

**Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Ιατρικής**

**Ρόλος αυτοαντισωμάτων που αναγνωρίζουν
χαρακτηρισμένα και νέα αυτοαντιγόνα του πυρηνικού
φακέλου στην διάγνωση, πρόγνωση και θεραπευτική
ανταπόκριση ασθενών με πρωτοπαθή χολική κίρρωση**

Διδακτορική Διατριβή

Ουρανία Μ. Σφακιανάκη

Βιολόγος

Ηράκλειο 2010

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κουρούμαλης Ηλίας (επιβλέπων): Καθηγητής Γαστροεντερολογίας

Θεωδορόπουλος Παναγιώτης: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας

Τζαρδή Μαρία: Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογοανατομίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κουρούμαλης Ηλίας

Καθηγητής Γαστροεντερολογίας Παν/μίου Κρήτης

Θεωδορόπουλος Παναγιώτης

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Κρήτης

Τζαρδή Μαρία

Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογοανατομίας Παν/μίου Κρήτης

Θερμού Κυριακή

Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Παν/μίου Κρήτης

Καστανάς Ηλίας

Καθηγητής Εργαστηριακής Ενδοκρινολογίας Παν/μίου Κρήτης

Παπαδάκη Ελένη

Καθηγήτρια Κλινικής Αιματολογίας Παν/μίου Κρήτης

Κολιός Γεώργιος

Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας Παν/μίου Θράκης

Στην οικογένεια μου

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γαστροεντερολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ηλία Κουρούμαλη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση και την ενθάρρυνση που μου παρείχε καθώς και για τις πολύτιμες ιδέες και συμβουλές του κατά την εκπόνηση και την συγγραφή της εργασίας αυτής.

Τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Παναγιώτη Θεοδωρόπουλο και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Μαρία Τζαρδή, ευχαριστώ θερμά για την συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της παρούσας εργασίας και για τις χρήσιμες παρατηρήσεις και υποδείξεις τους.

Τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, που στην κρίση τους υποβάλλεται αυτή η διατριβή ευχαριστώ θερμά για την διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους..

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γαστροεντερολογίας για το ευχάριστο περιβάλλον και την συμπαράστασή τους για την ολοκλήρωση της προσπάθειας αυτής. Ευχαριστώ την κ. Μαίρη Κουλεντάκη και τα μέλη της Γαστροεντερολογικής κλινικής του Παν/κού Νοσοκομείου Ηρακλείου, για την πολύτιμη βοήθεια τους.

Επίσης αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τις κυρίες: Κουράκη Κατερίνα, Μπουραντά Μαρία και Χατζάκη Ρένα, μέλη του Ανοσοϊστοχημικού Εργαστηρίου του Παν/κού Νοσοκομείου Ηρακλείου, για την βοήθεια και την καλοσύνη που μου έδωσαν απλόχερα όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήταν παράληψη να μην ευχαριστήσω τους φίλους μου, ήταν πάντα δίπλα μου και ο καθένας με τον δικό του μοναδικό τρόπο με στήριζε και μου έδινε κουράγιο να συνεχίσω. Σας ευχαριστώ όλους παιδιά !!!

Ένα μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στην γιαγιά μου Σοφία, αν δεν ήταν εκείνη αυτή η διατριβή ίσως να μην υπήρξε ποτέ.

Ευχαριστώ τους αγαπημένους μου γονείς που με στήριζαν με την αγάπη και την φροντίδα τους και την αδερφή μου Κατερίνα που στάθηκαν δίπλα μου και με βοήθησαν να ολοκληρώσω το στόχο μου.

Η εργασία αυτή υποστηρίχτηκε οικονομικά από το ερευνητικό πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ 2003 (03ΕΔ066) με υπεύθυνο τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παναγιώτη Θεοδωρόπουλο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά της νόσου	2
1.2 Ιστορική αναδρομή	2
1.3 Επιδημιολογία	3
1.4 Κλινική περιγραφή και διαγνωστικοί μέθοδοι	4
1.4.1 Βιοχημικός έλεγχος	5
1.4.2 Ο ρόλος της απεικόνισης	6
1.4.3 Βιοψία ήπατος	6
1.5 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με PBC	7
1.5.1 Συμπτώματα	8
1.5.2 Φυσική εξέταση	9
1.6 Άλλες ασθένειες/διαταραχές συνδεδεμένες με την PBC	12
1.7 AMA-Αρνητική PBC	13
1.8 Θεραπεία	14
1.8.1 Θεραπεία με UDCA	14
1.8.2 Μεταμόσχευση ήπατος	16
1.9 Επιβίωση στην PBC	16
2. Αιτιοπαθογένεση της PBC	17
2.1 Γενετικοί παράγοντες	17
2.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες	20
2.2.1 Βακτήρια	20
2.2.2 Ιοί	21
2.2.3 Προηγούμενες χειρουργικές επεμβάσεις	21
2.2.4 Χημικοί παράγοντες	22
2.3 Παθογένεση της PBC	22
2.3.1 Ρόλος των (BECs) στην παθογένεση της νόσου	22
2.3.2 Ανοσολογική απάντηση στη PBC	23
2.3.3 Ρολος των ενεργων μορφων οξυγονου (ROS) στην PBC	25
2.3.4 Μοντέλα ζώων	26
2.3.5 Θεωρίες παθογένεσης	26
2.3.6 Παθογένεση της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσεως: μια ενοποιημένη υπόθεση	31

3. Αντισώματα στην PBC	37
3.1 Αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA)	37
3.1.1 AMA-M2 αντισώματα	38
3.1.2 Μη-M2 μιτοχονδριακά αντισώματα	41
3.2 Πυρηνικός φάκελος και Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA)	42
3.2.1 Πυρηνικός φάκελος	42
3.2.2 Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA)	44
3.3 Άλλα αντισώματα στην PBC	49
4. Μέθοδοι ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων στην PBC	50
4.1 Μέθοδοι ανίχνευσης αντιμιτοχονδριακών αυτοαντισωμάτων στην PBC	50
4.1.1 Τεχνική του ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των AMA.	50
4.1.2 Μέθοδος ποσοτικού καθορισμού αντίδρασης συνδέσεως του συμπληρώματος (CFTs)	52
4.1.5 Μέθοδος με την χρήση σφαιριδίων.	57
4.2 Μέθοδοι ανίχνευσης αντιπυρηνικών αυτοαντισωμάτων	58
4.2.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός (IF) για την ανίχνευση των ANA	59
4.2.2 Ανοσοκατακρήμνιση (Immunoprecipitation)	60
4.2.3 Ανοσοαποτύπωση	61
4.2.4 Ηλεκτρονική μικροσκοπία	61
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	64
1. ΣΚΟΠΟΣ	65
2. ΥΛΙΚΑ	66
2.1 Υλικά κυτταροκαλλιιεργειών	66
2.2 Υλικά ανοσοφθορισμού	66
2.3 Υλικά για εγκλεισμό και αποπαραφίνωση ιστών	67
2.4 Προσδιορισμός της gp210 με ELISA	67
2.5 Διαλύματα	67
3. ΑΣΘΕΝΕΙΣ	69
4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	71
4.1 Λήψη και καταγραφή υλικού	71
4.1.1 Δημιουργία ηλεκτρονικού αρχείου ασθενών	71
4.1.2 Ορός	72

4.2 Κυτταροκαλλιέργειες	72
4.3 Έμμεσος ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων του ορού	72
4.3.1 Αντιμιτοχονδριακά Αυτοαντισώματα (AMA)	72
4.3.2 Αυτοαντισώματα έναντι αντιγόνων του πυρηνικού φακέλου (ANEA)	72
4.4 Ανίχνευση και ημιποσοτικός προσδιορισμός, στον ορό, αντισωμάτων έναντι της gp210	73
4.5 Βιοψία ήπατος	73
4.6 Εγκλεισμός ιστού σε παραφίνη	73
4.7 Αποπαραφίνωση και ενυδάτωση τομών	74
4.8 Ανοσοφθορισμός σε ιστούς παραφίνης	74
4.9 Στατιστική ανάλυση	74
5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	76
5.1 ANEA θετικοί έναντι ANEA αρνητικών ασθενών	76
5.2 Ανίχνευση αυτοαντισωμάτων έναντι της Gp210	83
5.2.1 Αντί-gp210 θετικοί έναντι ANEA θετικών ,αντί-gp210 αρνητικών.	83
5.2.2 Αντί-gp210 θετικοί έναντι ANEA αρνητικών	86
5.2.3 ANEA θετικοί, αντί-gp210 αρνητικοί έναντι ANEA αρνητικών.	88
5.3 Ανοσοφθορισμός σε ιστούς παραφίνης.	90
5.3.1 Ανοσοφθορισμός σε ιστούς ασθενών με PBC χρησιμοποιώντας ομόλογο ορό και δευτερογενή IgG αντισώματα.	90
5.3.2 Ανοσοφθορισμός ιστών ασθενών με PBC με ετερόλογο ορό PBC	93
5.3.3 Ανοσοφθορισμός ιστών ασθενών με PBC και ορό υγιούς	96
5.3.4 Ανοσοφθορισμός ιστών ασθενών με disease controls και ορό υγιούς.	97
5.3.5 Ανοσοφθορισμός ιστού υγιούς με ορό ασθενών με PBC.	98
5.3.6 Ανοσοφθορισμός σε ιστό ασθενών με disease control και ορός ασθενών με PBC.	100
5.3.7 Ανοσοφθορισμός σε ιστό ασθενών με PBC και ορό από disease control.	101

5.3.8 Ανοσοφθορισμός σε ιστό ασθενών με disease control και ορό από disease control.	103
5.3.9 Ανοσοφθορισμός σε ιστούς ασθενών με PBC χρησιμοποιώντας ομόλογο ορό και δευτερογενή IgM αντισώματα.	104
6.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	108
7.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	117
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	118
ABSTRACT	121
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	124

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά της νόσου

Η πρωτοπαθής χολική κίρρωση (PBC) είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος του ήπατος, πιθανόν αυτοάνοσης αιτιολογίας. Χαρακτηρίζεται από καταστροφή των μικρών ενδοηπατικών χοληφόρων αγγείων και έχει ως συνέπεια την χολόσταση, ίνωση, κίρρωση και ηπατική ανεπάρκεια.

1.2 Ιστορική αναδρομή

Το 1851 ο Addison και ο Gull περιέγραψαν για πρώτη φορά ένα χρόνια χολοστατικό σύνδρομο, χαρακτηριζόμενο από ίκτερο και ξανθώματα (1)

Αυτή ήταν γενικά η πρώτη φορά που χαρακτηρίστηκε η νόσος, ενώ ο όρος πρωτοπαθής χολική κίρρωση χρησιμοποιήθηκε το 1949 από τους Dauphinee και Sinclair.(2).

Ήδη από τις αρχές της δεκαετίας 1950 -1960 υπήρχαν λεπτομερείς μελέτες που περιέγραφαν τα κλινικά, ορολογικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης, χωρίς να είναι γνωστή η αιτιολογία. Το 1950 οι Ahrens et al έκαναν την πρώτη λεπτομερή δημοσίευση 17 ασθενών με PBC (3). Το 1959 η Sherlock ανέφερε μία άλλη σειρά ασθενών με PBC, όπου ανακάλυψε ότι η ασθένεια μπορούσε να διαγνωστεί σε προ-κίρρωτικό στάδιο και πρότεινε τον όρο "chronic intrahepatic cholestasis" ως πιο κατάλληλο για την περιγραφή της νόσου. (4)

Το 1965 οι Walker et al ανακάλυψαν ότι στην PBC, αλλά όχι σε άλλες χολοστατικές ασθένειες, ο ορός ασθενών περιέχει ένα αντίσωμα που αντιδρά κατά προτίμηση με κύτταρα πλούσια σε μιτοχόνδρια (5) .

Δύο χρόνια αργότερα οι Berg et al (1967) επιβεβαίωσαν ότι αυτά τα ειδικά αντισώματα αντιδρούν με τα μιτοχόνδρια, και ότι ο αντιγονικός επίτοπος βρίσκεται στο εσωτερικό της μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Η ανακάλυψη των AMA ήταν ορόσημο για την ιστορία της PBC (6). Πίνακας 1 (7).

Πίνακας 1 :Ιστορική αναδρομή της PBC

Year	Concepts on pathogenesis
1851	Possible first description of PBC (Addison and Gull)
1892	Cases described as hypertrophic biliary cirrhosis probably included PBC (Hanot)
1938	Case of xanthomatous biliary cirrhosis likely to have been PBC (Thannhauser et al)
1949	Primary biliary cirrhosis coined to distinguish the disease from obstructive biliary cirrhosis (Dauphinée and Sinclair)
1950	Modern description of disease affecting middle-aged to older women with progressive jaundice, pruritus, and hepatosplenomegaly (Ahrens et al)
1958	Complement-fixing antibodies detected to tissue homogenates with implications for an autoimmune pathogenesis (Mackay)
1965	Description as chronic non-suppurative destructive cholangitis included the fundamental histological lesions (Rubin et al)
1965	Indirect immunofluorescence revealed a cytoplasmic staining representing antimitochondrial activity (Walker et al)
1982	M nomenclature developed for various mitochondrial antigens, with M2 being associated specifically with PBC (Berg)
1985	Detection in PBC by immunoblotting of a group of autoantigenic peptides of molecular weight 74–48 kDa (various groups)
1987	cDNA for the major 47 kDa mitochondrial antigen of PBC cloned from gene expression library (Gershwin et al)
1988	The cloned 74 kDa antigen identified as pyruvate dehydrogenase complex (Yeaman et al; van de Water et al)
1991	Effective treatment of PBC with UDCA (Poupon)
1992–3	Accumulation of PDC-E2 (or a mimic thereof) in biliary epithelial cells in PBC (Joplin et al; van de Water et al)
2000–5	?

1.3 Επιδημιολογία

Η PBC εμφανίζεται στην 4^η-7^η δεκαετία της ζωής των ασθενών και σπάνια γίνεται διάγνωση σε εφηβικές ηλικίες, συγκεκριμένα το 1992 και 1998 καταγράφηκαν 2 περιστατικά στον Καναδά, σε κορίτσια ηλικίας 16 και 15 ετών αντίστοιχα (8).

Η PBC επικρατεί στο γυναικείο φύλο με αναλογία 8:1 (9) ή 9:1 (10, 11), ανάλογα με την περιοχή όπου γίνεται η μελέτη. Έχει βρεθεί ότι από την PBC προσβάλλονται άτομα κάθε εθνικότητας και αντιπροσωπεύει το 0,6-2,0% των θανάτων από κίρρωση σε όλο τον κόσμο (12). Ο επιπολασμός της εκτιμάται ότι κυμαίνεται μεταξύ 6,7 και 94 κρούσματα ανά εκατομμύριο πληθυσμού ενώ η επίπτωση της κυμαίνεται μεταξύ 0,7 και 49 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού ανά έτος (13-16). Πίνακας 2 (17).

Όπως φαίνεται στον πίνακα 2 τα υψηλά ποσοστά επίπτωσης και επιπολασμού απαντώνται στο βόρειο ημισφαίριο, ενώ ο μικρότερος επιπολασμός παρατηρείται στην Αυστραλία με 19,1 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού (18).

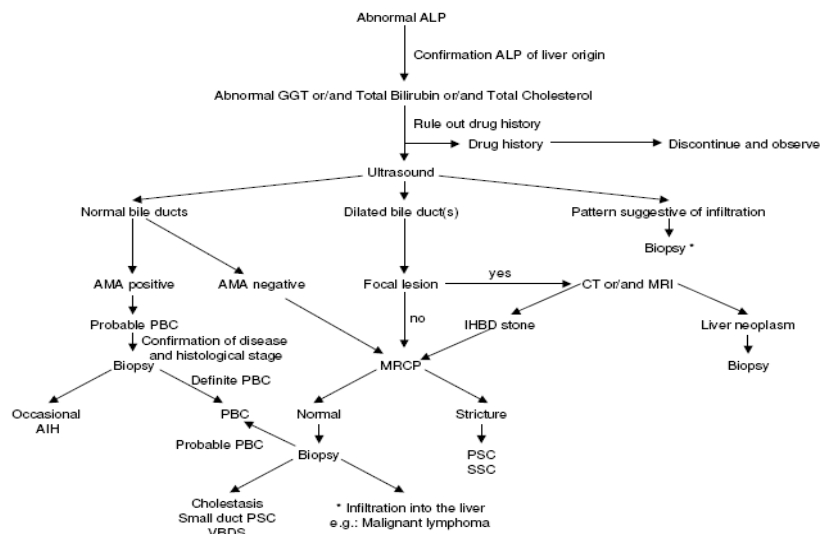
Πίνακας 2 :Επιδημιολογικός πίνακας της PBC

Table 1 Epidemiology of primary biliary cirrhosis: results from the most relevant studies ¹²⁻²¹					
Area	Patients (No.)	Prevalence (per million)	Incidence (per million/yr)	Age (yr)	Gender (M:F)
Europe (1984)	569	23	54	54	1:10
Northern Sweden (1990)	111	151 ¹	13.3	55	1:6
North East England (1990)	347	129 ¹	19	58	1:9
Ontario, Canada (1990)	225	22	3.3	59	1:13
Victoria, Australia (1995)	84	19	-	-	1:11
Newcastle, England (1997)	160	240 ¹	22	66	1:10
Olmsted County, MN (2000)	46	402 ¹	27	-	1:8
Victoria, Australia (2004)	249	51 ¹	-	61	1:9

1.4 Κλινική περιγραφή και διαγνωστικοί μέθοδοι

Η διάγνωση της PBC βασίζεται σε συνδυασμό βιοχημικών, κλινικών και ιστολογικών εξετάσεων. Εικόνα 1 (19). Βέβαιη διάγνωση της νόσου, έχουμε σε άτομα με αυξημένους δείκτες χολόστασης για περισσότερο από 6 μήνες, ανιχνεύσιμα αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA) στον ορό τους και ιστολογικά χαρακτηριστικά ενδεικτικά της νόσου. Όταν υπάρχουν δύο από τα τρία παραπάνω κριτήρια, τότε μιλάμε για μια πιθανή PBC (20).

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μία αύξηση των ασθενών με PBC και η διάγνωση γίνεται σε πρωϊμότερο στάδιο από ότι στο παρελθόν (21, 22) και αυτό οφείλεται σε δύο παράγοντες. Ο πρώτος είναι ότι τα τελευταία χρόνια οι τεχνικές ανίχνευσης των AMA είναι πιο ακριβείς και ο δεύτερος είναι ότι γίνεται πιο συχνά βιοχημικός έλεγχος σε υγιή άτομα (23).



Εικόνα 1 Διάγνωση της PBC. Συντομογραφίες: AIH, αυτοάνοση ηπατίτιδα, ALP, αλκαλική φωσφατάση, AMA, αντιμιτοχονδριακά αντισώματα, CT, αξονική τομογραφία, GGT, γ-γλουταμύλ τρανσπεπτιδάση, IHBD, ενδοηπατικό χοληφόρο, MRCP, μαγνητική χολαγγειοπανεκτογραφία, MRI, μαγνητική τομογραφία, PBC, πρωτοπαθής χολική κίρρωση, PSC, πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα, SSC, δευτερογενής σκληρυντική χολαγγειίτιδα, VBDS, vanishing bile duct syndrome

1.4.1 Βιοχημικός έλεγχος

Οι περισσότεροι ασθενείς με PBC έχουν μη φυσιολογικές τιμές σε ηπατικούς δείκτες όπως η αλκαλική φωσφατάση, η δραστικότητα των αμινοτρανσφερασών (αλανίνης ή ασπαρτάμης) και υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης M (IgM). Σε μερικούς ασθενείς με PBC οι υψηλές τιμές στην δραστικότητα των αμινοτρανσφερασών συσχετίζονται με υπερανοσοσφαιριναιμία (αύξηση των IgG). Οι αλλαγές στους βιοχημικούς δείκτες, εν μέρει οφείλονται στο στάδιο και εν μέρει στη σοβαρότητα της ιστολογικής βλάβης. Σε ασθενείς χωρίς κίρρωση, ο βαθμός της αύξησης της αλκαλικής φωσφατάσης είναι συνδεδεμένος με την σοβαρότητα της χολαγγειοπενίας και την φλεγμονή, ενώ η αύξηση στην δραστικότητα των αμινοτρανσφερασών και τα επίπεδα των IgG αντανακλούν κυρίως στον βαθμό περιπυλαίας και λοβιακής νέκρωσης και φλεγμονής, η

υπερανοσοσφαιριναιμία στην σοβαρότητα της χολαγγειοπενίας και την χολική διαβρωτική νέκρωση. Αύξηση στον ορό χολερυθρίνης, γ-ανοσοσφαιρίνης και υαλουρονικού οξέος συνοδευόμενη από μείωση αλβουμίνης και μείωση αιμοπεταλίων, είναι οι πρώιμες ενδείξεις μίας επερχόμενης κίρρωσης και πυλαίας υπέρτασης (24-26). Όπως και στις άλλες χολοστατικές ασθένειες τα επίπεδα χοληστερίνης είναι αυξημένα (27). Στον ορό των ασθενών, τα επίπεδα των χολικών οξέων είναι αυξημένα, αλλά συνήθως σε εξετάσεις ρουτίνας δεν ελέγχονται (28).

1.4.2 Ο ρόλος της απεικόνισης

Η μη επεμβατική απεικόνιση του ήπατος και των χοληφόρων είναι υποχρεωτική σε όλους τους ασθενείς με βιοχημικές ενδείξεις χολόστασης. Εάν η διάγνωση είναι αβέβαιη, τότε η χολαγγειογραφία μπορεί να είναι απαραίτητη κατά προτίμηση με μη επεμβατική μαγνητική τομογραφία ή ενδοσκοπικά για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο μιας πρωτογενούς σκληρυντικής χολαγγειίτιδας ή άλλες παθήσεις των χοληφόρων. Η ελαστογραφία (Fibroscan) είναι ένα νέο επεμβατικό εργαλείο για την αξιολόγηση του βαθμού ινώσεως του ήπατος, η οποία έχει μελετηθεί σε ασθενείς με PBC (29), αλλά δεν έχει εγκριθεί ακόμη από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (Food and Drug Administration, FDA) (28).

1.4.3 Βιοψία ήπατος

Η βιοψία ήπατος σε ασθενείς με $AMA \geq 1:40$ και βιοχημικά ευρήματα συμβατά με την νόσο είναι απαραίτητη για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση της PBC και για την σταδιοποίηση των ασθενών. Ωστόσο, τα ιστολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με PBC, ιδίως σε μη κίρρωτικούς ασθενείς, είναι πολύ συγκεκριμένα. Παρά το γεγονός ότι τα διαφορετικά ιστολογικά στάδια της νόσου (στάδιο 1 έως 4) έχουν καλά περιγραφεί, δεν είναι ασυνήθιστο να βρεθούν τυπικά χαρακτηριστικά διαφορετικών σταδίων στο ίδιο δείγμα μιας βιοψίας. Επειδή αυτή η ασθένεια πλήττει κυρίως χοληφόρα, είναι απαραίτητο το δείγμα της βιοψίας να έχει επαρκή αριθμό πύλαίων διαστημάτων ώστε να μπορεί να γίνει μια σωστή εκτίμηση της βλάβης που έχουν υποστεί τα

χοληφόρα (30). Στον πίνακα 3 (31) ο Ludwig παραθέτει μία σύγκριση των τεσσάρων (I-IV) σταδίων της PBC, με εκείνα του Scheuer το 1967 (32) και των Scheuer, Popper και Schaffner το 1970 (33). Η έννοια της σταδιοποίησης βασίστηκε σε προηγούμενες εργασίες των Popper, Rubin και Schaffner το χρονικό διάστημα 1962-1965 (34-36). Σύμφωνα με τον Ludwig στο στάδιο I η νόσος χαρακτηρίζεται από πύλαια ηπατίτιδα και κοκκιωματώδη καταστροφή των χοληφόρων. Το στάδιο II χαρακτηρίζεται από περιπυλαία ηπατίτιδα και πολλαπλασιασμό των χοληφόρων. Η παρουσία του ινώδους διαφράγματος ή γεφυροποιός νέκρωση χαρακτηρίζει το στάδιο III και η κίρρωση το στάδιο IV (31) Σε κίρρωτικό στάδιο, μπορεί να είναι αδύνατον να γίνει με ακρίβεια η αιτιολογική διάγνωση της PBC (37).

Πίνακας 3 :Σύγκριση σταδιοποίησης διαφορετικών συστημάτων στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση

Table 1. Comparison of staging systems for CNDC

Classi- fication	Morphologic findings on biopsy			
	Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
Ludwig, Dickson, and McDonald	<i>Portal</i> Portal hepatitis	<i>Periportal</i> Periportal hepatitis	<i>Septal</i> Bridging necrosis (pas- sive septa) or septal fibrosis (active septa), or both	<i>Cirrhosis</i>
Popper and Schaffner	<i>Cholangitis</i> Portal hepatitis with duct lesions	<i>Ductular proliferation</i> Same as stage II of Scheuer	<i>Precirrhosis</i> Same as stage III of Scheuer	<i>Cirrhosis</i>
Scheuer	<i>Florid duct lesion</i> Portal hepatitis with duct lesions, or peri- portal hepatitis with duct lesions but without ductular proliferation	<i>Ductular proliferation</i> Periportal hepatitis (and bridging necrosis?), with ductular pro- liferation but without fibrosis	<i>Scarring</i> Septal fibrosis but absence of true regenerative nodules	<i>Cirrhosis</i>

1.5 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με PBC

Στις μέρες μας, σε περισσότερους από τους μισούς ασθενείς γίνεται διάγνωση της νόσου όταν αυτοί είναι σε ασυμπτωματικό στάδιο (38, 39). Μπορεί να περάσουν χρόνια πριν τα ασυμπτωματικά άτομα να αναπτύξουν

συμπτώματα της νόσου. Αλλά η ασυμπτωματική νόσος δεν είναι συνώνυμη με πρόωρο στάδιο της νόσου. Δεν είναι ακόμα γνωστό γιατί ορισμένοι ασθενείς παραμένουν ασυμπτωματικοί και άλλοι προχωρούν γρήγορα και αναπτύσσουν ηπατική ανεπάρκεια. Η σοβαρότητα της ηπατικής νόσου μπορεί να μην συμφωνεί με τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων. Το 21% και 19% των ασθενών παρουσιάζεται με κόπωση και κνησμό αντίστοιχα κατά την διάγνωση (38, 40). Στην πλειονότητα των ασθενών χωρίς θεραπεία και των ασυμπτωματικών ασθενών, κάποιοι εμφανίζουν συμπτώματα στα επόμενα 2-4 χρόνια, ενώ ένα τρίτο αυτών μπορεί να παραμείνει χωρίς συμπτώματα για πολλά χρόνια (38, 41).

1.5.1 Συμπτώματα

1.5.1.1 Κόπωση:

Κατά τη διάρκεια της νόσου, μέχρι και το 80% των ασθενών με PBC μπορεί να εμφανίσει χρόνια κόπωση η οποία παρεμβαίνει στις δραστηριότητες της καθημερινής ζωής με αποτέλεσμα να υποβαθμίζεται η ποιότητα της ζωής τους (42, 43). Η κόπωση δεν σχετίζεται με τη σοβαρότητα, το ιστολογικό στάδιο, ή τη διάρκεια της PBC (42). Ο ακριβής παθοφυσιολογικός μηχανισμός που οδηγεί σε χρόνια κόπωση στην PBC και άλλες χολοστατικές ασθένειες δεν είναι γνωστός μέχρι στιγμής. Υπάρχει μια συσχέτιση με δυσλειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος (ιδιαίτερα ορθοστατική υπόταση), διαταραχές του ύπνου και υπερβολική υπνηλία κατά την διάρκεια της ημέρας (43), και ελαφριάς μορφή κατάθλιψη (44). Επίσης θεωρείται ότι η κόπωση μπορεί να οφείλεται σε αθεράπευτο υποθυρεοειδισμό που εμφανίζεται περίπου στο 20% των ασθενών με PBC (45). Η κόπωση δεν βελτιώνεται με τη θεραπεία της κατάθλιψης (46), ούτε με την καθιερωμένη θεραπεία της PBC με UDCA. Ακόμη και η μεταμόσχευση ήπατος μπορεί να αποτύχει να βελτιώσει αυτό το σύμπτωμα (47).

1.5.1.2 Κνησμός:

Ο κνησμός συνδέεται πιο συχνά με την PBC από ότι με άλλες χρόνιες χολοστατικές παθήσεις του ήπατος. Κατά τη διάρκεια της ασθένειας, ο κνησμός εμφανίζεται στο 20% έως 70% των ασθενών (48). Αναπτύσσεται

ανεξάρτητα από το βαθμό της χολόστασης και το στάδιο της νόσου. Ο κνησμός μπορεί να είναι τοπικός ή σε όλο το σώμα, συνήθως χειρότερος τη νύχτα, και συχνά επιδεινώνεται από την επαφή με το μαλλί ή άλλα υφάσματα, την θερμότητα, ή την εγκυμοσύνη. Η παθογένεση του κνησμού παραμένει δυσνόητη μέχρι σήμερα. Μεταβολίτες των χολικών αλάτων, μεταβολίτες της προγεστερόνης, ισταμίνης, και ενδογενή οπιοειδή, είναι μερικές ουσίες, που έχουν προταθεί ως αιτιώδεις παράγοντες για τον κνησμό (49).

1.5.1.3 Άλλα συμπτώματα

Περίπου το 10% των ασθενών διαμαρτύρονται για πόνο ή δυσφορία στο άνω δεξιό τεταρτημόριο, τα οποία παρέρχονται αφτεαυτών (48).

Οι ασθενείς με κίρρωση μπορεί να παρουσιάσουν ασκίτη, ηπατική εγκεφαλοπάθεια και / ή κίρσους οισοφάγου (50).

1.5.2 Φυσική εξέταση

Η φυσική εξέταση μπορεί να είναι φυσιολογική στους ασθενείς που βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο της νόσου. Καθώς η νόσος εξελίσσεται, οι ασθενείς μπορεί να αναπτύξουν σημεία όπως πυλαία υπέρταση, σπληνομεγαλία και φλεβεκτάσεις κοιλιακού τοιχώματος. Επίσης εμφανίζουν χαρακτηριστικά της χολόστασης όπως χρωματισμό του δέρματος λόγω της αυξημένης εναπόθεσης μελανίνης στο δέρμα. Στα τελευταία στάδια της νόσου, όταν και ο σπλήνας είναι διατεταμένος, εμφανίζονται τα σημάδια της ηπατικής ανεπάρκειας, όπως ασκίτης και η εγκεφαλοπάθεια (38). Ξανθελάσματα υπάρχουν σε μειοψηφία των ασθενών και ξανθώματα είναι σπάνια στις μέρες μας, παρά το γεγονός ότι η PBC σχετίζεται με την παρουσία υπερχοληστερολαιμίας. Επίσης μπορεί να υπάρχουν σημάδια και συμπτώματα σκληροδερμίας.

1.5.2.1 Πυλαία υπέρταση

Παρόμοια με άλλες ασθένειες του ήπατος, πυλαία υπέρταση είναι το σύμπτωμα που αναπτύσσεται πιο συχνά σε ασθενείς με PBC κατά τη

διάρκεια της νόσου, όταν έχουν εδραιωμένη κίρρωση. Υπάρχουν σπάνιες περιπτώσεις όπου σε αντίθεση με άλλες ασθένειες του ήπατος, η πυλαία υπέρταση μπορεί να εμφανιστεί και σε ασθενείς που βρίσκονται σε προ-κίρρωτικό στάδιο. Αυτοί οι ασθενείς μπορεί να αιμορραγούν από κίρσους του οισοφάγου, ή γαστρικούς κίρσους, ή από πυλαία γαστροπάθεια παρά το γεγονός ότι η συνθετική λειτουργία του ήπατος είναι φυσιολογική ή σχεδόν φυσιολογική. Οι ασθενείς μπορούν να επιβιώσουν, για πολλά χρόνια μετά από αιμορραγικό επεισόδιο χωρίς μεταμόσχευση ήπατος (51, 52).

Ωστόσο, η πυλαία υπέρταση όπως καθορίζεται από την μέτρηση της διαφοράς πίεσεως μεταξύ κοιλιοειδών και ηπατικών φλεβών (πίεση ενσφηνώσεως, PHG) είναι κοινή στους ασθενείς με PBC, και μία σταθερή ή - υπό θεραπεία - βελτίωση της PHG είναι ένας προγνωστικός δείκτης επιβίωσης (53, 54).

1.5.2.2 Νόσος των οστών

Η οστεοπόρωση είναι η διαταραχή των οστών που παρατηρείται πιο συχνά σε ασθενείς με PBC (55) και το ποσοστό μπορεί να ανέλθει στο ένα τρίτο των ασθενών (56, 57). Ο σχετικός κίνδυνος για οστεοπόρωση στην PBC σε σύγκριση με υγιή άτομα ίδιου φύλου και ηλικίας είναι 4,4 (56). Η ανάπτυξη της οστεοπόρωσης σε ασθενείς με PBC έχει αποδοθεί σε δύο παράγοντες, την μειωμένη δραστηριότητα οστεοβλαστών και την αυξημένη δραστηριότητα οστεοκλαστών (58).

Ο μεταβολισμός της βιταμίνης D είναι φυσιολογικός στους ασθενείς με PBC με εξαιρούνται οι ασθενείς με χολόσταση και κλινικά προχωρημένη νόσο οι οποίοι, παρουσιάζουν έλλειψη της βιταμίνης D (59-61).

1.5.2.3 Υπερλιπιδαιμία

Τα λιπίδια του ορού μπορεί να είναι εντυπωσιακά αυξημένα στην PBC (62, 63). Ο μηχανισμός της υπερλιπιδαιμίας είναι διαφορετικός από ότι σε άλλες ασθένειες. Τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας είναι αυξημένα, καθώς επίσης υπάρχουν και ασυνήθιστα σωματίδια λιποπρωτεϊνών, όπως αυτά της λιποπρωτεΐνης X, τα οποία συσσωρεύονται (64). Η μέση τιμή των επιπέδων χοληστερόλης ήταν 370 και 265 mg / dL σε

δύο μελέτες ασθενών με PBC και τα επίπεδα κυμαίνονταν από 120-1775 mg / dL (64, 65). Ενώ οι λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας είναι δυσανάλογα αυξημένες σε σύγκριση με τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας, και οι ασθενείς με PBC δεν διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο θανάτου από αθηροσκλήρωση (63, 65, 66).

1.5.2.4 Ανεπάρκεια βιταμινών

Παρά το γεγονός ότι οι ασθενείς με PBC μπορεί να έχουν μειωμένη ροή χολικών οξέων από το δωδεκαδάκτυλο με αποτέλεσμα αυξημένο κίνδυνο δυσαπορρόφησης των λιπιδίων, ωστόσο, κλινικής σημαντικότητας ελλείψεις των λιποδιαλυτών βιταμινών A, D, E, K δεν είναι συνήθεις (60, 67-69). Ο μεταβολισμός της βιταμίνης D και τα επίπεδα στον ορό της 25-υδροξυ βιταμίνης D και 1-25 διύδροξυ βιταμίνης D είναι συνήθως σε φυσιολογικές τιμές, στους ασθενείς με PBC, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που πάσχουν από οστεοπόρωση (70). Η εξαίρεση συμβαίνει σε χολοστατικούς ασθενείς που περιμένουν μεταμόσχευση ήπατος που μπορεί να έχουν επίσης οστεομαλακία. Τα επίπεδα των βιταμινών A, D, E, K μπορεί να μειωθούν, έχοντας ως αποτέλεσμα την ημεραλωπία, οστεοπενία, νευρολογικές διαταραχές, και μειωμένη δραστηριότητα προθρομβίνης, αντίστοιχα (71, 72).

1.5.2.5 Λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος

Έχουν αναφερθεί επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος σε ποσοστό έως και 19% των γυναικών με PBC και πιθανολογείται μια παθοφυσιολογική συσχέτιση με στελέχη της *Escherichia coli* (73).

1.5.2.6 Κακοήθεια

Μελέτες σχετικές με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε γυναίκες με PBC αναφέρουν είτε αύξηση του κινδύνου (74, 75) είτε ίση πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου (76, 77), σε σύγκριση με υγιείς γυναίκες. Η πιθανότητα ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος στο τελευταίο στάδιο της νόσου ασθενών με PBC κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα με άλλα είδη κίρρωσεων

(78-80), αλλά φαίνεται να είναι αυξημένη στους άνδρες που πάσχουν από PBC. Μία μελέτη αναφέρει ότι στους ασθενείς με PBC σε προχωρημένο στάδιο ο επιπολασμός του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος ήταν κατά μέσο όρο 5,9% (4,1% σε γυναίκες, αλλά 20% στους άνδρες) (78).

1.6 Άλλες ασθένειες/διαταραχές συνδεδεμένες με την PBC

Μια σειρά ασθενειών/διαταραχών παρατηρούνται συχνά σε ασθενείς με PBC. Πίνακας 4 (19) Θυρεοειδική δυσλειτουργία συνδέεται συχνά με την PBC (81). Το σύνδρομο Sicca παρατηρείται σε ποσοστό που φτάνει και το 70% των ασθενών (82). Ατελής ή πλήρες σύνδρομο CREST (δερματική ασβέστωση, σύνδρομο Raynaud, διαταραχή κινητικότητας του οισοφάγου, σκληροδακτυλία, τηλεαγγειεκτασία) δεν είναι ασυνήθιστα (83). Κοιλιοκάκη έχει αναφερθεί σε ποσοστό μέχρι και 6% των ασθενών (72) και είναι κατά πολύ πιο συχνά συνδεδεμένο με την PBC από ότι η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (84). Άλλα αυτοάνοσα τα οποία συνυπάρχουν με την PBC είναι: σκληροδερμία, ρευματοειδής αρθρίτιδα, αυτοάνοση θρομβοπενία και αιμολυτική αναιμία (19).

Πίνακας 4 : Ασθένειες ή διαταραχές που συνδέονται με την PBC

Sjögren's syndrome (Sicca syndrome)	
Scleroderma	
Raynaud's disease	
CREST syndrome	
	Calcinosis cutis
	Raynaud's phenomenon
	Esophageal dysmotility
	Sclerodactyly
	Telangiectases
Systemic lupus erythematosus	
Rheumatoid arthritis	
Mixed connective tissue disease	
Polymyositis	
Cutaneous disorders	
	Dermatomyositis
	Lichen planus
	Pemphigoid
	Psoriasis
Autoimmune thrombocytopenic purpura	
Pernicious anemia	
Sarcoidosis	
Myasthenia gravis	
Autoimmune thyroid disease	
	Chronic thyroiditis (Hashimoto's disease)
	Grave's disease (Basedow's disease)
Diabetes Type I (Insulin-dependent diabetes mellitus)	
Addison's disease	
Inflammatory bowel diseases	
	Celiac disease
	Ulcerative colitis
	Crohn's disease
Gallstones	
Pulmonary fibrosis	
Glomerulonephritis	

1.7 AMA-Αρνητική PBC

Ασθενείς με αρνητικά AMA αναφέρεται ότι έχουν παρόμοια κλινική, ιστολογική, και φυσική πορεία με τους ασθενείς που είναι θετικοί για τα AMA. Σχεδόν σε όλους τους AMA-αρνητικούς ασθενείς ανιχνεύονται στον ορό τους αντιπυρηνικά και / ή αντισώματα έναντι των λείων μυϊκών ινών (85-87). Ελάχιστες διαφορές στην ιστοπαθολογική, ανοσολογική και στα αντιγόνα των λευκοκυττάρων υπάρχουν μεταξύ των AMA-θετικών και αρνητικών ασθενών. Στην προς τον αυλό των χολαγγείων μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων των AMA-αρνητικών ασθενών, εκφράζεται μιτοχονδριακό

αντιγόνο όπως ακριβώς συμβαίνει και με τους AMA-θετικούς ασθενείς, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παθογένεια ανάμεσα στις δύο ομάδες ασθενών είναι παρόμοια (88). Τα επίπεδα των IgM είναι χαμηλότερα στους AMA-αρνητικούς από ότι στους AMA-θετικούς ασθενείς (86). Επίσης έχει αναφερθεί ότι δεν υπάρχει καμία διαφορά στη βιοχημική ανταπόκριση στο UDCA ανάμεσα σε AMA-θετικούς και AMA-αρνητικούς ασθενείς (89, 90).

1.8 Θεραπεία

Τρεις ομάδες φαρμάκων έχουν μελετηθεί για την θεραπεία της PBC: ανοσοτροποποιητές, αντιπρωκτικά και αντιχολοστατικά (91).

1.8.1 Θεραπεία με UDCA

Η θεραπεία πρώτης γραμμής είναι το ουρσοδεοξυχολικό οξύ (UDCA), ένα αντιχολοστατικό (91).

Το UDCA είχε χορηγηθεί στην κινέζικη παράδοση, από την εποχή της Δυναστείας του T'ang (618-907 Μ.Χ.) ως φάρμακο για την θεραπεία ασθενειών του ήπατος και άλλες διαταραχές υπό την μορφή χολής μαύρης αρκούδας και επανακαθιερώθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1950 στην Ιαπωνία ως χολαιρετικός παράγων με ικανότητα διαλύσεων των χολολίθων και αντιχολοστατικές ιδιότητες. Στην Δύση, τα ευεργετικά αποτελέσματα του UDCA στον ορό ασθενών που έπασχαν από διαταραχές του ήπατος έγιναν στη δεκαετία του 1980 (92, 93), και έκτοτε έχει καθιερωθεί για τη θεραπεία της PBC. Σήμερα, είναι το μόνο φάρμακο εγκεκριμένο από το FDA για την θεραπεία της PBC. Είναι ασφαλές και οι παρενέργειες είναι ελάχιστες (94).

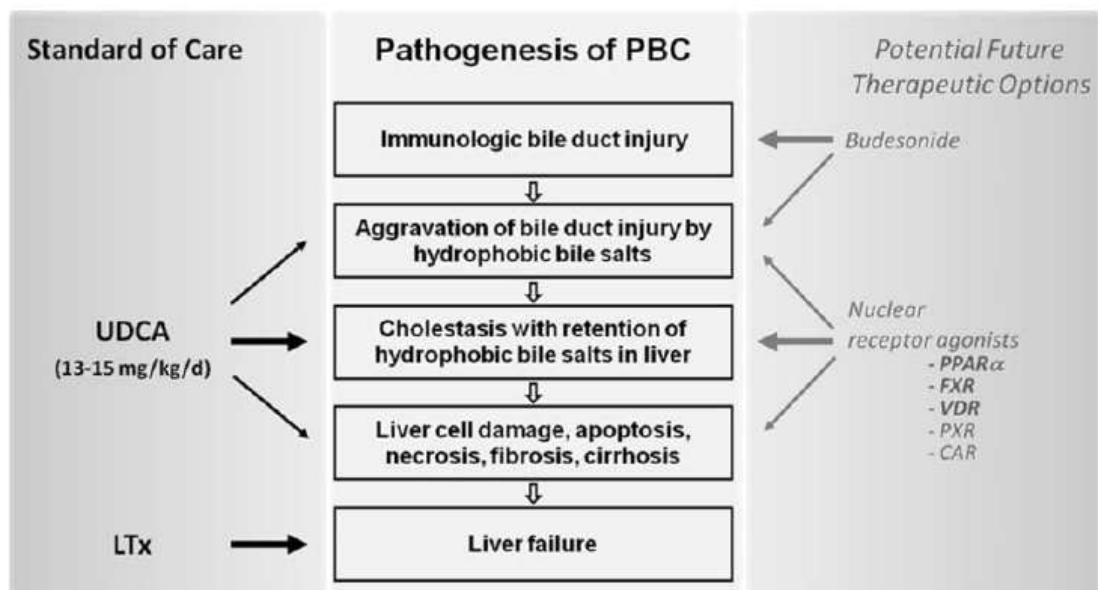
Σύμφωνα με στοιχεία από τρεις διαφορετικές μελέτες, προκύπτει ότι 13-15 mg / kg σωματικού βάρους UDCA ημερησίως επαρκούν για την θεραπεία της PBC (95).

Το UDCA βελτιώνει τους βιοχημικούς δείκτες όπως, χολερυθρίνη, AP, γGT, χοληστερόλη, και τα επίπεδα IgM στον ορό των ασθενών (96-99). Το UDCA μπορεί να επιβραδύνει την ιστολογική εξέλιξη της νόσου σε κίρρωση (98), και / ή καθυστερεί την ηπατική ίνωση στα πρώιμα στάδια της νόσου (100), την ανάπτυξη των κισμών οισοφάγου σε ασθενείς με PBC (101), βελτιώνει την

ποιότητα της ζωής και την επιβίωση τόσο στους AMA-θετικούς όσο και στους AMA-αρνητικούς ασθενείς (90, 95, 102).

Δεν υπάρχουν στοιχεία που να δείχνουν ότι το UDCA προκαλεί τερατογένεση, ωστόσο σε περίπτωση εγκυμοσύνης θα ήταν συνετό να μην χορηγηθεί καμία φαρμακευτική αγωγή πριν και κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου. Το UDCA χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ενδοηπατικής χολόστασης στην εγκυμοσύνη (103) και δεν έχει αποδειχθεί ότι είναι τοξικό για το έμβρυο εάν δοθεί κατά το δεύτερο ή τρίτο τρίμηνο.

Ωστόσο, οι μηχανισμοί δράσης του UDCA σε χρόνια χολόσταση παραμένουν αινιγματικοί (104). Περίπου το ένα τρίτο των ασθενών δεν απαντά επαρκώς σε μονοθεραπεία με UDCA (105, 106), και αυτό μας οδηγεί στην αναζήτηση για πρόσθετες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Εικόνα 2 (47).



Εικόνα 2 Σύνοψη της καθιερωμένης θεραπείας και μέλλοντικές υποσχόμενες θεραπευτικές επιλογές στην PBC σε σχέση με τη δράση τους στην παθοφυσιολογία της PBC. Το UDCA σε μια δόση των 13-15 mg ανά kg σωματικού βάρους χορηγείται είτε σε μία δόση είτε σε δύο ημερισίως, είναι το μόνο εγκεκριμένο από τον FDA φάρμακο και αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο στην θεραπεία της PBC. Η μεταμόσχευση ήπατος (LTX) εφαρμόζεται στην ηπατική ανεπάρκεια στο τελευταίο στάδιο της νόσου. Η πιο ολοκληρωμένη βάση δεδομένων διαθέσιμη για μελλοντική θεραπευτική αγωγή είναι για την βουδεσονίδη. Υπάρχουν κάποια προκαταρκτικά δεδομένα για μελλοντική χρήση ορισμένων αγωνιστών των πυρηνικών υποδοχέων: όπως, υποδοχείς- α που ενεργοποιούνται από παράγοντες που

επάγουν τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων (PPARα), υποδοχέας X της φαρνεζόλης (FXR), των υποδοχέων της βιταμίνης D (VDR), πρεγνάνιος X υποδοχέας (PXR), και υποδοχέας ξενοβιοτικών (CAR).

1.8.2 Μεταμόσχευση ήπατος

Η μεταμόσχευση ήπατος είναι η θεραπεία επιλογής σε ασθενείς που βρίσκονται στο τελευταίο στάδιο της νόσου. Ενδείξεις για μεταμόσχευση είναι η ρήξη της αντιρρόπησης με ανθεκτικό ασκίτη, επαναλαμβανόμενη αυτόματη βακτηριακή περιτονίτιδα, εγκεφαλοπάθεια, επαναλαμβανόμενες κίρσοραγίες, ή ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Σε εξαιρετικά ειδικές περιπτώσεις, ένδειξη για μεταμόσχευση μπορεί να αποτελέσουν τόσο ο έντονος κνησμός όσο και η σοβαρή οστεοπόρωση (37, 107).

Έχουν αναφερθεί ποσοστά επιβίωσης από 80% έως 90% στα 5 χρόνια. Η νόσος επανεμφανίζεται σε ποσοστό έως και 30% στα 10 χρόνια μετά από μεταμόσχευση, αλλά στη συνέχεια, εμφανίζει κατά κανόνα ήπια πορεία υπό ανοσοκατασταλτική θεραπεία (107).

1.9 Επιβίωση στην PBC

Η πλειοψηφία (80%) των ασυμπτωματικών ασθενών αναπτύσσουν συμπτώματα μέσα στα επόμενα 10 έτη και οι εκτιμήσεις για την ανάπτυξη συμπτωμάτων στα 5 και στα 20 έτη είναι 50% και 95%, αντίστοιχα (41). Μια άλλη μεγάλη μελέτη με ασθενείς με PBC έδειξε ότι η μέση επιβίωση ή το χρονικό διάστημα ώσπου να γίνει η παραπομπή για μεταμόσχευση ήπατος από την στιγμή της διάγνωσης ήταν 9,3 χρόνια (38). Οι ασθενείς που ήταν ασυμπτωματικοί κατά τη διάγνωση δεν ζουν περισσότερο από τους ομολόγους τους που είναι συμπτωματικοί (διάμεσος επιβίωσης 9,6 έναντι 8,0 χρόνια, αντίστοιχα) (41). Η κατ' εκτίμηση 10-ετής επιβίωση σε ασυμπτωματικούς ασθενείς με PBC κυμαίνεται από 57% έως 90% (18, 108, 109). Κλασικά, η προχωρημένη ηλικία, αυξημένος χρόνος προθροβίνης, ίκτερος, χαμηλή λευκωματίνη ορού, οίδημα, ασκίτης και προχωρημένο ιστολογικό στάδιο είναι στενά συνδεδεμένα με μέση τιμή επιβίωσης λιγότερο από 5 έτη, σε ασθενείς που είναι συμπτωματικοί κατά την διάγνωση (110).

