A

ΑΠΟ ΤΗΝ LIVER UNIT, KING' S COLLEGE HOSPITAL, LONDON
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ROGER WILLIAMS

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΕΙΔΙΚΗΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΠΑΣΧΟΝΤΩΝ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΑ ΣΤΑΔΙΑ ΟΞΕΙΑΣ ΙΟΓΕΝΟΥΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΟΣ

ΑΝΤΩΝΙΟΥ Α. ΠΕΡΠΕΡΑ
Διευθυντού Ναυτικού Νοσοκομείου Σαλαμίνος

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΥΦΗΓΕΣΙΑΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 1984

ΣΤΗ ΜΝΗΜΗ ΤΟΥ ΠΑΤΕΡΑ ΜΟΥ

ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΜΟΥ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μελέτη για τον προσδιορισμό και απομόνωση διαφόρων αντιγόνων οργανοειδικών και μη, κατά την διαδρομή νοσημάτων με αυτοάνοσο χαρακτήρα, και η εν συνεχεία αναζήτηση των αντιστοίχων αντισωμάτων, έχει συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών, των καταστάσεων αυτών.

Κατά την μελέτη αυτή, με την χρήση μιας πολύ ευαίσθητης ραδιο-ανοσολογικής μεθόδου, ανιχνεύθηκε στον ορό πασχόντων από οξεία ιογενή ηπατίτιδα τύπου "Α" και "Β", η παρουσία αυτοαντισωμάτων προς ειδικά αντιγόνα της ηπατοκυτταρικής μεμβράνης (L.S.P) ανθρώπου, κονίκλου και μυός.

Όπως θα αναλυθεί διεξοδικότερα πάρα κάτω, το L.S.P (liver specific lipoprotein) είναι ένα σύμπλεγμα αντιγόνων μερικών από τα οποία είναι "ειδικά ήπατος" από τα οποία, άλλα μεν είναι "ειδικά του ανθρώπου" και άλλα παρουσιάζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με "άλλα είδη ζώντων οργανισμών". Αυτός ήταν άλλως τε ο λόγος για τον οποίο σαν αντιγόνο στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε σύμπλεγμα L.S.P προερχόμενο από ήπαρ ανθρώπου, κονίκλου και μυός.

Στο Γενικό μέρος της μελέτης αναφέρονται οι βασικές γνώσεις περί Ανοσίας, περί Αυτοανοσίας, ενώ μνημονεύονται ωρισμένες αντιπροσωπευτικές καταστάσεις αυτοανόσου χαρακτήρος.

Στη συνέχεια επιχειρείται μια εκτεταμένη ανασκόπιση ειδικά για τις ανοσολογικές αντιδράσεις των ηπατικών νοσημάτων, ενώ αναλύονται λεπτομερώς τα βασικά γνωρίσματα της ταυτότητος του ειδικού της ηπατοκυτταρικής μεμβράνης αντιγόνου, του συμπλέγματος L.S.P.

Τέλος το Γενικό μέρος κλείνει με μια ανάλυση των τελευταίων παρατηρήσεων διαφόρων ερευνητών, για την σημασία και πιθανή εμπλοκή των αυτοαντισωμάτων έναντι του συμπλέγματος L.S.P., στην παθογένεια των ηπατικών νόσων με αυτοάνοσο χαρακτήρα.

Ακολουθεί το Ειδικό μέρος, όπου αναλύεται το υλικό που μελετήθηκε, περιγράφεται η ραδιο-ανοσολογική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, ο τρόπος παρασκευής του L.S.P, καθώς επίσης και η εν συνεχεία ραδιοσήμανσή του.

Η μελέτη κλείνει με μια εκτεταμένη συζήτηση που προέκυψε από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, ενώ τονίζονται τα κυριότερα συμπεράσματα.

Αισθάνομαι την υποχρέωση να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Καθηγητή κ. Χ.Μουτσόπουλο για την πολύτιμο συμβολή του στη μελέτη αυτή, στον Διευθυντή της Ηπατολογικής Μονάδος του King's College Hospital, Dr. Roger Williams για την παραχώρηση του εργαστηρίου της μονάδος, καθώς επίσης και τον Διευθυντή του εργαστηρίου Dr Ian Mc Farlane για την σημαντική βοήθεια κατά την εξέλιξη της εργασίας αυτής.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΑΝΟΣΙΑΣ

Το ανοσοβιολογικό σύστημα (Α.Σ.) έχει βασική αποστολή την άμυνα και προστασία του οργανισμού από παθογόνους μικροοργανισμούς, από ξένα προς τον οργανισμό παθογόνα στοιχεία, ή και από κύτταρα τα οποία έχουν υποστή κακοήθη εξαλλαγή.

Την αποστολή του αυτή την εκπληρώνει με την βοήθεια τριών βασικών ιδιοτήτων που το χαρακτηρίζουν. Έχει την ιδιότητα να αναγνωρίζει σαν "ξένα" προς τον οργανισμό στοιχεία, τα αντιγόνα, τα οποία τελικώς το διεγείρουν με αποτέλεσμα την παραγωγή αντισωμάτων.

Χαρακτηρίζεται επίσης από την "μνήμη" να αντιδρά σε μια νέα εμφάνιση των αντιγόνων αυτών, καθώς επίσης το διακρίνει και η "ειδικότητα" ώστε τα παραγόμενα από το Ανοσοβιολογικό σύστημα αμυντικά στοιχεία να καταπολεμούν ειδικώς τον καθορισμένο αυτόν αντιγονικό παράγοντα.

Πρωτεργάται στις λειτουργίες αυτές είναι τα κυτταρικά στοιχεία του Α.Σ., και τα μη κυτταρικά ή μοριακά στοιχεία, γενικά γνωρίσματα των οποίων αναφέρονται περιληπτικώς[1].

Α. ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ Α.Σ.

α. Τ-Λεμφοκύτταρα. Είναι υπεύθυνα για την κυτταρική ανοσία. Προέρχονται από τα αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών από όπου κατόπιν διαφοροποιήσεως και ωριμάνσεως στο θύμο αδένα μετατρέπονται σε ώριμες μορφές[2]. Η εμφάνιση αντιγόνου, τα διαφοροποιεί σε λεμφοβλάστες, οι οποίες εκκρίνουν ουσίες τις λεμφοκίνες, πολύ απαραίτητες για την δραστηριοποίηση όλων των κυτταρικών στοιχείων του Α.Σ.

Λειτουργικώς διακρίνονται δυο βασικοί υποπληθυσμοί Τ-λεμφοκυττάρων: α. Τα ανοσορυθμιστικά (Regulatory) Τ-λεμφοκύτταρα τα οποία άλλα μεν μπορούν να υποβοηθούν τις λειτουργίες άλλων Τ ή Β λεμφοκυττάρων (Helpers), και άλλα να καταστέλλουν τις λειτουργίες των ως άνω κυττάρων (Suppressors)[3]. β. Τα ανοσοδραστικά (Effectors) Τ-λεμφοκύτταρα τα οποία είναι κυρίως υπεύθυνα δια την κυτταρική ανοσία (C.M.I) π.χ. την ανάπτυξη επιβραδυνομένης υπερ-

ευαισθησίας, απόρριψη ξένου ιστού, όγκων κ.τ.λ. Τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα (C.T.L) είναι ένα είδος από αυτά. Τα Τ-λεμφοκύτταρα στην επιφάνεια της κυτταρικής τους μεμβράνης φέρουν υποδοχείς αντιγόνων, υποδοχείς ανοσοσφαιρινών ιδίως της IgG και IgM. Μορφολογικώς με το μικροσκόπιο οι πληθυσμοί των Τ-λεμφοκυττάρων από τα Β που περιγράφονται πάρα κάτω είναι δύσκολο να διαχωρισθούν. Διακρίνονται όμως κυρίως από το ότι τα Τ-λεμφοκύτταρα σχηματίζουν ρόδακες στην επιφάνεια των ερυθρών προβάτου,ή με ανοσοφθορισμό, με την παρουσία ανοσοσφαιρινών στην επιφάνεια των Β-λεμφοκυττάρων. Τελευταίως, με την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι αντιγονικών δεικτών της επιφανείας των λεμφοκυττάρων είναι δυνατός ο διαχωρισμός των τελευταίων σε υποπληθυσμούς. Αρχικά ο προσδιορισμός και η μελέτη των υποπληθυσμών γινόταν με την τεχνική των ροδάκων χρησιμοποιόντας ερυθροκύτταρα βοός επικαλυμένα με IgM και IgG. Με αυτό τον τρόπο διαχωρίζονταν,στα Τ-λεμφοκύτταρα που έφεραν υποδοχείς για την IgM (Τμ-Cells) και ανήκαν στα βοηθητικά (Helpers),και στα Τ-λεμφοκύτταρα που έφεραν υποδοχείς για την IgG (Τγ-Cells), και ανήκαν στα κατασταλτικά (suppressors).

Αντιθέτως η χρησιμοποίηση των μονοκλωνικών αντισωμάτων για τον προσδιορισμό και μελέτη των υποομάδων των Τ-λεμφοκυττάρων αποτελεί το πεδίο οργασμού τελευταίως των περισσοτέρων ερευνητικών κέντρων.

Η πλέον διαδεδομένη σειρά των αντισωμάτων αυτών είναι η σειρά OKT. Εκτός από την σειρά OKT3 που χαρακτηρίζεται σαν Pan-T, με την χρησιμοποίηση των OKT4 αντισωμάτων προσδιορίζονται τα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα που ανέρχονται περίπου στο 50-60% των Τ-λεμφοκυττάρων του αίματος. Με την χρησιμοποίηση δε των OKT5 και OKT8 προσδιορίζονται τα κατασταλτικά και κυτταροτοξικά, ανερχόμενα σε 30-40% των Τ-λεμφοκυττάρων του αίματος[4,5].

β. Β-Λεμφοκύτταρα. (Χυμική ανοσία). Είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των αντισωμάτων, συνθέτοντας όλες τις κλάσεις των ανοσοσφαιρινών (M, G, A, E, D).

Ενώ η ωρίμανσή τους στα πτηνά εξαρτάται από τον θύλακο του Fabricius, στον άνθρωπο το ανάλογο όργανο δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί, και ο μυελός των οστών, σαν πηγή προελεύσεώς τους, ακόμη ερευνάται.

Στην κυτταρική τους επιφάνεια φέρουν υποδοχείς για την σύνδεση ανοσοσυμπλεγμάτων, την άθροιση ανοσοσφαιρινών, υποδοχείς συμπληρώματος (complement receptors) για να συνδέονται με τα στοιχεία C_3b, C_3d, C_4 και C_{1s}[6].

γ. Κ-Κύτταρα. Μορφολογικώς ομοιάζουν με τα λεμφοκύτταρα, είναι ουδέτερα κύτταρα (Null Cells), τα οποία κατά την γνώμη μερικών ανήκουν σε υποομάδα του λεμφικού συστήματος, ή στα μονοκύτταρα. Φέρουν FC υποδοχείς, ώστε μπορούν να κατευθύνονται και να καταστρέφουν κύτταρα-στόχους καλυμένους με αντισώματα. Η κυτταροτοξικότης τελικώς αυτών των κυττάρων είναι εξαρτωμένη από την παρουσία αντισώματος (Antibody dependent cytotoxicity, A.D.C.C.).

δ. NK-Κύτταρα (Natural Killer cells). Ονομάζονται έτσι διότι η κυτταροτοξικότης τους εμφανίζεται προ της ανοσοποιήσεως του ζώντος οργανισμού. Διακρίνονται από τα Τ-λεμφοκύτταρα, από τους διαφορετικούς αντιγονικούς υποδοχείς επιφανείας που φέρουν. Επίσης τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα έχουν τρυμερή εκλεκτική "ειδικότητα" μόνον για ορισμένους στόχους, ενώ τα NK κύτταρα εκδηλώνουν επιθετικότητα σε λιαν ευρύ αριθμό κυττάρων π.χ. φυσιολογικούς ιστούς, ινοβλάστες, θυμοκύτταρα, κύτταρα όγκων ιδία λεμφωμάτων[7].

ε. Μακροφάγα. Τα κύτταρα αυτά περιλαμβάνονται στο σύστημα μονοπυρήνων-φαγοκυττάρων όπου υπάγονται και τα ιστιοκύτταρα, τα μακροφάγα, του πνεύμονος, τα κύτταρα kupffer, οι οστεοβλάστες και άλλα. Παίζουν λίαν σημαντικό ρόλο στον εν γένει μηχανισμό της ανόσου απαντήσεως, συνεργαζόμενα με τα λεμφοκύτταρα.

Ενεργοποιούμενα όπως τα λεμφοκύτταρα από την παρουσία αντιγόνου, εκκρίνουν από την επιφάνειά τους ένα πλήθος ουσιών-μεταβιβαστών, περίπου 50 είδη, με τις οποίες ρυθμίζεται περαιτέρω η απάντηση των Τ και Β λεμφοκυττάρων[8].

Τα μακροφάγα φέρουν στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης υποδοχείς για την IgG, IgM και IgE.

Επίσης φέρουν ανεξάρτητους υποδοχείς συμπληρώματος για τα στοιχεία C_3b, C_3d, $C_{5\alpha}$, καθώς επίσης και για τις λεμφοκίνες.

Τέλος, συμμετέχουν ιδιαίτερα κατά την ανοσο-απάντηση, κατά την τελική παρουσίαση του αντιγόνου στα λεμφοκύτταρα.

στ. Ουδετερόφιλα. Αποτελούν το 60% των λευκών και είναι ικανά να μεταναστεύουν προς το ερέθισμα με χημιοτακτισμό, αφομοιώνοντας στοιχεία φλεγμονής. Φέρουν FC υποδοχείς για ανοσοσφαιρίνες, και για το στοιχείο του συμπληρώματος C_3[9].

ζ. Βασεόφιλα και Μαστοκύτταρα. Τα πρώτα ευρίσκονται στο συνδετικό ιστό, ενώ τα δεύτερα στον υποβλεννογόνιο του λεπτού εντέρου και στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα. Φέρουν FC υποδοχείς για την IgE, καθώς επίσης και κοκκία ισταμίνης και ηπαρίνης, που απελευθώνονται εάν συμβή σύνδεση αντιγόνου με την ανοσοσφαιρίνη[10].

η. Ηωσινόφιλα. Αποτελούν το 2-5% των λευκών, παρουσιάζουν φαγοκυτταρικές ιδιότητες, συλλαμβάνουν ανοσοσυμπλέγματα και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα αναφυλακτικά και αλλεργικά φαινόμενα εν γένει[11].

Β. ΜΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ Α.Σ.

Βασικώς εδώ υπάγονται οι ανοσοσφαιρίνες, το συμπλήρωμα, και οι λεμφοκίνες, στοιχεία τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του Α.Σ.

α. Ανοσοσφαιρίνες

Είναι γλυκοπρωτεΐνες αποτελούμενες από 82-96% από πολυπεπτίδια και 4-18% από υδατάνθρακες. Η πολυπεπτιδική τους δομή παρέχει όλες τις ιδιότητες των ανοσοσφαιρινών όπως την σύνδεση με αντιγόνα, την σύνδεση του συμπληρώματος, απελευθέρωση της ισταμίνης από τα μαστοκύτταρα, ή την σύνδεσή τους με μακροφάγα, Κ-κύτταρα ή λεμφοκύτταρα.

Από απόψεως δομής, αποτελούνται από δύο όμοιες βαρειές αλύσους Η (Heavy chains), και δυο όμοιες ελαφρές L (Light chains), που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Το τελι-

κό τμήμα της πολυπεπτιδικής αλύσου καλείται V περιοχή (variable region), που είναι περιοχή συνδέσεως των αντιγόνων και λέγεται ιδιότυπος. Η τελική περιοχή που επικρατούν οι υδατάνθρακες λέγεται C περιοχή (Constant region).

