για να μπορέσει να χαρακτηριστεί η αντιδραστικότητα των AMA σε ορούς ασθενών με ΠΧΚ. Με τη χρήση ανοσοαποτύπωσης ή ELISA βρέθηκε ότι περισσότερο από 95% των ασθενών με ΠΧΚ παρουσιάζουν αντιδραστικότητα έναντι του PDC-E2, ενώ η αντιδραστικότητα των ορών έναντι του OGDC-E2 και του BCOADC-E2 κυμαίνεται μεταξύ 50-70% [1]. Η πλειοψηφία των ασθενών με ΠΧΚ εμφανίζει αντιδραστικότητα έναντι περισσότερων του ενός αντιγονικών στόχων, ενώ λίγοι είναι οι ασθενείς που εμφανίζουν αντιδραστικότητα μόνο έναντι του PDC-E2 [54].

Ένα παράδοξο που χαρακτηρίζει την ΠΧΚ είναι το γεγονός ότι ενώ μιτοχονδριακές πρωτεΐνες βρίσκονται σε όλα τα εμπύρνα κύτταρα, ανοσιακή απάντηση έναντι αυτών ανιχνεύεται μόνο στα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων με μεγάλη ειδικότητα. Επίσης δεν ήταν σαφές πώς ενώ το PDC-E2 βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια των μιτοχονδρίων γίνεται στόχος των AMA [27].

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει κάποια πρόοδος που αφορά στην αποσαφήνιση της διαδικασίας που οδηγεί στην ειδική έναντι των επιθηλιακών χοληφόρων ανοσιακή απάντηση.

Πρώτον, έχειδειχτεί ότι η αναγνώριση του PDC-E2 από αυτοαντισώματα εξαρτάται από το αν έχει τροποποιηθεί το λιποϋλικό τμήμα του από τη γλουταθειόνη [55]. Τα επιθηλιακά κύτταρα διαχειρίζονται την PDC-E2 με τρόπο διαφορετικό από άλλα κύτταρα του σώματος. Αν και δεν έχει αποσαφηνιστεί ο ακριβής τρόπος με τον

οποίο συμβαίνει αυτό, υπάρχουν ενδείξεις ότι κυρίαρχο ρόλο παίζει η διαδικασία της απόπτωσης των χολαγγειοκυττάρων, η δημιουργία αποπτωτικών σωμάτων (apoptotic blebs) που περιέχουν ακέραιο το αντιγόνο που έχει ανοσογονικότητα [56].

#### **1.2.4.2 Τα AMA σαν προγνωστικοί δείκτες της ΠΧΚ**

Η παρουσία των AMA είναι άρικτα συνδεδεμένη με την ΠΧΚ. Στο γενικό πληθυσμό έχει υπολογιστεί ότι AMA έχει το 0.5% [57], ποσοστό που είναι πολύ υψηλότερο από τον επιπολασμό της ΠΧΚ. Από μελέτες που διενεργήθηκαν στη δεκαετία του 1980 φάνηκε ότι η παρουσία των AMA προηγείται κατά πολύ της κλινικής έναρξης της νόσου.

Οι ομάδα του Newcastle έδειξε σε μια μικρή μελέτη 29 ατόμων, που τυχαία βρέθηκαν να έχουν AMA, ενώ δεν είχαν ούτε συμπτώματα ούτε ηπατική βιοχημεία, ότι η πλειοψηφία αυτών (24/29, 83%) είχε ιστολογικά ευρήματα διαγνωστικά ή συμβατά με ΠΧΚ [58]. Σημειωτέον, μόνο 2 είχαν φυσιολογική ιστολογική εικόνα. Δέκα χρόνια μετά (ενδιάμεση παρακολούθηση 17.8 έτη), το 75% των ασθενών είχε κλινική συμπτωματολογία και χολόσταση, αλλά κανείς εξ αυτών δεν είχε αναπτύξει κίρρωση [59]. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι η παρουσία AMA είναι πολύ ισχυρός προγνωστικός δείκτης ανάπτυξης ΠΧΚ στο μέλλον.

Η υπάρχουσα βιβλιογραφία δεν έχει απαντήσει ακόμα στο κατά πόσο τα AMA είναι προγνωστικός δείκτης εξέλιξης της ΠΧΚ. Οι van Norstrand και συνεργάτες συσχέτισαν τους τίτλους των AMA, όπως ανιχνεύτηκαν με ποσοτική μέθοδο ELISA και χρήση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών OADC, με δείκτες εξέλιξης του νοσήματος,

όπως είναι το Mayo risk score. Στη μελέτη αυτή δεν υπήρξε συσχέτιση ανάμεσα στους τίτλους των AMA και στο στάδιο της ίνωσης [60].

Στις περισσότερες μελέτες δεν βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στις παρουσία AMA και την εξέλιξη του νοσήματος, ακόμα και όταν εξετάστηκαν επιμέρους τάξεις αυτών (IgG, IgA, IgM). Επίσης δεν υπάρχουν δεδομένα που να υποστηρίζουν ότι πτώση του τίτλου των AMA σχετίζεται με απάντηση στη θεραπεία [49]. Υπάρχουν όμως και μελέτες που δείχνουν συσχέτιση μεταξύ των AMA και παραμέτρων ενδεικτικών του ιστολογικού σταδίου της νόσου. Σε συνάρτηση με τα παραπάνω οι Nakajima και συνεργάτες ανέφεραν ότι η παρουσία IgA AMA χαρακτηρίζει τα πρώιμα στάδια της ΠΧΚ, ενώ άλλη ομάδα έδειξε τη συσχέτιση των IgA AMA με προχωρημένα στάδια της νόσου [61-62]. Μελέτη σε ελληνικό πληθυσμό δεν μπόρεσε να δείξει καμιά συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των AMA (IgG/IgA) με κάποια κλινική ή ιστολογική παράμετρο, αν και φάνηκε τάση για συσχέτιση με το Mayo risk score [63]. Μια πιο πρόσφατη μελέτη από την ίδια ομάδα δεν αναφέρει σημαντικές μεταβολές στον τίτλο των AMA σε διαδοχικά δείγματα ασθενών με ΠΧΚ, ενώ παράλληλα δεν φάνηκε να αποτελούν προγνωστικό παράγοντα για την εξέλιξη του ιστολογικού σταδίου [64].

### **1.2.5 Κλινική εικόνα ΠΧΚ**

Η διάγνωση της ΠΧΚ γίνεται στις μέρες μας πολύ νωρίτερα στη φυσική πορεία της νόσου από ότι στο παρελθόν. Το 50-60% των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί κατά τη διάγνωση [7]. Στην πλειοψηφία των ασυμπτωματικών ασθενών, τα συμπτώματα θα εμφανιστούν μέσα σε 2-4 έτη. Περίπου 1/3 των ασθενών θα παραμένουν

ασυμπτωματικοί για μεγάλο χρονικό διάστημα [7]. Τα συχνότερα συμπτώματα που οδηγούν τον ασθενή στο γιατρό είναι η κόπωση και ο κνησμός στο 21 και 19% των ασθενών αντίστοιχα. Στο σύνολο των ασθενών, το 78% αναφέρει κόπωση και σχετίζεται με σημαντικό επηρεασμό της ποιότητας ζωής [65]. Η παρουσία κόπωσης δε φαίνεται να σχετίζεται με τη σοβαρότητα, το ιστολογικό στάδιο ή τη διάρκεια της νόσου. Κνησμός αναφέρεται στο 20-70% των ασθενών με ΠΧΚ και αποτελεί συνήθως το πιο βασανιστικό σύμπτωμα [66]. Ο κνησμός συνήθως προηγείται της εμφάνισης του ικτέρου κατά πολλά έτη. Στην παθογένεια του κνησμού φαίνεται ότι παίζουν ρόλο τα ενδογενή οπιοειδή, αν και η αιτιολογία παραμένει ακόμα ασαφής. Άλλα συχνά ευρήματα σε ασθενείς με ΠΧΚ είναι η συνύπαρξη άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων με συχνότερα το σύνδρομο Sjögren και τη θυρεοειδίτιδα Hashimoto, ενώ συχνά επίσης υπάρχει οστεοπενία. Τα κλινικά σύνδρομα που σχετίζονται με την παρουσία πυλαίας υπέρτασης, όπως ο ασκίτης, η ηπατική εγκεφαλοπάθεια και αιμορραγία από κίρσοις οισοφάγου εμφανίζονται μόνο στα τελικά στάδια της νόσου. Η παρουσία ικτέρου χαρακτηρίζει τα τελικά στάδια της νόσου και τιμές  $>10\text{mg/dl}$  αποτελούν ένδειξη για μεταμόσχευση στους ασθενείς με ΠΧΚ. Η επίπτωση του ηπατοκυτταρικού καρκίνου είναι αυξημένη σε ασθενείς με προχωρημένο ιστολογικά στάδιο της νόσου.

Άλλα νοσήματα που έχουν συσχετιστεί με την ΠΧΚ είναι διάμεση πνευμονίτιδα, κοιλιοκάκη, σαρκοείδωση, σωληναριακή οξέωση, αιμολυτική αναιμία και ιδιοπαθής θρομβοπενία.

### **1.2.5.1 Φυσική εξέταση ΠΧΚ**

Συχνά δεν υπάρχουν ευρήματα κατά τη φυσική εξέταση των ασθενών με ΠΧΚ, κυρίως αυτών που είναι ασυμπτωματικοί [3]. Συχνά παρατηρείται μελάχρωση του δέρματος και εκδορές από τον κνησμό. Επίσης περίπου 5-10% των ασθενών παρουσιάζει ξανθελάσματα, ενώ είναι σπάνια η παρουσία ξανθωμάτων. Ηπατομεγαλία μπορεί να υπάρχει περίπου στο 70% των ασθενών, ενώ σπληνομεγαλία και αγγειωματώδεις σπίλοι μπορεί να υπάρχουν σε προχωρημένα στάδια της νόσου [3]. Όπως προαναφέρθηκε ο ίκτερος είναι εύρημα σε προχωρημένα στάδια της νόσου.

### **1.2.6 Εργαστηριακά ευρήματα ΠΧΚ**

Χαρακτηριστικό των ασθενών με ΠΧΚ είναι διαταραχή κυρίως των χολοστατικών ενζύμων, της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) και της γ-γλουταμινικής τρανσφεράσης (γ-GT), ενώ σε μικρότερο βαθμό είναι αυξημένες και οι αμινοτρανσφεράσες (alanine aminotransferase-ALT και aspartate aminotrasferase -AST). Αρκετοί έχουν αυξημένα επίπεδα ανοσοσφαιρινών, κυρίως IgM. Οι διαταραχές της ηπατικής βιοχημείας σχετίζονται εν μέρει με το ιστολογικό στάδιο της νόσου και τη σοβαρότητα των ιστολογικών βλαβών [8, 67]. Η αύξηση της ALP σε μη κίρρωτικούς ασθενείς φαίνεται να σχετίζεται με το βαθμό της χολαγγειοπενίας και της φλεγμονής, ενώ η αύξηση των αμινοτρανσφερασών και της IgG σχετίζεται με την παρουσία περιτυλαίας λοβιακής νέκρωσης και φλεγμονής.

Άλλο συχνό εύρημα σε ασθενείς με ΠΧΚ είναι η υπερλιπιδαιμία, ο μηχανισμός δε που ευθύνεται για την ανάπτυξή της είναι διαφορετικός από αυτόν που ευθύνεται

σε άλλα νοσήματα, ενώ οι ασθενείς με ΠΧΚ φαίνεται ότι δεν έχουν αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν αθηρωμάτωση [68].

### **1.2.7 Διάγνωση ΠΧΚ**

Σύμφωνα με τις συστάσεις της Αμερικανικής Εταιρείας για τη μελέτη του ήπατος (AASLD), η διάγνωση της ΠΧΚ βασίζεται στα ακόλουθα 3 κριτήρια: 1) παρουσία χολόστασης, που συχνά εμφανίζεται με αύξηση τόσο της ALP και της γGT για περισσότερο από 6 μήνες, 2) την παρουσία AMA σε τίτλο  $\geq 1:40$  και 3) ιστολογικές βλάβες συμβατές με μη πυώδη καταστροφική χολαγγειίτιδα και καταστροφή των ενδολοβιακών χοληφόρων [2]. Ως πιθανή (probable) θεωρείται η διάγνωση της ΠΧΚ όταν πληρούνται 2 από τα 3 κριτήρια, ενώ βέβαιη (definite) είναι όταν πληρούνται και τα 3 κριτήρια.

### **1.2.8 Μέθοδοι ανίχνευσης των AMA**

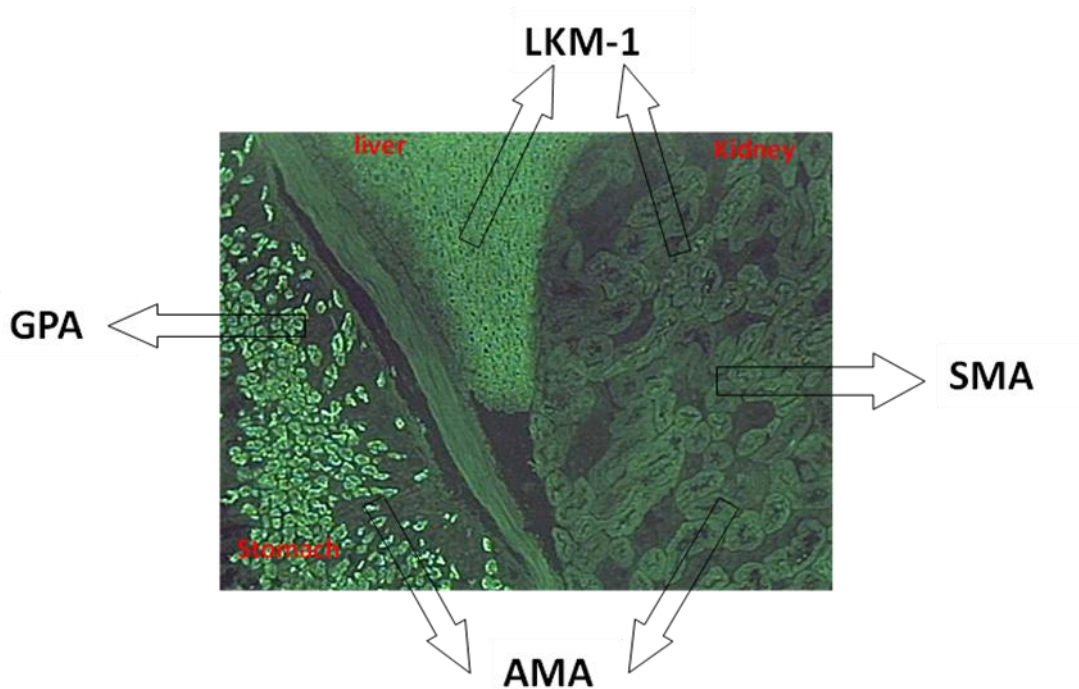
Η παρουσία των AMA είναι τόσο στενά συνδεδεμένη με την ΠΧΚ, που η απουσία τους θέτει σε αμφισβήτηση τη διάγνωση [1, 48]. Επίσης η παρουσία των AMA σε ασυμπτωματικούς ασθενείς χωρίς αύξηση των χολοστατικών ενζύμων είναι προγνωστικός δείκτης ανάπτυξης της νόσου στο μέλλον. Ως εκ τούτου είναι απαραίτητη η ύπαρξη μεθόδων που μπορούν να ανιχνεύσουν τα AMA αξιόπιστα. Τα AMA μπορούν πλέον να ανιχνευθούν με αρκετές μεθόδους. Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (ΕΑΦ) αποτέλεσε την αρχική μέθοδο και αποτελεί ακόμα την πιο κοινή και αξιόπιστη μέθοδο ανίχνευσής τους στο εργαστήριο [69-70]. Το ιδανικό υπόστρωμα είναι φρέσκες ή κατεψυγμένες τομές ήπατος, στομάχου και νεφρού

από αρουραίο, ενώ μπορούν σαν υπόστρωμα να χρησιμοποιηθούν μονιμοποιημένα καρκινικά κύτταρα HEp-2 αλλά κυρίως για την καλύτερη ανίχνευση των προτύπων ANA [69-70].

Η μέθοδος του ΕΑΦ βασίζεται στην χρήση συνδυασμένου υποστρώματος από ιστούς αρουραίου και μπορεί να επιτρέψει την ανίχνευση μιας ποικιλίας αυτοαντισωμάτων, όπως τα αντισώματα έναντι των λείων μυικών ινών (smooth muscle antibodies-SMA), αντισωμάτων έναντι των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου (gastric parietal cells, GPA) και των αντισωμάτων έναντι μικροσωμίων ήπατος και νεφρού (liver kidney microsomal antibodies, αντί-LKM) (Εικόνα 1.4) [71].

Το τυπικό pattern των AMA στον ΕΑΦ χαρακτηρίζεται από συνεχή φθορισμό των εγγύς και άπω εσπειραμένων σωληναρίων του νεφρού (Εικόνα 1.5), ενώ σε παρουσία αντισωμάτων έναντι των αντί-LKM χαρακτηριστικά υπάρχει φθορισμός μόνο στα εγγύς σωληνάρια. Για το λόγο αυτό σημασία έχει και η σωστή προετοιμασία των τομών. Σε υπόστρωμα HEp-2 κυττάρων παρατηρείται κυτταροπλασματικός φθορισμός (Εικόνα 1.6).

Οι τομές (ήπατος, νεφρών, στομάχου) μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίς μονιμοποίηση ή να φυλαχθούν στους -20°C για 4 – 8 εβδομάδες μέχρι τη χρήση. Υπάρχουν και εμπορικά διαθέσιμες τομές η ποιότητα παρασκευής των οποίων ποικίλλει, δεδομένου ότι για να παρατείνουν την ημερομηνία λήξης μονιμοποιούνται με αποτέλεσμα να παρατηρείται αυξημένο background, το οποίο μπορεί να περιορίσει την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων.

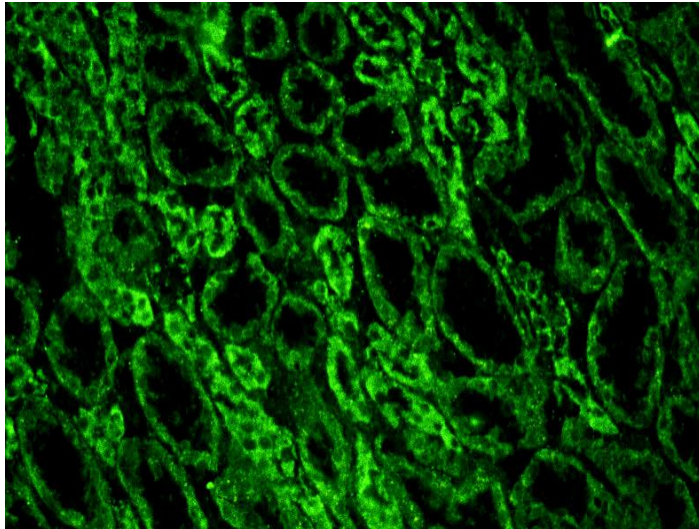


**Εικόνα 1.4.** Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός σε συνδυασμένες τομές ήπατος, στομάχου και νεφρού από αρουραίο δίνει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλών αυτοαντισωμάτων. Υποδεικνύονται οι θέσεις ανίχνευσης διαφόρων αυτοαντισωμάτων: AMA (antimitochondrial antibodies-αντιμιτοχονδριακά αντισώματα), SMA (smooth muscle antibodies-έναντι λείων μυικών ινών), GPA (gastric parietal cells antibodies- αντισώματα έναντι τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου) και αντί-LKM (liver kidney microsomal antibodies- αντισώματα έναντι μικροσωμίων ήπατος και νεφρού) (αρχείο Δ.Π.Μπόγδανου).

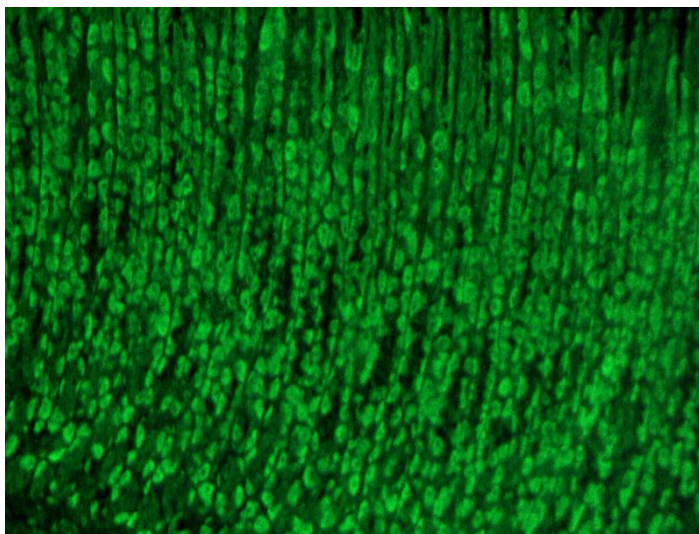
Στα μειονεκτήματα του ΕΑΦ αναφέρονται ότι μπορεί να ανιχνεύσει την παρουσία των AMA, χωρίς όμως να μπορεί να ανιχνεύσει αντιδραστικότητα έναντι μεμονωμένων αντιγόνων. Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι μπορεί να ταυτοποιήσει και άλλες κλάσεις AMA πλην των IgG ανάλογα με το δευτερεύον αντίσωμα που χρησιμοποιείται στο πείραμα, ενώ μπορεί να ανιχνεύσει και άλλα



αυτοαντισώματα που συχνά συνυπάρχουν στην ΠΧΚ, όπως είναι τα ειδικά για την ΠΧΚ ANA. Στα μειονεκτήματα του ΕΑΦ είναι το ότι είναι χρονοβόρος και η εκτίμηση των αποτελεσμάτων του εξαρτώνται από τον παρατηρητή.

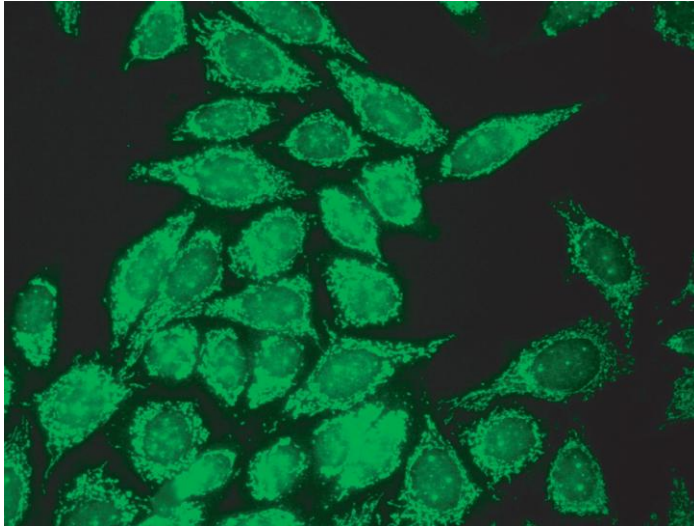


**A.**



**B.**

**Εικόνα 1.5.** Αντιμιτοχονδριακά αντισώματα με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού σε υπόστρωμα νεφρού (A, συνεχής φθορισμός των εγγύς και άπω εσπειραμένων σωληναρίων του νεφρού) και ήπατος (B) αρουραίου.



*Εικόνα 1.6. Τα αντιμιτοχονδριακά αντισώματα προσδίδουν κυτταροπλασματικό φθορισμό σε μονιμοποιημένα HEp-2 κύτταρα με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού.*

Αυτές οι δυσκολίες οδήγησαν στην ανάπτυξη και χρήση μοριακών μεθόδων, όπως είναι οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι (ELISA) και η ανοσοαποτύπωση, που επιτρέπουν τον προσδιορισμό της αντιδραστικότητας έναντι επιμέρους αντιγονικών στόχων των μιτοχονδρίων. Στα πλεονεκτήματα της ELISA συγκαταλέγονται το ότι μπορεί να είναι ημιαυτοματοποιημένη, γίνεται γρήγορα, είναι αντικειμενική και μπορεί να ελέγξει πολλά δείγματα ταυτόχρονα. Οι πρώτες ELISA βασίστηκαν σε καθαρισμένο PDC από μιτοχόνδρια καρδιάς χοίρου ή μοσχαριού. Οι μέθοδοι αυτές είχαν χαμηλή ευαισθησία δεδομένου ότι 4-13% των ασθενών με κλινικές, βιοχημικές και ιστολογικές ενδείξεις ΠΧΚ δεν παρουσίαζαν αντιδραστικότητα έναντι των AMA-M2. Αυτό οφειλόταν στο γεγονός ότι οι ασθενείς αυτοί εμφάνιζαν αντιδραστικότητα έναντι των BCOADC-E2 και/ή OGDC-E2 [48]. Επίσης είναι γνωστό ότι περίπου στο 5% των ασθενών με ΠΧΚ δεν ανιχνεύονται AMA με ΕΑΦ και δεν παρουσιάζουν αντιδραστικότητα έναντι του PDC.

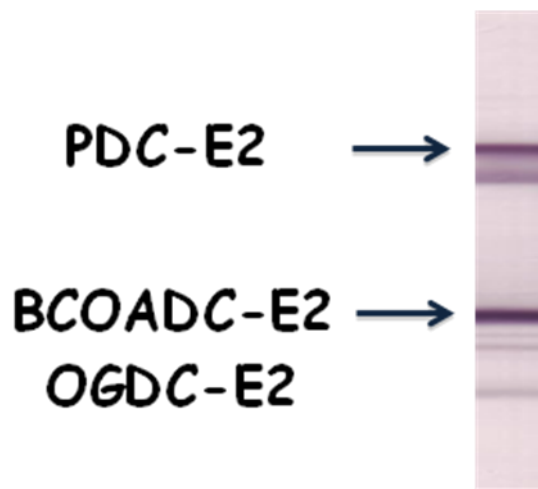
Αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη μιας ELISA με τη χρήση ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων των τριών κυρίαρχων επιτόπων των μιτοχονδριακών αντιγόνων (MIT3) [72]. Το ανασυνδυασμένο αυτό υβριδικό αντιγόνο περιέχει τους 3 επιτόπους από το PDC-E2, το BCOADC-E2 και το OGDC-E2. Η μέθοδος αυτή έχει αυξημένη ευαισθησία συγκριτικά με τον ΕΑΦ, γιατί οδηγεί στην ανίχνευση των AMA περίπου στο 70% των AMA αρνητικών δειγμάτων με ΕΑΦ [72]. Σε συνάρτηση με τα παραπάνω, οι Gabeta και συνεργάτες έδειξαν ότι η χρήση μιας MIT3 ELISA για την ανίχνευση IgG και IgA τάξεων οδήγησε στην ανακάλυψη AMA στο 45% Ελλήνων ασθενών με ΠΧΚ, που θεωρούνταν μέχρι τότε AMA αρνητικοί [63].

Στην πλειοψηφία των ασθενών τα AMA είναι IgG τάξης. Ιδανική θα μπορούσε να θεωρηθεί η ELISA που ανιχνεύει όλες τις τάξεις των AMA και συγκεκριμένα IgG, IgM και IgA. Όσον αφορά στα IgA AMA είναι αυτοαντισώματα που μπορεί να ανιχνευτούν στη χολή, στο σάλιο και στα ούρα ασθενών με ΠΧΚ [73-74]. Δεδομένου ότι IgA είναι κυρίαρχη ανοσοσφαιρίνη του επιθηλίου και αποτελεί τη βασική πρωτεΐνη στη χολή, προτάθηκε η πιθανή συμβολή της στην παθογένεια της βλάβης των χοληφόρων στην ΠΧΚ διαμέσου της σύνδεσης των IgA AMA με το αυτοαντιγόνο στόχο στο επιθήλιο των χοληφόρων. Σε συνάφεια με αυτό φάνηκε ότι τα IgA αλλά όχι τα IgG AMA επάγουν την ενεργοποίηση της κασπάσης σε πειραματικό μοντέλο νεφρικών κυττάρων σκύλου που είχαν μολυνθεί με πολυμερισμένο Ig υποδοχέα [75]. Παρά τις υπάρχουσες υποθέσεις για τον πιθανό παθογενετικό ρόλο των IgA AMA στην ΠΧΚ, τα δεδομένα που αφορούν στην κλινική τους σημασία είναι διφορούμενα. Η μελέτη των Gabeta και συνεργατών δεν μπόρεσε να δείξει συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των IgA AMA και του κλινικού/ ιστολογικού

σταδίου της νόσου, αν και υπήρχε μια τάση για συσχέτιση με το Mayo risk score [63].

Η ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιείται μόνο σε εξειδικευμένα κέντρα για πειραματικούς σκοπούς και λιγότερο για διάγνωση, ενώ έχει πρωταγωνιστικό ρόλο στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ELISA και την προτυποποίηση αυτής της μεθόδου [48]. Στη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα συνήθως ομογενοποιημένο ιστικό εκχύλισμα ή κλάσμα (πχ μιτοχονδριακό) που έχει απομονωθεί μετά από υπερφυγοκέντρηση ιστών (συνήθως καρδιά βοός ή χοίρου, ήπαρ αρουραίου ή ανθρώπινος πλακούντας). Ο διαχωρισμός των συστατικών γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και στη συνέχεια ακολουθεί αποτύπωση σε μεμβάνες νιτροκυτταρίνης και τέλος ανοσοσήμανση με ενζυμο-σημασμένες ανοσοσφαιρίνες. Τα αντιγόνα διαχωρίζονται βάσει του μοριακού τους βάρους και της ηλεκτροφορητικής τους ικανότητας (Εικόνα 1. 7) .

Όπως και με τις προηγούμενες μεθόδους (ΕΑΦ και ELISA), προκειμένου να ανιχνευτούν όλες οι τάξεις AMA, πρέπει κανονικά να χρησιμοποιείται σαν δευτερογενές αντίσωμα αντιανθρώπιος πολυδύναμη ανοσοσφαιρίνη IgA, IgG και IgM και στη συνέχεια αν απαιτείται (ως reflex τεστ) μεμονωμένες τάξεις. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι με τη χρήση τέτοιου δευτερεύοντος αντισώματος, η ανοσοαποτύπωση είχε υψηλότερη ειδικότητα και ευαισθησία για την ανίχνευση των AMA από ότι ο ΕΑΦ σε τομές αρουραίου [76]. Οι Rigorouli και συνεργάτες έδειξαν ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ του τίτλου των AMA σε ΕΑΦ και του αριθμού (καθώς και του μεγέθους) των μπαντών, που αντιστοιχούν σε αντιμιτοχονδριακά αντιγόνα στην ανοσοαποτύπωση [54].



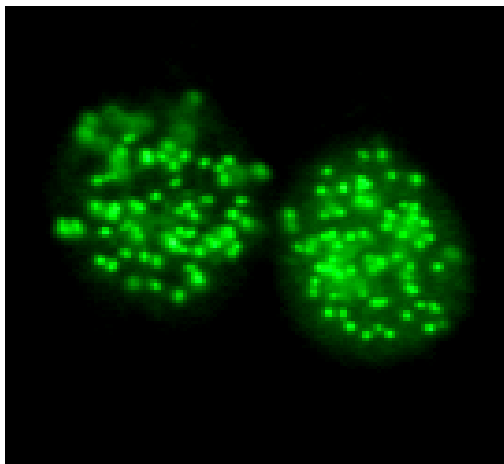
**Εικόνα 1.7.** Αντιπροσωπευτικό πείραμα ανοσοαποτύπωσης AMA θετικού ασθενούς με ΠΧΚ χρησιμοποιώντας ως αντιγόνο μιτοχονδριακό κλάσμα απομονωμένο από πρωτεύον (*primate*) θηλαστικό. Απεικονίζεται η αντιδραστικότητα έναντι των κύριων αντιμιτοχονδριακών αντιγόνων (PDC-E2, BCOADC-E2 και OGFC-E2) με τη μορφή των ορατών ζωνών.

### 1.2.9 Αντιπυρηνικά αντισώματα στην ΠΧΚ

Αντιπυρηνικά αντισώματα ανιχνεύονται έως και στο 70% των ασθενών με ΠΧΚ. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται αυτά που δεν είναι ειδικά για την ΠΧΚ και αυτά που θεωρούνται ειδικά για τη νόσο. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα αντικεντρομεριδιακά αντισώματα (AKA) και αυτά έναντι εκχυλισμένων πυρηνικών αντιγόνων (αντί-ENA), τα οποία αναγνωρίζουν μεγάλη γκάμα μοριακών στόχων, όπως είναι οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες του πυρήνα, ριβοσωμικές φωσφοπρωτεΐνες, και κυτταρικά ένζυμα, όπως είναι η DNA τοποϊσομεράση I (Scl-70) και η ιστιδυλ-tRNA συνθετάση (Jo-1).

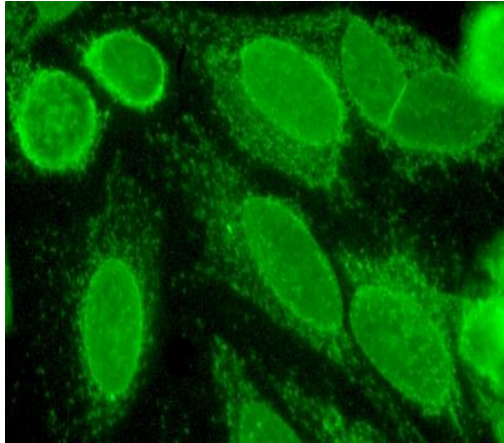
Αρκετές μελέτες των τελευταίων 15 ετών έχουν δείξει ότι η παρουσία ANA ειδικών για την ΠΧΚ έχουν διαγνωστική αξία, ενώ σε κλινικό επίπεδο έχουν προγνωστική αξία δεδομένου ότι υποδεικνύουν χειρότερη πρόγνωση [77]. Τα ειδικά για την ΠΧΚ αντιπυρηνικά αντισώματα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες βάσει του προτύπου ανοσοφθορισμού που προσδίδουν στον ΕΑΦ σε κύτταρα HEp-2: αυτά που έχουν πρότυπο πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων (multiple nuclear dots, MND) και αυτά που έχουν περιπυρηνικό πρότυπο μεμβράνης (rim-like membranous pattern, RLM) [48].

Το MND πρότυπο χαρακτηρίζεται από την παρουσία 3-20 κηλίδων που κατανέμεται σε όλο τον πυρήνα, αλλά καθόλου στους πυρηνίσκους (Εικόνα 1.8). Ο κύριος μοριακός τους στόχος περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1987 από τους Szostecki και συνεργάτες [78].



**Εικόνα 1.8.** Πρότυπο πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων σε ανοσοφθορισμό σε κύτταρα HEp2 με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού σε ασθενή με πρωτοπαθή χολική κίρρωση.

Το RLM πρότυπο χαρακτηρίζεται από χαρακτηριστικό φθορισμό της περιφέρειας του πυρήνα και οφείλεται σε αντισώματα έναντι δομών του πυρηνικού φακέλου (Nuclear pore complexes, NPC), που βοηθούν στη μεταφορά μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (Εικόνα 1.9).



*Εικόνα 1.9. Πρότυπο περιπυρηνικού φθορισμού σε κύτταρα HEp-2 με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού σε ασθενή με πρωτοπαθή χολική κίρρωση*

Η εκτίμησή τέτοιων αυτοαντισωμάτων με ΕΑΦ απαιτεί πολύ εξειδικευμένο παρατηρητή, γιατί μπορεί εύκολα να μπερδευτεί με τον κυτταροπλασματικό φθορισμό των AMA στα HEp-2 κύτταρα.

Τα ειδικά για την ΠΧΚ ANA ανιχνεύονται στο 50% των ασθενών [79]. Η αναγνώριση των αντιγονικών στόχων αυτών των αυτοαντισωμάτων αποτέλεσε μεγάλη πρόοδο στη διαγνωστική προσπέλαση των ασθενών με ΠΧΚ. Επίσης οδήγησε στην ανάπτυξη μεθόδων ELISA και ανοσοαποτύπωσης για την ανίχνευσή τους, οι οποίες είναι πιο ευαίσθητες και αντικειμενικές ως προς την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων τους.

Η εκτίμηση των ANA με τη μέθοδο του ΕΑΦ μπορεί να παρεμποδίζεται από την ταυτόχρονη παρουσία των AMA και μη ειδικών ANA (όπως τα αντικεντρομεριδιακά)

στον ορό των ασθενών με ΠΧΚ. Ο λόγος αυτός οδήγησε στην εσφαλμένη εντύπωση ότι ειδικά για την ΠΧΚ ANA είναι πιο συχνά σε AMA αρνητικούς ασθενείς παρά σε AMA θετικούς.

Σε μια μελέτη 105 ασθενών με ΠΧΚ, η χρήση ανοσοαποτύπωσης οδήγησε στην ανίχνευση αντί-NPCs στο 22% αυτών που ήταν ANA αρνητικοί με τη μέθοδο του ΕΑΦ και στο 35% αυτών που ήταν ANA θετικοί [80].

Σε μια άλλη μελέτη η χρήση αντι-ορών για τις επιμέρους υποτάξεις IgG απέδειξε ότι μπορεί να αυξήσει σημαντικά τη διαγνωστική αξία του συμβατικού ΕΑΦ [77]. Συγκεκριμένα, 65% των ασθενών με ΠΧΚ είχε MND και/ή RLM φθορισμό με τη χρήση αντι-IgG(1-4) αντιορών συγκριτικά με 15% όταν χρησιμοποιήθηκαν στους ίδιους ασθενείς IgG αντιοροί στον ΕΑΦ [77].

#### **1.2.9.1 Αντί-MND αντισώματα**

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) .

Οροί με MND πρότυπο έχουν ως αντιγονικό στόχο μια πρωτεΐνη του πυρήνα, που ονομάζεται sp100 και μια δεύτερη την PML (Promyelocytic Leukemia protein), η οποία ονομάστηκε έτσι γιατί υπερεκφράζεται σε κύτταρα της προμυελωτικής λευχαιμίας). Επίσης ένα τρίτο αντιγόνο είναι η πρωτεΐνη SUMO (small ubiquitin-like modifier).

Ο επιπολασμός των αντί-sp100 αντισωμάτων κυμαίνεται από 21 and 34% στους ασθενείς με ΠΧΚ [78]. Τα αντί-sp100 θεωρούνται ειδικά για την ΠΧΚ δεδομένου ότι



ανευρίσκονται πολύ σπάνια σε άλλα νοσήματα [81]. Τα αντί-sp100 αντισώματα φαίνεται ότι παραμένουν σταθερά κατά την πορεία της νόσου [81] και συνεχίζουν να ανιχνεύονται και μετά τη μεταμόσχευση [82].

Σε μια ελληνική μελέτη σε σύνολο 110 ασθενών με ΠΧΚ, μείωση του τίτλου των αντί- sp100 αντισωμάτων κατά τη διάρκεια της παρατήρησης συσχετίστηκε με βελτίωση του Mayo risk score και απάντηση στη θεραπεία με UDCA, υποδεικνύοντας ότι η παρακολούθηση του τίτλου των αντισωμάτων αυτών μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν προγνωστικός δείκτης [64].

Η χρήση αντι-ορών για τις επιμέρους υποτάξεις IgG απέδειξε ότι μπορεί να αυξήσει σημαντικά τη διαγνωστική αξία του συμβατικού ΕΑΦ. Συγκεκριμένα, 65% των ασθενών με ΠΧΚ είχε MND και/ή RLM φθορισμό με τη χρήση αντι-IgG(1-4) αντιορών συγκριτικά με 15% όταν χρησιμοποιήθηκαν στους ίδιους ασθενείς IgG αντιοροί στον ΕΑΦ [77]. Σε αυτή τη μελέτη αντί-MND αντιδραστικότητα παρουσίαζε το 41.1% από τους 90 ασθενείς με ΠΧΚ .

Η παρουσία αντί-MND (μετρούμενη είτε με ΕΑΦ είτε με ELISA έναντι του sp100) έχει συσχετιστεί με σημαντικά σοβαρότερη νόσο, όπως προκύπτει από βιοχημικές παραμέτρους, το εκτιμώμενο ιστολογικό στάδιο και την έκβαση των ασθενών [77, 82].

Η ταυτόχρονη αντιδραστικότητα έναντι και των sp100 και PML είναι συχνή, γεγονός που φαίνεται να οφείλεται στην κοινή εντόπισή τους στα πυρηνικά σωμάτια, όπου αποτελούν μέρος ενός συμπλέγματος καθώς και στο γεγονός ότι η έκφρασή τους επάγεται από κοινά ερεθίσματα (λοιμώξεις, ορμόνες κ.ά) [81, 83]. Η ανάπτυξη μιας line immunoassay (LIA) φάνηκε ότι υπερτερεί στην ανίχνευση των αντί-PML παράλληλα με αντί-sp100 συγκριτικά με την κλασικά μέθοδο του ΕΑΦ (12.6% έναντι

23%, αντίστοιχα). Οι Mytilinaίου και συνεργάτες έδειξαν ότι τα αντισώματα αυτά είναι ειδικά για την ΠΧΚ, δεδομένου ότι βρέθηκαν μόνο στο 2% των μαρτύρων. Τα sp100 ανιχνεύτηκαν πιο συχνά από τα αντί-PML (23% έναντι 13%) [81]. Η παρουσία διπλής αντιδραστικότητας (αντί-PML+/Sp100+) συσχετίστηκε με πιο προχωρημένο στάδιο της νόσου.

Πρόσφατα αναφέρθηκε η ανακάλυψη μιας ακόμα πρωτεΐνης που προσδίδει MND πρότυπο στον ΕΑΦ, που ονομάστηκε Sp140 και σύμφωνα με μια Ιταλική μελέτη έχουν πολύ σημαντική διαγνωστική αξία [84]. Ανιχνεύτηκε στο 15% των ασθενών, αλλά η ειδικότητά τους είναι 100%, ενώ η παρουσία τους στους AMA αρνητικούς ασθενείς αναφέρεται στο 53% [84].

#### **1.2.9.2 Αντί-RLM αντισώματα**

Τα NPC είναι μοριακές δομές 125 kDa που βρίσκονται σε σημεία που ενώνονται η εσωτερική και εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης του πυρήνα και αποτελούνται από τουλάχιστον 80-100 πρωτεΐνες. Κάποιες από αυτές έχουν χαρακτηριστεί. Ως αντιγονικοί στόχοι των ANA που προσδίδουν RLM πρότυπο στον ΕΑΦ σε ασθενείς με ΠΧΚ έχουν ταυτοποιηθεί η πρωτεΐνη gp210, η nucleoporin 62 και ο υποδοχέας lamin B (LBR) [79].

Η παρουσία αντί-RLM αντισωμάτων αναφέρθηκε για πρώτη φορά με λεπτομέρεια το 1985 και θεωρείται ειδική για την ΠΧΚ [85]. Ανιχνεύεται περίπου στο 25% των ασθενών με ΠΧΚ και σε περίπου 1% των μαρτύρων. Ο αντιγονικός στόχος των αντί-RLM αντισωμάτων βρέθηκε ότι είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 210 kDa, που ονομάστηκε gp210 [86]. Η συχνότητα ανίχνευσης των αντί-gp210 σε ασθενείς με ΠΧΚ κυμαίνεται στο 10-41% των AMA θετικών και στο 20-50% των AMA αρνητικών ασθενών [47,

64, 73, 87-90]. Οι Rigoroulou και συνεργάτες με τη χρήση αντι-ορών για τις επιμέρους υποτάξεις IgG έδειξε ότι ο επιπολασμός των αντί-RLM αντισωμάτων είναι 46.7% σε πληθυσμό 90 ασθενών με ΠΧΚ [77].

Η διακύμανση του επιπολασμού των αντί-gr210 ανάμεσα στις διάφορες μελέτες μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε, ενώ δεν μπορεί να αποκλειστεί και το ενδεχόμενο να παίζουν ρόλο και γεωγραφικές/εθνικές διαφορές. Μελέτες της τελευταίας δεκαετίας έδειξαν ότι τα αντί-NPC αντισώματα και κυρίως τα αντί-gr210 είναι προγνωστικοί δείκτες εξέλιξης της ΠΧΚ σε τελικά στάδια της νόσου [91-92]. Σε συνάρτηση με τα παραπάνω, οι Rigoroulou και συνεργάτες έδειξαν με τη χρήση αντιορών που εμπεριέχουν υποτάξεις των IgG ότι η παρουσία αντί-RLM αντισωμάτων και κυρίως αυτών της IgG3 υποτάξης είχαν πιο προχωρημένη νόσο [64, 77].

Αντίθετα μια ελληνική μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκε εμπορική ELISA για την ανίχνευση των αντί-gr210 δεν έδειξε να υπάρχει συσχέτιση του τίτλου τους με κακή πρόγνωση των θετικών ασθενών με ΠΧΚ [64]. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε και στο γεγονός ότι ο επιπολασμός των αντί-gr210 στο συγκεκριμένο πληθυσμό ήταν χαμηλός (4.5%).

Δεδομένης της έλλειψης προγνωστικών μοντέλων για την ΠΧΚ, θεωρείται πλέον ότι προσδιορισμός των αντί-gr210 σε ασθενείς με πρώιμο στάδιο ΠΧΚ μπορεί να προστεθεί στο panel των εξετάσεων για την αρχική εκτίμηση των ασθενών με ΠΧΚ.

Το δεύτερο συχνότερο στοιχείο του συμπλέγματος των NPC είναι η νουκλεοπορίνη 62 (nup62). Ανάλογα με τη μέθοδο που έχει χρησιμοποιηθεί, έχει αναφερθεί μεγάλη διακύμανση στην ανίχνευση της nup62 σε ασθενείς με ΠΧΚ. Σε μελέτη που εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης αναφέρεται ότι 15% των ασθενών

με ΠΧΚ είχαν αντί-nur62, ενώ η ίδια ομάδα με τη χρήση ανοσοκατακρήμνισης αναφέρει οροθετικότητα σε 55% των ασθενών [92-93]. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν την σύγχυση που υπάρχει ως αναφορά τη γνώση μας για τον πραγματικό επιπολασμό των αντί-nur62 στους ασθενείς με ΠΧΚ και ότι στην παρούσα φάση δεν υπάρχουν οδηγίες για το ποια μέθοδος πρέπει να χρησιμοποιείται για την ανίχνευσή τους.

Πολύ σπανιότερα ανιχνεύονται και αντισώματα έναντι του LBR (1.3%), αν και στη Ιαπωνία αναφέρονται σε υψηλότερο ποσοστό (9%). Έχουν αναφερθεί και άλλα αντισώματα του φακέλου σε ασθενείς με ΠΧΚ, όπως είναι έναντι της Trp πρωτεΐνης, των lamina-σχετιζόμενων πολυπεπτιδίων (LAP1 και LAP2) και έναντι των lamins, αλλά δεν θεωρούνται ειδικά για τη νόσο [79].

Το 2010 οι Liu και συνεργάτες [90] εκτίμησαν την αποτελεσματικότητα μιας ανοσοενζυμικής μεθόδου (PBC screen) για τη ταυτόχρονη ανίχνευση ειδικών για την ΠΧΚ AMA και ANA, χρησιμοποιώντας IgG και IgA αυτοαντισώματα έναντι των κύριων επιτόπων των 3 μιτοχονδιακών αντιγόνων (MIT3) και πυρηνικών αντιγόνων (gp210, and sp100). Συγκριτικά με τις ανοσοενζυμικές μεθόδους για την ανίχνευση των επιμέρους αυτοαντισωμάτων, το PBC screen φάνηκε να έχει καλή ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση των ειδικών για την ΠΧΚ αυτοαντισωμάτων. Παράλληλα, το 44.7% των ατόμων που είχαν θεωρηθεί σαν AMA αρνητικοί με ΕΑΦ, ήταν AMA θετικοί με τη μέθοδο αυτή [90].

### 1.2.10 Ιστολογικά ευρήματα ΠΧΚ

Η ΠΧΚ ιστολογικά χαρακτηρίζεται από καταστροφή του επιθηλίου των χοληφόρων πόρων ιδιαίτερα των μικρών, μεσολόβιων πόρων. Συχνά συνυπάρχουν πυκνές λεμφοκυτταρικές αθροίσεις γύρω από τα χοληφόρα (florid duct lesions) και κοκκιώματα κυρίως στα πρώιμα στάδια. Οι διηθήσεις χαρακτηρίζονται από την παρουσία πλασματοκυττάρων, μακροφάγων και πολυμορφοπύρηνων (κυρίως ηωσινοφίλων). Ένα άλλο σημαντικό εύρημα που μπορεί να ανευρεθεί στην ΠΧΚ είναι η χολαγγειοπενία, η οποία ορίζεται ως εξάλειψη των χοληφόρων >50% των πυλαίων διαστημάτων που περιλαμβάνονται στην βιοψία.