2. Αιτιοπαθογένεση της PBC

Η αιτιολογία της (PBC) είναι αιτιολογική, αν και είναι σαφές ότι υπάρχει μια γενετική προδιάθεση σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες (111).

2.1 Γενετικοί παράγοντες

Αν και η νόσος δεν κληρονομείται όπως ένα απλό υπολειπόμενο ή επικρατές γονίδιο (112), εν τούτοις υπάρχουν τα παρακάτω στοιχεία που υποστηρίζουν την γενετική προδιάθεση της νόσου.

- Στοιχεία από μελέτη σε μονοζυγωτικά δίδυμα δείχνει ότι η συχνότητα προσβολής (concordance rate) της PBC ανέρχεται σε ποσοστό 63%, ενώ για τα άλλα αυτοάνοσα νοσήματα η συχνότητα προσβολής κυμαίνεται μεταξύ 25%-50% (113).
- Περίπου το 6% των ασθενών με PBC έχουν πρώτου βαθμού συγγενείς που υποφέρουν από τη νόσο (114). Έχει αναφερθεί ότι η οικογενειακή PBC σχετίζεται με κληρονομικότητα από την πλευρά της μητέρας και η ασθένεια παρουσιάζεται νωρίτερα στη δεύτερη γενιά (115).
- Υπάρχει επικράτηση του γυναικείου φύλου σε αναλογία 8-9:1, κάτι που υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο που έχουν τα X χρωμοσώματα στην PBC, με βάση την παρατήρηση ότι οι γυναίκες με PBC έχουν σημαντικά αυξημένη συχνότητα μονοσωμίας του X χρωμοσώματος στα περιφερικά λευκά αιμοσφαίρια, σε σύγκριση με ίδιας ηλικίας υγιείς γυναίκες (116)
- Υπάρχει συσχέτιση των ασθενών που πάσχουν από PBC, με τα γονίδια που κωδικοποιούν το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC). Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι η παρουσία του αλληλίου HLA DRB1 * 08 συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου, ενώ τα αλληλία HLA DRB1 * 11 και * 13 είναι συνδεδεμένα με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου (117-119), Πίνακας 5 (119). Γενετικές επιρροές που ενέχονται στην PBC μπορεί να οφείλονται σε μεταλλαγές που μεταδίδονται μέσω γονιδίων βλαστικών κυττάρων, είτε ενδεχομένως, σε σωματικές μεταλλαγές στα προδρόμα αιμοποιητικά κύτταρα (120). Επίσης, διαφορές στα αλληλόμορφα του

παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF α) και του αντιγόνου 4 των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων T (CTLA-4), ενός βασικού ρυθμιστή του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία έχουν επανειλημμένα συνδεθεί με ευαισθησία σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα όπως σακχαρώδης διαβήτης τύπου I και συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, έχουν επίσης βρεθεί και στην PBC (121-123). Ο Rouron et al. (124) πρόσφατα επιβεβαίωσαν έναν ισχυρό ρόλο κάποιων πολυμορφισμών του TNF α και του CTLA-4 στην παθογένεση της PBC. Σε 258 ασθενείς με PBC και δύο ανεξάρτητες ομάδες ελέγχου των 286 και 269 υγείων εθελοντών, μελέτησαν haplotype-tagging SNPs (htSNP) 15 επιλεγμένων, υποψήφιων για την PBC γονιδίων :δύο σχετίζονται με την ανοσία και κωδικοποιούν το CTLA-4 και TNF α , δέκα γονίδια που σχετίζονται με το σχηματισμό χολής και είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση ηπατοχολικών μεταφορέων, και τρία που σχετίζονται με την προσαρμοστική απάντηση στη χολόσταση και κωδικοποιούν υποδοχείς του πυρήνα. Μόνο τα htSNPs για τα γονίδια CTLA-4 και TNF α σχετίζονταν σημαντικά με την ευαισθησία στην PBC, επιβεβαιώνοντας πιθανόν ρόλο τους στην παθογένεση της νόσου. Βρέθηκε μια ισχυρή συσχέτιση των αλληλόμορφων του TNF α rs 1799724 (C / T) και του AE2 rs 2303932 (T / A), ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για την ακραία ανταλλαγή ανιόντων 2 (AE2) σε χολαγγειοκύτταρα και ηπατοκύτταρα, με την εξέλιξη της νόσου. Και στις δύο περιπτώσεις, η παρουσία του πολυμορφισμού συνδέθηκε με καθυστέρηση στην εξέλιξη της νόσου. Πίνακας 6 (124). Αντίθετα, τα htSNPs των δέκα γονιδίων που σχετίζονται με το σχηματισμό χολής και είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση ηπατοχολικών μεταφορέων, και τα τρία htSNPs που σχετίζονται με την προσαρμοστική απάντηση στη χολόσταση και κωδικοποιούν υποδοχείς του πυρήνα έχουν ίση κατανομή στους ασθενείς με PBC και στα άτομα ελέγχου και επομένως δεν σχετίζονται με την νόσο (20, 125, 126).

Μελέτες για πολυμορφισμό σε γονίδια υποδοχέων οιστρογόνων έδειξαν συσχέτιση με τη νόσο, τουλάχιστον σε ορισμένους πληθυσμούς (127). Σε

επίπεδο των ιστών, τα χολαγγειοκύτταρα από ασθενείς με PBC στα πρώτα στάδια της ασθένειας (αλλά όχι σε χολαγγειοκύτταρα ατόμων ελέγχου) εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων (128).

Πρόσφατα, σε μία μελέτη βρέθηκε τροποποιημένη έκφραση των microRNA (miRNA) των ηπατικών κυττάρων που απομονώθηκαν από ιστούς ασθενών με PBC (129). Τα miRNA ανήκουν σε μια κατηγορία μικρών, μη-κωδικοποιήσιμων μορίων RNA που ελέγχουν την έκφραση πρωτεϊνών σε μετά-μεταγραφικό επίπεδο και ως εκ τούτου, παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση κυτταρικών διεργασιών, όπως του μεταβολισμού, την λειτουργία του ανοσοποιητικού, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την απόπτωση, την ανάπτυξη των ιστών και την κυτταρική διαφοροποίηση (130, 131). Ωστόσο, η συσχέτιση μεταξύ τροποποιημένης έκφρασης miRNA και ανάπτυξης της PBC εξακολουθεί να μην είναι τεκμηριωμένη.

Πίνακας 5 : Συχνότητα του αλληλίου DRB1 που παρατηρήθηκε σε 664 ασθενείς με PBC και 1992 υγιή άτομα ελέγχου.

DRB1 Allele	PBC (%)	H*	Controls (%)	H*	P†	Pc
*01	9.6	8	8.2	7		
*02	12	10	12	32	0.0034	0.041
*03	10.9	9	7.8	11		
*04	10	3	9.1	16	0.038	
*07	16.9	28	11.7	25		
*08	7.2	2	2.3		4×10^{-32}	4.8×10^{-31}
*09	0.7		0.2		0.012	
*10	1.6		1.0			
*11	13.6	16	30.0	166	1.9×10^{-24}	2.3×10^{-23}
*12	1.1		1.0	1		
*13	8.6	5	11.2	16	3.6×10^{-6}	0.000043
*14	7.8	5	5.5	5		

Ο επιπολασμός (%) και ο αριθμός των ομόζυγων (H) παρατίθενται για την PBC και για τα υγιή άτομα ελέγχου. Τιμές P(P†) πριν και μετά τη διόρθωση (PC) για πολλαπλές δοκιμές δίνονται. για κάθε αλληλόμορφο όταν $P < 0,05$.

* Αριθμός ομόζυγων για κάθε αλληλόμορφο.

† Μόνο P αξίες $< 0,05$ εμφανίζονται.

Πίνακας 6 : HtSNPs γονιδίων που συσχετίζονται με την PBC, ποσοστά και κατανομή τους σε ασθενείς με PBC και σε άτομα ελέγχου.

Gene symbol (chromosome position)	dbSNP ID	SNP ^a	Location ^b (amino acid residue)	Variant allele (%)		OR	95% CI		P ^c
				Controls (n = 286)	PBC (n = 258)				
<i>CTLA4</i> (2q33)	rs11571317	C/T	5' Flanking	10.2	5.7	.53	.34	.85	.008
	rs5742909	C/T	5' Flanking	11.1	7.6	.66	.43	1.00	.048
	rs231775	A/G	Exon 1 (T17A)	28.9	39.4	1.60	1.24	2.07	.0003
<i>TNFA</i> (6p21.3)	rs1800630	C/A	5' Flanking	14.6	21.3	1.58	1.14	2.17	.006
	rs1799724	C/T	5' Flanking	11.0	9.7	.87	.58	1.31	.511
	rs1800629	G/A	5' Flanking	13.5	12.6	.92	.64	1.33	.657

a Γίνεται αναφορά (in the NCBI human ruler sequence build 36.1)/ πολυμορφισμός νουκλεοτιδίων.

b Τοποθεσία των SNPs και των αντίστοιχων αμινοοξέων ορίζονται για τα ακόλουθα mRNAs: *CTLA4*, NM_005214.2, *TNFA*, NM_000594.2.

c Η πιθανότητα, μετά τη διόρθωση για πολλαπλά τεστ ήταν: *CTLA-4* rs11571317, P^c = 0,29, *CTLA-4* rs5742909, P^c = 0,95 *CTLA-4* rs231775, P^c <0,02, *TNFA* rs1800630, P^c = 0,26.

2.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται βακτήρια, ρετροϊοί και ξενοβιοτικές ουσίες (132-134).

2.2.1 Βακτήρια

Η *Escherichia coli* και το "rough" μεταλλαγμένο στέλεχος της, έχουν βρεθεί σε μεγάλο βαθμό στα κόπρανα ασθενών με PBC, επιπλέον, η συχνότητα των λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος είναι υψηλή σε ασθενείς με PBC (73, 135). Πρόσφατα, το *Novosphingobium aromaticivorans*, ένας οργανισμός που βρίσκεται παντού, ο οποίος μεταβολίζει οργανικές ενώσεις και οιστρογόνα, έχει θεωρηθεί ως υποψήφιος για την επαγωγή της νόσου (133). Οι τίτλοι των αντισωμάτων κατά των lipoylated βακτηριακών πρωτεϊνών του *N. aromaticivorans* ήταν 1.000 φορές υψηλότεροι από εκείνα της *E. coli*, σε ασθενείς με PBC συμπεριλαμβανομένων των ασθενών που βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο της νόσου.

Διάφορα άλλα βακτήρια, όπως η *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* και *Mycobacterium gordonae* έχουν επίσης χαρακτηριστεί ως πιθανά παθογόνα για την PBC (136, 137).

IgG3 αντισώματα έναντι του *Lactobacillus delbrueckii* μπορούν να αντιδράσουν με τον επίτοπο PDC-E2 212-226 σε ορό ασθενών με PBC (138)

2.2.2 Ιοί

Πρόσφατα, έχει αναφερθεί ότι λοίμωξη από betaretrovirus που προσβάλλει τον ανθρώπινο οργανισμό (σημειώνεται ότι έχει κάποια κοινά σημεία γενετικής ομοιότητας με τον ιό που προκαλεί καρκίνο του μαστού στα ποντίκια) μπορεί να ανιχνευθεί περίπου στο 75% των ασθενών με PBC (134). Αυτό έχει υποστηριχθεί και σε μια πιλοτική μελέτη για θεραπεία με φάρμακα έναντι των ρετροϊών στην PBC όπου υπήρχε βελτίωση στα ιστολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών (139). Ωστόσο, σε άλλες μελέτες δεν έχουν επαληθευτεί τα ίδια αποτελέσματα (140).

2.2.3 Προηγούμενες χειρουργικές επεμβάσεις

Σε μια επιδημιολογική μελέτη στη Βόρειο Αμερική παρατηρήθηκε ότι χειρουργικές επεμβάσεις, όπως σκωληκοειδεκτομή, αμυγδαλεκτομή και άλλες χειρουργικές επεμβάσεις στην κοιλιακή χώρα απαντώνται συχνά σε ασθενείς με PBC (141). Ωστόσο, μια προηγούμενη μελέτη τύπου ασθενή-μάρτυρα, που διεξήχθη στην Αγγλία δεν έδειξε καμία σύνδεση με χειρουργικές επεμβάσεις (142). Πρόσφατα, σε μία άλλη μελέτη τύπου ασθενή-μάρτυρα απέδειξαν ότι δεν υπάρχει σύνδεση μεταξύ εμφάνισης PBC και σκωληκοειδεκτομής, και οι συγγραφείς επεσήμαναν την μεροληψία επιλογής ασθενών που υπήρχε στην προηγούμενη μελέτη που διεξήχθη στη Βόρεια Αμερική (143). Ωστόσο, σε μία μελέτη έχει βρεθεί ότι το 40% των ασθενών με PBC έδωσε ανοσολογική απάντηση έναντι στην καζείνολυτική πρωτεάση P της *Yersinia enterocolitica*, γεγονός που εικάζει μία παρελθοντική σκωληκοειδεκτομή (144), όπου η λοίμωξη με *Y. enterocolitica* είναι μία από τις κύριες αιτίες της οξείας τελικής ειλεΐτιδος που μιμείται την οξεία σκωληκοειδίτιδα (145).

2.2.4 Χημικοί παράγοντες

Ένα πρόσφατο πείραμα έδειξε ότι, αντισώματα απομονωμένα από ορό ασθενών με PBC αναγνώριζαν το τεχνητά τροποποιημένο (από περιβαλλοντικές χημικές ουσίες) λιποϊκό οξύ, το οποίο αποτελεί μέρος του επίτοπου του συμπλέγματος της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDC) (146). Η ίδια αυτή ομάδα ερευνητών έχει δείξει ότι το 2-octynoic acid, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για την παρασκευή αρωμάτων, κραγιόν και πολλών άλλων κοινών αρωματικών ουσιών τροφίμων, έχει τη δυνατότητα να τροποποιεί την υπομονάδα E2 της PDC (PDC-E2), in vivo (147, 148). Η συχνή χρήση βερνικιών νυχιών έχει συνδεθεί με κίνδυνο εμφάνισης PBC (114). Το κάπνισμα έχει αποδειχθεί ότι επιταχύνει την εξέλιξη της νόσου και αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου (114, 149), ενδεχομένως λόγω έκθεσης σε χημικές ουσίες που περιέχει ο καπνός των τσιγάρων. Ομάδες πληθυσμών ή ατόμων που ζουν κοντά σε τοξικά απόβλητα ή ειδικές δεξαμενές έχει αναφερθεί ότι έχουν υψηλότερο ποσοστό επίπτωσης ή επιπολασμού της νόσου και αυτό υποδηλώνει ότι τα τοξικά απόβλητα ίσως να αποτελούν παράγοντα κινδύνου ή να ενεργοποιούν τη νόσο (150, 151).

2.3 Παθογένεση της PBC

2.3.1 Ρόλος των (BECs) στην παθογένεση της νόσου

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου προκύπτουν οι τυπικές βλάβες στην PBC είναι άγνωστος, ωστόσο, τα στοιχεία που υπάρχουν μέχρι σήμερα είναι αρκετά, ώστε να υποστηρίξουμε ότι η καταστροφή των μικρών χοληφόρων οφείλεται σε επίθεση του ανοσοποιητικού συστήματος που οδηγεί τα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων (BECs) σε απόπτωση (152-154).

Παράγοντες όπως Fas / FasL, TRAIL (TNF- related apoptosis-inducing ligand), και Bcl-2 είναι πρωτεΐνες στο μιτοχονδριακό τοίχωμα που είναι γνωστό ότι παίζουν ρόλο στην απόπτωση (152, 155-158). Πράγματι, στην επιφάνειά των BECs ασθενών με PBC υπάρχουν Fas, και τα γειτονικά μονοπύρρηνα φλεγμονώδη κύτταρα εκφράζουν FasL (159, 160). TNFα και IFNγ ίσως να ενεργούν ως διαμεσολαβητές για την απόπτωση των BEC, καθώς και οι δύο κυτταροκίνες προκαλούν αύξηση στην έκφραση του Fas

(158, 161). Το TRAIL, εκτός των φλεγμονωδών κυττάρων, εκφράζεται στα BECs και στα ηπατοκύτταρα ασθενών με PBC (162). Η έξοδος του κυτοχρώματος c από το χώρο της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων προς το κυτταρόπλασμα διαδραματίζει βασικό ρόλο στην απόπτωση. Αυτή η διαδικασία διευκολύνεται από τις πρωτεΐνες Bax, μεταξύ άλλων, και παρεμποδίζεται από τις πρωτεΐνες Bcl2 και BclXL, που βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (152, 154). Στην PBC το Bcl2 είναι συνήθως μη ανιχνεύσιμο στα BECs (157), για τον λόγω αυτό, και το κυτόχρωμα c μπορεί εύκολα να διαρρεύσει από τα μιτοχόνδρια και να ξεκινήσει ο αποπτωτικός μηχανισμός.

2.3.2 Ανοσολογική απάντηση στη PBC

2.3.2.1 Πρωτογενής (innate) ανοσία στην PBC

Πρωτογενής ανοσία είναι μια πρώτη γραμμή άμυνας κατά των λοιμώξεων και νεοπλασμάτων, αλλά η σημασία της για την επίκτητη ανοσία έχει εκτιμηθεί μόλις πρόσφατα, και ο ρόλος στην επαγωγή της αυτοανοσίας είναι μόνο εν μέρει γνωστός (163). Στην πρωτογενή ανοσία, συμπεριλαμβάνονται δενδριτικά κύτταρα (DC) και άλλα αντιγόνο παρουσιαστικά κύτταρα (APCs) (164), και κύτταρα NKT, που ως γνωστό ρυθμίζουν την ποιοτική και ποσοτική λειτουργία της μετέπειτα επίκτητης ανοσολογικής απάντησης, συμπεριλαμβανομένων των ειδικών συμπλεγμάτων αντιγόνου-αντισώματος και απαντήσεις των T-λεμφοκυττάρων. Η πρωτογενής ανοσία σε ασθενείς με PBC χαρακτηρίζεται από αυξημένη απάντηση σε παθογόνα που σχετίζονται με ερεθίσματα, όπως αποδεικνύεται *in vitro* από τα υψηλά επίπεδα των εκκρινόμενων, από μονοκύτταρα, προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών μετά από έκθεση τους σε μικροοργανισμούς (165). Στην PBC, οι Chuang και συνεργάτες, έδειξαν πρόσφατα μια σημαντική αύξηση στην συχνότητα και στον απόλυτο αριθμό στο αίμα και στο ήπαρ κυττάρων NK. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη, η κυτταροτοξική δραστηριότητα και η έκφραση περφορίνης από απομονωμένα κύτταρα NK ήταν σημαντικά αυξημένα, και συσχετιζόνταν με αυξημένα επίπεδα IL-8 στο πλάσμα και την έκφραση του CD128a (υποδοχέα της IL-8) σε αυτό το είδος κυττάρων. Αντίθετα, τα επίπεδα των IFN- γ , IL-6 και

IL-8 που παράγονται από τα κύτταρα NK ήταν σημαντικά μειωμένα στους ασθενείς με PBC σε σύγκριση με άτομα ελέγχου (166).

2.3.2.2 Χυμική ανοσία στην PBC

Η PBC θεωρείται ως αυτοάνοση νόσο ειδικού οργάνου. Το χαρακτηριστικό της αυτοάνοσης διαδικασίας είναι η ανίχνευση των AMA στον ορό, αν και μια πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι AMA είναι ανιχνεύσιμα παροδικά σε κεραυνοβόλο ηπατική ανεπάρκεια, (167). Στόχοι των AMA αποτελούν όλα τα μέλη του συμπλέγματος της 2-κετοξύ-αφυδρογονάσης (2-OADC). Αυτό περιλαμβάνει την E2 υπομονάδα του συμπλόκου της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDC-E2), του συμπλόκου 2-κετοξυ αφυδρογονάσης με διακλαδούμενη άλυσσο (BCOADC-E2), του συμπλόκου 2-κετο-γλουταρικής αφυδρογονάσης (OGDC-E2), και της δεσμευτικής πρωτεΐνης της αφυδρογονάσης (E3BP) (168). Όλοι οι επίτοποι αυτοί βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και καταλύουν τη οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση των κετο-οξικών υποστρωμάτων.

Παραμένει ένα μυστήριο πώς η PDC-E2 και άλλοι επίτοποι που βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων αποτελούν στόχους στα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων και στα επιθηλιακά κύτταρα των σιελογόνων (169). Έχει προταθεί ότι η απόπτωση μπορεί να αυξήσει την έκθεση των PDC-E2 στο ανοσοποιητικό σύστημα, που οδηγεί σε μια αυτοάνοση επίθεση. Έχει τεκμηριωθεί ότι τα αποπτωτικά χολαγγειοκύτταρα, σε αντίθεση με άλλα αποπτωτικά κύτταρα, αποτελούν ισχυρή ανοσογονική πηγή PDC-E2 σε ασθενείς με PBC (161). Οροί από ασθενείς με PBC έχουν βρεθεί να έχουν αντισώματα σε περιβαλλοντικές τοξίνες κάτι που οδηγεί στην σκέψη ότι αυτό είναι ικανό να σπάσει την αυτό-ανοχή (147).

Ίσως η καλύτερη απόδειξη για τον παθογενετικό ρόλο των αυτό-αντισωμάτων στη PBC προέρχεται από την περιγραφή των εκκρινόμενων IgA αντι-PDC στο σάλιο, τη χολή και στα ούρα των ασθενών οι οποίοι διατηρούν την ανασταλτική ενζυμική ιδιότητά τους (170, 171).

2.3.2.3 Απόκριση T-λεμφοκυττάρων στην PBC

Ασθενείς με PBC χαρακτηρίζονται συνήθως από την παρουσία των PDC-E2-ειδικών CD4 και CD8 θετικών T κυττάρων στον ορό (172) και PDC-ειδικών T-λεμφοκυττάρων στο ήπαρ (153), ως επί το πλείστον κατά την πρώιμη φάση της νόσου. Πρόσφατα, στα CD8 θετικά T-λεμφοκύτταρα βρέθηκε ένας επίτοπος του PDC-E2 (αμινοξέα 159-167) (173). HLA^{DR4} * 0101-restricted CD8 θετικά T-λεμφοκύτταρα στο ήπαρ ασθενών με PBC έχουν αποδειχθεί κυτταροτοξικά κατά PDC-E2 (αμινοξέα 159-167) ***pulsed autologous cells*** (174). Τέτοια αυτενεργά T-λεμφοκύτταρα παίζουν πιθανότατα κάποιο ρόλο στην απόπτωση των BEC μέσω απελευθέρωσης granzyme / perforin ή μέσω FasL ή TNF α (153, 175, 176).

2.3.3 Ρολος των ενεργων μορφων οξειγονου (ROS) στην PBC

Δεδομένα σχετικά με το ρόλο του οξειδωτικού στρες στην παθογένεση της PBC σπανίζουν. Στα κατεστραμμένα χοληφόρα των ασθενών με PBC, η έκφραση της γλουταθειόνης-S-τρανσφεράσης έχει μειωθεί αισθητά, αντικατοπτρίζοντας τη μείωση της ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης, ενώ η περιπυρηνική έκφραση του 4-hydroxynonenal αυξάνεται, αντικατοπτρίζοντας ενεργό υπεροξειδωση λιπιδίων που σχετίζονται με βλάβη στα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων (177). Τα επίπεδα της αντιοξειδωτικής βιταμίνης E είναι μειωμένα στους ασθενείς με PBC, μαζί με άλλες λιποδιαλυτές βιταμίνες (60, 72, 178), ενώ στον ορό η συνολική αντιοξειδωτική δράση (που μετράται με μια ενισχυμένη τεχνική χημειοφωταύγειας) είναι σημαντικά μειωμένη σε ασθενείς με PBC (179). Ορισμένες αντιοξειδωτικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων ρετινόλη, άλφα-τοκοφερόλη, ολικά καροτενοειδή, λουτεΐνη, ζεαξανθίνη, λυκοπένιο, άλφα και βήτα-καροτίνη είναι μειωμένες σε ασθενείς με PBC σε σύγκριση με υγιή άτομα ελέγχου (180). Ωστόσο, σε μία μελέτη έχει αναφερθεί ιδιαίτερα αυξημένη η διορθωμένη ολική αντιοξειδωτική ικανότητα σε ασθενείς με PBC (181), γεγονός που μπορεί να αντανάκλα σε αντισταθμιστικό μηχανισμό, ο οποίος όμως δεν επαρκεί ώστε να αντισταθμίσει την αυξημένη παραγωγή των ROS. Αποδεικτικά στοιχεία για το ρόλο των ROS στην ηπατική βλάβη της PBC παρέχεται από μελέτες in vitro ότι το UDCA έχει καθαριστικές ιδιότητες για τα ROS και εμποδίζει το

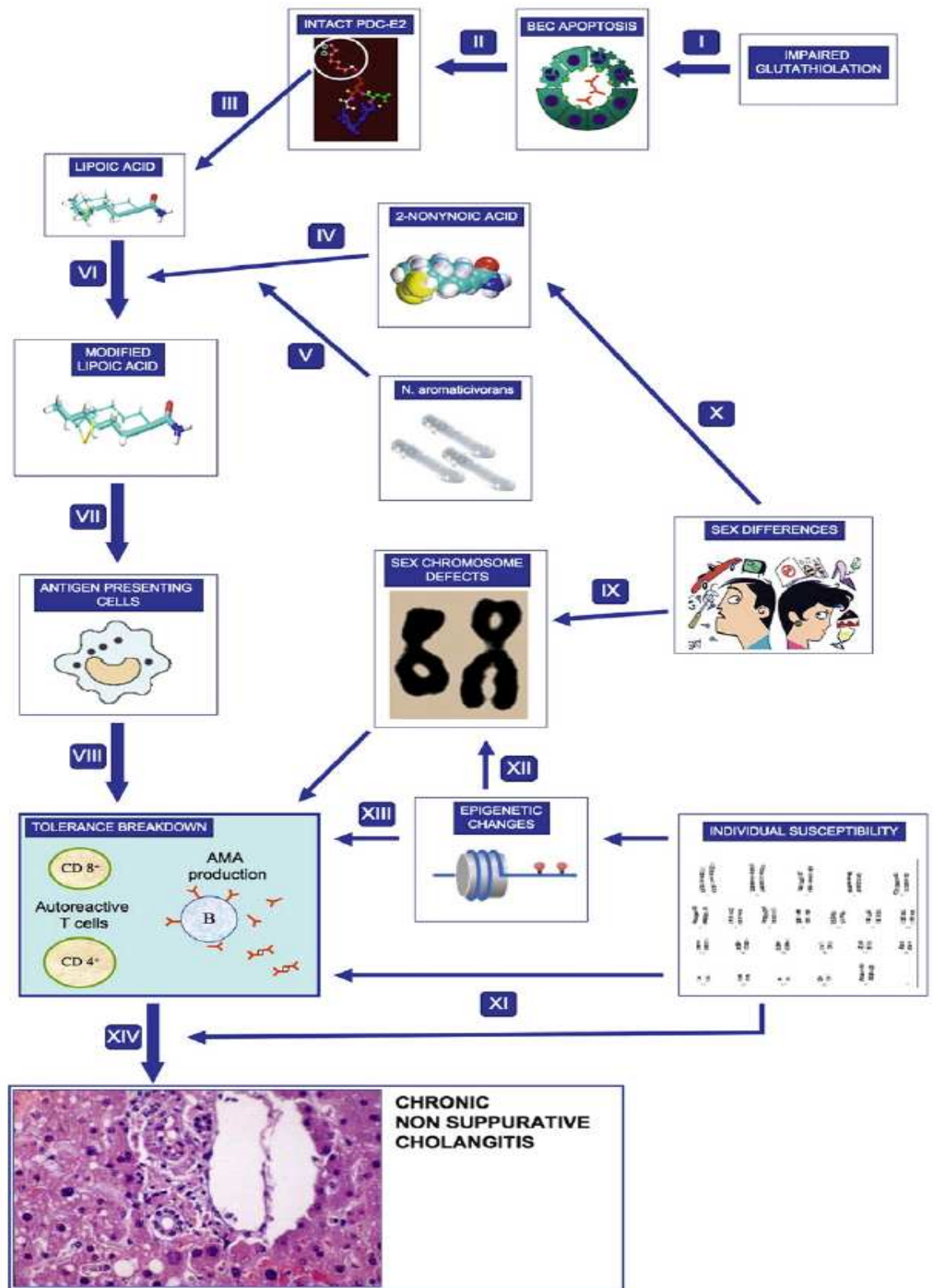
οξειδωτικό στρες των μιτοχονδρίων και την υπεροξειδωση των λιπιδίων με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (182, 183).

2.3.4 Μοντέλα ζώων

Ένα μοντέλο τρωκτικών τα NOD.c3c4 ποντίκια τα οποία προέρχονται από μη-παχύσαρκα διαβητικά στελέχη, πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι αναπτύσσουν μια αυτοάνοση νόσο των χοληφόρων και έχουν θετικά AMA (184). Δύο άλλα μοντέλα ζώων, ποντίκια με (-/-) υποδοχέα άλφα της IL- 2 και ποντίκια με επικρατούσα αρνητική μεταλλαγή του υποδοχέα II του TGFβ (dnTGFβRII), έδειξαν επίσης κάποια συσχέτιση με AMA και χρόνια χολική νόσο (185, 186). Στο επιθήλιο των χοληφόρων έχει γίνει διήθηση από CD4 θετικά και CD8 θετικά T κύτταρα σε όλα αυτά τα μοντέλα. Ωστόσο, επιθηλιακό κοκκίωμα και ηωσινόφιλη διήθηση έχει παρατηρηθεί μόνο σε ποντίκια NOD.c3c4. Παρότι αυτά τα μοντέλα ποντικών διευκολύνουν την κατανόηση της παθογένεσης στην PBC, εν τούτοις η παθογένεση στον άνθρωπο παραμένει άγνωστη.

2.3.5 Θεωρίες παθογένεσης

Διάφορες θεωρίες έχουν προταθεί για την αιτιοπαθογένεια της PBC. Τέτοιες θεωρίες δεν είναι κατ 'ανάγκη ανεξάρτητες η μία από την άλλη, αλλά η καθεμία απευθύνεται σε διαφορετικές φάσεις της αιτιοπαθογένειας. Εικόνα 3 (187). Υπάρχουν θεωρίες που προσπαθούν να ερμηνεύσουν τις διαδικασίες που γίνονται κατά την έναρξη της νόσου, τις διαδικασίες για την διαιώνιση, κυρίως ελλείψεις στην ανοσολογική ανοχή και διεργασίες για την επιλεκτική καταστροφή των BECs, με την προϋπόθεση ότι αυτές εκφράζουν το στόχο της νόσου σε προσιτή μορφή, AMA αυτοαντισώματα PDC-E2.



Εικόνα 3. Η τρέχουσα υπόθεση της ανάπτυξης της PBC απεικονίζεται. Πρωτεύονα σημασία έχει ο προτεινόμενος μηχανισμός που βασίζεται στον ιδίομορφο αποπτωτικό χαρακτηριστικό των επιθηλιακών κυττάρων των

χοληφόρων (BEC). Δεύτερον σε μειωμένη γλουταθειόλυση (I), τα αποπτωτικά BEC απελευθερώνουν έναν ανέπαφο PDC-E2 (II), το οποίο περιλαμβάνει επίσης λιποϊκό οξύ (III). Λιποϊκό οξύ με τη σειρά του γίνεται ιδανικός στόχος για τροποποιήσεις που επάγονται από ξενοβιοτικά με το 2-octynoic οξύ ως τον καλύτερο υποψήφιο (IV) και με τον N. aromaticivorans ενδεχομένως να επηρεάζει αυτή την οδό (V). Το τροποποιημένο λιποϊκό οξύ ή τα υπολείμματα του λιποϊκού οξέος που έχουν αντικατασταθεί προσλαμβάνονται έπειτα από τα αντιγόνο παρουσιαστικά κύτταρα (VII) και είναι ικανά να σπάσουν την ανοσολογική ανοχή (VIII), παρουσία ενός ανεκτικού γενετικού υπόβαθρου. Η θηλυκή επικράτηση της PBC μπορεί να εξηγηθεί από τα βασικά ελαττώματα των φυλοκαθοριστικών χρωμοσωμάτων, όπως μονοσωμία του X (IX) ή από την αυξημένη έκθεση σε συγκεκριμένες ξενοβιοτικές ουσίες (X). Πράγματι, η ευαισθησία του κάθε ατόμου μπορεί να βασίζεται σε άμεσα πιθανολογούμενες επιπτώσεις σε μια συγκεκριμένη ομάδα γονιδίων για την ανάπτυξη της νόσου ή την εξέλιξη της (XI), όπως προτείνεται από μελέτες, είτε από επιγενετικές αλλαγές του φύλου (XII) ή σωματικών (XIII) χρωμοσωμάτων που πρέπει να διερευνηθούν. Το τελικό αποτέλεσμα ενός ανεκτικού γενετικού υπόβαθρου και μίας ακαθόριστης περιβαλλοντικής έκθεσης είναι η ανάπτυξη και η διαιώνιση της ηπατικής βλάβης της PBC (XIV).

2.3.5.1 Η θεωρία του μονοπατιού Hedgehog

Η χρόνια φλεγμονή και επαναλαμβανόμενη βλάβη στα μικρά χοληφόρα προκαλεί πολλαπλασιασμό των χολαγγειοκυττάρων και ίνωση η οποία προκαλείται από παρακείμενους μυοϊνοβλάστες του παρεγχύματος του ήπατος. Ίνο –υπερπλαστικά κύτταρα των μικρών χοληφόρων συχνά επεκτείνονται μέσα στο ηπατικό παρέγχυμα, ενώνοντας παρακείμενα πυλαία διαστήματα μεταξύ τους οδηγώντας σε χολική κίρρωση χωρίς να υπάρχει ανανέωση των χοληφόρων οδών (188). Η παθογένεια της ινωγενούς απάντησης στην βλάβη των χοληφόρων έχει διερευνηθεί πρόσφατα με μια νέα έννοια το "μονοπάτι Hedgehog" στο ήπαρ, το οποίο είναι ένα σύστημα που ρυθμίζει τη βιωσιμότητα και τη διαφοροποίηση των διαφόρων κυττάρων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης (189). Έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι η

οδός Hedgehog προωθεί την ανάπτυξη των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων και των στρωματικών κυττάρων, όπου η σηματοδότηση μεταξύ των δύο μπορεί να ρυθμίσει τον μηχανισμό τη βλάβης των χοληφόρων (190). Η γειτονία των μυοϊνοβλαστών και των χολαγγειοκυττάρων δείχνει ότι η 'επικοινωνία' μεσεγχυματικών-επιθηλιακών κυττάρων προωθεί την ίνο-υπερπλαστική απάντηση στο χολοστατικό ήπαρ μέσω μονοπατιού του Hedgehog (191).

2.3.5.2 Τρέχουσες απόψεις σχετικά με την παθογένεση της PBC

Υπάρχουν δύο βασικά στοιχεία που θα πρέπει να ερμηνευτούν σε κάθε μοντέλο που προσπαθεί να εξηγήσει την παθογένεση της PBC. Πρώτον, το αυτό-αντιγόνο PDC βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και ως εκ τούτου κανονικά διαχωρίζεται από το εξωκυτταρικό ανοσοποιητικό σύστημα από τρεις μεμβράνες. Είναι δύσκολο να κατανοήσει κανείς πώς ένα τέτοιο αντιγόνο εκτίθεται σε αντιγόνο-παρουσιάστικά κύτταρα, ικανά να προκαλέσουν, μια αυτοάνοση αντίδραση. Δεύτερον, η PBC είναι μια ασθένεια με πολύ περιορισμένη κατανομή ιστών, ενώ η αυτοάνοση αντίδραση απευθύνεται σε ένα αντιγόνο με εξαιρετικά διαδεδομένο εντοπισμό. Μέχρι στιγμής, τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν για να εξηγήσουν την παθογένεση της PBC δείχνουν ότι το βασικό στάδιο της παθογένεσης της νόσου είναι η κατανομή των T-λεμφοκυττάρων αυτό-ανοχής στο PDC, αν και η παραγωγή αντισωμάτων αντί-PDC δεν αρκεί από μόνη της για την ανάπτυξη ηπατικής νόσου (192).

2.3.5.2.1 Καθοριστικό πρότυπο πυκνότητας

Το μοντέλο αυτό έχει περιγραφεί λεπτομερώς από την Jones (193). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, ενδεχομένως τα αυτό-PDC αντιδραστικά T-λεμφοκύτταρα επιβιώνουν στην αρνητική επιλογή του θύμου αδένου, επειδή ο T κυτταρικός υποδοχέας (TCR) δείχνει χαμηλή συγγένεια για το σύμπλεγμα του αυτό-πεπτιδίου και MHC.

Σποραδικοί επίτοποι που προέρχονται από το αυτό-PDC που παρουσιάζονται από τα αντιγόνο παρουσιαστικά κύτταρα (APC) σε αυτά της

χαμηλής συγγένειας TCR T-κύτταρα, δεν είναι σε θέση να ενεργοποιηθούν τα T-λεμφοκύτταρα.

Ωστόσο, ο εμπλουτισμός των APC με επιτόπους που προέρχονται από τα αυτό-PDC θα μπορούσε να δώσει επαρκή παρνεμία χαμηλής συγγένειας για την υπέρβαση ενός ορίου ενεργοποίησης και να προκαλέσει μια σωστή ενεργοποίηση των CD4 T-λεμφοκυττάρων.

Σε αυτό το μοντέλο, επίσης, η αρχική ενεργοποίηση της απάντησης των αντισωμάτων στην διασταυρούμενη αντίδραση με το αυτό-PDC θα μπορούσε να είναι είτε ιογενής είτε βακτηριακός επίτοπος με μια δομική ομολογία για το PDC. Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του μοντέλου αυτού είναι ότι η κατάσταση της ενεργοποίησης των APC με τη μεσολάβηση, μέσω του toll-like υποδοχέα, μπορεί να καθορίσει την αποτελεσματικότητα της παρουσίασης αντιγόνου και να προωθήσει την κατάρρευση της ανοχής.

Μονοκύτταρα από περιφερικό αίμα ασθενών με PBC παράγουν υψηλότερα επίπεδα προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF α , IL1b, IL-6, IL-8) όταν προκαλούνται με ειδικούς συνδέτες για TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 και TLR9. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι μονοκύτταρα ασθενών με PBC (και ενδεχομένως τα αντιγόνο παρουσιαστικά κύτταρα) είναι υπερευαίσθητα στο να σηματοδοτούν μέσω TLRs, γεγονός που μπορεί να βοηθήσει στην κατάρρευση της ανοχής (165).

2.3.5.2.2 "Upstream" και "downstream" γεγονότα στην PBC

Η Jones (194) πρότεινε ένα ακόμη μοντέλο ανάπτυξης της PBC, το οποίο διακρίνεται σε "upstream" και "downstream" γεγονότα. Τα "upstream" γεγονότα σε αυτό το μοντέλο αφορούν τα αίτια της απώλειας των BEC, την χολαγγειοπενία και χολόσταση, τα οποία είναι μοναδικά στην PBC (και ίσως μοναδικά για κάθε συγκεκριμένο ασθενή) και περιλαμβάνουν γενετικούς, τοξικούς και μολυσματικούς παράγοντες, και γεγονότα που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα. Στα "downstream" γεγονότα της έναρξης αυτού του μηχανισμού, συμβαίνουν μη ειδικά παθολογικά γεγονότα που έχουν ως αποτέλεσμα την βλάβη των χοληφόρων, τον τραυματισμό των ηπατοκυττάρων, φλεγμονή, και ίνωση ανεξάρτητα από τα πρωτογενή-ατομικά αίτια.

2.3.6 Παθογένεση της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσεως: μια ενοποιημένη υπόθεση

Έχει αναφερθεί πρόσφατα μια σημαντική αύξηση των ενδοθηλινών , ιδιαίτερα της ET-2 (και σε μικρότερο βαθμό, της ET-1), τόσο στο περιφερικό αίμα και στην ηπατική φλέβα, που συμβαίνουν σε πρώιμο στάδιο της νόσου. Επιπλέον, η θεραπεία με UDCA προκαλεί σημαντική μείωση και των τριών ενδοθηλινών, το αποτέλεσμα της είναι πιο έντονο σε πρώιμο στάδιο της νόσου.

Βάση αυτών των παρατηρήσεων, μια νέα ενοποιημένη υπόθεση για την παθογένεια της PBC έχει προταθεί. Σχήμα 1 (195). Σε αυτό το μοντέλο, υπάρχει μια πρωταρχική δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία υπερπαράγουν ET-2 (και σε μικρότερο βαθμό, ET-1). Αυτό θα μπορούσε να είναι ένα πρωτεύον γενετικά καθορισμένο γεγονός. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν υποδοχέα-καθαριστή τύπου B (196) ο οποίος εσωτερικεύει ξένα αντιγόνα. Πράγματι λιποτεϊχολικό οξύ, ένας έντονα αντιγονικός παράγοντας των gram θετικών βακτηρίων, έχει βρεθεί σε ενδοθηλιακά κύτταρα (196), ενώ το ελικοβακτηρίδιο και λιποπολυσακχαρίτες έχουν επίσης περιγράψει στο ήπαρ ασθενών με PBC, (197, 198).

Η ET-2 μπορεί με τη σειρά της να διεγείρει τα κύτταρα Kupffer ώστε να παράγουν τις προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, IL-1 και IL-6 όπως έχει περιγραφεί σε περιτοναϊκά μακροφάγα ποντικών (αλλά όχι TNFα ή NO σε αυτό το συγκεκριμένο μοντέλο) (199). Η ET-2 είναι επίσης ένας ισχυρός χημειοελκτικός παράγοντας των μακροφάγων (200) μέσω των υποδοχέων ETB. Η ET-2 συμερίζεται παρόμοια αλληλουχία αμινοξέων με τις CXC χημειοκίνες.

Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, τα μακροφάγα αποτελούν το 30% των κυττάρων που διεισδύουν στο πυλαίο διάστημα και γύρω από τα κατεστραμμένα χοληφόρα (201). Ενεργοποιημένα μακροφάγα έχουν επίσης, παρατηρηθεί με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κοντά στα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων και φαίνεται να διαφοροποιούνται σε επιθηλιοειδή κύτταρα (202). Το επιθηλιοειδές κοκκίωμα στους ασθενείς με PBC περιέχει περισσότερα MCP2 και MCP3 θετικά κύτταρα στην άκρη τους και πάνω από το 60% εξ

αυτών συν-εκφράζει CD68, γεγονός που φανερώνει ότι προέρχονται από μακροφάγα (203).

Στα στάδια 3 και 4, της PBC τα κύτταρα Kupffer και οι μυοϊνοβλάστες αυξάνονται στην περιπυλαία και την ***periseptal*** περιοχή, δείχνοντας ενδεχομένως ότι τα κύτταρα Kupffer αλληλεπιδρούν με τα αστεροειδή κύτταρα και οδηγούν σε ίνωση (204), αποτελώντας έτσι το συνδετικό στοιχείο για την ανάπτυξη της κίρρωσας.

Οι ενδοθηλίνες επίσης προκαλούν σύσπασση στα αστεροειδή κύτταρα (205) και ενδεχομένως βοηθάνε στην διαφοροποίησή τους σε μυοϊνοβλάστες. Αυτή η αντίφαση μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρώιμη ανάπτυξη υπέρτασης της πυλαίας στην PBC όπως παρατηρήθηκε σε αρουραίους με χολική κίρρωση (204-206). Τα ενδοηπατικά χοληφόρα αιματώνονται από ***periductal*** δίκτυο μικρών αγγείων γνωστό ως peribiliary vascular plexus (PVP). Αυτό το πλέγμα προέρχεται από κλάδους της ηπατικής αρτηρίας που συνοδεύουν τα ενδοηπατικά χοληφόρα (207) και παροχετεύουν κυρίως στα κολποειδή (208). Ο περιχολαγγειακός χώρος περιλαμβάνει επίσης δένδριτικά κύτταρα και αστεροειδή κύτταρα. Ανεπαρκής αιμάτωση του συστήματος αυτού μπορεί να προκαλέσει σοβαρές βλάβες στα χοληφόρα (209). ETs και NO φαίνεται να είναι τα κύρια μόρια που ρυθμίζουν την κυκλοφορία της PVP (210). Προτείνεται στο μοντέλο αυτό, ότι οι ασθενείς με PBC έχουν βλάβες στα μικρά χοληφόρα, πρωτίστως που προκαλείται από ισχαιμία λόγω της αγγειοσύσπασσης που προκαλεί η ET-2.

Υπάρχουν άμεσες αποδείξεις ότι τα peribiliary capillary plexus είναι κατεστραμμένα πράγματι στην PBC. Αναφέρεται ότι τα peribiliary plexus είναι σημαντικά μειωμένα στην PBC (και έχει ενδιαφέρον επίσης στην αυτοάνοση ηπατίτιδα), ενώ υπάρχει πολλαπλασιασμός των plexus σε άλλες ασθένειες του ήπατος (211). Υπάρχουν επίσης και άλλες μελέτες οι οποίες δείχνουν αγγειακή δυσλειτουργία στην PBC (206). Η αυξημένη κυκλοφορία της ET-2, που παρατηρήθηκε τόσο στο πρώιμο όσο και σε προχωρημένο στάδιο της νόσου φαίνεται να είναι ειδικό για τη νόσο αυτή, δεδομένου ότι δεν έχει βρεθεί σε ομάδες ελέγχου σε ασθενείς με κίρρωση και σε ασθενείς με χρόνια ιογενή ασθένεια του ήπατος.

Ισχαιμία χοληφόρων μπορεί στη συνέχεια να οδηγήσει σε απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων (158, 160). Επιπλέον τα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων (BEC) που υποβάλλονται σε απόπτωση απελευθερώνουν το σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDC) από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα σε μόλις 6 ώρες μετά την επαγωγή της απόπτωσης και αυτό-αντιδρώντες επίτοποι είναι παρόντες στα BEC, ενώ το κυτταροπλασματικό PDC στα άλλα κύτταρα διαγράφεται αποτελεσματικά με γλουταθειόνη (161, 212).

Ένας τέτοιος μηχανισμός μπορεί να εξηγήσει επίσης τις ομοιότητες μεταξύ PBC και τη νόσο μοσχεύματος κατά του ξενιστή (GVHD) (213-215). GVHD συνδέεται με βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων (216) και η IL-1 έχει εμπλακεί στην παθογένεια της (217). Το πιο σημαντικό, στην GVHD μετά από μικρή μεταμόσχευση εντέρου, τα επίπεδα της ET1 αυξάνονται πριν από την επαγωγή της GVHD και έχει αποδειχθεί ιστοχημικά η αύξηση στα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα μερικές ημέρες πριν από GVHD, εμπλέκονται σημαντικά στην παθογένεση (218).

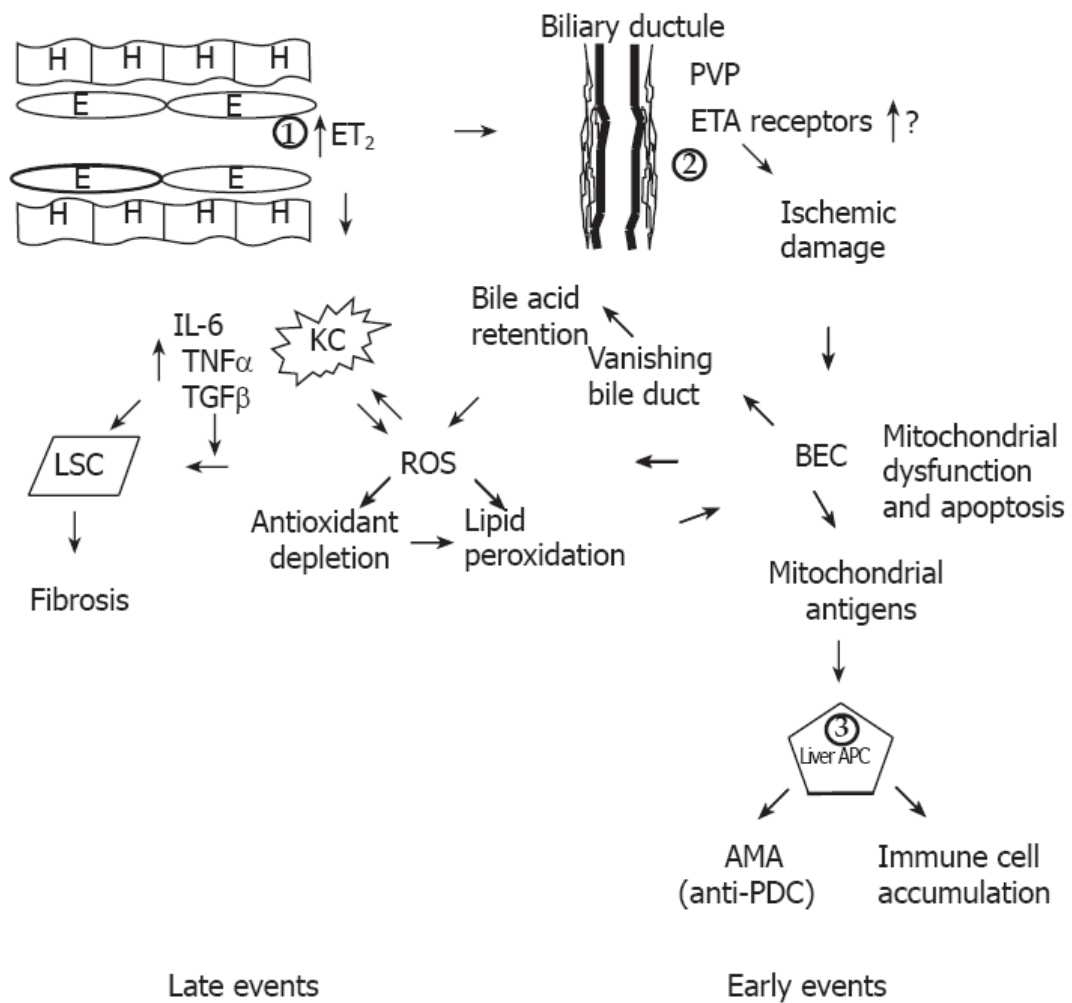
Ανοσοδραστικοί επίτοποι αυτό-PDC που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, ενδεχομένως μέσω της δράση της κασπάσης 3 (212) έχουν ληφθεί, είτε από το ***peribiliary*** δενδριτικά κύτταρα ή από BEC εκφράζοντας MHC II (αυτό θα μπορούσε να είναι είτε γενετικώς προσδιορισμένη ή εναλλακτικά να προκληθεί από προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (219). Κατά πρώτον αυτό οδηγεί στην παραγωγή των αυτό-αντισωμάτων και πιθανόν καθοριστικό πρότυπο πυκνότητας (determinant density model), όπως περιγράφεται από την Jones (193).