Από λειτουργικής πλευράς, υπάρχει το Fab τμήμα (Fragment antigen binding) που συνδέεται με αντιγόνα, ενώ ένα άλλο το FC τμήμα (Fragment crystalizable) συνδέεται με το συμπλήρωμα, με τα μακροφάγα, Κ-κύτταρα λεμφοκύτταρα, στοιχεία που φέρουν υποδοχείς για το τμήμα αυτό.

Οι Η αλύσεις (γ,α,μ,δ, και ε) αποφασίζουν για τις αντίστοιχες κλάσεις των ανοσοσφαιρινών όπως την IgG, IgM,IgA,IgD, και IgE[12].

Η ανοσοσφαιρίνη G αποτελεί το 75% όλων των ανοσοσφαιρινών διέρχεται τον πλακούντα παρέχοντας ανοσία τους πρώτους 6 μήνες στο έμβρυο, ενώ είναι η βασική ανοσοσφαιρίνη της δευτερογενούς ανόσου-απαντήσεως.

Η ανοσοσφαιρίνη M αποτελεί το 10% όλων, απαντά υπό πενταμερή μορφή, προεξάρχει στην πρωτογενή ανοσο-απάντηση, ενώ είναι η κυρία ανοσοσφαιρίνη στην επιφάνεια των Β-λεμφοκυττάρων.

Η ανοσοσφαιρίνη A αποτελεί το 15% των υπολοίπων,και υπάρχει σε αφθονία στο σίελο, δάκρυα, βρογχικές εκκρίσεις,βλεννογόνο στοματικής κοιλότητος και λεπτού εντέρου,υγρά κόλπου,παρέχοντας άμηνα και προστασία στις περιοχές αυτές.

Η ανοσοσφαιρίνη D παρουσιάζεται σε ίχνη, 0,2%, μονομερής, αδιευκρινίστου αποστολής. Ευρίσκεται μαζί με την IgM στην επιφάνεια των Β-λεμφοκυττάρων.

Η ανοσοσφαιρίνη E αποτελεί το 0,004%, μονομερής.Καθηλώνεται στους FC υποδοχείς των μαστοκυττάρων, και συντελεί στην απελευθέρωση από τα κύτταρα αυτά ουσιών-μεσολαβιτών (Mediators) μετά από σύνδεσή τους με αλλεργιογόνα.

β. Συμπλήρωμα (Σ)

Αποτελεί την πρωταρχική ουσία-μεταβιβαστή,κατά κάποιο τρόπο, σαν αποτέλεσμα δράσεως αντιγόνου-αντισώματος.

Αποτελείται τουλάχιστον από 20 πρωτεϊνικές ουσίες που βρίσκονται φυσιολογικά σε ανενεργή μορφή στο πλάσμα. Διακρίνονται μεταξύ τους χημικώς και ανοσολογικώς και έχουν την δυνατότητα να δρουν με αντισώματα, με την μεμβράνη κυττάρων, και μεταξύ τους.

Οι πρωτεΐνες του Σ παριστώνται με στοιχεία όπως C_1, C_2, C_3 κ.ο.κ. ή με ονόματα όπως προπερδίνη, παράγων Β, παράγων D κτλ[13].

Η ενεργοποίηση του Σ αποτελεί δυναμική διαδοχική πράξη κατά την οποία δραστηριοποιούνται τα πρωτεϊνικά του στοιχεία και στρατολογούνται διάφοροι μηχανισμοί, χυμικής και κυτταρικής ανοσίας, όπως απελευθέρωση ισταμίνης, η μετανάστευση λευκοκυττάρων, η απελευθέρωση αναφυλατοξινών, δραστηριότητες που θα οδηγήσουν τελικώς στη λύση κυττάρων, βακτηριδίων, ιών.

Υπάρχουν δυο μηχανισμοί ενεργοποιήσεως του Σ, η κλασική και η εναλλακτική οδός, που μέχρι της ενεργοποιήσεως του C_5 βαίνουν παραλλήλως, ενώ από εκεί και πέρα υπάρχει κοινή οδός ενεργοποιήσεως μέχρι του C_9 του Σ.

γ. Ενδιάμεσοι μεταβιβασταί κυτταρικής ανοσίας - Λεμφοκίναι.

Πρόκειται για ουσίες ευδιάλυτες που εκκρίνουν κυρίως τα λεμφοκύτταρα και μακροφάγα, όταν ενεργοποιούνται από αντιγόνο, και ονομάζονται λεμφοκίνες. Η αποστολή τους είναι μεγάλης σημασίας δεδομένου ότι υποβοηθούν στην επικοινωνία και τις αλληλοεπιδράσεις των κυτταρικών στοιχείων του Α.Σ. με τελικό σκοπό την φυσιολογική ανοσο-απάντηση.

Με την χρήση ειδικών ουσιών ενεργοποιήσεως των λεμφοκυττάρων έχει μελετηθεί ένα μεγάλο πλήθος λεμφοκινών, Ο παράγων αναχαιτίσεως μεταναστεύσεως των μακροφάγων (M.I.F), ο παράγων ενεργοποιήσεως (M.A.F), ο χημιοτακτικός παράγων ή ο παράγων αναχαιτίσεως των λευκών (L.I.F), είναι ένα μέρος αυτών των ουσιών. Άλλες σημαντικές λεμφοκίνες προάγουν την παραγωγή αντισωμάτων από τα Β-λεμφοκύτταρα, ή παρέχουν κυτταροτοξική δράση (Λεμφοτοξίνες) ή παρεμποδίζουν την αναπαραγωγή των ιών, όπως η ιντερφερόνη, και πολλές άλλες.

2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ - ΑΝΟΣΟΡΡΥΘΜΙΣΗ

Η φυσιολογική έκφραση της ανοσο-απαντήσεως απαιτεί μια συνεργασία και ωρισμένες αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των ανοσο-ανταγωνιστικών κυττάρων, κύριοι πρωτεργάται των οποίων είναι το Τ-λεμφοκύτταρο και Β-λεμφοκύτταρο. Επί παραδείγματι τα Β - λεμφοκύτταρα για να μετασχηματισθούν σε πλασματοκυτταρικές μορφές ώστε να παράγουν αντισώματα χρειάζονται δυο μηνύματα: Το ένα το παρέχει η παρουσία του αντιγόνου, το δε άλλο το παρέχουν τα βοηθητικά (Helpers) κύτταρα, τα οποία επίσης ενεργοποιούνται από το αντιγόνο, αλλά και από άλλα υποβοηθητικά κύτταρα, με την δράση μεταβιβαστών-ουσιών (ιντερλευκίνες). Επίσης τα ενδοθηλιακά, τα πολυμορφοπύρηνα, τα βασεόφιλα κύτταρα επηρεάζουν με τους ίδιους μηχανισμούς την ενεργοποίηση των βοηθητικων (Helpers) κυττάρων.

Τέλος, θα παρέμβουν και τα κατασταλτικά (suppressors) κύτταρα, ώστε να είναι ελεγχομένη έκτοτε η παραγωγή των αντισωμάτων από τα Β-λεμφοκύτταρα. Βεβαίως στην φυσιολογική ανοσο - απάντηση, βασικό ρόλο θα παίξει και το συμπλήρωμα[14].

3. ΤΥΠΟΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

Αρχικά επικρατούσε η αντίληψη ότι η ανάπτυξη ανοσολογικής απαντήσεως πάντοτε προστάτευε τον ξενιστή από αντιγονικές ουσίες. Σήμερα όμως είναι γνωστό ότι ακριβώς αυτοί οι μηχανισμοί ενδέχεται να είναι βλαπτικοί, προκαλόντας ιστικές βλάβες υπερευαισθησίας.

Έχουν αναγνωρισθή 5 τύποι ανοσολογικών αντιδράσεων, των οποίων περιγράφονται τα πλέον βασικά τους γνωρίσματα[15].

α. Αναφυλακτική αντίδραση τύπου Ι (ή άμεσος υπερευαισθησία).

Στην αντίδραση αυτή λαμβάνουν μέρος κύτταρα ιστών όπως τα βασεόφιλα και μαστοκύτταρα. Υπεύθυνα αντισώματα στην επιφάνεια των κυττάρων αυτών είναι της IgE κλάσεως, ενώ σαν αντιγόνα δρούν

διάφοροι ετερόλογοι πρωτεΐνες, ορμόνες, ένζυμα, πτερά, τροφές, φάρμακα. Με την σύνδεση των αντιγόνων αυτών με την IgE απελευθερώνονται πλήθος ουσιών όπως η ισταμίνη, σεροτονίνη, SRS - A, ECF-A, προσταγλανδίνες και άλλες ουσίες, με ποικίλες δράσεις στην διαβατότητα των αγγείων, στο χημιοτακτισμό, στις λείες μυϊκές ίνες κ.τ.λ. Χαρακτηριστικές αντιδράσεις είναι ο βρογχόσπασμος, το οίδημα λάρυγγος, δερματικές εκδηλώσεις, το shock.

β. Αντίδραση τύπου ΙΙ (Κυτταροτοξική αντίδραση)

Στην εκδήλωση της αντιδράσεως τύπου ΙΙ συμμετέχουν αντισώματα IgG ή IgM, που αντιδρούν εναντίον αντιγόνων επιφανείας κυτταρικών μεμβρανών, με αντιγονικώς φερόμενες πρωτεΐνες της επιφανείας των κυττάρων, ή εναντίον απτινών συνδεδεμένων με τα κύτταρα (π.χ. φάρμακα).

Κατά την αντίδραση με την συμμετοχή IgM αντισωμάτων ενεργοποιείται το συμπλήρωμα με συνέπεια την κυτταρόλυση, ενώ η συμμετοχή IgG αντισωμάτων οδηγεί σε φαγοκυττάρωση από μακροφάγα και ουδετερόφιλα κύτταρα που φέρουν Fc υποδοχείς των αντισωμάτων αυτών.

Αναλόγως επομένως του μηχανισμού που οδηγεί στην κυτταρική βλάβη διακρίνει κανείς τρεις επί μέρους μορφές της αντιδράσεως τύπου ΙΙ:

ΙΙα, με κυτταρόλυση, κατά την οποία κύτταρα-στόχοι των αντισωμάτων έχουν βρεθεί π.χ. ερυθροκύτταρα, αιμοπετάλια, επιθήλια νεφρικών σωληναρίων ή τοιχώματα πνευμονικών κυψελίδων, με αντίστοιχα αντιπροσωπευτικά παραδείγματα την αυτοάνοσο αιμολυτική αναιμία, την θρομβοπενική πορφύρα, την σπειραματονεφρίτιδα και το σύνδρομο Goodpasture.

ΙΙβ, Διεγερτική, κατά την οποία η παρουσία συμπλεγμάτων αντιγόνου/αντισώματος διεγείρει τα Β-λεμφοκύτταρα τα οποία έκτοτε παράγουν αυτο-αντισώματα. Κλασσικό παράδειγμα αποτελεί η παραγωγή αυτοαντισωμάτων εναντίον του θυρεοειδούς (L.A.T.S).

ΙΙγ, Δεσμευτική, κατά την οποία αυτοαντισώματα δρουν εναντίον υποδοχέων κυττάρων-στόχων παρεμποδίζοντας έκτοτε την λειτουργία των κυττάρων αυτών.

Αντιπροσωπευτικές καταστάσεις αποτελούν η Μυασθένεια Gravis κατά την οποία τα αντισώματα δρουν στους υποδοχείς ακετυλχολίνης αναστέλλοντας την μεταβίβαση των νευρομυϊκών συνάψεων, ή δρουν εναντίον υποδοχέων της ινσουλίνης με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσεως της τελευταίας.

Αντιπροσωπευτικές εκδηλώσεις των αντιδράσεων αυτών είναι η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, η αυτοάνοση θρομβοπενία, το σύνδρομο Goodpasture, οι αντιδράσεις από μετάγγιση, η ακοκκιοκυτταραιμία.

γ. Αντίδραση τύπου III (Ανοσοσυμπλέγματα).

Χαρακτηρίζεται από εναπόθεση συμπλεγμάτων αντιγόνου - αντισώματος σε ιστούς, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και εξ αυτού την πρόκληση φλεγμονωδών αντιδράσεων.

Για να συμβή εναπόθεση των ανοσοσυμπλεγμάτων,θα πρέπει αυτά να είναι διαλυτά και να μην καθιζάνουν, πράγμα που συμβαίνει όταν υπερέχει σε ποσότητα το αντιγόνο. Παρ'όλο ότι μόνον οι ανοσοσφαιρίνες IgG και IgM ενεργοποιούν το συμπλήρωμα, εν τούτοις η IgG κυρίως παίρνει μέρος στις αντιδράσεις τύπου III.

Ουσίες που δρουν αντιγονικά μπορεί να είναι ετερόλογοι ορροί, βακτηρίδια, φάρμακα.

Αντιπροσωπευτικές κλινικές εκδηλώσεις είναι το φαινόμενο Arthus, η ορονοσία και η σπειραματονεφρίτιδες.

δ. Αντίδραση τύπου IV (Επιβραδυνομένης ευαισθησίας).

Η αντίδραση αυτή είναι αποτέλεσμα συνδέσεως ευαισθητοποιημένων Τ-λεμφοκυττάρων με ειδικά αντιγόνα επιφανείας κυττάρων με τελικό-αποτέλεσμα την καταστροφή των κυττάρων αυτών.

Στην αντίδραση αυτή δεν μεσολαβούν αντισώματα,ή το συμπλήρωμα, αλλά συντελείται από τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα, με την βοήθεια των λεμφοκινών.

Κλασσικό παράδειγμα αντιδράσεως τύπου IV είναι η επιβραδυνομένη δερματική αντίδραση που εμφανίζεται 24-48 ώρες μετά την ένεση αντιγονικής ουσίας.

Ουσίες που δυνατόν να δράσουν αντιγονικά είναι μικρόβια, ιοί, παράσιτα, μύκητες, καρκινικά κύτταρα, ή και κύτταρα του ιδίου οργανισμού όπως συμβαίνει στην θυρεοειδίτιδα, την ρευματοειδή αρθρίτιδα ή το σύνδρομο Sjögren.

ε. **Αντίδραση VI** (Κυτταροτοξικότης εξαρτωμένη από αντίσωμα. A.D.C.C.).

Κυτταροτοξικά Κ-κύτταρα συνδέονται με τους FC υποδοχείς τους με αντισώματα που ήδη ευρίσκονται συνδεδεμένα με αντιγόνα στις επιφάνειες κυττάρων-στόχων. Με την γέφυρα αυτή που δημιουργούν τα αντισώματα, τα Κ-κύτταρα καταστρέφουν αυτά τα κύτταρα στόχους. Η θεωρία της παθογένειας της χρονίας ενεργού ηπατίτιδος, έχει σαν βάση αυτόν τον τύπο της αντιδράσεως.

4. ΠΕΡΙ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑΣ

Πρώτος ο Erlich το 1900 ανεκοίνωσε ότι το φυσιολογικό ανοσοβιολογικό σύστημα ουδέποτε δρα εναντίον στοιχείων του ιδίου του οργανισμού.

Σήμερα γενικώς θα μπορούσε κανείς να χαρακτηρίσει την αυτοανοσία σαν την κατάσταση εκείνη κατά την οποία, το ανοσοβιολογικό σύστημα του οργανισμού χάνει την ανοχή προς τα "ιδικά" του στοιχεία, παύοντας να τα αναγνωρίζει.

Κλινικώς ο ευρύς αριθμός των αυτοανόσων παθήσεων διακρίνεται σε δύο βασικές ομάδες:

α. Αυτοάνοσα νοσήματα μη ειδικά οργάνου.