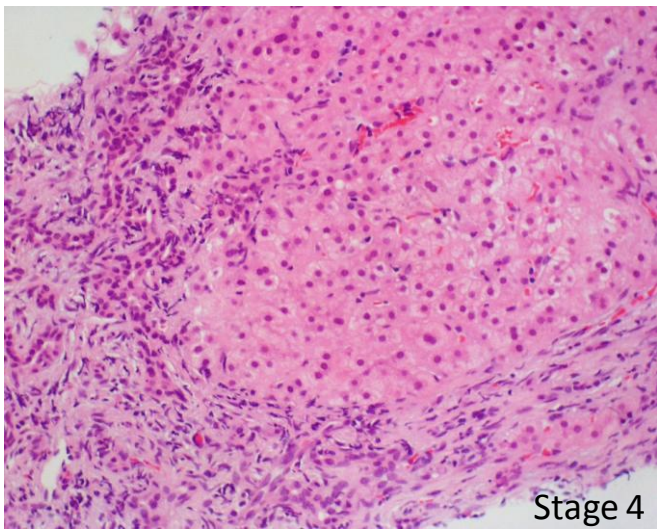
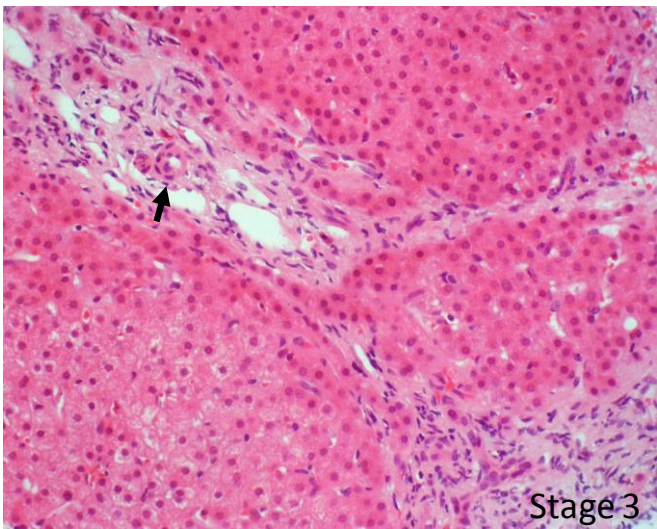
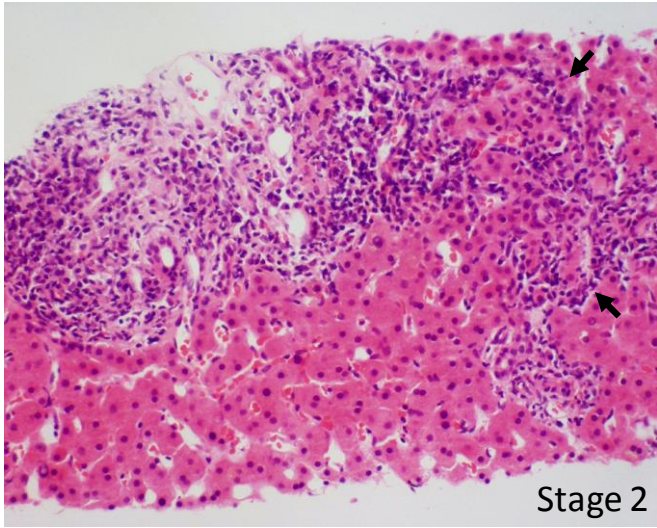
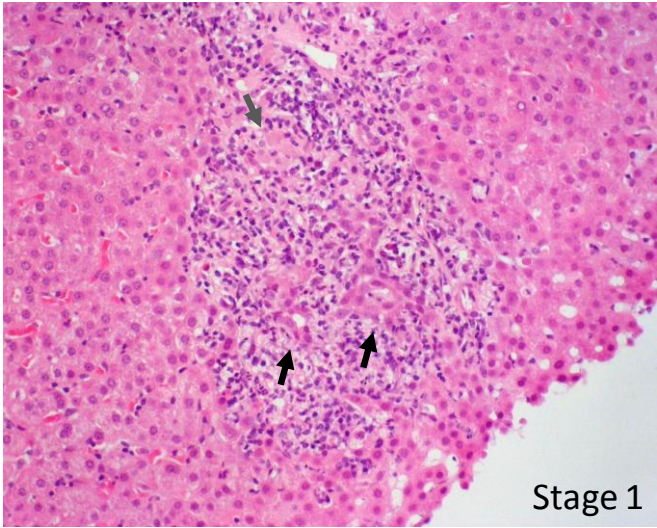
Η ταξινόμηση των ιστολογικών αλλοιώσεων στην ΠΧΚ γίνεται σε 4 στάδια σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Scheuer και κατά Ludwig, οι οποίες παρουσιάζουν ελάχιστες διαφορές μεταξύ τους [94].

Στο Στάδιο I, παρατηρείται φλεγμονή εντός των πυλαίων διαστημάτων με ή χωρίς φλεγμονή γύρω από τα χοληφόρα. Στο Στάδιο II παρατηρείται επέκταση των φλεγμονωδών διηθήσεων στο ηπατικό παρέγχυμα (2 τύπου διαβρωτικής νέκρωσης: χολική διαβρωτική νέκρωση ή χολική περιπυλαία ηπατίτιδα). Στο στάδιο III ανευρίσκεται διαταραχή της αρχιτεκτονικής του ήπατος και πολλαπλά ινώδη διαφραγμάτια. Το στάδιο IV χαρακτηρίζεται από την παρουσία κίρρωσης και αναγεννητικά οζία (Εικόνα 1.10).

Δεδομένης της υψηλής ειδικότητας των AMA για την νόσο θεωρείται πλέον ότι όταν συνυπάρχει και χολόσταση δεν είναι απαραίτητη η διενέργεια βιοψίας ήπατος [2].

Αυτή συστήνεται όταν δεν ανιχνεύονται AMA σε ασθενή με υψηλή υποψία για ΠΧΚ

και όταν βάσει των κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων πιθανολογείται η συνύπαρξη άλλου νοσήματος, όπως η αυτοάνοση ηπατίτιδα.



*Εικόνα 1.10. Οι ιστολογικές αλλοιώσεις στην ΠΧΚ διακρίνονται σε 4 στάδια (Κατά Ludwig)*

### **1.2.11 Φυσική ιστορία και θεραπεία ΠΧΚ**

Η φυσική ιστορία της ΠΧΚ έχει παρουσιάσει σημαντική βελτίωση τα τελευταία χρόνια. Αυτό οφείλεται κατά μεγάλο μέρος στο γεγονός ότι η διάγνωση γίνεται σε πρωιμότερα στάδια κυρίως λόγω της ευρύτερης χρήσης των ΑΜΑ στη διερεύνηση ασθενών με χολόσταση και της μεγαλύτερης ενημέρωσης και επαγρύπνησης των γιατρών για το νόσημα. Δεδομένης της πρωιμότερης διάγνωσης, αρκετοί ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί κατά τη διάγνωση, η οποία σε κάποιες μελέτες έχει συσχετιστεί με καλύτερη πρόγνωση. Επίσης η χορήγηση αγωγής με ουρσοδεοξυχολικό οξύ (ursodeoxycholic acid-UDCA) σε πρωιμότερα στάδια, όπως θα αναφερθούμε αναλυτικά παρακάτω, έχει συσχετιστεί με βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών με ΠΧΚ, κυρίως όταν χορηγείται σε πρώιμα στάδια [2].

Οι γνώσεις που είχαμε πριν 50 χρόνια για τη φυσική ιστορία της ΠΧΚ αφορούσαν σε ασθενείς που στην πλειοψηφία τους η διάγνωση γινόταν σε προχωρημένο ιστολογικό στάδιο και η ενδιάμεση επιβίωση ήταν βραχεία. Περιγράφονται 4 στάδια στη φυσική ιστορία της νόσου, αν και η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου δεν είναι προκαθορισμένη. Με την πάροδο των ετών έχει αναγνωριστεί ότι η ΠΧΚ παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια στην κλινική έκφραση με ποικιλία στην έκβαση του νοσήματος και στην ανταπόκριση στη θεραπεία.

Τα στάδια της φυσικής ιστορίας της ΠΧΚ [1, 3]:



- 1) Στάδιο προκλινικό, το οποίο χαρακτηρίζεται από την παρουσία AMA, χωρίς όμως να υπάρχει κλινική συμπτωματολογία και συμβατή βιοχημικά δραστηριότητα. Στο γενικό πληθυσμό έχει υπολογιστεί ότι AMA έχει το 0.5% [57]. Βασιζόμενοι στα υπάρχοντα επιδημιολογικά δεδομένα, πιστεύεται ότι λιγότερο από 10% των AMA θετικών ατόμων θα αναπτύξουν ΠΧΚ. Η προοπτική μελέτη των Metcalf και συνεργατών έδειξε ότι ασυμπτωματικοί ασθενείς με φυσιολογική ηπατική βιοχημεία παρουσίασαν συμπτώματα και διαταραχή της ηπατικής βιοχημείας σε ένα ενδιάμεσο χρόνο 6 ετών (εύρος 1-19 έτη). Κανείς από τους ασθενείς στη διάρκεια της παρακολούθησης δεν εμφάνισε κίρρωση [59].
- 2) Στάδιο ασυμπτωματικό, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία AMA και βιοχημικών διαταραχών χωρίς όμως συμπτωματολογία που σχετίζεται με τη νόσο. Από τη δεκαετία του 1970 έχει επισημανθεί ότι ένα μέρος των ασθενών με ΠΧΚ είναι ασυμπτωματικοί κατά τη διάγνωση. Σε μια μελέτη από την Βορειοανατολική Αγγλία μεταξύ των 770 ασθενών με ΠΧΚ, που παρακολουθήθηκαν από το 1987 έως το 1994, το 61% (469) ήταν ασυμπτωματικοί κατά τη διάγνωση [7]. Από άλλη μελέτη από τις ΗΠΑ φάνηκε ότι το 1/3 των ασυμπτωματικών ασθενών παρέμεινε χωρίς συμπτώματα καθόλη τη διάρκεια της παρακολούθησης [95]. Από μεγάλες πληθυσμιακές μελέτες της τελευταίας 10ετίας φαίνεται επίσης ότι η ενδιάμεση επιβίωση των ασυμπτωματικών ασθενών είναι μακρύτερη των συμπτωματικών ασθενών. Σε μια μελέτη παρακολούθησης 279 ατόμων με ΠΧΚ από τις ΗΠΑ για ένα χρονικό διάστημα έως και 24 έτη, οι ασυμπτωματικοί ασθενείς είχαν ενδιάμεση επιβίωση 16 έτη έναντι 7.5 έτη των συμπτωματικών ασθενών [95]. Ανάλογα είναι τα ευρήματα μεταγενέστερων μελετών [96]. Αντίθετα, οι Prince και συνεργάτες από

τη Βορειοανατολική Αγγλία έδειξαν ότι τόσο οι ασυμπτωματικοί όσο και οι συμπτωματικοί ασθενείς έχουν ανάλογη επιβίωση, αν και αρκετοί από την πρώτη ομάδα πέθαναν από μη ηπατικά αίτια [7].

- 3) Στάδιο συμπτωματικό το χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση συμπτωμάτων. Από τις υπάρχουσες μελέτες υπάρχει σημαντική διακύμανση στο χρονικό διάστημα από τη διάγνωση στην εμφάνιση συμπτωμάτων. Σε 2 μεγάλες μελέτες από την Αγγλία και τις ΗΠΑ το διάστημα αυτό ήταν 2 και 4.2 έτη, αντίστοιχα [9, 96]. Η ενδιάμεση επιβίωση στους ασθενείς αυτούς είναι 7.5 έτη [95]. Στους συμπτωματικούς ασθενείς η προχωρημένη ηλικία, αυξημένα επίπεδα χολερυθρίνης, τα μειωμένα επίπεδα αλβουμίνης και η παρουσία ηπατομεγαλίας και κίρρωσης σχετίστηκε με μειωμένη επιβίωση. Το Mayo risk score είναι ένα προγνωστικό μοντέλο που αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 80 και χρησιμοποιεί την ηλικία τους ασθενούς μαζί με βιοχημικές (χολερυθρίνη, χρόνος προθρομβίνης και αλβουμίνη) και κλινικές παραμέτρους (παρουσία οιδήματος, ασκίτη) για να υπολογίσει τη βραχυπρόθεσμη επιβίωση ασθενών με ΠΧΚ χωρίς θεραπεία [97].
- 4) Στάδιο με ρήξη της αντιρρόπησης, που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση κλινικών εκδηλώσεων ενδεικτικών σοβαρής πυλαίας υπέρτασης. Η μέση επιβίωση χωρίς μεταμόσχευση είναι σημαντικά ελαττωμένη.

### **1.2.12 Θεραπεία με ουρσοδεοξυχολικό οξύ**

Το ουρσοδεοξυχολικό οξύ (ursodeoxycholic acid-UDCA) είναι η μόνη μέχρι στιγμής ενδεδειγμένη θεραπεία για τους ασθενείς με ΠΧΚ [2]. Η χρήση του φαρμάκου έχει συμβάλει καθοριστικά στην αλλαγή της φυσικής πορείας της νόσου. Συνηγορητικό

υπέρ αυτού είναι το γεγονός ότι έχει μειωθεί ο αριθμός των ατόμων με ΠΧΚ, που χρειάζεται να μεταμοσχευτούν λόγω ηπατικής ανεπάρκειας.

Ο τρόπος δράσης του UDCA δεν είναι ιδιαίτερα σαφής, αν και υπάρχοντα δεδομένα δείχνουν ότι το φάρμακο δρα πλειοτροπικά. Το UDCA είναι υδρόφιλο και φαίνεται ότι στη δόση των 13-15mg/Kg/ημέρα βοηθάει στη μείωση των πρωτογενών χολικών οξέων συμβάλλοντας στην απέκκρισή τους. Παράλληλα έχει δειχτεί ότι προστατεύει τα κύτταρα από απόπτωση, ενώ ρυθμίζει κυτταρικούς σηματοδοτικούς μηχανισμούς [98]. Στην ενδεδειγμένη δόση το UDCA είναι ασφαλές με ελάχιστες παρενέργειες. Αρκετές τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες και μετα-αναλύσεις έχουν δείξει μέχρι τώρα ότι το UDCA βελτιώνει τις βιοχημικές παραμέτρους και επιβραδύνει την εξέλιξη του ιστολογικού στάδιου με αποτέλεσμα την βελτίωση της επιβίωσης χωρίς μεταμόσχευση [99-101]. Ισπανική μελέτη έδειξε ότι η επιβίωση των ασθενών με σταδίου I και II ΠΧΚ που παρουσίασαν βιοχημική ανταπόκριση μετά από 1 έτος χορήγησης UDCA ήταν παρόμοια με τους υγιείς μάρτυρες [102]. Σε συνάρτηση με αυτό η χορήγηση UDCA έχει συσχετιστεί με σταθεροποίηση ή βελτίωση της πίεσης στην πυλαία, αναστολή της εμφάνισης κίρσων οισοφάγου και καθυστέρηση του χρόνου μεταμόσχευσης [103].

Ένα μέρος των ασθενών με ΠΧΚ δεν θα ανταποκριθεί στη χορήγηση UDCA. Αυτοί είναι οι ασθενείς που θα έχουν εξέλιξη της νόσου σε προχωρημένο ιστολογικό στάδιο και θα χρειαστούν άλλη θεραπευτική παρέμβαση. Το 2006 η ομάδα της Βαρκελώνης πρότεινε σαν καλό προγνωστικό δείκτη την πτώση της τιμής της αλκαλικής φωσφατάσης μετά από 1 έτος θεραπείας με UDCA >40% της τιμής προ θεραπείας (Barcelona criteria). Οι ασθενείς που παρουσίασαν ανταπόκριση είχαν παρόμοια επιβίωση με το γενικό πληθυσμό [102, 104].

Χρειάζονται μακροχρόνιες μελέτες με καλή εκτίμηση των ασθενών με ΠΧΚ κατά την ένταξή τους στη μελέτη έτσι ώστε να αναγνωριστούν παράμετροι που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν προγνωστικοί δείκτες εξέλιξης του νοσήματος. Έτσι θα μπορέσει να αναγνωριστεί η ομάδα των ασθενών, οι οποίοι θα παρουσιάσουν γρήγορη εξέλιξη σε προχωρημένα στάδια και οι οποίοι θα χρειαστούν θεραπευτικές παρεμβάσεις που μπορούν να τροποποιήσουν τη φυσική ιστορία της νόσου.

Πολύ πρόσφατα μια πολυκεντρική μελέτη, που συμπεριέλαβε πάνω από 4000 ασθενείς με ΠΧΚ ανέπτυξε ένα νέο μοντέλο (GLOBE score) για να εκτιμήσει την πιθανότητα επιβίωσης χωρίς μεταμόσχευση στους ασθενείς που λαμβάνουν UDCA. Ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες για το θάνατο και τη μεταμόσχευση ήπατος ήταν η ηλικία, τα επίπεδα χολερυθρίνης, της αλβουμίνης και της αλκαλικής φωσφατάσης και ο αριθμός των αιμοπεταλίων [104].

### 1.2.13 Άλλες θεραπείες

**Το ομπετιχολικό οξύ (OCA)** είναι ένα ημισυνθετικό ανάλογο του χηνοδεοξυχολικού οξέος, που αποτελεί ενδογενή συνδέτη του υποδοχέα του farnesoid X receptor (FXR). Ο FXR ρυθμίζει την ομοιοστασία των χολικών οξέων διαμέσου της καταστολής της δράσης των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την σύνθεση, απέκκριση, σύνδεση, μεταφορά και απορρόφηση των χολικών οξέων. Το OCA είναι 100 φορές πιο ισχυρός αγωνιστής από το CDCA, ενώ αντίθετα το UDCA δεν δρα καθόλου στον FXR. Προκλινικές και κλινικές μελέτες έδειξαν ότι το OCA μειώνει τη χολόσταση, ενώ έχει αντιφλεγμονώδη και αντιινωτική δράση. Πρόσφατα, σε μια τυχαιοποιημένη μελέτη, η χορήγηση OCA σε ασθενείς που είχαν ανεπαρκή

ανταπόκριση στο UDCA οδήγησε μετά από 3 μήνες σε σημαντική μείωση της αλκαλικής φωσφατάσης σε σχέση με τις τιμές προ ενάρξεως της θεραπείας [105]. Βασική παρανέργεια ήταν ο επίμονος κνησμός, ο οποίος ήταν αμελητέος στο δόση των 10mg, η οποία φαίνεται ότι θα είναι και αυτή η οποία θα δοκιμαστεί σε κλινικές μελέτες φάσης III.

**Οι φιμπράτες**, συμπεριλαμβανομένων της φενοφιμπράτης, που είναι ειδικός αγωνιστής του ενεργοποιημένου άλφα υποδοχέα, που επάγει τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων (PPARα), και της βεζαφιμπράτης (παν-PPAR αγωνιστής) έχουν δείξει ότι βελτιώνουν την ηπατική βιοχημεία και τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών τόσο σε παίινε ασθενείς με ΠΧΚ, όσο και σε αυτούς που είχαν παρουσιάσει ανεπαρκή ανταπόκριση στο UDCA [106]. Επίσης οι φιμπράτες θεωρούνται ότι έχουν αντι-ινωτική δράση, διαμέσου της αναστολής του TGFb-1. Παρόλα αυτά σε κλινικό επίπεδο δεν είναι γνωστό από τις μέχρι τώρα μελέτες αν η χορήγηση φιμπρατών έχουν επίδραση στα κλινικά συμπτώματα και στην έκβαση των ασθενών με ΠΧΚ.

Η βουδεζονίδη είναι ένα μόριο με συνδυαστική δράση γλυκοκορτικοειδών και αγωνιστή του υποδοχέα Pregnane X (PXR), που έχει 15-20 φορές υψηλότερη συγγένεια δέσμευσης από ότι η πρεδνιζολόνη. Μέχρι τώρα 2 τυχαιοποιημένες μελέτες έχουν δείξει ότι συνδυασμός βουδεζονίδης με UDCA είναι πιο αποτελεσματικός στη βελτίωση της ηπατικής βιοχημείας και της ιστολογίας συγκριτικά με τη μονοθεραπεία με UDCA στους ασθενείς με ΠΧΚ [107-108]. Δεδομένων των λιγότερων παρενεργειών σε σχέση με τα κλασικά κορτικοειδή, ο συνδυασμός UDCA με βουδεζονίδη απομένει να μελετηθεί σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με ΠΧΚ για να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητά του και η ασφάλειά του.

### **1.3 ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ**

#### **1.3.1 Γενικά**

Η αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ) είναι μια σχετικά σπάνια χρόνια ηπατοπάθεια, η οποία κυρίως προσβάλλει γυναίκες και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια όσον αφορά στα επιδημιολογικά, γενετικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά της. Το κλασικό κλινικό πρότυπο αφορά γυναίκες με βασικά χαρακτηριστικά την παρουσία τρανσαμινασαιμίας, αυτοαντισωμάτων, αύξηση ανοσοσφαιρίνης G (IgG), ιστολογικά νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα και συσχέτιση με τον απλότυπο του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (HLA) DR3 ή DR4 [109-110].

#### **1.3.2 Ιστορική αναδρομή**

Η πρώτη περιγραφή ασθενούς με ΑΗ χρονολογείται το 1950, όταν ο Waldenström δημοσίευσε μια σειρά νέων γυναικών που παρουσίαζαν επιμένουσα, σοβαρή και συχνά με διακυμάνσεις ηπατίτιδα σχετιζόμενη με ακμοειδές εξάνθημα και αγγειοματώδεις σπίλους, ενώ στον εργαστηριακό έλεγχο είχαν αύξηση των ανοσοσφαιρίνων G και ANA.

Η θεραπευτική επίδραση των κορτικοστεροειδών έχει αναγνωριστεί από τις αρχές του 1960, όταν ελεγχόμενες κλινικές μελέτες έδειξαν ότι τα φάρμακα αυτά μπορεί να είναι σωτήρια στη θεραπεία της «HBsAg αρνητικής χρόνιας ηπατίτιδας» [111-112].

Ο όρος ΑΗ υιοθετήθηκε αργότερα από δύο συναντήσεις της Διεθνούς ομάδας για την αυτοάνοση ηπατίτιδα [International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG)], όταν πλέον είχε αναγνωριστεί η ετερογένεια της φύσης της νόσου, από οξεία εμφάνιση

και συχνά με παρουσία κλινικών και εργαστηριακών διακυμάνσεων έως περιόδους αυτόματης ύφεσης [113-114].

Η IAIHG ήταν αυτή που ήταν υπεύθυνη για την ανάπτυξη ενός αρχικού συστήματος βαθμονόμησης και αργότερα ενός πιο απλοποιημένου για την ευκολότερη χρήση του στην κλινική πράξη για τη διάγνωση της ΑΗ [114-115]. Πρόσφατα η Ευρωπαϊκή Εταιρεία για την Μελέτη του Ήπατος (European Association for the Study of Liver, EASL) εξέδωσε συστάσεις για τη διάγνωση και θεραπεία της ΑΗ [116].

### **1.3.3 Επιδημιολογία ΑΗ**

Η ΑΗ είναι σχετικά σπάνιο νόσημα αν και η πραγματική επίπτωση και επιπολασμός της νόσου είναι άγνωστος. Γενικά υπάρχουν λίγες περιγραφικές μελέτες, οι πρώτες εκ των οποίων δεν βασίζονται σε σαφή κριτήρια ορισμού της νόσου. Ο επιπολασμός της ΑΗ στην Ευρώπη κυμαίνεται από 16-18 περιπτώσεις ανά 100000 κατοίκους. Σε μια μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά τα απλοποιημένα κριτήρια της IAIHG και αφορούσαν στον πληθυσμό της Αλάσκας, που είναι σταθερός, ο επιπολασμός αναφέρεται 42.9 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους [117].

Επίσης μια πρόσφατη μελέτη από τη Δανία έδειξε ότι η επίπτωση στη χώρα διπλασιάστηκε σε διάστημα 20 ετών (από το 1994 έως το 2012), γεγονός που δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο σε αλλαγές στον τρόπο εύρεσης των περιστατικών [118].

Στην Ασία η ΑΗ θεωρείται ότι είναι πιο σπάνια. Οι περισσότερες περιπτώσεις προέρχονται από την Ιαπωνία, ενώ τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί και αριθμός των περιπτώσεων από την Κίνα, συνεπεία της μεγαλύτερης ευαισθητοποίησης των

γιατρών, που εφαρμόζουν τα ισχύοντα διαγνωστικά κριτήρια για την ανίχνευσή τους [119].

Η επιδημιολογία της ΑΗ τύπου II (ΑΗ-2), που αναφέρεται ως επί το πλείστον σε παιδιατρικό πληθυσμό, είναι ακόμα πιο ασαφής.

### **1.3.4 Παθογένεια ΑΗ**

Η παθογένεια της ΑΗ είναι πολύπλοκη, και θεωρείται ότι η έκφραση της νόσου είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης ενός παράγοντα που αποτελεί έναυσμα παράλληλα με περιβαλλοντικούς παράγοντες σε ένα γενετικά ευαίσθητο άτομο.

Φαίνεται ότι απαιτείται η παρουσία αρκετών πολυμορφισμών η αλληλεπίδραση των οποίων μπορεί να επηρεάσει τον κλινικό φαινότυπο της νόσου. Παρακάτω θα αναφερθούν εν συντομία οι κυριότεροι παράμετροι που θεωρούνται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ΑΗ.

#### **Γενετικοί παράγοντες**

Η ισχυρότερη γενετική συσχέτιση που έχει μέχρι στιγμής βρεθεί στην ΑΗ είναι με τον απλότυπο HLA-DRB1, και συγκεκριμένα τους απλοτύπους HLADRB1\*03 και HLA-DRB1\*04 σε Ευρωπαίους και Αμερικάνους, αντίστοιχα. Οι συσχετίσεις αυτές έχουν επαληθευτεί σε πρόσφατη GWAS [120]. Η παρουσία των απλοτύπων HLA-DR\*03 and HLA-DR\*07 έχουν συσχετιστεί με προδιάθεση για ΑΗ-2 στη Μεγάλη Βρετανία και τη Βραζιλία. Άλλες συσχετίσεις με γονίδια εκτός HLA αφορούν στα γονίδια που κωδικογραφούν το CTLA-4, τον εκκινητή του tumor necrosis factor (TNF), και το Fas-Fasl [109].



## **Πιθανά ερεθίσματα**

Σε ασθενείς με γενετική προδιάθεση για ΑΗ έχει εμπλακεί ο μηχανισμός της μοριακής μίμησης ως μηχανισμός πρόκλησης ανοσιακής απάντησης σε αυτοαντιγόνα. Το αντιπροσωπευτικότερο παράδειγμα υπερ αυτής της θεωρίας είναι η λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), που παρουσιάζει σημαντική ομολογία αμινοξέων με το κυτόχρωμα CYP2D6, τον αυτοαντιγόνο στόχο των αντί-LKM1 αυτοαντισωμάτων στην ΑΗ-2 [121]. Άλλοι ιοί που πιθανόν να ενέχονται στην παθογένεια της ΑΗ είναι ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV), ο κυτταρομεγαλιός και ο ιός του απλού έρπη [122]. Άλλα μη λοιμώδη αίτια είναι φάρμακα, όπως η νιτροφουραντοίνη και μινοκυκλίνη καθώς και οι στατίνες και οι αντί-TNF παράγοντες. Θεωρείται ότι η επαγόμενη από φάρμακα ΑΗ είναι ένας ιδιαίτερος τύπος της νόσου για τον οποίο συνήθως δεν χρειάζεται μακροχρόνια χορήγηση ανοσοκαταστολής.

## **Μηχανισμοί ηπατοκυτταρικής βλάβης**

Οι μηχανισμοί που οδηγούν στην ηπατοκυτταρική βλάβη στους ασθενείς με ΑΗ είναι αντικείμενο εντατικής έρευνας τις τελευταίες 3 δεκαετίες. Παρόλα αυτά το εναρκτήριο λάκτισμα που οδηγεί στην αυτοάνοση διαταραχή παραμένει άγνωστο. Η βασική παρατήρηση ότι η περιπυλαία ηπατίτιδα, που είναι το χαρακτηριστικό ιστολογικό εύρημα στους ασθενείς με ΑΗ, αποτελείται από λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα και μακροφάγα αποτέλεσε και το πρώτο στοιχείο ότι βασική διαταραχή στην ΑΗ είναι αυτοάνοση κυτταρική διαταραχή. Φαίνεται ότι εμπλέκονται τόσο το σκέλος της εγγενούς όσο και της επίκτητης ανοσιακής απάντησης [123-124]. Συνηγορητικό υπέρ αυτού είναι το γεγονός ότι εκτός από τα

CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα, που αποτελούν την πλειοψηφία των κυττάρων στην ηπατική βλάβη υπάρχουν και κύτταρα φυσικοί φονιάδες (natural killer cells, NK) καθώς και μακροφάγα και πλασματοκύτταρα. Τα εν λόγω κύτταρα ενεργοποιούνται όταν πεπτίδια-αυτοαντιγόνα παρουσιάζονται διαμέσου των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων του ήπατος (κύτταρα Kupffer, δενδριτικά κύτταρα κ.ά.) στα CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα. Στη διάρκεια αυτής της διαδικασίας τα λεμφοκύτταρα αποκτούν φαινότυπο που εξαρτάται τόσο από συνδιεγερτικά μόρια (co-stimulatory molecules) όσο και από το περιβάλλον των κυτταροκινών [125]. Έτσι Th0 κύτταρα αποκτούν φαινότυπο Th1 παρουσία IL-12 και φαινότυπο Th2 παρουσία IL-4. Αντίθετα, όταν υπερτερούν η IL-1b και IL-6 τα Th0 διαφοροποιούνται προς Th17 κύτταρα, τα οποία έχουν άμεσα συσχετιστεί με την αυτοανοσία [126-130]. Διαταραχή στην ανοσορύθμιση μπορεί να συμβάλει στην παθογένεια της ΑΗ με πολλούς τρόπους. Τα κύτταρα που έχουν μελετηθεί περισσότερο από όλα στην περιφέρεια είναι τα ρυθμιστικά (regulatory T-cells (Tregs)), τα οποία αποτελούν μια ετερογενή ομάδα κυττάρων, που έχουν σημαντική ανοσοκατασταλτική δράση είτε μετά από άμεση επαφή με κύτταρα (δραστικά T κύτταρα και αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα) είτε με άλλους τρόπους [127, 131]. Επηρεασμένη λειτουργία των Tregs έχει αναφερθεί σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα [132].

Η πλειοψηφία των μελετών που αφορά στα Tregs στην ΑΗ προέρχονται από την ομάδα του King's College στο Λονδίνο. Οι μελέτες αυτές έχουν δείξει μείωση του αριθμού τους σε ασθενείς με ΑΗ κυρίως στη φάση της διάγνωσης, ο οποίος εν μέρει αποκαθίσταται στη φάση της ύφεσης οφειλόμενης σε ανοσοκατασταλτική αγωγή. Παράλληλα έχει δειχτεί ότι αυτά τα κύτταρα δεν μπορούν να αναστείλουν τις

δραστικές λειτουργίες των CD4+ και CD8+ T λεμφοκυττάρων, όπως ο πολλαπλασιασμός τους [133]. Παράλληλα, πιο πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα CD4+ T λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν κάποια αντίσταση στη δράση των Tregs, κυρίως λόγω του ότι εκφράζουν ανασταλτικούς υποδοχείς, όπως είναι το CD5, CTLA-4 και ο programmed cell death-1 (PD-1).

### 1.3.5 Ταξινόμηση ΑΗ

Η ΑΗ διακρίνεται σε 2 τύπους, την ΑΗ τύπου 1 (ΑΗ-1) και την ΑΗ τύπου 2 (ΑΗ-2) [114]. Η ΑΗ-1 χαρακτηρίζεται από την παρουσία ANA ή/και SMA, ενώ συχνά ανιχνεύονται και αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετεροφίλων με περιπυρηνικό φθορισμό (p-ANCA) [71, 134-136]. Ένα ποσοστό ασθενών με ΑΗ-1 έχουν αντισώματα έναντι διαλυτών ηπατικών αντιγόνων (αντί-soluble liver antigen, αντί-SLA)[137] ή έναντι αντιγόνου ήπατος-παγκρέατος (αντί-liver pancreas, αντί-LP)[138], που πλέον θεωρούνται ότι είναι ένα και το αυτό [139]. Τα αντισώματα αυτά ονομάζονται πλέον αντί-SLA/LP και η ανίχνευσή τους είναι σημαντική για τη διάγνωση της ΑΗ σε ασθενείς αρνητικούς για ANA και SMA.

Η ΑΗ-2 χαρακτηρίζεται από την παρουσία ειδικών αυτοαντισωμάτων, που είναι συνήθως τα αντί-μικροσωμίων LKM τύπου 1 (αντί-LKM1) [140-141] ή σπανιότερα τα αντί-LKM-3 ή αντισώματα έναντι κυτοσολίων ήπατος τύπου 1 (liver cytosol type 1 antigen (αντί-LC1))[142].

Εκτός από τις βασικές διαφορές στα αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται υπάρχουν και άλλες διαφορές μεταξύ της ΑΗ-1 και ΑΗ-2 που αφορούν κυρίως σε κλινικά χαρακτηριστικά. Η ΑΗ-2 εμφανίζεται συχνότερα στα παιδιά και νεαρούς ενήλικες, έχει συνήθως πιο οξεία ή σοβαρή πορεία, έχει πιο προχωρημένη ιστολογικά νόσο

κατά την εμφάνισή της, ενώ φαίνεται ότι έχει καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία, όπως και λιγότερες υποτροπές με τη διακοπή της [109, 143]. Στο παρελθόν έχει προταθεί και ένας τρίτος τύπος ΑΗ, χαρακτηριστικό της οποίας θεωρείτο η παρουσία αντί-SLA αντισωμάτων. Πλέον, όμως, η υπάρχουσα βιβλιογραφία έχει δείξει ότι οι ασθενείς αυτοί συμπεριφέρονται κλινικά και παθοφυσιολογικά σαν αυτούς που έχουν ΑΗ-1 και ως τέτοιοι πρέπει να θεραπεύονται [115].

### **1.3.6 Κλινική εικόνα**

Σήμερα, 65 χρόνια μετά την περιγραφή των πρώτων περιπτώσεων ΑΗ, ξέρουμε πλέον ότι το νόσημα αυτό είναι ξεχωριστή οντότητα που χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια ως προς τις κλινικές εκδηλώσεις και τα εργαστηριακά και ιστολογικά χαρακτηριστικά [109]. Μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, αλλά από καιρό είναι γνωστή η δικόρυφη ηλικιακή κατανομή την οποία ακολουθεί το νόσημα, με πρώτο peak στην εφηβεία και δεύτερο peak μεταξύ 4<sup>ης</sup> και 6<sup>ης</sup> δεκαετίας. Δεν έχει συγκεκριμένη φυλετική προδιάθεση, ενώ υπερτερούν οι γυναίκες των αντρών με σχέση 3:1 [117, 144].

Όσον αφορά στην κλινική εικόνα έχουν αναγνωριστεί 2 κύριες μορφές. Η συχνότερη μορφή (περίπου 2/3 των ασθενών) χαρακτηρίζεται από ήπια συμπτωματολογία ή και πλήρη απουσία συμπτωμάτων. Τα συμπτώματα που περιγράφονται είναι συνήθως μη ειδικά, όπως κακουχία, ανορεξία, απώλεια βάρους, άλγος δεξιού υποχονδρίου και αρθραλγίες σε πολλές αρθρώσεις και μπορεί να αναφέρονται για μεγάλο διάστημα πριν τη διάγνωση. Πιθανά ευρήματα από την κλινική εξέταση είναι: τηλεαγγειεκτασίες, υπερτρίχωση, σταγονοειδής ακμή, ηπατοσπληνομεγαλία και ίκτερος σε προχωρημένα στάδια της νόσου. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ένα

σημαντικό ποσοστό ασθενών μπορεί να μην υπάρξουν παθολογικά ευρήματα από την κλινική εξέταση. Παρά την ήπια συμπτωματολογία, 25-30% των ασθενών είναι κίρρωτικοί στη διάγνωση [145].

Ένα τρίτο των ασθενών εμφανίζεται με εικόνα οξείας ηπατίτιδας, η οποία μπορεί να μην συνοδεύεται από υπερσφαιριναιμία, ούτε να ανιχνεύονται κλασικά αυτοαντισώματα. Η μορφή αυτή διακρίνεται σε 2 υποκατηγορίες, η πρώτη που θεωρείται οξεία ηπατίτιδα σε έδαφος χρόνιας ηπατίτιδας και η «καθαρή» οξεία μορφή που δεν έχει ιστολογικά στοιχεία χρονιότητας. Σε ένα μικρό ποσοστό, κυρίως παιδιά και νεαρούς ενήλικες, μπορεί να εμφανιστεί και ως οξεία κεραυνοβόλος ηπατική ανεπάρκεια [145].

ΑΗ σε ειδικές καταστάσεις

Σπάνια, η ΑΗ μπορεί να εμφανιστεί είτε κατά την εγκυμοσύνη ή πιο συχνά μετά τον τοκετό και ο κλινικός γιατρός πρέπει να είναι υποψιασμένος αν δει αύξηση των αμινοτρανσαμινασών μαζί με αύξηση της IgG μετά τον τοκετό [146].

Η ΑΗ μπορεί να εμφανιστεί σε συνάρτηση με τη χρήση κάποιων φαρμάκων σε ασθενείς με γενετική προδιάθεση [147]. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φάρμακα, που έχουν αναφερθεί σαν «εκλυτικοί» παράγοντες για ΑΗ είναι η νιτροφουραντοΐνη, που χρησιμοποιείται στη θεραπεία των ουρολοιμώξεων και η μινουκυκλίνη, φάρμακο για την ακμή. Φάρμακα που στο παρελθόν έχουν συσχετιστεί με φαρμακευτικά επαγόμενη ΑΗ, αλλά δεν χρησιμοποιούνται πλέον είναι το τιελινικό οξύ και η διυδραλαζίνη [148]. Εκτός από τα παραπάνω, στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές ΑΗ επαγόμενης από διάφορα παράγωγα.

Τα πιθανά σενάρια που έχουν επικρατήσει για εξηγήσουν παθοφυσιολογικά την ηπατική βλάβη σχετιζόμενη με φάρμακα είναι: 1) ΑΗ με φαρμακευτική ηπατική βλάβη, 2) επαγόμενη από φάρμακα ΑΗ και 3) ανοσολογικά επαγόμενη ηπατική βλάβη από φάρμακα [149].

Η ΑΗ μπορεί να συνυπάρχει με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. Συχνότερη συνύπαρξη είναι η θυρεοεοδίτιδα Hashimoto, ενώ άλλες αναφορές αφορούν σε συνύπαρξη με ρευματοειδή αρθρίτιδα, σύνδρομο Sjögren, συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου, κοιλιοκάκη, ψωρίαση, διαβήτη τύπου-1, νόσο Graves, λεύκη, κ.ά [143, 150].

Συχνά διαγνωστικό πρόβλημα αποτελούν αυτά που πλέον ονομάζονται “variant” σύνδρομα, στα οποία εκτός από τα χαρακτηριστικά της ΑΗ, συνυπάρχουν και κλινικά, εργαστηριακά και ιστολογικά ευρήματα συμβατά με χολοστατικά νοσήματα του ήπατος, όπως ΠΧΚ και ΠΣΧ [151].

### **1.3.7 Διάγνωση ΑΗ**

Η διάγνωση της ΑΗ βασίζεται στην ακόλουθη τριάδα: αυξημένα επίπεδα αμινοτρανσφερασών και IgG, παρουσία αυτοαντισωμάτων στον ορό και εικόνα διαβρωτικής ηπατίτιδας στη βιοψία ήπατος [116]. Το 1993 δημοσιεύτηκαν από την ΙΑΙΗG περιγραφικά κριτήρια για τη διάγνωση της ΑΗ, τα οποία στη συνέχεια αναθεωρήθηκαν το 1998 [113-114]. Το αρχικό διαγνωστικό σύστημα αναπτύχθηκε αρχικά για ερευνητικούς σκοπούς, αλλά στη συνέχεια αποδείχθηκε αρκετά χρήσιμο στην εκτίμηση κυρίως ασθενών χωρίς τυπική εικόνα ΑΗ (Πίνακας 1.2). Το διαγνωστικό σύστημα περιλαμβάνει θετική και αρνητική βαθμολογία για κλινικά, εργαστηριακά και ιστολογικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης και της

απάντησης στη θεραπεία [114]. Στα εργαστηρικά ευρήματα περιλαμβάνονται οι τρανσαμινάσες, η αύξηση της IgG και η παρουσία ANA, SMA και αντί-LKM-1 που παίρνουν θετική βαθμολογία, ενώ η παρουσία χολόστασης παίρνει αρνητική βαθμολογία. Στα κλινικά χαρακτηριστικά που βαθμολογούνται αρνητικά είναι η κατανάλωση αλκοόλ, η λήψη φαρμάκων και λοιμώξεις (κυρίως ιογενείς ηπατίτιδες), που ενοχοποιούνται για ηπατική βλάβη. Η διάγνωση της «βέβαιης» ΑΗ μπαίνει όταν η συνολική βαθμολογία είναι >15 πριν την έναρξη της ανοσοκαταστολής και >17 μετά την έναρξη αυτής. Όταν η συνολική βαθμολογία είναι μεταξύ 10-15 πριν την έναρξη της ανοσοκαταστολής και 12-17 μετά την έναρξη αυτής, τότε τίθεται η διάγνωση της «πιθανής» ΑΗ. Αναλυτικά το αναθεωρημένο σύστημα βαθμολόγησης του IAIHG παρουσιάζεται στον πίνακα 1.2. Για τα παιδιά τα διαγνωστικά κριτήρια είναι κάπως διαφορετικά σε σχέση με τους ενήλικες. Έτσι τίτλος αντισωμάτων 1:20 για τα ANA και SMA και 1:10 για τα αντί-LKM-1 θεωρούνται συμβατά με τη διάγνωση της ΑΗ-1 και ΑΗ-2, αντίστοιχα.

Το 2008 αναπτύχθηκε ένα απλοποιημένο σύστημα βαθμολόγησης, στο οποίο περιλαμβάνονται μόνο 4 κριτήρια: αυτοαντισώματα, IgG, ιστολογικά ευρήματα και αποκλεισμός ιογενών ηπατιτίδων και είχε σκοπό τη διευκόλυνση της διάγνωσης της ΑΗ (Πίνακας 1.3). Σίγουρη θεωρείται η διάγνωση της ΑΗ όταν το score είναι  $\geq 7$  και πιθανή ΑΗ όταν το score είναι  $\geq 6$ . Το απλοποιημένο σύστημα βαθμονόμησης έχει δείξει ότι υπερτερεί του αρχικού ως προς την ειδικότητα (90% έναντι 73%) και τη διαγνωστική ακρίβεια (92% έναντι 82%), αλλά έχει μικρότερη ευαισθησία (95% έναντι 100%). Το απλοποιημένο score είναι πιο εύκολο στη χρήση, βοηθάει σημαντικά στην κλινική πράξη, αλλά πάντα πρέπει να χρησιμοποιείται σε συναρτηση με την κρίση του κλινικού γιατρού.

**Πίνακας 1.2.** Αναθεωρημένα διαγνωστικά κριτήρια για την ΑΗ [114].

Παράμετρος	Εύρημα	Πόντοι
Φύλο	Γυναικείο	+2
ALP/ AST (ή ALT)	>3	-2
	1.5-3	0
	<1.5	+2
γ-σφαιρίνες ή IgG (×ΑΦΤ)	2	+3
	1.5-2	+2
	1.0-1.5	+1
ANA, SMA ή αντί-LKM-1	>1:80	+3
	1:80	+2
	1:40	+1
	<1:40	0
AMA	Θετικά	-4
Δείκτες για ενεργό χρόνια ηπατίτιδα	Θετικοί	-3
	Αρνητικοί	+3
Λήψη ηπατοτοξικών φαρμάκων	Ναι	-4
	Όχι	+2
Κατανάλωση αλκοόλ (μέση ημερήσια ποσότητα)	<25gr	+2
	>60gr	-2
Ιστολογικά ευρήματα	Διαβρωτική ηπατίτιδα	+3
	Πλασματοκύτταρα	+1
	Ροζέττες	+1
	Κανένα από τα παραπάνω	-5
	Βλάβες χοληφόρων	-3
	Άτυπα ευρήματα	-3
Αυτοάνοσα νοσήματα	Θυρεοειδίτιδα, κολίτιδα, κ.ά	+2
HLA	DR3 ή DR4	+1
Άλλα αυτοαντισώματα	Αντί-SLA/LP, F-actin, ASGPR, ρANNA	+2
Ανταπόκριση στη θεραπεία	Πλήρης ανταπόκριση	+2
	Υποτροπή	+3



**Πίνακας 1.3.** Απλοποιημένα διαγνωστικά κριτήρια για την ΑΗ[115].

Παράμετρος	Εύρημα	Πόντοι
Αυτοαντισώματα	ANA ή SMA ή αντί-LKM $\geq 1/40$	1
	ANA ή SMA ή αντί- LKM $\geq 1/80$	2
	αντί-SLA/αντί-LP (+) (>20 units)	2
IgG	Ανώτερα φυσιολογικά	1
	>1.10 φορές του φυσιολογικού	2
Ιστολογικά ευρήματα	Συμβατή με ΑΗ	1
	Τυπική για ΑΗ	2
Απουσία ιογενούς ηπατίτιδας	Ναι	2
	Όχι	0

Βέβαιη ΑΗ: όταν το score  $\geq 7$ , πιθανή ΑΗ: όταν το score  $\geq 6$

Η υπάρχουσα βιβλιογραφία, συμπεριλαμβανομένης και μελέτης από το IAHG, έχει δείξει ότι τα κριτήρια διάγνωσης της ΑΗ έχουν χαμηλή ευαισθησία για τη διάγνωση της ΑΗ στους ασθενείς με “variant” σύνδρομο και ως εκ τούτου δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται στους ασθενείς αυτούς [151].

### 1.3.8 Εργαστηριακά ευρήματα

Τυπικό εργαστηριακό εύρημα αποτελεί η αύξηση των αμινοτρανσφερασών (ALT, AST), σε επίπεδα που είναι συνήθως  $< 500$  IU/L. Παρόλα αυτά πρέπει κανείς να γνωρίζει ότι τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών μπορεί να κυμαίνονται από φυσιολογικά εως πολύ ψηλά, που φτάνουν αυτά που παρατηρούνται σε οξείες ηπατίτιδες ( $> 50$  ΑΦΤ) [145]. Υπάρχουσες μελέτες έχουν δείξει ότι ο βαθμός αύξησης των αμινοτρασφερασών δε σχετίζεται με το βαθμό της νεκροφλεγμονώδους βλάβης σε ιστολογικό επίπεδο.

Όταν υπάρχει σημαντική αύξηση της χολερυθρίνης και της αλκαλικής φωσφατάσης πρέπει να αποκλειστεί αρχικά η παρουσία απόφραξης των εξωηπατικών

χοληφόρων και κατά δεύτερο λόγο οι χολοστατικές μορφές ηπατίτιδας, η φαρμακευτική ηπατίτιδα, η ΠΧΚ και η ΠΣΧ. Συνήθως τα αναμενόμενα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης δεν ξεπερνούν το διπλάσιο των ανώτερων φυσιολογικών.

Ένα άλλο στοιχείο που έχει αναγνωριστεί τα τελευταία έτη είναι η αύξηση της γGT, η οποία έχει δειχτεί ότι είναι κακός προγνωστικός δείκτης απάντησης στη θεραπεία [152].

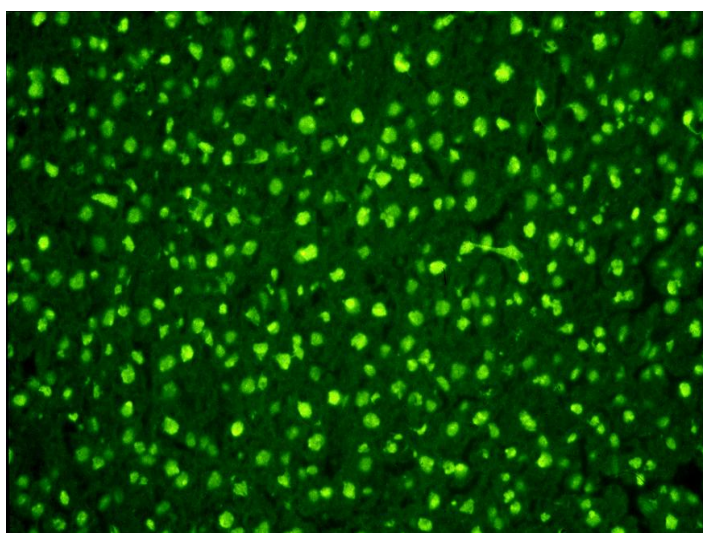
Ένα άλλο χαρακτηριστικό εύρημα στους ασθενείς με ΑΗ είναι η αύξηση της IgG ανοσοσφαιρίνης. Σε συνάρτηση με τα παραπάνω τα ακολουθα στοιχεία είναι σημαντικά: συχνά η μέτρηση της IgG στη διερεύνηση ασθενών με τρανσαμινασαιμία δεν πραγματοποιείται, γεγονός που έχει οδηγήσει στην υποδιάγνωση της ΑΗ. Επίσης αναγνωρίζεται όλο και συχνότερα το γεγονός ότι η απουσία υπεργαμμασφαιριναιμίας δεν πρέπει να αποκλείει τη διάγνωση της ΑΗ. Συγκεκριμένα, η IgG μπορεί να είναι εντός φυσιολογικών επιπέδων σε παιδιά, ηλικιωμένους και στις περιπτώσεις οξείας εμφάνισης της νόσου [116]. Βέβαια, όπως τονίζεται και στις πρόσφατες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Εταιρείας για τη μελέτη του Ήπατος, θα πρέπει να είναι κανείς πολύ προσεκτικός στο χαρακτηρισμό των επιπέδων της IgG ως φυσιολογικών, δεδομένου ότι η διακύμανση των «φυσιολογικών» επιπέδων είναι πολύ ευρεία στα διάφορα εργαστήρια [116]. Όπως είναι σημαντική η εκτίμηση της υπεργαμμασφαιριναιμίας για τη διάγνωση της ΑΗ, εξίσου χρήσιμη είναι και η μέτρησή της IgG κατά τη διάρκεια της θεραπείας, καθώς η πτώση της σε φυσιολογικά επίπεδα σχετίζεται με ανταπόκριση στη θεραπεία και επίσης αντανακλά βελτίωση της νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας στο ηπατικό παρέγχυμα [153]. Τα επίπεδα IgA και IgM είναι συνήθως φυσιολογικά και η τυχόν

αύξησή τους ενδεχομένως υποδεικνύει την ύπαρξη διαφορετικού νοσήματος, όπως αλκοολική ηπατοπάθεια ή ΠΧΚ.