Υπάρχουν πολλά ερωτήματα που πρέπει ακόμη να απαντηθούν σχετικά με το παραπάνω μοντέλο τραυματισμού του ήπατος στην PBC. Το πιο σημαντικό θέμα είναι ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις της ET-2 έχουν βρεθεί στη συστηματική κυκλοφορία. Αυτό σημαίνει ότι η αγγειοσυστολή και η συνακόλουθη ισχαιμική βλάβη έπρεπε να συμβεί σε πολλά όργανα εκτός από το ήπαρ και PVP. Μια πιθανή εξήγηση για την επιλεκτικότητα είναι η αυξημένη έκφραση των υποδοχέων ET στο PVP των ασθενών με PBC, αλλά η υπόθεση αυτή πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω.

Ωστόσο, το παραπάνω μοντέλο έχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα. Εμπλέκεται τόσο η έμφυτη όσο και η επίκτητη ανοσία. Το πρώτο είναι η έναρξη της εκδήλωσης, ενώ το τελευταίο είναι η αιτία για την διαιώνιση της της ασθένειας ακόμη και μετά την εξαφάνιση της αρχικής αιτίας (εάν αυτή οφείλεται σε περιβαλλοντικές λοιμώξεις). Εξηγεί το ρόλο των μολυσματικών παραγόντων και την ομοιότητα της PBC με graft vs host disease. Αλληλεπίδραση των ενδοθηλιακών κυττάρων και Kupffer με αστεροειδή κύτταρα εξηγεί την πρόοδο σε ίνωση και κίρρωση.

Προβλέπει ότι τα περισσότερα διεισδυτικά κύτταρα θα πρέπει να είναι CD4 βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων, όπως είναι πράγματι η υπόθεση (176, 220, 221), αλλά ο ρόλος των CD8 είναι περιορισμένος (173, 222). Η παραγωγή AMA είναι δευτερεύον φαινόμενο παρά παθογενετικό που σχετίζεται με την ηπατική βλάβη, και αυτό εξηγεί την παρουσία AMA αρνητικών περιστατικών στην PBC.

Το UDCA μπορεί να ενεργεί ως επί το πλείστον ως καθαριστής ROS ώστε να προλαμβάνει το μιτοχονδριακό οξειδωτικό στρες. Το σημαντικότερο, διαθέτει 3 επίπεδα, όπου η γενετική προδιάθεση μπορεί να παίξει κάποιο ρόλο, δηλαδή το επίπεδο των ενδοθηλιακών κυττάρων (και ενδεχομένως των κυττάρων Kupffer), το επίπεδο έκφρασης του περιαγγειακού πλέγματος και του υποδοχέα ET, και το επίπεδο των ***peribiliary*** δενδριτικών κυττάρων που μπορεί να είναι γενετικά υπερ-ευαίσθητα. Όλα αυτά μπορεί και να εξαρτώνται από τα οιστρογόνα, έτσι εξηγούνται οι ακραίες τιμές γυναικείου επιπολασμού της νόσου, αλλά αυτό απαιτεί περαιτέρω έρευνα.



Σχήμα 1 Εμφάνιση των πρώιμων και των μετέπειτα (όψιμων) συμβάντων στο ενοποιητικό μοντέλο. Το πρώιμο και θεμελιώδες ελάττωμα στην PBC είναι η υπερπαραγωγή ET-2 από ενδοθηλιακά κύτταρα (1), ενδεχομένως, καθοδηγείται από ιούς (223, 224) ή άλλα παθογόνα μικρόβια σε άτομα με γενετική προδιάθεση. Η ET-2 είναι ένα χημειοελκτικό για τα κύτταρα Kupffer και επίσης προκαλεί συστολή των αστεροειδών κυττάρων οδηγώντας σε πρώιμη υπέρταση της πυλαίας. Η ET-2 οδηγεί σε ισχαιμική βλάβη των BEC (2) μέσω σύσφιξης των PVP με επακόλουθη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων των BEC και διάρρηξη της μεμβράνης από παραγωγή των ROS και τελικά οδηγούνται σε απόπτωση με αποτέλεσμα το σύνδρομο εξαφάνισης χοληφόρων (vanishing bile duct syndrome). Μιτοχονδριακά αντιγόνα προκύπτουν ενδεχομένως μέσω διάσπαση κασπάσης, παρουσιάζονται από υπερ-ευαίσθητα δενδριτικά κύτταρα (APC) του ήπατος

(3) και να οδηγήσει σε συσσώρευση των κυττάρων του ανοσοποιητικού και παραγωγή AMA.

Το δεύτερο θεμελιώδες ελάττωμα που συμβαίνει σε δεύτερη φάση στην διαδικασία της νόσου είναι η παραγωγή ROS. Μαζί με την κατάποση των αποπτωτικών σωματίων των BEC, τα ROS οδηγούν τα συσσωρευμένα κύτταρα Kupffer να παράγουν περισσότερα ROS και προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και TGFβ, τα οποία με τη σειρά τους οδηγούν σε ίνωση. Τα ROS παράγονται επίσης, μετά την ανάπτυξη του συνδρόμου εξαφάνισης των χοληφόρων ως αποτέλεσμα της κατακράτησης χολικών οξέων.

Τέλος, μέσω εξάντλησης των αντιοξειδωτικών ή μέσω ανεπαρκούς αύξησης αντιοξειδωτικών ROS το σύστημα οδηγείται σε υπεροξειδωση λιπιδίων και περαιτέρω απόπτωση BEC και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Γενετικά προκαθορισμένος έλεγχος μπορεί να ασκείται στα επίπεδα 1,2 και 3.

3. Αντισώματα στην PBC

Καθοριστικό ρόλο τόσο για την διάγνωση της PBC όσο και για τη μελέτη της παθογένειας της νόσου, είναι η παρουσία αντισωμάτων έναντι αντιγόνων της μιτοχονδριακής μεμβράνης: τα αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA) (225, 226). Η ανίχνευση των AMA είναι η πιο σημαντική ορολογική εξέταση για τη διάγνωση της PBC, ιδίως όταν κλινικά, βιοχημικά και ιστολογικά χολοστατικά σημάδια, χαρακτηριστικά της νόσου, δεν έχουν εμφανιστεί ακόμα (227). Ειδικά για την νόσο AMA, ανιχνεύονται σε ποσοστό άνω του 95% των ασθενών με PBC (176, 228).

Σε ποσοστό 20-50% των ασθενών που πάσχουν από PBC, ανιχνεύονται επίσης αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) (227, 229).

3.1 Αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA)

Βασισμένο σε διαφορετικά κλάσματα μιτοχονδριακών αντιγόνων, ένα πιο περιγραφικό σύστημα αντιγόνων αποτελείται από εννέα τμήματα που χαρακτηρίζονται ως M1-M9 (230).

Αυτός ο διαχωρισμός περιλαμβάνει τα αντιγόνα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (M1, M2, M5α, M7) και της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (M3, M4, M5β, M6, M8, M9).

Αντί-M1 αυτοαντισώματα (αντι-καρδιολιπίνη) έχουν βρεθεί σε σύφιλη, αντί-M7 κατά της αφυδρογονάσης της σαρκοσίνης σε οξεία μυοκαρδίτιδα, αντί-M3 σε ψευδολύκο επαγόμενο από venocurran, αντί-M6 σε ηπατίτιδα επαγόμενη από το ironiacide και αντί-M5 σε ένα αριθμό ασθενών με διαταραχές κολλαγόνου (225).

Το 1985, η νέα εποχή για τη μελέτη της PBC ξεκίνησε με την εφαρμογή τεχνικών της μοριακής βιολογίας. Αρχικά, η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης επέτρεψε την αναγνώριση πολυπεπτιδίων ορισμένου μοριακού βάρους (231). Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι, γενικώς υπάρχει αντίδραση έναντι ενός ή περισσοτέρων μιτοχονδριακών αυτοαντιγόνων, αν και το πιο κοινό αυτοαντιγόνο που αναγνωρίζεται από ορούς ασθενών ήταν ένα πολυπεπτίδιο 74 kDa που βρέθηκε στα μιτοχόνδρια πολλών ειδών. Και άλλα αντιγόνα διαφορετικού μοριακού βάρους (56 kDa, 48 kDa, 42 kDa, και 36

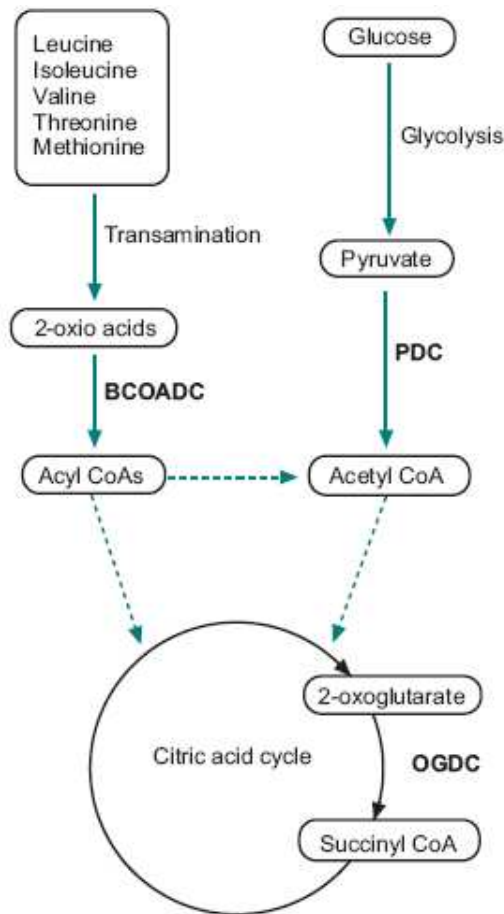
kDa) έχουν αναγνωρισθεί από ορούς ασθενών με PBC σε μικρότερο ποσοστό. Πίνακας 7 (232)

Πίνακας 7: Μοριακά βάρη αντιγόνων M2

Table 2. Molecular weights and functions of the 2-oxo-acid dehydrogenase complexes.		
Enzymes	MW (kDa)	Function
<i>Pyruvate dehydrogenase complexes (PDC)</i>		
E1 α decarboxylase	41	Decarboxylates pyruvate with thiamine pyrophosphate (TTP) as a co-factor
E1 β decarboxylase	36	Decarboxylates pyruvate with TTP as a co-factor
E2 acetyltransferase	74	Transfers acetyl group from E1 to coenzyme A (CoA)
E3 lipoamide dehydrogenase	55	Regenerates disulphide of E2 by oxidation of lipoic acid
E3 binding protein (protein X)	56	Anchoring E2 to the E2 core of pyruvate dehydrogenase complex
<i>2-oxoglutarate dehydrogenase complex (OGDC)</i>		
E1 oxoglutarate dehydrogenase	113	Decarboxylates α -ketoglutarate with TTP as a co-factor
E2 succinyl transferase	48	Transfers succinyl group from E2 to CoA
E3 lipoamide dehydrogenase	55	Regenerates disulphide of E2 by oxidation of lipoic acid
<i>Branched-chain 2-oxo-acid dehydrogenase complex (BCOADC)</i>		
E1 α decarboxylase	46	Decarboxylates α -keto acids
E1 β decarboxylase	38	Derived from leucine, isoleucine, and valine with TTP as a co-factor
E2 acyltransferase	52	Transfers acyl group from E1 to CoA
E3 lipoamide dehydrogenase	55	Regenerates disulphide of E2 by oxidation of lipoic acid

3.1.1 AMA-M2 αντισώματα

Το αντιγόνο με μοριακό βάρος 74 kDa στην συνέχεια αναγνωρίστηκε ως διυδρολιποαμιδική ακύλτρανσφεράση (dihydrolipoamide acyltransferase) (ένζυμο 2 (E2)) μέρος του συμπλέγματος της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDC) (89, 233) Η πυροσταφυλική αφυδρογονάση (PDC) είναι μέλος του συμπλέγματος της 2-κετοξύ αφυδρογονάσης (OADC) τα άλλα μέλη του συμπλέγματος είναι η 2-κετογλουταρική αφυδρογονάση (OGDC) και 2-κετοξική αφυδρογονάση με διακλαδούμενη αλυσίδα (BCOADC). PDC, OGDC, και BCOADC όλα έχουν θεμελιώδη ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό (234). Η δραστηριότητα του κάθε συμπλέγματος εντός των μιτοχονδρίων είναι υπό αυστηρό έλεγχο των διαιτητικών παραγόντων και ορμονών. Η PDC συνδέει την γλυκόλυση με τον κύκλο του κιτρικού οξέος (κύκλο Krebs), ενώ η OGDC χρησιμεύει εντός του κύκλου του κιτρικού οξέος, και η BCOADC καταλύει τον καταβολισμό μερικών απαραίτητων αμινοξέων (essential amino acids), συμπεριλαμβανομένων της βαλίνης, της λευκίνης και της ισολευκίνης εικόνα 4 (232).



Εικόνα 4. Ο ρόλος του συμπλέγματος της 2-κετοξύ αφυδρογονάσης (2-OADC) στο ενδιάμεσο μεταβολισμό. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν ότι εμπλέκονται πολλά βήματα αντίδρασης.

Αυτά τα συμπλέγματα διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό σε ολόκληρη την εξέλιξη, και είναι παρόντα σε όλους τους οργανισμούς από την rickettsia και προς τα πάνω (235). Τα τρία συμπλέγματα μοιράζονται μια κοινή δομή, με πολλαπλές επαναλήψεις της E1 (αποκαρβοξυλάση) και E3 (διυδρολιποαμιδική αφυδρογονάση) υπομονάδες γύρω από έναν πυρήνα E2 (και στην περίπτωση της PDC μόνο, E2 και E3 δεσμευτική πρωτεΐνη (E3BP)) (236).

Όλες οι υπομονάδες κωδικοποιούνται στον πυρήνα και μετά την μετάφραση γίνεται ενεργητική μεταφορά τους στα μιτοχόνδρια όπου γίνεται και η αυτοσυναρμολόγηση του συμπλέγματος. Η τροποποίηση κάποιων συστατικών του συμπλέγματος πραγματοποιείται εντός των μιτοχονδρίων,

και κυρίως η προσθήκη λιποϊκού οξέως στην ομάδα E2 (και όπου παραβρίσκεται E3BP). Το λιποϊκό οξύ διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην ενζυματική λειτουργία του κάθε συμπλέγματος.

Οι E2 αλυσίδες των PDC, OGDC, και BCOADC μοιράζονται μια άκρως κατακερματισμένη δομή. Περιλαμβάνουν, ξεκινώντας από το N-terminal, ένα έως τρία λιποειδικά τμήματα, μία περιφερειακή υπομονάδα ως δεσμευτικό τμήμα, και ένα μεγάλο πυρήνα που αποτελεί τον καταλυτικό τομέα της ακετυλτρανσφεράσης, όλα συνδεόμενα μεταξύ τους από ένα μακρύ (25-30 κατάλοιπα) τμήμα πολυπεπτιδικής αλυσίδας πλούσιας σε αλανίνη και προλίνη (237).

Η τρισδιάστατη δομή του PDC-E2 των προκαρυωτικών (238) και των ευκαρυωτικών (239) έχει προσδιοριστεί μέσω πυρηνικής φασματοσκοπίας. Αποτελείται από δύο β-φύλλα τετραπλής έλικας που αποτελούν ένα πεπλατυσμένο βαρέλι, με την θέση πρόσδεσης του λιποειδικού τμήματος αποτελούμενο από υπόλειμμα λυσίνης στο άκρο μίας σφιχτής στροφής σε ένα από τα β-φύλλα, και τα N-terminal και C-terminal φαίνονται να κλείνουν μαζί στο άλλο άκρο του μορίου. Λίγα πράγματα είναι γνωστά, μέχρι στιγμής, όσον αφορά την τρισδιάστατη δομή των άλλων υπομονάδων της PDC .

Αυτοαντισώματα στον ορό άνω του 90% των ασθενών με PBC αντιδρούν με το PDC-E2 και E3BP με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, ενώ η συχνότητα της δραστηριότητας κατά της E2 υπομονάδας OGDC και BCOADC είναι χαμηλότερη, γύρω στο 50-70% (240). Αντισώματα για την PDC-E1α είναι παρόντα σε χαμηλότερους τίτλους. Περίπου το 10% των ασθενών αντιδρούν μόνο με OGDC-E2 και/ή BCOADC-E2. Πίνακας 8 (232). Είναι ενδιαφέρον ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στη συχνότητα και αντιγονικές ιδιαιτερότητες στα AMA μεταξύ ανδρών και γυναικών, ανεξάρτητα από την επικράτηση της νόσου στο γυναικείο φύλο (241).

Αν και αναφέρθηκαν αυτοαντισώματα για την E3 υπομονάδα του PDC, παρόμοια αντίδραση διαπιστώθηκε επίσης και στον ορό ατόμων ελέγχου (242).

Πίνακας 8 : Ποσοστά αυτοαντιγόνων AMA-M2 που ανιχνεύονται στον ορό ασθενών με PBC

Antigen	Prevalence (%)
<i>Mitochondrial location</i>	
PDC-E2	90–95
PDC-E3-binding protein	90–95
OGDC-E2	39–88
BCOADC-E2	53–55
PDC-E1 α	41–66
PDC-E1 β	1–7

Και στα τρία ενζυμικά συμπλέγματα ο επίτοπος εντοπίζεται στην υπομονάδα E2 και πιο συγκεκριμένα στο λιποϋλικό τμήμα του μορίου.

Για το PDC-E2 αποτελείται από 93 αμινοξέα (87, 243), για το BCOADC-E2 από 227 αμινοξέα (244), και για το OGDC-E2 από 81 αμινοξέα (245).

Τα AMA στον ορό εκφράζονται με τους ισοτύπους ανοσοσφαιρινών, IgG, IgM και IgA (246).

Στο 89% των ασθενών με PBC AMA εντοπίζονται και στη χολή. Πρόκειται για τα ίδια AMA που απαντώνται και στον ορό με ποσοστά PDC-E2 (79%), BCOADC-E2 (32%) και OGDC-E2 (5%) (170). Περίπου το 50% των χολικών AMA είναι ανοσοσφαιρίνες του υποτύπου IgA, οι οποίες στρέφονται κατά του ίδιου αυτοεπίτοπου όπως και στον ορό.

Επίσης έχουν αναφερθεί και εκκρινόμενες ανοσοσφαιρίνες τύπου IgA έναντι του συμπλέγματος PDC, στα ούρα ασθενών με PBC (171).

3.1.2 Μη-M2 μιτοχονδριακά αντισώματα

Έχει διαπιστωθεί από την ομάδα του Tubingen ότι υπάρχουν και άλλα μιτοχονδριακά αντισώματα εκτός από την οικογένεια M2 που είναι σημαντικά για την PBC.

Αρχικά οι Berg et al. περιέγραψαν τρία αντιγόνα (M4, M8, και M9), τα οποία απαντώνται στην PBC, που συνδέονται με την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (247-249).

Αναδρομικές μελέτες πρότειναν ότι οι ασθενείς οι οποίοι ήταν αντί-M2 και αντί-M9 θετικοί κατά τη διάγνωση είχαν σχετικά καλή μετέπειτα πορεία της νόσου, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι ασθενείς που ήταν αντί-M4 και αντί-M8 θετικοί κατά την διάγνωση είχαν χειρότερη έκβαση (250). Μια προοπτική μελέτη που πραγματοποιήθηκε από την ίδια ερευνητική ομάδα επιβεβαίωσε τα προηγούμενα ευρήματα (251).

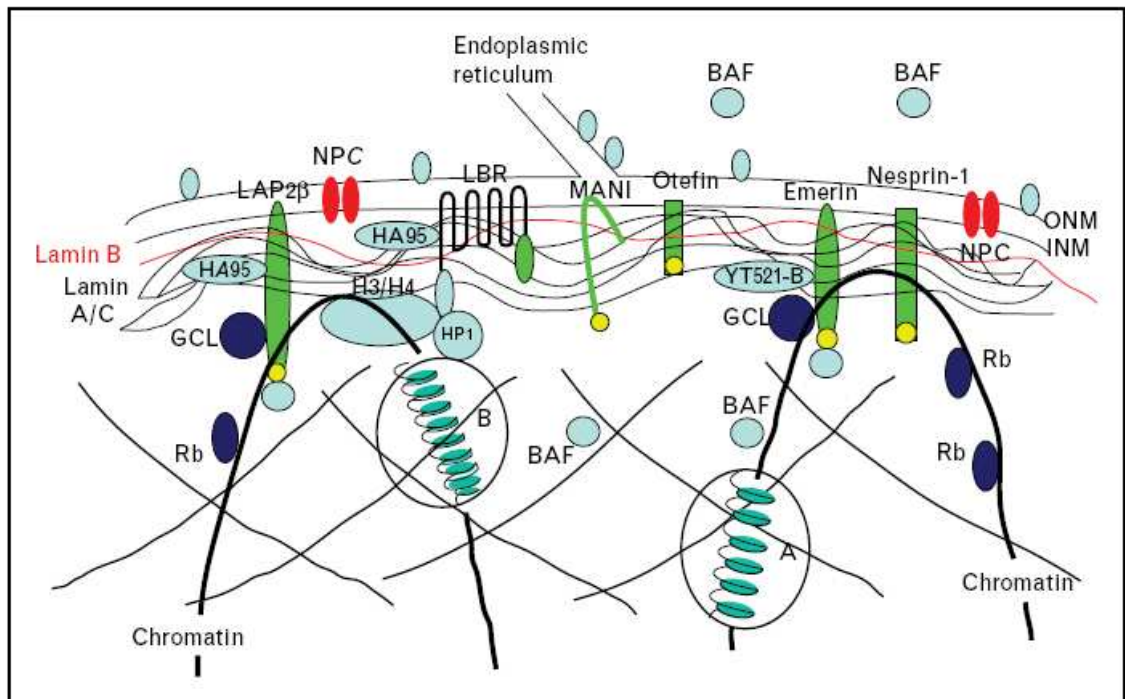
Παρόλο που ένας ορολογικός δείκτης κατά την διάγνωση θα ήταν πολύ χρήσιμος για την κλινική διαχείριση των ασθενών, εξακολουθούν να υπάρχουν αμφιβολίες σχετικά με τη σημασία των δεδομένων που αφορούν τα αντί-M4, αντί-M8, και αντί-M9.

Το μεγαλύτερο πρόβλημα σε σχέση με αυτές τις μελέτες είναι ότι δεν έχουν, μέχρι στιγμής, αναπαραχθεί ανεξάρτητα η μία από την άλλη. Αυτό οφείλεται, εν μέρει, στην περίπλοκη φύση των πειραμάτων που απαιτούνται για την ανίχνευση αυτών των αντισωμάτων.

3.2 Πυρηνικός φάκελος και Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA)

3.2.1 Πυρηνικός φάκελος

Ο πυρηνικός φάκελος αποτελείται από τρεις τομείς που διαχωρίζονται μεταξύ τους μορφολογικά (252) Εικόνα 5 (253).



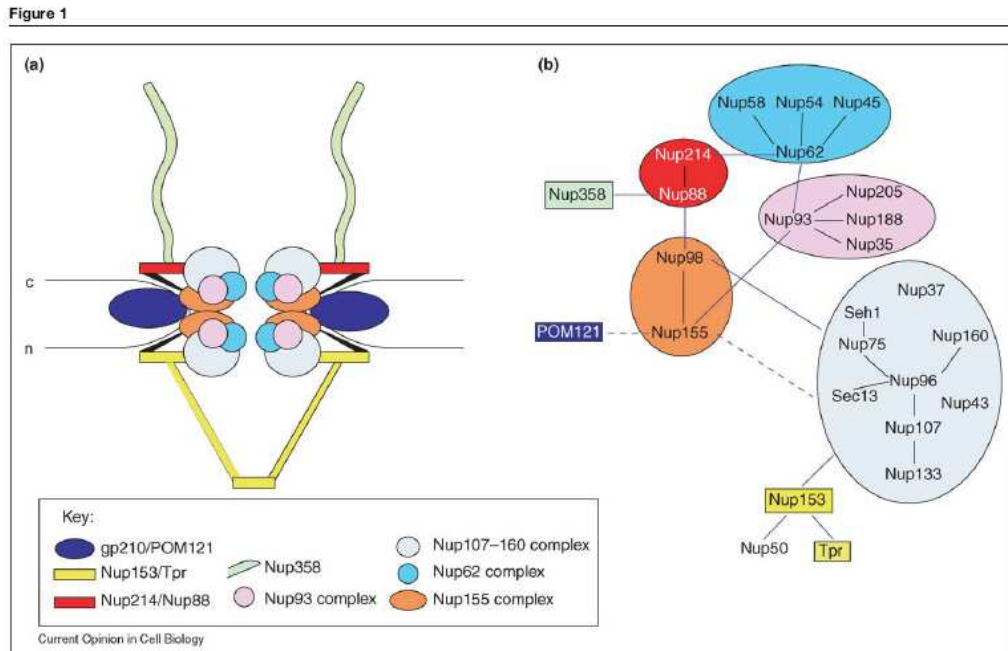
Εικόνα 5 Σχηματικό διάγραμμα του πυρηνικού φακέλου δυναμική οργάνωση και η σχέση του με την ευχρωματίνη και ετεροχρωματίνη.

Στην εξωτερική μεμβράνη του πυρήνα υπάρχουν ριβοσώματα και, σε πολλά σημεία, συνέχονται με το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (RER).

Το εσωτερικό της πυρηνικής μεμβράνης περιέχει μεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες μεσολαβούν στην σύνδεση της λαμίνης με την χρωματίνη. Κάποιες από αυτές έχουν ταυτοποιηθεί όπως ο υποδοχέας της λαμίνης B (LBR) και οι Lamin associated proteins (LAP-1 και LAP-2). Η πυρηνική λαμίνη αποτελείται από ένα δίκτυο από ενδιάμεσα ινίδια που συνδέονται με την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερις διαφορετικές πρωτεΐνες Lamin (A, B1, B2, C). Οι Λαμίνες A (74 kDa) και C (65 kDa) εκφράζονται σε τελικώς διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα και είναι προϊόντα εναλλακτικού splicing του γονιδίου Lamin A / C (LMNA).(254).

Η επικοινωνία ανάμεσα σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα είναι θεμελιώδης για τα ευκαρυωτικά κύτταρα και περιγράφει την αμφίδρομη ανταλλαγή μορίων η οποία γίνεται μέσω των πολλών τρημάτων του πυρηνικού φακέλου (NE) που ονομάζονται σύμπλεγμα πυρηνικών πόρων (NPC) (255). Στα σπονδυλωτά

το NPC είναι μια πρωτεϊνική δομή συνολικού βάρους 120 MDa. Σε μοριακό επίπεδο, κάθε NPC αποτελείται από 30 διαφορετικές πρωτεΐνες που ονομάζονται νουκλεοπορίνες (Nups) Εικόνα 6 (256).



Εικόνα 6 Συμπλέγματα νουκλεοπορινών : εντοπισμός και αλληλεπιδράσεις

3.2.2 Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA)

Θετικά ANA στον ορό ασθενών έχουν εντοπιστεί σε διάφορες ηπατικές ασθένειες όπως η μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, η αλκοολική ηπατίτιδα, η ηπατίτιδα C, η πρωτογενής σκληρυντική χολαγγειίτιδα και η PBC, (257), άλλα και σε μη ηπατικά αυτοάνοσα νοσήματα καθώς και σε μια υποομάδα υγιών ατόμων.

Τα αντισώματα που ανιχνεύονται σε αυτοάνοσες ηπατικές νόσους περιλαμβάνουν εκείνα έναντι αντιγόνων μονής και διπλής έλικας DNA (ss-, ds-DNA), μικρών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (smRNP), κεντρομεριδίου (ACA), λαμινών, ιστονών, κυκλίνης A, και χρωματίνης (258-261). Πίνακας 9 (246)

Πίνακας 9 : Αυτοαντισώματα σε διάφορες ηπατικές νόσους

Table I. Synopsis of the antigen specificity and known clinical associations and seroprevalence for serum autoantibodies in AIH, PBC and PSC.

Autoantibody	Molecular targets	Detection systems	Disease (diagnosis)	Other liver diseases	Reference
ANA	Multiple nuclear targets	IIF	AIH-1 (70–80%)	Drug/alcohol induced hepatitis, HCV,PSC,PBC	[5,6]
	Sp100, PML, SUMO	IIF (MND)	PBC (30–50%)	–	[22,74]
	gp210.NUP62	IIF (RL/M)	PBC (30–50%)	–	[22]
SMA	Multiple targets: F-actin (most specific) and non actin components	IIF	AIH-1 (80%)	HCV, advanced liver diseases, PBC	[6,39,40]
Anti-LKM-1	CYP2D6	IIF	AIH-2 (100%)	HCV	[6]
AMA	E2 subunits of 2-oxo-acid dehydrogenase complexes, mainly PDC-E2	IIF ELISA,	PBC (95%)	–	[3]
Atypical pANCA or pANNA	50kDa neutrophil specific nuclear pore complex protein	IIF	PSC (88%)	AIH (70%) PBC (5%)	[65]
Anti-SLA	UGA-suppressor serine tRNA-associated protein	ELISA, IB, RIA	AIH-1, (10–50), AIH negative for other Ab, AIH-2	–	[5]

Μια πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι το ποσοστό αντί-κυκλίνης A στην PBC φτάνει στο 7% (261).

ANA ανιχνεύονται τόσο στην Αυτοάνοση ηπατίτιδα, τύπου 1, όπου αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό διαγνωστικό δείκτη και ανιχνεύονται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, όσο και στην PBC όπου τα συναντάμε στο 30-50% των περιπτώσεων όπου φαίνεται να μην συσχετίζονται με τα AMA. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι τα ANA ανιχνεύονται σχεδόν σε όλους τους ασθενείς με PBC που είναι AMA αρνητικοί (85, 262).

Στην PBC, μερικές φορές υπάρχουν μη ειδικά για τη νόσο ANA, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που προσδίδουν ομοιογενή, κοκκιώδη και αντί-κεντρομεριδίου (ACA) χρώση στον έμμεσο ανοσοφθορισμό, (263). Άλλα αυτοαντισώματα είναι ειδικά για την PBC, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που στον ανοσοφθορισμό δίνουν χρώση πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων (MND) και δακτυλιοειδή μεμβρανικό φθορισμό (RL/M). Τα αυτοαντιγόνα στόχοι έχουν καλά χαρακτηριστεί ως πολυπρωτεϊνικά σωμάτια μοριακού βάρους 100 kDa (sp100), ως πρωτεΐνη προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (PML), και ως μικρός τροποποιητής δίκην ουμπικουϊίνης (small ubiquitin-like modifier) (SUMO) πρωτεΐνες που στον ανοσοφθορισμό δίνουν MND χρώση.

Επίσης ως πρωτεΐνες εντός του συμπλέγματος των πυρηνικών πόρων (anti-NPC), συμπεριλαμβανομένων των νουκλεοπορινών 210 kDa (gp210) και 62 kDa (NUP62) που αντιστοιχούν σε RL / M χρώση (264-266). Πολλές μελέτες για την PBC δείχνουν ότι η συχνότητα ανίχνευσης των παραπάνω αντισωμάτων κυμαίνονταν από 16 έως 30% (267-270) για τα αντισώματα του πυρηνικού φακέλου και σε 11 με 24% (270-272) για τα MND, Πίνακας 10 (273).

Πίνακας 10 : Ποσοστά ANA στην PBC

Table 1
ANA highly specific for PBC and approximate prevalence in individuals with the disease

Nuclear antigen recognized	Approximate prevalence in PBC (%)
<i>Definite</i>	
gp210	25
sp100	20–30
LBR	2
<i>Probable</i>	
PMI	20
p62	14

3.2.2.1 RL/M ANA

Καλά χαρακτηρισμένα είναι τα αυτοαντισώματα έναντι μιας γλυκοπρωτεΐνης, μοριακού βάρους 210 kDa, των πυρηνικών πόρων (gp 210) (274, 275), τα αντισώματα αυτά είναι PBC-ειδικά και εμφανίζονται στο 10-47% των ασθενών με PBC (267). Αν και αυτά τα αυτοαντισώματα έχει διαπιστωθεί ότι εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση για την PBC, εξακολουθούν να υφίστανται και μετά μεταμόσχευση ήπατος και δεν φαίνεται να συσχετίζονται με την επανεμφάνιση της νόσου σε αυτή την κατάσταση (276, 277). Ο επίτοπος έχει χαρτογραφηθεί και αποτελείται από μια σειρά 15 αμινοξέων που βρίσκονται στο C-terminal τμήμα της πρωτεΐνης και αναγνωρίζεται από όλους τους gp210-θετικούς ορούς (278). Μια άλλη μελέτη, με βιοχημικά καθαρισμένο gp210, έχει αποδείξει ότι τα αντισώματα έναντι της gp210 αναγνωρίζουν τουλάχιστον δύο διαφορετικούς επίτοπους, ορισμένοι αντιδρούν όπως παραπάνω, ενώ άλλοι οροί αντιδρούν με ένα νέο επίτοπο που εντοπίζεται στο γλυκοζυλιωμένο N-terminal τμήμα της πρωτεΐνης (279).

Άλλη γλυκοπρωτεΐνη των πυρηνικών πόρων, η p62, η οποία πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα αυτοαντιγόνο περίπου στο 32% των ασθενών με PBC (280). Και πάλι, τμήματα πλούσια σε υδατάνθρακες φαίνεται να συμμετάσχουν στην ανοσοποιητική αναγνώριση από τα RL/M ANA. Αντισώματα κατά του p62 δεν έχουν αναφερθεί σε άλλες μελέτες που έψαχναν για αντισώματα κατά των πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου (267, 274, 281) και αναγνώριση του ανασυνδυασμένου p62 δεν έχει αναφερθεί. Αντί-p62 αντισώματα είναι πολύ ειδικά για την PBC αλλά δεν συνεντοπίζονται με τα αντί-grp210 αυτοαντισώματα. Αντί-grp210 και αντί-p62 θετικότητα φαίνεται, επομένως, να προσδιορίζει διαφορετικές υποομάδες ασθενών. Η κλινική σημασία παρατήρησης αυτής, αν υπάρχει, παραμένει ασαφής.

Πρόσφατα στοιχεία υποδεικνύουν ότι οι ασθενείς οροθετικοί για αντί-NPC έχουν μια πιο σοβαρή πορεία της νόσου, έχοντας ενδείξεις πιο προχωρημένου σταδίου και χειρότερη έκβαση (282, 283).

Σπάνια ασθενείς με PBC έχουν αντισώματα κατά τον υποδοχέα της Λαμίνης Β (LBR), μία πρωτεΐνη της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης (284). Ο επιπολασμός των αντισωμάτων LBR σε άτομα με PBC είναι μεταξύ 1 και 2% και τα αυτοαντισώματα αυτά δεν έχουν αναφερθεί σε καμία άλλη ασθένεια (267, 275). Τα αντί-LBR αντισώματα στην PBC αναγνωρίζουν τα πρώτα 60 αμινοξέα της πρωτεΐνης (285). Μέχρι στιγμής, αυτοαντισώματα κατά του υποδοχέα της Λαμίνης Β επίσης φαίνεται να είναι PBC ειδικά και πιο συχνά απαντώνται στον ορό ασθενών που είναι AMA αρνητικοί.

Αντισώματα κατά της πυρηνικής λαμίνης, ανιχνεύονται επίσης σε ασθενείς με διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα (286, 287) και περίπου στο 2% των ασθενών με PBC (267, 274).

3.2.2.2 MND ANA

Οροί PBC δίνουν multiple nuclear dot μοτίβο στον ανοσοφθορισμό και αναγνωρίζουν πρωτεΐνες μοριακού βάρους 95 kDa (288) και 78-92 και 96-100 kDa (289) με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Δύο πυρηνικές πρωτεΐνες έχουν πλέον αποδειχθεί ότι αντιδρούν με αυτά.

Η πρώτη που κλωνοποιήθηκε ήταν η Sp100 (290). Αυτό το cDNA κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας με ομοιότητες στην ακολουθία με αρκετές μεταγραφικές πρωτεΐνες που ενεργοποιούν την μεταγραφή, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών NEF του ιού HIV-1.

Η χαρτογράφηση του επίτοπου έχει δείξει ότι ένα τμήμα της Sp100 (που περιέχει το ακολουθία δείχνει ομοιότητα με το NEF HIV πρωτεΐνες) αναγνωρίζεται από όλους τους αντί-Sp100 θετικούς ορού (291). Δύο άλλοι επίτοποι έχουν ήδη εντοπιστεί στα αμινοξέα 296-311 και 332-351 (292). Σε ποσοστό περίπου 20% των ασθενών PBC (291, 293). Τα αντί-Sp100 φαίνεται να είναι ειδικά για την νόσο και έχει βρεθεί επίσης να εξακολουθούν να υφίστανται μετά μεταμόσχευση ήπατος (277).

Μια δεύτερη πρωτεΐνη που δίνει MND χρώση και αντιδρά με τον ορό ασθενών με PBC είναι η πρωτεΐνη προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (PML) (294). Η PML, όπως συμβαίνει με Sp100, δείχνει ομοιότητα ακολουθίας με παράγοντες μεταγραφής, πράγμα που υποδεικνύει πιθανό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής (295). Η PML είναι μια πρωτεΐνη των πυρηνικών σωματίων που συνδέονται με την sp100 (296). Αντισώματα κατά PML ανιχνεύονται συχνά σε άτομα με PBC και αντί-sp100 αντισώματα, ωστόσο, φαίνεται να είναι πιο δύσκολο να εντοπιστούν. Σε μια σειρά με 170 ασθενείς με PBC, οι Züchner και συν. (297) ανέφεραν ότι ο επιπολασμός των αντί-PML αντισωμάτων είναι 19%.

Έχει αναφερθεί ότι η ιντερφερόνη αυξάνει τις συγκεντρώσεις και των δύο Sp100 και PML τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης (298). Αυτοαντισώματα κατά PML απαντούνται σε ίδια ποσοστά και είναι τόσο ειδικά για την νόσο όσο και τα Sp100 (294).

Μια πρωτεΐνη των πυρηνικών σωματίων που ονομάζεται sp140 έχει επίσης ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί χρησιμοποιώντας αντισώματα από ορό ασθενούς με PBC (299). Ο επιπολασμός των αντισωμάτων αντί-sp140 στην PBC δεν είναι ακόμη γνωστός.

3.3 Άλλα αντισώματα στην PBC

Εκτός από τα καλώς περιγραφέντα μιτοχονδριακά και πυρηνικά αυτοαντιγόνα, έχουν αναφερθεί και άλλα αυτοαντιγόνα. Μία αυτοσωματική απάντηση με δυνητικά κλινικής σημασία είναι ότι υπάρχουν αντισώματα κατά ειδικών αντιγόνων των αιμοπεταλίων. Πράγματι, η αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του τίτλου των αντ αιμοπεταλιακών αντισωμάτων και αιμοπεταλίων υποδηλώνει ότι η απάντηση αυτή συμβάλει (μαζί με μη αυτοάνοσες διεργασίες) στην θρομβοπενία που φαίνεται στην PBC (300). Έχει αποδειχθεί πρόσφατα ότι τα αντιγόνα που προκαλούν τις αντ αιμοπεταλιακές απαντήσεις που ανευρίσκονται στην PBC είναι τα συγκροτήματα γλυκοπρωτεΐνης των αιμοπεταλίων IIb-IIIa και Ib-IX (301, 302).

4. Μέθοδοι ανιχνεύσεως αυτοαντισωμάτων στην PBC

Τα AMA είναι τα πιο χαρακτηριστικά αντισώματα στην PBC (6). Αυτά τα AMA είναι μη όργανο και μη άνθρωπο-ειδικά και ανήκουν τόσο στις IgG και στις IgM ανοσοσφαιρίνες. Για πρώτη φορά ανιχνεύθηκαν σε ασθενείς με PBC, το 1965 από τους Walker et al, με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού σε τομές κρυστάτη (5).

Μέχρι σήμερα, 9 διαφορετικά είδη AMA (αντί-M1 έως αντί-M9) έχουν οριστεί, χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές όπως ανοσοφθορισμό, την τεχνική αντίδρασης συνδέσεως του συμπληρώματος (CFTs), ενζυμική ανοσοπροσρόφηση (ELISA) και την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (247, 303).

Οι πρώτες μελέτες για την PBC απέδειξαν ότι μέχρι και το ένα τρίτο των ασθενών με PBC είχαν αυτοαντισώματα στον ορό τους και έναντι πυρηνικών αυτοαντιγόνων όπως δείχνουν τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού (304).

4.1 Μέθοδοι ανίχνευσης αντιμιτοχονδριακών αυτοαντισωμάτων στην PBC

4.1.1 Τεχνική του ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των AMA.

Ελέγχθηκαν 56 οροί ασθενών, εκ των οποίων 32 είχαν PBC που είχε διαγνωστεί ιστολογικά.

Η ανίχνευση των αντισωμάτων έγινε με την τεχνική του ανοσοφθορισμού (IF) χρησιμοποιώντας μονιμοποιημένες και αμονιμοποίητες τομές από ασθενείς με θυρεοτοξικό θυρεοειδή και θόλο από ανθρώπινο στομάχι, επίσης οι οροί δοκιμάστηκαν σε ήπαρ πιθήκου και αρουραίου καθώς και σε νεφρό αρουραίου. Οι οροί PBC επίσης δοκιμάστηκαν με την τεχνική αντίδρασης συνδέσεως του συμπληρώματος (CFTs) (χρησιμοποιώντας ομογενοποίηση ήπατος αρουραίου και νεφρού, ανθρώπινο γαστρικό βλεννογόνο έπειτα από ενζυμική επίδραση με ficin από ασθενή με θυρεοτοξικό θυρεοειδή).

Και οι 32 οροί ασθενών με PBC και κανένας ορός από τα άτομα ελέγχου (έξω ηπατική απόφραξη χοληφόρων, χολόσταση επαγόμενη από τα ναρκωτικά και ιογενή ηπατίτιδα) έδωσαν μία συγκεκριμένη χρώση στον ανοσοφθορισμό : υπήρξε κυτταροπλασματική χρώση στις αμονιμοποίητες

τομές του θυρεοειδούς και του στομάχου, οι μονιμοποιημένες τομές δεν έδωσαν όμοιο φθορισμό στον ανοσοφθορισμό.

Επειδή υπήρχε ένας κοκκώδης φθορισμός σε αυτού του είδους των ιστών πλούσιων σε μιτοχόνδρια και απουσία χρώσης σε ιστούς, όπως ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα που είναι φτωχά σε μιτοχόνδρια, υπέθεσαν ότι αυτά τα αντισώματα αντιδρούσαν κατά των μιτοχονδρίων. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε από το γεγονός ότι η απορρόφηση των ορών με τα μιτοχόνδρια αρουραίου και όχι με άλλα κυτταρικά υποκλάσματα καταργεί τον φθορισμό του ιστού. Αν και η παρουσία των αυτοαντισωμάτων στον ορό ασθενών με PBC είχε τεκμηριωθεί και από άλλους ερευνητές, αυτή ήταν η πρώτη απόδειξη με ανοσοφθορισμό της ύπαρξης αντισωμάτων, ειδικά για PBC που αντιδρούν με μιτοχονδριακά αντιγόνα, έτσι, τα AMA έφθασαν στον ιατρικό χώρο. Ένα χρόνο αργότερα βελτίωσαν την τεχνική τους και το αναλυτικό πρωτόκολλο φθορισμού είναι αυτό που περιγράφεται παρακάτω (304).

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική με διπλό υπόστρωμα για την ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό, με μονιμοποιημένες τομές κρυοστάτη από θυρεοειδή αδένα θυρεοτοξικού ασθενή και ένα σύνθετο μπλοκ αποτελούμενο από αμονιμοποίητες χειρουργικές τομές ανθρώπινου γαστρικού βλεννογόνου, θυρεοειδή αδένα και νεφρικού φλοιού. Το σύνθετο μπλοκ προετοιμάστηκε τοποθετώντας τα μικρά τμήματα των τριών ιστών σε πλάκα χαλκού σε επαφή με στερεό διοξείδιο του άνθρακα και η προσκόλληση έγινε με μικρές σταγόνες φυσιολογικού ορού πριν την τελική τους προσκόλληση και την διαδικασία του κοψίματος.(305).

Τα ιστοτεμάχια επωάστηκαν με τον ορό ασθενών για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, πλύθηκαν σε 0,01 M barbitone buffer, pH 7,2 , που περιέχει 0,85% χλωριούχο νάτριο για 15 λεπτά και στη συνέχεια επωάστηκαν με φλουορεσκεΐνη συζευγμένη με αντί-ανθρώπινες ανοσοσφαιρίνες για 20 λεπτά. Μετά από ένα τελικό πλύσιμο των 15 λεπτών στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα, μονιμοποιήθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 50% γλυκερόλη pH 8,6 (306).Ο αντί-Ig ορός παράχθηκε σε κουνέλια έπειτα από ανοσοποίηση τους με τμήμα σφαιρίνης από κλάσμα ανθρώπινου ορού έπειτα από κατακρήμνιση του σε 18% θειικό νάτριο, και σύζευξη με

ισοθειοκυανική φθορεϊσίνη με τη μέθοδο των Marshall et al (307), για να δώσει ένα λόγο φλουορεσκεϊνης-πρωτεϊνης 7: 1.

Έπειτα από την σύζευξη με την φθορίζουσα ουσία τα συμπλέγματα που δημιουργήθηκαν πέρασαν από στήλη Deacidite FF ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της φθορίζουσας ουσίας, στην συνέχεια γίνεται πάλι διόρθωση του pH σε 7,2 με το παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα και έπειτα περνάμε το δείγμα από στήλη Sephadex G-25. Ακριβώς πριν από τη χρήση απορροφώνται με σκόνη ήπατος ινδικού χοιριδίου (100 mg / ml). Στην ανοσοηλεκτροφόρηση τα συμπλέγματα αντέδρασαν με IgG, IgA και IgM και άλλες β-σφαιρίνες, και έδωσαν ελάχιστο φθορισμό υποβάθρου.

Για να γίνει διάκριση μεταξύ μιτοχονδριακής και ειδικής για τον θυρεοειδή χρώση είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί ένας θυρεοτοξικός θυρεοειδής αδένας με κυλινδρικά κύτταρα και μικρά acini λόγω του ότι αδένες με επίπεδο επιθήλιο δεν δείχνουν την υψηλή συγκέντρωση των μικροσωμάτων που δρουν ως αντιγόνο κοντά στα όρια του κολλοειδούς που προκαλεί το πρότυπη χρώση χαρακτηριστική της θυρεοειδίτιδας.

Ο ιστός ήπατος είτε προέρχεται από τον άνθρωπο ή τον αρουραίο ή πίθηκο, αποτελεί ένα κακό υπόστρωμα για την ανίχνευση AMA αν και από τον κυτταροπλασματικό φθορισμό φαίνεται σαφώς όταν ο τίτλος αντισωμάτων είναι υψηλός .

4.1.2 Μέθοδος ποσοτικού καθορισμού αντίδρασης συνδέσεως του συμπληρώματος (CFTs)

Η μέθοδος των Rapport και Graf (308) χρησιμοποιήθηκε όπως εφαρμόζεται στη μελέτη των αντιγόνων μικροσωμάτων (309, 310). Τα δισκία Ca / Mg του διαλύματος CFT (Oxoid Ltd., London) διαλύθηκαν με προσθήκη 0,1% αλβουμίνης ορού βοοειδών.

Σε διάλυμα Alsever αφέθηκαν να σταθεροποιηθούν για 1 εβδομάδα ερυθροκύτταρα προβάτου (Burroughs Wellcome & Co., London, England). Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν για 2-4 εβδομάδες. Εναιώρημα κυττάρων 6% ευαισθητοποιήθηκε με ίσο όγκο αιμολυσίνης και τιτλοποιήθηκε με περίσσεια συμπληρώματος.