β. Αυτοάνοσα νοσήματα ειδικά οργάνου.

Αντιπροσωπευτικές καταστάσεις της πρώτης ομάδας, κατά τις οποίες η αυτοάνοσος απάντηση εκδηλώνεται εναντίον ενός ευρέος αριθμού αυτοαντιγόνων είναι ο Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, το σύνδρομο Goodpasture, η ρευματοειδής αρθρίτις, το σύνδρομο Sjogren κ.τ.λ.

Καταστάσεις που αντιπροσωπεύουν την δευτέρα ομάδα των αυτοανόσων παθήσεων, κατά τις οποίες η αυτοάνοσος απάντηση εκδηλώνεται εναντίον ενός αυτοαντιγόνου είναι, η νόσος του Hashimoto, η νόσος του Basedow, ο νεανικός ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης,

η νόσος του Addison, και άλλες. Υπάρχουν βεβαίως και ενδιάμεσες καταστάσεις.

Το βασικό ερώτημα της αυτοανοσίας είναι πως και γιατί δημιουργούνται ξαφνικά στον οργανισμό αυτά τα αυτοαντισώματα. Διάφορες θεωρίες υπάρχουν που επεξηγούν το φαινόμενο αυτό.

1. Αυτοαντιγόνα βρίσκονται απομονωμένα εντός ιστών, τα οποία μετά ιστική καταστροφή δυνατόν να απελευθερωθούν ερχόμενα έκτοτε σε επαφή με τα κυτταρικά και μη στοιχεία του Α.Σ., το οποίο εκδηλώνει τότε την μη ανοχή του.

2. Η ελάττωση σε αριθμό ή λειτουργικότητα των κατασταλτικών (suppressors) κυττάρων, δυνατόν να προκαλέσει την έναρξη αυτοανόσου καταστάσεως.

3. Το επίπεδο ανοχής που παρουσιάζουν τα βοηθητικά (Helpers cells) κύτταρα, έναντι των "ιδικών" του οργανισμού αντιγόγων είναι αποφασιστικής σημασίας. Αν δραστηριοποιηθούν τα κύτταρα αυτά από άλλα αντιγόνα που παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντίδραση με αντιγόνα του οργανισμού, έκτοτε ενεργοποιούνται τα βοηθητικά κύτταρα, τα οποία εν συνεχεία δραστηριοποιούν τα Β-λεμφοκύτταρα για παραγωγή αντισωμάτων.

4. Υπάρχει δυνατότης "τροποποιήσεως" των καθοριστικών αντιγονικών ομάδων στις επιφάνειες κυττάρων ιστών, ώστε η δημιουργία νέων αντιγόνων δυνατόν να προκαλέσει έναρξη αυτοανόσου απαντήσεως. Η "τροποποίηση" αυτή μπορεί να επέλθει από φάρμακα, ιους, ή κατόπιν ανωμαλίας στα μικροσώματα.

5. Οι διαφοροποιήσεις των Τ-λεμφοκυττάρων (Helpers-suppressors), και κυτταροτοξικών, διέπονται από την δράση του θύμου. Κάθε λοιπόν λειτουργική ορμονική ανωμαλία του αδένος αυτού δυνατόν να καταλήξη σε εμφάνιση αυτοανόσου καταστάσεως.

6. Υπάρχει ακόμη σκέψη για πρωτοπαθή ανωμαλία των Β - λεμφοκυττάρων, ενώ τα βοηθητικά να είναι φυσιολογικά και αμέτοχα, οπότε κατ'αυτό τον τρόπο παράγονται κλώνοι Β-λεμφοκυττάρων οι οποίοι αυτοαντιδρούν. Αυτή η ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων προκαλείται από ενδογενή ή εξωγενή μιτογόνα πού καλούνται πολυκλωνικοί ενεργοποιηταί των Β-κυττάρων, με αποτέλεσμα την παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Στοιχεία με τέτοιες ιδιότητες είναι οι ιοί, ιδία ο Ε.Β.V, παράσιτα, το μυκόπλασμα, ή διάφορα αντιβιοτικά[16].

Γενικώς, παρά την αλματώδη εξέλιξη των μεθόδων ερεύνης της ανοσοβιολογίας, παραμένει ακόμη ανερμήνευτη η παθογένεια των περισσοτέρων από τις αυτοάνοσες παθήσεις.

5. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΠΙ ΗΠΑΤΙΚΩΝ ΝΟΣΩΝ

Από πολλών ετών ενοχοποιείται η συμμετοχή των ανοσοβιολογικών μηχανισμών στην εξέλιξη των περισσοτέρων ηπατικών παθήσεων.

Η ανίχνευση στον ορό πασχόντων από χρονία ενεργό ηπατίτιδα (Χ.Ε.Η) ιδίως της IgG,ή της IgM και IgA στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση (Π.Χ.Κ) και αλκοολική ηπατίτιδα αντιστοίχως,από μακρού έχουν αποτελέσει το επίκεντρο συζητήσεων[17].

Επίσης η παρουσία των "μη ειδικών οργάνου" αυτοαντισωμάτων λείων μυϊκών ινών και αντιπυρηνικών στην Χ.Ε.Η,και η επικράτηση αυτών μαζί με τα αντισώματα DNA στην αυτοάνοσο μορφή της σε ποσοστό περίπου 30-60%, επίσης υποδηλώνουν ύπαρξη αυτοανόσου μηχανισμού[18]. Τα δε αντιμιτοχονδριακά αντισώματα δυνατόν να ανιχνευθούν σε αναλογία 95% στην Π.Χ.Κ[19]. Δυνατόν επίσης να τα συναντήσομε σε συγγενείς πασχόντων από πρωτοπαθή χολική κίρρωση, καίτοι ασυμπτωματικών. Γενικώς είναι τα μόνα πουθεωρούνται παθογνωμονικά νόσου[19,20].

Τέλος τα αυτοαντισώματα αυτά ανιχνεύονται ακόμα και σε υγειά άτομα. Δεν φαίνεται να παρουσιάζουν ιδιαίτερο παθογενετικό ενδιαφέρον θεωρούμενα απότοκα ενός παθολογικού ανοσοβιολογικού συστήματος, το οποίον μάλιστα το χαρακτηρίζει γενετική βάση[21].

Από την άλλη πλευρά, στις χρόνιες ηπατικές παθήσεις,από παλαιά είχε εντοπισθεί η αύξηση παραγωγής αντισωμάτων,,είτε λόγω ανικανότητος του ΔΕΣ του ήπατος να εξουδετερώνει τους εντερικούς μικροοργανισμούς, είτε λόγω ελαττώσεως του απολύτου αριθμού των κυττάρων του Kupffer, είτε λόγω αναπτύξεως παραπλεύρου κυκλοφορίας[22]. Εξ άλλου, λόγω ηπατοκυτταρικής ανεπαρκείας παρουσιάζεται αυξημένη κυκλοφορία ενδοτοξινών, ουσίες που παρέ-

χουν ισχυρή δράση μιτογόνων, και ως εκ τούτου προκαλείται ενεργοποίηση του λεμφοκυτταρικού πληθυσμού με αποτέλεσμα την αλόγιστο έκτοτε παραγωγή αντισωμάτων. Αλλά και η μειωμένη δραστηριότης των κατασταλτικών Τ-λεμφοκυττάρων (suppressors), που παρατηρείται σε ωρισμένα ηπατικά νοσήματα, συντελεί στην υπερβολική παραγωγή αντισωμάτων[23]. Με αυτές άλλως τε τις παρατηρήσεις επεξηγείται η ανάπτυξη αντισωμάτων εναντίον μη εντερικών μικροοργανισμών όπως των ιων ερυθράς, ιλαράς, CMV επί χρονίας ενεργού ηπατίτιδος[24,25].

Γενικώς, στην παθογένεια ενός μεγάλου αριθμού ηπατοπαθειών αναφέρονται σήμερον οι ανοσοβιολογικοί μηχανισμοί.

Εκτός από την ηπατίτιδα από ιο, είναι οι φαρμακευτικές (από αλοθάνη, οξυφαινιζατίνη, μεθυλ ντόπα), είναι η αλκοολική ηπατική νόσος και άλλες, στις οποίες η ηπατοκυτταρική βλάβη είναι απότοκος ανοσολογικών αντιδράσεων εναντίον νεοαντινόνων της μεμβράνης των ηπατοκυττάρων, τροποποιηθέντων ίσως από την δράση των πάρα πάνω τοξικών ουσιών, αλλά και εναντίον "ιδίων" αντιγόνων[26,27,28,29].

Την κορυφή όμως των αυτοανόσων νοσημάτων κατέχουν ως γνωστόν η χρονία ενεργός ηπατίτις και η πρωτοπαθής χολική κίρρωση όπου ο κύριος στόχος ανοσοαντιδράσεων της πρώτης είναι η μεμβράνη του ηπατοκυττάρου, της δε δευτέρας τα επιθηλιακά κύτταρα ή η βασική μεμβράνη των ενδοηπατικών χοληφόρων. Οπωσδήποτε, ο αρχικός αιτιολογικός παράγων της τύπου "Β" Χ.Ε.Η είναι γνωστός, ενώ ο αυτοάνοσος χαρακτήρας της "Lupoid" Χ.Ε.Η προδίδεται από την σχέση της με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, ή την ευνοϊκή επίδραση των κορτικοειδών, και την επικράτηση των αυτοαντισωμάτων, ενώ η παρεμβολή γενετικού χαρακτήρος τονίζεται από την σχέση της με τα HLA B_8 και DR_3[18,21,30].

Η διαπίστωση κυτταρικής και χυμικής ανοσίας σε ασθενείς με Χ.Ε.Η θετικής και αρνητικής στο HBsAg, καθώς και η παρατήρηση του Lee και συν.[31], ότι τα λεμφοκύτταρα των 70% πασχόντων από Χ.Ε.Η αρνητική στο HBsAg παρουσιάζουν ευαισθησία προς το αντιγόνο αυτό, οδήγησαν τους Eddleston και Williams να διατυπώσουν μια θεωρία που επεξηγεί τους μηχανισμούς της παθογένειας των δυο αυτών νόσων[32].

Κατά τη θεωρία αυτή, στις περιπτώσεις Χ.Ε.Η θετικής στο HBsAg, αλλά και στις περισσότερες αρνητικές μορφές που κατά τον Lee ήταν κάποτε θετικές, έχει προκληθεί ευαισθητοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων από την παρουσία του ιού.

Σαν συνέπεια αυτού είναι, αφ'ενός η ηπατοκυτταρική καταστροφή λόγω αναπτύξεως κυτταρικής ανοσίας, και αφ'ετέρου η ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων, που ήδη είναι ευαισθητοποιημένα από την παρουσία στην επιφάνεια της ηπατοκυτταρικής μεμβράνης "τροποποιημένης" της ειδικής του ήπατος λιποπρωτεΐνης (L.S.P) που αναπτύσσεται πάρα κάτω. Τα κύτταρα αυτά όμως παράγουν συνεχώς αντισώματα έναντι του L.S.P διότι ναι μεν τα κατασταλτικά Ts λεμφοκύτταρα λειτουργούν καλώς, αλλά υπάρχει διαρκής ευαισθητοποίηση των βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων από την παρουσία του ιού.

Στην περίπτωση της Χ.Ε.Η αρνητικής στο αντιγόνο επιφανείας, ναι μεν τα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα λειτουργούν καλώς, υφίσταται όμως ελαττωματική λειτουργικότης των Ts-λεμφοκυττάρων, με συνέπεια την διαρκή παραγωγή από τα Β κύτταρα, αντισωμάτων.

Αυτή μάλιστα η μειονεκτικότης χαρακτηρίζεται από παρέμβαση γενετικών χαρακτήρων[33,34].

Ως προς την παθογένεια τώρα της πρωτοπαθούς χολικής κιρρώσεως υπάρχουν πολλές σκοτεινές πτυχές, παρά τον πράγματι οργασμό ερευνών. Σημαντική υπήρξε η παρατήρηση του Eddleston το οποίος διαπίστωσε ευαισθητοποίηση του λεμφικού συστήματος έναντι αντιγόνων χολής[35]. Αργότερα ο Mc Farlane και συν., διεπίστωσαν την ύπαρξη τριών τουλάχιστον αντιγόνων χολής[36,37]. Βεβαίως είναι ακόμη άγνωστος ο ρόλος αυτών των αντιγονικώς φερομένων ουσιών. Τελευταίως, η διαπίστωση υπάρξεως χολικών αντιγόνων μέσα σε κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα πασχόντων από Π.Χ.Κ, αυξάνει την πιθανότητα να παίζουν σημαντικό ρόλο τα συμπλέγματα αυτά στην παθογένεια της νόσου αυτής[37,38,39].

Από την μάλλον σύντομη ανασκόπηση, δεν υπάρχει καμμιά αμφιβολία ότι στις περισσότερες ηπατικές παθήσεις επεμβαίνουν αυτοάνοσοι μηχανισμοί που καταλήγουν στην βλάβη του ηπατικού κυττάρου ή των χοληφόρων. Οι ιστικές αυτές βλάβες τελικώς είτε εί-

ναι το αποτέλεσμα αμέσου δράσεως των ενεργών Τ - λεμφοκυττάρων (effectors T-cells), είτε των κυτταροτοξικών (K-cells) με την παρεμβολή αντισώματος (antibody dependent cellular cytotoxicity A.D.C.C), ή ενδέχεται πάλι να είναι το αποτέλεσμα κυτταρολύσεως με την δράση του συμπληρώματος[18,40,41,42,43,44,45].

Όποια και να είναι όμως η μορφή της παθογένειας της ιστικής βλάβης, το ενδιαφέρον όλων έχει συγκεντρωθεί στην έρευνα για ένα πιθανό προσδιορισμό των αυτοαντιγόνων-στόχων στην μεμβράνη των ηπατοκυττάρων, τα οποία προκάλεσαν τελικώς την έναρξη της αυτοανοσίας.

6. ΕΙΔΙΚΗ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΩΝ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΗ (L.S.P)

Το 1972 ο Meyer zum Buschenfelde και οι συνεργάτες του παρετήρησαν ότι κατά την ανοσοποίηση κουνελιών με επανηλειμμένη χορήγηση μιας ουσίας μεγάλου σχετικώς ειδικού βάρους (LP_1), την οποία ελάμβαναν από λυοτριβημένο ήπαρ, προκαλούσαν ιστολογικές αλλοιώσεις στα ζωα ανάλογες με της χρονίας ενεργού ηπατίτιδος στον άνθρωπο[46]. Αντιθέτως η χρησιμοποίηση για τον ίδιο σκοπό ενός διαφορετικού κλάσματος της ουσίας που απομονώθηκε (το LP_2), δεν προκαλούσε τις αλλοιώσεις αυτές. Το δραστικό τελικώς συστατικό LP_1 χαρακτηρίστηκε σαν ειδική του ήπατος λιποπρωτεϊνη, προέρχεται από την μεμβράνη των ηπατοκυττάρων, σε αντίθεση με το LP_2 που προέρχεται από το κυτταρόπλασμα, και διεθνώς ονομάζεται L.S.P (liver specific lipoprotein)[47,48].

