



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ
ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ.**

ΜΑΝΤΑΚΑ Ν. ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΙΑΤΡΟΣ

Εργαστήριο Γαστρεντερολογίας, Τομέας Παθολογίας

Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων:

-

Ηλίας Κουρούμαλης, Καθηγητής Γαστρεντερολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Συνεπιβλέποντες:

Γρηγόρης Χλουβεράκης, Αναπληρωτής Καθηγητής
Βιοστατιστικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ιωάννης Κουτρομπάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής
Γαστρεντερολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΕΠΙΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ηλίας Κουρούμαλης, Καθηγητής Γαστρεντερολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γρηγόρης Χλουβεράκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοστατιστικής,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ιωάννης Κουτρομπάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γαστρεντερολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Παπαδάκη Ελένη, Καθηγήτρια Αιματολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Σιαφάκας Νικόλαος, Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μουζάς Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γαστρεντερολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τζαρδή Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Ευχαριστίες
2. Περίληψη
3. Abstract
Γενικό Μέρος
4. Εισαγωγικά Στοιχεία
4.1 Ορισμός-Γενικά Χαρακτηριστικά
4.2 Επιδημιολογία
4.3 Αιτιοπαθογενεια
4.3.1 Ο ρόλος των αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων
4.3.2 Ο ρόλος της απόπτωσης των BEC και το οξειδωτικό στρες
4.3.3 Ο ρόλος της κυτταρικής ανοσίας
4.3.4 Ο ρόλος της μη-ειδικής ανοσίας
4.3.5 Ο ρόλος των περιβαλλοντικών παραγόντων
5.3.5.1 Μικρόβια, ιοί
4.3.5.2 Χημικοί Παράγοντες-Ξενοβιοτικά
4.4 Γυναικείο φύλο και ΠΧΚ
4.4.1 Εμβρυϊκός μικροχμαιορισμός
4.4.2 Φυλετικές Ορμόνες
4.4.3 Φυλετικά χρωμοσώματα
4.4.4 Ο ρόλος των γενετικών παραγόντων
4.5 Πειραματικά Μοντέλα
4.5.1 Το μοντέλο του μοριακού μιμητισμού
4.5.2 Determinant density model-Παθογενετικό μοντέλο Jones και συνεργατών
4.5.3 Υπεραπαντητικότητα συστήματος μή ειδικής ανοσίας και αυξημένη έκφραση TLR9.
4.5.4 Το Μοντέλο Ισχαιμικής Βλάβης Μέσω Ενδοθηλινών
4.5.5 Παθογενετικό μοντέλο γήρανσης των κυττάρων και αυτοφαγίας
4.6 Ιστολογικά Χαρακτηριστικά
4.7 Διάγνωση
4.7.1 Διαγνωστικά κριτήρια ΠΧΚ
4.7.2 Κλινική εικόνα ασθενών με ΠΧΚ κατά τη διάγνωση.
4.8 Εργαστηριακά ευρήματα και άλλα αυτοαντισώματα στην ΠΧΚ.
4.8.1 Διαταραχή ηπατικής βιοχημείας
4.8.2 Διαταραχή λιπιδίων ορού
4.8.3 Αυξημένες ανοσοσφαιρίνες IgM η IgG
4.8.4 AMA
4.8.5 ANA
4.8.6 Άλλα αυτοαντισώματα
4.8.6.1 SMA
4.8.6.2 SSA/SSB, ACA και άλλα

4.9 Κοινωνικοδημογραφικά Χαρακτηριστικά Ασθενών
4.10 Παράγοντες κινδύνου-Συννοσηρότητες
4.10.1 Έξεις - Τρόπος ζωής
4.10.2 Ουρολοιμώξεις
4.10.3 Γυναικολογικό ιστορικό
4.10.4 Χειρουργικό Ιστορικό
4.10.5 Καρδιαγγειακή νόσος και ΠΧΚ
4.10.6 Οστεοπόρωση και ΠΧΚ
4.10.7 Καρκίνος και ΠΧΚ
4.10.8 Συνοδά Αυτοάνοσα Νοσήματα
4.11 Πορεία νόσου- Θεραπεία
5. Η έννοια της κληρονομικότητας στην ΠΧΚ
5.1 Ενδοοικογενειακή ΠΧΚ
5.1.1 Μελέτες Διδύμων
5.1.2 Μελέτες συγγενών Α βαθμού
5.1.3 ΠΧΚ στην εκτεταμένη οικογένεια
6. Αυτοανοσία και συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ
7. Ο ρόλος των Γενετικών Πολυμορφισμών στον καθορισμό της κληρονομικότητας στην ΠΧΚ.
7.1 Βασικές Έννοιες
7.1.1 Γενετικοί Πολυμορφισμοί (SNPs)
7.1.2 Πλήρης γονιδιωματική ανάλυση συσχέτισης (Genome-wide association study)
7.2 SNP στην ΠΧΚ
7.2.1 HLA SNPs
7.2.2 SNPs σε γενετικούς τόπους πλησίον HLA στην ΠΧΚ
7.2.3 Κυτταροκίνες και ΠΧΚ
7.2.3.1 Ιντερλευκίνες
7.2.3.2 CTLA4 και ΠΧΚ
7.2.4 Άλλα γονίδια και ο πιθανός ρόλος τους στην ΠΧΚ
7.3 GWAS και άλλοι γενετικοί τόποι σχετιζόμενοι με την ΠΧΚ
7.4 Ο ρόλος γονιδίων που σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου
7.4.1 Ενδοθηλιακή συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου
7.4.2 Ενδοθηλίνες
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
8. Σκοπός της μελέτης
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ
9. Πληθυσμός της μελέτης
9.1 Κλινική έρευνα: Ενημέρωση-Συλλογή υλικού
9.2 Μεθοδολογία κλινικής έρευνας- μελέτης
9.3 Ασθενείς και ομάδα ελέγχου για τη μελέτη γενετικής συσχέτισης .
10. Μεθοδολογία ανίχνευσης γενετικών πολυμορφισμών
I. Απομόνωση DNA
II. Τεχνική PCR και RFLP

II.a Ανάλυση των πολυμορφισμών eNOS intron4 VNTR και exon7
II.b Ανάλυση των πολυμορφισμών CTLA-4 rs231775 και rs3087243
II.c Ανάλυση των πολυμορφισμών EDN-1 rs2071942 και rs5370.
III. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης
11. Ασθενείς και συλλογή στοιχείων για γεωστατιστική μελέτη ΠΧΚ
12. Μεθοδολογία χρόνο-χωρικής ανάλυσης.
13. Στατιστική Ανάλυση
14. Αποτελέσματα
14.1 Αποτελέσματα κλινικής έρευνας
I. Γενικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΠΧΚ στην Κρήτη
II. Δημογραφικά χαρακτηριστικά
III. Αυτοαντισώματα, αυτοάνοσα νοσήματα σε ασθενείς με ΠΧΚ, συγγενείς Α βαθμού και ομάδα ελέγχου.
III.1 Ασθενείς vs Ομάδα ελέγχου
III.2 FDR vs Ομάδας ελέγχου
IV. Συννοσηρότητες, λοιπό ιατρικό ιστορικό
IV.1 Ασθενείς vs Ομάδα ελέγχου
IV.2 Συγγενείς Α βαθμού έναντι ομάδας ελέγχου
V. Γυναικολογικό και αναπαραγωγικό ιστορικό σε ασθενείς, συγγενείς Α και ομάδα ελέγχου
VI. Πολυπαραγοντική ανάλυση
VI.1 Μόνο θήλεα άτομα
VI.2 Με το σύνολο των ασθενών με ΠΧΚ
14.2 Αποτελέσματα εργαστηριακής έρευνας-μελέτης γενετικής συσχέτισης
I. Ο VNTR στο ιντρόνιο 4 της eNOS σχετίζεται με την εμφάνιση ΠΧΚ
II. Αυξημένη συχνότητα του αλληλομόρφου T του πολυμορφισμού eNOS rs1799983 στους ασθενείς με ΠΧΚ Κρητικής καταγωγής
III. Καμία συσχέτιση των πολυμορφισμών CTLA-4 rs231775 και rs3087243 με την εμφάνιση ΠΧΚ ή με το στάδιο της νόσου στην Κρήτη.
IV. Οριακά μη σημαντική συσχέτιση του 'Α' αλληλομόρφου EDN-1 rs2071942 και του 'Τ' αλληλομόρφου rs5370 με τα προχωρημένα στάδια της ΠΧΚ
14.3 Αποτελέσματα γεωστατιστικής μελέτης της ΠΧΚ στην Κρήτη
I. Γενικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΠΧΚ που συμμετείχαν στη γεωστατιστική μελέτη.
II. Επίπτωση και επιπολασμός της ΠΧΚ στην Κρήτη
III. Γεωγραφική κατανομή των ασθενών με ΠΧΚ στην Κρήτη.
IV. Χάρτης πρόβλεψης της ΠΧΚ στην Κρήτη – χωρική συσχέτιση.
V. Χάρτης κινδύνου και χρόνο-χωρική πορεία της ΠΧΚ στην Κρήτη.
15. Συζήτηση

1.ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα καταρχάς να ευχαριστήσω τον Καθηγητή μου κο Κουρουμαλη Ηλία για την ανάθεση του θέματος και την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την παρούσα διδακτορική διατριβή. Τον ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την αμέριστη βοήθεια, την έμπρακτη υποστήριξη και τη συμπαράσταση σε κάθε βήμα του κλινικού ή εργαστηριακού ερευνητικού έργου. Θεωρώ τον εαυτό μου ιδιαίτερα τυχερό που είχα τη δυνατότητα να εργαστώ πλάι σε έναν τόσο σημαντικό 'δάσκαλο'. Δεν μπορώ να μην αναγνωρίσω την αγάπη με την οποία με δέχτηκε στην κλινική και το εργαστήριο, την προθυμία να απαντήσει σε κάθε ερώτημα μου, τις εύστοχες παρατηρήσεις και τη μεταλαμπάδευση της γνώσης που μου προσέφερε.

Επιπρόσθετα σημαντική ήταν η βοήθεια της Επιμελήτριας Α της Γαστρεντερολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, κας Κουλεντακη Μαίρης. Από το ξεκίνημα του εγχειρήματος έως και το τέλος με στήριξε αλόγιστα. Η βοήθεια ήταν σημαντική από τη συλλογή του δείγματος, μέχρι την οργάνωση της κλινικής έρευνας και τη συγγραφή των εργασιών-δημοσιεύσεων που προέκυψαν. Οι παρατηρήσεις και οι υποδείξεις της πάντα εύστοχες, οδήγησαν στη βελτίωση του αποτελέσματος. Την ευχαριστώ θερμά για το ενδιαφέρον της και την προθυμία της να με συμβουλέψει και να με δεχτεί στο Εξωτερικό Ηπατολογικό Ιατρείο της Γαστρεντερολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.

Αναμφισβήτητα η συμβολή του αναπληρωτή καθηγητή Γενετικής (Μοριακής γενετικής του ανθρώπου με έμφαση στην παθολογία), στο τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Κρήτης, κου Γουλιέλμου Γεώργιου, ήταν παραπάνω από σημαντική. Όχι μόνο μου παρείχε τις απαραίτητες θεωρητικές και τεχνικές γνώσεις για την έναρξη και ολοκλήρωση των πολυμορφισμών γονιδίων στο εργαστήριο, αλλά επιπλέον ήταν δίπλα μου σε κάθε πρόβλημα τεχνικό που προέκυπτε και με προθυμία με οδηγούσε στην άμεση επίλυση του. Πραγματικά τον ευχαριστώ και ένα μεγάλο μέρος της επιτυχίας αυτής της εργασίας οφείλεται στην καλή συνεργασία μας.

Σημαντική ήταν επίσης και η συμβολή της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Παθολογικής Ανατομικής κας Τζαρδη Μαρίας, στην εμπέδωση και εν τω βαθει κατανόηση των ιστολογικών χαρακτηριστικών της νόσου, αλλά και στην περαιτέρω αναζήτηση από το αρχείο καταγραφής βιοψιών ήπατος, των ασθενών με ΠΧΚ.

Ευχαριστώ επίσης και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοστατιστικής, κο Χλουβερακη Γρηγόριο για τη σημαντικότερη βοήθεια του στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων καθώς και για την προθυμία για επεξηγήσεις και περαιτέρω διευκρινήσεις-διορθώσεις.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην αναφερθώ στην καλή συνεργασία με τους ειδικευόμενους ιατρούς-συναδέλφους Jean-Marie Enele Menolo και Τζαγκουρνη Ορέστη κατά τη διάρκεια της συλλογής δειγμάτων ολικού αίματος και καταγραφής των ασθενών με ΠΧΚ στη Γαστρεντερολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τη φίλη μου βιολόγο Σκαρακη Αικατερίνη για τη ψυχολογική υποστήριξη και για τις συμβουλές της στο τεχνικό μέρος του εργαστηρίου που ήταν καταλυτικής σημασίας οποιαδήποτε στιγμή και αν τις χρειάστηκα, όπως επίσης και τη Γεωγράφο Σηφακη-Πιστόλλα Δήμητρα για την άριστη συνεργασία και την εφαρμογή των εξειδικευμένων γνώσεων της κυρίως στο κομμάτι της γεωεπιδημιολογικής ανάλυσης της ΠΧΚ στην Κρήτη.

2.ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η Π.Χ.Κ. είναι μια όργανο-ειδική αυτοάνοση νόσος αγνώστου αιτιολογίας. Χημικές ουσίες, λοιμώδεις παράγοντες, ορμονοθεραπεία, το αναπαραγωγικό ιστορικό και οι χειρουργικές επεμβάσεις συνιστούν παράγοντες οι οποίοι έχουν συνδεθεί με πιθανή επίδραση στην εμφάνιση της νόσου. Ενδοοικογενειακή εμφάνιση της Π.Χ.Κ. έχει αναφερθεί σε συγγενείς Α βαθμού ασθενών.

Σε μελέτη που διεξήχθη στο εργαστήριο Γαστρεντερολογίας της Ιατρικής σχολής Κρήτης βρέθηκε ότι τα επίπεδα των ενδοθηλινών που παράγονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος είναι αυξημένα στην Π.Χ.Κ. και πιθανά να έχουν κάποιο ρόλο στην παθογένεση της νόσου, ενισχύοντας το ρόλο του γενετικού παράγοντα.

Σε συνάρτηση με τα παραπάνω, ο επιπολασμός της Π.Χ.Κ. ποικίλλει σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, γεγονός το οποίο πιθανά αντανάκλα την επίδραση γενετικών ή περιβαλλοντικών παραγόντων στην εμφάνιση της νόσου.

Σκοπός: Οι περισσότερες μελέτες ομάδων (cohort), είναι γενετικά ετερογενείς. Σκοπός της μελέτης μας είναι α) να καθοριστεί πιθανή συσχέτιση της Π.Χ.Κ. με παράγοντες από τις συνήθειες και τον τρόπο ζωής των ασθενών, με άλλα νοσήματα καθώς και να υπολογιστεί το ποσοστό ενδοοικογενειακής Π.Χ.Κ. σε ένα πληθυσμό γενετικά ομοιογενή και γεωγραφικά περιορισμένο όπως είναι ο Κρητικός, β) να μελετηθούν γενετικοί πολυμορφισμοί οι οποίοι σχετίζονται με τα ενδοθηλιακά κύτταρα (γονίδια eNOS, EDN-1) και, να διερευνηθεί εάν η συσχέτιση των πολυμορφισμών του γονιδίου CTLA4 αναπαράγεται και στον γενετικά ομοιογενή Ελληνικό πληθυσμό της Κρήτης και γ) να καθοριστεί η επίπτωση και ο επιπολασμός της Π.Χ.Κ. στην Κρήτη, να περιγραφεί η γεωεπιδημιολογική κατανομή των ασθενών στο νησί, να δημιουργηθούν χάρτες πρόβλεψης ύπαρξης της νόσου και να ανιχνευθεί πιθανή χώρο-χρονική πορεία της Π.Χ.Κ. στην Κρήτη, στην Ελλάδα.

Μεθοδολογία: Στο διάστημα 1990-2010, από τους 245 ασθενείς με Π.Χ.Κ. που διαγνώστηκαν και παρακολουθούνται στη Γαστρεντερολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Κρήτης και των Περιφερειακών νοσοκομείων του νησιού, οι 222 συμπεριελήφθησαν στην χώρο-χρονική ανάλυση. 111 εξ αυτών συναίνεσαν να συμμετάσχουν στην κλινική μελέτη συμπληρώνοντας ένα

ερωτηματολόγιο με στοιχεία δημογραφικά, τρόπου ζωής, ιατρικό, χειρουργικό και αναπαραγωγικό ιστορικό. Οι ασθενείς αυτοί συγκριθήκαν με 115 συγγενείς Α βαθμού και 149 υγιείς εθελοντές αντίστοιχης ηλικίας, φύλου, Κρητικής καταγωγής και διαμονής. Οι στατιστικά σημαντικές μεταβλητές στην μονοπαραγοντική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω σε πολυπαραγοντική, με τη χρήση μοντέλου βηματικής λογιστικής παλινδρόμησης προς τα εμπρός. Επιπλέον εκατό από το σύνολο των ασθενών με Π.Χ.Κ. (83 θήλεα, 93% AMA+, 74/100 σταδίου Ludwig I–II) και 158 υγιείς εθελοντές συναίνεσαν για την εξαγωγή γενομικού DNA προκειμένου να ανιχνευθούν οι πολυμορφισμοί των γονιδίων eNOS, CTLA4 και ET1 με τη χρήση PCR–RFLP.

Πιο συγκεκριμένα, για να γίνει η χαρτογράφηση της χώρο-χρονικής κατανομής των 222 ασθενών ανά 5ετία, εφαρμόστηκαν γεωχωρικά μοντέλα στο λογισμικό Gis–ArcMap 9.3. Η μέθοδος χωρικής παρεμβολής Kriging χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία χάρτη πρόβλεψης της Π.Χ.Κ. στην Κρήτη. Οι περιοχές υψηλής ή χαμηλής πιθανότητας για εμφάνιση της νόσου υπολογίστηκαν με πολυπαραγοντικό μοντέλο. Το Arc map’s toolbox λογισμικό εφαρμόστηκε, ώστε να χαραχθεί η χώρο-χρονική πορεία της ΠΧΚ στην Κρήτη.

Αποτελέσματα: Όσον αφορά στη μελέτη των συνοσηροτήτων, δυσλιπιδαιμία βρέθηκε στο 69.4% των ασθενών με Π.Χ.Κ., στο 60% των συγγενών Α βαθμού και στο 40.9% της ομάδας ελέγχου($p < 0.0001$ και $p = 0.003$ αντίστοιχα), συνοδά αυτοάνοσα νοσήματα στο 36.9% των ασθενών, στο 30.4% των συγγενών Α βαθμού και στο 13.4% της ομάδας ελέγχου($p < 0.0001$ και $p = 0.011$ αντίστοιχα). Η θυρεοειδίτιδα Hashimoto($p = 0.003$), το σύνδρομο Raynaud($p = 0.023$) και Sjögren($p = 0.044$) είχαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την Π.Χ.Κ. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της νόσου με την πρωτοβάθμια εκπαίδευση (χαμηλό επίπεδο εκπαίδευσης) (AOR 2.304, 95% CI 1.024-5.181), με τη χολοκυστεκτομή(AOR 2.927, 95% CI 1.347-6.362) και με τη συνύπαρξη τουλάχιστον ενός άλλου αυτοανοσου νοσήματος (AOR 3.318, 95% CI 1.177-6.22). Ιστορικό κακοήθειας βρέθηκε με μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς με Π.Χ.Κ. σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές($p = 0.033$). Η ενδοοικογενειακή εμφάνιση Π.Χ.Κ. στην Κρήτη υπολογίστηκε σε 9.9%.

Από τη μελέτη των γενετικών πολυμορφισμών τόσο το eNOS intron4 VNTR όσο και το eNOS exon7 G894T SNP βρέθηκε ότι σχετίζονται σημαντικά με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης Π.Χ.Κ. Τα αλληλομορφα EDN-1 rs2071942 “A” και rs5370

“T” έδειξαν μια τάση για συσχέτιση με το στάδιο της νόσου. Καμία συσχέτιση δεν βρέθηκε ανάμεσα στην Π.Χ.Κ. και στους πολυμορφισμούς CTLA4 που μελετήθηκαν.

Ο επιπολασμός της Π.Χ.Κ. στην Κρήτη προσδιορίστηκε στις 365 περιπτώσεις ανά 1.000.000 πληθυσμού και η μέση επίπτωση 20.88(εύρος 3.79-35.99). Οι χάρτες πρόβλεψης υπολογίζουν από 1.22 έως 11 ασθενείς ανά 50 km² στην Κρήτη. Οι περιοχές υψηλού κινδύνου για εμφάνιση της νόσου βρίσκονται στο ανατολικό τμήμα του νησιού, ενώ οι χαμηλού κινδύνου στο δυτικό τμήμα.

Συμπεράσματα: Η δυσλιπιδαιμία και τα συνοδά αυτοάνοσα νοσήματα ήταν σημαντικά αυξημένα όχι μόνο στους ασθενείς με Π.Χ. Κ. όπως αναμενόταν, αλλά και στους συγγενείς Α βαθμού. Επιπλέον, αυξημένα ποσοστά κακοηθειών είχαν οι ασθενείς με Π.Χ. Κ. Ως πιθανοί παράγοντες κινδύνου για τη νόσο βρέθηκαν η πρωτοβάθμια εκπαίδευση, η χολοκυστεκτομή και η παρουσία τουλάχιστον ενός άλλου αυτοάνοσου νοσήματος. Δεν διεπιστώθη συσχέτιση της Π.Χ.Κ. με το κάπνισμα, τις λοιμώξεις ουροποιητικού ή το αναπαραγωγικό ιστορικό. Λόγω των υψηλών ποσοστών ενδοοικογενειακής εμφάνισης της νόσου στην Κρήτη προτείνεται προληπτικός έλεγχος AMA στους συγγενείς Α βαθμού στους οποίους συνυπάρχει τουλάχιστον ένα άλλο αυτοάνοσο νόσημα.

Επίσης δείξαμε ότι το γονίδιο eNOS, το οποίο επιδρά στη λειτουργία του ενδοθηλίου του ήπατος σχετίζεται με την εμφάνιση PBC στον Κρητικό πληθυσμό, όχι όμως και το σχετιζόμενο με την επίκτητη ανοσία γονίδιο CTLA4.

Η επίπτωση και ο επιπολασμός της Π.Χ.Κ. στην Κρήτη είναι από τους μεγαλύτερους στην Ευρωπαϊκή βιβλιογραφία. Με δεδομένο την ομοιογένεια του υπό μελέτη πληθυσμού και τα γεωπολιτικά χαρακτηριστικά του νησιού, η παρατηρηθείσα ετερογένεια στην χώρο-χρονική κατανομή και στην πορεία της νόσου, ενισχύει την υπόθεση της επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων στην αιτιολογία της Π.Χ.Κ.

3.ABSTRACT

Introduction: Primary biliary cirrhosis (PBC) is an organ specific autoimmune disease of still unidentified etiology, with genetic and environmental pathogenetic background.

Chemicals, infectious agents, hormone therapy, reproductive history and surgical interventions have been implicated in the induction of PBC. Familial PBC has been documented in first degree relatives (FDR). The prevalence of Primary biliary cirrhosis varies in different geographic areas. This might reflect genetic or environmental risk factors.

On the other hand, we have shown that endothelins (ETs), produced by the liver endothelial cells are increased in PBC and may play a major pathogenetic role.

Aims: Most cohort studies are genetically heterogeneous. Our study aimed a) to determine lifestyle or disease associations and familial occurrence rates in the genetically homogeneous and geographically defined Cretan population of PBC patients, b) to study gene polymorphisms related to the endothelial cells (eNOS, EDN-1 genes) and, to investigate whether the previously reported association with CTLA4 gene polymorphisms is also applicable in our genetically homogeneous population and c) to define PBC prevalence and incidence, describe patient's spatial distribution, generate prediction maps and detect any possible routing pattern of time-spatial appearance of the disease in Crete, Greece.

Methods: From 1990-2010, 245 Primary biliary cirrhosis patients diagnosed and followed up at the Gastroenterology Dept of the University Hospital and the District Hospitals of the island, were contacted and 222 were included in the time-spatial analysis. 111 consenting PBC patients, were compared with 115 FDR and 149 controls matched for age, sex, Cretan origin and residence. All participants completed a questionnaire regarding demographics, lifestyle, medical, surgical and reproductive history. Significant variables on the univariate analysis were analyzed by multivariate analysis using a forward step-wise logistic regression model. Genomic DNA was extracted from 100 PBC patients (83 females, 93% AMA+, 74/100 Ludwig stage I-II) and 158 healthy controls. eNOS, CTLA4 and ET1 polymorphisms were determined by PCR-RFLPs analysis.

To map the spatial distribution of the 222PBC patients per 5-year periods, geospatial models were applied in Gis–ArcMap 9.3 software. Kriging Interpolation methods were used to generate prediction maps for the disease in Crete. Areas of high and low probability of disease occurrence were estimated through multi-criteria modeling. The disease route was defined by Arc map’s toolbox.

Results: Dyslipidaemia was found in 69.4% of PBC patients, 60% of FDR and 40.9% of controls ($p < 0.0001$ and $p = 0.003$ respectively), autoimmune diseases in 36.9% of patients, 30.4% of FDR and 13.4% of controls ($p < 0.0001$ and $p = 0.011$ respectively). Hashimoto’s disease ($p = 0.003$), Raynaud syndrome ($p = 0.023$) and Sjögren syndrome ($p = 0.044$) were significantly associated with PBC. On multivariate analysis statistically significant associations were found with primary educational level (AOR 2.304, 95% CI 1.024-5.181), cholecystectomy (AOR 2.927, 95% CI 1.347-6.362) and the presence of at least another autoimmune disease (AOR 3.318, 95% CI 1.177-6.22). Cancer history was more frequent in patients than in controls ($p = 0.033$). Familial PBC was found to be 9.9%.

Both eNOS intron4 VNTR and eNOS exon7 G894T SNP were significantly associated with increased risk in PBC. EDN-1 rs2071942 “A” and rs5370 “T” alleles appeared a tendency for association with disease progression. No association was found between PBC and the CTLA4 SNPs analyzed.

PBC prevalence was found to be 365 cases per million, with a mean incidence of 20.88(range 3.79-35.99). Prediction map estimates from 1.22 to 11 patients per 50 km² all over Crete. Areas of high risk of disease occurrence are located in the Eastern part, while low risk in the Western part of the island

Conclusions: Dyslipidaemia and autoimmune diseases were significantly increased not only in PBC patients as expected but also in their FDR. An increased prevalence of malignancies was found in PBC patients. Primary educational level, cholecystectomy and the presence of at least another autoimmune disease were found as putative risk factors for PBC. No association was found with smoking, urinary tract infection or reproductive history. The reported high familial occurrence of PBC could imply screening with AMA of FDR with at least another autoimmune disease.

We also demonstrated that eNOS, a gene related to the liver endothelium function is associated with PBC. In contrast the important in adaptive immunity gene CTLA4 was not associated with the disease in the homogeneous population analyzed. These

results are partially compatible with our previous hypothesis that defects of the liver endothelial system, leading to endothelin overproduction, may be a fundamental early pathogenetic mechanism in PBC.

Prevalence and incidence of Primary biliary cirrhosis in Crete are among the highest published in Europe. Given the homogeneous and stable study population and the geopolitics of the island, the heterogeneity in the time-spatial distribution and the route of disease appearance strongly suggest a role for environmental causative agents.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ

4.1 Ορισμός-Γενικά χαρακτηριστικά

Η Πρωτοπαθής χολική κίρρωση (Π.Χ.Κ.) είναι ένα χρόνια, προοδευτικά επιδεινούμενο χολοστατικό σύνδρομο αγνώστου αιτιολογίας. Χαρακτηρίζεται από καταστροφή των μικρών-μεσαίου μεγέθους ενδολοβιακών χοληφόρων(πιθανώς μέσω των Τ-κυττάρων)που οδηγεί σε προοδευτική ίνωση και συχνά καταλήγει σε τελικού σταδίου κίρρωση του ήπατος.

Αν και ο ακριβής μηχανισμός της ηπατικής βλάβης παραμένει άγνωστος, υπάρχουν ενδείξεις υπέρ της αυτοάνοσης προέλευσης της νόσου.

Σε ποσοστό 95-98% των ασθενών χαρακτηριστική είναι η παρουσία στο περιφερικό αίμα ειδικών για τη νόσο των αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων (AMA). Στους ασθενείς στους οποίους δεν ανιχνεύονται τα AMA, η νόσος χαρακτηρίζεται ως Αυτοάνοση Χολαγγειίτιδα (ΑΧ) ή καλύτερα αρνητική για τα αντιμιτοχονδριακά αντισώματα ΠΧΚ. Η νόσος επικρατεί σε γυναίκες μέσης ηλικίας στο 75-90% του συνόλου των ασθενών, με ακραίες ηλικίες 20-93 έτη, και είναι σπάνια πριν την ηλικία των 30 ετών.

Οι λιγιστές αναφορές σε παιδιατρικά περιστατικά συνήθως αφορούν παρουσία θετικών AMA, είτε άνευ κλινικών ενδείξεων της νόσου¹, είτε σε έδαφος άλλων ηπατικών νοσημάτων^{2,3}.

Η πρώτη περιγραφή της νόσου έγινε το 1851, από τους Addison και Gull⁴, οι οποίοι περιέγραψαν την κλινική εικόνα ασθενούς με προοδευτικά επιδεινούμενο ίκτερο, επί απουσίας μηχανικής απόφραξης των μεγάλων χοληφόρων. Η ονομασία της νόσου εδόθη το 1950 από τον Ahrens και συνεργάτες⁵, ενώ ο όρος ΠΧΚ αμφισβητείται από πολλούς καθότι η κίρρωση αναπτύσσεται μόνο στα προχωρημένα στάδια της νόσου.

Ο καλύτερος όρος είναι χρόνια καταστρεπτική μή πυώδης ενδοηπατική χολαγγειίτιδα, ορισμός που εδόθη από τον Hans. Στην ουσία ανήκει στη μεγαλύτερη

οικογένεια τού συνδρόμου τών εξαφανιζομένων ενδοηπατικών χοληφόρων (vanishing bile duct syndrome).

4.2 Επιδημιολογία

Υπάρχουν δεδομένα πως η Π.Χ.Κ. παρουσιάζει άνιση γεωγραφική κατανομή. Μέχρι σήμερα η επιδημιολογία της νόσου δεν έχει μελετηθεί συστηματικά. Οι περισσότερες δημοσιευμένες αναφορές προέρχονται κυρίως από περιοχές του Δυτικού κόσμου και επισημαίνουν έντονη ποικιλότητα στον επιπολασμό και στην επίπτωση της νόσου.

Τα υψηλότερα επιδημιολογικά δεδομένα προέρχονται από χώρες της Βόρειας Ευρώπης όπως Αγγλία^{7, 8, 9, 10}, Σκωτία¹¹, Σουηδία^{12, 13}, Φιλανδία¹⁴ και της Βόρειας Αμερικής (π.χ. κομητεία Olmsted, Minnesota)¹⁵.

Ο επιπολασμός της ΠΧΚ στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής υπολογίζεται σε 65.4 περιπτώσεις για θήλεα και 12.1 περιπτώσεις για άρρενα (40.2 περιπτώσεις συνολικά) ανά 100.000 πληθυσμού. Η επίπτωση της νόσου εκτιμάται σε 4.5 περιπτώσεις για θήλεα και 0.7 περιπτώσεις για άρρενα (2.7 περιπτώσεις συνολικά) ανά 100.000 πληθυσμού.

Η επίπτωση της ΠΧΚ υπολογίζεται σε 24 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού στο Newcastle, από το Ηνωμένο Βασίλειο, 12.9 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού στη Βορειοανατολική Αγγλία, 9.2 περιπτώσεις ανά 100.000 στο Malmö της Σουηδίας και 15.1 ανά 100.000 πληθυσμού στο Umea της Σουηδίας.

Σε αντίθεση, χαμηλότερος επιπολασμός και επίπτωση της νόσου καταγράφεται σε έρευνες που έχουν διεξαχθεί στον Καναδά^{16, 17}, την Αυστραλία^{18, 19} και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες όπως στην Ισπανία²⁰, στην Ιταλία²¹, Ολλανδία²² και στην Εσθονία²³, ενώ αντίστοιχα στοιχεία δεν υπάρχουν για την Ελλάδα εως και σήμερα.

Αν και τα επιδημιολογικά δεδομένα στην Ασία και στην Αφρική είναι ελλιπή και περιορισμένα, στις μέρες μας διενεργείται μια συστηματική προσπάθεια για την εκτίμηση των επιδημιολογικών χαρακτηριστικών της ΠΧΚ στην Ανατολή. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μια πρόσφατη μελέτη από το νότιο Ισραήλ²⁴ ο επιπολασμός της νόσου βρέθηκε ιδιαίτερα υψηλός, 550 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού. Τα αποτελέσματα πρόσφατων επιδημιολογικών μελετών στη νότια Κίνα^{25, 26}, στη

νοτιοανατολική Ασία²⁷ καθώς και αναφορές σε ενδοοικογενειακές συναθροίσεις περιπτώσεων ΠΧΚ στην Ινδία²⁸ και την Ιαπωνία^{29, 30} έρχονται σε σύγκρουση με την έως τώρα αντίληψη της επικράτησης της νόσου στις βόρειες χώρες του Δυτικού κόσμου.

Βάσει, λοιπόν, πρόσφατων ερευνών η συχνότητα εμφάνισης της ΠΧΚ εμφανίζει αυξητική τάση παγκοσμίως την τελευταία δεκαετία, θέτοντας το ερώτημα εάν αντανακλά μια πραγματική αύξηση ή οφείλεται σε μεγαλύτερη ιατρική επαγρύπνηση και βελτίωση των δυνατοτήτων διάγνωσης σε παγκόσμια κλίμακα.

4.3 Αιτιοπαθογένεια

Η ακριβής αιτία της ΠΧΚ είναι άγνωστη. Μελέτες υποστηρίζουν τη συσχέτιση της νόσου τόσο με γενετικούς, όσο και με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Θεωρείται ότι η νόσος είναι αποτέλεσμα διαταραχής της ανοσιακής ανοχής (σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα), η οποία οδηγεί σε διέγερση του ανοσιακού μηχανισμού, με ενεργοποίηση ειδικών T και B λεμφοκυτταρικών κλώνων, παραγωγή κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων, κυτοκινών και διαμεσολαβητών φλεγμονής, μετά από έκθεση σε περιβαλλοντικούς εκλυτικούς παράγοντες (όπως μικροοργανισμοί, πρωτεΐνες ρετροϊών, μικροχμαιορισμός ή ξενοβιοτικά). Για την κατανόηση των παθογενετικών μονοπατιών και της πολυπαραγοντικής φύσης της νόσου σημαντικές πληροφορίες έχουν προκύψει και από τη μελέτη ερευνητικών μοντέλων σε ποντίκια, ιδίως τις τελευταίες δεκαετίες.

4.3.1 Ο ρόλος των αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων

Το ενδοηπατικό χοληφόρο δέντρο συνιστά τον μοναδικό ιστό-στόχο του ανοσιακού μηχανισμού στην ΠΧΚ. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για εκλεκτική καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων των μικρών χοληφόρων, μέσω αναγνώρισης ειδικών αντιγόνων της E2 υποομάδας του συμπλέγματος της πυρουβικής δεϋδρογενάσης (PDC-E2), τα οποία εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Η PDC-E2 αποτελεί τμήμα του πολυενζυμικού συστήματος, του συμπλέγματος της 2-οξο-οξικής δεϋδρογενάσης(2-OADC), που είναι απαραίτητο για τον ενεργειακό

μεταβολισμό³¹. Στο πολυενζυμικό αυτό σύστημα εκτός του PDC, ανήκουν και το σύμπλεγμα της 2-όξο-γλουταρικής δευδρογενάσης και η διακλαδισμένη αλυσος του συμπλέγματος της 2-όξο-οξικής δευδρογενάσης. Καθένα από τα 3 αυτά συμπλέγματα αποτελείται από επαναλήψεις 3ων υποομάδων, της E1(δεκαρβοξυλάση εξαρτώμενη από την πυροφωσφορική θειαμίνη), της E2(δεκαρβοξυλάση εξαρτώμενη από συνένζυμο A) και της E3(η διύδρολιποϊκή αφυδρογονάση). Οι E2 υποομάδες περιλαμβάνουν τα εξής λειτουργικά τμήματα: α) το εσωτερικό καταλυτικό τμήμα(ενεργό τμήμα), β) ένα ή περισσότερα αμινοτελικά λιπόφιλα τμήματα, όπου δεσμεύεται ο συμπάροντας λιποϊκό οξύ και γ) την πρωτεΐνη-θέση δέσμευσης της E3 υποομάδας (E3BP)^{32, 33, 34}. Εξ αυτών, κυρίως το λιπόφιλο τμήμα PDC-E2(Εικόνα 1) και αλλά και η E3BP συνιστούν τα αυτό-αντιγόνα, τα οποία αναγνωρίζονται από τα AMA.

Η ορολογική αναγνώριση των AMA διενεργήθηκε το 1965 από τους Walker και συνεργάτες³⁵.

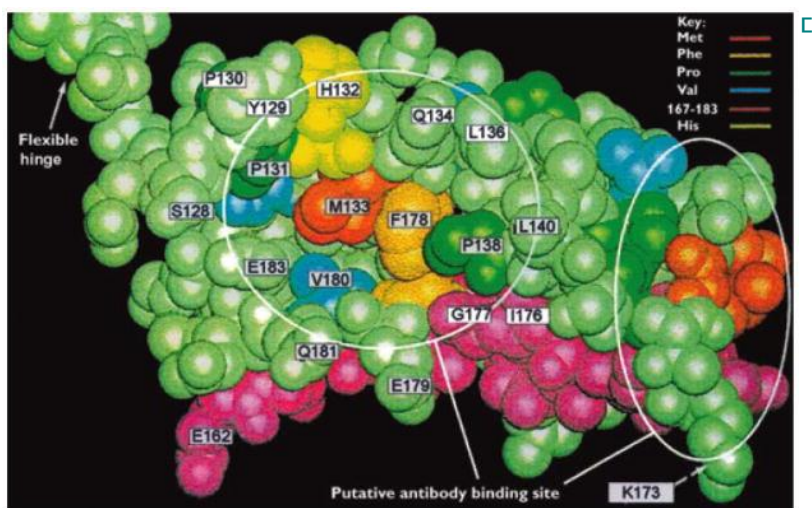
Ανάμεσα στα διάφορα μιτοχονδριακά αντιγόνα, τα M2 έδειξαν ειδική συσχέτιση με την ΠΧΚ³⁶. Πέντε έτη αργότερα, κλωνοποιήθηκε το cDNA του βασικού μιτοχονδριακού αντιγόνου, και ταυτοποιήθηκε η PDC-E2^{37, 38}.

Τα AMA αντισώματα του ορού ανήκουν και στους τρεις κύριους ισότυπους των ανοσοσφαιρινών IgG, IgM, IgA αλλά η ενεργότητά τους οφείλεται κυρίως στις υποτάξεις IgG1 και IgG3. Τίτλοι AMA ορού υψηλότεροι από 1:40 ανιχνεύονται σε >90% των ασθενών με ΠΧΚ με τεχνικές έμμεσου ανοσοφθορισμού και συνιστούν τον πιο ειδικό διαγνωστικό δείκτη για τη νόσο.

Ελλείπει δεδομένων που να επιβεβαιώνουν την διήθηση των επιθηλιακών κυττάρων με AMA-IgG, έχει περιγραφεί η παρουσία AMA-IgA στον ορό, αλλά και στην χολή, στον σίελο και στα ούρα ασθενών με ΠΧΚ³⁹. Η ανίχνευση των AMA-IgA μαζί με το PDC-E2 εντός του κυτταροπλάσματος και στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη των χολαγγειοκυττάρων, θα μπορούσε να εξηγήσει είτε την άμεση σύζευξη των AMA-IgA με τον μιτοχονδριακό αντιγονικό επίτοπο ή έμμεσα μέσω ανοσοσυμπλεγμάτων, ως μηχανισμό κυτταρικής καταστροφής στα χοληφόρα⁴⁰.

Αυτό που παραμένει ακόμα άγνωστο είναι ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η μεταφορά του αυτοαντιγόνου PDC από την εσωτερική επιφάνεια, της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου στην εξωτερική επιφάνεια την κυτταρικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων(όπου μεσολαβούν 3 μεμβράνες συνολικά)⁴¹.

Ο παθογενετικός ρόλος των AMA στην ΠΧΚ αμφισβητείται από ορισμένους ερευνητές. Αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι: α) υπάρχουν ασθενείς AMA αρνητικοί, οι οποίοι παρουσιάζουν την ίδια κλινική εικόνα και εξέλιξη της νόσου, με τους AMA θετικούς ασθενείς⁴², β) παρατηρήθηκε αδυναμία αναπαραγωγής των ιστολογικών χαρακτηριστικών της νόσου μετά από πειραματική ένεση επιθηλιακών κυττάρων με ΠΧΚ και κεκαθαρισμένο PDC-E2 με λιποπολυσακχαρίδη (LPS) ή ανασυνδυασμένα πολυπεπίδια PDC-E2 σε υγιή ποντίκια^{43, 44}, ή ακόμα ότι AMA μπορούν να εμφανιστούν στο ορό ζωικών μοντέλων μετά από ανοσοποίηση με ειδικές αλογονοποιημένες ενώσεις συζευγμένες με αλβουμίνη⁴⁵ και γ) δεν φαίνεται να συνδέεται ο τίτλος ή το είδος των AMA με το βαθμό εξέλιξης της νόσου⁴⁶.



Εικόνα 1

Τρισδιάστατη δομή του εσωτερικού λιπόφιλου τμήματος της PDC-E216. (Howard MJ, Fuller C, Broadhurst RW, Perham RN, Tang JG, Quinn J, et al. Three-dimensional structure of the major autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 1998;115(1):139–46.)

4.3.2 Ο ρόλος της απόπτωσης των BEC και το οξειδωτικό στρες

Ο ρόλος της απόπτωσης στο μηχανισμό της ιστικής βλάβης στο επιθήλιο των χοληφόρων έχει συζητηθεί αρκετά^{47,48}. Η κυτταρική απόπτωση αυξάνει την έκθεση της PDC-E2 στην κυτταρική επιφάνεια και οδηγεί σε ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος⁴⁹.

Ως γνωστόν η γλουταθειόνη έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Στους ασθενείς με ΠΧΚ, τα χολαγγειοκύτταρα που αποπίπτουν, αποτυγχάνουν να συνδέσουν τη γλουταθειόνη με το λιπόφιλο τμήμα της δευδρογενάσης, με αποτέλεσμα να ενισχύεται η οξειδωτική βλάβη στο δίκτυο των μικρών χοληφόρων. Αυτό εξηγείται από τη μείωση της έκφρασης του μεταφορέα της γλουταθειόνης S, που έχει ως συνέπεια τη μείωση των επιπέδων της ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης⁵⁰. Ακολούθως, τα γειτονικά χολαγγειοκύτταρα μέσω του μηχανισμού φαγοκύτωσης καταστρέφουν τα αποπτωτικά κύτταρα και εν συνεχεία εκφράζουν τον M2 επίτοπο^{51,52}. Επίσης σε πειραματικά μοντέλα φαίνεται ότι τα IgA-M2 αντισώματα επάγουν την ιστική βλάβη μέσω κασπασών⁵³, ενισχύοντας την αντίληψη ότι η απόπτωση των χολαγγειοκυττάρων συμμετέχει τόσο στην έναρξη, όσο και στην ενίσχυση της αυτοανοσίας στην ΠΧΚ. Βέβαια, τα κύτταρα του επιθηλίου των μικρών χοληφόρων εκφράζουν την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl2 και τα καθιστά ανθεκτικά στην απόπτωση⁵⁴, πράγμα το οποίο αναστρέφεται σε συνθήκες μειωμένων επιπέδων γλουταθειόνης.

Στην ΠΧΚ, η μειωμένη έκφραση του Bcl2 στα μικρού μεγέθους χοληφόρα οδηγεί σε οξειδωτικό στρες, κυτταρική γήρανση και απόπτωση^{55,56,57}. Φαίνεται λοιπόν, ότι, η γήρανση των επιθηλιακών κυττάρων υπό την επίδραση οξειδωτικού στρες, βλάβης του DNA, ή στέρησης ορού, συντελεί στη διαμόρφωση ενός μικροπεριβάλλοντος με έκκριση-παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών και χυμοκινών γύρω από τα μικρά χοληφόρα, συνεισφέροντας στην παθογένεση της ιστικής τους βλάβης⁵⁸.

4.3.3 Ο ρόλος της κυτταρικής ανοσίας

Δεδομένα που προκύπτουν από μελέτες σε ήπαρ ασθενών με ΠΧΚ, με μεθόδους διαλογής κυττάρων -ενεργοποιούμενη από φθορισμό- και ανοσοϊστοχημικές, επισημαίνουν την επικράτηση ενεργοποιημένων CD4+ και CD8+ T λεμφοκυττάρων στο κυτταρικό διήθημα των πυλαίων διαστημάτων^{59, 60}. Η βλάβη στα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων(BEC) συνοδεύεται από αύξηση στην έκφραση δεικτών όπως τάξεως II MHC και το μόριο προσκόλλησης ICAM-1 στην κυτταρική επιφάνεια⁶¹. Το εύρημα αυτό ενισχύει την άποψη της τοπικής ενεργοποίησης των T-κυττάρων. Η παρουσίαση των αυτοαντιγόνων των BEC στα CD4+ λεμφοκύτταρα συμβαίνει διαμέσω μιας γλυκοπρωτεΐνης του TNF, της CD40, η έκφραση της οποίας

φαίνεται να αυξάνεται στην φλεγμονώδη απάντηση⁶². Η αλληλεπίδραση CD40/CD40L ανάμεσα σε BEC και T-λεμφοκύτταρα οδηγεί σε παραγωγή IL-12, κυτοκίνη-κλειδί για την περαιτέρω κυτταροτοξική δράση των Th1.

Τα CD8 T-κύτταρα έχουν ειδική κυτταροτοξικότητα έναντι της PDC-E2 και οδηγούν στην παραγωγή κυρίως INF- γ . Ο τίτλος αυτών των ειδικών CD8 λεμφοκυττάρων φαίνεται πως είναι σημαντικά υψηλότερος στα αρχικά στάδια της νόσου, στον ηπατικό ιστό ασθενών με ΠΧΚ σε σύγκριση με το περιφερικό αίμα.

4.3.4 Ο ρόλος της μη-ειδικής ανοσίας

Η μη-ειδική ανοσία συνιστά την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των λοιμώξεων και των νεοπλασιών. Η αλληλεπίδρασή της με την ειδική ανοσία αναγνωρίστηκε πρόσφατα, ενώ η σημασία της στην αυτοανοσία παραμένει εν μέρει άγνωστη⁶³.

Τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς είναι τα κυτταρικά στοιχεία του συστήματος της μη-ειδικής ανοσίας, τα οποία καθορίζουν την ποιοτική και ποσοτική απαντητικότητα των T- και B-κυττάρων καθώς και την παραγωγή αντισωμάτων^{64, 65, 66}.

Επιπλέον, συμβάλλουν στην εγκατάστασης της κυτταρικής ανοχής στα αυτοαντιγόνα, προστατεύοντας τον οργανισμό από το μηχανισμό της αυτοανοσίας⁶⁷.

Στους ασθενείς με ΠΧΚ, αυτός ο μηχανισμός κυτταρικής ανοχής διαταράσσεται και η έκθεση των μονοκυττάρων του αίματος στα μη μεθυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια (CpG) οδηγεί στην παραγωγή AMA και κυτοκινών (IL-1 β , IL6, IL8, TNF α)⁶⁸.

Οι υποδοχείς TLR (Toll-like receptors) παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της μη-ειδικής ανοσίας⁶⁹. Οι υποδοχείς αυτοί, ενεργοποιούνται από βακτηριδιακά παράγωγα, κυρίως λιποπολυσακχαρίδες (LPS) και CpG. Σε αντίθεση με άλλα ηπατικά νοσήματα στην ΠΧΚ οι υποδοχείς TLR4 είναι ιδιαίτερα αυξημένοι στο επιθήλιο των μικρών χοληφόρων και στα περιτυλαία κύτταρα, και ο βαθμός έκφρασής τους συνδέεται με το στάδιο της νόσου⁷⁰.

Αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των B-κυττάρων μέσω των TLR4⁷¹ είναι η παραγωγή IgM. Έτσι λοιπόν, εξηγούνται τα υψηλά επίπεδα IgM στον ορό των ασθενών με ΠΧΚ, ως απάντηση των B-κυττάρων μνήμης, μετά από αντιγονικό

ερεθισμό ουσιών που προέρχονται από τα βακτήρια. Τελικά, ο συνεχής ερεθισμός των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων από τις LPS των βακτηριδίων μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγής TNF α ⁷², άλλων προφλεγμονωδών κυτταροκινών (INF β), τα οποία αυξάνουν τον αριθμό των υποδοχέων TLR4 στην επιφάνεια των κυττάρων αυτών, στην ΠΧΚ^{73,74,75}. Επιπλέον και οι υποδοχείς TLR9 ενεργοποιούνται στην ΠΧΚ, όπως και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα^{76,77}.

Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση αυτή διενεργείται μέσω της σύνδεσης με τα CpG. Η σύνδεση αυτή αναγνωρίζεται από τα μονοπύρρηνα του περιφερικού αίματος⁷⁸ ή τα CD27+ B-κύτταρα μνήμης^{79,80} και τελικά προκαλείται αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων TLR8 και TLR9 στα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων, αύξηση της έκφρασης των CD86 (στα μονοκύτταρα και τα ενεργοποιημένα B-κύτταρα), και παραγωγή IgM και AMA.

Παρατηρείται, επομένως, στους ασθενείς με ΠΧΚ αυξημένη απάντηση του συστήματος της μή-ειδικής ανοσίας στον αντιγονικό ερεθισμό των παθογόνων, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται από την έκκριση υψηλότερων επιπέδων προφλεγμονωδών κυτταροκινών *in vitro* από τα μονοκύτταρα μετά από έκθεσή τους σε μικροοργανισμούς⁶⁸.

Η υπερ-απαντητικότητα του συστήματος της μή-ειδικής ανοσίας δεν μπορεί να εξηγήσει επαρκώς το μηχανισμό της διαταραχής της φυσικής ανοσολογικής ανοχής στην ΠΧΚ. Θα μπορούσε όμως να ερμηνεύσει την έναρξη και συνέχιση της υποκείμενης απάντησης των μηχανισμών αυτοανοσίας.

4.3.5 Ο ρόλος των περιβαλλοντικών παραγόντων

4.3.5.1 Μικρόβια, ιοί

Αποτελέσματα ερευνών υποστηρίζουν το ρόλο ορισμένων μικροοργανισμών ή των προϊόντων τους ως αιτιολογικοί παράγοντες της ΠΧΚ^{81,82}. Πράγματι, η βακτηριακή λοίμωξη είναι κοινό εύρημα αυτών των ασθενών⁸³, ενώ προϊόντα των μικροβίων έχουν βρεθεί στον ηπατικό ιστό των ασθενών με ΠΧΚ^{84,85}. Ως πιθανός μηχανισμός απώλειας της ανοσολογικής ανοχής προτείνεται ο «μοριακός μιμητισμός», κατά τον

οποίο μικροβιολογικοί παράγοντες εμφανίζουν έναν επίτοπο με δομικές ομοιότητες με αντιγόνα του ξενιστή-οργανισμού⁸⁶. Πιο συγκεκριμένα στην ΠΧΚ, η είσοδος των μικροοργανισμών στον οργανισμό οδηγεί σε ενεργοποίηση της μη-ειδικής αρχικά - μέσω υποδοχέων TLR- και στη συνέχεια της ειδικής ανοσίας. Λόγω υψηλού βαθμού ομοιότητας των μικροβιακών αντιγόνων με το PDC-E2 μιτοχονδριακό αυτό-αντιγόνο, τα Τ-κύτταρα μνήμης στρέφονται εναντίον των αυτό-αντιγόνων του ίδιου του ηπατικού ιστού⁸⁷⁻⁹³.

Μία άλλη θεωρία που συναντάται και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, είναι η «διάδοση του αντιγονικού επίτοπου». Σύμφωνα με αυτήν, αυτό-επίτοποι οι οποίοι απελευθερώνονται δευτεροπαθώς μετά από βλάβη που προκαλείται από την αντίδραση αντιγόνου-παθογόνου μικροοργανισμού με ειδικά Τ-κύτταρα, οδηγούν σε προοδευτική ενεργοποίηση της Τ-κυτταρικής ανοσίας και ενισχύουν την ανοσολογική αντίδραση σε άτομα με γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση της ΠΧΚ^{94,95}. Οι αυτό-επίτοποι είναι διαφορετικοί από το αρχικό ερέθισμα που προκάλεσε την ανοσολογική απάντηση, δεν εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση με τον κύριο επίτοπο και τελικά καταλήγουν να είναι οι κύριοι στόχοι του ανοσολογικού μηχανισμού.

Βέβαια, παρόλο που ο ρόλος των μικροβιακών παραγόντων στην εμφάνιση της ΠΧΚ είναι σημαντικός, η θεωρία του μοριακού μιμητισμού και της διασταυρούμενης αντίδρασης των AMA με βακτηριακά αντιγόνα δεν αρκούν για να οδηγήσουν στην ΠΧΚ, ή για να υποστηρίξουν ότι η αρχική ανοσολογική απάντηση κατευθύνεται στο μικροβιακό αντιγόνο με δομική ομοιότητα με την PDC-E2. Αντιθέτως ενισχύουν την άποψη ότι πρόκειται για μια πολυπαραγοντική διαδικασία που λαμβάνει χώρα σε γενετικά ευπαθείς ασθενείς⁹⁶.

Μεταξύ των μικροοργανισμών με πιθανή συμμετοχή στον παθογενετικό μηχανισμό της ΠΧΚ έχουν αναφερθεί η *Escherichia coli*, *Novosphingobium aromaticivorans*, *Salmonella Minnesota*⁹⁷, *Pseudomonas aeruginosa*⁹⁸, *Haemophilus influenza*, *Yersinia enterocolitica*⁹⁹, *Streptococcus intermedius*¹⁰⁰, *Lactobacillus delbruecki*¹⁰¹, *Paracoccus denitrificans*¹⁰², *Mycoplasma*^{103,104}, *Mycobacterium gordonae*^{105,106}, *Borrelia burgdorferi*¹⁰⁷, *Trypanosomes*¹⁰⁸, *Helicobacter pylori*^{91,109}, *Klebsiella pneumoniae*¹¹⁰, *Proteus mirabilis*.

Ο πιθανός ρόλος της *Escherichia coli* βασίζεται σε δομικές ομοιότητες πρωτεϊνών του βακτηρίου με την υποομάδα PDC-E2 και στην παρατήρηση αντίδρασης των AMA με R μορφές της *E.coli* από τα κόπρανα ασθενών με ΠΧΚ^{91, 99, 111}. Ειδικό

ενδιαφέρον φαίνεται να παρουσιάζει ο gram(-) μικροοργανισμός *Novosphingobium aromaticivorans* λόγω του υψηλότερου βαθμού ομολογίας με τον PDC-E2 αυτοεπίτοπο^{112,113,114}. Σε πειραματικά μοντέλα φαίνεται να προκαλεί την παραγωγή AMA και να επάγει τον μηχανισμό αυτοανοσίας μέσω T-κυττάρων έναντι των μικρών χοληφόρων¹¹⁵.

Σποραδικές παρατηρήσεις έδειξαν την συχνή παραγωγή AMA κατά τη διάρκεια φυματίωσης¹¹⁶ και διασταυρούμενη αντίδραση της πρωτεΐνης HSP65 του *Mycobacterium gordonae* με την υποομάδα PDC-E2. Η συμμετοχή, όμως, των μυκοβακτηριδίων στην παθογένεση της ΠΧΚ αμφισβητείται καθότι τα δεδομένα δεν είναι διεθνώς επιβεβαιώμενα, ούτε έχουν απομονωθεί από τον ηπατικό ιστό οι μικροοργανισμοί αυτοί.

Ιστολογικά χαρακτηριστικά όμοια με αυτά της ΠΧΚ μπορούν να προκληθούν σε ποντίκια μετά από ανοσοποίηση με mycoplasma¹¹⁷. Αντιγόνα και mRNA από *Chlamydia pneumoniae* έχουν απομονωθεί από τον ηπατικό ιστό¹¹⁸, όχι όμως και από τον ορό ασθενών με ΠΧΚ και με αντισώματα έναντι *C.pneumoniae*¹¹⁹.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει τα τελευταία χρόνια ένας *ανθρώπινος β-ρετροϊός*, ο οποίος βρέθηκε στους περιηπατικούς λεμφαδένες και σε άλλα βιολογικά υγρά ασθενών με ΠΧΚ¹²⁰. Ο ρόλος του β-ρετροϊού στην παθογένεια της ΠΧΚ ενισχύεται από την ανίχνευση σωματιδίων και πρωτεϊνικών αλληλουχιών του ιού στο επίθηλιο των χοληφόρων στο 75% των ασθενών με ΠΧΚ¹²¹. Παράλληλα, μετά από λοίμωξη με τον ρετροϊό, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του PDC-E2 επίτοπου στα χολαγγειοκύτταρα¹²².

Πρωτεΐνες του ρετροϊού MMTV (mouse mammalian tumor virus) βρέθηκαν, επίσης, στο επιθήλιο των χοληφόρων σε πειραματικά μοντέλα ΠΧΚ με ποντίκια NODc3c4^{123,124}. Μετά από θεραπεία των ποντικίων με αντι-ιικούς παράγοντες anti MMTV, δεν αναδείχθησαν οι χαρακτηριστικές ιστολογικές βλάβες της ΠΧΚ, ενισχύοντας την άποψη ότι ο MMTV προκαλεί ιογενή χολαγγειίτιδα¹²⁵. Όμως, τα αποτελέσματα μιας μη τυχαιοποιημένης μελέτης ελέγχου της θεραπείας ασθενών με ΠΧΚ με λαμβουδίνη και/ή ζιδοβουδίνη δεν ήταν επαρκή για να υποστηρίξουν την αιτιολογική συσχέτιση της νόσου με τον ανθρώπινο β-ρετροϊό¹²⁶.

Εν τέλει η συμβολή των ιογενών λοιμώξεων από ανθρώπινους β-ρετροϊούς, στην πυροδότηση του μηχανισμού της αυτοανοσίας στην ΠΧΚ δεν έχει αποσαφηνιστεί, καθώς υπάρχουν μελέτες ασθενών με ΠΧΚ, χωρίς καμία ένδειξη ιογενούς λοίμωξης^{127,128}.

4.3.5.2 Χημικοί Παράγοντες-Ξενοβιοτικά

Ξενοβιοτικό είναι κάθε χημική ένωση που μπορεί να ανευρεθεί σε κάποιον οργανισμό, αλλά φυσιολογικά δεν παράγεται απ' αυτόν, ούτε αναμένεται να βρίσκεται σ' αυτόν. Πρόκειται για ουσίες που δεν χρησιμοποιούνται από τον οργανισμό ούτε για παραγωγή ενέργειας, ούτε για σύνθεση δομικών συστατικών αυτού.