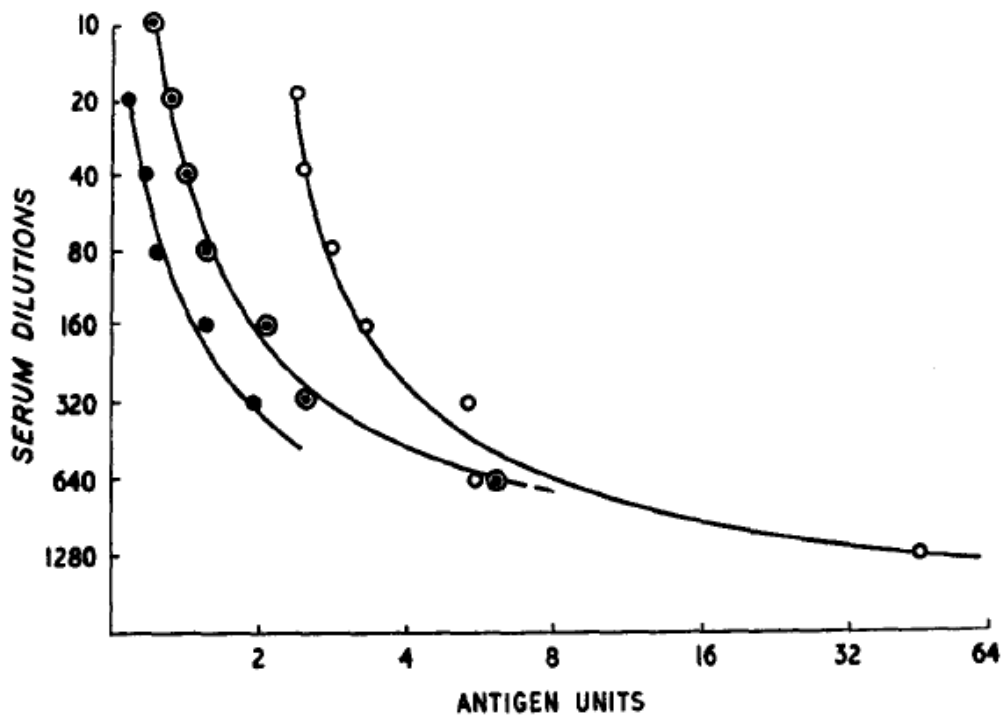
Ο τίτλος του συμπληρώματος των ινδικών χοιριδίων (BW dried preserved) καθορίστηκε σύμφωνα με την μέθοδο των Osler et al. (311) και το 50% αιμολυτικής μονάδας ($C'H_{50}$) υπολογίζεται με το εμβαδόν του ποσοστού λύσης σε κλίμακα "logit" προς τη συγκέντρωση του συμπληρώματος σε κλίμακα "log".

Για τη δοκιμασία του αντιγόνου, 0,1 ml αραιωμένου αντιγόνου αναμειγνύεται με 0,1 ml πρότυπου αραιωμένου PBC ορού και $3C'H_{50}$ μονάδες του συμπληρώματος, και καταλήγουμε σε τελικό όγκο 1,2 ml με buffer Ca / Mg.

Όλα τα αντιδραστήρια διατηρήθηκαν σε πάγο κατά τη διάρκεια του πιπετταρίσματος για να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια του C' (συμπληρώματος). Το σύστημα επωάστηκε στους 37°C για 1 ώρα, 0,3 ml ευαισθητοποιημένων κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτης προστέθηκαν και η επώαση συνεχίστηκε για ακόμη 1 ώρα με συχνή ανάδευση.

Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C και ο βαθμός λύσης καθορίστηκε από την απορρόφηση στα 541 nm. Διαδοχικές αραιώσεις κάθε κλάσματος αντιγόνου προσδιορίστηκαν και η αραιώση που δίνει 50% λύσης ορίστηκε ως μία μονάδα.

Για να επιλεγεί ο πρότυπος ορός για την ανίχνευση του αντιγόνου των μιτοχονδρίων, εξετάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαφορετικών ορών ασθενών με PBC. Αυξανόμενες ποσότητες μιτοχονδρίων και isofixation curves κατασκευάστηκαν από την εκτίμηση του επιπέδου του αντιγόνου που απαιτείται για να ***fix*** 2 από τα $3C'H_{50}$ για κάθε αραιώση των ορών που μελετήθηκαν. Οι τρεις isofixation καμπύλες που φαίνονται στο σχήμα 2 (6) κατασκευάστηκαν από τρεις ορούς ασθενών με PBC και μία μιτοχονδριακή προετοιμασία.



Σχήμα 2. "Isofixation curves" που κατασκευάστηκαν από τρεις ορούς ασθενών με πρωτοπαθή χολική κίρρωση και μία προετοιμασία μιτοχονδριακή ως αντιγόνο. Κάθε σημείο της καμπύλης αντιπροσωπεύει το ποσό του αντιγόνου που fix δύο από τους τρεις C_H50 μονάδες του συμπληρώματος, η πρώτη καμπύλη, επιλέχθηκε ο ορός από τον ασθενή LH ως πρότυπο .

Οι τίτλοι ήταν μεταξύ 640 και 1280. Οι διαφορές μεταξύ των καμπύλων σε περίσσεια αντισώματος σχετίζονται προφανώς με τον αριθμό των αντιγονικών επιτόπων που συμμετέχουν στην αντίδραση των μιτοχονδρίων με τους διαφορετικούς ορούς ασθενών με PBC.

Ο ορός που τελικά επιλέχθηκε (LH) έδωσε μια σχεδόν κάθετη καμπύλη isofixation στα περίσσεια του ανιχνεύσιμου αντιγόνου σε ένα ευαίσθητο επίπεδο. Το δείγμα είχε ληφθεί από μια γυναίκα ασθενή ηλικίας 51 ετών η οποία είχε αποφρακτικό ίκτερο για 3 έτη και στην οποία η πρωτοπαθής χολική κίρρωση είχε διαγνωστεί με σφηνοειδή βιοψία που λήφθηκε κατά την διάρκεια ερευνητικής λαπαροτομίας.

4.1.3.1 Προετοιμασία του ανασυνδυσασμένου PDC-E2, BCOADCE2, και OGDC-E2.

Χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυσασμένα αυτοαντιγόνα που είχαν κλωνοποιηθεί στο UC Davis και είχαν εκφραστεί στο πλασμίδιο PGEX 4T-1 (87, 312-314).

Τα πλασμίδια που εκφράζουν τους κλώνους καλλιεργούνται ολονυκτίως και στην συνέχεια, έπειτα από αραιώση 1:10 καλλιεργούνται σε φρέσκο θρεπτικό μέσο Lauria-Bertani (50 µg/ml ampicillin) εωσότου η οπτική πυκνότητα (OD) φτάσει το 0,7 με 0,8 η οποία επάγεται με την προσθήκη στην καλλιέργεια 1 mM isopropyl-β-thiogalactopyranoside και επωάζονται για 3 έως 4 ώρες στους 37°C. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται και επαναδιαλύονται σε PBS που περιέχει 1% Triton X-100 και 1% Tween 20 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) και στην συνέχεια ακολουθεί διάσπαση των κυττάρων με την χρήση υπερήχων. Το παραπάνω ομογενοποίημα φυγοκεντρείται σε 10.000 g για 15 λεπτά στους 4 °C και γίνεται συλλογή του υπερκείμενου υγρού.

Σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης πλύθηκαν 3 φορές με PBS και η πρωτεΐνη σύντηξης εκλούεται από τον ανταγωνισμό με 50 mM Tris HCl pH 8,0 που περιέχει 20 mM αναχθείσα γλουταθειόνη (Sigma, St Louis, MO). Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης καθορίστηκε με την μέθοδο Bradford και η ειδικότητα της καθαρής ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης επαληθεύτηκε με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης με μονοκλωνικά αντισώματα, συμπεριλαμβανομένων των θετικών και αρνητικών δειγμάτων ελέγχου σε όλες τις περιπτώσεις (315).

4.1.3 2 Τεχνική ανοσοαποτύπωσης για την ανίχνευση των AMA.

Καθορισμένες ποσότητες αντιγόνου, 16 µg, 30 µg και 30 µg καθαρού ανασυνδυσασμένου αντιγόνου PDC-E2, BCOADC-E2, και OGDC-E2 αντίστοιχα φορτώθηκαν σε 10% μίνι-πρωτεϊνούχα γέλη (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), ο διαχωρισμός των δειγμάτων έγινε στα 170 V για 1 ώρα, και έγινε μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ολονυκτίως (316). Εν συνεχεία οι μεμβράνες κόπηκαν σε λωρίδες και στην συνέχεια για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων επωάστηκαν με διάλυμα, το οποίο αποτελείται από 5% άπαχο γάλα για 1 ώρα και στην συνέχεια ακολούθησε επώαση με τα δείγματα σε αραιώση 1:1.000, 1:500, και 1:200 σε γάλα και

επώαση για 1 ώρα. Ακολουθεί πλύσιμο με PBS με 0.5% Tween 20 (PBS-T). Τέλος οι λωρίδες επωάζονται για 1 ώρα με IgA/G/M αίγας αντί-ανθρώπινο αντίσωμα (Zymed, South San Francisco, CA), πλένονται, και το αποτέλεσμα ανιχνεύεται σε υπόστρωμα φθορισμού Pierce Pico Luminol Fluorescent Substrate (Pierce, Rockford, IL). Γίνεται έκθεση των Blots σε φωτογραφικές μεμβράνες και οι εικόνες ψηφιοποιούνται με FluorTech 8900 gel doc system (Alpha Innotech, San Leandro, CA) το οποίο είναι εξοπλισμένο με φίλτρο χημειοφθορισμού.

4.1.4.1 ELISA για την ανίχνευση AMA

Οι Van de Water et al.(23) ανέπτυξαν μία τεχνική ενζυμικής ανοσοαπορρόφησης (ELISA) με ανασυνδυασμένο κλωνοποιημένο αντιγόνο για να προσδιορίσουν ποσοτικά τα ειδικά για την PBC αντιμιτοχονδριακά αντισώματα .

Η μέθοδος αυτή έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με επιτυχία από τους Heseltine et al.(317). Ωστόσο, σε αντίθεση με το κλωνοποιημένο αντιγόνο που χρησιμοποιήθηκε από τους Gershwin et al. (312) χρησιμοποίησαν το καθαρό σύμπλεγμα PDC που κατόρθωσαν να απομονώσουν με την τεχνική διαδοχικά βήματα διήθησης πηκτωμάτων.

Η τεχνική της ELISA είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη και ποσοτική μέθοδος για την ανίχνευση των AMA. Αυτή η μέθοδος θα έπρεπε να αντικαταστήσει τελικά τον ανοσοφθορισμό ως μέθοδος για την ανίχνευση των μιτοχονδριακών αυτοαντισωμάτων στην κλινική πρακτική.

Το 1987 οι Gershwin et al. εντόπισαν ένα cDNA κλώνο που απομονώθηκε από cDNA βιβλιοθήκη από ήπαρ αρουραίου που εξέφρασε το 70 kD M2-αυτοαντιγόνο (312).

Αυτό οδήγησε στον προσδιορισμό των 3 μεγάλων M2 αντιγόνων, όπως η υπομονάδα E2 (διυδρολιποαμιδική ακύλτρανσφεράση) του μιτοχονδριακού συμπλέγματος της 2-κετοξύ-αφυδρογονάσης (2-OADC) που όπως προαναφέραμε αποτελείται από το συγκρότημα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDC), συμπλόκου 2-κετο-γλουταρικής αφυδρογονάσης (OGDC-E2) και του συμπλόκου 2-κετοξυ αφυδρογονάσης με διακλαδούμενη αλυσό (BCOADC-E2) (233, 318). Ένα τέταρτο αντιγόνο προσδιορίστηκε τότε

το οποίο είναι γνωστό ως πρωτεΐνη X ή δεσμευτική πρωτεΐνη της αφυδρογονάσης (E3BP) (319). Αυτό βρέθηκε να έχει διασταυρούμενη αντίδραση με τον επίτοπο των AMA της υπομονάδας E2 του συμπλέγματος της PDC (319, 320).

4.1.4.2 MIT-3 (recombinant proteins containing PDC-E2, BCOADC-E2, OGDC-E2), ELISA.

Ενενήντα-έξι οπών πλάκες ELISA επιστρώθηκαν με MIT3 αντιγόνο σε συγκέντρωση 2 µg/µl και επωάστηκαν ολονυκτίς. Έγινε κάλυψη των μη ειδικών θέσεων με 1% αλβουμίνη ορού βοοειδών σε PBS για 1 ώρα. Μετά από δύο πλύσεις με PBS-T, προστέθηκαν 100µl ορού σε αρραίωση 1:200 σε PBS και επωάστηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Οι πλάκες πλύθηκαν τρεις φορές με PBS-T, και επωάστηκαν με αντίσωμα αίγας αντί-IgA/G/M έναντι ανθρώπου (Zymed, South San Francisco, CA). Μετά από τέσσερις πλύσεις με PBS-T, προστέθηκαν 100µl ABTS, υπόστρωμα λύσης υπεροξειδάσης (KPL, Gaithersburg, MD) σε κάθε οπή. Μετά την ανάπτυξη του χρώματος, έγινε η επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε αναγνώστη μικροπλακών (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

4.1.5 Μέθοδος με την χρήση σφαιριδίων.

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν αρκετοί τρόποι για να ανιχνευτούν τα AMA, εν τούτοις υπάρχει ένα 5% περίπου των ασθενών που είναι αρνητικοί για τα AMA, αλλά σύμφωνα με τους Oertelt, S et al (316) ανάμεσα σε αυτό το 5% υπάρχει ένα ποσοστό που είναι ψευδώς αρνητικοί, γι' αυτό δημιούργησαν αυτή την τεχνική για να μειωθεί το ποσοστό των ψευδών αρνητικών για AMA, ασθενών.

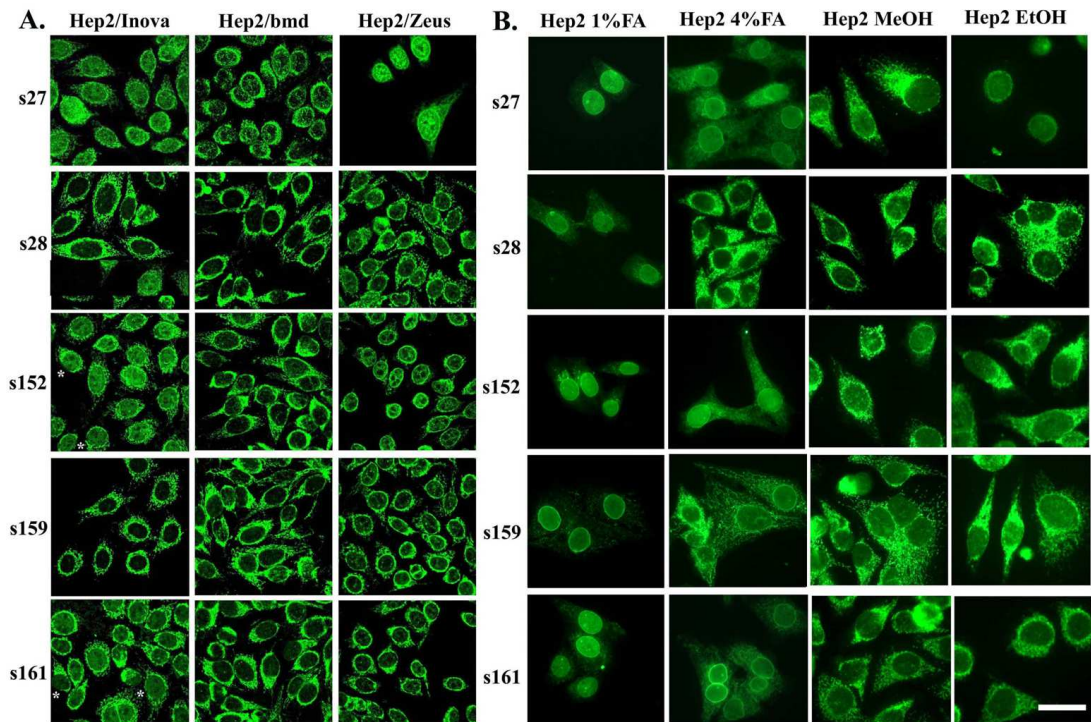
LiquiChip beads αγοράστηκαν από την Qiagen (Valencia, CA) και έγινε σύζευξη των πρωτεϊνών με τα ενεργοποιημένα σφαιρίδια σε συγκέντρωση 0.2 µg/µl. Πρώτον, για να αξιολογήσουν την εγκυρότητα της μεθόδου και τα αρχικά αποτελέσματα του φθορισμού, χρησιμοποίησαν ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των μιτοχονδριακών αντιγόνων (315, 321), θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες εξετάστηκαν εις διπλούν ή εις τετραπλούν. Μετά την επικύρωση της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν οροί ασθενών με PBC σε

αραιώσεις $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$, $1:10^{-5}$, and $1:10^{-6}$ σε Blotto blocker (Pierce, Rockford, IL) και προστέθηκαν στο διάλυμα με τα σφαιρίδια (1.250 σφαιρίδια/10μl). Όλα τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν εις διπλούν, πολλά δε από αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα ως μάρτυρες. Τα δείγματα επωάστηκαν για 2 ώρες υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Οι πλάκες πλύθηκαν 3 φορές με PBS-Tween και επωάστηκαν με βιοτίνη -Sp-συζευγμένο αντίσωμα αίγας έναντι ανθρώπινων αντί IgA/G/M (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) για 45 λεπτά. Οι πλάκες, στην συνέχεια πλύθηκαν ξανά και επωάστηκαν με στρεπταβιδίνη συζευγμένη με R-φυκοερυθρίνη (Caltag, Burlingame, CA) για 30 λεπτά στο σκοτάδι. Οι πλάκες πλύθηκαν μια φορά και τα beads επαναδιαλύθηκαν σε PBS-Tween και διαβάστηκαν σε Luminex 100 αναγνώστη (Luminex Corp, Austin, TX). Γνωστοί θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες προστέθηκαν σε κάθε πλάκα.

4.2 Μέθοδοι ανίχνευσης αντιπυρηνικών αυτοαντισωμάτων

Υπάρχουν δύο χαρακτηριστικές μορφές πυρηνικής χρώσης στον ανοσοφθορισμό (καλύτερα περιγράφονται χρησιμοποιώντας κύτταρα Hep2 και όχι το μπλοκ που αποτελείται από διάφορους τύπους ιστών όπως χρησιμοποιούνται στον ανοσοφθορισμό για την ανίχνευση των AMA) οι οποίες έχουν περιγραφεί στην PBC, ένας δίνει μια μεμβρανική χρώση - περιπυρηνική (ANEA) και η άλλη χρώση είναι αυτή των multiple nuclear dots (MND).

Όπως προκύπτει από κάποιες μελέτες και όπως φαίνεται και στην Εικόνα 7 (322) , η καλύτερη τεχνική για την ανίχνευση των ANA στην PBC παραμένει ο ανοσοφθορισμός χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα κύτταρα Hep2 (322, 323).



Εικόνα 7. Ανοσολογική χρώση των κυττάρων Hep2 με ορούς PBC. Εμπορικά διαθέσιμα Hep2 κύτταρα (A) και Hep2 κύτταρα καλλιεργημένα στο εργαστήριο (B), φιξαρισμένα με μεθανόλη, αιθανόλη, 1% ή 4% φορμαλδεΐδης έπειτα από χρώση με ορούς 27, 28, 152, 159 και 161 σε αραιώση 1/80, Bar = 20 μ m.

4.2.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός (IF) για την ανίχνευση των ANA

ANA ανιχνεύθηκαν σε αραιώση $\geq 1/100$ σε τομές ήπατος αρουραίου αποξηραμένες στον αέρα. Τα αντισώματα αποκαλύφθηκαν είτε με σεσημασμένα με φθορίζουσα ουσία IgG προβάτου έναντι ανθρώπινων Ig (Institut Pasteur, Παρίσι), ή με IgG κουνελιού έναντι ανθρώπινων βαρέων και ελαφρών αλυσίδων των Ig (Dako, Kobenhaven).

Θετικοί οροί, δίνοντας ένα δαχτυλιδοειδή πυρηνικό φθορισμό, μελετήθηκαν περαιτέρω χρησιμοποιώντας 2 διαφορετικά είδη κυττάρων, κύτταρα HeLa καλλιεργημένα σε καλυπτρίδες και ανθρώπινα κύτταρα T από λεμφοβλαστοειδή κυτταρική σειρά (KE 37). Και οι δύο τύποι κυττάρων έχουν μονιμοποιηθεί για 6 λεπτά σε παγωμένη μεθανόλη. Ο φθορισμός έγινε χρησιμοποιώντας τους ορούς σε αραιώση 1/100.

4.2.2 Ανοσοκατακρήμνιση (Immunoprecipitation)

Κύτταρα HeLa καλλιεργημένα σε απλή στοιβάδα είχαν σημανθεί με ραδιενεργό ισότοπο για 16 ώρες με 0,2 mCi/ml [³⁵S]-μεθειονίνη σε θρεπτικό μέσο RPMI-1640 χωρίς μεθειονίνη που περιέχει 10% ορό μόσχου, στη συνέχεια πλύθηκαν τρεις φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (150 mM NaCl, 10 mM φωσφορικό νάτριο, pH 7,4).

Όλα τα επόμενα βήματα έγιναν στους 4°C. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας ξέστρο, επώαστηκαν για 6 λεπτά σε 1 mM Tris pH 8,0, στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν γρήγορα σε ρυθμιστικό διάλυμα TNM (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂) που περιέχει 1 mM PMSF, 5 mM ιωδιοκεταμίδιο και αναστολείς πρωτεασών (1 µg / ml leupeptin, 1 µg / ml pepstatin, 100, µg / ml aprotinin). Τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν με ομογενοποιητή Dounce και το ομογενοποίημα ρυθμίστηκε σε διάλυμα 5 mM MgCl₂ και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 900 g με ρότορα Beckman, JS13 περνώντας μέσα από ένα στρώμα που αποτελείται από 30% σακχαρόζη στο ίδιο μέσο, ώστε να προκύψει μία στοιβάδα πυρήνων.

Οι πυρήνες επαναδιαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα DOC (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 2 mM EDTA, 0 1% SDS, 0 5% NP40, 0,5% DOC), διασπάστηκαν με υπέρηχο, στη συνέχεια προστέθηκαν 100 µg/ml απροτινίνη και 5 mM ιωδιοακεταμίδιο. Μετά από 15 λεπτά επώασης φυγοκεντρήθηκαν σε 10.000 g για 15 λεπτά, ποσότητες του υπερκείμενου υγρού που περιέχει 15×10^6 ct/min επώαστηκαν ολονυχτίως σε αραιώση 1/50 με τον ορό ασθενών ή ατόμων ελέγχου.

Τα δείγματα προστέθηκαν στη συνέχεια σε 30 µl πρωτεΐνης A-Sepharose 4B και επώαστηκαν υπό ανάδευση για 2 ώρες στους 4°C, στην συνέχεια πλύθηκαν τέσσερις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα DOC και μια φορά με απεσταγμένο νερό. Τα beads θερμάνθηκαν σε θερμοκρασία βρασμού για 3 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα SDS και οι πρωτεΐνες που προέρχονται διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση.

Ο διαχωρισμός έγινε χρησιμοποιώντας 7,5% πηκτή πολυακρυλαμιδίου σύμφωνα με τον Laemmli (324). Το αποτέλεσμα ανιχνεύεται με φθοριογραφία σύμφωνα με τη μέθοδο των Bonner & Laskey (325).

Τα κύτταρα KE 37 είχαν σημανθεί με ισότοπο για 6 ώρες με 1 mCi/ml [³⁵S]-μεθειονίνης στο ίδιο μέσο καλλιέργειας όπως και τα κύτταρα HeLa. Έπειτα από πλύσιμο με PBS τα κύτταρα μεταφέρθηκαν στο ρυθμιστικό διάλυμα TNM και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και για τα κύτταρα HeLa. Μετά το στάδιο της φυγοκέντρωσης ελήφθηκαν οι πυρήνες, το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε για ακόμη 30 λεπτά σε 300.000 g σε TLA-100. ρότορα (Beckman) ώστε να προκύψει μια στοιβάδα από μεμβράνες (P300), ενώ στο υπερκείμενο βρίσκεται το κυτταρόπλασμα (S 300) το οποίο αμέσως κατακρημνίζεται σε 90% παγωμένη μεθανόλη και συλλέγεται έπειτα από φυγοκέντρωση.

Και οι τρεις στοιβάδες (πυρήνες, P 300, S 300) επαναδιαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα DOC και η επεξεργασία για διαλυτοποίηση και ανοσοκατακρήμιση έγινε όπως περιγράφεται και για τα κύτταρα HeLa .

4.2.3 Ανοσοαποτύπωση

Πυρήνες ήπατος αρουραίου παράχθηκαν σύμφωνα με τους Blobel & Potter (326). Οι πυρηνικοί φάκελοι ελήφθησαν έπειτα από πέψη των πυρήνων με DNAase I και RNAase A και ακολούθησε απομόνωση με 1 M NaCl (327).

Οι πυρηνικοί φάκελοι επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα SDS, έγινε διάσπαση τους με υπέρηχο, κατακρημνίστηκαν σε 90% παγωμένη μεθανόλη, επαναδιαλύθηκαν και έβρασαν για 3 λεπτά σε διάλυμα SDS και στην συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% πηκτή πολυακρυλαμίδης (324). Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε νιτροκυτταρίνη με ηλεκτροφόρηση (328, 329).

Οι ακινητοποιημένες πρωτεΐνες επώασθησαν με ορό ασθενών, ατόμων ελέγχου ή με δύο προηγουμένως χαρακτηρισμένους ορούς ειδικούς είτε για Λαμίνες A και C ή Λαμίνη B (330) και ακολούθησε επώαση με συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση IgG έναντι ανθρώπου και το αποτέλεσμα ανιχνεύτηκε με το σύστημα protoblot immunoblotting (Promega, Madison, USA).

4.2.4 Ηλεκτρονική μικροσκοπία

Κύτταρα HeLa που καλλιεργούνται σε καλυπτρίδες επωάζονται για 1 λεπτό με 0,15% Triton X 100 (v / v) σε ρυθμιστικό διάλυμα HTEM (45 mM Hepes-NaOH, pH 6,9, 45 mM Pipes -NaOH, pH 6,9, 10 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 1

mM PMSF) και έπειτα πλένονται με PBS. Στην συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιούνται με 2% (w / v) παραφορμαλδεΐδη, 0,05% (v / v) γλουταραλδεΐδη σε PBS για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Η δράση της γλουταραλδεΐδης σταματάει με δύο πλυσίματα διαλύματος 50 mM NH₄Cl σε PBS για 15 λεπτά το καθένα, ακολουθεί επώαση σε διάλυμα PBS που περιέχει 0,05% (w / v) σαπωνίνης για 30 λεπτά. Στην συνέχεια γίνεται επώαση με τον ορό των ασθενών διαλυμένων σε PBS που περιέχει 0,05% σαπωνίνη και 0,2% ζελατίνη, σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, ακολουθεί επώαση με τμήματα Fab έναντι-ανθρώπινα IgG συζευγμένα με υπεροξειδάση (Institut Pasteur Production)

Μετά το πλύσιμο παρουσία σαπωνίνης, τα κύτταρα επαναμονιμοποιούνται με γλουταραλδεΐδη 2,5% σε 0,1 M cacodylate buffer, pH 7,3, πλένονται σε cacodylate buffer, επωάζονται σε μέσο που περιγράφεται από τους Graham & Karnovsky (331) για 10 λεπτά στο σκοτάδι. Μονιμοποιούνται σε 2% (w / v) OsO₄ σε cacodylate buffer, αφυδατώνονται σε αιθανόλη και ενσωματώνονται σε Epon. Τμήματα παράλληλα προς το επίπεδο των μονοστρωμάτων εξετάζονται με Philips 201 ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

4.2.5 1 Ενζυμική ανοσοπροσρόφηση (ELISA)

Οι 96 οπές μιας πλάκας πολυστυρενίου με επίπεδο πυθμένα (Maxisorp, Nalge Nunc International, Denmark) επικαλύφθηκαν με 100 μl, συγκεντρώσεως 5 μg / ml καθαρού gp210 C- terminal πεπτιδίου, το οποίο ήταν διαλυμένο σε 0,1 M ανθρακικού ρυθμιστικού διαλύματος, pH 9,6.

Οι πλάκες επώασθηκαν στους 4°C για 24 ώρες, ακολούθησε περαιτέρω δώρη επώαση με 100 μl PBS που περιέχει 1% BSA. Οι πλάκες στέγνωσαν σε θερμοκρασία δωματίου και να αποθηκεύτηκαν στους 4°C μέχρι τη χρήση. Στη συνέχεια προστέθηκαν 100 μl κάθε ορού σε κάθε οπή, σε αραιώση 1:100 σε PBS που περιέχει 0,05% v / v Tween 20, επώαστηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα ακολούθησε πλύσιμο τέσσερις φορές με PBS-Tween 20. Η βέλτιστη αραιώση του συζευγμένου με υπεροξειδάση έναντι-ανθρώπου IgG (Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan) προστέθηκε σε κάθε οπή και επώαστηκε για 1 ώρα. Έπειτα από πλύσιμο τέσσερις φορές με PBS-Tween 20, προστέθηκαν 100 μl διάλυμα

υποστρώματος το οποίο περιέχει 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine και H₂O₂ σε κάθε οπή.

Μετά από επώαση 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, η αντίδραση διακόπηκε με την προσθήκη 100 μl 0,5 M H₂SO₄ και αναλύθηκε η οπτική πυκνότητα στα 450 nm χρησιμοποιώντας ένα αυτόματο plate reader (MPRA4i, TOSO, Japan). Οι τίτλοι αντισωμάτων υπολογίστηκαν με αναφορά στο πρότυπο ορό, ο οποίος είχε αραιωθεί σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις (200, 100, 50 και 0 μονάδες / ml) (282).

4.2.5.2 Σύνθεση πεπτιδίων

Το ανθρώπινο gp210 C- terminal πεπτίδιο, ένα εικοσιπενταμερές με την ακόλουθη ακολουθία, SPNALPPARKASPPSGLWSPAYASH, συντέθηκε με συνθέτη πεπτιδίων (Model 432A Synergy, Applied Biosystems, Fostercity, CA) που χρησιμοποιεί F-moc χημεία (221). Το πεπτίδιο καθαρίστηκε με HPLC αντίστροφης φάσης, και η συνακόλουθη καθαρότητα ήταν μεγαλύτερη από 90%, όπως προσδιορίζεται από την ανάλυση HPLC.

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ

Αν και τα αντιμιτοχονδριακά αυτοαντισώματα (AMA), που είναι ειδικά για τη νόσο, ανιχνεύονται σε ποσοστό άνω του 95% των ασθενών με πρωτοπαθή χολική κίρρωση εν τούτοις δεν σχετίζονται με την πορεία της νόσου (176, 228). Σε αντίθεση με τα AMA, τα αυτοαντισώματα έναντι των κεντρομεριδίων (ACA) και τα αυτοαντισώματα έναντι του πυρηνικού φακέλου (ANEA) τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των αντιπυρηνικών αυτοαντισωμάτων (ANA) και ανιχνεύονται σε ποσοστό 20-50% φαίνονται να συσχετίζονται με την βαρύτητα της νόσου (283, 332).

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι :

- Ο προσδιορισμός της συχνότητας εμφάνισης, στους ορούς ασθενών με PBC, αυτοαντισωμάτων που αναγνωρίζουν αντιγόνα του πυρηνικού φακέλου.
- Στην διερεύνηση της σημασίας της συχνότητας εμφάνισης αυτών των αυτοαντισωμάτων, στην διάγνωση, πρόγνωση και κλινική πορεία των ασθενών με PBC
- Δημιουργία βάσης δεδομένων των ασθενών, όπου αναγράφονται τα κλινικό-εργαστηριακά στοιχεία, ιστολογικά χαρακτηριστικά καθώς και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.
- Προσδιορισμός του είδους των κυττάρων που αποτελούν στόχο των αυτοαντισωμάτων που περιέχονται σε ορούς ασθενών.

2. ΥΛΙΚΑ

2.1 Υλικά κυτταροκαλλιιεργειών

Για τον εντοπισμό περιπυρηνικού φθορισμού χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα κύτταρα **Hep2**, τα οποία προέρχονται από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (ECACC 86030501).

Χρησιμοποιήθηκαν **καλλιιεργητικές φλάσκες και αναλώσιμα πλαστικά καλλιιεργειας** από την Corning Inc και την Nalge Nunc International και **τα καλλιιεργητικά υλικά MEM (31095-029), HBSS(14170-088), Trypsin/ EDTA (25200-056), Penicillin/Streptomycin (15140-122), Foetal Bovin Serum (10108-165) και MEM non essential aminoacids (11140-035)** από την Gibco.

2.2 Υλικά ανοσοφθορισμού

Nova Lite™ (IFA) ANA plus Mouse Kidney & Stomach (708150) αγοράστηκε από την Inova diagnostics, San Diego CA, Inc

PBS tablets (18912-014) από την Gibco

Gelatin from cold water fish skin (G7765) αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich

Glycine (G8898), MgCl₂ (M8266) και Triton –X (X100) από την Sigma-Aldrich

UltraCruz™ Mounting Medium (sc-24941) από την Santa Cruz Biotechnology, Inc.

IgG-FITC (AP112F): Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας έναντι ανθρώπου συζευγμένο με FITC από την Chemicon.

IgM-FITC (F005801): Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι ανθρώπου συζευγμένο με FITC από την Dako.

Καλυπτρίδες 24 x 24 mm από την Citoglas

To-pro-3 iodide (642/661) 1mM solution in DMSO (T3605) από την Invitrogen

Glycergel Mounting medium (C0563) από την DakoCytomation, Inc

2.3 Υλικά για εγκλεισμό και αποπαραφίνωση ιστών

Πλάκες αντικειμενοφόρες Superfrost plus (J1800AMNZ) καλυπτρίδες 24 x 60 mm (BB022060A1) από την Menzel-Gläser, Germany

Tris (A1086) από την Applichem

Tri-sodium citrate 2 hydrate (131655) και Citric acid 1-hydrate (131018) από την Panreac

Ξυλόλη (108685), Αιθανόλη (818760) και Φολμαδεΰδη (104003) από την Merck

Παραφίνη (18393) αγοράστηκε από την Parapast® Plus

2.4 Προσδιορισμός της gp210 με ELISA

ELISA kits Quanta lite™ gp210 (708995) από την Inova diagnostics, San Diego CA, Inc

2.5 Διαλύματα

PBS (Phosphate Buffered Saline): Διαλύουμε ένα δισκίο σε 500 ml απεσταγμένου ύδατος και στην συνέχεια φιλτράρουμε με διηθητικό φίλτρο (Corning) και φυλάσσουμε στους 4°C.

TBS (Tris Buffered Saline): Το διάλυμα αποτελείται από 50mM Tris και 150 mM NaCl και το pH ρυθμίζεται στο 7,6 με σταγόνες πυκνού HCl.

Blocking buffer: αποτελείται από 2 mM MgCl₂, 1,1% Fish skin gelatine, 0,2% Triton-X διαλυμένα σε PBS.

Citrate Buffer: παρασκευάζεται με 1,8mM κιτρικό οξύ και 8,2 mM κιτρικό νάτριο.

Quench: αποτελείται από 20mM Glycine και ο διαλύτης είναι το PBS.

IgG-FITC: την ημέρα της δοκιμής γινόταν αραιώση 1/500 σε blocking buffer

IgM-FITC: την ημέρα της δοκιμής γινόταν αραιώση 1/100 σε blocking buffer

To-pro: την ημέρα της δοκιμής γινόταν αραιώση 1/1000 σε blocking buffer

Minimum Essential Medium (MEM) εμπλουτισμένο με 1% με Non Essential aminoacids (Gibco), διάλυμα 100U/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco) και εμπλουτισμένο με 10% απενεργοποιημένο ορό εμβρύου βόειου (FBS) χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των κυττάρων.

Φορμαλδεΰδη: Παρασκευάζονταν διάλυμα 1% και 4% από φορμαλδεΰδη 37% σε PBS την ημέρα της χρώσης των κυττάρων

Αιθανόλη: Για την αποπαραφίνωση των τομών χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης (100%, 96%,80% και 70%).

3. ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Από τον Ιανουάριο του 1989 έως τον Ιούνιο του 2009, έγινε διάγνωση της νόσου σε 232 ασθενείς που παρακολουθούνται στη Γαστρεντερολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, Κρήτης. Οι ασθενείς στους οποίους είχε γίνει αιμοληψία και για τους οποίους υπήρχε ορός (-80°C) την στιγμή της διάγνωσης, είχαν αρνητικούς δείκτες ιογενούς ηπατίτιδας και οι οποίοι έδωσαν την συγκατάθεση τους συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Νοσοκομείου. Τα κριτήρια αυτά τα πληρούν 147 ασθενείς που τελικά συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη (Πίνακας 1). Οι ασθενείς αυτοί παρακολουθήθηκαν για μια περίοδο από 1-240 μήνες ($96,1 \pm 55,8$ μήνες, διάμεσος 89,5 μήνες) έπειτα από την αρχική διάγνωση της PBC. Την στιγμή που έγινε η συλλογή των ορών 19 (12,9%) ασθενείς ήταν AMA αρνητικοί και 128 (87,1%) ήταν AMA θετικοί με την μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Είκοσι δύο ασθενείς (15%) ήταν άρρενες και 125 (85%) θήλεις. Ο μέσος όρος ηλικίας την στιγμή της διάγνωσης κυμαίνεται $59,2 \pm 10,9$ έτη (διάμεσος 60, ακραίες τιμές 31-80 έτη). Σύμφωνα με τα κριτήρια του Ludwig, κατά την διάγνωση, 97 (66%) ασθενείς βρίσκονταν στο στάδιο I-II και 50 (34%) στο στάδιο III-IV. Ο μέσος όρος του Mayo risk score κατά την διάγνωση ήταν $5,1 \pm 1,6$. Όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ουρσοδεοξυχολικό οξύ (UDCA) σε δόση 13-15 mg / kg, έπειτα από τη συλλογή του ορού.

Άλλα συνυπάρχοντα αυτοάνοσα νοσήματα ήταν: σύνδρομο Sjogren σε 12 ασθενείς, φαινόμενο Raynaud σε 2, ψωρίαση σε 1, σαρκοειδωση σε 1, δισκοειδής ερυθρηματώδης λύκος σε 1, αυτοάνοση ατροφική γαστρίτιδα σε 2 και λεύκη σε 1.

Κατά την διάρκεια της μελέτης 14 ασθενείς ανέπτυξαν κίρσους οισοφάγου, 15 ασκίτη, 2 ηπατική εγκεφαλοπάθεια και 6 ηπατοκαρκίνωμα. Τέσσερις ασθενείς έκαναν μεταμόσχευση ήπατος. Τριάντα ασθενείς πέθαναν κατά την διάρκεια της μελέτης (ο θάνατος πέντε ασθενών δεν οφείλονταν στην νόσο και τρεις πέθαναν τον πρώτο μήνα της διάγνωσης). Οι υπόλοιποι 117 ζουν και παρακολουθούνται ακόμα στη Γαστρεντερολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, Κρήτης.

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των ασθενών

Χαρακτηριστικά ασθενών	Αριθμός Ασθενών n = 147
Ηλικία	59,2±10,9
AMA+	128 (87,1%)
AMA -	19 (12,9%)
Στάδιο I-II	97 (66%)
Στάδιο III-IV	50 (34%)
Εν Ζωή	117 (79,6%)
Νεκροί	30 (20,4%)
Επιβίωση	97,2±53,1
Mayo risk score	5,1±1,6

4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Τα αυτοαντισώματα που βρέθηκαν συσχετίστηκαν με τα κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά, τα ιστολογικά χαρακτηριστικά που είχαν οι ασθενείς κατά την διάγνωση καθώς και την επιβίωση. Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν, περιλαμβάνουν: ίνωση (1-3) (1=μικρή, 2=μεσαία, 3=ισχυρή ή ικανή), περιπυλαία ηπατίτιδα (0-3) (0=απουσία, 1=μικρή, 2=μεσαία, 3=μεγάλη) φλεγμονή στο πυλαίο διάστημα (1-3) (1=μικρή, 2=μεσαία, 3=ικανή) ενδολοβιακή φλεγμονή (0-2) (0=απουσία, 1=μικρή, 2=μεσαία) , επιθηλιώδες κοκκίωμα (0-1) (0=απουσία, 1=παρουσία) και υπερπλασία χοληφόρων (0-1) (0=απουσία, 1=παρουσία).

4.1 Λήψη και καταγραφή υλικού

4.1.1 Δημιουργία ηλεκτρονικού αρχείου ασθενών

Δημιουργήθηκε ένα αρχείο excel όπου καταγράφονται :

- Ονοματεπώνυμο ασθενούς
- Έτος Γεννήσεως
- Έτος Διάγνωσης της νόσου
- Ηλικία κατά την διάγνωση
- Έτος βιοψίας
- Έτος θανάτου
- Φύλο
- Εν ζωή/ νεκρός
- Στάδιο
- Τίτλος AMA
- Θετικά/ Αρνητικά ANEA
- Θετικότητα ή μη για αντί-gr210
- Αίτια θανάτου
- Ρήξη αντιρρόπησης
- Πιθανά συνοδά προβλήματα
- Ιστολογικά χαρακτηριστικά

4.1.2 Ορός

Ολικό περιφερικό αίμα φυγοκεντρήθηκε σε 4000g για 20 λεπτά και ο ορός μοιράστηκε σε μικρές ποσότητες και φυλάχθηκε στους -80°C .

4.2 Κυτταροκαλλιέργειες

Ανθρώπινα κύτταρα Hep2 (καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας) χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων έναντι αντιγόνων του πυρηνικού φακέλου. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε Minimum Essential Medium εμπλουτισμένο με 10 % FBS, πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη και 1% non essential aminoacids. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε υγρή ατμόσφαιρα στον επωαστήρα στους 37°C και 5% CO_2 .

4.3 Έμμεσος ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων του ορού

4.3.1 Αντιμιτοχονδριακά Αυτοαντισώματα (AMA)

Για την ανίχνευση και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των αντιμιτοχονδριακών IgG αυτοαντισωμάτων (AMA), έγινε έμμεσος ανοσοφθορισμός χρησιμοποιώντας το kit της Nova Lite™ (IFA) ANA plus, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

4.3.2 Αυτοαντισώματα έναντι αντιγόνων του πυρηνικού φακέλου (ANEA)

Έμμεσος ανοσοφθορισμός (IIF) διεξάχθηκε για την ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι του πυρηνικού φακέλου (ANEA) όπως περιγράφεται από τους Tsiakalou V et al (322). Εν συντομία, κύτταρα Hep2 καλλιεργήθηκαν οληνυκτίς σε καλυπτρίδες και πλύθηκαν με PBS.

Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 1% και 4% φορμαλδεΐδη για 10 λεπτά. Έγινε πλύση των μονιμοποιημένων κυττάρων με PBS. Για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων τα μονιμοποιημένα κύτταρα επώαστηκαν με quench, για 5 λεπτά. Μετά το blocking με PBS που περιέχει 0.2% TritonX-100, 0.2% MgCl_2 and 1% fish skin gelatine, για 10 λεπτά, τα κύτταρα επώαστηκαν με ορό (αραίωση 1:80) σε blocking buffer για 45 λεπτά. Εν συνεχεία, οι καλυπτρίδες πλύθηκαν με blocking buffer για 10

λεπτά και επωάστηκαν με ισοθειοκυανική φθορεΐσίνη (FITC)–συζευγμένη με IgG αίγας έναντι-ανθρώπου (αραίωση 1:500), για 45 λεπτά. Τέλος, τα κύτταρα εμβαπτίστηκαν σε PBS και καλύφθηκαν με mounting medium που εμπεριέχει dapi. Όλα τα βήματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

Ο φθορισμός παρατηρήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP .

4.4 Ανίχνευση και ημιποσοτικός προσδιορισμός, στον ορό, αντισωμάτων έναντι της gp210

Για την ανίχνευση και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό, στον ορό ασθενών με PBC, αντισωμάτων gp210 χρησιμοποιήθηκε εμπορικώς διαθέσιμη ELISA της Quanta lite TM σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

4.5 Βιοψία ήπατος

Για την βιοψία ήπατος χρησιμοποιήθηκαν βελόνες τύπου Tru-Cut για να αποκτήσουμε ένα δείγμα 1 mm διαμέτρου και 1-2 cm σε μήκος.

4.6 Εγκλεισμός ιστού σε παραφίνη

Έπειτα από την βιοψία, γίνεται μονιμοποίηση του ιστού. Η μονιμοποίηση του ιστού γίνεται με υγρά που έχουν την ικανότητα να πήζουν τα λευκώματα και να καθλώνουν τα ιστικά στοιχεία. Ένα από τα μονιμοποιητικά μέσα είναι η παραφίνη. Πριν τον εγκλεισμό του ιστού στην παραφίνη γίνεται αφυδάτωση του ιστού, γιατί η παραφίνη δεν αναμιγνύεται με το νερό. Η αφυδάτωση γίνεται σε μία σειρά οινόπνεύματα 70°, 96°, και σε απόλυτο οινόπνευμα 100°. Στην συνέχεια γίνεται διαύγαση του ιστού, δηλαδή ο ιστός από αδιαφανής γίνεται ημιδιαφανής και αυτό επιτυγχάνεται με εμβάπτιση του ιστού σε ξυλόλη. Η ξυλόλη είναι ένα πτητικό υγρό που αναμιγνύεται εύκολα τόσο με την παραφίνη όσο και με την αλκοόλη. Στην συνέχεια, ο ιστός είναι έτοιμος να εγκλειστεί στην παραφίνη, αφού προηγουμένως έχουμε λιώσει την παραφίνη σε κλίβανο στους 56-58° C και την έχουμε βάλει σε πάγο για να σταθεροποιηθεί.

4.7 Αποπαραφίνωση και ενυδάτωση τομών

Τομές παραφίνης πάχους 3 μm τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες super frost και ακολουθεί αποπαραφίνωση και ενυδάτωση των τομών.

Οι ιστοί τοποθετούνται σε κλίβανο αέρος στους 40 °C ολονυκτίς και στη συνέχεια οι τομές τοποθετούνται σε δοχεία (μπανάκια) με ξυλόλη για 15 λεπτά. Ακολούθως γίνεται η ενυδάτωση των τομών σε φθίνουσες συγκεντρώσεις αιθανόλης για 5 λεπτά σε κάθε συγκέντρωση (100%, 96%, 80% και 70%). Έπειτα ξεπλένονται σε νερό βρύσης και μετά γίνεται αποκάλυψη του επίτοπου με citrate buffer σε κλίβανο αέρος στους 40°C για 2 ώρες.

4.8 Ανοσοφθορισμός σε ιστούς παραφίνης

Έπειτα από την αποκάλυψη του επίτοπου οι τομές ξεπλένονται με άφθονο νερό βρύσης και στην συνέχεια ακολουθεί ένα πλύσιμο με PBS. Εν συνεχεία, οι τομές επωάζονται για 10 λεπτά με blocking buffer. Ακολουθεί επώαση των τομών με ορό (αραίωση 1:50, σε blocking buffer) για 2 ώρες, μετά το πέρας των 2 ωρών ακολουθούν 4 πεντάλεπτες πλύσεις με blocking buffer, γίνεται ξανά επώαση με blocking buffer για άλλα 10 λεπτά και εν συνεχεία προσθέτουμε το συζευγμένο με FITC IgG (αραίωση 1:400 σε blocking buffer) ή IgM (αραίωση 1:100 σε blocking buffer) αντίσωμα για 45 λεπτά. Ακολουθούν 3 πεντάλεπτες πλύσεις με blocking buffer και 1 πλύση με PBS. Έπειτα γίνεται χρώση των πυρήνων με TO-PRO (αραίωση 1:1000 σε blocking buffer), για 5 λεπτά και στην συνέχεια πλύσιμο με PBS για 5 λεπτά. Τέλος γίνεται επικάλυψη με mounting medium που εμπεριέχει dapi. Όλες οι διαδικασίες λαμβάνουν μέρος σε θερμοκρασία δωματίου.

4.9 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως επί τις εκατό ποσοστά (%) ή ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (SD), εκτός και αν υποδεικνύονται διαφορετικά. Διαφορές ανάμεσα σε θετικούς και αρνητικούς για τα αντισώματα ασθενείς για διάφορα κλινικά, ιστολογικά και ορολογικά χαρακτηριστικά συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης. Χρησιμοποιήθηκε το Fisher's exact test για την σύγκριση των αιτιών θανάτου

μεταξύ ANEA θετικών και αρνητικών και gr-210 θετικών και αρνητικών ασθενών. Ο χρόνος επιβίωσης υπολογίστηκε με την μέθοδο Kaplan-Meier και συγκρίθηκε με το Breslow τεστ. Για την πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης μονόπλευρη τιμή $p < 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική, ενώ για την επιβίωση και το Fisher's exact test δίπλευρη τιμή $p < 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική . Η στατιστική ανάλυση έγινε με το SPSS v.15.0 και Excel 2003 software.