### 1.3.9 Διαγνωστικά αυτοαντισώματα

#### Αντιπυρηνικά αντισώματα

Τα πρώτα αυτοαντισώματα που περιγράφηκαν ως σχετιζόμενα με την ΑΗ είναι τα ANA. Τα ANA ανιχνεύονται στον ΕΑΦ και σε υπόστρωμα τομών στομάχου-ήπατος-νεφρών αρουραίου. Έχουν ανιχνευτεί διάφορα πρότυπα φθορισμού σε ασθενείς με ΑΗ, αλλά το συχνότερο είναι το ομοιογενές πρότυπο σε υπόστρωμα ήπατος, ενώ σπανιότερα αναφέρεται διάχυτος ή λεπτός στικτός φθορισμός [154]. Τα ΗEr-2 καρκινικά κύτταρα, που χαρακτηρίζονται από μεγάλο πυρήνα πρέπει να χρησιμοποιούνται για την καλύτερη εκτίμηση του τύπου του φθορισμού των ANA (Εικόνα 11).

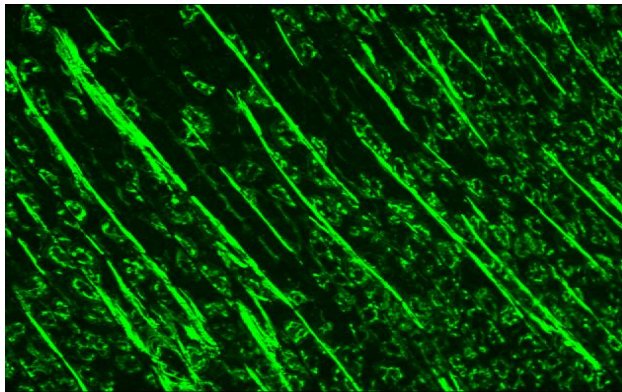


*Εικόνα 1.11. Αντιπυρηνικά αντισώματα με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε ΗEr-2 κύτταρα από ασθενή με αυτοάνοση ηπατίτιδα.*

Οι αντιγονικοί στόχοι των ANA στην ΑΗ δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Έχει περιγραφεί αντιδραστικότητα έναντι των ss- και dsDNA, small nuclear RNPs (sn-RNPs), κεντρομεριδίων, ιστονών, χρωματίνης κ.α., τα οποία, όμως, δεν είναι ειδικά για την ΑΗ. Οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων στη φάση της διάγνωσης καθώς και η συμπεριφορά τους κατά τη διάρκεια παρακολούθησης δεν έχει φανεί μέχρι τώρα να έχουν προγνωστική σημασία [71, 155].

### **Αντισώματα έναντι λείων μυικών ινών (SMA)**

Τα SMA ανιχνεύονται με ΕΑΦ σε υπόστρωμα ήπατος-νεφρού αρουραίου λόγω του ότι φθορίζουν τα τοιχώματα των αγγείων και σε υπόστρωμα στομάχου λόγω του φθορισμού τύπου ινιδίων της μυικής στοιβάδας (Εικόνα 1.12).



***Εικόνα 1.12.** Αντισώματα έναντι λείων μυικών ινών σε υπόστρωμα στομάχου αρουραίου με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού σε ασθενή με ΑΗ.*

Στους νεφρούς είναι δυνατό να δει κανείς φθορισμό στα αγγεία (V), στα σπειράματα (G) και στα σωληνάκια (T) [156]. Το πρότυπο VGT ή VG θεωρείται πιο ειδικό από ότι το V. Τα SMA στοχεύουν δομές του κυτταροσκελετού, όπως η ακτίνη,

η τροπονίνη, η βιμεντίνη και η τροπομυοσίνη. Το VGT πρότυπο αντιστοιχεί στην f-ακτίνη. Ο βασικός αντιγονικός στόχος των SMA στην ΑΗ είναι η πολυμερισμένη ακτίνη [157]. Παρόλα αυτά η διάγνωση της ΑΗ δεν πρέπει να βασίζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων έναντι ακτίνης με τη μέθοδο της ELISA, δεδομένου ότι 20% των ασθενών με ΑΗ δεν έχουν τέτοια αντιδραστικότητα. Έτσι χρήση μόνο ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι ακτίνης θα είχε σαν αποτέλεσμα την πιθανή υποδιάγνωση της ΑΗ.

Θετικά αντισώματα θεωρούνται τίτλοι  $\geq 1:40$  στους ενήλικες και στα παιδιά  $\geq 1:20$  για τα ANA και SMA και  $\geq 1:10$  για τα αντί-LKM και αντί-LC1 με ΕΑΦ σε τομές ιστών [70]. Γενικά θεωρείται ότι το εργαστήριο πρέπει να αναφέρει οποιαδήποτε αντιδραστικότητα  $\geq 1:10$  και θα πρέπει στη συνέχεια ο κλινικός γιατρός να εκτιμάει τα αποτελέσματα σε συνάρτηση με την ηλικία και τα κλινικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε ασθενούς. Χαμηλοί τίτλοι μπορεί, όμως, να ανιχνευτούν σε ασθενείς και με άλλα νοσήματα, όπως ιογενείς ηπατίτιδες, αλλά στις περιπτώσεις αυτές δεν ανιχνεύεται αντιδραστικότητα έναντι F-ακτίνης. Τις δυσκολίες ερμηνείας των αποτελεσμάτων συζητάμε εκτενέστερα στο ειδικό μέρος της εισαγωγής.

### **Τα αντισώματα έναντι του κυταροπλάσματος των ουδετεροφίλων (αντί-neutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA)**

Κλασική μέθοδος ανίχνευσης των ANCA είναι ο ΕΑΦ σε υπόστρωμα απομονωμένων ουδετεροφίλων πολυμορφοκυττάρων, που έχουν μονιμοποιηθεί σε απόλυτη αιθανόλη [69-70]. Έχουν παρατηρηθεί δύο τύποι φθορισμού, ο διάχυτος ή κοκκιώδης φθορισμός στο κυτταρόπλασμα (c-ANCA) και ο περιπυρηνικός φθορισμός (p-ANCA)[158]. Ο πρώτος χαρακτηρίζει συνήθως την κοκκιωμάτωση με

πολυαγγειίτιδα (πρώην Wegener) και ο δεύτερος την μικροσκοπική πολυαγγειίτιδα. Η πρωτεΐνωση-3 είναι ο κύριος αντιγονικός στόχος των c-ANCA και η μυελοπεροξειδάση των p-ANCA. Αντισώματα p-ANCA ανιχνεύονται και σε αρκετά άλλα νοσήματα, κυρίως φλεγμονώδη, όπως είναι οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου. Στην ΑΗ έχουν αναφερθεί p-ANCA σε αρκετά υψηλό ποσοστό (60-90%) των ασθενών και πλέον θεωρείται σωστότερη η χρήση του όρου peripheral antineutrophil nuclear antibodies (p-ANNA)[136], καθώς τα αυτοαντιγόνα- στόχοι φαίνεται ότι βρίσκονται στην περιφέρεια του πυρήνα και ότι στο κυτταρόπλασμα.

**Αντισώματα έναντι διαλυτών ηπατικών αντιγόνων (αντί-soluble liver antigen, αντί-SLA) ή έναντι αντιγόνου ήπατος-παγκρέατος (αντί-liver pancreas, αντί-LP)**

Τα πιο ειδικά για την ΑΗ αυτοαντισώματα θεωρούνται ότι είναι τα αντί-SLA/LP [139]. Η συχνότητα ανίχνευσής τους σε ασθενείς με ΑΗ-1 αναφέρεται ότι είναι 30-50%. Αντιγονικός στόχος των SLA/LP είναι η synthase (S) converting O-phosphoserilyl-tRNA (Sep) to selenocysteinyl-tRNA(Sec), που έχει τη συντομογραφία SepSecS [159]. Μετά τον καθορισμό του αντιγονικού στόχου τους έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι που βασίζονται σε μοριακές τεχνικές, όπως είναι η ELISA, η ανοσοαποτύπωση και οι radioligand assays για την ανίχνευση των αντί-SLA/LP [160]. Η διαγνωστική ακρίβεια των αντί-SLA/LP είναι πολύ υψηλή, όπως φάνηκε από μια πρόσφατη μετα-ανάλυση [161].

Η παρουσία των αντί-SLA/LP έχει συσχετιστεί με σοβαρότερη νόσο και συχνότερες υποτροπές μετά τη διακοπή της θεραπείας. Μια πρόσφατη μελέτη από την Ελλάδα έδειξε τη συνύπαρξη των αντί-SLA/LP και το Ro52 στο 98% των ασθενών με ΑΗ. Η συνύπαρξη δεν φάνηκε να οφείλεται σε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Στη

μελέτη αυτή η παρουσία αντί-SLA/LP με ή χωρίς Ro52 συσχετίστηκε με χειρότερη πρόγνωση και με χαμηλότερα ποσοστά απάντησης στη θεραπεία. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, μια μεταγενέστερη ελληνική μελέτη δεν μπόρεσε να δείξει ανάλογες συσχετίσεις [162].

### **Αντισώματα έναντι μικροσωμίων ήπατος-νεφρού (antibodies against liver-kidney microsomes (αντί- LKM))**

Έχουν μέχρι στιγμής ανιχνευτεί τρεις τύποι αντί-LKM αντισωμάτων [148]. Τα αντί-LKM-1 ανιχνεύονται χαρακτηριστικά στην AH-2. Πρωτοπεριγράφηκαν από τον Rizzetto και συνεργάτες [163] με τη μέθοδο του ΕΑΦ σε υπόστρωμα τομών στομάχου-ήπατος-νεφρών αρουραίου. Όπως έχει ήδη περιγραφεί η χρήση του τριπλού υποστρώματος είναι απαραίτητη για τη διάκρισή τους από τα AMA. Συγκεκριμένα τα αντί-LKM-1 έχουν χαρακτηριστικό πρότυπο φθορισμού στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων, αλλά και στο P3 τμήμα του εγγύς νεφρικών σωληναρίων. Αντίθετα τα AMA αναγνωρίζονται από το φθορισμό τόσο στα εγγύς όσο και στα άπω νεφρικά σωληνάκια [70-71].

Κύριος αντιγονικό στόχος των αντί-LKM-1 είναι το P4502D6 (CYP2D6)[164-165]. Έχουν αναγνωρισθεί 4 γραμμικοί επίτοποι εκ των οποίων 2 (αμινοξέα 257–269 και 321–351) αναγνωρίζονται στην πλειοψηφία των ασθενών με AH-2. Μελέτες βιοπληροφορικής έχουν δείξει ότι οι συγκεκριμένοι επίτοποι είναι στην επιφάνεια του αντιγόνου [134, 166-167]. Μετά την αναγνώριση των μοριακών στόχων των αντί-LKM-1 αντισωμάτων κατέστη δυνατή η ανάπτυξη μεθόδων, όπως η ELISA για τον προσδιορισμό των αντισωμάτων αυτών κυρίως σε περιπτώσεις, όπου τα αποτελέσματα του ΕΑΦ δεν είναι σαφή ή τα υπόλοιπα αυτοαντισώματα (π.χ. ANA,

SMA) είναι αρνητικά σε ασθενή με συμβατή για AH κλινική και εργαστηριακή εικόνα.

Σημαντικό είναι το γεγονός ότι 1-10% των ασθενών με HCV λοίμωξη έχουν αντί-LKM-1 αντισώματα ανεξάρτητα από το γονότυπο του HCV [168]. Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι στην HCV λοίμωξη αναγνωρίζονται τα ίδια αυτοαντιγόνα στόχοι όπως και στην AH-2 [169]. Ο μηχανισμός της μοριακής μίμησης φαίνεται ότι ευθύνεται για την εμφάνιση των αντί-LKM-1 στους ασθενείς με HCV λοίμωξη, γεγονός που έχει αποδειχτεί από την ύπαρξη ομολογίας αμινοξέων μεταξύ CYP2D6 και HCV σε ασθενείς που έχουν γενετική προδιάθεση [121].

Το IAIHG έχει προτείνει τον έλεγχο όλων των ασθενών με χρόνια HCV λοίμωξη για αντί-LKM-1 πριν την έναρξη αγωγής με ιντερφερόνη-α. Στους ασθενείς με HCV λοίμωξη και αντί-LKM-1 αντισώματα συστήνεται προσεκτική παρακολούθηση, δεδομένου ότι η ιντερφερόνη μπορεί να προκαλέσει αυτοάνοσες διαταραχές [116]. Επίσης μικρό ποσοστό (5-10%) ασθενών με AH-2 έχει αντί-LKM3 αντισώματα σε συνδυασμό ή όχι με αντί-LKM1. Τα αντί-LKM3 χαρακτηρίζονται από φθορισμό όχι μόνο του ήπατος και του νεφρικού ιστού στο ΕΑΦ, αλλά και φθορισμό του παγκρέατος, των επινεφριδίων και του στομάχου. Το κύριο αυτοαντιγόνο-στόχος των αντί-LKM3 τόσο στην AH-2 όσο και στη χρόνια ηπατίτιδα D είναι μέλος της οικογένειας των UDP γλυκουρονικών τρανσφερασών (UGT1, μοριακό βάρος 55 kDa) [170].

#### **Αντισώματα έναντι κυτοσολίων ήπατος (antibodies against liver cytosol type 1 antigen, αντί-LC1)**

Το αντίσωμα αυτό ανακαλύφθηκε το 1988 σε ασθενείς με AH-2 [142]. Συγκεκριμένα περίπου 1/3 των ασθενών με AH έχουν αντί-LC1, συνήθως παράλληλα με αντι-



LKM1. Ανιχνεύονται με τη μέθοδο του ΕΑΦ και χαρακτηριστικά προσδίδουν φθορισμό στον ηπατικό αλλά όχι στο νεφρικό ιστό. Στο ήπαρ χαρακτηριστικός είναι ο κυτταροπλασματικός φθορισμός των ηπατοκυττάρων ιδιαίτερα στις περιπυλαίες περιοχές, ενώ διακόπτεται γύρω από τις κεντρικές φλέβες. Το αυτοαντιγόνο στόχος των αντί-LC1 είναι το ένζυμο φορμυμινο-τρανσφεράση της κυκλοδεμινάσης, το οποίο εμπλέκεται στο μεταβολισμό του φυλλικού οξέος [171]. Αν και είναι οργανοειδικό το αντίσωμα δε θεωρείται ειδικό για την ΑΗ-2, γιατί ανιχνεύονται (όπως και τα αντί-LKM1) σε ένα ποσοστό έως 10% των ασθενών με ΗCV λοίμωξη όταν χρησιμοποιηθούν ευαίσθητες μέθοδοι [172].

Τα προβλήματα που προκύπτουν από την ανίχνευση των αντί-LC1 με τη μέθοδο του ΕΑΦ είναι ότι η ανίχνευσή τους συχνά γίνεται δύσκολη από τη συνύπαρξη των αντί-LKM1 αντισωμάτων. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που βασίζονται στην ανίχνευση του μοριακού στόχου, όπως είναι ELISA και γραμμικοί ανοσοπροσδιορισμοί [172]. Σε αντίθεση με άλλα αυτοαντισώματα, σε παιδιατρικό πληθυσμό, ο τίτλος των αντί-LC1 φαίνεται να σχετίζεται με την ενεργότητα της νόσου, γεγονός που υποδεικνύεται από το ότι η πτώση του τίτλου τους (>50%) ή και πλήρης εξαφάνισή τους σχετίζεται με ύφεση της νόσου [173].

### **Αντισώματα έναντι του υποδοχέα της ασιαλογλυκοπρωτεΐνης (αντί-asialoglycoprotein receptor antibodies (αντί-ASGPR))**

Ο υποδοχέας της ασιαλογλυκοπρωτεΐνης είναι μια γλυκοπρωτεΐνη της μεμβράνης του συμπλέγματος της ηπατοειδικής μεμβρανικής λιποπρωτεΐνης (LSP) των ηπατοκυττάρων, που συμμετέχει στη σύνδεση και ενδοκυττάρωση των γλυκοπρωτεϊνών που φέρουν τελικές ομάδες γαλακτόζης. Είναι το μονοδικό ειδικό

για το ήπαρ αντιγόνο που έχει ταυτοποιηθεί έως τώρα, που εκφράζεται στην επιφάνεια της μεμβράνης του ηπατοκυττάρου [174]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο ASGPR είναι αντιγονικός στόχος των T και B λεμφοκυττάρων του ήπατος. Το παραπάνω έχει δειχτεί σε ασθενείς με ΑΗ. Στην κλινική πράξη μερίπου 90% των ασθενών με ΑΗ είναι θετικοί για αντισώματα έναντι του ASGPR και συνυπάρχουν με ANA, SMA και αντί-LKM-1. Οι τίτλοι τους έχουν συσχετιστεί με παραμέτρους ενδεικτικούς φλεγμονής και έχει προταθεί η χρήση τους στην παρακολούθηση της θεραπείας στην ΑΗ. Προβλήματα από τη χρήση τους στην καθημέρα πράξη είναι ότι δεν είναι ειδικά, μιας και ανιχνεύονται σε αρκετούς ασθενείς συμπεριλαμβανομένων αυτών με ιογενείς ηπατίτιδες, φαρμακευτικές ηπατίτιδες και ΠΧΚ.

Τα αντί-ASGPR δεν μπορούν να ανιχνευτούν με ΕΑΦ και εξ' αιτίας αυτού από νωρίς αναγνωρίστηκε η ανάγκη ανάπτυξης μεθόδων που βασίζονται στην αναγνώριση μοριακών αντιγονικών στόχων. Βασικό πρόβλημα στην ανάπτυξη των τέτοιων μεθόδων είναι η δυσκολία στην απομόνωση καθαρμένου ASGPR. Πρόσφατα, αναπτύχθηκε μια ELISA που χρησιμοποιεί σαν αντιγονικό στόχο ASGPR από κουνέλι, το οποίο είναι άκρως καθαρμένο. Στην πρώτη μελέτη που δημοσιεύτηκε και στην οποία χρησιμοποιήθηκε η συγκεκριμένη ELISA, το 70% των ασθενών με ΑΗ (ΑΗ-1, ΑΗ-2), ήταν θετικοί για αντί-ASGPR προ ενάρξεως θεραπείας, ενώ μόνο το 30% αυτών που είχαν λάβει ανοσοκαταστολή (στερεοειδή ή/και αζαθειοπρίνη) [175].

Σε μια δεύτερη μελέτη σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών με ΑΗ και άλλες ηπατοπάθειες, που ελέγχθηκαν σαν μάρτυρες, το 29.1% και 16.7%, των ασθενών με ΑΗ-1 και ΑΗ-2 αντίστοιχα είχαν αντί-ASGPR αντισώματα [176]. Η σχετικά χαμηλή συχνότητα ανίχνευσης των αντί-ASGPR σε ασθενείς με ΑΗ συγκριτικά με τα

ποσοστά προηγούμενων μελετών μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η πλειοψηφία των ασθενών ελάμβανε ανοκαταστολή, η οποία έχει συσχετιστεί με μείωση των τίτλων των αντισωμάτων αυτών. Ανάλογο ποσοστό αντί-ASGPR είχαν ασθενείς με ΠΣΧ και ΗCV λοίμωξη, αλλά όχι ασθενείς με ΠΧΚ. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι 24.4% των ασθενών με ΑΗ αρνητικοί για οποιοδήποτε άλλο ειδικό για την ΑΗ αντίσωμα είχαν αντί-ASGPR αντισώματα, δεδομένο που υποδεικνύει ότι τα αντισώματα αυτά θα μπορούσαν να ενταχθούν στον αρχικό έλεγχο των ατόμων με πιθανή ΑΗ [176].

### **AMA**

Αν και τα AMA αποτελούν το σήμα κατατεθέν των ασθενών με ΠΧΚ, η παρουσία τους έχει αναφερθεί στους ασθενείς με ΑΗ σε ποσοστό που κειμένεται από 3.6 έως 34% [177]. Δεν είναι σαφές αν τα πολύ υψηλά ποσοστά ανταποκρίνονται σε αληθώς θετικά δείγματα που ανιχνεύθηκαν λόγω της ευαισθησίας της μεθόδου (ανοσοαποτύπωση) ή εάν η μέθοδος είναι ευαίσθητη αλλά χαμηλής ειδικότητας (ψευδώς θετικά).

Σήμερα θεωρείται ότι οι ασθενείς με ΑΗ, που έχουν AMA δεν διαφέρουν ως προς τα γενικά τους χαρακτηριστικά από τους ασθενείς με ΑΗ χωρίς AMA. Σε συμφωνία με τα πιο πάνω είναι μια μελέτη από τον Καναδά, η οποία έδειξε ότι ασθενείς με AMA θετική ΑΗ που έλαβαν κορτικοστεροειδή δεν εμφάνισαν χαρακτηριστικά κλινικά ή ιστολογικά συμβατά με ΠΧΚ κατά τη διάρκεια 27 ετών παρακολούθησης [178]. Άλλοι, όμως, ερευνητές πιστεύουν ότι ασθενείς με AMA θετική ΑΗ χρειάζονται πολύ προσεκτική παρακολούθηση, γιατί μπορεί να εμφανίσουν σε βάθος χρόνου ευρήματα υπέρ ΠΧΚ [179].

### 1.3.10 Ιστολογικά ευρήματα

Η βιοψία ήπατος θεωρείται απαραίτητη στην ΑΗ τόσο για τη διάγνωση, την εκτίμηση του σταδίου, αλλά και για τον καθορισμό θεραπευτικών χειρισμών. Η ύπαρξη συμβατών ή τυπικών ιστολογικών ευρημάτων αποτελεί κριτήριο και στα 2 συστήματα βαθμονόμησης της ΑΗ [114]. Τα ιστολογικά ευρήματα που παρατηρούμε στην ΑΗ δεν είναι ειδικά για τη νόσο, δεδομένου ότι τα βλέπουμε και σε άλλα νοσήματα. Τυπικό εύρημα είναι η φλεγμονή στα πυλαία διαστήματα και στην περιπυλαία ζώνη. Το διήθημα αποτελείται από πλασματοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και λιγότερα ηωσινόφιλα και ιστιοκύτταρα. Η απουσία πλασματοκυττάρων δεν αποκλείει τη διάγνωση της ΑΗ. Η παρουσία φλεγμονής στο όριο πυλαίου διαστήματος παρεγχύματος, γνωστής ως διαβρωτική ηπατίτιδα (interface hepatitis) είναι το πιο χαρακτηριστικό διαγνωστικό εύρημα για την ΑΗ, αν και όχι παθογνωμονικό [117].

Άλλες αλλοιώσεις είναι η διόγκωση του κυτταροπλάσματος των ηπατοκυττάρων, η ροζετοειδής διάταξή τους σε περιπυλαίες θέσεις και η παρουσία εμπεριπόλυσης (η εισβολή ενός μικρού κυττάρου σε ένα μεγαλύτερο) [110]. Ίνωση βλέπει κανείς σχεδόν σε όλες τις βιοψίες με εξαίρεση τις πολύ ήπιες ηπατίτιδες. Σε περιπτώσεις οξείας εμφάνισης ευρήματα από τη βιοψία ήπατος είναι πανλοβιακή ηπατίτιδα, γεφυροποιός νέκρωση και μαζική νέκρωση των ηπατοκυττάρων. Επίσης πρέπει να αναφερθεί ότι συχνά δεν υπάρχει συσχέτιση της βιοχημικής δραστηριότητας με τη βαρύτητα της νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας και το βαθμό της ίνωσης.

Σε συνάρτηση με αυτό δεν υπάρχει καμιά μη επεμβατική μέθοδος που να θεωρείται μέχρι στιγμής αξιόπιστη για την εκτίμηση της ιστολογίας σε ασθενείς με ΑΗ. Ένας από τους βασικούς λόγους είναι ότι στη φάση της ενεργού

δραστηριότητας της νόσου η παρουσία έντονης νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας δεν επιτρέπει τη σωστή εκτίμηση του σταδίου της ίνωσης. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η διενέργεια βιοψίας ήπατος είναι απαραίτητη στους ασθενείς που θεωρείται ότι είναι πιθανή η διάγνωση της ΑΗ [116].

### **1.3.11 Θεραπεία**

Η ανάγκη θεραπείας των ασθενών με ΑΗ έχει προκύψει από πρώιμες μελέτες που διενεργήθηκαν κατά τη δεκαετία του 70 και 80, στις οποίες φάνηκε ότι η χορήγηση ανοσοκατασταλτικής αγωγής σχετίζεται με βελτίωση των ηπατικών ενζύμων και των συμπτωμάτων των ασθενών και τελικά με βελτίωση της επιβίωσής τους. Αντίθετα, ασθενείς με μετρίου-σοβαρού βαθμού ΑΗ, που παρέμειναν χωρίς θεραπεία είχαν κακή πρόγνωση [111].

Ο στόχος της θεραπείας είναι η επίτευξη της πλήρους ύφεσης της νόσου και αναστολή της εξέλιξής της [116]. Η ύφεση της νόσου συνήθως επιτυγχάνεται με μακροχρόνια θεραπεία συντήρησης, ενώ λιγότερο συχνά μπορεί η ύφεση να διατηρηθεί μετά από induction θεραπεία και διακοπή της στη συνέχεια.

Ένδειξη για άμεση έναρξη θεραπείας έχουν όσοι έχουν επιθετικό νόσημα, κυρίως παιδιά και νεαροί ενήλικες και σε όσους υπάρχουν ιστολογικά ενδείξεις interface hepatitis ανεξάρτητα από την παρουσία κίρρωσης ή όχι [116].

Δεν υπάρχουν σαφείς οδηγίες για τη θεραπεία ασθενών με ήπια πυλαία ηπατίτιδα χωρίς διαβρωτική ηπατίτιδα. Όπως προαναφέρθηκε, τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών και της IgG δεν σχετίζονται πάντα με την ιστολογική βλάβη και δεν είναι κριτήριο για έναρξη της θεραπείας. Σε μεγαλύτερους ασθενείς με ήπια πυλαία φλεγμονή η απόφαση για έναρξη αγωγής θα πρέπει να εξατομικεύεται και

να καθορίζεται από την παρουσία βιοχημικής δραστηριότητας και αυξημένης IgG, από την παρουσία συμπτωμάτων ή όχι και από την συνεκτίμηση άλλων συνυπαρχουσών καταστάσεων, έτσι ώστε να μπορέσει να αξιολογηθεί το όφελος-κόστος από την θεραπεία στα άτομα αυτά.

Η μη ύπαρξη σαφών οδηγιών για ασθενείς με ήπιο νόσημα οφείλεται σε δεδομένα που υπάρχουν από παλιότερες μελέτες οι οποίες δείχνουν ότι η επιβίωση αυτών που δεν έχουν λάβει αγωγή είναι ανάλογη με αυτών που έλαβαν θεραπεία. Γνωρίζοντας, όμως, ότι η ΑΗ μπορεί να χαρακτηρίζεται από αυτόματες εξάρσεις και υφέσεις, οι ασθενείς αυτοί χρήζουν στενής παρακολούθησης, δεδομένου ότι στην πορεία μπορεί να εμφανίσουν συμπτώματα και σε μακροχρόνια παρακολούθηση πολλοί να γίνουν κίρρωτικοί. Πρόσφατα η Ευρωπαϊκή Εταιρεία για την μελέτη του ήπατος, στις δημοσιευμένες οδηγίες για τη θεραπεία της ΑΗ, συστήνει την έναρξη αγωγής σε οποιονδήποτε έχει ενεργό νόσημα [116].

Πλήρης ύφεση του νοσήματος κατά τη διάρκεια της θεραπείας ορίζεται η ομαλοποίηση των αμινοτρασφερασών και της IgG και βελτίωση ή εξάλειψη των συμπτωμάτων του ασθενούς. Ως ιστολογική ύφεση ορίζεται η παρουσία ελάχιστης νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας ( $HA1 \leq 4$ ) ή φυσιολογική βιοψία ήπατος.

Το προτεινόμενο σχήμα στους πρωτοθεραπευόμενους ασθενείς περιλαμβάνει χορήγηση πρεδνιζολόνης (δόση 0.5-1mg/Kg βάρους/ημέρα) και προσθήκη αζαθειοπρίνης στο σχήμα μετά 2 εβδομάδες και δεδομένου ότι δεν υπάρχει σημαντικός ίκτερος (<6mg/dl) (αρχική δόση: 50mg/ημέρ και προοδευτικά αύξηση σε 1-2mg/Kgr βάρους/ημέρα ανάλογα με την ανταπόκριση του ασθενούς). Το πλάνο πάντα είναι η ταχεία μείωση της δόσης των κορτικοστεροειδών και στη συνέχεια διακοπή της ή παραμονή μικρής δόσης (5mg πρεδνιζολόνης). Η πλήρης ύφεση

πρέπει να είναι ο βασικός στόχος της θεραπείας. Παραμονή των αμινοτρανσαμινασών υποδηλώνει την παρουσία νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας στη βιοψία ήπατος και αποτελούν προγνωστικό δείκτη για υποτροπή μετά από διακοπή της θεραπείας, εξέλιξη σε κίρρωση και μειωμένη επιβίωση [110].

Η ιστολογική ύφεση της νόσου έχει δείξει ότι ακολουθεί κατά πολύ την ομαλοποίηση των αμινοτρανσφερασών και σε πολλές περιπτώσεις παρατηρείται και υπολλειματική φλεγμονή. Στοιχεία από τις υπάρχουσες μελέτες που να δείχνουν ποια είναι η ενδεικνυόμενη διάρκεια θεραπείας για την επίτευξη ιστολογικής ύφεσης δεν υπάρχουν.

Οι οδηγίες προτείνουν να συνεχίζεται η αγωγή για τουλάχιστον 3 έτη ή τουλάχιστον για 2 έτη από την επίτευξη της ιστολογικής ύφεσης. Μια μελέτη έδειξε ότι επίπεδα αμινοτρανσφερασών κάτω από το μισό του φυσιολογικού μαζί με IgG<1200mg/dl αποτελούν προγνωστικούς δείκτες για τη διατήρηση της ύφεσης μετά τα διακοπή της φαρμακευτικής αγωγής [180].

Εναλλακτικό σχήμα για τη θεραπεία ασθενών με ΑΗ αποτελούν ο συνδυασμός βουδεσονίδης (9mg/ημέρα) με αζαθειοπρίνη. Σε μια τυχαιοποιημένη διπλή τυφλή μελέτη όπου σύγκριθηκε ο συνδυασμός αυτός με το κλασικό σχήμα πρεδνιζολόνης/αζαθειοπρίνης σε μη κίρρωτικούς ασθενείς, φάνηκε πιο συχνή ομαλοποίηση των αμινοτρανσφερασών και πιο συχνά πλήρης βιοχημική ανταπόκριση καθώς και λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες με τον πρώτο συνδυασμό [181]. Αν και φαίνεται να υπάρχουν προβληματισμοί για τον σχεδιασμό της μελέτης, η μελέτη αυτή έδειξε την αποτελεσματικότητα του συνδυασμού σε μη κίρρωτικούς ασθενείς με ΑΗ.

Υποτροπή θα εμφανίσει το 50-90% των ατόμων μετά τη διακοπή της αγωγής συνήθως μέσα στον πρώτο χρόνο, αν και υποτροπή μετά το έτος μπορεί να παρατηρηθεί. Υποτροπή σύμφωνα με τα κριτήρια που έχει ορίσει το IAIHG ορίζεται ως η αύξηση των αμινοτρανσφερασών >3 ΑΦΤ, ενώ συχνά υποτροπή μπορεί να θεωρηθεί ότι υπάρχει και σε μικρότερες αυξήσεις των αμινοτρανσφερασών και αύξηση της IgG. Για τη θεραπεία της υποτροπής χρησιμοποιούνται συνήθως δόσεις κορτικοστεροειδών και αζαθειοπρίνης ανάλογες με αυτές του πρώτου θεραπευτικού σχήματος.

Δεύτερης γραμμής φάρμακα για τους ασθενείς που είτε δεν είχαν ικανοποιητική ανταπόκριση (non-responders, incomplete responders) είτε εμφάνισαν τοξικότητα από τη λήψη αζαθειοπρίνης είναι το mycophenolate mofetil (MMF) και αναστολείς της καλσινευρίνης (κυκλοσπορίνη, τακρόλιμους). Το MMF έχει μέχρι στιγμής χρησιμοποιηθεί κυρίως σαν 2<sup>ης</sup> γραμμής θεραπεία. Μια μελέτη σε 59 πρωτοθεραπευόμενους ασθενείς έδειξε ενθαρρυντικά αποτελέσματα με 89% πλήρη βιοχημική ανταπόκριση και 37% ύφεση μετά τη διακοπή της κορτιζόνης, ενώ μόλις 2 άτομα χρειάστηκε να διακόψουν το φάρμακο λόγω σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών [152].

#### **1.4 Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ)**

##### **1.4.1 Γενικά**

Η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα είναι μια προοδευτικά εξελισσόμενη χολοστατική νόσος του ήπατος που χαρακτηρίζεται από διάχυτη φλεγμονή και ίνωση των μικρών και μεγάλων ενδοηπατικών και εξωηπατικών χολοφόρων του



ήπατος. Το νόσημα είναι ετερογενές και περιλαμβάνει τις ακόλουθες υποομάδες: την ΠΣΧ μεγάλων χοληφόρων, που είναι και η κλασική μορφή, την ΠΣΧ μικρών χοληφόρων και το σύνδρομο «επικάλυψης» μεταξύ ΠΣΧ και ΑΗ [182]. Το νόσημα πρωτοπεριγράφηκε το 1867 από τον Hoffman στην εργασία του με τίτλο “Verschluss der gallenwege durch verdickung der wandungen” που δημοσιεύτηκε στο Arch Pathol Anat Physiol (39:206–215). Ωστόσο, χρειάστηκαν περισσότερο από 100 χρόνια για να τεθούν κριτήρια για τη διάγνυσή της. Σε αυτό βοήθησαν πολύ η χρήση της ERCP στη δεκαετία του 1970 και στη συνέχεια της MRCP στη δεκαετία του 1990.

#### **1.4.2 Επιδημιολογία**

Η ΠΣΧ είναι μια σπάνια νόσος, που προσβάλλει κυρίως άντρες (συχνότητα άντρες: γυναίκες= 2:1) και η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 40 χρόνια, αν και μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία.

Ο επιπολασμός σε διάφορες μελέτες αναφέρεται από 0.22 έως 16.2 ανά 100.000 κατοίκους. Σε μια πρόσφατη συστηματική ανάλυση η επίπτωση της ΠΣΧ στην Ευρώπη και Νότια Αμερική φτάνει την 1 περίπτωση ανά 100.000 κατοίκους ανά έτος [183]. Και στην ΠΣΧ, όπως και στην ΠΧΚ έχουν παρατηρηθεί διακυμάνσεις στην επίπτωση και τον επιπολασμό της νόσου με αυξανόμενο επιπολασμό στη Βόρεια Ευρώπη. Αντίθετα, η επίπτωση βαίνει αυξανόμενη σε παγκόσμιο επίπεδο και δεν είναι σαφές αν αυτό οφείλεται σε πραγματική αύξηση ή αυτό αντανακλά την αυξανόμενη επαγρύπνηση των γιατρών για το νόσημα και ως εκ τούτου την αυξανόμενη διάγνωση.

Έχει αναφερθεί γενετική προδιάθεση και συγκεκριμένα 1<sup>ου</sup> βαθμού συγγενείς έχουν 10-20 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να νοσήσουν συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό.

Επίσης είναι γνωστή η συσχέτιση της ΠΣΧ με τις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου (ΙΦΝΕ), η οποία όμως εξαρτάται από την γεωγραφική εντόπιση. Συγκεκριμένα, 2/3 των Βορειοευρωπαίων με ΠΣΧ έχουν ΙΦΝΕ, ενώ αντίθετα μόνο οι μισοί των Ισπανών και μόλις το 20% των Ιαπώνων με ΠΣΧ. Στο 80% των περιπτώσεων ΙΦΝΕ πρόκειται για ελκώδη κολίτιδα και στο υπόλοιπο για νόσο Crohn.

Πρόσφατες παρατηρήσεις δείχνουν αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ ΠΣΧ και ΙΦΝΕ. Συγκεκριμένα, ασθενείς με ΠΣΧ, που θα χρειαστούν μεταμόσχευση ήπατος φαίνεται ότι έχουν λιγότερο ενεργό ελκώδη κολίτιδα με μικρότερες πιθανότητες να χρειαστεί κολεκτομή. Αντίθετα, ασθενείς με μη εξελισσόμενη ΠΣΧ έχουν σοβαρότερη ιστολογικά έλκώδη κολίτιδα με αυξημένη πιθανότητα να χρειαστούν κολεκτομή [184].

### **1.4.3 Παθογένεια ΠΣΧ**

Αρκετά ερευνητικά βήματα έχουν γίνει τις τελευταίες 3 δεκαετίες στην κατανόηση της παθογένειας της ΠΣΧ, ωστόσο αυτή παραμένει ακόμα ασαφής [185-187].

Αρκετά δεδομένα μέχρι τώρα δείχνουν ότι η ΠΣΧ είναι αυτοάνοσο νόσημα ή ανοσολογικά επαγόμενο. Αποδεικτικά στοιχεία υπέρ της αυτοάνοσης αιτιολογίας της ΠΣΧ είναι: 1) η συσχέτιση με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα στον ασθενή και σε συγγενείς 1<sup>ου</sup> βαθμού, 2) διήθηση των πυλαίων διαστημάτων από Τ λεμφοκύτταρα 3) συσχέτιση με συγκεκριμένα αλληλία του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας και 4) η παρουσία αυτοαντιγόνων. Από την άλλη, υπάρχουν αρκετά δεδομένα που

δεν είναι συνηγορητικά υπέρ της μη αυτοανόσου αιτιολογίας του νοσήματος, όπως η παντελής έλλειψη ανταπόκρισης σε ανοσοκαταστολή και η υπεροχή των αντρών έναντι των γυναικών (σε αντίθεση με τα υπόλοιπα αυτοάνοσα νοσήματα). Οι παρατηρήσεις αυτές συνηγορούν υπέρ του ότι υπάρχουν και άλλοι παθογενετικοί μηχανισμοί που συμβάλουν στη βλάβη των χοληφόρων στην ΠΣΧ. Πλέον θεωρείται ότι η ΠΣΧ είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης περιβαλλοντικών και αυτόνομων μηχανισμών σε γενετικά προδιαθετιμένα άτομα [188].

### **Γενετικοί παράγοντες**

Συγγενείς 1ου βαθμού ασθενών με ΠΣΧ έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (9-39 φορές). Η ΠΣΧ έχει συσχετιστεί κυρίως με τους παρακάτω απλότυπους γονιδίων: HLA-DRB1\*1501-DQB1\*0602, HLA-DRB1\*1301-DQB1\* 0603, and HLA-A1-B8-DRB1\*0301-DQB1\*0201 [186]. Πιο πρόσφατα μια GWAS μελέτη επιβεβαίωσε τα ευρήματα των προηγούμενων μελετών, όπου τον μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης ΠΣΧ προσδίδουν γονίδια του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας [189-191] . Παράλληλα μη-HLA γονίδια έχουν δείξει να σχετίζονται με προδιάθεση για την εμφάνιση της ΠΣΧ και συγκεκριμένα γονίδια-ρυθμιστές της προσαρμοστικής ανοσιακής απάντησης καθώς και της ανοσολογικής ανοχής [190].

Πολλοί από τους πολυμορφισμούς που σχετίζονται με την ΠΣΧ φαίνεται ότι σχετίζονται σε άλλοτε άλλο βαθμό και με την εμφάνιση ΙΦΝΕ, υποδεικνύοντας την ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο νοσημάτων. Στη μεγαλύτερη μέχρι στιγμής πολυκεντρική μελέτη στην ΠΣΧ εκτιμήθηκε ο γενετικός κίνδυνος ανάμεσα σε 130422 πολυμορφισμούς νουκλεοτιδίων (SNPs) σε συνολικά 3789 άτομα με ΠΣΧ και 25079 ως μάρτυρες και για τη γονοτύπωση χρησιμοποιήθηκε ImmunoChip [192]. Στη

μελέτη αυτή ταυτοποιήθηκαν 9 καινούργια loci εκτός του MHC συστήματος, που προσδίδουν αυξημένο κίνδυνο για ΠΣΧ. Παράλληλα ταυτοποιήθηκαν άλλα 33 loci, που έχουν συσχετιστεί με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. Κατά πόσο οι συσχετίσεις αυτές αντανakλούν αποκλίνουσα ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων ή διαταραχή στην ομοιοστασία των χολικών οξέων απομένει να διαπιστωθεί.

### **Λοιμώδη-τοξικά αίτια και ανοσιακή απάντηση**

Η ισχυρή συσχέτιση της ΠΣΧ με τις ΙΦΝΕ οδήγησε στην διατύπωση υποθέσεων που να συνδέουν τα δύο όργανα. Έτσι προτάθηκε ότι η διαμετάθεση μικροβίων και τοξικών ουσιών από το φλεγμένον έντερο διαμέσου της πυλαίας κυκλοφορίας προς τα χοληφόρα μπορεί να ενεργοποιήσει την ανοσιακή απάντηση και στη συνέχεια τη φλεγμονή στα χοληφόρα [185]. Η έκθεση των χολαγγειοκυττάρων σε βακτήρια, τοξίνες και χολικά άλατα μπορεί να οδηγήσει σε διάσπαση των φραγμών μεταξύ τους με αποτέλεσμα τη φλεγμονή και ενεργοποίηση της ανοσιακής απάντησης, όπως έχει δείχτεί από τα αυξημένα επίπεδα TLR, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-8 και του συμπλέγματος MyD88/IRAK σε όλα τα στάδια της νόσου. Παράλληλα η αλληλεπίδραση μεταξύ μορίων προσκόλλησης και συνάθροισης λεμφοκυττάρων στο ήπαρ θεωρούνται πολύ σημαντικό στάδιο στην παθογένεια της ΠΣΧ. Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι υπάρχουν μόρια προσκόλλησης στο ήπαρ και στο έντερο που έχουν ανάλογο προφίλ έκφρασης, όπως το MadCAM-1 (mucosal vascular addressin cell adhesion molecule) και το VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1).

Η παρατήρηση ότι ΠΣΧ μπορεί να αναπτυχθεί και μετά από κολεκτομή σε ασθενείς με ΙΦΝΕ ή ότι η ΙΦΝΕ μπορεί να εμφανιστεί μετά από μεταμόσχευση ήπατος σε

ασθενείς με τελικού σταδίου ΠΣΧ οδήγησε στην υπόθεση ότι υπάρχουν λεμφοκύτταρα που κυκλοφορούν μεταξύ ήπατος και εντέρου και ότι αυτό μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια και των 2 νοσημάτων.

Από τα υπάρχοντα δεδομένα η «εντεροηπατική κυκλοφορία των λεμφοκυττάρων» φαίνεται να σχετίζεται με τη παθογένεια της ΠΣΧ. Θεραπευτική «τροποποίηση» των T λεμφοκυττάρων με τη χρήση αναστολέων διαφόρων μορίων, όπως τα μόρια προσκόλλησης, που προαναφέρθηκαν μπορεί ίσως να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της ΠΣΧ, των ΙΦΝΕ ή και των δύο νοσημάτων.

#### **1.4.4 Κλινική εικόνα ΠΣΧ**

Η κλινική εικόνα των ασθενών με ΠΣΧ είναι ετερογενής [182]. Τα τελευταία χρόνια αυξάνει το ποσοστό των ασθενών που είναι ασυμπτωματικοί και η διάγνωση γίνεται στα πλαίσια διερεύνησης αυξημένης αλκαλικής φωσφατάσης σε έλεγχο ρουτίνας ή σε ασθενείς με γνωστή ΠΣΧ. Στη συμπτωματολογία ασθενών με ΠΣΧ περιλαμβάνονται διαλείπων ίκτερος, αίσθημα βάρους ή και πόνος στο δεξιό υποχόνδριο, κνησμός, απώλεια βάρους και λήθαργος. Σπάνια ασθενείς διαγιγνώσκονται λόγω συμπτωμάτων που οφείλονται σε πυλαία υπέρταση (ασκίτης, εγκεφαλοπάθεια, αιμορραγία πεπτικού). Στην πορεία της νόσου οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν συμπτώματα οξείας χολαγγειίτιδας (πυρετός, ρίγος, κοιλιακό άλγος), που οφείλεται σε λοίμωξη λόγω στένωσης στα χοληφόρα.

Ειδικά σημεία στην κλινική εξέταση, που να χαρακτηρίζουν την ΠΣΧ δεν υπάρχουν.

#### **1.4.5 Διάγνωση ΠΣΧ**

Η διάγνωση της ΠΣΧ τίθεται όταν σε ασθενείς με χολόσταση ανευρίσκονται χαρακτηριστικές βλάβες χοληφόρων με στενώσεις και διατάσεις στη χολαγγειογραφία (MRCP ή ERCP) και εφ' όσον έχουν αποκλειστεί αιτίες δευτεροπαθούς σκληρυντικής χολαγγειίτιδας [182].

Αιτίες δευτεροπαθούς χολαγγειίτιδας είναι: χοληδοχολιθίαση, χειρουργικός τραυματισμός των χοληφόρων, χολαγγειοκαρκίνωμα, ηωσινοφιλική χολαγγειίτιδα, ιστοκυττάρωση X, IgG4-σχετιζόμενη χολαγγειίτιδα, υποτροπιάζοντα επεισόδια παγκρεατίτιδας, υποτροπιάζοντα επεισόδια βακτηριακής χολαγγειίτιδας, ισχαιμική χολαγγειίτιδα κ.ά.

#### **1.4.6 Εργαστηριακά ευρήματα**

Η πιο χαρακτηριστική και συχνή διαταραχή στους ασθενείς με ΠΣΧ είναι η αύξηση της αλκαλικής φωσφατάσης. Τα επίπεδα της διαταραχής μπορεί να έχουν σημαντικές διακυμάνσεις κατά την πορεία της νόσου, ενώ μπορεί να είναι και φυσιολογικά. Μπορεί να παρατηρηθεί και αύξηση των αμινοτρανσφερασών σε επίπεδα που συνήθως δεν ξεπερνούν 2-3 φορές τα ανώτερα φυσιολογικά, εκτός από περιπτώσεις οξείας απόφραξης. Σε αυτές τις περιπτώσεις θα πρέπει να διερευνάται και το ενδεχόμενο συνύπαρξης ΑΗ, ανάλογα βέβαια και με τα υπόλοιπα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα.

Τα επίπεδα της χολερυθρίνης είναι συνήθως εντός φυσιολογικών ορίων, εκτός από περιπτώσεις σημαντικής απόφραξης χοληφόρων και σε τελικού σταδίου ηπατική ανεπάρκεια.

### 1.4.7 Αυτοαντισώματα στην ΠΣΧ

Η ΠΣΧ έχει συσχετιστεί με πληθώρα αυτοαντισωμάτων [193]. Η ειδικότητά τους, όμως, είναι πολύ χαμηλή και η συχνότητα ανίχνευσής τους διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες μελέτες. Οι διαφορές μπορεί να οφείλονται σε διαφορετικές μεθοδολογίες ή στην ετερογένεια των πληθυσμών μελέτης, κάνοντας την ερμηνεία των ευρημάτων δύσκολη. Συνοπτικά στον πίνακα 1.4 παρουσιάζονται αυτοαντισώματα και η συχνότητα ανίχνευσής τους σε ασθενείς με ΠΣΧ.

**Πίνακας 1.4.** Αυτοαντισώματα σε ορό ασθενών με Πρωτοπαθή Σκληρυντική Χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ) [193]

Αντίσωμα	Επιπολασμός (%)
Αντισώματα έναντι κυτταροπλάσματος ουδετεροφίλων (ANCA)	42-93
p ANCA	26-94
Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA)	7-77
Αντισώματα έναντι λείων μυικών ινών (SMA)	0-83
Αντισώματα έναντι ενδοθηλίου χοληφόρων (αντί-BEC)	63
Αντισώματα έναντι καρδιολιπίνης	4-63
Αντισώματα έναντι θυρεοϋπεροξειδάσης	7-16
Αντισώματα έναντι θυρεοσφαιρίνης	4
Ρευματοειδής παράγοντας	15

ANCA περιγράφηκαν λεπτομερώς για πρώτη φορά σε ασθενείς με ΠΣΧ το 1989 [194]. Αυτά θεωρούνται ότι είναι «άτυπα» όπως και στην περίπτωση της ΑΗ και περιγράφονται καλύτερα με τον όρο ANNA, καθώς αναγνωρίζουν αντιγόνα που βρίσκονται στον πυρήνα και όχι στο κυτταρόπλασμα (όπως στην περίπτωση των τυπικών ANCA).

Ο επιπολασμός των ANCA γενικά κυμαίνεται από 42-93%, ενώ συγκεκριμένα των pANCA από 26-94% [195]. Δεν έχει περιγραφεί συσχέτιση των ANCA με συγκεκριμένο απλότυπο του MHC. Αντιγόνα που θεωρούνται στόχοι των ANCA σε ασθενείς με ΠΣΧ και η συχνότητα ανίχνευσής τους σε διάφορες μελέτες είναι: η λακτοφερρίνη (4-54%), η μυελουπεροξειδάση (0-33%), η BPI (Bactericidal/permeability increasing protein) (5-46%), η καθεψίνη (0-35%), η πρωτεΐνάση 3 (0-44%), η ελαστάση (0-35%), η α-ενολάση (11-33%), η καταλάση (16-60%) και πιο πρόσφατα η TBB5 (Tubulin beta-5 chain) και η πρωτεΐνάση 3 [196-201]. Πολλές από αυτές τις αντιδραστικότητες, όπως έναντι BPI και της λακτοφερρίνης ανευρίσκονται και σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα. Κατά πολλούς αυτό ίσως ενισχύει τη θεωρία ότι η ΠΣΧ είναι αποτέλεσμα της ανοσιακής απάντησης έναντι αντιγόνων του αυλού του εντέρου σε γενετικά ευαίσθητα άτομα.