Η αρχική ανάλυση του L.S.P από τον Hütteroth απέδειξε ότι αποτελείται από μεγάλες ποσότητες τριγλυκεριδίων και φωσφατιδίων. Ειδικότερα περιέχει 1gr% λεύκωμα, 28gr% φωσφατίδια, 8mg% χοληστερίνη και 290mgr% τριγλυκερίδια[49]. Ο χαρακτηρισμός "ειδική της ηπατοκυτταρικής μεμβράνης λιποπρωτεΐνη" έχει επικρατήσει από δημοσιεύσεις που αναφέρουν το L.S.P σαν αντιγονικό μόριο[27,42,45,50]. Τελευταίως όμως αποδείχθηκε ότι δεν πρόκειται για μια καθαρή "ειδική της ηπατοκυτταρικής μεμβράνης λιποπρωτεΐνη"[51]. Οι τελευταίες μελέτες απέδειξαν ότι το L.S.P είναι σύμπλεγμα μεγαλομοριακο αποτελούμενο από λιπίδια και από αντιγονικώς φερόμενες ουσίες προερχόμενες από την επιφάνεια της μεμβράνης των ηπατοκυττάρων. Μερικά από τα αντιγόνα αυτά δεν είναι

"ειδικά οργάνου". Άλλα όμως είναι,από τα οποία ένα τουλάχιστον είναι "ειδικόν είδους", ενώ τουλάχιστον ένα άλλο εκδηλώνη διασταυρούμενη αντίδραση με άλλα είδη[27,52,53].

Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρουσιάζει την μορφή φυσαλίδων διαμέτρου 40-1600nm, μεταξύ των οποίων υπάρχουν τμήματα από την μεμβράνη των ηπατοκυττάρων.

Τελευταίως επιχειρούνται προσπάθειες με την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων να απομονωθούν και ει δυνατόν να χαρακτηρισθούν τα αντιγόνα του L.S.P. Μια σημαντική παρατήρηση που προέκυψε από τις έρευνες αυτές αποδεικνύει ότι στο σύμπλεγμα L.S.P εμπεριέχεται υποδοχεύς ειδικός για τις γλυκοπρωτεΐνες, γνωστός σαν ηπατική λεκτίνη[54,55]. Πρόκειται μάλλον για πολύ σημαντική αντιγονική ουσία, το πρώτο αντιγόνο του συμπλέγματος L.S.P που απομονώνεται, είναι "ειδική του ήπατος" και παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με άλλα είδη,και περιέχει περίπου το 0.25% της πρωτεΐνης του L.S.P[56]

Παράλληλα με τις μελέτες για την δομή του L.S.P ένας σεβαστός αριθμός ερευνητικών κέντρων άρχισε να διαπιστώνει την ύπαρξη ευαισθητοποιήσεως των λεμφοκυττάρων στο σύμπλεγμα L.S.P, των περισσοτέρων ασθενών με Χ.Ε.Η, ή και εναντίον ετερολόγων ηπατοκυττάρων[56,57,58,59,60,61].Επίσης διαπιστώθηκε ανάπτυξη κυτταροτοξικότητος λεμφοκυττάρων, εναντίον ερυθροκυττάρων πτηνών καλυμένων με L.S.P in vitro[62]. Υπεύθυνος δε πληθυσμός κυττάρων για την κυτταροτοξικότητα αυτή δεν θεωρείται των Τ-λεμφοκυττάρων. Πιθανώς πρόκειται για Κ-κύτταρα που η δράση τους εξαρτάται από την παρεμβολή αντισώματος, δεδομένου ότι προσθήκη μικρής ποσότητος IgG αναχαιτίζει την αντίδραση κυτταροτοξικότητος (A. D.C.C)[59].

Σημαντική επίσης ήταν η διαπίστωση της αναστολής της κυτταροτοξικότητος μετά από προσθήκη μικρής ποσότητος λιποπρωτεΐνης (L.S.P), γεγονός που σήμαινε ότι υπεύθυνο αντιγόνο - στόχος της κυτταροτοξικότητος αυτής ήταν το L.S.P[59].

Γενικό συμπέρασμα τελευταίως είναι ότι όλες αυτές οι αντιδράσεις κυτταροτοξικότητος, εκδηλώνονται εναντίον ειδικού (ών) της μεμβράνης των ηπατοκυττάρων αντιγόνου (ων) που εμπεριέχον-

ται στο σύμπλεγμα L.S.P. Επίσης, δεδομένου ότι οι αντιδράσεις αυτές εκδηλώνονται εναντίον ηπατοκυττάρων ανθρώπου, κουνελιών, ή ποντικών κ.τ.λ., είναι εμφανές ότι το (τα) αντιγόνα - στόχοι παρέχουν διασταυρούμενη αντίδραση σε διάφορα είδη ζώντων οργανισμών, όπως άλλως τε αναφέρθηκε στη περιγραφή της δομής του L.S.P[18,42,50,63].

Τι συμβαίνει όμως με την πιθανή ύπαρξη στον ορό ασθενών αντισωμάτων εναντίον της λιποπρωτεΐνης αυτής;

Anti-L.S.P αντισώματα

Η ύπαρξη του αντισώματος L.S.P κατ'ουσίαν άρχισε να συζητείται για πρώτη φορά, σε μελέτες του Hopf και συνεργατών οι οποίοι παρετήρησαν μια εναπόθεση IgG σε ηπατοκύτταρα ασθενών με χρονία ενεργό ηπατίτιδα, αλλά και σε ηπατοκύτταρα κουνελιών μετά από επώαση με ορό ασθενών[54]. Αργότερα οι Bianchi και συνεργάτες επιβεβαίωσαν τις παρατηρήσεις αυτές με την παρατήρηση ότι μετά από προσθήκη ποσότητος L.S.P στον ορό των ασθενών, ανέστελαν την εναπόθεση της IgG[55].

Έκτοτε οι μελέτες πέντε ερευνητικών κέντρων από την Αγγλία, Γερμανία, και Ιαπωνία, χρησιμοποιόντας κατ'ουσίαν δυο μεθόδους R.I.A για ανίχνευση των anti-L.S.P αντισωμάτων, έχουν καταλήξει σε πλήρη συμφωνία αποτελεσμάτων.

Τούτο είναι σημαντικό, διότι παρά το διάφορο των μεθόδων, (Protein-A R.I.A) και (double-Antibody R.I.A), τα προαναφερόμενα ερευνητικά κέντρα διεπίστωσαν την παρουσία των anti - L.S.P αντισωμάτων στον ορό πασχόντων από οξεία τύπου "A" και "B" ηπατίτιδα, και περισσότερον συχνά στους πάσχοντες από χρονία ενεργό ηπατίτιδα και πρωτοπαθή χολική κίρρωση, όπου οι τίτλοι των αντισωμάτων βρέθηκαν πολύ υψηλοί[66,67,68,69,70,71].

Τελευταία διαπιστώθηκε η ύπαρξη anti-L.S.P αντισωμάτων σε πάσχοντες από αλκοολική ηπατική νόσο, και σε ποσοστό 60% στους ασθενείς με ενεργό μορφή αλκοολικής κιρρώσεως, εν σχέσει προς τα υπόλοιπα στάδια της νόσου όπου το ποσοστό των αντισωμάτων ήταν 15% και σε χαμηλούς τίτλους[72].

Αντισώματα L.S.P έχουν διαπιστωθεί επίσης, σχετικά σπάνια,

σε περιπτώσεις οξείας Non A - Non B ηπατίτιδος,και σε χαμηλούς τίτλους, οι οποίοι με λιαν ταχύ ρυθμό έπεφταν κατά το στάδιο αναρρώσεως[66,73,74].

Αντιθέτως, anti-L.S.P αντισώματα δεν διαπιστώθηκαν ποτέ σε οξείες τοξικές βλάβες του ήπατος (π.χ. δηλητηριάσεις με ακεταμινοφαίνη), πλην σπανίων περιπτώσεων, παροδικά και κατά το στάδιο αναρρώσεως γεγονός που ίσως αντανακλά στην βλάβη του ηπατοκυττάρου[73].

Πολύ σημαντική υπήρξε η διαπίστωση σχέσεως μεταξύ της συχνότητος, αλλά και του ύψους των τίτλων των anti-L.S.P αντισωμάτων, και της περιπυλαίας φλεγμονώδους διηθήσεως και διαυρωτικής νεκρώσεως (piecemeal necrosis) σε περιπτώσεις χρονίας ενεργού ηπατίτιδος, πρωτοπαθούς χολικής κιρρώσεως, και αλκοολικής ηπατικής νόσου. Εξ αυτών συμπεραίνεται ότι τα αυτοαντισώματα αυτά δεν είναι "ειδικά νόσου" αλλά "ειδικά ιστολογικής αλλοιώσεως"[66,75,76].

Έχει διαπιστωθεί δε τελευταίως,ότι η ανύψωση των τίτλων των αντισωμάτων αυτών προηγείται της ανυψώσεως των αμινοτρανσφεραζών, γεγονός που σημαίνει ότι η εμφάνιση των L.S.P αντισωμάτων προηγείται της ηπατοκυτταρικής βλάβης[73].

Τέλος εξαιρετικής σημασίας είναι η διαπίστωση ότι σε πάσχοντες από χρονία ενεργό ηπατίτιδα των οποίων έχει διακοπεί η θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, η κατά καιρούς ανίχνευση anti-L.S.P αντισωμάτων μπορεί να "προβλέψη" υποτροπή της νόσου, δεδομένου ότι έχει διαπιστωθεί να προηγείται η ανύψωση των τίτλων των, της υποτροπής (B.S.G, Spring Meeting,Salford 1984).

Κλείνοντας την ιστορία του L.S.P και του αντισώματός του, καλό είναι να αναφερθούν περιληπτικά ωρισμένα για την πιθανή σχέση του anti-L.S.P και του αντισώματος L.M.A (Liver membrane antibody).

Το L.M.A είναι ένα αντίσωμα IgM ή IgG κλάσεως που αντιδρά με "ειδικό του ήπατος" ουχί όμως "ειδικό είδους" αντιγόνο (LM-ag), στην επιφάνεια της ηπατοκυτταρικής μεμβράνης.Με ανοσοφθορισμό δίδει ένα χαρακτηριστικό λειο "γραμμικό" σχήμα που διακρίνεται από το "κοκκιώδες" σχήμα που δίδουν άλλα αντισώματα[76,77,78].

Τα αποτελέσματα από επτά μελέτες επάνω στο σύστημα L.M.A / LM-ag συμφωνούν ότι το αντίσωμα L.M.A ανιχνεύεται σε αναλογία 42%, σε ασθενείς με αυτοάνοσο χρονία ενεργό ηπατίτιδα, 38% με κρυψιγενή κίρρωση, 24% με πρωτοπαθή χολική κίρρωση, 7% με χρονία ενεργό ηπατίτιδα, και 6% με αλκοολική ηπατική νόσο[68,71,77,79,80]. Εν αντιθέσει με το L.S.P, το L.M.A έχει ανιχνευθεί στον ορό 9 από 10 ασθενών με χρονία Non A-Non B ηπατίτιδα[81].

Γενικώς ποιά είναι η σχέση μεταξύ των δύο αυτών αντισωμάτων δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως. Ο Meliconi διεπίστωσε ότι προσθήκη L.S.P αναχαίτιζε την σύνδεση του L.M.A αλλά μόνον σε 4 από 11 υπό εξέταση ορούς. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι έρευνες του Burt. Και στις δυο περιπτώσεις οι τίτλοι των ολίγων αυτών περιστατικών ήσαν χαμηλοί[80,82]. Εν πάσει περιπτώσει, ο Meyer zum Buschenfelde σε μελέτες του αποδεικνύει ότι πρόκειται για δυο διαφορετικά αντισώματα[83].Πάντως εφ'όσον στο σύμπλεγμα LSP υπάρχει μικρή ποσότητα LM-ag, επεξηγεί γιατί οι τίτλοι των αντισωμάτων L.M.A. που βρέθηκαν από τον Meliconi και Burt ήσαν χαμηλοί[47,48].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρουσία αυτοαντισωμάτων εναντίον του συμπλέγματος της ειδικής του ήπατος λιποπρωτείνης (L.S.P), στον ορό ασθενών με οξεία ιογενή ηπατίτιδα, ή την χρονία μορφή της, ή ακόμη στον ορό ασθενών με αυτοάνοσο χρονία ενεργό ηπατίτιδα και πρωτοπαθή χολική κίρρωση, έχει ευρέως αναφερθή μέχρι σήμερα[66,68,69,72,73,75].

Ποιό είναι το (ή τα) ακριβή αντιγόνα-στόχοι των αντισωμάτων αυτών μέσα στο σύμπλεγμα του L.S.P, δεν έχει διευκρινισθεί. Όπως είναι γνωστό, μερικά από τα αντιγόνα του συμπλέγματος L.S.P είναι "ειδικά οργάνου" από τα οποία άλλα μεν είναι "ειδικά είδους" και άλλα παρουσιάζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με "άλλα είδη" ζώντων οργανισμών[53,54,69,84].

Ο Manns και οι συνεργάτες του μετά από μελέτες αναφέρουν ότι σε καταστάσεις οξείας ιογενούς ηπατίτιδος τύπου "Α", παρουσιάζονται αντισώματα-L.S.P (Anti-L.S.P) στον ορό πασχόντων, κατά το στάδιο εισβολής των συμπτωμάτων, και αντιδρούν επικρατιστικά με τις "ειδικές του ανθρώπου" καθοριστικές αντιγονικές θέσεις του συμπλέγματος-L.S.P. Η αντίδραση αυτή αποτελεί ένα πρόσκαιρο φαινόμενο αναπτυχθείσης αυτοανοσίας[68].

Στις περιπτώσεις τώρα ιογενούς τύπου "Β" ηπατίτιδος που παρουσιάζουν εξέλιξη χρονιότητος, π.χ. της Χ.Ε.Η, δίδεται η εξήγηση από την ίδια ερευνητική ομάδα, ότι υπάρχει μια "απώλεια ανοχής" εκ μέρους του ξενιστού προς τις αντιγονικές καθοριστικές θέσεις του συμπλέγματος-L.S.P που παρουσιάζουν "διασταυρούμενη αντίδραση προς άλλα είδη"[52].

Οι παρατηρήσεις αυτές δεν έχουν βεβαίως τεκμηριωθεί, αλλά εάν εκφράζουν την πραγματικότητα, είναι όντως τεραστίας αξίας, αφ'ενός διότι συμβάλλουν στην επεξήγηση της παθογενείας της Χ.Ε.Η, και αφ'ετέρου με την ανεύρεση αντισωμάτων-L.S.P, εναντίον αντιγόνων-L.S.P όχι "ειδικών είδους" σε περιπτώσεις οξείας ιογενούς τύπου "Β" ηπατίτιδος, θα μπορούσε κανείς να προδικάζει μια επιπλοκή χρονιότητος της νόσου.

Σκοπός λοιπόν της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της κλινικής σημασίας των anti-LSP αντισωμάτων σαν προγνωστικών δεικτών χρονιότητος της ηπατίτιδος "Β".

Για τον σκοπό αυτό μελετήσαμε το είδος της συνδέσεως που πραγματοποιούν τα αντισώματα-LSP στον ορό 20 ασθενών πασχόντων από οξεία ιογενή ηπατίτιδα τύπου "Α" και "Β" χωρίς επιπλοκές,με αντιγόνα-LSP προερχόμενα από ήπαρ ανθρώπου, κονίκλου,και μυός.

2. ΥΛΙΚΟ - ΜΕΘΟΔΟΣ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν 20 ασθενείς πάσχοντες από οξεία ιογενή ηπατίτιδα χωρίς επιπλοκές. Οι 10 έπασχαν από τύπου "Α" ηπατίτιδα (6 άνδρες, 4 γυναίκες), και οι άλλοι 10 από τύπου "Β" (8 άνδρες, 2 γυναίκες).

Για την διαγνωση κάθε περιπτώσεως χρησιμοποιήθηκαν τα τρέχοντα συνήθη βιοχημικά κριτήρια. Ειδικότερα δε, για μεν την επιβεβαίωση των τύπου "Α" περιπτώσεων, χρησιμοποιήθηκε η ανίχνευση στον ορό των αντισωμάτων-HAV της IgM κλάσεως, και για τους πάσχοντες από την τύπου "Β" ηπατίτιδα χρησιμοποιήθηκε η ανίχνευση του Αυστραλιανού αντιγόνου (HBsAg). Το τελευταίο βρέθηκε σε τίτλους από 1:400 έως 1:102.400 (Μέση τιμή 1:12.800).