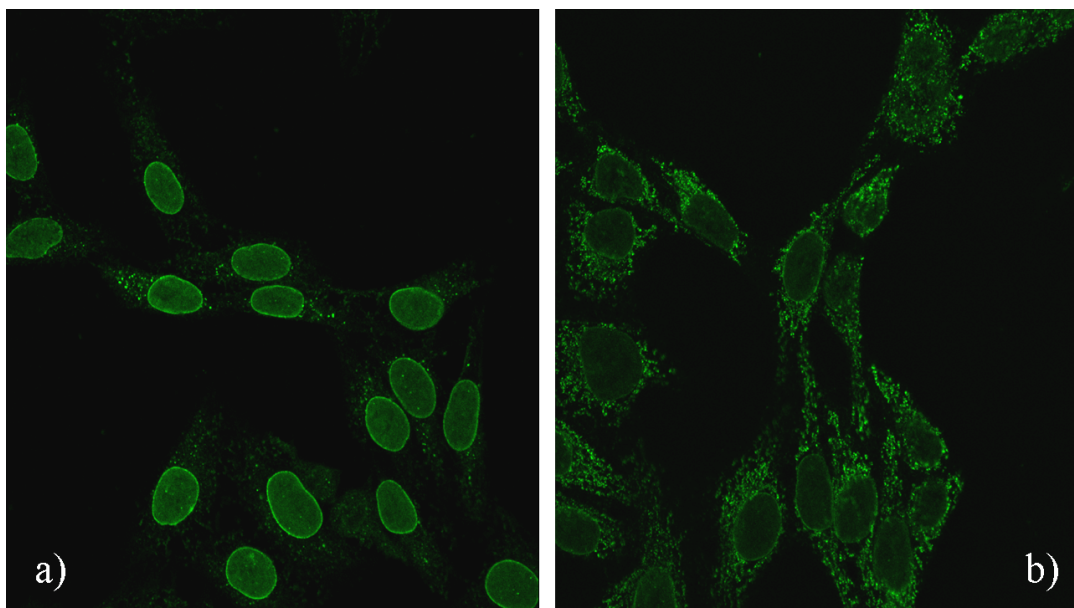
5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 ANEA θετικοί έναντι ANEA αρνητικών ασθενών

Τα ANEA ανιχνεύτηκαν με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού σε κύτταρα Her2 καλλιεργημένα στο εργαστήριο δίνοντας μία τυπική περιπυρηνική χρώση (Εικόνα 1). ANEA ανιχνεύθηκαν σε 69 (46,9%) από τους 147 ασθενείς. Οι συγκρίσεις μεταξύ ANEA θετικών και αρνητικών ασθενών φαίνονται στους (Πίνακες 2 και 3). Αν και δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στον αριθμό των ζωντανών / νεκρών μεταξύ των θετικών και αρνητικών ασθενών για τα ANEA (51 (77,3%) / 15 (22,7%) έναντι 66 (86,8%) / 10 (13,2%) NS), υπήρχε μια στατιστικής σημασίας διαφορά, στην επιβίωση μεταξύ των δύο ομάδων ($91,7 \pm 50,7$ vs $101,8 \pm 55$ μήνες, $p = 0,043$) (Πίνακας 2 και Γράφημα 1). Επιπλέον, τα αίτια θανάτου μεταξύ ANEA θετικών και αρνητικών ασθενών ήταν διαφορετικά. Οι ANEA θετικοί ασθενείς πεθαίνουν συχνότερα από ηπατική ανεπάρκεια και /ή ΗΚΚ, ενώ οι ANEA αρνητικοί ασθενείς πεθαίνουν συχνότερα από κίρσοραγία ($p=0,016$) (Γράφημα 2). Οι ασθενείς που ήταν θετικοί για τα ANEA είχαν υψηλότερους τίτλους AMA (35(50,7%)/ 34(49,3%) vs 56(71,8%)/ 22 (28,2%), $p=0,001$) (Γράφημα 3). Παρά ταύτα οι τίτλοι των AMA δεν συσχετίζονται με τη σοβαρότητα της νόσου. Πράγματι όταν εξετάστηκαν οι τίτλοι των AMA σε σχέση με την επιβίωση των ασθενών, η ανάλυση Kaplan-Meier έδωσε μια τιμή $p > 0,7$ (Γράφημα 4). Επίσης, οι θετικοί για τα ANEA ασθενείς, βρισκόταν σε προχωρημένο ιστολογικό στάδιο (39 (56,5%)/ 30(43,5%) vs 58(74,4%)/ 20(25,6%), $p=0,005$) κατά την διάγνωση (Γράφημα 5).

Υπήρξε μια σημαντική διαφορά μεταξύ ANEA θετικών και ANEA αρνητικών ασθενών σε ιστολογικά χαρακτηριστικά όπως, ίνωση, φλεγμονή στο πυλαίο διάστημα, περιπυλαία ηπατίτιδα και πολλαπλασιασμό των χοληφόρων ($p = 0,008$, $p = 0,008$, $p = 0,019$ και $p = 0,027$, αντίστοιχα). Ενώ για το επιθηλιώδες κοκκίωμα και την ενδολοβιακή φλεγμονή δεν βρέθηκε κάποια διαφορά ($p= 0,425$ και $p= 0,359$, αντίστοιχα) (Πίνακας 3). Παρά το γεγονός ότι οι ασθενείς που είναι θετικοί για τα ANEA έχουν σοβαρότερη περιπυλαία ηπατίτιδα, εν τούτοις δεν υπάρχει κάποια διαφορά στην επιβίωση των ασθενών με σοβαρή περιπυλαία ηπατίτιδα ανάμεσα σε ANEA θετικούς και ANEA αρνητικούς ασθενείς, σύμφωνα με την ανάλυση Kaplan-Meier ($101,2 \pm$

38,2 vs 105,4 ± 47,0 μήνες, $p=1,000$) (Γράφημα 6). Αλλά ούτε η περιπυλαία ηπατίτιδα από μόνη της δεν αποτελεί παράγοντα μείωσης της επιβίωσης. Πράγματι, η ανάλυση Kaplan-Meier ανάμεσα σε ασθενείς με σοβαρή περιπυλαία ηπατίτιδα (103,0 ± 41,9 μήνες) και με αρνητική ή ελαφρώς θετική περιπυλαία ηπατίτιδα (92,3 ± 61,6 μήνες) έδωσε μία τιμή $p=0,969$ (Γράφημα 7).



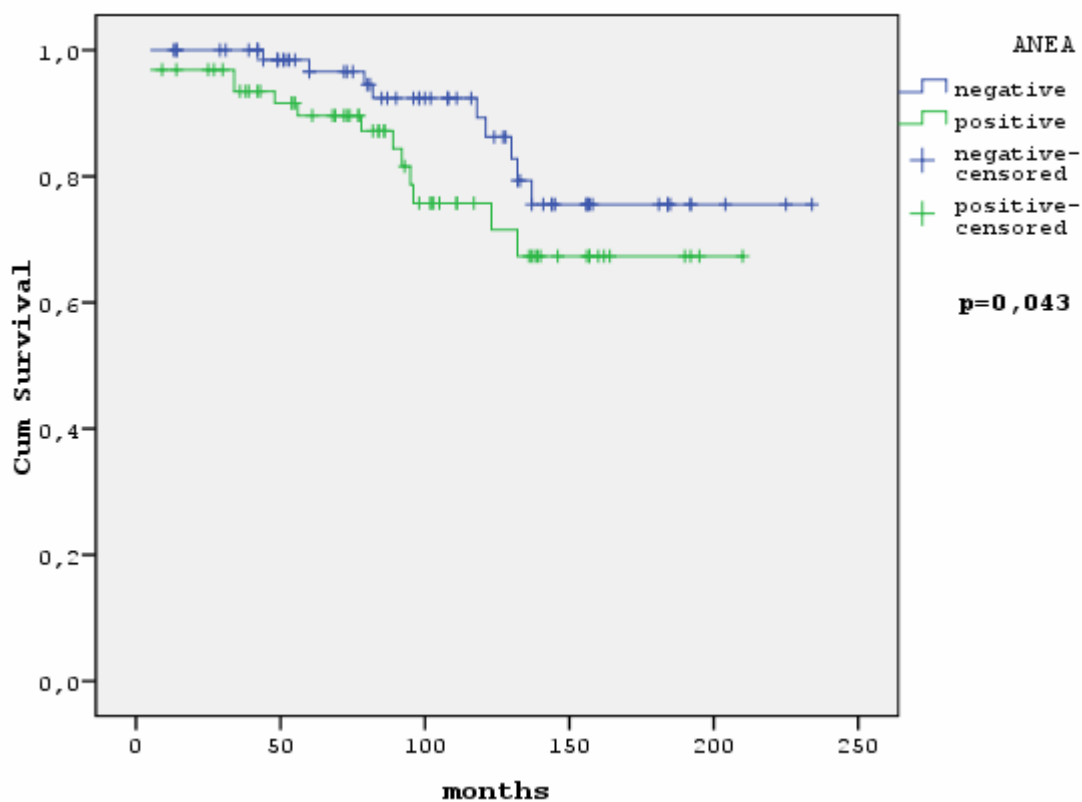
Εικόνα 1. Τυπική περί-πυρηνική χρώση όπως παρουσιάζεται από ANEA θετικούς ορούς σε κύτταρα Hep2 με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού.

(α) Τα κύτταρα έχουν μονιμοποιηθεί με 1% φορμαλδεΰδη. (β) τα κύτταρα έχουν μονιμοποιηθεί με 4% φορμαλδεΰδη.

Πίνακας 2 Σύγκριση των κλινικών παραμέτρων μεταξύ ANEA θετικών και ANEA αρνητικών ασθενών.

	ANEA		Τιμή p
	Θετικοί	Αρνητικοί	
Ασθενείς N(%)	69(46,9)	78(53,1)	
Ηλικία διάγνωσης	59,3±11,8	59,1±10,1	0,330
Τίτλος AMA ≤1:160/>1:160(%)	35(50,7)/ 34(49,3)	56(71,8)/ 22(28,2)	0,001
Στάδιο I-II / Στάδιο III-IV(%)	39(56,5)/ 30(43,5)	58(74,4)/ 20(25,6)	0,005
Ζώντες / Νεκροί (%)	51(77,3)/ 15(22,7)	66(86,8)/ 10(13,2)	0,162
Επιβίωση	91,7±50,7	101,8±55	0,043
Mayo risk score	5,19±1,8	5,04±1,3	0,239

Γράφημα 1 Kaplan-Meier επιβίωσης ανάμεσα σε ANEA θετικούς και ANEA αρνητικούς ασθενείς (p=0,043)

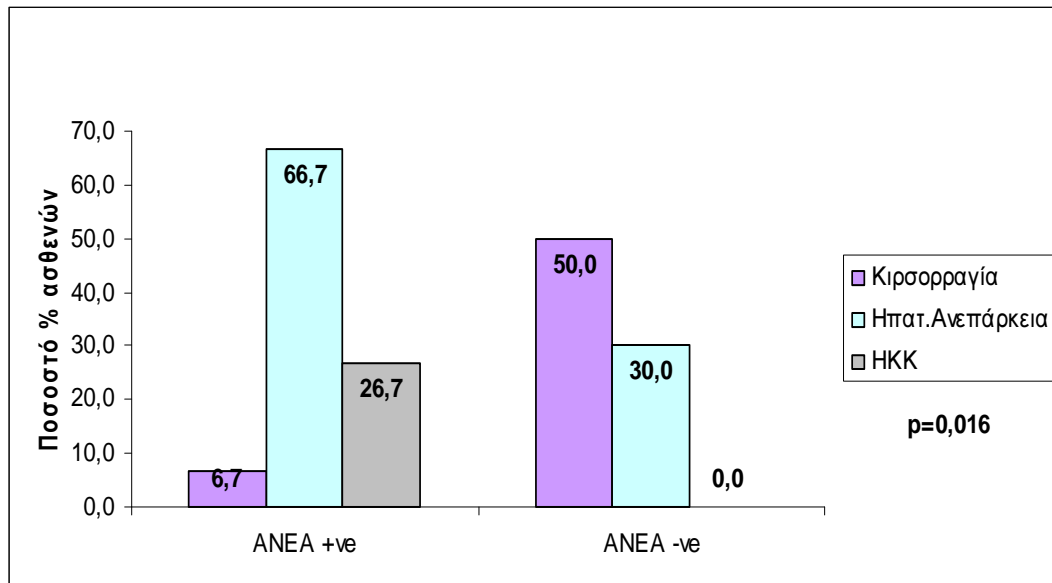


Πίνακας 3, Σύγκριση των ιστολογικών παραμέτρων μεταξύ ANEA θετικών και ANEA αρνητικών ασθενών,

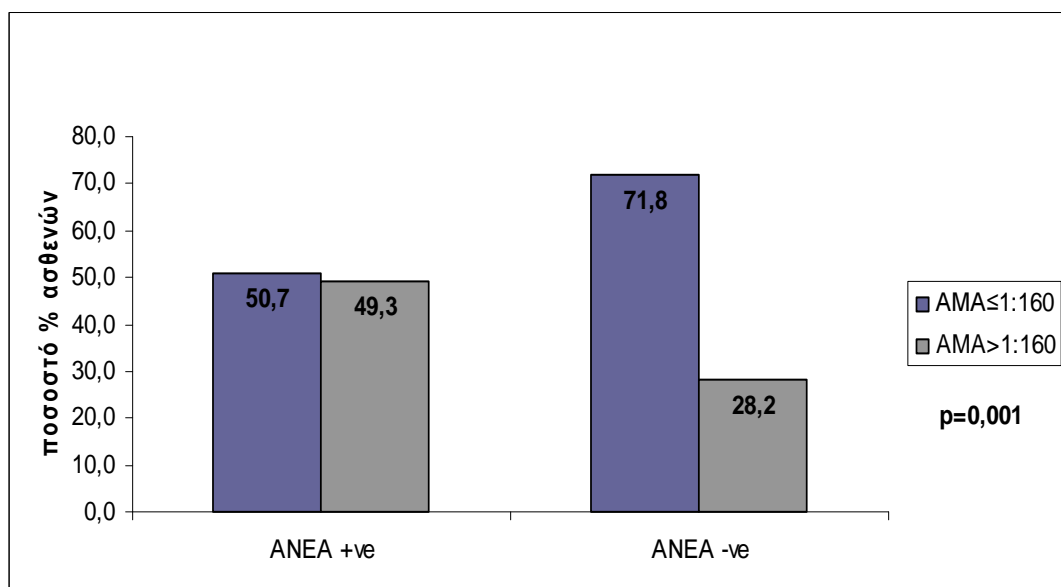
Ιστολογικά χαρακτηριστικά

		ANEA Θετικοί (n=69)	ANEA Αρνητικοί (n=78)	Τιμή p
Ίνωση	1	10(22,7%)	22(40,7%)	0,008
	2	17(38,6%)	22(40,7%)	
	3	17(38,6%)	10(18,6%)	
Φλεγμονή στο πυλαίο διάστημα	1	8(18,2%)	22(40,7%)	0,008
	2+3	36(81,8%)	32(59,3%)	
Περιπυλαία ηπατίτιδα	0+1	16(36,4%)	31(57,4%)	0,019
	2+3	28(63,6%)	23(42,6%)	
Ενδολοβιακή φλεγμονή	0	11(25%)	9(16,7%)	0,359
	1	19(43,2%)	35(64,8%)	
	2	14(31,8%)	10(18,5%)	
Πολλαπλασιασμός χοληφόρων	0	12(27,3%)	25(46,3%)	0,027
	1	32(72,7%)	29(53,7%)	
Επιθηλιώδες κοκκίωμα	0	31(70,5%)	39(72,2%)	0,425
	1	13(29,5%)	15(27,8%)	

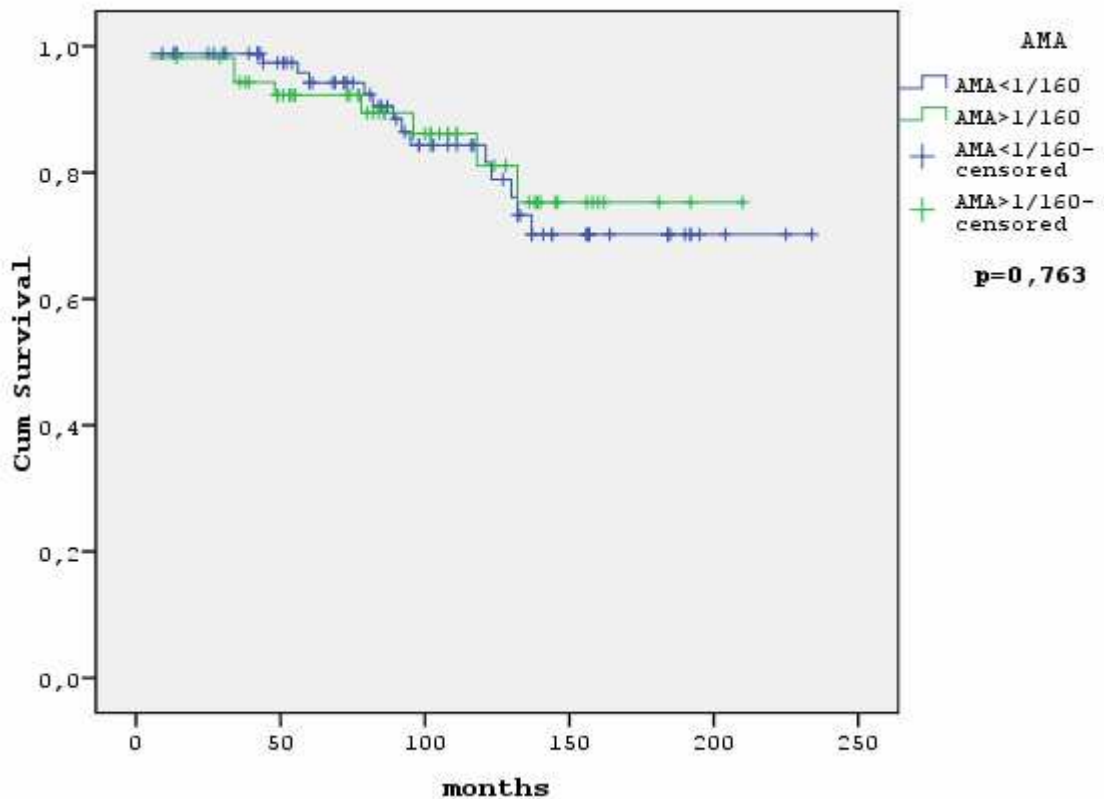
Γράφημα 2: Αιτίες θανάτου μεταξύ ANEA θετικών και ANEA αρνητικών ασθενών ($p= 0,016$).



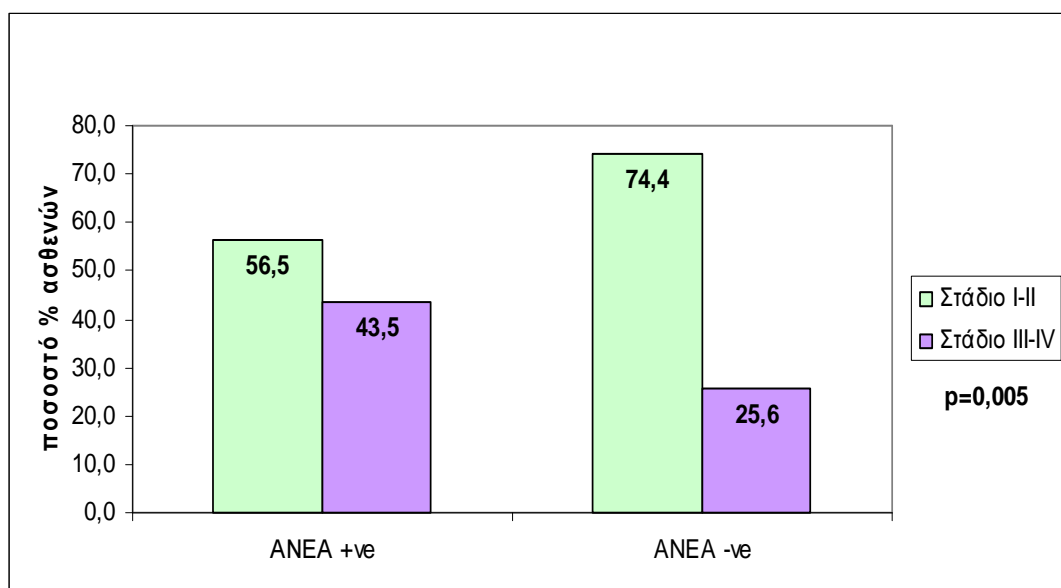
Γράφημα 3: Τίτλοι AMA μεταξύ ANEA θετικών και ANEA αρνητικών ασθενών ($p= 0,001$).



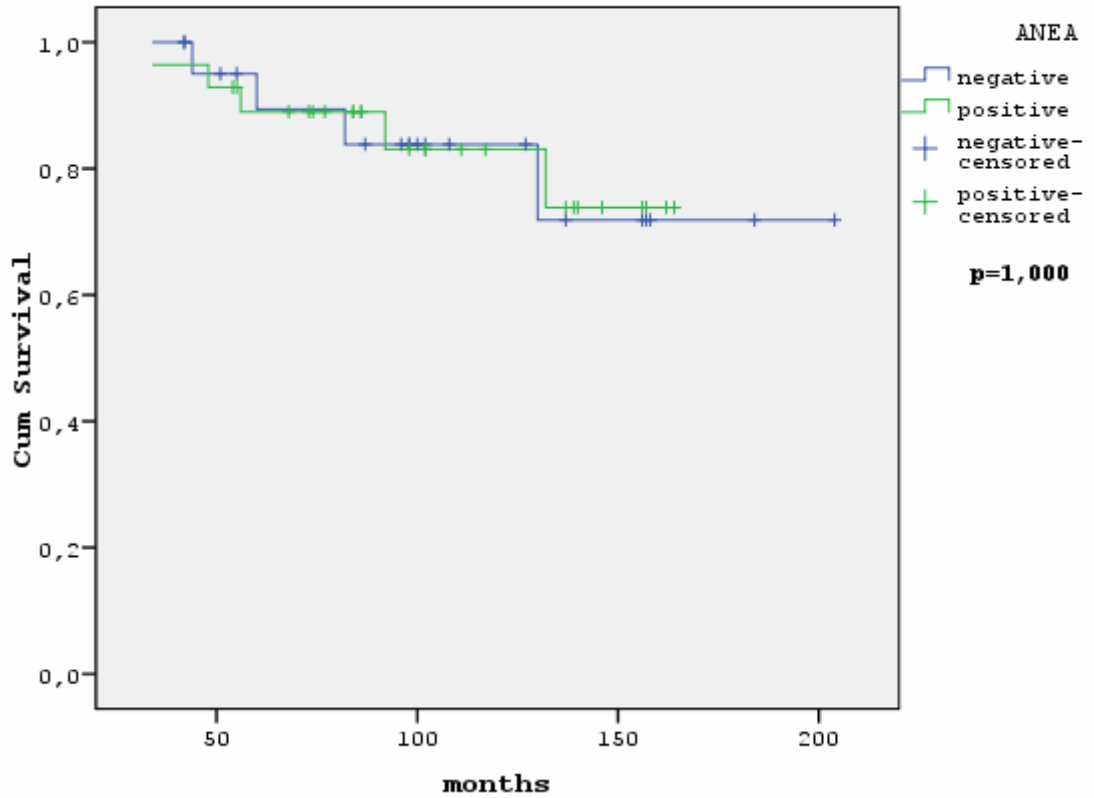
Γράφημα 4 Kaplan-Meier επιβίωσης ανάμεσα σε ασθενείς με τίτλο AMA $\leq 1:160$ και τίτλο AMA $>1:160$ ($p=0,763$)



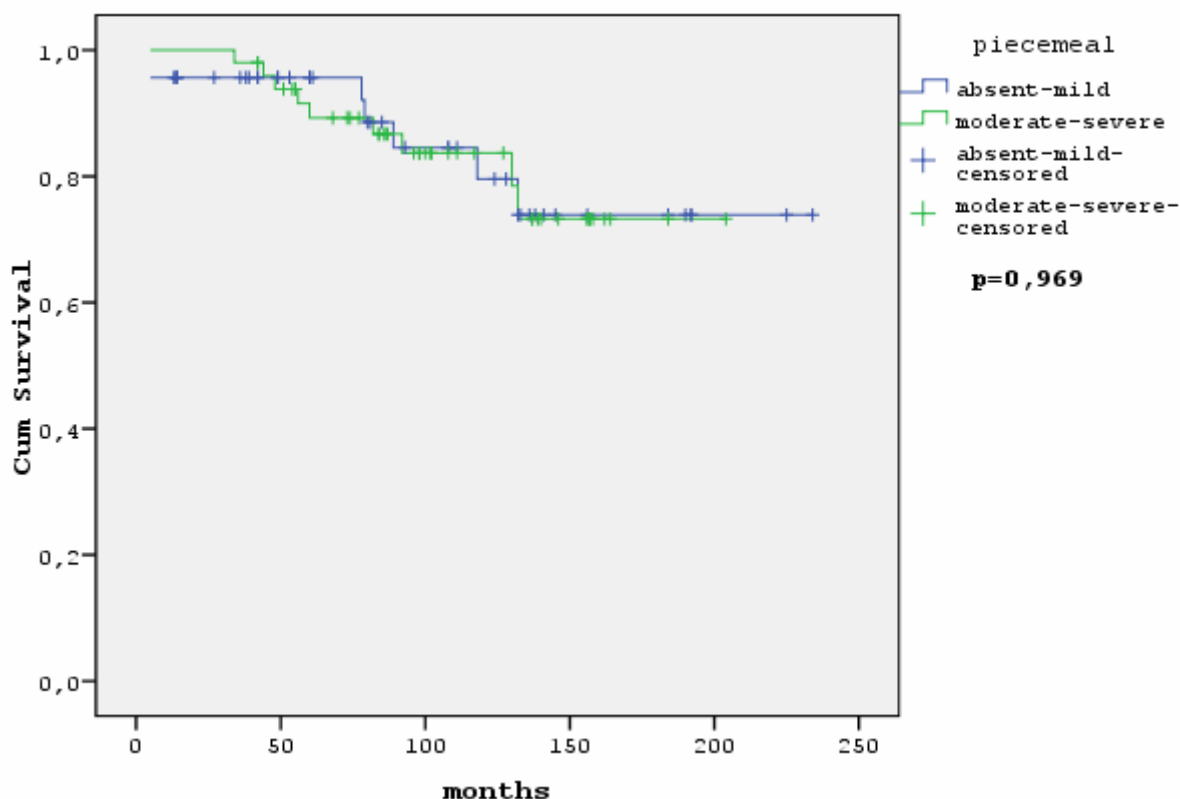
Γράφημα 5: Ιστολογικό στάδιο μεταξύ ANEA θετικών και ANEA αρνητικών ασθενών ($p= 0,005$).



Γράφημα 6: Kaplan-Meier επιβίωσης ανάμεσα σε ANEA θετικούς και ANEA αρνητικούς ασθενείς με σοβαρή περιπυλαία ηπατίτιδα ($p=1,000$).



Γράφημα 7: Kaplan-Meier ανάμεσα σε ασθενείς με σοβαρή περιπυλαία ηπατίτιδα και ασθενείς με αρνητική ή ελαφρώς θετική περιπυλαία ηπατίτιδα ($p=0,969$).



5.2 Ανίχνευση αυτοαντισωμάτων έναντι της Gr210

Δοκιμάσαμε τους 69 ANEA θετικούς ασθενείς (18 νεκροί, πέντε εκ των οποίων ο θάνατος δεν σχετίζεται με την νόσο) για την ανίχνευση των αντί-gr210 αντισωμάτων με ELISA και βρέθηκαν 38 (55,1%) αρνητικοί και 31 (44,9%) θετικοί, που αντιπροσωπεύουν το 21% του συνόλου των ασθενών που μελετήθηκαν.

5.2.1 Αντί-gr210 θετικοί έναντι ANEA θετικών ,αντί-gr210 αρνητικών.

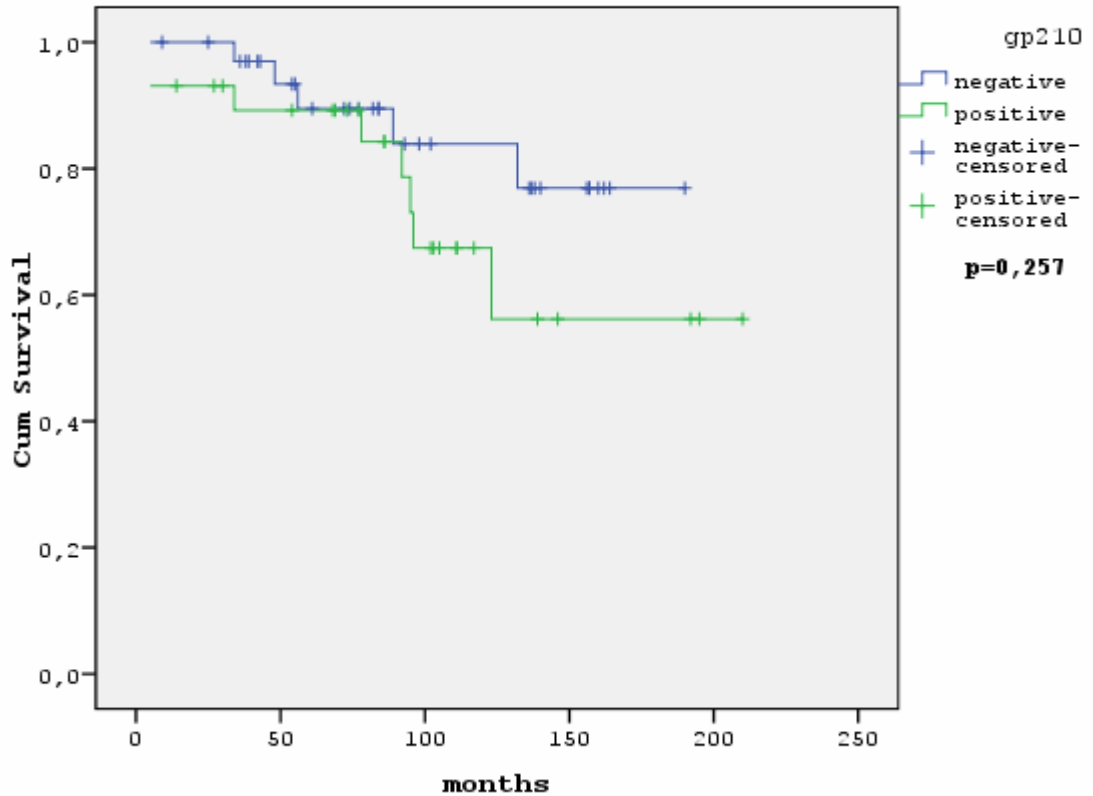
Το Mayo risk score ήταν η μόνη παράμετρος που διέφερε μεταξύ των αντί-gr210 θετικών ($n = 31$) και ANEA θετικών, αντί-gr210 αρνητικών ($n = 38$) ασθενών ($p = 0,038$) (Πίνακες 4 και 5). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων σε οποιαδήποτε από τις άλλες κλινικές, δημογραφικές, ιστολογικές παραμέτρους ή επιβίωση (μέσος όρος $91,1 \pm 52,9$ και $92 \pm 49,6$

μήνες αντίστοιχα, $p=0,257$) (Πίνακας 4 και Γράφημα 8). Όπως όμως φαίνεται από το Γράφημα 8, μετά τα 5 χρόνια φαίνεται να υπάρχει χειρότερη επιβίωση των θετικών ασθενών αν και ο αριθμός είναι μικρός και δεν επηρεάζεται η στατιστική σημαντικότητα.

Πίνακας 4 Σύγκριση των κλινικών παραμέτρων μεταξύ ANEA θετικών, gr210 θετικών και ANEA θετικών, gr210 αρνητικών ασθενών.

	ANEA θετικοί, gr210 θετικοί	ANEA θετικοί, gr210 αρνητικοί	Τιμή p
Ασθενείς N(%)	31(44,9)	38(55,1)	
Ηλικία διάγνωσης	58,7±11,3	59,8±12,3	0,479
Τίτλος AMA ≤1:160/>1:160(%)	16(51,6)/15(48,4)	19(50)/19(50)	0,361
Στάδιο I-II/Στάδιο III-IV(%)	17(54,8)/14(45,2)	22(57,9)/16(42,1)	0,264
Ζώντες / Νεκροί (%)	21(72,4)/8(27,6)	30(85,7)/5(14,3)	0,126
Επιβίωση	91,1±52,9	92,1±49,6	0,257
Mayo risk score	5,5±1,9	4,9±1,7	0,038

Γράφημα 8: Kaplan-Meier επιβίωσης ανάμεσα σε ANEA θετικούς, gp210 θετικούς και ANEA θετικούς, gp210 αρνητικούς ασθενείς ($p=0,257$)



Δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα ιστολογικά χαρακτηριστικά, μεταξύ gp210 θετικών και αρνητικών ασθενών (Πίνακας 5).

Πίνακας 5 Σύγκριση ιστολογικών χαρακτηριστικών μεταξύ ANEA θετικών, gr210 θετικών και ANEA θετικών, gr210 αρνητικών ασθενών.

Ιστολογικά χαρακτηριστικά

		ANEA θετικοί, gr210 θετικοί (n=31)	ANEA θετικοί, gr210 αρνητικοί (n=38)	Τιμή p
Ύψωση	1	3(18,8 %)	7(25,0%)	0,269
	2	9(56,2%)	8(28,6%)	
	3	4(25,0%)	13(48,4%)	
Φλεγμονή στο πυλαίο διάστημα	1	3(18,8%)	5(17,9%)	0,471
	2+3	13(81,2%)	23(82,1%)	
Περιπυλαία ηπατίτιδα	0+1	6(37,5%)	10(35,7%)	0,454
	2+3	10(62,5%)	18(64,3%)	
Ενδολοβιακή φλεγμονή	0	3(18,8%)	8(28,6%)	0,054
	1	5(31,2%)	14(50,0%)	
	2	8(50,0%)	6(21,4%)	
Πολλαπλασιασμός χοληφόρων	0	5(31,2%)	7(25,0%)	0,332
	1	11(68,8%)	21(75,0%)	
Επιθηλιώδες κοκκίωμα	0	12(75,0%)	19(67,9%)	0,314
	1	4(25,0%)	9(32,1%)	

5.2.2 Αντί-gr210 θετικοί έναντι ANEA αρνητικών

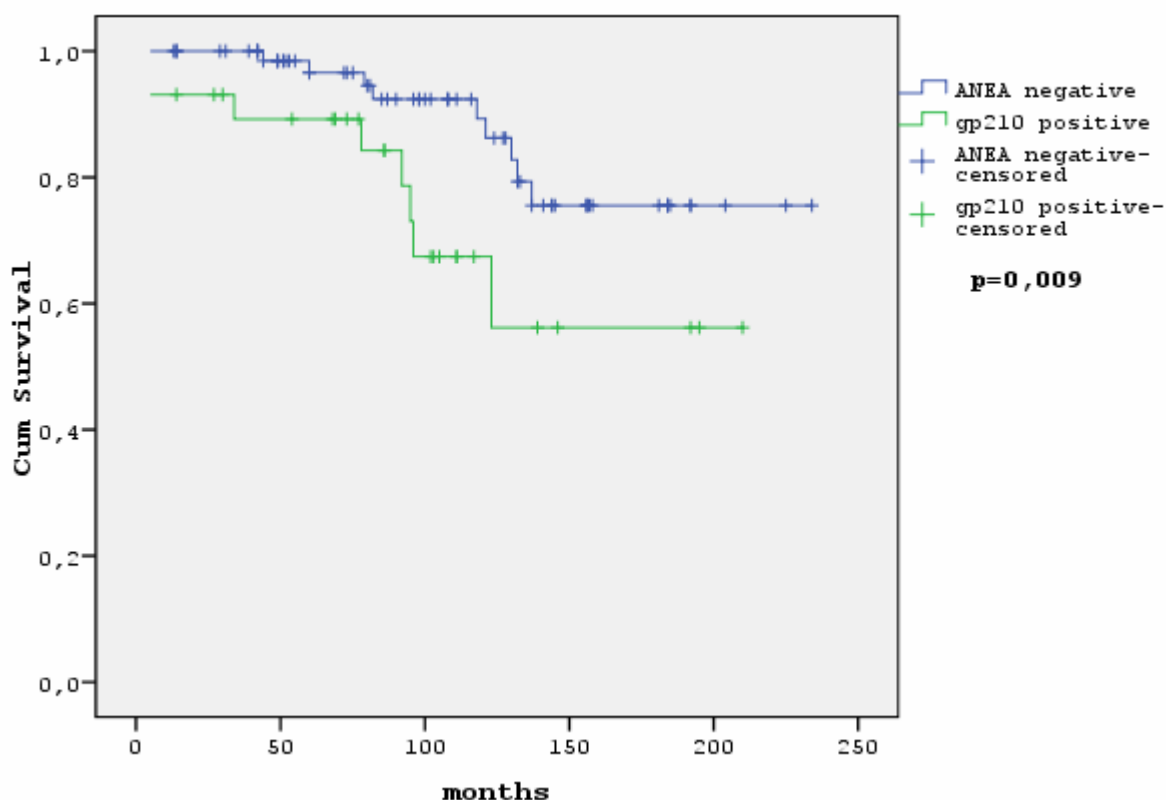
Συγκρίνοντας τους αντί-gr210 θετικούς ασθενείς (n = 31) με τους ANEA αρνητικούς ασθενείς (n = 78) βρήκαμε σημαντικά υψηλότερο τίτλο AMA (p = 0,009), πιο προχωρημένο στάδιο της νόσου (p = 0,006), υψηλότερο Mayo risk score (p = 0,04) και μικρότερη επιβίωση (p = 0,009) (Πίνακας 6 και Γράφημα 9).

Για τα ιστολογικά χαρακτηριστικά δεν υπήρξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά (Πίνακας 7).

Πίνακας 6. Σύγκριση των κλινικών παραμέτρων μεταξύ ANEA θετικών, gr210 θετικών και ANEA αρνητικών ασθενών.

	ANEA θετικοί, gr210 θετικοί	ANEA αρνητικοί	Τιμή p
Ασθενείς N(%)	31(44,9)	78(53,1)	
Ηλικία διάγνωσης	58,7±11,3	59,1±10,1	0,371
Τίτλος AMA ≤1:160/>1:160(%)	16(51,6)/15(48,4)	56(71,8)/22(28,2)	0,009
Στάδιο I-II / Στάδιο III-IV(%)	17(54,8)/14(45,2)	58(74,4)/20(25,6)	0,006
Ζώντες / Νεκροί (%)	21(72,4)/ 8(27,6)	66(88)/9(12)	0,067
Επιβίωση	91,1±52,9	101,8±55	0,009
Mayo risk score	5,5±1,9	5,04±1,3	0,040

Γράφημα 9: Kaplan-Meier επιβίωσης ανάμεσα σε ANEA θετικούς, gr210 θετικούς και ANEA αρνητικούς ασθενείς (p=0,009)



Δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα ιστολογικά χαρακτηριστικά, μεταξύ gr210 θετικών και ANEA αρνητικών ασθενών (Πίνακας 7).

Πίνακας 7 Σύγκριση των ιστολογικών χαρακτηριστικών μεταξύ ANEA θετικών, gp210 θετικών και ANEA αρνητικών ασθενών.

Ιστολογικά χαρακτηριστικά

		ANEA θετικοί gp210 θετικοί (n=31)	ANEA αρνητικοί (n=78)	Τιμή p
Ίνωση	1	3(18,8%)	22(40,7%)	0,088
	2	9(56,2%)	22(40,7%)	
	3	4(25,0%)	10(18,6%)	
Φλεγμονή στο πυλαίο διάστημα	1	3(18,8%)	22(40,7%)	0,055
	2+3	13(81,2%)	32(59,3%)	
Περιπυλαία ηπατίτιδα	0+1	6(37,5%)	31(57,4%)	0,83
	2+3	10(62,5%)	23(42,6%)	
Ενδολοβιακή φλεγμονή	0	3(18,8%)	9(16,7%)	0,057
	1	5(31,2%)	35(64,8%)	
	2	8(50,0%)	10(18,5%)	
Πολλαπλασιασμός των χοληφόρων	0	5(31,2%)	25(46,3%)	0,146
	1	11(68,8%)	29(53,7%)	
Επιθηλιώδες κοκκίωμα	0	12(75,0%)	39(72,2%)	0,415
	1	4(25,0%)	15(27,8%)	

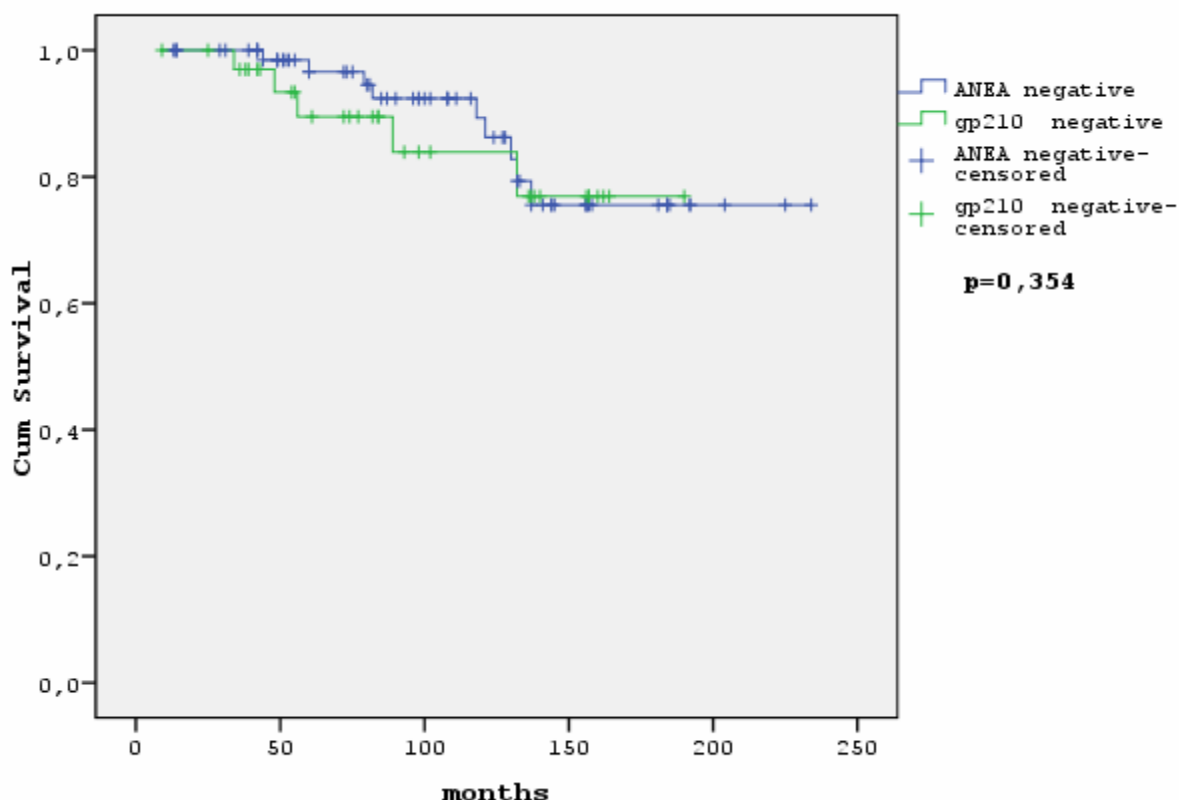
5.2.3 ANEA θετικοί, αντί-gp210 αρνητικοί έναντι ANEA αρνητικών.

Συγκρίνοντας τους 78 ANEA αρνητικούς ασθενείς με τους 38 ANEA θετικούς gp210-αρνητικούς ασθενείς, βρήκαμε ότι οι ANEA αρνητικοί ασθενείς έχουν στατιστικής σημαντικότητας χαμηλότερο τίτλο AMA ($p = 0,002$) και βρίσκονται σε πρωιμότερο ιστολογικό στάδιο ($p = 0,033$) (Πίνακας 8), ενώ δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στην επιβίωση των δύο ομάδων (Πίνακας 8 και Γράφημα 10). Ενώ, σε ότι αφορά τα ιστολογικά τους χαρακτηριστικά υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές καθώς οι ANEA αρνητικοί ασθενείς είχαν, λιγότερο σοβαρή ίνωση, μικρότερου βαθμού φλεγμονή στο πυλαίο διάστημα, μικρότερου βαθμού περιπυλαία ηπατίτιδα και λιγότερο πολλαπλασιασμό των χοληφόρων ($p = 0,009$, $p = 0,018$, $p = 0,032$ και $p = 0,031$, αντίστοιχα) (Πίνακας 9).

Πίνακας 8 Σύγκριση των κλινικών παραμέτρων μεταξύ ANEA θετικών, gp210 αρνητικών και ANEA αρνητικών ασθενών.

	ANEA θετικοί, gp210 αρνητικοί	ANEA αρνητικοί	Τιμή p
Ασθενείς N(%)	38(55,1)	78(53,1)	
Ηλικία διάγνωσης	59,8±12,3	59,1±10,1	0,343
Τίτλος AMA ≤1:160/>1:160(%)	19(50)/19(50)	56(71,8)/ 22(28,2)	0,002
Στάδιο I-II / Στάδιο III-IV(%)	22(57,9)/16(42,1)	58(74,4)/20(25,6)	0,033
Ζώντες / Νεκροί (%)	30(85,7)/5(14,3)	66(88)/9(12)	0,445
Επιβίωση	92,1±49,6	101,8±55	0,354
Mayo risk score	4,9±1,7	5,04±1,3	0,263

Γράφημα 10: Kaplan-Meier επιβίωσης ανάμεσα σε ANEA θετικούς, gp210 αρνητικούς και ANEA αρνητικούς ασθενείς (p=0,354)



Πίνακας 9 Σύγκριση των ιστολογικών χαρακτηριστικών μεταξύ ANEA θετικών, gp210 αρνητικών και ANEA αρνητικών ασθενών.

Ιστολογικά χαρακτηριστικά

		ANEA θετικοί, gp210 αρνητικοί (n=38)	ANEA αρνητικοί (n=78)	Τιμή p
Ίνωση	1	7(25,0%)	22(40,7%)	0,009
	2	8(28,6%)	22(40,7%)	
	3	13(48,4%)	10(18,6%)	
Φλεγμονή στο πυλαίο διάστημα	1	5(17,9%)	22(40,7%)	0,018
	2+3	23(82,1%)	32(59,3%)	
Περιπυλαία ηπατίτιδα	0+1	10(35,7%)	31(57,4%)	0,032
	2+3	18(64,3%)	23(42,6%)	
Ενδολοβιακή Φλεγμονή	0	8(28,6%)	9(16,7%)	0,274
	1	14(50,0%)	35(64,8%)	
	2	6(21,4%)	10(18,5%)	
Πολλαπλασιασμός χοληφόρων	0	7(25,0%)	25(46,3%)	0,031
	1	21(75,0%)	29(53,7%)	
Επιθηλιώδες κοκκίωμα	0	19(67,9%)	39(72,2%)	0,342
	1	9(32,1%)	15(27,8%)	

5.3 Ανοσοφθορισμός σε ιστούς παραφίνης.

Ο προσδιορισμός του είδους των κυττάρων που αποτελούν στόχο των αυτοαντισωμάτων που περιέχονται σε ορούς ασθενών, έγινε με ανοσοφθορισμό, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ιστό ασθενών και ως πρωτογενή αντίσωμα ορό ασθενών.

5.3.1 Ανοσοφθορισμός σε ιστούς ασθενών με PBC χρησιμοποιώντας ομόλογο ορό και δευτερογενή IgG αντισώματα.

Στο σύνολο τους δοκιμάστηκαν 21 ιστοί με ομόλογο ορό ασθενών με PBC. Όλοι οι ασθενείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εν ζωή, οι 17 (81%) ήταν σταδίου I-II και οι υπόλοιποι 4 (19%) ήταν σταδίου III-IV. Επίσης στους 15

(71,4%) είχαν ανιχνευτεί περιπυρηνικά αυτοαντισώματα στα κύτταρα Her2 ενώ οι υπόλοιποι 6 (28,6%) ήταν αρνητικοί.

Ο μέσος όρος ηλικίας κατά την διάγνωση ήταν 52,9±13,4 (Πίνακας 10).

Πίνακας 10 Χαρακτηριστικά ασθενών

Χαρακτηριστικά ασθενών	Αριθμός Ασθενών n =21
Ηλικία	52,9±13,4
AMA+	20(95,2%)
AMA-	1(4,8%)
ANApp+	15(71,4%)
ANApp-	6(28,6%)
gp210+	8(53,3%)
gp210-	7(46,7%)
Στάδιο I-II	17(81%)
Στάδιο III-IV	4(19%)
Mayo risk score	4,3±1,0

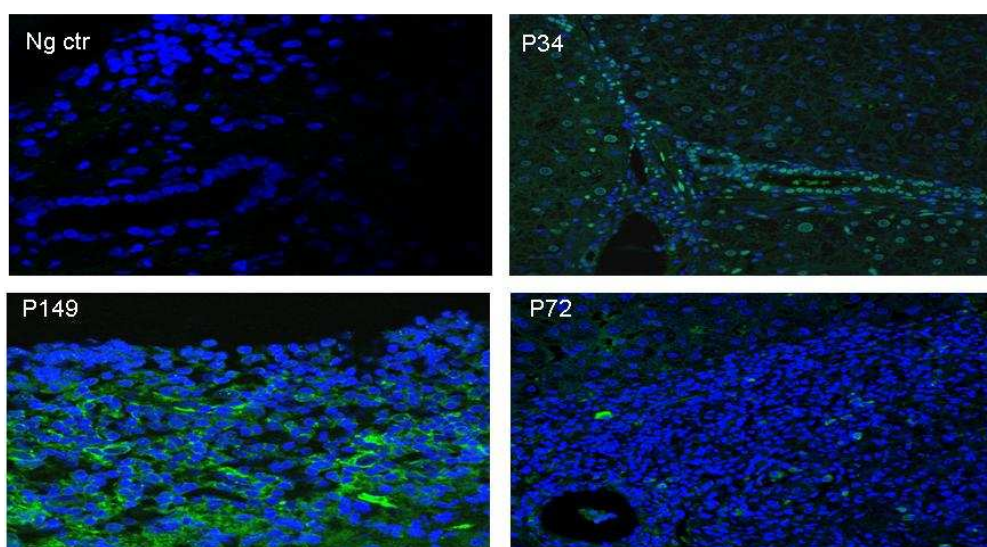
Από αυτούς οι 10/21 (47,6%) έδωσαν χρώση στα λεμφοκύτταρα, 8/21 (38%) στα χοληφόρα, 7/21 (33,3%) στα ηπατοκύτταρα και 18/21 (85,7%) στα κολποειδή του ήπατος (Πίνακας 11 και Εικόνα 2).