ANA και SMA ανιχνεύονται σε μεγάλο ποσοστό σε ασθενείς με ΠΣΧ. Όσον αφορά στα ANA δεν έχει αναφερθεί συγκεκριμένη αντιδραστικότητα να χαρακτηρίζει τους ασθενείς με ΠΣΧ. Συνηθέστερες είναι αντί-dsDNA, αντί-ENA, αντί-SSA/B, ενώ λιγότερο συχνά ανιχνεύονται αντί-RNP, αντί-ssDNA κ.ά [195].

Συχνά ανιχνεύονται ANA και SMA ταυτόχρονα, αλλά λόγω της χαμηλής ειδικότητας που παρουσιάζουν για την ΠΣΧ δεν έχουν καμιά διαγνωστική αξία για τη νόσο. Γενικά η παρουσία αυτοαντισωμάτων στην ΠΣΧ συχνά αποδίδεται σε μη ειδική δυσλειτουργία του ανοσιακού συστήματος. Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία για την ΠΣΧ υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι πιθανά να υπάρχουν ειδικοί αντιγονικοί στόχοι τόσο στο επιθήλιο των χοληφόρων όσο και στα ουδετερόφιλα. Γεγονός είναι ότι για να επιβεβαιωθεί αυτό χρειάζονται μελέτες σε μεγάλες πληθυσμιακές ομάδες ασθενών με ΠΣΧ.



#### **1.4.8 Απεικονιστικά ευρήματα**

Η ERCP θεωρείται το gold standard για τη διάγνωση της ΠΣΧ [182].

Η ERCP και η MRCP θεωρούνται ότι έχουν εφάμιλλη διαγνωστική αξία, αν και μερικές φορές πρώιμες αλλοιώσεις στα χοληφόρα μπορεί να μην γίνουν διακριτικές στη δεύτερη. Δεδομένων των πιθανών επιπλοκών από την ERCP, όπως είναι η παγκρεατίτιδα, η ανιούσα χολαγγειίτιδα κ.ά., συστήνεται πλέον η διενέργεια MRCP, η οποία έχει ευαισθησία και ειδικότητα 88 και 99% αντίστοιχα για τη διάγνωση της ΠΣΧ [202].

Χαρακτηριστικά ευρήματα στη χολαγγειογραφία είναι η ανεύρεση στενώσεων και διατάσεων των ενδο- ή/και των εξωηπατικών χολαγγείων. Οι στενώσεις μπορεί να είναι διάχυτες ή μονήρεις είναι συνήθως μικρές σε μήκος και δακτυλιοειδείς. Αυτές συνδυάζονται συνήθως με προστενωτικές διατάσεις που μοιάζουν με εκκόλπωμα ή σακκοειδή εκτασία. Διάχυτη προσβολή των ενδοηπατικών χολαγγείων μπορεί να οδηγήσει σε μη απεικόνισή τους στην MRCP, και δίνει την εντύπωση ερήμωσης.

Στο 75% των περιπτώσεων προσβάλλονται ταυτόχρονα τα ενδοηπατικά και τα εξωηπατικά χοληφόρα. Στο 15-20% προσβάλλονται μόνο τα ενδοηπατικά χοληφόρα, ενώ προσβολή μόνο των εξωηπατικών χοληφόρων είναι σπάνια. Μπορεί σε ασθενείς με ΠΣΧ να παρατηρηθεί και προσβολή της χοληδόχου κύστης, του κυστικού πόρου ή του παγκρεατικού πόρου.

#### **14.9 Ιστολογικά ευρήματα**

Η βιοψία ήπατος δεν θεωρείται απαραίτητη όταν υπάρχουν τυπικά χολαγγειογραφικά ευρήματα, καθώς τα ιστολογικά ευρήματα δεν είναι τυπικά στην

ΠΣΧ. Μόνο εύρημα που θεωρείται παθognωμονικό στη βιοψία ήπατος, το οποίο όμως περιγράφεται σε μικρό ποσοστό των ασθενών, είναι η παρουσία αλλοίωσης που θυμίζει «φλοιό κρεμμυδιού» (onion skin lesion), η οποία οφείλεται σε συγκεντρική ίνωση με μικρού βαθμού φλεγμονώδη αντίδραση γύρω από τα χολαγγεία.

Περιπτώσεις που θεωρείται ότι η βιοψία είναι απαραίτητη είναι όταν παρά την υψηλή υποψία για τη νόσο δεν υπάρχουν χολαγγειογραφικά ευρήματα και μπορεί να πρόκειται για ΠΣΧ μικρών χολαγγείων είτε σε περίπτωση υποψίας «συνδρόμου επικάλυψης» με ΑΗ.

#### **1.4.10 Επιπλοκές**

##### **Πυλαία υπέρταση και επιπλοκές**

Όπως και στα υπόλοιπα χρόνια ηπατικά νοσήματα, η εξέλιξη της ίνωσης σχετίζεται με την εμφάνιση πυλαίας υπέρτασης και των επιπλοκών. Στις περιπτώσεις αυτές εφαρμόζονται τα θεραπευτικά μέτρα όπως και στην πυλαία υπέρταση άλλων αιτιών.

##### **ΠΣΧ και Ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου**

Ο επιπολασμός των ΙΦΝΕ στους ασθενείς με ΠΣΧ κυμαίνεται μεταξύ 60-80% κυρίως σε μελέτες από τη Βόρεια Ευρώπη και Βόρεια Αμερική [182]. Η συσχέτιση αφορά κυρίως στην παρουσία ελκώδους κολίτιδας (έως και στο 86% των περιπτώσεων), ενώ νόσος Crohn αναφέρεται σε πολύ μικρότερα ποσοστά (έως 13%) [203-204]. Αντίθετα, σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα το αναφερόμενο ποσοστό ΠΣΧ κυμαίνεται από 2.4%-7.5% και 3.4% σε ασθενείς με νόσο Crohn, αν και ο

πραγματικός επιπολασμός της ΠΧΚ δεν είναι γνωστός λόγω της μη διενέργειας χολαγγειογραφίας σε όλους τους ασθενείς με ΙΦΝΕ ανεξάρτητα από την παρουσία συμπτωμάτων.

Έτσι, οι επιστημονικές εταιρείες συστήνουν την διενέργεια κολοσκόπησης σε όλους τους ασθενείς με ΠΣΧ, ανεξάρτητα από το αν έχουν συμβατή συμπτωματολογία και επίσης επανάληψή της ανά ένα ή δύο έτη με διενέργεια βιοψιών όπου χρειάζεται ως προσυμπτωματικό έλεγχο για ανάπτυξη νεοπλασίας. Αρκετές μελέτες μέχρι τώρα έχουν δείξει ότι η ΙΦΝΕ, που σχετίζεται με την ΠΣΧ φαίνεται ότι έχει διαφορετικό φαινότυπο από ότι η ΙΦΝΕ που δε σχετίζεται με την παρουσία ΠΣΧ. Κάποια από τα χαρακτηριστικά της είναι: η εκτεταμένη κολίτιδα που αφορά κυρίως στο δεξί κόλον, η μη προσβολή του ορθού, η προσβολή του ειλεού σε ελκώδη κολίτιδα, η πιο ήπια κλινική πορεία, ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης νεοπλασίας εντέρου, η μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης «rouchitis» σε ασθενείς μετά από εκτομή πρωκτού από ότι σε ασθενείς χωρίς ΠΧΚ και ο αυξημένος κίνδυνος περιπρωκτικών κισμών σε ασθενείς με εκτομή πρωκτού και ειλεοστομία.

### **Χολαγγειοκαρκίνωμα**

Η δεκαετής πιθανότητα εμφάνισης χολαγγειοκαρκινώματος σε ασθενείς με ΠΣΧ ανέρχεται σε 7-9%. Η διάρκεια της ΠΣΧ δεν φαίνεται να αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα για την εμφάνιση του χολαγγειοκαρκινώματος, ενώ αντίθετα ως προδιαθεσικοί παράγοντες έχουν αναφερθεί: η αυξημένη χολερυθρίνη, η διάρκεια της ΙΦΝΕ, η παρουσία ΙΦΝΕ με δυσπλασία ή καρκίνο εντέρου, η διενέργεια εκτομής πρωκτού και ο πολυμορφισμός NKG2D [205-206]. Στο 50% των περιπτώσεων η διάγνωση του χολαγγειοκαρκινώματος γίνεται κατά τη διάγνωση της ΠΣΧ.

Δεδομένου του αυξημένου κινδύνου για την κακοήθεια αυτή, συστήνεται η διερεύνηση των ασθενών με ΠΣΧ προς αυτή την κατεύθυνση όταν παρατηρείται επιδείνωση της ηπατικής βιοχημείας ή υπάρχει επιδείνωση της συμπτωματολογίας των ασθενών.

Η διάγνωση του χολαγγειοκαρκινώματος είναι εύκολη όταν υπάρχει μάζα με χαρακτηριστική αιμοδυναμική συμπεριφορά στην CT με ενδοφλέβιο σκιαγραφικό, που συνίσταται σε μάζα με ενίσχυση της πρόσληψης του σκιαγραφικού σε φλεβική φάση. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων όμως, δεν υπάρχει μάζα στα πρώιμα στάδια της νόσου και συχνά πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω μια στένωση στο χοληφόρο δέντρο. Η διάκριση μιας καλοήθους στένωσης από το χολαγγειοκαρκίνωμα είναι συχνά δύσκολη δεδομένης της απουσίας βιολογικών δεικτών και απεικονιστικών εξετάσεων που να διαθέτουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα.

Το CA19-9 του ορού είναι ο δείκτης που έχει μελετηθεί έως τώρα πιο πολύ για τη διάγνωση του χολαγγειοκαρκινώματος. Δυστυχώς μπορεί να βρεθεί αυξημένος και σε άλλες περιπτώσεις, όπως π.χ. σε περιπτώσεις βακτηριακής χολαγγειίτιδας, ενώ μπορεί είναι να είναι αρνητικό σε άτομα που δεν διαθέτουν το αντιγόνο Lewis. Τιμές  $\geq 130$  IU/L έχουν ευαισθησία και ειδικότητα 79% και 98% αντίστοιχα [207]. Έτσι ο προσδιορισμός του CA19-9 έχει σημασία στη διερεύνηση ενός συμπτωματικού ασθενούς που μπορεί να έχει χολαγγειοκαρκίνωμα.

Η απεικόνιση του χοληφόρου δέντρου με ERCP ή MRCP μπορεί να απεικονίσει στένωση- απόφραξη του αυλού των χοληφόρων, έχει όμως χαμηλή προγνωστική αξία για τη διάγνωση του χολαγγειοκαρκινώματος. Κυτταρολογικές που μπορούν να ληφθούν με ψύκτρα διαμέσου της ERCP έχουν αυξημένη ειδικότητα, αλλά χαμηλή

ευαισθησία. Η χρήση της μεθόδου FISH (fluorescent *in situ* hybridization) έχει αυξήσει την ευαισθησία στην εκτίμηση της κυτταρολογικής. Η εκτίμηση ασθενών με ΠΣΧ για πιθανή ανάπτυξη χολαγγειοκαρκινώματος είναι συχνά δύσκολη, ενώ σαφείς συστάσεις δεν υπάρχουν από τις επιστημονικές εταιρείες.

#### **1.4.11 Θεραπεία ΠΣΧ**

Μέχρι σήμερα, όλες οι τυχαίοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες διαφόρων φαρμάκων που είχαν σαν καταληκτικό σημείο την αναστολή της εξέλιξης της ίνωσης στην ΠΣΧ έχουν δώσει αρνητικά αποτελέσματα. Το φάρμακο που έχει μελετηθεί περισσότερο μέχρι στιγμής είναι το UDCA, το οποίο στην ΠΧΚ έχει φανεί ότι επιβραδύνει την εξέλιξη της ίνωσης [δες πιο πάνω άρθρα για την ΠΧΚ].

Σε δόση 17-23mg/Kgr/ημέρα το UDCA δεν έδειξε πλεονέκτημα στην επιβίωση συγκριτικά με το placebo. Μια αμερικάνικη μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκε UDCA σε υψηλές δόσεις (28-30mg/Kgr/ημέρα) διακόπηκε, γιατί πρώιμα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε αυτή τη δόση το φάρμακο σχετίστηκε με διπλάσιο κίνδυνο εξέλιξης της ίνωσης και των απώτερων επιπλοκών συγκριτικά με placebo [208-209]. Μια μετα-ανάλυση 8 κλινικών δοκιμών συμπέρανε ότι το UDCA δεν επιβραδύνει την εξέλιξη της νόσου [210].

Βασιζόμενοι στα παραπάνω, η Αμερικανική Εταιρεία για τη μελέτη του ήπατος (AASLD) δεν συστήνει τη χορήγηση UDCA για τη θεραπεία της ΠΣΧ, ενώ η Ευρωπαϊκή εταιρεία για τη μελέτη του ήπατος (EASL) δεν συστήνει ούτε τη χορήγηση, αλλά ούτε παίρνει θέση υπέρ της συνταγογράφησης του φαρμάκου [182].

Η μεταμόσχευση ήπατος αποτελεί τη θεραπεία εκλογής σε τελικού σταδίου νόσημα.

Η 5ετής επιβίωση μετά τη μεταμόσχευση αναφέρεται να είναι 70-80%, ενώ υποτροπή της ΠΣΧ στο μόσχευμα αναφέρεται στο 25% των περιπτώσεων [211].

Παράγοντας κινδύνου για την υποτροπή της ΠΣΧ στο μόσχευμα θεωρείται η συνύπαρξη ΙΦΝΕ χωρίς κολεκτομή.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### 2.Μέθοδοι ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο θα συζητηθούν οι τεχνικές και πρακτικές ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων και ειδικότερα εκείνες που σχετίζονται με την παρούσα μελέτη η οποία εστιάζεται στον προσδιορισμό αυτοαντισωμάτων σε αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα. Τα μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα των διαφόρων μεθόδων ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων έχουν μελετηθεί εις βάθος, μια και οι περισσότερες από αυτές χρησιμοποιούνται για πολλές δεκαετίες. Για το λόγο αυτό, θα αναφερθούν μόνο τα βασικά πλεονεκτήματα ή μειονεκτήματα των μεθόδων, δίνοντας ιδιαίτερη σημασία σε εκείνα που αφορούν αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται σε ασθενείς με αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα.

#### 2.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός (Indirect Immunofluorescence, IIF)

Η αρχή της μεθόδου του ΕΑΦ [50, 70, 140] στηρίζεται στην επώαση των δειγμάτων με υπόστρωμα (συνήθως ιστικό ή καρκινικής σειράς) που αρχικά επωάζεται με τον αραιωμένο όρο του δότη για προκαθορισμένο χρόνο (συνήθως 30'). Μετά το απαραίτητο πλύσιμο που στοχεύει στην απομάκρυνση των ασύνδετων αντισωμάτων, το υπόστρωμα επωάζεται με αντιγόνο κατά αντι-ανθρώπινης σφαιρίνης συνδεδεμένης με φθοριόχρωμα (συνήθως φλουροσκεΐνη). Στη συνέχεια το ασύνδετο αντιδραστήριο ξεπλένεται. Κατά την επισκόπηση με το μικροσκόπιο φθορισμού, τα θετικά δείγματα φθορίζουν σε περιοχές/οργανύλλια του κυττάρου



που ανταποκρίνονται στο προσκολληθέν αυτοαντίσωμα (πχ σε θετικά τεστ για ANA θα φθορίζει ο πυρήνας κλπ). Η μέθοδος του ΕΑΦ έχει αναπτυχθεί εδώ και δεκαετίες και αποτελεί μια από τις πρώτες μεθόδους ανίχνευσης αντισωμάτων. Παρά την ανάπτυξη προηγμένων τεχνολογιών, η μέθοδος χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα με αξιοπρόσεκτη επιτυχία και αποδεδειγμένα αποτελεί τη συνηθέστερη μέχρι σήμερα μέθοδο ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει την ανάγκη για ορθή ανίχνευση αυτοαντισωμάτων που επιτυγχάνεται μόνο (και κυρίως) μέσω της μεθόδου αυτής, καθώς και της υψηλής χρηστικότητας, ενώ έμμεσα αναδεικνύει την ανικανότητα άλλων μεθόδων να ανταποκριθούν στις αυξημένες απαιτήσεις που ικανοποιούνται από τον ΕΑΦ. Η μέθοδος είναι σχετικά απλή στην κατανόηση της αλλά δύσκολη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ειδικά όταν προκύπτουν πολλαπλά ή σπάνια πρότυπα ανοσοφθορισμού. Επειδή απαιτείται η χρήση μικροσκοπίου φθορισμού, τα αποτελέσματα που είναι ορατά στον κοινό οφθαλμό επιδέχονται παρερμηνείας προτύπων ανοσοφθορισμού που μόνο ο χρήστης με πολυετή εμπειρία μπορεί ορθά να αναδείξει. Η μέθοδος θεωρείται εργώδης και κοπιαστική και δυστυχώς η χρήση της έχει αρχίσει να μειώνεται σε εργαστήρια που επεξεργάζονται δεκάδες εκατοντάδες δείγματα ορών. Τα εργαστήρια αυτά λανθασμένα (όπως θα τονίσουμε παρακάτω) στηρίζονται σε αυτοματοποιημένα συστήματα ELISA που δεν απαιτούν έμπειρο χρήστη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (κυρίως αύξηση των ψευδώς αρνητικών δειγμάτων). Θα πρέπει να τονιστεί ότι ο ΕΑΦ είναι ουσιαστικά μια πολυμετρική μέθοδος ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων καθώς επιτρέπει την αναγνώριση πολλαπλών προτύπων/αυτοαντισωμάτων με ένα μόνο προσδιορισμό. Τα πιο συνηθισμένα πρότυπα δύναται να αναγνωριστούν από τους τελικούς χρήστες και δεν

δημιουργούν παρερμηνείες. Ωστόσο, η ποσοτικοποίηση του τίτλου των αυτοαντισωμάτων απαιτεί επανάληψη του προσδιορισμού σε διαδοχικές αραιώσεις (συνήθως 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 κλπ) μέχρι την εξάλειψη του προτύπου του ανοσοφθορισμού [70].

Για την ακριβή ανίχνευση αυτοαντισωμάτων που σχετίζονται με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος απαιτείται η χρήση υποστρωμάτων από λεπτά μέρη οργάνων (ήπαρ, νεφρός, στόμαχος) τρωκτικών [70]. Η ταυτόχρονη χρήση κυτταρικών σειρών του τύπου HEp-2 επιτρέπει την ευκολότερη αναγνώριση προτύπων σε ασθενείς με θετικά τεστ για ANA, όπως ασθενείς με ΑΗ και ΠΧΚ. Η επιλογή του υποστρώματος και ο τρόπος προετοιμασίας/παρασκευής του (με κρουτόμους) είναι υψίστης σημασίας για την αποτελεσματικότητα του παρασκευάσματος. Αυτό φαίνεται και από τις ασυμφωνίες που προκύπτουν ανάμεσα σε *in house* και εμπορικά διαθέσιμα υποστρώματα. Εκτός του υποστρώματος, άλλοι παράγοντες που είναι εξίσου σημαντικοί και κρίσιμοι για την αποδοτικότητα του ΕΑΦ είναι το στερεωτικό κατά τη προετοιμασία της πλάκας, ο λόγος φθορισμού πρωτεΐνης (F/P) και τέλος η ειδικότητα τάξης/υπόταξης της ανοσοσφαιρίνης του συζεύγματος (conjugate). Για να γίνει αυτό περισσότερο κατανοητό, αξίζει να σημειωθεί ότι μερικά στερεωτικά ή συνδυασμοί τους αλλοιώνουν σε υπερθετικό βαθμό την αντιγονικότητα των υπο εξέταση στόχων και επηρεάζουν την ευαισθησία/ειδικότητα της μεθόδου [70, 212]. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα κυρίως διαγνωστικά αυτοαντισώματα ανήκουν στην τάξη IgG και η σφαιρίνη για IgG αναγνωρίζεται ως η πλέον ειδική. Χαμηλοί τίτλοι αυτοαντισωμάτων (όπως ANA) τόσο IgG όσο IgA αλλά και IgM ανευρίσκονται σε σημαντικό αριθμό ηλικιωμένων υγιειών δοτών (περίπου 1-5%). Η πιο συχνή

επιλογή υποστρώματος για την ανίχνευση ANA είναι αυτή της καρκινικής σειράς από ανθρώπινο λαρυγγικό επιθηλίωμα (Human epithelioma, HEp-2). Ειδικά για τα ANA χρησιμοποιείται κεκκαθαρμένη αντιανθρώπινη IgG που έχει προσεκτικά επιλεγμένο F/P λόγο ώστε να επιτρέπεται η ανίχνευση ANA που είναι δύσκολα να ανιχνευθούν από κοινά conjugates (όπως αντισωμάτων έναντι του Scl- 70)[212]. Η χρήση ειδικά επεξεργασμένων σφαιρινών που χρησιμοποιούνται στις ημέρες μας έχουν οδηγήσει στη μείωση των «ψευδώς» θετικών τεστ που αποδίδονται στον μικρό τίτλο αυτοαντισωμάτων IgM που συναντώνται σε ηλικιωμένους υγιείς δότες.

**Πίνακας 2.1.** Απολύτως απαραίτητα (ανοιχτό τετράγωνο), απαραίτητα (ανοιχτό τρίγωνο) και υποβοηθητικά (ανοιχτός κύκλος) tests αυτοαντισωμάτων σε άτομα με κλινική υποψία αυτοάνοσου ηπατικού νοσήματος.

**Κλινική Υποψία**

	Αυτοάνοση Ηπατίτιδα	Πρωτοπαθής Χολική Κίρρωση	Πρωτοπαθής Σκληρυντική Χολαγγειίτιδα
<b>Tests</b>			
ΕΑΦ (ιστός ήπατος, νεφρού, στομάχου)	□	□	
ΕΑΦ (ουδετερόφιλα)			□
ΕΑΦ (HEp-2)	○	△	
Αντί-SLA	△		
Αντί -CYP2D6 (LKM1)	△		
Αντί -FTCD (LC1)	○		
Αντί -F-actin	○		
Αντί -sp100		△	
Αντί -gp210		△	

ΕΑΦ, έμμεσος ανοσοφθορισμός; HEp-2, human epithelioma cells; SLA, soluble liver antigen; CYP2D6, cytochrome P4502D6; LKM1, liver kidney microsomal type 1; FTCD, formiminotransferase cyclodeaminase; F-actin, filamentous actin

Πρόσφατα, ημιαυτοματοποιημένα ή πλήρως αυτοματοποιημένα συστήματα ΕΑΦ επιτρέπουν την ολοκλήρωση δεκάδων προσδιορισμών σε λίγες ώρες καθώς και την αυτοματοποιημένη αναγνώριση θετικών vs αρνητικών (για αυτοαντισώματα) δειγμάτων καθώς και τον ψηφιακό προσδιορισμό των πιο συχνών προτύπων ανοσοφθορισμού [213]. Τέτοια συστήματα έχουν αναπτυχθεί από πολλούς κατασκευαστές και η αποτελεσματικότητά τους είναι αντικείμενο ενδελεχούς έρευνας. Κάποια από αυτά έχουν ήδη εμπορευματοποιηθεί και χρησιμοποιούνται από μεγάλα ή μικρομεσαία ανοσολογικά εργαστήρια [214]. Με την βοήθεια της τεχνολογίας, αναμένεται να ελατωθούν σημαντικά οι εργατώρες που απαιτούνται για την ορθή αναγνώριση και κλινικοεργαστηριακή ερμηνεία των αποτελεσμάτων του ΕΑΦ [215]. Ο κλασικός ανοσοφθορισμός με την μορφή που τον γνωρίζουμε σήμερα θα παραμείνει ένα βασικό εργαλείο αναγνώρισης σπάνιων ή περίπλοκων προτύπων ανοσοφθορισμού που θα απαιτούν το έμπειρο μάτι του χειριστή και τα οποία δεν μπορούν να αναγνωριστούν από τις ψηφιακές κάμερες και τα λογισμικά προγράμματα υψηλής τεχνολογίας.

## **2.2 Ενζυμικά συνδεδεμένος ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (Enzyme Linked Immunosorbent assay)**

Η ELISA χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και ποικίλη (συνήθως μεγάλη) ειδικότητα για την ανίχνευση αντιγονοειδικών αυτοαντισωμάτων. Ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα της μεθόδου αποτελεί η ικανότητα να διατηρείται η στερεοδομή του αντιγόνου στην περίπτωση για παράδειγμα που αυτό είναι ανασυνδυασμένο και έχει παραχθεί με τη χρήση ευκαρυωτικού συστήματος (πχ

baculovirus). Στην περίπτωση αυτή, γίνεται ευκολότερη η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων που στοχεύουν στερεοτακτικούς επίτοπους (conformational epitopes). Αξίζει να τονιστεί ότι η πλειονότητα των αντισωμάτων-αυτοαντισωμάτων στρέφονται κατά στερεοτακτικών δομών των αντιγονικών στόχων. Για τον παραπάνω λόγο, η ELISA υπερτερεί της Western ανοσοαποτύπωσης, η οποία δεν έχει την ικανότητα να ανιχνεύει conformational epitopes.

Κατά τη μέθοδο αυτή δίνεται η δυνατότητα στο αντιγόνο (σε τελική συγκέντρωση που έχει προκαθοριστεί από πειράματα τυποποίησης) να προσκολληθεί σε φρεάτια (πηγαδάκια, well) πολυστυρενίου (Εικόνα 2.1). Στις περισσότερες των περιπτώσεων και για λόγους ευκολίας χρησιμοποιούνται 96-well U-turn μικροπλάκες. Μετά την προσκόλληση του αντιγόνου, το δείγμα ορού σε προκαθορισμένη αραιώση (συνήθως 1/51 ή 1/101) επώαζεται στο φρεάτιο για χρονικό διάστημα που μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται (συνήθως 30' ή 60'). Η επώαση του ορού με το προσκολλημένο στο φρεάτιο αντιγόνο επιτρέπει της σύζευξη του αντισώματος με το αντιγόνο και τον καθορισμό ανοσοσυμπλέγματος. Για την ανίχνευση του -συνδεδεμένου με το αντιγόνο- αυτοαντισώματος απαιτείται η περαιτέρω επώαση με ένζυμο συνδεδεμένο με αντιορό κατά ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης. Η επώαση αυτή ακολουθείται από το στάδιο χρήσης υποστρώματος κατάλληλου για την ενζυμική αντίδραση του υπο χρήση προσκολλημένου ενζύμου και την τελική φάση φωτομετρικής προσμέτρησης του χρωμοφόρου που παράγεται από την αντίδραση του ενζύμου με το υπόστρωμα [29].



Υπόστρωμα

Ένζυμο

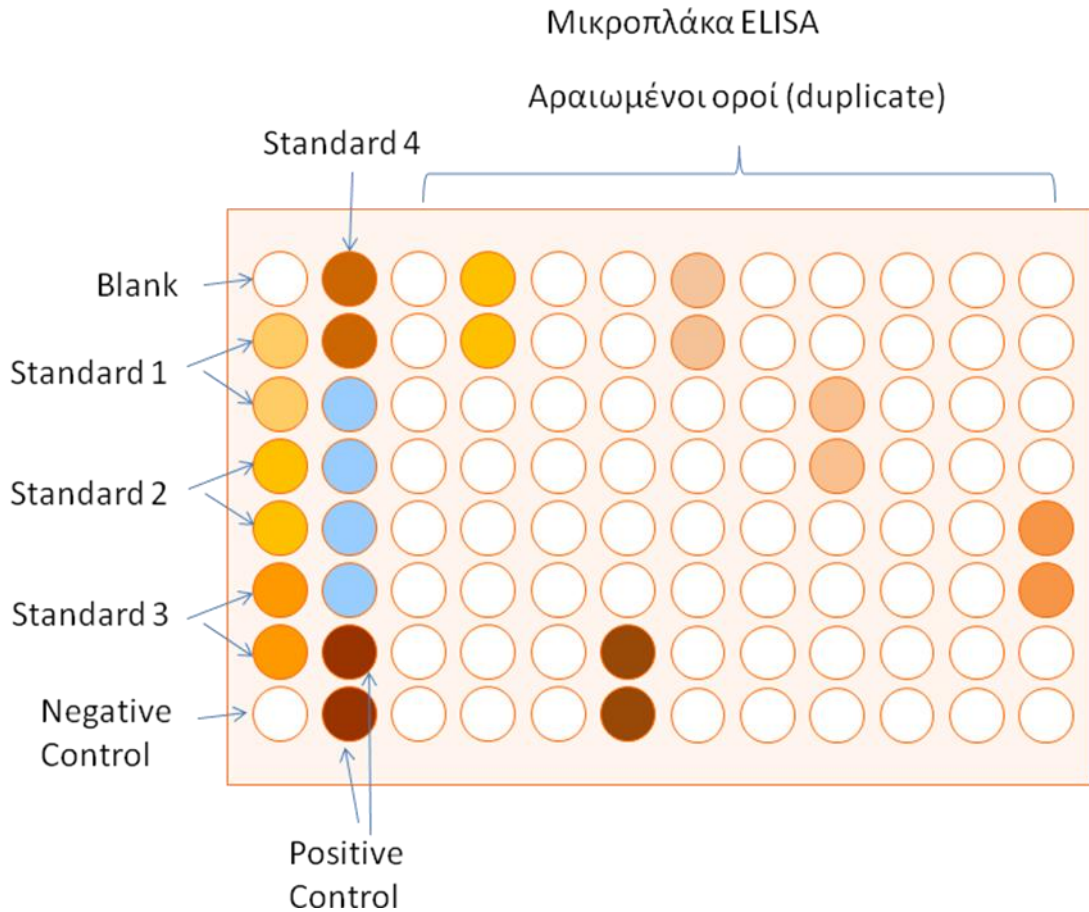
Conjugate

Ορός Ασθενούς

Αυτοαντιγόνο

**Εικόνα 2.1** Βασικές αρχές της τεχνικής ELISA.





**Εικόνα 2.2.** Σχηματική αναπαράσταση μικροπλάκας ELISA. Για κάθε πείραμα απαιτείται η χρήση αρνητικών και θετικών controls καθώς και standards για την αναγκαία ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων που είναι ποιοτικές ή ημιποσοτικές (ΕΑΦ, ανοσοαποτύπωση), η ELISA επιτρέπει την πλήρη ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των υπό εξέταση αυτοαντισωμάτων που περιέχονται στον ορό. Επίσης, η χρήση της είναι πολύ διαδεδομένη στα ανοσολογικά εργαστήρια προφανώς λόγω των συγκριτικών πλεονεκτημάτων της έναντι των άλλων τεχνικών και αποτελεί εξέταση ρουτίνας.

Εκτός από τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπο ανίχνευση αυτοαντισωμάτων, η ELISA επιτρέπει την εξακρίβωση της τάξης (IgG, IgA, IgM ή IgE) ή ακόμα και της υποτάξης (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) των αυτοαντισωμάτων [216]. Η μέθοδος αυτή είναι εύκολα τυποποιήσιμη. Για το λόγο αυτό, στις μέρες μας κυκλοφορούν εμπορικά διαθέσιμα ELISA kits που περιέχουν όλα όσα χρειάζονται για την ανίχνευση σωρείας αυτοαντισωμάτων και κυρίως εκείνων που είναι αγοραστικά επικερδή. Τα τελευταία χρόνια, έχουν κατασκευαστεί μηχανήματα και εξοπλισμός που επιτρέπουν την σχεδόν ολοκληρωτική αυτοματοποιημένη προσμέτρηση αυτοαντισωμάτων με ELISA αναλυτές [217]. Μεγάλα ανοσολογικά εργαστήρια που επεξεργάζονται χιλιάδες δείγματα την ημέρα/εβδομάδα χρησιμοποιούν τέτοιους αναλυτές μειώνοντας σημαντικά τον χρόνο και το κόστος ανά δείγμα. Ωστόσο, η πλήρης αυτοματοποίηση έχει δημιουργήσει και μεγάλα προβλήματα, μια και μεγάλα ανοσολογικά εργαστήρια χρησιμοποιούν τεχνικές ELISA ακόμη και για ανίχνευση αυτοαντισωμάτων που απαιτείται η χρήση ΕΑΦ αψηφώντας κατευθυντήριες οδηγίες διεθνών επιστημονικών εταιριών [69]. Τέλος, η ευασθησία και ειδικότητα της ELISA ποικίλει μεταξύ εταιριών δημιουργώντας σύγχυση στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και δημιουργώντας ερωτηματικά για την αποτελεσματικότητα των εμπορικά-διαθέσιμων ELISA κιτ, ειδικά για σπάνια αυτοαντισώματα που δεν έχουν επαρκώς τυποποιηθεί (standardization) ή δεν έχει γίνει αξιολόγηση της ποιότητάς τους (quality assessment) [212]. Ένας από τους σημαντικότερους λόγους που δικαιολογεί την ασυμφωνία μεταξύ κατασκευαστών είναι η καθαρότητα-ποιότητα του αντιγόνου που χρησιμοποιείται για την προσκόλληση του στα πηγαδάκια, καθώς επίσης και οι συχνές διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ ανασυνδυασμένων αντιγόνων που παράγονται σε

προκαρυωτικά (πχ *Escherichia coli*) σε σύγκριση με ευκαρυωτικά συστήματα (baculovirus), μια και τα προκαρυωτικά δεν είναι κατάλληλα για την ακριβή ανίχνευση αντισωμάτων έναντι conformational epitopes. Για τους παραπάνω λόγους, ερευνητικά εργαστήρια χρησιμοποιούν ακόμη πρότυπες μεθόδους ανίχνευσης (*in house*) υψηλής ευασθησίας και ειδικότητας που πλεονεκτούν σημαντικά έναντι των εμπορικών μια και στηρίζονται σε ανασυνδυασμένα αντιγόνα παρασκευασμένα σε ευκαρυωτικά συστήματα.

Το πιο μεγάλο μειονέκτημα που έχουν οι ELISA είναι ότι παρέχουν περιορισμένες πληροφορίες μια και στηρίζονται στην ανίχνευση μόνο των αντισώματων έναντι του υποεξέταση αντιγόνου (ένα αντιγόνο-ένα αντιγονοειδικό αντίσωμα). Για τον προσδιορισμό αυτοαντισωμάτων έναντι διαφόρων αντιγόνων απαιτούνται πολλαπλοί προσδιορισμοί που έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη των λεγόμενων προφίλ αυτοαντισωμάτων. Για παράδειγμα υπάρχει το ELISA ANA profile 5 και ANA profile 8 που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση αντιπυρηνικών αντισωμάτων έναντι 5 και 8 πυρηνικών στόχων αντίστοιχα. Καθένα από αυτά τοποθετούνται σε διαφορετικά πηγαδάκια σε 96well μικροπλάκες. Ανάλογοι συνδυασμοί χρησιμοποιούνται και για άλλα αυτοαντισώματα. Δυστυχώς όσο περισσότεροι προσδιορισμοί απαιτούνται για την συστηματική ανίχνευση της πολυαντιγονοειδικής χυμικής ανταπόκρισης σε ρευματολογικά και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα τόσο πιο δυσχερής γίνεται και η δυνατότητα της ELISA να ανταποκριθεί στην ορθή προσμέτρησή τους.

Η ELISA βασισμένη σε πειράματα αναστολής (inhibition ELISA) αποτελεί παραλλαγή της συμβατικής και χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν για την ανίχνευση

αυτοαντισωμάτων όπως εκείνων έναντι του SLA (κυρίως την εποχή που δεν ήταν γνωστός σε μοριακό επίπεδο ο αντιγονικός στόχος των αντισωμάτων έναντι του SLA)[137]. Η μέθοδος στηρίζεται στην σχετική έκφραση του υπο εξέταση ορού σε σχέση με τη γνωστή αντιδραστικότητα σε ορό με προκαθορισμένη αντιδραστικότητα.

### **2.3 Ανοσοαποτύπωση Western (Western blotting)**

Η ανοσοαποτύπωση αποτελεί κοπιώδη και πολύπλοκη μέθοδο ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων που ολοένα και λιγότερο χρησιμοποιείται στην καθημέρα πράξη. Παρόλα ταύτα, τα πλεονεκτήματά της είναι σημαντικά με πρώτο και καλύτερο αυτό της μεγάλης ευαισθησίας σε πολλές περιπτώσεις αυτοαντισωμάτων, όπως για παράδειγμα εκείνης των AMA [54]. Χρησιμοποιείται κυρίως όταν απαιτείται χρήση κυτταρικού εκχυλίσματος (όπως για παράδειγμα του μιτοχονδριακού κλάσματος από καρδιά βοειδούς) που περιέχει σημαντικό αριθμό διαφορετικών πρωτεϊνών-αντιγόνων τα οποία αναγνωρίζονται από AMA θετικούς ασθενείς με ΠΧΚ. Με την ανοσοαποτύπωση επιτρέπεται στις πρωτεΐνες του εκχυλίσματος να διαχωριστούν με βάση το μοριακό τους βάρος και την ηλεκτροφορητική τους ικανότητα [218]. Στην πρώτη κάθετη ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται πηκτή πολυακρυλαμίδιου (**PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, PAGE**) και δωδεκυλοθειικό νάτριο (**Sodium Dodecyl Sulfate, SDS**), μια τεχνική που είναι γνωστή ως SDS-PAGE. Μια δεύτερη οριζόντια ηλεκτροφόρηση (γνωστή ως Western blot) απαιτείται ώστε οι πρωτεΐνες να μεταφερθούν από την πηκτή στη μεμβράνη (συνήθως μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, nitrocellulose). Στη συνέχεια η μεμβράνη κόβεται σε ταινίες και

κάθε μικρή ταινία χρησιμοποιείται για την επώαση με τον υπό εξέταση ορό και διαδοχικές επώσεις με ένζυμο συνδεδεμένο με αντιορό κατά ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης (συνήθως IgG ή αντί-total IgG, A, M) και περαιτέρω επώαση με υπόστρωμα για το ένζυμο. Η μέθοδος είναι ημιποσοτική και επιτρέπει την ανάδειξη ορατών ζωνών (μπάντες) που αντιστοιχούν στις συζεύξεις των αντισωμάτων με τα αντίστοιχα αυτοαντιγόνα. Για την όσο το δυνατόν ακριβέστερη αναγνώριση των ζωνών και ειδικά στην περίπτωση των εκχυλισμάτων που μπορεί να περιέχουν πολυάριθμα αντιγόνα, χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες προσδιορισμού πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους ή οροί που περιέχουν αντισώματα γνωστής αντιγονοειδικότητας ως θετικοί μάρτυρες (positive controls). Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την προσμέτρηση αυτοαντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση περιγράφεται με λεπτομέρεια σε προηγούμενες μελέτες [54].

Η υψηλή ευαισθησία της ανοσοαποτύπωσης αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα της μεθόδου. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται στη ρουτίνα εργαστηρίων που ελέγχουν αντισώματα που σχετίζονται με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος. Ωστόσο, ένα από τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα της μεθόδου (εκτός από το γεγονός ότι είναι εργώδης και πολύπλοκη) είναι το θέμα της περιορισμένης (χαμηλής) ειδικότητας (πάντα σε σχέση με το υπό εξέταση αυτοαντίσωμα). Επιπλέον μειονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν το γεγονός ότι σε πολλές περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται κεκαθερμένα εκχυλίσματα (π.χ ηπατοκυττάρων για ασθενείς με πιθανό αυτοάνοσο νόσημα του ήπατος) μπορεί να παρατηρούνται αντιδραστικότητες σε άγνωστες ζώνες (δηλ. σε άγνωστες πρωτεΐνες-αντιγόνα) που δυσκολεύουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η χρήση αποδιατακτικών

συνθηκών (denaturing conditions) αλλάζει τη στερεοτακτική διαμόρφωση των πρωτεϊνών και περιορίζει την ικανότητα της ανοσοαποτύπωσης στην αναγνώριση αντιδραστικότητας έναντι conformational epitopes. Με βάση τα παραπάνω η χρήση της ανοσοαποτύπωσης ως μεθόδου ρουτίνας για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων έχει περιοριστεί δραματικά και χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά σε εργαστήρια αναφοράς.

Όπως και στην περίπτωση της ELISA, η μέθοδος western blot επιτρέπει την εξακρίβωση της τάξης (IgG, IgA, IgM ή IgE) ή ακόμα και της υποτάξης (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) των αυτοαντισωμάτων. Η μέθοδος αυτή δύσκολα ταυτοποιείται. Παρόλα αυτά (ειδικά σε περιπτώσεις που δεν έχουν αναπτυχθεί ELISA) στις μέρες μας κυκλοφορούν εμπορικά διαθέσιμα kits που περιέχουν ταινίες στις οποίες τα αντιγόνα έχουν διαχωριστεί και μεταφερθεί στη μεμβράνη (προσχεδιασμένες-premade) και είναι έτοιμα προς χρήση. Οι ταινίες αυτές μπορούν να διατηρηθούν στους 4 °C για μεγάλο χρονικό διάστημα (6-24 μήνες).

Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την ανίχνευση οργανοειδικών αυτοαντισωμάτων σε ηπατικά νοσήματα που βασίζονται σε ιστικά εκχυλίσματα από ήπαρ ποντικού ή αρουραίου ή (σε σπάνιες περιπτώσεις ήπαρ πιθήκου) (δες γενικό μέρος). Για το λόγο αυτό υπάρχει μεγάλη εμπειρία σχετική με την ευαισθησία και την ειδικότητά της.

## **2.4 Γραμμικός Ανοσοπροσδιορισμός (Line Immunoassay) ή Ανοσοπροσδιορισμός κουκκίδας (Dot immunoassay)**

Η συγκεκριμένη μέθοδος συγγέεται πολλές φορές με την ανοσοαποτύπωση. Ωστόσο, πρόκειται για μια μέθοδο κατά την οποία το (τα) αντιγόνο(α) δεν έχουν διαχωριστεί/μεταφερθεί με ηλεκτροφόρηση, αλλά έχουν τοποθετηθεί (σε γραμμική μορφή ή μορφή κουκκίδας) απευθείας σε μεμβράνη με ελεγχόμενη συγκέντρωση αντιγόνου [219]. Ο αριθμός των αντιγόνων που μπορούν να τοποθετηθούν στην μεμβράνη ποικίλλει. Η μέθοδος χρησιμοποιείται ως μέθοδος ανίχνευσης προφίλ αυτοαντισωμάτων (πχ προφίλ ANA με την τοποθέτηση 5, 8 ή 12 πυρηνικών αυτοαντιγόνων) ή προφίλ ασθενειών (πχ προφίλ σκληροδέρματος με την τοποθέτηση 5, 10, 13 αυτοαντιγόνων που ανιχνεύονται από ορούς ασθενών με συστηματική σκλήρυνση). Το πιο σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι για την ολοκλήρωσή της δεν απαιτείται ειδικός εξοπλισμός. Τα αποτελέσματά της εκφράζονται ποιοτικά ή ημιποσοτικά, και αυτό αποτελεί επίσης ένα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου σε σχέση πχ με την ELISA. Η μέθοδος αυτή λόγω της ευκολίας πραγματοποίησής της χρησιμοποιείται κυρίως σε μικρά εργαστήρια.

## **2.5 Ραδιοανοσοπροσφορητική μέθοδος (Radioimmunosorbent assay, RIA)**

Εμφανίζει πολλές ομοιότητες με την ELISA. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η υψηλή ευασθησία (υψηλότερη συγκριτικά από όλες τις άλλες) ενώ το κύριο μειονέκτημά της είναι η ανάγκη χρήσης ραδιοϊσοτόπων (για το λόγο αυτό έχει σχεδόν εγκαταλειφθεί από την πλειονότητα των εργαστηρίων με ελάχιστες

εξαιρέσεις). Στο παρελθόν τέτοιου είδους μέθοδοι είχαν χρησιμοποιηθεί κυρίως για τον προσδιορισμό αντί-SLA και αντί-LKM-1 (αντί-CYP2D6) αντισωμάτων σε ασθενείς με κλινική υποψία ΑΗ [160, 220-221].

Άλλη μέθοδος ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων είναι η μέθοδος της διπλής ανοσοδιάχυσης κατά Ouchterlony και ανήκει στις ειδικές μεθόδους ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για αυτοαντισώματα που παρουσιάζουν ιδιότητες ιζηματινής. Ανάλογη είναι και η μέθοδος της αντίθετης ανοσοαποτύπωσης. Στην πρώτη περίπτωση σχηματίζονται κυκλικά φρεάτια μέσα σε πηκτή αгарόζης μέσα στις οποίες τοποθετούνται οι υπό εξέταση οροί. Στο κέντρο της πηκτής τοποθετείται σε φρεάτιο η αντιγονική πηγή. Η διάχυση των μορίων μέσα στην αгарόζη οδηγεί στην αναγνώριση των αντιγόνων από τα αυτοαντισώματα και τη δημιουργία ιζηματικών γραμμών ειδικά στην περιοχή άριστης συγκέντρωσης αντιγόνου-αντισώματος. Στη δεύτερη μέθοδο, η βασική αρχή παραμένει η ίδια αλλά το ηλεκτρικό ρεύμα που χρησιμοποιείται επιταχύνει το σχηματισμό αντισώματος-αντιγόνου, ενισχύοντας το σύστημα.

Οι παραπάνω μέθοδοι δεν χρησιμοποιούνται στις μέρες μας για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων που σχετίζονται με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος και δεν θα αναπτυχθούν περαιτέρω.

## **2.6 Ανάπτυξη πολυμετρικών μεθόδων ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων**

Στα περισσότερα αυτοάνοσα ρευματολογικά νοσήματα απαιτείται η ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών αυτοαντισωμάτων. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί προφίλ



αυτοαντισωμάτων ELISA. Αυτά τα προφίλ αποτελούνται από λωρίδες φρεατίων μικροπλακών που έχουν επικαλυφθεί με 1 από τα 3, 5, 8 ή περισσότερα αντιγόνα που εμπεριέχονται στη μικροπλάκα πολυστερενίου (ανάλογα με τον κατασκευαστή). Ο χρήστης μπορεί να ελέγξει την αντιδραστικότητα ενός ή περισσότερων ορών χρησιμοποιώντας τα ανάλογα standards, αρνητικό και θετικό control για κάθε αντιγόνο (λωρίδα) χωριστά. Το τελικό αποτέλεσμα δίνει την δυνατότητα στον χρήστη να προσδιορίσει πολλά αυτοαντισώματα (πχ 5) χρησιμοποιώντας την ίδια μικροπλάκα αντί να εκτελέσει 5 διαφορετικές ELISA. Τέτοιες ELISA έχουν αναπτυχθεί σχετικά πρόσφατα για τον προσδιορισμό αυτοαντισωμάτων σχετιζόμενων με την ΠΧΚ, οι οποίες δίνουν τη δυνατότητα στο χρήστη να προσδιορίσει αυτοαντισώματα έναντι AMA αντιγόνων (αντί-M2), αντί-sp100 και αντί-gr210. Παρόμοια προφίλ έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας μείγμα των υπό εξέταση αντιγόνων [90]. Στις συγκεκριμένες ELISA καθένα από τα φρεάτια της μικροπλάκας έχει επικαλυφθεί με μείγμα μιτοχονδριακού αυτοαντιγόνου M2 (ή στην ανασυνδυασμένη MIT3 μορφή του) και πυρηνικών αντιγόνων sp100 και gr210 σε προκαθορισμένες συγκεντρώσεις. Δείγματα ορών με IgA/IgG αντιδραστικότητα έναντι του μείγματος των αυτοαντιγόνων στη συνέχεια επανεξετάζονται (reflex testing) για επιμέρους αντιδραστικότητες για να προσδιοριστεί με πιο από τα τρία αυτοαντιγόνα (ή το συνδυασμό τους) αντιδρούν οι οροί.

Ανάλογα προφίλ έχουν σχεδιαστεί και για τον προσδιορισμό αυτοαντισωμάτων με τη μέθοδο του γραμμικού ανοσοπροσδιορισμού για τον προσδιορισμό πολλαπλών

αυτοαντιγόνων που σχετίζονται με αυτοάνοσα ρευματικά ή ηπατικά νοσήματα (όπως θα συζητηθεί εκτενέστερα παρακάτω).

Πιο εξελιγμένα συστήματα πολυμετρικής ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια [222]. Κάποια από αυτά στηρίζονται στο σύστημα xMAP της Luminex που επιτρέπει τη δυνατότητα προσμέτρησης δυνητικά μέχρι εκατό (100) διαφορετικών αυτοαντισωμάτων σε μόλις ένα φρεάτιο μικροπλάκας τιτλοποίησης [223]. Το σύστημα χρησιμοποιεί ειδικά μικροσφαιρίδια (xMAP) πολυστυρενίου που έχουν ενσωματωμένες σε διαφορετικές αναλογίες δύο φθορίζουσες ουσίες. Ο συνδυασμός αυτός δίνει τη δυνατότητα σε κάθε σετ μικροσφαιριδίων να εκπέμπει το δικό του μοναδικό φθορίζον σήμα. Η επιφάνεια του μικροσφαιριδίου μπορεί να συνδεθεί με αυτοαντιγόνα (πεπτίδια, αντίσωματα, ολιγονουκλεοτίδια κ.α.) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν εν προκειμένω για την ανίχνευση των επιθυμητών παραμέτρων, δηλαδή των αυτοαντισωμάτων έναντι πολλαπλών αντιγόνων μια και κάθενα από τα bead με κατάλληλη φθορίζουσα χρωστική εκπέμπει φθορισμό σε συγκεκριμένο μήκος κύματος.