Στην κατηγορία των ξενοβιοτικών συμπεριλαμβάνονται προϊόντα ρύπανσης του περιβάλλοντος, συντηρητικά τροφίμων και φαρμάκων, βελτιωτικά γεύσης και οσμής αυτών, μερικά συστατικά καλλυντικών, χρώματα, αγροχημικά προϊόντα, κλπ. Ο μεταβολισμός τους γίνεται κυρίως στο ήπαρ και ορισμένα μπορούν να ενεργοποιήσουν μηχανισμούς αυτοανοσίας ή να προκαλέσουν ηπατίτιδα. Τα ξενοβιοτικά μπορούν να τροποποιήσουν τη μοριακή δομή μιας πρωτεΐνης του οργανισμού και να οδηγήσουν στη διαμόρφωση νεοαντιγόνων. Αυτά με τη σειρά τους προάγουν ανοσολογική απάντηση με ενεργοποίηση Β και Τ-κυττάρων, τα οποία τελικά μέσω διασταυρούμενης αντίδρασης στρέφονται έναντι των πρωτεϊνών του ίδιου του οργανισμού.

Ο ακριβής τρόπος με τον οποίο διεγείρεται ο μηχανισμός της αυτοανοσίας από τη δράση των ξενοβιοτικών παραμένει άγνωστος, εν τούτοις έχουν αναπτυχθεί ορισμένες θεωρίες: α) πρόκληση απόπτωσης ή νέκρωσης των κυττάρων και εμφάνιση ανοσογονικών αυτό-επίτοπων, β) διασταυρούμενη αντίδραση των Β και Τ-κυττάρων, τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί από νέο-αντιγόνα, με αντιγόνα του ίδιου του οργανισμού και γ) χημική τροποποίηση πρωτεϊνών των κυττάρων οργανισμού, που μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή της επεξεργασίας από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και τελικά την εμφάνιση ενός κρυπτικού επίτοπου¹²⁹.

Στην ΠΧΚ, διασταυρούμενη αντίδραση ανάμεσα στο λιποϊκό οξύ, που συνδέεται σε ειδική περιοχή στο αμινοτελικό λιπόφιλο τμήμα της PDC-E2, και σε ξενοβιοτικά με δομική ομοιότητα, πιθανόν οδηγεί σε διαταραχή της ανοσολογικής ανοχής. Το λιποϊκό οξύ βρίσκεται φυσιολογικά στο εξωτερικό τμήμα της PDC-E2, οπότε συνιστά έναν ιδανικό στόχο για χημική τροποποίηση από τα ξενοβιοτικά..

Η παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι της PDC-E2 στον ορό ανοσοποιηθέντων ατόμων με αλοθάνη, φαίνεται να ενισχύει την άποψη αυτή. Πιο συγκεκριμένα, η αλοθάνη οξειδώνεται σε ένα ενεργό μεσολαβητή, ο οποίος συνδέεται με κυτταρικές πρωτεΐνες και σχηματίζει τρι-φλουορο-ακετύλια(TFA), υπεύθυνα για την ανοσολογική απάντηση¹³⁰.

Πειραματικά μοντέλα υποστηρίζουν τη συμμετοχή των ξενοβιοτικών στην παθογένεια της ΠΧΚ, όπως και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα.

Μετά από ανοσοποίηση κονίκλων με αλογονοποιημένο ξενοβιοτικό σύμπλεγμα, το 6-βρωμοεξανοϊκό οξύ, αναπτύχθηκαν υψηλοί τίτλοι AMA έναντι της PDC-E2 υποομάδας, αναστέλλοντας την ενζυματική της δράση^{45,131}, χωρίς όμως, αντίστοιχες ιστολογικές βλάβες στο ήπαρ. Αντιθέτως, παρατηρήθηκαν ιστολογικά χαρακτηριστικά αυτοάνοσης χολαγγειίτιδας μετά από ανοσοποίηση με τον ίδιο παράγοντα σε ινδικά χοιρίδια.¹³²

Σε άλλες μελέτες, ανοσοποίηση NOD1101 και C57BL/6 ποντικών με 2-οκτινοϊκό οξύ οδήγησε σε παραγωγή AMA και παθολογοανατομικές αλλοιώσεις ΠΧΚ^{133,134} όπως επίσης ανοσοποίηση CD4 και CD8 knockout ποντικών με 2-οκτινοϊκό οξύ συνδεδεμένο με χοίρειο αλβουμίνη παρουσία ή απουσία α-γαλακτοσυλκεραμίδης (2-OA-BSA/PBS ή 2-OA-BSA/α-GalCer) οδηγεί σε παραγωγή AMA, πυλαία διήθηση και ίνωση¹³⁵.

Η τροποποιητική δράση του 2-νονινοϊκού οξέος στην PDC-E2 έχει μελετηθεί in vivo. Φαίνεται πως ο ορός AMA (+) ασθενών με ΠΧΚ, συνδέεται ισχυρά με τον τροποποιημένο μιτοχονδριακό επίτοπο¹³⁶. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το 2-νονινοϊκό οξύ ανευρίσκεται ως συστατικό αρκετών καλλυντικών προϊόντων, αρωμάτων, βερνικιών νυχιών, βαφών μαλλιών κτλ, θα μπορούσε να συσχετιστεί η νόσος με συχνή χρήση αυτών των προϊόντων, καθώς επίσης και να ερμηνευτεί εν μέρει η επικράτηση του γυναικείου φύλου ανάμεσα στους ασθενείς με ΠΧΚ^{137,138}. Από την άλλη μεριά, η ιδιότητα του N.Aromaticivorans να μεταβολίζει χημικές ουσίες, πιθανόν να συνδέει αιτιολογικά την εμφάνιση της ΠΧΚ με την αλληλεπίδραση ξενοβιοτικών και μικροοργανισμών στον ίδιο οργανισμό.

4.4. Γυναικείο φύλο και ΠΧΚ

Η αιτία της επικράτησης του γυναικείου φύλου στην ΠΧΚ παραμένει αδιευκρίνιστη. Μελέτες αναφέρουν ότι ο λόγος γυναικών / ανδρών ποικίλει πάντοτε υπέρ των γυναικών, μεταξύ 3:1 στη Σουηδία έως και 22:1 στην Εσθονία. Σε γενικές γραμμές υπολογίζεται ότι 9 στους 10 ασθενείς είναι θήλεα. Άλλα αυτοάνοσα νοσήματα με τόσο μεγάλη υπεροχή των θήλεων είναι το σύνδρομο Sjögren και η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα. Και τα δύο νοσήματα χαρακτηριστικά συνυπάρχουν με την ΠΧΚ σε υψηλή συχνότητα^{139,140,141}. Προκειμένου να ερμηνευτεί αυτή η επικράτηση του γυναικείου φύλου, οι ερευνητές έχουν στραφεί σε τρεις κύριες κατευθύνσεις.

4.4.1 Εμβρυϊκός μικροχμαιορισμός

Κατά τον εμβρυϊκό μικροχμαιορισμό (fetal microchimerism, FMC) ένας μικρός αριθμός εμβρυϊκών κυττάρων που φτάνουν στη μητρική κυκλοφορία, διεισδύουν στους ιστούς και εξακολουθούν να παραμένουν στο μυελό των οστών της μητέρας για δεκαετίες μετά τον τοκετό¹⁴². Τα εμβρυϊκά κύτταρα είναι αλλογενή κατά το ήμισυ στο ανοσολογικό σύστημα της μητέρας, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να προκαλέσει αντίδραση μοσχεύματος κατά ξενιστή (graft –versus host disease, GVHD) στις γυναίκες. Έχουν λοιπόν, βρεθεί άρρενα εμβρυϊκά κύτταρα στο αίμα και στους ιστούς γυναικών-που έχουν τεκνοποιήσει-με αυτοάνοσο νόσημα, όπως πχ σκληρόδερμα. Βάσει αυτών των δεδομένων ακολούθησε μια σειρά μελετών προκειμένου να διερευνηθεί πιθανή αιτιολογική συσχέτιση του εμβρυϊκού μικροχμαιορισμού με την ΠΧΚ σε αντιστοιχία με το σκληρόδερμα. Οι ερευνητές στηρίχθηκαν στην παρόμοια επιδημιολογία των 2 νοσημάτων και στην κλινική συσχέτιση ανάμεσα σε ΠΧΚ και σκληρόδερμα . Οι μελέτες αυτές επικεντρώθηκαν στα ηπατικά κύτταρα και στα μονοπύρηνα του περιφερικού αίματος γυναικών με ΠΧΚ και υγιών εθελοντών με προηγούμενη εγκυμοσύνη άρρενος εμβρύου. Ως μέθοδοι ανίχνευσης αλληλουχιών DNA του Y χρωμοσώματος, χρησιμοποιήθηκαν κυρίως nested PCR και FISH.

Η πλειοψηφία των μελετών απέτυχε να βρεί στατιστικά σημαντική διαφορά στον εμβρυϊκό μικροχμαιορισμό μεταξύ γυναικών με ΠΧΚ και υγιών εθελοντών¹⁴³⁻¹⁴⁸.

Από την άλλη μεριά, μία μόνο μελέτη μικροχμαιοισμού σε ηπατικό ιστό κατέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά (<0.05), 42% των ασθενών με ΠΧΚ έναντι 0% της ομάδας ελέγχου¹⁴⁹.

Τα αποτελέσματά της όμως, αμφισβητούνται λόγω ανακρίβειών στην επιλογή της ομάδας ελέγχου, όπου συμπεριλήφθησαν γυναίκες χωρίς ιστορικό εγκυμοσύνης άρρενος εμβρύου. Συμπερασματικά λοιπόν, φαίνεται ότι δεν υπάρχουν επαρκή πειραματικά δεδομένα που να συνδέουν τον εμβρυικό μικροχμαιοισμό με την υπερίσχυση του γυναικείου φύλου στην ΠΧΚ.

4.4.2 Φυλετικές Ορμόνες

Τις τελευταίες 5 δεκαετίες το ερευνητικό ενδιαφέρον για τις ορμόνες του φύλου ήταν ιδιαίτερα αυξημένο και τους αποδόθηκαν σημαντικές ανοσορυθμιστικές λειτουργίες. Παρόλα αυτά η δράση τους δεν φαίνεται να σχετίζεται με την επικράτηση του γυναικείου φύλου στην ΠΧΚ¹⁵⁰. Εν τούτοις, τα οιστρογόνα επιδρούν στα χολαγγειοκύτταρα άμεσα μέσω ειδικών υποδοχέων οι οποίοι εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων αυτών. Πιο συγκεκριμένα, η απουσία των υποδοχέων-α οιστρογόνων στην επιφάνεια των χολαγγειοκυττάρων σε ασθενείς σταδίου IV, πιθανόν να υποδηλώνει το ρόλο της ανεπάρκειας των οιστρογόνων στην ανάπτυξη του «συνδρόμου εξαφάνισης των μικρών χοληφόρων» στην ΠΧΚ¹⁵⁰. Ο πιθανός ρόλος των οιστρογόνων στην έναρξη και εξέλιξη της ΠΧΚ αποτελεί ένα πεδίο για περαιτέρω έρευνα και επιστημονική μελέτη.

4.4.3 Φυλετικά χρωμοσώματα

Ο ρόλος των φυλετικών χρωμοσωμάτων στην αυτοανοσία μελετάται αρκετά τα τελευταία χρόνια.

Πρόσφατες αναφορές υποστηρίζουν ότι χρωμοσωμικές βλάβες στα φυλετικά χρωμοσώματα οδηγούν σε υπερίσχυση του γυναικείου φύλου στα αυτοάνοσα νοσήματα^{152,142}. Τρεις παρατηρήσεις ενισχύουν την παραπάνω θεωρία. Καταρχάς, νοσήματα τα οποία χαρακτηρίζονται από μονοσωμία X ή άλλες βλάβες του X

χρωμοσώματος , όπως το σύνδρομο Turner¹⁵³ ή η πρόιμη ωοθηκική ανεπάρκεια¹⁵⁴ (POF, premature ovarian failure), συνδέονται με αυτοανοσία και σε ορισμένες περιπτώσεις με χρόνια χολόσταση. Πληθώρα ανοσολογικών ανωμαλιών συνοδεύουν επίσης νοσήματα με μονογονιδιακές διαταραχές συνδεόμενες με το X χρωμόσωμα, όπως η X-φυλοσύνδετη ανοσοανεπάρκεια¹⁵⁵. Εξάλλου, ένας αριθμός γονιδίων με βασικό ρόλο στην διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής εδράζονται στο X χρωμόσωμα, όπως το γονίδιο FoxP3¹⁵⁶.

Η βιολογία του X χρωμοσώματος είναι ιδιαίτερα σύνθετη συγκρινόμενη με άλλα χρωμοσώματα. Έτσι λοιπόν, οι γυναίκες συνιστούν λειτουργικά μωσαικά για τα X-φυλοσύνδετα γονίδια, με τα περισσότερα γονίδια του X χρωμοσώματος να μην εκφράζονται λόγω της απενεργοποίησης του X-χρωμοσώματος. Η απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος είναι ένα επιγενετικό φαινόμενο, όπου ένα από τα X χρωμοσώματα στις γυναίκες παύει να λειτουργεί, ώστε ένα μόνο αντίγραφο των γονιδίων στο X χρωμόσωμα υπάρχει στα εμβρυικά κύτταρα. Η απενεργοποίηση που μπορεί να αφορά το X χρωμόσωμα είτε μητρικής, είτε πατρικής προέλευσης, είναι τυχαία και συμβαίνει κατά τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης. Βέβαια αρκετά γονίδια μπορούν να διαφύγουν της διαδικασίας της απενεργοποίησης¹⁵⁷. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν υψηλότερη συχνότητα X μονοσωμίας στα κύτταρα του περιφερικού αίματος γυναικών με ΠΧΚ, συγκρινόμενα με ομάδα ελέγχου υγιών γυναικών¹⁵⁸. Αντίστοιχα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η συστηματική σκλήρυνση και η αυτοάνοση θυροειδική νόσος¹⁵⁹, όχι όμως και σε γυναίκες με συστηματικό ερυθματώδη λύκο^{160,161}. Τέλος, ερευνητές υποστηρίζουν ότι η απώλεια του X χρωμοσώματος στην ΠΧΚ(αλλά και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα) δεν είναι τυχαία και αφορά συνήθως το πατρικής προέλευσης X χρωμόσωμα¹⁶².

4.4.4 Ο ρόλος των γενετικών παραγόντων

Η πλειοψηφία των γενετικών μελετών που έχουν διεξαχθεί για την ανίχνευση γονιδίων που ενέχονται στην αιτιοπαθογένεση της ΠΧΚ εστιάζονται κυρίως σε μελέτες γενετικής συσχέτισης. Αφορούν κυρίως σε ανοσορυθμιστικά γονίδια που συμβάλλουν στη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής και ανήκουν στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας ή σε άλλους γενετικούς τόπους μη σχετιζόμενους με αυτό^{163,164}. Ένα μεγάλο μέρος των μελετών αυτών έχει καταλήξει στην ανεύρεση μη ισχυρών και συχνά αντικρουόμενων συσχετίσεων της ΠΧΚ με σημαντικό αριθμό γονιδίων, με μοναδική εξαίρεση τη γενετική περιοχή του MHC¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Πράγματι, τα αποτελέσματα της μεγαλύτερης σε αριθμό ασθενών μελέτης σε πολυμορφισμούς γονιδίων του HLA έδειξε σημαντική συσχέτιση της ΠΧΚ με το αλληλόμορφο HLA DRB1*08 και παράλληλα προστασία από τη νόσο των αλληλομόρφων DRB1*11 και DRB1*13^{165,168}.

Ακόμα πιο πρόσφατα δεδομένα από μελέτες GWAS δίνουν ολοένα και περισσότερες πληροφορίες για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας και της σύνθετης αιτιολογίας αυτού του πολυπαραγοντικού νοσήματος. Δεκατρείς γενετικοί τόποι στην περιοχή HLA τάξεως II βρέθηκαν να έχουν σημαντική συσχέτιση με την ευπάθεια στη ΠΧΚ σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης GWAS που έλαβε χώρα σε Βόρειο Αμερική και Ιταλία^{167,169}.

Μεταξύ των μη σχετιζόμενων με το HLA γενετικών τόπων, ισχυρότερη συσχέτιση με τη νόσο έδειξαν δύο SNPs(rs6441286 and rs574808) του γονιδίου της υποομάδας A της ιντερλευκίνης 12 (*IL12A*) και ένα SNP(rs3790567) της υποομάδας B2 του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 12 (*IL12RB2*), ενώ σημαντική ήταν και η συσχέτιση και με έναν επιπλέον πολυμορφισμό rs3790565 του *IL12RB2*. Σημαντική συσχέτιση της ΠΧΚ περιγράφηκε και με SNPs άλλων γονιδίων με ρυθμιστικό ρόλο στους μηχανισμούς της ειδικής ανοσίας όπως στο ιντρόνιο 3 του *STAT4* (rs7574865), *CTLA4* (rs6748358) και *IRF5-TNPO3* (rs10488631). Νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η ευπάθεια στη ΠΧΚ σχετίζεται με πολυμορφισμούς των γονιδίων DENND1B, CD80, IL7R, CXCR5, TNFRSF1A, CLEC16A and NFKB¹⁷⁰, καθώς και με πολυμορφισμούς άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στην μη ειδική ανοσία όπως MDR3 (multidrug resistance protein 3)¹⁷¹ και A2BP1¹⁷².

Φαίνεται λοιπόν ότι υπάρχει γενετική ποικιλομορφία στην κατανομή αλληλομόρφων γονιδίων που κωδικοποιούν παράγοντες που συμμετέχουν στην ειδική και μη ειδική ανοσία. Η παρουσία των αλληλομόρφων αυτών πιθανόν να οδηγεί σε διαταραχή των μηχανισμών ανοσολογικής ανοχής του ξενιστή σε περίπτωση μικροβιακής λοίμωξης με συνέπεια την έναρξη ή/και τη διαιώνιση της φλεγμονώδους διεργασίας. Αξίζει να αναφερθεί το παράδειγμα γενετικής ποικιλομορφίας του γονιδίου της IL-12 που οδηγεί σε κληρονομούμενη ανεπάρκεια της IL-12, του υποδοχέα της και της INF- γ οι οποίες με τη σειρά τους συνεπάγονται αυξημένη ευπάθεια σε μικροβιακή λοίμωξη και σοβαρότητα λοιμωδών νόσων κυρίως μυκοβακτηριδιακών¹⁷³.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση των Invernizzi και συνεργατών υψηλότερης συχνότητας μονοσωμίας του X χρωμοσώματος στα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος θηλέων ασθενών με ΠΧΚ^{158,159}. Το χαρακτηριστικό αυτό εύρημα έχει αναφερθεί και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα με επικράτηση του γυναικείου φύλου, όπως η συστηματική σκλήρυνση και η αυτοάνοση θυρεοειδική νόσος. Εξάλλου στο X χρωμόσωμα εδράζονται τα γονίδια που ρυθμίζουν την ομοιοστασία των φυλετικών ορμονών και τη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής. Ένα γονίδιο υπεύθυνο για την εμφάνιση ανοσοανεπάρκειας εξαρτώμενης από το X χρωμόσωμα (X-linked immunodeficiency) είναι το γονίδιο για τον CD40 συνδέτη (*CD40L*) και χαρακτηρίζεται από την παρουσία αυξημένων IgM στον ορό. Αντίστοιχα και στην ΠΧΚ τα επίπεδα των IgM ορού στην πλειοψηφία των ασθενών είναι αυξημένα. Συνεπώς θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι τόσο η επικράτηση του γυναικείου φύλου όσο και η περιεμμηνοπαυσιακή ηλικιακή περίοδος εμφάνισης της ΠΧΚ ερμηνεύονται από διαταραχές στη ρύθμιση του X χρωμοσώματος ή ακόμα και απενεργοποίηση αυτού^{159,162,174}. Έτσι ίσως εξηγείται και η συνύπαρξη της ΠΧΚ με συστηματική σκλήρυνση και αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα.

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η μονοσωμία του X χρωμοσώματος επιδρά στην παθογένεια της ΠΧΚ δεν είναι γνωστός και πιθανόν είναι περισσότερο πολύπλοκος^{158,159,162,175}.

Ερευνητές υποστηρίζουν ότι η ΠΧΚ είναι το αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης πολλών γονιδίων, όπου η ευπάθεια στη νόσο εξαρτάται κύρια από ένα γενετικό τόπο συνδεδεμένο με το X χρωμόσωμα¹⁶². Η ευπάθεια του γυναικείου φύλου ίσως να οφείλεται συν τοις άλλοις και σε γονίδια του χρωμοσώματος Y¹⁶².

Εναλλακτικά, έχει προταθεί ένα πολυγονιδιακό μοντέλο κληρονομής της ΠΧΚ, όπου γονίδια συνδεδεμένα με το Y χρωμόσωμα ασκούν προστατευτική δράση έναντι της νόσου, ενώ γονίδια συνδεδεμένα με το X χρωμόσωμα επενεργούν σε άλλα γονίδια προκειμένου να εμφανιστεί ή όχι η ευπάθεια στη νόσο¹⁶². Οι ίδιοι ερευνητές σε μεταγενέστερες μελέτες αναφέρουν ότι η μονοσωμία X χρωμοσώματος που ανιχνεύεται στα λευκοκύτταρα του αίματος ασθενών με ΠΧΚ είναι αποτέλεσμα μη κληρονομής του ενός χρωμοσώματος από τον ένα μόνο γονέα και όχι δευτεροπαθούς λειτουργικής απενεργοποίησης του ενός X χρωμοσώματος¹⁶². Έτσι λοιπόν πιθανολογείται ότι σε γυναίκες με μονοσωμία X χρωμοσώματος αυτό-αντιγόνα σχετιζόμενα με το X χρωμόσωμα διαφεύγουν της παρουσίας τους στον θύμο αδένα ή σε πιο περιφερικά όργανα. Κάτω από ειδικές συνθήκες η εμφάνιση αυτών των αυτοαντιγόνων μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση των ανοσολογικών μηχανισμών και τελικά την εκδήλωση της νόσου.

Βέβαια, η θεωρία αυτή μειονεκτεί καθότι η μονοσωμία του X χρωμοσώματος στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος δεν συνιστά χαρακτηριστικό γνώρισμα σε όλους τους ασθενείς με ΠΧΚ.

4.5 Πειραματικά Μοντέλα

Το επιστημονικό ενδιαφέρον για την αναζήτηση των παθογενετικών μηχανισμών που προκαλούν την ΠΧΚ οδήγησε τους ερευνητές στην ανάπτυξη πειραματικών μοντέλων¹⁷⁶.

Βέβαια, η δυσκολία έγκειται στην προσομοίωση των ανθρώπινων χαρακτηριστικών στα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που συνήθως χρησιμοποιούνται. Το πρώτο εκ των τριών πειραματικών μοντέλων αφορά σε συγγονιδιακή (congenic) παραλλαγή του μη παχύσαρκου διαβητικού (NOD, non-obese diabetic) ποντικού NOD.c3c4. Χαρακτηρίζεται από αυτοάνοση χολαγγειοπάθεια των μεγαλύτερων χολαγγείων, παρουσία 50-60% AMA και 80-90% ANA στον ορό¹²³ και λεμφοκυτταρική CD4+, CD8+ διήθηση ανάμεσα στα πυλαία διαστήματα, εικόνα παρόμοια με χρόνια μη διαπυητική χολαγγειίτιδα και επιθηλιοειδές κοκκίωμα. Ταυτόχρονα ανευρίσκονται και ιστολογικές βλάβες στα χοληφόρα που δεν απαντώνται στο ανθρώπινο ήπαρ ασθενών με ΠΧΚ, ιδιαίτερα κυστικές αλλαγές¹²³.

Το δεύτερο μοντέλο διαγονιδιακού ποντικίου προερχόμενο από την εισαγωγή ενός επικρατούς γονιδίου του υποδοχέα του TGF-β type II (dominant negative transforming growth factor receptor type II)¹⁷⁷. Ως γνωστόν ο TGF-β είναι μια κυτοκίνη με πλειοτροπική δράση στην κυτταρική ανάπτυξη και στον ανοσολογικό έλεγχο, ιδίως στην προαγωγή της ανάπτυξης των T-ρυθμιστικών κυττάρων. Με τη σύνδεση του TGF-β στον υποδοχέα του, ενεργοποιείται μια σηματοδοτική αλυσίδα που οδηγεί στη ρύθμιση της μεταγραφής επηρεάζοντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Ο υποδοχέας αυτός αδυνατεί να ενεργοποιηθεί μετά από σύνδεση με τον TGF-β καθότι καταστρέφεται το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα και αναστέλλεται η μεταγωγή του σήματος για την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων. Σημαντικό ρόλο στην πρόκληση ηπατικής βλάβης φαίνεται να παίζουν τα CD1d-εξαρτώμενα T-κύτταρα φυσικοί φονείς σε αυτά τα διαγονιδικά πειραματικά μοντέλα ΠΧΚ^{177, 178} με αποτέλεσμα να αναπτύσσεται εικόνα χολαγγειίτιδας. Επιπλέον, η παρουσία AMA περιγράφεται στον ορό των ποντικών σε ποσοστό 100% αυτών.

Ένα άλλο πειραματικό παθογενετικό μοντέλο ΠΧΚ βασίστηκε στην αδρανοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα ιντερλευκίνης-2α (IL-2Rα) σε «knockout» ποντίκι¹⁷⁹. Ο υποδοχέας IL-2Rα είναι ένα CD25 μόριο το οποίο προσδίδει ανοσορυθμιστική ιδιότητα στα CD4+ κύτταρα, όταν εκφράζεται στην επιφάνειά τους. Στα ποντίκια IL-2Rα-/- του μοντέλου αυτού παρατηρήθηκε 100% παρουσία AMA

έναντι της υποομάδας PDC-E2 στον ορό, 80% ANA και διήθηση των πυλαίων τριάδων από λεμφοκύτταρα CD4+ και CD8+, όχι όμως και από NKT ή διαμόρφωση κοκκιωμάτων. Επιπλέον, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα κυτοκινών στον ορό των ποντικών αυτών όπως IFN-γ, TNF-α, IL-12p40, and IL-6, κατά αντιστοιχία με τον ορό ασθενών με ΠΧΚ¹⁸⁰⁻¹⁸². Η μελέτη αυτή βασίστηκε σε προηγηθείσα αναφορά των ερευνητών Aoki και συνεργατών, σε άρρεν παιδί με γενετική ανεπάρκεια IL-2Rα με ηπατική δυσλειτουργία και ορολογικά χαρακτηριστικά ΠΧΚ¹⁸³.

Ένα άλλο πειραματικό μοντέλο δημιουργήθηκε με ανοσοποίηση των πειραματόζωων με μοριακά τροποποιημένο PDC-E2 επίτοπο από τη δράση ξενοβιοτικών. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι με αυτόν τον τρόπο ανοσοποίησης προκλήθηκε η παραγωγή AMA σε διαφορετικά είδη πειραματόζωων όπως κονίκλους, ινδικά χοιρίδια και ποντίκια^{175,184}.

Υψηλοί τίτλοι AMA αντισωμάτων έναντι PDC-E2 επιτόπων, διαφορετικών σε σχέση με τα αντισώματα που παρήχθησαν από τη δράση του ξενοβιοτικού, εμφανίστηκαν στον ορό των κουνελιών έπειτα από ανοσοποίηση με 6-βρωμοεξανοικό οξύ(μια

ξενοβιοτικά τροποποιημένη απτίνη που μιμείται το λιποϊκό οξύ). Η ανοσοποίηση αυτή δεν είχε όμως ως αποτέλεσμα την παραγωγή ειδικών για ΠΧΚ ηπατικών βλαβών¹⁸⁵. Αντιθέτως, παρατηρήθηκαν ιστολογικά χαρακτηριστικά αυτοάνοσης χολαγγειίτιδας μετά από ανοσοποίηση με τον ίδιο παράγοντα σε ινδικά χοιρίδια¹³⁰, ενώ ανοσοποίηση NOD1101 και C57BL/6 ποντικών με 2-οκτινοϊκό οξύ οδήγησε σε παραγωγή AMA και παθολογοανατομικές αλλοιώσεις ΠΧΚ^{45,133}. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ιδιότητα του N.Aromaticinorans να μεταβολίζει χημικές ουσίες, θέτοντας υπό συζήτηση την αιτιολογική συσχέτιση της ΠΧΚ με την αλληλεπίδραση ξενοβιοτικών και μικροοργανισμών στον ίδιο οργανισμό.

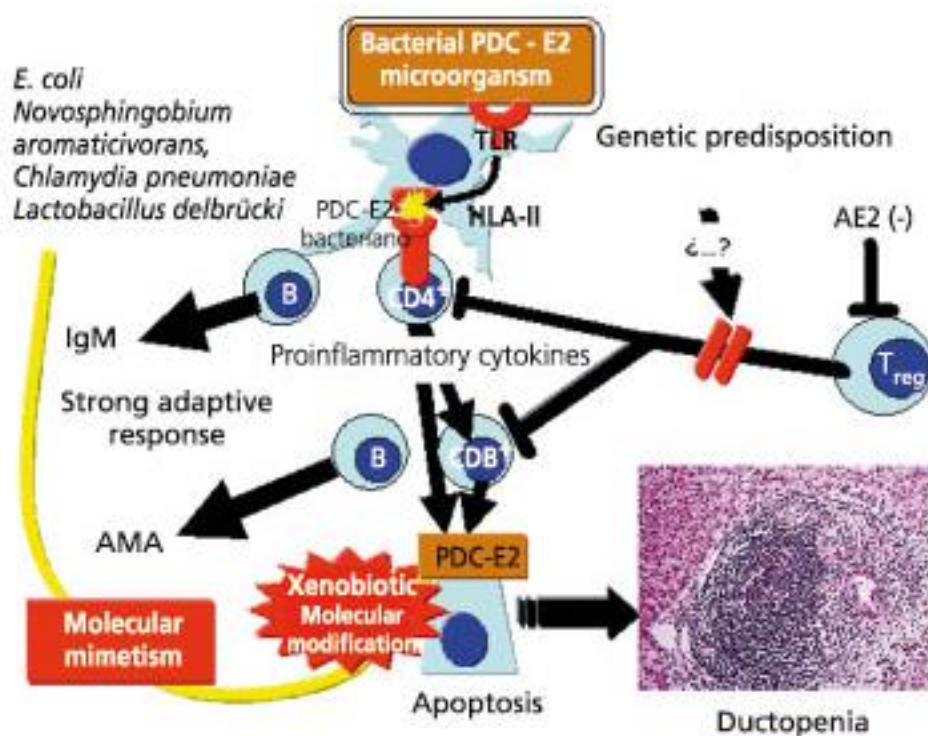
Κυρίαρχα Παθογενετικά Μοντέλα

Ποικίλα θεωρητικά μοντέλα για την αιτιοπαθογένεια της ιστικής βλάβης ΠΧΚ έχουν αναπτυχθεί έως τις μέρες μας. Τα μοντέλα αυτά δεν είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους και μπορεί να αναφέρονται σε διαφορετικά στάδια του παθογενετικού μηχανισμού, συμπεριλαμβάνοντας το αρχικό αίτιο, τις διαταραχές του ανοσιακού συστήματος που ευνοούν την συνέχιση και ενίσχυση της διαδικασίας και φυσικά, την εκλεκτική καταστροφή των BEC μέσω των AMA αυτό-αντισωμάτων. Παρακάτω παρατίθενται ορισμένα από τα κυρίαρχα παθογενετικά μοντέλα της ΠΧΚ.

4.5.1 Το μοντέλο του μοριακού μιμητισμού

Λοίμωξη βακτηριακής ή ιογενούς προέλευσης μπορεί, είτε να προκαλέσει άμεσα απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων, είτε έμμεσα, ως αποτέλεσμα διέγερσης ανοσολογικών μηχανισμών στα πλαίσια μοριακού μιμητισμού. Η σύνδεση του αντιγονικού επιτόπου του παθογόνου μικροοργανισμού ή ξενοβιοτικού με τους υποδοχείς TLR οδηγεί σε ενεργοποίηση των T-κυττάρων έναντι της PDC-E2 μέσω διασταυρούμενης αντίδρασης. Η δράση αυτή των T-κυττάρων στα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων προκαλεί απόπτωση αυτών.

Μέχρι και σήμερα τα δεδομένα από έρευνες για την ταυτότητα του παθογόνου εκλυτικού παράγοντα για την απώλεια της ανοσολογικής ανοχής στην ΠΧΚ παραμένουν αντικρουόμενα και ελλιπή.



Εικόνα 2. Παθογενετικό μοντέλο μοριακού μιμητισμού.

Απώλεια της ανοσολογικής ανοχής του συμπλέγματος E2 της πυρουβικής δευδρογενάσης PDC-E2 στα χολαγγειοκύτταρα μετά από την επίδραση ξενοβιοτικών ή βακτηρίων με μοριακή δομή ομοιάζουσα με τη PDC-E2 μονάδα των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση της ΠΧΚ. Οι μικροοργανισμοί ενεργοποιούν το σύστημα της φυσικής ανοσίας μέσω TLRs, δημιουργείται ένα μικροπεριβάλλον το οποίο οδηγεί περαιτέρω σε ισχυρή ενεργοποίηση μηχανισμών επίκτητης ανοσίας σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα. Το γυναικείο φύλο, HLA αντιγόνα και η AE2 ανεπάρκεια συνιστούν γενετικά χαρακτηριστικά τα οποία προδιαθέτουν σε ΠΧΚ, μέσω μείωσης του αριθμού και της ενεργότητας των T-ρυθμιστικών κυττάρων και αύξησης της ενεργοποίησης των B-κυττάρων. Αυτό οδηγεί σε αύξηση των IgM και των αντιμιχονδριακών αντισωμάτων IgG και IgA έναντι του συμπλέγματος PDC-E2. Επιπλέον, η ενεργοποίηση των CD-8 κυττάρων θα οδηγήσει στην απόπτωση των BECs και SECs και στην καταστροφή των μικρού μεγέθους χοληφόρων.

(Solís Herruzo JA, Solís Muñoz P, Muñoz Yagüe T. The pathogenesis of primary biliary cirrhosis Rev Esp Enferm Dig. 2009;101(6):413-23.)

4.5.2 Determinant density model-Παθογενετικό μοντέλο Jones και συνεργατών

Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο¹⁸⁶, T-κύτταρα ενεργοποιημένα έναντι στον PDC αυτό-επίτοπο διαφεύγουν της αρνητικής επιλογής στον θύμο αδένα, λόγω χαμηλής συγγένειας του αντιγονικού υποδοχέα των T-κυττάρων TCR(T cell receptor) με τον αυτό-επίτοπο και το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας MHC(major histocompatibility complex).

Η έναρξη της ανοσολογικής αντίδρασης έναντι της PDC-E2 υποομάδας με ενεργοποίηση επαρκούς αριθμού CD4 T-κυττάρων, συμβαίνει μόνο όταν αυξηθεί σημαντικά ο αριθμός των αντιγονικών αυτό-επίτοπων και συνεπώς και η παρουσίασή τους από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα APC (antigen presenting cells) στα T-κύτταρα με χαμηλή συγγένεια TCR.

Η παρατήρηση ότι τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενών με ΠΧΚ μετά τη σύνδεσή τους με τους υποδοχείς TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 and TLR9 παράγουν υψηλά επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF α , IL1b, IL-6, IL-8) υποδηλώνει το πιθανό ρόλο της υπεραπαντητικότητας γενικά των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στην απώλεια της ανοσολογικής ανοχής.

Βέβαια το αρχικό ερέθισμα που οδηγεί σε διασταυρούμενη αντίδραση ειδικών αντισωμάτων με την PDC-E2 υποομάδα, πιθανόν να είναι μικροβιακά ή ιικά αντιγόνα με δομική ομολογία με την PDC-E2.

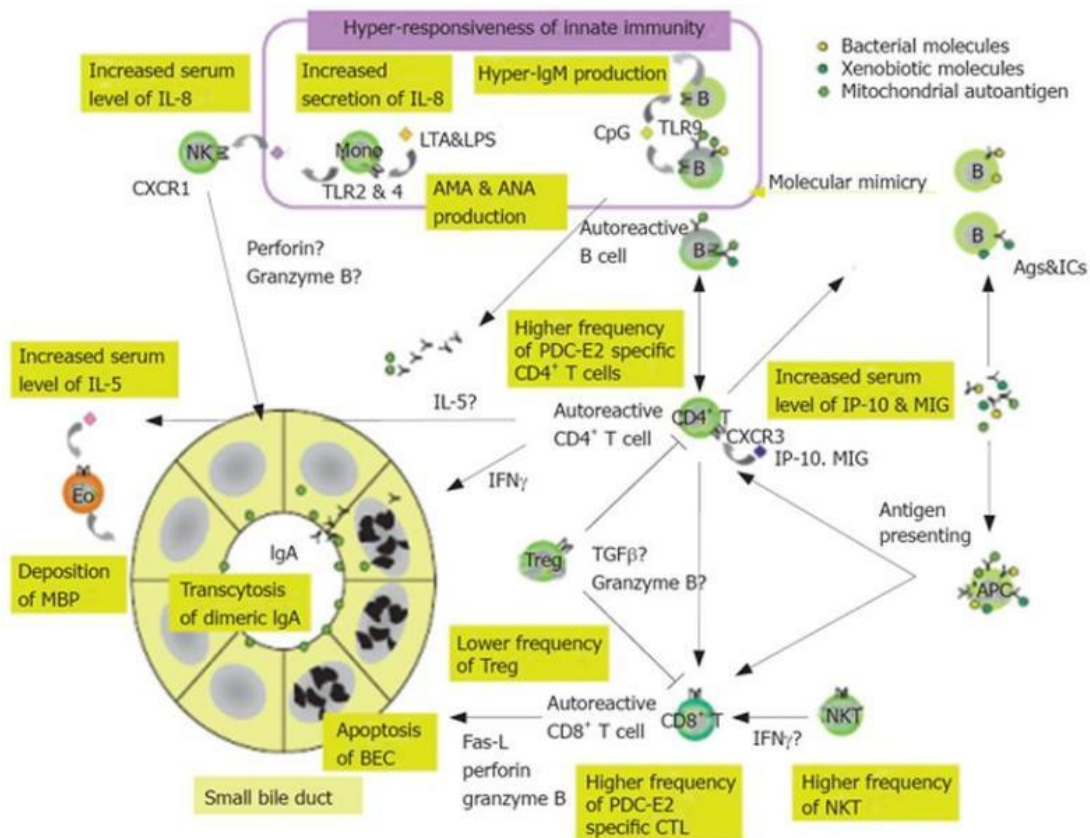
4.5.3 Υπεραπαντητικότητα συστήματος μη ειδικής ανοσίας και αυξημένη έκφραση TLR9.

Η έναρξη της ανοσολογικής αντίδρασης σηματοδοτείται από ένα αυτό-αντιγονικό ερέθισμα, είτε στα πλαίσια μοριακού μιμητισμού της PDC-E2 από παθογόνο μικροοργανισμό, είτε από τροποποίηση της δομής της PDC-E2 από ξενοβιοτικά, ή τέλος από εξεσημασμένη απελευθέρωση των μιτοχονδριακών αυτό-αντιγόνων στην επιφάνεια των κυττάρων από τα αποπίπτοντα BEC. Σημαντικός θεωρείται ο ρόλος της γενετικής προδιάθεσης, με πολλαπλές κληρονομούμενες ανεπάρκειες στο μηχανισμό ανοσολογικής ανοχής, χωρίς αυτές να έχουν ακόμα διευκρινιστεί επαρκώς. Σύμφωνα με το μοντέλο Leo και συνεργατών¹⁸⁷ η υπεραπαντητικότητα

του συστήματος μη ειδικής ανοσίας επάγει την παραγωγή IgM και την κυτταρική έκφραση του TLR9. Η σύνδεση των TLR με τον αντιγονικό αυτό-επίτοπο (ή άλλα μιμητικά μόρια) ενεργοποιεί τα APC, τα οποία με τη σειρά τους διαμέσω μορίων του MHC παρουσιάζουν το αυτό-αντιγόνο στα CD4+ T-λεμφοκύτταρα. Ακολουθεί ενεργοποίηση των CD8+ κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων και B-λεμφοκυττάρων, και τα τελευταία παράγουν τα AMA.

Η ήδη μειωμένη T- ανοσολογική ανοχή επιτείνεται εξαιτίας της ανεπαρκούς δραστηριότητας των T-ρυθμιστικών κυττάρων στα αυτό-διεγερμένα T-λεμφοκύτταρα. Τελικός στόχος του ανοσιακού μηχανισμού είναι τα BEC με επιβλαβή δράση κυτοκινών από τα CD4+ T-κύτταρα, άμεση κυτταροτοξικότητα από τα CD8+ T-κύτταρα ή ενδοκύττωση του συμπλέγματος IgA-AMA. Ενίσχυση της τοξικής δράσης στα BEC πιθανόν συντελείται από την απελευθέρωση MBP(μείζονος βασικής πρωτεΐνης) από τα κρυσταλλοειδή κοκκία των ενεργοποιημένων εωσινοφίλων.

Εν τέλει, η διαίωσιση του μηχανισμού αυτοανοσίας επιτυγχάνεται λόγω συνεχούς απελευθέρωσης των PDC-E2 μιτοχondριακών αυτό-αντιγόνων από τα διαρκώς αποπίπτοντα με τους προαναφερθέντες μηχανισμούς BECs.



Εικόνα 3. Παθογενετικό μοντέλο Lleo, Invernizzi et al.

(Lleo A, Invernizzi P, Mackay IR, Prince H, Zhong RQ, Gershwin ME. Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2008;14(21): 3328 -37. Review.)

4.5.4 Το Μοντέλο Ισχαιμικής Βλάβης Μέσω Ενδοθηλινων

Σύμφωνα με μελέτη ερευνητών που διεξήχθη το 2006 στο εργαστήριό μας, παρατηρήθηκε αύξηση των ενδοθηλινών κυρίως EDN-2 (και σε μικρότερο βαθμό της EDN-1), τόσο στο περιφερικό αίμα, όσο και στην ηπατική φλέβα ασθενών με αρχικού σταδίου ΠΧΚ, σε σύγκριση με κίρρωτικούς ασθενείς άλλης αιτιολογίας και ασθενείς με χρόνια ηπατική νόσο ιογενους αιτιολογίας¹⁸⁸.

Στο παθογενετικό μοντέλο Κουρούμαλη και συνεργατών^{189, 190} η αρχική βλάβη στο επιθήλιο των μικρών χοληφόρων προκαλείται λόγω ισχαιμίας από υπερπαραγωγή της EDN-2 (και σε μικρότερο βαθμό της EDN-1). Η υπερπαραγωγή αυτή πιθανά προκαλείται από τη δράση ρετροϊών, άλλων μικροβίων *N.Aromaticivorans* ή μοριακών συμπλεγμάτων σχετιζομένων με παθογόνους μικροοργανισμούς(PAMPs) σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα. Η EDN-2 δρά χημειοτακτικά στα κύτταρα Kupffer, προκαλεί σύσπαση των αστεροειδών κυττάρων οδηγώντας πρώιμα σε πυλαία υπέρταση. Επιπλέον η EDN-2 οδηγεί σε ισχαιμική βλάβη των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων(BEC) μέσω σύσπασης του αγγειακού πλέγματος των χοληφόρων(PVP). Αποτέλεσμα αυτής της δράσης είναι η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, ρήξη της μεμβράνης τους λόγω παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species) και τελικά απόπτωση των (BEC). Η απελευθέρωση του συμπλέγματος (PDC) από τα μιτοχόνδρια κατά την απόπτωση των BEC συντελεί με τη σειρά της σε εμφάνιση αυτό-ενεργων επιτόπων στα BEC, οι οποίοι πιθανά μέσω της δράσης της caspase 3 δεσμεύονται είτε από τα δενδριτικά κύτταρα πέριξ των χοληφορων, είτε από τα BEC που εκφράζουν MCH τύπου II, με αποτέλεσμα την παραγωγή AMA. Η δεύτερη θεμελιώδης διαταραχή η οποία λαμβάνει χώρα αργότερα στην πορεία της νόσου είναι η παραγωγή ROS που προκαλείται από τη συνάθροιση των χολικών οξέων ως αποτέλεσμα των 'εξαφανιζόμενων χοληφόρων αγγείων' καθώς και από τα κύτταρα Kupffer που αθροίζονται γύρω από τα αποπτωτικά

σώματα των BEC. Τα ROS διεγείρουν τα κύτταρα Kupffer προς παραγωγή κυτταροκινών, TGFβ και ROS. Επιπλέον, η ύπαρξη σχετικής ανεπάρκειας αντιοξειδωτικών επιτρέπει στα ROS να προκαλέσουν υπεροξειδωση των λιπιδίων περαιτέρω απόπτωση των BEC και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Οι παραγόμενες από τα κύτταρα Kupffer και τα ενδοθηλιακά CXCL χημειοκίνες οδηγούν σε συνάθροιση ανοσολογικών κυττάρων, ενώ IP-10 αναστέλει την απόπτωση των LSC, η οποία επάγεται από φυσικά κύτταρα φονείς(NKT). Έτσι με τη δράση του TGFβ ευνοείται η δημιουργία ίνωσης. Συν τοίς άλλοις η αυξημένη παραγωγή TGF-β3 ίσως να μπορεί να ερμηνευσει και τα μειωμένα επίπεδα Tregs που ανευρίσκονται στην ΠΧΚ. Σε αυτό το μοντέλο τα BECs καταστρέφονται και με άλλους μηχανισμούς πλὴν αυτού της αρχικής ισχαιμίας, όπως η δράση των ROS, η καταστροφή των NKT μέσω της παραγόμενης από τα κύτταρα Kupffer INFα, η κυτταροτοξικότητα από CD8+ve και Th17. Ολοι αυτοί τελικά οδηγούν στην εκδήλωση του ‘συνδρόμου εξαφάνισης των χοληφόρων αγγείων’ που χαρακτηρίζει την ΠΧΚ.

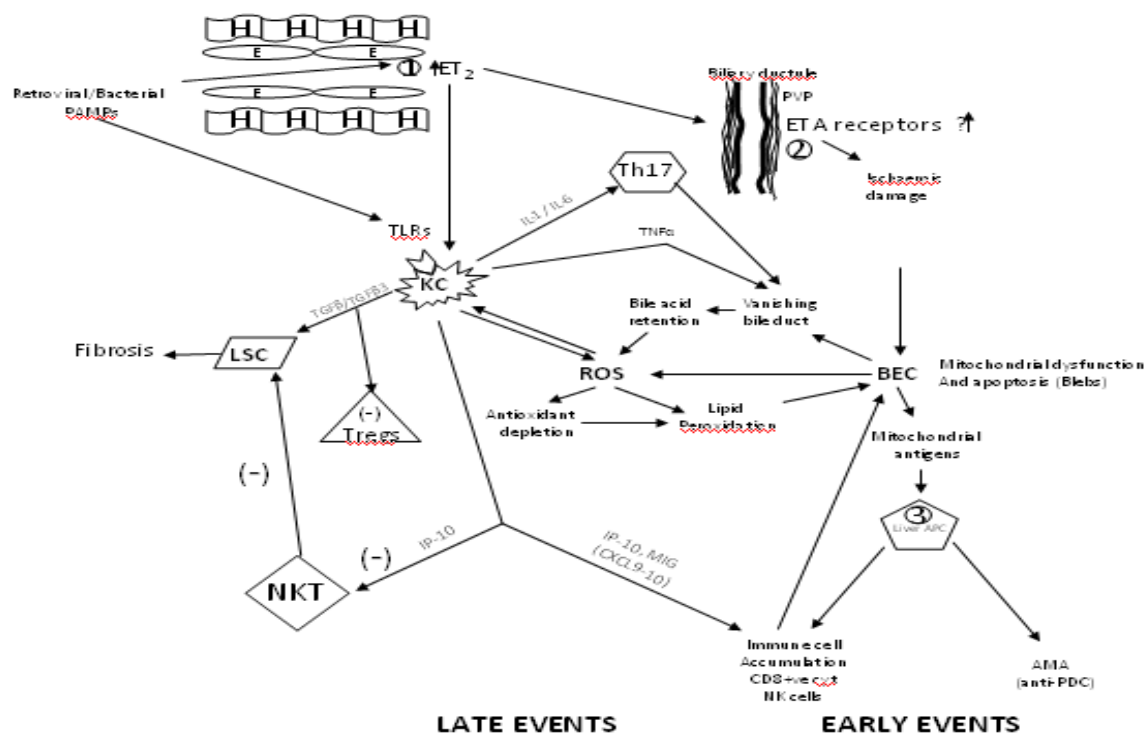
Βέβαια το παραπάνω παθογενετικό μοντέλο ΠΧΚ αδυνατεί να εξηγήσει επαρκώς την πρόκληση βλαβών εκλεκτικά στο ήπαρ παρόλο που τα αυξημένα επίπεδα EDN-2 βρέθηκαν στην συστηματική κυκλοφορία. Η αγγειοσύσπαση και κατ’επέκταση η ισχαιμική βλάβη θα έπρεπε να λαμβάνει χώρα και σε άλλα όργανα.

Μία πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η γενετικώς καθοριζόμενη αυξημένη έκφραση υποδοχέων ενδοθηλίνης ή η αυξημένη συγγένεια των υποδοχέων ενδοθηλίνης στο αγγειακό δίκτυο των χοληφόρων, μία υπόθεση που χρήζει περαιτέρω πειραματικής διερεύνησης.

Αυτό το υποθετικό παθογενετικό μοντέλο ΠΧΚ συνδυάζει την αλληλεπίδραση μεταξύ φυσικής και επίκτητης ανοσίας. Ενσωματώνει επίσης το ρόλο των λοιμωδών παραγόντων και την ομοιότητα των μηχανισμών της ΠΧΚ με τη GVHD, ενώ η αλληλεπίδραση ενδοθηλιακών και αστεροειδών κυττάρων συμβάλλει στην ανάπτυξη ίνωσης και κίρρωσης.

Με δεδομένο ότι η παραγωγή AMA είναι ένα δευτερογενές φαινόμενο παρά παθογενετικό, η ύπαρξη ασθενών με ΠΧΚ AMA(-) ερμηνεύεται ομοίως με την παρουσία άλλων αυτοαντισωμάτων ειδικών ή μή για τη νόσο.

Το μοντέλο αυτό παθογένεσης της ΠΧΚ προσφέρεται σε πολλά επίπεδα για γενετικά καθοριζόμενο έλεγχο και πιθανά να παίζουν κάποιο ρόλο και τα οιστρογόνα ώστε να μπορεί να δοθεί ερμηνεία της επικράτησης του γυναικείου φύλου στη νόσο.



Εικόνα 4. Ο ρόλος των ενδοθηλινών και των ROS στον παθογενετικό μηχανισμό της ΠΧΚ.
(Kouroumalis E, Notas G. Primary biliary cirrhosis: From bench to bedside. World J Gastrointest Pharmacol Ther. 2015;6(3):32-58. Review)

)

4.5.5 Παθογενετικό μοντέλο γήρανσης των κυττάρων και αυτοφαγίας

Στο παθογενετικό μοντέλο των ερευνητών Harada και Nakanuma¹⁹¹ υποστηρίζεται ότι το αρχικό ερέθισμα για την πρόκληση της καταστροφής των BEC στην ΠΧΚ αφορά αποκλειστικά τα χοληφόρα και το σύστημα της μή ειδικής ανοσίας σε αυτά. Σύμφωνα με τα παραπάνω η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών ή η δράση ξενοβιοτικών δεν είναι απαραίτητη για την πρόκληση χολαγγειοπάθειας ως αποτέλεσμα ενεργοποίησης μηχανισμών ειδικής ανοσίας. Άλλωστε φαίνεται να

υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στη γήρανση του ανοσολογικού συστήματος και στον κίνδυνο ανάπτυξης αυτοάνοσων νοσημάτων σε μεγαλύτερη ηλικία.

Πρόσφατες μελέτες επιβεβαιώνουν τη συμμετοχή της γήρανσης των κυττάρων και της αυτοφαγίας στους μηχανισμούς της μη ειδικής ανοσίας και πιθανόν της αυτοανοσίας^{192, 193}.

Η γήρανση των κυττάρων προάγεται από οξειδωτικό στρες, βλάβες στο DNA και μείωση του μήκους του τελομερούς^{194, 195}. Η αυτοφαγία συνιστά μια διαδικασία κατά την οποία, ενδοκυττάρια πρωτεΐνες και κυτταρικά οργανίδια αποδομούνται προκειμένου να περιοριστεί η κυτταρική βλάβη και να διατηρηθεί ο μεταβολισμός των γηρασμένων κυττάρων¹⁹⁶⁻¹⁹⁹.

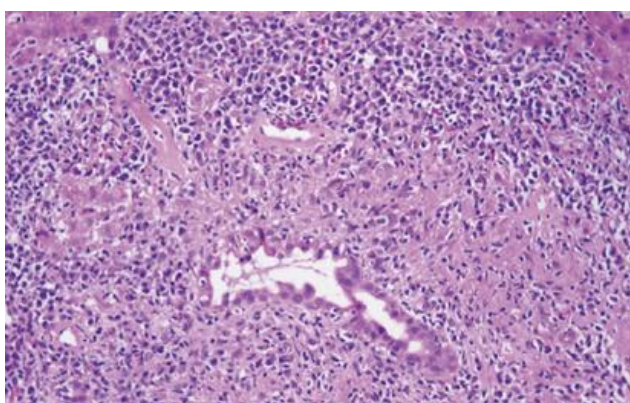
Αναφορές υποστηρίζουν πως η κυτταρική γήρανση και αυτοφαγία πιθανόν συνεισφέρουν στην βλάβη των μικρών χοληφόρων που χαρακτηρίζει την ΠΧΚ^{58,200-203}.

Οι δύο αυτές κυτταρικές διαδικασίες σχετίζονται με την παραγωγή AMA και ειδικών T-κυττάρων ενεργοποιημένων έναντι αυτοαντιγόνων οδηγώντας στην καταστροφή των BEC. Από την άλλη πλευρά, τα γηρασμένα, αυτό-διεγυρόμενα BEC, μέσω έκκρισης χημειοκινών και κυτοκινών, διαμορφώνουν ένα μικροπεριβάλλον πέριξ του δικτύου των χοληφόρων το οποίο ευνοεί στην περαιτέρω εξέλιξη της κυτταρικής βλάβης²⁰⁴.

Η πλήρης κατανόηση της μοριακής βάσης της υποκείμενης ανοσοφυσιολογίας και ανοσοπαθολογίας των μικρών χοληφόρων στην ΠΧΚ, απαιτεί βαθύτερη μελέτη των μηχανισμών τόσο της μη ειδικής όσο και της ειδικής ανοσίας.

4.6 Ιστολογικά Χαρακτηριστικά

Εκτός από την κλινική εικόνα, τα εργαστηριακά ευρήματα και την παρουσία στον ορό των ασθενών των όργανο-ειδικών αυτοαντισωμάτων, πρωτεύοντα ρόλο στη διάγνωση της ΠΧΚ κίρρωσης κατέχει η ιστολογική εξέταση του ηπατικού ιστού. Το χαρακτηριστικό (αλλά όχι παθognωμονικό) για τη νόσο ιστολογικό εύρημα είναι η ‘florid duct lesion’, η οποία επίσης περιγράφεται με τον όρο χρόνια εστιακή μη πυώδης καταστροφική χολαγγειίτιδα (εικόνα 5), όπως προανεφέρθη.



Εικόνα 5. Χρόνια εστιακή μη πυώδης χολαγγειίτιδα με βλάβη του χοληφόρου και φλεγμονώδη κοκκιώματα. (Mary K Washington. *Autoimmune liver disease: overlap and outliers Modern Pathology* (2007) 20, S15–S30)

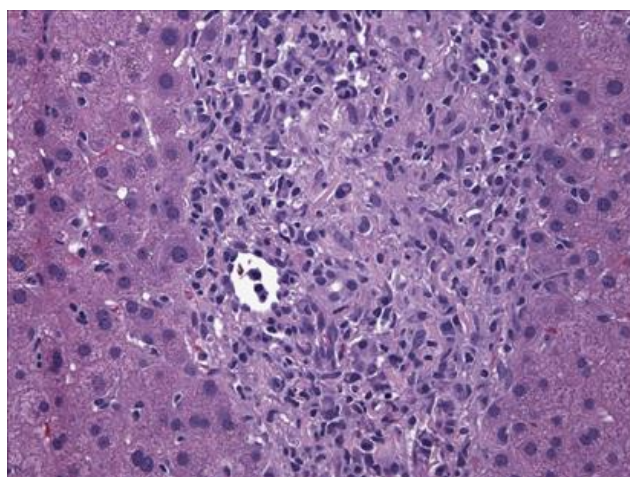
Κυρίως απαντάται στα διαλοβιδιακά χοληφόρα διαμέτρου 40-80 μm , τα οποία στα αρχικά στάδια της ΠΧΚ περιβάλλονται από πυκνό φλεγμονώδες λεμφοκυτταρικό διήθημα, ενώ μεμονωμένα λεμφοκύτταρα διασπούν τη συνέχεια της βασικής τους μεμβράνης, προκαλούν εκτασία και τελικά ρήξη αυτής. Σε όλα τα στάδια της νόσου παρατηρείται καταστροφή των πόρων του Hering.

Η ιστολογική σταδιοποίηση της νόσου διενεργήθηκε το 1967 από τον Scheuer²⁰⁵ και αργότερα το 1978 από τον Ludwig²⁰⁶. Η τελευταία επικρατεί μέχρι και τις ημέρες μας. Σύμφωνα με τη σταδιοποίηση κατά Ludwig, η νόσος διακρίνεται ιστολογικά σε 4 στάδια (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Ιστολογική σταδιοποίηση της ΠΧΚ

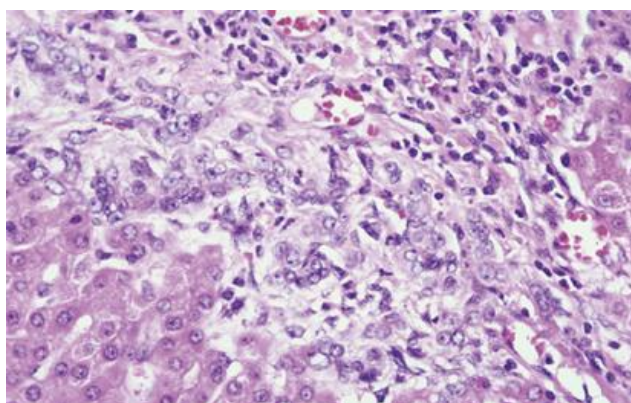
	Στάδια κατά Scheuer(1967)	Στάδια κατά Ludwig(1978)
Στάδιο I	Βλάβη χοληφόρων- Πυλαία Ηπατίτιδα	Πυλαία Ηπατίτιδα
Στάδιο II	Περιπυλαία Ηπατίτιδα- Πολλαπλασιασμός Χολαγγείων	Περιπυλαία Ηπατίτιδα
Στάδιο III	Γεφυροποιός Νέκρωση- Διαφραγματική Ίνωση- Καταστροφή χοληφόρων	Γεφυροποιός Νέκρωση- Διαφραγματική Ίνωση
Στάδιο IV	Κίρρωση	Κίρρωση

Μορφολογικά, το στάδιο I κατά Ludwig χαρακτηρίζεται από φλεγμονώδη διήθηση του πυλαίου διαστήματος, με προεξάρχον λεμφοκυτταρικό διήθημα και σταδιακή καταστροφή των μικρής διαμέτρου διαλοβιδιακών χοληφόρων (εικόνα 6). Σε αυτό το στάδιο η διάγνωση της ΠΧΚ θεωρείται πολύ πιθανή, εάν η εξάλειψη των μικρών χοληφόρων συνδυάζεται με το σχηματισμό φλεγμονωδών κοκκιωμάτων(πλησίον του χοληφόρου δικτύου, στη ζώνη 1, επί απουσίας σαρκοείδωσης ή φυματίωσης.