Πίνακας 11 Ιστός ασθενών με PBC και ομόλογο ορό

ΑΣΘΕΝΗΣ	ΟΡΟΣ	ΤΙΤΛΟΣ ΑΜΑ	ΛΕΜΦ/ΡΑ	ΧΟΛ/ΡΑ	ΗΠΑΤ/ΡΑ	ΚΟΛΠΟΕΙΔΗ	ΣΤΑΔΙΟ
1	P81	1/160	+	-	-	+	I-II
2	P10	1/320	-	-	-	+	I-II
3	P146	1/80	++	+ (ΚΥΤ/ΜΑ)	-	+	I-II
4	P72	1/160	+	-	-	+	I-II
5	A18	N*	-	+ (ΚΥΤ/ΜΑ)	-	+	I-II
6	P100	1/160	+	-	-	-	I-II
7	P106	1/160	+	-	+ (ΚΟΚΚΙΑ, ΠΥΡΗΝΕΣ)	+	I-II
8	P130	1/320	-	-	+ (ΚΟΚΚΙΑ, ΠΥΡΗΝΕΣ, ΜΕΜΒ.)	+	I
9	P7	1/320	+	+ (ΚΥΤ/ΜΑ)	-	+	I-II
10	P46	1/320	-	-	-	+	I
11	P34	1/160	++	+ (ΠΥΡΗΝΕΣ+ ΚΥΤ/ΜΑ)	+ (ΠΥΡΗΝΕΣ)	+	I
12	P65	1/320	-	+ (ΚΥΤ/ΜΑ)	+ (ΚΥΤ/ΜΑ)	-	I
13 ΚΑΚΗ ΕΙΚ.	P90	1/640	-	-	-	-	II
14	P80	1/80	-	+ (ΚΥΤ/ΜΑ)	-	+	I
15	P77	1/20	-	+ (ΚΥΤ/ΜΑ)	-	+	I
16	P142π	1/320	-	-	+ (ΠΥΡΗΝΕΣ)	+	II
	P142μ		-	+ (ΚΥΤ/ΜΑ)	+ (ΠΥΡΗΝΕΣ)	+	
17	P89	1/320	-	-	-	+	IV

18	P12	1/3200	-	-	-	+	IV
19	P62	1/320	++	-	-	+	III
20	P88	1/160	+	+	+	+	IV
				(ΚΥΤ/ΜΑ)	(ΚΥΤ/ΜΑ)		
21	P149	Missing data	++	-	+	+	II-III
					(ΚΥΤ/ΜΑ)		

*N=Αρνητικά



Εικόνα 2 Πρότυπα φθορισμού μετά από χρώση ιστού ασθενών με PBC με ομόλογο ορό και δευτερογενή IgG αντισώματα.

5.3.2 Ανοσοφθορισμός ιστών ασθενών με PBC με ετερόλογο ορό PBC

Οι οροί των ασθενών P34, P149 και P72 χρησιμοποιήθηκαν ως πρώτο αντίσωμα σε 5 ετερόλογους ιστούς ασθενών με PBC.

Ο ορός P34: Έδωσε θετικά λεμφοκύτταρα στους 3/5 (60%) των ιστών, 3/5 (60%) θετικά χοληφόρα και 2/5 (40%) σε ηπατοκύτταρα και σε 1/5 (20%) ιστούς έδωσε θετικότητα στα κολποειδή του ήπατος.

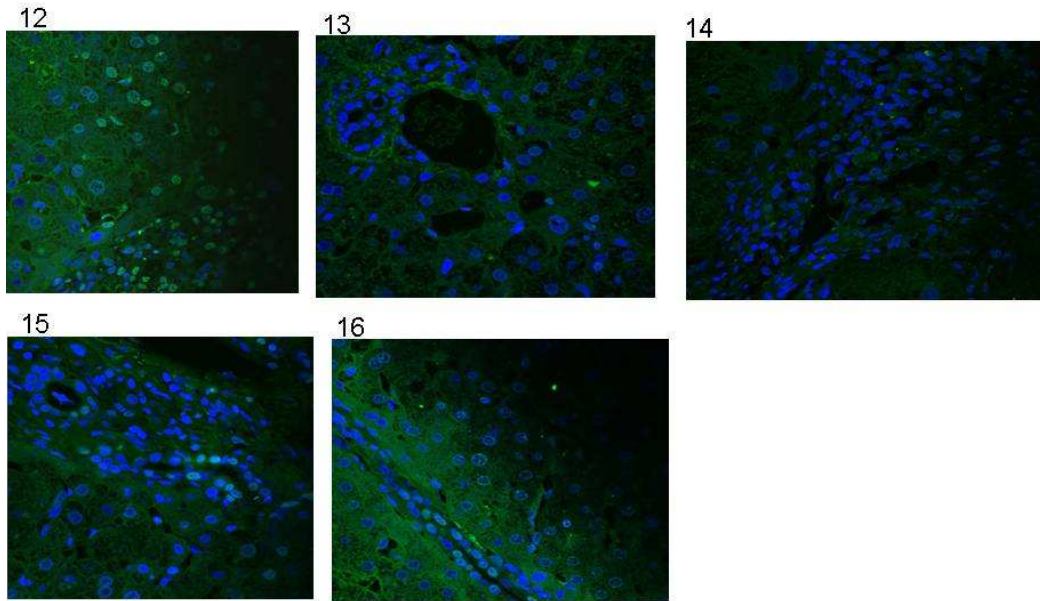
Ο ορός P72: Έδωσε θετική χρώση στα κολποειδή του ήπατος μόνο σε 1 ιστό (20%).

Ο ορός P149: Έδωσε θετική χρώση στα κολποειδή του ήπατος μόνο σε 1 ιστό (20%).

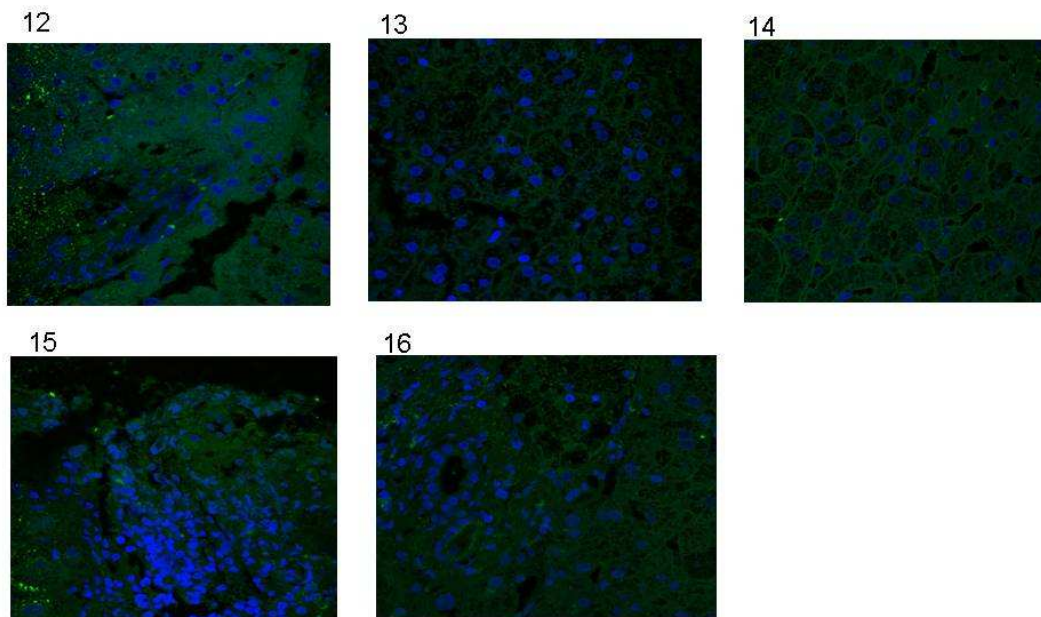
Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι και οι τρεις παραπάνω οροί έδωσαν θετικότητα στα κολποειδή του ήπατος στον ιστό του ίδιου ασθενή (ασθενής 14). (Πίνακας 12 και Εικόνες 3, 4 και 5).

Πίνακας 12 Ιστός ασθενών με PBC και ετερόλογο ορό PBC

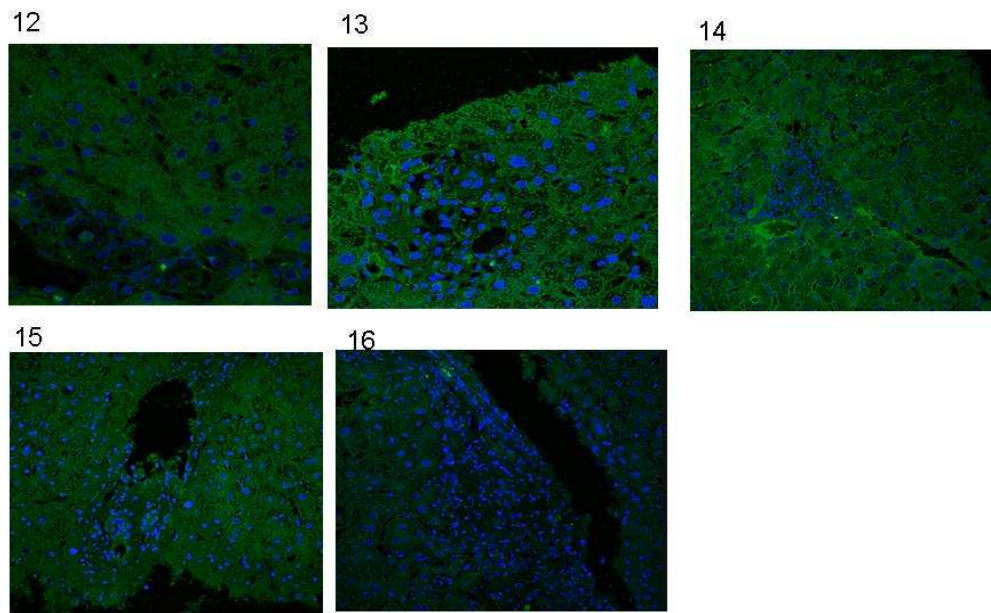
ΑΣΘΕΝΗΣ	ΟΡΟΣ	ΛΕΜΦ/ΡΑ	ΧΟΛ/ΡΑ	ΗΠΑΤ/ΡΑ	ΚΟΛΠΟΕΙΔΗ
12	P34	+	-	+ (ΠΥΡΗΝΕΣ + ΚΥΤ/ΜΑ)	-
	P149	-	-	-	-
	P72	-	-	-	-
13	P34	+	-	-	-
	P149	-	-	-	-
	P72	-	-	-	-
14	P34	++	+ (ΠΥΡΗΝΕΣ)	+ (ΠΥΡΗΝΕΣ)	+
	149	-	-	-	+
	P72	-	-	-	+
15	P34	-	+ (ΠΥΡ+ΚΥΤ/ΜΑ)	-	-
	P149	-	-	-	-
	P72	-	-	-	-
16	P34	-	+ (ΠΥΡΗΝΕΣ)	-	-
	P149	-	-	-	-
	P72	-	-	-	-



Εικόνα 3 Πρότυπα φθορισμού μετα από χρώση ιστού των ασθενών (12-16) με PBC με ετερόλογο ορό PBC (P34) και δευτερογενή IgG αντισώματα.



Εικόνα 4 Πρότυπα φθορισμού μετα από χρώση ιστού των ασθενών (12-16) με PBC με ετερόλογο ορό PBC (P149) και δευτερογενή IgG αντισώματα.



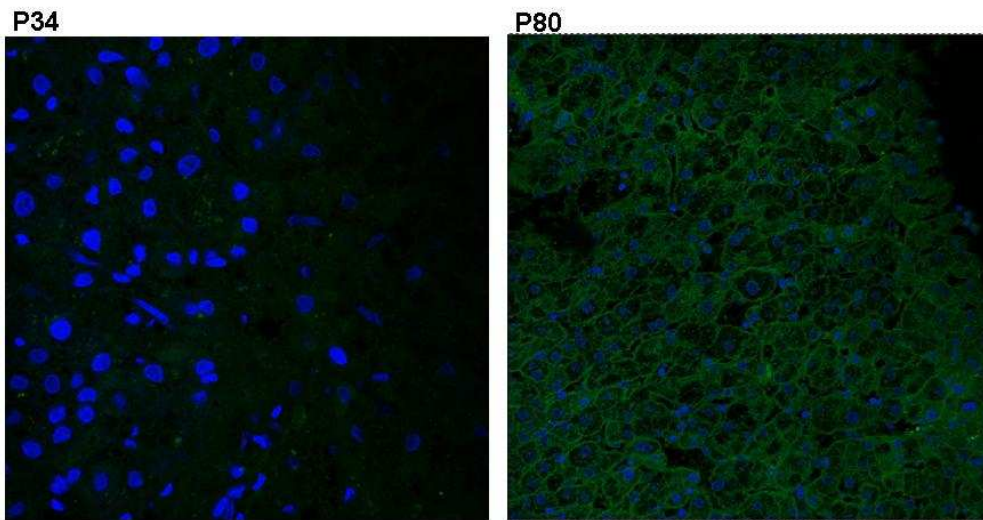
Εικόνα 5 Πρότυπα φθορισμού μετά από χρώση ιστού των ασθενών (12-16) με PBC με ετερόλογο ορό PBC (P72) και δευτερογενή IgG αντισώματα.

5.3.3 Ανοσοφθορισμός ιστών ασθενών με PBC και ορό υγιούς

Έγινε ανοσοφθορισμός σε 7 ιστούς ασθενών με PBC με ορό υγιούς και μόλις σε 1 (14,3%) ιστό παρατηρήθηκε θετική χρώση στα κολποειδή του ήπατος, ενώ στους υπόλοιπους 6 ιστούς δεν παρατηρήθηκε θετικότητα σε κανένα είδος κυττάρων. (Πίνακας 13 και Εικόνα 6).

Πίνακας 13 Ιστός ασθενών με PBC και disease controls με ορό υγιούς

ΙΣΤΟΣ	ΟΡΟΣ ΥΓΙΟΥΣ
35016	-
43583	-
48501	-
58574	+
61205	-
84653	-
114422	-
sHBV	-
sHCV	-
sAAH	-
sSteat	-



Εικόνα 6 Πρότυπα φθορισμού μετά από χρώση ιστού ασθενών με PBC με ορό υγιούς και δευτερογενή IgG αντισώματα.

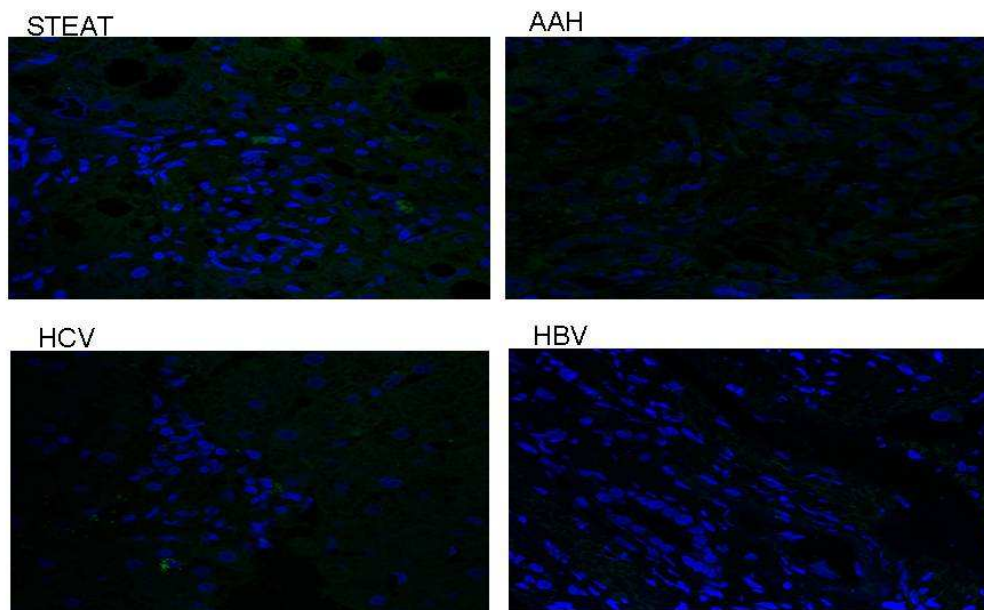
5.3.4 Ανοσοφθορισμός ιστών ασθενών με disease controls και ορό υγιούς.

Έγινε ανοσοφθορισμός σε 4 ιστούς με disease controls (χρόνια ιογενής ηπατίτιδα Β και C, οξεία αλκοολική ηπατίτιδα και στεατοηπατίτιδα), χρησιμοποιώντας ορό υγιούς.

Σε κανέναν από τους ιστούς δεν παρατηρήθηκε κάποια θετική χρώση (Πίνακας 14 και Εικόνα 7).

Πίνακας 14 Ιστός ασθενών με disease controls με ορό υγιούς

ΙΣΤΟΣ	ΟΡΟΣ ΥΓΙΟΥΣ
HBV	-
HCV	-
AAH	-
Steat	-



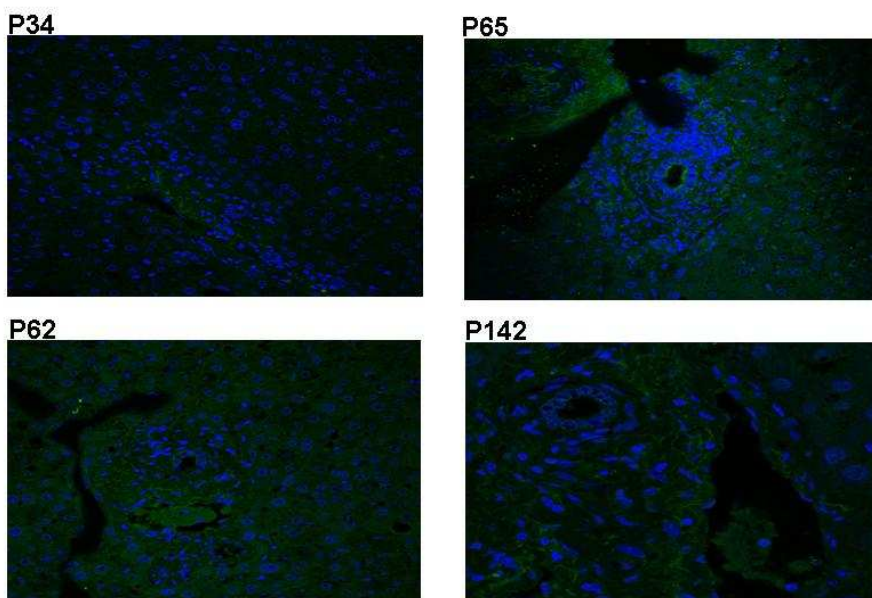
Εικόνα 7 Πρότυπα φθορισμού μετά από χρώση ιστού ασθενών με disease control με ορό υγιούς και δευτερογενή IgG αντισώματα.

5.3.5 Ανοσοφθορισμός ιστού υγιούς με ορό ασθενών με PBC.

Δοκιμάσαμε και τους 21 ορούς ασθενών με PBC σε ιστό υγιούς και μόνο 3/21 (14,3%) έδωσαν χρώση στα χοληφόρα, ενώ κανένας άλλος ορός δεν έδωσε κάποια χρώση σε κάποιο άλλο είδος κυττάρου (Πίνακας 15, Εικόνα 8).

Πίνακας 15 Ορός ασθενών ΡΒC σε ιστό υγιούς

ΟΡΟΣ	ΙΣΤΟΣ ΥΓΙΟΥΣ
A18	-
P7	-
P10	-
P12	-
P34	-
P46	-
P62	+
P65	+
P72	-
P77	-
P80	-
P81	-
P88	-
P89	-
P90	-
P100	-
P106	-
P130	-
P142	+
P146	-
P149	-



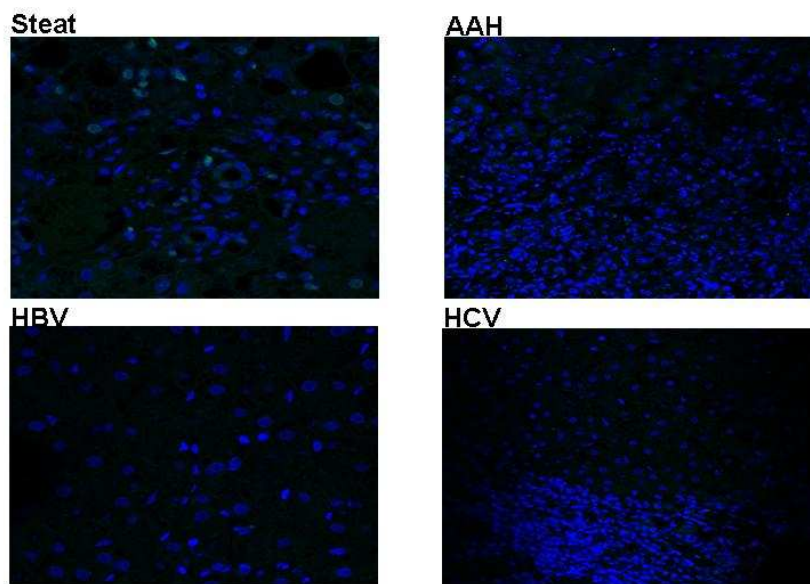
Εικόνα 8 Πρότυπα φθορισμού μετά από χρώση ιστού υγιούς με ορό ΡΒC και δευτερογενή IgG αντισώματα.

5.3.6 Ανοσοφθορισμός σε ιστό ασθενών με disease control και ορός ασθενών με PBC.

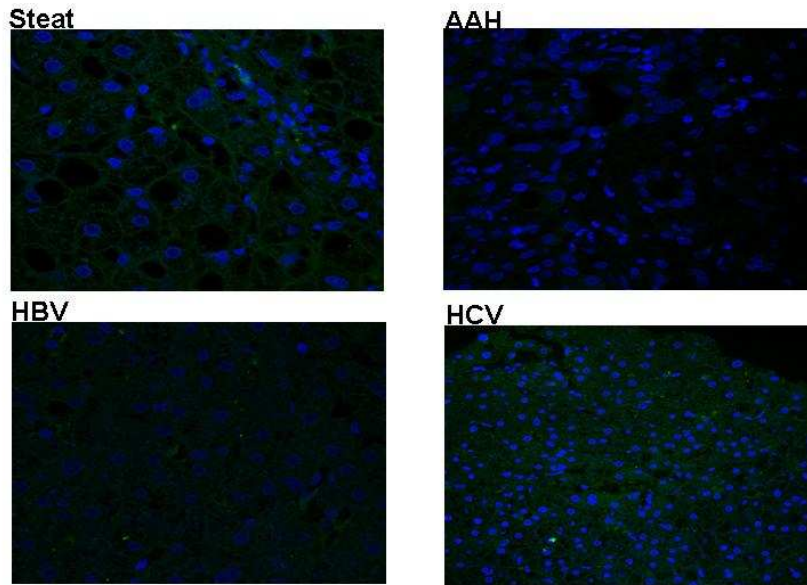
Δοκιμάσαμε τέσσερις ιστούς ασθενών με disease controls (ιογενής ηπατίτιδα Β, ιογενής ηπατίτιδα C, οξεία αλκοολική ηπατίτιδα και στεατοηπατίτιδα) με 2 ορούς ασθενών με PBC. Σε κανένα δείγμα δεν παρατηρήθηκε κάποια θετική χρώση (Πίνακας 16 και Εικόνες 9 και 10).

Πίνακας 16 Ιστός ασθενών με disease control και ορός ασθενών με PBC.

ΙΣΤΟΣ	ΟΡΟΣ	
	P34	P149
STEAT	-	-
AAH	-	-
HCV	-	-
HBV	-	-



Εικόνα 9 Πρότυπα φθορισμού μετά από χρώση ιστού ασθενών με disease control με ορό PBC (P34) και δευτερογενή IgG αντισώματα.



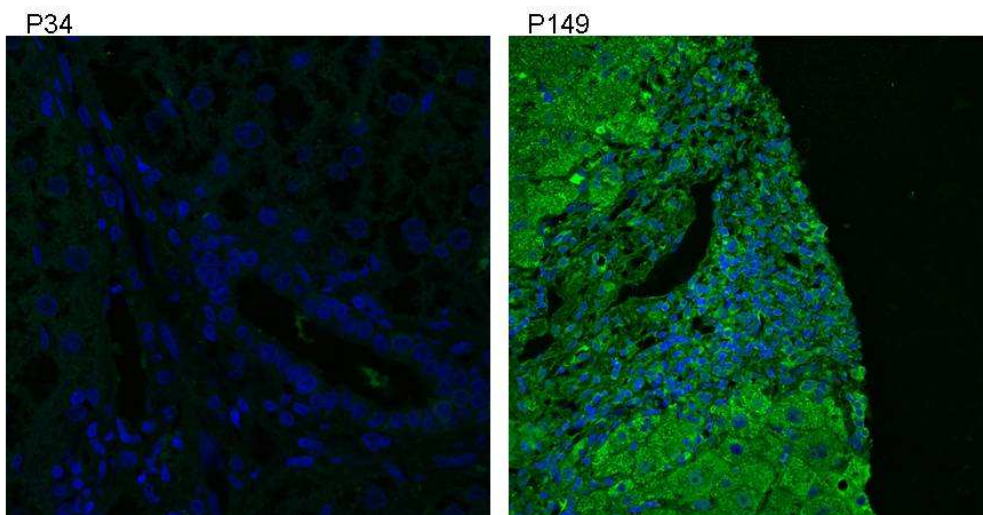
Εικόνα 10 Πρότυπα φθορισμού μετά από χρώση ιστού ασθενών με disease control με ορό PBC (P149) και δευτερογενή IgG αντισώματα.

5.3.7 Ανοσοφθορισμός σε ιστό ασθενών με PBC και ορό από disease control.

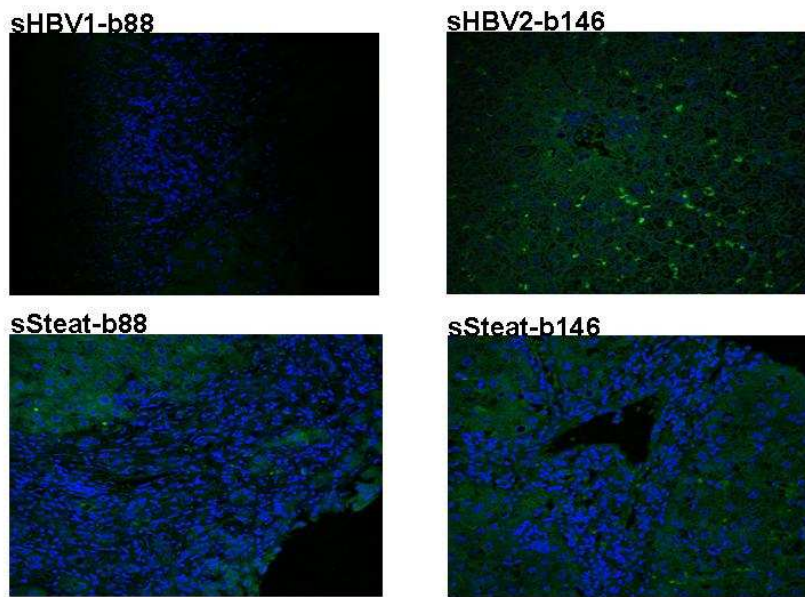
Αρχικά δοκιμάστηκε ένας ορός ασθενούς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα Β σε 2 ιστούς ασθενών με PBC και ενώ στον έναν ιστό δεν υπήρχε θετική χρώση, στον δεύτερο ιστό είδαμε πολύ έντονη χρώση σε λεμφοκύτταρα και ηπατοκύτταρα (Εικόνα 11). Αυτό το ερμηνεύσαμε ως μη ειδική χρώση και έτσι έγινε επανάληψη με δύο διαφορετικούς ιστούς PBC και 2 άλλους ορούς χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας Β καθώς και έναν ορό στεατοηπατίτιδας (Πίνακας 17). Ενώ ο ένας ορός χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας Β δεν έδωσε καμία χρώση σε κανέναν από τους δύο ιστούς των ασθενών με PBC, ο δεύτερος έδωσε χρώση στα κολποειδή του ήπατος ή σε ενδοκοιλιακά λεμφοκύτταρα. Ενώ ο ορός στεατοηπατίτιδας που χρησιμοποιήθηκε, έδωσε θετική χρώση σε ηπατοκύτταρα και λεμφοκύτταρα στον ένα από τους δύο ιστούς ασθενών με PBC που χρησιμοποιήσαμε (Εικόνα 12).

Πίνακας 17 Ιστός ασθενών με PBC και ορός ασθενων με disease control

ΙΣΤΟΣ	ΟΡΟΣ			
	sHBV	sHBV1	sHBV2	sSteat
b34	-	Not tested	Not tested	Not tested
b149	+ (Λεμφ+ηπατ/ρα)	Not tested	Not tested	Not tested
b146	Not tested	-	+ (κολποειδή)	-
b88	Not tested	-	-	+ (Λεμφ.+ηπατ/ρα)



Εικόνα 11 Πρότυπα φθορισμού μετά από χρώση ιστού ασθενών με PBC με HBV ορό και δευτερογενή IgG αντισώματα.



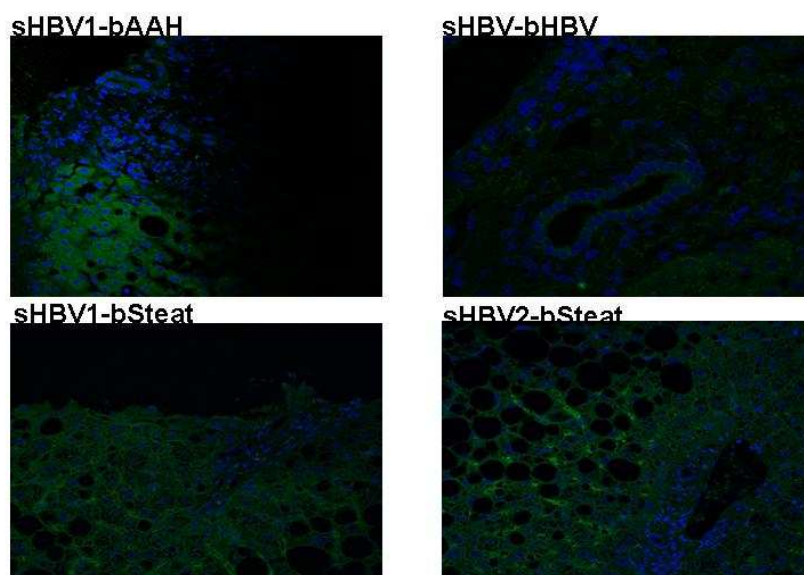
Εικόνα 12 Πρότυπα φθορισμού μετά από χρώση ιστού ασθενών με PBC με ορό ασθενών με disease control και δευτερογενή IgG αντισώματα.

5.3.8 Ανοσοφθορισμός σε ιστό ασθενών με disease control και ορό από disease control.

Δοκιμάσαμε ορούς από ασθενείς με disease control (χρόνια ιογενή ηπατίτιδα B και στεατοηπατίτιδα) σε ιστούς με disease control (στεατοηπατίτιδα, οξεία αλκοολική ηπατίτιδα, χρόνια ιογενή ηπατίτιδα B και C). Ο ορός ασθενούς με στεατοηπατίτιδα δεν έδωσε φθορισμό σε κανέναν από τους παραπάνω ιστούς, όπως επίσης και κανένας από τους παραπάνω ορούς δεν έδωσε θετικό φθορισμό στον ιστό του ασθενούς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα C. Εν αντιθέσει, οι 2 στους 3 ορούς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα B που χρησιμοποιήθηκαν έδωσαν θετικό φθορισμό στα κολποειδή του ήπατος του ιστού του ασθενούς με στεατοηπατίτιδα, αλλά κυρίως πρόκειται για ενδοκολποειδικά λεμφοκύτταρα και όχι για κύτταρα κολποειδών, ενώ 2 στους 3 ορούς έδωσαν θετική χρώση σε χοληφόρα και ηπατοκύτταρα σε ιστό ασθενούς με οξεία αλκοολική ηπατίτιδα και ο ένας από τους παραπάνω ορούς έδωσε επιπλέον θετική χρώση σε χοληφόρα ασθενούς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα B (Πίνακας 18 και Εικόνα 13).

Πίνακας 18 Οροί ασθενών με disease control και ιστοί ασθενών με disease control

ΙΣΤΟΣ	ΟΡΟΣ			
	sHBV	sHBV1	sHBV2	sSteat
bsteat	-	+	+	-
		(κολποειδή)	(κολποειδή)	
bAAH	+	+	-	-
	(ηπατ/ρα+χολ/ρα)	(χολ/ρα+ηπατ/ρα)		
bHBV	+	-	-	-
	(χολ/ρα)			
bHCV	-	Not teted	Not teted	-



Εικόνα 13 Πρότυπα φθορισμού μετά από χρώση ιστού ασθενών με disease control με ορό ασθενών με disease control και δευτερογενή IgG αντισώματα.

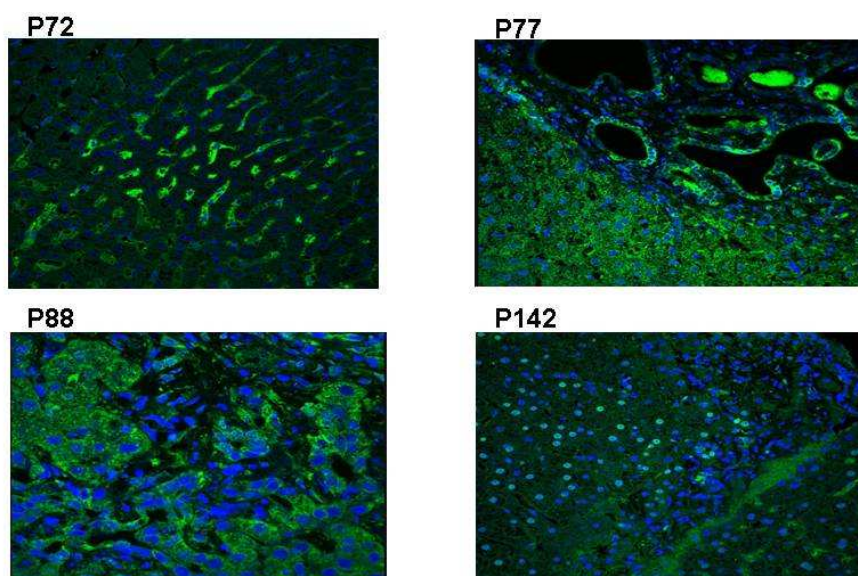
5.3.9 Ανοσοφθορισμός σε ιστούς ασθενών με PBC χρησιμοποιώντας ομόλογο ορό και δευτερογενή IgM αντισώματα.

Σε ιστό 8 ασθενών με PBC κάναμε ανοσοφθορισμό για το έλεγχο των IgM αυτοαντισωμάτων, χρησιμοποιώντας ομόλογο ορό. Από αυτούς 6/8 (75%) έδωσε θετική χρώση σε λεμφοκύτταρα, 5/8 (62,5%) σε χοληφόρα, 3/8 (37,5%) σε ηπατοκύτταρα και 4/8 (50%) στα κολποειδή του ήπατος (Πίνακας 19 και Εικόνα 14).

Σε έναν μόνο ασθενή ο φθορισμός που ανιχνεύτηκε με τα IgG αντισώματα είναι ίδιος με αυτόν που παρατηρείται με τα IgM. Πιο συγκεκριμένα, σε ότι αφορά τα λεμφοκύτταρα για 3 ασθενείς παρατηρείται θετικότητα στα λεμφοκύτταρα για τα IgG και τα IgM, για άλλους 3 υπάρχει θετικότητα μόνο για τα IgM και δύο ήταν αρνητικοί και για τα IgG και τα IgM αντισώματα. Για τα χοληφόρα για 5 ασθενείς παρατηρείται θετική χρώση και για τα δύο είδη αντισωμάτων, για έναν ασθενή παρατηρείται θετικότητα μόνο για τα IgG, ενώ για τους υπόλοιπους δύο ασθενείς δεν υπήρχε θετική χρώση ούτε για τα IgG ούτε για τα IgM αντισώματα. Δύο ασθενείς είχαν θετικά ηπατοκύτταρα και για τα δύο είδη αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, ένας είχε θετικά ηπατοκύτταρα μόνο για τα IgG και ένας μόνο για τα IgM, ενώ οι υπόλοιποι τέσσερις δεν έδωσαν θετική χρώση ούτε με τα IgG ούτε τα IgM αντισώματα. Για τα αντισώματα έναντι των κολποειδών του ήπατος, τρεις ασθενείς ήταν θετικοί και για τα δύο είδη αντισωμάτων, τρεις ήταν θετικοί μόνο για τα IgG, ένας μόνο για τα IgM και ένας ήταν αρνητικός και για τα δύο είδη αντισωμάτων (Πίνακας 19).

Πίνακας 19 Ομόλογος ιστός–ορός με IgM

		Λεμφοκύτταρα	Χοληφόρα	Ηπατοκύτταρα	Κολποειδή
P72	IgG	+	-	-	+
	IgM	+	-	-	+
P88	IgG	+	+	+	+
	IgM	+	+	+	-
P146	IgG	+	+	-	+
	IgM	+	-	-	+
P90	IgG	-	-	-	-
	IgM	+	-	-	-
P77	IgG	-	+	-	+
	IgM	+	+	-	+
P65	IgG	-	+	+	-
	IgM	-	+	-	+
P142	IgG	-	+	+	+
	IgM	+	+	+	-
P80	IgG	-	+	-	+
	IgM	-	+	+	-



Εικόνα 14 Πρότυπα φθορισμού μετά από χρώση ιστού ασθενών με PBC με ομόλογο ορό και δευτερογενή IgM αντισώματα.

Εν συνόψει : Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, έδειξαν τα αντισώματα έναντι των κυττάρων των κολποειδών όπου :

- 1) Ασθενείς με PBC έχουν σε σημαντικό ποσοστό (86%) αντισώματα κατά κυττάρων των κολποειδών.
- 2) Ο Ορός ασθενών με θετικά αντισώματα κατά των κολποειδών στον ομόλογο ιστό, δίνει θετικότητα μόνον 20% σε άλλες PBC.
- 3) Στα controls :
 - α) Ιστός PBC με ορό υγιούς : όλα είναι αρνητικά.
 - β) Ιστός χρόνιας ηπατίτιδας Β και C με ορό υγιούς : όλα αρνητικά.
 - γ) Ιστός υγιούς με ορό PBC : όλα αρνητικά.
 - δ) Ιστός χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας με ορό ασθενούς με PBC : όλα αρνητικά.
 - ε) Ορός PBC και ορός άλλων χρόνιων ηπατοπαθειών σε ιστό ασθενούς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα C: όλα αρνητικά.
 - στ) Ιστός PBC και ιστός άλλων χρόνιων ηπατοπαθειών με ορό ασθενών με χρόνια ιογενή Β :Χρώση ηπατοκυττάρων, ενδοκολποειδικών , πυλαίων λεμφοκυττάρων και χολαγγειακών κυττάρων. Αμφίβολη χρώση κυττάρων κολποειδών.

6.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει σημαντικά βήματα σε ότι αφορά την αιτιοπαθογένεση της PBC, εν τούτοις ακόμα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως η αλυσίδα έναρξη-διαίωσιση της νόσου (187, 195)

Επιπλέον, οι μηχανισμοί που ελέγχουν τη σοβαρότητα της νόσου και ως εκ τούτου την πρόγνωση σε αυτή την κλινικά ετερογενή νόσο δεν είναι ακόμα καλά τεκμηριωμένοι. Τα τελευταία χρόνια οι περισσότεροι ασθενείς διαγιγνώσκονται σε προσυμπτωματικό ή ασυμπτωματικό στάδιο, από ό, τι παλαιότερα.

Μερικοί από αυτούς τους ασθενείς έχουν καλή πορεία ενώ για άλλους ασθενείς η έκβαση της νόσου είναι χειρότερη, με πρόωρη εμφάνιση των συμπτωμάτων και ταχεία επιδείνωση, που οδηγούν σε μεταμόσχευση ήπατος ή θάνατο (19, 109, 333)

Έχουν αναπτυχθεί προγνωστικά σκορ τα οποία βασίζονται σε κλινικές παραμέτρους (Mayo risk score, χολερυθρίνη) σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο, αλλά δεν ισχύουν για προσυμπτωματικούς ή ασυμπτωματικούς ασθενείς (110).

Αν και ειδικά για την νόσο αντιμιτοχονδριακά αυτοαντισώματα (AMA) ανιχνεύονται σε ποσοστό άνω του 95% των ασθενών με πρωτοπαθή χολική κίρρωση εν τούτοις δεν σχετίζονται με την πορεία της νόσου (176, 228). Πράγματι, και στη παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε ότι αν και υπάρχει συσχέτιση του τίτλου των AMA με την θετικότητα των ANEA και των anti-grp210 αντισωμάτων, εύρημα διαφορετικό από αυτό που παρατηρήθηκε σε 2 παλαιότερες μελέτες (268, 274), ωστόσο τα AMA δεν συσχετίζονται με τη σοβαρότητα της νόσου.

Στο 30%-50% των ασθενών με PBC, πέρα των AMA ανιχνεύονται και αντιπυρηνικά αυτοαντισώματα (ANA) με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού (272, 332, 334, 335).

Τα ANA διαχωρίζονται σε κατηγορίες ανάλογα με το που εντοπίζεται το αντιγόνο στόχος. Έτσι για την PBC έχουμε αντισώματα έναντι της sp100 και των κεντρομεριδίων (ACA) (273, 297) όπου τα αντιγόνα στόχοι βρίσκονται

μέσα στον πυρήνα και στον ανοσοφθορισμό αναγνωρίζονται ως μικρές κουκίδες μέσα στον πυρήνα.

Τα αντισώματα έναντι του πυρηνικού φακέλου (ANEA), εμφανίζονται στον ανοσοφθορισμό με μία περιπυρηνική χρώση. Στα τελευταία ανήκουν οι πρωτεΐνες των πυρηνικών πόρων (NPC), όπως η gp210 και p62 (268, 336) και οι πρωτεΐνες της πυρηνικής λάμινας, όπως ο υποδοχέας της Lamin B (284, 285). Αντισώματα των αντιγόνων του πυρηνικού πόρου, όπως gp210 και p62, είναι ειδικά (> 95%) για την πρωτογενή χολική κίρρωση και μπορούν να βοηθήσουν στην ορολογική διάγνωση, ιδίως στις περιπτώσεις κατά τις οποίες δεν ανιχνεύονται αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (254).

Προγενέστερες μελέτες απέτυχαν να αποδείξουν μια συσχέτιση μεταξύ των αυτοαντισωμάτων έναντι του πυρηνικού φακέλου (ANEA) με την σοβαρότητα και την εξέλιξη της νόσου.

Πράγματι οι Lassoued et al (274) έδειξαν ότι 43 από τους 150 ασθενείς (29%) είχαν αντιπυρηνικά αντισώματα που έδιναν περιπυρηνικό φθορισμό. Οι 40 από τους 43 ασθενείς, θετικούς για τα αντιπυρηνικά αντισώματα, αναγνώριζαν ένα πολυπεπτίδιο του πυρηνικού φακέλου, μοριακού βάρους 200 kDa. Αδυναμία, αρθραλγία, συνοδά εξωηπατικά νοσήματα και φαινόμενο Raynaud απαντώνται λιγότερο συχνά στους ασθενείς που είναι αρνητικοί για τα αυτοαντισώματα αυτά και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική. Η κλινική πορεία, οι βιοχημικές εξετάσεις του ήπατος, και οι ιστολογικές βλάβες δεν ήταν διαφορετικές σε ασθενείς με, και χωρίς αυτά τα αντισώματα (274).

Το 1994 οι Nickowitz et al (275) ανίχνευσαν αυτοαντισώματα έναντι της gp210 και του υποδοχέα της Lamin B σε 159 ασθενείς με PBC και σε 46 άτομα ελέγχου, χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένα πολυπεπτίδια. Βρήκαν αντί-gp210 σε 15/159 ασθενείς και σε 0/46 άτομα ελέγχου. Αντισώματα κατά του υποδοχέα της Lamin B ανιχνεύτηκαν σε 2 ασθενείς με PBC και σε κανένα από τα άτομα ελέγχου. Η παρουσία αυτών των αυτοαντισωμάτων είχε ευαισθησία 11% και η ειδικότητα τους ήταν 100% για τη διάγνωση της PBC. Αντισώματα έναντι της gp210 ανιχνεύτηκαν σε 4 από τους 19 (21%) ασθενείς με PBC που ήταν αρνητικοί για αντιμιτοχονδριακά αυτοαντισώματα. Ασθενείς με PBC και gp210 αυτοαντισώματα είχαν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης

αρθρίτιδας. Αυτοαντισώματα έναντι της gp210 και του υποδοχέα της Lamin B παρουσιάζονται περίπου στο 10% των ασθενών με PBC. Αυτά τα αντισώματα είναι ειδικά για τη διάγνωση της PBC και μπορεί να είναι χρήσιμα για τη διάγνωση ασθενών με αρνητικά αντιμιτοχονδριακά αυτοαντισώματα και στον εντοπισμό μιας υποομάδας ασθενών με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης αρθρίτιδας (275).

Ωστόσο, το 2001, οι Invernizzi et al. (268) έπειτα από μελέτη 171 ασθενών με PBC και 230 ατομων ελέγχου (53 υγιή άτομα και 177 ασθενείς με άλλα ηπατικά νοσήματα), ανέφεραν μία συσχέτιση ανάμεσα στα αντισώματα των πυρηνικών πόρων (NPC) με τη σοβαρότητα της νόσου, η οποία επιβεβαιώθηκε, ιδίως για τα αντί-gp210 αντισώματα, σε Ιταλούς ασθενείς με PBC δύο χρόνια αργότερα από τους Muratori P et al (270).

Και έκτοτε ακολούθησαν και άλλες μελέτες με σκοπό να διερευνήσουν τη σημασία των διάφορων τύπων ANA στην έκβαση της νόσου (268, 270, 282, 283, 337).

Οι ως τώρα μελέτες έχουν δείξει ότι οι αντί-NPC (283) και οι αντί-gp210 θετικοί (282, 337) ασθενείς βρίσκονται σε μεγαλύτερο ιστολογικό στάδιο σε σχέση με τους αρνητικούς για αυτά τα αντισώματα ασθενείς, κάτι που επιβεβαιώνεται και στη δική μας μελέτη.

Επίσης τα δεδομένα μας ενισχύουν την ήδη (338, 339) υπάρχουσα άποψη ότι οι αντί-gp210 θετικοί ασθενείς έχουν υψηλότερο Mayo risk score σε σχέση με τους αντί-gp210 αρνητικούς. Αν και οι Invernizzi et al (268) είχαν βρει ότι γενικά οι αντί-NPC θετικοί ασθενείς είναι εκείνοι που έχουν το υψηλότερο Mayo risk score.

Μερικά χρόνια αργότερα οι Wesierska-Gadek J et al (283) δημοσίευσαν μία μελέτη, η οποία αφορούσε τα αντί-NPC αντισώματα σε 127 ασθενείς με PBC, οι οποίοι ήταν υπό παρακολούθηση για μια δεκαπενταετία και τα συσχέτισαν με πιο δυσμενή κλινική πορεία και με ταχύτερη εξέλιξη της νόσου, κυρίως σε

ασθενείς που βρίσκονται σε πρώιμο ιστολογικό στάδιο κατά τη διάγνωση και έχουν χολερυθρίνη >1 mg/dl.

Σε Αμερικανούς και Καναδούς ασθενείς, τα ANA συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο για ηπατική ανεπάρκεια. Πράγματι, χρησιμοποίησαν την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού σε εμπορικά διαθέσιμα κύτταρα Hep 2 για τον προσδιορισμό ANAs σε 492 ασθενείς με PBC. Το 41% των ANA-θετικών ασθενών ανέπτυξε ανεπάρκεια ήπατος έναντι του 25% των ANA-αρνητικών ασθενών με PBC ($p=0,005$). Η παρουσία αντίκεντρομεριδιακών (ACA) αντισωμάτων συσχετίστηκε με ηπατική ανεπάρκεια (αντί-κεντρομερίδιο θετικοί 58% έναντι 33% των αρνητικών, $p= 0,001$), ενώ για τις άλλες κατηγορίες των ANA (NPC, homogeneous, speckled και nuclear body) δεν βρήκαν κάποια συσχέτιση μεταξύ αυτών των αντισωμάτων και την ανάπτυξη ηπατικής ανεπάρκειας, αν και το 43% των αντί-NPC θετικών ασθενών ανέπτυξε ηπατική ανεπάρκεια έναντι του 35% των αντί-NPC αρνητικών, ωστόσο, η διαφορά αυτή δεν φτάνει την στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα ANAs εν γένει, και τα αντί-κεντρομεριδίου αντισώματα ειδικότερα, σχετίζονται με ηπατική ανεπάρκεια στην PBC. (340).