## 2.7 Κλινικοεργαστηριακή ερμηνεία αποτελεσμάτων ελέγχου αυτοαντισωμάτων

Τα συχνότερα ανιχνεύσιμα αυτοαντισώματα στην αυτοανοσία είναι τα ANA. ANA ανιχνεύονται και σε ασθενείς με AH-1 (με ή χωρίς SMA). Όπως αναφέρεται στο γενικό μέρος, ANA ανιχνεύονται και σε ασθενείς με ΠΧΚ και διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα νοσοειδικά ANA κατά των MND ή RLM-like που ανιχνεύονται σχεδόν αποκλειστικά σε ασθενείς με ΠΧΚ και στα ANA ποικίλης αντιγονοειδικότητας και τύπου ανοσοφθορισμού που μπορούν να παρατηρηθούν σε διάφορα νοσήματα [48].

Οι τύποι φθορισμού των ANA και των αντιγονικών τους στόχο καθώς και η κλινική τους συσχέτιση αναφέρεται στον Πίνακα 2.2. Ανάμεσά τους διακρίνεται:

- α) ο **ομοιόμορφος ή ομοιογενής** τύπος φθορισμού του χαρακτηρίζεται από ομοιόμορφο φθορισμό του πυρηνοπλάσματος με σταθερή χρώση του πυρήνα, χωρίς χρώση του πυρηνίσκου,
- β) ο **περιφερικός** τύπος που χαρακτηρίζεται από σταθερή χρώση κυρίως της περιφέρειας του πυρήνα και σαφώς ασθενέστερο φθορισμό του κέντρου.
- γ) ο **στικτός** τύπος των κοκκίων του πυρήνα που χαρακτηρίζεται από ανομοιογενή κοκκιώδη φθορισμό χωρίς χρώση των μιτωτικών κυττάρων.
- δ) ο τύπος φθορισμού του **πυρηνίσκου** που χαρακτηρίζεται από φθορισμό μεγάλων κοκκίων του πυρήνα (λιγότερα από 6 ανά κύτταρο)
- ε) ο **κεντρομεριδιακός** τύπος που χαρακτηρίζεται από στικτού τύπου φθορισμό αυτοαντισωμάτων έναντι των κεντρομεριδίων.

**Πίνακας 2.2.** Κύριοι τύποι ανοσοφθορισμού των ANA και κλινική συσχέτισή τους.

Τύποι φθορισμού	Αυτοαντιγόνα	Αυτοάνοσα Νοσήματα Ήπατος	Άλλα Αυτοάνοσα Νοσήματα
<b>Ομοιογενής</b>	dsDNA, ssDNA, histones	Κυρίως σε ασθενείς με ΑΗ-1, ειδικότερα σε υψηλούς τίτλους; και σε ασθενείς με ΠΧΚ (χωρίς συνυπάρχουσα ΑΗ)	Υψηλοί τίτλοι κυρίως σε ΣΕΛ, χαμηλότεροι σε άλλα αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα
<b>Περιφερικός</b>	dsDNA, ssDNA, DNP, histones	Κυρίως σε ασθενείς με ΑΗ-1, ειδικότερα σε υψηλούς τίτλους	Υψηλοί τίτλοι κυρίως σε ΣΕΛ, χαμηλότεροι σε άλλα αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα
<b>Λεπτός στικτός</b>	Sm, RNP, Scl-70, SS-A, SS-B, κ.α	Αντί-SS-A (Ro-52) σε ασθενείς με ΑΗ[1 και ΠΧΚ (με ή χωρίς συνυπάρχον σύνδρομο Sjögren)	Αντί-Sm (ΣΕΛ), αντί-Scl-70 (συστηματική σκλήρυνση), αντι-SS-A, SS-B (κυρίως σύνδρομο Sjögren)
<b>Πυρηνίσκου</b>	4-6S RNA	Λιγότερο συχνό σε ΑΗ -1	Συστηματική σκλήρυνση, σύνδρομο Sjögren
<b>Κεντρομεριδιακός</b>	κεντρομερίδια	ΠΧΚ (με ή χωρίς συνυπάρχον σκληρόδερμα)	Κυρίως συστηματική σκλήρυνση

ΑΗ, αυτοάνοση ηπατίτιδα, ΠΧΚ, πρωτοπαθής χολική κίρρωση, ΣΕΛ, συστηματικός ερυθματώδης λύκος, dsDNA, double stranded DNA, ssDNA, single stranded DNA, RNP, ribonucleoprotein, SS-A, Sjögren's syndrome antigen A

Στην περίπτωση του ΕΑΦ, ένα δείγμα θεωρείται αρνητικό όταν ο φθορισμός του κυτταρικού στοιχείου/περιοχής/οργανυλλίου είναι ανάλογος ή λιγότερο φωτεινός από τον αρνητικό μάρτυρα. Τα δείγματα μπορεί να παρουσιάζουν σε διαφορετικό βαθμό φθορισμό φόντου που να μην θεωρείται θετικός και να αποδίδεται σε ετερόφιλα αντισώματα ή άλλες μη ειδικές αντιδραστικότητες. Επίσης, ο βαθμός ή η ένταση του φθορισμού σε συγκεκριμένη αραίωση ορού συνήθως ακολουθεί σχετικά ημιποσοτικά κριτήρια, τα πιο συνηθισμένα από τα οποία ακολουθούν την πεπατημένη της αναγνώρισης α) πολύ έντονου φθορισμού (βαθμολογία: 4+), β) έντονου φθορισμού (3+), γ) ευδιάκριτου φθορισμού (2+), δ) χαμηλού ειδικού φθορισμού που επιτρέπει την ευδιάκριτη διαφοροποίηση της χρώσης και τέλος ε) χαμηλού δυσδιάκριτου φθορισμού (+/-) ο οποίος επιτρέπει οριακά την διαφοροποίηση της χρώσης αλλά δυσχεραίνει την διάκρισή της σε ειδική ή μη ειδική σε σχέση με τον φθορισμό του φόντου. Όπως διαφαίνεται από τον Πίνακα 2.2 δεν υπάρχει πάντα συσχέτιση του τύπου του φθορισμού με την αναγνώριση αυτοαντιγόνων. Επίσης, σε μια ασθένεια μπορεί να παρατηρηθούν πολλαπλά πρότυπα ανοσοφθορισμού.

Έχει τονιστεί επανειλημένως ότι τα εργαστηριακά (ανοσολογικά ευρήματα), συμπεριλαμβανομένων και των δοκιμασιών για αυτοαντισώματα δεν έχουν διαγνωστική και κλινική αξία εάν δεν συσχετιστούν με την κλινική εικόνα του ασθενούς. Στην μεγαλύτερη τους πλειοψηφία, τα αποτελέσματα των τεστ χρησιμοποιούνται για να επιβεβαιώσουν την πιθανολογούμενη διάγνωση ή για να βοηθήσουν στον αποκλεισμό νοσημάτων που σχετίζονται με την ύπαρξή τους. Στην περίπτωση των αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος, η ανίχνευση των σχετιζόμενων

αυτοαντισωμάτων (ειδικά όταν διαπιστωθούν σε υψηλούς τίτλους/συγκεντρώσεις) βοηθούν στην διάγνωση ενός αυτοάνοσου νοσήματος του ήπατος από μια άλλη μη αυτοάνοση ηπατοπάθεια, υποβοηθούν στην ταξινόμηση της υποομάδας των νοσημάτων ή στην αναγνώριση του τύπου του αυτοάνοσου νοσήματος (πχ ΑΗ σε σχέση με ΠΧΚ ή ΑΗ-1 σε σχέση με την ΑΗ-2). Επίσης μπορούν να βοηθήσουν στην αναγνώριση κλινικά σημαντικών συνδρόμων που εμφανίζουν αλληλοεπικαλυπτόμενες αυτοάνοσες διαταραχές χολοστατικού και ηπατιτιδικού τύπου (πχ ταυτόχρονη ΑΗ και ΠΧΚ) τα οποία απαιτούν έγκαιρη διάγνωση και χρειάζονται ιδιαίτερη θεραπευτική μεταχείριση και παρακολούθηση.

Η βασική αρχή (που ωστόσο στη γενική της μορφή εμφανίζει πολλές εξαιρέσεις για τα αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα αλλά όχι για τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος) είναι ότι ο τύπος των αυτοαντισωμάτων καθώς και η ύπαρξή τους ποικίλει μεταξύ νοσημάτων. Ιδεατά, κάθε νόσημα (ή ακριβέστερα κάθε νοσολογική οντότητα) έχει το χαρακτηριστικό (ίδιον) αντισωματικό προφίλ που το ξεχωρίζει από κάποιο άλλο. Οι περιπτώσεις που αυτό συμβαίνει στην πραγματικότητα είναι ελάχιστες. Για παράδειγμα, η αρχή ότι ANA ανιχνεύονται μόνο σε ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο είναι αναληθής. Στην πραγματικότητα αυτό που μόνο ισχύει είναι ότι οι περισσότεροι ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο έχουν ANA. Για παράδειγμα, ANA μπορούν να ανιχνευθούν σε πολλά αυτοάνοσα ρευματικά (και μη) νοσήματα, συμπεριλαμβανομένων και των αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος (ΑΗ-1 και ΠΧΚ). Επίσης, ANA μπορούν να ανιχνευθούν σε πολλές μη αυτοάνοσες παθήσεις. Ειδικά (και σχετικά με την παρούσα μελέτη), ANA μπορούν να ανιχνευθούν σε ιογενείς ηπατίτιδες Β και C, αλκοολική ηπατίτιδα, οξεία

ηπατική ανεπάρκεια κ.α. Συζητώντας επιμέρους στοιχεία των ανιχνεύσιμων αυτοαντισωμάτων (όπως το πρότυπο του ανοσοφθορισμού και τον τίτλο των αυτοαντισωμάτων), θα πρέπει να τονιστούν ανάλογες διαπιστώσεις. Για παράδειγμα, υψηλός τίτλος ANA με ομοιογενή φθορισμό είναι «χαρακτηριστικό» εύρημα σε ασθενείς με ερυθματώδη λύκο. Ωστόσο, ανάλογο εύρημα υψηλών τίτλων ANA με ομοιογενή φθορισμό χαρακτηρίζει και την πλειονότητα των ασθενών με AH-1 χωρίς συνύπαρξη αυτοάνοσου ρευματικού νοσήματος. ANA με ομοιογενή φθορισμό (συνήθως σε χαμηλούς τίτλους) ανευρίσκονται και σε ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες ή ασθενείς με ΠΧΚ (χωρίς απαραίτητα συνυπάρχουσα AH-1). Τα παραπάνω ευρήματα αναδεικνύουν την περιορισμένη θετική προγνωστική αξία των ANA σε μη επιλεγμένα δείγματα ατόμων. Τέτοιου είδους παρατηρήσεις οδήγησαν κλινικούς ιατρούς-ηπατολόγους αναγνωρισμένης αξίας στην λανθασμένη διαπίστωση ότι η ανίχνευση των ANA, SMA και αντι-LKM δεν είναι απαραίτητη για τη διαγνωστική προσέγγιση ασθενών με ανεξήγητη ηπατοπάθεια. Ωστόσο, κανένας δεν μπορεί να αμφισβητήσει τη διαγνωστική αξία υψηλού τίτλου ANA με ομοιογενή φθορισμό σε ηπατοπαθή με κλινική υποψία αυτοάνοσου νοσήματος του ήπατος και ειδικά AH-1. Με μοναδική εξαίρεση τη χρόνια ηπατίτιδα C, αντι-LKM-1 αντισώματα (ακόμη και σε χαμηλούς τίτλους πχ 1:20) ανιχνεύονται αποκλειστικά σε ασθενείς (κυρίως παιδιά) με AH-2, η οποία χρειάζεται έγκαιρη διάγνωση και έχει κακή πρόγνωση όταν δεν χορηγηθεί άμεση θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά δια βίου.

Ο τίτλος του αυτοαντισώματος είναι ενδεικτικός της συνολικής συγκέντρωσης του αυτοαντισώματος. Μεγάλη συζήτηση γίνεται για το cut off τίτλο αυτοαντισωμάτων πάνω από τον οποίο ένα δείγμα θεωρείται θετικό. Για τα ANA

όταν χρησιμοποιείται ΕΑΦ σε υπόστρωμα ΗΕρ-2, τίτλοι >1:80 θεωρούνται διαγνωστικής αξίας. Ωστόσο, στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται τομές ιστών τρωκτικών, τίτλοι ANA  $\geq$ 1:40 θεωρούνται θετικοί και αξιολογούνται ανάλογα. Ωστόσο θα πρέπει να τονιστεί ότι σε νοσήματα υπό ύφεση (επαγόμενη συνήθως από την ανοσοκατασταλτική αγωγή όπως για παράδειγμα στις περιπτώσεις των ΑΗ-1 ή ΑΗ-2), τα αυτοαντισώματα μπορεί να ανιχνεύονται σε μικρούς (1:10, 1:20, 1:40) τίτλους ή ακόμη και να μην ανιχνεύονται και καθόλου. Πολλοί ερευνητές συσχετίζουν την ελάτωση του τίτλου των αντισωμάτων με την ανταπόκριση στη θεραπεία ειδικά σε παιδιά με ΑΗ. Ανάλογα, η παρουσία αυξημένου τίτλου αυτοαντισωμάτων κατά την παρακολούθηση ασθενών με ΑΗ που ήταν σε ύφεση μπορεί δυνητικά να υποδηλώνει την παρουσία ενεργότητας/έξαρσης της νόσου.

Ανησυχητικό παραμένει το ολοένα και αυξανόμενο γεγονός, ότι πολλοί ιατροί τείνουν να βασίζονται στα αποτελέσματα των αυτοαντισωμάτων για να κάνουν διάγνωση παρά στην αναγκαιότητα να χρησιμοποιούν τα αποτελέσματα των αυτοαντισωμάτων ως επιπλέον εργαλείο που μπορεί να τους βοηθήσει για να επιβεβαιώσουν ή να αποκλείσουν την κλινική τους υποψία. Πριν παραγγείλει ένα τεστ, ο ιατρός πρέπει να γνωρίζει επαρκώς την απόλυτη ή σχετική ένδειξη του επιμέρους αυτοαντισώματος. Για παράδειγμα, στην περίπτωση που υπάρχει κλινική υποψία ΑΗ, αποτελεί απόλυτη ένδειξη η δοκιμασία ανίχνευσης ANA, SMA (κυρίως αλλά όχι αποκλειστικά F-actin αντιγονοειδικότητας), αντί-LKM (όχι μόνο τύπου αντί-LKM-1) και αντι-LC1. Ανεξάρτητα από τα αποτελέσματα της αντιδραστικότητας στα παραπάνω αυτοαντισώματα, όλοι οι οροί πρέπει να ελέγχονται και για αντί-SLA αντισώματα, καθώς αυτά τα αυτοαντισώματα δεν ανιχνεύονται με ΕΑΦ και η



ύπαρξή τους μπορεί να είναι το μοναδικό εύρημα σε ασθενείς με ΑΗ, που είναι οροαρνητικοί για όλα τα άλλα (παλαιότερα τέτοιου είδους ασθενείς χαρακτηρίζονταν ως ΑΗ τύπου 3).

Με βάση τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι εάν χρειαστεί να διερευνηθεί ανοσολογικά ένα άτομο με κλινική υποψία αυτοάνοσου νοσήματος πρέπει να ελεγχθούν μια σειρά από διάφορα αυτοαντισώματα, καθένα από τα οποία έχει τη δική του διαγνωστική και προγνωστική αξία.

## 2.8 Σκοπός της Διατριβής

- **Γενικός Σκοπός**

Να αναπτυχθεί μια πολυμετρική μέθοδος για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων που σχετίζονται με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος και εξηπατικές αυτοάνοσες διαταραχές

- **Ειδικοί σκοποί**

Να αναπτυχθούν μια ή περισσότερες πολυμετρικές μέθοδοι που θα είναι απλές στη χρήση, ευαίσθητες και ειδικές και θα επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση αυτοαντισωμάτων που σχετίζονται με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος.

Οι συγκεκριμένες μέθοδοι μπορεί να είναι πολυμετρικές ELISA, γραμμικοί ανοσοπροσδιορισμοί ή να στηρίζονται στην τεχνολογία xMAP της Luminex και θα πρέπει να μπορούν να έχουν την δυνατότητα να αντικαταστήσουν τις πολυμετρικές μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα και να εξυπηρετούν τους ίδιους σκοπούς επαρκέστερα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Ασθενείς

Συνολικά μελετήθηκαν 85 ασθενείς με ΠΧΚ, 32 ασθενείς με ΑΗ και 45 ασθενείς με ΠΣΧ. Διενεργήθηκε αιμοληψία κατά την πρώτη επίσκεψη στο Εξωτερικό Ηπατολογικό Ιατρείο του King's College Hospital του Λονδίνου. Παράλληλα αιμοληψία έγινε από 68 άτομα (52 γυναίκες, μέση ηλικία 52.8 ( $\pm$ 12.5) έτη), που χρησιμοποιήθηκαν σαν υγιείς μάρτυρες. Όλοι οι ασθενείς έδωσαν γραπτή συγκατάθεση να συμμετέχουν στη μελέτη.

Αναλυτικά μελετήθηκαν 85 ασθενείς με ΠΧΚ, τα δημογραφικά και εργαστηριακά των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Η διάγνωση της ΠΧΚ τέθηκε για κάθε έναν από αυτούς εφ' όσον πληρούσαν τουλάχιστον 2 από τα 3 κριτήρια: αυξημένα χολοστατικά ένζυμα για τουλάχιστον 6 μήνες, θετικά AMA (σε αραιώση  $\geq$ 1:40) με τη μέθοδο του ΕΑΦ σε υπόστρωμα ήπατος-νεφρού-στομάχου αρουραίου και ιστολογική εικόνα συμβατή με ΠΧΚ.

Μελετήθηκαν 32 ασθενείς με ΑΗ (10 ασθενείς με ΑΗ-1 και 22 ασθενείς με ΑΗ-2). Η διάγνωση της νόσου βασίστηκε σε κλινικά, εργαστηριακά και ιστολογικά δεδομένα, σύμφωνα με τα αναθεωρημένα κριτήρια του IAHG [114]. Τα δημογραφικά, εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης συνοψίζονται στον Πίνακα 3.2 .

Τέλος, μελετήθηκαν και 45 ασθενείς με ΠΣΧ. Τα δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3

**Πίνακας 3.1 Δημογραφικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά 85 ασθενών με ΠΧΚ**

		Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση	Ενδιάμεση τιμή (εύρος)
Ηλικία		55.7 ± 11.4	54.3 (25-76)
Φύλο (Α/Γ)	15/70		
Ηλικία διάγνωσης νόσου		53.2 ± 12	54 (23-72)
Αλβουμίνη (gr/dl, φ.τ.=3.5-5.5)		3.9 ± 0.6	3.8 (2.5-4.4)
Χρόνος προθρομβίνης (INR)		14.2 ± 2.5 (1.3± 0.5)	14.5 (11.1-28) [1.1 (0.8-3.2)]
Ολική χολερυθρίνη (mg/dl, φ.τ.<1.1)		0.8 ± 0.5	0.9 (0.8-4.5)
γ GT (IU/L, φ.τ. <55)		72.4 ± 58.3	56 (32-458)
ALP (IU/L, <120)		134.3± 92.4	154 (76-820)
ALT (IU/L, <45)		36.4± 32.1	29.2 (14-148)
AST (IU/L, <35)		42.3 ± 38.4	36 (14-152)
Χοληστερόλη (mg/dl, φ.τ.<200)		226.2 ± 76.2	225.2 (102-380)
IgG (mg/dl, φ.τ.=847-1690)		1648.5± 438.2	1560 (1234-2540)
IgM (mg/dl, φ.τ.=64-249)		264.8 ± 212.2	246 (124- 486)
Ιστολογικό στάδιο (I/II/III/IV)			

**Πίνακας 3.2 Δημογραφικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά 32 ασθενών με ΑΗ**

		Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση	Ενδιάμεση τιμή (εύρος)
Ηλικία		25.4 ± 14.2	15 (6-52)
Φύλο (Α/Γ)	5/27		
Αλβουμίνη (gr/dl, φ.τ.=3.5-5.5)		3.9 ± 0.9	3.8 (2.9-5.2 )
Χρόνος προθρομβίνης (INR)		14.6 ± 2.7 (1.2± 0.7)	14.6 (12.4-22.5) [1.1 (0.8-2.8)]
Ολική χολερυθρίνη (mg/dl, (φ.τ.<1.1)		1.4 ± 0.9	1.2 (0.9-24)
γ GT (IU/L, φ.τ. <55)		52.4 ± 25.7	56 (32-258)
ALP (IU/L, <120)		134.3± 92.4	154 (76-420)
ALT (IU/L, <45)		36.4± 32.1	29.2 (14-148)
AST (IU/L, <35)		42.3 ± 38.4	36 (14-152)
IgG (mg/dl, φ.τ.=847-1690)		1750± 549	1720 (1450-5240)
IgM (mg/dl, φ.τ.=64-249)		156 ± 98	198 (122- 342)

**Πίνακας 3.3 Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά 45 ασθενών με ΠΣΧ**

		Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση	Ενδιάμεση τιμή (εύρος)
Ηλικία		45.7 ± 9.2	43.3 (29-65)
Φύλο (Α/Γ)	35/10		
Αλβουμίνη (gr/dl, φ.τ.=3.5-5.5)		3.2 ± 0.8	3.5 (2.8-4.1)
Χρόνος προθρομβίνης (INR)		14.1 ± 2.2 (1.2± 0.6)	14.5 (12.3-25) [1.2 (0.8-2.8)]
Ολική χολερυθρίνη (mg/dl, (φ.τ.<1.1)		1.4 ± 0.6	1.2 (0.8-4.8)
γ GT (IU/L, φ.τ. <55)		92.4 ± 68.3	86 (78-856)
ALP (IU/L, <120)		156.3± 90.4	160 (92-726)
ALT (IU/L, <45)		45.4± 31	34.5 (22-122)
AST (IU/L, <35)		52.3 ± 34.5	52 (22-166)
IgG (mg/dl, φ.τ.=847-1690)		1648.5± 438.2	1560 (1234-2540)
IgM (mg/dl, φ.τ.=64-249)		122.8 ± 46.2	134 (114- 268)

### 3.2 Διαδικασία Συντήρησης & Αποθήκευσης Δειγμάτων

Όλα τα υπό εξέταση δείγματα διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου όχι περισσότερο από 6-8 ώρες. Στις περιπτώσεις που η δοκιμασία ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων δεν πραγματοποιήθηκε άμεσα ή σε εκείνες τις περιπτώσεις που έπρεπε να επανεξεταστούν δείγματα την επόμενη ημέρα, τότε αυτά δείγματα διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία συντήρησης (~4°C) μέχρι το πολύ για 48 ώρες. Σε περίπτωση που απαιτήθηκε μεγαλύτερο διάστημα αποθήκευσης, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (στους -20°C). Πριν τη χρησιμοποίησή τους, τα κατεψυγμένα δείγματα αποψύχθηκαν πλήρως και αναμίχθηκαν καλά, όπως προβλέπεται από τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες του Clinical and Laboratory Standards Institute *document H18-A4- Procedures for the Handling & Processing of Blood Specimens for Common Laboratory tests* ([http://shop.clsi.org/site/Sample\\_pdf/H18-A4.pdf](http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/H18-A4.pdf)). Σε καμία περίπτωση δεν χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που είχαν αποψυχθεί και καταψυχθεί επανειλημμένα.

### 3.3 ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.3.1 Υλικά

##### 3.3.1.1 Χημικά

3,3'-Diaminobenzidine (DAB)	Sigma-Aldrich Ltd, Coylton, Ayrshire, UK
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Inova Diagnostics Inc, Werfen Group San Diego, California, USA
$\beta$ -mercaptoethanol (HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SH)	Sigma-Aldrich Ltd
<i>o</i> -phenylenediamine [C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ]	Sigma-Aldrich Ltd

Acetic acid (CH <sub>3</sub> COOH)	BDH Laboratories, Poole, UK
Acetonitrile (CH <sub>3</sub> CN)	Sigma-Aldrich Ltd
Acrylamide/bis Proto Flow gel 30%	Flowgen Bioscience, Wilford, Nottingham, UK
Ammonium persulfate [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ]	Sigma-Aldrich Ltd
BenchMark™ Protein Ladder	Invitrogen Life Technologies
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Ltd
Bromophenol Blue	<i>ibid</i>
Chloroform (CHCl <sub>3</sub> )	<i>ibid</i>
Dymethyl sulphoxide (DMSO)	<i>ibid</i>
Hydrogen peroxide solution	<i>ibid</i>
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	BDH Laboratories
Milk powder (fat free)	Nestlé, Vevey, Switzerland
Phosphate buffered saline (PBS) tablets	Sigma-Aldrich Ltd
Phosphate-citrate buffer with sodium perborate capsules	<i>ibid</i>
Ponceau S powder (C <sub>22</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>13</sub> S <sub>4</sub> Na <sub>4</sub> )	<i>ibid</i>
RPMI 1640 medium with and without glutamine	Invitrogen Life Technologies
Sodium azide (NaN <sub>3</sub> )	BDH Laboratories
Sodium carbonate (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Ltd
Sodium dodecyl sulphate (SDS) (C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub> Na)	Sigma-Aldrich Ltd
Sulfuric acid (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Ltd



Tetramethylethylenediamine (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	(TEMED)	National Diagnostics, Georgia, USA	Atlanta,
TRIZMA base (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )		Sigma-Aldrich Ltd	
Trypan blue (0.4%)		<i>ibid</i>	
Tween 20		<i>ibid</i>	

### 3.3.1.2 Αντισώματα-Αντιοροί

HRP-conjugated mouse αντί-histidine (His)		Sigma-Aldrich Ltd	
HRP-conjugated immunoglobulins	goat anti-rabbit	Dako Cytomation Ltd, Cambridgeshire, UK	Ely,
HRP-conjugated immunoglobulins	goat anti-mouse	Dako Cytomation	
HRP-conjugated goat anti-human IgG (γ-chain specific)		Sigma-Aldrich Ltd	
HRP-conjugated goat anti-human IgG		Inova Diagnostics Inc	
HRP-conjugated mouse anti-human IgG (γ chain specific)		Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama, USA	
HRP-conjugated mouse anti-human IgG1 (γ <sub>1</sub> chain specific)		<i>ibid</i>	
HRP-conjugated mouse anti-human IgG2 (γ <sub>2</sub> chain specific)		<i>ibid</i>	
HRP-conjugated mouse anti-human IgG3 (γ <sub>3</sub> chain specific)		<i>ibid</i>	
HRP-conjugated mouse anti-human IgG4 (γ <sub>4</sub> chain specific)		<i>ibid</i>	

### 3.3.1.3 Αντιγόνα

Purified His-tag human recombinant PDC-E2	Dr Lars Komorowski, Institute of Experimental Immunology, Euroimmun AG, Lübeck, Germany
Purified His-tag human recombinant BCOADC-E2	<i>ibid</i>
Purified His-tag human recombinant OGDC-E2	<i>ibid</i>
Purified His-tag human recombinant BPO [triple molecule M2 (PDC-E2, BCOADC-E2, OGDC-E2)]	<i>ibid</i>
Purified His-tag human recombinant TBB5	<i>ibid</i>
Purified heart bovine M2	<i>ibid</i>
Recombinant human PDC-E2	DIARECT AG, Freiburg, Germany
Recombinant human BCOADC-E2	<i>ibid</i>
Recombinant human OGDC-E2	<i>ibid</i>

### 3.3.2 Εμπορικά διαθέσιμες μέθοδοι

#### 3.3.2.1 IFL

ANA LKS IFL NOVA Lite <sup>TM</sup>	Inova Diagnostics Inc
ANCA Lite <sup>TM</sup>	Inova Diagnostics Inc
HEp-20-10 IFL	EUROIMMUN AG

#### 3.3.2.2 ELISA

Anti-M2-3E ELISA (IgG) ( <i>for in vitro use</i> )	EUROIMMUN AG
Anti-sp100 (IgG) ( <i>for in vitro use</i> )	EUROIMMUN AG
Anti-gp210 (IgG) ( <i>for in vitro use</i> )	EUROIMMUN AG

Anti-MPO (IgG)	EUROIMMUN AG
Anti-PR3 (IgG)	EUROIMMUN AG
gp210 ELISA QUANTA Lite <sup>TM</sup>	Inova Diagnostics Inc
M2 EP (MIT3) ELISA QUANTA Lite <sup>TM</sup>	Inova
sp100 ELISA QUANTA Lite <sup>TM</sup>	<i>ibid</i>

### 3.3.2.3 Immunoblot και Line Assay

Anti-Liver Antigen EUROLINE WB (IgG)	Euroimmun AG
EUROLINE Profile Autoimmune Liver Diseases (ALD)	<i>ibid</i>
Anti-ENA (Extractable Nuclear Antigen) Profile Plus 1 EUROLINE	Euroimmun AG

### 3.3.2.4 Western Blot buffers και διαλύματα

- Sample Buffer (2X):
  - Distilled water 18.75 ml
  - SDS 5 gr
  - EDTA 2.5 mg
  - Sodium Azide 5 mg
  - Tris-HCl buffer [(100 ml), Tris 6.006 gr, SDS 0.4 gr, sodium azide 0.01 gr, (pH 6.8)] 1.25 ml
  - Glycerol 5 ml
  - Bromophenol blue 5mg
- Separating gel mixture (8.8 ml):
  - 30% acrylamide/bis 2.9 ml (10% gel), 3.48 ml (12% gel), 4.35 ml (15% gel)

- Distilled water 4.16 ml (10% gel), 3.58 ml (12% gel), 2.71 ml (15% gel)
- 2M Tris-HCl (pH 8.7) 1.65 ml
- 20% SDS 44  $\mu$ l
- 0.1% ammonium persulfate 39.6  $\mu$ l
- TEMED 6.6  $\mu$ l
- Stacking gel mixture (2.4 ml):
  - 30% acrylamide/bis 320  $\mu$ l
  - Distilled water 1.76 ml
  - 1M Tris-HCl (pH 6.8) 320  $\mu$ l
  - 20% SDS 12  $\mu$ l
  - 0.1% ammonium persulfate 12  $\mu$ l
  - TEMED 2.4  $\mu$ l
- Electrophoretic Buffer (10X) (1000ml)
  - Glycine 144 gr
  - Tris 30 gr
  - SDS 10 gr
- Blotting Buffer (10X) (1000ml)
  - Glycine 144 gr
  - Tris 30 gr
  - SDS 2 gr
- Transfer Buffer (2000ml)
  - Distilled Water 1400 ml
  - 100% Methanol 400 ml
  - Blotting buffer 200 ml
- Διάλυμα Ponceau S (100 ml)
  - Distilled Water 95 ml
  - Acetic Acid 5 ml
  - Ponceau S 0.5 gr

### 3.3.3 Αντιδραστήρια

Cassettes 1.5 mm	Invitrogen Life Technologies
Centrifuge tubes (50 ml; 15 ml)	Falcon, BD Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Centrifuge tube filters	Corning Incorporated, Corning, New York, NY, USA
Combs 1.5 mm	Invitrogen Life Technologies
Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene, Nalge Europe Ltd., Hereford, Herefordshire, UK
Disposable plastic pipettes	Bibby Sterlin Ltd., Stone, Staffordshire, UK
Filter and pipette tips	Starlab, Milton Keynes, Bucks, UK
Filter papers 3 mm	Whatman International Ltd., Maidstone, Kent, England, UK
Glass-fibre filter papers	Packard Instrument, Groningen, The Netherlands
Immobilon-P transfer (0.45 µm) Roll Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane	Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, USA
Microcentrifuge Biopur tubes (0.5, 1.5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Nunc-Immuno™ 96-well flat bottom plates	Nunc
Pasteur pipettes	Greiner Labortechnik Ltd., Darsey, Gloucestershire, UK
Petri dishes (90 mm)	Greiner Labortechnik Ltd
Syringes	BD Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA

### 3.3.4 Όργανα- εξοπλισμός

Camera DMR-DFC 300 FX	Leica Camera AG, London, UK
-----------------------	-----------------------------

Centrifuge (model Labofuge 400R)	Heraeus Instruments, Osterode, Germany
Centrifuge (model Rotina 420R)	Hettich Instruments, Tuttlingen, Germany
ELISA microplate reader (model MRX)	Dynex Technologies, Worthing, West Sussex, UK
ELISA plate shaker Titramax 100	Heidolf Instruments, Saffron, Walden, Essex, UK
Fluorescence microscope (Aristoplan)	Leica Microsystems Ltd., Milton Keynes, Bucks, UK
Microcentrifuge (model IEC Centra-M)	Heraeus
Platform rocker STR6	Jencons, Leighton Buzzard, UK
Power Pack 200 Biorad	Biorad Laboratories, Hercules, California, USA
Vortex Genie 2	Jencons-PLS (Scientific Industries Inc), Leighton Buzzard, UK
XCell <i>SuperLock</i> Mini-Cell	Invitrogen

### 3.4 Πρωτόκολλα τεχνικών

#### 3.4.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Όλα τα πειράματα ΕΑΦ έγιναν κωδικοποιημένα από τον Dr Ted Davies, Head of Immunology Laboratory, King's College Hospital και τους συνεργάτες του στα πλαίσια του διαγνωστικού ελέγχου και από την Δρ Μαρία Μυτιλιναίου, MD, PhD, Clinical Research Fellow, Immunology Group (Head: Professor Diego Vergani), Institute of Liver Studies, King's College London School of Medicine. Στις περισσότερες περιπτώσεις όλοι οι οροί ελέχθηκαν ξανά για τις ανάγκες της διατριβής σε επαναληπτικά πειράματα κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Κωδικοποιημένα αποτελέσματα που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων του

εργαστηρίου του Dr Davies, αποκωδικοποιήθηκαν για διασταύρωση. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων έδειξε συμφωνία σε ποσοστό πάνω από 90% (90%-98% ανάλογα με τα υποστρώματα). Το ποσοστό αυτό είναι ικανοποιητικό για μελέτες τέτοιου είδους στις οποίες συμπεριλαμβάνονται πάρα πολλοί οροί με οριακούς τίτλους (1/20, 1/40). Σε μεμονωμένες περιπτώσεις και όπου χρειάστηκε ανεξάρτητη επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων λόγω διχογνωμίας των παρατηρητών (όπως για παράδειγμα σε ορούς με μικρούς τίτλους αυτοαντισωμάτων ή σε ορούς με ταυτόχρονη παρουσία πολλών προτύπων ανοσοφθορισμού), τα slides εκτιμήθηκαν από τον Dr Munther Hussain (Senior Research Fellow, Immunology Group), ή ακόμη και από τον ίδιο τον Καθηγητή Diego Vergani. Ο υποψήφιος πήρε μαθήματα πολύ βασικών γνώσεων ΕΑΦ αρχικά από τους Δρ Μυτιλιναίου, Δρ Μπόγδανο και στη συνέχεια από τον Dr Davies.

Οι οροί ελέγχθηκαν για οργανοειδικά και μη οργανοειδικά αυτοαντισώματα που σχετίζονται με αυτοάνοσες ηπατοπάθειες με τη μέθοδο του ΕΑΦ χρησιμοποιώντας τριπλό συνδυασμό ιστικών υποστρώματων (τομές ήπατος, νεφρού και στομάχου) τρωκτικών (κυρίως αρουραίου αλλά και ποντικού). Όλα τα slides με τις τριπλές ιστικές τομές προήλθαν από εμπορικά διαθέσιμα κιτ (Inova Diagnostics) και τα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν περιγράφονται με σαφήνεια στις οδηγίες του κατασκευαστή ή έχουν περιγραφεί λεπτομερώς σε προηγούμενες μελέτες [77]. Slides με HEp-2 και HEp-20-10 κύτταρα παραχωρήθηκαν χωρίς τίμημα για ερευνητικούς σκοπούς από τους Dr Gary L. Norman (Inova Diagnostics) και Dr Lars Komorowski (Euroimmun GA).

Ο έλεγχος των ορών των ασθενών με ΠΧΚ, ΑΗ και των μαρτύρων για ANA, SMA, AMA, GPA πραγματοποιήθηκε σε διαδοχικές αραιώσεις (αρχικά 1/20 και 1/40 και

στην περίπτωση θετικού δείγματος 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560 έως 1/5120 ή 1/10240 ) σε αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.15 mol/L, pH 7.4 (phosphate buffer saline, PBS) για 30' σε σκοτεινό-υγρό περιβάλλον και θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε 5' πλύσιμο και τα ανοσοσυμπλέγματα έγιναν ορατά μετά από επώαση των πλακών για 30' σε διάλυμα προαραιωμένου και έτοιμου προς χρήση αντι-ανθρωπίου ολικού αντιορού IgG συνδεδεμένου με φλουροσκεΐνη (FITC conjugate, Inova). Μετά από 5' πλύσιμο στις πλάκες εναπότέθηκε γλυκερόλη/PBS (9:1), τοποθέτηση καλυπτρίδας και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού (Leica Camera, AG, UK). Όπου χρειάστηκε χρησιμοποιήθηκε ψηφιακή κάμερα χρησιμοποιώντας το Leica Application Suite V3.3.0 software (Dr Davies & Dr Mytilinaiou).

#### **3.4.2 In house ELISA για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων**

Αντιδραστικότητα έναντι διαφόρων μιτοχονδριακών αυτοαντιγόνων, όσο και αντιγονικών επιτόπων των ειδικών για την ΠΧΚ ANA μελετήθηκε με *in house* ELISA, όπως έχει περιγραφεί με παραλλαγές [29, 216, 224-225]. Μικροπλάκες πολυστυρενίου 96 θέσεων με επίπεδο πάτο (NUNC Maxi-Sorp plate) καλύφθηκαν με αντιγόνο και επώαστηκαν στους 20° C για 60'. Μετά από το στάδιο δέσμησης με 2% BSA για 60' ακολούθησαν 3 πλυσίματα και στη συνέχεια προστέθηκαν στις θέσεις των μικροπλακών οροί σε διάφορες αραιώσεις ανάλογα με το αντιγόνο που μελετήθηκε σε PBS/Tween20 0.1% (δες Κεφάλαιο 4. Αποτελέσματα) και παρέμεινε για 1.5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου πάνω σε αναδευτή. Μετά από πλύσιμο (3x με PBS 0.1 Tween 20), προστέθηκε αντιανθρώπινη IgG συνδεδεμένη με horseradish peroxidase 100μl/θέση και επώαστηκε για 30' σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά



από καλό πλύσιμο των μικροπλακών χρησιμοποιήθηκε TMB 100μl/φρεάτιο ως χρωμογόνο υπόστρωμα. Η αντίδραση τερματίστηκε με 0,344 M θειικό οξύ (100μl/θέση). Οι μικροπλάκες διαβάστηκαν σε ELISA reader στα 450 nm (Magellan4 software). Τιμές απορροφητικότητας (absorbance values) μεγαλύτερες από το μέσο όρο+5SD της απορροφητικότητας ορών 40 υγείων μαρτύρων χρησιμοποιήθηκε σαν το cut-off για το εκάστοτε αντιγόνο. Οροί με γνωστή αντιδραστικότητα έναντι των υπό μελέτη αντιγόνων χρησιμοποιήθηκαν σαν θετικοί μάρτυρες/standards σε κάθε μικροπλάκα.

### **3.4.3 Ανοσοαποτύπωση**

Αντισωματική απάντηση μελετήθηκε και με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, όπως έχει περιγραφεί [54]. Η τεχνική βασίζεται στη μετακίνηση ενός αντιγόνου σε μια μεμβράνη, όπου αναγνωρίζεται από ένα συγκεκριμένο αντίσωμα ή από ορό ανθρώπου, που περιέχει αντισώματα ειδικά για το αντιγόνο αυτό ([218]. Μετά τη διάλυση του αντιγόνου, το δείγμα πρωτεΐνης διαχωρίζεται με τη χρήση ενός ηλεκτροφορητικού συστήματος SDS polyacrylamide (PAGE).

Το σύστημα αποτελείται από 2 πήγματα. Το πήγμα επιστοιβάξης (stacking gel) έχει ως κύριο ρόλο την επιστοιβάξη των πρωτεϊνών του ηλεκτροφορούμενου δείγματος έτσι ώστε να εισέλθουν στο πήγμα διαχωρισμού (separating gel) όσο το δυνατόν ταυτόχρονα. Το πήγμα επιστοιβάξης έχει τελική συγκέντρωση 10% ακρυλαμιδίου, 0.1% SDS, 0.125M TRIS-HCl pH 6.8. Το πήγμα διαχωρισμού (separating gel) έχει ως κύριο ρόλο το διαχωρισμό της πρωτεΐνης σε προϊόντα σύμφωνα με το μοριακό του

βάρος. Τελικές συγκεντρώσεις του πηγματος διαχωρισμού είναι 12% ακρυλαμιδίου, 0.1% SDS, 0.375M TRIS-HCl pH 8.8.

Το σύστημα χρησιμοποιεί μιας διάστασης PAGE για να διαχωρίσει πρωτεΐνες, που βρίσκονται σε συνθήκες αποδιάταξης (denaturing conditions). Η ανοσοαποτύπωση πραγματοποιείται σε δεξαμενή ρυθμιστικού διαλύματος και το πήγμα τοποθετείται μεταξύ 2 ηλεκτροδίων. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος καθώς μετακινούνται πάνω στο πήγμα προς την κατεύθυνση του αρνητικού ηλεκτροδίου.

Η πρωτεΐνη που πρόκειται να αναλυθεί τοποθετήθηκε για βράσιμο στους 100 °C για 5 min. 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 πηγματος διαχωρισμού. Το μοριακό βάρος των ηλεκτροφορημένων πρωτεϊνών υπολογίζεται με βάση την κινητική τους συμπεριφορά, συγκριτικά με πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους που τοποθετούνται παράλληλα στο πήγμα (molecular markers, Rainbow marker: Invitrogen, Bench Marker Protein Ladder).

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά αυτών (transfer) των πρωτεϊνών από το πήγμα διαχωρισμού σε μεμβράνη PVDF με τη βοήθεια ειδικής συσκευής ηλεκτρομεταφοράς. Εφαρμόστηκε σταθερή τάση ρεύματος 25V για 2 ώρες. Μετά το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς, ακολούθησε χρώση των πρωτεϊνών με τη χρώση Ponceau S προκειμένου να εκτιμηθεί η ικανοποιητική μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήγμα διαχωρισμού στη μεμβράνη.

Στη συνέχεια κόπηκε το τμήμα της μεμβράνης που περιέχει τα standards προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια σαν αναφορά και στη συνέχεια η υπόλοιπη μεμβράνη κόπηκε σε ταινίες που στη συνέχεια βάφτηκαν για τον προσδιορισμό διαφόρων αντιδραστικότητων. Βασιζόμενοι σε πρωτόκολλα που έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο παρελθόν, δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιγόνων (0.01, 0.1, 1, 5, 10 µg/lane), διαφορετικές αραιώσεις ορών (1/50, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/5000, 1/10,000, 1/100,000) και δευτερεύοντος αντισώματος (1/1000, 1/2000, 1/5000, 1/10,000, 1/20,000) προκειμένου να βρεθούν οι καλύτερες συνθήκες για τον έλεγχο αντισωμάτων. Τα πρωτεύοντα αντισώματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 90' και στη συνέχεια μετά από πλύσιμο ακολούθησε επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα. Ανάλογα με την περίπτωση, σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένα πολυκλωνικό αντίσωμα με γνωστή αντιδραστικότητα έναντι της πολυϊστιδιωμένης περιοχής της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης (anti-His-Taq).

Πριν την επώαση με το πρωτεύον και δευτερεύον αντίσωμα και προκειμένου να αποφευχθεί η παρουσία μη ειδικής αντιδραστικότητας, οι ταινίες επώαστηκαν αρχικά με διάλυμα PBS 0,5% Tween 20 με 5% σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος για 1 ώρα (blocking step). Στη συνέχεια η εμφάνιση των προϊόντων σύνδεσης αντιγόνου-αυτοαντισώματος-δεύτερου αντισώματος έγινε με χρωματομετρική μέθοδο και χρήση αντιδραστηρίου 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.

#### **3.4.4 Πολυμετρικός γραμμικός ανοσοπροσδιορισμός**

Αναπτύχθηκαν μέθοδοι πολυμετρικού γραμμικού ανοσοπροσδιορισμού που περιλαμβάνουν τα παρακάτω αυτοαντιγόνα: (M2, PBO-E2, PDC-E2, BCOADC-E2, OGDC-E2, nup62), τα οποία αναπτύσσονται εκτενέστερα στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων.

#### **3.4.5 Πολυμετρική profile ELISA: (Δες αποτελέσματα)**

#### **3.4.6 Πολυπλεξία σήματος με φωτοβολία: PBO-E2, gr210**

Όσον αφορά την εκτίμηση της ευαισθησίας και ειδικότητας της προτεινόμενης μεθοδολογίας σε νοσήματα του ήπατος, συγκρίθηκε με αποτελέσματα απο σετ μικροσφαιριδίων για την ανίχνευση των ειδικών για την ΠΧΚ αντισωμάτων έναντι PBO-E2 και gr210 αντιγόνων (δες αποτελέσματα).

Αναλυτικά οι πολυμετρικές μέθοδοι ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων, που αναπτύχθηκαν για τις ανάγκες της διατριβής περιγράφονται με λεπτομέρεια στο κεφάλαιο 4 (Αποτελέσματα).

### **3.5 Στατιστική ανάλυση**

Τα δεδομένα που είχαν κανονική κατανομή εκφράστηκαν σαν μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση (SD), ενώ τα δεδομένα που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή παρουσιάστηκαν σαν διάμεση τιμή. Ανάλογα με τις εκάστοτε προϋποθέσεις χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικά (student's t test) ή μη παραμετρικά τεστ (Mann-Whitney U-test, Kruskal-Wallis). Ως στατιστικά σημαντικές δοκιμασίες θεωρήθηκαν

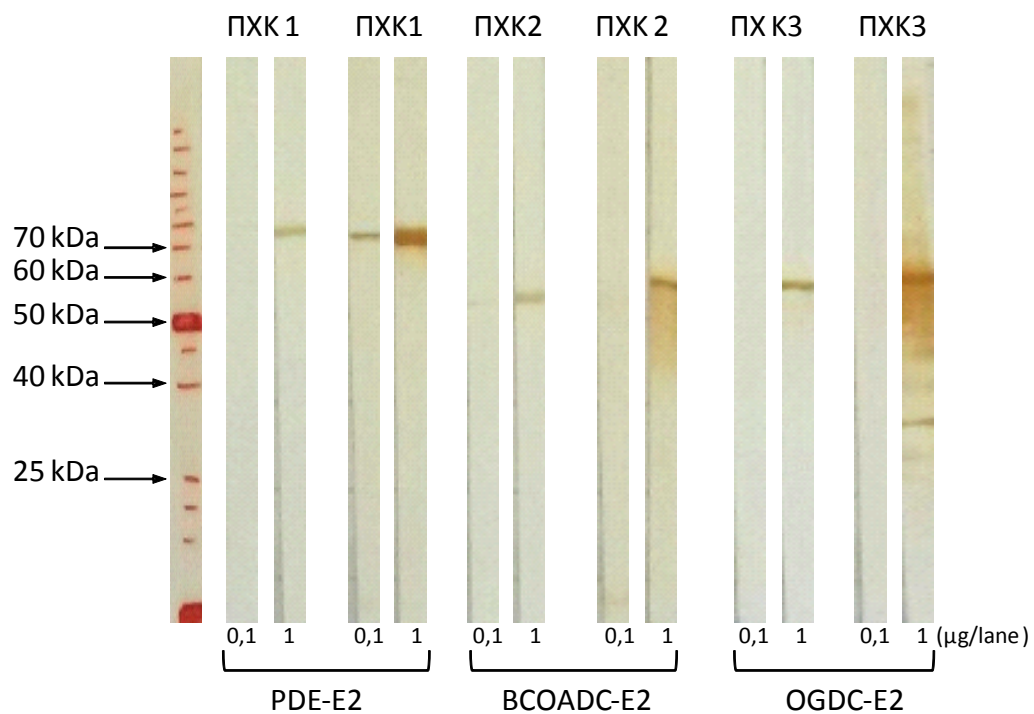
αυτές που το  $p < 0.05$ . Για την στατιστική επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε το SPSS 17.0 for Windows.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

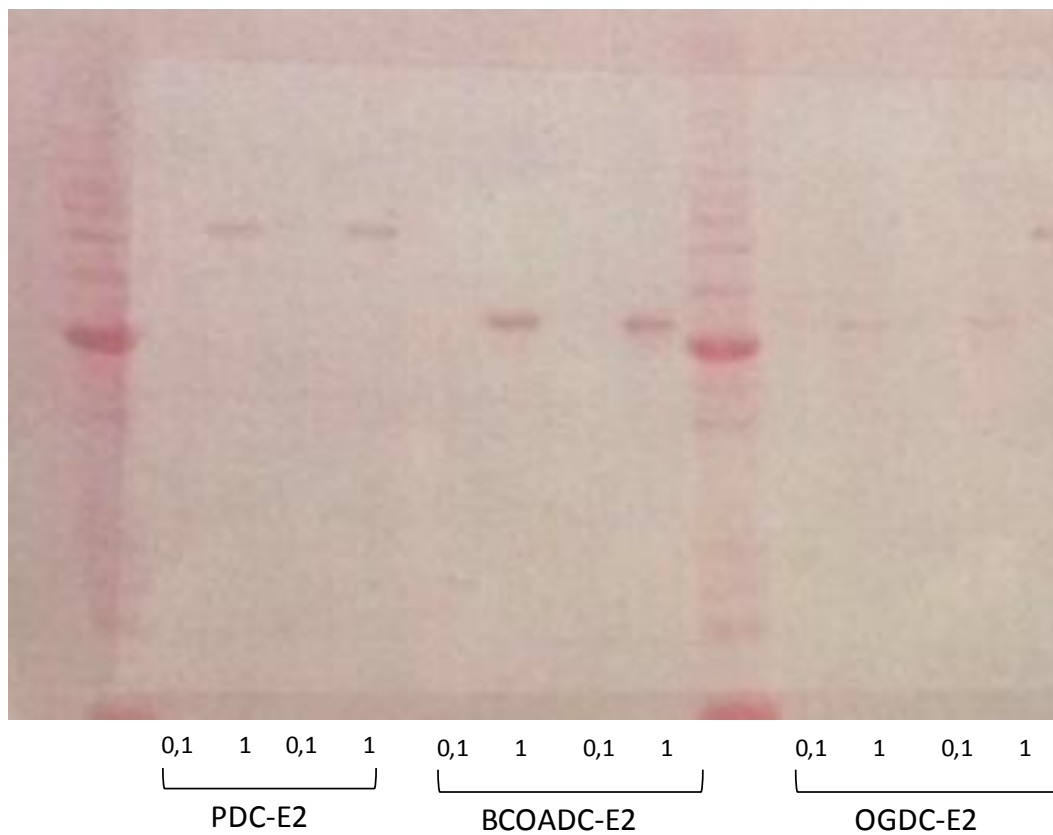
### **4.1 In house ELISA για ταυτόχρονη ανίχνευση μιτοχονδριακών αυτοαντιγόνων στην ΠΧΚ**

Στο πρώτο στάδιο έγιναν προκαταρκτικά πειράματα σε 5 AMA θετικούς ασθενείς με γνωστή αντιδραστικότητα κατά των PDC-E2, BCOADC-E2 και OGDC-E2 (από τα προαναφερόμενα πειράματα με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιγόνων (0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml & 5 µg/ml) και διαφορετικές αραιώσεις ορών (1/50, 1/100, 1/200, 1/500 και 1/1000) για να προσδιοριστούν οι καταλληλότερες συνθήκες για την εκτέλεση του τελικού πειράματος. Από τα πειράματα αυτά προέκυψε ότι για όλα τα αντιγόνα εκτός του OGDC-E2 η καταλληλότερη τελική συγκέντρωση είναι το 1 µg/ml. Η τελική συγκέντρωση για το OGDC-E2 καθορίστηκε στα 2 µg/ml. Ως τελική αραιώση ορού επιλέχθηκε εκείνη της 1/200. Για καθένα από τα αυτοαντιγόνα, έγιναν πειράματα σε 40 AMA αρνητικούς υγιείς μάρτυρες και το cut off ορίστηκε ως το mean+5SD.