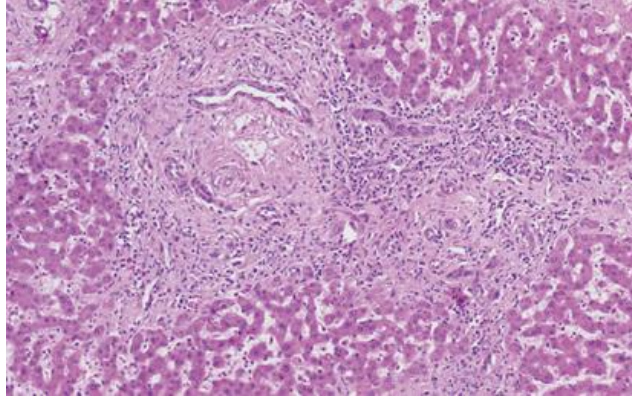
Εικόνα 6. ΠΧΚ σταδίου I, με καταστροφή των μικρών χοληφόρων, άνευ πυλαίας ίνωσης.

Στο στάδιο II, ο βαθμός της φλεγμονής είναι μεγαλύτερου βαθμού και επεκτείνεται πέραν της βασικής μεμβράνης των χοληφόρων. Χαρακτηριστικό εύρημα στο στάδιο αυτό είναι η εμφάνιση φλεγμονής περίξ των πυλαίων διαστημάτων, η οποία προοδευτικά εκτείνεται και στο γειτονικό λοβιδιακό παρέγχυμα (περιπυλαία ηπατίτιδα) και καταλήγει σε καταστροφή των ηπατοκυττάρων (διαβρωτική νέκρωση)²⁰⁷. Σημεία χολόστασης και εκφύλιση των περιπυλαίων ηπατοκυττάρων με σωμάτια Mallory-Denk συνιστούν κοινό εύρημα σε αρκετούς ασθενείς. Εξαιτίας της ανομοιογενούς κατανομής της φλεγμονώδους διεργασίας στην ΠΧΚ, αρκετά πυλαία διαστήματα παραμένουν άθικτα ή παρουσιάζουν μη ειδική μονοπυρηνική διήθηση, περιλαμβάνοντας κυρίως T-κύτταρα, αλλά και πλασματοκύτταρα, ηωσινόφιλα και ιστιοκύτταρα. Τα χολλαγγειόλια υπερπλάσσονται.



Εικόνα 7. ΠΧΚ σταδίου II, με περιχολαγγειακή αντίδραση και περιπυλαία ίνωση.

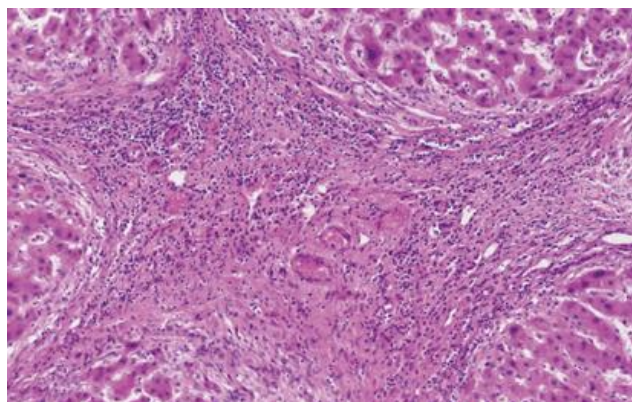
Ως εξέλιξη της περιπυλαίας ηπατοκυτταρικής βλάβης και της καταστροφής των χοληφόρων, στο στάδιο III ακολουθεί η δημιουργία ινωδών διαφραγματίων (πυλαίο-πυλαίων αρχικά, πυλαιο-κεντρικών μεταγενέστερα) και τελικά γεφυροποιού ίνωσης, (άνω του ημίσεως των ορατών διαλοβιδιακών χολαγγείων έχουν εξαφανιστεί)²⁰⁸. Όπως και σε άλλα χολοστατικά σύνδρομα, εναποθέσεις χαλκού και της πρωτεΐνης που συνδέει τον χαλκό, στα περιπυλαία και παρά των διαφραγμάτων ηπατοκύτταρα, μπορεί να παρατηρηθούν σε αυτό το στάδιο.



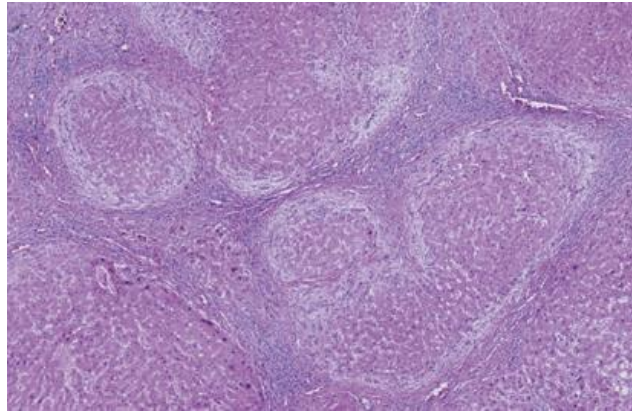
Εικόνα 8. ΠΧΚ σταδίου ΙΙΙ, πυλαίο-πυλαία γεφυροποιός ίνωση.

Τέλος, το στάδιο ΙV αντιστοιχεί στην ανάπτυξη κίρρωσης του ήπατος. Τα ινώδη διαφραγμάτια διαταράσσουν προοδευτικώς την αρχιτεκτονική του ήπατος και επακολουθεί ο σχηματισμός αναγεννητικών όζων(εικόνα 9, εικόνα 10). Σε γενικές, όμως, γραμμές, η ιστολογική εξέλιξη της νόσου από το στάδιο Ι στο στάδιο ΙV της κίρρωσης είναι προοδευτική και εμφανίζεται μετά την πάροδο αρκετών ετών.

Αξίζει να αναφερθεί, ότι παρόλο που ο μηχανισμός δημιουργίας των κοκκιωμάτων στην ΠΧΚ παραμένει άγνωστος, μελέτες σε πειραματικά μοντέλα υποστηρίζουν το ρόλο gram θετικών βακτηριδίων στην έναρξη της φλεγμονώδους διεργασίας, μέσω λιπoteϊχοϊκού οξέος²⁰⁹. Επιπλέον, η παρουσία ηωσινοφίλων στον ηπατικό ιστό ασθενούς με ΠΧΚ θεωρείται ειδικό εύρημα για τη νόσο²¹⁰, χωρίς όμως να μπορεί να εξηγηθεί επαρκώς η παρουσία τους και στο περιφερικό αίμα²¹¹.



Εικόνα 9. ΠΧΚ σταδίου ΙV, τα μικρής διαμέτρου χολαγγεία έχουν εξαφανιστεί στο κίρρωτικό ήπαρ. Αναγνωρίζεται ήπια υπολειμματική φλεγμονώδης αντίδραση.



Εικόνα 10. Ιστολογική εικόνα τελικού σταδίου ΠΧΚ. Διακρίνεται χαρακτηριστά η χολική κίρρωση. Το λιγότερο έντονο χρώμα περιφερικά των αναγεννητικών οζιδίων οφείλεται στη χολόσταση.

Διαφοροδιαγνωστικό ρόλο, από άλλα χρόνια φλεγμονώδη ηπατικά νοσήματα όπως η αυτοάνοση ηπατίτιδα, μπορεί να διαδραματίσει η χαρακτηριστική ιστολογική εικόνα περιπυλαιάς ηπατίτιδας και λοβιδιακής φλεγμονής, τα οποία διακρίνονται στην ΠΧΚ.

Αναφορικά με την λήψη του βιοπτικού υλικού και τη σωστή αξιολόγηση του βαθμού της καταστροφής των χοληφόρων, απαραίτητη θεωρείται στο δείγμα που λαμβάνεται να εμπεριέχονται τουλάχιστον 4 πυλαία διαστήματα. Ιδιαίτερα στην περίπτωση όπου στο δείγμα της ηπατικής βιοψίας περιλαμβάνονται τμήματα ιστού με διαφορετικά στάδια της νόσου, ως στάδιο νόσου ορίζεται το μεγαλύτερο εξ αυτών προσδιοριζόμενο.

Δεδομένου ότι μεταξύ των 3ων διεθνούς αποδοχής κριτηρίων για τη διάγνωση της ΠΧΚ συγκαταλέγεται και η συμβατή βιοψία ήπατος, στους ασθενείς με AMA αρνητικά και φυσιολογικά επίπεδα ALP όπου υπάρχει υψηλή κλινική υποψία για τη νόσο, η βιοψία ήπατος μπορεί να φανεί ιδιαίτερα χρήσιμη.

Βέβαια ο ρόλος της βιοψίας δεν περιορίζεται, μόνο, στην αρχική διάγνωση και σταδιοποίηση της ΠΧΚ, αλλά επεκτείνεται και στην παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου έως το στάδιο της κίρρωσεως²¹².

4.7 Διάγνωση

4.7.1 Διαγνωστικά κριτήρια ΠΧΚ

Πριν ακόμα αναγνωρισθεί η ΠΧΚ ως ξεχωριστή νοσολογική οντότητα, η διάγνωσή της καθυστερούσε αρκετά και συνήθως ελάμβανε χώρα σε προχωρημένα στάδια. Οι ασθενείς υποβάλλονταν σε μία ή περισσότερες λαπαροτομίες προς αποκλεισμό χειρουργικών αιτίων ικτέρου.

Σήμερα, η διάγνωση της ΠΧΚ τίθεται από ένα συνδυασμό κλινικών, ορολογικών και ιστολογικών χαρακτηριστικών. Έτσι λοιπόν, ένας ασθενής έχει ΠΧΚ όταν συνυπάρχουν αυξημένοι βιοχημικοί δείκτες χολόστασης, κυρίως ALP για περισσότερους από 6 μήνες με συνοδό παρουσία αυξημένων AMA(>1:40). Η χαρακτηριστική ιστολογική εικόνα ήπατος επιβεβαιώνει τη διάγνωση και επιτρέπει τη σταδιοποίηση πριν την έναρξη της θεραπείας. «Πιθανή ΠΧΚ» έχει ένας ασθενής όταν πληρεί τα 2 εκ των 3 κριτηρίων, ενώ «σίγουρη» νόσο όταν συνυπάρχουν και τα 3.

4.7.2 Κλινική εικόνα ασθενών με ΠΧΚ κατά τη διάγνωση.

Η συνεχώς αυξανόμενη επάρκεια των διαγνωστικών μέσων σε συνδυασμό με την αυξημένη επαγρύπνιση των ιατρών για το νόσημα αυτό, έχει οδηγήσει σε συχνότερη διάγνωση της ΠΧΚ και σε προωμότερα στάδια της νόσου.

Η πλειοψηφία των ασθενών με ΠΧΚ είναι ασυμπτωματικοί τη στιγμή της διάγνωσης²¹³⁻²¹⁴. Η αιτία προσέλευσης στον ιατρό είναι συνήθως η τυχαία ανεύρεση αυξημένων επιπέδων αλκαλικής φωσφατάσης(ALP) και/ή ολικής χοληστερίνης(CHOL)²¹⁵⁻²¹⁶.

Τα συνηθέστερα αναφερόμενα συμπτώματα είναι η κόπωση, ο κνησμός και σε μικρότερη συχνότητα το αίσθημα βάρους στο δεξιο υποχόνδριο. Η κόπωση δεν

φαίνεται να σχετίζεται με τη σοβαρότητα της νόσου, αλλά με συναισθηματικές και αισθητικές διαταραχές, ενώ ο κνησμός επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών. Συχνά αναφέρονται και συμπτώματα Sicca(ξηροφθαλμία, ξηροστομία) ή αρθραλγίες.

Σπανιότερα οι ασθενείς προσέρχονται σε προχωρημένα στάδια της νόσου με σημεία μη αντιρροπούμενης κίρρωσης και επιπλοκές πυλαίας υπέρτασης.

Οι ασυμπτωματικοί ασθενείς καθίστανται συμπτωματικοί συνήθως μετά παρέλευση 2 έως 4 ετών, αν και το 1/3 των ασθενών παραμένει ελεύθερο συμπτωμάτων για αρκετά χρόνια. Δυσανορρόφηση, ανεπάρκεια λιποδιαλυτών βιταμινών και στεατόρροια συνοδεύουν τα μεταγενέστερα στάδια της ΠΧΚ.

Με την πρόοδο της νόσου και την ανάπτυξη κίρρωσης εμφανίζονται οι επιπλοκές της, ασκίτης, ηπατική εγκεφαλοπάθεια, κίρσοι οισοφάγου.

4.8 Εργαστηριακά ευρήματα και άλλα αυτοαντισώματα στην ΠΧΚ.

4.8.1 Διαταραχή ηπατικής βιοχημείας

Τα εργαστηριακά ευρήματα στην ΠΧΚ είναι τυπικά χρόνιου χολοστατικού συνδρόμου και χρόνιας ηπατικής νόσου. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων τα επίπεδα ALP και γ-GT του ορού είναι αυξημένα περίπου 2-2.5 φορές το ανώτερο φυσιολογικό όριο κατά τη διάγνωση. Η τιμή της ALP παραμένει σχετικά σταθερή και δεν σχετίζεται με το στάδιο ή την πρόοδο της νόσου. Σε λίγες περιπτώσεις τα επίπεδα της ALP είναι εντός φυσιολογικών ορίων, σε ασθενείς με AMA θετικά και ιστολογικές αλλοιώσεις χαρακτηριστικές της νόσου. Στις περιπτώσεις αυτές πρόκειται για πολύ πρώιμα στάδια της νόσου. Παρατηρείται επίσης, μέτρια αύξηση των SGOT, SGPT, συνήθως λιγότερο από 5 φορές της ανώτερης φυσιολογικής τιμής, η οποία δεν συνδέεται με τη σοβαρότητα της νόσου. Εντός φυσιολογικών ορίων βρίσκεται η χολερυθρίνη του ορού στα αρχικά στάδια της ΠΧΚ και άνοδος αυτής υποδηλώνει πρόοδο νόσου. Χρησιμοποιείται ως βασικός προγνωστικός δείκτης της

έκβασης της νόσου τελικού σταδίου, σε συνδυασμό με την θρομβοπενία και την πολυκλωνική υπεργαμμασφαιριναιμία.

4.8.2 Διαταραχή λιπιδίων ορού

Η ολική χοληστερόλη του ορού είναι αυξημένη σε όλους τους ασθενείς με ΠΧΚ, όπως συμβαίνει και σε άλλα χολοστατικά σύνδρομα. Αρκετοί ασθενείς παρουσιάζονται με εξαιρετική υπερχοληστερολαιμία που συνδέεται με το κλινικό εύρημα των ξανθωμάτων και ξανθελασμάτων. Τα κλάσματα τόσο της HDL όσο και της LDL είναι αυξημένα. Όμως η υψηλή υπερχοληστερολαιμία οφείλεται κυρίως στην LpX²¹⁷. Η LpX είναι χαρακτηριστικό εύρημα των χολοστατικών νόσων του ήπατος και προέρχεται από την παλίνδρομη είσοδο των χολικών λιπών στην κυκλοφορία του αίματος²¹⁸. Πρόκειται για ένα υποκλάσμα της LDL το οποίο αποτελείται από λιποσώματα ελεύθερης χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων. Εξαιτίας της δομής αυτής η LpX δεν συμμετέχει στο σχηματισμό των αθηρωματικών πλακών και μπορεί να ελαττώσει την αθηρογόνο δράση της LDL μέσω περιορισμού της οξειδωσης της²¹⁹. Η υπερχοληστερολαιμία αυτή μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρήση στατινών, δεν σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακή νόσο, ενώ και η χρόνια χρήση ουρσοδεοξυχολικού οξέος φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης²²⁰.

Αργότερα, στα προχωρημένα στάδια της ΠΧΚ παρατηρείται πτώση των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης στα πλαίσια μείωσης της συνθετικής ικανότητας του ήπατος. Παράλληλα η τελικού σταδίου ηπατική ανεπάρκεια συνοδεύεται από υποαλβουμιναιμία και αύξηση του χρόνου προθρομβίνης. Η τελευταία μπορεί να επιδεινωθεί λόγω δυσασπορρόφησης των λιποδιαλυτών βιταμινών όπως της βιταμίνης Κ.

4.8.3 Αυξημένες ανοσοσφαιρίνες IgM ή IgG

Οι αυξημένες τιμές IgM ανοσοσφαιρινών στον ορό του αίματος, είναι ένα κοινό εύρημα σε όλες τις κλινικές μορφές ΠΧΚ. Πιθανόν προέρχεται από χρόνια διέγερση των Β-κυττάρων μέσω ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών σχετιζόμενων με TLR(υποδοχέων τύπου Toll). Βέβαια η ειδικότητα αυτού του ευρήματος είναι περιορισμένη γι'αυτό και ο τίτλος των IgM δεν χρησιμοποιείται ως διαγνωστικό κριτήριο της νόσου^{80,221}.

Τα επίπεδα των IgA ανοσοσφαιρινών βρίσκονται συνήθως εντός φυσιολογικών ορίων, αν και ΠΧΚ έχει περιγραφεί και σε άτομα με ανεπάρκεια IgA²²². Συμπερασματικά, ο ποσοτικός προσδιορισμός των ανοσοσφαιρινών είναι αναγκαίος μόνο σε μη τυπικές μορφές ΠΧΚ. Χαρακτηριστικά, στους AMA αρνητικούς ασθενείς, το κλάσμα IgG ανοσοσφαιρίνης είναι συχνότερα αυξημένο, σε αντίθεση με το IgM^{223- 224}.

4.8.4 AMA

Η αναζήτηση του ρόλου των AMA στην παθογένεια της ΠΧΚ οδήγησε τους ερευνητές στην ανεύρεση σημαντικών πληροφοριών σχετικά με την ειδικότητα αυτής της ανοσολογικής απάντησης. Τα AMA συνιστούν μια ετερογενή ομάδα αυτοαντισωμάτων τα οποία κατευθύνονται έναντι πρωτεϊνών της εξωτερικής και εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Εμφανίζουν υψηλή ειδικότητα για την ΠΧΚ και ανιχνεύονται στο 90-95% των ασθενών, όταν χρησιμοποιούνται τεχνικές με ανασυνδυασμένα αντιμιχονδριακά αντιγόνα (ELISA ή ανοσοαποτύπωση). Σημαντικά μικρότερη ειδικότητα και ευαισθησία παρατηρείται όταν εφαρμόζονται οι ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές έμμεσου ανοσοφθορισμού.

Βάσει αποτελεσμάτων φυγοκέντρησης αντιγονικών παρασκευασμάτων, δημιουργήθηκε ένα πιο περιγραφικό αντιγονικό σύστημα αποτελούμενο από 9 κλάσματα AMA, M1-M9²²⁵.

Μεταξύ αυτών τα M2 κατευθύνονται έναντι της E2 υποομάδας της πυρουβικής δευδρογενάσης, στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Τα M1, M2, M5a, M7 ανευρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, ενώ τα M3, M4, M5b, M6, M8, M9 στην εξωτερική. Ειδικά για την ΠΧΚ θεωρούνται τα M2, M4, M8, M9. Οι άλλοι AMA υπότυποι σχετίζονται με άλλα νοσήματα, όπως τα M1 αυτοαντισώματα(αντικαρδιολιπινικά) στην σύφιλη, M5 σε ασθενείς με κολλαγονώσεις, M7 στην οξεία μυοκαρδίτιδα έναντι της δευδρογενάσης της σαρκοσίνης, ή με φαρμακευτικά επαγόμενα νοσήματα, M3 με ψευδο-λύκο και M6 με φαρμακευτική ηπατίτιδα²²⁶. Τα M9 ανιχνεύονται τόσο στους AMA-M2 θετικούς ασθενείς, όσο και στους AMA-M2 αρνητικούς, ενώ τα M4 ανιχνεύονται μόνο σε ταυτόχρονη παρουσία και των AMA-M2 αντισωμάτων.

Η διάκριση των αυτοαντισωμάτων με διαφορετική ειδικότητα επιτεύχθηκε με τεχνικές έμμεσου ανοσοφθορισμού σε ιστούς διαφορετικών οργάνων, όπως ήπαρ, στομάχι, νεφροί, καρδιά και πάγκρεας ή HEP-2 κύτταρα³⁵. Ο προσδιορισμός των IgG AMA-M2 αυτοαντισωμάτων στον ανθρώπινο ορό, διενεργείται μέσω ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA σε κεκαθαρισμένο PDC επίτοπο από μιτοχόνδρια βοιών ή χοίρειων καρδιακών κυττάρων, με ευαισθησία 88% και ειδικότητα 96% για τη διάγνωση της ΠΧΚ.

Υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με την προγνωστική αξία των διαφορετικών κλασμάτων AMA αυτοαντισωμάτων²²⁷⁻²²⁸. Μελέτες δείχνουν τα M4 και M8 συνδέονται με βαρύτερη πορεία της ΠΧΚ, η οποία απαιτεί νωρίτερα μεταμόσχευση ήπατος²²⁹. Αντίθετα, ο προσδιορισμός των M9 αντισωμάτων συνδέεται με τα αρχικά στάδια της νόσου όπου οι ιστολογικές αλλοιώσεις είναι ελάχιστες και η πορεία της νόσου καλοηθέστερη²³⁰.

4.8.5 ANA

Τα αντιπυρηνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη ως ένας διαγνωστικός δείκτης πληθώρας ανοσολογικών παθήσεων συμπεριλαμβανομένων και των αυτοάνοσων νοσημάτων του ήπατος²³¹. Η παρουσία των ANA στον ορό ανιχνεύεται στο 30-72% του συνόλου των ασθενών με ΠΧΚ^{232,233}. Αυτά στρέφονται έναντι πυρηνικών αυτοαντιγόνων και ανιχνεύονται με

τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού²³⁴. Η κλινική συσχέτιση των ANA με την ΠΧΚ έγκειται στην ύπαρξη μιας μικρής υποομάδας ασθενών AMA-M2 αρνητικών, οι οποίοι όμως είναι ANA θετικοί^{235,236}(αυτοάνοση χολαγγειίτιδα) με κοινά κλινικά χαρακτηριστικά και με το ίδιο εύρος απάντησης στη θεραπεία με τους AMA θετικούς ασθενείς²³⁷.

Αξίζει να σημειωθεί ότι βασικό διαφοροδιαγνωστικό χαρακτηριστικό των ANA ανάμεσα στην αυτοάνοση ηπατίτιδα(AH) και την AMA θετική ή AMA αρνητική ΠΧΚ είναι η ομοιογενής ή στικτή εμφάνισή τους στον ανοσοφθορισμό σε σύγκριση με την εικόνα πυρηνικών κηλίδων ή περηπυρηνικών δακτυλίων, αντίστοιχα.

Στον ορό των ασθενών με ΠΧΚ συχνά ανιχνεύονται ANA με το πρότυπο των πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων(MND-ANA). Στα κύρια αντιγόνα MND ανήκουν α) οι πρωτείνες sp100(ενεργοποιητές μεταγραφής), με τα αντισώματα anti-sp100 να είναι θετικά και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, εκτός της ΠΧΚ, β) η πρωτεΐνη της προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας(PML), γ) η NDP52, μία πρωτεΐνη που φαίνεται να συμμετέχει στο μηχανισμό μη ειδικής ανοσίας, και δ) οι πρωτείνες sp140, με τα anti-sp140 παρόντα και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος(ΣΕΛ).

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ο στόχος των anti-MND είναι η πρωτεΐνη sp-100. Τα anti-sp100 αντισώματα παρουσιάζουν υψηλή ειδικότητα για τη διάγνωση ΠΧΚ σε AMA αρνητικούς ασθενείς, εφόσον αποκλείονται άλλα νοσήματα^{232,238-240}. Τα anti-PML αυτοαντισώματα συχνά συνυπάρχουν με anti-sp100²⁴¹. Και τα anti-sp140 αντισώματα μπορεί να συνυπάρχουν με anti-sp100 και anti-PML αυτοαντισώματα. Καμία συσχέτιση δεν έχει βρεθεί ανάμεσα στα anti-sp140 και στα κλινικά χαρακτηριστικά της ΠΧΚ.

Μια άλλη κατηγορία αντισωμάτων ανιχνεύσιμα στην ΠΧΚ είναι τα ANA έναντι πρωτεϊνών της πυρηνικής μεμβράνης(anti-NM ANA). Ο κύριος στόχος των αντισωμάτων αυτών είναι η πρωτεΐνη gp210, μια πρωτεΐνη των πυρηνικών πόρων του πυρηνικού φακέλου.

Τα αποτελέσματα διεθνών μελετών δείχνουν ποσοστά 10.4%-44% των ανιχνεύσιμων anti-Gp210 αντισωμάτων στον ορό ασθενών με AMA θετική ΠΧΚ και έως 50% σε AMA αρνητική ΠΧΚ^{240, 242-249}.

Αρκετές αναφορές συσχετίζουν τα anti-grp210 αντισώματα με τη σοβαρότητα της ΠΧΚ και με κακή πρόγνωση^{249, 250}, όπως και μια πρόσφατη μελέτη από το εργαστήριό μας²⁵¹.

Στην κατηγορία των περιπυρηνικών αντισωμάτων anti-MN ANA ανήκουν και τα anti-p62 αυτοαντισώματα, τα οποία διαμορφώνουν ένα χαρακτηριστικό περιπυρηνικό πρότυπο στον έμμεσο ανοσοφθορισμό²⁵²⁻²⁵⁴ και συνδέονται με την πρόοδο της νόσου, αλλά όχι με την παρουσία των AMA. Σπάνια κυκλοφορούν ταυτόχρονα στον ορό των ασθενών anti-grp210 και anti-p62 ANA.

Τέλος αντισώματα του πυρηνικού φακέλου έναντι λαμινών A, B, C δεν φαίνεται να έχουν κάποια ειδικότητα για την ΠΧΚ, καθότι ανιχνεύονται σε αρκετά άλλα αυτοάνοσα νοσήματα²⁵⁵⁻²⁵⁸. Εντούτοις, και τα αντισώματα έναντι του υποδοχέα B της λαμινίνης (anti-LBR) έχουν υψηλή ειδικότητα για την ΠΧΚ, χωρίς να έχει διευκρινιστεί όμως ο ακριβής ρόλος τους.

Πρόσφατες μελέτες επισημαίνουν τον ρόλο μιας άλλης κατηγορίας ANA, τα αντικεντρομεριδιακά(anti-ACA) τα οποία φαίνεται πως έχουν σημαντική προγνωστική αξία για πρόωμη εξέλιξη σε πυλαία υπέρταση^{242, 259}.

4.8.6 Άλλα Αυτοαντισώματα

4.8.6.1 SMA

Τα αντισώματα έναντι των λείων μυικών ινών(SMA) ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά το 1965 από G. D. Johnson και συνεργάτες. Ανευρίσκονται στον ορό ασθενών με ιογενείς και τοξικές μορφές ηπατίτιδας, κακοήθειες, αλλά και σε ΠΧΚ ή Πρωτοπαθή Σκληρυντική Χολαγγειίτιδα(ΠΣΧ) (40-70%). Τα αντισώματα αυτά αντιδρούν έναντι δομών του κυτταροσκελετού- η ακτίνη είναι ο πιο συχνός στόχος στα ηπατικά νοσήματα, -και ανιχνεύονται καλύτερα στη μυική στιβάδα των αρτηριών και αρτηριολίων²⁶⁰⁻²⁶².

Υψηλοί τίτλοι IgG αντισωμάτων έναντι ακτίνης παρατηρούνται σε Αυτοάνοση Ηπατίτιδα (ΑΗ, άνω 90% στην οξεία φάση, κυρίως τύπου I, σπανιότερα τύπου III) και σε μικτές μορφές ΧΕΗ / ΠΧΚ (στο 20% των περιπτώσεων με ΠΧΚ)²⁶³.

Βέβαια τα αντισώματα αυτά δεν φαίνεται να έχουν προγνωστική ή διαγνωστική αξία στην ΑΗ καθότι ούτε ο τίτλος τους, ούτε η δράση τους επηρεάζουν την εξέλιξη της νόσου²⁶⁴⁻²⁶⁵.

Συνήθως η παρουσία των ANA, IgG και SMA στους AMA αρνητικούς ασθενείς με ΠΧΚ είναι σε μεγαλύτερα επίπεδα από τους AMA θετικούς.

Τα αντισώματα SMA ανιχνεύονται έως και άνω του 50% στον ορό ασθενών με ΠΧΚ, αν και αρκετές πρόσφατες αναφορές προσδιορίζουν μικρότερα ποσοστά όπως 5% και 27%, σε 160 ασθενείς στην Βορειοανατολική Αγγλία²⁶⁶ και σε 15 ασθενείς στην Ινδία²⁸, αντίστοιχα.

Στα πλαίσια των αυξημένων ανοσολογικών διαταραχών που έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των συγγενών ασθενών με ΠΧΚ, συγκαταλέγεται και η ανίχνευση θετικών SMA αυτοαντισωμάτων²⁶⁷.

4.8.6.2 SSA/SSB, ACA και άλλα

Η παρουσία των SSA/SSB στον ορό των ασθενών με ΠΧΚ συνήθως υποδηλώνει σύνδρομο επικάλυψης ΠΧΚ με Sjogren. Τα αυτοαντισώματα anti-Ro/SSA και anti-La/SSB, τα οποία κατευθύνονται ενάντια σε 2 εκχυλίσμα πυρηνικά αντιγόνα, ανιχνεύονται με υψηλή συχνότητα σε ασθενείς με σύνδρομο Sjögren. Σημαντική είναι επίσης η διαγνωστική τους αξία στους ασθενείς με ΣΕΛ²⁶⁸. Συγκριτική μελέτη 105 ασθενών με ΠΧΚ, με 162 άτομα με άλλη αυτοάνοση ηπατική νόσο (με τύπο I και τύπο II ΑΗ, ΠΣΧ), 30 με ΣΕΛ και 50 υγιείς εθελοντές, έδειξε σημαντικά υψηλότερη εμφάνιση anti-ENA στην ΠΧΚ(30%vs.2.5%, τύπου I ΑΗ, 0% τύπου II ΑΗ, 11.5% ΠΣΧ), χαμηλότερη όμως σε σχέση με ΣΕΛ (30%vs.53%)²⁶⁹. Σε μεγαλύτερο ποσοστό από την κατηγορία των ENA αντισωμάτων παρατηρήθηκαν τα anti-SSA/Ro-52kD, σε ποσοστό 28%. Οι ασθενείς με ΠΧΚ και θετικά anti-SSA είχαν ταυτόχρονα πιο προχωρημένο στάδιο νόσου κατά τη διάγνωση και σημαντικά υψηλότερες τιμές χολερυθρίνης και IgM, σε σύγκριση με τους anti-SSA αρνητικούς ασθενείς. Επιπλέον, ACA ανιχνευθηκαν με ανοσοδιάχυση σε 21% των ασθενών με ΠΧΚ, σε καμία όμως άλλη υπόομάδα, της ομάδας ελέγχου. Φαίνεται λοιπόν, ότι η ανεύρεση

anti-SSA/Ro-52kD στον ορό ασθενών με ΠΧΚ πιθανόν να διακρίνει τους ασθενείς με πιο προχωρημένη και ενεργό νόσο. Άλλα αυτοαντισώματα, πέραν των AMA ανιχνεύθηκαν και σε 56% από 164 ασθενείς με ΠΧΚ από τη Βόρειο Ιταλία. Μεταξύ αυτών τα συνηθέστερα εμφανιζόμενα ήταν τα ANA με στικτή εμφάνιση, ACA και ENA²⁷¹. Πιο ειδικά τα ACA και ENA ήταν σημαντικά συχνότερα σε ασθενείς με συνύπαρξη ΠΧΚ και άλλης νόσου του συνδετικού ιστού, όχι όμως και τα ANA με στικτή εμφάνιση. Επίσης το SSA αντίσωμα, το συχνότερο από την ομάδα των ENA δεν φάνηκε να σχετίζεται με τη συνύπαρξη άλλων αυτοανώσων νοσημάτων. Από την πολυπαραγοντική ανάλυση προέκυψε ότι ο καλύτερος δείκτης συνυπάρχουσας ρευματικής νόσου είναι τα ACA, ακολουθούμενα από την παρουσία ENA. Σε αρκετές περιπτώσεις ασθενείς με ΠΧΚ εμφανίζουν σύνδρομο επικάλυψης και με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, καθότι εμφανίζουν στον ορό τους SLA/LP ή LKM-1 αντισώματα, χαρακτηριστικά της ΑΗ τύπου III και II αντίστοιχα²⁷¹. Πρόσφατα διεξήχθη μελέτη για τον επιπολασμό και την κλινική σημασία άλλων αυτοαντισωμάτων στον ορό των ασθενών με ΠΧΚ από τους ερευνητές Agmon-Levin και συνεργάτες²⁷². Αυτοαντισώματα εκτός των AMA ανιχνεύθηκαν σε 76% των ασθενών. Μεταξύ αυτών τα πιο συχνά ανιχνεύσιμα ήταν ANA(dsDNA, Sm, chromatin, ribosomal-P, RNP, SmRNP, SSA, SSB, ACA) και αντισώματα σχετιζόμενα με θρομβοφιλία. Ιδιαίτερα τα IgM αντισώματα έναντι προθρομβίνης συσχετίστηκαν με χειρότερη πρόγνωση της νόσου. Ο παθογενετικός ρόλος άλλων αυτοαντισωμάτων εκτός των AMA στην ΠΧΚ δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως και ο συσχετισμός αυτός σίγουρα ενέχει πολύπλοκους μηχανισμούς τους οποίους καλούνται οι ερευνητές να μελετήσουν περαιτέρω και εις βάθος²⁷³.

4.9 Κοινωνικοδημογραφικά Χαρακτηριστικά Ασθενών

Από το σύνολο των μελετών ασθενών-μαρτύρων προκύπτει ότι η ΠΧΚ είναι μία νόσος των γυναικών και η μέση ηλικία διάγνωσης κυμαίνεται 40-70 έτη. Επιπλέον η

κατανομή του επιπέδου εκπαίδευσης δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ασθενείς και ομάδα υγιών εθελοντών, με το μεγαλύτερο ποσοστό να έχουν ανώτερη της δευτεροβάθμιας εκπαίδευση^{137,274}, όχι όμως και στην αντίστοιχη γαλλική μελέτη²⁷⁵. Διαφοροποιήσεις παρατηρούνται στο ετήσιο οικογενειακό εισόδημα, το οποίο είναι σημαντικά υψηλότερο στην ομάδα των ασθενών^{274,275}, χωρίς όμως αυτό να έχει αναπαραχθεί και σε άλλες μελέτες. Οι κυριότερες μελέτες στο Δυτικό ημισφαίριο^{137,274} αφορούν Καυκάσιους ασθενείς σε ποσοστό 97-98%, χωρίς να διευκρινίζεται πάντα ο τύπος καταγωγής τους¹³⁸. Η εθνική κατανομή ασθενών από τις Ανατολικές χώρες ποικίλει^{24,27,28} και παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια, όπως και στην Αυστραλία¹⁸. Εντούτοις, οι τελευταίες αφορούν στην πλειοψηφία τους μικρό δείγμα ασθενών. Αναφορές σε ανθρωπομετρικές παραμέτρους, περιγράφουν τη μέση τιμή του BMI (δείκτη μάζα σώματος) να κυμαίνεται συνήθως μεταξύ φυσιολογικών (18,5-25) έως και την κατηγορία των υπέρβαρων (>25-30)²⁷⁵⁻²⁷⁸.

4.10 Παράγοντες κινδύνου-Συννοσηρότητες

4.10.1 Έξιες - Τρόπος ζωής

Μεταξύ των παραγόντων κινδύνου για την εμφάνιση ΠΧΚ αναφέρονται και αρκετοί σχετιζόμενοι με τις καθημερινές έξιες και τον τρόπο ζωής των ασθενών με ΠΧΚ. Καταρχάς μελέτες στη Γαλλία, στο Ηνωμένο Βασίλειο, στις ΗΠΑ αναδεικνύουν το κάπνισμα ως επιβαρυντικό παράγοντα για την εμφάνιση ΠΧΚ σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα. Πιο ειδικά, στατιστικά σημαντικά υψηλότερο ποσοστό των ασθενών αναφέρουν ενεργό ή παθητικό κάπνισμα έναντι της ομάδας ελέγχου στον γαλλικό πληθυσμό ($p < 0.0001$)²⁷⁵, ενώ πρώην καπνιστές βρέθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό οι ασθενείς σε ΗΠΑ και Ηνωμένο βασίλειο^{137,138,279}. Εξάλλου, το ιστορικό καπνίσματος και η μέση διάρκεια κατανάλωσης καπνού φαίνεται να συνδέεται με προχωρημένα στάδια της νόσου και ίνωση τη στιγμή της διάγνωσης²⁸⁰.

Χαρακτηριστικά κάθε επιπλέον πακέτο/έτος καπνίσματος υπολογίστηκε ότι αυξάνει κατά 5% την πιθανότητα ανεύρεσης προχωρημένης ίνωσης στη βιοψία ήπατος²⁸¹.

Το αλκοόλ δεν βρέθηκε παράγων κινδύνου για ΠΧΚ σε μελέτες ΗΠΑ, Γαλλία, Βρετανική Κολούμπια^{137,275,282} και σε πιο πρόσφατη μελέτη στο Ηνωμένο Βασίλειο, συσχετίστηκε αρνητικά με την εμφάνιση ΠΧΚ⁴. Σημαντικά δεδομένα έχουν προκύψει για το ρόλο των καλλυντικών στην εκδήλωση της νόσου, όπως βερνίκια νυχιών^{137,275}, βαφές μαλλιών^{138,275}. Υποστηρίζεται ότι τα ξενοβιοτικά που εμπεριέχονται στα καλλυντικά προϊόντα ενέχονται στους παθογενετικούς μηχανισμούς της ΠΧΚ^{136,283}.

4.10.2 Ουρολοιμώξεις

Η ευπάθεια των ασθενών με ΠΧΚ στις λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος περιγράφεται τα τελευταία 30 χρόνια και οι περισσότερες έρευνες στοχεύουν στην ερμηνεία αυτής της παρατήρησης. Η αρχική αναφορά έγινε από την ομάδα Burroughs και συνεργατών²⁸⁴, οι οποίοι παρατήρησαν υποτροπιάζοντα επεισόδια ασυμπτωματικής βακτηριουρίας σε ασθενείς με ΠΧΚ, με διαφορετικό μικροβιολογικό παράγοντα κάθε φορά. Ακόλουθες μελέτες από τους ίδιους ερευνητές έδειξαν χαμηλό τίτλο AMA στον ορό γυναικών χωρίς ηπατική νόσο, με ιστορικό υποτροπιάζόντων ουρολοιμώξεων^{83,285}.

Εν συνεχεία, βρέθηκε ότι στις γυναίκες ασθενείς με ΠΧΚ η επανεμφάνιση ουρολοίμωξης μετά το πέρας της θεραπείας προερχόταν από το ίδιο είδος μικροβίου (*E.coli* του ίδιου ορότυπου), σε αντίθεση με τις φυσιολογικές γυναίκες στις οποίες η υποτροπή σχετιζόταν με πιο ισχυρά παθογόνο στέλεχος²⁸⁶⁻²⁸⁷.

Το μοντέλο του μοριακού μιμητισμού πιθανόν να μπορεί να εξηγήσει τις παραπάνω παρατηρήσεις λόγω του υψηλού βαθμού ομολογίας αμινοξέων μεταξύ πρωτεϊνών της *E.coli* και AMA στην ΠΧΚ.

Εξάλλου, σε υψηλά ποσοστά ανιχνεύθηκαν τα anti-sp100 στον ορό γυναικών με υποτροπιάζουσες ουρολοιμώξεις, χωρίς ηπατική νόσο, αλλά με θετικά AMA, ενισχύοντας την υπόθεση της επίδρασης λοίμωξης με *E.coli* στην εκδήλωση ΠΧΚ²⁸⁸.

Αναφορά σε διαταραχή της ηπατικής βιοχημείας και ανίχνευσης AMA/M2+ 28χρονης γυναίκας κατά τη διάρκεια επεισοδίου πυελονεφρίτιδας και σήψης ενισχύει την άποψη ότι μια νεφρική φλεγμονή προηγείται της έναρξης της ΠΧΚ²⁸⁹. Επιδημιολογικές και μή μελέτες της τελευταίας πενταετίας σε ασθενείς με ΠΧΚ

επιβεβαιώνουν τη θετική συσχέτιση της νόσου με ιστορικό λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος πριν τη διάγνωση της νόσου: α) σε ασθενείς από τη Βορειοανατολική Αγγλία¹³⁸ και επιπλέον σε μια πιο πρόσφατη μελέτη 800 ασθενών όπου βρέθηκε 50% μεγαλύτερη πιθανότητα ιστορικού ουρολοίμωξης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, τόσο σε >1 έτος, όσο και >5 έτη πριν τη διάγνωση, αλλά και σε σχέση με ομάδα ασθενών με χρόνια ηπατική νόσο έως και 5 έτη πριν τη διάγνωση²⁹⁰ β) σε 1032 ασθενείς από τις ΗΠΑ, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης¹³⁷, γ) σε πρόσφατη μεταανάλυση 5 μελετών ασθενών από την Κίνα²⁹¹, δ) σε 48% ασθενών με ΠΧΚ, έναντι 31% ομάδας υγιών εθελοντών από τη Γαλλία, ενώ 18% των ασθενών έναντι 7% της ομάδας ελέγχου ανέφεραν ιστορικό υποτροπιάζουσών ουρολοιμώξεων²⁷⁵.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι το ιστορικό ουρολοίμωξης (ή ακόμα και πυελονεφρίτιδας) προηγείται της εμφάνισης ΠΧΚ και πιθανόν να ενέχεται στον παθογενετικό μηχανισμό της νόσου.

4.10.3 Γυναικολογικό ιστορικό

Η επικράτηση του γυναικείου φύλου και στην ΠΧΚ όπως και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα έστρεψε το ενδιαφέρον των ερευνητών στη διερεύνηση παραγόντων από το γυναικολογικό ιστορικό των γυναικών-ασθενών, ως παράγοντες κινδύνου για τη νόσο. Το ιστορικό χολόστασης ή κνησμού κατά τη διάρκεια εγκυμοσύνης, η χρήση σκευασμάτων ορμονικής υποκατάστασης, η χρήση αντισυλληπτικών, το ιστορικό τραχηλίτιδων-κολπίτιδων, η φλεγμονώδης νόσος της πυέλου, το ιστορικό υστερεκτομής, το ιστορικό ωθηκεκτομής, το ινομύωμα μήτρας και η εκτομή αυτού, ο φυσιολογικός τοκετός ή η καισαρική τομή, η εκτομή ωθηκικής κύστης, η ηλικία εμμηναρχής, η ηλικία εμμηνόπαυσης, αίτιο εμμηνόπαυσης, ο αριθμός κυήσεων και η ηλικία 1^{ης} εγκυμοσύνης, η αδυναμία κυοφορίας(ως δείκτης υπογονιμότητας), το ιστορικό αποβολών ή εξωμητρίου κύησης, η διάρκεια(σε ημέρες) καταμήνιου κύκλου, η διάρκεια(σε ημέρες) έμμηνου ρύσεως στην ηλικία 20 ετών, είναι οι παράμετροι που έχουν μελετηθεί συνολικά.

Αρχικές αναφορές συσχετίζουν την ΠΧΚ με μειωμένη γονιμότητα, αμηνόρροια, καθέξιν αποβολές, ενδομητρίωση, πρόωμη έκπτωση της λειτουργίας των ωοθηκών και επιδείνωση της ηπατικής λειτουργίας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης^{5,221,292}.

Εξάλλου το ιστορικό καθέξιν αποβολών, η ενδομητρίωση και η πρόωμη έκπτωση της λειτουργίας των ωοθηκών έχουν παρατηρηθεί με αυξημένη συχνότητα και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα²⁹³⁻²⁹⁹.

Ο ρόλος της κύησης στην εμφάνιση και πρόοδο πολλών αυτοανόσων νοσημάτων όπως και στην ΠΧΚ παραμένει αμφιλεγόμενος. Στην περίπτωση της ΠΧΚ, υπάρχουν περιορισμένα επιδημιολογικά δεδομένα σχετικά με αναπαραγωγικούς παράγοντες, κυρίως λόγω της μικρής συχνότητας της νόσου.

Υπάρχουν πρόσφατες μελέτες που υποστηρίζουν ότι οι γυναίκες με ΠΧΚ μπορούν να έχουν φυσιολογική εγκυμοσύνη³⁰⁰. Εντούτοις δεν είναι σπάνια η ενεργοποίηση της νόσου μετά τον τοκετό, οπότε και παρατηρείται αύξηση των χολοστατικών ενζύμων σε ποσοστά 60-72% των ασθενών όπως περιγράφεται από αναδρομικές μελέτες εγκύων ασθενών με ΠΧΚ³⁰⁰⁻³⁰³. Από την άλλη μεριά έχουν περιγραφεί περιπτώσεις ασθενών όπου η διάγνωση της νόσου ετέθη στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, και αμέσως μετά τον τοκετό η νόσος επιδεινώθηκε δραματικά, ώστε να οδηγήσει σε λίστα για μεταμόσχευση ήπατος. Σε υψηλά ποσοστά παρατηρείται εμφάνιση του κνησμού κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης των ασθενών, ενώ μπορεί να επιταθεί η ένταση του συμπτώματος αυτού εάν προϋπήρχε της σύλληψης και σε ορισμένες περιπτώσεις να μην καθίσταται ελεγχόμενος με φαρμακευτική αγωγή³⁰⁴.

Ο διεγερτικός ρόλος των οιστρογόνων στον πολλαπλασιασμό των χολαγγειοκυττάρων διερευνήθηκε σε κυτταρικό επίπεδο, από τους Alvaro και συνεργάτες την τελευταία δεκαετία^{151,305,306}.

Πειραματικά μοντέλα των ερευνητών αυτών έδειξαν ότι τα οιστρογόνα και άλλοι αυξητικοί παράγοντες προκαλούν πολλαπλασιασμό των χολαγγειοκυττάρων, μέσω ενεργοποίησης του Src/Shc/ERK μοριακού σηματοδοτικού καταρράκτη (extracellular signal-regulated kinase [ERK], the steroid-receptor co activator Src, Shc: (Src-homology/collagen protein)). Η εξωγενής χορήγηση 17-β-οιστραδιόλης αυξάνει την πρωτεϊνική έκφραση των Src/Shc/ERK και επομένως τον πολλαπλασιασμό των χολαγγειοκυττάρων, ενώ αντίθετα, οι ανταγωνιστές των υποδοχέων οιστρογόνων αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των χολαγγειοκυττάρων και μειώνουν την έκφραση σημαντικών διαμεσολαβητών όπως ERK/Shc.

Από ανοσοϊστοχημική εξέταση δειγμάτων ηπατικών βιοψιών σε ομάδα ασθενών με ΠΧΚ και ομάδα ελέγχου(φυσιολογικό ήπαρ, αλκοολική κίρρωση και σκληρυντική χολαγγειίτιδα) προέκυψε ότι α-και β-υποδοχείς οιστρογόνων βρέθηκαν μόνο στους ασθενείς με ΠΧΚ. Ειδικότερα, οι υποδοχείς β υπήρχαν σε όλα τα στάδια ΠΧΚ, σε ποσοστό 50-65% των ασθενών. Οι υποδοχείς α- ήταν μειωμένοι στα προχωρημένα στάδια της νόσου, υποδηλώνοντας ότι η οιστρογονική ανεπάρκεια ίσως να ευνοεί την εξέλιξη της νόσου σε απώλεια των μικρών χοληφόρων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει μία αρχική παρατήρηση σημαντικής βελτίωσης της ηπατικής βιοχημείας 5 ασθενών, μετά από εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων³²⁵. Από μεταγενέστερες μελέτες ασθενών-μαρτύρων στις ΗΠΑ, συχνότερη φαίνεται να είναι χρήση αντισυλληπτικών από τις ασθενείς σε σύγκριση με γυναίκες υγιείς εθελοντές, χωρίς όμως η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική σε δύο μελέτες που διεξήχθησαν στις ΗΠΑ^{137,308}.

Αντίθετα είναι τα συμπεράσματα από τους Rouron και συνεργάτες στη Γαλλία, σύμφωνα με τους οποίους οι 197 ασθενείς ανέφεραν σημαντικά μειωμένη χρήση αντισυλληπτικών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου(56% vs. 66%; $p = 0.0258$), αποτέλεσμα που διατηρήθηκε και στην πολυπαραγοντική ανάλυση(OR, 0.6; 95% CI, 0.5–0.8). Η διαφορά αυτή διατηρείται ακόμα και όταν γίνει αναπροσαρμογή της υπό μελέτη ομάδας και ληφθούν υπόψη μόνο οι καπνίστριες ασθενείς-υγιείς εθελοντές .

Η χρήση θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης συσχετίστηκε με την εμφάνιση ΠΧΚ, στη μεγαλύτερη μελέτη κοορτής 955 γυναικών με ΠΧΚ στις ΗΠΑ, επιβεβαιώνοντας τις αρχικές παρατηρήσεις.

Μεγαλύτερος μέσος αριθμός κύησεων (2.6 vs 2 κύησεις, $p=0.008$) και μικρότερη μέση ηλικία στην 1^η εγκυμοσύνη (21.4 vs 22.5 έτη, $p=0.03$) περιγράφηκαν συχνότερα στις ασθενείς με νόσο στην μονοπαραγοντική ανάλυση της αρχικής μελέτης από τις ΗΠΑ, Patel και συνεργατών . Το ιστορικό κύησης συσχετίστηκε θετικά με την ΠΧΚ και στην πολυπαραγοντική ανάλυση (OR = 1.40, 95% CI = 1.14, 1.71), προτείνοντας την εγκυμοσύνη ως παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση ΠΧΚ. Αντίστοιχα, οι ίδιοι ερευνητές το 2004, σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών, διαπίστωσαν ότι το ιστορικό μή κυοφορίας έχει προστατευτικό ρόλο στην ανάπτυξη ΠΧΚ(AOR 0.612, 95% CI 0.449-0.834). Από την πιο πρόσφατη μελέτη Rouron και συνεργατών επίσης βρέθηκε σημαντικά μικρότερη ηλικία στην 1η εγκυμοσύνη των ασθενών έναντι της ομάδας ελέγχου (24.0 ± 4.8 έτη vs. 25 ± 4.5 έτη, $p = 0.0096$),όχι όμως και σύνδεση της νόσου με το ιστορικό κύησης ή με την πολλαπλότητα των κύησεων. Το ιστορικό κνησιού

κατά τη διάρκεια της κύησης και η μικρότερη ηλικία στην πρώτη εγκυμοσύνη συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΠΧΚ σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης με δεδομένα από το αναπαραγωγικό ιστορικό. Στην μελέτη των Prince από την Αγγλία και συνεργατών δεν επιβεβαιώθηκαν οι προαναφερθέντες παράγοντες κινδύνου, αλλά το ιστορικό χολόστασης στην κύηση βρέθηκε να συνδέεται σημαντικά ,με τη νόσο¹³⁹.

Παράγοντες κινδύνου για την ΠΧΚ βρέθηκαν μόνο από την μελέτη Roupon και συνεργατών το ιστορικό εκτρώσεων ή εξωμήτριου κύησης.

Ομοφωνία όμως προκύπτει, από το σύνολο των παραπάνω μελετών, σε πληθυσμούς διαφορετικής γεωγραφικής κατανομής και καταγωγής, για τη θετική επίδραση των λοιμώξεων του γεννητικού συστήματος(κυρίως κολπίτιδων) στην εμφάνιση της νόσου.

4.10.4 Χειρουργικό Ιστορικό

Το ιστορικό χειρουργικών επεμβάσεων πριν τη διάγνωση της ΠΧΚ έχει παρατηρηθεί με σημαντικά αυξημένη συχνότητα μεταξύ των ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, η εμφάνιση της νόσου φαίνεται να σχετίζεται με προηγηθέν ιστορικό σκωληκοειδεκτομής ή αμυγδαλεκτομής, όπως προκύπτει από επιδημιολογική μελέτη στη Βόρειο Αμερική²⁷⁴.

Στη μελέτη αυτή η σύγκριση μεταξύ ασθενών και ομάδας φίλων τους έδειξε αυξημένη συχνότητα αμυγδαλεκτομής και ιστορικού άλλων χειρουργικών επεμβάσεων στην ομάδα των ασθενών. Όταν στην ομάδα ελέγχου συμπεριλήφθηκαν siblings τότε βρέθηκε θετική συσχέτιση για την εμφάνιση της νόσου με αμυγδαλεκτομή, κολονική πολυπεκτομή ή χολοκυστεκτομή. Βέβαια η επιλογή της ομάδας υγιών εθελοντών από το φιλικό και οικογενειακό περιβάλλον των ασθενών δεν ακολουθεί τους κανόνες της τυχαίας δειγματοληψίας και πιθανόν να οδήγησε σε διαστρέβλωση των αποτελεσμάτων της στατιστικής έρευνας.

Όσον αφορά στο ρόλο της σκωληκοειδεκτομής, σε μια πιο πρόσφατη έρευνα σε ελληνικό πληθυσμό ανευρέθη έλλειψη συσχέτισης μεταξύ ιστορικού σκωληκοειδεκτομής και ΠΧΚ³⁰⁹. Σε μία μεγάλη μελέτη ασθενών-μαρτύρων από τις

ΗΠΑ η αμυγδαλεκτομή, η χολοκυστεκτομή και η κολονική πολυπεκτομή βρέθηκαν με στατιστικά σημαντική αυξημένη συχνότητα στους ασθενείς με ΠΧΚ¹³⁷.

Εν τέλει παραμένει αμφιλεγόμενη η συσχέτιση της σκωληκοειδεκτομής με την νόσο, καθώς παρατηρήσεις δείχνουν ότι 40% των ασθενών με ΠΧΚ παρουσιάζουν ειδική ανοσολογική απάντηση(μέσω μοριακού μιμητισμού) στην καζεινολυτική πρωτεάση P της *Yersinia enterocolitica*, συνδέοντας τη νόσο με προηγηθείσα σκωληκοειδεκτομή^{99,310}.

Ιστορικό χειρουργικής επέμβασης ανέφεραν με μεγαλύτερη συχνότητα οι ασθενείς με ΠΧΚ στη μελέτη των Rouron και ερευνητών. Ειδικότερα εξ αυτών μόνο η χολοκυστεκτομή ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με ΠΧΚ²⁷⁵.

Από την άλλη μεριά, υπάρχουν και αναφορές από την Αγγλία που δεν επιβεβαιώνουν καμία συσχέτιση του χειρουργικού ιστορικού με τη νόσο^{138,279}.

4.10.5 Καρδιαγγειακή νόσος και ΠΧΚ

Η υπερλιπιδαιμία είναι πλέον γνωστό ότι συνιστά προγνωστικό παράγοντα αυξημένης νοσηρότητας-θνησιμότητας από καρδιαγγειακή νόσο στον γενικό πληθυσμό³¹¹.

Και στην περίπτωση των ασθενών με ΠΧΚ, η υπερλιπιδαιμία αρχικά θεωρήθηκε ότι σχετίζεται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο, δεδομένου ότι η νόσος εμφανίζεται σε γυναίκες μέσης ηλικίας.

Η άνοδος της χοληστερόλης στην ΠΧΚ οφείλεται κυρίως στην λιποπρωτεΐνη X, ένα λιποπρωτεϊνικό κλάσμα της LDL³¹².

Συσχέτιση όμως ανάμεσα στην υπερλιπιδαιμία της ΠΧΚ και την καρδιαγγειακή νόσο δεν μπορεί να αποδοθεί³¹³⁻³¹⁴.

Ταυτόχρονα, πειραματικά και κλινικά δεδομένα δείχνουν ότι στους ασθενείς με ΠΧΚ υπάρχει διαταραχή της λειτουργίας του ενδοθηλίου. Εξάλλου, οι χολοστατικές νόσοι χαρακτηρίζονται από ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών βιταμινών. Παρόλ'αυτά ακόμα και οι πιο πρόσφατες μελέτες δεν φαίνεται να αποδίδουν αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο στους ασθενείς με ΠΧΚ³¹⁵. Σε πρόσφατη μελέτη 930 ασθενών με ΠΧΚ δεν βρέθηκε συσχέτιση της νόσου με αυξημένο κίνδυνο

εμφράγματος του μυοκαρδίου, αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου ή παροδικού ισχαιμικού επεισοδίου³¹⁶.

Αρνητικά ήταν και τα αποτελέσματα μελέτης, μετά υπερηχογραφικό έλεγχο των καρωτίδων για την εκτίμηση του πάχους έσω-μέσου χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος, ως δείκτη υποκλινικής καρδιαγγειακής νόσου σε ασθενείς με ΠΧΚ και υπερχοληστερολαιμία³¹⁷. Τόσο οι ασυμπτωματικοί, όσο και οι ασθενείς με συμπτώματα κόπωσης παρά τις αυξημένες τιμές ολικής χοληστερόλης, HDL και LDL, δεν εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα καρδιαγγειακών συμβαμάτων, βάσει των συμπερασμάτων ερευνητών σε 180 ασθενείς με ΠΧΚ συγκριτικά με 151 ασθενείς με HCV λοίμωξη ως ομάδα ελέγχου³¹⁸.

4.10.6 Οστεοπόρωση και ΠΧΚ

Η χρόνια χολόσταση συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο οστεοπενίας και οστεοπόρωσης. Η ανάπτυξη της πρωτοπαθούς οστεοπόρωσης στην ΠΧΚ λαμβάνει χώρα μέσω 2 μηχανισμών :α) την «χαμηλού μεταβολισμού οστεοπόρωση», με φυσιολογική οστική απορρόφηση, αλλά μειωμένη σύνθεση οστού και αργή εναπόθεση ασβεστίου και β) την «υψηλού μεταβολισμού», με αυξημένη οστική απορρόφηση, είτε λόγω αυξημένης οστεοκλαστικής, είτε λόγω μειωμένης οστεοβλαστικής δραστηριότητας³¹⁹⁻³²¹.

Οι παράγοντες κινδύνου πρωτοπαθούς οστεοπόρωσης, όπως η μετεμμηνοπαυσιακή κατάσταση, το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ και γενικότερα η δυσαπορρόφηση Ca και βιταμίνης D(συνύπαρξη κοιλιοκάκης και/ή ικτέρου) συναντώνται και στην ΠΧΚ³²¹⁻³²². Ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για οστεοπόρωση έχουν βρεθεί η εμμηνόπαυση και/ή σοβαρότητα της ηπατικής νόσου στην ΠΧΚ³²³⁻³²⁴.

Επιπλέον έχει αναφερθεί κληρονομούμενη προδιάθεση για μειωμένη οστική πυκνότητα σε ασθενείς με ΠΧΚ, μέσω γενετικών πολυμορφισμών του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D³²⁵. Αδιευκρίνιστο και αμφιλεγόμενο τελικά παραμένει αν οι ασθενείς με ΠΧΚ βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης οστεοπόρωσης σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό³²⁶⁻³²⁷.

Οι ερευνητές Menon και συνεργάτες παρατήρησαν σε 176 ασθενείς με ΠΧΚ ότι η οστεοπόρωση είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό των ασθενών μεγαλύτερης ηλικίας, χαμηλού BMI και και προχωρημένου σταδίου³²⁷. Σε άλλη μελέτη κοορτής βρέθηκε μετρίου βαθμού αύξηση τόσο σε απόλυτο, όσο και σχετικό κίνδυνο καταγμάτων, ιδίως σε ασθενείς με σοβαρότερη νόσο³²⁸. Επιπρόσθετα, η εμφάνιση οστικών καταγμάτων σε μεταμοσχευθέντες ασθενείς είναι αποτέλεσμα συνδυασμού προυπάρχουσας χαμηλής οστικής πυκνότητας και πρόιμης απώλειας οστικής μάζας μετά τη μεταμόσχευση ήπατος³²⁹. Καταληκτικά λοιπόν όλοι οι ασθενείς με ΠΧΚ βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση οστεοπόρωσης, γ'αυτό κρίνεται απαραίτητη η λήψη προφυλακτικών και θεραπευτικών μέτρων³³⁰.