Για την ανίχνευση δε των πάρα πάνω δεικτών χρησιμοποιήθηκε η ραδιο-ανοσολογική μέθοδος.

Η λήψη του αίματος των ασθενών για τον προσδιορισμό των αντισωμάτων-L.S.P, πραγματοποιήθηκε κατά τον χρόνο της αρχικής παρουσιάσεως του καθ'ενός στο Νοσοκομείο. Οι δε οροί των εφυλάσσοντο μέχρι να μελετηθούν, στους -20°C.

Ειδικότερα δε για τους ασθενείς με τύπου "Β" ηπατίτιδα, εκτός από το αρχικό δείγμα αίματος, πραγματοποιήθηκε η λήψη δυο επί πλέον και σε διάστημα 1-4 εβδομάδων και 5-9 εβδομάδων από το αρχικό πρώτο δείγμα.

Πρέπει να σημειωθεί ότι στην ομάδα των ασθενών με τύπου "Β" ηπατίτιδα, οι τίτλοι του HBsAg του δευτέρου δείγματος αίματος (1-4 εβδομάδα), είχαν μειωθεί παρουσιάζοντας τιμές από 1:8 έως 1:51.200 (Μέση τιμή 1:1600), ενώ από την εξέταση του τρίτου δείγματος (5-9 εβδομάδα), απεδείχθει ότι 5 ασθενείς είχαν αρνητικοποιηθεί στο HBsAg, οι δε τίτλοι στους υπολοίπους θετικούς παρουσίαζαν τιμές από 1:8 έως 1:6.400 (Μέση τιμή 1:256).

Επανερχόμενοι τώρα στην ανάλυση της μεθόδου της παρούσας εργασίας, σε κάθε εκτέλεση της ραδιο-ανοσολογικής μεθόδου για την ανίχνευση των αντισωμάτων-LSP, εκτός από τους όρους των υπό μελέτη ασθενών, χρησιμοποιείτο πάντα ορός πάσχοντος από αυτοάνοσο Χ.Ε.Η.-

γνωστός για τους λίαν υψηλούς τίτλους αντισωμάτων, καθώς επίσης και ορός που αποτελούσε μείγμα ορών 20 απολύτως φυσιολογικών ατόμων. Εξυπακούεται ότι τα δυο τελευταία δείγματα ορών αποτελούσαν το θετικό και αρνητικό μάρτυρα για την μελέτη.

Τέλος, η μέση τιμή των τίτλων των αντισωμάτων-L.S.P που ανιχνεύθηκαν στον ορό του θετικού μάρτυρα ήταν 1:4.600, 1:2.400, και 1:7.000, έναντι του L.S.P από ήπαρ ανθρώπου, κονίκλου, και μυός αντιστοίχως.

α. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΗΣ (L.S.P).

Για την παρασκευή L.S.P ανθρώπου χρησιμοποιήθηκε το ήπαρ δότου νεφρού, ο οποίος αποδεδειγμένα δεν έπασχε από οιοδήποτε ηπατικό νόσημα, μετά από έλεγχο των συνήθων ηπατικών δοκιμασιών, αυτοαντισωμάτων, και δεικτών ηπατίτιδος τύπου "Α" και "Β". Για δε την παρασκευή L.S.P κονίκλου και μυός, χρησιμοποιήθηκε το ήπαρ αυτών των ζώων αφού διατηρήθηκαν, χωρίς την λήψη τροφής, από το απόγευμα της προηγουμένης.

Το ήπαρ από κάθε είδος, ομογενοποιήθηκε χωριστά (40% w/v), σε σουκρόζη 0,25M, και pH 8. Στη συνέχεια το ομογενοποιημένο υλικό φυγοκεντρήθηκε στις 100.000 x g για μια ώρα, απομονώθηκε το υπερκείμενο το οποίο διοχετεύθηκε δια μέσω στήλης Sepharose 6B και σε buffer βορικού οξέος/Βορικό νάτριο, ιονικής ισχύος 0.1 M και pH 8,5, που περιείχε 1mM borate/EDTA buffer (disodium-ethylene-diamine-tetraacetate)[85].

Επακολούθησε στη συνέχεια η συλλογή του L.S.P το οποίο αντιστοιχούσε στην πρώτη καμπύλη του χρωματογραφικού χάρτου. Κατόπιν το υλικό συμπυκνώθηκε με την χρήση σουκρόζης η οποία στην συνέχεια απομακρύνθηκε με την χρησιμοποίηση 5x1 l borate/EDTA buffer.

Τέλος, αναγκαίος ήταν ο υπολογισμός της ποσοστιαίας αναλογίας της συνυπαρχούσης πρωτεΐνης στο υλικό, ο οποίος επιτυγχάνετο σύμφωνα με την μέθοδο των Lawry και συνεργατών, με την χρησιμοποίηση B.S.A (bovine serum albumin) της Sigma, σαν Standard[86].

β. ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΝΣΙΣ ΤΟΥ L.S.P.

Ποσότης 20 ng από κάθε ένα από τα τρία είδη του L.S.P ραδιο-

σημαίνετο σύμφωνα με την μέθοδο των David και Reisfeld με την χρησιμοποίηση λακτοπεροξειδάσης (Sigma), και ελευθέρου φορέος Na ^{125}I (Amersham).

Στη συνέχεια το ελεύθερο ^{125}I απομακρύνετο με επανηλειμμένες διαπηδήσεις εντός Borate/EDTA ρυθμιστικού διαλύματος[6,7].

Τέλος, οι ειδικές τιμές ραδιενεργείας που υπολογίστηκαν βρέθηκαν 21.200 cpm/ng για το L.S.P του ανθρώπου (H-L.S.P), 24.800 cpm/ng για το L.S.P κονίκλου (Rb-L.S.P), και 21.000 cpm/ng για το L.S.P του μυός (Ra-L.S.P).

γ. ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΡΑΔΙΟ-ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Χρησιμοποιήθηκε ραδιο-ανοσολογική μέθοδος (R.I.A)με την χρήση της πρωτεΐνης "A" των κυττάρων σταφυλοκκόκου[67].Τα βασικά στάδια της μεθόδου απεικονίζονται στον (Πίνακα I).

Ποσότητα 25ml υπό εξέταση ορού, ο οποίος προηγουμένως έχει αδρανοποιηθεί στην θερμοκρασία των 56^{0}C επί 30',χρησιμοποιείται για να γίνουν οι κατάλληλες αραιώσεις με την χρησιμοποίηση borate/EDTA buffer το οποίο περιέχει 1% B.S.A (Sigma,R.I.A grade).

Οι αραιώσεις αυτές των ορών τοποθετούνται σε διπλά δείγματα μέσα σε φυγοκεντρικά σωληνάρια από πολυπροπυλένιο των 1,5cc στα οποία προστίθενται 25ml (2,5ng) ραδιοσεσημασμένο ^{125}I-L.S.P. Επακολουθεί επώαση όλη την νύκτα σε περιβάλλον 4^{0}C.

Την επομένη προστίθεται στο περιεχόμενο κάθε σωληναρίου,1mg κυττάρων σταφυλοκόκκου σε ξηρά μορφή για να επιτευχθεί η καθίζηση των ανοσοσυμπλεγμάτων με την βοήθεια της πρωτεΐνης "A" των κυττάρων (Newman D_2C στέλεχος Sigma).Η ποσότης αυτή του 1mgr περιέχεται σε 100 μl borate/EDTA/Albumin ρυθμιστικό διάλυμα.

Επακολουθεί επώαση 3 ωρών στη θερμοκρασία των 4^{0}C κατά την διάρκεια της οποίας τα σωληνάρια ανακινούνται κάθε μισή ώρα.

Εν συνεχεία με την προσθήκη καταλλήλου ποσότητος borate/EDTA / Albumin ρυθμιστικού διαλύματος, το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου, γίνεται 1 cc.

Επακολουθεί φυγοκέντρηση όλων των σωληναρίων για 2',εν συνεχεία αναρρόφηση πολύ αργά ποσότητος 0,5ml από κάθε ένα, η οποία μεταφέρεται σε σωληνάρια με επίπεδο πυθμένα από πολυστιρένιο (Luckham's, U.K.).

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι

ΜΕΘΟΔΟΣ: 'ΠΡΩΤΕΪΝΗ Α'' - ΡΑΔΙΟ-ΑΝΟΣΟ-ΑΝΑΛΥΣΗ

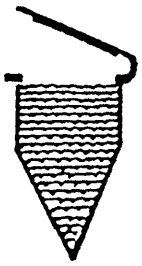
1. •ΠΡΟΣΘΗΚΗ 25μl ΟΡΟΥ
   •ΠΡΟΣΘΗΚΗ 25μl ^{125}I-L.S.P.

---

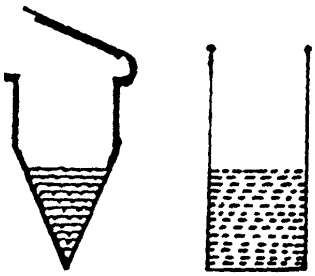
2. •ΕΠΩΑΣΗ ΟΛΟΝΥΚΤΙΑ ΣΕ 4°C

3. •ΠΡΟΣΘΗΚΗ 1mg ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥ ΣΕ 100μl borate/EDTA
   •ΕΠΩΑΣΗ ΕΠΙ 3 ΩΡΕΣ ΣΕ 4°C

4. •ΠΡΟΣΘΗΚΗ 850μl borate/EDTA buffer
   •ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ χ 2'



5. •ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΑΝΑ 500μl



6. •ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΟΝ γ.COUNTER ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ

$$\% \text{ ΣΥΝΔΕΣΗ} = \frac{\text{CPM ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟ} - \text{CPM ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟ}}{\text{CPM ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟ} + \text{CPM ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟ}} \times 100$$

Τέλος τοποθετούνται στον γ-Counter (Packard) τα δυο είδη σωληναρίων ανά ζεύγη, του μεν ενός να περιέχει το υπερκείμενο και του άλλου το υποκείμενο μαζί με το ίζημα, για προσδιορισμό της ραδιενεργείας επί ένα λεπτό.

Η επί τοις εκατό σύνδεση του αντισώματος με το ^{125}I - L.S.P προσδιορίζεται από τον τύπο:

$$\frac{\text{CPM Υποκείμενο - CPM Υπερκείμενο}}{\text{CPM Υποκείμενο + CPM Υπερκείμενο}} \times 100$$

Τελικώς καθορίζοντο οι τίτλοι των Anti-L.S.P αντισωμάτων, με τον προσδιορισμό του ποσοστού δεσμεύσεως του υπό εξέταση ορού, σε διάφορες αραιώσεις.

Το σημείο εκείνο της γραμμικής παραστάσεως, που σχηματιζόταν από τις διαδοχικές αραιώσεις των υπό εξέταση ορών, που έτεμνε την καμπύλη που σχηματιζόταν από τις αραιώσεις των ορών 20 απολύτως φυσιολογικών ατόμων (Μέση τιμή +2 SD κάθε αραιώσεως), καθόριζε τον τίτλο των αντισωμάτων[67].

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία "t" για την σύγκριση των διαφορών μεταξύ των τίτλων των αντισωμάτων σε κάθε ομάδα ασθενών.

- 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το σύνολο των ασθενών με τύπου "Α" ηπατίτιδα βρέθηκαν να είναι οροθετικοί στα αντισώματα-L.S.P εναντίον L.S.P ανθρώπου (Anti-HL.S.P), L.S.P κονίκλου (Anti-RbL.S.P), και ενατίον του μυός (Anti-RaL.S.P) (Σχήμα Ι).

Οι τίτλοι των Anti-Ra L.S.P βρέθηκαν σημαντικώς υψηλότεροι των άντιστοίχων Anti-H L.S.P ($p<0.02$) και οι τελευταίοι σημαντικώς υψηλότεροι των Anti-Rb L.S.P ($p<0.001$).

Αλλά και οι πάσχοντες από τύπου "Β" ηπατίτιδα απεδείχθησαν όλοι οροθετικοί και για τα τρια είδη αντισώματα-L.S.P, από την εξέταση του αρχικού δείγματος αίματος (Πίνακας ΙΙ).

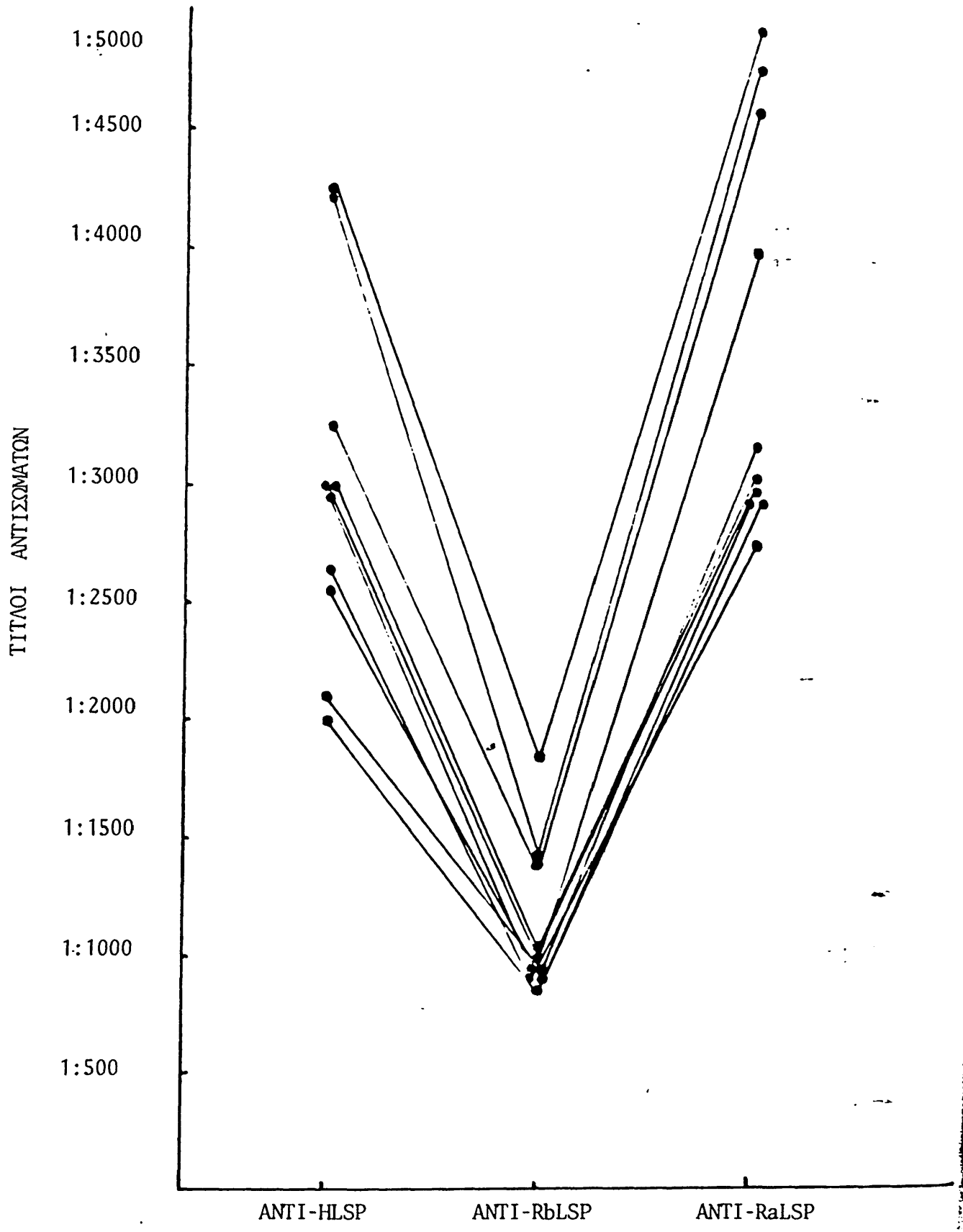
Και εδώ επίσης οι τίτλοι των Anti-Ra L.S.P αποδείχθηκαν σημαντικώς υψηλότεροι των αντιστοίχων του ανθρώπου, Anti-H L.S.P ($p<0.05$), ενώ οι τελευταίοι βρέθηκαν υψηλότεροι των αντιστοίχων του κονίκλου, Anti-Rb L.S.P ($p<0.02$).