Τα ανασυνδυασμένα αυτοαντιγόνα χρησιμοποιήθηκαν και ως αντιγονική πηγή για την επιτέλεση πειραμάτων ανοαποτύπωσης. Αντιπροσωπευτικά πειράματα από δείγματα 3ΠΧΚ ασθενών με γνωστή αντιδραστικότητα στα 3 ανασυνδυασμένα μιτοχονδριακά αυτοαντιγόνα απεικονίζονται στην Εικόνα 4.1 και αντιπροσωπευτική Ponceau S σήμανση (που δείχνει την επιτυχημένη μεταφορά αντιγόνου) στην Εικόνα 4.2.



**Εικόνα 4.1.** Αντιδραστικότητα έναντι των PDC-E2, BCOADC-E2 και OGDC-E2 σε τρεις ασθενείς (1 αντί-PDC-E2 θετικό, 1 αντί-BCOADC-E2 και 1 με αντί-OGDC-E2 αντισώματα) Τα ανασυνδυασμένα αυτοαντιγόνα χρησιμοποιήθηκαν σε 2 συγκεντρώσεις (0.1 και 1 μg ανά strip).



**Εικόνα 4.2.** Ροσεαυ S χρώση της μεμβράνης που παρήχθη με τη τεχνική ανοσοαποτύπωσης. Απεικονίζονται οι βαθμονομητές και τα αντιγόνα PDC-E2, OGDC-E2 και BCOADC-E2 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.1 και 1 µg ανά strip).



#### **4.1.1 Ανάπτυξη *in house* ELISA για αντι-μιτοχονδριακά αντισώματα:**

##### **Έλεγχος AMA θετικών ασθενών με ΠΧΚ**

Στη μικροπλάκα της ELISA έγιναν πειράματα χρησιμοποιώντας σε ξεχωριστά φρεάτια 1) το ανασυνδυασμένο σε ευκαρυωτικό σύστημα υβριδικό αντιγόνο που περιέχει τους 3 κυρίαρχους επίτοπους των PDC-E2, BCOADC-E2 και OGDC-E2 (Diarect AG), 2) το PDC-E2 μόνο του, 3) το BCOADC-E2 μόνο του, 4) το OGDC-E2 μόνο του ή 5) το κεκαθαρμένο M2 αντιγόνο από καρδιά μόσχου (που περιέχει κυρίως υπομονάδες του PDC, και συγκεκριμένα τις PDC-E2, PDC-E1α και PDC-1β) . Σκοπός του πειράματος ήταν να επιτύχουμε μια προφίλ ELISA που θα παρέχει ολοκληρωμένες πληροφορίες για αυτοαντισώματα έναντι καθενός από τα κύρια και δευτερεύοντα μιτοχονδριακά αυτοαντιγόνα. Ο Πίνακας 4.1 δείχνει αναλυτικά τα αποτελέσματα σε 17 AMA θετικούς ΠΧΚ ασθενείς σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στους ίδιους ασθενείς με 2 ELISAs (Inova ELISA (E2 EP)[90], Euroimmun ELISA (M2+PBO)[226] και έναν εμπορικά διαθέσιμο γραμμικό ανοσοπροσδιορισμό (Euroimmun Line Immunoassay AMA (M2) και PBO) [219]. Στον Πίνακα 4.1 τα θετικά δείγματα ορών φαίνονται με γκρι χρωματισμό.

Οι ασθενείς αυτοί επιλέχθηκαν βάση της γνωστής αντιδραστικότητάς τους όσον αφορά στα ΠΧΚ-AMA και ΠΧΚ-ANA όπως αυτή είχε προσδιοριστεί από προηγούμενα πειράματα ΕΑΦ και ανοσοαποτύπωσης ή από πειράματα που έγιναν στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής.

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1</b>	<b>ΠΧΚ1</b>	<b>ΠΧΚ2</b>	<b>ΠΧΚ3</b>	<b>ΠΧΚ4</b>	<b>ΠΧΚ5</b>	<b>ΠΧΚ6</b>	<b>ΠΧΚ7</b>
<b>ΕΑΦ (ΗΝΣ)</b>	ΑΜΑ (τύπου Μ2)	ΑΜΑ-Μ2	ΑΜΑ-Μ2	ΑΜΑ-Μ2	ΑΜΑ-Μ2	ΑΜΑ-Μ2	ΑΜΑ-Μ2
<b>Ανοσοαποτύπωση (εΗ)</b>	74, 51, 45 bands	74, 51	74, 51	74, 51, 45	74, 51	74, 51, 45	51, 74, 45
<b><i>in house ELISA</i></b>							
<b>recE2-PBO</b>	2.95	1.816	2.7	2.5	2.9	1.73	2.69
<b>recPDC-E2</b>	1.41	1.41	2.66	2.7	2.7	1.75	2.7
<b>recBCOADC-E2</b>	2.53	2	1.8	2.5	1.5	1.704	2.4
<b>recOGDC-E2</b>	3.2	0.156	0.68	0.2	0.11	0.126	0.13
<b>Μ2 (καρδιά μόσχου)</b>	1.2	1.39	1.3	1.5	1.4	1.055	1.37
<b>INOVA ELISA</b>							
<b>PBO</b>	3.3	3.3	3.3	3.4	3.4	3.4	3.5
<b>EUROIMMUN ELISA</b>							
<b>Μ2&amp;Ε2-PBO</b>	2.6	2.4	2.6	2.8	2.5	2.4	2.8
<b>EUROIMMUN Line Immunoassay</b>							
<b>ΑΜΑ (Μ2)</b>	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]
<b>PBO</b>	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]

	<b>ΠΧΚ8</b>	<b>ΠΧΚ9</b>	<b>ΠΧΚ10</b>	<b>ΠΧΚ11</b>	<b>ΠΧΚ12</b>	<b>ΠΧΚ13</b>	<b>ΠΧΚ14</b>
<b>ΕΑΦ (ΗΝΣ)</b>	ΑΜΑ-Μ2	ΑΜΑ-Μ2	ΑΜΑ-Μ2	ΑΜΑ-Μ2	ΑΜΑ-Μ2	ΑΜΑ-Μ2	ΑΜΑ-Μ2
<b>Ανοσοαποτύπωση (εΗ)</b>	74, 51, 45	74, 51, 45	74, 51	Δ/Ε	Δ/Ε	Δ/Ε	Δ/Ε
<b><i>in house ELISA</i></b>							
<b>recE2-PBO</b>	3.5	3.5	1.7	2.85	2.1	2.3	2.3
<b>recPDC-E2</b>	2.5	2.5	0.36	2.99	2.3	1.4	2.43
<b>recBCOADC-E2</b>	2.6	2.8	2.55	1.67	0.16	2.5	0.17
<b>recOGDC-E2</b>	3.4	3.7	0.93	0.15	0.36	0.13	0.14
<b>Μ2 (καρδιά μόσχου)</b>	1.7	1.3	0.83	1.86	1.77	1.01	1.5
<b>INOVA ELISA</b>							
<b>Μ2 ΕΡ</b>	3.5	3.5	3.3	3.5	3.4	3.2	3.4

<b>EUROIMMUN ELISA</b>							
<b>M2&amp;E2-PBO</b>	3.1	2.6	1.8	2.7	2.5	2.4	2.3
<b>EUROIMMUN Line Immunoassay</b>							
<b>AMA (M2)</b>	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]
<b>PBO</b>	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]

	<b>ΠΧΚ15</b>	<b>ΠΧΚ16</b>	<b>ΠΧΚ17</b>
<b>ΕΑΦ (ΗΝΣ)</b>	AMA-M2	AMA-M2	AMA-M2
<b>Ανοσοαποτύπωση (εΗ)</b>	Δ/Ε	Δ/Ε	Δ/Ε
<b><i>in house</i> ELISA</b>			
<b>recE2-PBO</b>	1.9	2.7	2.12
<b>recPDC-E2</b>	0.22	2.11	1.3
<b>recBCOADC-E2</b>	1.8	2.8	2.6
<b>recOGDC-E2</b>	0.95	1.11	0.12
<b>M2 (καρδιά μόσχου)</b>	0.77	1.6	1.2
<b>INOVA ELISA</b>			
<b>PBO</b>	0.72	3.5	3.08
<b>EUROIMMUN ELISA</b>			
<b>M2&amp;E2-PBO</b>	0.8	2.5	2.1
<b>EUROIMMUN Line Immunoassay</b>			
<b>AMA (M2)</b>	[+++]	[+++]	[+++]
<b>PBO</b>	[+]	[+++]	[+++]

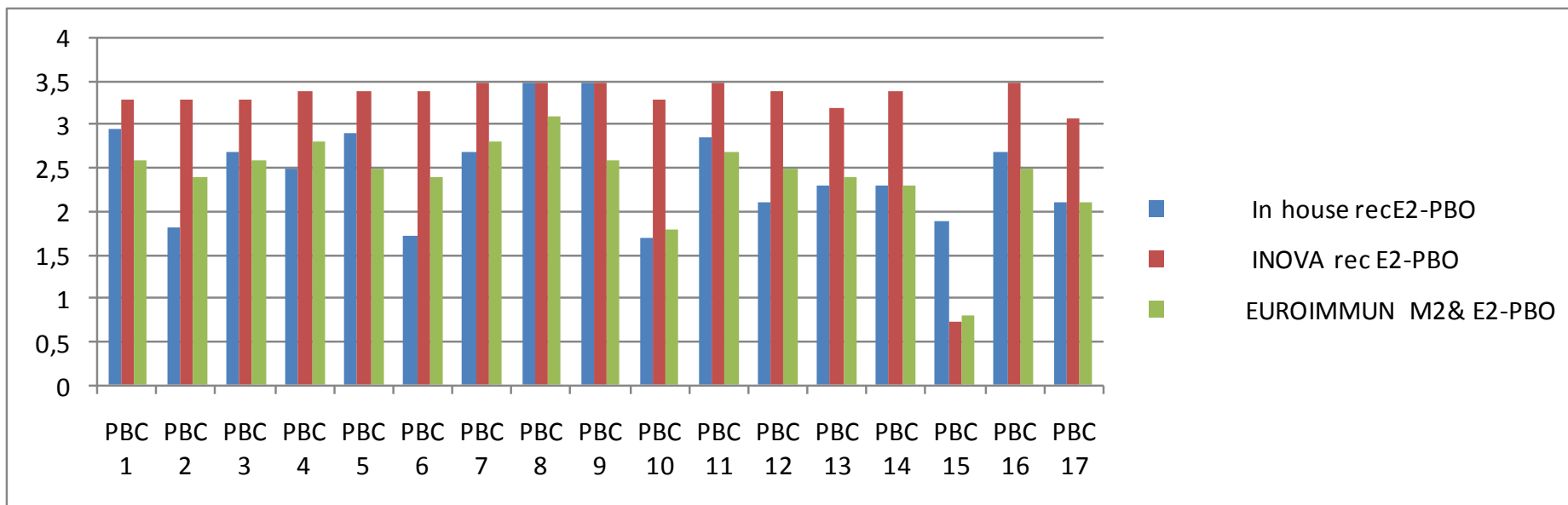
Σε γκρί χρωματισμό σημειώνονται τα θετικά δείγματα ορών. Δ/Ε, δεν ελέχθησαν.

Απο τον έλεγχο των 17 AMA θετικών ασθενών με ΠΧΚ για αντιδραστικότητα στα επιμέρους μιτοχονδριακά αυτοαντιγόνα προέκυψαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα.

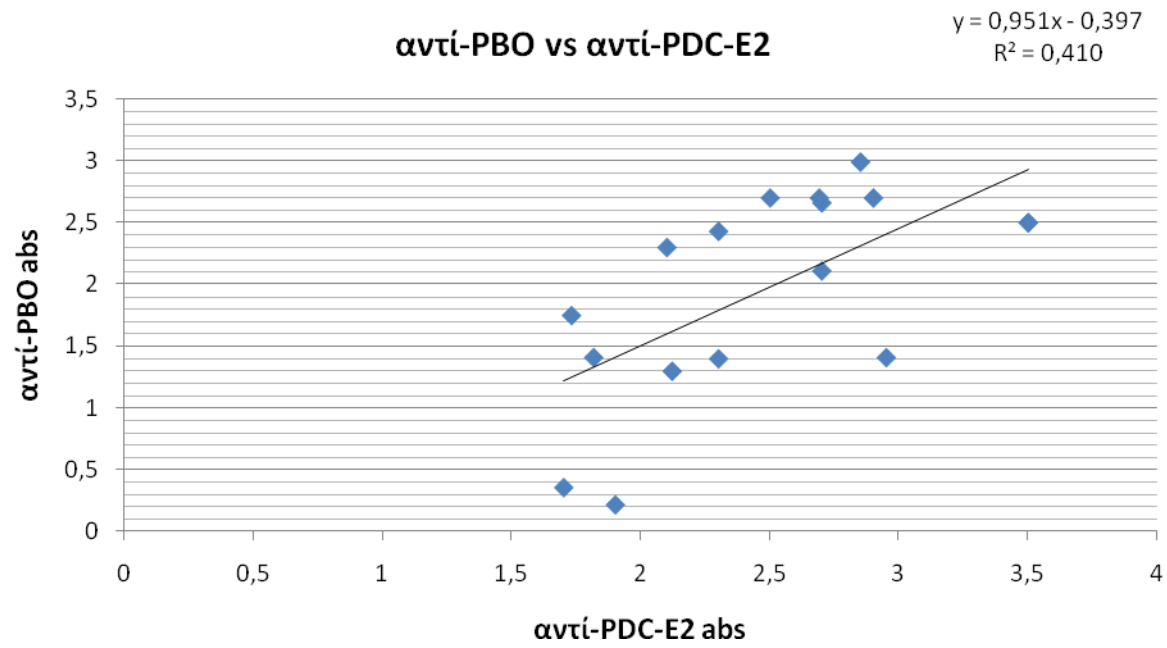
Συνοψίζοντας, 17/17 (100%) AMA θετικοί (με ΕΑΦ) έδειξαν αντιδραστικότητα στην *in house* PBO ELISA με υψηλές απορροφήσεις που κυμαίνονταν από 1.7 έως 3.5 (median 2.5 OD).

Οι τιμές απορροφητικότητας της Inova ήταν οι υψηλότερες όλων, αλλά και αυτές που έδειξαν τις μικρότερες διακυμάνσεις μεταξύ των τριών μεθόδων ELISA (median 3.4 (range 0.72 - 3.5),  $p < 0.01$  vs *in house* PBO). Η *in house* ELISA και εκείνη της Euroimmun έδειξαν συγκριτικά παρόμοιες απορροφήσεις ( $p > 0.05$ ). Να σημειωθεί ότι η ELISA της Euroimmun είναι μια *in house* ELISA που εμπεριέχει μίγμα του ανασυνδυασμένου υβριδίου των E2-PBO και μιτοχονδριακού M2 εκχυλίσματος (και για το λόγο αυτό τα αποτελέσματα της σύγκρισης θα πρέπει να ερμηνευτούν με προσοχή).

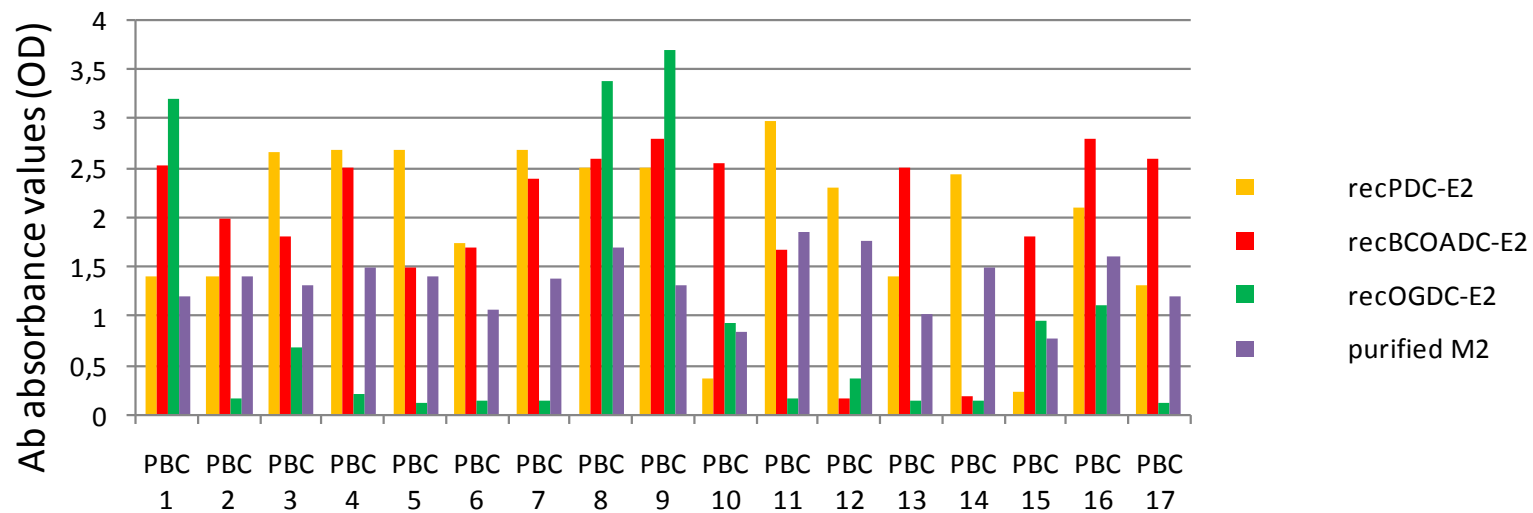
Το ποσοστά αντιδραστικότητας στις *in house* PDC-E2, BCOADC-E2 και OGDC-E2 ELISA, ήταν 94% (16/17), 88% (15/17) και 41% ( 7/17), αντίστοιχα. Συμπερασματικά, η αντιδραστικότητα κατά των PDC-E2 και BCOADC-E2 είναι συγκρίσιμες και συχνότερες εκείνης κατά της OGDC-E2, η οποία εμφανίζεται σε λιγότερο από το 50% των AMA θετικών (με ΕΑΦ) ΠΧΚ ασθενών. Ο ένας ορός ΠΧΚ ασθενούς που δεν αντέδρασε με την PDC-E2, είχε αντισώματα έναντι των BCOADC-E2 και OGDC-E2. Συνολικά, 17/17 AMA θετικοί (με ΕΑΦ) ασθενείς με ΠΧΚ αντέδρασαν με τουλάχιστον ένα από τα τρία κύρια μιτοχονδριακά αυτοαντιγόνα. Ανάλυση της έντασης της αντιδραστικότητας μεταξύ της αντί-PDC-E2 και αντί-E2-PBO έδειξαν σχετικό συσχετισμό (Εικόνα 4.3)



**Εικόνα 4.3.** Συγκριτική απεικόνιση των αντιδραστικότητων έναντι της E2-PBO σε τρεις διαφορετικές ELISA (in house, εμπορική της Inova και in house της Euroimmun). Ο κάθετος (Y) άξονας δείχνει απορροφητικότητα της αντιδραστικότητας των αντισωμάτων εκφρασμένη ως οπτική πυκνότητα (OD).



**Εικόνα 4.4.** Σύγκριση της αντιδραστικότητας της *in house* ELISA έναντι της E2-PBO και της *in house* PDC-E2.



**Εικόνα 4.5.** Συνοπτικά αποτελέσματα αντιδραστικότητας 17 AMA θετικών ασθενών με ΠΧΚ με *in house* ELISA σε 4 αντιγόνα και συγκεκριμένα στα ανασυνδυασμένα PDC-E2, BCOADC-E2, OGDC-E2 και κεκαθαρισμένο M2 .

Τρεις από τους 17 (18%) AMA θετικούς ασθενείς με ΠΧΚ έδειξαν υψηλότερη αντιδραστικότητα στην OGDC-E2 και 6/17 (35%) στην BCOADC-E2 (Εικόνα 4.5). Τέλος, 17/17 (100%) AMA θετικοί (με ΕΑΦ) ΠΧΚ ασθενείς έδειξαν αντιδραστικότητα στο κεκεθαρμένο M2 αντιγόνο από καρδιά μόσχου.

#### **4.1.2 Ανάπτυξη *in house* ELISA για αντι-μιτοχονδριακά αντισώματα:**

##### **Έλεγχος AMA αρνητικών ασθενών με ΠΧΚ**

Για πολλές δεκαετίες η ανίχνευση των AMA αντισωμάτων στηρίζονταν στον ΕΑΦ με συνδυασμό τριπλών ιστικών τομών. Για τον έλεγχο των AMA σε μοριακό επίπεδο χρησιμοποιούνταν το M2 αντιγόνο από πλούσια σε μιτοχόνδρια όργανα μεγάλων ζώων όπως την καρδιά βοειδούς. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας ανέδειξαν την χρησιμότητα και μεγάλη ευαισθησία αυτής της πρακτικής μια και από ότι φαίνεται η ανίχνευση των AMA με ΕΑΦ συσχετίζεται απόλυτα με την ύπαρξη των αντί-M2 αντισωμάτων που ανιχνεύονται με ELISA.

Ωστόσο, αυτό που οδήγησε στην ανάπτυξη πιο ευαίσθητων μεθόδων για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των μιτοχονδρίων είναι η αναγνώριση ασθενών με αποδεδειγμένη ΠΧΚ που δεν έχουν AMA με ΕΑΦ. Το ποσοστό τέτοιων ασθενών μπορεί να υπερβαίνει το 10% σε μερικές σειρές ΠΧΚ. Προηγούμενες μελέτες (μεταξύ των οποίων και εκείνες που προέρχονται από την δική μας ερευνητική ομάδα) υποστηρίζουν ότι ένα σημαντικό ποσοστό αυτών των ασθενών έχουν στην πραγματικότητα αντι-μιτοχονδριακά αντισώματα τα οποία ανευρίσκονται όταν για την ανίχνευσή τους χρησιμοποιηθεί το τριπλό υβριδικό αυτοαντιγόνο που

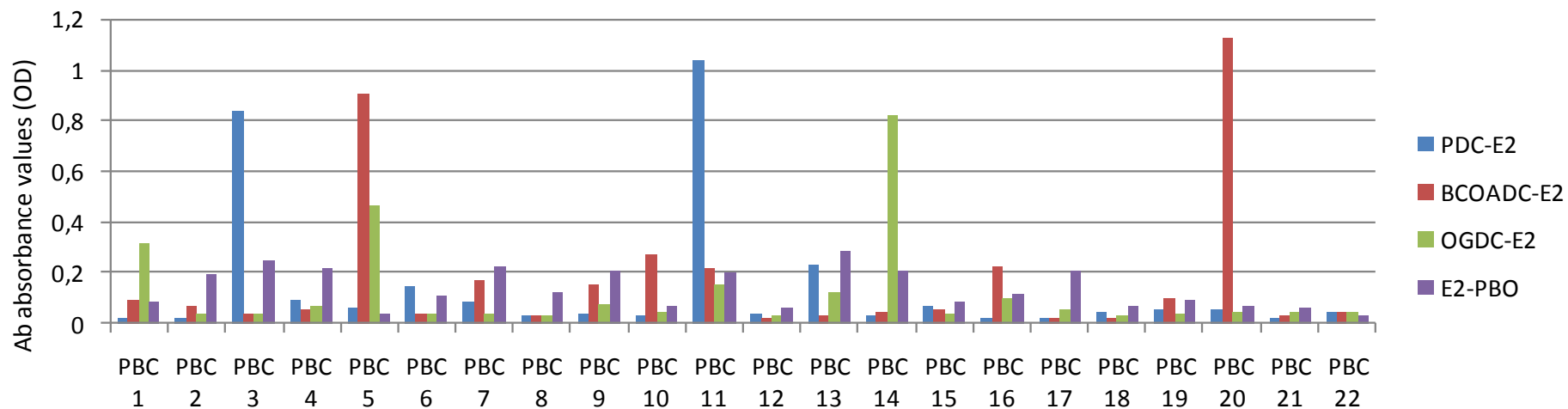


αποτελείται από τους κύριους επιτόπους των E2 υπομονάδων του PDC, BCOADC και OGDC.

Για να αναλύσουμε λεπτομερέστερα την βασιμότητα των παραπάνω διαπιστώσεων ελέγξαμε ορούς από 22 AMA αρνητικούς (με ΕΑΦ) ασθενείς με ΠΧΚ χρησιμοποιώντας την *in house* ELISA και προσμετρήσαμε την αντιδραστικότητα έναντι των E2-PBO, PDC-E2, BCOADC-E2 και OGDC-E2. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήσαμε (αραίωση ορών και τελικές συγκεντρώσεις αντιγόνων) ήταν πανομοιότυπες με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των AMA θετικών ασθενών με ΠΧΚ.

Συνοπτικά αποτελέσματα των πειραμάτων παρατίθενται λεπτομερώς στην Εικόνα 4.6.

### Ab reactivity against mitochondrial ags in AMA-neg PBC patients (n=22)



**Εικόνα 4.6** . Αντιδραστικότητα με *in house* ELISA έναντι των E2-PBO (τριπλό υβριδικό αντιγόνο), ανασυνδυασμένα PDC-E2, BCOADC-E2 και OGDC-E2 σε ορούς από 22 AMA αρνητικούς (με ΕΑΦ) ασθενείς με ΠΧΚ.

Σε γενικές γραμμές, η ένταση της αντιδραστικότητας κατά των εξεταζόμενων αντιγόνων ήταν πολύ πιο χαμηλή σε σχέση με αυτήν που διαπιστώσαμε στους AMA θετικούς ασθενείς με ΠΧΚ. Τα πειράματά μας έδειξαν ότι μόνο 4/22 (18%) των AMA αρνητικών ορών ξεπέρασαν απορροφητικότητα >0.4 σε κάποιο από τα 4 αντιγόνα. Συνολικά, 12/22 (55%) των AMA αρνητικών ασθενών με ΠΧΚ αναγνώρισαν τουλάχιστον ένα από τα 4 αντιγόνα, που ελέγχθηκαν. Ανάμεσα στους 12 ασθενείς που αντέδρασαν, 2 έδειξαν τη μεγαλύτερη αντιδραστικότητα στο PDC-E2, 2 στο BCOADC-E2, 2 στο OGDC-E2 και 6 στο E2-PBO.

Με βάση τα παραπάνω, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι η συμμετοχή των υπομονάδων των κύριων μιτοχονδριακών αυτοαντιγόνων σε προφίλ αυτοαντισωμάτων που χρησιμοποιούνται για την διαγνωστική προσέγγιση ασθενών με ΠΧΚ κρίνεται αναγκαία, ιδιαίτερα σε εκείνες τις περιπτώσεις που υπάρχουν ισχυρές κλινικές ενδείξεις ΠΧΚ αλλά δεν ανιχνεύονται AMA με ΕΑΦ.

#### **4.2 In house ELISA για ταυτόχρονη ανίχνευση ειδικών για την ΠΧΚ ANA**

Στη συνέχεια αποφασίσαμε να αναπτύξουμε μια ELISA για τους κυρίαρχους μοριακούς επιτόπους των ειδικών για την ΠΧΚ ANA και εάν είναι δυνατόν να ενσωματώσουμε την ELISA αυτή στην προηγούμενη προφίλ AMA ELISA (PDC-E2, PDC-1α, PDC-1β, BCOADC-E2, OGDC-E2, PBO-E2).

Προκαταρκτικά πειράματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιγόνων (0.1 μg/ml, 0.5 μg/ml, 1 μg/ml, 2 μg/ml & 5 μg/ml) και διαφορετικές αραιώσεις ορών (1/50, 1/100, 1/200, 1/500, 1/1000) οδήγησαν στην επιλογή της 0.5 μg/ml ως τελικής

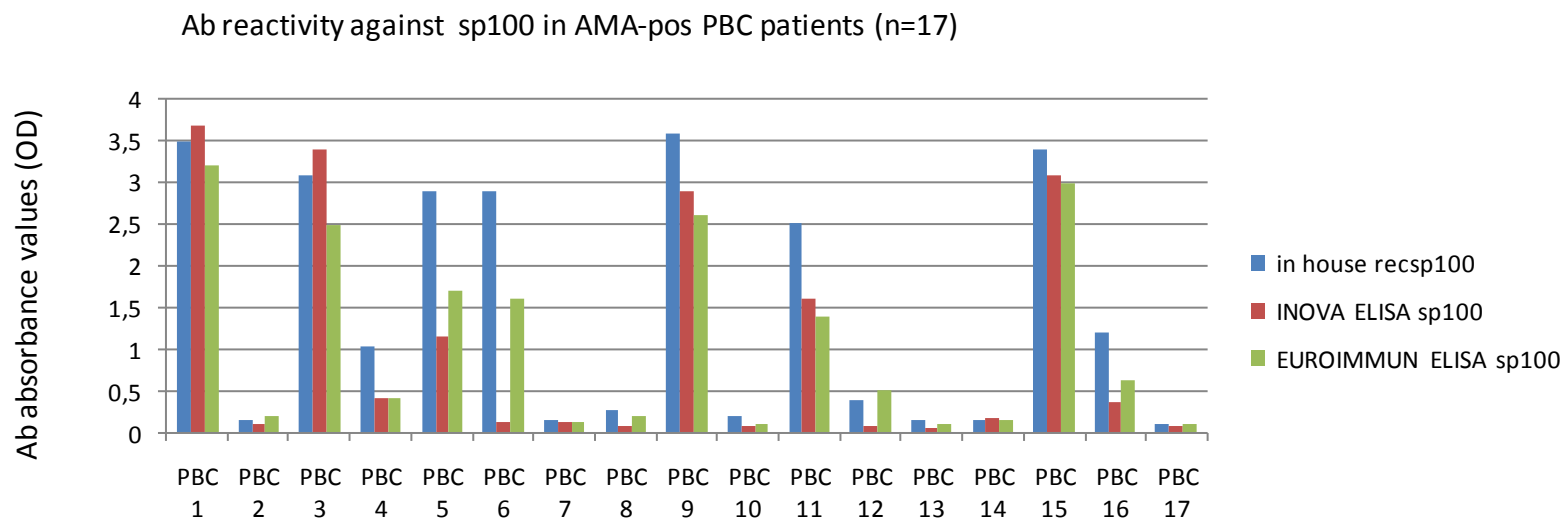
συγκέντρωσης για το sp100 και 0.1 µg/ml ως τελικής συγκέντρωσης για το gp210 και αραίωση ορού 1/200. Για τον ορισμό του cut off χρησιμοποιήθηκε η πρωθύστερη πρακτική της επιλογής του mean+5SD σε 40 ορούς από MND και RLM αρνητικούς υγιείς δότες. Ένας PBC ορός με απορρόφηση για το sp100 στο όριο της θετικότητας και ένας PBC ορός με απορρόφηση στο όριο της θετικότητας για το gp210 χρησιμοποιήθηκαν σαν standards για τα υπολλειπόμενα πειράματα.

Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης από την *in house* ELISA για τα ΠΧΚ-ειδικά ANA (sp100 και gp210) παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2, ενώ τα συγκριτικά αποτελέσματα της *in house* ELISA σε σχέση με τις ELISA απο την Inova και την Euroimmun, δίνονται στον Πίνακα 4.2 και στις Εικόνες 4.7 & 4.8.

**Πίνακας 4.2.** Αποτελέσματα αντιδραστικότητας της *in house* ELISA για τα ΠΧΚ-ειδικά ANA (sp100 και gp210) συγκριτικά με τις αντίστοιχες ELISA απο την Inova και την Euroimmun και το γραμμικό ανοσοπροσδιορισμό της Euroimmun σε 17 AMA θετικούς ΠΧΚ ασθενείς.

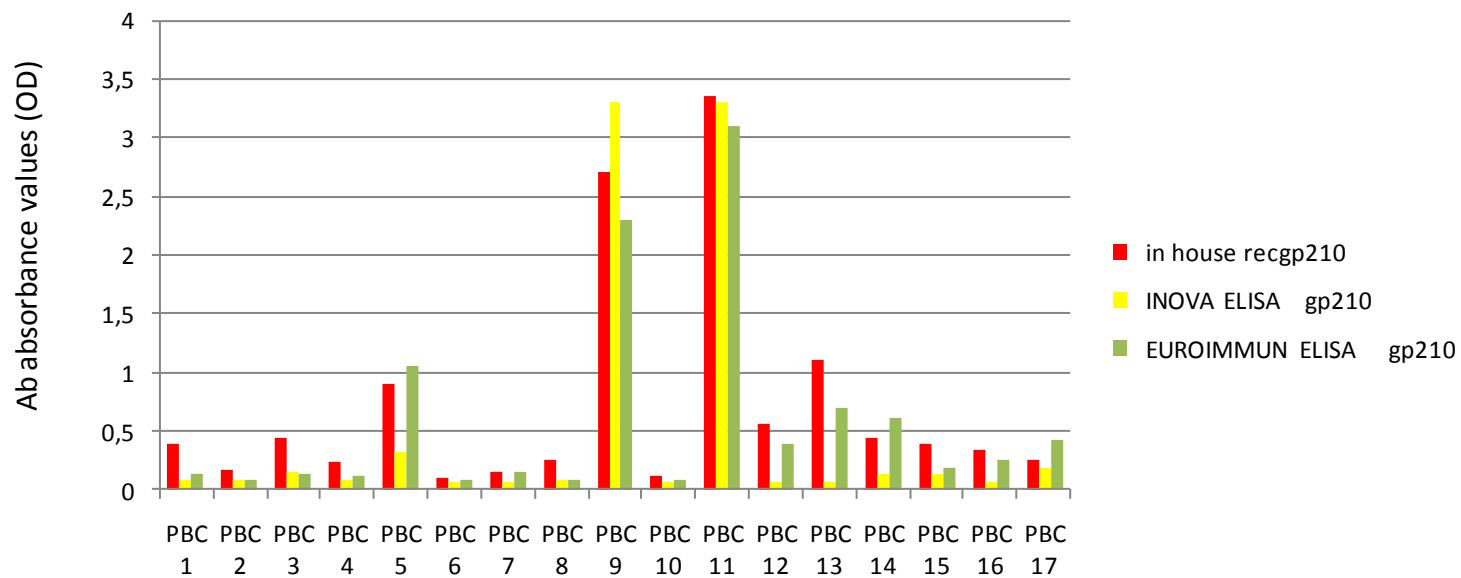
	<b>ΠΧΚ1</b>	<b>ΠΧΚ2</b>	<b>ΠΧΚ3</b>	<b>ΠΧΚ4</b>	<b>ΠΧΚ5</b>	<b>ΠΧΚ6</b>
<b>ΕΦΑ</b>	<b>MND (+)</b> <b>RLM (+)</b>	<b>MND (-)</b> <b>RLM (-)</b>	<b>MND (+)</b> <b>RLM (-)</b>	<b>MND (+)</b> <b>RLM (-)</b>	<b>MND (+)</b> <b>RLM (+)</b>	<b>MND (+)</b> <b>RLM (+)</b>
<b><i>in house</i> ELISA</b>						
<b>recsp100</b>	3.5	0.151	3.1	1.04	2.9	2.9
<b>recgp210</b>	0.392	0.164	0.446	0.23	0.9	0.095
<b>INOVA ELISA</b>						
<b>sp100</b>	3.7	0.09	3.4	0.4	1.15	0.109
<b>gp210</b>	0.08	0.09	0.15	0.09	0.32	0.07
<b>EUROIMMUN ELISA</b>						
<b>sp100</b>	3.2	0.2	2.5	0.4	1.7	1.6
<b>gp210</b>	0.13	0.09	0.137	0.112	1.06	0.09
<b>EUROIMMUN Line Immunoassay</b>						
<b>gp210</b>	0	0	0	0	[++]	0
<b>sp100</b>	[+++]	0	[+++]	[++]	[+++]	[+++]

	<b>ΠΧΚ8</b>	<b>ΠΧΚ9</b>	<b>ΠΧΚ10</b>	<b>ΠΧΚ11</b>	<b>ΠΧΚ12</b>	<b>ΠΧΚ13</b>	<b>ΠΧΚ14</b>
<b>EΦΑ</b>	<b>MND (-)</b>	<b>MND (+)</b>	<b>MND (-)</b>	<b>MND (+)</b>	<b>MND (-)</b>	<b>MND (-)</b>	<b>MND (-)</b>
	<b>RLM (-)</b>	<b>RLM (+)</b>	<b>RLM (-)</b>	<b>RLM (+)</b>	<b>RLM (-)</b>	<b>RLM (+)</b>	<b>RLM (+)</b>
<b>in house ELISA</b>							
<b>recsp100</b>	0.27	3.6	0.19	2.52	0.39	0.15	0.15
<b>recgp210</b>	0.26	2.7	0.12	3.36	0.56	1.11	0.44
<b>INOVA ELISA</b>							
<b>sp100</b>	0.082	2.9	0.075	1.6	0.065	0.05	0.17
<b>gp210</b>	0.09	3.3	0.06	3.3	0.07	0.06	0.14
<b>EUROIMMUN ELISA</b>							
<b>sp100</b>	0.19	2.6	0.09	1.4	0.5	0.11	0.135
<b>gp210</b>	0.08	2.3	0.08	3.1	0.4	0.7	0.61
<b>EUROIMMUN Line Immunoassay</b>							
<b>gp210</b>	0	[+++]	0	[+++]	[++]	[+++]	[+++]
<b>sp100</b>	0	[++]	0	[+++]	0	0	0
	<b>ΠΧΚ15</b>	<b>ΠΧΚ16</b>	<b>ΠΧΚ17</b>				
<b>EΦΑ</b>							
<b>in house ELISA</b>							
<b>recsp100</b>	3.4	1.2	0.11				
<b>recgp210</b>	0.395	0.33	0.25				
<b>INOVA ELISA</b>							
<b>sp100</b>	3.1	0.35	0.06				
<b>gp210</b>	0.13	0.06	0.18				
<b>EUROIMMUN ELISA</b>							
<b>sp100</b>	3	0.63	0.105				
<b>gp210</b>	0.19	0.25	0.43				
<b>EUROIMMUN Line Immunoassay</b>							
<b>gp210</b>	[++]	[++]	[+++]				
<b>sp100</b>	[+++]	[++]	0				



**Εικόνα 4.7.** Αντιδραστικότητα κατά του sp100 με τρεις μεθόδους (*in house ELISA, Inova, Euroimmun*) σε ορούς από 17 AMA θετικούς ασθενείς με ΠΧΚ.

Ab reactivity against gp210 in AMA-pos PBC patients (n=17)



**Εικόνα 4.8.** Αντιδραστικότητα κατά του gp210 με τρεις μεθόδους (*in house ELISA, Inova, Euroimmun*) σε ορούς από 17 AMA θετικούς ασθενείς με ΠΧΚ.



Από τους 17 ΠΧΚ ασθενείς που μελετήθηκαν, 9 (53%) έδειξαν αντιδραστικότητα έναντι του sp100. Σε 8 από τους 9 αντί-sp100 θετικούς ορούς η μεγαλύτερη απορροφητικότητα διαπιστώθηκε στην *in house* ELISA παρά στις άλλες ELISA. Από τις 9 αντί-sp100 θετικές περιπτώσεις, 1 ήταν αρνητική με την ELISA της EUROIMMUN και 2 με την ELISA της Inova (Εικόνα 4.7).

Η ανάλυση της αντιδραστικότητας κατά της gp210 έδειξε ότι 7/17 (41%) των ασθενών είχαν αντι-gp210 αντισώματα σε τουλάχιστον 1 από τις 3 ELISA, και συγκεκριμένα σε 7/7 με την *in house* ELISA (5 από τους οποίους είχαν αντιδραστικότητα με αυτήν της EUROIMMUN και μόλις 2 με της Inova). Απο τα παραπάνω προκύπτει ότι η πιο ευαίσθητη ELISA ήταν η *in house* και ότι 5/7 ασθενείς με αντί-gp210 αντισώματα, θα είχαν θεωρηθεί ως αντί-gp210 αρνητικοί εάν είχαν ελεχθεί μόνο με εκείνη της Inova (Εικόνα 4.8).

Το σύνολο των ευρημάτων για όλες τις μοριακές τεχνικές ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων που περιγράψαμε μέχρι τώρα αναφέρονται στον Πίνακα 4.3. Στον συγκεκριμένο πίνακα αναγράφονται και ημιποσοτικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τον έλεγχο με τον γραμμικό ανοσοπροσδιορισμό της EUROIMMUN που συμπεριλαμβάνει εκτός των προαναφερομένων και άλλα αυτοαντισώματα που αφορούν αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος.

**Πίνακας 4.3** . Συνολικά αποτελέσματα αντιδραστικότητας της *in house* ELISA για τα αντιμιτοχονδριακά αντισώματα και για τα ΠΧΚ-ειδικά ANA (sp100 και gp210) συγκριτικά με τις αντίστοιχες ELISA απο την Inova και την Euroimmun και το γραμμικό ανοσοπροσδιορισμό της Euroimmun σε 17 AMA θετικούς ΠΧΚ ασθενείς.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.3	NC	PC	ΠΧΚ1	ΠΧΚ2	ΠΧΚ3	ΠΧΚ4	ΠΧΚ5	ΠΧΚ6
<b>in house ELISA</b>								
<b>recE2-PBO</b>	0.058	1.37	2.95	1.816	2.7	2.5	2.9	1.73
<b>recPDC-E2</b>	0.087	1.08	1.41	1.41	2.66	2.7	2.7	1.75
<b>recBCOADC-E2</b>	0.069	0.883	2.53	2	1.8	2.5	1.5	1.704
<b>recOGDC-E2</b>	0.06	0.764	3.2	0.156	0.68	0.2	0.11	0.126
<b>recsp100</b>	0.055	0.939	3.5	0.151	3.1	1.04	2.9	2.9
<b>recgp210</b>	0.053	0.929	0.392	0.164	0.446	0.23	0.9	0.095
<b>M2 (καρδιά μύσχου)</b>	0.059	1.2	1.2	1.39	1.3	1.5	1.4	1.055
<b>INOVA ELISA</b>								
<b>M2 EP</b>	0.05	2.3	3.3	3.3	3.3	3.4	3.4	3.4
<b>sp100</b>	0.05	1.6	3.7	0.09	3.4	0.4	1.15	0.109
<b>gp210</b>	0.05	1.7	0.08	0.09	0.15	0.09	0.32	0.07
<b>EUROIMMUN ELISA</b>								
<b>M2&amp;E2-PBO</b>	0.06	0.8	2.6	2.4	2.6	2.8	2.5	2.4
<b>sp100</b>	0.06	0.75	3.2	0.2	2.5	0.4	1.7	1.6
<b>gp210</b>	0.05	0.87	0.13	0.09	0.137	0.112	1.06	0.09
<b>EUROIMMUN Line Immunoassay</b>								
<b>AMA (M2)</b>	0	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]
<b>3E (BPO)</b>	0	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]
<b>gp210</b>	0	[+++]	0	0	0	0	[++]	0
<b>sp100</b>	0	[+++]	[+++]	0	[+++]	[++]	[+++]	[+++]
<b>PML</b>	0	[+++]	[+++]	0	0	0	0	0
<b>SLA</b>	0	[+++]	0	0	0	0	0	0
<b>Ro52</b>	0	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	0	0
<b>LKM-1</b>	0	[+++]	0	0	0	0	0	0
<b>LC-1</b>	0	[+++]	0	0	0	0	0	0

Πίνακας 4.3 (συνέχεια)	ΠΧΚ7	ΠΧΚ8	ΠΧΚ9	ΠΧΚ10	ΠΧΚ11	ΠΧΚ12	ΠΧΚ13	ΠΧΚ14
<b>in house ELISA</b>								
recE2-PBO	2.69	3.5	3.5	1.7	2.85	2.1	2.3	2.3
recPDC-E2	2.7	2.5	2.5	0.36	2.99	2.3	1.4	2.43
recBCOADC-E2	2.4	2.6	2.8	2.55	1.67	0.16	2.5	0.17
recOGDC-E2	0.13	3.4	3.7	0.93	0.15	0.36	0.13	0.14
recsp100	0.14	0.27	3.6	0.19	2.52	0.39	0.15	0.15
recgp210	0.15	0.26	2.7	0.12	3.36	0.56	1.11	0.44
M2 (καρδιά μύσχου)	1.37	1.7	1.3	0.83	1.86	1.77	1.01	1.5
<b>INOVA ELISA</b>								
M2 EP	3.5	3.5	3.5	3.3	3.5	3.4	3.2	3.4
sp100	0.128	0.082	2.9	0.075	1.6	0.065	0.05	0.17
gp210	0.07	0.09	3.3	0.06	3.3	0.07	0.06	0.14
<b>EUROIMMUN ELISA</b>								
M2&E2-PBO	2.8	3.1	2.6	1.8	2.7	2.5	2.4	2.3
sp100	0.11	0.19	2.6	0.09	1.4	0.5	0.11	0.135
gp210	0.15	0.08	2.3	0.08	3.1	0.4	0.7	0.61
<b>EUROIMMUN Line Immunoassay</b>								
AMA (M2)	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]
3E (BPO)	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]
gp210	0	0	[+++]	0	[+++]	[++]	[+++]	[+++]
sp100	0	0	[++]	0	[+++]	0	0	0
PML	0	0	0	0	[+++]	[+++]	[+]	[++]
SLA	0	0	0	0	0	0	0	0
Ro52	0	0	0	0	[+++]	[+++]	[+++]	[+++]
LKM-1	0	0	0	0	0	0	0	0
LC-1	0	0	0	0	0	0	0	0

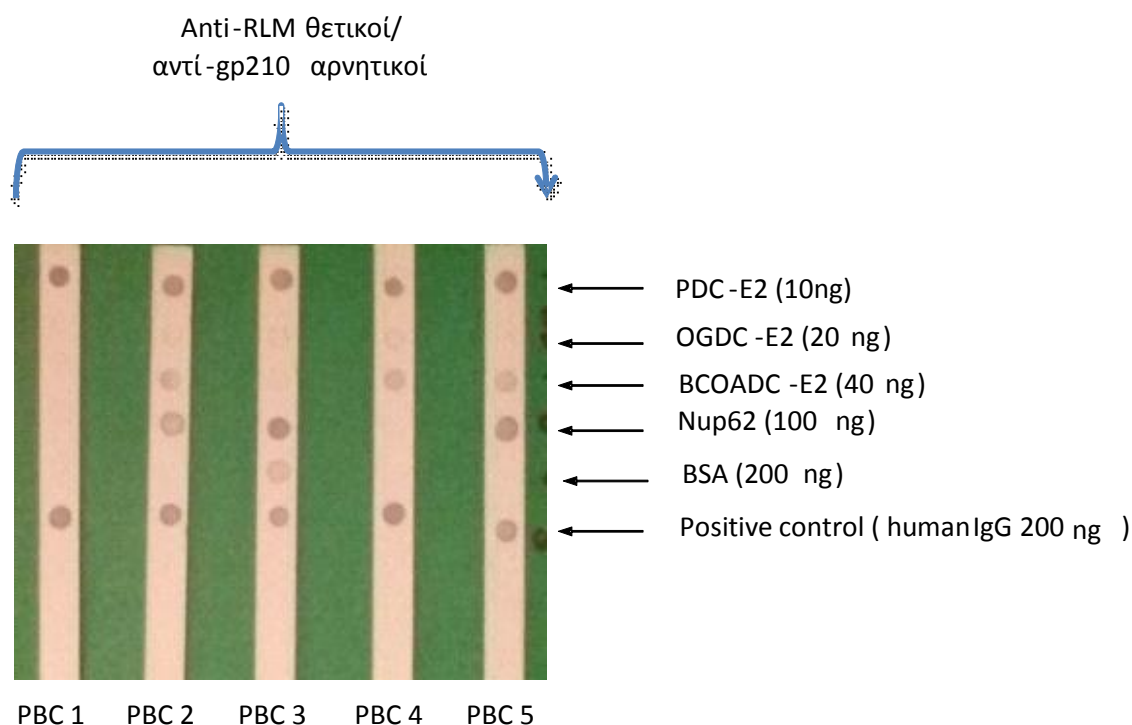
<b>Πίνακας 4.3 (συνέχεια)</b>	<b>ΠΧΚ15</b>	<b>ΠΧΚ16</b>	<b>ΠΧΚ17</b>
<b><i>in house</i> ELISA</b>			
<b>recE2-PBO</b>	1.9	2.7	2.12
<b>recPDC-E2</b>	0.22	2.11	1.3
<b>recBCOADC-E2</b>	1.8	2.8	2.6
<b>recOGDC-E2</b>	0.95	1.11	0.12
<b>recsp100</b>	3.4	1.2	0.11
<b>recgp210</b>	0.395	0.33	0.25
<b>M2 (καρδιά μύσχου)</b>	0.77	1.6	1.2
<b>INOVA ELISA</b>			
<b>M2 EP</b>	0.72	3.5	3.08
<b>sp100</b>	3.1	0.35	0.06
<b>gp210</b>	0.13	0.06	0.18
<b>EUROIMMUN ELISA</b>			
<b>M2&amp;E2-PBO</b>	0.8	2.5	2.1
<b>sp100</b>	3	0.63	0.105
<b>gp210</b>	0.19	0.25	0.43
<b>EUROIMMUN Line Immunoassay</b>			
<b>AMA (M2)</b>	[+++]	[+++]	[+++]
<b>3E (BPO)</b>	[+]	[+++]	[+++]
<b>gp210</b>	[++]	[++]	[+++]
<b>sp100</b>	[+++]	[++]	0
<b>PML</b>	0	0	0
<b>SLA</b>	0	0	0
<b>Ro52</b>	[+++]	[+++]	[+++]
<b>LKM-1</b>	0	0	0
<b>LC-1</b>	0	0	0

Εκτός από το sp100, συχνός αντιγονικός στόχος των αντί-MND αντισωμάτων είναι και το PML. Όπως προαναφέρθηκε στο γενικό μέρος, σε μελέτη των Mytilinaίου και συνεργατών η παρουσία των PML συνδέεται πάντα με την ταυτόχρονη παρουσία των αντί-sp100 αντισωμάτων. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν κατά της όποιας διαγνωστικής αξίας των συγκεκριμένων αυτοαντισωμάτων και για το λόγο αυτό δεν προσπαθήσαμε να εντάξουμε στις προφίλ μεθόδους μας το PML.