4.10.7 Καρκίνος και ΠΧΚ

Η συσχέτιση των κακοηθειών με την ΠΧΚ παραμένει αδιευκρίνιστη μέχρι και σήμερα. Αρχικές αναφορές περιέγραψαν αυξημένο κίνδυνο με εξωηπατικές μορφές καρκίνου και ειδικότερα με καρκίνο του μαστού.

Στο 11.8% του συνόλου 85 ασθενών από τη Γλασκώβη ανευρέθη εξωηπατική κακοήθεια(3 με καρκίνο μαστού, 1 με αδenoκαρκίνωμα ωοθηκών, 1 με καρκίνο παχέος εντέρου, 1 με καρκίνο τραχήλου μήτρας, 1 με αδenoκαρκίνωμα μήτρας και νεφρικών κυττάρων, 1 με καρκίνο λάρυγγα, 1 καρκίνο στομάχου και 1 μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα). Στο 2.4% των ασθενών συνυπήρχε HCC³³¹.

Τρία χρόνια αργότερα οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν ότι 3.5% από τις 171 υπό μελέτη γυναίκες με ΠΧΚ, ανέπτυξαν ιστολογικά επιβεβαιωμένο καρκίνο του μαστού, ποσοστό σημαντικά υψηλότερο συγκρινόμενο με γυναίκες της ίδιας ηλικίας και φύλου³³².

4.4 φορές υψηλότερη εμφάνιση του καρκίνου του μαστού σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό βρέθηκε επίσης και σε ομάδα ασθενών από περιοχή της Αμερικής³³³.

Σε μεταγενέστερη μελέτη, 175 ασθενών κίρρωτικού σταδίου από την Βορειο-Ανατολική Ιταλία, βρέθηκαν σε ποσοστό 4.5% εξωηπατικές κακοήθειες και σε 2.3% HCC. Οι δύο από τους τέσσερις ασθενείς με HCC είχαν και HCV λοίμωξη. Η επίπτωση του καρκίνου του μαστού στην ομάδα των ασθενών με ΠΧΚ του εν λόγω

πληθυσμού δεν ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με την αναφερόμενη για τον γενικό πληθυσμό επίπτωση³³⁴. Ακολούθως, μελέτη σε 22 γυναίκες ασθενείς-22 μάρτυρες από την ίδια ομάδα ερευνητών, δεν έδειξε μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του ενδομητρίου στην ομάδα της ΠΧΚ³³⁵. Η μεγαλύτερη πολυκεντρική μελέτη ασθενών-μαρτύρων στην Αμερική, σχετικά με συνοσηρότητες στην ΠΧΚ, έδωσε αντικρουόμενα αποτελέσματα σε σύγκριση με τις αρχικές αναφορές, για τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού στις ασθενείς¹³⁷. Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα από παρόμοια, μονοκεντρική Γαλλική μελέτη, όπου δεν ανευρέθη καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στη συνύπαρξη κακοηθειών εξωηπατικών ή μή, ανάμεσα σε ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου²⁷⁵.

Από το σύνολο των αναφορών προκύπτει ότι η συνύπαρξη HCC και ΠΧΚ υπολογίζεται σε 0.3% έως 4.22% των περιπτώσεων³³⁶⁻³⁴¹. Το 2001 βέβαια, οι ερευνητές Caballeria και συνεργάτες από την Ισπανία παρατήρησαν ιδιαίτερα αυξημένο επίπολοσμο HCC σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο ΠΧΚ (III ή IV), σε ποσοστό 11.1%³⁴². Το ποσοστό αυτό προσεγγίζει το αντίστοιχο 15% που σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης HCC σε κίρρωτικούς ασθενείς από HCV λοίμωξη. Υψηλότερη συχνότητα ανάπτυξης HCC σε προχωρημένο στάδιο ΠΧΚ βρέθηκε και σε μελέτη στην Ιαπωνία το 2002³⁴¹. Στην μελέτη αυτή η ανάπτυξη HCC συνδέθηκε με την μεγαλύτερη ηλικία και την κίρρωση, αλλά όχι και με αρνητική επίδραση στην επιβίωση των ασθενών. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσαν το 2007 και οι ερευνητές από τη Mayo Clinic, προτείνοντας προσυμπτωματικό έλεγχο για HCC σε ασθενείς με ΠΧΚ όταν πρόκειται για άρρενες ηλικιωμένους ασθενείς, με ιστορικό μετάγγισης αίματος και σημεία πυλαίας υπέρτασης³⁴³.

Από την πρόσφατη μελέτη των ερευνητών Deutsch και συνεργατών προέκυψε ότι στο 10.8% των ασθενών με ΠΧΚ Ελληνικής καταγωγής συνυπήρχε κακοήθεια, εκ των οποίων 3.8% HCC και 7% με εξωηπατική κακοήθεια³⁴⁴. Ο κίνδυνος εμφάνισης εξωηπατικής κακοήθειας ήταν υψηλότερος σε σύγκριση με εκείνον για HCC, εν τούτοις όμως φάνηκε να μην επηρεάζεται από το ιστολογικό στάδιο της ηπατικής νόσου. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων από δεδομένα ασθενών με ΠΧΚ δύο μεγάλων Ευρωπαϊκών κέντρων της Ιταλίας και της Ισπανίας(Πάντοβα και Βαρκελώνη) έδωσε παρόμοια ποσοστά εμφάνισης HCC, 3.36% και 3.34% αντίστοιχα³⁴⁵. Και σε αυτήν τη δικεντρική μελέτη το προχωρημένο στάδιο νόσου βρέθηκε παράγοντας κινδύνου για ανάπτυξη HCC στην ΠΧΚ. Σε πρόσφατη μετα-ανάλυση οι ασθενείς με ΠΧΚ είχαν

19 φορές υψηλότερο κίνδυνο να εμφανίσουν HCC σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό³⁴⁶. Σε μια μεγάλη μεγάλη μελέτη κοορτής ασθενών με ΠΧΚ από την Ιαπωνία η επίπτωση HCC ήταν 2.4% σε διάστημα 80 μηνών παρακολούθησης των ασθενών. Η επίπτωση HCC ήταν υψηλότερη στους άνδρες έναντι των γυναικών (5.1% vs 2.0%)³⁴⁷.

Τέλος, έχει πρόσφατα αναφερθεί η συσχέτιση της ανταπόκρισης στη θεραπεία με ουροδεοξυχολικό οξύ(UDCA) με την ανάπτυξη HCC. Ο κίνδυνος για HCC ήταν υψηλότερος στην ομάδα των ασθενών που δεν απάντησαν στη θεραπεία με ουροδεοξυχολικό οξύ. Πιο συγκεκριμένα η 10ετής επίπτωση HCC ήταν 9% και η 15ετής, 20%, όπως περιγράφουν ερευνητές από την Ολλανδία σε πολυκεντρική μελέτη 375 ασθενών με ΠΧΚ³⁴⁸.

4.10.8 Συνοδά Αυτοάνοσα Νοσήματα

Υψηλό ποσοστό των ασθενών με ΠΧΚ εκδηλώνουν, είτε πριν τη διάγνωση, είτε μετά τη διάγνωση συνοδά αυτοάνοσα νοσήματα. Τουλάχιστον άλλο ένα συνυπάρχον αυτοάνοσο νόσημα αναφέρεται σε ποσοστό άνω 50% έως 84% του συνόλου των ασθενών³⁴⁹. Σε μικρό πληθυσμό ασθενών από τη Βρετανική Κολούμπια, στον Καναδά το ποσοστό αυτό υπολογίστηκε σε 79% με το 12% να αντιστοιχεί σε ΣΕΛ. Οι πιο συχνά συνυπάρχουσες αυτοάνοσες παθήσεις είναι το σύνδρομο Sjögren, το φαινόμενο Raynaud, η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα Hashimoto, η Ρευματοειδής αρθρίτιδα(PA), ο ΣΕΛ, το σκληρόδερμα, σύνδρομο CREST. Το σύνδρομο Sjögren αναφέρεται σε 9.14-38% των ασθενών με ΠΧΚ, με το μεγαλύτερο ποσοστό από μια δημοσίευση προοπτικής μελέτης στη Χιλή²⁸³. Σε 8-24% των ασθενών συνυπάρχει φαινόμενο Raynaud, σε 3.95-13% PA, σε 3-23% θυρεοειδίτιδα Hashimoto, σε 3-12% ΣΕΛ, 2-11% σκληρόδερμα^{28,137,266,274-275,282,291,350-353}. Με μικρότερη συχνότητα έχουν περιγραφεί λεύκη,ψωρίαση, πολλαπλή σκλήρυνση, φλεγμονώδης εντεροπάθεια, διαβήτης τύπου I, πολυμυοσίτιδα, νόσος Graves, νόσος Addison καθώς και αναφορές περιπτώσεων κακοήθους αναιμίας³⁵⁴, κοινής ποικίλους ανοσοανεπάρκειας³⁵⁵, σαρκοειδωσής³⁵⁶, κοιλιοκάκης³⁵⁷ ή ακόμα και συνύπαρξη

πολλών αυτοανόσων νοσημάτων σε έναν ασθενή με ΠΧΚ^{266,356,358}. Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται στα ποσοστά ερμηνεύονται αφενός μεν από το γεγονός ότι μελέτες προερχόμενες από περιοχές του Ανατολικού κόσμου περιλαμβάνουν πολύ μικρό δείγμα ασθενών(σε κάποιες περιπτώσεις δεν ξεπερνούν τους 10 ασθενείς), αφετέρου δε σε αρκετές περιπτώσεις τα αποτελέσματα προκύπτουν από συνεντεύξεις των ασθενών χωρίς να επιβεβαιώνονται κλινικοεργαστηριακά. Κοινό χαρακτηριστικό όμως των ασθενών με ΠΧΚ, ανεξαρτήτως εθνικής προέλευσης, είναι η διαταραχή των μηχανισμών αυτοανοσίας με συνέπεια την ευπάθεια και εμφάνιση περισσότερων του ενός αυτοάνοσων νοσημάτων. Χαρακτηριστικό επίσης των ασθενών με ΠΧΚ είναι η αυξημένη συχνότητα ανεύρεσης αντιθυροειδικών αντισωμάτων στον ορό του αίματος, χωρίς να συνυπάρχουν κλινικές ενδείξεις θυροειδικής νόσου. Συμπτώματα συνδρόμου Sicca συνιστούν κοινό εύρημα των ασθενών, αλλά μόνο ένας μικρός αριθμός εξ αυτών έχουν στον ορό τους τα τυπικά anti-SSA/anti-SSB αυτοαντισώματα του πρωτοπαθούς συνδρόμου Sjogren. Συνήθως η συνύπαρξη σκληροδέρματος με ΠΧΚ, αφορά στην εντοπισμένη μορφή συνδρόμου CREST. Το ιστορικό αρθραλγιών περιγράφεται συχνά από τους ασθενείς με ΠΧΚ, πλήν όμως λίγοι πληρούν τα κριτήρια διάγνωσης ρευματοειδούς αρθρίτιδας.

4.11 Πορεία νόσου- Θεραπεία

Υπάρχουν αρκετά αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με τη φυσική πορεία της ΠΧΚ. Πράγματι, η εξέλιξη της νόσου μπορεί να ποικίλλει ευρύτατα και δεν είναι ασύνηθες στην κλινική πράξη ασθενείς να παραμένουν ασυμπτωματικοί για δεκαετίες και σε άλλους η πρόοδος της νόσου να οδηγεί ταχύτατα σε ηπατική ανεπάρκεια και μεταμόσχευση ήπατος. Αρχικά η χρήση UDCA στη θεραπεία της ΠΧΚ και η χρήση του μοντέλου πρόβλεψης της επιβίωσης Mayo score θεωρήθηκαν ως επαρκή μέσα για την προγνωση και θεραπεία της νόσου. Μέχρι και σήμερα δεν έχει ξεκαθαριστεί τι προκαλεί τη σοβαρότητα και την εξέλιξη της ΠΧΚ. Βέβαια υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν το ρόλο γενετικών παραγόντων μή σχετιζόμενων με αυτούς που ενεχονται στην εμφάνιση της νόσου³⁵⁸. Μεταξύ των μή γενετικών παραγόντων

πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν το ρόλο της παρουσίας των ειδικών για την ΠΧΚ ANA σε σχέση με πιο επιθετική μορφή της νόσου^{249,359-360}.

Όταν η νόσος είναι ασυμπτωματική στη διαγνώση η 10ετής επιβίωση των ασθενών δεν διαφοροποιείται από αυτήν των υγιών ίδιας ηλικίας και φύλου, το 67% μη κίρρωτικών ασθενών θα αναπτύξουν κίρρωση σε περίοδο παρακολούθησης 7 ετών, το 70% των ασυμπτωματικών ασθενών θα εμφανίσουν συμπτώματα. Με βάση τα προαναφερθέντα θεωρείται ότι τα ποσοστά επιβίωσης των ασυμπτωματικών ασθενών με ΠΧΚ είναι μικρότερα συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό εάν εμφανιστούν συμπτώματα κατά τη διάρκεια παρακολούθησης, γεγονός που πιθανά να μη σχετίζεται την ηπατική νόσο^{216,361}.

Ο μηχανισμός δράσης του UDCA στην ΠΧΚ δεν έχει πλήρως ξεκαθαριστεί. Η ενεργοποίηση των διαταραγμένων μηχανισμών έκκρισης των χολικών οξέων, η μείωση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών, η επίδραση στην απόπτωση και στους αγγειοδραστικούς μεσολαβητές συνιστούν ορισμένους από τους πιθανούς τρόπους δράσης του³⁶²⁻³⁶⁴. Πλήρης βιοχημική ανταπόκριση στη θεραπεία με UDCA συμβαίνει στο 30% των ασθενών, με την επίτευξη φυσιολογικών τιμών ALP και σταθεροποίηση ή βελτίωση των ιστολογικών βλαβών του ήπατος και συνιστά ένδειξη αποτελεσματικότητας της θεραπείας³⁶⁵⁻³⁶⁷. Ανάλυση των τριών μεγαλύτερων κλινικών μελετών έδειξε ότι η χρήση UDCA επιμηκύνει την επιβίωση των ασθενών με ΠΧΚ ελεύθερης ηπατικής μεταμόσχευσης³⁶⁸. Ο προσδιορισμός των επιπέδων ALP ορού 6 μήνες μετά θεραπεία με UDCA μπορεί να προβλέψει την απάντηση στο UDCA.

Και άλλα φάρμακα έχουν μελετηθεί στη θεραπεία της ΠΧΚ ως μονοθεραπεία ή συμπληρωματικά στο UDCA, με πτωχά αποτελέσματα. Η χρήση κορτικοειδών σε συνδυασμό με UDCA φαίνεται να επιδρά θετικά στις παθολογοανατομικές αλλοιώσεις της νόσου, με κίνδυνο όμως να επιδεινώσει την οστεοπενία και συνήθως έχει καλύτερα αποτελέσματα σε περιπτώσεις συνδρόμου αλληλοεπικάλυψης με ΑΙΗ³⁶⁹⁻³⁷⁰. Τα θετικά αποτελέσματα αρχικών μελετών με βελτίωση των βιοχημικών δεικτών στη χρήση μπεζαφιμπράτης, φαινοφιμπράτης³⁷¹⁻³⁷², ομπετιχολικού οξέος³⁷³ και FXR(farnesoid X receptor)³⁷⁴ πιθανά να αναδείξουν νέες θεραπευτικές επιλογές στις μορφές ΠΧΚ που δεν ανταποκρίνονται στο UDCA.

Η μεταμόσχευση ήπατος συνιστά αποτελεσματική θεραπεία για την ΠΧΚ τελικού σταδίου, με αποτελέσματα καλύτερα συγκριτικά με τις άλλες ηπατικές νόσους³⁷⁵. Τα ποσοστά επιβίωσης στο έτος και στην πενταετία κυμαίνονται 92% και 85%,

αντίστοιχα. Το 20-25% των ασθενών με ΠΧΚ επανεμφανίζουν τη νόσο μετά τη δεκαετία, χωρίς όμως αυτό να επηρεάζει την επιβίωση των ασθενών ή του μοσχεύματος³⁷⁶.

5. Η έννοια της κληρονομικότητας στην ΠΧΚ

5.1 Ενδοοικογενειακή ΠΧΚ

Αν και η αιτία της ΠΧΚ παραμένει άγνωστη και παρόλο που δεν θεωρείται μια νόσος που ακολουθεί απλή Μενδελική κληρονομικότητα, εντούτοις φαίνεται πως υπάρχει μια κληρονομούμενη προδιάθεση για τη νόσο. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το σύνολο των παρατηρήσεων σε επιδημιολογικές μελέτες μονοζυγωτικών και διζυγωτικών διδύμων αδερφών, καθώς επίσης και σε μελέτες των οικογενειών των ασθενών με ΠΧΚ.

5.1.1 Μελέτες Διδύμων

Οι μελέτες διδύμων αδερφών με ΠΧΚ έως και σήμερα είναι περιορισμένες σε αριθμό.

Η πρώτη περιγραφή ΠΧΚ μεταξύ διδύμων, θηλέων αδελφών έγινε το 1973 από τον Chohan³⁷⁷. Βέβαια στην αναφορά αυτή εκλείπουν πληροφορίες σχετικά με περιβαλλοντικούς, γενετικούς παράγοντες και το λοιπό ιατρικό ιστορικό των 2 γυναικών.

Ακολούθως το 1994 δημοσιεύθηκε η περίπτωση παρουσίας ΠΧΚ μόνο στη μία από τις 2 μονοζυγωτικές διδύμους³⁷⁸. Αρχικά, η παρουσία AMA στον ορό και των 2 διδύμων υποδηλώνει την ύπαρξη κοινής ανοσολογικής διαταραχής. Κάποιο άλλο γεγονός είναι αυτό που πυροδότησε την ανοσολογική απάντηση στον οργανισμό της μίας αδελφής, ώστε να διηθηθεί το επιθήλιο των μικρών χοληφόρων από T-λεμφοκύτταρα. Παρόλα αυτά η μονοζυγωτία σε αυτήν την αναφορά δεν είναι τελείως

ξεκάθαρη³⁷⁹. Μεταγενέστερη μελέτη από τους Selmi και συνεργάτες³⁸⁰ σε 8 ζεύγη μονοζυγωτικών και 8 ζεύγη διζυγωτικών διδύμων αδελφών διέκρινε 5 από τα 8 ζεύγη μονοζυγωτικών διδύμων με ΠΧΚ. Η συνύπαρξη της ΠΧΚ στα μονοζυγωτικά δίδυμα αδέρφια υπολογίστηκε 63%. Πρόκειται για το μεγαλύτερο ποσοστό συνύπαρξης αυτοανόσου νοσήματος μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων, δεδομένου ότι κυμαίνεται μεταξύ 25-50% για τα άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. Από τα 3 ζεύγη μονοζυγωτικών διδύμων που δεν συνυπήρχε ΠΧΚ, τα δύο ζεύγη είχαν AMA θετικά στον ορό με φυσιολογική ηπατική λειτουργία. Πιθανόν με την πάροδο των ετών, οι ασυμπτωματικοί δίδυμοι να ανέπτυξαν ΠΧΚ.

Από τα άλλα συνυπάρχοντα αυτοάνοσα νοσήματα, σύνδρομο Sicca είχαν τα περισσότερα ζεύγη μονοζυγωτικών διδύμων, ένα ζεύγος είχε θυρεοειδίτιδα Hashimoto και το ένα από τα δύο αδέρφια ενός ζεύγους είχε αυτοάνοση ηπατίτιδα. Η υψηλή επίπτωση άλλων αυτοανόσων νοσημάτων υποδηλώνει ροπή προς την αυτοανοσία γενετικά προδιατεθειμένων ατόμων.

Όλα τα αδέρφια με ΠΧΚ ήταν θήλεα, τα 4 ζεύγη ήταν Καυκάσιοι και το ένα ζεύγος διδύμων Ασιατικής καταγωγής. Η ηλικία εμφάνισης της νόσου ήταν μεταξύ 33 και 60 ετών και τα περισσότερα ζεύγη διδύμων εμφάνιζαν τη νόσο στην ίδια ηλικία ή με διαφορά 2 ετών. Βέβαια παρατηρήθηκαν και αρκετές διαφοροποιήσεις, τόσο στο ιστολογικό στάδιο κατά τη διάγνωση, όσο και στην κλινική εξέλιξη της νόσου. Οι διαφοροποιήσεις αυτές ίσως να οφείλονται σε αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο γονιδίωμα και το περιβάλλον ή ακόμα και σε επιγενετικές αλλαγές.

5.1.2 Μελέτες συγγενών Α βαθμού

Το σύνολο των μελετών που έχουν διεξαχθεί για τον προσδιορισμό της ενδοοικογενειακής εμφάνισης της ΠΧΚ, επιβεβαιώνουν ιδιαίτερα υψηλό επιπολασμό της νόσου μεταξύ των συγγενών Α βαθμού συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό. Οι Bach και Schaffner στο Νοσοκομείο Mount Sinai της Νέας Υόρκης διεξήγαγαν μία

αναδρομική ανασκόπηση για τον καθορισμό του επιπολασμού της ΠΧΚ σε συγγενείς 405 ασθενών με ΠΧΚ. Ανευρέθησαν 26 οικογένειες των ασθενών με τουλάχιστον έναν συγγενή Α βαθμού με τη νόσο, ποσοστό 4.3%, ή 14.9% αν συμπεριληφθούν και οι περιπτώσεις πιθανής ΠΧΚ³⁸¹. Πρόκειται για ποσοστό περισσότερο από 150 φορές μεγαλύτερο από αυτό του γενικού πληθυσμού^{15,382}.

Σε αντίστοιχα συμπεράσματα οδήγησε και μελέτη στην Ιταλία³⁸³ και στην Σουηδία³⁸⁴ με ποσοστά ενδοοικογενειακής εμφάνισης ΠΧΚ 3.8% και 4.5% αντίστοιχα. Στην Ιαπωνία οι ερευνητές Tsuji και συνεργάτες³⁸⁵ βρήκαν το ποσοστό αυτό 5.1% και παρατήρησαν ακόμα υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης της ΠΧΚ μεταξύ οικογενειών στην Χιροσίμα(944 φορές), σε σχέση με τις οικογένειες ασθενών από την υπόλοιπη Ιαπωνία(210 φορές) και φυσικά σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό. Άλλοι ερευνητές από το πανεπιστημιακό νοσοκομείο στη Gumna της Ιαπωνίας²⁷⁵ σε 171 ασθενείς με ΠΧΚ υπολόγισαν το ποσοστό ενδοοικογενειακής ΠΧΚ σε 5.8%.

Οι ομάδες ερευνητών Gershwin και συνεργάτες¹³⁷, Corpechot και συνεργάτες²⁷⁵ ανέφεραν εξίσου υψηλά ποσοστά ΠΧΚ 5.9% σε ΗΠΑ και 4% σε Γαλλία αντίστοιχα, ανάμεσα στους συγγενείς Α βαθμού των ασθενών.

Από τις παραπάνω αναφορές φαίνεται ότι η ενδοοικογενειακή επίπτωση της νόσου μεταξύ των συγγενών Α βαθμού ασθενών υπολογίζεται σε 4–6%.

Ασφαλώς υπάρχουν και άλλες αναφορές με χαμηλότερα ποσοστά όπως 1.33% από το Νοσοκομείο King's College στην Αγγλία³⁸⁷ ή και με μεγαλύτερα ποσοστά όπως 6.4% στη μελέτη των Jones και συνεργατών³⁸⁸. Η τελευταία μελέτη δίνει έμφαση στον προσδιορισμό των ομάδων μεταξύ των συγγενών που βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο εκδήλωσης ΠΧΚ. Σε γενικές γραμμές, στους συγγενείς Α βαθμού βρέθηκε επίπτωση της ΠΧΚ 0.72%. Πιο συγκεκριμένα, υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης ΠΧΚ παρατηρήθηκε στα παιδιά των ασθενών με ποσοστό 1.2% και ιδιαίτερα όταν επρόκειτο για κορίτσια 2.3%, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται από τις κλινικές παρατηρήσεις και μεμονωμένες αναφορές περιστατικών συνύπαρξης της ΠΧΚ σε μητέρες και κόρες³⁸⁷. Ακολουθεί αριθμητικά η επίπτωση της νόσου ανάμεσα σε γυναίκες αδερφές¹³⁸, ή ανάμεσα σε μητέρα-αδερφή-κόρη³⁸⁹.

Χαρακτηριστικά, οι ερευνητές Jaup και Zettergren³⁹⁰ αναφέρουν την ύπαρξη μίας οικογένειας όπου οι 4 στις 6 αδερφές είχαν ΠΧΚ. Από την άλλη μεριά σε μία οικογένεια Παλαιστινιακής καταγωγής οι ερευνητές Abu-Mouch και συνεργάτες³⁹¹ μελέτησαν μια οικογένεια με 10 αδέρφια(8 γυναίκες-2 άνδρες) εκ των οποίων οι 5 αδερφές εμφάνισαν ΠΧΚ σε μεσοδιάστημα 10 ετών η μία από την άλλη, υψηλό τίτλο

AMA και το ίδιο στάδιο νόσου. Από τις υπόλοιπες 3 αδερφές οι 2 είχαν θετικά AMA αλλά σε χαμηλό τίτλο, ενώ η μία αδερφή, η μητέρα και τα 2 άρρενα αδέρφια είχαν αρνητικά AMA. Εξάλλου σε μελέτη ανίχνευσης AMA στον ορό συγγενών Α βαθμού ασθενών με ΠΧΚ από ερευνητές στη Mayo Clinic στο Ρότσεστερ³⁸⁹, η επίπτωση της νόσου μεταξύ των θήλεων αδερφών υπολογίστηκε στο 20.7%, ενώ μόλις 7.8% μεταξύ άρρενων αδερφών και 3.7% στους πατέρες ασθενών με ΠΧΚ. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει αναφορά σε μητέρα και κόρη με ΠΧΚ καθώς πέρα της γενετικής συσχέτισης είχαν κοινές περιβαλλοντικές επιδράσεις, που πιθανόν να επέδρασαν στην εκδήλωση της νόσου σε μικρό χρονικό διάστημα μεταξύ τους³⁸⁹. Υπάρχουν και άλλες παρόμοιες αναφορές σε μητέρα-κόρη με ΠΧΚ με διαφορετική κλινική πορεία της νόσου μεταξύ τους, αλλά με κλινική εκδήλωση και διάγνωση σε μικρό χρονικό διάστημα η μία από την άλλη^{393,394}. Βέβαια στην περίπτωση των ερευνητών Douglas και Finlayson³⁹³ η νόσος διαγνώστηκε πρώτα στην κόρη(τελικό στάδιο) και μετά 21 μήνες από το θάνατό της διαγνώστηκε στην μητέρα και σε μια οικογενειακή τους φίλη.

Από τον έλεγχο AMA αυτοαντισωμάτων σε συγγενείς Α βαθμού της εν λόγω οικογένειας βρέθηκαν αρκετοί συγγενείς με AMA θετικά, χωρίς διαταραχή της ηπατικής βιοχημείας. Κανείς από αυτούς δεν ελέγχθηκε ξανά ώστε να διαπιστωθεί ή όχι η εξέλιξη σε ΠΧΚ.

Δεν εκλείπουν βέβαια, και σπανιότερες περιπτώσεις εκδήλωσης ΠΧΚ σε πατέρα και κόρη^{392,395}, όχι όμως και σε πατέρα και υιό.

Λίγες είναι και οι αναφορές ΠΧΚ μεταξύ αρρένων αδερφών³⁹⁶ αλλά η εγκυρότητα και η ακριβής εφαρμογή των κριτηρίων διάγνωσης αμφισβητείται³⁸².

Οι ερευνητές Tanaka και συνεργάτες περιγράφουν αρκετές περιπτώσεις ΠΧΚ μεταξύ πατέρα-κόρης καθώς και 2 μεταξύ αδερφών-αδερφές, άνευ περαιτέρω πληροφοριών για την κλινική εξέλιξη της νόσου σε αυτές τις ενδοοικογενειακές μορφές ΠΧΚ³⁸².

5.1.3 ΠΧΚ στην εκτεταμένη οικογένεια

Αρκετές πληροφορίες σχετικά με το ρόλο περιβαλλοντικών επιδράσεων προκύπτουν από τη μελέτη εκτεταμένων οικογενειών, καθώς τα μέλη μοιράζονται το ίδιο περιβάλλον, αλλά έχουν γενετικές διαφοροποιήσεις.

Η ομάδα των Abu-Mouch και συνεργατών περιέγραψαν την εμφάνιση ΠΧΚ σε ένα ανδρόγυνο³⁹¹.

Και οι 2 είχαν μεγαλώσει στην ίδια γειτονιά στο Michigan και ήταν καπνιστές. Ο σύζυγος αν και 5 έτη νεότερος ανέπτυξε τη νόσο 5 έτη μετά τη συζυγό του, με ιστολογικά χαρακτηριστικά πιο προχωρημένης νόσου.

Άλλες βιβλιογραφικές αναφορές για συνύπαρξη ΠΧΚ μεταξύ συζύγων δεν υπάρχουν έως και σήμερα γεγονός ενδεικτικό της σπανιότητας του φαινομένου.

Οι ίδιοι ερευνητές παρουσίασαν μία οικογένεια από τη Νέα Υόρκη όπου η μητέρα και η σύζυγος του υιού της είχαν ΠΧΚ. Η κόρη και η εγγονή (κόρη του υιού) της πρώτης ασθενούς είχαν AMA θετικά στον ορό τους για έτη, χωρίς όμως κλινικοεργαστηριακές εκδηλώσεις ΠΧΚ. Να σημειωθεί ότι η δεύτερη ασθενής με ΠΧΚ είχε καταγωγή από την Κορέα, ζούσε στην ίδια γειτονιά για περισσότερο από 30 έτη και στο ίδιο σπίτι με τη μητέρα του συζύγου της τα τελευταία 2 έτη. Πρόκειται για 2 γυναίκες γενετικά μη σχετιζόμενες μεταξύ τους όπου η εμφάνιση της νόσου παράμενει αινιγματική³⁹⁷.

5. Αυτοανοσία και συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ

Ήδη από τις αρχές της 10ετίας του 1970 παρατηρήθηκε εμφάνιση μη ειδικών ανοσολογικών διαταραχών σε συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ σε αρκετά υψηλή συχνότητα έως και 70% συγγενών^{398, 399}. Ακόμα και σε συγγενείς πρώτου βαθμού (κυρίως γυναίκες), χωρίς ηπατική νόσο, έχουν βρεθεί αυτοάνοσες διαταραχές, όπως αυξημένα επίπεδα IgG και IgM και μη όργανο-ειδικά αυτοαντισώματα συμπεριλαμβανομένων των αντιπυρηνικών (ANA), των αντισωμάτων έναντι των λείων μυικών ινών (SMA) και των AMA^{398,400}. Πιο πρόσφατες μελέτες σε συγγενείς ασθενών με ΠΧΚ, επιβεβαιώνουν την αυξημένη ενδοοικογενειακή επίπτωση της αυτοανοσίας. Η ομάδα ήπατος από το Newcastle της Αγγλίας ανακοίνωσε ότι 14% από 1118 συγγενείς Α βαθμού, 160 ασθενών με ΠΧΚ είχαν τουλάχιστον ένα αυτοάνοσο νόσημα, μεταξύ των οποίων πιο συχνά, θυρεοειδίτιδα Hashimoto, ΡΑ, σύνδρομο Sjogren, φαινόμενο Raynaud και κακοήθης αναιμία²⁶⁶. Αντίστοιχα, 5% συγγενών Α βαθμού, 26 ασθενών από τη Βραζιλία ανέφεραν ένα αυτοάνοσο

νόσημα(μόνο σε μία περίπτωση ΠΧΚ), ενώ ANA, SMA και AMA αυτοαντισώματα ανιχνεύθηκαν συνολικά στον ορό 11% των συγγενών, χωρίς κλινικά σημεία νόσου στην πλειονότητα²⁶⁷.

Οι ερευνητές Lazaridis³⁹² και συνεργάτες, βρήκαν σε ποσοστό 13.1% vs 1% θετικά AMA στον ορό συγγενών έναντι της ομάδας ελέγχου. Μεταξύ αυτών υψηλότερη συχνότητα παρατηρήθηκε στα θήλεα μέλη των οικογενειών, αδερφές 20.7%, μητέρες 15.1%, κόρες 9.8%. Τα αντίστοιχα ποσοστά για τους άρρενες συγγενείς ήταν αδερφοί 7.8%, πατέρες 3.7%, και υιοί 0%. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν τους ερευνητές να συστήσουν παρακολούθηση των συγγενών με AMA θετικά αυτοαντισώματα, προκειμένου να διαγνωσθεί σε πρώιμα στάδια πιθανή ΠΧΚ και να δοθεί άμεσα η κατάλληλη θεραπεία.

Ακόμα πιο πρόσφατη είναι η μελέτη από το Παρίσι των Corpechot και συνεργατών²⁷⁵, σύμφωνα με την οποία ιστορικό αυτοάνοσου νοσήματος ανέφερε 31% των συγγενών Α βαθμού. Τα δύο νοσήματα με την μεγαλύτερη συχνότητα μεταξύ των συγγενών Α βαθμού ήταν η θυρεοειδίτιδα Hashimoto και η ΠΧΚ, με 6% και 4%, αντίστοιχα.

Τα ευρήματα των προαναφερθέντων μελέτων ενισχύουν την υπόθεση της ύπαρξης γενετικού παράγοντα στην ΠΧΚ και/ή την πιθανή επίδραση κοινών περιβαλλοντικών παραγόντων για την εμφάνιση της νόσου. Εξάλλου η αυξημένη εμφάνιση αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας, τόσο στους ασθενείς, όσο και στα μέλη των οικογενειών τους, ισχυροποιεί την άποψη της αμοιβαίας δράσης γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στην παθογένεια και των 2 αυτοανόσων νοσημάτων.

7. Ο ρόλος των Γενετικών Πολυμορφισμών στον καθορισμό της κληρονομικότητας στην ΠΧΚ.

7.1 Βασικές Έννοιες

7.1.1 Γενετικοί Πολυμορφισμοί (SNPs)

Τα αυτοάνοσα νοσήματα, συνιστούν χρόνιες καταστάσεις, οι οποίες προκαλούνται έπειτα από απώλεια της ανοσολογικής ανοχής σε αυτό-αντιγόνα. Ανήκουν στην κατηγορία των πολυπαραγοντικών νοσημάτων. Κοινό χαρακτηριστικό των νοσημάτων αυτών είναι ότι ο φαινότυπός τους ελέγχεται από πολλά γονίδια και παράλληλα επηρεάζεται από γενετικούς, περιβαλλοντικούς και τυχαίους παράγοντες. Παρόλο που οι παθογενετικοί μηχανισμοί που ευθύνονται για την έναρξη της αυτοανοσίας είναι ελάχιστα κατανοητοί, πληθώρα ερευνών έχει αναδείξει το γενετικό υπόβαθρο ως ένα σημαντικό παράγοντα για την προδιάθεση στη νόσο.

Δύο κύριως μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό γενετικών τόπων που πιθανόν να σχετίζονται με κάποιο πολυπαραγοντικό νόσημα: α) η ανάλυση σύνδεσης (linkage studies)⁴⁰¹⁻⁴⁰³ και β) η ανάλυση συσχέτισης (association studies)⁴⁰¹⁻⁴⁰⁵.

Η ανάλυση συσχέτισης ασθενών-μαρτύρων είναι η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος διερεύνησης της γενετικής ποικιλότητας για την ευπάθεια σε μία νόσο.

Συγκεκριμένα ερευνάται η συσχέτιση του αλληλομόρφου ενός γενετικού δείκτη (marker) με την ασθένεια, μέσω σύγκρισης της συχνότητας του αλληλομόρφου ανάμεσα σε ασθενείς και σε μία ομάδα υγιών. Διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία του DNA μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την απαντητικότητα των ατόμων στην επίδραση παθογόνων μικροοργανισμών, χημικών ουσιών ή φαρμάκων καθώς επίσης και στην εκδήλωση ασθενειών.

Οι περισσότερες μελέτες αναφορικά με το γενετικό υπόβαθρο της ΠΧΚ έχουν επικεντρωθεί σε μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNP). Ένας μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός χαρακτηρίζεται από αλλαγή στην αλληλουχία του DNA, η οποία λαμβάνει χώρα όταν μία αζωτούχος βάση (A, T, C ή G) αντικαθίσταται από μία άλλη σε κάποιο σημείο του γενετικού υλικού ατόμων του ίδιου είδους ή μεταξύ ενός ζεύγους χρωμοσωμάτων του ίδιου ατόμου. Για παράδειγμα, η αλληλουχία DNA για τον ίδιο γενετικό τόπο σε δύο διαφορετικά άτομα, AAGCCTA και AAGCTTA, διαφέρει μόνο σε ένα νουκλεοτίδιο. Στην περίπτωση αυτή έχουμε 2 αλληλόμορφα : C και T. Εντοπίζονται συνήθως ανά 200 με 300 βάσεις .

Η αντικατάσταση αυτή μπορεί να γίνει σε κωδικές(εξώνια) , μη κωδικές αλληλουχίες γονιδίων(ιντρόνια, VNTR) ή σε διαγονιδιακές περιοχές των γονιδίων. Όταν συμβεί μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός SNPs σε μια κωδικοποιούσα περιοχή δεν συνεπάγεται απαραίτητα αλλαγή στο αμινοξύ της παραγόμενης πρωτεΐνης, λόγω εκφύλισης του γενετικού κώδικα. Τα αλληλόμορφα ενός SNP πολυμορφισμού ονομάζονται συνώνυμα όταν και τα 2 οδηγούν στην παραγωγή της ίδιας πρωτεΐνης (σιωπηλή μεταλλαγή). Μη συνώνυμα είναι αντίστοιχα τα αλληλόμορφα που οδηγούν στην παραγωγή διαφορετικού πρωτεϊνικού προϊόντος. Επιπτώσεις στο φαινότυπο μπορεί να υπάρξουν και σε περίπτωση που η αντικατάσταση βάσης προκύψει σε μή κωδικοποιούσα περιοχή γονιδίου, αλλά σε ρυθμιστική περιοχή ή ιντρόνιο, καθώς δύναται να επηρεάσει την πρόσδεση ρυθμιστικών πρωτεϊνών ή την ωρίμανση του mRNA μεταγράφου. Σημαντικό χαρακτηριστικό επίσης των SNP είναι ότι μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών, το αλληλόμορφο που επικρατεί στη μία ομάδα(κοινής εθνικότητας ή εντός καθορισμένων γεωγραφικών ορίων)μπορεί να έχει διαφορετική συχνότητα στην άλλη ομάδα και να είναι πολύ πιο σπάνιο.

7.1.2 Πλήρης γονιδιωματική ανάλυση συσχέτισης (Genome-wide association study)

Οι πλήρεις γονιδιωματικές αναλύσεις δίνουν την δυνατότητα για εντοπισμό νέων γονιδίων, εφόσον δεν απαιτούν την προηγούμενη γνώση των υποψήφιων γονιδίων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί μεγάλες ομάδες γενετικών δεικτών όπως μικροδορυφόρων και SNPs σε όλο το γονιδίωμα για την κατασκευή χάρτη ανισορροπίας σύνδεσης, ο οποίος θα αποτελέσει ένα σημαντικό στοιχείο για την χαρτογράφηση των γονιδίων των ανθρώπινων ασθενειών. Η πυκνότητα των γενετικών δεικτών παραμένει ακόμα άγνωστη, εξαρτάται από την κατασκευή των δειγμάτων και είναι πιθανό να ποικίλει από περιοχή σε περιοχή και από έθνος σε έθνος. Παρόλο που η χρήση των GWAS επιτυγχάνει να αποκαλύψει τη συσχέτιση νοσημάτων με συγκεκριμένους γενετικούς τόπους, συνολικά οι ανιχνεύσιμοι SNPs μπορούν να εξηγήσουν ένα μικρό μόνο ποσοστό της κληρονομικότητας των νόσων. Η αύξηση του αριθμού των υπό μελέτη πληθυσμών σε συνδυασμό με την

διεξοδικότερη μελέτη σπάνιων αλληλομόρφων πιθανόν να οδηγήσει στην ανεύρεση των γενετικών τόπων που μπορούν να ερμηνεύσουν την κληρονομικότητα των πολυπαραγοντικών νοσημάτων.

7.2 SNP στην ΠΧΚ

7.2.1 HLA SNPs

Ένας σημαντικός αριθμός μελετών συσχέτισης έχει διενεργηθεί σε ανοσορυθμιστικά γονίδια τα οποία ανήκουν στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MCH). Ήδη από τις αρχικές μελέτες διαφάνηκε η σημαντική συσχέτιση της ΠΧΚ με το MHC⁴⁰⁶. Με αυξημένη συχνότητα βρέθηκαν οι πολυμορφισμοί των γονιδίων HLAB8, DR3, DQA1*0501, και DQB1*0201, μαζί στον ίδιο απλότυπο σε 23 Δανούς ασθενείς με ΠΧΚ σε σύγκριση με υγιή άτομα, όχι όμως και ο πολυμορφισμός στο HLA-DRw8⁴⁰⁷. Μέχρι τότε αναλύσεις σε Αμερική⁴⁰⁸ και Γερμανία⁴⁰⁹ ανέφεραν στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ΠΧΚ και του DRw8.

Η συχνότερα αναφερόμενη συσχέτιση της ΠΧΚ με το MCH τάξεως II αφορά το HLA DR8. Το HLA-DR8 είναι ένας HLA-DR ορότυπος ο οποίος αναγνωρίζει τους DRB1*0801 έως *0807, και *0810 έως *0812 γενετικούς τύπους. Ειδικότερα, ο DRB1*0801 έχει βρεθεί σημαντικά συχνότερα στη Βορειοανατολική Αγγλία (Newcastle upon Tyne)⁴¹⁰, σε πολυκεντρική μελέτη με Άγγλους και Ιταλούς ασθενείς¹⁶⁶, σε πολυκεντρική μελέτη από Κεντρική, Βόρεια και Νότια Ιταλία ανεξάρτητα από τη γεωγραφική τους καταγωγή¹⁶⁵, σε μελέτες από τη Βόρεια Αμερική^{411,412} (Seattle και British Columbia Vancouver Canada).

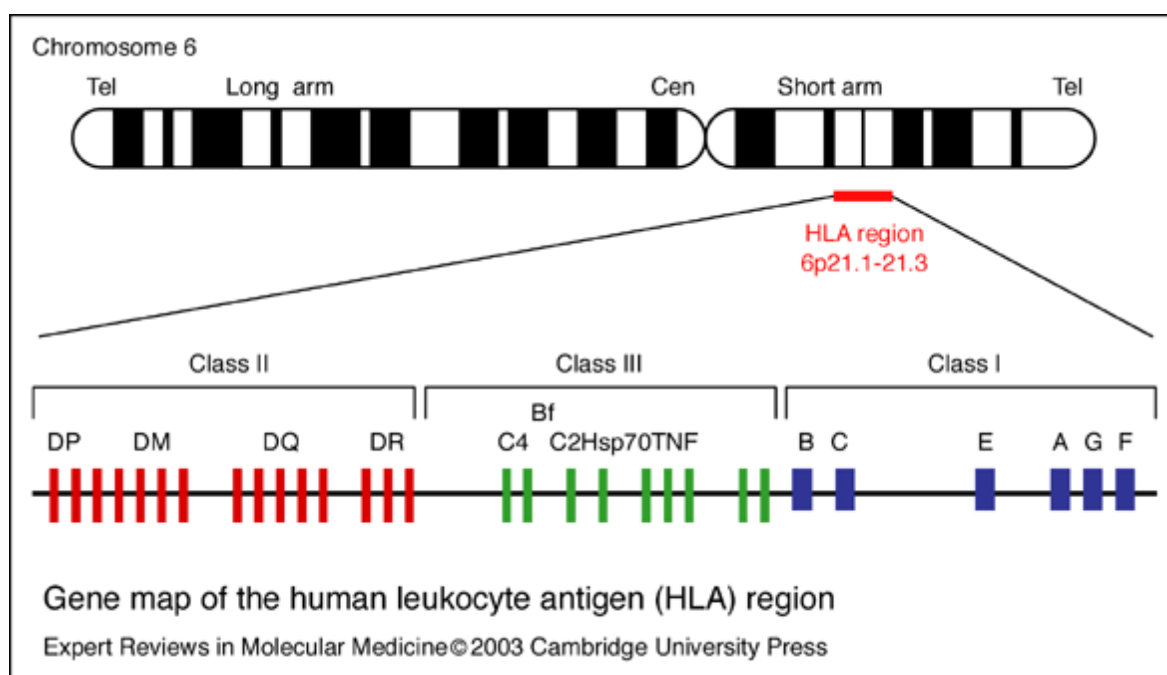
Σε αντίθεση με τις παραπάνω αναφορές, Ιταλική μελέτη από τους Invernizzi και συνεργάτες⁴¹³ δεν βρήκε καμία συσχέτιση με DRB1*08, ενώ η νόσος ανεξάρτητα από το στάδιο ή την παρουσία AMA+, συσχετίστηκε σημαντικά με τα αλληλόμορφα των B*15 B*41 B*55 B*58. Στην ίδια μελέτη το HLA-DRB1*11 βρέθηκε να συνδέεται με σημαντικά μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης νόσου.

Ομοίως καμία συσχέτιση της νόσου με το DRB1*08 δεν έχει βρεθεί έως και σήμερα σε Κινέζους^{414,415}, σε Μεξικάνους^{416,417}, και σε Βραζιλιάνους⁴¹⁸.

Μελέτες σε άλλους γενετικούς τύπους του MHC τύπου II αναφέρουν θετική συσχέτιση με τη νόσο του DRB1*0803 σε Ιάπωνες⁴¹⁹, του HLA DRB1*0701 και DRB1*03 σε Κινέζους⁴¹⁵, ενώ προστατευτικό ρόλο στη νόσο, φαίνεται να έχουν τα DRB1*11 σε Ιταλούς, σε Ιάπωνες, DR B1*12 σε Κινέζους και τα DRB1*13 σε Ιταλούς και Βρετανούς¹⁶⁶.

Επιπλέον, παρατηρείται διαφοροποίηση στην έκφραση των HLA γονιδίων ανάμεσα σε AMA θετικούς και AMA αρνητικούς ασθενείς⁴¹¹.

Υψηλότερη συχνότητα των HLA-DRB1*08 και DQB1*04 βρέθηκαν σε AMA θετικούς ασθενείς. Πιο πρόσφατη μελέτη σε Ιάπωνες ασθενείς έδειξε ότι τα HLA-DRB1*0405 and *0803 αλληλία προδιαθέτουν τους ασθενείς σε παραγωγή anti-grp210 και ACA αντισωμάτων, αντίστοιχα, ενώ τα HLA-DRB1*1502 και *0901 συσχετίζονται με πιο ήπια μορφή νόσου⁴²⁰.



Εικόνα 11. Γονιδιακός χάρτης της HLA περιοχής

Ο ρόλος των απλοτύπων στην ανίχνευση των πολυμορφικών γενετικών τύπων στο χρωμόσωμα 6 που εδράζεται το HLA πιθανόν να μπορεί να δώσει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο κληρονόμησης των πολυπαραγοντικών νοσημάτων όπως η ΠΧΚ. Οι ερευνητές έχουν ήδη συσχετίσει ορισμένους απλότυπους με κίνδυνο ανάπτυξης νόσου και άλλους με προστασία από αυτήν. Έτσι

ο απλότυπος DRB1*0801-DQA1*0401-DQB1*04 βρέθηκε ότι συσχετίζεται με ευπάθεια στην ΠΧΚ σε Αμερικάνους^{412,421}, σε ασθενείς Βορειοευρωπαϊκής καταγωγής με τελικού σταδίου ΠΧΚ³⁵⁸, και σε Ιταλούς ασθενείς¹⁶⁸, ενώ ο απλότυπος DRB1*08, *11, *13 ήταν σημαντικά υψηλότερος σε ασθενείς από πολυκεντρική μελέτη στην Ιταλία¹⁶⁵, και οι απλότυποι DRB1*08:03-DQB1*06:01 και DRB1*04:05-DQB1*04:01 στην Ιαπωνία⁴²². Περιγράφηκε επίσης η ύπαρξη του ίδιου ΜHC απλότυπου HLA-A1, -B8, -DR3, -C4AQ0B1 σε μητέρα και κόρη με ΠΧΚ, καθώς και σε μία άλλη οικογένεια οι 2 αδερφές με ΠΧΚ είχαν τον ίδιο απλότυπο HLA-A24, -B8, -DRw8, -C4A4B2⁴⁰⁹.

Σε ανισορροπία σύνδεσης βρέθηκαν το HLA DR8 και το C4B2 σε μελέτη από το Ηνωμένο Βασίλειο⁴²³.

Ως προστατευτικοί για τη νόσο χαρακτηρίστηκαν άλλοι απλότυποι όπως οι DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 και DRB1*1302-DQA1*0102-DQB1*0604 σε Αμερικάνους⁴²¹ και οι απλότυποι DRB1*13:02-DQB1*06:04 και DRB1*11:01-DQB1*03:01 σε Ιάπωνες ασθενείς με ΠΧΚ⁴²².

Από την ανάλυση μικροδορυφορικών δεικτών σε Ιάπωνες ασθενείς με ΠΧΚ προέκυψε σημαντικά αυξημένη συχνότητα των DQ.CAR (βρίσκεται ανάμεσα σε DQA1 και DQB1), D6S273 (στην περιοχή του ΜHC τάξης III) και C1-2-A⁴²⁴.

Σε μικρή μελέτη 32 Καυκάσιων ασθενών από τη Γερμανία⁴²⁵ συσχέτισαν το HLA DPB1*0301 αλληλίο. Καμία συσχέτιση με το HLA DR και DQ με την εμφάνιση ΠΧΚ δε βρέθηκε σε αναφορά μικρού αριθμού ασθενών από τη Βραζιλία⁴¹⁸.

Περιορισμένες είναι οι αναφορές στην επίδραση των πολυμορφισμών στο HLA τάξης I και ως τώρα δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση σε ασθενείς από τη Γερμανία⁴⁰⁹, το Ηνωμένο Βασίλειο⁴⁰⁶, την Κίνα⁴¹⁵, ενώ σημαντικά αυξημένη ήταν η συχνότητα των C4AQ0 αλληλίων τάξεως III σε πληθυσμό από τη Γερμανία.

Όπως, λοιπόν, φαίνεται και από τα αποτελέσματα του συνόλου των μελετών, λόγω γενετικής ετερογένειας, το είδος και ο αριθμός των γονιδίων που εμπλέκονται με την ΠΧΚ εξαρτάται από τον εκάστοτε πληθυσμό που μελετάται.

Η αρχική μελέτη γενετικής συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS) σε ασθενείς από Βόρειο Αμερική¹⁶⁷ αναγνώρισε 13 γενετικούς τόπους που εδράζονται στην HLA τάξεως II γενετική περιοχή και συσχετίζονται με προδιάθεση στη νόσο. Ισχυρότερη συσχέτιση βρέθηκε με το HLA-DQB1.

Σε μεταγενέστερη μελέτη GWAS έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων ασθενών Ιταλικής καταγωγής με αυτά που είχαν προκύψει από την αρχική μελέτη στη Βόρειο Αμερική. Υπήρχε σημαντική αλληλοεπικάλυψη των HLA SNPs που εμφάνισαν την ισχυρότερη συσχέτιση με τη νόσο, ανάμεσα στις 2 πληθυσμιακές ομάδες. Σε γενικές γραμμές, οι απλότυποι στην ομάδα των Ιταλών, οι σχετιζόμενοι τόσο με υψηλότερο, όσο και χαμηλότερο κίνδυνο για ΠΧΚ, αντιστοιχούσαν σε υψηλού και χαμηλού κινδύνου *HLA DRB1* αλληλία¹⁷⁰.

Επιβεβαίωση της συσχέτισης της ΠΧΚ με τη HLA γενετική περιοχή έγινε και στη μεγαλύτερη έως σήμερα GWAS, η οποία διενεργήθηκε σε 1840 ασθενείς Βρετανικής ή Ιρλανδικής καταγωγής¹⁷¹.

7.2.2 SNPs σε γενετικούς τόπους πλησίον HLA στην ΠΧΚ

Η πιθανή συμβολή άλλων γονιδίων που εδράζονται στο χρωμόσωμα 6 σε γονιδιακή θέση μεταξύ των γονιδιακών θέσεων Τάξης III και Τάξης II του MCH, όπως π.χ. τα γονίδια για τον TNF-α (tumor necrosis factor), TAP1 και TAP2⁴²⁶, έχει μελετηθεί, χωρίς όμως να προκύπτουν σημαντικά δεδομένα ανάμεσα στους πολυμορφισμούς αυτών των 2 τελευταίων γονιδίων και στην Π.Χ.Κ.

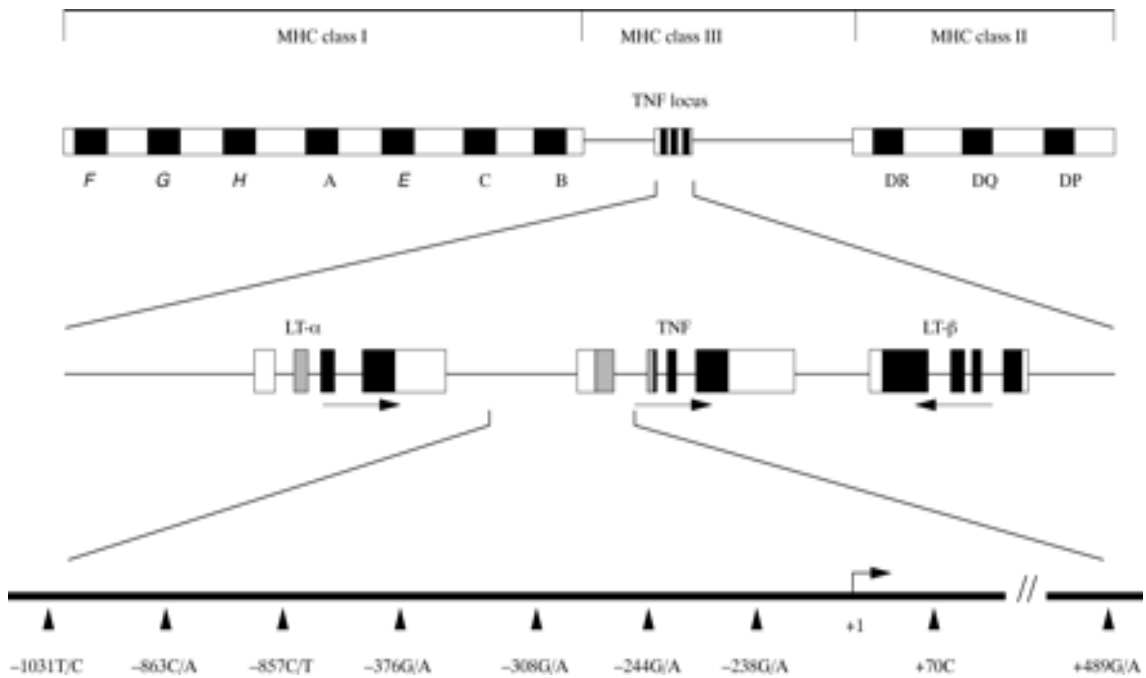
Αλληλόμορφα γονιδίων, όπως το γονίδιο που κωδικοποιεί τη μη χαρακτηριζόμενη πρωτεΐνη *C6orf10* και τη *BTNL2* (Butyrophilin-like protein 2) τα οποία βρίσκονται στο χρωμόσωμα 6p21.3 πλησίον των *HLA* τάξης II γονιδίων (*DQB1*, *DPB1*, *DRB1* και *DRA*), αλλά και απλότυποι των *C6orf10*, *BTNL2* και *HLA-DQB1* γονιδίων φαίνεται να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΠΧΚ, όπως επισημαίνουν οι ερευνητές Hirschfield και συνεργάτες στην πρώτη μεγάλη GWAS που διεξήχθη σε ασθενείς από τη Βόρειο Αμερική¹⁶⁷.

Το γονίδιο του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF, tumor necrosis factor) είναι στενά συνδεδεμένο με την περιοχή στην οποία εντοπίζονται τα γονίδια του MHC τάξης III.

Αποτελείται από τέσσερα εξόνια(exon) και τρία εσώνια(intron). Η συσχέτιση του αλληλομόρφου A του πολυμορφισμού του προαγωγέα του TNF-α στη θέση -308 με αυξημένη έκφραση του TNF οδήγησε σε περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του στην

ΠΧΚ. Καμία συσχέτιση των πολυμορφισμών του προαγωγέα του TNF-α στις θέσεις -238 και -308 με προδιάθεση στη νόσο δεν ανευρέθη σε μελέτη από το Ηνωμένο Βασίλειο⁴²⁷, την Κίνα⁴²⁸, τη Βραζιλία⁴¹⁸, σε ασθενείς από Βόρεια ή Νότια Ιταλία⁴²⁹, ενώ προστατευτικό ρόλο βρέθηκε να έχει το TNF-α-308*2 αλληλίο στη νόσο, σε μελέτη από το Σέφιλντ⁴³⁰. Αντίθετα με την προηγούμενη αναφορά σημαντική συσχέτιση του ετερόζυγου γονότυπου AG του προαγωγέα του TNF-α-308 με υψηλότερες τιμές Mayo Risk Score και συνεπώς προχωρημένα στάδια της ΠΧΚ, περιγράφηκε σε μελέτη από τις ΗΠΑ⁴³¹. Αντίθετα είναι και τα αποτελέσματα από πρόσφατη μελέτη από τους ερευνητές Juran και συνεργάτες, όπου το TNF-α-308*2 αλληλίο συσχετίστηκε οριακά με την ευπάθεια στη νόσο σε Βόρειους Αμερικάνους και ταυτόχρονα ο AA γονότυπος αυτού σε συνδυασμό με το γονότυπο AA του πολυμορφισμού rs231725 του CTLA4 γονιδίου ήταν σε σημαντικά υψηλότερη συχνότητα στους ασθενείς με ΠΧΚ⁴³².

Σημαντική συσχέτιση με την ευπάθεια στην ΠΧΚ έδειξε επίσης μελέτη ανισορροπίας σύνδεσης πολυμορφισμών σε μικροδορυφορικούς δείκτες του TNF και C1-2-A, σε μελέτη ασθενών από την Ιαπωνία⁴²⁴. Τρεις γενετικοί τόποι που συμπεριλαμβάνουν γονίδια τα οποία εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια του TNFα: 12p13 (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A, *TNFRSF1A*), 1q31 (encoding the DENN/MADD domain containing 1B protein, *DENND1B*), και 14q32 (tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2, *TNFAIP2*) εντοπίστηκαν ως παράγοντες κινδύνου για την ΠΧΚ, από τη μεγαλύτερη GWAS ανάλυση σε ασθενείς Βόρειο-Ευρωπαϊκής καταγωγής. Μετα-ανάλυση των αποτελεσμάτων GWAS από τη Βόρειο-Αμερική μαζί με άλλη ομάδα ασθενών από την Ιταλία^{169,170}, οδήγησε μεταξύ των άλλων και στο συσχετισμό του γονιδίου *DENND1B* με την προδιάθεση εκδήλωσης ΠΧΚ. Τα ευρήματα αυτά δίνουν το έναυσμα για περαιτέρω ανάλυση, μέσω λεπτομερούς χαρτογράφησης (finemapping), γονιδιακής έκφρασης (gene-expression) και λειτουργικών μελετών των γονιδίων.