Σημαντική εξ άλλου υπήρξε η παρατήρηση ότι η ομάδα των πασχόντων από τύπου "Α" ηπατίτιδα, παρουσίασε τίτλους Anti-Ra L.S.P σαφώς υψηλότερους των αντιστοίχων αντισωμάτων, επί των πασχόντων από τύπου "Β" ηπατίτιδα ($p<0.00$).

Δεν παρατηρήθηκε όμως το ίδιο στις δυο αυτές ομάδες ασθενών όσον αφορά τα Anti-Rb L.S.P όπου η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($p>0.01$).

Στην ομάδα των ασθενών με τύπου "Β" ηπατίτιδα οι τίτλοι και των τριών ειδών αντισωμάτων (Anti-H L.S.P, Anti-Ra L.S.P , Anti-Rb L.S.P), παρουσίαζαν μια προοδευτική ελάττωση σε συνάρτηση με την πάροδο της αναρρώσεως, εκτός από τους τίτλους των αντισωμάτων του Νο 3 ασθενούς, στον οποίο παρέμεναν υψηλοί. Τονίζεται όμως ότι ο ασθενής αυτός δεν παρουσίασε την κλινική και βιοχημική βελτίωση που χαρακτήριζε τους άλλους ασθενείς (Πίνακας ΙΙ).

Κατά την ανίχνευση των αντισωμάτων-L.S.P την 1-4 εβδομάδα μετά την αρχική παρουσίαση των ασθενών με τύπου "Β" ηπατίτιδα,



ΣΧΗΜΑ I. Τίτλοι αντισωμάτων-LSP αντιδρώντων με την ειδική λιποπρωτεΐνη του ήπατος ανθρώπου (H.LSP), κονίκλου(RbLSP), και μυός (Ra.LSP), στον ορό ασθενών με οξεία τύπου "A" ηπατίτιδα (AVH-A), κατά το στάδιο της αρχικής παρουσιάσεως.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙ. Τίτλοι αντισωμάτων-L.S.P αντιδρώντων με την ειδική λιποπρωτεΐνη του ήπατος ανθρώπου (H.L.S.P),κονίκλου (Rb.L.S.P),και μυός (Ra.L.S.P), στον ορό ασθενών με οξεία τύπου "Β" ηπατίτιδα (AVH-B), κατά το στάδιο της αρχικής παρουσιάσεως και κατά την ανάρρωση.

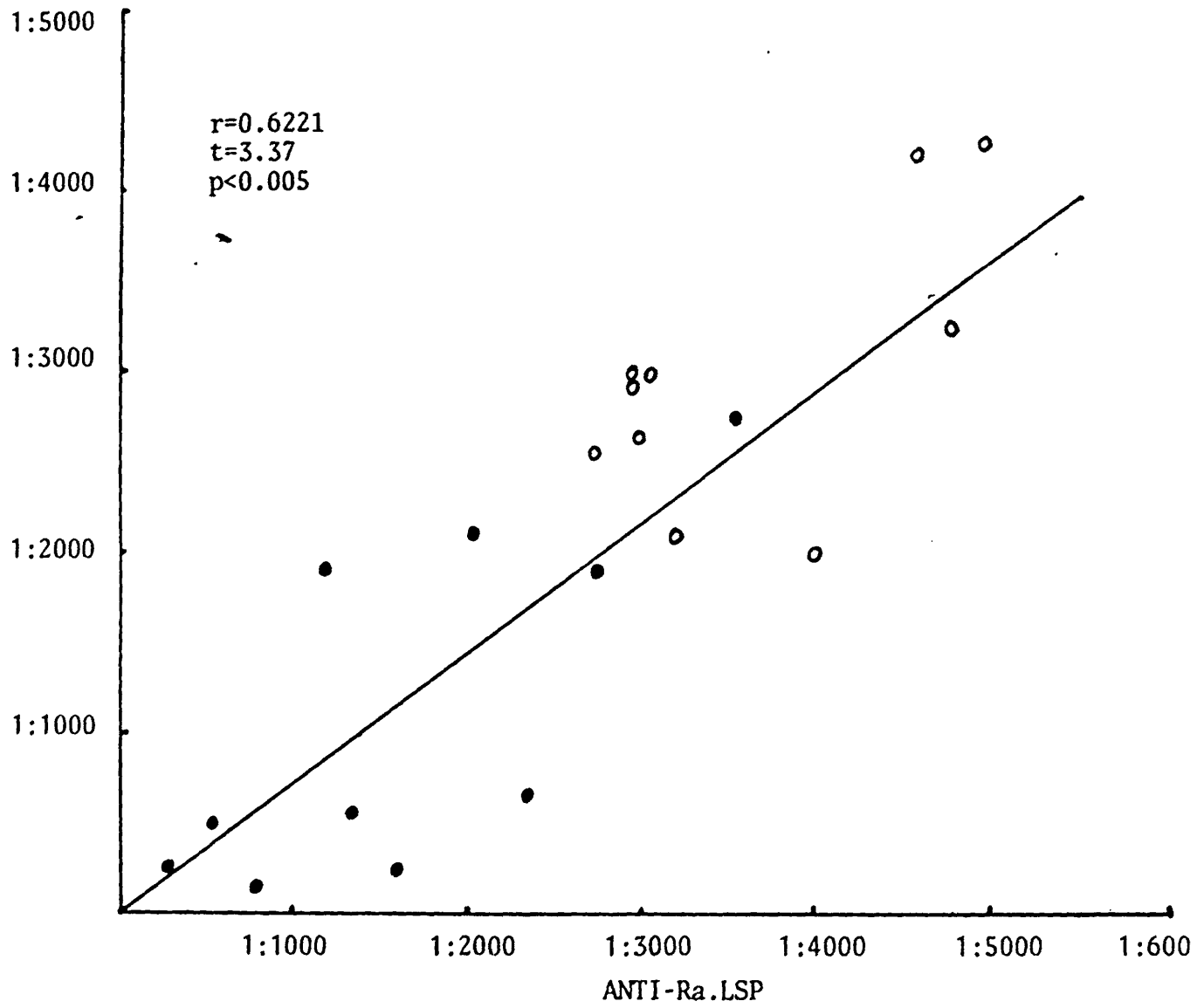
No ΑΣΘΕΝΩΝ	ANTI - H-L.S.P			ANTI - RbL.S.P			ANTI - Ra L.S.P		
	ΑΡΧΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ	1-4 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ	5-9 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ	ΑΡΧΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ	1-4 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ	5-9 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ	ΑΡΧΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ	1-4 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ	5-9 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ
1	1:2750	1:1650	(-)	1:1150	1:200	1:200	1:3550	1:2000	(-)
2	1:2100	1:600	(-)	1:950	1:100	1:250	1:2050	1:1100	1:700
3	1:1900	1:3200	(-)	1:1000	1:1100	(-)	1:1200	1:2150	(-)
4	1:1900	1:1150	(-)	1:1500	1:700	1:50	1:2750	1:2350	1:400
5	1:650	(-)	(-)	1:200	(-)	(-)	1:2350	(-)	(-)
6	1:550	1:100	(-)	1:50	(-)	(-)	1:1350	1:800	(-)
7	1:500	1:250	1:100	1:200	1:150	1:50	1:550	1:50	(-)
8	1:250	1:100	(-)	1:350	(-)	(-)	1:300	1:250	(-)
9	1:250	(-)	(-)	1:400	(-)	(-)	1:600	1:900	1:650
10	1:150	(-)	(-)	1:200	(-)	(-)	1:800	(-)	(-)

δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές στους τίτλους των Anti-HL.S.P και Anti-Ra L.S.P, πλην όμως και των δυο οι τίτλοι ήσαν σαφώς υψηλότεροι των αντιστοίχων Anti-Rb L.S.P ($p<0.05$ και $p<0.01$ αντιστοίχως).

Παρατηρήθηκε επίσης μια πολύ εμφανής γραμμική σχέση μεταξύ των τίτλων των Anti-H L.S.P και Anti-Ra L.S.P (Σχήμα II).

Προέκυψαν εξ άλλου όμοιες σχέσεις για τα αντισώματα Anti-Rb L.S.P, V.S Anti-H L.S.P - $r=0.8906$- και V.S Anti-Ra L.S.P - $r=0.8067$ ($p<0.001$), γεγονός που υποδηλώνει πιθανώς ότι τα αντισώματα αυτά αντέδρασαν εναντίον πολύ ομοίων αντιγόνων εντός των τριών ειδών παρασκευασμάτων του L.S.P. Η πιθανότητα άλλως τε αυτή έρχεται σε πλήρη συμφωνία με την παρατήρηση που προέκυψε κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας διασταυρουμένης αναστολής (cross inhibition experiment), κατά την οποία δεν προκλίθηκε σημαντική αναχαίτιση συνδέσεως των αντισωμάτων, μετά από προσθήκη του H-L.S.P ή του Ra-L.S.P (Πίνακας III).

Τέλος καμμιά σχέση δεν διαπιστώθηκε μεταξύ των τίτλων καθ' ενός από τα τρια είδη των αντισωμάτων και των ηπατικών ενζύμων, της χολερυθρίνης, της IgG, ή των δεικτών της ηπατίτιδος τύπου "B".



ΣΧΗΜΑ ΙΙ. Σύγκρισις μεταξύ των τίτλων των αντισωμάτων έναντι LSP ανθρώπου (ANTI-H.LSP), και LSP μυός (ANTI-Ra.LSP), στον ορό ασθενών με οξεία τύπου "A" (o), και οξεία τύπου "B" (●) ηπατίτιδα.

ΠΙΝΑΚΑΣ III. Δοκιμασία διασταυρουμένης αναχαιτίσεως των αντισωμάτων ANTI-H-L.S.P και ANTI-Ra-L.S.P με L.S.P ανθρώπου (H-L.S.P)και μυός (Ra-L.S.P).

No ΑΣΘΕΝΩΝ	ANTI- H-L.S.P			ANTI-Ra-L.S.P		
	ΤΙΤΛΟΙ	Αναχαίτιση %		ΤΙΤΛΟΙ	Αναχαίτιση %	
		H-L.S.P	Ra-L.S.P		H-L.S.P	Ra-L.S.P
1	1:2750	88.3	83.7	1:3550	82.8	70.3
2	1:2100	100.0	100.0	1:2050	96.8	84.9
3	1:1900	100.0	100.0	1:1200	100.0	70.8

Εξέτασις ορού σε αραίωση 1:100, τριών ασθενών κατά την αρχική παρουσίασή των, έναντι σεσημασμένου ^{125}I-H-L.S.P και ^{125}I-Ra-L.S.P, με και χωρίς την προσθήκη, μη σεσημασμένου H-L.S.P και Ra-L.S.P.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα μελέτη αποδεικνύεται ότι το σύνολο των 20 ασθενών με τύπου "Α" και "Β" ηπατίτιδα, παρουσίαζαν στον ορό τους, κατά το αρχικό στάδιο της νόσου αντισώματα-L.S.P εναντίον αντιγόνων ανθρώπου, κονίκλου και μυός.

Στην ομάδα των ασθενών με ηπατίτιδα τύπου "Β" παρατηρήθηκε μια προοδευτική ελάττωση των τίτλων και των τριών ειδών αντισωμάτων (Anti-H L.S.P, Anti-Ra L.S.P, Anti-Rb L.S.P), με την πάροδο της αναρρώσεως. Αργότερα δε κατά την 5η έως 9η εβδομάδα από της εισβολής της νόσου, λιγότεροι από τους μισούς ασθενείς διατηρούντο οροθετικοί, αλλά με τίτλους αντισωμάτων εμφανώς χαμηλούς.

Η διαπίστωση αυτή είναι απολύτως σύμφωνος με προηγούμενες άλλων ερευνητών οι οποίοι αναφέρουν ότι σε όλες τις οξείες ιογενείς ηπατίτιδες χωρίς επιπλοκή, τα αντισώματα-L.S.P εμφανίζονται σε υψηλούς τίτλους κατά τις δυο περίπου πρώτες εβδομάδες από την εισβολή, για να ελαττωθούν ταχέως και να αρνητικοποιηθούν εντός περίπου 12 εβδομάδων κατά την ανάρρωση[66,69,73].

Τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη έρχονται σε τελεία αντίθεση με τα στοιχεία που αναφέρουν τελευταίως ο Manns και οι συνεργάτες του κατά τα οποία από τους 14 ασθενείς με ιογενή ηπατίτιδα μόνον 3 (όλοι HBsAg(-)) βρέθηκαν οροθετικοί στα αντισώματα Anti-Rb L.S.P. Αν και δύσκολα μπορεί να δοθούν τεκμηριωμένες εξηγήσεις για τις διαφορές αποτελεσμάτων στις μελέτες αυτές, εν τούτοις μερικές πιθανές ερμηνείες είναι δυνατόν να δοθούν:

Με την χρησιμοποίηση κατά την εργασία αυτή της "Protein "A" R.I.A" μεθόδου, ανιχνεύθηκαν τίτλοι αντισωμάτων εναντίον L.S.P ανθρώπου (Anti-H L.S.P), εμφανώς υψηλότεροι των αντιστοίχων του κονίκλου (Anti-Rb L.S.P). Ενδέχεται λοιπόν ότι η "double antibody R.I.A" μέθοδος του Manns να μην ήταν τόσο ευαίσθητος με αποτέλεσμα την αποτυχία ανιχνεύσεως αντισωμάτων με χαμηλούς τίτλους.

Μια δεύτερη ερμηνεία των διαφορών στα αποτελέσματα των δυο ερευνητικών μελετών είναι, η ομάδα του Manns να χρησιμοποίησε για μελέτη αίμα ασθενών σε ένα απώτερο στάδιο κατά την ανάρρωση κατά το οποίο τα αντισώματα-L.S.P να έχουν αρχίσει να εξαφανίζονται.

Επίσης σε ένα απώτερο κατά την ανάρρωση στάδιο, τα αντισώματα-L.S.P είναι ως επί το πλείστον της IgG κλάσεως,και με την "Double antibody R.I.A" μέθοδο δεν προκαλείται εύκολα κατακρίμνιση των συμπλεγμάτων L.S.P/Anti-L.S.P της IgG κλάσεως. Αντιθέτως με την χρήση της "Protein-A R.I.A" μεθόδου, η πρωτεΐνη-Α των σταφυλοκόκκων συνδέεται με θέσεις των IgG αλλά και των IgM αντισωμάτων, και συντελεί στη ταχεία και καθολική κατακρίμνιση των ανοσοσυμπλεγμάτων[87].

Μια άλλη επίσης διαπίστωση από την μελέτη αυτή, στην οποία δύσκολα δίδεται κάποια ερμηνεία είναι,γιατί οι τίτλοι των Anti-Ra L.S.P βρέθηκαν υψηλότεροι των Anti-H L.S.P, και γιατί αμφότεροι οι τελευταίοι υπερτερούσαν των αντιστοίχων Anti - Rb L.S.P (Πίνακας II).

Θα περίμενε κανείς αντιθέτως τα αντισώματα εναντίον του L.S.P-ανθρώπου να παρουσιάζουν χαμηλότερους τίτλους, δεδομένου ότι έχει αποδειχθεί ότι το ήπαρ των ζώων ευρίσκεται σε ποιό "υγειά" κατάσταση σε αντίθεση με του ανθρώπου που παρουσιάζει μια "αντιγονική αποδόμιση".

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση για την τόσο κλειστή σχέση που υπάρχει μεταξύ των τίτλων και των τριων ειδών αντισωμάτων (Anti-H L.S.P, Anti-Ra L.S.P, και Anti-Rb L.S.P), που ανιχνεύθηκαν στον ορό των πασχόντων από την ιογενή ηπατίτιδα. Το εύρημα αυτό μαζί με την αποτυχία μας να διαπιστώσουμε διαφορές στις αντιγονικές ιδιότητες μεταξύ των Anti-H L.S.P και Anti-Ra L.S.P με την χρήση της "δοκιμασίας διασταυρουμένης αναχαιτίσεως" (cross inhibition experiment), υποδηλούν ότι ποιοτικώς, οι αντιγονικοί σχηματισμοί εναντίον των οποίων εκδηλώνεται η δράση των ανευρεθέντων αντισωμάτων, είναι όμοιοι .(Πίνακας III).

Υπάρχει επίσης η πιθανότης, οι μικρές διαφορές που προέκυψαν στους τίτλους των τριων ειδών αντισωμάτων, να σχετίζονται με διαφορές που υπάρχουν πιθανώς στο "προσιτό" ή μη και στην πυκνότητα των αντιστοίχων αντιγόνων των διαφόρων ειδών (ζώντων οργανισμών) μέσα στο σύμπλεγμα L.S.P. Επομένως σύμφωνα με τα παραπάνω, το L.S.P του μυός φαίνεται να είναι ποιό "προσιτό" και να υπερέχει σε πυκνότητα σε σχέσει με το L.S.P κονίκλου, ως προς την σύνδεσή τους με τα αντίστοιχα αντισώματα.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δεν δικαιώνουν καθόλου τις πράγματι ενδιαφέρουσες απόψεις του Manns και των συνεργατών του κατά τις οποίες η μετάπτωση της οξείας ιογενούς ηπατίτιδος σε χρονία ενεργό μορφή αφορά αυτοάνοσο απάντηση που την χαρακτηρίζει μια "απώλεια ανοχής" του ξενιστού ειδικώς προς τα αντιγόνα εκείνα του συμπλέγματος L.S.P, που εκδηλώνουν διασταυρούμενη αντίδραση με διαφόρους ζώντες οργανισμούς[52,68]. Αντιθέτως στην εργασία αυτή απεδείχθη ότι τα αντιγόνα-στόχοι του συμπλέγματος L.S.P που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της κυτταρικής και χυμικής ανοσίας δεν παρουσιάζουν ποιοτικώς σημαντικές αντιγονικές διαφορές. Η διαπίστωση αυτή είναι πράγματι πολύ σημαντική και πιθανώς να οδηγήση σε νέους ερευνητικούς ορίζοντες με σκοπό την επεξήγηση της παθογένειας της χρονίας ηπατίτιδος.

Εάν πράγματι όμως είναι έτσι, τότε η παθογένεια της χρονιότητος της νόσου θα πρέπει να συνδέεται με μια ανικανότητα ρυθμίσεως της αυτοανόσου απαντήσεως, είτε λόγω επιμονής της λοιμώξεως εκ του ιού, είτε λόγω υπάρξεως κάποιας βασικής, και πιθανώς εξαρτωμένης από γενετικούς παράγοντες, ανωμαλίας της ανόσου απαντήσεως. Πράγματι για την τελευταία εξήγηση έχουν διαπιστωθεί ωρισμένα στοιχεία μετά από έρευνες που έχουν γίνει στο King's College Hospital του Λονδίνου τελευταίως. Διαπιστώθηκε ότι τα κατασταλτικά Τ-λεμφοκύτταρα (suppressors T-cells) ασθενών με αυτοάνοσο χρονία ενεργό ηπατίτιδα, κατά ένα μεγάλο μέρος τους έχουν χάσει την ικανότητα αυτορρυθμίσεως της δράσεώς των έναντι του L.S.P[88].

Τέλος, μια άλλη σημαντική διαπίστωση από μελέτες ωρισμένων ερευνητών, που δικαιώνει τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής, είναι ότι τα αντιγόνα-στόχοι που εμπλέκονται στις αυτοανόσους αντιδράσεις των ηπατικών νόσων, παρουσιάζουν πράγματι πολύ μικρές διαφορές στις "αντιγονικές ειδικότητες"[89].

Εφ'όσον λοιπόν συμβαίνει αυτό, θα πρέπει τα αντισώματα-L.S.P να αποτελούν πληθυσμό αυτοαντισωμάτων, και δεδομένου ότι τα περισσότερα αντιγόνα-στόχοι όπως απεδείχθη είναι κοινά έναντι των αντισωμάτων-L.S.P στα χρόνια αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα, ένα ή δυο από αυτά θα πρέπει να αποτελούν αντιγόνο (α)-στόχους της νόσου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά την μελέτη αυτή, με την χρήση μιας ευαίσθητης μεθόδου ραδιοανοσοαναλύσεως, ανιχνεύθηκε στον ορό 10 ασθενών με ιογενή ηπατίτιδα τύπου "Α" και 10 με τύπου "Β", το επίπεδο αυτοαντισωμάτων προς ειδική της ηπατοκυτταρικής μεμβράνης λιποπρωτεΐνη (L.S.P).

Μελετήθηκε δε συστηματικά και συγκρίθηκε η σύνδεση που πραγματοποίησαν αυτά τα αυτοαντισώματα με αντιγόνα-L.S.P προερχόμενα από ήπαρ ανθρώπου, κονίκλου και μυός.

Αρνητικό μάρτυρες της μελέτης αποτελούσε μείγμα ορών προερχομένων από 20 απολύτως φυσιολογικά άτομα, ενώ σαν θετικό control χρησιμοποιήθηκε ορός ασθενούς με αυτοάνοσο Χ.Ε.Η, γνωστού για τους υψηλούς τίτλους αυτοαντισωμάτων.

Όλοι οι ασθενείς των ομάδων με τύπου "Α" και "Β" ιογενή ηπατίτιδα βρέθηκαν οροθετικοί στα αντισώματα-L.S.P και των τριών ειδών (Anti-H L.S.P, Anti-Rb L.S.P, Anti-Ra L.S.P).

Στους ασθενείς με την τύπου "Α" ηπατίτιδα, οι τίτλοι των αντισωμάτων έναντι του L.S.P-μυός (Anti-Ra L.S.P), βρέθηκαν σημαντικώς υψηλότεροι των αντιστοίχων έναντι του L.S.P ανθρώπου (Anti-H L.S.P) ($p<0.02$), και οι τελευταίοι υψηλότεροι των αντιστοίχων έναντι του κονίκλου (Anti-Rb L.S.P) ($p<0.001$).

Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην ομάδα των πασχόντων από τύπου "Β" ηπατίτιδα, με αντίστοιχα στατιστικά κριτήρια ($p<0.05$, και $p<0.02$).

Στην ομάδα επίσης των πασχόντων από τύπου "Β" ηπατίτιδα, οι τίτλοι και των τριών ειδών των αντισωμάτων παρουσίαζαν μια προοδευτική ελάττωση με την πάροδο της αναρρώσεως, ώστε μετά την 5η εβδομάδα οι περισσότεροι ασθενείς να έχουν γίνει οροαρνητικοί.

Σημαντική υπήρξε η παρατήρηση όσον αφορά την πολύ κλειστή γραμμική σχέση που διαπιστώθηκε μεταξύ των τίτλων των Anti-HLSP και Anti-RaLSP στην ομάδα των ασθενών με τύπου "Β" ηπατίτιδα.

Παρατηρήθηκαν εξ άλλου όμοιες σχέσεις μεταξύ των Anti-Rb L.S.P, V.S Anti-H L.S.P, r=0.8906, και V.S Anti-Ra L.S.P, r=0.8067, ($p < 0.001$).

Προσπάθεια επίσης αναχαιτίσεως της συνδέσεως των αντιγόνων H·L.S.P και Ra·L.S.P με τα αντίστοιχα αντισώματα χρησιμοποιόντας την δοκιμασία διασταυρουμένης αναχαιτίσεως (cross inhibition experiment), απέτυχε.

Ουδεμία τέλος σχέση βρέθηκε μεταξύ των τίτλων των τριων ειδών αντισωμάτων και των ηπατικών ενζύμων, της χολερυθρίνης της IgG του αίματος, ή των δεικτών της ηπατίτιδος τύπου "B".

Το σημαντικό συμπέρασμα της μελέτης αυτής είναι ότι τα αντιγόνα του συμπλέγματος-L.S.P που εμπλέκονται στην αυτοάνοσο απάντηση από τον ξενιστή, δεν παρουσιάζουν σημαντικές αντιγονικές διαφορές. Με βάση την πιθανότητα αυτή, θα πρέπει τα αντισώματα-L.S.P να παριστούν ένα πληθυσμό αυτοαντισωμάτων.

Τα δε αντιγόνα-στόχοι, δεδομένου ότι πιθανολογείται να είναι κοινά έναντι αυτών των αντισωμάτων στα χρόνια αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα, ένα ή δυο από αυτά θα πρέπει να αποτελούν το (τα) αντιγόνα-στόχους των νόσων αυτών.

SUMMARY

Detection of antibodies against a liver specific lipoprotein from different species, in the serum of patients in different stages of acute viral (type "A" and "B") hepatitis.

A Thesis
by
A.Perperas M.D.

In this study, serum level of autoantibodies against L.S.P was measured in 10 patients with hepatitis type "A" and another 10 with uncomplicated type "B", using a very sensitive radioimmunoassay method.

A systematic measurement and comparison of binding,between these autoantibodies with L.S.P antigen prepared from human, rabbit and rat livers, was made.

As a negative control of this study, pooled serum from 20 absolutely normal persons was used,and as a positive control was used the serum of a patient with autoimmune, untreated, C.A.H. known for his high autoantibodies titers.

The serum of both groups of type "A"and "B" acute viral hepatitis was demonstrated to be positive to Anti-L.S.P antibodies of all three kinds (Anti-H·L.S.P, Anti-Rb·L.S.P,Anti - Ra· L.S.P).

The titers of antibodies of hepatitis "A" patients against Rat-L.S.P (Anti-Ra·L.S.P) were considerably higher than those of Anti-H·L.S.P ($p<0.02$), and the later were higher than those against Rabbit-L.S.P ($p<0.001$).

Patients with type "B" acute viral hepatitis demonstrated proportional results, against Rat-L.S.P, Human-L.S.P and Rabbit-L.S.P with respective p values ($p<0.05$ and $p<0.02$).

In addition the titers of the above kinds of antibodies in the serum of patients with type "B" hepatitis showed a gradual

reduction during the recovery course of the disease, so that after the 5th week of the illness the majority of these patients became seronegative.

Also in patients with type "B" hepatitis, an important observation was the very close linear relationship between the Anti-H·L.S.P and Anti-Ra·L.S.P titers. Proportional relationship was also observed between the Anti-H·L.S.P and Anti-Ra·L.S.P titers, of hepatitis type "B" group patients.

There were also similar relationship between the Anti - Rb·L.S.P, V.S Anti-H·L.S.P, r=0.8906, and V.S Anti-Ra·L.S.P r=0.8067. ($p<0.001$).

An efford to inhibit the binding of H-L.S.P and Ra - L.S.P antigens with their respective antibodies using the cross inhibition experiment was unsuccessful.

Also there was not found any relationship between the titers of the three kinds of autoantibodies and liver enzimes, bilirubin, IgG, or hepatitis type "B" virus markers.

The important conclusion of that study is that the antigens of L.S.P-Complex which are involved in the host's autoimmune response, do not present substantial antigenic differences.

On the basis of the above observation, it is suggested that Anti-L.S.P antibodies may represent a population of autoantibodies.

Since it is bilieved that the target-antigens may be common to the respective antibodies in chronic autoimmune liver diseases, one or two of these antigens my represent the target-antigen (s) in those diseases.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gobud E.S.: The cellular basis of the immune response. 2nd ed. Sinauer Associates 1981.
2. Katz D.H.: Lymphocyte Differentiation, recognition and regulation. Academic Press 1977.
3. Reinherz E.L., Schbossman S.F.:The differentiation and function of human T-lymphocytes. Cell 1980; 19:821.
4. Ledbetter J. et al: Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T-lymphocyte helper/inducer,and cytotoxic/suppressor sybpopulations in mouse and man.J.Exp Med. 1981;153:310.
5. Χ.Μουτσόπουλος.Κλινική Ανοσολογία. Στο Βασικές αρχές Παθοφυσιολογίας.(Χ.Μουτσόπουλος, Δ.Εμμανουήλ),Λίτσας Αθήνα σελ. 5, 1984.
6. Zucker-Franklin D. et al: Atlas of blood cells:Function and Pathology. Lead and Febiger, 1981.
7. Moller G.: Natural killer cells. Immunol. Rev. 1979;44.
8. Rosenthal A. et al: Macrophage function in antigen recognition by T-lymphocytes. Chap 6, pp 131-160, in:Immunology of Macrophage. Nelson D. (Editor). Academic Press, 1976.
9. Fearon D.T., Kaneko I., Thomson G.: Membrane distribution and absorptive endocytosis by C_3b receptors on human polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med 1981;153-1615.
10. Metzger H. et al: Structure of the high affinity mast cell receptor for IgE. Fed Proc. 1982; 41:8.
11. Kay A.B.: The role of the eosinophil. J. Allergy Clin. Immunol 1979; 64:90.
12. Spiegelberg H.L.: Biological activities of immunoglobulins of different class and subclassess. Adv.Immunol. 1974; 19: 259.

13. Müller-Eberhard H.J.: Complement.Annual Rev. Biochem.1975; 44:697.

14. Rocklin R.E., Bendtzen K., Greineder D.: Mediators of immunity: Lymphokines and monokines. Adv. Immunol.1980;29:56.

15. Χ. Μουτσόπουλος.Κλινική Ανοσολογία.Στο Βασικές αρχές Παθοφυσιολογίας. (Χ. Μουτσόπουλος, Δ.Εμμανουήλ), Λίτσας Αθήνα, σελ. 16, 1984.

16. Goodman M.G., Weigle W.O.:Role of polyclonal B-cell activation in self/non self discrimination.Immunology today 1981; 2:54.

17. Feizi T. (1968). Serum Immunoglobulins in liver disease.Gut. 9, 193-198.

18. Mackay I.R. (1983). Immunological aspects of chronic active hepatitis. Hepatology 3, 724-728.

19. Crowe J., Christensen E., Smith M., Cochrane M., Ranek L., Watkinson G., Doniach D., Popper H., Tygstrup N., and Williams R. (1980). Azathioprine in PBC: A preliminary report of an international trial. Gastroenterology 78, 1005-1010.

20. Toghill P.J., Smith P.G., Bendon P., Brown R.C. and Mathews H.L. (1974). Methildopa liver damage. Br. Med. Journal iii, 545-548.

21. Eddleston A.L.W.F., and Williams R. (1978). HLA and liver disease. Brit. Med. Bulletin 34, 295-300.

22. Prytz H., Bjorneboe M., Johansen T.S. and Orskov F.(1974). The influence of portosystemic shunt operation on immunoglobulins and Escherichia Coli antibodies in patients with cirrhosis of the liver. Acta Medica Scantinavica 196, 109-112.

23. Berger S.R., and Bull D.M. (1977). Cirrhosis hyperglobulinaemia:increased rates of immunoglobulin synthesis by circulating lymphoid cells. Clinical Research 25, 307 (Abstr).

24. Triger D.R.,Mc Farlane I.G.,Kurtz J.B. and Wright R. (1972) : Raised antibody titers to measles and rubella viruses in chronic active hepatitis. Lancet 1, 665.

25. Smith M.G.M., Eddleston A.L.W.F., and Williams R. (1975) : Immunological factors in the evolution of active chronic hepatitis and other autoimmune liver diseases. Clin. Gastroenterology 4, 297.

26. Mc Farlane I.G., Wojcica B.M., and Williams R. (1980). Antigens of the human liver. Clinical and Experimental Immunology 40, 1-7.

27. Maddrey W.C. (1981). Drug-induced chronic active hepatitis In:Drug reactions and the Liver, pp 58-63.Ed Davis M.,Tredger J.M., and Williams R. Pitman Medical London.

28. Vergani D., Mieli-Vergani G., Alberti A., Neuberger J.,Eddleston A.L.W.F., Davis M., and Williams R. (1980). Antibodies to the surface of halothane-altered rabbit hepatocytes in patients with severe halothane-associated hepatitis. N.E.J.M. 303, 66-71.

29. Neuberger J., Crossley I.R., Saunders J., Davis M., Portman B., Eddleston A.L.W.F., Williams R. (1984). Antibodies to alcohol-altered liver cell determinants,in patients with alcoholic liver disease. Gut (in press).

30. Mc Kay I.R., and Tait B.D. (1980). HLA associations with autoimmune-type chronic active hepatitis:Identification of B_8-DRW_3 haplotype by family studies. Gastroenterology, 79, 95-98.

31. Lee W.M., Reed W.D., Michell C.G., Galbraith R.M., Eddleston A.L.W.F., Zuckerman A.J. and Williams R. (1975): Cellular and humoral immunity to hepatitis "B" surface antigen in active chronic hepatitis. Brit. Med. J. 1, 705.

32. Eddleston A.L.W.F. and Williams R. (1974). Inadequate antibody response to HBsAg or suppressor T-cell defect in development of active chronic hepatitis.Lancet, 2, 1543.

33. Galbraith R.M., Eddleston A.L.W.F., Smith M.G.M., Williams R., Mc Sween R.N., Watkinson G., Dick H., Kennedy L.A. and Batchelor J.R. (1974a): Histocompatibility antigens in active chronic hepatitis and primary biliary cirrhosis.Brit Med. J. 3, 604.

34. Ζέρβας Ι., Αποστολάκης Φ., Τσαντούλας Δ., Γκλεζάκου Ο.,Τηλιακός Μ., Παπανικολάου Ν. (1979): HLA και χρονία ενεργός ηπατίτις εξ ιού "Β". 5ον Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας.

35. Eddleston A.L.W.F., Mc Farlane I.G., Michell C.G., Reed W. D. and Williams R. (1973): Cell mediated immunity response in primary billiary cirrhosis to a protein fraction from human bile. Brit. Med. J., 4, 274.

36. Mc Farlane I.G., Wojcica B.M., Tsantoulas D., Portman B., Eddleston A.L.W.F. and Williams R. (1979). Leukocyte migration inhibition in response to biliary antigens in primary biliary cirrhosis, sclerosing cholagitis and other chronic liver diseases. Gastroenterology 76, 1333-1340.

37. Wojcica-Mc Farlane B.M., Mc Farlane I.G., Amoroso P., and Williams R. (1981). Differential in vitro immune responses to biliary track antigens in primary biliary cirrhosis and chronic active hepatitis. Liver 1, 268-279.

38. Thomas H.C., Potter B.J. and Sherlock S. (1977b):Is primary biliary cirrhosis an immune complex disease? Lancet.2, 1261.

39. Wands J.R., Dienstag J.L., Bhan A.K., Feller E.R., and Isselbacher K.J. (1978): Circulating immune complexes and complement activation in primary biliary cirrhosis. N.Engl.J. Med. 298, 233.

40. Lawley T.J., James S.P., and Jones E.A. (1980).Circulating immune complexes: Their detection and potential significance in some hepatobiliary and intestinal disease. Gastroenterology 78, 626-641.

41. Levy G.A. and Chisari F. (1981): The immunopathogenesis of chronic H.B.V induced liver disease. Springer Seminars in Immunopathology. 3, 439-459.

42. Hegarty J.E., Alexander G.M., Mc Farlane I.G., Nuberger J., Nouri-Aria K., Eddleston A.L.W.F. and Williams R. (1983). Immunological responses in liver disease. In:The Liver Annual. Vol 3, pp 170-188. Ed Arias I.M., Frenkel M. and Wilson J.H.D. Excepta Medica, Amsterdam.

43. Mayer zum Buschenfelde K.H., Hutteroth T.H., Manns M., and Moller B. (1980). The role of liver membrane antigens as targets in autoimmune-type liver disease.Springer Seminars in Immunopathology. 3, 297-315.

44. Williams R., and Eddleston A.L.W.F. (1980).Pathogenesis of active chronic hepatitis. Annals of the Academic of Medicine. 9, 158-166.

45. Klingenstein R.J., and Wands J.R. (1980).Immunologic effector mechanisms in hepatitis B-negative chronic active hepatitis. Springer Seminars in Immunopathology. 3,317-329.

46. Meyer zum BÜschenfelde K.H., Kossling F.K. and Miescher P. A. (1972). Experimental chronic active hepatitis in rabbits following immunization with human liver proteins.Clin. Exper. Immunol. 11, 99-108.

47. Meyer zum BÜschenfelde K.H., and Miescher P.A. (1972). Liver specific antigens, purification and characterization. Clin and Experiment Immunol. 10, 89-102.

48. Hopf U., Meyer zum BÜschenfelde K.H., and Frendenberg J., (1974). Liver specific antigens of different species.II Localization of a membrane antigen at cell surface of isolated hepatocytes. Clin Exp. Immunol. 16, 117-124.

49. HÜtteroth T.H., Meyer zum BÜschenfelde K.H., (1978):Clinical relevance of the liver specific lipoprotein (LSP).ACTA Hepato-Gastroenterol. 25, 243.

50 Eddleston A.L.W.F. and Williams R. (1981).Immunological responses in liver disease. In: The Liver Annual Vol 1, pp 108-125. Ed. Arias I.M., Frenkel M., and Wilson J.H.P. Excerpta Medica , Amsterdam.

51. Riison K., and Diederichsen H. (1983). Demonstration of organ-non specific antigens in liver specific protein. Gastroenterology, 85, 1271-1276.

52. Manns M., Meyer zum Büschenfelde K.H., Hutteroth T., and Hopf U. (1980b). The liver specific protein: evidence for species-specific and non - species - specific determinants. Journal of Clinical and Laboratory Immunology. 3, 9-13.

53. Uibo R.M., Helin H.J., and Krohn J.A. (1982).Immunological reactions to liver-specific membrane lipoprotein (LSP) in experimental autoimmune liver disease in rabbits. Clinical and Experimental Immunol. 48, 505-512.

54. Mc Farlane I.G., Mc Farlane B.M., Major G.N., Tolley P.and Williams R. (1984). Identification of the hepatic asialo - glycoprotein receptor (hepatic lectin), as a component of a liver specific membrane lipoprotein (LSP). Clinical and Experimental Immunol. 55, 347-354.

55. Mc Farlane I.G. (1983a). Hepatic clearance of serum glycoproteins. Clinical science. 64, 127-135.

56. Miller J., Smith M.G.M., Mitchel C.G., Reed W.D.,Eddleston A.L.W.F. and Williams R. (1972): Cell-mediated immunity to a human liver specific antigen in patients with active chronic hepatitis and primary biliary cirrhosis. Lancet 2,296.

57. Thestrap-Petersen K., Ladefoged K., and Andersen P. (1976). Lymphocyte transformation test with liver specific protein and phytohaemaglutinin in patients with liver disease.Clin Exp. Immunol. 24, 1.

58. Thomson A.D., Cochrane M.A.G., Mc Farlane I.G., Eddleston A.L.W.F. and Williams R. (1974). Lymphocyte cytotoxicity to isolated hepatocytes in chronic active hepatitis. Nature, 252, 721-722.

59. Cochrane M.A.G., Moussouros A., Thomson A.D., Eddleston A. L.W.F. and Williams R. (1976). Antibody-dependent cell-mediated (K-cell) cytotoxicity against isolated hepatocytes in chronic active hepatitis. Lancet 1, 441-444.

60. Kakumu S., Tateki H., Goji H. and Sakamoto N. (1978): Lymphocyte cytotoxicity against chang liver cells in chronic active hepatitis. Cellular Immunology 36, 46-53.

61. Faccini A., Stefanini G.F., Bernardi M., Miglio F., Gasparini G., and Labo G. (1978).Lymphocitotoxicity test against rabbit hepatocytes in chronic liver disease.Gut 19,189-193

62. Vogten A.J.M., Hadzic N., Shorter R.G., Summerskill W.H.J. and Taylor W.F. (1978). Cell-mediated cytotoxicity in chronic liver disease: a new test system. Gastroenterology 74, 883-889.

63. Eddleston A.L.W.F., Nouri K., Hegarty J., Alexander G., Newberger J. and Williams R. (1982). Immunological responses in liver disease. In: Liver Annual. Vol 2, pp 154-179. Ed. Arias I.M., Frenkel M., and Wilson J.H.P. Excerpta Medica, Amsterdam.

64. Hopf U., Meyer zum Buschenfelde K.H., and Arnold W.(1976): Detection of a liver-membrane autoantibody in HBsAg - negative chronic active hepatitis. N.E.J.M., 294, 578.

65. Bianchi F.B., Zauli D., Quarriero-Bobylena V. (1979).Liver membrane antibodies (LMA). In Immune reactions in liver disease, Edited by Eddleston, Weber and Williams R. p.27.

66. Jensen D.M., Mc Farlane I.G., Portman B., Eddleston A.L.W. F., and Williams R. (1978a). Detection of antibodies directed against a liver-specific membrane lipoprotein in patients with acute and chronic active hepatitis. N. E. J. M 299, 1-7.

67. Jensen D.M., Mc Farlane I.G., Nicholson A., Eddleston A.L. W.F. and Williams R. (1978b). The development of a RIA for

the detection of antibodies to a liver-specific membrane lipoprotein (LSP). Journal of Clin. and Lab. Immunol.1,31-35.

68. Manns M., Meyer zum Büschenfelde K.H. and Hess G. (1980a). Autoantibodies against liver-specific lipoprotein in acute and chronic liver diseases: studies on organ specific and disease-specificity. Gut 21, 255-961.

69. Kakumu S., Arakawa Y., Goji H., Kashio T., and Yata K.(1979). Occurrence and significance of antibody to liver membrane lipoprotein by double-antibody immunoprecipitation method in sera of patients with acute and chronic liver disease. Gastroenterology 76, 1281.

70. Gerber M.A., Lebwohl N., Thung S.N., Bodenheimer H., and Schaffner F. (1979). Antibodies to liver-specific protein in liver and kidney disease. Gastroenterology 76, 1281.

71. Meliconi R., Miglio F., Stancari M.V., Baraldini M.,Stefanini G.F., and Gasparini G.(1983).Hepatocyte membrane bound IgG and circulating liver-specific autoantibodies in chronic liver disease: relation to hepatitis "B" virus serum markers and liver histology. Hepatology 3, 155-161.

72. Perperas A., Tsantoulas D., Portman B., Eddleston A.L.W.F. and Williams R. (1981). Autoimmunity to a liver membrane lipoprotein and liver damage, in alcoholic liver disease. Gut 22, 149-152.

73. Meliconi R., Perperas A., Jensen D., Alberti A., Mc Farlane I.G., Eddleston A.L.W.F., and Williams R.(1981).Anti-LSP antibodies in acute liver disease. Gut. 23, 603-607.

74. Manns M., Arnold W., Meyer zum Büschenfelde K.H., Nagai S. and Hoffmann H. (1981). Studies on anti-LSP autoantibodies in acute and chronic non "B" hepatitis - evidence for lack of anti-LSP in Non "A" - Non "B" viral hepatitis.Klinische Wochenschrift 59, 635-689.

75. Tsantoulas D., Perperas A., Portman B., Eddleston A.L.W.F. and Williams R. (1980). Antibodies to a human liver membrane lipoprotein (LSP) in primary biliary cirrhosis. Gut 21, 557-560.

76. Meliconi R., Miglio F., Stancari M.V., Baraldini M., Stephanini G.F., and Gasbarrini G. (1983). Hepatocyte membrane-bound IgG and circulating liver-specific autoantibodies in chronic liver disease: relation to hepatitis "B" virus serum markers and liver histology. Hepatology 3, 155-161.

77. Hopf U., Meyer zum Büschenfelde K.H., and Arnold W.(1976). Detection of a liver-membrane autoantibody in HBsAg - negative chronic active hepatitis. N.E.J.M. 294, 578-582.

78. Trevisan A., Realdi G., Alberti A., and Noventa F. (1979). Relationship between membrane-bound immunoglobulin and viral antigens in liver cells from patients with hepatitis"B" virus infection. Gastroenterology. 77, 209-214.

79. Tage-Jensen V., Arnold W., Dietrichson D., Hardt F., Hopf V., Meyer zum Büschenfelde H.K., and Nielsen J.O. (1977). Liver cell membrane autoantibody specific for inflamatory liver diseases. Br. Med. J. 1, 206-208.

80. Meliconi R., Stancari M.V., Garagnani M., Baraldini M.,Stefanini G.F., Miglio F., and Gasbarrigni G. (1983). Occurrence and significance of IgG liver membrane autoantibodies (LMA) in chronic liver diseases of different aetiology. Clin and Exper. Immunol. 51, 565-571.

81. Tage-Jensen U., Permin H., Hardt F., Juhl E., Mathieson L. Nielsen J.O. and Ranek L. (1980). Circulating autoantibodies in patients with acute viral hepatitis. Scand. Journ. of Gastroent. 15, 229-235.

82. Burt A.D., Anthony R.S., Hislop W.S.,Bouchier I.A., and Mc Sween R.N.M. (1982). Liver membrane antibodies in alcoholic liver disease. Gut 23, 221-225.

83. Meyer zum Büschenfelde K.H., Manns M., Hutteroth T.H.,Hopf U., and Arnold W. (1979). LM-ag and LSP- two different target antigens involved in the immunopathogenesis of chronic active hepatitis? Clin. Exp. Immunol. 37, 205-212.

84. Mc Farlane I.G., Tolley P., Major G., Mc Farlane B.M., and Williams R. (1983b). Development of a micro-enzyme - linked immunosorbent assay for antibodies against liver - specific membrane lipoprotein. J. Immunol. Meth. 64, 215-225.

85. Mc Farlane I.G., Wojcicka B.M., Zucker G.M., Eddleston A. L.W.F. and Williams R. (1977). Purification and characterization of human liver specific membrane lipoprotein (LSP). Clin. Exp. Immunol. 27, 381-390.

86. Lawry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J., (1951). Protein measurement with the folic phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

87. Brunda M.J., Minden P., Sharpton P.R., Mc Clatchy J.K. and Farr R.S. (1977). Precipitation of radiolebelled antigen - antibody complexes with protein-A containing staphylococcus aureus. J. Immunol. 119, 193-198.

88. Vento S., Hegarty J.E., Bottazzo G., Macchia E., Eddleston A.L.W.F. and Williams R. (1984). Antigen specific suppressor cell function in autoimmune chronic active hepatitis. Lancet I, 1200-1204.

89. Vierling J.M., and Hammond D.D. (1983). Specificity of antibodies reacting with human liver-specific protein (LSP). Hepatology 3, 832 (Abstract).