Όπως προαναφέραμε, ένα από τα αυτοαντιγόνα της πυρηνικής μεμβράνης που δεν έχει μελετηθεί επαρκώς και θα μπορούσε δυνητικά να συμπεριληφθεί στο προφίλ της ΠΧΚ είναι η nucleoporin 62 (nup62), το οποίο φαίνεται να αγνωρίζεται από ασθενείς με αντί-RLM αντισώματα που δεν φαίνεται να αναγνωρίζουν το gp210.

Ένα σετ πειραμάτων που θέλαμε να εντάξουμε στη διατριβή, ήταν η πιθανότητα να εντάξουμε ένα γραμμικό ή κοκκώδη ανοσοπροσδιορισμό σαν αυτούς που έχουν αναπτυχθεί (με την συνεργασία της ερευνητικής μας ομάδας) τα τελευταία χρόνια και για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων που σχετίζονται με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος όπως την ΠΧΚ. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήσαμε τα ανασυνδυασμένα αυτοαντιγόνα PDC-E2, BCOADC-E2, OGDC-E2 καθώς και ανασυνδυασμένο Nup-62 (Euroimmun) με απώτερο σκοπό να αναπτύξουμε ένα πρωτότυπο κοκκώδη ανοσοπροσδιορισμό. Ενδεικτικά αποτελέσματα απεικονίζονται στην Εικόνα 4.9. Για να καταφέρουμε να επιτύχουμε θετική αντιδραστικότητα στο nup62 (όπως εκτιμήθηκε με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του nup62, δωρεά από τον Dr Lars Komorowski) χρειάστηκε να χρησιμοποιήσουμε έως και 100 ng ανά κόκκο. Να σημειωθεί ότι από τα ανασυνδυασμένα μιτοχονδριακά αυτοαντιγόνα σχετική

δυσκολία συναντήσαμε στο να επιτύχουμε την ανάδειξη αντιδραστικότητας κατά του BCOADC-E2 (40 ng ανά κόκκο) σε σχέση με το PDC-E2 (10 ng ανά κόκκο).



**Εικόνα 4.9.** Αντιδραστικότητα κατά των PDC-E2, OGDC-E2, BCOADC-E2 και Nup62 σε 5 αντί-RLM θετικούς ασθενείς χωρίς αντιδραστικότητα στο gr210.

Από τους 12 αντί-RLM θετικούς/ αντί-gr210 αρνητικούς ασθενείς με ΠΧΚ που ελέγχθησαν, 5 (42%) είχαν αντί-nup62 αντισώματα.

Μέχρι το στάδιο αυτό έχουμε καταφέρει να εντάξουμε τουλάχιστον 8 αυτοαντιγόνα (5 μιτοχονδριακά και 3 πυρηνικά) που σχετίζονται με αντιγονοειδική απόκριση σε ασθενείς με ΠΧΚ.

#### **4. 3 Πολυμετρική μέθοδος ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων με φωτοβολία σήματος (xMAP Luminex)**

Στο επόμενο στάδιο και μετά από συνεργασία με την εταιρία Inova διερευνήσαμε την πιθανότητα να αναπτύξουμε ένα προφίλ για έλεγχο αυτοαντισωμάτων της ΠΧΚ βασιζόμενοι στην τεχνολογία των xMAP beads της Luminex. Προκαταρκτικά αποτελέσματα ΠΧΚ ασθενών που ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας beads συζευγμένα με μιτοχονδριακά και πυρηνικά αντιγόνα (προσωπική επικοινωνία με Dr Gary L. Norman) ανέδειξε ότι οι προσδοκίες μας για ανάπτυξη ενός τέτοιου προφίλ ήταν δυνητικά πραγματοποιήσιμες.

Μεταξύ 77 ΠΧΚ ασθενών που μελετήθηκαν για αντιδραστικότητα έναντι του E2-PBO συζευγμένου με xMAP bead ή με ELISA, 17 (22%) ήταν αρνητικοί και με τα δύο, 56 (73%) ήταν θετικοί και με τα δύο, 3 (9%) ήταν θετικοί με τη Luminex αλλά αρνητικοί με την ELISA και 1 (1%) ήταν θετικός με την ELISA αλλά αρνητικός με την Luminex. Συνολικά 73/77 (94.8%) των ασθενών είχαν την ίδια αντιδραστικότητα με τις δύο τεχνικές (ποσοστό συμφωνίας 94.8%).

Επίσης, μελέτη της αντιδραστικότητας έναντι του gp210 με τις δύο μεθόδους οδήγησε στα παρακάτω αποτελέσματα: 60/77 (78%) ήταν αντι-gp210 αρνητικοί και με τις δύο μεθόδους, 16/77 (21%) θετικοί και με τις δύο, ενώ 1 (1%) ήταν θετικός με την ELISA και αρνητικός με την Luminex. Συνολικά το ποσοστό συμφωνίας μεταξύ των δύο τεχνικών ήταν 98.7% για τα αντί-gp210 αντισώματα.

Ωστόσο, η εταιρία Inova αποφάσισε λόγω του αυξημένου κόστους και της μικρής ζήτησης να εγκαταλείψει την συγκεκριμένη τεχνολογία, στερώντας μας την

δυνατότητα να διερευνήσουμε σε βάθος την πιθανή ανάπτυξη ενός τέτοιου προφίλ στο άμεσο μέλλον.

#### **4.4 Πολυμετρική ανίχνευση αυτοαντισωμάτων σχετιζόμενων με την αυτοάνοση ηπατίτιδα**

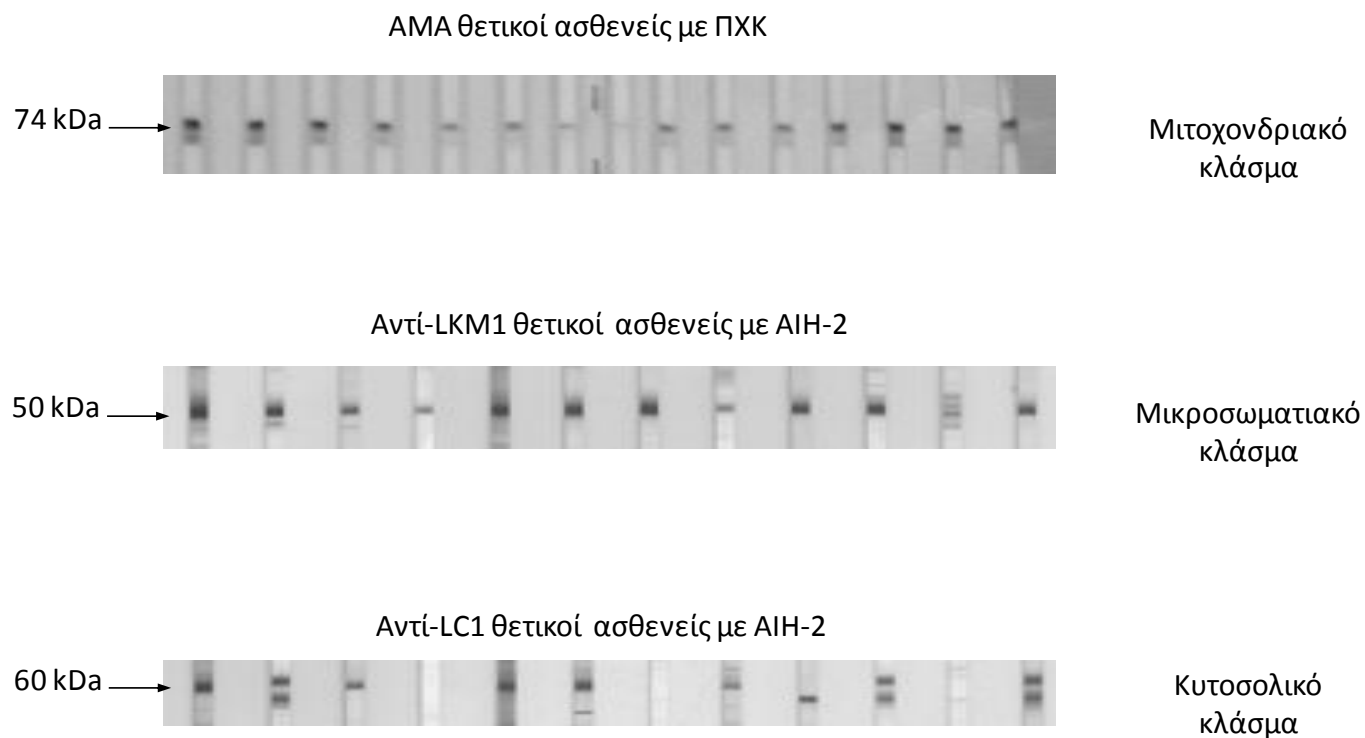
Όπως παρουσιάζεται εκτενώς στο γενικό μέρος, η AH-1 χαρακτηρίζεται από την παρουσία ANA και SMA ενώ η AH-2 από αντί-LKM1 και αντί-LC1. Οι μοριακοί στόχοι των ANA στην AIH παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Διάφορα (μη ειδικά για την AH) πυρηνικά αυτοαντιγόνα αναγνωρίζονται από ANA θετικούς ορούς ασθενών με AH - 1. Σε αυτά συγκαταλέγονται τα dsDNA, ssDNA, RNP, histones, SS-A, SS-B, centromeres κ.α. SMA θετικοί ασθενείς με AH-1 αντιδρούν κυρίως (αλλά όχι αποκλειστικά) με F-actin. Οι μοριακοί στόχοι των αντί-LKM1 και αντί-LC1 είναι το CYP2D6 και το FTCD, αντίστοιχα. Αυτοτελείς ή προφίλ μέθοδοι ανίχνευσης των συγκεκριμένων αυτοαντισωμάτων (ELISA, ανοσοαποτύπωση, γραμμικός/κοκκώδης ανοσοπροσδιορισμός) έχουν αναπτυχθεί και είναι εμπορικά διαθέσιμες [219].

Σκοπός του συγκεκριμένου σκέλους της διατριβής ήταν να αναπτύξουμε *in house* μεθόδους για την ανίχνευση των συγκεκριμένων αυτοαντισωμάτων και εάν είναι δυνατόν να τις εντάξουμε στη προφίλ ELISA που έχει αναπτυχθεί έως τώρα.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση βασισμένη σε έτοιμα προς χρήση μιτοχονδριακά, μικροσωματιακά και κυτοσολικά κλάσματα από ανθρώπινο ήπαρ (Euroimmun, Dr Lars Komorowski).



Αντιδραστικότητα από αντιπροσωπευτικά δείγματα ασθενών με ΑΗ-2 (Professor Giorgina Mieli-Vergani, King's College London) απεικονίζεται στην Εικόνα 4.10.

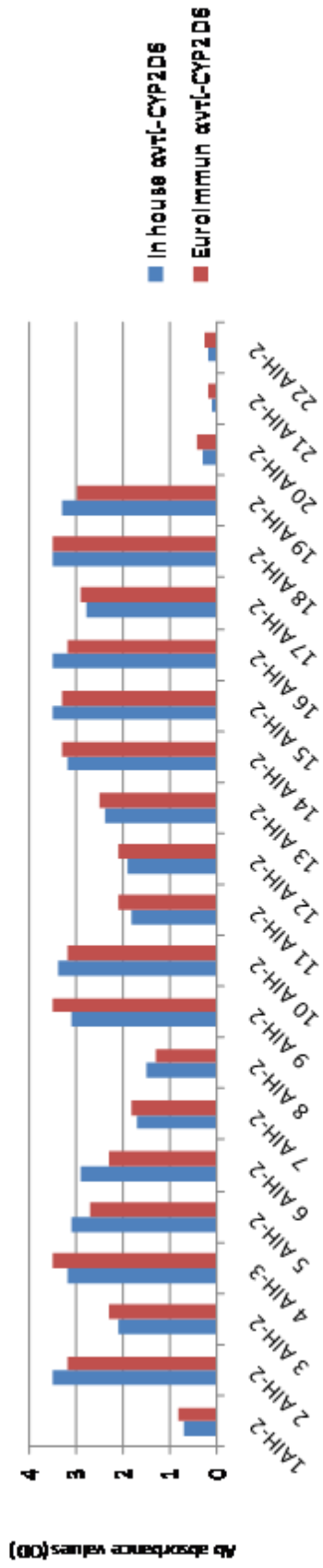


**Εικόνα 4.10.** Αντιδραστικότητα κατά της 74 kDa PDC-E2 χρησιμοποιώντας μιτοχονδριακό κλάσμα ήπατος σε αντιπροσωπευτικά δείγματα ΑΜΑ θετικών ΠΧΚ ασθενών. Αντιδραστικότητα ασθενών με ΑΙΗ-2 έναντι του 50 kDa CYP2D6 (αντί-LKM1) και του 60 kDa FTCD (αντί-LC1) μικροσωματιακού και κυτοσολικού κλάσματος ήπατος, αντίστοιχα.

Για την ανάπτυξη της αντί-CYP2D6 και της αντί-FTCD ELISA χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένα αυτοαντιγόνα από την Diarect AG. Προκαταρκτικά πειράματα υπολογισμού των τελικών βέλτιστων συγκεντρώσεων οδήγησαν στην επιλογή της 0.01 µg/ml και για τα δύο αυτοαντιγόνα σε αρραίωση ορού 1/200.

Από τους 22 ασθενείς με AH-2 (14 αντί-CYP2D6 θετικοί/αντί-FTCD θετικοί, 5 αντί-CYP2D6 θετικοί/αντί-FTCD αρνητικοί και 3 αντί-CYP2D6 αρνητικοί/αντί-FTCD θετικοί όπως είχαν χαρακτηριστεί με ELISA της Euroimmun), αντιδραστικότητα στο CYP2D6 ή FTCD ανιχνεύτηκε και στους 22 (ποσοστό συμφωνίας 100%). Στην Εικόνα 4.11 παρουσιάζεται η αντιδραστικότητα κατά του CYP2D6 σε ασθενείς με AH-2 με την *in house* ELISA που αναπτύχθηκε για τους σκοπούς της διατριβής και την εμπορικά διαθέσιμη ELISA της Euroimmun.

Αντι-CYP2D6 αντιδραστικότητα σε ασθενείς με AIH-2 (n=22)



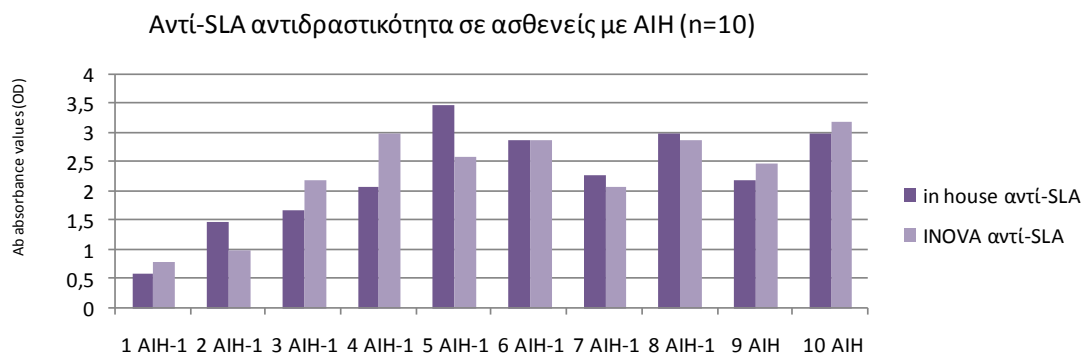
**Εικόνα 4.11.** Αντιδραστικότητα κατά του CYP2D6 σε ασθενείς με AH-2 με δύο διαφορετικές ELISA, την *in house* ELISA που αναπτύχθηκε για τους σκοπούς της διατριβής και την εμπορικά διαθέσιμη ELISA της Euroimmun, αντίστοιχα.

Παρόμοιο ποσοστό απόλυτης συμφωνίας (100%), παρατηρήθηκε και κατά τη μέτρηση της αντιδραστικότητας κατά του FTCD .



**Εικόνα 4.12.** Αντιδραστικότητα κατά του FTCD σε ασθενείς με AH-2 με δύο διαφορετικές ELISA, την *in house* ELISA που αναπτύχθηκε για τους σκοπούς της διατριβής και την εμπορικά διαθέσιμη ELISA της Euroimmun, αντίστοιχα.

Επιπλέον των CYP2D6 και FTCD αυτοαντιγόνων της AH-2, προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής ομάδας και των συνεργαζόμενων ερευνητών (Dr Bogdanos, Dr Ma) έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ευαίσθητης και ειδικής ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά του SLA. Χρησιμοποιώντας τις προκαθορισμένες συνθήκες (1/200 αραιώση ορού, 0.1 µg/ml ανασυνδυασμένου αντιγόνου), προσθέσαμε το SLA στην *in house* ELISA (Εικόνα 4.13).



**Εικόνα 4.13.** Αντιδραστικότητα κατά του SLA σε ασθενείς με AIH (n=10) με δύο διαφορετικές ELISA, την *in house* ELISA που αναπτύχθηκε για τους σκοπούς της διατριβής και την εμπορικά διαθέσιμη ELISA της Inova, αντίστοιχα (ποσοστό συμφωνίας 90%).

#### 4.5 Ανάπτυξη πρότυπης μεθόδου για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων σχετιζόμενων με την πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα

Το τελευταίο σετ πειραμάτων που κάναμε πριν την ολοκλήρωση της διατριβής αφορά στην ανίχνευση αυτοαντισωμάτων που σχετίζονται με τα ANCA (PR3 ή MPO). Όπως έχει αναφερθεί στο γενικό μέρος, τα αντί-PR3 ή αντί-MPO ANCA ανιχνεύονται κυρίως στις αγγειίτιδες. Η συχνότητα των αντί-PR3 στην ΠΣΧ ποικίλει ανάλογα με τις μεθόδους ανίχνευσης.

Συνολικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μέτρηση με ELISA φαίνονται στον Πίνακα 4.4.

**Πίνακας 4.4.** Αντί-PR3 και αντί-MPO αντιδραστικότητα σε 45 ασθενείς με πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ), 20 ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ) και 30 ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα (ΕΚ). (+)>20 AU, borderline 10-19 AU

prob_id	cANCA	pANCA	Atypical ANCA	PR3 ELISA [AU]	MPO ELISA [AU]
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos > 20 U/ml	pos > 20 U/ml
ΠΣΧ 1	0	0	0	6,2	1,4
ΠΣΧ 2	0	0	0	14,7	2,3
ΠΣΧ 3	0	0	1	18,4	5
ΠΣΧ 4	0	0	1	6,9	1,6
ΠΣΧ 5	0	0	1	30,3	5,5
ΠΣΧ 6	0	0	1	13,7	4,1
ΠΣΧ 7	0	0	0	5,3	1,7
ΠΣΧ 8	0	0	0	6,6	3,6
ΠΣΧ 9	1	0	0	15,6	4,2
ΠΣΧ 10	0	0	1	18,7	3,5
ΠΣΧ 11	0	0	0	7,5	1,5
ΠΣΧ 12	0	0	1	14,8	2,8
ΠΣΧ 13	0	0	1	13,4	4,6
ΠΣΧ 14	0	1	0	18,4	216,8
ΠΣΧ 15	0	0	1	14,5	3,9
ΠΣΧ 16	0	0	1	9,3	3
ΠΣΧ 17	0	0	1	10,3	2
ΠΣΧ 18	0	0	1	9,7	1,3
ΠΣΧ 19	0	0	1	32,4	3,2
ΠΣΧ 20	0	0	1	9,6	4,7
ΠΣΧ 21	1	0	0	20,7	5,3
ΠΣΧ 22	0	0	1	8,7	2,1
ΠΣΧ 23	0	0	0	9,1	2,2
ΠΣΧ 24	0	1	0	27,9	8,5
ΠΣΧ 25	0	0	0	25,3	7,8
ΠΣΧ 26	0	0	1	43	5,1
ΠΣΧ 27	0	0	1	27,4	5,6
ΠΣΧ 28	0	1	0	6,4	1,7
ΠΣΧ 29	0	1	0	12,2	2,6
ΠΣΧ 30	0	0	1	11,6	2,4
ΠΣΧ 31	0	0	0	4	1,9
ΠΣΧ 32	0	1	0	11,9	3,1
ΠΣΧ 33	0	1	0	8,9	2,4
ΠΣΧ 34	0	0	0	6,9	1,5
ΠΣΧ 35	0	0	0	13,6	2,6
ΠΣΧ 36	0	0	1	6,3	1,5

ΠΣΧ 37	0	0	0	5,4	1,5
ΠΣΧ 38	0	1	0	8,6	3,2
<b>prob_id</b>	<b>cANCA</b>	<b>pANCA</b>	<b>Atypical ANCA</b>	<b>PR3 ELISA [AU]</b>	<b>MPO ELISA [AU]</b>
	<b>pos/neg</b>	<b>pos/neg</b>	<b>pos/neg</b>	<b>pos &gt; 10 U/ml</b>	<b>pos &gt; 10 U/ml</b>
ΠΣΧ 39	0	0	0	3,4	1,4
ΠΣΧ 40	0	0	1	8,8	2,7
ΠΣΧ 41	0	0	0	7,2	1,4
ΠΣΧ 42	0	0	1	9,4	2,1
ΠΣΧ 43	0	0	1	8,1	2,1
ΠΣΧ 44	0	0	1	7,6	1,5
ΠΣΧ 45	0	0	1	<b>24</b>	2,8
AH-1 10	0	0	1	<b>22</b>	10
AH-1 14	0	1	0	7,5	6,7
AH-1 18	0	0	0	4,2	1,6
AH-1 19	0	0	1	6,8	8,4
AH-1 20	0	0	1	7,6	4,2
AH-1 23	0	1	0	7	5,3
AH-1 25	0	0	1	<b>15,3</b>	5,7
AH-1 27	0	1	0	9	2,6
AH-1 48	0	1	0	<b>11,3</b>	<b>13,5</b>
AH-1 53	0	0	1	3,9	2,7
AH-2 2	0	0	0	3,1	1,8
AH-2 13	0	1	0	<b>28,1</b>	8
AH-2 27	0	0	0	4,8	4,6
AH-2 38	0	0	0	3,5	2,2
AH-2 53	0	0	0	2,8	2,1
AH-2 65	0	0	0	4,3	2,1
AH-2 69	0	0	1	6,4	5,6
AH-2 130	0	0	0	2,7	2,7
AH-2 143	0	1	0	6	<b>22,7</b>
AH-2 164	0	0	0	5,1	2,2

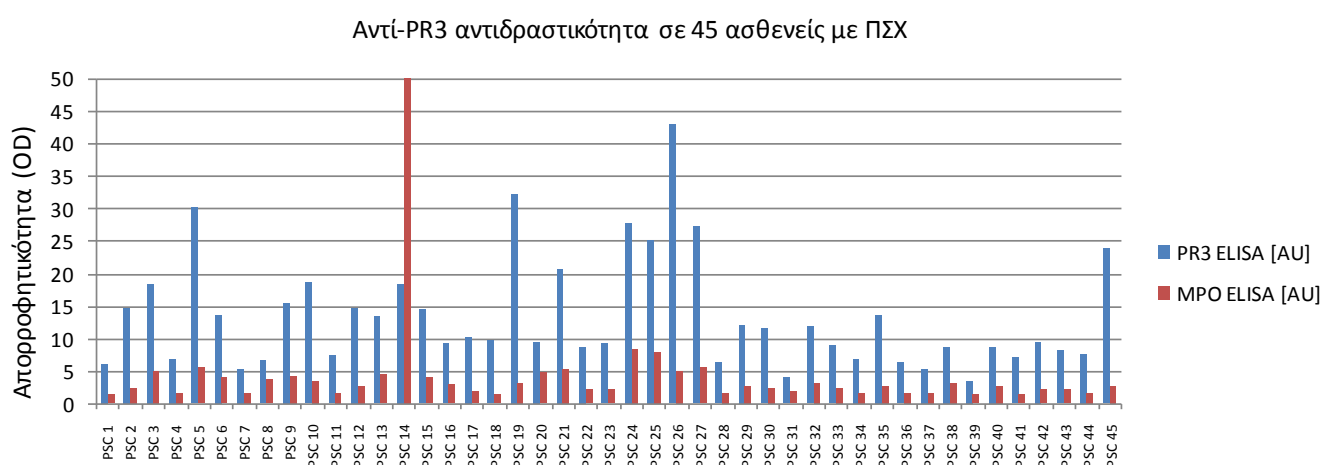


Πίνακας 4.14 (συνέχεια)

prob_id	cANCA	pANCA	Atypical ANCA	PR3 ELISA [AU]	MPO ELISA [AU]
	pos/neg	pos/neg	pos/neg	pos > 20 U/ml	pos > 20 U/ml
EK-1	0	1	0	6,8	1,7
EK-2	0	1	0	10,4	1,8
EK-3	0	0	1	6,7	1,6
EK-4	0	0	0	17,6	4,1
EK-5	0	0	1	6,6	1,6
EK-6	0	0	1	6,6	1,7
EK-7	0	1	0	9,1	2,4
EK-8	0	0	0	5,8	1
EK-9	0	0	0	7,6	1,9
EK-10	0	0	1	4,8	1
EK-11	0	0	1	4,5	10,3
EK-12	0	1	0	5,6	1,1
EK-13	0	0	1	9,7	2,4
EK-14	0	0	1	14,4	2
EK-15	0	0	1	6,2	1,1
EK-16	0	0	1	3,9	1
EK-17	0	1	0	11,7	4,2
EK-18	0	0	0	6,3	1,1
EK-19	0	0	1	14,4	4,2
EK-20	0	0	1	11	2,2
EK-21	0	0	0	17,7	3,6
EK-22	0	0	0	6,8	1
EK-23	0	0	0	5,1	1
EK-24	0	0	1	4,1	1,6
EK-25	0	0	1	8,9	1,6
EK-26	0	0	1	58,3	1,7
EK-27	0	0	1	7,5	1,2
EK-28	0	1	0	4,9	1
EK-29	0	0	1	4,9	1,7
EK-30	0	0	1	8,2	3,3

Το cut off για την θετικότητα της μεθόδου για το PR3 και το MPO ορίστηκε στις 20 AU (mean+5SD), ενώ οι ασθενείς με 10-19 AU θεωρήθηκαν borderline. Αντί-PR3 αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε 8/45 (18%) των ΠΣΧ ασθενών, σε σύγκριση με 1/20

(5%) ΑΗ ασθενείς και 1/30 (3.33%) ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα ( $p < 0.05$  ΠΣΧ vs ΑΗ ή ΠΣΧ vs ΕΚ). Τα αποτελέσματα της ELISA για τον προσδιορισμό της αντι-PR3 και αντι-MPO αντιδραστικότητας σε 45 ασθενείς με ΠΣΧ παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.14.



**Εικόνα 4.14.** Αντί-PR3 αντισώματα σε 45 ασθενείς με ΠΣΧ χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμη ELISA (Generic Assays AG)

Σχετικά πρόσφατα δημοσιεύτηκε μελέτη που αναφέρει ότι ο αντιγονικός στόχος των άτυπων ANCA στην ΠΣΧ (και γενικότερα στα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος που χαρακτηρίζονται από άτυπα ANCA) είναι η TBB5 και όχι τα PR3 ή MPO αυτοαντιγόνα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε ανασυνδυασμένη TBB5 (Euroimmun) και αναπτύξαμε ανοσοαποτύπωση και *in house* ELISA για την ανίχνευσή του. Αντιπροσωπευτικά πειράματα ανοσοαποτύπωσης απεικονίζονται στην Εικόνα 4.15. Με βάση τα πειράματα αυτά, στην *in house* ELISA

χρησιμοποιήθηκαν τελικές συγκεντρώσεις 2 µg/ml του TBB5. Ανάμεσα σε 22 ΠΧΚ ασθενείς με άτυπα ANCA (median 1/80, range 1/40 – 1/320), μόλις 7 (32%) είχαν ανιχνεύσιμα αντί-TBB5 αντισώματα.

#### **4.6. Κύρια χαρακτηριστικά της πρότυπης πολυμετρικής ELISA για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων στα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος**

Τα κύρια χαρακτηριστικά της νέας ELISA συνοψίζονται σχηματικά στην Εικόνα 4.16.

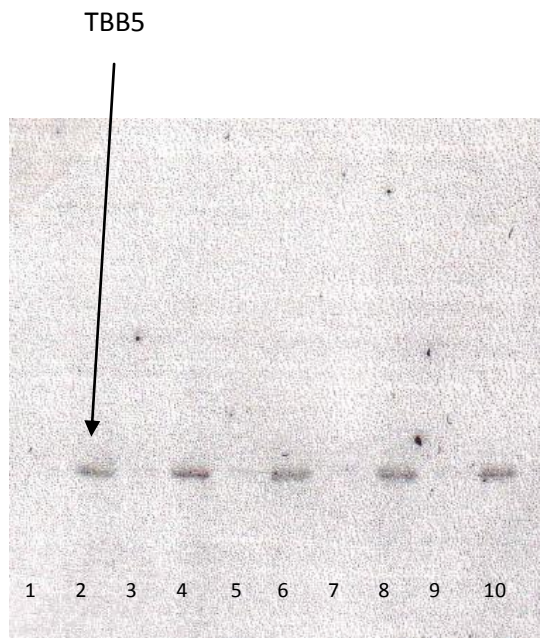
Η ELISA μπορεί να ανιχνεύσει αντισώματα έναντι 12 αντιγονικών στόχων:

1. M2 μιτοχονδριακό αντιγόνο
2. PDC-E2 μιτοχονδριακό αντιγόνο
3. BCOADC-E2 μιτοχονδριακό αντιγόνο
4. OGDC-E2 μιτοχονδριακό αντιγόνο
5. E2-PBO τριπλό υβρίδιο απ τους κύριους επιτόπους των 2,3,4
6. sp100 MND πυρηνικό αντιγόνο
7. gp210 RLM πυρηνικό αντιγόνο
8. nup62 RLM πυρηνικό αντιγόνο
9. CYP2D6 LKM1 μικροσωμιακό ηπατικό αντιγόνο
10. FTCD LC1 κυτοσολικό ηπατικό αντιγόνο
11. SLA ηπατικό αντιγόνο

## 12. TBB5 ANCA αντιγόνο

Με πειράματα ανοσοαποτύπωσης διαπιστώθηκε ότι το M2 αντιγόνο εμπεριέχει και τις υπομονάδες PDC-E1α και PDC-E1β. Σε συνάρτηση με τα παραπάνω η πρότυπη ELISA προσμετρά αντιγονοειδικές αποκρίσεις σε τουλάχιστον 14 αυτοαντιγόνα. Για κάθε ένα από τα αυτοαντισώματα υπάρχει ένα negative και ένα positive control. Επίσης, για κάθε ένα από τα αυτοαντιγόνα υπάρχει διαθέσιμος έτοιμος προς χρήση ορός η απορροφητικότητα του οποίου ισούται με το cut off της απόκρισης πάνω από την οποία το τεστ θεωρείται θετικό.

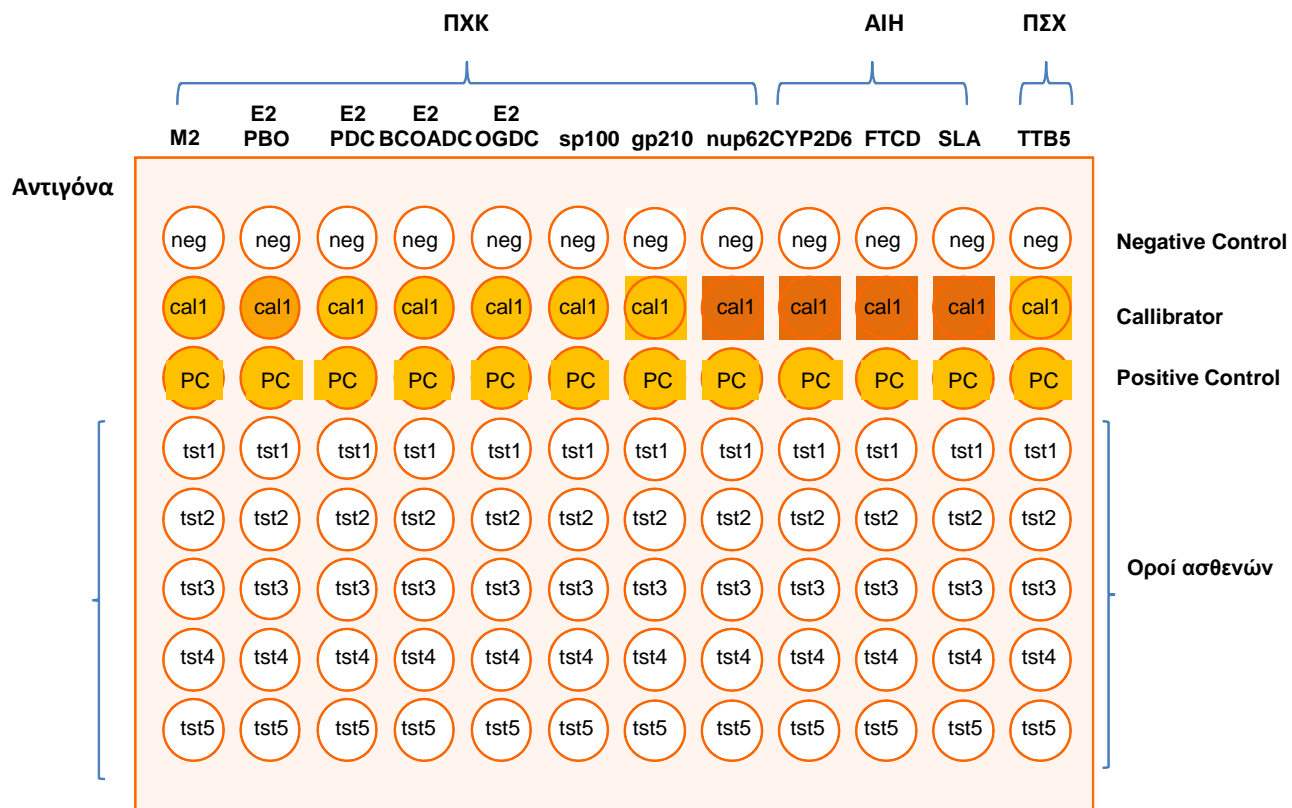
Κάθε ένα από τα πιάτα (αεροστεγώς κλεισμένα σε ειδικές σακούλες) μπορεί να αποθηκευτεί χωρίς αλλοίωση των χαρακτηριστικών του για τουλάχιστον 6 μήνες.



Lanes 1,3,5,7,9 1 µg/lane &  
lanes 2,4,6,8,10 0,1 µg/lane

**Εικόνα 4.15.** (Αριστερά) Ροψεαυ Σχρώση της μεμβράνης που παρήχθη με τεχνική ανοσοαποτύπωσης. Απεικονίζεται το αντιγόνο TBB5 σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις ανά ζεύγη 1-2, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10 (0,1 και 1 µg/lane, αντίστοιχα). (Δεξιά). Αντιδραστικότητα 5 ΡΧΚ ασθενών σε 2 συγκεντρώσεις (οι πρώτοι 2 ασθενείς είναι θετικοί για αντί-TBB5).

Πολυμετρική Μικροπλάκα ELISA Αυτοαντισωμάτων Ηπατοπαθειών



Εικόνα 4.16. Κύρια χαρακτηριστικά πολυμετρικής ELISA για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων στα αυτοάνοσα νοσήματα ήπατος

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### 5.1 ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη διαγνωστική προσέγγιση ασθενών με ΠΧΚ, πρέπει απαραίτητα να γίνεται προσδιορισμός των AMA [69]. Αν υπάρχει κλινική υποψία, ευρύματα χολόστασης και ιστολογικές αλλοιώσεις συμβατές με το νόσημα, ο υπό διερεύνηση ασθενής έχει χωρίς αμφιβολία ΠΧΚ. Το ερωτηματικό που δημιουργείται και αποτελεί αντικείμενο συζήτησης στις ημέρες μας είναι αν σε αυτές τις περιπτώσεις έχει νόημα να ελέγχονται αυτοαντισώματα έναντι MND ή RLM με ΕΑΦ χρησιμοποιώντας ΗΕρ-2 κύτταρα και αν αυτός ο προσδιορισμός πρέπει να γίνεται σε 1<sup>ο</sup> (ταυτόχρονο με τον προσδιορισμό των AMA) ή σε 2<sup>ο</sup> χρόνο (ως reflex τεστ). Η απάντηση είναι απλή: παρόντων των AMA, ο προσδιορισμός των ΠΧΚ-ειδικών αυτοαντισωμάτων δεν έχει καμία επιπλέον διαγνωστική αξία και στην πράξη πρέπει να θεωρείται περιττός. Εξάλλου στην περίπτωση που τα AMA (αντι-M2) είναι θετικά στον ορό, δεν τίθεται το έρωτημα της περαιτέρω διερεύνησης του/των αντιγονικού/αντιγονικών στόχων των AMA και δεν ενδιαφέρει αν αυτά είναι έναντι του PDC-E2 μόνο (σπάνιες περιπτώσεις) ή έναντι συνδυασμού των PDC-E2, OGDC-E2, BCOADC-E2 (η μεγαλύτερη πλειονότητά τους), ή αποκλειστικά έναντι άλλων υπομονάδων του PDC (όπως για παράδειγμα του PDC-E1α) [48].

Όσον αφορά στον προσδιορισμό με ΕΑΦ των ΠΧΚ-ειδικών ANA χρησιμοποιώντας ιστοικές τομές αρουραίου ή κυρίως ΗΕρ-2, αυτή θεωρείται απολύτως απαραίτητη όταν υπάρχει κλινική υποψία ΠΧΚ αλλά τα τεστ για AMA είναι απολύτως και κατεξακολούθηση αρνητικά. Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται ΗΕρ-2 ή

επεξεργασμένα HEp-20-10, το ποσοστό των ασθενών με θετικά ειδικά για την ΠΧΚ αυτοαντισώματα μπορεί να κυμαίνεται από 30-75% [54, 77]. Η ύπαρξη τους επιβεβαιώνει την κλινική υποψία της ΠΧΚ. Σε τέτοιες περιπτώσεις ή σε περιπτώσεις με οριακό τίτλο AMA, ο προσδιορισμός των AMA σε μοριακό επίπεδο μπορεί να διευκολύνει την αναγνώριση αληθώς AMA θετικών περιπτώσεων και αυτό γιατί παρότι οι ορού αυτοί έχουν οριακούς τίτλους AMA με ΕΑΦ, μπορεί να εμφανίζουν μέτριους ή ακόμη και αυξημένους τίτλους έναντι του PDC-E2 ή άλλων μιτοχονδριακών αυτοαντισωμάτων [72, 88, 222]. Σε μια τέτοια μελέτη του εργαστηρίου μας στην οποία συμμετείχε και ο υποψήφιος, η αντιδραστικότητα σε μια τουλάχιστον ζώνη (μπάντα) μιτοχονδριακών αντιγόνων (εύρος 1-12 μπάντες) παρατηρήθηκε σε 96% των ΠΧΚ ασθενών, εκ των οποίων μόλις το 75% αναγνώρισαν την κυρίαρχη 74 kDaPDC-E2 [54]. Τόσο η ένταση όσο και ο αριθμός των μπαντών διέφερε μεταξύ ασθενών. Η συγκεκριμένη μελέτη ανέδειξε την ανάγκη συνδυασμένου προσδιορισμού των AMA με ΕΑΦ και μοριακές τεχνικές (ανοσοαποτύπωση, ELISA κ.α.). Το γεγονός ότι 25% των ασθενών δεν αναγνωρίζουν το PDC-E2 (με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης) και ότι οι ΕΑΦ τίτλοι των AMA δεν σχετίζονται απόλυτα με την ένταση του PDC-E2 καταδεικνύει με πειστικό τρόπο ότι ή χρήση αποκλειστικά του PDC-E2 για την ανίχνευση των AMA σε μοριακό επίπεδο είναι ανεπαρκής και εσφαλμένη. Με βάση αυτά τα δεδομένα, οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ανίχνευση των AMA πρέπει να βασίζεται σε συνδυασμό των κύριων επιτόπων ή σε εκχυλίσματα μιτοχονδριακών κλασμάτων [54]. Το πλεονέκτημα της πρώτης επιλογής που ακολουθείται από πολλούς κατασκευαστές και εργαστήρια που χρησιμοποιούν *in house* τεχνικές είναι ότι οι τελικές συγκεντρώσεις των αυτοαντιγόνων ελέγχονται από το χρήστη σε αντίθεση



με τα εκχυλίσματα μιτοχονδριακών κλασμάτων (συνήθως από καρδιά βοοειδών) στα οποία η τελική συγκέντρωση των αυτοαντιγόνων διαφέρει και δεν δύναται επακριβώς να προσδιοριστεί. Επιπλέον, η καθαρότητα των εκχυλίσματων σε άλλα ανεπιθύμητα αντιγόνα-πρωτεΐνες δεν δύναται να προκαθοριστεί. Ωστόσο, πειράματα που να εξετάζουν με λεπτομέρεια την αντιδραστικότητα σε καθεμία από τις E2 υπομονάδες των PDC, OGDC και BCOADC είναι μεμονωμένα.

Ο λόγος για τον οποίο σε πολλές περιπτώσεις τεχνικές ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων στηριζόμενες σε ανασυνδυασμένα ή κεκαθαρμένα αυτοαντιγόνα είναι πιο ευαίσθητες από τον ΕΑΦ έχει συζητηθεί εκτενώς σε δικές μας μελέτες, μελέτες συνεργαζόμενων εργαστηρίων ή ανεξάρτητων συγγραφέων και σχετίζεται κυρίως με την αυξημένη αντιγονικότητα της ELISA και την διατήρηση των δομών των επιτόπων που ως γνωστόν για τα AMA είναι κυρίως στερεοτακτικοί (conformational) [53].

Μπορεί λοιπόν η χρησιμοποίηση των προφίλ για αυτοαντισώματα του ήπατος να θεωρείται περιττή από πολλούς ερευνητές, ωστόσο υπάρχουν και άλλοι που λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω και προκειμένου να αποφεύγουν οι επαναλαμβανόμενες αιμοληψίες και ακριβές παρακλινικές εξετάξεις (υπέρηχοι, αξονικές, μαγνητικές κ.α) τείνουν να υποστηρίζουν την διενέργεια τουλάχιστον σε 2<sup>ο</sup> χρόνο των προφίλ για την ανίχνευση ΠΧΚ-ειδικών AMA και ANA, καθώς αυτή η στρατηγική θεωρείται οικονομικά πιο αποδοτική σε βάθος χρόνου σε σχέση με άλλες που ακολουθούνται στη καθημέρα πρακτική.

Ο κατεξακολούθηση προσδιορισμός των AMA σε ασθενείς που παρακολουθούνται στα εξωτερικά ηπατολογικά ιατρεία δεν φαίνεται να προσφέρει περισσότερες

κλινικές πληροφορίες σχετικά με την πρόγνωση ή την ανταπόκριση της νόσου στην θεραπευτική αντιμετώπιση ή την εξέλιξη της νόσου. Για το λόγο αυτό και δε συστήνεται. Μεμονωμένες μελέτες σε σχετικά μικρό αριθμό ασθενών που ανέδειξαν την κλινική σημασία ANA της IgG3 υποτάξης χρειάζονται ανεξάρτητη επικύρωση και επιπλέον σπουδή σε μεγάλες ομάδες ασθενών που πρέπει να μελετηθούν προοπτικά.

Ωστόσο, διαφορετικές προσεγγίσεις έχουν διαπιστωθεί όσον αφορά τα ΠΧΚ-ειδικά ANA. Πρόσφατες μελέτες από διάφορες χώρες σε ασθενείς με ΠΧΚ, ανέδειξαν τον προγνωστικό/κλινικό ρόλο των συγκεκριμένων αυτοαντισωμάτων. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που έχουν αμφισβητήσει την κλινική σημασία των ειδικών για την ΠΧΚ ANA και αμφιβάλλουν για την αναγκαιότητα της προσμέτρησής τους κατά τη διάγνωση ή την μακροχρόνια παρακολούθηση των ασθενών. Ίσως, αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι δεν έχουν όλα τα ειδικά για την ΠΧΚ ANA προγνωστική/κλινική σημασία. Η μεγαλύτερη σημασία έχει δοθεί στα αντί-gr210 ANA και γενικότερα τα αυτοαντισώματα έναντι της πυρηνικής μεμβράνης. Επιπλέον αποτελέσματα έρευνας που έχουν δημοσιευθεί από την ερευνητική ομάδα της Παθολογικής Κλινικής και του Ομώνυμου Ερευνητικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνεργασία με το King's College του Λονδίνου έχουν αναδείξει την προγνωστική αξία αποκλειστικά της IgG3 υποτάξης των αυτοαντισωμάτων έναντι των ΠΧΚ-ειδικών ANA αυτοαντισωμάτων [227]. Ίσως αυτό να εξηγεί και τις διχογνωμίες μεταξύ των ερευνητών ως προς τον προγνωστικό ρόλο των αυτοαντισωμάτων αυτών. Οι προοπτικές μελέτες που έχουν μελετήσει τον προγνωστικό ρόλο και την χαρακτηριστικά της συμπεριφοράς (αυξομείωση τίτλου,

αλλάγή υποτάξης IgG, ειδική αντιγονικότητα επιτόπων) των ειδικών για την ΠΧΚ ANA είναι περιορισμένες και δεν μπορούν να οδηγήσουν σε ασφαλή συμπεράσματα. Πολλά από τα προφίλ αυτοαντισωμάτων της ΠΧΚ έχουν συμπεριλάβει πρόσφατα και τα αντι-κεντρομεριδιακά αυτοαντισώματα κυρίως για δυο λόγους [219]. Πρώτον, γιατί η παρουσία τους μπορεί να αναδείξει ασθενείς με συνυπάρχουσα συστηματική σκλήρυνση και δεύτερον γιατί αναφέρονται ευρήματα που συνηγορούν υπέρ της συσχέτισης της παρουσίας τους με ενεργότητα της ηπατιτιδής βλάβης. Με το ίδιο σκεπτικό, η παρουσία στα προφίλ του SLA έχει συσχετιστεί με τη δυνατότητα αναγνώρισης περιπτώσεων ΠΧΚ με συνυπάρχουσα ΑΗ. Πράγματι, έχει πειστικά καταδειχτεί ότι η παρουσία των αντί-SLA αντισωμάτων με ΠΧΚ αποδεικνύουν την ταυτόχρονη ύπαρξη ΑΗ στο ίδιο άτομο. Αντιθέτως, η παρουσία αντι-κεντρομεριδιακών αντισωμάτων ή αντισωμάτων κατά του Ro-52 είναι ενδεικτική αλλά όχι αποδεικτική της πιθανής συνύπαρξης συστηματικής σκλήρυνσης ή *Sicca* συμπτωματολογίας, αντίστοιχα, καθώς σε πολλές περιπτώσεις η παρουσία τους δεν συσχετίζεται με την ύπαρξη των προαναφερόμενων νοσημάτων.

## 5.2 ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάπτυξη πολυμετρικών μεθόδων για την ταυτόχρονη ανίχνευση δεκάδων εκατοντάδων ή ακόμη και χιλιάδων αντιγονειδικών αυτοαντισωμάτων βρίσκεται σε αρκετά προχωρημένο στάδιο. Μια από τις πρώτες μεθόδους που υποσχέθηκαν ότι θα μπορούσαν να ανταποκριθούν στην πρακτική ανάγκη ύπαρξης μιας μεθόδου που θα μπορούσε να ανιχνεύσει δεκάδες αυτοαντισώματα ήταν εκείνη της

πολυπλεξίας με τη χρήση αναλυτή ροής σήματος Luminescence™. Η ικανότητα του αναλυτή να διακρίνει διαφορετικού χρωματισμού σφαιρίδια χρησιμοποιήθηκε για να προσμετρηθούν ταυτόχρονα πολλά αυτοαντισώματα. Η ίδια τεχνολογία χρησιμοποιείται για την ταυτόχρονη προσμέτρηση δεκάδων κυτταροκινών. Καθένα από τα αυτοαντιγόνα συνδέεται με διαφορετικού φθορισμού «χρωματιστό» bead (χάντρα). Καθώς ο αναλυτής ροής μπορεί να διακρίνει το χρώμα του κάθε σφαιριδίου από τα άλλα, και μετρά την ένταση φθορισμού του συζυγούς σε κάθε bead, μπορούν δυνητικά να αναλυθούν πολλαπλές αντιγονοειδικές αντιδραστικότητες αφού υπάρχουν δεκάδες διαθέσιμα beads που μπορούν να συζευχθούν με αυτοαντιγόνα. Ωστόσο, η τεχνολογία αυτή έχει περιοριστεί σε μεγάλα εργαστήρια που επεξεργάζονται δεκάδες εκατοντάδες δείγματα ημερησίως. Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που έχει προκύψει είναι η δυσκολία πολλών αυτοαντιγόνων να συνδεθούν με τα bead, μια διαδικασία της οποίας η επιτυχής κατάληξη είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη της τεχνολογίας. Επίσης το υψηλό κόστος αγοράς και συντήρησης του αναλυτή καθώς και το αυξημένο κόστος αγοράς αντιδραστηρίων έχουν περιορίσει τη χρήση της συγκεκριμένης τεχνολογίας συγκριτικά με άλλες μεθόδους όπως την ELISA.

Ένας από τους πρωταρχικούς σκοπούς της διατριβής ήταν να συνεργαστούμε από κοινού με μια από τις μεγαλύτερες ανοσοδιαγνωστικές εταιρείες στο κόσμο για την ανάπτυξη μιας πολυμετρικής μεθόδου που θα χρησιμοποιούσε την συγκεκριμένη τεχνολογία και θα ανίχνευε μεμιάς τα σημαντικά αυτοαντισώματα για τη διάγνωση των αυτοάνοσων νοσημάτων του ήπατος και των κύριων εξωηπατικών αυτοάνοσων διαταραχών τους.

Παρά τα ελπιδοφόρα προκαταρκτικά αποτελέσματα με τα PBO-E2 και gr210 αυτοαντιγόνα, η προσπάθεια δεν καρποφόρησε γιατί η εταιρεία εγκατέλειψε λόγω των τεχνικών δυσκολιών, του αυξημένου κόστους και της μειωμένης ζήτησης την προσπάθεια να ετοιμάσει beads με περισσότερα αυτοαντιγόνα.

Παρά τον σημαντικό αυτό σκόπελο στην ερευνητική μας προσπάθεια, συνεχίσαμε το πειραματικό σκέλος αλλάζοντας στρατηγική και επικεντρώθήκαμε περισσότερο σε πολυμετρικές ELISA. Στην πραγματικότητα, η ανίχνευση πολλαπλών αυτοαντισωμάτων στηρίζεται σε περισσότερο συμβατικές τεχνικές όπως αυτής της πολυμετρικής ανίχνευσης χρησιμοποιώντας προφίλ ELISA, όπως αυτές για τα ENA (τα προφίλ 5 και 8 είναι τα πιο διαδεδομένα). Το συγκριτικό ελάττωμα της κλασικής μονοπαραμετρικής ELISA σε σχέση με τα προφίλ είναι ότι κάθε φορά που πρέπει να ελεχθεί ένας ορός, απαιτείται η χρήση μιας σειράς από standards, θετικού και αρνητικού control. Οκτώ με δώδεκα φρεάτια (το 1/12 με 1/8 του κιτ) μπορεί να απαιτούνται κάθε φορά μόνο για την προσδιορισμό ενός ορού. Η χρησιμοποίηση των προφίλ δεν λύνει σε σημαντικό βαθμό το πρόβλημα της υπερκατανάλωσης φρεατίων για τη χρήση των standards. Απλά διευκολύνει την προσμέτρηση διαφορετικών αυτοαντισωμάτων στην ίδια μικροπλάκα χρησιμοποιώντας σετ φρεατίων επικαλυπτόμενα με διαφορετικά αυτοαντιγόνα, παρέχοντας τα ανάλογα standards.

Τα προβλήματα αυτά φαίνεται τουλάχιστον σε ένα σημαντικό βαθμό να λύνονται με τη χρήση των line/dot μεθόδων. Από την χρονιά έναρξης της συγκεκριμένης διατριβής μέχρι και σήμερα περισσότερες από 5 διαφορετικές εκδόσεις τέτοιων

μεθόδων από διαφορετικές εταιρίες έχουν αναπτυχθεί και έχουν κυκλοφορήσει στην αγορά.

Σε διάφορα στάδια της διατριβής πειραματιστήκαμε με την ανάπτυξη γραμμικού ή κοκκώδους ανοσοπροσδιορισμού. Για παράδειγμα αναπτύξαμε με επιτυχία κοκκώδη ανοσοπροσδιορισμό που συμπεριελάμβανε τα κύρια μιτοχονδριακά αυτοαντιγόνα και το RLM-ειδικό pnr62 πυρηνικό αυτοαντιγόνο. Η μέθοδος είναι εύκολη στη χρήση της και απλή και μπορεί να ολοκληρωθεί σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα από τον χειριστή χωρίς την χρήση εξειδικευμένου εξοπλισμού (μικροσκόπιο, ELISA reader κλπ). Τα αποτελέσματα είναι ορατά με γυμνό μάτι και μπορούν να ποσοτικοποιηθούν με τη χρήση ειδικού λογισμικού και scanner που εκφράζει τα αποτελέσματα σε AU, όπως αυτά που είναι εμπορικά διαθέσιμα.

Στην πλαστική μεμβράνη που τοποθετούνται τα κομμάτια της μεμβράνης με το αντιγόνο μπορούν να τοποθετηθούν 8-15 αυτοαντιγόνα. Στο μέλλον θα πρέπει να διερευνηθεί αν τέτοιου είδους γραμμικοί ή κοκκώδεις ανοσοπροσδιορισμοί έχουν την ίδια ή και καλύτερη ευαισθησία από τις διαθέσιμες στο εμπόριο [219].

Επιπρόσθετα αυτοαντιγόνα που θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν είναι εκείνα συχνών αυτοάνοσων εξωηπατικών νοσημάτων όπως της αυτοάνοσης θυροειδίτιδας, του συνδρόμου Sjögren's, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της συστηματικής σκληρυνσης, των φλεγμονωδών νοσημάτων του εντέρου κ.α.

Συμπερασματικά, αναπτύξαμε μια πρότυπη ELISA με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για αυτοαντισώματα που σχετίζονται με τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος. Η ELISA μπορεί να ανιχνεύσει αυτοαντισώματα έναντι 12 αυτοαντιγόνων,

όλα εκ των οποίων είναι καθοριστικά για την διαγνωστική προσέγγιση ασθενών με πρωτοπαθή χολική κίρρωση, αυτοάνοση ηπατίτιδα και πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kaplan, M.M. and M.E. Gershwin, *Primary biliary cirrhosis*. N Engl J Med, 2005. **353**(12): p. 1261-73.
2. Lindor, K.D., et al., *Primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2009. **50**(1): p. 291-308.
3. Neuberger, J., *Primary biliary cirrhosis*. Lancet, 1997. **350**(9081): p. 875-9.
4. Muratori, P., et al., *Clinical and serological profile of primary biliary cirrhosis in men*. QJM, 2007. **100**(8): p. 534-5.
5. Smyk, D.S., et al., *Sex differences associated with primary biliary cirrhosis*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 610504.
6. Beuers, U., et al., *Changing Nomenclature for PBC: From 'Cirrhosis' to 'Cholangitis'*. Gastroenterology, 2015.
7. Prince, M.I., et al., *Asymptomatic primary biliary cirrhosis: clinical features, prognosis, and symptom progression in a large population based cohort*. Gut, 2004. **53**(6): p. 865-70.
8. Lammers, W.J., et al., *Levels of alkaline phosphatase and bilirubin are surrogate end points of outcomes of patients with primary biliary cirrhosis: an international follow-up study*. Gastroenterology, 2014. **147**(6): p. 1338-49 e5; quiz e15.
9. Prince, M., et al., *Survival and symptom progression in a geographically based cohort of patients with primary biliary cirrhosis: follow-up for up to 28 years*. Gastroenterology, 2002. **123**(4): p. 1044-51.
10. Prince, M.I. and O.F. James, *The epidemiology of primary biliary cirrhosis*. Clin Liver Dis, 2003. **7**(4): p. 795-819.
11. Hamlyn, A.N. and S. Sherlock, *The epidemiology of primary biliary cirrhosis: a survey of mortality in England and Wales*. Gut, 1974. **15**(6): p. 473-9.
12. Selmi, C., et al., *Genetics and geoepidemiology of primary biliary cirrhosis: following the footprints to disease etiology*. Semin Liver Dis, 2005. **25**(3): p. 265-80.
13. Parikh-Patel, A., et al., *The geoepidemiology of primary biliary cirrhosis: contrasts and comparisons with the spectrum of autoimmune diseases*. Clin Immunol, 1999. **91**(2): p. 206-18.
14. Triger, D.R., *Primary biliary cirrhosis: an epidemiological study*. Br Med J, 1980. **281**(6243): p. 772-5.
15. Myszor, M. and O.F. James, *The epidemiology of primary biliary cirrhosis in north-east England: an increasingly common disease?* Q J Med, 1990. **75**(276): p. 377-85.
16. James, O.F., et al., *Primary biliary cirrhosis once rare, now common in the United Kingdom?* Hepatology, 1999. **30**(2): p. 390-4.
17. Metcalf, J. and O. James, *The geoepidemiology of primary biliary cirrhosis*. Semin Liver Dis, 1997. **17**(1): p. 13-22.
18. Sarin, S.K., et al., *Primary biliary cirrhosis in India*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2006. **5**(1): p. 105-9.
19. Samanta, A.K., et al., *Primary biliary cirrhosis in India*. Gut, 1973. **14**(6): p. 448-50.

20. Boonstra, K., et al., *Rising incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis: a large population-based study*. Liver Int, 2014. **34**(6): p. e31-8.
21. Pla, X., et al., *Incidence, prevalence and clinical course of primary biliary cirrhosis in a Spanish community*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2007. **19**(10): p. 859-64.
22. Delgado, J.S., et al., *Primary biliary cirrhosis in Southern Israel: a 20 year follow up study*. Eur J Intern Med, 2012. **23**(8): p. e193-8.
23. Rigopoulou, E.I. and D.P. Bogdanos, *Is primary biliary cirrhosis rare or common? The truth lies somewhere in between*. Liver Int, 2014. **34**(7): p. e165-7.
24. Smyk, D., et al., *PBC triggers in water reservoirs, coal mining areas and waste disposal sites: from Newcastle to New York*. Dis Markers, 2010. **29**(6): p. 337-44.
25. Smyk, D., et al., *Autoimmunity and environment: am I at risk?* Clin Rev Allergy Immunol, 2012. **42**(2): p. 199-212.
26. Wang, L., et al., *Breach of tolerance: primary biliary cirrhosis*. Semin Liver Dis, 2014. **34**(3): p. 297-317.
27. Gershwin, M.E. and I.R. Mackay, *The causes of primary biliary cirrhosis: Convenient and inconvenient truths*. Hepatology, 2008. **47**(2): p. 737-45.
28. Selmi, C., et al., *Primary biliary cirrhosis*. Lancet, 2011. **377**(9777): p. 1600-9.
29. Bogdanos, D.P., et al., *Microbial mimics are major targets of crossreactivity with human pyruvate dehydrogenase in primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 2004. **40**(1): p. 31-9.
30. Chen, R.C., et al., *Antimitochondrial antibody heterogeneity and the xenobiotic etiology of primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2013. **57**(4): p. 1498-508.
31. Varyani, F.K., J. West, and T.R. Card, *An increased risk of urinary tract infection precedes development of primary biliary cirrhosis*. BMC Gastroenterol, 2011. **11**: p. 95.
32. Prince, M.I., S.J. Ducker, and O.F. James, *Case-control studies of risk factors for primary biliary cirrhosis in two United Kingdom populations*. Gut, 2010. **59**(4): p. 508-12.
33. Smyk, D., et al., *Hair dyes as a risk for autoimmunity: from systemic lupus erythematosus to primary biliary cirrhosis*. Auto Immun Highlights, 2013. **4**(1): p. 1-9.
34. Smyk, D.S., et al., *Urinary tract infection as a risk factor for autoimmune liver disease: from bench to bedside*. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2012. **36**(2): p. 110-21.
35. Ala, A., et al., *Increased prevalence of primary biliary cirrhosis near Superfund toxic waste sites*. Hepatology, 2006. **43**(3): p. 525-31.
36. McNally, R.J., S. Ducker, and O.F. James, *Are transient environmental agents involved in the cause of primary biliary cirrhosis? Evidence from space-time clustering analysis*. Hepatology, 2009. **50**(4): p. 1169-74.
37. Burroughs, A.K., et al., *Bacteriuria and primary biliary cirrhosis*. Gut, 1984. **25**(2): p. 133-7.
38. Shimoda, S., et al., *Mimicry peptides of human PDC-E2 163-176 peptide, the immunodominant T-cell epitope of primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2000. **31**(6): p. 1212-6.
39. Selmi, C., et al., *Patients with primary biliary cirrhosis react against a ubiquitous xenobiotic-metabolizing bacterium*. Hepatology, 2003. **38**(5): p. 1250-7.
40. Smyk, D.S., E.I. Rigopoulou, and D.P. Bogdanos, *Potential Roles for Infectious Agents in the Pathophysiology of Primary Biliary Cirrhosis: What's New?* Curr Infect Dis Rep, 2013. **15**(1): p. 14-24.
41. Zografos, T.A., et al., *Primary biliary cirrhosis-specific autoantibodies in first degree relatives of Greek primary biliary cirrhosis patients*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(34): p. 4721-8.



42. Selmi, C., et al., *Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment*. *Gastroenterology*, 2004. **127**(2): p. 485-92.
43. Hirschfield, G.M., et al., *Primary biliary cirrhosis associated with HLA, IL12A, and IL12RB2 variants*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(24): p. 2544-55.
44. Donaldson, P.T., et al., *HLA class II alleles, genotypes, haplotypes, and amino acids in primary biliary cirrhosis: a large-scale study*. *Hepatology*, 2006. **44**(3): p. 667-74.
45. Onishi, S., et al., *DNA typing of HLA class II genes; DRB1\*0803 increases the susceptibility of Japanese to primary biliary cirrhosis*. *J Hepatol*, 1994. **21**(6): p. 1053-60.
46. Yao, Y., et al., *Distinct from its canonical effects, deletion of IL-12p40 induces cholangitis and fibrosis in interleukin-2Ralpha(-/-) mice*. *J Autoimmun*, 2014. **51**: p. 99-108.
47. Rigopoulou, E.I. and G.N. Dalekos, *Molecular diagnostics of primary biliary cirrhosis*. *Expert Opin Med Diagn*, 2008. **2**(6): p. 621-34.
48. Bogdanos, D.P., H. Baum, and D. Vergani, *Antimitochondrial and other autoantibodies*. *Clin Liver Dis*, 2003. **7**(4): p. 759-77, vi.
49. Invernizzi, P., et al., *Comparison of the clinical features and clinical course of antimitochondrial antibody-positive and -negative primary biliary cirrhosis*. *Hepatology*, 1997. **25**(5): p. 1090-5.
50. Walker, J.G., et al., *Serological Tests in Diagnosis of Primary Biliary Cirrhosis*. *Lancet*, 1965. **1**(7390): p. 827-31.
51. Berg, P.A., D. Doniach, and I.M. Roitt, *Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. I. Localization of the antigen to mitochondrial membranes*. *J Exp Med*, 1967. **126**(2): p. 277-90.
52. Frazer, I.H., et al., *Reactivity of anti-mitochondrial autoantibodies in primary biliary cirrhosis: definition of two novel mitochondrial polypeptide autoantigens*. *J Immunol*, 1985. **135**(3): p. 1739-45.
53. Gershwin, M.E., et al., *Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis*. *J Immunol*, 1987. **138**(10): p. 3525-31.
54. Rigopoulou, E.I., 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. **380**(1-2): p. 118-21.
55. Odin, J.A., et al., *Bcl-2-dependent oxidation of pyruvate dehydrogenase-E2, a primary biliary cirrhosis autoantigen, during apoptosis*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(2): p. 223-32.
56. Lleo, A., et al., *Apoptosis and the biliary specificity of primary biliary cirrhosis*. *Hepatology*, 2009. **49**(3): p. 871-9.
57. Mattalia, A., et al., *Characterization of antimitochondrial antibodies in health adults*. *Hepatology*, 1998. **27**(3): p. 656-61.
58. Mitchison, H.C., et al., *Positive antimitochondrial antibody but normal alkaline phosphatase: is this primary biliary cirrhosis?* *Hepatology*, 1986. **6**(6): p. 1279-84.
59. Metcalf, J.V., et al., *Natural history of early primary biliary cirrhosis*. *Lancet*, 1996. **348**(9039): p. 1399-402.
60. Van Norstrand, M.D., 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): p. 6-11.
61. Nakajima, M., et al., *Detection of IgA, IgM, and IgG subclasses of anti-M2 antibody by immunoblotting in autoimmune cholangitis: is autoimmune cholangitis an early stage of primary biliary cirrhosis?* *J Gastroenterol*, 1999. **34**(5): p. 607-12.

62. Masuda, J., et al., *Correlation between histopathological findings of the liver and IgA class antibodies to 2-oxo-acid dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis*. Dig Dis Sci, 2003. **48**(5): p. 932-8.
63. Gabeta, S., 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. **27**(4): p. 378-87.
64. Gatselis, N.K., et al., *Clinical significance of the fluctuation of primary biliary cirrhosis-related autoantibodies during the course of the disease*. Autoimmunity, 2013. **46**(7): p. 471-9.
65. Mells, G.F., et al., *Impact of primary biliary cirrhosis on perceived quality of life: the UK-PBC national study*. Hepatology, 2013. **58**(1): p. 273-83.
66. Talwalkar, J.A., et al., *Natural history of pruritus in primary biliary cirrhosis*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2003. **1**(4): p. 297-302.
67. Poupon, R., et al., *Clinical and biochemical expression of the histopathological lesions of primary biliary cirrhosis. UDCA-PBC Group*. J Hepatol, 1999. **30**(3): p. 408-12.
68. Allocca, M., et al., *Hypercholesterolaemia is not associated with early atherosclerotic lesions in primary biliary cirrhosis*. Gut, 2006. **55**(12): p. 1795-800.
69. Bogdanos, D.P., et al., *Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(21): p. 3374-87.
70. Vergani, D., et al., *Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group*. J Hepatol, 2004. **41**(4): p. 677-83.
71. Zachou, K., E. Rigopoulou, and G.N. Dalekos, *Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease*. J Autoimmune Dis, 2004. **1**(1): p. 2.
72. Moteki, S., et al., *Use of a designer triple expression hybrid clone for three different lipoyl domain for the detection of antimitochondrial autoantibodies*. Hepatology, 1996. **24**(1): p. 97-103.
73. Nishio, A., et al., *Comparative studies of antimitochondrial autoantibodies in sera and bile in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1997. **25**(5): p. 1085-9.
74. Tanaka, A., et al., *Mucosal immunity and primary biliary cirrhosis: presence of antimitochondrial antibodies in urine*. Hepatology, 2000. **32**(5): p. 910-5.
75. Matsumura, S., et al., *Caspase induction by IgA antimitochondrial antibody: IgA-mediated biliary injury in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2004. **39**(5): p. 1415-22.
76. Muratori, P., et al., *'True' antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis, low sensitivity of the routine assays, or both?* Clin Exp Immunol, 2004. **135**(1): p. 154-8.
77. Rigopoulou, E.I., et al., *Prevalence and clinical significance of isotype specific antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis*. Gut, 2005. **54**(4): p. 528-32.
78. Szosteck, C., et al., *Autoimmune sera recognize a 100 kD nuclear protein antigen (sp-100)*. Clin Exp Immunol, 1987. **68**(1): p. 108-16.
79. Duarte-Rey, C., et al., *Primary biliary cirrhosis and the nuclear pore complex*. Autoimmun Rev, 2012. **11**(12): p. 898-902.
80. Invernizzi, P., et al., *Autoantibodies against nuclear pore complexes are associated with more active and severe liver disease in primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 2001. **34**(3): p. 366-72.
81. Mytilinaiou, M.G., 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. **413**(15-16): p. 1211-6.

82. Zuchner, D., et al., *Prevalence, kinetics, and therapeutic modulation of autoantibodies against Sp100 and promyelocytic leukemia protein in a large cohort of patients with primary biliary cirrhosis*. *Hepatology*, 1997. **26**(5): p. 1123-30.
83. Sternsdorf, T., K. Jensen, and H. Will, *Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1*. *J Cell Biol*, 1997. **139**(7): p. 1621-34.
84. Granito, A., et al., *PML nuclear body component Sp140 is a novel autoantigen in primary biliary cirrhosis*. *Am J Gastroenterol*, 2010. **105**(1): p. 125-31.
85. Ruffatti, A., et al., *Nuclear membrane-staining antinuclear antibody in patients with primary biliary cirrhosis*. *J Clin Immunol*, 1985. **5**(5): p. 357-61.
86. Courvalin, J.C., et al., *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. **86**(1): p. 279-85.
87. Nickowitz, R.E., et al., *Autoantibodies against integral membrane proteins of the nuclear envelope in patients with primary biliary cirrhosis*. *Gastroenterology*, 1994. **106**(1): p. 193-9.
88. Bizzaro, N., et al., *Overcoming a "probable" diagnosis in antimitochondrial antibody negative primary biliary cirrhosis: study of 100 sera and review of the literature*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2012. **42**(3): p. 288-97.
89. Kempinska-Podhorodecka, A., et al., *TRAF1 gene polymorphism correlates with the titre of Gp210 antibody in patients with primary biliary cirrhosis*. *Clin Dev Immunol*, 2012. **2012**: p. 487521.
90. Liu, H., et al., *PBC screen: an IgG/IgA dual isotype ELISA detecting multiple mitochondrial and nuclear autoantibodies specific for primary biliary cirrhosis*. *J Autoimmun*, 2010. **35**(4): p. 436-42.
91. Nakamura, M., et al., *Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis*. *J Hepatol*, 2005. **42**(3): p. 386-92.
92. Wesierska-Gadek, J., et al., *Correlation of initial autoantibody profile and clinical outcome in primary biliary cirrhosis*. *Hepatology*, 2006. **43**(5): p. 1135-44.
93. Wesierska-Gadek, J., et al., *Characterization of autoantibodies against components of the nuclear pore complexes: high frequency of anti-p62 nucleoporin antibodies*. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1109**: p. 519-30.
94. Ludwig, J., E.R. Dickson, and G.S. McDonald, *Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis)*. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 1978. **379**(2): p. 103-12.
95. Mahl, T.C., W. Shockcor, and J.L. Boyer, *Primary biliary cirrhosis: survival of a large cohort of symptomatic and asymptomatic patients followed for 24 years*. *J Hepatol*, 1994. **20**(6): p. 707-13.
96. Springer, J., et al., *Asymptomatic primary biliary cirrhosis: a study of its natural history and prognosis*. *Am J Gastroenterol*, 1999. **94**(1): p. 47-53.
97. Dickson, E.R., et al., *Prognosis in primary biliary cirrhosis: model for decision making*. *Hepatology*, 1989. **10**(1): p. 1-7.
98. Crosignani, A., et al., *Changes in bile acid composition in patients with primary biliary cirrhosis induced by ursodeoxycholic acid administration*. *Hepatology*, 1991. **14**(6): p. 1000-7.
99. Poupon, R.E., et al., *Combined analysis of randomized controlled trials of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis*. *Gastroenterology*, 1997. **113**(3): p. 884-90.
100. Gong, Y., et al., *Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2008(3): p. CD000551.

101. Gong, Y., et al., *Ursodeoxycholic acid for patients with primary biliary cirrhosis: an updated systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials using Bayesian approach as sensitivity analyses*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(8): p. 1799-807.
102. Pares, A., L. Caballeria, and J. Rodes, *Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic Acid*. Gastroenterology, 2006. **130**(3): p. 715-20.
103. Huet, P.M., et al., *Portal hypertension and primary biliary cirrhosis: effect of long-term ursodeoxycholic acid treatment*. Gastroenterology, 2008. **135**(5): p. 1552-60.
104. Lammers, W.J., et al., *Development and Validation of a Scoring System to Predict Outcomes of Patients With Primary Biliary Cirrhosis Receiving Ursodeoxycholic Acid Therapy*. Gastroenterology, 2015.
105. Hirschfield, G.M., et al., *Efficacy of obeticholic acid in patients with primary biliary cirrhosis and inadequate response to ursodeoxycholic acid*. Gastroenterology, 2015. **148**(4): p. 751-61 e8.
106. Hosonuma, K., et al., *A prospective randomized controlled study of long-term combination therapy using ursodeoxycholic acid and bezafibrate in patients with primary biliary cirrhosis and dyslipidemia*. Am J Gastroenterol, 2015. **110**(3): p. 423-31.
107. Rautiainen, H., et al., *Budesonide combined with UDCA to improve liver histology in primary biliary cirrhosis: a three-year randomized trial*. Hepatology, 2005. **41**(4): p. 747-52.
108. Angulo, P., et al., *Oral budesonide in the treatment of patients with primary biliary cirrhosis with a suboptimal response to ursodeoxycholic acid*. Hepatology, 2000. **31**(2): p. 318-23.
109. Heneghan, M.A., et al., *Autoimmune hepatitis*. Lancet, 2013. **382**(9902): p. 1433-44.
110. Zachou, K., et al., *Review article: autoimmune hepatitis -- current management and challenges*. Aliment Pharmacol Ther, 2013. **38**(8): p. 887-913.
111. Soloway, R.D., et al., *Clinical, biochemical, and histological remission of severe chronic active liver disease: a controlled study of treatments and early prognosis*. Gastroenterology, 1972. **63**(5): p. 820-33.
112. Murray-Lyon, I.M., R.B. Stern, and R. Williams, *Controlled trial of prednisone and azathioprine in active chronic hepatitis*. Lancet, 1973. **1**(7806): p. 735-7.
113. Johnson, P.J. and I.G. McFarlane, *Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group*. Hepatology, 1993. **18**(4): p. 998-1005.
114. Alvarez, F., et al., *International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 1999. **31**(5): p. 929-38.
115. Hennes, E.M., et al., *Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis*. Hepatology, 2008. **48**(1): p. 169-76.
116. *EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 2015. **63**(4): p. 971-1004.
117. Krawitt, E.L., *Autoimmune hepatitis*. N Engl J Med, 2006. **354**(1): p. 54-66.
118. Gronbaek, L., H. Vilstrup, and P. Jepsen, *Autoimmune hepatitis in Denmark: incidence, prevalence, prognosis, and causes of death. A nationwide registry-based cohort study*. J Hepatol, 2014. **60**(3): p. 612-7.
119. Yang, F., et al., *Autoimmune hepatitis: East meets west*. J Gastroenterol Hepatol, 2015. **30**(8): p. 1230-6.
120. de Boer, Y.S., et al., *Genome-wide association study identifies variants associated with autoimmune hepatitis type 1*. Gastroenterology, 2014. **147**(2): p. 443-52 e5.

121. Kerkar, N., 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. **170**(3): p. 1481-9.
122. Bogdanos, D.P., et al., *Multiple viral/self immunological cross-reactivity in liver kidney microsomal antibody positive hepatitis C virus infected patients is associated with the possession of HLA B51*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2004. **17**(1): p. 83-92.
123. Vergani, D., et al., *Autoimmune hepatitis*. Semin Immunopathol, 2009. **31**(3): p. 421-35.
124. Vergani, D. and G. Mieli-Vergani, *Cutting edge issues in autoimmune hepatitis*. Clin Rev Allergy Immunol, 2012. **42**(3): p. 309-21.
125. Liberal, R., et al., *Autoimmune hepatitis: a comprehensive review*. J Autoimmun, 2013. **41**: p. 126-39.
126. Longhi, M.S., et al., *Autoantigen-specific regulatory T cells, a potential tool for immune-tolerance reconstitution in type-2 autoimmune hepatitis*. Hepatology, 2011. **53**(2): p. 536-47.
127. Longhi, M.S., et al., *Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis*. J Immunol, 2006. **176**(7): p. 4484-91.
128. Longhi, M.S., et al., *Inhibition of interleukin-17 promotes differentiation of CD25(-) cells into stable T regulatory cells in patients with autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 2012. **142**(7): p. 1526-35 e6.
129. Longhi, M.S., et al., *Impairment of CD4(+)/CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease*. J Hepatol, 2004. **41**(1): p. 31-7.
130. Grant, C.R., et al., *Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis*. Hepatology, 2014. **59**(3): p. 1007-15.
131. Longhi, M.S., et al., *Regulatory T cells in autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 2012. **57**(4): p. 932-3; author reply 933-4.
132. Longhi, M.S., et al., *T-regs in autoimmune hepatitis-systemic lupus erythematosus/mixed connective tissue disease overlap syndrome are functionally defective and display a Th1 cytokine profile*. J Autoimmun, 2013. **41**: p. 146-51.
133. Grant, C.R., et al., *Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and--yet--unanswered questions*. Autoimmun Rev, 2015. **14**(2): p. 105-16.
134. Bogdanos, D.P., G. Mieli-Vergani, and D. Vergani, *Autoantibodies and their antigens in autoimmune hepatitis*. Semin Liver Dis, 2009. **29**(3): p. 241-53.
135. Johnson, G.D., E.J. Holborow, and L.E. Glynn, *Antibody to smooth muscle in patients with liver disease*. Lancet, 1965. **2**(7418): p. 878-9.
136. Terjung, B., et al., *"Atypical p-ANCA" in IBD and hepatobiliary disorders react with a 50-kilodalton nuclear envelope protein of neutrophils and myeloid cell lines*. Gastroenterology, 2000. **119**(2): p. 310-22.
137. Manns, M., et al., *Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen*. Lancet, 1987. **1**(8528): p. 292-4.
138. Stechemesser, E., R. Klein, and P.A. Berg, *Characterization and clinical relevance of liver-pancreas antibodies in autoimmune hepatitis*. Hepatology, 1993. **18**(1): p. 1-9.
139. Wies, I., et al., *Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis*. Lancet, 2000. **355**(9214): p. 1510-5.
140. Smith, M.G., et al., *Hepatic disorders associated with liver-kidney microsomal antibodies*. Br Med J, 1974. **2**(5910): p. 80-4.

141. Homberg, J.C., et al., *Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis*. *Hepatology*, 1987. **7**(6): p. 1333-9.
142. Martini, E., et al., *Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2*. *Hepatology*, 1988. **8**(6): p. 1662-6.
143. Gregorio, G.V., et al., *Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience*. *Hepatology*, 1997. **25**(3): p. 541-7.
144. Mieli-Vergani, G. and D. Vergani, *Autoimmune hepatitis in children*. *Clin Liver Dis*, 2002. **6**(3): p. 623-34.
145. Gatselis, N.K., et al., *Autoimmune hepatitis, one disease with many faces: etiopathogenetic, clinico-laboratory and histological characteristics*. *World J Gastroenterol*, 2015. **21**(1): p. 60-83.
146. Heneghan, M.A., et al., *Management and outcome of pregnancy in autoimmune hepatitis*. *Gut*, 2001. **48**(1): p. 97-102.
147. deLemos, A.S., et al., *Drug-induced liver injury with autoimmune features*. *Semin Liver Dis*, 2014. **34**(2): p. 194-204.
148. Obermayer-Straub, P., C.P. Strassburg, and M.P. Manns, *Autoimmune hepatitis*. *J Hepatol*, 2000. **32**(1 Suppl): p. 181-97.
149. Castiella, A., et al., *Drug-induced autoimmune liver disease: A diagnostic dilemma of an increasingly reported disease*. *World J Hepatol*, 2014. **6**(4): p. 160-8.
150. Muratori, P., et al., *Autoimmune liver disease and concomitant extrahepatic autoimmune disease*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2015. **27**(10): p. 1175-9.
151. Boberg, K.M., et al., *Overlap syndromes: the International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) position statement on a controversial issue*. *J Hepatol*, 2011. **54**(2): p. 374-85.
152. Zachou, K., et al., *Mycophenolate for the treatment of autoimmune hepatitis: prospective assessment of its efficacy and safety for induction and maintenance of remission in a large cohort of treatment-naive patients*. *J Hepatol*, 2011. **55**(3): p. 636-46.
153. Luth, S., et al., *Serologic markers compared with liver biopsy for monitoring disease activity in autoimmune hepatitis*. *J Clin Gastroenterol*, 2008. **42**(8): p. 926-30.
154. Bogdanos, D., et al., *Primary biliary cirrhosis following Lactobacillus vaccination for recurrent vaginitis*. *J Hepatol*, 2008. **49**(3): p. 466-73.
155. Czaja, A.J., *Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis*. *J Hepatol*, 1999. **30**(3): p. 394-401.
156. Bottazzo, G.F., et al., *Classification of smooth muscle autoantibodies detected by immunofluorescence*. *J Clin Pathol*, 1976. **29**(5): p. 403-10.
157. Lidman, K., et al., *Anti-actin specificity of human smooth muscle antibodies in chronic active hepatitis*. *Clin Exp Immunol*, 1976. **24**(2): p. 266-72.
158. Bosch, X., A. Guilabert, and J. Font, *Antineutrophil cytoplasmic antibodies*. *Lancet*, 2006. **368**(9533): p. 404-18.
159. Palioura, S., et al., *The human SepSecS-tRNA<sup>Sec</sup> complex reveals the mechanism of selenocysteine formation*. *Science*, 2009. **325**(5938): p. 321-5.
160. Ma, Y., et al., *Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease*. *Hepatology*, 2002. **35**(3): p. 658-64.
161. Zhang, W.C., et al., *Meta-analysis: diagnostic accuracy of antinuclear antibodies, smooth muscle antibodies and antibodies to a soluble liver antigen/liver pancreas in autoimmune hepatitis*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e92267.
162. Zachou, K., et al., *Anti-SLA/LP alone or in combination with anti-Ro52 and fine specificity of anti-Ro52 antibodies in patients with autoimmune hepatitis*. *Liver Int*, 2015. **35**(2): p. 660-72.

163. Rizzetto, M., F.B. Bianchi, and D. Doniach, *Characterization of the microsomal antigen related to a subclass of active chronic hepatitis*. Immunology, 1974. **26**(3): p. 589-601.
164. Gueguen, M., et al., *Anti-liver kidney microsome antibody recognizes a cytochrome P450 from the IID subfamily*. J Exp Med, 1988. **168**(2): p. 801-6.
165. Manns, M.P., et al., *Major antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P450db1*. J Clin Invest, 1989. **83**(3): p. 1066-72.
166. Bogdanos, D.P. and G.N. Dalekos, *Enzymes as target antigens of liver-specific autoimmunity: the case of cytochromes P450s*. Curr Med Chem, 2008. **15**(22): p. 2285-92.
167. Ma, Y., et al., *Key residues of a major cytochrome P4502D6 epitope are located on the surface of the molecule*. J Immunol, 2002. **169**(1): p. 277-85.
168. Lenzi, M., et al., *Prevalence of non-organ-specific autoantibodies and chronic liver disease in the general population: a nested case-control study of the Dionysos cohort*. Gut, 1999. **45**(3): p. 435-41.
169. Kerkar, N., et al., *Detection of liver kidney microsomal type 1 antibody using molecularly based immunoassays*. J Clin Pathol, 2002. **55**(12): p. 906-9.
170. Durazzo, M., et al., *Heterogeneity of liver-kidney microsomal autoantibodies in chronic hepatitis C and D virus infection*. Gastroenterology, 1995. **108**(2): p. 455-62.
171. Lapierre, P., et al., *Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 1999. **116**(3): p. 643-9.
172. Rigopoulou, E.I., et al., *Autoimmune hepatitis-specific antibodies against soluble liver antigen and liver cytosol type 1 in patients with chronic viral hepatitis*. J Autoimmune Dis, 2007. **4**: p. 2.
173. Muratori, L., et al., *Liver/kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2 autoimmune hepatitis*. Gut, 1998. **42**(5): p. 721-6.
174. Rigopoulou, E.I., et al., *Asialoglycoprotein receptor (ASGPR) as target autoantigen in liver autoimmunity: lost and found*. Autoimmun Rev, 2012. **12**(2): p. 260-9.
175. Hausdorf, G., et al., *Autoantibodies to asialoglycoprotein receptor (ASGPR) measured by a novel ELISA--revival of a disease-activity marker in autoimmune hepatitis*. Clin Chim Acta, 2009. **408**(1-2): p. 19-24.
176. Villalta, D., et al., *Autoantibodies to asialoglycoprotein receptor (ASGPR) in patients with autoimmune liver diseases*. Clin Chim Acta, 2015. **450**: p. 1-5.
177. Liaskos, C., et al., *Development of antimitochondrial antibodies in patients with autoimmune hepatitis: art of facts or an artifact?* J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22**(3): p. 454-5.
178. O'Brien, C., et al., *Long-term follow-up of antimitochondrial antibody-positive autoimmune hepatitis*. Hepatology, 2008. **48**(2): p. 550-6.
179. Dinani, A.M., et al., *Patients with autoimmune hepatitis who have antimitochondrial antibodies need long-term follow-up to detect late development of primary biliary cirrhosis*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2012. **10**(6): p. 682-4.
180. Hartl, J., et al., *Patient selection based on treatment duration and liver biochemistry increases success rates after treatment withdrawal in autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 2015. **62**(3): p. 642-6.
181. Manns, M.P., et al., *Budesonide induces remission more effectively than prednisone in a controlled trial of patients with autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 2010. **139**(4): p. 1198-206.

182. Chapman, R., et al., *Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis*. Hepatology, 2010. **51**(2): p. 660-78.
183. Boonstra, K., U. Beuers, and C.Y. Ponsioen, *Epidemiology of primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis: a systematic review*. J Hepatol, 2012. **56**(5): p. 1181-8.
184. Marelli, L., et al., *Does the severity of primary sclerosing cholangitis influence the clinical course of associated ulcerative colitis?* Gut, 2011. **60**(9): p. 1224-8.
185. Liaskou, E., G.M. Hirschfield, and M.E. Gershwin, *Mechanisms of tissue injury in autoimmune liver diseases*. Semin Immunopathol, 2014. **36**(5): p. 553-68.
186. Henriksen, E.K., E. Melum, and T.H. Karlsen, *Update on primary sclerosing cholangitis genetics*. Curr Opin Gastroenterol, 2014. **30**(3): p. 310-9.
187. Fickert, P., et al., *Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC)*. J Hepatol, 2014. **60**(6): p. 1290-303.
188. Weismuller, T.J., et al., *The challenges in primary sclerosing cholangitis--aetiopathogenesis, autoimmunity, management and malignancy*. J Hepatol, 2008. **48 Suppl 1**: p. S38-57.
189. Folseraas, T., et al., *Extended analysis of a genome-wide association study in primary sclerosing cholangitis detects multiple novel risk loci*. J Hepatol, 2012. **57**(2): p. 366-75.
190. Melum, E., et al., *Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis identifies two non-HLA susceptibility loci*. Nat Genet, 2011. **43**(1): p. 17-9.
191. Karlsen, T.H., et al., *Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis*. Gastroenterology, 2010. **138**(3): p. 1102-11.
192. Liu, J.Z., et al., *Dense genotyping of immune-related disease regions identifies nine new risk loci for primary sclerosing cholangitis*. Nat Genet, 2013. **45**(6): p. 670-5.
193. Angulo, P., et al., *Serum autoantibodies in patients with primary sclerosing cholangitis*. J Hepatol, 2000. **32**(2): p. 182-7.
194. Snook, J.A., et al., *Anti-neutrophil nuclear antibody in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis*. Clin Exp Immunol, 1989. **76**(1): p. 30-3.
195. Hov, J.R., K.M. Boberg, and T.H. Karlsen, *Autoantibodies in primary sclerosing cholangitis*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(24): p. 3781-91.
196. Orth, T., et al., *Identification and characterization of autoantibodies against catalase and alpha-enolase in patients with primary sclerosing cholangitis*. Clin Exp Immunol, 1998. **112**(3): p. 507-15.
197. Roozendaal, C., et al., *Prevalence and clinical significance of anti-lactoferrin autoantibodies in inflammatory bowel diseases and primary sclerosing cholangitis*. Adv Exp Med Biol, 1998. **443**: p. 313-9.
198. Seibold, F., et al., *Neutrophil autoantibodies: a genetic marker in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis*. Gastroenterology, 1994. **107**(2): p. 532-6.
199. Xu, B., et al., *High frequency of autoantibodies in patients with primary sclerosing cholangitis that bind biliary epithelial cells and induce expression of CD44 and production of interleukin 6*. Gut, 2002. **51**(1): p. 120-7.
200. Terjung, B., et al., *p-ANCA in autoimmune liver disorders recognise human beta-tubulin isotype 5 and cross-react with microbial protein FtsZ*. Gut, 2010. **59**(6): p. 808-16.
201. Mahler, M., et al., *PR3-ANCA: a promising biomarker for ulcerative colitis with extensive disease*. Clin Chim Acta, 2013. **424**: p. 267-73.
202. Angulo, P., et al., *Magnetic resonance cholangiography in patients with biliary disease: its role in primary sclerosing cholangitis*. J Hepatol, 2000. **33**(4): p. 520-7.
203. Sinakos, E., et al., *Inflammatory bowel disease in primary sclerosing cholangitis: a robust yet changing relationship*. Inflamm Bowel Dis, 2013. **19**(5): p. 1004-9.



204. Fausa, O., E. Schrumpf, and K. Elgjo, *Relationship of inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis*. *Semin Liver Dis*, 1991. **11**(1): p. 31-9.
205. Schrumpf, E. and K.M. Boberg, *Hepatic and extrahepatic malignancies and primary sclerosing cholangitis*. *Gut*, 2003. **52**(2): p. 165.
206. Bergquist, A., et al., *Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis*. *J Hepatol*, 2002. **36**(3): p. 321-7.
207. Levy, C., et al., *The value of serum CA 19-9 in predicting cholangiocarcinomas in patients with primary sclerosing cholangitis*. *Dig Dis Sci*, 2005. **50**(9): p. 1734-40.
208. Imam, M.H., et al., *High-dose ursodeoxycholic acid increases risk of adverse outcomes in patients with early stage primary sclerosing cholangitis*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011. **34**(10): p. 1185-92.
209. Lindor, K.D., et al., *High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis*. *Hepatology*, 2009. **50**(3): p. 808-14.
210. Triantos, C.K., et al., *Meta-analysis: ursodeoxycholic acid for primary sclerosing cholangitis*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011. **34**(8): p. 901-10.
211. Moncrief, K.J., et al., *The natural history of inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis after liver transplantation--a single-centre experience*. *Can J Gastroenterol*, 2010. **24**(1): p. 40-6.
212. Bogdanos, D.P. and L. Komorowski, *Disease-specific autoantibodies in primary biliary cirrhosis*. *Clin Chim Acta*, 2011. **412**(7-8): p. 502-12.
213. Bizzaro, N., et al., *Automated antinuclear immunofluorescence antibody screening: a comparative study of six computer-aided diagnostic systems*. *Autoimmun Rev*, 2014. **13**(3): p. 292-8.
214. Willitzki, A., et al., *New platform technology for comprehensive serological diagnostics of autoimmune diseases*. *Clin Dev Immunol*, 2012. **2012**: p. 284740.
215. Copple, S.S., et al., *Interpretation of ANA indirect immunofluorescence test outside the darkroom using NOVA view compared to manual microscopy*. *J Immunol Res*, 2014. **2014**: p. 149316.
216. Bogdanos, D.P., et al., *Primary biliary cirrhosis is characterized by IgG3 antibodies cross-reactive with the major mitochondrial autoepitope and its *Lactobacillus* mimic*. *Hepatology*, 2005. **42**(2): p. 458-65.
217. Kim, S., et al., *Evaluation of three automated enzyme immunoassays for detection of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in qualitative and quantitative aspects*. *Rheumatology (Oxford)*, 2010. **49**(3): p. 450-7.
218. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
219. Villalta, D., et al., *Autoantibody profiling of patients with primary biliary cirrhosis using a multiplexed line-blot assay*. *Clin Chim Acta*, 2015. **438**: p. 135-8.
220. Dalekos, G.N., et al., *Epitope mapping of cytochrome P4502D6 autoantigen in patients with chronic hepatitis C during alpha-interferon treatment*. *J Hepatol*, 1999. **30**(3): p. 366-75.
221. Ma, Y., et al., *Establishment of a novel radioligand assay using eukaryotically expressed cytochrome P4502D6 for the measurement of liver kidney microsomal type 1 antibody in patients with autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection*. *J Hepatol*, 1997. **26**(6): p. 1396-402.
222. Oertelt, S., et al., *A sensitive bead assay for antimitochondrial antibodies: Chipping away at AMA-negative primary biliary cirrhosis*. *Hepatology*, 2007. **45**(3): p. 659-65.
223. Kim, Y., et al., *Comparison of automated multiplexed bead-based ANA screening assay with ELISA for detecting five common anti-extractable nuclear antigens and anti-dsDNA in systemic rheumatic diseases*. *Clin Chim Acta*, 2012. **413**(1-2): p. 308-11.

224. Bogdanos, D.P., 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. **39**(10): p. 981-7.
225. Bogdanos, D.P., et al., *Antibodies against homologous microbial caseinolytic proteases P characterise primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 2002. **36**(1): p. 14-21.
226. Dahnrich, C., et al., *New ELISA for detecting primary biliary cirrhosis-specific antimitochondrial antibodies*. Clin Chem, 2009. **55**(5): p. 978-85.
227. Rigopoulou, E.I., et al., *Antimitochondrial antibodies of immunoglobulin G3 subclass are associated with a more severe disease course in primary biliary cirrhosis*. Liver Int, 2007. **27**(9): p. 1226-31.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αυτοαντισώματα που χρησιμοποιούνται για τη διαγνωστική προσέγγιση ασθενών με πιθανά αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος είναι πολλά και μια απλή, λειτουργική, ευαίσθητη και ειδική μέθοδος που να τα προσμετρά ταυτόχρονα δεν έχει αναπτυχθεί μέχρι σήμερα.

Σκοπός: Σκοπός της διατριβής ήταν να αναπτύξει μια πρωτότυπη μέθοδο για την ταυτόχρονη ανίχνευση των διαγνωστικά σημαντικών αυτοαντισωμάτων χρόνιων ηπατοπαθειών.

Μέθοδοι: Χρησιμοποιήθηκαν οροί από ασθενείς με Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση (ΠΧΚ), Αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ) και Πρωτοπαθή Σκληρυντική Χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ) για την ανάπτυξη πολυμετρικής profil ELISA. Χρησιμοποιήθηκαν 11 ανασυνδυασμένα και 1 καθαρό αυτοαντιγόνο.

Αποτελέσματα: Στην πρώτη φάση αναπτύχθηκε μια πολυμετρική ELISA που επιτυχώς προσδιορίζει όλα τα αυτοαντισώματα έναντι των μιτοχονδριακών αντιγόνων (5). Ενώ στη δεύτερη φάση η ELISA εμπλουτίστηκε με 3 πυρηνικά αυτοαντιγόνα με διαγνωστική αξία για την ΠΧΚ. Στη τρίτη φάση η πολυμετρική ELISA εμπλουτίστηκε με 3 κύρια αυτοαντιγόνα για την ΑΗ (σύνολο 11). Στο τελικό στάδιο το ΤΤΒ5 ειδικό αντιγόνο για την ΠΣΧ προστέθηκε επιτυχώς στο panel των αντισωμάτων.

Συμπέρασμα: Η πρωτότυπη ELISA είναι πιο ευαίσθητη και εξίσου ειδική με τις *in house* ELISA που έχουν περιγραφεί και υπερτερεί των εμπορικά διαθέσιμων. Είναι η πρώτη που μπορεί να ανιχνεύσει 12 αυτοαντισώματα ταυτόχρονα.

## **SUMMARY**

Introduction: Autoantibody testing for diagnosis of autoimmune liver disease is demanding. More than a dozen (or more) antigen-specific autoantibodies need to be tested. A multiparametric assay for the simultaneous detection of these autoantibodies is currently missing.

Aim: to develop a prototype profil ELISA for the simultaneous detection of 20 liver related autoantibodies.

Methods: An in house multiparametric ELISA was developed and tested in a large cohort of patients with autoimmune liver diseases.

Results: The ELISA is based on 12 antigenic preparations from mitochondrial (5), nuclear (3) and liver specific (4) antigens. The prototype ELISA is highly sensitive and specific and can be use for the accurate detection of liver autoantibody serology.

Conclusion: This is the first multiparametric liver autoantibody ELISA profil. More antigens can be displayed on the platform in the near future.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής οδήγησε στην ανάπτυξη μιας πρωτότυπης πολυμετρικής ELISA που ανιχνεύει ταυτόχρονα 12 ηπατικά αυτοαντιγόνα τα οποία είναι αναγκαία για τη διάγνωση των αυτοανόσων νοσημάτων του ήπατος.