Εικόνα 12. Η θέση του γονιδίου του TNF στο χρωμόσωμα 6.

(Verweij CL. *Ann Rheum Dis* 1999;58 Suppl 1:120-6.)

7.2.3 Κυτταροκίνες και ΠΧΚ

7.2.3.1 Ιντερλευκίνες

Η πλειοψηφία των ιντερλευκινών (ILs) συντίθεται από τα βοηθητικά CD4⁺ T λεμφοκύτταρα, καθώς επίσης και από τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Προάγουν την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των T, B και αιμοποιητικών κυττάρων .

Στην ΠΧΚ η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων διαμεσολαβούμενη από τη δράση παθογόνων στους υποδοχείς TLR (toll-like receptors) οδηγεί σε απελευθέρωση προ-

φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως IL-1, IL-6, IL-18, IL-12, και TNF-α. Οι τελευταίες μπορούν να ενισχύσουν την απάντηση του επίκτητου ανοσιακού μηχανισμού μέσω των Τ-λεμφοκυττάρων ενάντια στα παθογόνα⁴³³.

Σημαντικός είναι ο ρόλος των IL-1, IL-6 στην ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονής, ενώ η IL-10 ως αντι-φλεγμονώδης κυτταροκίνη προκαλεί ελάττωση της ανοσιακής απάντησης και αναστέλλει την ίνωση.

Η IL12 αποτελείται από 2 υπομονάδες, p35 (κωδικοποιείται από το γονίδιο IL12A) και p40 (κωδικοποιείται από το γονίδιο IL12B), και εκκρίνεται από τα APCs. Οι υπομονάδες αυτές συνδέονται με ειδικούς TCR υποδοχείς στην επιφάνεια των CD4+ Τ-κυττάρων, οδηγώντας στην ενεργοποίησή τους⁴³⁴.

Σε μελέτη ομάδας ασθενών Βόρειας Ευρωπαϊκής καταγωγής, διαμένοντες στο Newcastle οι γονότυποι *IL-1B*1,1* και *IL-1RN*1,1* βρέθηκαν ως παράγοντες κινδύνου για τη νόσο, ενώ προστατευτικό ρόλο βρέθηκαν να έχουν οι γονότυποι *IL-1B*1,2* και *IL-1RN*1,2*. Ο γονότυπος *IL-1B*1,1* συσχετίστηκε σημαντικά με τα αρχικά στάδια νόσου³⁵⁸. Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα σε μεταγενέστερη μελέτη σε ασθενείς από την Κίνα. Ο *IL-1RN*1,1* γονότυπος συσχετίστηκε σημαντικά με την ευπάθεια στη νόσο, σε αντίθεση με τον γονότυπο *IL-1RN*1,2* που συσχετίστηκε σημαντικά με προστασία από τη νόσο. Ένας άλλος πολυμορφισμός στη θέση -174 του προαγωγέα του γονιδίου της IL-6 και πιο συγκεκριμένα το ο γονότυπος IL-6-174GC βρέθηκε με σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα στην ομάδα των ασθενών σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου⁴³⁵.

Τα συμπεράσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε επόμενη μελέτη των ίδιων ερευνητών σε πληθυσμό ασθενών από την ανατολική Κίνα⁴³⁶.

Μελέτη τριών SNPs στην περιοχή του γονιδίου του προαγωγέα της IL-10 σε δύο εθνικά διαφορετικούς πληθυσμούς(ο ένας από την Ιταλία και ο άλλος από την Ιαπωνία) έδωσε διαφορετικά αποτελέσματα⁴³⁷. Ο γονότυπος GG στη θέση -1082 ήταν σημαντικά συχνότερος στην ομάδα των Ιταλών ασθενών σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου της ίδιας εθνικής προέλευσης. Επίσης, ο απλότυπος GCC (στις θέσεις -1082, -819 και -592, αντίστοιχα) ο οποίος συνδέεται με υψηλότερη παραγωγή IL-10, βρέθηκε με σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα στην ίδια ομάδα ασθενών.

Καμία συσχέτιση δεν βρέθηκε με τους SNPs της IL-10 και την ευπάθεια στην ΠΧΚ σε ασθενείς με καταγωγή από την Ιαπωνία, αλλά ούτε και σε άλλες μελέτες από την Κίνα^{434,436} και το Ηνωμένο Βασίλειο⁴³⁹.

Ανάλυση γενετικών πολυμορφισμών στη γονιδιακή περιοχή IL2/IL21 δεν έδειξε καμία συσχέτιση με την ΠΧΚ σε μελέτη ασθενών από τη Γερμανία⁴⁴⁰.

Στην πρώτη GWAS, η οποία διενεργήθηκε σε σύνολο 536 Καναδών και Αμερικανών ασθενών με ΠΧΚ¹⁶⁷, έγινε γονοτύπηση για > 300,000 SNPs και η νόσος συσχετίστηκε σημαντικά με τα SNPs rs6441286 και rs574808 της *IL12A* και το rs3790567 στο ιντρόνιο 9 της *IL12RB2*, καθώς και με έναν απλότυπο 5 αλληλομόρφων από το 3' άκρο του γονιδίου της *IL12A*. Μέτρια ισχυρή ήταν και η συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης νόσου με rs3024921 στο ιντρόνιο 3 του γονιδίου *STAT4* (signal transducer and activator of transcription 4). Τα ίδια αποτελέσματα αναπαράχθηκαν και από δύο άλλες μελέτες γενετικής συσχέτισης όλου του γονιδιώματος: α) σε 1,840 ασθενείς Βρετανικής ή Ιρλανδικής καταγωγής¹⁶⁹, καθώς και β) σε 453 ασθενείς Ιταλικής καταγωγής¹⁶⁹. Στην ομάδα των τελευταίων ακόμα και όταν προστέθηκαν και οι 481 ασθενείς από τον Καναδά, η συσχέτιση της νόσου με *IL12A* και *IL12RB2* παρέμεινε ισχυρή.

Αντίθετα, μια μελέτη σε 303 Ιάπωνες ασθενείς δεν βρήκε καμία συσχέτιση τόσο των πολυμορφισμών *IL12A* (rs574808, rs1075498), όσο και *IL12RB2* (rs3790567) με την ευπάθεια στην ΠΧΚ⁴⁴¹.

Έτσι λοιπόν, τα δεδομένα που υπάρχουν σχετικά με το ρόλο της IL12 στην ΠΧΚ είναι αρκετά ισχυρά. Αυτό που μένει είναι να καθοριστούν επακριβώς οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που οδηγούν στην αυτοανοσία στην ΠΧΚ και σχετίζονται με τους προαναφερθέντες γενετικούς τόπους.

7.2.3.2 CTLA4 και ΠΧΚ

Η πρωτεΐνη 4 σχετιζόμενη με τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα (cytotoxic t-lymphocyte associated 4, CTLA4) ανήκει στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών και βρίσκεται στην επιφάνεια των Τ-βοηθητικών λεμφοκυττάρων. Το γονίδιο της CTLA4 βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 2.

Μετά το αρχικό σήμα ενεργοποίησης των Τ-λεμφοκυττάρων που δημιουργείται από την αλληλεπίδραση, MHC-II-Ag στην επιφάνεια του αντιγόνοπαρουσιαστικού

κυττάρου (antigen-presenting cells, APC) με τον T-κυτταρικό υποδοχέα (T-cell receptor, TCR) σε σύνδεση με τον CD3, ακολουθεί το μη ειδικό συνδιεγερτικό σήμα. Αυτό δημιουργείται είτε μέσω σύζευξης του CD28 με τον συνδιεγέρτη B7-2, οπότε μεταφέρει ένα θετικό σήμα και οδηγεί σε ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, είτε με σύζευξη της πρωτεΐνης CTLA 4 στην επιφάνεια των T-κυττάρων με τον συνδιεγέρτη B7-1 των APC, οπότε μεταφέρει ανασταλτικό σήμα και οδηγεί στην καταστολή των T-λεμφοκυττάρων. Επίσης έχει βρεθεί ότι ορισμένες υποομάδες T ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs) εκφράζουν την CTLA-4^{442, 443}.

SNPs στην CTLA-4 μπορεί να επηρεάζουν την έκφραση ή τη λειτουργία της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα την ενίσχυση των μηχανισμών αυτοανοσίας, λόγω έλλειψης ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων ή ανοσορύθμισης από τα Tregs⁴⁴⁴.

Γενετικοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο της CTLA4, συνηθέστερα 49AG (rs231775) και/ή CT60 (rs3087243), έχουν συσχετιστεί με ένα σημαντικό αριθμό αυτοάνοσων νοσημάτων⁴⁴⁵ όπως η νόσος Graves⁴⁴⁶, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I⁴⁴⁷, ο ΣΕΛ⁴⁴⁸ και ασθενέστερα με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα⁴⁴⁹, την αυτοάνοση θυρεοειδική νόσο, τη συστηματική σκλήρυνση⁴⁵⁰ και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα⁴⁵¹.

Ο CTLA4 49AG SNP βρίσκεται στην κωδικοποιούσα περιοχή του σηματοδοτικού πεπτιδίου και χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση ενός αμινοξέος, θρεονίνης(A αλληλόμορφο) από αλανίνη(G αλληλόμορφο), η οποία οδηγεί σε ελάττωση της έκφρασης του πεπτιδικού μορίου του CTLA 4 στην επιφάνεια των T-λεμφοκυττάρων^{452, 453}.

Έτσι, το G αλληλόμορφο θεωρείται ως παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση αυτοανοσίας, καθώς επάγεται ο πολλαπλασιασμός των T-κυττάρων, σε απάντηση της ανοσολογικής διέγερσης.

Ο CT60 SNP βρίσκεται στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου CTLA 4 και το A αλληλίο φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο από την αυτοανοσία⁴⁵⁴, ενώ το G αυξάνει τον κίνδυνο για αυτοανοσία καθώς οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή της διαλυτής μορφής της πρωτεΐνης CTLA4, έχοντας ως αποτέλεσμα σε πειραματικά μοντέλα την αναστολή της διέγερσης των T-λεμφοκυττάρων⁴⁵⁵.

Ήδη από τις αρχικές μελέτες, διαφάνηκε σημαντικά αυξημένη συχνότητα του G αλληλίου του πολυμορφισμού 49AG στους ασθενείς με ΠΧΚ στο Ηνωμένο Βασίλειο⁴⁵⁶, στην Κίνα⁴⁵⁷ και στη Γαλλία⁴⁵⁸.

Τα παραπάνω όμως αποτελέσματα δεν αναπαράχθηκαν και σε άλλες μελέτες από τις ΗΠΑ, τη Βραζιλία και την Ιαπωνία. Αντίθετα, προστατευτικό ρόλο στην εμφάνιση ΠΧΚ βρέθηκε να έχει ο απλότυπος CTLA4 49AG:CT60. σε μεγάλη αμερικανική μελέτη⁴⁵⁹, καμία συσχέτιση με τη νόσο σε μικρό αριθμό ασθενών από τη Βραζιλία⁴¹⁸, ή την Ιαπωνία⁴⁶⁰. Εξάλλου σε μεταγενέστερη μελέτη των ερευνητών από την Αγγλία σε 6 CTLA4 SNPs, και σε 2 διαφορετικούς γενετικά πληθυσμούς(Αγγλία-Ιταλία), δεν επιβεβαιώθηκε η αρχική συσχέτιση της νόσου με το CTLA4 49AG σε κανένα από τους 2 πληθυσμούς ασθενών, δημιουργώντας εκ νέου ερωτήματα⁴⁶¹. Σημαντικό είναι και το εύρημα μελετών που συνδέουν πολυμορφισμούς της CTLA4 με την παρουσία θετικών AMA στον ορό των ασθενών. Έτσι μελέτη από την Ιταλική ομάδα των Oertelt και συνεργατών βρήκε συσχέτιση του αλληλομόρφου G του CTLA4 CT60 με την παρουσία AMA στον ορό των ασθενών⁴⁶² και αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα από μελέτη των ΗΠΑ, με σημαντικά αυξημένη συχνότητα του γονότυπου GG του CTLA4 AG με την παρουσία AMA⁴⁵⁹.

Σημαντική συσχέτιση με την ευπάθεια στην ΠΧΚ αναφέρθηκε σε μεταγενέστερη μελέτη από τις ΗΠΑ⁴⁶³ με το γονότυπο AA του rs231725 στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου CTLA4, ο οποίος δεν είχε μελετηθεί έως τότε. Σε ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης βρέθηκαν τα αλληλία A rs231725, G CT60 και G 49AG στον απλότυπο 2 CCCGCGGA, στην ίδια μελέτη.

Μελέτη 21 πολυμορφισμών των γονιδίων ICOS/CTLA4 από μελέτη στον Καναδά⁴⁶⁴, οδήγησε στον εντοπισμό 5 SNPs -318CT, 49AG, rs231779 [1822C/T], CT60, και rs11571297 [JO27_1]) με σημαντική συσχέτιση με την ΠΧΚ, αντίστοιχα. Προστασία από τη νόσο βρέθηκε να έχει ο απλότυπος ACC, ενώ παράγοντας κινδύνου για τη νόσο ήταν ο απλότυπος GTT. Σε ακόμα πιο πρόσφατη μελέτη σε πληθυσμό ασθενών από την Ιαπωνία⁴⁶⁵ τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική συσχέτιση του απλότυπου CGGA των CTLA4 -318CT, 49AG, CT60, and rs231725, τόσο με τους AMA θετικούς ασθενείς, όσο και με το σύνολο των ασθενών. Όμως κανένας γονότυπος, ξεχωριστά, δεν ήταν σημαντικά συχνότερος στην ομάδα των ασθενών. Η ίδια ερευνητική ομάδα, πάλι σε ασθενείς από την Ιαπωνία⁴⁶⁶ κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι πολυμορφισμοί CTLA4 49 AG, CT60 και rs231725 συσχετίζονται με την ευπάθεια στην ΠΧΚ, ενώ ο τελευταίος και με την εξέλιξη σε τελικού σταδίου νόσο. Ως παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση ΠΧΚ, αλλά προστατευτικός για την πρόοδο της νόσου βρέθηκε ο απλότυπος GCGA (49AG , rs231777 , CT60,

rs231725). Σημαντική βρέθηκε και η συσχέτιση του απλότυπου ATGG με την παρουσία anti-grp210 αντισωμάτων στον ορό των ασθενών.

Τα συμπεράσματα 2 μετα-αναλύσεων^{467,468} επιβεβαιώνουν τις αρχικές παρατηρήσεις για τη σημαντική συσχέτιση του G αλληλίου του CTLA4 49AG στην ευπάθεια στη νόσο, αλλά κυρίως στους ασθενείς Ασιατικής καταγωγής. Επίσης συνολικά, οι AMA θετικοί ασθενείς, οι οποίοι φέρουν το G αλληλόμορφο, εμφανίζουν σημαντικά μεγαλύτερη προδιάθεση για εμφάνιση της ΠΧΚ συγκριτικά με τους AMA αρνητικούς.

Μέτρια ισχυρή συσχέτιση της ΠΧΚ με τον πολυμορφισμό *CTLA4* rs6748358 βρέθηκε στην πλήρη γονιδιωματική ανάλυση συσχέτισης που διεξήχθη σε σύνολο 536 ασθενών με ΠΧΚ από Καναδά και ΗΠΑ¹⁶⁷.

Παρατηρείται λοιπόν, γενετική ετερογένεια στους πληθυσμούς διαφορετικών φυλών και εθνικοτήτων. Μεγαλύτερες μελέτες με ασθενείς διαφόρων εθνικοτήτων, κατηγοριοποιημένων σε κλινικά στάδια και βάσει ειδικών ορολογικών δεικτών, είναι απαραίτητες προκειμένου να επικυρώσουν τα παραπάνω συμπεράσματα ή να δώσουν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς αυτοανοσίας.

7.2.4 Άλλα γονίδια και ο πιθανός ρόλος τους στην ΠΧΚ

Στην προσπάθεια να ανακαλυφθούν οι γενετικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην εμφάνιση της ΠΧΚ, έχει μελετηθεί μεγάλος αριθμός γενετικών πολυμορφισμών που εμπλέκονται στην ανοσορύθμιση και σχετίζονται με το σύστημα της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας.

Οι χημειοκίνες και οι υποδοχείς τους συνιστούν σημαντικούς διαμεσολαβητές και καθοριστές της διακίνησης των λευκοκυττάρων στις φλεγμονώδεις διεργασίες, παίζοντας σπουδαίο ρόλο στους μηχανισμούς της αυτοανοσίας. Δικεντρική μελέτη από Padua της Ιταλίας και Newcastle της Αγγλίας, ανέφερε σημαντικά αυξημένο τον γονότυπο CCR5Delta32 (του γονιδίου CC του υποδοχέα της χημειοκίνης 5, CC chemokine receptor 5) στην ομάδα των ασθενών με ΠΧΚ συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου⁴⁶⁹.

Αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης νόσου έχει αποδοθεί στον BsmI πολυμορφισμό του γονιδίου VDR σε Ιάπωνες, Ιταλούς⁴⁷⁰, Γερμανούς⁴⁷¹ και Κινέζους ασθενείς⁴⁷², στον απλότυπο HYP A από 4 πολυμορφικές περιοχές, οι δύο (H/L και X/Y) στον προαγωγέα και οι άλλες δύο (P/Q και A/B) στο εξόνιο 1, του γονιδίου MBL(mannose- binding leptin) σε Ιάπωνες ασθενείς⁴⁷³, στον Pvu II πολυμορφισμό του γονιδίου του οιστρογονικού υποδοχέα τύπου α (estrogen receptor alpha, ERα) και συγκεκριμένα στον ετερόζυγο γονότυπο Pp⁴⁷⁴, και σε ένα λειτουργικό πολυμορφισμό του γονιδίου Fc receptor-like 3 (FCRL3) αλλά μόνο σε Ιάπωνες ασθενείς⁴⁷⁵, ο οποίος έχει συσχετιστεί και με την ευπάθεια σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα.

Προστατευτικός για την ΠΧΚ βρέθηκε να είναι ο ρόλος του pp γονότυπου του ERα σε μελέτη ασθενών από την Κίνα⁴⁷⁴ και του "s" αλληλομόρφου του γενετικού πολυμορφισμού του κολλαγόνου τύπου I α1 (collagen type I alpha 1, COLIA1)⁴⁶⁶, ο οποίος δεν συνδέθηκε με χαμηλή οστική πυκνότητα σε μελέτη 70 θήλεων ασθενών από την Ουγγαρία, σε αντίθεση με τις έως τότε αναφορές.

Σημαντική συσχέτιση με υψηλό κίνδυνο εξέλιξης της νόσου σε κίρρωτικό στάδιο και ηπατική ανεπάρκεια έχει δειχθεί σε τρία SNPs(rs31658, rs31672, και rs1149222) του γονιδίου MDR3/ABCB4 (multidrug resistance protein), στον απλότυπο Har 2, καθώς και στον ομόζυγο διπλότυπο αυτού, Har 2/Har 2 σε Ιάπωνες ασθενείς¹⁷¹, στον πολυμορφισμό του γονιδίου του υποδοχέα ενδοκανναβινοειδών CB1, όπου συσχετίστηκε και με αστοχία στη θεραπεία με ουρσοδεοξυχολικό οξύ, τόσο σε ασθενείς από την Ιταλία, όσο και άλλους διαμένοντες στην Αμερική⁴⁷⁷, στο E4 αλληλόμορφο του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης E (apo-E) σε ασθενείς από τη Γαλλία⁴⁷⁸,σε τρία SNPs rs3911238, rs10174098 και rs1448427 του γονιδίου της αV υπομονάδας της ιντεγκρίνης (integrin αV subunit gene, ITGAV)-η οποία διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη διαδικασία της ίνωσης- σε ασθενείς από την Ιαπωνία⁴⁷⁹. Στην τελευταία μελέτη μόνο ο rs1448427 συσχετίστηκε σημαντικά με τελικού σταδίου νόσο όταν επανελέγχθηκε σε ομάδα ασθενών που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση ήπατος λόγω ηπατικής ανεπάρκειας.

7.3 GWAS και άλλοι γενετικοί τόποι σχετιζόμενοι με την ΠΧΚ

Σημαντικές πληροφορίες έχουν προκύψει και από αναλύσεις GWAS τόσο σε Ευρωπαϊκό, όσο και σε Αμερικάνικο ή Ιαπωνικό πληθυσμό ασθενών με ΠΧΚ και ομάδες υγιών εθελοντών.

Πέρα από το ρόλο των πολυμορφισμών στα γονίδια *HLA*, *IL12A* και *IL12RB2* στην ευπάθεια στην ΠΧΚ, και άλλα γονίδια φαίνεται να εμφανίζουν σημαντική συσχέτιση με τη νόσο όπως αναφέρουν οι πιο πρόσφατες GWAS μελέτες. Σύμφωνα με αυτές SNPs και απλότυποι, στους γενετικούς τόπους που εδράζονται τα γονίδια όπως αυτό που κωδικοποιεί τον ρυθμιστικό παράγοντα 5 της ιντερφερόνης και την τρανσπορτίνη 3 (*IRF5-TNPO3*, interferon regulatory factor 5 and transportin 3), στη χρωμοσωμική θέση 17q12-21 (με τα γονίδια *IKZF3*: IKAROS family zinc finger 3 protein, *ZBP2*: zona pellucida-binding protein 2, *GSDMB*: gasdermin-B, και *ORMDL*: ORM1-like protein 3) και στο γονίδιο *MMEL1* στο χρωμόσωμα 1p36 (membrane metalloendopeptidase-like 1) έχουν σημαντική συσχέτιση με την ΠΧΚ.

Οι πολυμορφισμοί στο γενετικό τόπο *IRF5-TNPO3* έχουν βρεθεί με αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με ΣΕΛ^{480, 481}, με Συστηματική Σκλήρυνση⁴⁸² και σύνδρομο Sjogren⁴⁸³ και πρόσφατα σε ασθενείς με ΠΧΚ Βόρειο-Ευρωπαϊκής⁴⁸⁴, Ιταλικής¹⁶⁹ και Βόρειο-Αμερικανικής καταγωγής¹⁶⁷. Οι πολυμορφισμοί στη χρωμοσωμική περιοχή 17q12-21 συνδέονται ισχυρά με νόσο Crohn⁴⁸⁵, σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1⁴⁸⁶ και με ΠΧΚ σε ασθενείς Βορειο-Ευρωπαϊκής⁴⁸⁴ και Ιαπωνικής καταγωγής⁴⁴¹ και τέλος SNPs στο γονίδιο *MMEL1*, συσχετίζονται σημαντικά με ΡΑ⁴⁸⁷, κοιλιοκάκη⁴⁸⁸ και ΠΧΚ⁴⁸⁴ σε ασθενείς Ευρωπαϊκής καταγωγής.

Με τη χρήση 400 μικροδορυφορικών δεικτών ελέγχθηκε το γονιδίωμα 126 ασθενών Ιαπωνικής καταγωγής για γενετικούς τόπους που πιθανόν εμπλέκονται στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της νόσου.

Τέσσερις μικροδορυφορικές περιοχές βρέθηκαν να σχετίζονται θετικά με την ευπάθεια στην ΠΧΚ (*D1S207*, *D12S86*, *D16S423* και *D21S1256*), ενώ επτά άλλες βρέθηκαν ως προστατευτικοί παράγοντες (*D1S2726*, *D3S1300*, *D5S426*, *D10S249*, *D14S275*, *D20S186*, *DXS1060*). Επειδή ο *D16S423* στο χρωμόσωμα 16p13.3 είχε την ισχυρότερη συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης ΠΧΚ, ακολούθησε περαιτέρω SNP ανάλυση του γονιδίου της *A2BP1* (ataxin 2-binding protein 1), το οποίο βρίσκεται 27 kb από το μικροδορυφόρο *D16S423*. Από τα επτά SNPs (rs17139207, rs12926282,

rs17139244, rs6500742, rs4146812, rs4124065 και rs889699) του γονιδίου *A2BP1* που μελετήθηκαν, μόνο το αλληλόμορφο C του rs6500742 συσχετίστηκε σημαντικά με την ΠΧΚ. Πρόκειται για την μοναδική αναφορά στο γονίδιο *A2BP1* και τον πιθανό ρόλο του στην παθογένεια της νόσου¹⁷². Το βασικό μειονέκτημα αυτής της μελέτης είναι βέβαια ο περιορισμένος αριθμός ασθενών και ομάδας ελέγχου, αλλά και ο μικρός αριθμός των μικροδορυφορικών δεικτών που ελέγχθησαν.

Παρόλο που οι μελέτες GWAS είναι επαρκείς στην ανίχνευση νέων γονιδίων που καθορίζουν την ευπάθεια στη νόσο, η ανεύρεση γονιδίων που ενέχονται στη σοβαρότητα ή τις επιπλοκές της νόσου είναι περισσότερο πολύπλοκη. Η πολυπλοκότητα αυτή έγκειται σε αρκετές περιπτώσεις στον μη καλό σχεδιασμό των μελετών ή σε εθνικές ή/και φυλετικές ιδιαιτερότητες του εκάστοτε πληθυσμού.

Βλέπουμε λοιπόν ότι βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων, πιθανώς, περισσότεροι του ενός γενετικοί καθοριστές να ερμηνεύουν την προδιάθεση στη νόσο, ώστε τελικά η επίδραση εξωγενών-περιβαλλοντικών παραγόντων να οδηγεί στην εκδήλωση της Π.Χ.Κ. Χρειάζεται όμως να διεξαχθούν αρκετές μελέτες, τόσο σε ασθενείς, όσο και σε συγγενείς αυτών, ώστε να καθοριστούν οι γενετικές θέσεις που πιθανώς δίνουν το κλειδί στην παθογένεια και την κληρονομικότητα της νόσου.

7.4 Ο ρόλος γονιδίων που σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθελίου

7.4.1 Ενδοθηλιακή συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου

Περιορισμένα είναι τα ήδη υπάρχοντα δεδομένα αναφορικά με την κλινική σημασία διαταραχών σε γονίδια τα οποία ρυθμίζουν τη σωστή λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων του ήπατος.

Σημαντικός φαίνεται να είναι ο ρυθμιστικός ρόλος αγγειοδραστικών παραγόντων όπως το NO(μονοξείδιο του αζώτου), οι ενδοθηλίνες και το μονοξείδιο του άνθρακα στους μηχανισμούς πρόκλησης ηπατικής βλάβης, κίρρωσης και ίνωσης του ήπατος.

Το NO, είναι ένας βραχύβιος βιοενεργός διαμεσολαβητής, ο οποίος παράγεται από την L-αργινίνη μέσω της ομώνυμης συνθάσης (NOS, Nitric Oxide Synthase). Λειτουργικά το μόριο αυτό συμβάλλει στους μηχανισμούς νευρομεταβίβασης, παρεμβαίνει στη δημιουργία θρόμβου, στη ρύθμιση της αγγειοδραστικότητας και συμμετέχει σε μη ειδικές ανοσολογικές αντιδράσεις. Και οι τρεις ισομορφές της NOS έχουν βρεθεί στο ανθρώπινο ήπαρ. Εξ αυτών η επαγόμενη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (inducible NOS, iNOS, NOS-2) και η ενδοθηλιακή συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS, NOS-3) είναι πιο σημαντικές.

Ερευνητές υποστηρίζουν ότι η αυξημένη παραγωγή NO στη σπλαχνική και συστηματική κυκλοφορία των κίρρωτικών ασθενών οδηγεί σε αγγειοδιαστολή και συνεπώς υπερδυναμική κυκλοφορία⁴⁸⁹⁻⁴⁹⁰. Από την άλλη μεριά τα επίπεδα NO στην ενδοηπατική μικροκυκλοφορία είναι μειωμένα και συνεπάγονται αυξημένη ενδοηπατική αγγειακή αντίσταση, ευνοώντας την ανάπτυξη ιστικής βλάβης και πρόωμης έναρξης πυλαίας υπέρτασης^{491,492}.

Πειραματικά μοντέλα ηπατικής φλεγμονής, έχουν δείξει ότι η ενζυματική ενεργότητα της ενδοθηλιακής ισομορφής της NOS μπορεί να διαταραχθεί τόσο ποιοτικά, όσο και ποσοτικά, με συνέπεια την αύξηση της αντίστασης των κολποειδών του ήπατος^{493,494}. Υψηλά έχουν βρεθεί τα συνολικά επίπεδα κυκλοφορούντων μορίων NO σε ασθενείς με προχωρημένα στάδια ΠΧΚ⁴⁹⁵, χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί ο βαθμός έκφρασης και η δραστηριότητα των eNOS και iNOS στην νόσο αυτή.

Μελέτη έδειξε ότι στο ήπαρ ασθενών με προχωρημένο στάδιο ΠΧΚ, οι ανιχνεύσιμοι τίτλοι eNOS, με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων, ήταν μεγαλύτεροι σε σύγκριση με αυτούς ασθενών με αρχικού σταδίου νόσο ή με κίρρωση άλλης αιτιολογίας⁴⁹⁶.

Ερευνητές από το εργαστήριό μας στηριζόμενοι στην υπόθεση ότι η βλάβη στην ΠΧΚ οφείλεται καταρχάς σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, έδειξαν ότι το NO ήταν σημαντικά αυξημένο στον ορό των ασθενών με ΠΧΚ, ανεξαρτήτως σταδίου νόσου, σε σύγκριση με ομάδα υγιών εθελοντών. Επιπρόσθετα, μετά 6μηνη θεραπεία με UDCA αυξήθηκε σημαντικά το NO στους ασθενείς αρχικού σταδίου ΠΧΚ. Η αύξηση αυτή μπορεί να οδηγήσει εν συνεχεία σε περιορισμό της αγγειοσύσπασης στα κολποειδή του ήπατος⁴⁹⁷. Οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν ότι η ολική αντιοξειδωτική

ικανότητα του ορού σε ασθενείς με ΠΧΚ είναι αυξημένη¹⁸⁸, όχι όμως σε επίπεδα ικανά να αντισταθμίσουν την αυξημένη παραγωγή των ελεύθερων ριζών. Αν και η ερευνητική δραστηριότητα στην ανίχνευση γενετικών τόπων με πιθανή παθογενετική συσχέτιση με την ΠΧΚ είναι ιδιαίτερα εκτεταμένη, μία μόνο αναφορά συνολικά υπάρχει για τον ρόλο γενετικών πολυμορφισμών στο γονίδιο της eNOS από τους Selmi και συνεργάτες⁴⁹⁸. Πρόκειται για μελέτη των πολυμορφισμών eNOS 894G/T(αντικατάσταση της γουανίνης από θυμίνη στο κωδικόνιο 894 του εξονίου 7 του γονιδίου της eNOS, αλλαγή από GAG σε GAT, η οποία οδηγεί σε αντικατάσταση Glu σε Asp στη θέση 298 της πρωτεΐνης) και -786T/C (ένας λειτουργικός πολυμορφισμός στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή) σε 109 ασθενείς από την Ιταλία, από τους Selmi και συνεργάτες. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων και των γονοτύπων των δύο eNOS SNPs δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ ασθενών και υγιών εθελοντών. Οι γονότυποι 894TT και -786TT συσχετίστηκαν σημαντικά με προχωρημένα στάδια και τη σοβαρότητα της νόσου, όχι όμως και με την εύπαθεια στην ΠΧΚ.

Ένας άλλος πολυμορφισμός του γονιδίου eNOS στο ιντρόνιο 4 a/b, ο οποίος βασίζεται σε επαναλήψη μιας αλληλουχίας 27 ζευγών βάσεων έχει μελετηθεί διεξοδικότερα και φαίνεται να έχει συσχετιστεί με μεγάλο αριθμό παθήσεων αυτοάνοσων και μη. Το αλληλίο που αποτελείται από 4 επαναλήψεις της αλληλουχίας των 27 ζευγών βάσεων είναι το a(allele a), με 5 επαναλήψεις είναι το αλληλίο b και με 6 επαναλήψεις το αλληλίο c. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τα επίπεδα NO στον ορό. Η ανίχνευση του eNOS intron 4 πολυμορφισμού έχει αποκαλύψει σημαντική συσχέτιση του αλληλομόρφου a με στεφανιαία νόσο, διαταραχές των λιπιδίων, ιδιοπαθείς καθέξιν αποβολές, προχωρημένη διαβητική νεφροπάθεια, τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια σε μη διαβητικούς ασθενείς και οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου σε ορισμένες πληθυσμιακές ομάδες⁴⁹⁹. Αναφορικά με το ρόλο του εν λόγω πολυμορφισμού στην αυτοανοσία η έρευνα επικεντρώνεται κυρίως στον ΣΕΛ και τη ΡΑ. Έτσι ο γονότυπος a/b του γονιδίου eNOS στο ιντρόνιο 4 έχει συσχετιστεί σημαντικά με την ανάπτυξη νεφρίτιδας του λύκου σε μελέτη ασθενών με ΣΕΛ από την Κορέα⁵⁰⁰, και σε γενετικά ομοιογενή ομάδα ασθενών Κρητικής καταγωγής με ΣΕΛ ή ΡΑ⁵⁰¹. Σημαντικά υψηλότερη συχνότητα των γονοτύπων 894GG, 894GT του πολυμορφισμού eNOS σε ασθενείς με νεφρίτιδα του λύκου βρέθηκε σε ασθενείς από τη Βόρεια Κίνα⁵⁰², ενώ

ως παράγοντες κινδύνου για τον ΣΕΛ βρέθηκαν οι απλότυποι T_bC και C_aG από τους τρεις πολυμορφισμούς eNOS T-786C, G894T και intron 4 VNTR και ως προστατευτικοί οι απλότυποι T_aG και C_bG⁵⁰³. Μεταανάλυση των δημοσιευμένων μελετών⁵⁰⁴ αναδεικνύει τη συσχέτιση του αλληλίου a ή των γονοτύπων aa+ab του γονιδίου eNOS στο intron 4 με την ανάπτυξη νεφρίτιδας του λύκου και του γονότυπου TT του πολυμορφισμού eNOS C786T με την ευπάθεια στον ΣΕΛ. Φαίνεται λοιπόν ότι γενετικοί τόποι του γονιδίου της eNOS πιθανόν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς της αυτοανοσίας. Περαιτέρω έρευνες ίσως αποδώσουν αντίστοιχα αποτελέσματα και για την ΠΧΚ.

7.4.2 Ενδοθηλίνες

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τροποποίηση της απαντητικότητας της ενδοθηλίνης και των υποδοχέων της σε καταστάσεις βλάβης ή φλεγμονής του ήπατος, όπως συμβαίνει και με την iNOS.

Υπάρχουν τρία είδη ενδοθηλινών, η ET-1, η ET-2 και ET-3. Είναι πεπτίδια αποτελούμενα από 21 αμινοξέα με κύριο ρόλο τη ρύθμιση του αγγειακού τόνου μέσω αγγειοσύσπασης. Άλλες βιολογικές δράσεις των ενδοθηλινών είναι η ομοιόσταση ύδατος και Na, η κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση, η φλεγμονή, η αγγειογένεση, η ανάπτυξη της νευρικής ακρολοφίας, η ρύθμιση της νευρικής λειτουργίας και η επούλωση των τραυμάτων.

Οι ενδοθηλίνες δρουν μέσω σύζευξής τους σε δύο διαφορετικούς υποδοχείς, τον EDNR-A (endothelin receptor type A) ο οποίος βρίσκεται στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και ενεργοποίησή του προκαλεί αγγειοσύσπαση και τον EDNR-B (endothelin receptor type B), ο οποίος βρίσκεται στο αγγειακό ενδοθήλιο και ενεργοποίησή του προάγει την αγγειοδιαστολή μέσω απελευθέρωσης NO. Βέβαια νεότερες μελέτες απεκάλυψαν την ύπαρξη ET-B υποδοχέων στη σφαγίτιδα και στη σαφήνη φλέβα κονίκλων, που η ενεργοποίησή τους προκαλούσε αγγειοσύσπαση. Έτσι το 1993 αποδείχτηκε και τυπικά η ύπαρξη δύο τύπων ET-B: ο ET-B₁ και ο ET-B₂. Ο ET-B₁ βρίσκεται στο ενδοθήλιο και όντως προάγει τη χάλαση των αγγείων, ενώ ο ET-B₂ εντοπίζεται στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα και προκαλεί σύσπαση.

Ενδοθηλίνες έχει βρεθεί ότι μπορούν να παράγουν και άλλα κύτταρα όπως τα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος και τα μακροφάγα⁵⁰⁵. Στο ήπαρ ο ρόλος των ενδοθηλινών στην κολποειδική μικροκυκλοφορία είναι μείζονος σημασίας καθώς προκαλούν σύσπαση των αστεροειδών κυττάρων και θεωρούνται εν μέρει υπαίτιες για την αυξημένη αγγειακή αντίσταση που απαντάται στην κίρρωση του ήπατος⁵⁰⁶. Εξίσου σημαντική είναι και η συμβολή τους στην πρόκληση ίνωσης του ήπατος μέσω ενεργοποίησης των αστεροειδών κυττάρων⁵⁰⁷. Εξάλλου και η ΠΧΚ χαρακτηρίζεται από οξειδωτικό στρες και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου.

Μελέτη του εργαστηρίου Γαστρεντερολογίας της Ιατρικής Σχολής Ηρακλείου, από τους ερευνητές Δημουλιός και συνεργάτες, ανίχνευσε αυξημένα επίπεδα ET-1 και κυρίως ET-2 στον ορό των ασθενών σε όλα τα στάδια της ΠΧΚ, ενώ σημαντικά αυξημένες ήταν οι τιμές ET-1 και ET-3 στις περιφερικές φλέβες σε σύγκριση με την ηπατική φλέβα. Στην ίδια μελέτη, σημαντική ήταν η μείωση μόνο του τίτλου της ET-2 μετά χορήγηση UDCA τόσο σε ασθενείς σταδίου I, II όσο και σε ασθενείς σταδίου III, IV. Τα αποτελέσματα αυτά θέτουν το ερώτημα αν τελικά μια πιο γενικευμένη βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων συμβάλλει στην έναρξη της βλάβης στην ΠΧΚ⁴⁹⁷.

Στις παρατηρήσεις αυτές στηρίζεται και το παθογενετικό μοντέλο ΠΧΚ^{189,190} που προτάθηκε από τους Κουρούμαλη και Νότα όπου περιγράφεται ότι πιθανόν η πρωταρχική βλάβη διαμεσολαβούμενη από τη δράση ιογενών ή άλλων μικροβιακών παραγόντων σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα, είναι βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η υπερπαραγωγή ενδοθηλινών από αυτά οδηγεί στη σύσπαση τόσο των αστεροειδών κυττάρων(και συνεπώς προκαλεί πρωιμα την εμφάνιση πυλαίας υπέρτασης), όσο και του αγγειακού δικτύου των χοληφόρων (προκαλώντας ισχαιμική βλάβη στα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων).

Το γονίδιο της ενδοθηλίνης 1 (EDN1) αποτελείται από 5 εξόνια και 4 ιντρόνια, βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6, 6p23-p24 σε απόσταση από την HLA-A, HLA-B και DRB1, σε στενή σύνδεση με το D6S89⁵⁰⁸.

Σημαντική συσχέτιση πολυμορφισμών του γονιδίου της ET-1 και συγκεκριμένα του EDN-1 Lys198Asn (rs5370) στο εξόνιο 5, έχει αναφερθεί με την αρτηριακή υπέρταση και τα αυξημένα επίπεδα ET-1 στον ορό των ασθενών^{509,510,511}, με την ιδιοπαθή πνευμονική υπέρταση⁵¹², με μειωμένο κίνδυνο διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας σε ασθενείς σακχαρώδους διαβήτη τύπου II (ο γονότυπος Asn/Asn)⁵¹³, με χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης εξαρτώμενη και από το

γυναικείο φύλο σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο (το T αλληλίο Asn)⁵¹⁴ καθώς και του αλληλομόρφου A8002 στο ιντρόνιο 4 του *EDN-1* (rs2071942) και του *Asn198* του rs5370 με τη στηθάγχη Prinzmetal σε ομάδα ασθενών από την Κορέα⁵¹⁵.

Σε πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη, γενετικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου της ενδοθηλίνης βρέθηκαν με σημαντικά αυξημένη συχνότητα σε παιδιατρικούς ασθενείς με άσθμα, Γερμανικής καταγωγής, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου⁵¹⁶, ενώ τα δεδομένα ελληνικής μελέτης δείχνουν πως λειτουργικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου της *EDN-1* (rs 5370 και 138/ex1ins/delA) δύνανται να ενέχονται στον τελικό φαινότυπο της ΧΑΠ⁵¹⁷.

Λιγοστές σε αριθμό είναι οι μελέτες SNPs του γονιδίου της *EDN-1* σε νοσήματα αυτοάνοσης αιτιολογίας όπως η λεύκη, η ψωρίαση, το σκληρόδερμα, το πρωτοπαθές φαινόμενο Raynaud και η PA, με αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης ΑΥ, υψηλής ΣΑΠ και πίεσης σφυγμού αναφέρθηκε σε ασθενείς με PA με τον απλότυπο *EDN-1* rs1800541-rs5370 T-T⁵¹⁸, ενώ, η συχνότητα των απλοτύπων της *EDN1* στο ιντρόνιο 4 G/A(rs2071942) και στο εξόνιο 5 G/T(rs5370) βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς με λεύκη⁵¹⁹ σε σύγκριση με ομάδα υγιών εθελοντών, καθώς και με την εστιακή ή την τμηματική μορφή της νόσου. Αντίθετα καμία συσχέτιση πολυμορφισμών της *EDN1* με το πρωτοπαθές φαινόμενο Raynaud⁵²⁰ δεν αναδείχθηκε σε ομάδα 95 Καυκάσιων ασθενών, ούτε με το σκληρόδερμα⁵²¹ σε 205 ασθενείς σε μελέτη από το Ηνωμένο Βασίλειο, ή με την ψωρίαση κατά πλάκας⁵²² σε μελέτη 207 ασθενών από την Αυστρία.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο πολυμορφισμός στο ιντρόνιο 4 της *EDN-1* rs5370 έχει ενοχοποιηθεί ως παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση πυλαίας υπέρτασης όπως αναφέρεται σε μελέτη 106 ασθενών με κίρρωση του ήπατος, στα πλαίσια HBV λοίμωξης⁵²³. Ο ίδιος πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί και με υψηλές τιμές ορού ET-1. Έκτοτε δεν έχει διενεργηθεί άλλη μελέτη προκειμένου να διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος των γενετικών πολυμορφισμών της ET-1 στην κίρρωση του ήπατος και πιο ειδικά η συμβολή τους στην πολυπαραγοντικής αιτιολογίας ΠΧΚ.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

8. Σκοπός της μελέτης

Στην Ελλάδα είναι περιορισμένα τα ως σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα όσον αφορά σε μελέτες σε ασθενείς με Π.Χ.Κ. και στους συγγενείς αυτών, ως προς την αναζήτηση τόσο γενετικών πολυμορφισμών, όσο και περιβαλλοντικών παραγόντων, στην αιτιοπαθογένεια και στην έκβαση της πορείας της νόσου.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα προαναφερθέντα βιβλιογραφικά δεδομένα και την ήδη υπάρχουσα επιστημονική γνώση, οριοθετούμε τον προσανατολισμό της μελέτης στοχεύοντας στα εξής :

- Συλλογή στοιχείων σχετικά με κοινωνικοδημογραφικές παραμέτρους, τον τρόπο ζωής και τις έξεις ασθενών με ΠΧΚ/ΑΧ στην Κρήτη και συγγενών Α βαθμού αυτών, προκειμένου να ανιχνευθούν πιθανοί περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου για τη νόσο.
- Ανάλυση ιστορικού με δεδομένα από το ατομικό αναμνηστικό, το οικογενειακό, γυναικολογικό και λοιπό χειρουργικό ιστορικό για καθορισμό του ρόλου και της συχνότητας των συννοσηροτήτων στην ΠΧΚ σε ασθενείς Κρητικής καταγωγής, σε συγγενείς Α βαθμού και ομάδα μαρτύρων.
- Καταγραφή των συνοδών αυτοάνοσων νοσημάτων που πιθανόν συνυπάρχουν σε ασθενείς με Π.Χ.Κ. και Α.Χ. που έχουν διαγνωστεί και παρακολουθούνται στην Γαστρεντερολογική κλινική του ΠΑ.Γ.Ν.Η. και στους συγγενείς πρώτου βαθμού και σύγκριση των αποτελεσμάτων με τις διεθνείς βιβλιογραφικές αναφορές .
- Ανίχνευση και καταγραφή της επίπτωσης της Π.Χ.Κ./Α.Χ. σε συγγενείς ασθενών με Π.Χ.Κ./Α.Χ.

- Να γίνει γενετική ανάλυση πολυμορφισμών γονιδίων που επηρεάζουν τη λειτουργία του ενδοθηλίου, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η θεωρία των Κουρούμαλη και συνεργατών για την παθογένεια της ΠΧΚ, σύμφωνα με την οποία η αρχική βλάβη στο επιθήλιο των μικρών χοληφόρων προκαλείται λόγω ισχαιμίας από υπερπαραγωγή ενδοθηλινών. Θα αναζητηθούν οι πολυμορφισμοί των γονιδίων eNOs στο ιντρόνιο 4 και εξόνιο 7 και της EDN1 στο ιντρόνιο 4 στη θέση +356 και στο εξόνιο 5 στη θέση +61 σε ασθενείς και μάρτυρες Κρητικής καταγωγής. Επιπρόσθετα, θα διερευνηθεί πιθανή συσχέτιση των πολυμορφισμών αυτών με την πρόοδο της νόσου καθώς και με την παρουσία ή όχι των AMA αντισωμάτων στον ορό των ασθενών.
- Μελέτη γενετικής συσχέτισης ασθενών και μαρτύρων από την Κρήτη για να διερευνηθεί ο ρόλος των ήδη μελετηθέντων στην ΠΧΚ πολυμορφισμών του γονιδίου της CTLA4 rs231775 και rs3087243 σε σχέση με την ευπάθεια, το στάδιο της νόσου και τα AMA. Όπως προαναφέρθηκε, η CTLA4 συνιστά αντιγόνο των T-λεμφοκυττάρων, η σύνδεση με την οποία οδηγεί σε αναστολή της ενεργοποίησης των μηχανισμών αυτοανοσίας και οι εν λόγω πολυμορφισμοί του γονιδίου της CTLA4 έχουν συσχετιστεί μεταξύ των άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων και με την ΠΧΚ σε μελέτες από Ηνωμένο Βασίλειο, Ιταλία, ΗΠΑ, Καναδά και Ιαπωνία.
- Να καθοριστεί η επίπτωση και ο επιπολασμός της ΠΧΚ στην Κρήτη.
- Να χαρτογραφηθεί η χωρική κατανομή της νόσου στο νησί της Κρήτης σε καθορισμένη χρονική περίοδο(1990-2010) και να καθοριστούν οι περιοχές με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου την εν λόγω χρονική περίοδο καθώς και στο εγγύς μέλλον.
- Να δημιουργηθεί μία χρόνο-χωρική διαδρομή της ΠΧΚ, προκειμένου να ανιχνευθεί το πιθανό πρότυπο εμφάνισης της νόσου στην Κρήτη.

ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

9. Πληθυσμός της μελέτης

9.1 Κλινική έρευνα: Ενημέρωση-Συλλογή υλικού

Σε 196 ασθενείς με ΠΧΚ [175 AMA (+) και 21 AMA (-)] οι οποίοι παρακολουθούνται στη Γαστρεντερολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης εστάλησαν ειδικές επιστολές από τον Μάρτιο-Οκτώβριο του έτους 2007, οι οποίες εμπεριείχαν ένα ενημερωτικό γράμμα σχετικά με την έρευνα που πρόκειται να διεξαχθεί, τα υπάρχοντα επιστημονικά δεδομένα για τη νόσο, τον στόχο και τον τρόπο διεξαγωγής της μελέτης για πλήρη ενημέρωση αυτών και των συγγενών τους Α βαθμού, καθώς και ένα ένθετο για την ενυπόγραφη συγκατάθεση συμμετοχής τους στη μελέτη (ένθετο 1,2).

Αξιότιμε/η κύριε-κυρία

Σας ενημερώνουμε ότι η Γαστρεντερολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου με πρωτοβουλία του διευθυντή της Κου Η. Κουρούμαλη και υπεύθυνους ιατρούς τις Κα Μαίρη Κουλεντάκη και Αικατερίνη Μάντακα διεξάγει μια μελέτη για την σημασία της κληρονομικότητας στο νόσημά σας (την πρωτοπαθή χολική κίρρωση, Π.Χ.Κ.) και για τη διερεύνηση των περιβαλλοντικών παραγόντων που πιθανόν έχουν σχέση με τη νόσο.

Μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε Ευρώπη και Αμερική τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότερο συγκλίνουν στην άποψη της ύπαρξης κληρονομικής βάσης της νόσου, σε συνδυασμό βέβαια με την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουμε κάνει και εμείς, μια που από την ομάδα των ασθενών μας φαίνεται ότι 8 οικογένειες έχουν περισσότερα από 1 μέλη τους που πάσχουν από αυτήν την ασθένεια.

Όπως γνωρίζετε η νόσος δεν έχει πολλά συμπτώματα στα πρώτα χρόνια (συνήθως κούραση και φαγούρα). Πολλές φορές η διάγνωση ακολουθεί το τυχαίο εύρημα αυξημένων ηπατικών ενζύμων που κάποιος κάνει για άλλο λόγο. Υπάρχουν όμως ειδικές αιματολογικές εξετάσεις που μπορούν να αποδείξουν την νόσο και πριν εμφανιστούν τα συμπτώματα.

Για τον λόγο αυτό και μια που η έγκαιρη διάγνωση έχει ιδιαίτερη σημασία στην αποτελεσματικότητα της θεραπείας σχεδιάσαμε αυτήν την μελέτη ελέγχου των *συγγενών σας 1^{ου} βαθμού* (γονέων, αδελφών και παιδιών μεγαλύτερων των 18 ετών).

Εφ' όσον η οικογένειά σας αποφασίσει να λάβει μέρος σε αυτήν την Παγκρήτια μελέτη κατ' αρχάς ελάτε σε επικοινωνία με τις υπεύθυνες ιατρούς [(Για Ρέθυμνο και Χανιά την Αικατερίνη Μάντακα, τηλέφωνο *κιν.6946107430* - *σταθερό 28210-52432* και για Ηράκλειο

και Λασίθι την κα Μαίρη Κουλεντάκη, τηλέφωνο 2810-392251 (κάθε Τετάρτη και Παρασκευή μετά τις 10:30 π.μ.)] για τον καθορισμό μιας συνάντησης μας με εσάς και όσους από τους συγγενείς σας πρώτου βαθμού επιθυμούν να λάβουν μέρος.

Το πρωτόκολλο που θα ακολουθηθεί είναι ότι εσείς και οι συγγενείς σας θα συμπληρώσετε από ένα ερωτηματολόγιο και ταυτόχρονα, οι συγγενείς σας θα υποβληθούν σε προληπτικές εξετάσεις αίματος, για έλεγχο της ηπατικής λειτουργίας, και τις ειδικές εξετάσεις αντισωμάτων. Είναι σημαντικό να σας διαβεβαιώσουμε ότι και το ιατρικό απόρρητο θα εφαρμοστεί σε κάθε βήμα της μελέτης αυτής.

Σας ευχαριστήσουμε προκαταβολικά για την συμμετοχή σας.

Με εκτίμηση,

Αι. Μάντακα

Μ. Κουλεντάκη

Η.Κουρούμαλης

Ιατρός

Γαστρεντερολόγος

Καθηγητής Γαστρ/γίας

Επιμελήτρια Γαστρ/κής Κλ.

Διευθυντής Γαστρ/κής Κλ.

Ενθετο 1. Ενημερωτικό γραμμα για την κλινική μελέτη για την επίδραση της κληρονομικότητας στην Π.Χ.Κ.

ΕΝΤΥΠΟ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ

Αφού ενημερώθηκα για την μελέτη «Η επίδραση της κληρονομικότητας στην Π.Χ.Κ.» δέχομαι να λάβω μέρος.

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΣΥΓΓΕΝΟΥΣ

ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΙΑΤΡΟΥ

Ημερομηνία

Ημερομηνία

Ημερομηνία

Ενθετο 2. Εντυπο συγκαταθεσης συμμετοχης στη μελετη.

Όλοι οι ασθενείς πληρούσαν τουλάχιστον 2 εκ των τριών διεθνώς αποδεκτών διαγνωστικών κριτηρίων για την ΠΧΚ: α)βιοχημικά ευρήματα χολοστατικού συνδρόμου, β) θετικός τίτλος AMA>1:40 με τεχνική έμμεσου ανοσοφθορισμού (IIFL) [Nova Lite TM (IFA)] σε υπόστρωμα νεφρών & στομάχου μυός από την Inova

Diagnostics, San Diego CA, Inc, και/ή γ) ιστολογικά ευρήματα συμβατά με ΠΧΚ. Όλοι οι AMA αρνητικοί ασθενείς με κλινικά ευρήματα ΠΧΚ είχαν υποβληθεί σε βιοψία ήπατος η οποία επιβεβαίωσε τη διάγνωση Αυτοάνοσης Χολαγγειίτιδας. Κανένας εκ των ασθενών δεν έφερε θετικό αντιγόνο επιφανείας για Ηπατίτιδα Β, ούτε αντισώματα έναντι του ιού της Ηπατίτιδας C στον ορό του αίματος. Η νόσος σταδιοποιήθηκε βάσει των ιστολογικών ευρημάτων κατά Ludwig σε πρώιμη(στάδια I-II) ή προχωρημένη ΠΧΚ(στάδια III-IV), ενώ σε απουσία βιοψίας ήπατος προχωρημένη θεωρήθηκε η νόσος ασθενών με ιστορικό μείζονων επιπλοκών πυλαίας υπέρτασης. Για κάθε ασθενή προσδιορίστηκε το μοντέλο πρόβλεψης διετούς επιβίωσης από τη Mayo Clinic, όπου ο σχετικός κίνδυνος υπολογίστηκε από τιμές: χολερυθρίνης, ηλικίας, χρόνου προθρομβίνης, λευκωματίνης και την παρουσία ή όχι οιδήματος (Mayo risk score).

Κριτήρια επιλογής των συγγενών Α βαθμού των ασθενών με ΠΧΚ/ΑΧ ήταν μόνον η ηλικία >18 ετών.

Από την παραπάνω ομάδα ασθενών οι 111 συνέναισαν (56.6%), 40 αρνήθηκαν και 45 δεν έδωσαν καμία απάντηση. Εκατό δεκαπέντε συγγενείς Α βαθμού (75 θήλεα, 40 άρρενα) δέχτηκαν να συμμετάσχουν (55% των εν ζωή συγγενών Α βαθμού). Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 149 υγιείς εθελοντές αντίστοιχης ηλικίας (± 2.5 έτη) και φύλου από τα Εξωτερικά Ιατρεία της Γαστρεντερολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και της Παθολογικής κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Χανίων. Τόσο οι ασθενείς όσο και οι υγιείς μάρτυρες ήταν όλοι Κρητικής καταγωγής για τουλάχιστον δύο γενεές όπως επιβεβαιώθηκε με προφορική συνέντευξη, αλλά και Κρητικής διαμονής.

9.2 Μεθοδολογία κλινικής έρευνας- μελέτης

Μετά την ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους όλοι οι συμμετέχοντες (ασθενείς, συγγενείς Α βαθμού και υγιείς εθελοντές) εκλήθησαν και συμπλήρωσαν ένα ερωτηματολόγιο υπό καθοδήγηση ιατρού(ένθετο 3). Το ερωτηματολόγιο εμπεριείχε στοιχεία κοινωνικοδημογραφικά (ηλικία, φύλο, επάγγελμα, επίπεδο εκπαίδευσης), έξεις-τρόπος ζωής (ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) κατηγοριοποιημένος ως ‘υψηλός’ (>30), ‘μέτριος’ (25-30), και ‘χαμηλός’(<25), το κάπνισμα $20 \leq$, >20

pack/year λαμβάνοντας υπόψη και πρώην καπνιστές, η εβδομαδιαία κατανάλωση αλκοόλ ως “καθόλου” (καμία κατανάλωση), “χρήση” (<14 units/week για τους άνδρες και <7 units/week για γυναίκες) ή “κατάχρηση” (≥ 14 units/week για άνδρες και ≥ 7 units/week για γυναίκες) υπολογίζοντας ότι 1 unit αντιστοιχεί σε 12gr αλκοόλ. Στους λοιπούς περιβαλλοντικούς παράγοντες συμπεριλήφθησαν και η χρήση βαφών μαλλιών και βερνικιών νυχιών από τις γυναίκες ασθενείς(τουλάχιστον μία φορά τον μήνα). Το λοιπό ιατρικό και χειρουργικό ιστορικό των ασθενών με ΠΧΚ αφορούσε την περίοδο πριν τη διάγνωση της νόσου. Λεπτομερής ήταν η λήψη πληροφοριών σχετικά με τη συχνότητα κολπίτιδων και ουρολοιμώξεων (UTI), θυρεοειδικής νόσου, άλλων χρονίων νοσημάτων [υπέρτασης(HT), σακχαρώδους διαβήτη (DM), δυσλιπιδαιμίας, στεφανιαίας (CAD), περιφερικής αγγειοπάθειας, άσθμα/ χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD)], το ιστορικό αλλεργιών, την πιθανή συνύπαρξη άλλων ηπατικών ή αυτοάνοσων νοσημάτων. Η διάγνωση της θυρεοειδίτιδας Hashimoto στηρίχθηκε στη συνύπαρξη υποθυρεοειδισμού και αυξημένων επιπέδων αντισωμάτων έναντι θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (TPO) και θυρεοσφαιρίνης (TG). Από όλες τις θήλεις συμμετέχοντες ελήφθησαν στοιχεία από το αναπαραγωγικό ιστορικό (πριν τη διάγνωση της ΠΧΚ), συμπεριλαμβανομένων της ηλικίας εμμηναρχής, της ηλικίας 1ης εγκυμοσύνης, τον αριθμό κυήσεων, τον αριθμό τέκνων, αποβολές ή εκτρώσεις, την ηλικία εμμηνόπαυσης, τη χρήση αντισυλληπτικών δισκίων ή θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης και το ιστορικό γυναικολογικών επεμβάσεων.

Μετά τη συνέντευξη συγγενών Α βαθμού και υγιών εθελοντών ακολούθησε ορολογικός έλεγχος για ALT, AST, ALP, γ -GT, total bilirubin, glucose, urea, cholesterol, triglycerides, fT4, TSH, anti-TPO και anti-TG, ανοσοσφαιρίνες IgA, IgG, IgM και ειδικές ανοσολογικές εξετάσεις για ANA, AMA, SMA με τεχνικές έμμεσου ανοσοφθορισμού, προσδιορισμός anti-M2 αυτοαντισωμάτων και ιολογικός έλεγχος για Ηπατίτιδα Β και C με τεχνικές ELISA, προκειμένου να αναζητηθεί πιθανή ύπαρξη ηπατικής ή ανοσολογικής διαταραχής σε αυτούς. Η συλλογή των δεδομένων διήρκησε από τον Ιανουάριο 2008 έως το Δεκέμβριο του 2010. Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.

ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΡΒC

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΑΣΘΕΝΟΥΣ:

ΦΥΛΟ: ΆΡΡΕΝ ΘΗΛΥ

ΗΛΙΚΙΑ:

ΚΑΤΑΓΩΓΗ:

ΜΟΝΙΜΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑ:

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ:

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ: ΑΝΕΥ ΔΗΜΟΤΙΚΟ ΓΥΜΝΑΣΙΟ/ΛΥΚΕΙΟ

ΤΡΙΤΟΒΑΜΙΑ(ΑΕΙ/ΤΕΙ) ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΕΣ

ΒΑΡΟΣ:

BMI:

ΥΨΟΣ:

ΟΜΑΔΑ ΑΙΜΑΤΟΣ: A B AB O

RHESUS:

ΚΑΠΝΙΣΜΑ: ΝΑΙ ΟΧΙ

ΠΟΣΑ ΧΡΟΝΙΑ ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ:

ΠΟΣΑ ΤΣΙΓΑΡΑ ΗΜΕΡΗΣΙΩΣ:

ΔΙΑΚΟΠΗ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΑΓΝΩΣΗ
ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ:

ΝΑΙ ΟΧΙ

ΑΛΚΟΟΛ: ΝΑΙ ΟΧΙ

ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΑΝΑ ΕΒΔΟΜΑΔΑ/ΗΜΕΡΑ

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

ΑΓΑΜΟΣ ΕΓΓΑΜΟΣ

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΓΥΝΑΙΚΕΣ

ΗΛΙΚΙΑ ΕΜΜΗΝΑΡΧΗΣ(ΕΝΑΡΞΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΥ):

ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΠΕΡΙΟΔΟΥ:

ΗΛΙΚΙΑ ΠΡΩΤΗΣ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ:

ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΗΣΕΩΝ:

ΑΤΕΚΝΗ:

ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΕΚΝΩΝ:

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΚΕΤΟΣ:

ΚΑΙΣΑΡΙΚΗ ΤΟΜΗ:

ΑΠΟΒΟΛΗ:

ΗΛΙΚΙΑ ΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΗΣ:

ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΟΡΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ: ΝΑΙ ΟΧΙ

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΠΑΤΕΡΑ:

ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΜΗΤΕΡΑΣ:

ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΕΣΑΣ

ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΕ ΦΑΡΜΑΚΑ ΣΕ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΧΡΗΣΗ:

ΝΑΙ ΟΧΙ

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΠΟΣΟ ΚΑΙΡΟ ΤΑ ΠΑΙΡΝΕΤΕ:

ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΩΝ ΕΠΕΜΒΑΣΕΩΝ

ΥΣΤΕΡΕΚΤΟΜΗ:

ΑΙΤΙΑ:

ΩΟΘΗΚΕΚΤΟΜΗ:

ΑΙΤΙΑ:

ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ:

ΙΝΟΜΥΩΜΑΤΑ:

ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΗΣ ΠΥΕΛΟΥ: ΝΑΙ ΟΧΙ

ΚΟΛΠΙΤΙΔΑ: ΝΑΙ ΟΧΙ

ΠΟΣΕΣ ΦΟΡΕΣ ΣΕ ΠΟΣΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ:

Ca ΜΑΣΤΟΥ: ΝΑΙ ΟΧΙ

ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ:

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗΣ ΛΥΚΟΣ:

ΣΚΛΗΡΟΔΕΡΜΑ:

ΠΟΛΥΜΥΟΣΙΤΙΣ:

ΣΥΝΔΡΟΜΟ SJOGREN:

ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ RAYNAUD:

ΨΩΡΙΑΣΗ:

ΕΚΖΕΜΑ:

ΝΟΣΟΣ CROHN

ΕΛΚΩΔΗΣ ΚΟΛΙΤΙΔΑ:

ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΗ ΝΟΣΟΣ:

ΝΑΙ

ΟΧΙ

ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΤΙΣ:

ΥΠΟΘΥΡΕΟΕΙΔΙΣΜΟΣ

ΥΠΕΡΘΥΡΕΟΕΙΔΙΣΜΟΣ

ΑΛΛΟ:

ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΗΠΑΤΟΣ

PBC:

ΙΟΓΕΝΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ :

A

B

C

ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΗΠΑΤΟΣ:

ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΗΠΑΤΟΣ:

ΝΟΣΟΣ WILSON:

ΑΙΜΟΧΡΩΜΑΤΩΣΗ:

Χ.Ε.Η.:

ΑΛΛΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΗΠΑΤΟΣ:

ΧΡΟΝΙΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

ΑΥ:

ΣΔ:

ΔΥΣΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑ:

ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ:

ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΗ ΑΓΓΕΙΟΑΘΕΙΑ:

ΑΣΘΜΑ / ΧΑΠ:

ΑΛΛΕΡΓΙΕΣ: ΟΧΙ ΝΑΙ ΠΟΙΕΣ;

ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ: ΟΧΙ ΝΑΙ

ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ/ΠΟΣΕΣ ΦΟΡΕΣ ΣΕ ΠΟΣΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ:

ΑΛΛΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ:

Ca: ΝΑΙ ΟΧΙ ΜΟΡΦΗ Ca :

ΑΛΛΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ:

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

ΑΜΥΓΔΑΛΕΚΤΟΜΗ:

ΣΚΩΛΗΚΟΕΙΔΕΚΤΟΜΗ:

ΕΚΤΟΜΗ ΧΟΛΗΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ:

ΠΟΛΥΠΕΚΤΟΜΗ {ΚΟΛΟΝ}:

ΕΚΤΟΜΗ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ:

ΑΛΛΕΣ ΧΕΙΡ. ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ:

Ενθετο 3. Ερωτηματολόγιο κλινικής μελέτης.

9.3 Ασθενείς και ομάδα ελέγχου για τη μελέτη γενετικής συσχέτισης .

Εκατό από τους προαναφερθέντες ασθενείς και 158 υγιείς εθελοντές(84.2% γυναίκες, διάμεσης ηλικίας 62.19 ± 13.9 έτη) εδέχθησαν να συλλεγθεί ολικό περιφερικό αίμα, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την αναζήτηση γενετικών καθοριστών που πιθανόν συνδέονται με την ευπάθεια ή την πρόοδο της ΠΧΚ, μέσω μελέτης μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών γονιδίων. Στην ομάδα των εκατό ασθενών (83% γυναίκες, διάμεσης ηλικίας 64.4 ± 11.9 έτη) Κρητικής καταγωγής, οι ενενήντα τρεις είχαν θετικά ΑΜΑ στον ορό τους και οι εβδομήντα τέσσερις είχαν ιστολογικά χαρακτηριστικά συμβατά με αρχικού σταδίου νόσο(I-II).

Ως διάρκεια της νόσου υπολογίστηκε το χρονικό διάστημα από τη διάγνωση της νόσου μέχρι την ημερομηνία της αιμοληψιας για την ανάλυση των γενετικών πολυμορφισμών.

10. Μεθοδολογία ανίχνευσης γενετικών πολυμορφισμών

I. Απομόνωση DNA

Αρχικά έγινε λήψη 1 ml περιφερικού φλεβικού αίματος υπό στείρες συνθήκες, το οποίο συλλέχθηκε σε σωληνάριο ψεκασμένο με αντιπηκτικό EDTA και φυλλάχθηκε στους -80°C .

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στην απομόνωση DNA⁵²⁴ από τα εμπύρνηνα λευκοκύτταρα και τον περαιτέρω καθαρισμό του από πρωτεΐνες και άλατα (salting-out) στα επόμενα στάδια.

Συνοπτικά, η μέθοδος περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- ❖ Σε θερμοκρασία δωματίου 500μl αίματος μεταφέρονται σε πλαστικό σωληνάριο (eppendorf) που περιέχεται 1ml διαλύματος για τη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων(RBC lysis buffer) και επωάζονται για 5min.
- ❖ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 25°C για 1min στις 13.000 rpm.

- ❖ Απομακρύνουμε το υπερκείμενο διάλυμα και αφήνουμε 10-20μl στον πυθμένα του eppendorf (λευκά αιμοσφαίρια), τα οποία επαναδιαλύουμε με 1ml H₂O και ήπιο πιπετάρισμα.
- ❖ Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση του διαλύματος στους 25C για 1min στις 13.000 rpm.
- ❖ Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο διάλυμα, στην πελλέτα που παραμένει ποσότητας <5μl, προστίθενται 360μl ενζυμικού διαλύματος πρωτεϊνάσης K προκειμένου να αποδεσμευτεί το DNA από τις ιστόνες και να αδρανοποιηθούν οι νουκλεάσες. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και πιπετάρισμα για να διευκολυνθεί η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών.
- ❖ Το διάλυμα επωάζεται στους 65C για 30min προκειμένου να απενεργοποιηθεί η πρωτεϊνάση K.
- ❖ Προσθέτουμε 220μl διαλύματος NaCl 6M και ανακινούμε ισχυρά με το χέρι για 10sec.
- ❖ Μετά τη φυγοκέντρηση για 10min σε 13.000 rpm, έχει σχηματιστεί αρκετά μεγάλη πρωτεϊνική πελλέτα στον πυθμένα του eppendorf την οποία και απομακρύνουμε.
- ❖ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf και φυγοκεντρούμε ξανά για 5 min στις 13.000rpm.
- ❖ Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο eppendorf με ~ 1ml διαλύματος αιθανόλης 95% και το αναποδογυρίζουμε για 2 min. Οι υδρόφοβες αζωτούχες βάσεις των νουκλεϊκών οξέων έλκονται από το υδρόφοβο τμήμα της αλκοόλης και συγκεντρώνονται στην επιφάνεια επαφής του διαλύματος με την αιθανόλη. Το DNA εμφανίζεται ως αδιάλυτο λευκό νεφέλωμα.
- ❖ Φυγοκεντρούμε για 5min στις 13.000rpm.
- ❖ Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1ml αιθανόλης 70% και φυγοκεντρούμε ξανά για 5min στις 13.000 rpm.
- ❖ Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 12h.
- ❖ Αναδυαλύουμε το εκχυλισμένο DNA με 80μl διαλύματος ενυδάτωσης (10Mm Tris-Cl-0,5Mm EDTA) και το επωάζουμε στους 56C για 15min, προκειμένου να γίνει η ενυδάτωση και να ολοκληρωθεί η εναιώρηση του DNA. Εν συνεχεία, το αποθηκεύουμε στους -20C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

II. Τεχνική PCR και RFLP

Στην παρούσα μελέτη διενεργήθηκε ανίχνευση έξι γενετικών πολυμορφισμών. Για τον eNOS intron 4 a/b VNTR χρησιμοποιήθηκε η τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), ενώ η ανίχνευση των γενετικών πολυμορφισμών 894G/T eNOS exon 7, +49 A/G CTLA-4, 60C/T CTLA-4, +356 G/A EDN-1 intron 4 και 198 G/T exon5 πραγματοποιήθηκε με PCR και ανάλυση μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism). Τα προϊόντα της PCR και της πέψης διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και ελήφθησαν εικόνες αυτών σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Η PCR συνιστά μια πειραματική διαδικασία που επιτυγχάνει τον *in vitro* ενζυμικό πολλαπλασιασμό, με εκθετικό τρόπο, συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών, μέσω του θερμοάαντοχου ενζύμου Taq-πολυμεράση.

Απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η γνώση εκ των προτέρων της υπό διερεύνησης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, ώστε να σχεδιαστούν οι εκκινητές (primers). Οι τελευταίοι είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 15-20 νουκλεοτιδίων, συμπληρωματικά στις αλυσίδες του δίκλωνου DNA, τα οποία οριοθετούν την νουκλεοτιδική αλληλουχία και δεσμεύονται στα άκρα του τμήματος του προς πολλαπλασιασμό γονιδίου ως «εναρκτήριοι θέσεις» για την Taq πολυμεράση. Ο κάθε εκκινητής έχει συμπληρωματική αλληλουχία προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA αλλά και οι δύο έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature, T_m). Η αντίδραση περιλαμβάνει 25-40 επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών σταδίων:

1. Αποδιάταξη του μήτρας DNA (denaturation of DNA template)
2. Πρόσδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς ακολουθίες (primer annealing).
3. Επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'→3' (elongation).

Το προϊόν επιμήκυνσης του κάθε εκκινητού από τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης αποτελεί εκμαγείο για τον άλλο εκκινητή στον επόμενο κύκλο. Μετά από n κύκλους το προϊόν PCR περιέχει $2n$ δίκλιωνα μόρια DNA που είναι αντίγραφα της αλληλουχίας που ορίζεται από τους εκκινητές.

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ειδικές συσκευές που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές (thermal cycler) που εναλλάσσουν τη θερμοκρασία βάσει προγραμματισμού που έχουμε καθορίσει εκ των προτέρων.

Η επιτυχία της αντίδρασης πιστοποιείται μετά από ηλεκτροφόρηση ενός μικρού κλάσματος προϊόντος της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

Τα ένζυμα περιορισμού, είναι ενδονουκλεάσες, ειδικά ένζυμα που κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις νουκλεοτιδίων, οι οποίες αποτελούνται από 4 με 6 νουκλεοτίδια, γνωστά και ως «θέσεις αναγνώρισης» των ενζύμων αυτών. Για να μπορέσει η ενδονουκλεάση περιορισμού να διασπάσει και τις δύο έλικες του διπλού DNA, οι θέσεις πρέπει να είναι ως αντικατοπτρικές εικόνες ή αλλιώς παλλίνδρομες (διαβάζονται το ίδιο από αριστερά προς τα δεξιά και το αντίστροφο). Εάν αλλάξει η ακολουθία αυτή κατά μία βάση, το ένζυμο δεν θα διασπάσει το DNA στη συγκεκριμένη θέση. Αυτές οι φυσικά εμφανιζόμενες διαφορές, που ονομάζονται πολυμορφισμοί στην ακολουθία των νουκλεοτιδίων, σε ειδικές θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών, οδηγεί στη δημιουργία κλασμάτων DNA διαφορετικού μήκους. Αυτή η μεταβολή στον τύπο των θραυσμάτων ονομάζεται Πολυμορφισμός Μήκους Θραύσματος εκ Περιορισμού (RFLP). Η ανάλυση RFLP αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη γονιδιακή χαρτογράφηση, για την εντόπιση γονιδίων γενετικά κληρονομούμενων νόσων, για τον προσδιορισμό κινδύνου εμφάνισης μίας κληρονομούμενης ασθένειας, για το γενετικό αποτύπωμα και τέλος για το τεστ πατρότητας.

Μετά την επώαση με τα ένζυμα περιορισμού, το επωασμένο DNA μεταφέρεται σε πηκτή αγαρόζης 2% με χρώση από βρωμιούχο αιθίδιο και πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση.

II.a Ανάλυση των πολυμορφισμών eNOS intron4 VNTR και exon7

Για την ανίχνευση του eNOS intron4 VNTR ο οποίος όπως προαναφέρθηκε βασίζεται σε επαναλήψη μιας αλληλουχίας 27bp στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική PCR. Οι εκκινητές της αντίδρασης ήταν ο ευθύς εκκινητής (Forward

primer) 5' AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT- 3' και ο ανάστροφος εκκινητής (Reverse primer) 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTTCAC-3'. Η PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl. Η σύσταση, οι συγκεντρώσεις και οι τελικές ποσότητες των αντιδραστηρίων της PCR παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. Συστατικά και συγκεντρώσεις μίγματος PCR για eNOS intron4.

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις	Ποσότητες
DNA	100ng	1μl
Ρυθμιστικό δ/μα DNA πολυμεράσης (Buffer) χωρίς Mg⁺⁺	1X (10mM Tris-HCl pH 8.5, 25°C, 50mM KCl)	2.5μl
MgCl₂	2.5mM	2μl
dNTPs	0.5mM	0.25μl
Forward primer	0.5μM	1μl
Reverse primer	0.5μM	1μl
Taq Polymerase(IMBB-FORTH, Hellas)	3-5u/μl	0.4μl
Απεσταγμένο H₂O		16.1μl
Τελικός Όγκος		25μl

Μετά την αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94° C για 5min, η PCR πραγματοποιήθηκε για 35 κύκλους που ο καθένας περιελάμβανε αποδιάταξη του προϊόντος στους 94° C για 30sec, υβριδοποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο στους 63° C για 30sec και επέκταση της νεοσυντιθεμένης αλυσού στους 72° C για 30sec. Μετά την ολοκλήρωση των 35 κύκλων ακολούθησε ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72° C για 7min. Αν το προϊόν της αντίδρασης αυτής περιέχει 5 επαναλήψεις από μία αλληλουχία 27bp, συνολικού μήκους 420bp τότε έχουμε το αλληλόμορφο b και αντίστοιχα ο ομοζυγώτης θα φέρει τον γονότυπο b/b. Στην περίπτωση 4 επαναλήψεων της εν λόγω αλληλουχίας, το θραύσμα DNA έχει μήκος 393bp και πρόκειται για το αλληλόμορφο a. Οι γονότυποι aa και ab αφορούν σε ομοζυγώτη για το a αλλήλιο και ετεροζυγώτη με ένα a και ένα b αλλήλιο, αντίστοιχα.

Για τον πολυμορφισμό G894T του γονιδίου eNOS στο εξόνιο 7 η αντίδραση PCR διενεργήθηκε με τη χρήση των εκκινητών 5'- TCC CTG AGG AGG GCA TGA GGC T -3' και 5'-TGA GGG TCA CAC AGG TTC CT -3' προκειμένου να πολλαπλασιαστεί μία περιοχή 457 bp του γονιδίου eNOS μέσα στην οποία

εντοπίζεται η πολυμορφική περιοχή Glu298Asp. Τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις PCR γι' αυτόν τον πολυμορφισμό παρατίθενται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Συστατικά και συγκεντρώσεις μίγματος PCR για eNOS rs1799983.

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις	Ποσότητες
DNA	100ng/ml	2μl
Ρυθμιστικό δ/μα DNA πολυμεράσης (Buffer) χωρίς Mg ⁺⁺	1X (10mM Tris-HCl pH 8.5, 25°C, 50mM KCl)	2.5μl
MgCl ₂	2.5mM	1.5μl
dNTPs	0.5mM	0.125μl
Forward primer	0.5μM	1μl
Reverse primer	0.5μM	1μl
Taq Polymerase(IMBB-FORTH, Hellas)	3-5u/μl	0.25μl
Απεσταγμένο H ₂ O		16.25μl
Τελικός Όγκος		25μl

Η αρχική αποδιάταξη του DNA έγινε στους 94°C για 5 min. Ακολούθησαν οι 35 κύκλοι της αντίδρασης PCR. Τα στάδια κάθε κύκλου εμπεριείχαν με τη σειρά αποδιάταξη του προιόντος στους 94°C για 30sec, υβριδοποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο στους 63°C για 30 sec και επέκταση της νέας αλύσου στους 72°C για 30 sec. Τέλος μετά την αποπεράτωση των 35 κύκλων ακολούθησε το τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 7 min.

Εν συνεχεία, 8μl από το πολλαπλασιασμένο προιόν της PCR επώαστηκε με 4.0 U από το περιοριστικό ένζυμο *BanII* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) στους 37°C για 1h, σε αντίδραση όγκου 20μl με 1X ρυθμιστικό διάλυμα (NEBuffer 4). Η ενδονουκλεάση *BanII* αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'...GRGCYC...3', όπου R και Y δύο οποιαδήποτε διαφορετικά νουκλεοτίδια. Αντικατάσταση της βάσης γουανίνης (G) από θυμίνη (T) στη νουκλεοτιδική θέση 1917 του eNOS οδηγεί σε αδυναμία πέψης από το ένζυμο *BanII* οπότε όταν έχουμε την ομόζυγη κατάσταση (T/T) στην ηλεκτροφόρηση εμφανίζεται μία μόνο ζώνη 457 bp. Η παρουσία του μείζονος αλληλομόρφου G σε ομόζυγη κατάσταση (G/G) στην προαναφερθείσα θέση οδηγεί την ενδονουκλεάση στην αναγνώριση μίας θέσης περιορισμού και επομένως στην πέψη του προιοντος PCR σε 2 θραύσματα μεγέθους 320 και 137 bp.

II.b Ανάλυση των πολυμορφισμών CTLA-4 rs231775 και rs3087243

Η ανίχνευση του πολυμορφισμού A/G στη θέση +49 του εξονίου 1 στο γονίδιο CTLA-4 επιτεύχθη με τη χρήση τεχνικής PCR και επώασης του τελικού προϊόντος με την ενδονουκλεάση *BbvI* για 1h στους 37°C.

Οι ποσότητες και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της αντίδρασης PCR για τον rs231775 πολυμορφισμό ήταν αντίστοιχες με αυτές του eNOS rs1799983. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο Forward 5'-CCA CGG CTT CCT TTC TCG TA-3' και Reverse 5'- AGT CTC ACT CAC CTT TGC AG-3'. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR ήταν οι εξής: αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 5min, ακολούθησαν 35 κύκλοι, καθένας εκ των οποίων συμπεριελάμβανε αποδιάταξη του προϊόντος στους 94°C για 1min, υβριδοποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο στους 68°C για 1min και επέκταση της νέας αλυσού στους 72°C για 1min. Το τελικό στάδιο επιμήκυνσης διήρκησε 7min στους 72°C. Αν η περιοριστική ενδονουκλεάση *BbvI* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) αναγνωρίσει την παρουσία της βάσης γουανίνης (G) στη θέση +49 (exon1), τότε πέπτει το προϊόν της PCR σε 2 θραύσματα μεγέθους 244 και 84 bp και αντίστοιχα προκαλείται αντικατάσταση της αλανίνης από θρεονίνη στη θέση 17 της αμινοτελικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Η αντικατάσταση αυτή δεν φαίνεται να έχει λειτουργική σημασία, πιθανόν όμως να βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με κάποιο άλλο «γειτονικό» γονίδιο. Όταν στην ίδια θέση παραμένει το A αλλήλιο τότε δεν ακολουθεί πέψη οπότε διατηρείται το αρχικό προϊόν 328bp. Για την αντίδραση πέψης χρησιμοποιήθηκε συνολικός όγκος 20μl αποτελούμενος από 7μl προϊόντος PCR, 2μl ρυθμιστικού διαλύματος NEBuffer 2 1X και 2U *BbvI*.

Ένας άλλος γενετικός πολυμορφισμός ο CT60 SNP (rs3087243), ο οποίος βρίσκεται στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου CTLA 4 ανιχνεύθηκε με την ίδια μεθοδολογία, αντίδραση PCR με επώαση του τελικού της προϊόντος με το ένζυμο περιορισμού *NlaIII* για 1h στους 37°C.

Η σύσταση της αντίδρασης PCR συνολικού όγκου 25μl, περιγράφεται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις PCR για CTLA-4 rs3087243 .

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις	Ποσότητες
DNA	100ng/ml	2μl
Ρυθμιστικό δ/μα DNA πολυμεράσης (Buffer) χωρίς Mg⁺⁺	1X (10mM Tris-HCl pH 8.5, 25°C, 50mM KCl)	2.5μl
MgCl₂	2.5mM	0.5μl
dNTPs	0.5mM	0.15μl
Forward primer	0.5μM	1μl
Reverse primer	0.5μM	1μl
Taq Polymerase(IMBB-FORTH, Hellas)	3-5u/μl	0.4μl
Απεσταγμένο H₂O		17μl
Τελικός Όγκος		25μl

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR ήταν ο ευθύς 5'- TCA TGA GTC AGC TTT GCA CC -3' και ο ανάστροφος 5'- CTG AGA AAG CAG GCG GTA AG -3'

Οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν στους 94°C για 2 min για την αρχική αποδιάταξη του DNA. Οι 32 κύκλοι της αντίδρασης PCR περιείχαν 3 στάδια, αποδιάταξη του προϊόντος στους 94°C για 30sec, υβριδοποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο στους 55°C για 30 sec και επέκταση της νέας αλύσου στους 72°C για 30 sec. Με την ολοκλήρωση των 32 κύκλων, το τελικό στάδιο επιμήκυνσης προγραμματίστηκε στους 72°C για 5 min.

Εν συνεχεία, 8μl από το πολλαπλασιασμένο προϊόν της PCR επώαστηκε με 4.0 U από την περιοριστική ενδονουκλεάση *NlaIII* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), σε αντίδραση τελικού όγκου 20μl με 1X ρυθμιστικό διάλυμα (NEBuffer 4) και 0.4μl BSA(Bovine Serum Albumin). Η ενδονουκλεάση *NlaIII* αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'...CATG...3' στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου CTLA4. Αντικατάσταση της βάσης αδενίνης (A) με γουανίνη (G) στην παραπάνω αλληλουχία εμποδίζει τη δράση του ενζύμου *NlaIII* με αποτέλεσμα να διατηρείται το αρχικό προϊόν της PCR μήκους 170bp. Αντίθετα, η παραμονή του ελάσσονος αλληλομόρφου A οδηγεί σε πέψη του προϊόντος των 170bp σε 2 θραύσματα μεγέθους 100 και 70bp.

Π.ε Ανάλυση των πολυμορφισμών EDN-1 rs2071942 και rs5370.

Δύο μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί μελετήθηκαν στο γονίδιο της ενδοθηλίνης 1, ο ένας στη νουκλεοτιδική θέση +356 στο ιντρόνιο 4(rs2071942) και ο άλλος στη θέση +61 στο εξόνιο 5 (rs5370) της EDN-1.

Για την ανίχνευση του πρώτου SNP χρησιμοποιήθηκαν ο ευθύς 5' - CAAACCGATGTCCTCTGTA -3' και ο ανάστροφος εκκινητής 5' - ACCAAACACATTTCCCTATT- 3'. Η PCR αντίδραση προγραμματίστηκε για 38 κύκλους, μετά την αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 5min. Κάθε κύκλος περιελάμβανε αποδιάταξη του προϊόντος στους 94°C για 30sec, υβριδοποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο στους 58°C για 30sec και επέκταση της νέας αλυσούσους στους 72°C για 45sec. Ακολούθησε το τελικό στάδιο επιμήκυνσης διάρκειας 7 min στους 72°C. Ο όγκος αυτής της αντίδρασης ήταν 50μl και αναλυτικά τα συστατικά της απεικονίζονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Σύσταση αντίδρασης PCR EDN-1 rs2071942.

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις	Ποσότητες
DNA	100ng/ml	3μl
Ρυθμιστικό δ/μα DNA πολυμεράσης (Buffer) χωρίς Mg⁺⁺	1X (10mM Tris-HCl pH 8.5, 25°C, 50mM KCl)	5μl
MgCl₂	2.5mM	2.5μl
dNTPs	0.5mM	0.375μl
Forward primer	0.5μM	1μl
Reverse primer	0.5μM	1μl
Taq Polymerase(IMBB-FORTH, Hellas)	3-5u/μl	0.5μl
Απεσταγμένο H₂O		35.5μl
Τελικός Όγκος		50μl

Η επώαση με 6U από το περιοριστικό ένζυμο *Taq^qI* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) έγινε στους 65C για 3h, με όγκο αντίδρασης 20μl, εκ των οποίων 8μl προϊόντος PCR, 1X ρυθμιστικό διάλυμα (NEBuffer 4) και 0,4 μl BSA. Η ενδονουκλεάση *Taq^qI* αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'...TCGA...3' όταν στη θέση +356 στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου της ενδοθηλίνης υπάρχει η βάση γουανίνη (G), οπότε και πέπτει το προϊόν της PCR μήκους 353bp σε 2 θραύσματα 203 και 150bp αντίστοιχα. Αν στην ίδια θέση βρίσκεται το έλασσον αλληλόμορφο A, τότε το ένζυμο

Taq^aI δεν δύναται να δράσει στην εν λόγω αλληλουχία οπότε και διατηρείται το αρχικό προϊόν της PCR μήκους 353bp.

Τέλος, ο πολυμορφισμός rs5370 του γονιδίου EDN-1 μελετήθηκε με τη χρήση τεχνικής PCR και ακολούθως RFLP με το περιοριστικό ένζυμο *CaC8 I* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Οι εκκινητές της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ήταν ο ευθύς με αλληλουχία 5'- CTTTTGCCAAAGGGTGATTT -3' και ο ανάστροφος 5'- TGATGGAAGCCAGTGAAGA -3'. Σε τελικό όγκο 20μl χρησιμοποιήθηκαν 0.25μl από κάθε dNTP, 1μl από κάθε εκκινητή, 2.5μl ρυθμιστικού διαλύματος χωρίς Mg⁺⁺, 3μl MgCl₂ 0.4μl *Taq* πολυμεράση (IMBB-FORTH, Hellas). Τα αντιδραστήρια της PCR ετέθησαν στον θερμικό κυκλοποιητή, όπου μετά την αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 5min, ακολούθησαν οι 38 κύκλοι της αντίδρασης. Καθένας από αυτούς περιελάμβανε 3 στάδια, την αποδιάταξη του προϊόντος στους 94°C για 30sec, υβριδοποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο στους 58°C για 30sec και επέκταση της νέας αλυσού στους 72°C για 30sec. Το τελικό στάδιο επιμήκυνσης διήρκησε 7min σε θερμοκρασία 72°C. Εν συνεχεία 10μl από το τελικό προϊόν PCR επώαστηκαν με 2U *CaC8 I* και 2μl ρυθμιστικού διαλύματος NEBuffer 4, για 3h στους 37°C. Η ενδονουκλεάση *CaC8 I* αναγνωρίζει την παρουσία της βάσης γουανίνης (G) στη θέση +61 στο εξόνιο 5 της EDN-1 με αποτέλεσμα να πέπτει το προϊόν της PCR μήκους 363bp σε 2 θραύσματα μεγέθους 243 και 120 bp. Η παρουσία του αλληλομόρφου G στην εν λόγω θέση οδηγεί κατ'αντιστοιχία σε αντικατάσταση του αμινοξέος ασπαραγίνη από λυσίνη στη θέση 198 της αλληλουχίας του πρωτεϊνικού μορίου της ενδοθελίνης 1.

Πίνακας 6. Σύσταση αντίδρασης PCR EDN-1 rs5370.

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις	Ποσότητες
DNA	100ng/ml	3μl
Ρυθμιστικό δ/μα DNA πολυμεράσης (Buffer) χωρίς Mg⁺⁺	1X (10mM Tris-HCl pH 8.5, 25°C, 50mM KCl)	2.5μl
MgCl₂	2.5mM	3μl
dNTPs	0.5mM	0.25μl
Forward primer	0.5μM	1μl
Reverse primer	0.5μM	1μl
Taq Polymerase(IMBB-FORTH, Hellas)	3-5u/μl	0.4μl
Απεσταγμένο H₂O		8.1μl
Τελικός Όγκος		20μl

III. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να διαχωριστούν μόρια DNA με κριτήριο το μήκος τους. Χρησιμοποιείται ιδιαίτερος στο διαχωρισμό τμημάτων DNA που έχουν προκύψει μετά από επεξεργασία με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

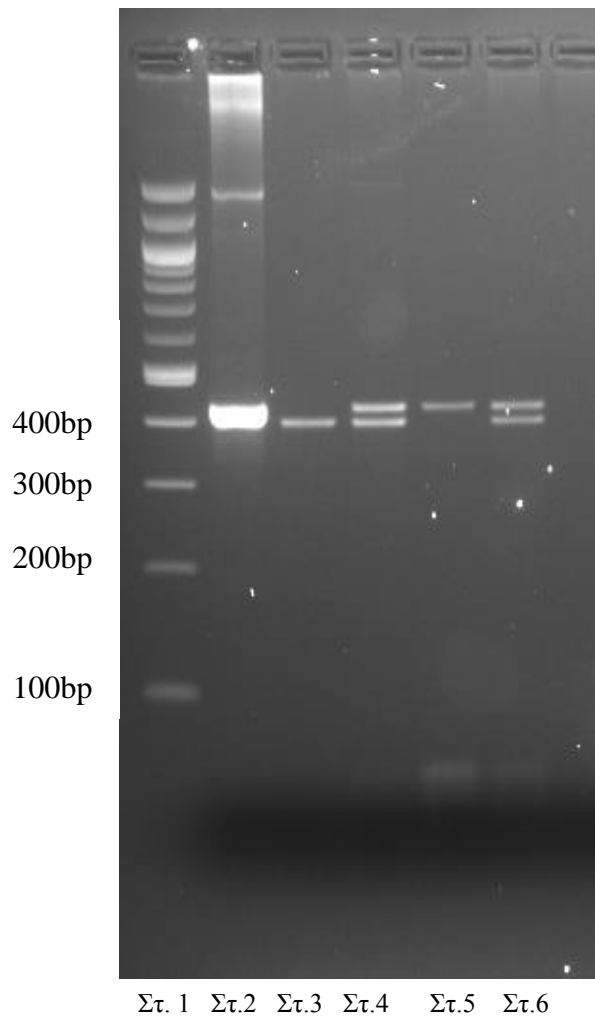
Τα δείγματα DNA τοποθετούνται σε μια χαραγή που έχει δημιουργηθεί στο ένα άκρο μιας πλάκας από πήκτωμα αγαρόζης και καλύπτονται από ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Με την τοποθέτηση ηλεκτροδίων στα άκρα της πλάκας εξασφαλίζεται η εφαρμογή τάσης μεταξύ τους. Η τάση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση των διαφόρων θραυσμάτων DNA προς το θετικό πόλο, καθώς αποτελούνται από νουκλεοτίδια που είναι αρνητικά φορτισμένα (η φωσφορική ομάδα λόγω απόδοσης πρωτονίων φέρει αρνητικό φορτίο). Επειδή όμως η ταχύτητα μετακίνησης ενός θραύσματος εξαρτάται από το μέγεθός του (τα μεγάλα θραύσματα κινούνται πιο αργά από τα μικρά) σε μια δεδομένη χρονική στιγμή τα μικρότερα θραύσματα «προπορεύονται» έναντι των μεγαλύτερων κατά την κίνησή τους προς το θετικό πόλο, με αποτέλεσμα να μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους. Χρησιμοποιώντας ένα γνωστού μεγέθους θραύσμα DNA (ladder) ως μέτρο σύγκρισης, δίνεται η δυνατότητα προσδιορισμού του μεγέθους των θραυσμάτων DNA που έχουν προκύψει από την αντίδραση PCR-RFLP, σε ζεύγη βάσεων (bp). Η διαδικασία έχει ολοκληρωθεί όταν υπάρχει πλήρης διαχωρισμός των ζωνών του μάρτυρα και των υπό μελέτη κλασμάτων DNA.

Στην παρούσα μελέτη η ηλεκτροφόρηση διενεργήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Για την παρασκευή του πηκτώματος χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (Tris Borate EDTA) 0.5X και βρωμιούχο αιθίδιο. Το τελευταίο συνιστά μια φθορίζουσα στο υπεριώδες φως ουσία. Ο φθορισμός της ενισχύεται κατά 20 φορές περίπου μετά την πρόσδεσή της στο DNA με αποτέλεσμα να γίνονται ορατές οι ζώνες των θραυσμάτων DNA μετά τον διαχωρισμό τους από την ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα αγαρόζης.

Αρχικά ηλεκτροφορήθηκαν όλα τα προϊόντα της αντίδρασης PCR προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της εκάστοτε αντίδρασης. Η εικόνα που ελήφθη στο υπεριώδες φως από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων eNOS intron4 VNTR παρατίθεται παρακάτω (εικόνα 13). Όσον αφορά στους υπόλοιπους πολυμορφισμούς, μετά το πέρας της επώασης με το αντίστοιχο ένζυμο περιορισμού πραγματοποιήθηκε

και πάλι ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης δίνοντας τα αποτελέσματα που φαίνονται στις εικόνες 14,15,16,17, και 18.

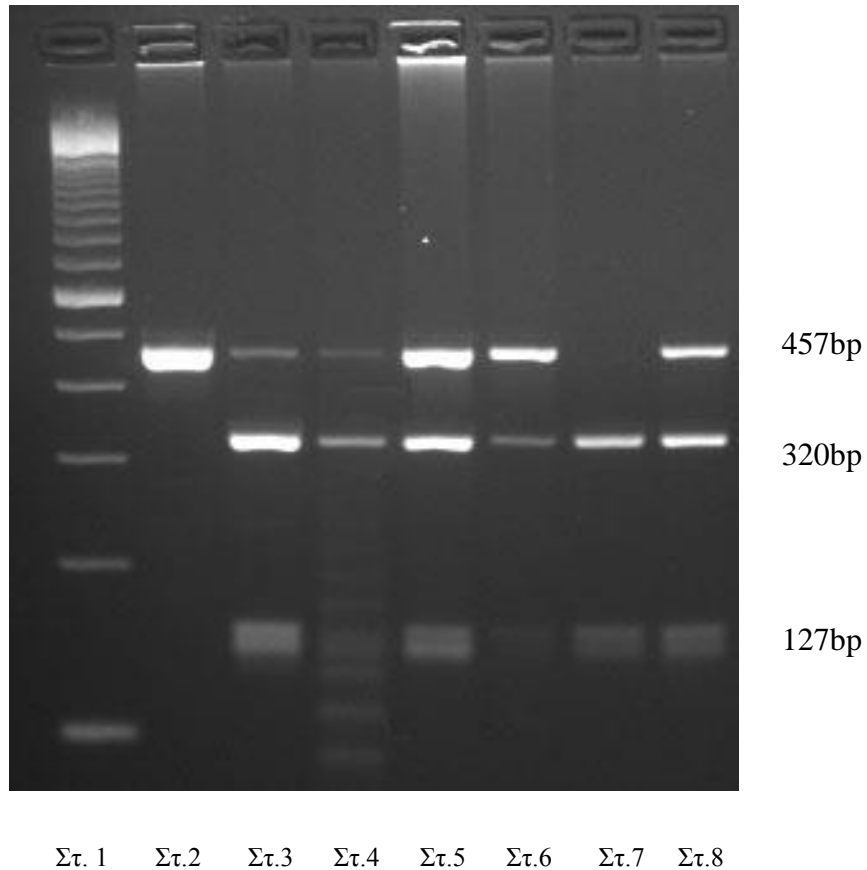
Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση αгарόζης για eNOS intron4 VNTR.



Η ζώνη μεγέθους **420bp** αντιστοιχεί στο θραύσμα DNA το οποίο περιέχει 5 επαναλήψεις από την αλληλουχία **27bp** και είναι το **αλληλόμορφο b**. Στην **στήλη 5** απεικονίζεται ο ομοζυγώτης για το αλληλίο b, (**b/b**). Αντίστοιχα η ζώνη μεγέθους **393bp** αναπαριστά το τμήμα DNA με τις 4 επαναλήψεις της αλληλουχίας 27bp και είναι το **αλληλόμορφο a**. Στην **στήλη 3** απεικονίζεται ο ομοζυγώτης **a/a** για το αλληλίο a, ενώ στη **στήλη 4 ή 6** ο ετεροζυγώτης **a/b** που φέρει ένα a και ένα b αλληλίο.

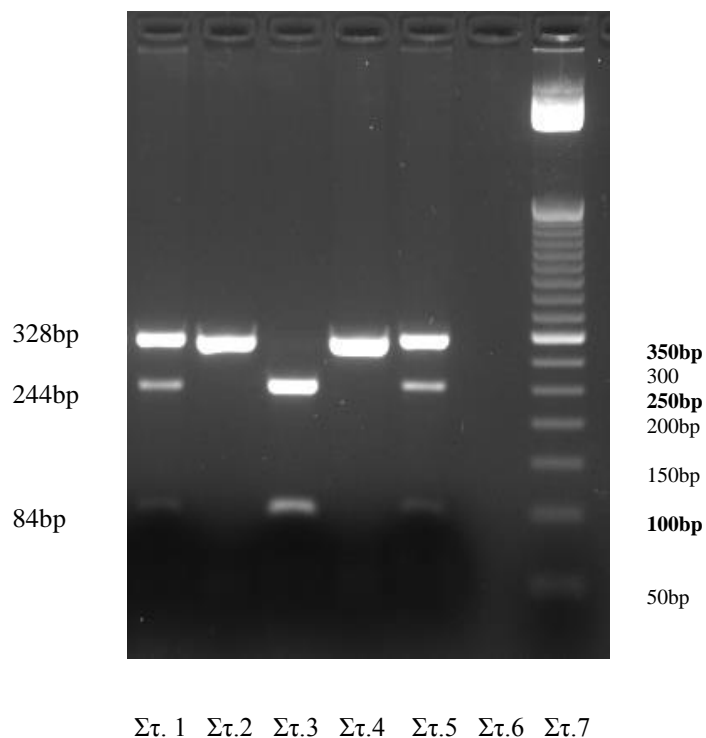
Η σύγκριση έγινε με χρήση DNA ladder μήκους **100bp** ως δείκτη αναφοράς.

Εικόνα 14. Προϊόντα πολυμορφισμού μήκους θραύσματος εκ περιορισμού G894T στο εξόνιο 7 του γονιδίου eNOS.



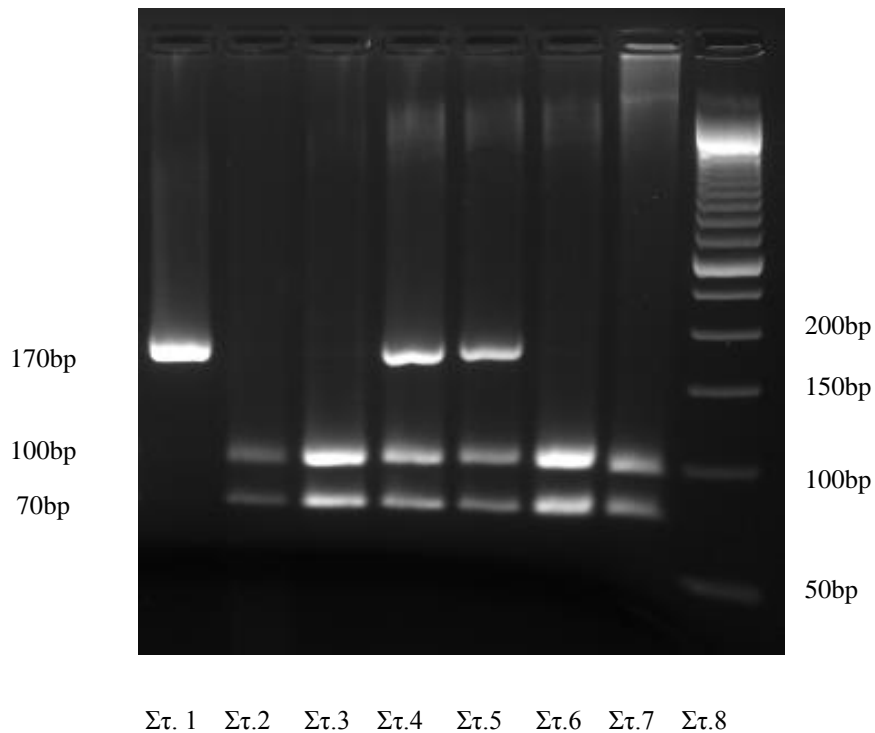
Στην εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% φαίνονται τα κλασματα του DNA μετά τη δράση της ενδονουκλεάσης **Ban II** στο προϊόν PCR (μήκους 457bp). Στην **στήλη 2** έχουμε μία μόνο ζώνη **457bp** που αντιστοιχεί στον μη-πολυμορφικό γονότυπο TT, στην **στήλη 7** έχουμε 2 ζώνες (**320 και 127bp**) που αντιστοιχούν στον πολυμορφικό γονότυπο GG και τέλος ο σχηματισμός 3 ζωνών(**457, 320, και 127bp**) όπως στη **στήλη 5 ή 8** ανήκει στον ετερόζυγο πολυμορφικό γονότυπο GT. Το μέγεθος του DNA μάρτυρα ήταν 100bp.

Εικόνα 15. Εικόνα ηλεκτροφόρησης RFLP CTLA4 exon 1 +49 A/G.



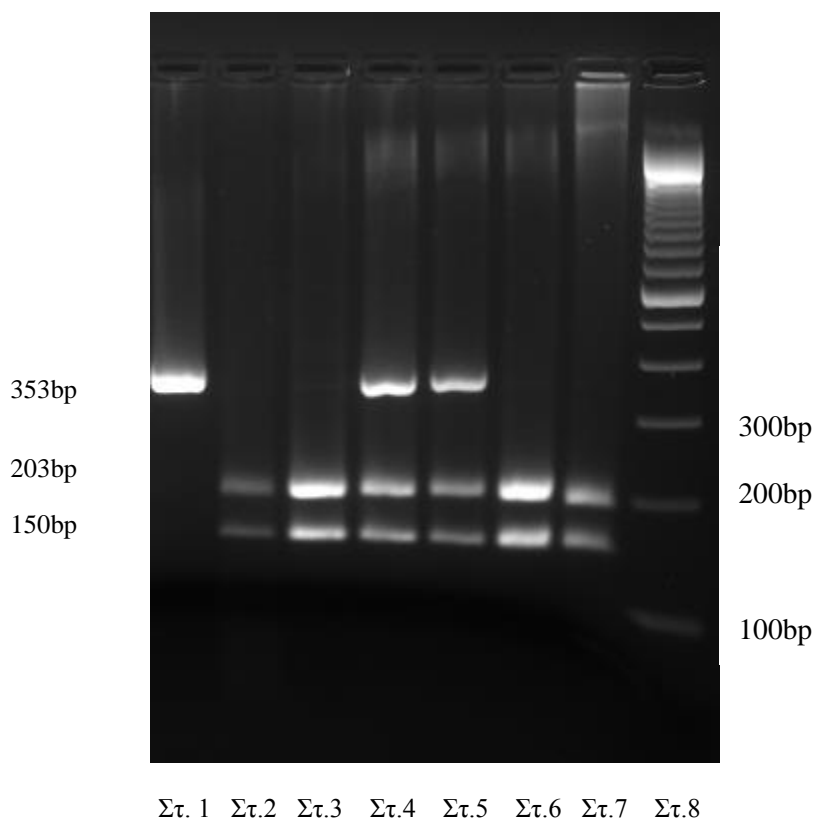
Το περιοριστικό ένζυμο **BbvI** αναγνωρίζει την παρουσία του αλληλομόρφου G και πέπτει το προϊόν της PCR (328bp) σε 2 κλάσματα μεγέθους **244 και 84 bp**. Ο γονότυπος **GG** απεικονίζεται στη **στήλη 3**. Η ύπαρξη του αλληλομόρφου A στη θέση +49 στο εξόνιο 1 του γονιδίου CTLA-4 δίνει μία μόνο ζώνη **328bp** στην ηλεκτροφόρηση (**στήλη 2, 4**) και αντιστοιχεί στο γονότυπο TT. Οι τρεις ζώνες **328, 244 και 84bp** (**στήλη 1, 5**) απαντώνται στον ετεροζυγότη GT. Ο DNA ladder που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ήταν μεγέθους **50bp**.

Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR-RFLP CTLA-4 CT60 σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.



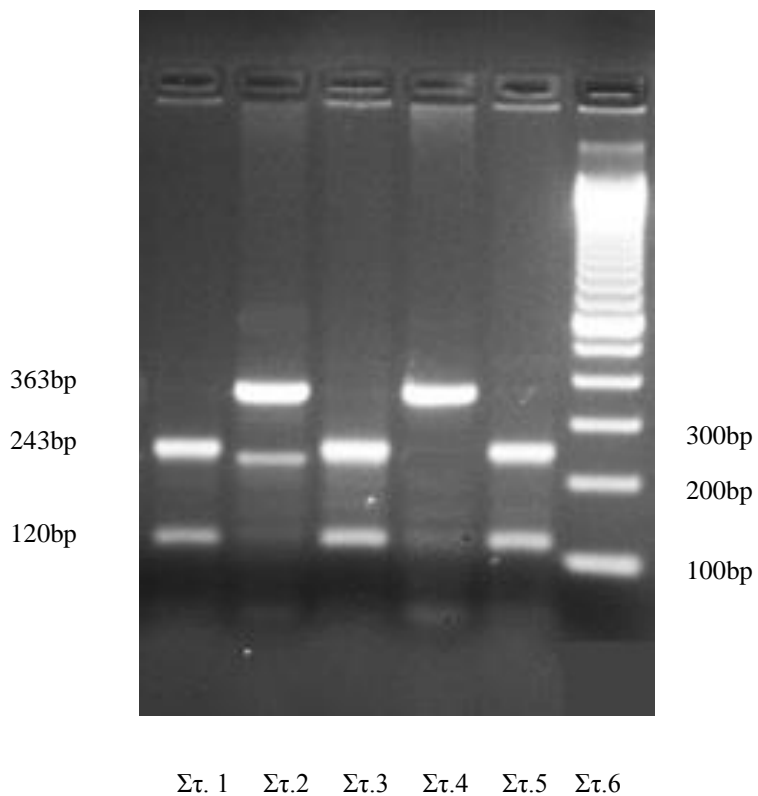
Στην παραπάνω εικόνα ηλεκτροφόρησης διακρίνονται οι γονότυποι που προέκυψαν μετά την επώαση των προϊόντων PCR (170bp) με την ενδονουκλεάση NlaIII. Στην **στήλη 1** φαίνεται ο ομοζυγος γονότυπος GG με ζώνη μήκους **170bp**. Η παρουσία του μείζονος αλληλομόρφου A οδηγεί σε πέψη και δημιουργία 2 κλασμάτων DNA μεγέθους **100 και 70bp**. Στην **στήλη 2, 3** απεικονίζεται ο ομόζυγος γονότυπος AA, ενώ στην **στήλη 4, 5** ο ετεροζυγώτης AG με τρεις ζώνες που αντιστοιχούν σε κλάσματα DNA μεγέθους **170, 100 και 70bp**. Ο DNA ladder που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ήταν μεγέθους **50bp**.

Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για τον πολυμορφισμό EDN-1 rs2071942.



Στη **στήλη 2 ή 3 ή 6 ή 7** φαίνεται ο γονότυπος **GG** με 2 ζώνες μεγέθους **203bp** και **150bp** αντίστοιχα, ο οποίος έχει προκύψει από τη δράση της ενδονουκλεάσης *Taq^αI* στη θέση +356 στο ιντρόνιο 4 της EDN-1. Στη **στήλη 1** έχει παραμείνει το άπεπτο προϊόν της PCR μήκους **353bp** εικόνα που αντιστοιχεί στον ομοζυγότη για το έλασσον αλληλόμορφο A, (AA). Η ετερόζυγη κατάσταση **AG** απεικονίζεται στη **στήλη 4 ή 5**, με 3 ζώνες μεγέθους **353bp, 203bp και 150bp**. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των DNA θραυσμάτων, DNA οδηγός μεγέθους **100bp**.

Εικόνα 18. Απεικόνιση των γονοτύπων του πολυμορφισμού EDN-1 rs5370 από την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.



Το ένζυμο κοπής *CaC8 I* περιορίζει το προϊόν της PCR μεγέθους 363bp σε δύο κλάσματα παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου G. Έτσι ο γονότυπος **GG** εκφράζεται στην ηλεκτροφόρηση με 2 ζώνες στα **243bp** και **120 bp**, **στήλη 2 ή 4**, ο γονότυπος **GT** με 3 ζώνες **363bp, 243bp και 120bp**, **στήλη 7** και ο ομόζυγος για το έλασσον αλληλόμορφο T γονότυπος **TT** με μία μόνο ζώνη μεγέθους **363bp**. Για τη σύγκριση του μεγέθους των κλασμάτων DNA του πολυμορφισμού rs5370 χρησιμοποιήθηκε ως οδηγός DNA ladder 50bp.

11. Ασθενείς και συλλογή στοιχείων για γεωστατιστική μελέτη ΠΧΚ

Κατά τη διάρκεια του έτους 2011, 245 ασθενείς με ΠΧΚ που παρακολουθούνται στη Γαστρεντερολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου(κέντρο αναφοράς ηπατικών νοσημάτων στην Κρήτη) και σε 3 Περιφερειακά νοσοκομεία του νησιού από τον Ιανουάριο 1990 έως το Δεκέμβριο 2010, ενημερώθηκαν για το σκοπό της μελέτης, ζητήθηκε άδεια για ανασκόπηση των ιατρικών τους φακέλων και ταυτοποιήθηκε ο τόπος διαμονής τους για τα τελευταία 15 έτη. Σε περίπτωση που οι ασθενείς είχαν αποβιώσει, η άδεια και οι περαιτέρω πληροφορίες εδόθησαν από το/τη σύζυγο ή άλλους συγγενείς Α βαθμού. Οι διαμένοντες στην Κρήτη ακόμα και για λιγότερο των τελευταίων 15 ετών συμπεριελήφθησαν στους υπολογισμούς της επίπτωσης και του επιπολασμού της ΠΧΚ στην Κρήτη, όχι όμως και στη χώρο-χρονική ανάλυση της νόσου στο νησί. Συνολικά 222 ήταν το σύνολο των ασθενών που συμπεριελήφθησαν στη χώρο-χρονική μελέτη, που αποτελούν το 89.42% των διαγνωσμένων με ΠΧΚ ασθενών στην Κρήτη. Όλοι οι ασθενείς πληρούσαν τουλάχιστον 2 εκ των τριών διεθνώς αποδεκτών διαγνωστικών κριτηρίων για την ΠΧΚ: α) βιοχημικά ευρήματα χολοστατικού συνδρόμου, β) θετικός τίτλος AMA>1:40 με τεχνική έμμεσου ανοσοφθορισμού, και/ή γ) ιστολογικά ευρήματα συμβατά με ΠΧΚ. Όλοι οι AMA αρνητικοί ασθενείς με κλινικά ευρήματα ΠΧΚ είχαν υποβληθεί σε βιοψία ήπατος η οποία επιβεβαίωνε τη διάγνωση Αυτοάνοσης Χολαγγειίτιδας.

Τα ιατρικά δεδομένα που ανασκοπήθηκαν ήταν το φύλο, η ημερομηνία και ο τόπος γέννησης, ο τόπος διαμονής τα τελευταία 15 έτη, η ημερομηνία διάγνωσης, η ηλικία διάγνωσης, τα συμπτώματα στην εμφάνιση της νόσου, Mayo risk score, τα ιστολογικά χαρακτηριστικά από τη βιοψία ήπατος στη διάγνωση της ΠΧΚ, η έκβαση νόσου(εν ζωή-θανόντες). Τα αίτια θανάτου διαχωρίστηκαν σε σχετιζόμενα και μή με την ηπατική νόσο. Το στάδιο της νόσου κατηγοριοποιήθηκε βάσει της ιστολογικής ταξινόμησης κατά Ludwig σε πρώιμο(στάδια I–II) ή προχωρημένο(στάδια III–IV). Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.

12. Μεθοδολογία χρόνο-χωρικής ανάλυσης.

Η γεωγραφική περιοχή της μελέτης συνίσταται στους τέσσερις νομούς της Κρήτης (Χανιά, Ρέθυμνο, Ηράκλειο, Λασιθί). Στατιστικά στοιχεία για τον πληθυσμό της Κρήτης ελήφθησαν από την Ελληνική Στατιστική Αρχή (ΕΛ.ΣΤΑΤ) για τα έτη 1980-2010. Ο επιπολασμός υπολογίστηκε τόσο για κάθε νομό ξεχωριστά, όσο και για ολόκληρο το νησί, ως περιπτώσεις ΠΧΚ / 1.000.000, λαμβάνοντας υπόψη την απογραφή του Ελληνικού πληθυσμού το έτος 2001.

Η ετήσια επίπτωση της νόσου υπολογίστηκε ως μέτρηση των διαγνωσθέντων περιστατικών με ΠΧΚ στην Κρήτη, με χρήση των δεδομένων από την απογραφή του πληθυσμού το 1981 για το έτος 1990, από την απογραφή του πληθυσμού το 1991 για την περίοδο 1991-2000 και από την απογραφή του 2001 για τα έτη 2001-2010.

Χρόνο-χωρικές μέθοδοι εφαρμόστηκαν στη μελέτη αυτή. Ο αριθμός των ασθενών ανά 1000 άτομα πληθυσμού ανά νομό υπολογίστηκε προκειμένου να οριστεί κλίμακα αναφοράς. Χάρτες κατανομής της πυκνότητας και των χωρικών συναθροίσεων δημιουργήθηκαν, με χρήση καταρχάς του τόπου γεννήσεως και δευτερευόντως του τόπου διαμονής. Οι χάρτες αυτοί απεικονίζουν τα δεδομένα μας ανά πενταετία, από το 1990 έως το 2010, με τη μορφή έγχρωμων κηλίδων ανάλογα με τη χρονική περίοδο (χάρτες πυκνότητας) και με τη μορφή έγχρωμων περιοχών σε κάθε δήμο του νησιού με γνώμονα τον αριθμό των ασθενών ανά 1000 άτομα πληθυσμού (χωρικές συναθροίσεις).

Ακολούθως εφαρμόστηκε χωρικό στατιστικό τεστ μέτρησης της χωρικής αυτοσυσχέτισης (local Geary's C statistic) με επίπεδο εμπιστοσύνης 95% προκειμένου να ανιχνευθεί πιθανή σημαντική διαφορά στη χωρική κατανομή βάσει τόπου γέννησης ή τόπου καταγωγής και κατόπιν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χωρικής παρεμβολής Kriging για να δημιουργηθεί ένας χάρτης πρόβλεψης της ΠΧΚ στην Κρήτη.

Ως τεχνική γεωστατιστικής μοντελοποίησης η προαναφερθείσα μέθοδος λαμβάνει υπόψη την υπάρχουσα χωρική δομή μιας γεωγραφικά προσδιορισμένης πληροφορίας και θεωρείται το καλύτερο μέσο για την πρόβλεψη μη δειγματοληπτικών τοποθεσιών, διότι ελαχιστοποιεί το μέσο υπολειπόμενο σφάλμα^{525,526}.

Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν εν συνεχεία για τον υπολογισμό ανά 50 km² σε όλο το νησί της Κρήτης, ακόμα και σε περιοχές που δεν υπήρχαν δεδομένα από το δείγμα της μελέτης. Ο χάρτης πρόβλεψης αναφέρεται σε περιοχές στην Κρήτη όπου δεν υπήρχαν ασθενείς από τη βάση δεδομένων μας, αλλά με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατό με τη χρήση μαθηματικών πολωνύμων να δημιουργηθεί ένα ήμβριογραμμα. Το ήμβριογραμμα και η συνδιακύμανση μεταβλητών(ασθενείς, απόσταση) συνιστούν την μαθηματική πληροφορία που βρίσκεται στο μοντέλο Kriging και ποσοτικοποιεί την υπόθεση ότι τα στοιχεία που βρίσκονται πλησίον και τείνουν να ομοιάζουν περισσότερο από τα στοιχεία που βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση.

Ο κίνδυνος εμφάνισης της ΠΧΚ σε κάθε σημείο της Κρήτης ανιχνεύθηκε με εφαρμογή πολυπαραγοντικής ανάλυσης βάσει 5 παραμέτρων, το ιστολογικό στάδιο της νόσου κατά Ludwig, την ύπαρξη piecemeal necrosis στη βιοψία ήπατος, το Mayo risk score στη διάγνωση και το σύνολο του πληθυσμού ανά περιφέρεια καθώς και τον αριθμό των ασθενών ανα περιφέρεια^{527,528}.

Το Arc map's toolbox λογισμικό εφαρμόστηκε, ώστε να χαραχθεί η χωρο-χρονική πορεία της ΠΧΚ στην Κρήτη. Εκτιμήθηκε εν συνεχεία εάν αυτή η πορεία της νόσου είχε τυχαία ή μη κατεύθυνση, με τη χρήση του arc map's toolbox σε σχέση με τα αποτελέσματα του τεστ χωρικής αυτοσυσχέτισης Geary's C όπως προαναφέρθηκε.

13. Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων διενεργήθηκε με την εφαρμογή του στατιστικού πακέτου SPSS (SPSS Inc.Chicago, IL, USA). Η αξιολόγηση των δεδομένων που συλλέχθηκαν μετά τη συμπλήρωση των ειδικών ερωτηματολογίων και τη διεξαγωγή των εργαστηριακών εξετάσεων έγινε με σύγκριση μεταξύ α) ασθενών και υγιών εθελοντών και β) συγγενών Α βαθμού και υγιών εθελοντών.