Επίσης είναι λίγες οι μελέτες όπου έχει γίνει συσχετισμός μεταξύ των αντισωμάτων και των ιστολογικών χαρακτηριστικών.

Οι Invernizzi et al (268) συγκρίνανε τα ιστολογικά χαρακτηριστικά σε 13 θετικούς για τα αντί-NPC αντισώματα και σε 13 αρνητικούς ασθενείς, οι οποίοι ταίριαζαν ως προς το φύλο, το Mayo risk score και την παρουσία ή μη κίρρωσεως. Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά που μελέτησαν ήταν η φλεγμονή στο πυλαίο διάστημα, η λεμφομονοκυττάρια διήθηση, η πλασματοκυτταρική διήθηση, η ηωσινόφιλη διήθηση, η ουδετερόφιλη διήθηση, η περιπυλαία ηπατίτιδα, η λοβιακή νέκρωση, η ίνωση και η βλάβη των χοληφόρων. Οι αντί-NPC θετικοί ασθενείς είχαν μεγαλύτερου βαθμού φλεγμονή στο πυλαίο διάστημα και μεγαλύτερη ηωσινόφιλη διήθηση σε σχέση με τους αντί-NPC αρνητικούς ασθενείς.

Οι Nakamura et al (282, 337) σε δύο μελέτες τους έδειξαν ότι οι αντί-gr210 θετικοί ασθενείς έχουν μεγαλύτερου βαθμού περιπυλαία ηπατίτιδα και λοβιακή φλεγμονή.

Αυτά τα ευρήματα έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της δικιά μας μελέτης όπου βρήκαμε ότι γενικά οι ANEA θετικοί ασθενείς έχουν μεγαλύτερου βαθμού ίνωση, φλεγμονή στο πυλαίο διάστημα, περιπυλαία ηπατίτιδα και πολλαπλασιασμό των χοληφόρων, τα ίδια αποτελέσματα έδωσαν και οι ANEA θετικοί ασθενείς οι οποίοι είναι αρνητικοί για τα αντί-gr210 αντισώματα, όταν αυτοί συγκρίθηκαν με τους ANEA αρνητικούς ασθενείς.

Επίσης οι Nakamura et al (337) ανέφεραν ότι σε μια μελέτη όπου συμμετείχαν 276 Ιάπωνες ασθενείς με PBC η επικράτηση για τα αντί-gr210 αντισώματα ήταν 26%, ποσοστό παρόμοιο με το δικό μας 21%. Στη μελέτη αυτή, η παρουσία των αντί-gr210 αντισωμάτων σχετιζόταν με την επιβίωση και με ηπατική ανεπάρκεια καθώς η νόσος εξελίσσονταν.

Αντίθετα σε μια μελέτη ομάδας 332 ασθενών με PBC συμπεριλαμβανομένων 170 από τη Βαρκελώνη, Ισπανία και 162 από τη Λάρισα, Ελλάδα μόνο το 10,4% των ασθενών ήταν αντί-gr210 θετικοί. Στη μελέτη αυτή δεν υπήρχε συσχέτιση ανάμεσα στην επιβίωση και την παρουσία αντί-gr210 αντισωμάτων και επιπλέον οι αντί-gr210 θετικοί ασθενείς δεν είχαν σοβαρότερα ιστολογικά ευρήματα σε σχέση με τους αντί-gr210 αρνητικούς ασθενείς, εν αντιθέσει είχε αναφερθεί μία συσχέτιση με την παρουσία αντί-gr210 αντισωμάτων με το Mayo risk score ($5,2 \pm 1$ έναντι $4,2 \pm 0,7$, $P < 0,012$), ALP και τη χολερυθρίνη. Η αντί-gr210 θετικότητα δεν προβλέπει κακή έκβαση (επιβίωση, ανάγκη για μεταμόσχευση, θάνατο που σχετίζεται με το ήπαρ) ούτε ορίζει ιστολογική σοβαρότητα της νόσου (338).

Οι συγγραφείς της παραπάνω μελέτης, υποστήριξαν ότι, η χαμηλή επικράτηση των αντί-gr210 αντισωμάτων θα μπορούσε να είναι μια εθνική ή γεωγραφική ιδιομορφία και ότι, αν και τα αντί-gr210 αντισώματα αποτελούν ένα δείκτη σοβαρότητας της νόσου, δεν αποτελούν προγνωστικό παράγοντα.

Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας σε ότι αφορά την επικράτηση των αντί-gr210 αντισωμάτων, χρησιμοποιώντας το ίδιο ELISA kit σε έναν ομοιογενή Ελληνικό πληθυσμό από το νησί της Κρήτης, είναι παρόμοια με τα αποτελέσματα της ιαπωνικής μελέτης.

Πράγματι, στην παρούσα μελέτη βρήκαμε ότι 46,9% των ασθενών ήταν ANEA θετικοί και 21% αυτών ήταν αντί-gr210 θετικοί. Επιπλέον οι ANEA θετικοί ασθενείς έχουν μικρότερη περίοδο επιβίωσης από τους ANEA αρνητικούς ασθενείς και η παρουσία των αντί-gr210 αντισωμάτων είναι ένας παράγοντας ο οποίος μειώνει επιπλέον την επιβίωση. Επίσης οι ANEA θετικοί ασθενείς πεθαίνουν συχνότερα από ηπατική ανεπάρκεια και/ή ΗΚΚ ενώ οι ANEA αρνητικοί ασθενείς πεθαίνουν συχνότερα από κίρσοραγία.

Στη δική μας μελέτη για πρώτη φορά έγινε δοκιμή ταυτοποίησης των κυττάρων στόχων στο ήπαρ των ασθενών, των αυτοαντισωμάτων που βρίσκονται στον ορό. Ως τώρα δύο μόνο μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει τομές παραφίνης ως υπόστρωμα για την ανίχνευση αντισωμάτων. Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις έχει γίνει ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα που έχουν παραχθεί είτε σε ποντίκια είτε έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο.

Η πρώτη μελέτη έγινε χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα παραγμένα από ποντίκια, είτε με ανασυνδυασμένα ανθρώπινα αντισώματα έναντι της υπομονάδας E2 της πυροσταφυλικής δεϋδρογενάσης (PDC-E2). Στην οποία βρέθηκε ότι στην προς τον αυλό των χολαγγείων μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων των AMA-αρνητικών ασθενών, εκφράζεται μιτοχονδριακό αντιγόνο όπως ακριβώς συμβαίνει και με τους AMA-θετικούς ασθενείς (88).

Σε μία μεταγενέστερη μελέτη οι Nakamura M et al ξεκινώντας από την παραδοχή ότι η παρουσία αντί-gr210 αντισωμάτων δείχνει μια υποομάδα ασθενών με PBC οι οποίοι διατρέχουν υψηλό κίνδυνο για την εξέλιξη σε τελικού σταδίου ηπατική ανεπάρκεια, αποφάσισαν να μελετήσουν με

ανοσοϊστοχημεία την έκφραση του gp210 αντιγόνου σε βιοψίες ήπατος ασθενών με PBC χρησιμοποιώντας ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την gp210, το οποίο παρασκεύασαν οι ίδιοι. Χρησιμοποίησαν τόσο βιοψίες ασθενών με PBC όσο βιοψίες ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα (AIH), χρόνια ιογενή ηπατίτιδα Β (CHB) και C (CHC), ως άτομα ελέγχου. Η έκφραση του αντιγόνου της gp210 ήταν προφανώς αυξημένη στον πυρηνικό φάκελο των επιθηλιακών κυττάρων των μικρών χοληφόρων (BECs) σχεδόν σε όλα τα δείγματα των ασθενών με PBC. Αντίθετα, η έκφραση της gp210 ήταν αρνητική στα BECs των μικρών χοληφόρων σε φυσιολογικό ήπαρ, ενώ σχετικά αδύναμη ανοσολογική απόκριση για τα αντί-gp210 αντισώματα παρατηρήθηκαν σε AIH, CHC και CHB. Επιπλέον, ο βαθμός της έκφρασης της gp210 στα BECs των μικρών χοληφόρων συσχετίστηκαν θετικά με την πυλαία φλεγμονή, περιπυλαία ηπατίτιδα και την φλεγμονή στο λοβίο των ασθενών με PBC. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η αυξημένη έκφραση της gp210 στα μικρά χοληφόρα, η οποία συνδέεται πιθανώς με βλάβη των BECs λόγω φλεγμονής, συμμετέχει ενδεχομένως στην αυτοάνοση απάντηση της gp210 που οδηγεί στην εξέλιξη σε τελικού σταδίου ηπατική ανεπάρκεια στην PBC (341).

Στη δική μας μελέτη χρησιμοποιήσαμε τομές παραφίνης και τον ανθρώπινο ορό με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού για να εντοπίσουμε τα αντιγόνα που αποτελούν τον στόχο των αντισωμάτων που περιέχονται στον ορό.

Όταν ο ορός ασθενών με PBC χρησιμοποιηθεί με ομόλογο ιστό παρατηρούμε ότι το 47,6% αυτών των ορών δίνει θετική χρώση στα λεμφοκύτταρα, το 38% στα χοληφόρα, το 33,3% στα ηπατοκύτταρα και το 85,7% στα κολποειδή του ήπατος. Ενώ όταν χρησιμοποιηθούν οι ίδιοι οροί σε ιστό άλλου ασθενούς με PBC ή σε ασθενείς με άλλες ηπατικές νόσους ή σε ιστό υγιούς τότε για τη μεν πρώτη περίπτωση τα ποσοστά μειώνονται στο 20%, 20%, 13,3% και στο 20% αντίστοιχα, στη δεύτερη περίπτωση μηδενίζονται κάτι ανάλογο θα περιμέναμε και στην περίπτωση που χρησιμοποιήσαμε ιστό υγιούς, η υπόθεση που κάναμε επιβεβαιώθηκε μόνο σε ότι αφορά τα λεμφοκύτταρα, τα ηπατοκύτταρα και τα κολποειδή του

ήπατος, αλλά όχι και τα χοληφόρα όπου ανιχνεύτηκε θετική χρώση στο 14,3% των περιπτώσεων.

Όταν χρησιμοποιήθηκε ορός υγιούς σε ιστό ασθενών με PBC και σε άτομα με άλλα ηπατικά νοσήματα, στη μεν πρώτη περίπτωση μόνο σε 1 ιστό (14,3%) ανιχνεύτηκε θετικότητα στα κολποειδή του ήπατος ενώ σε όλες τις άλλες περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε θετική χρώση σε κανένα είδος κυττάρων και ιστών.

Οι οροί από άτομα με άλλες ηπατικές νόσους, όπως η χρόνια ιογενής ηπατίτιδα Β και η στεατοηπατίτιδα σε ιστό ασθενών με PBC και σε ιστό ασθενών με άλλα ηπατικά νοσήματα, δεν αναμενόταν να δώσουν κάποια θετική χρώση, παρά ταύτα οι οροί ασθενών με χρόνια ιογενής ηπατίτιδα Β έδωσαν θετική χρώση σε ποσοστό 16,7% στα λεμφοκύτταρα των ιστών των ασθενών με PBC, αλλά όχι στα λεμφοκύτταρα των ασθενών με άλλες ηπατικές νόσους. Επίσης έδωσαν θετική χρώση στο 16,7% των ηπατοκυττάρων των ιστών των ασθενών με PBC και στο 20% των ηπατοκυττάρων ασθενών με άλλες ηπατικές νόσους. Για τα κολποειδή του ήπατος τα ποσοστά ήταν 16,6% και 20% αντίστοιχα, ενώ για τα χοληφόρα ανιχνεύτηκε θετική χρώση σε ποσοστό 30% μόνο στους ιστούς ασθενών με άλλες ηπατικές νόσους.

Φυσικά παραμένει το πρόβλημα ,εάν τά αντισώματα πού κυκλοφορούν στον ορό ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β και αντιδρούν είτε με τα κύτταρα των κολποειδών, είτε με τά ενδοηπατικά χολαγγεία αναγνωρίζουν τους ίδιους επιτόπους με τά κυκλοφορούντα στην Πρωτογενή χολική κίρρωση. Το πρόβλημα αυτό απαιτεί περαιτέρω μελέτη.

Αντιθέτως ο ορός ασθενούς με στεατοηπατίτιδα έδωσε θετικότητα σε λεμφοκύτταρα και ηπατοκύτταρα σε ένα από τους δύο ιστούς ασθενών με PBC που μελετήθηκαν ενώ δεν έδωσε θετική χρώση σε κανένα είδος κυττάρου στους ιστούς ασθενών με άλλα ηπατικά νοσήματα.

Σε ότι αφορά τα αυτοαντισώματα έναντι των ανοσοσφαιρίνων τύπου IgM, χρησιμοποιώντας ορό ασθενών με PBC σε ομόλογο ιστό, τα ποσοστά διαφοροποιούνται από εκείνα για τις ανοσοσφαιρίνες τύπου IgG και έτσι έχουμε (75%) θετική χρώση σε λεμφοκύτταρα, (62,5%) σε χοληφόρα, (37,5%) σε ηπατοκύτταρα και (50%) στα κολποειδή του ήπατος.

Η διαφορά ανάμεσα στα ποσοστά των IgM και IgG ανοσοσφαιρινών μπορεί να οφείλεται σε δύο λόγους. Ο ένας είναι ότι ενώ για τις IgG ανοσοσφαιρίνες εξετάσαμε 21 ασθενείς για τις ανοσοσφαιρίνες τύπου IgM εξετάσαμε μόλις 8 ασθενείς.

Και ο δεύτερος λόγος είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι οι ασθενείς με PBC εκφράζουν περισσότερο ανοσοσφαιρίνες τύπου IgM (342, 343)

7.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, τα δεδομένα μας επιβεβαιώνουν ότι στους Έλληνες ασθενείς με PBC υπάρχει συσχέτιση των αντισωμάτων ANEA με τη σοβαρότητα της νόσου και μικρότερη επιβίωση. Καθώς επίσης οι θετικοί ασθενείς πεθαίνουν πιο συχνά από ηπατική ανεπάρκεια και / ή ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα σε σχέση με τους ANEA αρνητικούς οι οποίοι πεθαίνουν πιο συχνά από κίρρωση. Η παρουσία των αντί-gp210 αντισωμάτων στους ασθενείς μας, σε παρόμοια συχνότητα με τους ασθενείς από την Ασία, φαίνεται να είναι ένας επιπλέον παράγοντας ο οποίος, μειώνει την επιβίωση.

Ως εκ τούτου προτείνουμε ότι η παρουσία των ANEA και των gp210 αντισωμάτων πρέπει να ελέγχονται τακτικά, καθώς η παρουσία τους προσδιορίζει μια υποομάδα ασθενών με PBC με κακή πρόγνωση. Ο μηχανισμός που βασίζεται στη σύνδεση των ANEA με την πρόγνωση πρέπει να διευκρινιστεί περαιτέρω.

Η μελέτη των ιστών έδειξε ότι στην πρωτογενή χολική κίρρωση κυκλοφορούν στον ορό πληθώρα αντισωμάτων κατευθυνόμενα εναντίον λεμφοκυττάρων, κυττάρων χοληφόρων και ηπατοκυττάρων. Παρόμοια αντισώματα ανιχνεύτηκαν σε χαμηλότερο ποσοστό και σε ορό ασθενών με άλλες ηπατικές νόσους. Εν τούτοις αντισώματα κατά των κολποειδικών κυττάρων φαίνεται ότι είναι χαρακτηριστικά για την πρωτογενή χολική κίρρωση, όπως φαίνεται από την αδρή αυτή μελέτη. Έναντι ποιων κυττάρων των κολποειδών κατευθύνονται τα αντισώματα αυτά και η ειδικότητά τους χρήζει περαιτέρω μελέτης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτοπαθής χολική κίρρωση (PBC) είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος του ήπατος, πιθανόν αυτοάνοσης αιτιολογίας. Χαρακτηρίζεται από καταστροφή των μικρών ενδοηπατικών χοληφόρων αγγείων και έχει ως συνέπεια την χολόσταση, ίνωση, κίρρωση και ηπατική ανεπάρκεια.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι :

- Ο προσδιορισμός της συχνότητας εμφάνισης, στους ορούς ασθενών με PBC, αυτοαντισωμάτων που αναγνωρίζουν αντιγόνα του πυρηνικού φακέλου.
- Στην διερεύνηση της σημασίας της συχνότητας εμφάνισης αυτών των αυτοαντισωμάτων, στην διάγνωση, πρόγνωση και κλινική πορεία των ασθενών με PBC
- Δημιουργία βάσης δεδομένων των ασθενών, όπου αναγράφονται τα κλινικό-εργαστηριακά στοιχεία, ιστολογικά χαρακτηριστικά καθώς και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.
- Προσδιορισμός του είδους των κυττάρων που αποτελούν στόχο των αυτοαντισωμάτων που περιέχονται σε ορούς ασθενών

Μεθοδολογία

Για την ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι του πυρηνικού φακέλου (ANEA) έγινε έμμεσος ανοσοφθορισμός (IIF) σε κύτταρα Hep2 καλλιεργημένα στο εργαστήριο. Η ανίχνευση των αντισωμάτων gp210 έγινε με την εμπορικώς διαθέσιμη ELISA της Quanta lite™. Επίσης για τον προσδιορισμό των ειδών των κυττάρων που αποτελούν στόχο των αυτοαντισωμάτων που περιέχονται σε ορούς ασθενών έγινε έμμεσος ανοσοφθορισμός σε τομές παραφίνης.

Τα διάφορα κλινικά, ιστολογικά και ορολογικά χαρακτηριστικά συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης. Το Fisher's exact test χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των αιτιών θανάτου μεταξύ ANEA θετικών και αρνητικών και gp-210 θετικών και αρνητικών ασθενών. Ο χρόνος επιβίωσης υπολογίστηκε με την μέθοδο Kaplan-Meier και συγκρίθηκε με το Breslow τεστ. Τιμή $p < 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

Αποτελέσματα

ANEΑ ανιχνεύτηκαν στο 46,9 % των ασθενών. Οι ANEA θετικοί ασθενείς είχαν μικρότερη περίοδο επιβίωσης σε σχέση με τους ANEA αρνητικούς ασθενείς, είχαν υψηλότερους τίτλους AMA, βρισκόταν σε προχωρημένο ιστολογικό στάδιο, καθώς επίσης πεθαίνουν συχνότερα από ηπατική ανεπάρκεια και /ή ΗΚΚ, ενώ οι ANEA αρνητικοί ασθενείς πεθαίνουν συχνότερα από κίρσοραγία. Επίσης, οι ANEA θετικοί ασθενείς είχαν υψηλότερου βαθμού ίνωση, φλεγμονή στο πυλαίο διάστημα, περιπυλαία ηπατίτιδα και πολλαπλασιασμό των χοληφόρων σε σχέση με τους ANEA αρνητικούς ασθενείς.

Από τους 69 ANEA θετικούς ασθενείς οι 38 (55,1%) ήταν αρνητικοί για τα αντί-gr210 αντισώματα και οι 31 (44,9%) ήταν θετικοί, που αντιπροσωπεύουν το 21% του συνόλου των ασθενών που μελετήθηκαν.

Οι αντί-gr210 θετικοί ασθενείς είχαν υψηλότερο Mayo risk score σε σχέση με τους ANEA θετικούς, αντί-gr210 αρνητικούς ασθενείς.

Οι αντί-gr210 θετικοί ασθενείς εν συγκρίση με τους ANEA αρνητικούς ασθενείς είχαν σημαντικά υψηλότερο τίτλο AMA, υψηλότερο Mayo risk score, μικρότερη επιβίωση και βρίσκονταν σε πιο προχωρημένο στάδιο της νόσου.

Συγκρίνοντας τους 78 ANEA αρνητικούς ασθενείς με τους 38 ANEA θετικούς gr210-αρνητικούς ασθενείς, βρήκαμε ότι οι ANEA αρνητικοί ασθενείς έχουν στατιστικής σημαντικότητας χαμηλότερο τίτλο AMA και βρίσκονται σε πρωιμότερο ιστολογικό στάδιο. Οι ANEA αρνητικοί ασθενείς είχαν, λιγότερο σοβαρή ίνωση, μικρότερου βαθμού φλεγμονή στο πυλαίο διάστημα, μικρότερου βαθμού περιπυλαία ηπατίτιδα και λιγότερο πολλαπλασιασμό των χοληφόρων.

Στο σύνολο τους δοκιμάστηκαν 21 ιστοί με ομόλογο ορό ασθενών με PBC. Από αυτούς το 47,6% έδωσε χρώση στα λεμφοκύτταρα, το 38% στα χοληφόρα, το 33,3% στα ηπατοκύτταρα και το 85,7% στα κολλοειδή του ήπατος.

Ο ορός PBC με ετερόλογο ιστό PBC μειώνει τα παραπάνω ποσοστά στο 20% για τα λεμφοκύτταρα, στο 20% για τα χοληφόρα, στο 13,3% για τα ηπατοκύτταρα και στο 20% για τα κολλοειδή του ήπατος.

Όταν χρησιμοποιήθηκε ορός υγιούς σε ιστό ασθενών με PBC υπήρξε θετική χρώση σε ποσοστό 14,3% στα κολποειδή του ήπατος. Όταν όμως, χρησιμοποιήθηκαν οροί ασθενών με PBC στον ίδιο ιστό υγιούς, τότε οι οροί 3 ασθενών (14,3%), έδωσαν θετική χρώση στα χοληφόρα του ιστού.

Οι οροί ασθενών με disease control (χρόνια ιογενή ηπατίτιδα Β και στεατοηπατίτιδα) σε ιστούς με disease control (στεατοηπατίτιδα, οξεία αλκοολική ηπατίτιδα, χρόνια ιογενή ηπατίτιδα Β και C) έδωσαν τα παρακάτω αποτελέσματα: Οι 2 στους 3 ορούς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα Β που χρησιμοποιήθηκαν έδωσαν θετικό φθορισμό στα κολποειδή του ήπατος του ιστού του ασθενούς με στεατοηπατίτιδα, αλλά κυρίως πρόκειται για ενδοκολποειδικά λεμφοκύτταρα και όχι για κύτταρα κολποειδών, ενώ 2 στους 3 ορούς έδωσαν θετική χρώση σε χοληφόρα και ηπατοκύτταρα σε ιστό ασθενούς με οξεία αλκοολική ηπατίτιδα και ο ένας από τους παραπάνω ορούς έδωσε επιπλέον θετική χρώση σε χοληφόρα ασθενούς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα Β.

Σε ιστό 8 ασθενών με PBC κάναμε ανοσοφθορισμό για το έλεγχο των IgM αυτοαντισωμάτων, χρησιμοποιώντας ομόλογο ορό. Από αυτούς το 75% έδωσε θετική χρώση σε λεμφοκύτταρα, το 62,5% σε χοληφόρα, το 37,5% σε ηπατοκύτταρα και το 50% στα κολποειδή του ήπατος.

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, τα δεδομένα μας επιβεβαιώνουν ότι στους Έλληνες ασθενείς με PBC υπάρχει συσχέτιση των αντισωμάτων ANEA με τη σοβαρότητα της νόσου και μικρότερη επιβίωση. Η παρουσία των αντί-gp210 αντισωμάτων φαίνεται να είναι ένας επιπλέον παράγοντας ο οποίος, μειώνει την επιβίωση.

Η μελέτη των ιστών έδειξε ότι αντισώματα κατά των κολποειδικών κυττάρων φαίνεται ότι είναι χαρακτηριστικά για την πρωτογενή χολική κίρρωση, όπως φαίνεται από την αδρή αυτή μελέτη.

ABSTRACT

Primary biliary cirrhosis (PBC) is a chronic inflammatory liver disease of probable autoimmune etiology. It is characterized by destruction of small intrahepatic bile ducts and lead to cholestasis, fibrosis, cirrhosis and liver failure.

Aim

The aim of this study is:

- The determination of the frequency of the autoantibodies that recognize antigens of the nuclear envelope, in the sera of patients with PBC.
- To investigate the importance of the incidence of these autoantibodies in the diagnosis, prognosis and clinical course of patients with PBC.
- Creation of a Data base of patients showing the clinical-laboratory data, histological features and the results of this study.
- Try to identify the cell types targeted by autoantibodies present in patient sera.

Methods

The detection of antibodies against antigens of the nuclear envelope (ANEA) was performed an indirect immunofluorescence (IIF) in Hep2 cells cultured in the laboratory. The detection of gp210 antibodies was performed using the commercially available ELISA of Quanta lite™. Also, to identify the cell types targeted by autoantibodies present in patient sera was performed an indirect immunofluorescence on paraffin sections.

Various clinical, histological, and serological measurements were compared using multivariate regression analysis. Fisher's exact test was used to compare causes of death between ANEA positive and negative and gp-210 positive and negative patients. The survival time was estimated by the Kaplan-Meier method, and compared by the Breslow test. A *P* value < 0.05 was considered significant.

Results

ANEA were detected in 46.9% of patients. The ANEA positive patients had a shorter survival period compared with the ANEA negative ones, had higher AMA titers, they were in advanced histological stage and also they die more

frequently of hepatic failure and/or hepatocellular carcinoma (HCC), while ANEA negative patients die more frequently as a result of variceal bleeding. Also, ANEA positive patients had more severe fibrosis, portal inflammation, interface hepatitis and proliferation of bile ductules than the ANEA negative ones.

From the 69 ANEA positive patients the 38 (55.1%) were negative for the anti-gp210 antibodies and the 31 (44.9%) were positive, representing 21% of all studied patients.

The anti-gp210 positive patients had higher Mayo risk score than the ANEA positive, anti-gp210 negative patients.

The anti-gp210 positive patients compared with the ANEA negative ones had significantly higher AMA titer, higher Mayo risk score, shorter survival period and they were in advanced histological stage.

Comparing the 78 ANEA negative patients with the 38 ANEA positive gp210-negative patients, we found that ANEA negative ones had statistically significant lower AMA titers and were at an earlier histological stage. The ANEA negative patients had less severe fibrosis, portal inflammation, interface hepatitis, and proliferation of bile ductules.

A total of 21 tissues were tested with homologous serum of patients with PBC. Of these, 47.6% gave staining in lymphocytes, 38% in cholangiocytes, 33.3% in the hepatocytes, and 85.7% in sinusoidal cells.

PBC serum with a heterologous PBC tissue reduces the above rates at 20% for lymphocytes, 20% for the cholangiocytes, 13.3% for the hepatocytes and 20% for the sinusoidal cells.

When was used healthy serum in PBC patient tissue there was positive staining at a percentage of 14.3% in sinusoidal cells. However, when PBC patient sera were used in the same healthy tissue, then the sera of 3 (14.3%) patients gave positive staining in cholangiocytes of the tissue.

When, patient sera with disease control (chronic viral hepatitis B and steatohepatitis) were used with tissues with disease control (steatohepatitis, acute alcoholic hepatitis, chronic viral hepatitis B and C) gave the following results: 2 out of 3 sera with chronic viral hepatitis B that were used gave positive fluorescence in liver sinusoids of patient with steatohepatitis, but

mostly in sinusoidal lymphocytes and not in sinusoidal cells, while 2 out of 3 sera gave positive staining in cholangiocytes and hepatocytes in acute alcoholic hepatitis patient tissue and one of these sera also gave positive staining in cholangiocytes of patient with chronic viral hepatitis B.

A total of 8 PBC patient tissues were used in order to detect IgM autoantibodies using homologous serum. Of these 75% gave positive staining in lymphocytes, 62.5% in cholangiocytes, 37.5% in hepatocytes and 50% in sinusoidal cells.

Conclusions

In conclusion, our data confirm that, in Greek PBC patients, there is a correlation between the presence of ANEA antibodies and disease severity and shorter survival. The presence of anti-gp210 seems to be an additional factor, reducing survival.

The study of the tissues showed that antibodies against sinusoidal cells appear to be characteristic of primary biliary cirrhosis, as shown by this rough study.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Addison T, Gull W. On a certain affection of the skin-vitiligoidea- α -plana B-tuberosa., 7 ed 1851. p. 265-277.
- (2) Dauphinee JA, Sinclair JC. Primary biliary cirrhosis. Can Med Assoc J 1949 Jul;61(1):1-6.
- (3) Ahrens EH, Jr., Payne MA, Kunkel HG, Eisenmenger WJ, Blondheim SH. Primary biliary cirrhosis. Medicine (Baltimore) 1950 Dec;29(4):299-364.
- (4) Sherlock S. Primary biliary cirrhosis (chronic intrahepatic obstructive jaundice)., 37 ed 1959. p. 574-586.
- (5) Walker JG, Doniach D, Roitt IM, Sherlock S. Serological Tests In Diagnosis Of Primary Biliary Cirrhosis. Lancet 1965 Apr 17;1(7390):827-831.
- (6) Berg PA, Doniach D, Roitt IM. Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. I. Localization of the antigen to mitochondrial membranes. J Exp Med 1967 Aug 1;126(2):277-290.
- (7) Mackay IR. Autoimmunity and primary biliary cirrhosis. Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol 2000 Aug;14(4):519-533.
- (8) Dahlan Y, Smith L, Simmonds D, Jewell LD, Wanless I, Heathcote EJ, et al. Pediatric-onset primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 2003 Nov;125(5):1476-1479.
- (9) Sakauchi F, Mori M, Zeniya M, Toda G. A cross-sectional study of primary biliary cirrhosis in Japan: utilization of clinical data when patients applied to receive public financial aid. J Epidemiol 2005 Jan;15(1):24-28.

- (10) Muratori P, Granito A, Pappas G, Muratori L, Quarneti C, De MC, et al. Clinical and serological profile of primary biliary cirrhosis in men. *QJM* 2007 Aug;100(8):534-535.
- (11) Selmi C, Invernizzi P, Zuin M, Podda M, Gershwin ME. Genetics and geoepidemiology of primary biliary cirrhosis: following the footprints to disease etiology. *Semin Liver Dis* 2005 Aug;25(3):265-280.
- (12) Kaplan MM. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 1987 Feb 26;316(9):521-528.
- (13) Hamlyn AN, Sherlock S. The epidemiology of primary biliary cirrhosis: a survey of mortality in England and Wales. *Gut* 1974 Jun;15(6):473-479.
- (14) James OF, Bhopal R, Howel D, Gray J, Burt AD, Metcalf JV. Primary biliary cirrhosis once rare, now common in the United Kingdom? *Hepatology* 1999 Aug;30(2):390-394.
- (15) Lazaridis KN, Talwalkar JA. Clinical epidemiology of primary biliary cirrhosis: incidence, prevalence, and impact of therapy. *J Clin Gastroenterol* 2007 May;41(5):494-500.
- (16) Parikh-Patel A, Gold E, Mackay IR, Gershwin ME. The geoepidemiology of primary biliary cirrhosis: contrasts and comparisons with the spectrum of autoimmune diseases. *Clin Immunol* 1999 May;91(2):206-218.
- (17) Crosignani A, Battezzati PM, Invernizzi P, Selmi C, Prina E, Podda M. Clinical features and management of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2008 Jun 7;14(21):3313-3327.
- (18) Watson RG, Angus PW, Dewar M, Goss B, Sewell RB, Smallwood RA. Low prevalence of primary biliary cirrhosis in Victoria, Australia. Melbourne Liver Group. *Gut* 1995 Jun;36(6):927-930.

- (19) Kumagi T, Heathcote EJ. Primary biliary cirrhosis. *Orphanet J Rare Dis* 2008;3:1.
- (20) Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 2005 Sep 22;353(12):1261-1273.
- (21) Prince MI, James OF. The epidemiology of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2003 Nov;7(4):795-819.
- (22) Myszor M, James OF. The epidemiology of primary biliary cirrhosis in north-east England: an increasingly common disease? *Q J Med* 1990 Apr;75(276):377-385.
- (23) Van de Water J, Cooper A, Surh CD, Coppel R, Danner D, Ansari A, et al. Detection of autoantibodies to recombinant mitochondrial proteins in patients with primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 1989 May 25;320(21):1377-1380.
- (24) Corpechot C, Poujol-Robert A, Wendum D, Galotte M, Chretien Y, Poupon RE, et al. Biochemical markers of liver fibrosis and lymphocytic piecemeal necrosis in UDCA-treated patients with primary biliary cirrhosis. *Liver Int* 2004 Jun;24(3):187-193.
- (25) Poupon R, Chazouilleres O, Balkau B, Poupon RE. Clinical and biochemical expression of the histopathological lesions of primary biliary cirrhosis. UDCA-PBC Group. *J Hepatol* 1999 Mar;30(3):408-412.
- (26) Christensen E, Neuberger J, Crowe J, Portmann B, Williams R, Altman DG, et al. Azathioprine and prognosis in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1986 Feb;90(2):508-509.
- (27) Sorokin A, Brown JL, Thompson PD. Primary biliary cirrhosis, hyperlipidemia, and atherosclerotic risk: a systematic review. *Atherosclerosis* 2007 Oct;194(2):293-299.

- (28) Lindor KD, Gershwin ME, Poupon R, Kaplan M, Bergasa NV, Heathcote EJ. Primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2009 Jul;50(1):291-308.
- (29) Corpechot C, El NA, Poujol-Robert A, Ziol M, Wendum D, Chazouilleres O, et al. Assessment of biliary fibrosis by transient elastography in patients with PBC and PSC. *Hepatology* 2006 May;43(5):1118-1124.
- (30) Tadrus PJ GRD. How many portal tracts are necessary to make a diagnosis of significant bile duct loss (SBDL)?, 181 ed 1997. p. 11A.
- (31) Ludwig J, Dickson ER, McDonald GS. Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1978 Aug 22;379(2):103-112.
- (32) Scheuer P. Primary biliary cirrhosis. *Proc R Soc Med* 1967 Dec;60(12):1257-1260.
- (33) Popper H, Schaffner F. Nonsuppurative destructive chronic cholangitis and chronic hepatitis., 3 ed 1970. p. 336-354.
- (34) Popper H, Rubin E, Schaffner F. The problem of primary biliary cirrhosis. *Am J Med* 1962 Dec;33:807-810.
- (35) Rubin E, Schaffner F, Popper H. Localization of the basic injury in primary biliary cirrhosis. *JAMA* 1963 Feb 2;183:331-334.
- (36) Rubin E, Schaffner F, Popper H. Primary Biliary Cirrhosis. Chronic Non-Suppurative Destructive Cholangitis. *Am J Pathol* 1965 Mar;46:387-407.
- (37) Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines. *Hepatology* 2000 Apr;31(4):1005-1013.
- (38) Prince M, Chetwynd A, Newman W, Metcalf JV, James OF. Survival and symptom progression in a geographically based cohort of patients with

primary biliary cirrhosis: follow-up for up to 28 years. *Gastroenterology* 2002 Oct;123(4):1044-1051.

- (39) Nakano T, Inoue K, Hirohara J, Arita S, Higuchi K, Omata M, et al. Long-term prognosis of primary biliary cirrhosis (PBC) in Japan and analysis of the factors of stage progression in asymptomatic PBC (a-PBC). *Hepatol Res* 2002 Apr;22(4):250-260.
- (40) Milkiewicz P HE. Fatigue in chronic cholestasis. *Gut* 2004;53(4):475-477.
- (41) Prince MI, Chetwynd A, Craig WL, Metcalf JV, James OF. Asymptomatic primary biliary cirrhosis: clinical features, prognosis, and symptom progression in a large population based cohort. *Gut* 2004 Jun;53(6):865-870.
- (42) Cauch-Dudek K, Abbey S, Stewart DE, Heathcote EJ. Fatigue in primary biliary cirrhosis. *Gut* 1998 Nov;43(5):705-710.
- (43) Newton JL, Pairman J, Sutcliffe K, Wilton K, Jones DE. A predictive model for fatigue and its etiologic associations in primary biliary cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008 Feb;6(2):228-233.
- (44) Jones DE. Fatigue in cholestatic liver disease: is it all in the mind? *J Hepatol* 2007 Jun;46(6):992-994.
- (45) Elta GH, Sepersky RA, Goldberg MJ, Connors CM, Miller KB, Kaplan MM. Increased incidence of hypothyroidism in primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1983 Nov;28(11):971-975.
- (46) van OE, van den Broek WW, Mulder PG, ter Borg PC, Bruijn JA, van Buuren HR. Depression in patients with primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2007 Jun;46(6):1099-1103.
- (47) Hohenester S, Oude-Elferink RP, Beuers U. Primary biliary cirrhosis. *Semin Immunopathol* 2009 Sep;31(3):283-307.

- (48) Laurin JM, DeSotel CK, Jorgensen RA, Dickson ER, Lindor KD. The natural history of abdominal pain associated with primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1994 Oct;89(10):1840-1843.
- (49) Kremer AE, Beuers U, Oude-Elferink RP, Pusch T. Pathogenesis and treatment of pruritus in cholestasis. *Drugs* 2008;68(15):2163-2182.
- (50) Colina F, Pinedo F, Solis JA, Moreno D, Nevado M. Nodular regenerative hyperplasia of the liver in early histological stages of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1992 Apr;102(4 Pt 1):1319-1324.
- (51) Boyer TD, Kokenes DD, Hertzler G, Kutner MH, Henderson JM. Effect of distal splenorenal shunt on survival of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1994 Dec;20(6):1482-1486.
- (52) Thornton JR, Triger DR, Losowsky MS. Variceal bleeding is associated with reduced risk of severe cholestasis in primary biliary cirrhosis. *Q J Med* 1989 May;71(265):467-471.
- (53) Huet PM, Vincent C, Deslaurier J, Cote J, Matsutami S, Boileau R, et al. Portal hypertension and primary biliary cirrhosis: effect of long-term ursodeoxycholic acid treatment. *Gastroenterology* 2008 Nov;135(5):1552-1560.
- (54) Mayo MJ. Portal hypertension in primary biliary cirrhosis: a potentially reversible harbinger of demise. *Gastroenterology* 2008 Nov;135(5):1450-1451.
- (55) Levy C, Lindor KD. Management of osteoporosis, fat-soluble vitamin deficiencies, and hyperlipidemia in primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2003 Nov;7(4):901-910.
- (56) Springer JE, Cole DE, Rubin LA, Cauch-Dudek K, Harewood L, Evrovski J, et al. Vitamin D-receptor genotypes as independent genetic

predictors of decreased bone mineral density in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2000 Jan;118(1):145-151.

- (57) Menon KV, Angulo P, Weston S, Dickson ER, Lindor KD. Bone disease in primary biliary cirrhosis: independent indicators and rate of progression. *J Hepatol* 2001 Sep;35(3):316-323.
- (58) Hodgson SF, Dickson ER, Wahner HW, Johnson KA, Mann KG, Riggs BL. Bone loss and reduced osteoblast function in primary biliary cirrhosis. *Ann Intern Med* 1985 Dec;103(6 (Pt 1)):855-860.
- (59) Eastell R, Dickson ER, Hodgson SF, Wiesner RH, Porayko MK, Wahner HW, et al. Rates of vertebral bone loss before and after liver transplantation in women with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1991 Aug;14(2):296-300.
- (60) Kaplan MM, Elta GH, Furie B, Sadowski JA, Russell RM. Fat-soluble vitamin nutriture in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1988 Sep;95(3):787-792.
- (61) Matloff DS, Kaplan MM, Neer RM, Goldberg MJ, Bitman W, Wolfe HJ. Osteoporosis in primary biliary cirrhosis: effects of 25-hydroxyvitamin D3 treatment. *Gastroenterology* 1982 Jul;83(1 Pt 1):97-102.
- (62) Gregory WL, Game FL, Farrer M, Idle JR, Laker MF, James OF. Reduced serum lipoprotein(a) levels in patients with primary biliary cirrhosis. *Atherosclerosis* 1994 Jan;105(1):43-50.
- (63) Longo M, Crosignani A, Battezzati PM, Squarcia GC, Invernizzi P, Zuin M, et al. Hyperlipidaemic state and cardiovascular risk in primary biliary cirrhosis. *Gut* 2002 Aug;51(2):265-269.
- (64) Jahn CE, Schaefer EJ, Taam LA, Hoofnagle JH, Lindgren FT, Albers JJ, et al. Lipoprotein abnormalities in primary biliary cirrhosis. Association with hepatic lipase inhibition as well as altered cholesterol esterification. *Gastroenterology* 1985 Dec;89(6):1266-1278.

- (65) Crippin JS, Lindor KD, Jorgensen R, Kottke BA, Harrison JM, Murtaugh PA, et al. Hypercholesterolemia and atherosclerosis in primary biliary cirrhosis: what is the risk? *Hepatology* 1992 May;15(5):858-862.
- (66) Allocca M, Crosignani A, Gritti A, Ghilardi G, Gobatti D, Caruso D, et al. Hypercholesterolaemia is not associated with early atherosclerotic lesions in primary biliary cirrhosis. *Gut* 2006 Dec;55(12):1795-1800.
- (67) Kowdley KV, Emond MJ, Sadowski JA, Kaplan MM. Plasma vitamin K1 level is decreased in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1997 Nov;92(11):2059-2061.
- (68) Lanspa SJ, Chan AT, Bell JS, III, Go VL, Dickson ER, DiMagno EP. Pathogenesis of steatorrhea in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1985 Sep;5(5):837-842.
- (69) Phillips JR, Angulo P, Petterson T, Lindor KD. Fat-soluble vitamin levels in patients with primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2001 Sep;96(9):2745-2750.
- (70) Kaplan MM, Goldberg MJ, Matloff DS, Neer RM, Goodman DB. Effect of 25-hydroxyvitamin D3 on vitamin D metabolites in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1981 Oct;81(4):681-685.
- (71) Jeffrey GP, Muller DP, Burroughs AK, Matthews S, Kemp C, Epstein O, et al. Vitamin E deficiency and its clinical significance in adults with primary biliary cirrhosis and other forms of chronic liver disease. *J Hepatol* 1987 Jun;4(3):307-317.
- (72) Munoz SJ, Heubi JE, Balistreri WF, Maddrey WC. Vitamin E deficiency in primary biliary cirrhosis: gastrointestinal malabsorption, frequency and relationship to other lipid-soluble vitamins. *Hepatology* 1989 Apr;9(4):525-531.

- (73) Burroughs AK, Rosenstein IJ, Epstein O, Hamilton-Miller JM, Brumfitt W, Sherlock S. Bacteriuria and primary biliary cirrhosis. *Gut* 1984 Feb;25(2):133-137.
- (74) Goudie BM, Burt AD, Boyle P, Macfarlane G, Birnie GG, Mills PR, et al. Breast cancer in women with primary biliary cirrhosis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985 Dec 7;291(6509):1597-1598.
- (75) Wolke AM, Schaffner F, Kapelman B, Sacks HS. Malignancy in primary biliary cirrhosis. High incidence of breast cancer in affected women. *Am J Med* 1984 Jun;76(6):1075-1078.
- (76) Loof L, Adami HO, Sparen P, Danielsson A, Eriksson LS, Hultcrantz R, et al. Cancer risk in primary biliary cirrhosis: a population-based study from Sweden. *Hepatology* 1994 Jul;20(1 Pt 1):101-104.
- (77) Witt-Sullivan H, Heathcote J, Cauch K, Blendis L, Ghent C, Katz A, et al. The demography of primary biliary cirrhosis in Ontario, Canada. *Hepatology* 1990 Jul;12(1):98-105.
- (78) Jones DE, Metcalf JV, Collier JD, Bassendine MF, James OF. Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis and its impact on outcomes. *Hepatology* 1997 Nov;26(5):1138-1142.
- (79) Nijhawan PK, Therneau TM, Dickson ER, Boynton J, Lindor KD. Incidence of cancer in primary biliary cirrhosis: the Mayo experience. *Hepatology* 1999 May;29(5):1396-1398.
- (80) Shibuya A, Tanaka K, Miyakawa H, Shibata M, Takatori M, Sekiyama K, et al. Hepatocellular carcinoma and survival in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2002 May;35(5):1172-1178.
- (81) Crowe JP, Christensen E, Butler J, Wheeler P, Doniach D, Keenan J, et al. Primary biliary cirrhosis: the prevalence of hypothyroidism and its relationship to thyroid autoantibodies and sicca syndrome. *Gastroenterology* 1980 Jun;78(6):1437-1441.

- (82) Mang FW, Michieletti P, O'Rourke K, Cauch-Dudek K, Diamant N, Bookman A, et al. Primary biliary cirrhosis, sicca complex, and dysphagia. *Dysphagia* 1997;12(3):167-170.
- (83) Reynolds TB, Denison EK, Frankl HD, Lieberman FL, Peters RL. Primary biliary cirrhosis with scleroderma, Raynaud's phenomenon and telangiectasia. New syndrome. *Am J Med* 1971 Mar;50(3):302-312.
- (84) Bush A, Mitchison H, Walt R, Baron JH, Boylston AW, Summerfield JA. Primary biliary cirrhosis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1987 Jun;92(6):2009-2013.
- (85) Michieletti P, Wanless IR, Katz A, Scheuer PJ, Yeaman SJ, Bassendine MF, et al. Antimitochondrial antibody negative primary biliary cirrhosis: a distinct syndrome of autoimmune cholangitis. *Gut* 1994 Feb;35(2):260-265.
- (86) Taylor SL, Dean PJ, Riely CA. Primary autoimmune cholangitis. An alternative to antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis. *Am J Surg Pathol* 1994 Jan;18(1):91-99.
- (87) Van de Water J, Gershwin ME, Leung P, Ansari A, Coppel RL. The autoepitope of the 74-kD mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis corresponds to the functional site of dihydrolipoamide acetyltransferase. *J Exp Med* 1988 Jun 1;167(6):1791-1799.
- (88) Tsuneyama K, Van De Water J, Van TD, Coppel R, Ruebner B, Nakanuma Y, et al. Abnormal expression of PDC-E2 on the apical surface of biliary epithelial cells in patients with antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1995 Nov;22(5):1440-1446.
- (89) Gisbert JP, Jones EA, Pajares JM, Moreno-Otero R. Review article: is there an optimal therapeutic regimen for antimitochondrial antibody-

negative primary biliary cirrhosis (autoimmune cholangitis)? *Aliment Pharmacol Ther* 2003 Jan;17(1):17-27.

- (90) Koulentaki M, Moscandrea J, Dimoulios P, Chatzicostas C, Kouroumalis EA. Survival of anti-mitochondrial antibody-positive and -negative primary biliary cirrhosis patients on ursodeoxycholic acid treatment. *Dig Dis Sci* 2004 Aug;49(7-8):1190-1195.
- (91) Poupon R. Trials in primary biliary cirrhosis: need for the right drugs at the right time. *Hepatology* 2004 Apr;39(4):900-902.
- (92) Poupon R, Chretien Y, Poupon RE, Ballet F, Calmus Y, Darnis F. Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary biliary cirrhosis? *Lancet* 1987 Apr 11;1(8537):834-836.
- (93) Leuschner U, Leuschner M, Sieratzki J, Kurtz W, Hubner K. Gallstone dissolution with ursodeoxycholic acid in patients with chronic active hepatitis and two years follow-up. A pilot study. *Dig Dis Sci* 1985 Jul;30(7):642-649.
- (94) Hempfling W, Dilger K, Beuers U. Systematic review: ursodeoxycholic acid--adverse effects and drug interactions. *Aliment Pharmacol Ther* 2003 Nov 15;18(10):963-972.
- (95) Poupon RE, Lindor KD, Cauch-Dudek K, Dickson ER, Poupon R, Heathcote EJ. Combined analysis of randomized controlled trials of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1997 Sep;113(3):884-890.
- (96) Leuschner U, Fischer H, Kurtz W, Guldutuna S, Hubner K, Hellstern A, et al. Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a controlled double-blind trial. *Gastroenterology* 1989 Nov;97(5):1268-1274.

- (97) Lindor KD, Dickson ER, Baldus WP, Jorgensen RA, Ludwig J, Murtaugh PA, et al. Ursodeoxycholic acid in the treatment of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1994 May;106(5):1284-1290.
- (98) Pares A, Caballeria L, Rodes J, Bruguera M, Rodrigo L, Garcia-Plaza A, et al. Long-term effects of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a double-blind controlled multicentric trial. UDCA-Cooperative Group from the Spanish Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 2000 Apr;32(4):561-566.
- (99) Poupon RE, Balkau B, Eschwege E, Poupon R. A multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. UDCA-PBC Study Group. *N Engl J Med* 1991 May 30;324(22):1548-1554.
- (100) Corpechot C, Carrat F, Bonnard AM, Poupon RE, Poupon R. The effect of ursodeoxycholic acid therapy on liver fibrosis progression in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2000 Dec;32(6):1196-1199.
- (101) Lindor KD, Jorgensen RA, Therneau TM, Malinchoc M, Dickson ER. Ursodeoxycholic acid delays the onset of esophageal varices in primary biliary cirrhosis. *Mayo Clin Proc* 1997 Dec;72(12):1137-1140.
- (102) Kuiper EM, Hansen BE, de Vries RA, den Ouden-Muller JW, van Ditzhuijsen TJ, Haagsma EB, et al. Improved prognosis of patients with primary biliary cirrhosis that have a biochemical response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 2009 Apr;136(4):1281-1287.
- (103) Palma J, Reyes H, Ribalta J, Iglesias J, Gonzalez MC, Hernandez I, et al. Effects of ursodeoxycholic acid in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Hepatology* 1992 Jun;15(6):1043-1047.
- (104) Beuers U. Drug insight: Mechanisms and sites of action of ursodeoxycholic acid in cholestasis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006 Jun;3(6):318-328.

- (105) Corpechot C, Abenavoli L, Rabahi N, Chretien Y, Andreani T, Johanet C, et al. Biochemical response to ursodeoxycholic acid and long-term prognosis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2008 Sep;48(3):871-877.
- (106) Pares A, Caballeria L, Rodes J. Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic Acid. *Gastroenterology* 2006 Mar;130(3):715-720.
- (107) MacQuillan GC, Neuberger J. Liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2003 Nov;7(4):941-56, ix.
- (108) Roll J, Boyer JL, Barry D, Klatskin G. The prognostic importance of clinical and histologic features in asymptomatic and symptomatic primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 1983 Jan 6;308(1):1-7.
- (109) Springer J, Cauch-Dudek K, O'Rourke K, Wanless IR, Heathcote EJ. Asymptomatic primary biliary cirrhosis: a study of its natural history and prognosis. *Am J Gastroenterol* 1999 Jan;94(1):47-53.
- (110) Dickson ER, Grambsch PM, Fleming TR, Fisher LD, Langworthy A. Prognosis in primary biliary cirrhosis: model for decision making. *Hepatology* 1989 Jul;10(1):1-7.
- (111) Selmi C, Gershwin ME. The role of environmental factors in primary biliary cirrhosis. *Trends Immunol* 2009 Aug;30(8):415-420.
- (112) Lleo A, Invernizzi P, Mackay IR, Prince H, Zhong RQ, Gershwin ME. Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2008 Jun 7;14(21):3328-3337.
- (113) Selmi C, Mayo MJ, Bach N, Ishibashi H, Invernizzi P, Gish RG, et al. Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology* 2004 Aug;127(2):485-492.

- (114) Gershwin ME, Selmi C, Worman HJ, Gold EB, Watnik M, Utts J, et al. Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: a controlled interview-based study of 1032 patients. *Hepatology* 2005 Nov;42(5):1194-1202.
- (115) Brind AM, Bray GP, Portmann BC, Williams R. Prevalence and pattern of familial disease in primary biliary cirrhosis. *Gut* 1995 Apr;36(4):615-617.
- (116) Invernizzi P, Miozzo M, Battezzati PM, Bianchi I, Grati FR, Simoni G, et al. Frequency of monosomy X in women with primary biliary cirrhosis. *Lancet* 2004 Feb 14;363(9408):533-535.
- (117) Donaldson PT, Baragiotta A, Heneghan MA, Floreani A, Venturi C, Underhill JA, et al. HLA class II alleles, genotypes, haplotypes, and amino acids in primary biliary cirrhosis: a large-scale study. *Hepatology* 2006 Sep;44(3):667-674.
- (118) Invernizzi P, Selmi C, Mackay IR, Podda M, Gershwin ME. From bases to basis: linking genetics to causation in primary biliary cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005 May;3(5):401-410.
- (119) Invernizzi P, Selmi C, Poli F, Frison S, Floreani A, Alvaro D, et al. Human leukocyte antigen polymorphisms in Italian primary biliary cirrhosis: a multicenter study of 664 patients and 1992 healthy controls. *Hepatology* 2008 Dec;48(6):1906-1912.
- (120) Gershwin ME, Mackay IR. The causes of primary biliary cirrhosis: Convenient and inconvenient truths. *Hepatology* 2008 Feb;47(2):737-745.
- (121) Agarwal K, Jones DE, Daly AK, James OF, Vaidya B, Pearce S, et al. CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2000 Apr;32(4):538-541.

- (122) Jones DE, Donaldson PT. Genetic factors in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2003 Nov;7(4):841-864.
- (123) Selmi C, Invernizzi P, Zuin M, Podda M, Seldin MF, Gershwin ME. Genes and (auto)immunity in primary biliary cirrhosis. *Genes Immun* 2005 Oct;6(7):543-556.
- (124) Poupon R, Ping C, Chretien Y, Corpechot C, Chazouilleres O, Simon T, et al. Genetic factors of susceptibility and of severity in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2008 Dec;49(6):1038-1045.
- (125) Pauli-Magnus C, Kerb R, Fattinger K, Lang T, Anwald B, Kullak-Ublick GA, et al. BSEP and MDR3 haplotype structure in healthy Caucasians, primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2004 Mar;39(3):779-791.
- (126) Takahashi M, Matsuda F, Margetic N, Lathrop M. Automated identification of single nucleotide polymorphisms from sequencing data. *J Bioinform Comput Biol* 2003 Jul;1(2):253-265.
- (127) Lakatos LP, Bajnok E, Hegedus D, Toth T, Lakatos P, Szalay F. Vitamin D receptor, oestrogen receptor-alpha gene and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in Hungarian patients with primary biliary cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002 Jul;14(7):733-740.
- (128) Alvaro D, Invernizzi P, Onori P, Franchitto A, De SA, Crosignani A, et al. Estrogen receptors in cholangiocytes and the progression of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2004 Dec;41(6):905-912.
- (129) Padgett KA, Lan RY, Leung PC, Lleo A, Dawson K, Pfeiff J, et al. Primary biliary cirrhosis is associated with altered hepatic microRNA expression. *J Autoimmun* 2009 May;32(3-4):246-253.

- (130) Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* 2008 Aug;9(8):839-845.
- (131) Check HE. Thousands of proteins affected by miRNAs. *Nature* 2008 Jul 31;454(7204):562.
- (132) McNally RJ, Ducker S, James OF. Are transient environmental agents involved in the cause of primary biliary cirrhosis? Evidence from space-time clustering analysis. *Hepatology* 2009 Oct;50(4):1169-1174.
- (133) Selmi C, Balkwill DL, Invernizzi P, Ansari AA, Coppel RL, Podda M, et al. Patients with primary biliary cirrhosis react against a ubiquitous xenobiotic-metabolizing bacterium. *Hepatology* 2003 Nov;38(5):1250-1257.
- (134) Xu L, Shen Z, Guo L, Fodera B, Keogh A, Joplin R, et al. Does a betaretrovirus infection trigger primary biliary cirrhosis? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Jul 8;100(14):8454-8459.
- (135) Hopf U, Moller B, Stemerowicz R, Lobeck H, Rodloff A, Freudenberg M, et al. Relation between *Escherichia coli* R(rough)-forms in gut, lipid A in liver, and primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1989 Dec 16;2(8677):1419-1422.
- (136) Abdulkarim AS, Petrovic LM, Kim WR, Angulo P, Lloyd RV, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis: an infectious disease caused by *Chlamydia pneumoniae*? *J Hepatol* 2004 Mar;40(3):380-384.
- (137) Leung PS, Park O, Matsumura S, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME. Is there a relation between *Chlamydia* infection and primary biliary cirrhosis? *Clin Dev Immunol* 2003 Jun;10(2-4):227-233.
- (138) Bogdanos DP, Baum H, Okamoto M, Montalto P, Sharma UC, Rigopoulou EI, et al. Primary biliary cirrhosis is characterized by IgG3

antibodies cross-reactive with the major mitochondrial autoepitope and its *Lactobacillus* mimic. *Hepatology* 2005 Aug;42(2):458-465.

- (139) Mason AL, Farr GH, Xu L, Hubscher SG, Neuberger JM. Pilot studies of single and combination antiretroviral therapy in patients with primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2004 Dec;99(12):2348-2355.
- (140) Selmi C, Ross SR, Ansari AA, Invernizzi P, Podda M, Coppel RL, et al. Lack of immunological or molecular evidence for a role of mouse mammary tumor retrovirus in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2004 Aug;127(2):493-501.
- (141) Parikh-Patel A, Gold EB, Worman H, Krivy KE, Gershwin ME. Risk factors for primary biliary cirrhosis in a cohort of patients from the united states. *Hepatology* 2001 Jan;33(1):16-21.
- (142) Howel D, Fischbacher CM, Bhopal RS, Gray J, Metcalf JV, James OF. An exploratory population-based case-control study of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2000 May;31(5):1055-1060.
- (143) Rigopoulou EI, Georgiadou SP, Barbanis S, Dalekos GN. Lack of association between appendectomy and primary biliary cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2006 May;41(5):573-576.
- (144) Bogdanos DP, Baum H, Sharma UC, Grasso A, Ma Y, Burroughs AK, et al. Antibodies against homologous microbial caseinolytic proteases P characterise primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2002 Jan;36(1):14-21.
- (145) Bennion RS, Thompson JE, Jr., Gil J, Schmit PJ. The role of *Yersinia enterocolitica* in appendicitis in the southwestern United States. *Am Surg* 1991 Dec;57(12):766-768.
- (146) Long SA, Quan C, Van de Water J, Nantz MH, Kurth MJ, Barsky D, et al. Immunoreactivity of organic mimeotopes of the E2 component of

pyruvate dehydrogenase: connecting xenobiotics with primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 2001 Sep 1;167(5):2956-2963.

- (147) Amano K, Leung PS, Rieger R, Quan C, Wang X, Marik J, et al. Chemical xenobiotics and mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis: identification of antibodies against a common environmental, cosmetic, and food additive, 2-octynoic acid. *J Immunol* 2005 May 1;174(9):5874-5883.
- (148) Rieger R, Leung PS, Jeddloh MR, Kurth MJ, Nantz MH, Lam KS, et al. Identification of 2-nonynoic acid, a cosmetic component, as a potential trigger of primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2006 Aug;27(1):7-16.
- (149) Zein CO, Beatty K, Post AB, Logan L, Debanne S, McCullough AJ. Smoking and increased severity of hepatic fibrosis in primary biliary cirrhosis: A cross validated retrospective assessment. *Hepatology* 2006 Dec;44(6):1564-1571.
- (150) Ala A, Stanca CM, Bu-Ghanim M, Ahmado I, Branch AD, Schiano TD, et al. Increased prevalence of primary biliary cirrhosis near Superfund toxic waste sites. *Hepatology* 2006 Mar;43(3):525-531.
- (151) Triger DR. Primary biliary cirrhosis: an epidemiological study. *Br Med J* 1980 Sep 20;281(6243):772-775.
- (152) Graham AM, Dollinger MM, Howie SE, Harrison DJ. Bile duct cells in primary biliary cirrhosis are 'primed' for apoptosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998 Jul;10(7):553-557.
- (153) Kita H, Matsumura S, He XS, Ansari AA, Lian ZX, Van de Water J, et al. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest* 2002 May;109(9):1231-1240.

- (154) Tinmouth J, Lee M, Wanless IR, Tsui FW, Inman R, Heathcote EJ. Apoptosis of biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Liver* 2002 Jun;22(3):228-234.
- (155) Dienes HP, Lohse AW, Gerken G, Schirmacher P, Gallati H, Lohr HF, et al. Bile duct epithelia as target cells in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Virchows Arch* 1997 Aug;431(2):119-124.
- (156) Harada K, Furubo S, Ozaki S, Hiramatsu K, Sudo Y, Nakanuma Y. Increased expression of WAF1 in intrahepatic bile ducts in primary biliary cirrhosis relates to apoptosis. *J Hepatol* 2001 Apr;34(4):500-506.
- (157) Iwata M, Harada K, Kono N, Kaneko S, Kobayashi K, Nakanuma Y. Expression of Bcl-2 familial proteins is reduced in small bile duct lesions of primary biliary cirrhosis. *Hum Pathol* 2000 Feb;31(2):179-184.
- (158) Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Sata M, Tanikawa K. Nuclear DNA fragmentation and expression of Bcl-2 in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1997 May;25(5):1077-1084.
- (159) Harada K, Ozaki S, Gershwin ME, Nakanuma Y. Enhanced apoptosis relates to bile duct loss in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1997 Dec;26(6):1399-1405.
- (160) Kuroki T, Seki S, Kawakita N, Nakatani K, Hisa T, Kitada T, et al. Expression of antigens related to apoptosis and cell proliferation in chronic nonsuppurative destructive cholangitis in primary biliary cirrhosis. *Virchows Arch* 1996 Oct;429(2-3):119-129.
- (161) Odin JA, Huebert RC, Casciola-Rosen L, LaRusso NF, Rosen A. Bcl-2-dependent oxidation of pyruvate dehydrogenase-E2, a primary biliary cirrhosis autoantigen, during apoptosis. *J Clin Invest* 2001 Jul;108(2):223-232.

- (162) Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 2004 Jun;52(6):821-831.
- (163) Lang KS, Burow A, Kurrer M, Lang PA, Recher M. The role of the innate immune response in autoimmune disease. *J Autoimmun* 2007 Dec;29(4):206-212.
- (164) Papadimitraki ED, Bertias GK, Boumpas DT. Toll like receptors and autoimmunity: a critical appraisal. *J Autoimmun* 2007 Dec;29(4):310-318.
- (165) Mao TK, Lian ZX, Selmi C, Ichiki Y, Ashwood P, Ansari AA, et al. Altered monocyte responses to defined TLR ligands in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2005 Oct;42(4):802-808.
- (166) Chuang YH, Lian ZX, Tsuneyama K, Chiang BL, Ansari AA, Coppel RL, et al. Increased killing activity and decreased cytokine production in NK cells in patients with primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2006 Jun;26(4):232-240.
- (167) Leung PS, Rossaro L, Davis PA, Park O, Tanaka A, Kikuchi K, et al. Antimitochondrial antibodies in acute liver failure: implications for primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007 Nov;46(5):1436-1442.
- (168) Dubel L, Tanaka A, Leung PS, Van de Water J, Coppel R, Roche T, et al. Autoepitope mapping and reactivity of autoantibodies to the dihydrolipoamide dehydrogenase-binding protein (E3BP) and the glycine cleavage proteins in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1999 Apr;29(4):1013-1018.
- (169) Joplin RE, Johnson GD, Matthews JB, Hamburger J, Lindsay JG, Hubscher SG, et al. Distribution of pyruvate dehydrogenase dihydrolipoamide acetyltransferase (PDC-E2) and another mitochondrial marker in salivary gland and biliary epithelium from

patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1994 Jun;19(6):1375-1380.

- (170) Nishio A, Van de Water J, Leung PS, Joplin R, Neuberger JM, Lake J, et al. Comparative studies of antimitochondrial autoantibodies in sera and bile in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1997 May;25(5):1085-1089.
- (171) Tanaka A, Nalbandian G, Leung PS, Benson GD, Munoz S, Findor JA, et al. Mucosal immunity and primary biliary cirrhosis: presence of antimitochondrial antibodies in urine. *Hepatology* 2000 Nov;32(5):910-915.
- (172) Palmer JM, Diamond AG, Yeaman SJ, Bassendine MF, Jones DE. T cell responses to the putative dominant autoepitope in primary biliary cirrhosis (PBC). *Clin Exp Immunol* 1999 Apr;116(1):133-139.
- (173) Kita H, Lian ZX, Van de Water J, He XS, Matsumura S, Kaplan M, et al. Identification of HLA-A2-restricted CD8(+) cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis: T cell activation is augmented by immune complexes cross-presented by dendritic cells. *J Exp Med* 2002 Jan 7;195(1):113-123.
- (174) Kita H, Matsumura S, He XS, Ansari AA, Lian ZX, Van de Water J, et al. Analysis of TCR antagonism and molecular mimicry of an HLA-A0201-restricted CTL epitope in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2002 Oct;36(4 Pt 1):918-926.
- (175) Kita H, Naidenko OV, Kronenberg M, Ansari AA, Rogers P, He XS, et al. Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology* 2002 Oct;123(4):1031-1043.
- (176) Shimoda S, Van de Water J, Ansari A, Nakamura M, Ishibashi H, Coppel RL, et al. Identification and precursor frequency analysis of a

common T cell epitope motif in mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest* 1998 Nov 15;102(10):1831-1840.

- (177) Tsuneyama K, Harada K, Kono N, Sasaki M, Saito T, Gershwin ME, et al. Damaged interlobular bile ducts in primary biliary cirrhosis show reduced expression of glutathione-S-transferase-pi and aberrant expression of 4-hydroxynonenal. *J Hepatol* 2002 Aug;37(2):176-183.
- (178) Sokol RJ, Kim YS, Hoofnagle JH, Heubi JE, Jones EA, Balistreri WF. Intestinal malabsorption of vitamin E in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1989 Feb;96(2 Pt 1):479-486.
- (179) Aboutwerat A, Pemberton PW, Smith A, Burrows PC, McMahon RF, Jain SK, et al. Oxidant stress is a significant feature of primary biliary cirrhosis. *Biochim Biophys Acta* 2003 Mar 20;1637(2):142-150.
- (180) Floreani A, Baragiotta A, Martines D, Naccarato R, D'odorico A. Plasma antioxidant levels in chronic cholestatic liver diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2000 Mar;14(3):353-358.
- (181) Notas G, Miliaraki N, Kampa M, Dimoulios F, Matrella E, Hatzidakis A, et al. Patients with primary biliary cirrhosis have increased serum total antioxidant capacity measured with the crocin bleaching assay. *World J Gastroenterol* 2005 Jul 21;11(27):4194-4198.
- (182) Ljubuncic P, Abu-Salach O, Bomzon A. Ursodeoxycholic acid and superoxide anion. *World J Gastroenterol* 2005 Aug 21;11(31):4875-4878.
- (183) Serviddio G, Pereda J, Pallardo FV, Carretero J, Borrás C, Cutrin J, et al. Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. *Hepatology* 2004 Mar;39(3):711-720.
- (184) Irie J, Wu Y, Wicker LS, Rainbow D, Nalesnik MA, Hirsch R, et al. NOD.c3c4 congenic mice develop autoimmune biliary disease that

serologically and pathogenetically models human primary biliary cirrhosis. *J Exp Med* 2006 May 15;203(5):1209-1219.

- (185) Oertelt S, Lian ZX, Cheng CM, Chuang YH, Padgett KA, He XS, et al. Anti-mitochondrial antibodies and primary biliary cirrhosis in TGF-beta receptor II dominant-negative mice. *J Immunol* 2006 Aug 1;177(3):1655-1660.
- (186) Wakabayashi K, Lian ZX, Moritoki Y, Lan RY, Tsuneyama K, Chuang YH, et al. IL-2 receptor alpha(-/-) mice and the development of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2006 Nov;44(5):1240-1249.
- (187) Selmi C, Zuin M, Gershwin ME. The unfinished business of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2008 Sep;49(3):451-460.
- (188) Lazaridis KN, Strazzabosco M, Larusso NF. The cholangiopathies: disorders of biliary epithelia. *Gastroenterology* 2004 Nov;127(5):1565-1577.
- (189) Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lora J, Zaret KS. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 2001 Mar;128(6):871-881.
- (190) Sicklick JK, Li YX, Melhem A, Schmelzer E, Zdanowicz M, Huang J, et al. Hedgehog signaling maintains resident hepatic progenitors throughout life. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006 May;290(5):G859-G870.
- (191) Jung Y, McCall SJ, Li YX, Diehl AM. Bile ductules and stromal cells express hedgehog ligands and/or hedgehog target genes in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007 May;45(5):1091-1096.
- (192) Butler P, Hamilton-Miller J, Baum H, Burroughs AK. Detection of M2 antibodies in patients with recurrent urinary tract infection using an ELISA and purified PBC specific antigens. Evidence for a molecular

mimicry mechanism in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis?
Biochem Mol Biol Int 1995 Mar;35(3):473-485.

- (193) Jones DE. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis. J Hepatol 2003 Oct;39(4):639-648.
- (194) Jones DE. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis. Gut 2007 Nov;56(11):1615-1624.
- (195) Kouroumalis E, Notas G. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis: a unifying model. World J Gastroenterol 2006 Apr 21;12(15):2320-2327.
- (196) Tsuneyama K, Harada K, Kono N, Hiramatsu K, Zen Y, Sudo Y, et al. Scavenger cells with gram-positive bacterial lipoteichoic acid infiltrate around the damaged interlobular bile ducts of primary biliary cirrhosis. J Hepatol 2001 Aug;35(2):156-163.
- (197) Nilsson HO, Taneera J, Castedal M, Glatz E, Olsson R, Wadstrom T. Identification of Helicobacter pylori and other Helicobacter species by PCR, hybridization, and partial DNA sequencing in human liver samples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary biliary cirrhosis. J Clin Microbiol 2000 Mar;38(3):1072-1076.
- (198) Sasatomi K, Noguchi K, Sakisaka S, Sata M, Tanikawa K. Abnormal accumulation of endotoxin in biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. J Hepatol 1998 Sep;29(3):409-416.
- (199) Speciale L, Roda K, Saresella M, Taramelli D, Ferrante P. Different endothelins stimulate cytokine production by peritoneal macrophages and microglial cell line. Immunology 1998 Jan;93(1):109-114.
- (200) Grimshaw MJ, Wilson JL, Balkwill FR. Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. Eur J Immunol 2002 Sep;32(9):2393-2400.

- (201) Colucci G, Schaffner F, Paronetto F. In situ characterization of the cell-surface antigens of the mononuclear cell infiltrate and bile duct epithelium in primary biliary cirrhosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1986 Oct;41(1):35-42.
- (202) Tobe K, Tsuchiya T, Itoshima T, Nagashima H, Kobayashi T. Electron microscopy of fat-storing cells in liver diseases with special reference to cilia and cytoplasmic cholesterol crystals. *Arch Histol Jpn* 1985 Oct;48(4):435-441.
- (203) Tsuneyama K, Harada K, Yasoshima M, Hiramatsu K, Mackay CR, Mackay IR, et al. Monocyte chemotactic protein-1, -2, and -3 are distinctively expressed in portal tracts and granulomata in primary biliary cirrhosis: implications for pathogenesis. *J Pathol* 2001 Jan;193(1):102-109.
- (204) Mathew J, Hines JE, Toole K, Johnson SJ, James OF, Burt AD. Quantitative analysis of macrophages and perisinusoidal cells in primary biliary cirrhosis. *Histopathology* 1994 Jul;25(1):65-70.
- (205) Rockey D. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology* 1997 Jan;25(1):2-5.
- (206) Palmer JM, Kirby JA, Jones DE. The immunology of primary biliary cirrhosis: the end of the beginning? *Clin Exp Immunol* 2002 Aug;129(2):191-197.
- (207) Washington K, Clavien PA, Killenberg P. Peribiliary vascular plexus in primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis. *Hum Pathol* 1997 Jul;28(7):791-795.
- (208) Roberts SK, Ludwig J, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Gastroenterology* 1997 Jan;112(1):269-279.

- (209) Ludwig J, Batts KP, MacCarty RL. Ischemic cholangitis in hepatic allografts. *Mayo Clin Proc* 1992 Jun;67(6):519-526.
- (210) Koda W, Harada K, Tsuneyama K, Kono N, Sasaki M, Matsui O, et al. Evidence of the participation of peribiliary mast cells in regulation of the peribiliary vascular plexus along the intrahepatic biliary tree. *Lab Invest* 2000 Jul;80(7):1007-1017.
- (211) Matsunaga Y, Terada T. Peribiliary capillary plexus around interlobular bile ducts in various chronic liver diseases: An immunohistochemical and morphometric study. *Pathol Int* 1999 Oct;49(10):869-873.
- (212) Matsumura S, Van De Water J, Kita H, Coppel RL, Tsuji T, Yamamoto K, et al. Contribution to antimitochondrial antibody production: cleavage of pyruvate dehydrogenase complex-E2 by apoptosis-related proteases. *Hepatology* 2002 Jan;35(1):14-22.
- (213) Howell CD, Li J, Chen W. Role of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 during nonsuppurative destructive cholangitis in a mouse graft-versus-host disease model. *Hepatology* 1999 Mar;29(3):766-776.
- (214) Kimura T, Suzuki K, Inada S, Hayashi A, Isobe M, Matsuzaki Y, et al. Monoclonal antibody against lymphocyte function-associated antigen 1 inhibits the formation of primary biliary cirrhosis-like lesions induced by murine graft-versus-host reaction. *Hepatology* 1996 Oct;24(4):888-894.
- (215) McDonnell WM. Is primary biliary cirrhosis a complication of pregnancy? *Hepatology* 1998 Aug;28(2):593-594.
- (216) Beschorner WE, Shinn CA, Hess AD, Suresch DL, Santos GW. Immune-related injury to endothelium associated with acute graft-versus-host disease in the rat. *Transplant Proc* 1989 Feb;21(1 Pt 3):3025-3027.

- (217) McCarthy PL, Jr., Abhyankar S, Neben S, Newman G, Sieff C, Thompson RC, et al. Inhibition of interleukin-1 by an interleukin-1 receptor antagonist prevents graft-versus-host disease. *Blood* 1991 Oct 15;78(8):1915-1918.
- (218) Hiroyasu S, Shiraishi M, Kusano T, Muto Y. Involvement of endothelin in graft-versus-host disease after rat small bowel transplantation. *Transpl Int* 1997;10(2):121-124.
- (219) Ayres RC, Neuberger JM, Shaw J, Joplin R, Adams DH. Intercellular adhesion molecule-1 and MHC antigens on human intrahepatic bile duct cells: effect of pro-inflammatory cytokines. *Gut* 1993 Sep;34(9):1245-1249.
- (220) Jones DE, Palmer JM, Yeaman SJ, Bassendine MF, Diamond AG. T cell responses to natural human proteins in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 1997 Mar;107(3):562-568.
- (221) Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Hayashida K, Niho Y. HLA DRB4 0101-restricted immunodominant T cell autoepitope of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: evidence of molecular mimicry in human autoimmune diseases. *J Exp Med* 1995 May 1;181(5):1835-1845.
- (222) Matsumura S, Kita H, He XS, Ansari AA, Lian ZX, Van De Water J, et al. Comprehensive mapping of HLA-A0201-restricted CD8 T-cell epitopes on PDC-E2 in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2002 Nov;36(5):1125-1134.
- (223) Lai MM. Hepatitis C virus proteins: direct link to hepatic oxidative stress, steatosis, carcinogenesis and more. *Gastroenterology* 2002 Feb;122(2):568-571.
- (224) Thoren F, Romero A, Lindh M, Dahlgren C, Hellstrand K. A hepatitis C virus-encoded, nonstructural protein (NS3) triggers dysfunction and

apoptosis in lymphocytes: role of NADPH oxidase-derived oxygen radicals. *J Leukoc Biol* 2004 Dec;76(6):1180-1186.

- (225) Berg PA, Klein R. Mitochondrial antigen/antibody systems in primary biliary cirrhosis: revisited. *Liver* 1995 Dec;15(6):281-292.
- (226) Manns M, Meyer zum Buschenfelde KH. A mitochondrial antigen-antibody system in cholestatic liver disease detected by radioimmunoassay. *Hepatology* 1982 Jan;2(1):1-7.
- (227) Hideki Kinoshita, Katsuhisa Omagari, Isao Matsuo, Kanae Yamaguchi, Nobuhiro Ikuno, Shigeru Kohno. Frequency of IgG, IgM and IgA class autoantibodies against 2-oxo-acid dehydrogenase complex in 102 Japanese patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology Research* 1999;15:163-171.
- (228) Joplin R, Lindsay JG, Johnson GD, Strain A, Neuberger J. Membrane dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) on human biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1992 Jan 11;339(8785):93-94.
- (229) Coppel RL, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis: the molecule and the mimic. *Immunol Rev* 1995 Apr;144:17-49.
- (230) Berg PA, Klein R. Mitochondrial antigens and autoantibodies: from anti-M1 to anti-M9. *Klin Wochenschr* 1986 Oct 1;64(19):897-909.
- (231) Frazer IH, Mackay IR, Jordan TW, Whittingham S, Marzuki S. Reactivity of anti-mitochondrial autoantibodies in primary biliary cirrhosis: definition of two novel mitochondrial polypeptide autoantigens. *J Immunol* 1985 Sep;135(3):1739-1745.
- (232) Nishio A, Coppel R, Ishibashi H, Gershwin ME. The pyruvate dehydrogenase complex as a target autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000 Aug;14(4):535-547.

- (233) Yeaman SJ, Fussey SP, Danner DJ, James OF, Mutimer DJ, Bassendine MF. Primary biliary cirrhosis: identification of two major M2 mitochondrial autoantigens. *Lancet* 1988 May 14;1(8594):1067-1070.
- (234) Yeaman SJ. The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochem J* 1989 Feb 1;257(3):625-632.
- (235) Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz-Ponten T, Alsmark UC, Podowski RM, et al. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 1998 Nov 12;396(6707):133-140.
- (236) Strassburg CP, Manns MP. Autoimmune tests in primary biliary cirrhosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000 Aug;14(4):585-599.
- (237) Perham RN. Domains, motifs, and linkers in 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the design of a multifunctional protein. *Biochemistry* 1991 Sep 3;30(35):8501-8512.
- (238) Green JD, Laue ED, Perham RN, Ali ST, Guest JR. Three-dimensional structure of a lipoyl domain from the dihydrolipoyl acetyltransferase component of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1995 Apr 28;248(2):328-343.
- (239) Howard MJ, Fuller C, Broadhurst RW, Perham RN, Tang JG, Quinn J, et al. Three-dimensional structure of the major autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1998 Jul;115(1):139-146.
- (240) Bassendine MF, Fussey SP, Mutimer DJ, James OF, Yeaman SJ. Identification and characterization of four M2 mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1989 May;9(2):124-131.

- (241) Nalbandian G, Van de Water J, Gish R, Manns M, Coppel RL, Rudich SM, et al. Is there a serological difference between men and women with primary biliary cirrhosis? *Am J Gastroenterol* 1999 Sep;94(9):2482-2486.
- (242) Maeda T, Loveland BE, Rowley MJ, Mackay IR. Autoantibody against dihydrolipoamide dehydrogenase, the E3 subunit of the 2-oxoacid dehydrogenase complexes: significance for primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1991 Dec;14(6):994-999.
- (243) Gershwin ME, Mackay IR. Primary biliary cirrhosis: paradigm or paradox for autoimmunity. *Gastroenterology* 1991 Mar;100(3):822-833.
- (244) Leung PS, Chuang DT, Wynn RM, Cha S, Danner DJ, Ansari A, et al. Autoantibodies to BCOADC-E2 in patients with primary biliary cirrhosis recognize a conformational epitope. *Hepatology* 1995 Aug;22(2):505-513.
- (245) Moteki S, Leung PS, Dickson ER, Van Thiel DH, Galperin C, Buch T, et al. Epitope mapping and reactivity of autoantibodies to the E2 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis using recombinant 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Hepatology* 1996 Mar;23(3):436-444.
- (246) Meda F, Zuin M, Invernizzi P, Vergani D, Selmi C. Serum autoantibodies: a road map for the clinical hepatologist. *Autoimmunity* 2008 Feb;41(1):27-34.
- (247) Berg PA, Klein R, Lindenborn-Fotinos J. Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1986;2(1):123-131.
- (248) Klein R, Berg PA. Characterization of a new mitochondrial antigen-antibody system (M9/anti-M9) in patients with anti-M2 positive and anti-M2 negative primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 1988 Oct;74(1):68-74.

- (249) Weber P, Brenner J, Stechemesser E, Klein R, Weckenmann U, Kloppel G, et al. Characterization and clinical relevance of a new complement-fixing antibody--anti-M8--in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1986 Jul;6(4):553-559.
- (250) Klein R, Kloppel G, Garbe W, Fintelmann V, Berg PA. Antimitochondrial antibody profiles determined at early stages of primary biliary cirrhosis differentiate between a benign and a progressive course of the disease. A retrospective analysis of 76 patients over 6-18 years. *J Hepatol* 1991 Jan;12(1):21-27.
- (251) Klein R, Pointner H, Zilly W, Glassner-Bittner B, Breuer N, Garbe W, et al. Antimitochondrial antibody profiles in primary biliary cirrhosis distinguish at early stages between a benign and a progressive course: a prospective study on 200 patients followed for 10 years. *Liver* 1997 Jun;17(3):119-128.
- (252) Gerace L, Burke B. Functional organization of the nuclear envelope. *Annu Rev Cell Biol* 1988;4:335-374.
- (253) Sylvius N, Tesson F. Lamin A/C and cardiac diseases. *Curr Opin Cardiol* 2006 May;21(3):159-165.
- (254) Neshar G, Margalit R, Ashkenazi YJ. Anti-nuclear envelope antibodies: Clinical associations. *Semin Arthritis Rheum* 2001 Apr;30(5):313-320.
- (255) Fahrenkrog B, Aebi U. The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003 Oct;4(10):757-766.
- (256) Lim RY, Fahrenkrog B. The nuclear pore complex up close. *Curr Opin Cell Biol* 2006 Jun;18(3):342-347.
- (257) McFarlane IG. Autoimmune hepatitis: diagnostic criteria, subclassifications, and clinical features. *Clin Liver Dis* 2002 Aug;6(3):605-621.

- (258) Czaja AJ, Morshed SA, Parveen S, Nishioka M. Antibodies to single-stranded and double-stranded DNA in antinuclear antibody-positive type 1-autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1997 Sep;26(3):567-572.
- (259) Huguet S, Labas V, Duclos-Vallee JC, Bruneel A, Vinh J, Samuel D, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 identified as an autoantigen in autoimmune hepatitis by proteome analysis. *Proteomics* 2004 May;4(5):1341-1345.
- (260) Nishioka M, Morshed SA. Heterogeneity of anti-nuclear antibodies in autoimmune liver diseases. *Biomed Pharmacother* 1999 Aug;53(7):293-300.
- (261) Strassburg CP, Alex B, Zindy F, Gerken G, Luttig B, Meyer zum Buschenfelde KH, et al. Identification of cyclin A as a molecular target of antinuclear antibodies (ANA) in hepatic and non-hepatic autoimmune diseases. *J Hepatol* 1996 Dec;25(6):859-866.
- (262) Lacerda MA, Ludwig J, Dickson ER, Jorgensen RA, Lindor KD. Antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1995 Feb;90(2):247-249.
- (263) Bogdanos DP, Baum H, Vergani D. Antimitochondrial and other autoantibodies. *Clin Liver Dis* 2003 Nov;7(4):759-77, vi.
- (264) Courvalin JC, Worman HJ. Nuclear envelope protein autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1997 Feb;17(1):79-90.
- (265) Invernizzi P, Selmi C, Ranftler C, Podda M, Wiesierska-Gadek J. Antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2005 Aug;25(3):298-310.
- (266) Szosteki C, Guldner HH, Will H. Autoantibodies against "nuclear dots" in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1997 Feb;17(1):71-78.

- (267) Bandin O, Courvalin JC, Poupon R, Dubel L, Homberg JC, Johanet C. Specificity and sensitivity of gp210 autoantibodies detected using an enzyme-linked immunosorbent assay and a synthetic polypeptide in the diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1996 May;23(5):1020-1024.
- (268) Invernizzi P, Podda M, Battezzati PM, Crosignani A, Zuin M, Hitchman E, et al. Autoantibodies against nuclear pore complexes are associated with more active and severe liver disease in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2001 Mar;34(3):366-372.
- (269) Lozano F, Pares A, Borche L, Plana M, Gallart T, Rodes J, et al. Autoantibodies against nuclear envelope-associated proteins in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1988 Jul;8(4):930-938.
- (270) Muratori P, Muratori L, Ferrari R, Cassani F, Bianchi G, Lenzi M, et al. Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2003 Feb;98(2):431-437.
- (271) Muratori P, Muratori L, Cassani F, Terlizzi P, Lenzi M, Rodrigo L, et al. Anti-multiple nuclear dots (anti-MND) and anti-SP100 antibodies in hepatic and rheumatological disorders. *Clin Exp Immunol* 2002 Jan;127(1):172-175.
- (272) Rigopoulou EI, Davies ET, Pares A, Zachou K, Liaskos C, Bogdanos DP, et al. Prevalence and clinical significance of isotype specific antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Gut* 2005 Apr;54(4):528-532.
- (273) Worman HJ, Courvalin JC. Antinuclear antibodies specific for primary biliary cirrhosis. *Autoimmun Rev* 2003 Jun;2(4):211-217.
- (274) Lassoued K, Brenard R, Degos F, Courvalin JC, Andre C, Danon F, et al. Antinuclear antibodies directed to a 200-kilodalton polypeptide of the nuclear envelope in primary biliary cirrhosis. A clinical and

immunological study of a series of 150 patients with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1990 Jul;99(1):181-186.

- (275) Nickowitz RE, Wozniak RW, Schaffner F, Worman HJ. Autoantibodies against integral membrane proteins of the nuclear envelope in patients with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1994 Jan;106(1):193-199.
- (276) Dubel L, Farges O, Courvalin JC, Sebag M, Johanet C. Persistence of gp210 and multiple nuclear dots antibodies does not correlate with recurrence of primary biliary cirrhosis 6 years after liver transplantation. *J Hepatol* 1998 Jan;28(1):169-170.
- (277) Luettig B, Boeker KH, Schoessler W, Will H, Loges S, Schmidt E, et al. The antinuclear autoantibodies Sp100 and gp210 persist after orthotopic liver transplantation in patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1998 May;28(5):824-828.
- (278) Nickowitz RE, Worman HJ. Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis recognize a restricted region within the cytoplasmic tail of nuclear pore membrane glycoprotein Gp210. *J Exp Med* 1993 Dec 1;178(6):2237-2242.
- (279) Wesierska-Gadek J, Hohenauer H, Hitchman E, Penner E. Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis preferentially react with the amino-terminal domain of nuclear pore complex glycoprotein gp210. *J Exp Med* 1995 Oct 1;182(4):1159-1162.
- (280) Wesierska-Gadek J, Hohenauer H, Hitchman E, Penner E. Autoantibodies against nucleoporin p62 constitute a novel marker of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1996 Mar;110(3):840-847.
- (281) Lassoued K, Guilly MN, Andre C, Paintrand M, Dhumeaux D, Danon F, et al. Autoantibodies to 200 kD polypeptide(s) of the nuclear envelope: a new serologic marker of primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 1988 Nov;74(2):283-288.

- (282) Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y, Komori A, Yokoyama T, Ueki T, et al. Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2005 Mar;42(3):386-392.
- (283) Wesierska-Gadek J, Penner E, Battezzati PM, Selmi C, Zuin M, Hitchman E, et al. Correlation of initial autoantibody profile and clinical outcome in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2006 May;43(5):1135-1144.
- (284) Courvalin JC, Lassoued K, Worman HJ, Blobel G. Identification and characterization of autoantibodies against the nuclear envelope lamin B receptor from patients with primary biliary cirrhosis. *J Exp Med* 1990 Sep 1;172(3):961-967.
- (285) Lin F, Noyer CM, Ye Q, Courvalin JC, Worman HJ. Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis recognize a region within the nucleoplasmic domain of inner nuclear membrane protein LBR. *Hepatology* 1996 Jan;23(1):57-61.
- (286) Reeves WH, Chaudhary N, Salerno A, Blobel G. Lamin B autoantibodies in sera of certain patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1987 Mar 1;165(3):750-762.
- (287) Senecal JL, Ichiki S, Girard D, Raymond Y. Autoantibodies to nuclear lamins and to intermediate filament proteins: natural, pathologic or pathogenic? *J Rheumatol* 1993 Feb;20(2):211-219.
- (288) Evans J, Reuben A, Craft J. PBC 95k, a 95-kilodalton nuclear autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Arthritis Rheum* 1991 Jun;34(6):731-736.
- (289) Fusconi M, Cassani F, Govoni M, Caselli A, Farabegoli F, Lenzi M, et al. Anti-nuclear antibodies of primary biliary cirrhosis recognize 78-92-kD and 96-100-kD proteins of nuclear bodies. *Clin Exp Immunol* 1991 Feb;83(2):291-297.

- (290) Szostecki C, Guldner HH, Netter HJ, Will H. Isolation and characterization of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 1990 Dec 15;145(12):4338-4347.
- (291) Szostecki C, Will H, Netter HJ, Guldner HH. Autoantibodies to the nuclear Sp100 protein in primary biliary cirrhosis and associated diseases: epitope specificity and immunoglobulin class distribution. *Scand J Immunol* 1992 Oct;36(4):555-564.
- (292) Bluthner M, Schafer C, Schneider C, Bautz FA. Identification of major linear epitopes on the sp100 nuclear PBC autoantigen by the gene-fragment phage-display technology. *Autoimmunity* 1999;29(1):33-42.
- (293) Szostecki C, Krippner H, Penner E, Bautz FA. Autoimmune sera recognize a 100 kD nuclear protein antigen (sp-100). *Clin Exp Immunol* 1987 Apr;68(1):108-116.
- (294) Sternsdorf T, Guldner HH, Szostecki C, Grotzinger T, Will H. Two nuclear dot-associated proteins, PML and Sp100, are often co-autoimmunogenic in patients with primary biliary cirrhosis. *Scand J Immunol* 1995 Aug;42(2):257-268.
- (295) Kakizuka A, Miller WH, Jr., Umesono K, Warrell RP, Jr., Frankel SR, Murty VV, et al. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 1991 Aug 23;66(4):663-674.
- (296) Borden KL. Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol* 2002 Aug;22(15):5259-5269.
- (297) Zuchner D, Sternsdorf T, Szostecki C, Heathcote EJ, Cauch-Dudek K, Will H. Prevalence, kinetics, and therapeutic modulation of autoantibodies against Sp100 and promyelocytic leukemia protein in a

large cohort of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1997 Nov;26(5):1123-1130.

- (298) Grotzinger T, Sternsdorf T, Jensen K, Will H. Interferon-modulated expression of genes encoding the nuclear-dot-associated proteins Sp100 and promyelocytic leukemia protein (PML). *Eur J Biochem* 1996 Jun 1;238(2):554-560.
- (299) Bloch DB, de la Monte SM, Guigaouri P, Filippov A, Bloch KD. Identification and characterization of a leukocyte-specific component of the nuclear body. *J Biol Chem* 1996 Nov 15;271(46):29198-29204.
- (300) Bassendine MF, Collins JD, Stephenson J, Saunders P, James OF. Platelet associated immunoglobulins in primary biliary cirrhosis: a cause of thrombocytopenia? *Gut* 1985 Oct;26(10):1074-1079.
- (301) Feistauer SM, Penner E, Mayr WR, Panzer S. Target platelet antigens of autoantibodies in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1997 Jun;25(6):1343-1345.
- (302) Panzer S, Penner E, Nelson PJ, Prochazka E, Benda H, Saurugger PN. Identification of the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex as a target antigen in primary biliary cirrhosis-associated autoimmune thrombocytopenia. Evidence that platelet-reactive autoantibodies can also bind to the mitochondrial antigen M2. *J Autoimmun* 1990 Aug;3(4):473-483.
- (303) Baum H, Berg PA. The complex nature of mitochondrial antibodies and their relation to primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1981 Nov;1(4):309-321.
- (304) Doniach D, Roitt IM, Walker JG, Sherlock S. Tissue antibodies in primary biliary cirrhosis, active chronic (lupoid) hepatitis, cryptogenic cirrhosis and other liver diseases and their clinical implications. *Clin Exp Immunol* 1966 Jul;1(3):237-262.

- (305) Weller TH, Coons AH. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954 Aug;86(4):789-794.
- (306) Pital A, Janowitz SL. Enhancement Of Staining Intensity In The Fluorescent-Antibody Reaction. *J Bacteriol* 1963 Oct;86:888-889.
- (307) Marshall JD, Eveland WC, Smith CW. Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent-antibody technic with a modification of its application. *Proc Soc Exp Biol Med* 1958 Aug;98(4):898-900.
- (308) Rapport MM, Graf L. Immunochemical analysis based on complement fixation. *Ann N Y Acad Sci* 1957 Dec 16;69(4):608-632.
- (309) Baur S, Roitt IM, Doniach D. Characterization Of The Human Gastric Parietal Cell Auto-Antigen. *Immunology* 1965 Jan;8:62-68.
- (310) Roitt IM, Ling NR, Doniach D, Couchman KG. The Cytoplasmic Auto-Antigen Of The Human Thyroid. I. Immunological And Biochemical Characteristics. *Immunology* 1964 Jul;7:375-393.
- (311) Osler AG, Strauss JH, Mayer MM. Diagnostic complement fixation. I. A method. *Am J Syph Gonorrhea Vener Dis* 1952 Mar;36(2):140-153.
- (312) Gershwin ME, Mackay IR, Sturgess A, Coppel RL. Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 1987 May 15;138(10):3525-3531.
- (313) Robertson CA, Coppel RL, Prindiville T, Fregeau D, Kaplan M, Dickson ER, et al. The relative affinity of recombinant dihydrolipoamide transacetylase for autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1990 May;11(5):717-722.
- (314) Van de Water J, Surh CD, Leung PS, Krams SM, Fregeau D, Davis P, et al. Molecular definitions, autoepitopes, and enzymatic activities of

the mitochondrial autoantigens of primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1989 May;9(2):132-137.

- (315) Migliaccio C, Nishio A, Van de Water J, Ansari AA, Leung PS, Nakanuma Y, et al. Monoclonal antibodies to mitochondrial E2 components define autoepitopes in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 1998 Nov 15;161(10):5157-5163.
- (316) Oertelt S, Rieger R, Selmi C, Invernizzi P, Ansari AA, Coppel RL, et al. A sensitive bead assay for antimitochondrial antibodies: Chipping away at AMA-negative primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007 Mar;45(3):659-665.
- (317) Heseltine L, Turner IB, Fussey SP, Kelly PJ, James OF, Yeaman SJ, et al. Primary biliary cirrhosis. Quantitation of autoantibodies to purified mitochondrial enzymes and correlation with disease progression. *Gastroenterology* 1990 Dec;99(6):1786-1792.
- (318) Fussey SP, Guest JR, James OF, Bassendine MF, Yeaman SJ. Identification and analysis of the major M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 Nov;85(22):8654-8658.
- (319) Surh CD, Roche TE, Danner DJ, Ansari A, Coppel RL, Prindiville T, et al. Antimitochondrial autoantibodies in primary biliary cirrhosis recognize cross-reactive epitope(s) on protein X and dihydrolipoamide acetyltransferase of pyruvate dehydrogenase complex. *Hepatology* 1989 Aug;10(2):127-133.
- (320) Mutimer DJ, Fussey SP, Yeaman SJ, Kelly PJ, James OF, Bassendine MF. Frequency of IgG and IgM autoantibodies to four specific M2 mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1989 Oct;10(4):403-407.
- (321) Surh CD, Ahmed-Ansari A, Gershwin ME. Comparative epitope mapping of murine monoclonal and human autoantibodies to human

PDH-E2, the major mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 1990 Apr 1;144(7):2647-2652.

- (322) Tsiakalou V, Tsangaridou E, Polioudaki H, Nifli AP, Koulentaki M, Akoumianaki T, et al. Optimized detection of circulating anti-nuclear envelope autoantibodies by immunofluorescence. *BMC Immunol* 2006;7:20.
- (323) Jones DE. Autoantigens in primary biliary cirrhosis. *J Clin Pathol* 2000 Nov;53(11):813-821.
- (324) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug 15;227(5259):680-685.
- (325) Bonner WM, Laskey RA. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur J Biochem* 1974 Jul 1;46(1):83-88.
- (326) Blobel G, Potter VR. Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. *Science* 1966 Dec 30;154(757):1662-1665.
- (327) Gerace L, Comeau C, Benson M. Organization and modulation of nuclear lamina structure. *J Cell Sci Suppl* 1984;1:137-160.
- (328) Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981 Apr;112(2):195-203.
- (329) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979 Sep;76(9):4350-4354.

- (330) Lassoued K, Guilly MN, Danon F, Andre C, Dhumeaux D, Clauvel JP, et al. Antinuclear autoantibodies specific for lamins. Characterization and clinical significance. *Ann Intern Med* 1988 Jun;108(6):829-833.
- (331) Graham RC, Jr., Karnovsky MJ. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem* 1966 Apr;14(4):291-302.
- (332) Nakamura M, Kondo H, Mori T, Komori A, Matsuyama M, Ito M, et al. Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007 Jan;45(1):118-127.
- (333) Jones DE, James OF, Bassendine MF. Primary biliary cirrhosis: clinical and associated autoimmune features and natural history. *Clin Liver Dis* 1998 May;2(2):265-82, viii.
- (334) He XS, Ansari AA, Ridgway WM, Coppel RL, Gershwin ME. New insights to the immunopathology and autoimmune responses in primary biliary cirrhosis. *Cell Immunol* 2006 Jan;239(1):1-13.
- (335) Palmer JM, Doshi M, Kirby JA, Yeaman SJ, Bassendine MF, Jones DE. Secretory autoantibodies in primary biliary cirrhosis (PBC). *Clin Exp Immunol* 2000 Dec;122(3):423-428.
- (336) Wesierska-Gadek J, Klima A, Ranftler C, Komina O, Hanover J, Invernizzi P, et al. Characterization of the antibodies to p62 nucleoporin in primary biliary cirrhosis using human recombinant antigen. *J Cell Biochem* 2008 May 1;104(1):27-37.
- (337) Nakamura M, Kondo H, Mori T, Komori A, Matsuyama M, Ito M, et al. Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007 Jan;45(1):118-127.

- (338) Bogdanos DP, Liaskos C, Pares A, Norman G, Rigopoulou EI, Caballeria L, et al. Anti-gp210 antibody mirrors disease severity in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007 Jun;45(6):1583-1584.
- (339) Gao L, Tian X, Liu B, Zhang F. The value of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Med* 2008 Mar;8(1):9-15.
- (340) Yang WH, Yu JH, Nakajima A, Neuberger D, Lindor K, Bloch DB. Do antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis patients identify increased risk for liver failure? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004 Dec;2(12):1116-1122.
- (341) Nakamura M, Takii Y, Ito M, Komori A, Yokoyama T, Shimizu-Yoshida Y, et al. Increased expression of nuclear envelope gp210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2006 Mar;26(2):138-145.
- (342) Daniels JA, Torbenson M, Anders RA, Boitnott JK. Immunostaining of plasma cells in primary biliary cirrhosis. *Am J Clin Pathol* 2009 Feb;131(2):243-249.
- (343) Moreira RK, Revetta F, Koehler E, Washington MK. Diagnostic utility of IgG and IgM immunohistochemistry in autoimmune liver disease. *World J Gastroenterol* 2010 Jan 28;16(4):453-457.