Για την ανάλυση των κατηγορικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό κριτήριο χ^2 και το ακριβές τεστ του Fisher (Fisher's exact probability test), όταν οι

συχνότητες ήταν μικρότερες του 5. Όλες οι παράμετροι που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές από τη μονοπαραγοντική ανάλυση των στοιχείων από το ιατρικό, χειρουργικό, γυναικολογικό-αναπαραγωγικό ιστορικό, τις έξεις και τον τρόπο ζωής, ή ακόμα και άλλες οι οποίες έχουν βρεθεί ως πιθανοί παράγοντες κινδύνου σε προηγούμενες μελέτες, εισήχθησαν προς επεξεργασία σε πολυπαραγοντική ανάλυση με χρήση του μοντέλου πολλαπλής παλινδρόμησης κατά βήματα και με την προς τα εμπρός μέθοδο επιλογής των ανεξάρτητων μεταβλητών (forward step-wise logistic regression model, 0.05 for entry and 0.10 for removal probability). Υπολογίστηκε ο σχετικός κίνδυνος (odds ratio, OR) και το διάστημα εμπιστοσύνης (confidence interval CI) ως εκτίμηση της συσχέτισης περιβαλλοντικών παραγόντων με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Η τιμή του p μικρότερη από 0.05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Οι συγκρίσεις για τις συνεχείς μεταβλητές πραγματοποιήθηκαν με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann–Whitney U -test. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm σταθερό λάθος για τις ποσοτικές μεταβλητές.

Για τη σύγκριση της συχνότητας των γονοτύπων και των αλληλομόρφων των έξι υπό μελέτη γενετικών πολυμορφισμών μεταξύ ασθενών-μαρτύρων, συγγενών Α' βαθμού-μαρτύρων, καθώς και για τον έλεγχο αποκλίσεων από την ισορροπία Hardy-Weinberg Equilibrium χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 . Η ίδια δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε και για τη σύγκριση της συχνότητας των γονοτύπων και αλληλομόρφων μεταξύ AMA αρνητικών - AMA θετικών ασθενών και ασθενών με νόσο πρώιμου ή προχωρημένου σταδίου. Ως δείκτης του σχετικού κινδύνου υπολογίστηκε ο λόγος σχετικών πιθανοτήτων OR με 95% διάστημα εμπιστοσύνης. Ο προσδιορισμός του επιπέδου σημαντικότητας των OR και του λόγου ετεροζυγώτες/ομοζυγώτες έγινε με το Fisher's exact test.

Στη γεωστατιστική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν χρόνο-χωρικές μέθοδοι με το λογισμικό Gis-ArcMap 9.3. Εφαρμόστηκε χωρικό στατιστικό τεστ local Geary's C statistic), με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, για να ανιχνευθεί πιθανή στατιστικά σημαντική διαφορά στη χωρική κατανομή της νόσου βάσει τόπου γεννήσεως ή τόπου καταγωγής. Κατόπιν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Kriging για να δημιουργηθεί ένας χάρτης πρόβλεψης της ΠΧΚ στην Κρήτη. Ο κίνδυνος εμφάνισης της ΠΧΚ σε κάθε σημείο της Κρήτης ανιχνεύθηκε με εφαρμογή πολυπαραγοντικής ανάλυσης 5 παραμέτρων (το ιστολογικό στάδιο της νόσου κατά Ludwig, την ύπαρξη piecemeal

necrosis στη βιοψία ήπατος, το Mayo risk score στη διάγνωση, το σύνολο του πληθυσμού και τον αριθμό των ασθενών ανά περιφέρεια). Το Arc map's toolbox λογισμικό εφαρμόστηκε, ώστε να χαραχθεί η χωρο-χρονική πορεία της ΠΧΚ στην Κρήτη και εν συνεχεία εκτιμήθηκε η τυχαία ή μη κατεύθυνση, με τη χρήση του arc map's toolbox σε σχέση με τα αποτελέσματα του τεστ χωρικής αυτοσυσχέτισης Geary's C. Η στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση του SPSS (έκδοση 18, SPSS Inc.Chicago, IL, USA). Οι συγκρίσεις μεταξύ AMA θετικών και αρνητικών ασθενών έγιναν για τις συνεχείς μεταβλητές με το Student's t-test και η τιμή $P < 0.05$ θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντική.

14. Αποτελέσματα

14.1 Αποτελέσματα κλινικής έρευνας

I. Γενικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΠΧΚ στην Κρήτη

Οι 111(94 θήλεις) ασθενείς με ΠΧΚ είχαν μέση ηλικία 64.8 ± 11.9 έτη (37-80έτη), το 91% εξ αυτών, (86 θήλεα στο σύνολο) ήταν AMA(+) θετικοί και 10/111(οι 8 θήλεις) ήταν AMA(-) αρνητικοί. Σαράντα ένας ασθενείς (41/107) είχαν θετικά ANA (38.3%) στον ορό τους, δεκαεννέα ασθενείς (19/101) είχαν θετικά SMA (18,8%) και το 75.5% του συνόλου είχαν αυξημένες τιμές ανοσοσφαιρίνης IgM ορού (φυσιολογικά όρια 27-170mg/dl), ενώ η μέση τιμή της ήταν $IgM=330.3 \pm 227.7$ mg/dl. Η μέση ηλικία και η μέση τιμή του Mayo risk score κατά τη διάγνωση ήταν 56.87 ± 11.42 έτη και 4.7 ± 1.6 , αντίστοιχα. Ο μέσος χρόνος παρακολούθησης από την αρχική διάγνωση έως το πέρας της μελέτης (Δεκέμβριος 2010) ήταν 91.7 ± 61 μήνες. Οι 81 ασθενείς με ΠΧΚ (8 AMA αρνητικοί) είχαν νόσο πρώιμου σταδίου (Ludwig stage I-II) και οι 30 (2 AMA αρνητικοί) νόσο προχωρημένου σταδίου (Ludwig stage III-IV). Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου κατά τη διάγνωση, όπως ανέφερε η ομάδα των ασθενών με ΠΧΚ Κρητικής καταγωγής ήταν ο κνησμός σε 45/109 ασθενείς (3 AMA αρνητικοί), το αίσθημα καταβολής σε 45/109 ασθενείς (4 AMA αρνητικοί), η ξηρότητα στόματος σε 29/109 ασθενείς (1 AMA αρνητικών) και η ξηρότητα οφθαλμών σε 27 ασθενείς (1 AMA αρνητικός).

Ενενήντα έξι ασθενείς εδέχθησαν να υποβληθούν σε βιοψία ήπατος, ενώ οι υπόλοιποι 15 αρνήθηκαν. Στο 59.8% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε βιοψία ήπατος δεν ανευρέθησαν ιστολογικά χαρακτηριστικά στεάτωσης, το 28.7% είχε ήπια, το 9.2% μέτριου βαθμού και το 2.3% σοβαρού βαθμού ηπατική στεάτωση. Διαβρωτική νέκρωση (piecemeal necrosis) ανιχνεύθηκε στο 70.6% των ηπατικών βιοψιών που μελετήθηκαν μεταξύ των ασθενών (44.7% ήπια – 24.7% μετρίου βαθμού – 1.2% σοβαρού βαθμού).

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρόλο που 5 ασθενείς (4 θήλεα - 1 ΑΜΑ αρνητικός) ήταν ήδη θανόντες κατά την περίοδο αποστολής του ενημερωτικού γράμματος, οι συγγενείς Α βαθμού αυτών έδωσαν την ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους για συμμετοχή στη μελέτη μας.

II. Δημογραφικά χαρακτηριστικά

Τα ευρήματα που προέκυψαν από την ανάλυση των κοινωνικοδημογραφικών, ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών, τις έξεις και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες σε ασθενείς με ΠΧΚ, ομάδα ελέγχου και συγγενείς Α βαθμού παρουσιάζονται στον πίνακα 7. Η κατανομή φύλου και ηλικίας δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ ασθενών και υγιών εθελοντών (θήλεα 84.7% vs 85.2% και μέση ηλικία 64.8 ± 11.9 vs 64.6 ± 11.9 , αντίστοιχα). Περισσότεροι ασθενείς ανέφεραν διαμονή σε αγροτική περιοχή, αλλά η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (47.7% vs 35.6%, $p=0.056$, O.R. 0.6 95% C.I., 0.37-0.99). Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε και στην κατανομή της μέσης τιμής του δείκτη μάζας σώματος αλλά και στις επιμέρους κατηγορίες φυσιολογικών, υπέρβαρων και παχύσαρκων, ανάμεσα στις 2 ομάδες. Όσον αφορά στο επίπεδο εκπαίδευσης, με στατιστικά σημαντική μεγαλύτερη συχνότητα ανέφεραν πρωτοβάθμια εκπαίδευση οι ασθενείς (55% vs 35.6%, $p=0.01$). Εντούτοις, η πανεπιστημιακή εκπαίδευση δεν διέφερε μεταξύ των ασθενών και των υγιών εθελοντών (17.1% vs 12.8%). Από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου, ούτε το ιστορικό καπνίσματος (32.4% vs 36.9%, $p=0.512$, O.R.:0.82 95% C.I., 0.49-1.38), ούτε η εβδομαδιαία κατανάλωση αλκοόλ (10.8% vs 10.7%, $p=1$, O.R.:1.01(95% C.I., 0.46-2.23) διέφεραν σημαντικά μεταξύ των 2

ομάδων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι και στην ομάδα των Ελλήνων ασθενών Κρητικής καταγωγής το αλκοόλ και το κάπνισμα δεν φαίνεται να σχετίζονται με την ΠΧΚ. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στη χρήση βαφών μαλλιών (40.9% vs 50.3%, $p=0.165$) και βερνικίων νυχιών (23.6% vs 31.5%, $p=0.208$) από τις θήλεις ασθενείς με ΠΧΚ συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 7. Κοινωνικοδημογραφικά, ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά έξις και περιβαλλοντικοί παράγοντες σε ασθενείς με ΠΧΚ, ομάδα ελέγχου και συγγενείς Ά βαθμού.

	Controls N (%)	PBC N (%)	P	FDR N (%)	P
Female sex	127 (85.2%)	94(84.7%)	NS	75 (65.2%)	NS
Mean age (y)	64.6 ± 11.9	64.8 ± 11.9	NS	43.59±13.7	<0.0001
Urban residence	96 (64.4%)	58 (52.3%)	NS	89 (77.4%)	0.03
Rural residence	53 (35.6%)	53 (47.7%)	0.056	26 (22.6%)	NS
No Education	13 (8.7%)	2 (1.8%)	NS	0	NS
Elementary	53 (35.6%)	61 (55%)	0.01	14 (12.2%)	<0.0001
High school	64 (43%)	29 (26.1%)	0.01	59 (51.3%)	NS
University	19 (12.8%)	19 (17.1%)	NS	42 (36.2%)	<0.0001
BMI <25	48 (32.2%)	42 (37.8%)	NS	60 (52.2%)	NS
BMI 25-30	71 (47.7%)	44 (39.6%)	NS	32 (27.8%)	0.002

BMI >30	30 (20.1%)	25 (22.5%)	NS	23 (20%)	NS
Mean BMI	27.2 ± 4.25	27.04 ± 4.85	NS	25.58± 4.42	0.003
Currently smoking	35/54 (64.8%)	22/36 (61.1%)	NS	48/62 (77.4%)	NS
≤20packs/year	19/54 (35.2%)	20/36 (55.6%)	NS	43/65(66.2%))	NS
> 20 packs/year	35/54 (64.8%)	16/36 (44.4%)	NS	22/65 (33.8%)	0.001
Never smoked	94 (63.1%)	75 (67.6%)	NS	52/114(45.6 %)	0.006
Alcohol misuse	9/17 (52.9%)	13/15 (84.6%)	NS	13/34 (38.2%)	NS
Alcohol use	8/17 (47.1%)	2/15 (15.4%)	NS	21/34 (61.8%)	NS
No alcohol use	133 (89.3%)	99 (89.2 %)	NS	81 (70.4%)	<0.0001
Hair Dye	75 (50.3%)	45 (40.9%)	NS	NA	NA
Nail Polish	47 (31.5%)	26 (23.6%)	NS	NA	NA

Σημείωση: Οι συνεχείς μεταβλητές εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση, NS: not significant, μη στατιστικά σημαντικό, NA: μη διαθέσιμο.

Η μέση ηλικία των συγγενών Α βαθμού ήταν 43.59 ± 13.7 έτη (εύρος διακύμανσης 18-80 έτη), με υπέρσχυση του γυναικείου φύλου (65.2%). Από τους 115 FDR (75 θήλεα), το 20% ήταν αδερφοί και αδερφές των ασθενών με ΠΧΚ, οι 88 (76.5%, οι 56 θήλειες) ήταν παιδιά και μόνο 4(3.5%) ήταν μητέρες των ασθενών με ΠΧΚ.

Από τους παράγοντες που αφορούν στον τρόπο ζωής και στις έξεις, συνηθέστερη ήταν η χρήση καπνού και αλκοόλ από τους συγγενείς Α βαθμού σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου(p<0.0001 και p=0.006, αντίστοιχα), ενώ η μέση τιμή BMI βρέθηκε

σημαντικά χαμηλότερη στους πρώτους ($p=0.003$). Επιπλέον, οι FDR ανέφεραν με σημαντικά υψηλότερη συχνότητα πανεπιστημιακού βαθμού εκπαίδευσης σε σχέση με τους υγιείς εθελοντές ($p<0.0001$).

III. Αυτοαντισώματα, αυτοάνοσα νοσήματα σε ασθενείς με ΠΧΚ, συγγενείς Α βαθμού και ομάδα ελέγχου.

III.1 Ασθενείς vs Ομάδα ελέγχου

Από τον εργαστηριακό έλεγχο παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη εμφάνιση των ANA αντισωμάτων στον ορό των ασθενών με ΠΧΚ συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου 38.3% vs 16.7%, $p=0.002$, OR 3.01 95% CI 1.5-6.02. Στο 18.8% των ασθενών ανιχνεύθηκαν SMA αντισώματα στον ορό έναντι 10.7% των υγιών εθελοντών (OR 1.93 95%CI 0.82-4.52). Υψηλές τιμές IgM ανοσοσφαιρίνης άνωθεν των ανώτερων φυσιολογικών ορίων βρέθηκαν στο 75.5% των ασθενών έναντι μόλις 9.9% της ομάδας ελέγχου($p<0.0001$, O.R. 27.8 95%CI 11.9-66.7), ενώ σημαντικά μεγαλύτερη ήταν και η μέση τιμή IgM=330.3 ± 227.7mg/dl της ομάδας των ασθενών συγκριτικά με την αντίστοιχη τιμή της ομάδας ελέγχου IgM=109.9 ± 50.7mg/dl ($p<0.0001$ και φυσιολογικά όρια IgM: 27-170mg/dl).

Η συνύπαρξη τουλάχιστον ενός συνοδού αυτοάνοσου νοσήματος(πλὴν της ΠΧΚ) βρέθηκε με σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς με ΠΧΚ Κρητικής καταγωγής (41/111) σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές (20/149), ($p <0.0001$, OR 3.77 95%CI 2.06-6.94). Από το σύνολο των συνυπάρχοντων με την ΠΧΚ αυτοάνοσων νοσημάτων επικρατέστερα ήταν η θυρεοειδίτιδα Hashimoto (18% vs 6%, $p=0.003$, OR 3.41 95%CI 1.49-7.81), το σύνδρομο Raynaud (6.3% vs 0.7%, $p=0.023$, OR 10 95%CI 1.21-83.33) και το σύνδρομο Sjögren (5.4% vs 0.7%, $p=0.044$, OR 8.47 95%CI 1-71.43). Με μικρότερη συχνότητα βρέθηκαν ΡΑ, ΣΕΛ, σκληρόδερμα, σαρκοειδωση, έκζεμα, ψωρίαση και ΙΦΝΕ, χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην εμφάνισή τους μεταξύ των 2 ομάδων (πίνακας 8). Στα πλαίσια της αυτοανοσίας, αξίζει να αναφερθούν οι περιπτώσεις 2 ασθενών με

ΠΧΚ και αυτοάνοση θρομβοκυττοπενία, ενός ασθενούς με πολλαπλή σκλήρυνση, ενός ασθενούς με κοιλιοκάκη, ενός ασθενούς με λεύκη, τριών ασθενών με αυτοάνοση γαστρίτιδα, ενός ασθενούς με σύνδρομο Guillain Barré, ενός ασθενούς με BOOP, ενός ασθενούς με αγγειίτιδα ανοσολογικής αρχής και ενός ασθενούς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περιγραφή ενός ασθενή με ΠΧΚ και με ταυτόχρονη συνύπαρξη ΡΑ, συνδρόμου Sjögren, συνδρόμου Raynaud, θυρεοειδίτιδας Hashimoto και εκζέματος.

Πίνακας 8. Κατανομή αυτοάνοσων νοσημάτων στους ασθενείς με ΠΧΚ.

Autoimmune disease	PBC patients (N=111)	Controls (N=149)	Odds Ratio (95% C.I.)	p-value
Rheum.Arthritis(yes)	4.5% (5/111)	0.7% (1/149)	7 (0.8-62.5)	0.087
S.L.E (yes)	3.6% (4/111)	1.3% (2/149)	2.75 (0.49-15.38)	0.407
Scleroderma(yes)	1.8% (2/111)	0% (0/149)	1.02 (0.99-1.04)	0.181
Sarcoidosis(yes)	2.7% (3/111)	0.7% (1/149)	4.11 (0.42-40)	0.316
Sjogren Syndrome(yes)	5.4% (6/111)	0.7% (1/149)	8.47 (1-71.43)	0.044*
Raynaud(yes)	6.3% (7/111)	0.7% (1/149)	10 (1.21-83.33)	0.023*
Eczema(yes)	3.6% (4/111)	2.7% (4/149)	1.35 (0.33-5.55)	0.727
Psoriasis(yes)	1.8% (2/111)	1.3% (2/149)	1.35 (0.19-9.71)	1
IBD(yes)	1.8% (2/111)	0.7% (1/149)	2.72 (0.24-30.3)	0.577
Hashimoto(yes)	18% (20/111)	6% (9/149)	3.41 (1.49-7.81)	0.003*
At least one autoimmune disease	36.9% (41/111)	13.4% (20/149)	3.77 (2.06-6.94)	<0.0001*

*Στατιστικά σημαντική διαφορά

III.2 FDR vs Ομάδας ελέγχου

Σημαντικά αυξημένη μέση τιμή IgM: 151.6 ± 136.1 mg/dl (εύρος διακύμανσης 23-1360mg/dl) είχαν οι συγγενείς Α βαθμού σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, μέση τιμή IgM: 109.9 ± 50.7 (εύρος διακύμανσης 24.8-303mg/dl), $p=0.009$. Σε γενικές γραμμές, τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών IgM και IgG άνωθεν της ανώτερης φυσιολογικής τιμής ανευρέθησαν με υψηλότερη συχνότητα στην ομάδα των FDR

(O.R. 4.05 95%CI 1.75-9.43 και O.R.11.36 95%CI 1.46-90.9, αντίστοιχα) (πίνακας 9).

Πίνακας 9. Ανοσολογικό προφίλ των συγγενών Α βαθμού και της ομάδας ελέγχου.

Laboratory tests	FDR % (N=115)	CONTROLS % (N=149)	P-value	O. R. C.I.(95%)
IgM (25-170mg/dl)	30,8%	9,9%	0,001*	4,05 (1,75-9,43)
IgG (701-1545mg/dl)	12,5%	1,2%	0,004*	11,36 (1,46-90,9)
ANA	23,1%	16,7%	0,285	1,5 (0,73-3,12)
SMA	16,7%	10,7%	0,285	1,67 (0,69-4)

Η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων ANA και SMA δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των 2 ομάδων ($p=0.285$ και για τα δύο). Επιπλέον, από τον προσδιορισμό των AMA αυτοαντισωμάτων βρέθηκαν 6 AMA θετικοί/ M2 θετικοί συγγενείς Α βαθμού των ασθενών με ΠΧΚ.

Κατά τη διάρκεια της μελέτης μας ετέθη η διάγνωση της ΠΧΚ σε 7 συγγενείς Α βαθμού των ασθενών (6.3%). Οι πέντε(1 κόρη-1 αδερφή-2 μητέρες-1 αδερφός, όλοι AMA+) εξ αυτών εδέχθησαν να υποβληθούν σε βιοψία ήπατος η οποία επιβεβαίωσε ιστολογικά τη διάγνωση της ΠΧΚ (4 FDR στάδιο I, 1 FDR στάδιο III). Από τους υπόλοιπους δύο συγγενείς Α βαθμού, μια γυναίκα-αδερφή ασθενούς, 76 ετών AMA+ με αυξημένα χολοστατικά ένζυμα, αρνήθηκε να υποβληθεί σε βιοψία ήπατος, ενώ η 29χρονη AMA-, ANA+ κόρη ασθενούς η οποία παρουσίασε αυξημένα επίπεδα γ -GT ορού, διεγνώσθη ως Αυτοάνοση Χολαγγειίτιδα σταδίου I, μετά από την ιστολογική επιβεβαίωση με βιοψία ήπατος. Εξάλλου, η κόρη μίας ασθενούς με ΠΧΚ, στον ορό της οποίας ανιχνεύθηκε τίτλος AMA<1:40, με οριακά αυξημένη τιμή anti-M2 αυτοαντισωμάτων, ετέθη υπό εργαστηριακή παρακολούθηση με επανάληψη AMA/M2 κάθε 3 μήνες και επανεκτίμηση της ηπατικής βιοχημείας σε 3 και 6 μήνες μετά. Μετά την ολοκλήρωση 1 έτους εργαστηριακής παρακολούθησης, η τελευταία αρνήθηκε να ακολουθήσει άλλον επανέλεγχο. Επιπρόσθετα, σε έξι ακόμα περιπτώσεις συγγενών Α βαθμού ανευρέθησαν ανοσολογικές διαταραχές(αυξημένες τιμές IgM, ANA), με φυσιολογική όμως βιοχημεία ήπατος(με εξαίρεση την κόρη ασθενούς η οποία αρνήθηκε περαιτέρω διερεύνηση). Στους τελευταίους 5 FDR συνεστήθη επανάληψη των βιοχημικών δεικτών της λειτουργίας του ήπατος κάθε 6 μήνες και εκτίμηση από ειδικό ρευματολόγο.

Τέσσερεις(3 γυναίκες-1 άνδρας) από το σύνολο των 111 ασθενών είχαν ήδη επιβεβαιωμένο ιστορικό ΠΧΚ σε συγγενείς Ά βαθμού αυτών (οι μητέρες των 3 και ο πατέρας της μίας ασθενούς). Επομένως η ήδη γνωστή ενδοοικογενειακή επίπτωση της νόσου ανερχόταν σε ποσοστό 3.6%.

Επομένως, αν λάβουμε υπόψη τις 7 νεοδιαγνωσθείσες περιπτώσεις συγγενών Ά βαθμού με ΠΧΚ σε συνάρτηση με τις 4 ήδη γνωστές περιπτώσεις ενδοοικογενειακής ΠΧΚ, **η ενδοοικογενειακή επίπτωση της ΠΧΚ στην Κρήτη υπολογίζεται σε 9.9%.**

Η κατανομή των εξωηπατικών αυτοάνοσων νοσημάτων στους συγγενείς Ά βαθμού των ασθενών με ΠΧΚ Κρητικής καταγωγής παρουσιάζονται στον πίνακα 10. Τέσσερις συγγενείς Ά βαθμού(3 θήλεα) είχαν ιστορικό ΡΑ, ένας εξ αυτών(κόρη ασθενούς) με συνυπάρχουσα ψωρίαση και θυρεοειδίτιδα Hashimoto και η κόρη άλλης ασθενούς με έκζεμα και Ιστιοκύτωση Β κυττάρων. Οι δύο εκ των 4 FDR με ΡΑ ήταν αδέρφια. Πολλαπλή σκλήρυνση ανέφεραν δύο από τους 115 συγγενείς Ά βαθμού, ενώ αυτοάνοση θρομβοπενία είχε ένας. Η συνύπαρξη συστηματικής σκλήρυνσης, συνδρόμου Raynaud και αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας αναφέρθηκε από την αδερφή άρρενος ασθενούς με ΠΧΚ. Από τον δικό μας κλινικοεργαστηριακό έλεγχο βρέθηκε μια επιπλέον περίπτωση συνδρόμου Raynaud στην κόρη ενός ασθενούς. Υψηλές τιμές αντιθυρεοειδικών αυτοαντισωμάτων ανευρέθησαν σε 16 FDR, χωρίς όμως άλλες κλινικές ενδείξεις δυσλειτουργίας του θυρεοειδούς αδένα. Εντούτοις, η διάγνωση θυρεοειδίτιδας Hashimoto ετέθη σε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό συγγενών Ά βαθμού συγκριτικά με την ομάδα των υγιών εθελοντών 13.9% vs 6%, $p=0.035$, OR 2.51 95% CI 1.07-5.92). Συμπερασματικά προκύπτει ότι συμπεριλαμβανομένων και των περιπτώσεων ενδοοικογενειακής ΠΧΚ, σε **35/115 (30.4%) συγγενείς Ά βαθμού των ασθενών με ΠΧΚ στην Κρήτη εμφανίζουν τουλάχιστον ένα νόσημα αυτοάνοσης αρχής.**

Πίνακας 10. Κατανομή των αυτοάνοσων νοσημάτων στους FDR.

Autoimmune Disease	% FDR	% CONTROL	O. R. C.I.(95%)	P-value
Rheum.Arthritis(yes)	3.5% (4/115)	0.7% (1/149)	5.32 (0.59-47.62)	0.171
S.L.E (yes)	1.7% (2/115)	1.3% (2/149)	1.3 (0.18-9.35)	1
Scleroderma(yes)	0.9% (1/115)	0% (0/149)	1 (0.99-1.03)	0.436
Sarcoidosis(yes)	0.9% (1/115)	0.7% (1/149)	1.3 (0.08-20.83)	1
Sjogren Sydrome	0% (0/115)	0.7% (1/149)	0.99 (0.98-1.01)	1
Raynaud	2.6% (3/115)	0.7% (1/149)	3.97 (0.41-38.46)	0.321
Eczema	2.6% (3/115)	2.7% (4/149)	0.97 (0.21-4.42)	1
Psoriasis	3.5% (4/115)	1.3% (2/149)	2.65 (0.48-14.71)	0.409
IBD	0% (0/115)	0.7% (1/149)	0.99 (0.98-1.01)	1
Hashimoto	13.9% (16/115)	6% (9/149)	2.51 (1.07-5.92)	0.035*
At least one autoimmune disease besides PBC	26.1% (30/115)	13.4% (20/149)	2.28 (1.21-4.27)	0.011*

IV. Συννοσηρότητες, λοιπό ιατρικό ιστορικό

IV.1 Ασθενείς vs Ομάδα ελέγχου

Από την στατιστική επεξεργασία των κλινικοεργαστηριακών δεδομένων βρέθηκε ότι η συχνότητα εμφάνισης δυσλιπιδαιμίας (69.4% vs. 40.9%, $p < 0.0001$ OR 3.27, 95% CI 1.95-5.49) και θυρεοειδικής νόσου (πλήν αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας), (44.1% vs. 26.2%, $p = 0.003$, OR 2.23, 95% CI 1.32-3.76) ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς εθελοντές. Πιο συγκεκριμένα, σημαντικά αυξημένη βρέθηκε η μέση τιμή ολικής χοληστερόλης (224.5 ± 57.7 mg/dl vs 188.1 ± 41.2 mg/dl $p < 0.0001$), όχι όμως και η μέση τιμή των τριγλυκεριδίων ανάμεσα σε ασθενείς και ομάδα ελέγχου (126 ± 45 mg/dl vs. 140.1 ± 73.75 mg/dl).

Το ιστορικό ΑΥ, ΣΔ, ΣΝ, περιφερικής αγγειοπάθειας, άσθματος /ΧΑΠ δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των 2 ομάδων. Σε κανένα από τα συνηθέστερα αλλεργιογόνα (πενικιλίνη/β-λακτάμες, ασπιρίνη/ΜΣΑΦ, παρακεταμόλη, αεροαλλεργιογόνα, τροφικά αλλεργιογόνα, έντομα, εξ'επαφής και άγνωστα αλλεργιογόνα), δεν

αναφέρθηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα στους 35 ασθενείς και 42 υγιείς εθελοντές με ιστορικό αλλεργιών.

Καμία συσχέτιση δεν βρέθηκε ανάμεσα στο ιστορικό λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος και την εμφάνιση ΠΧΚ ($p=0.065$), ούτε και στη συχνότητα εμφάνισης αυτών (74.2% των ασθενών vs. 87.9% των υγιών εθελοντών ανέφεραν 1-4 UTIs/lifetime, ενώ 9.7% των ασθενών vs. 6.9% των υγιών εθελοντών ανέφεραν >10 UTI /lifetime, $p=0.187$). Σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, οι ασθενείς ανέφεραν με μεγαλύτερη συχνότητα ιστορικό καρκίνου (8.1% vs. 2%, $p=0.033$, OR 4.29 95% CI 1.13-16.13), και πιο αναλυτικά από την ομάδα των ασθενών : 3 με ηπατοκυτταρικό καρκίνο (HCC), 1 με καρκίνο του μαστού, 1 με καρκίνο του παχέος εντέρου, 1 με καρκίνο του ενδομητρίου, 1 με γαστρικό MALT λέμφωμα, 1 με βασικοκυτταρικό καρκίνο του δέρματος, 1 με καρκίνο αγνώστου πρωτοπαθούς, έναντι 2 ατόμων με καρκίνο του μαστού και ενός με παγκρεατικό καρκίνο από την ομάδα ελέγχου. Από το χειρουργικό ιστορικό, μόνο η χολοκυστεκτομή(λόγω χολολιθίασης) προ της διαγνώσεως της νόσου διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις 2 ομάδες (18.9% vs. 7.4%, $p=0.007$ OR 2.92 95% CI 1.35-6.37) σε αντίθεση με το ιστορικό αμυγδαλεκτομής, σκωληκοειδεκτομής και θυρεοειδεκτομής. Στον πίνακα 11 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα από τη σύγκριση των λοιπών συνοσηροτήτων και του χειρουργικού ιστορικού ανάμεσα σε ασθενείς και ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 11. Συνοσηρότητες και χειρουργικό ιστορικό ασθενών με ΠΧΚ-ομάδας ελέγχου.

Risk Factor/ Comorbidity	% PBC	% CONTROL	O. R. C.I.(95%)	P-value
Hypertension	44,1% (49/111)	47,7% (71/149)	0,87 (0,53-1,42)	0,616
Diabetes mellitus II	15,3% (17/111)	21,5% (32/149)	0,66 (0,34-1,26)	0,262
Dyslipidaemia	69,4% (77/111)	40,9% (61/149)	3,27 (1,95-5,49)	<0,0001
Coronary artery disease	9% (10/111)	6% (9/149)	1,54 (0,6-3,92)	0,471
Peripheral vasculopathy	28,8% (32/111)	26,2% (39/149)	1,14 (0,66-1,98)	0,674
Asthma /C.O.P.D.	9% (10/111) (10asthma)	11,4% (17/149) (8asthm- 9copd)* $p=0,19$	0,77 (0,34-1,75)	0,682
Allergies	31,5% (35/111)	28,2% (42/149)	1,17 (0,69-2)	0,585
Urinary tract infections	28,7% (31/108)	40,3% 60/149	0,6 (0,35-1,01)	0,065
Kidney stones/cysts	14,4%-4,5% (16stones-	12,1%-4% (18stones-		0,835

	5cyst/111)	6cyst/111)		
Gall bladder stones (yes)	32,4% (36/111)	23,5% (35/149)	1,56 (0,9-2,71)	0,123
Thyroid gland dysfunction(yes)	44,1% (49/111)	26,2% (39/149)	2,23 (1,32-3,76)	0,003
Cancer	8,1% (9/111)	2% (3/149)	4,29 (1,13-16,13)	0,033
Tonsillectomy	22,5% (25/111)	12,1% (24/149)	1,51 (0,81-2,82)	0,203
Appendectomy	28,8% (32/111)	18,8% (28/149)	1,75 (0,98-3,12)	0,074
Cholecystectomy	18,9% (21/111)	7,4% (11/149)	2,92 (1,35-6,37)	0,007
Thyroid gland surgery (no)	8,1% (9/111)	3,4% (5/149)	2,54 (0,83-7,81)	0,104

IV.2 Συγγενείς Α βαθμού έναντι ομάδας ελέγχου

Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε ανάμεσα σε συγγενείς Α βαθμού και την ομάδα ελέγχου όσον αφορά στο ιστορικό θυρεοειδικής νόσου (36.5% vs 26.2%, $p=0.081$). Σαράντα δύο συγγενείς πρώτου βαθμού των ασθενών με ΠΧΚ ανέφεραν ιστορικό θυρεοειδοπάθειας, αλλά μόνο στον ορό δεκαέξι ανευρέθησαν θετικά αντιθυρεοειδικά αντισώματα. ΑΥ ($p<0.0001$, OR, 0.12; 95% CI: 0.058-0.23), ΣΔ τύπου II ($p<0.0001$, OR, 0.17; 95% CI: 0.063-0.44) και ΣΝ ($p= 0.046$, OR, 0.14 95% CI: 0.02-1.09) βρέθηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα στην ομάδα ελέγχου, γεγονός το οποίο δικαιολογείται από τον παράγοντα ηλικία. Ανεξάρτητα από τη μικρότερή τους ηλικία οι συγγενείς Α βαθμού εμφάνιζαν υπερλιπιδαιμία(άνοδο της ολικής και/ή των τριγλυκεριδίων, ή πρόσφατη θεραπεία με στατίνες) σημαντικά συχνότερα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (60% vs 40.9%, $p=0.003$). Σε ποσοστό 52.8% των συγγενών Α βαθμού ανευρέθησαν αυξημένες τιμές ολικής χοληστερόλης, (μέση τιμή CHOL=210 ± 42.5mg/dl, διακύμανση 86-324mg/dl) vs. 31.9% της ομάδας ελέγχου ($p=0.008$, O.R. 2.39 95%CI 1.27-4.5). Η αύξηση των τιμών των τριγλυκεριδίων άνωθεν των φυσιολογικών ορίων ήταν λιγότερο συχνή στην ομάδα των συγγενών Α βαθμού (μέση τιμή TRG=106.3 ± 71.1, διακύμανση 24-452.5mg/dl) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 17.9% vs 27.9%, $p=0.135$, OR 0.56 95%CI 0.27-1.16).

Το ιστορικό περιφερικής αγγειοπάθειας, άσθματος/ΧΑΠ και αλλεργιών δε διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p=0.141$, $p=0.195$ and $p=0.42$ αντίστοιχα). Από τα ποικίλα αλλεργιογόνα, τα αεροαλλεργιογόνα αναφέρθηκαν συχνότερα από τους συγγενείς Α βαθμού, ενώ η πενικιλίνη και οι β-λακτάμες από την ομάδα ελέγχου($p=0.031$). Σημαντικά μεγαλύτερη ήταν και η συχνότητα εμφάνισης

λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος($p=0.002$), νεφρολιθίασης και νεφρικών κύστεων ($p=0.038$) στην ομάδα ελέγχου.

Στην κόρη και στη μητέρα 2 ασθενών με ΠΧΚ είχε τεθεί η διάγνωση καρκίνου των ωοθηκών και του μαστού, αντιστοίχως. Από το χειρουργικό ιστορικό, η αμυγδαλεκτομή (14.8% vs 12.1%, $p=0.864$, OR, 0.9; 95% CI: 0.46-1.78) η σκωληκοειδεκτομή (11.3% vs 18.8%, $p=0.123$, OR, 0.55; 95% CI: 0.27-1.12), η χολοκυστεκτομή (7% vs 7.4%, $p=1$, OR, 0.94; 95% CI: 0.36-2.41) και η θυρεοειδεκτομή (7% vs 3.4%, $p=0.252$, OR, 2.15; 95% CI: 0.68-6.76) δεν παρουσίασαν καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε συγγενείς Α βαθμού και τους υγιείς εθελοντές. Στον πίνακα 12 παρουσιάζονται αναλυτικά οι διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης των συννοσηροτήτων και στο χειρουργικό ιστορικό FDR και ομάδας ελέγχου.

Πίνακας 12. Συννοσηρότητες και χειρουργικό ιστορικό συγγενών Α βαθμού των ασθενών με ΠΧΚ και ομάδας ελέγχου.

Risk Factor	% FDR	% CONTROL	O. R. C.I.(95%)	P-value
Hypertension	9,6% (11/115)	47,7% (71/149)	0,12 (0,058-0,23)	<0,0001
Diabetes mellitus II	4,3% (5/115)	21,5% (32/149)	0,17 (0,063-0,44)	<0,0001
Dyslipidaemia	60% (69/115)	40,9% (61/149)	2,16 (1,32-3,56)	0,003
Coronary artery disease	0,9% (1/115)	6% (9/149)	0,14 (0,02-1,09)	0,046
Peripheral vasculopathy	18,3% (21/115)	26,2% (39/149)	0,63 (0,35-1,15)	0,141
Asthma / C.O.P.D.	6,1% (7/115) (3 asthma- 4copd)* $p=0,324$	11,4% (17/149) (8asthm- 9copd)* $p=0,19$	0,5 (0,2-1,26)	0,195
Allergies	33% (38/115)	28,2% (42/149)	1,26 (0,74-2,13)	0,42
Urinary tract infection	22,6% (26/115)	40,3% (60/149)	0,43(0,25- 0,75)	0,002
Kidney stones/cysts	5,2%-0,9% (6stones- 1cyst/115)	12,1%-4% (18stones- 6cyst/111)		0,038
Gall bladder stones	8,7% (10/115)	23,5% (35/149)	0,31(0,15- 0,66)	0,002
Thyroid gland dysfunction	36,5% (42/115)	26,2% (39/149)	1,62(0,96- 2,45)	0,081
Cancer	1,7% (2/115)	2% (3/149)	0,86(0,14- 5,24)	1
Tonsillectomy	14,8% (17/115)	12,1% (24/149)	0,9(0,46- 1,78)	0,864
Appendectomy	11,3% (13/115)	18,8% (28/149)	0,55(0,27- 1,12)	0,123
Cholecystectomy	7% (8/115)	7,4% (11/149)	0,94(0,36- 2,41)	1
Thyroid gland surgery	7% (8/115)	3,4% (5/149)	2,15(0,68- 6,76)	0,252

Από τον βιοχημικό έλεγχο ανευρέθησαν υψηλές τιμές ηπατικών ενζύμων σε 23/115 συγγενείς Α βαθμού. Αναλυτικότερα παρουσιάζονται στον πίνακα 13. Αρνητικά ήταν τα αποτελέσματα των εξετάσεων έναντι των ιολογικών δεικτών για Ηπατίτιδα Β και C, ενώ παράλληλα αποκλείστηκε η φαρμακοεξαρτώμενη ηπατοτοξικότητα, καθότι από το ιστορικό τους δεν αναφέρθηκε η χρήση ηπατοτοξικού φαρμάκου ή βοτάνων τους τελευταίους έξι μήνες.

Πίνακας 13. Συγγενείς Α βαθμού με εργαστηριακά ευρήματα χολόστασης ή διαταραχή ηπατικών ενζύμων.

Index patient	Relation	Age	AST	ALT	γGT	ALP	TBil	IgM	ANA	AMA	Autoimmune Diseases	Diagnosis of liver disease
XN	Sister	65	23	24	34	161	0.61	201	-	1:320/ M2	None	PBC
DA	Sister	76	68	65	527	816	1.29	1360	-	1:160/ M2	None	PBC
MD	Mother	55	33	90	213	362	4.7	303	1:80MND	1:160/M2	None	PBC
PK	Sister	67	42	49	57	140	1.4	296	1:80MND	1:320/M2	Sarcoidosis	PBC
BK	Son	43	26	57	39	90	1.43	81.9	-	-	None	Liver steatosis
	Daughter	51	17	17	15	63	0.85	238	-	1:160/ M2	Hashimoto	PBC
D	Mother	80	40	21	57	111	0.79	250	1:640	-	None	Refused f-up
	Brother	50	34	56	152	95	0.68	180	-	1:160/M2	None	PBC
TM	Daughter	29	51	89	33	126	0.3	193	1:80	-	None	AIC
PE	Daughter	43	22	16	11	191	0.53	211	-	-	Hashimoto, MS	Refused f-up
	Son	54	31	37	36	156	0.64	189	-	-	Hashimoto	Refused f-up
AT	Daughter	44	24	27	55	68	0.5	132	-	-	None	Nothing found
KA	Brother	54	18	24	61	58	0.41	120	-	-	None	Nothing found
KX	Son	43	21	58	16	56	0.65	35	-	-	None	Nothing found
ZP	Daughter	56	51	83	27	102	0.42	114	-	-	RA,HistiocytosisB	Nothing found
KF	Son	25	29	62	27	69	1.1	102	-	-	None	Liver Steatosis
B	Son	38	35	72	61	99	0.51	54.2	-	-	None	Liver Steatosis
M	Son	53	24	17	56	55	1.47	-	-	-	None	Alcohol abuse
ST	Brother	34	21	35	54	60	0.48	89.6	-	-	None	Liver steatosis
	Son	22	162	74	16	42	0.5	90.2	-	-	None	Alcohol abuse
L	Son	44	28	79	87	84	0.83	208	-	-	None	Refused f-up
TX	Son	55	20	36	44	188	0.85	34	-	-	None	Liver Steatosis
Z	Daughter	18	51	89	31	118	0.3	-	-	-	None	EBV infection

Τα άτομα αυτά εκλήθησαν για περαιτέρω εργαστηριακή διερεύνηση της αιτιολογίας της ηπατικής δυσλειτουργίας και τέσσερα εξ αυτών αρνήθηκαν.

Από τον υπερηχογραφικό έλεγχο του ήπατος ανευρέθη ηπατική στεάτωση σε πέντε άτομα (4 υιοί – 1 αδερφός ασθενούς με ΠΧΚ), και οι 2/5 είχαν επιπλέον και ιστορικό κατανάλωσης αλκοόλ >140gr/βδομάδα. Κατάχρηση αλκοόλ ανέφεραν δύο συγγενείς Α βαθμού με διαταραγμένη ηπατική βιοχημεία και ο νεότερος επιβεβαίωσε οξεία κατάχρηση τους τελευταίους τρεις μήνες. Κατόπιν οδηγιών για μείωση της πρόσληψης αλκοόλ ακολούθησε εργαστηριακή επανεκτίμηση μετά εξαμήνου. Μόνο ο νεότερος κατάφερε την πλήρη αποχή από το αλκοόλ και 6 μήνες αργότερα ομαλοποιήθηκε πλήρως η ηπατική του βιοχημεία.

Στους 5 συγγενείς Α βαθμού με επηρεασμένη ηπατική βιοχημεία αλλά χωρίς άλλες κλινικοεργαστηριακές ενδείξεις ηπατικής νόσου συνεστήθη παρακολούθηση και επανεκτίμηση από τον οικογενειακό τους ιατρό.

Σε όλους τους συγγενείς Α βαθμού που ετέθη η διάγνωση της ΠΧΚ μετά τη βιοψία ήπατος έγινε άμεση έναρξη με UDCA σε δόση 13-15 mg/kg.

V. Γυναικολογικό και αναπαραγωγικό ιστορικό σε ασθενείς, συγγενείς Α και ομάδα ελέγχου

Στην ανάλυση του γυναικολογικού και αναπαραγωγικού ιστορικού συμπεριλήφθησαν μόνο οι θήλεις ασθενείς (N=94), συγγενείς Α βαθμού (N=75) και υγιείς εθελοντές (N=127). Τα αποτελέσματα και οι συγκρίσεις μεταξύ των τριών υπό μελέτη ομάδων παρατίθενται στον πίνακα 14.

Καμία συσχέτιση δεν βρέθηκε με τη μέση ηλικία εμμηναρχής, την ηλικία 1^{ης} εγκυμοσύνης και τελευταίου εμμηνορυσιακού κύκλου και την ΠΧΚ σε ασθενείς Κρητικής καταγωγής. Ομοίως, το ιστορικό φυσιολογικού τοκετού, καισαρικής τομής, αποβολών ή εκτρώσεων δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ ασθενών και ομάδας ελέγχου. Περισσότεροι υγιείς εθελοντές ανέφεραν ιστορικό κολπίτιδας τουλάχιστον μία φορά, χωρίς καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 2 ομάδες (23.3% vs. 28.3%, OR 0.77, 95% CI, 0.41-1.43).

Η μέση ηλικία κατά τον τελευταίο κύκλο εμμηνορυσίας, ο μέσος αριθμός κυήσεων και ο μέσος αριθμός τέκνων διέφεραν σημαντικά ανάμεσα σε συγγενείς Α βαθμού και την ομάδα ελέγχου (p=0.039, p=0.018 και p=0.009), γεγονός το οποίο ερμηνεύεται

κυρίως από τη διαφορά στην ηλικία των δύο ομάδων (μόνο 18 συγγενείς Α βαθμού ήταν στην εμμηνόπαυση vs. 108 υγιών εθελοντών).

Προηγηθείσα χρήση αντισυλληπτικών και κολπίτιδα ήταν σημαντικά συχνότερα στο ιστορικό των συγγενών Α βαθμού συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0.005$ και $p=0.045$, αντίστοιχα). Επιπλέον, από τον παράγοντα ηλικία ερμηνεύεται και η μεγαλύτερη συχνότητα ιστορικού ινομυωμάτων στην ομάδα ελέγχου σε σχέση με τις σημαντικά νεότερες συγγενείς Α βαθμού ($p=0.05$).

Πίνακας 14. Αναπαραγωγικό ιστορικό: συγκρίσεις ασθενών με ΠΧΚ, συγγενών Α βαθμού και ομάδας ελέγχου.

	CONTROLS N =127	PBC N=94	P-value	FDR N=75	P-value
Mean age at menarche	13±1.6	13.13 ±1.4	NS	13.1 ±1.35	NS
Mean age at last period	49.2 ±4.6	48.6 ±4.8	NS	46.6 ± 5.9	0.039*
Mean age at first pregnancy	24.9 ±4.8	24.3 ±4.7	NS	23.35 ±4.7	NS
Mean duration of period	5.1 ±1.2	5.3 ±1.6	NS	5.35 ±1.2	NS
Number of pregnancies	2.8 ±2	2.9 ±1.6	NS	2.1 ±1.9	0.018*
Number of children	2 ±1.1	2.2±1.1	NS	1.6 ±1.3	0.009*
Normal child birth	74.8%	84%	NS	61.6%	NS
Caesarean section	15.7%	12.8%	NS	21.9%	NS
Miscarriage	27.6 %	29.8%	NS	20.5%	NS
Abortion	12.6 %	13.8%	NS	15.1%	NS
HRT	10.2%	16.3%	NS	26%	0.005*
Hysterectomy	10.2%	17%	NS	8.2%	NS
Ovariectomy	14.2%	18.1%	NS	13.7%	NS
Uterine fibroids	20.5%	21.3%	NS	9.6%	0.05*
Vaginal infection	28.3%	23.3%	NS	42.5%	0.045*

* Statistically significant: Στατιστικά σημαντικό

VI. Πολυπαραγοντική Ανάλυση

VI.1 Μόνο θήλεα άτομα

Δεδομένου ότι η ΠΧΚ είναι νόσος στην οποία επικρατεί το γυναικείο φύλο και προκειμένου να συμπεριληφθούν παράμετροι που αφορούν στο αναπαραγωγικό ιστορικό, η πολυπαραγοντική ανάλυση έγινε αρχικά μόνο με γυναίκες ασθενείς. Μεταξύ των υποψήφιων παραγόντων που μελετήθηκαν ήταν το ιστορικό καπνίσματος, λήψης αλκοόλ, η μέση ηλικία εμμηναρχής, η μέση ηλικία 1ης εγκυμοσύνης, ο μέσος αριθμός κυήσεων, το ιστορικό αποβολών, το ιστορικό εκτρώσεων, η μέση ηλικία στον τελευταίο καταμήνιο κύκλο, το ιστορικό θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης, αμυγδαλεκτομής, σκωληκοειδεκτομής, χολοκυστεκτομής, η χρήση βαφών μαλλιών και βερνικιών νυχιών.

Από όλους τους προαναφερθέντες περιβαλλοντικούς και κλινικούς παράγοντες μόνο το ιστορικό σκωληκοειδεκτομής (AOR 2.3, 95% CI 1.154-4.583) βρέθηκε να συνδέεται σημαντικά με την εμφάνιση ΠΧΚ ως ανεξάρτητη μεταβλητή, στο μοντέλο της λογιστικής ανάλυσης παλινδρόμησης που εφαρμόστηκε. Η συχνή χρήση βερνικιών νυχιών βρέθηκε να έχει αρνητική συσχέτιση με την ΠΧΚ στην ομάδα των γυναικών ασθενών με ΠΧΚ Κρητικής καταγωγής (AOR 0.485, 95% CI 0.236-0.998).

VI.2 Με το σύνολο των ασθενών με ΠΧΚ

Οι περιβαλλοντικοί και κλινικοί παράγοντες που μελετήθηκαν για τον πιθανό ρόλο τους στην ΠΧΚ και εισήχθησαν στην πολυπαραγοντική ανάλυση (για άρρενες και θήλεις ασθενείς) ήταν το ιστορικό καπνίσματος, λήψης αλκοόλ, χολοκυστεκτομής και σκωληκοειδεκτομής. Το ιστορικό χολοκυστεκτομής πρό της διαγνώσεως της ΠΧΚ (AOR 2.927, 95% CI 1.347-6.362) ανευρέθη ως παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση ΠΧΚ, ανεξάρτητα από το φύλο (όταν οι μεταβλητές από το αναπαραγωγικό ιστορικό και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες-καλλυντικά εξαιρέθηκαν από την ανάλυση).

14.2 Αποτελέσματα εργαστηριακής έρευνας-μελέτης γενετικής συσχέτισης

I. Ο VNTR στο ιντρόνιο 4 της eNOS σχετίζεται με την εμφάνιση ΠΧΚ

Οι συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό *eNOS* intron4 VNTR σε ασθενείς και μάρτυρες Κρητικής καταγωγής συνοψίζονται στους πίνακες 15 και 16. Ο ομόζυγος bb γονότυπος ήταν ο συχνότερα παρατηρούμενος και στις 2 ομάδες μελέτης (75.9% ασθενείς vs. 62% ομάδα ελέγχου). **Ο ετερόζυγος γονότυπος ab βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά με την εμφάνιση ΠΧΚ στην Κρήτη ($P = 0.015$, O.R. 2.065 95%CI 1.15-3.705). Σημαντικά υψηλότερη ήταν και η συχνότητα εμφάνισης του ελάσσονος αλληλομόρφου “a” στην ομάδα των ασθενών με ΠΧΚ (22% συγκριτικά με 14.6%; $P = 0.017$, O.R.1.935 95%CI 1.123-3.335).**

Καμία σημαντική διαφορά δεν έδειξε η κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων σε ασθενείς διαφορετικού ιστολογικού σταδίου νόσου ή μεταξύ AMA θετικών και AMA αρνητικών ασθενών(πίνακας 18 και 17 αντίστοιχα).

II. Αυξημένη συχνότητα του αλληλομόρφου T του πολυμορφισμού *eNOS* rs1799983 στους ασθενείς με ΠΧΚ Κρητικής καταγωγής

Από την ανάλυση του πολυμορφισμού **Glu298Asp *eNOS* exon7**, ο συχνότερα εμφανιζόμενος γονότυπος και στις δύο ομάδες βρέθηκε **ο ετερόζυγος GT** γονότυπος, με **στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών και μαρτύρων**($P=0.002$, O.R. 3.027, 95%CI 1.523-6.016). Δεκατρείς ασθενείς(13%) και σαράντα εννέα μάρτυρες (29.1%) χαρακτηρίστηκαν ομόζυγοι ως προς τον πολυμορφικό γονότυπο (GG), δέκα ασθενείς (10%) και είκοσι δύο μάρτυρες(13.9%) ήταν ομόζυγοι ως προς τον μη πολυμορφικό γονότυπο (TT). **Το έλασσον αλληλόμορφο ‘T’ αντιπροσωπεύεται με σημαντικά υψηλότερη συχνότητα στους ασθενείς με ΠΧΚ (48.5% vs 42.4% $P=0.003$, O.R.2.749 95%CI 1.398-5.406)**, γεγονός το οποίο υποδηλώνει πιθανή συσχέτιση με την ευπάθεια στη ΠΧΚ για τον Κρητικό πληθυσμό.

Τόσο μεταξύ των ασθενών πρώιμου ή προχωρημένου σταδίου, όσο και μεταξύ των ασθενών με παρουσία ή όχι AMA αντισωμάτων στον ορό του αίματος, η κατανομή

γονοτύπων και αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό eNOS exon7 894G/T δε διέφερε σημαντικά.

III. Καμία συσχέτιση των πολυμορφισμών CTLA-4 rs231775 και rs3087243 με την εμφάνιση ΠΧΚ ή με το στάδιο της νόσου στην Κρήτη.

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί το G αλληλόμορφο των πολυμορφισμών CTLA-4 49AG και CT60 αντίστοιχα, έχει συσχετιστεί με την ευπάθεια στην ΠΧΚ κυρίως σε ασθενείς Ασιατικής καταγωγής. Η συσχέτιση όμως αυτή δεν αποδόθηκε στην ομάδα των δικών μας ασθενών από την Κρήτη.

Πιο συγκεκριμένα, για τον **πολυμορφισμό** rs231775 η κατανομή των γονοτύπων δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες Κρητικής καταγωγής (ο ομόζυγος πολυμορφικός γονότυπος GG, 3% vs 5.7%, ο ετερόζυγος AG, 50% vs 45.6% και ο AA μη πολυμορφικός γονότυπος, 47% vs 48.7%).

Καμία σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε ανάμεσα στον πολυμορφισμό CTLA4 49AG και στους ασθενείς με διαφορετικό στάδιο νόσου, αν και υπήρχε μία αυξημένη συχνότητα (αλλά μη στατιστικά σημαντική) του ετερόζυγου AG γονότυπου στους ασθενείς με προχωρημένου σταδίου νόσο ($p=0.096$, OR 2.055 95%CI 0.879-4.802). Δεν ανεύρεθη σημαντική απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg Equilibrium στην κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων του rs231775, μεταξύ AMA θετικών και αρνητικών ασθενών.

Αντίστοιχα, **καμία συσχέτιση του πολυμορφισμού CTLA4 60C/T με την ευπάθεια στην ΠΧΚ δεν ανευρέθη από την ανάλυση γονοτύπων και αλληλομόρφων στον Κρητικό πληθυσμό.** Οι ασθενείς σταδίου I-II εμφάνιζαν συχνότερα τον πολυμορφικό γονότυπο AA σε σύγκριση με τους ασθενείς σταδίου III-IV (29.7% vs 16.7%, $P=0.28$, O.R. 0.526 95%CI 0.164-1.685). Σε τριάντα εννέα (41.9%) AMA θετικούς ασθενείς και τέσσερις (57.1%) AMA αρνητικούς παρατηρήθηκε ο ετερόζυγος γονότυπος AG ($P=0.312$). Ομοίως, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ AMA θετικών και αρνητικών ασθενών στη συχνότητα του 'Α' αλληλομόρφου του rs3087243 ($P=0.319$, OR 3 95%CI 0.346-26.025).

Τα αποτελέσματα από τη στατιστική ανάλυση των δύο πολυμορφισμών του γονιδίου *CTLA4* με υπολογισμό και του λόγου σχετικών πιθανοτήτων, συνοψίζονται στους πίνακες 15, 16, 17 και 18.

IV. Οριακά μη σημαντική συσχέτιση του ‘Α’ αλληλομόρφου EDN-1 rs2071942 και του ‘Τ’ αλληλομόρφου rs5370 με τα προχωρημένα στάδια της ΠΧΚ

Η κατανομή των γονοτύπων (AA, AG, GG) για τον πολυμορφισμό του γονιδίου EDN-1 στη νουκλεοτιδική θέση +356 στο ιντρόνιο 4 δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες (πίνακας 15). Όσον αφορά το στάδιο της νόσου καμία συσχέτιση δεν ανευρέθη, εντούτοις, *το έλασσον αλληλόμορφο ‘Α’ έδειξε μια τάση για συσχέτιση με τα αρχικά στάδια της ΠΧΚ* (28.1% vs 16.7%, $P=0.062$, O.R. 2.273 95% CI 0.96-5.381). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη συχνότητα των γονοτύπων και αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό rs2071942 μεταξύ των ασθενών με παρουσία ή απουσία AMA αντισωμάτων στον ορό του αίματος (πίνακας 17). Όπως φαίνεται ο AA, AG γονότυπος και το ‘Α’ αλληλόμορφο ήταν συχνότερα στην ομάδα των AMA αρνητικών ασθενών ($P=0.235$, $P=0.608$, $P=0.439$).

Από τη μελέτη του πολυμορφισμού του γονιδίου της EDN-1 στη θέση +61 στο εξόνιο 5, η κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων μεταξύ ασθενών με ΠΧΚ και μαρτύρων στην Κρήτη δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά. Ομοίως, από τη διάκριση των ασθενών βάσει του ιστολογικού σταδίου νόσου δεν προέκυψε καμία συσχέτιση με την πρόοδο νόσου (GG: 56.3% vs 75%, $P=0.163$, GT: 34.4% vs 22.2%, $P=0.136$ και TT: 9.4% vs 2.8%, $P=0.175$).

Εντούτοις, *το αλληλόμορφο ‘Τ’ ήταν συχνότερο στους ασθενείς με νόσο πρώιμου σταδίου, οριακά όμως σε επίπεδα μη στατιστικά σημαντικά* (26.6% vs 13.9%, $P=0.066$, O.R. 2.33 95% CI 0.947-5.749).

Επιπλέον, κανένας εκ των τριών γονοτύπων GG, GT και TT ή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού στο εξόνιο 5 της EDN-1 δεν βρέθηκε να προδιαθέτει τους ασθενείς στην παραγωγή AMA αυτοαντισωμάτων (πίνακας 17).

Συμπερασματικά λοιπόν, οι συχνότητες των γονοτύπων των δύο υπό μελέτη πολυμορφισμών της EDN-1 δεν έδειξαν καμία απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg equilibrium.

Πίνακας 15. Κατανομή των γονοτύπων των πολυμορφισμών eNOS intron4 και exon7, CTLA-4 rs231775 και rs3087243, EDN-1 intron4 και exon5 ανάμεσα σε ασθενείς με ΠΧΚ και την ομάδα ελέγχου Κρητικής καταγωγής.

	PBC patients (N=100)	Control group (N=158)	P-value	OR (95%CI)
eNOs intron4 VNTR				
bb	62%	75,9%	0.05	-
ab	32%	19%	0.015	2.065 (1.15-3.705)
aa	6%	5.1%	0.507	1.452 (0.482-4.37)
eNOs exon7 894G/T				
GG	13%	29.1%	0.004	-
GT	77%	57%	0.002	3.027 (1.523-6.016)
TT	10%	13.9%	0.336	1.608 (0.611-4.236)
CTLA-4 rs231775				
AA	47%	48.7%	0.544	-
GG	3%	5.7%	0.382	0.546 (0.141-2.119)
AG	50%	45.6%)	0.621	1.138 (0.682-1.898)
CTLA-4 rs3087243				
GG	32%	23.4%	0.221	-
AG	43%	53.2%	0.086	0.592 (0.325-1.078)
AA	25%	23.4%	0.486	0.781 (0.39-1.564)
EDN-1 intron4 rs2071942				
GG	57%	63.3%	0.223	-
AG	38%	28.5%	0.154	1.481 (0.863-2.544)
AA	5%	8.2%	0.476	0.675 (0.229-1.99)
EDN-1 exon5 rs5370				

GG	63%	62.7%	0.66	-
GT	30%	27.2%	0.362	0.627 (0.23-1.71)
TT	7%	10.1%	0.749	0.912 (0.519-1.602)

Πίνακας 16. Κατανομή της συχνότητας των αλληλομόρφων των πολυμορφισμών eNOS intron4 και exon7, CTLA-4 rs231775 και rs3087243, EDN-1 intron4 και exon5 μεταξύ ασθενών και μαρτύρων στην Κρήτη.

	Alleles	PBC patients (N=100)	Control group (N=158)	P-value	OR (95%CI)
eNOs intron4 VNTR					
	b allele	78% (156)	85.4% (270)	0.732	1.21 (0.407-3.597)
	a allele	22% (44)	14.6% (46)	0.017	1.935 (1.123-3.335)
eNOs exon7 894G/T					
	G allele	51.5% (103)	57.6% (182)	0.354	0.687 (0.311-1.519)
	T allele(MAF)	48.5% (97)	42.4% (134)	0.003	2.749 (1.398-5.406)
CTLA-4 rs231775					
	G allele(MAF)	28%(56)	28.5% (90)	0.786	0.933 (0.565-1.54)
	A allele	72% (144)	71.5% (226)	0.324	1.953 (0.516-7.395)
CTLA-4 rs3087243					
	G allele	53.5% (107)	50% (158)	0.772	1.090 (0.608-1.954)
	A allele(MAF)	46.5% (93)	50% (158)	0.13	0.65 (0.372-1.136)
EDN-1 intron4 rs2071942					
	G allele	76% (152)	77.5% (245)	0.326	0.587 (0.203-1.7)
	A allele(MAF)	24% (48)	22.5% (71)	0.314	1.301 (0.78- 2.169)
EDN-1 exon5 rs5370					
	G allele	78% (156)	76.3%(241)	0.393	1.497 (0.593-3.778)
	T allele(MAF)	22% (44)	23.7% (75)	0.956	0.985 (0.587-1.655)

Πίνακας 17. Γονότυποι και συχνότητα του ελάσσονος αλληλόμορφου ανάμεσα σε AMA θετικούς/αρνητικούς ασθενείς με ΠΧΚ στην Κρήτη.

	AMA positive (N=93)	AMA negative (N=7)	P-value	OR (95%CI)
eNOs intron4 VNTR				
bb	60.2%	85.7%	0,553	-
ab	33.3%	14.3%	0.276	3.321(0.382-28.858)
aa	6.5%	0%	0.999	-
a allele (MAF)	23.1%	7.1%	0.211	0.252 (0.029-2.182)
eNOs exon7 894G/T				
GG	0%	14%	1	-
GT	100%	75.2%	0.999	-
TT	0%	10.8%	1	-
T allele(MAF)	48.4%	50%	0.999	1(-)
CTLA-4 rs231775				
AA	45.2%	71.4%	0.477	-
GG	3.2%	0%	0.999	-
AG	51.65	28.6%	0.224	2.857 (0.527-15.504)
G allele(MAF)	29%	14.3%	0.198	3.036 (0.56-16.451)
CTLA-4 rs3087243				
GG	33.3%	14.3%	0.597	-
AG	41.9%	57.1%	0.312	0.315 (0.033-2.959)
AA	24.7%	28.6%	0.43	0.371 (0.032-4.343)
A allele(MAF)	45.7%	57.1%	0.319	3 (0.346-26.025)
EDN-1 intron4 rs2071942				
GG	58.1%	42.9%	0.489	-
AG	37.6%	42.9%	0.608	0.648 (0.124-3.395)
AA	4.3%	14.3%	0.235	0.222 (0.019-2.655)
A allele(MAF)	23.1%	35.7%	0.439	0.542 (0.115-2.559)
EDN-1 exon5 rs 5370				
GG	62.4%	71.4%	0.558	-
GT	31.2%	14.3%	0.413	2.5(0.279-22.401)
TT	6.5%	14.3%	0.575	0.517(0.052-5.189)
T allele (MAF)	22%	21.4%	0.634	1.509 (0.278-8.197)

Πίνακας 18. Γονότυποι και συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου σε ασθενείς με ΠΧΚ πρώιμου ή προχωρημένου σταδίου.

	Stage I-II (N=64)	Stage III-IV (N=36)	P-value	O.R. (95% CI)
eNOs intron4 VNTR				
bb	60.9%	63.9%	0.957	-
ab	32.8%	30.6%	0.961	0.955 (0.15-6.056)
aa	6.3%	5.6%	0.795	1.126 (0.461-2.75)
a allele	22.7%	20.8%	0.77	1.134 (0.487-2.641)
eNOs exon7 894G/T				
GG	12.5%	13.9%	0.908	-
GT	76.6%	77.8%	0.885	0.914 (0.273-3.066)
TT	10.9%	8.3%	0.673	0.686 (0.119-3.963)
T allele	49.2%	47.2%	0.843	1.129 (0.34-3.75)
CTLA-4 rs231775				
AA	53.1%	36.1%	0.249	-
GG	3.1%	2.8%	0.832	1.308 (0.109-15.679)
AG	43.8%	61.1%	0.096	2.055 (0.879-4.802)
G allele(MAF)	25%	33.3%	0.104	0.499 (0.216-1.154)
CTLA-4 rs3087243				
GG	31.3%	33.3%	0.336	-
AG	39.1%	50%	0.703	1.2 (0.47-3.065)
AA	29.7%	16.7%	0.28	0.526 (0.164-1.685)
A allele(MAF)	49.2%	41.7%	0.83	1.1 (0.46-2.63)
EDN-1 intron4 rs2071942				
GG	50%	69.4%	0.17	-
AG	43.8%	27.8%	0.322	0.32 (0.34-3.045)
AA	6.3%	2.8%	0.085	0.457 (0.187-1.115)
A allele(MAF)	28.1%	16.7%	0.062	2.273 (0.96-5.381)
EDN-1 exon5 rs5370				
GG	56.3%	75%	0.163	-
GT	34.4%	22.2%	0.136	0.485 (0.187-1.255)
TT	9.4%	2.8%	0.175	0.222 (0.025-1.956)
T allele(MAF)	26.6%	13.9%	0.066	2.33 (0.947-5.749)

14.3 Αποτελέσματα γεωστατιστικής μελέτης της ΠΧΚ στην Κρήτη

I. Γενικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΠΧΚ που συμμετείχαν στη γεωστατιστική μελέτη.

Τριάντα εκ του συνόλου των ασθενών ήταν άνδρες, δίδοντας αναλογία γυναικών-ανδρών με ΠΧΚ 7.2:1. Η διάμεση ηλικία στη διάγνωση της νόσου ήταν 58 έτη (εύρος ηλικίας 24–87 έτη). Είκοσιεννέα (12%) ασθενείς, είχαν Αυτοάνοση Χολαγγειίτιδα (AMA αρνητική ΠΧΚ). Σε τρεις ασθενείς γυναίκες συνυπήρχε σύνδρομο αλληλεπικάλυψης με Αυτοάνοση Ηπατίτιδα (ΑΗ) στη διάγνωση, ενώ μία ακόμα ασθενής εκδήλωσε ΑΗ 12 έτη μετά τη διάγνωση της ΠΧΚ. Τίτλοι ANA >1/80 και τίτλοι ASMA >1/40 ανευρέθησαν στο 43% και στο 24.2% των ασθενών με ΠΧΚ αντίστοιχα. Δύο ασθενείς ήταν χρόνιοι ανενεργοί φορείς της Ηπατίτιδας Β κατά τη διάγνωση της ΠΧΚ και ένας εξ αυτών επέτυχε κάθαρση από τον ιό με ορομετατροπή HBsAg σε HBsAb μετά από 6 έτη παρακολούθησης. Σε τέσσερεις ασθενείς συνυπήρχε HCV λοίμωξη, εκ των οποίων οι 2 κατέληξαν μετά από 11 και 20 χρόνια αντίστοιχα λόγω ηπατικής νόσου.

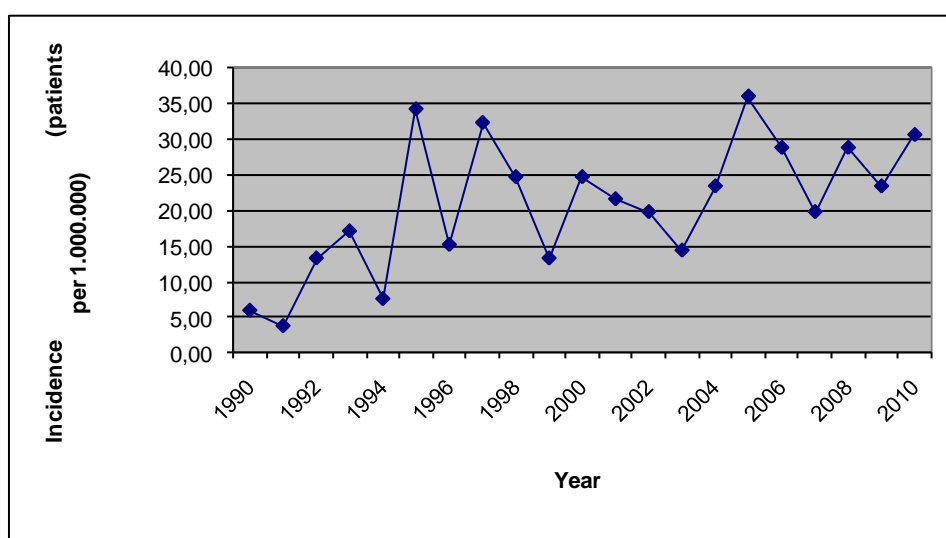
Η μέση τιμή του Mayo risk score ήταν 4.6 ± 1.3 (διάμεση τιμή 4.39, εύρος 1.46-9.8) χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε AMA θετικούς ή αρνητικούς ασθενείς ($p= 0.898$) και το 63.5% των ασθενών ήταν σε πρώιμο ιστολογικό στάδιο νόσου κατά Ludwig (I-II). Σε 29 ασθενείς διαπιστώθηκε ήπιου βαθμού στεάτωση στη βιοψία ήπατος, μετρίου βαθμού σε 13 και σοβαρού βαθμού σε δύο. Κνησμό ανέφερε μόνο το 37.7% των ασθενών κατά τη διάγνωση της ΠΧΚ, ενώ κόπωση ανέφερε το 35.2%. Ο διάμεσος χρόνος παρακολούθησης από τη διάγνωση μέχρι το τέλος της μελέτης ή τον θάνατο ήταν 77.52 μήνες (εύρος 2-245.3 μήνες). Με το πέρας της μελέτης 181 (81.5%) ασθενείς παρέμεναν εν ζωή και 41 είχαν καταλήξει.

Δεν ανιχνεύθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα αίτια θανάτου (σχετιζόμενα με ηπατική νόσο 18, μή σχετιζόμενα με ηπατική νόσο 21) ανάμεσα σε AMA θετικούς και AMA αρνητικούς ασθενείς ($p=0.477$).

II. Επίπτωση και επιπολασμός της ΠΧΚ στην Κρήτη

Συνολικά, ο επιπολασμός της ΠΧΚ στην Κρήτη υπολογίστηκε σε **365 περιπτώσεις ανά 1.000.000 πληθυσμού**. Πιο αναλυτικά ο επιπολασμός της νόσου για κάθε νομό ξεχωριστά βρέθηκε 262 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο για το νομό Χανίων, 321 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο για το νομό Ρεθύμνου, 440 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο για το νομό Ηρακλείου και 333 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο για το νομό Λασιθίου.

Η μέση επίπτωση της ΠΧΚ κατά τη διάρκεια της μελέτης υπολογίστηκε σε 20.88 περιπτώσεις / εκατομμύριο πληθυσμού ανά έτος. Η επίπτωση διακυμάνθηκε μεταξύ 3.79 και 35.99 περιπτώσεων / εκατομμύριο πληθυσμού ανά έτος και φάνηκε να παρουσιάζει αύξηση μετά 1992. Στο διάγραμμα 1 παρουσιάζονται οι διακυμάνσεις στην ετήσια επίπτωση της ΠΧΚ στην Κρήτη τα τελευταία 21 έτη.



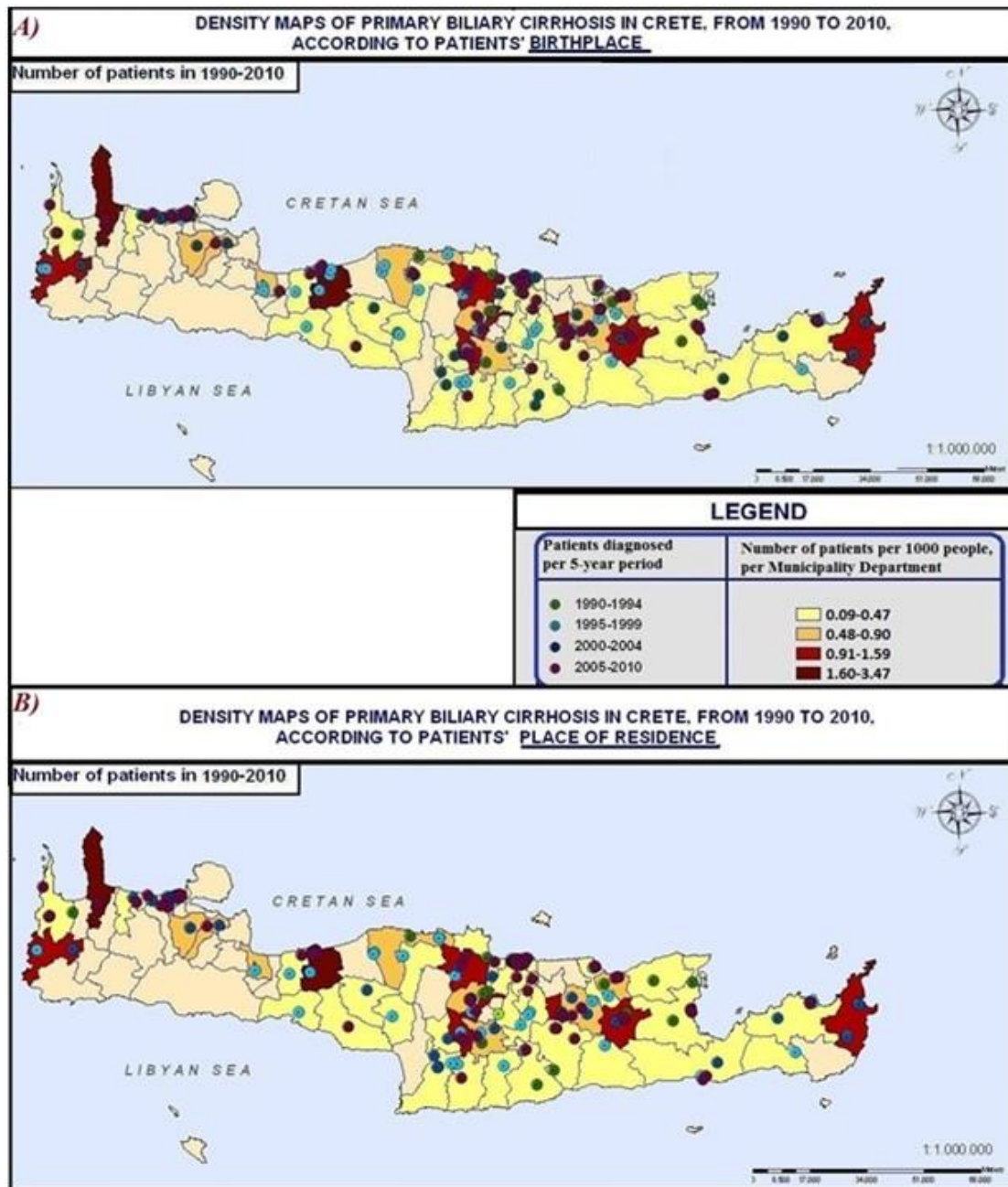
Διάγραμμα 1. Ετήσια επίπτωση της ΠΧΚ στην Κρήτη 1990-2010.

III. Γεωγραφική κατανομή των ασθενών με ΠΧΚ στην Κρήτη.

Η κατανομή των ασθενών βάσει τόπου γέννησης και τόπου διαμονής φαίνονται στους χάρτες Α και Β αντίστοιχα. Αυτοί οι χάρτες πυκνότητας με τις χωρικές συναθροίσεις απεικονίζουν την επίπτωση της νόσου στο νησί. Η τιμή Geary's C για την ΠΧΚ υπολογίστηκε 0.46 βάσει του τόπου γέννησης και 0.48 βάσει του τόπου διαμονής των ασθενών ($p < 0.001$), αναδεικνύοντας ότι η ΠΧΚ στην Κρήτη παρουσιάζει **θετική χωρική αυτοσυσχέτιση**, με μη στατιστικά σημαντικές διαφορές στην κατανομή των ασθενών στο νησί, είτε αν λάβουμε υπόψιν τον τόπο γέννησης, είτε τον τόπο διαμονής. Οπότε στις μετέπειτα αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα δεδομένα βάσει του τόπου διαμονής των ασθενών.

Ο αριθμός των ασθενών με ΠΧΚ ανά 1000 άτομα πληθυσμού ανά νομό κυμαίνεται από 0.09 έως 3.47 ασθενείς /1000 άτομα πληθυσμού (βάσει τόπου διαμονής όπως προαναφέρθηκε).

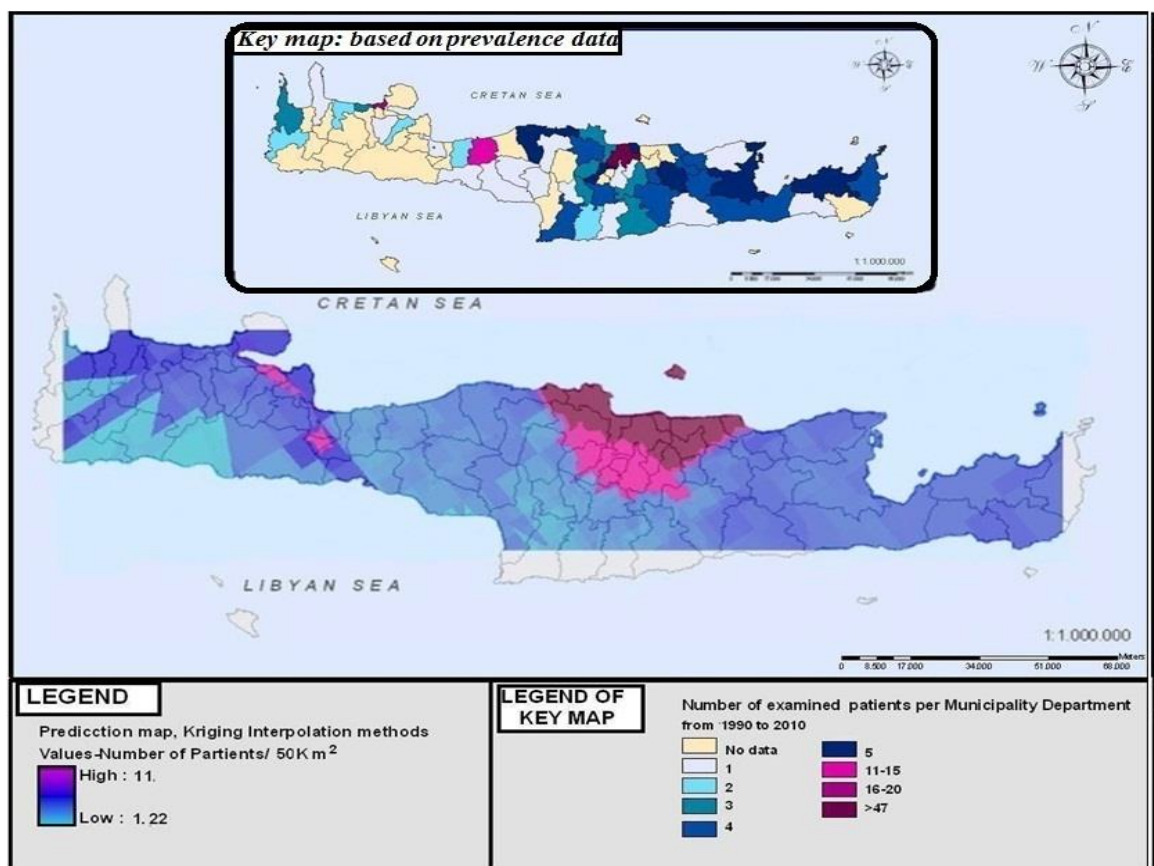
Χάρτες 1Α, 1Β. Οι χάρτες γεωγραφικής κατανομής των ασθενών με ΠΧΚ στην Κρήτη βάσει Α) τόπου γέννησης και Β) κατοικίας.



IV. Χάρτης πρόβλεψης της ΠΧΚ στην Κρήτη – χωρική συσχέτιση.

Με τη χρήση της γεωστατιστικής μεθόδου Kriging εκτιμήσαμε τον αναμενόμενο αριθμό ασθενών ανά 50 km² σε όλη την Κρήτη και οι τιμές κυμαίνονται από 1.22 σε 11 ασθενείς ανά 50 km². Το ημιβαριόγραμμα και ο χάρτης πρόβλεψης απεικονίζονται στον **χάρτη 2**.

Χάρτης 2. Χάρτης πρόβλεψης ΠΧΚ στην Κρήτη.

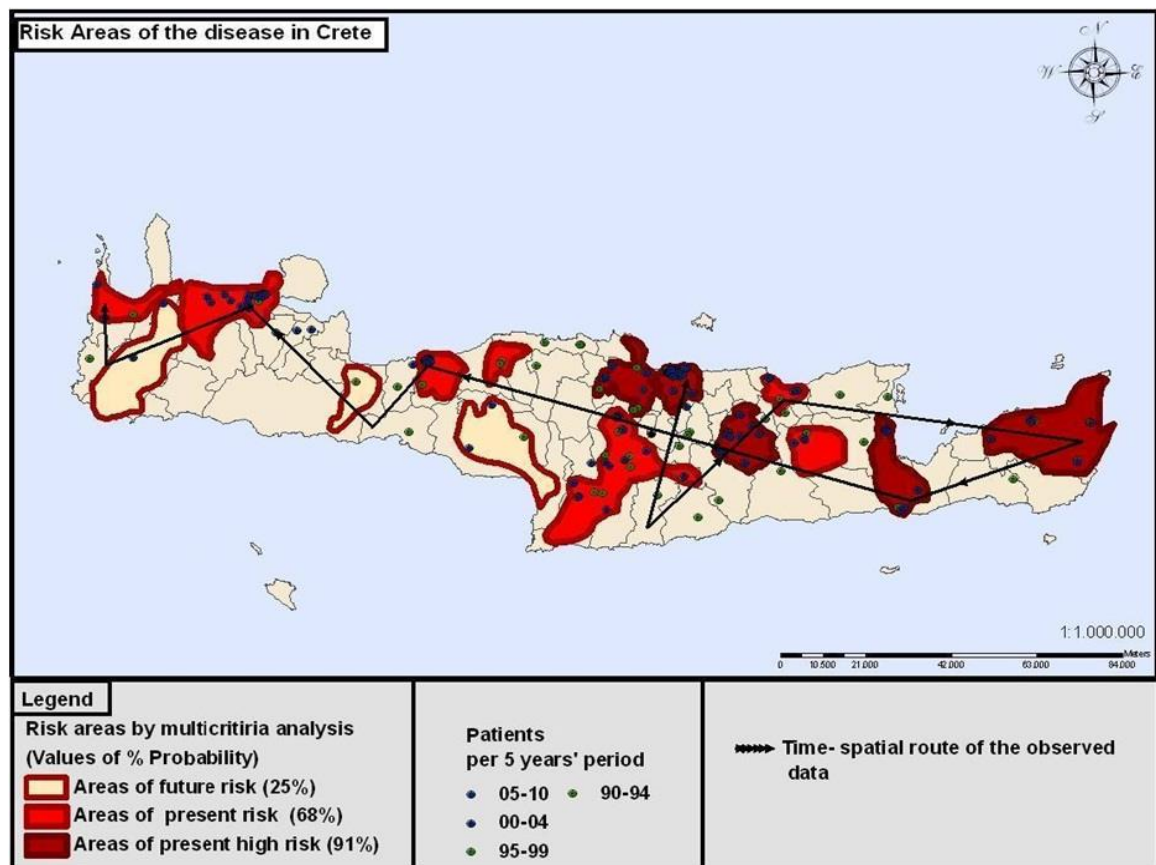


V. Χάρτης κινδύνου και χρόνο-χωρική πορεία της ΠΧΚ στην Κρήτη.

Τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης απεικονίζονται στον **χάρτη 3**. Η αναλυση των δεδομένων βασίστηκε στις προαναφερθείσες 5 παραμέτρους και ανάλογα με το βαθμό κινδύνου εμφάνισης της ΠΧΚ ορίσαμε-διακρίναμε περιοχές υψηλού κινδύνου (91% πιθανότητα εμφάνισης της νόσου), περιοχές ενδιάμεσου κινδύνου (68% πιθανότητα εμφάνισης της νόσου) και περιοχές χαμηλού κινδύνου (25% πιθανότητα εμφάνισης της νόσου). Όπως φαίνεται και στον **χάρτη 3** οι περιοχές με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης ασθενών με ΠΧΚ βρίσκονται στο ανατολικό ήμισυ της Κρήτης, ενώ περιοχές μικρού κινδύνου εμφάνισης της νόσου στο δυτικό τμήμα του νησιού.

Ακολούθως με τη βοήθεια του Arc map's toolbox η εμφάνιση της ΠΧΚ βρέθηκε να ακολουθεί μια συγκεκριμένη χρόνο-χωρική διαδρομή στην Κρήτη. Ειδικότερα, η πορεία-γραμμή της νόσου ακολουθεί τις συναθροίσεις των περιπτώσεων με ΠΧΚ ανά 5ετία, οι οποίες βρέθηκε να μην ακολουθούν τυχαία κατεύθυνση (Geary's $C=0.46$; $p<0.001$). Η γραμμή-πορεία της νόσου συνιστά ένα απλό εργαλείο προκειμένου να καθοριστεί η κινητικότητα των ασθενών με ΠΧΚ(κουκίδες στον **χάρτη**) ανά νομό, ανά 5ετία, σαν να χρησιμοποιούσαμε video(η μαύρη γραμμή στον **χάρτη 3**). Ξεκίνησε κεντρικά του νομού Ηρακλείου, πήγε στο νότιο τμήμα αυτού, έπειτα στην περιφέρεια Λασιθίου ακολουθώντας κατεύθυνση από το ανατολικό τμήμα προς το νότιο, κατόπιν στο βόρειο τμήμα της Περιφέρειας Ρεθύμνου προς το νότιο, ώστε να καταλήξει στο βόρειοδυτικό τμήμα της Περιφέρειας Χανίων. Στην πορεία αυτή της νόσου αναδεικνύεται ότι η νόσος εμφανίστηκε καταρχάς στις μεγάλες πόλεις του βόρειου τμήματος κάθε Περιφέρειας και ακολούθως κατέληγε στις νοτιότερες περιοχές.

Χάρτης 3. Χάρτης κινδύνου εμφάνισης της ΠΧΚ στην Κρήτη και χρονο-χωρική πορεία της νόσου, με αριθμό ασθενών ανά 5ετία .



15. Συζήτηση

Η κληρονομικότητα των πολυπαραγοντικών νοσημάτων είναι αρκετά πολύπλοκη διαδικασία δεδομένου ότι καθορίζεται από την αλληλεπίδραση πολλαπλών γονιδίων και περιβαλλοντικών παραγόντων. Η ΠΧΚ συνιστά ένα πολυπαραγοντικό αυτοάνοσο νόσημα στο οποίο παραμένει άγνωστο τόσο το γενετικό υπόβαθρο της νόσου, όσο και οι περιβαλλοντικοί παράμετροι που συνεισφέρουν στην εμφάνιση της νόσου.

Η υψηλή επίπτωση της νόσου και οι αυξημένοι τίτλοι των AMA αυτοαντισωμάτων στον ορό των συγγενών Α βαθμού ασθενών με ΠΧΚ σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό, η αυξημένη επίπτωση άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων στους ασθενείς και στους συγγενείς αυτών, η υψηλή concordance rate της νόσου σε μονοζυγωτικούς διδύμους σε συνδυασμό με τους SNPs που έχουν ανιχνευθεί ως γενετικοί παράγοντες υπεύθυνοι για την ευπάθεια στην ΠΧΚ από ανάλυση GWAS και RFLP σε διαφορετικές εθνικές ομάδες ασθενών επιβεβαιώνουν τη σύνθετη δομή του μοντέλου κληρονομικότητας της νόσου.

Στην παρούσα μελέτη αναζητήσαμε στοιχεία από το ιστορικό των ασθενών με ΠΧΚ στην Κρήτη και των συγγενών τους Α βαθμού σε μια προσπάθεια να εκτιμηθεί ο βαθμός κληρονομικότητας της νόσου, οι συνυπάρχουσες αυτοάνοσες και άλλες νόσοι καθώς και άλλα στοιχεία-παράγοντες από το περιβάλλον που πιθανόν να έχουν επιδράσει σε αυτήν την γενετικά ομοιογενή ομάδα. Ταυτόχρονα διεξήχθη και η πρώτη ανάλυση συσχέτισης ασθενών με ΠΧΚ-μαρτύρων στην Ελλάδα για την ανίχνευση των γενετικών τόπων που εμπλέκονται στην ευπάθεια της ΠΧΚ σε Έλληνες ασθενείς Κρητικής καταγωγής.

Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της μελέτης μας είναι η γενετική ομοιογένεια του Κρητικού πληθυσμού που μελετήθηκε λόγω της γεωγραφικής απομόνωσης και των μικρών ποσοστών μετανάστευσης, αλλά και η ομοιομορφία των περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου που επιδρούν σε αυτήν τη γενετικά ευπαθή ομάδα.

Ένα αδύναμο σημείο της μελέτης μας ίσως αποτελεί το μικρό δείγμα των ασθενών που συμμετείχαν σε αυτήν, γεγονός το οποίο μπορεί να δικαιολογηθεί αν λάβουμε υπόψη μας ότι η Κρήτη είναι ένα γεωγραφικά απομονωμένο νησί.

Έναν πρόσθετο περιορισμό της κλινικής μας μελέτης συνιστά η χρήση ερωτηματολογίων καθώς εμπεριέχεται ο κίνδυνος πιθανών καταχωρήσεων που να οδηγούν σε λανθασμένα συμπεράσματα. Ο κίνδυνος αυτός ελαχιστοποιήθηκε με

συνέντευξη των συμμετεχόντων από τον ίδιο ιατρο και με διασταύρωση της ακρίβειας των συλλεχθέντων δεδομένων, ειδικά για τους ασθενείς με ΠΧΚ, από τα αρχεία της κλινικής.

Το σχετικά χαμηλό ποσοστό συμμετεχόντων ασθενών με ΠΧΚ στη μελέτη (56.6%) θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από τα έθιμα και τις προκαταλήψεις του Κρητικού πληθυσμού, την προχωρημένη ηλικία των ασθενών στη διάγνωση της νόσου, τη διαμονή σε αγροτικές περιοχές (σχεδόν το ήμισυ των ασθενών) και το χαμηλό επίπεδο εκπαίδευσης των ασθενών.

Ο επιπολασμός της ΠΧΚ στους συγγενείς Α βαθμού των ασθενών με ΠΧΚ Κρητικής καταγωγής βρέθηκε αρκετά υψηλός 9.9%, πλησίον του ποσοστού 9% που έχει ήδη αναφερθεί στην πρόσφατη μελέτη των Lazaridis και συνεργατών³⁹². Πριν τη διεξαγωγή της μελέτης μας ο επιπολασμός της ενδοοικογενειακής ΠΧΚ στην Κρήτη υπολογιζόταν σε 3.6%, ποσοστό συναφές με το αναφερόμενο 5.9% από μελέτη στις ΗΠΑ¹³⁷, το 5% στο Ηνωμένο Βασίλειο²⁶⁶, το 4% στη Γαλλία²⁷⁵ και 5.8% στην Ιαπωνία³⁸⁶.

Όσον αφορά στον προσδιορισμό συνολικά της αυτοανοσίας συγκριτικά με τη μελέτη κοορτής από το Ηνωμένο Βασίλειο²⁶⁸ μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών μας με ΠΧΚ είχε τουλάχιστον ένα αυτοάνοσο νόσημα (36.9% vs 32%), με σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα συνύπαρξης με την ΠΧΚ της αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας, του σύνδρομου Raynaud και Sjögren. Παρόμοιες συνοσηρότητες της ΠΧΚ με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα έχουν αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες σε πληθυσμούς διαφορετικής εθνικότητας^{529,274}. Σημαντικά υψηλότερη βρέθηκε και η συχνότητα εμφάνισης αυτοάνοσων νοσημάτων στην ομάδα των συγγενών Α βαθμού επιβεβαιώνοντας τη συμμετοχή του γενετικού παράγοντα στους μηχανισμούς της αυτοανοσίας(30.4%). Και στην ομάδα των συγγενών Α βαθμού το πιο συχνό αυτοάνοσο νόσημα ήταν η θυρεοειδίτιδα Hashimoto (13.9%), ακολουθούμενη από την ΠΧΚ(9.9%).

Η ανάλυση των κοινωνικοδημογραφικών και ανθρωπομετρικών παραμέτρων έδειξε ότι: α)το επίπεδο εκπαίδευσης των ασθενών μας ήταν χαμηλότερο συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου όπως και από αναφορές με ασθενείς ΠΧΚ διαφορετικής εθνικότητας^{138,275}, β) το BMI των ασθενών με ΠΧΚ σε αντίθεση με τις έως και σήμερα αναφορές Αμερικάνων και Γάλλων ερευνητών δεν ανευρέθη μικρότερο σε σχέση με αυτό των μάρτυρων^{138,275} και οι περισσότεροι ασθενείς ήταν υπέρβαροι.

Δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση της νόσου με το ιστορικό (πρόσφατου ή πρώην) καπνίσματος, εύρημα το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα προηγθέντων μεγάλων επιδημιολογικών μελετών^{137, 281}, ενώ ο ρόλος του παθητικού καπνίσματος δεν διερευνήθηκε²⁷⁵.

Πρόσφατες μελέτες^{138,275} υποστηρίζουν ότι η συχνή χρήση βερνικιών νυχιών από άτομα γενετικά προδιατεθειμένα οδηγεί σε εμφάνιση της ΠΧΚ. Στον Κρητικό πληθυσμό με ΠΧΚ, σε αντίθεση με τις ως τώρα αναφορές σε άλλες πληθυσμιακές ομάδες, η χρήση βαφών μαλλιών και βερνικιών νυχιών ήταν λιγότερο συχνή, εύρημα το οποίο δικαιολογείται από τα έθιμα και τις προκαταλήψεις του Κρητικού πληθυσμού, την προχωρημένη ηλικία των ασθενών στη διάγνωση της νόσου, το υψηλό ποσοστό αγροτικής διαμονής και το χαμηλό επίπεδο εκπαίδευσης των ασθενών^{138, 274, 275}.

Αναφορικά με τις άλλες συννοσηρότητες, δεν επιβεβαιώθηκε αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος στην ομάδα των ασθενών μας. Τα στοιχεία βέβαια, για το ιστορικό UTIs προέκυψαν από τη συνέντευξη των ασθενών και δεν τεκμηριώνονται από εργαστηριακές εξετάσεις, ώστε τα συμπεράσματά μας να είναι ασφαλή. Από το χειρουργικό ιστορικό σε συμφωνία με τη Γαλλική μελέτη η χολοκυστεκτομή και στα δύο φύλα, η σκωληκοειδεκτομή μόνο στις γυναίκες ασθενείς, όχι όμως και η αμυγδαλεκτομή βρέθηκαν ως πιθανοί ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για την ΠΧΚ στην Κρήτη, μετά από ανάλυση πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης.

Περισσότεροι ασθενείς σε σχέση με μάρτυρες είχαν ιστορικό κακοηθειών, το ένα τρίτο ανέφεραν ΗCC με αναλογία πιθανοτήτων 4.29 (95%CI 1.13-16.13), εύρημα συμβατό με προηγούμενη αναφορά για αυξημένο κίνδυνο κακοηθειών σε 212 Έλληνες ασθενείς με ΠΧΚ³⁴⁴. Κανένας παράγοντας από το αναπαραγωγικό-γυναικολογικό ιστορικό δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς εθελοντές, ούτε και το ιστορικό κολπίτιδων στις γυναίκες ασθενείς.

Οι ασθενείς με ΠΧΚ θεωρείται ότι προστατεύονται από την ανάπτυξη μεταβολικού συνδρόμου γεγονός το οποίο ερμηνεύεται από τη μή οξειδωση της LDL με τη δράση της λιποπρωτεΐνης X, από την αντιοξειδωτική δράση της χολερυθρίνης και/ή τα αυξημένα επίπεδα της αδιπονεκτίνης^{219,385,530}.

Έτσι λοιπόν και στους ασθενείς Κρητικής καταγωγής παρά το αυξημένο βάρος τους και τα υψηλά επίπεδα ολικής χοληστερόλης η εμφάνιση ΑΥ,ΣΔ και ΣΝ δεν διέφερε

σημαντικά συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Αξιοσημείωτη είναι η ανίχνευση σημαντικά υψηλότερων ποσοστών υπερλιπιδαιμίας στους συγγενείς Α βαθμού σε σχέση με τους μάρτυρες, εύρημα το οποίο είναι αρκετά ενδιαφέρον αν ληφθεί υπόψη ότι πρόκειται για μικρότερη ηλικιακά ομάδα.

Λαμβάνοντας, επιπλέον, υπόψη και την υψηλή συχνότητα εμφάνισης της ενδοοικογενειακής ΠΧΚ στην Κρήτη, θα μπορούσε να συσταθεί ορολογικός έλεγχος των ΑΜΑ στους συγγενείς των ασθενών με ΠΧΚ, ειδικά σε αυτούς που συνυπάρχει τουλάχιστον άλλο ένα αυτοάνοσο νόσημα, ώστε η διάγνωση και η θεραπεία της νόσου να γίνονται σε προωμότερα στάδια.

Μετά τα αποτελέσματα της κλινικής έρευνας και εφόσον προσδιορίσαμε τους πιθανούς περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου για την ΠΧΚ στην Κρήτη και καθορίσαμε τα ποσοστά της ενδοοικογενειακής εμφάνισης της νόσου, η γενετική ανάλυση συσχέτισης ασθενών-μαρτύρων μας έδωσε πληροφορίες για το γενετικό υπόβαθρο ευπάθειας στη νόσο. Από τη μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται στη λειτουργία του ενδοθηλίου βρέθηκε σημαντική συσχέτιση της ΠΧΚ στον Κρητικό πληθυσμό με τον γονότυπο ab και το αλληλόμορφο a, του VNTR στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου eNOS καθώς και με τον ετερόζυγο γονότυπο GT και το έλασσον αλληλόμορφο T από τον πολυμορφισμό μήκους θραύσματος στο εξόνιο 7 του γονιδίου eNOS. Καμία συσχέτιση με τη σοβαρότητα της νόσου δεν ανιχνεύθηκε στη δική μας μελέτη. Εντούτοις, η μοναδική στη βιβλιογραφία μελέτη του πολυμορφισμού *eNOS* exon7 894G/T που έγινε σε Ιταλούς ασθενείς με ΠΧΚ⁴⁹⁸, έδειξε σημαντική συσχέτιση του αλληλομόρφου T μόνο με τα προχωρημένα στάδια της νόσου, και όχι με την ευπάθεια στη νόσο.

Αξίζει να αναφερθεί ότι προγενέστερη αναφορά, η οποία βασίζεται σε ανοσοϊστοχημικές τεχνικές, έχει επιβεβαιώσει την παρουσία συγκρίσιμων επιπέδων eNOS σε ηπατικό ιστό ασθενών σε πρώιμο στάδιο ΠΧΚ και σε ομάδα υγιών εθελοντών, ενώ παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα eNOS σε προχωρημένα στάδια νόσου⁴⁹⁶. Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι γενετικοί πολυμορφισμοί της eNOS ίσως προκαλούν διαταραχές στην παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου(NO), με συνέπεια την ανάπτυξη ιστικής βλάβης στο ήπαρ λόγω αυξημένης ενδοηπατικής αγγειακής αντίστασης.

Δύο ακόμα πολυμορφισμοί σε ένα άλλο γονίδιο σχετιζόμενο με τη λειτουργία του ενδοθηλίου, το γονίδιο της END-1, δεν εμφάνισαν **καμία συσχέτιση** με την ευπάθεια στη νόσο στον Κρητικό πληθυσμό. Ο ρόλος των πολυμορφισμών του γονιδίου της

EDN-1 στην ΠΧΚ δεν έχει διερευνηθεί ξανά στο παρελθόν. Περιορισμένες είναι οι αναφορές των EDN-1 SNPs με αντικρουόμενα αποτελέσματα για το ρόλο τους στην ευπάθεια άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων όπως η λεύκη⁵¹⁹, η ψωρίαση⁵²², το σκληρόδερμα⁵²³ και το πρωτοπαθές φαινόμενο Raynaud⁵²⁰. Εντούτοις, στη μελέτη πολυμορφισμών rs2071942 και rs5370 του γονιδίου της EDN-1 στον Κρητικής καταγωγής πληθυσμό δεν ανευρέθη καμία συσχέτιση με την εμφάνιση της ΠΧΚ. Παρατηρήθηκε όμως οριακά μη στατιστικά σημαντική συσχέτιση των αλληλομόρφων A και T των πολυμορφισμών rs2071942 και rs5370 αντίστοιχα, με τα αρχικά στάδια της νόσου ($P=0.062$ και $P=0.066$ αντίστοιχα).

Τα ευρήματά μας από την ανάλυση των τεσσάρων πολυμορφισμών σε γονίδια που εμπλέκονται στη λειτουργία του ενδοθηλιακού συστήματος ενισχύουν εν μέρει την υπόθεση των ερευνητών Κουρούμαλης και συνεργάτες από το εργαστήριό μας ότι η πρωτοπαθής βλάβη στην ΠΧΚ εντοπίζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος, οδηγώντας σε υπερπαραγωγή ενδοθηλινών με συνέπεια την πρόωμη εμφάνιση πυλαίας υπέρτασης και την πρόκληση ισχαιμικής βλάβης στα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων.

Στηριζόμενοι σε μιαν άλλη υπόθεση ότι SNPs στο γονίδιο της CTLA-4 μπορεί να επηρεάσουν την έκφραση ή τη λειτουργία της πρωτεΐνης και να οδηγήσουν σε διαταραχή των μηχανισμών αυτοανοσίας⁴⁴⁴, ένας σημαντικός αριθμός μελετών γενετικής συσχέτισης έχει διεξαχθεί σε πληθυσμούς διαφορετικής εθνικότητας δίνοντας ετερογενή αποτελέσματα.

Στη δική μας μελέτη αναλύθηκαν οι πολυμορφισμοί rs231775 και rs3087243 του γονιδίου CTLA4 κανένας όμως δεν έδειξε συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης ή τη σοβαρότητα της ΠΧΚ στους ασθενείς Κρητικής καταγωγής. Στο ίδιο συμπέρασμα για το rs231775 A/G SNP κατέληξαν και αντίστοιχες μελέτες ασθενών από το Ηνωμένο Βασίλειο⁴⁶¹, τη Βραζιλία⁴¹⁸, τον Καναδά⁴⁶⁴ και την Ιαπωνία⁴⁶⁵. Όσον αφορά στο rs3087243 C60T SNP καμία συσχέτιση με την ΠΧΚ δεν βρέθηκε ούτε και σε μελέτη της Mayo Clinic⁴⁶¹ ή σε Ιάπωνες ασθενείς⁴⁶⁵, όχι όμως και σε Καναδούς και Ιταλούς ασθενείς^{459,462}. Και οι δύο πολυμορφισμοί του γονιδίου της CTLA4 **δεν φαίνεται να έχουν σημαντική επίδραση στην εξέλιξη της ΠΧΚ στον Κρητικό πληθυσμό**, όπως άλλωστε επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες σε Ευρωπαίους και Ιάπωνες.

Ένα άλλο σημείο το οποίο χρήζει περαιτέρω συζήτησης είναι η παρατήρηση ότι οι AMA αρνητικοί ασθενείς με ΠΧΚ αν και δε διαφέρουν ως προς τα κλινικά και

ιστολογικά χαρακτηριστικά τους, εντούτοις υπάρχουν ενδείξεις υπέρ πιθανής γενετικής διαφοροποίησης αυτών. Ο γονότυπος GG του CTLA4 49A/G SNP έχει συσχετισθεί σημαντικά με την παρουσία AMA αντισωμάτων στον ορό των ασθενών⁵³², ενώ παράλληλα φαίνεται να επιδρά και στην ανάπτυξη των αντισωμάτων αυτών⁴³². Στην παρούσα μελέτη παρατηρούνται αρκετοί γονότυποι με υψηλότερη συχνότητα στους AMA θετικούς ή AMA αρνητικούς ασθενείς (πίνακας 17), χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, εύρημα το οποίο πιθανόν να οφείλεται στον μικρό αριθμό των AMA αρνητικών ασθενών. Περαιτέρω ανάλυση με μεγαλύτερο πλήθος AMA αρνητικών ασθενών ίσως θα μπορούσε να δώσει περισσότερες πληροφορίες.

Αναντίρρητα, η μελέτη μας λαμβάνοντας υπόψη τη χρήση των GWAS στην γονιδιακή ανάλυση και εξερεύνηση της ΠΧΚ και γενικότερα της αυτοανοσίας, ίσως να φαίνεται πολύ βασική.

Η GWAS ανάλυση δύναται να ανιχνεύσει σημαντική συσχέτιση μίας νόσου με έναν αριθμό SNPs. Πρίν όμως αποδοθεί σε ένα ή περισσότερα γονίδια η αιτιολογική τους συσχέτιση με μία νόσο, προϋποτίθεται η πλήρωση ορισμένων συνθηκών για τα αποτελέσματα της GWAS. Καταρχάς χρειάζεται να επιβεβαιωθεί η συσχέτιση των SNPs σε μια κοορτή ασθενών με διαφορετική εθνική προέλευση. Απαραίτητες είναι επίσης οι μελέτες λεπτομερους χαρτογράφησης, όπου μελετάται ο απλότυπος στον οποίο εντοπίζεται ο SNP προκειμένου να ανιχνευθεί ποιο γονίδιο ή ποιες ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδίου φέρουν μετάλλαξη/ πολυμορφισμό που πιθανόν να έχει βιολογικά ενεργό ρόλο στην παθογένεση της υπό διερεύνησης νόσου. Ακολούθως, χρειάζεται να γίνει ενσωμάτωση του λειτουργικού ρόλου του εν λόγω γονιδίου σε ένα κυτταρικό παθογενετικό μονοπάτι της νόσου και τέλος να διεξαχθούν λειτουργικές μελέτες σε κυτταρικές σειρές ή πειραματικά ζωικά μοντέλα ώστε να δειχθεί εάν πράγματι η δυσλειτουργία του γονιδίου αυτού οδηγεί στο ίδιο φαινοτυπικό αποτέλεσμα-τη (νόσο). Αναμφισβήτητα, ο καλύτερος τρόπος για τον εντοπισμό των γονιδίων που ενέχονται στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου είναι η αλληλούχιση ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος, πρόκειται όμως για τεχνική με υψηλό κόστος ακόμα. Παρόλ'αυτα, η αδυναμία αναπαραγωγής των γενετικών ευρημάτων των GWAS μελετών στις κύριες φυλές επιτρέπει τη διεξαγωγή περαιτέρω γενετικών συσχετίσεων σε άλλους πληθυσμούς, προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα γενετικά μονοπάτια και πιθανά να ανευρεθούν αποτελεσματικότερες θεραπείες.

Εν γένει επιδημιολογικές και γεωεπιδημιολογικές μελέτες για την ΠΧΚ στην Ελλάδα δεν έχουν διεξαχθεί. Το νησί της Κρήτης είναι κατάλληλο για επιδημιολογική έρευνα δεδομένου ότι ο πληθυσμός των 600.000 κατοίκων φέρει κοινό γενετικό υπόβαθρο και χαμηλό ποσοστό μετανάστευσης.

Οι γεωχωρικές μελέτες συγκριτικά με την κλασσική στατιστική, εξετάζουν ολοκληρωμένα κάθε φαινόμενο στο περιβάλλον του (αναφορικά με το χώρο, χρόνο, άτομο και νόσο), παρακολουθούν την εξέλιξη των νοσημάτων και οδηγούν στην εφαρμογή χωρικής πρόβλεψης της δυναμικότητας μίας νόσου, χωρικής στατιστικής, χωρικών χαρτών αυτοσυσχέτισης και χαρτών περιοχών κινδύνου. Εκτιμούν λοιπόν, τον κίνδυνο εμφάνισης μίας νόσου σε σχέση με τον πληθυσμό, το χώρο και τον χρόνο, συνυπολογίζοντας πλειάδα παραγόντων, όπως συμβαίνει και στην πραγματική ζωή^{527,528}.

Οι γεωεπιδημιολογικές μελέτες συνιστούν εργαλεία τα οποία δίδουν τη δυνατότητα να κατανοήσουμε και να συσχετίσουμε περιβαλλοντικούς παράγοντες με την παθογένεση ενός νοσήματος, προκειμένου να ληφθούν τα κατάλληλα προληπτικά μέτρα και να εφαρμοστούν μέτρα δημόσιας υγείας. Μέχρι σήμερα έχουν διενεργηθεί γεωεπιδημιολογικές μελέτες για την ΠΧΚ, αλλά χρόνο-χωρικές μελέτες για την ανίχνευση γεωγραφικών συναθροίσεων της νόσου είναι περιορισμένες^{214,391,532,533}.

Επιπλέον, όπως έχει πρόσφατα επισημανθεί και από τον Invernizzi ως τις μέρες μας δεν έχει γίνει καμία μελέτη σε γενετικά ομοιογενή πληθυσμό⁵³⁴.

Παρουσιάσαμε την πρώτη επιδημιολογική και γεωεπιδημιολογική μελέτη για την ΠΧΚ στην Ελλάδα, για την ανίχνευση συναθροίσεων της νόσου καθώς και για πρόβλεψη των μελλοντικών τάσεων εμφάνισης της νόσου στο νησί της Κρήτης.

Από την ανάλυση των δεδομένων που συλλέξαμε ο πληθυσμός της Κρήτης παρουσιάζει γεωγραφική σταθερότητα (μόνο το 14% των ασθενών με ΠΧΚ έχουν μετακινηθεί από τον τόπο γέννησης σε άλλο τόπο διαμονής, εντός του νησιού, από το 1990-2010). Προκειμένου να ενισχυθεί η ομοιογένεια του υπό μελέτη πληθυσμού αποκλείσαμε από την γεωεπιδημιολογική (όχι όμως από την επιδημιολογική) τις περιπτώσεις με ΠΧΚ με μικρότερη από 15 έτη Κρητική διαμονή.

Παγκοσμίως παρατηρείται ευρεία απόκλιση στον επιπολασμό και την επίπτωση της ΠΧΚ, με συνεχώς αυξητικές τάσεις, γεγονός που πιθανά αποδίδεται σε μεγαλύτερη επαγρύπνηση της ιατρικής κοινότητας.

Η μελέτη μας ανέδειξε επίπτωση 20.88 ανά εκατομμύριο ανά έτος και επιπολασμό 365 ανά εκατομμύριο, τιμές οι οποίες είναι από τις υψηλότερες όχι μόνο στην

Ευρώπη, αλλά παγκοσμίως. Πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα σε χώρες του Δυτικού κόσμου παρουσιάζουν ετερογένεια στον επιπολασμό της ΠΧΚ ακόμα και μεταξύ διαφορετικών περιοχών της ίδιας χώρας. Στο Ηνωμένο Βασίλειο υψηλές τιμές επίπτωσης 14-32/εκατομμύριο και 240/εκατομμύριο έχουν αναφερθεί στο Newcastle⁵³⁵ και 19/εκατομμύριο και 129-154/εκατομμύριο αντίστοιχα στην Βορειο-ανατολική Αγγλία⁸, ενώ μικρότερες τιμές έχουν αναφερθεί στη Σκωτία¹¹(10.6/εκατομμύριο και 40.2-92/εκατομμύριο αντίστοιχα).

Αντίστοιχες τιμές με τη Βορειο-ανατολική Αγγλία έχουν βρεθεί στην Ισπανία με επίπτωση 17/εκατομμύριο και επιπολασμό 195/εκατομμύριο²⁰, καθώς και στη Φιλανδία¹⁴.

Παρομοιες τιμές επιπολασμού με αυτές που υπολογίστηκαν στη δική μας μελέτη, 'έχουν αναφερθεί στην Olmsted County, Μινεσότα, στο Βόρειο τμήμα των ΗΠΑ με επίπτωση και επιπολασμό 27/εκατομμύριο και 402/εκατομμύριο, αντίστοιχα⁵³⁶.

Διαφορές επίσης έχουν σημειωθεί μεταξύ περιοχών του Καναδά από 3.26/εκατομμύριο και 22.39/εκατομμύριο αντίστοιχα στο Ontario έως 30.3/εκατομμύριο και 100-227/εκατομμύριο στο Calgary^{16,17}.

Από την άλλη μεριά στην Ασία έχουν αναφερθεί από σχεδόν κανένα περιστατικό στην Ινδία²⁸, έως την υψηλή τιμή σημειακού επιπολασμού 492 περιπτώσεων ανά εκατομμύριο (95% CI, 128 to 1,093) στη Νότιο Κίνα^{25,537}, έως την μεγαλύτερη τιμή επιπολασμού που έχει μέχρι σήμερα αναφερθεί 840/εκατομμύριο στην Ιαπωνία^{29,386}. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η Αυστραλία όπου ανευρέθει χαμηλός επιπολασμός 51/εκατομμύριο, ενώ όταν εξετάστηκαν πληθυσμοί μεταναστών, Ιταλικής και Ελληνικής καταγωγής τότε βρέθηκε υψηλός επιπολασμός 200/εκατομμύριο και 208/εκατομμύριο αντίστοιχα^{18,19}.

Τα ευρήματα της μελέτης μας αναδεικνύουν ότι η επίπτωση της ΠΧΚ στην Κρήτη είναι σταθερή τα τελευταία 20 έτη με εξαίρεση τις αρχές της δεκαετίας '90' όπου η επίπτωση ήταν χαμηλή. Το γεγονός αυτό πιθανά ερμηνεύεται από το γεγονός ότι η ίδρυση της Πανεπιστημιακής Γαστρεντερολογικής Κλινικής, το κέντρο αναφοράς ηπατικών νοσημάτων στο νησί, έγινε το 1990. Επιπλέον όπως φαίνεται και στο χάρτη 3 ίσως ο πραγματικός επιπολασμός της ΠΧΚ στην Κρήτη να είναι υψηλότερος, εφόσον βέβαια οι προβλεπόμενες τιμές στο μαθηματικό μας μοντέλο αποδεικνύονται αληθείς. Απαιτούνται βέβαια μελλοντικές προοπτικές επιδημιολογικές μελέτες στις περιοχές οι οποίες προτείνονται από τους χάρτες πρόβλεψης ως υψηλού κινδύνου, ώστε αυτό να επιβεβαιωθεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα γεωστατιστικά μοντέλα που

χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας ανήκουν σε μια μεγάλη οικογένεια χωρικής στατιστικής που έχει εφαρμοστεί σε αρκετές παρομοίες μελέτες^{10,532,538,539}.

Πρόκειται για τεχνικές οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ακρίβεια, ακόμα και σε ειδικές περιπτώσεις όπου το δείγμα είναι μικρό, τα δεδομένα ελλιπή, υπάρχει λάθος στις μετρήσεις ή στην καταχώρηση των πληροφοριών, ενώ προβλέπεται εφαρμογή δοκιμασιών σφάλματος για κάθε μοντέλο καθώς και τεχνικές εξομάλυνσης⁵⁴⁰.

Η εφαρμογή της τεχνικής Kriging εξομάλυνε αυτόματα τα δεδομένα μας για την εξαγωγή της βέλτιστης πρόβλεψης με το μικρότερο στατιστικό σφάλμα, δεδομένου ότι μπορεί να εκτιμήσει την αβεβαιότητα μίας πρόβλεψης σε αντίθεση με αρκετές άλλες μεθόδους που δεν μπορούν⁵⁴¹.

Εν γένει μέσω των τεχνικών αυτών εκτιμήθηκε ο τρόπος εξάπλωσης και η δυναμική του νοσήματος της ΠΧΚ σε όλες τις περιοχές του νησιού της Κρήτης, έγινε διαστρωμάτωση των εκάστοτε περιοχών με γνώμονα τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου και διέγραψε την πορεία εμφάνισής της στο νησί.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της μελέτης μας παρά τη γενετική ομοιογένεια και τον σχετικά σταθερό πληθυσμό της Κρήτης, η διαπίστωση της ετερογενούς κατανομής συναθροίσεων ΠΧΚ στην Κρήτη ενισχύει την υπόθεση της έκθεσης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου, οι οποίοι μένει να ταυτοποιηθούν. Προς την κατεύθυνση αυτή επιλέξαμε οι ασθενείς μας να έχουν τουλάχιστον 15 έτη μόνιμη διαμονή, ώστε να επιτραπεί περαιτέρω η αναζήτηση και η επίδραση πιθανού περιβαλλοντικού παράγοντα.

Αρχικά λοιπόν η νόσος εμφανίστηκε στα βόρεια αστικά κέντρα κάθε Περιφέρειας και μεταγενέστερα στις αγροτικές περιοχές του νότιου τμήματος του νησιού. Ως ερμηνεία θα μπορούσε να δοθεί η μεγαλύτερη ιατρική επαγρύπνηση και η άμεση πρόσβαση σε διαγνωστικά κέντρα στο βόρειο τμήμα του νησιού. Όμως στο σύνολο των περιπτώσεων η διάγνωση της ΠΧΚ ετέθη στην Πανεπιστημιακή μας Γαστρεντερολογική κλινική μετά από ιατρική παραπομπή. Ίσως λοιπόν η ερμηνεία να πρέπει να αναζητηθεί στην αλλαγή των διαιτητικών συνηθειών και περιβαλλοντικής μόλυνσης στις αστικές περιοχές της Βόρειας Κρήτης. Από τη διαδρομή που διαγράφει η νόσος, βάσει της διασποράς των περιπτώσεων ΠΧΚ ανά 5ετία και ανά περιοχή, φαίνεται πως ακολουθεί τη σταδιακή τουριστική ανάπτυξη του νησιού(από το Βορρά προς το νότο και από την Ανατολή προς τη Δύση) με τις συνέπειες που μπορεί να έχει αυτό στις διαιτητικές συνήθειες και στη μόλυνση του περιβάλλοντος.

Δυστυχώς δεν υπάρχουν βάσεις δεδομένων για την ΠΧΚ τις δεκαετίες 1960 και 1970 ώστε να μπορεί να τεκμηριωθεί καλύτερα η προαναφερθείσα υπόθεση. Ως μελλοντικός στόχος λοιπόν θα μπορούσε να είναι η επέκταση του πεδίου έρευνας στην αναζήτηση παραμέτρων που αφορούν στον τρόπο ζωής των ασθενών με ΠΧΚ στην Κρήτη, όπως αγροτική-αστική διαμονή και η έκθεση σε βιομηχανικά απόβλητα ως πιθανοί περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου.