ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Γαστρεντερολογική Κλινική :Διευθυντής Καθηγητής Ηλίας Κουρούμαλης

Η ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΛΟΘΑΝΙΟΥ ΕΠΙ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ KUPFFER ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ ΚΑΤΟΠΙΝ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗΣ Η ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΑΥΤΩΝ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΚΗ - ΔΑΥΪΔ ΚΑΛΛΙΟΠΗ
ΙΑΤΡΟΣ ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΟΛΟΓΟΣ

Διδακτορική Διατριβή

Ηράκλειο Κρήτης 2001

Στους γονείς μου

Στο σύζυγό μου Στέλιο

Στα παιδιά μου

Παναγιώτη και Μενέλαο

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων Καθηγητής: Κουρούμαλης Ηλίας

Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

2ο Μέλος : Μουζάς Ιωάννης

Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

3ο Μέλος : Παναγιωτίδης Ιωάννης

Λέκτορας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής : Η.Κουρούμαλης

Πανεπιστημίου Κρήτης

Καθηγήτρια: Ελένη Ασκητοπούλου

Πανεπιστημίου Κρήτης

Καθηγητής : Ν.Σιαφάκας

Πανεπιστημίου Κρήτης

Αναπληρωτής Καθηγητής : Δ.Μπούμπας

Πανεπιστημίου Κρήτης

Επίκουρος Καθηγητής : Ι.Μουζάς

Πανεπιστημίου Κρήτης

Επίκουρος Καθηγητής: Γ.Κολιός

Πανεπιστημίου Κρήτης

Λέκτορας : Ι.Παναγιωτίδης

Πανεπιστημίου Κρήτης

ΠΙΝΑΚΑΣ Π Ε ΡΙ Ε Χ Ο Μ Ε Ν ΩΝ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ
6
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ
8
ΠΡΟΛΟΓΟΣ
14

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1
Γενικά περί κυττάρων των κολποειδών 16
Μικροοργάνωση και προέλευση των κυττάρων του Kupffer 17
Ιστοχημεία και κυτταρικοί δείκτες των κυττάρων του Kupffer 19
Λειτουργίες των κυττάρων του Kupffer 23
Α) Ενδοκυττάρωση 23
Υποδοχείς των κυττάρων του Kupffer 23
Β) Φαγοκυττάρωση 31
Γ) Παραγωγή Κυτταροκινών 31
Ο ρόλος των κυττάρων του Kupffer στίς διάφορες παθήσεις 39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2
Φαρμακευτική Ηπατοπάθεια 44
Ηπατοκυτταρική δυσλειτουργία 52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3
Αλοθάνιο: Ιδιότητες, Φαρμακοκινητική και Φαρμακοδυναμική 56
Μεταβολισμός του αλοθανίου 67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4
Αλοθάνιο και Ηπατοτοξικότητα 74

Θεωρίες της ηπατοτοξικότητας 81

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Ογκογονίδια και Απόπτωση 93

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή 107

Αντικείμενο της διατριβής 108

Υλικό - Μέθοδος 109

Καθορισμός MAC 109

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

111

1. Προετοιμασία για Απλό Μικροσκόπιο 112
2. Προετοιμασία για Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο 113
3. Ανοσοιστοχημεία 113
4. Μέθοδος TUNEL 114

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Απλό μικροσκόπιο 117
2. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο 118
3. Μέθοδος TUNEL 120
4. Πρωτεΐνες συνδεδεμένες με την απόπτωση: Bcl-2 122

Waf/p21 123

p53 124

ΣΥΖΗΤΗΣΗ 128

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 139

ΕΙΚΟΝΕΣ - ΠΙΝΑΚΕΣ 143

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 165

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Γεννήθηκα στο Αρκαλοχώρι όπου και διδάχθηκα την πρωτοβάθμια εκπαίδευση στο Δημοτικό Σχολείο Αρκαλοχωρίου και τελείωσα τις δευτεροβάθμιες σπουδές μου στο Γυμνάσιο Αρκαλοχωρίου.
Τελείωσα την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Bologna Ιταλίας. Υπηρέτησα την υποχρέωση υπαίθρου στο Γενικό Νομαρχιακό Νοσο-κομείο Χανίων "Άγιος Γεώργιος" ώς βοηθός του Αναισθησιολογικού Τμήματος. Το 1986 τελείωσα την ειδικότητα της Αναισθησιολογίας στο Νοσοκομείο Ατυχημάτων"ΚΑΤ" .
Υπηρέτησα στο Νοσοκομείο Παίδων Αγία Σοφία σαν Αναισθησιολόγος και στο 1ο Θεραπευτήριο ΙΚΑ Αθηνών σαν εσωτερική βοηθός Αναισθη-σιολόγος και κατόπιν στο ΚΑΤ σαν επιμελήτρια Β' του ΕΣΥ.
Από το1988 εργάζομαι στο Βενιζέλειο Νοσοκομείο Ηρακλείου, όπου κατέχω τον τίτλο του Αναπληρωτού Διευθυντού.
Το 1998 Μετεκπαιδεύτηκα στη Μονάδα Πόνου του "Γ.Ν.Ν.Πατησίων" στο αντικείμενο "Χρόνιος Πόνος".

Είμαι μέλος της:

European Academy of Anaesthesiology

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ

Ειμαι μέλος των κατωτέρω επιστημονικών εταιρειών

1. ESRA (European Society of Regional Anaesthesia)
2. IASP (International Association for the Study of Pain)
3. Ελληνικής Αναισθησιολογικής Εταιρείας
4. Εταιρείας Αναισθ. και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδος
5. Ελληνικής Εταιρείας Πόνου
6. Εταιρείας Παρηγορητικής Συμπτωματικής Φροντίδας Καρκινοπαθών και μη Ασθενών

Δ Η Μ Ο Σ Ι Ε Υ Μ Ε Ν Ε Σ Ε Ρ Γ Α Σ Ι Ε Σ

1) Μόνιμος καθετηριασμός περιφερικών αρτηριών
Ελένη Πανταζάτου-Ιωαννίδου, Κυριακή Βελμάχου-Ζουρίδου, Σ. Λιβάνιος Μ. Πετσικόπουλος, Σ. Μπακλέ, **Πόπη Παναγιωτάκη**, Γ.Μήλιος, Μ.Αρετής,Βίκυ Βρεττού, Βέτα Παπαδημητρίου
Ελληνική Αναισθησιολογία Τομ.18.Τευχ.3,σ.244-249,1984

2) Επιτυχής αντιμετώπιση βαρέως υπογλυκαιμικού κώματος με πνευμονική εισρόφηση **Καλλιόπη Παναγιωτάκη-Δαυίδ**
Ελληνική Αναισθησιολογία Τομ.19,Τεύχ.2 σ.169-171,1985

3) Η συμβολή της ενδοφλέβιας περιοχικής αναισθησίας στη χειρουργική του άνω άκρου. Ανασκόπηση 238 ορθοπεδικών περιστατικών
Θ.Εμμ. Κανάκης, **Πόπη Παναγιωτάκη**, Α.Χρηστάκης, Μ.Ξυλούρης, Α.Κονίνης Περιοδικό της ΕΕΧΟΤ Τόμ.41 Τεύχ.4, Αθήνα 1990

4) Η άμεση οστεομεταμόσχευση και η ενός άξονος εξωτερική οστεοσύνθεση προάγουν την βιολογική και μηχανική σταθερότητα των ανοικτών καταγμά των 1Ο2,1Ο3,1Ο4 της κνήμης.
Θ. Εμμ. Κανάκης, Α. Κονίνης, Εμμ.Μ.Παπαδάκης, Γ.Ανατολιωτάκης, **Κ. Παναγιωτάκη** Ε Ε Χ Ο Τ Τόμ. 43, Τεύχ. 2,1992

5) Η Λαπαροσκοπική Χολεκυστεκτομή Πλεονεκτεί των Αλλων Μεθόδων Θεραπείας της Χολολιθιάσεως Μ.Βελεγράκης, **Κ.Παναγιωτάκη**, Θ.Κοκκινάκης, Δ.Βάμβουκας, Α.Απαλάκης Ιατρ. Επιθ. ΕΝ. Δυν. 28| 151-155 ,1994

6) Υποδόριο Εμφύσημα μετά Λαπαροσκοπική Χολεκυστεκτομή **Παναγιωτάκη Καλλιόπη**, Πουλιανάκη Άννα, Παρασύρη Μαρία, Βελεγράκης Μ., Τσαγκαράκη Γεωργία, Παπαδάκη Άννα.
Ελληνική Αναισθησιολογία, Τόμος 29,Τεύχος 1, Ιαν.-Μάρτ.1995

7) Λαπαροσκοπική Χολεκυστεκτομή σε ασθενείς υψηλού κινδύνου Μ.Βελεγράκης, Α Σαρούκος, Μ Σαββίδου, **Κ.Παναγιωτάκη**, Δ.Μανουκάκης Ελληνική Χειρουργική Τόμος 67,Τεύχος 3,Μάιος-Ιούνιος 1995

8) Πρώτη εμπειρία στη χρήση της τενοξικάμης στον έλεγχο του μετεγχειρητικού πόνου σε ορθοπεδικές επεμβάσεις.

Παναγιωτάκη Καλλιόπη, Δαυίδ Στυλιανός, Τσαγκαράκη Γεωργία, Καραντινός Γεώργιος, Μανουκάκης Δ.Παπαδάκη Αννα Ιατρικά Χρονικά Τόμος ΙΘ Τεύχος 6-9, Σελ.493-495

9) Φαρμακευτική Διερεύνηση του χλωριούχου μιβακούριου σε προγραμματισμένες καισαρικές τομές. Μανουκάκης Δ, **Παναγιωτάκη Καλλιόπη**, Δαυιδ Σ, Σαττι Αλι, Κανιάρης Π Ιατρικά Χρονικά Τόμος ΙΘ Τεύχος 11 Σελ.627-630.

10) Επισκληρίδια Μετεγχειρητική Αναλγησία με Αντλία μιάς Χρήσεως σε Γυναικολογικές Επεμβάσεις **Παναγιωτάκη Κ**.Τσαγκαράκη Γ.,Καραντινός Γ., Εμμ.Χανιωτάκης, Ρ.Ρουχωτά,Θ.Λουλάκη,Δαυίδ Σ.,Παντελή Χ. Χ.Αναστασιάδου Α.Ιατρικά Χρονικά ,Τόμος ΚΒ, Τεύχος 4, Σελ.254-256

11) Η Μετεγχειρητική Αναλγησία σε Ασθενείς με Διακυστική Προστατεκτομή Ι Χαιρέτης,Ν,Μακρυγιαννάκης,Ε.Λιανός Ι.Καζάνης, Βελεγράκης, Γ.Αρετάκης, Δ.Μανουκάκης**, Κ.Παναγιωτάκη**, Α.Αναστασιάδου, Χ.Δημητρακόπουλος: Ιατρικά Χρονικά, Τόμος ΚΒ, Τεύχος 4,Σελ.229-232

Α Ν Α Κ Ο Ι Ν Ω Μ Ε Ν Ε Σ Ε Ρ Γ Α Σ Ι Ε Σ

1) Μόνιμος καθετηριασμός περιφερικών αρτηριών Ελένη Πανταζάτου-Ιωαννίδου,Κυριακή Βελμάχου-Ζουρίδου, Σ.Λιβάνιος Μ.Πετσικόπουλος, Σ Μπακλέ, **Πόπη Παναγιωτάκη**, Γ.Μήλιος,Μ.Αρετής,Βίκυ Βρεττού, Βέτα Παπαδημητρίου 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας - Αθήνα, Μάιος 1983

2) Αρρωστοι με βαρειές κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις στη ΜΕΘ. Συμπεράσματα από τη μελέτη της νοσηλείας τους και των κυριοτέρων προβλημάτων τους. Πανταζάτου -Ιωαννίδου Ελένη, Παπαδημητρίου Βέτα, Ιμαίς Μάζεν,Βρεττού Βίκυ,Μωχάμετ Αλι, **Παναγιωτάκη Πόπη**, Ζουρίδου-Βελμάχου Κυριακή, Αποστόλου Απόστολος 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας -Θεσσαλονίκη, Μάιος 1985

3) Επίδραση της αναισθησίας και της χειρουργικής επέμβασης επί των κυττάρων του Kupffer.Ηλέκτρα Χατζηδάκη, **Καλλιόπη Παναγιωτάκη**, Αντα Σοφιανού,Χριστίνα Χατζή, Ελένη Παπαβασιλείου,Η.Κουρούμαλης 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας- Χανιά Μάιος 1987

4) Η δράση της Σωματοστατίνης στην έκκριση της γαστρίνης σε ασθενείς με Κ.Ε.Κ **Καλλιόπη Παναγιωτάκη**, Ηλέκτρα Χατζηδάκη, Αντα Σοφιανού, Δ.Χατζηδάκης, Σ.Ράπτης.7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας - Χανιά Μάιος 1987

5) Μετάδοση ιογενών νοσημάτων κατά την νάρκωση και την χειρουργική επέμβαση. Ηπατίτις Β και AIDS Η. Κουρούμαλης, Ηλέκτρα Χατζηδάκη, **Καλλιόπη Παναγιωτάκη**, Αντα Σοφιανού, Χριστίνα Χατζή, Μαριέττα Λάσκαρη 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας. Χανιά Μάιος 1987

6) Χειρουργική αντιμετώπιση της μετατραυματικής στένωσης του σπονδυλικού σωλήνα δια αφαιρέσεως των παρεκτοπισμένων οστών τεμαχίων και ανατάξεως, σταθεροποιήσεως της σπονδυλικής στήλης. G.Sapkas, D.Korres, A.Chatzidimos, J.Tsiribas, K.Balalis, N.Retsis, N.Stravoradis, **P.Panagiotaki**, Chr. Coutsodima,Th. Karachalios. Φθινοπωρινό Ορθοπεδικό Συνέδριο-Αθήνα 1987

7) Αναισθησιολόγος αυτός ο άγνωστος. Πόπη Σαλτερή, **Πόπη Παναγιωτάκη**, Αγγελική Διαμαντοπούλου, Μ.Πετσικόπουλος, Ζωή Γαμποπούλου, Ακριβή Τράγου, Καλαιτζάκης Γ. 8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας.Λευκωσία -Κύπρος 28-31 Μαρτίου 1989

8) Μεταβολές της γαστρίνης ορού μετά γενική και υπαραχνοειδή αναισθησία. Αντα Σοφιανού, Παρασκευή Ματσώτα, Μπεατρίς Ανδρεόττι, **Καλλιόπη Παναγιωτάκη,** Σ.Δαυίδ, Ηλέκτρα Χατζηδάκη, Δ.Χατζηδάκης, Σ.Ράπτης 8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας Λευκωσία- Κύπρος 28-31 Μαρτίου 1989

9) Η απολύμανση του αναισθησιολογικού κυκλώματος απαραίτητη προϋπόθεση για την προφύλαξη του ασθενούς Ειρήνη Ντρίμερη,

Πόπη Παναγιωτάκη, Ντίνα Γαλανού, Βίκυ Βρεττού,Γ.Σταματίου, Ηλέκτρα Χατζηδάκη, Ευαγγελία Παπουτσάκη,Αννα Χατζηνικολάου. 8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας Λευκωσία -Κύπρος 28-31 Μαρτίου 1989

10) Χολοπεριτόναιο-Τοπική περιτονίτις-Μινιγκίτις, σε αρρωστο με κοιλιοπεριτοναϊκή παροχέτευση υδροκεφαλίας. Μιά ακόμη σοβαρή επιπλοκή.Φ.Χαραλαμπόπουλος,Γ.Ζουρνατζίδης,Μ.Βελεγράκης, **Κ.Παναγιωτάκη,** Δ.Αρβανιτάκης XVII Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής-Αθήνα 10-14 Νοεμβρίου 1990

11) Ενδοφλέβια περιοχική αναισθησία στην χειρουργική των άνω άκρων. Ανασκόπηση 238 χειρουργημένων ορθοπεδικών περιστατικών.Θ.Κανάκης**, Πόπη Παναγιωτάκη**, Μανώλης Παπαδάκης, Ελένη Ασκητοπούλου.5ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο. Ρέθυμνο 15-18 Νοεμβρίου 1990.

12) Η Λ.Χ. πλεονεκτεί των άλλων μεθόδων θεραπείας της χολολιθιάσεως. Μ. Βελεγράκης**, Κ. Παναγιωτάκη**, Β.Χρυσοχόος, Θ.Κοκκινάκης, Ν.Μίρρα, Α.Απαλάκης: 6ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο. Ρέθυμνο 12-15 Νοεμβρίου 1992

13) Προεγχειρητικά προβλήματα υπερηλίκων ασθενών που υποβλήθηκαν σε ορθοπεδικές επεμβάσεις. **Κ.Παναγιωτάκη**, Γ.Τσαγκαράκη, Π.Ρουχωτά, Γ.Καραντινός, Μ.Παρασύρη Πολυθεματικό Συνέδριο Χ.Ο.Τ.Ε ΚΡΗΤΗΣ. Ηράκλειο 9 Μαίου 1992

14) Αναισθησιολογικά προβλήματα του πολυτραυματία **Π.Παναγιωτάκη**, Γ.Τσαγκαράκη, Αικ. Μακατουνάκη, Ε.Αστρινάκη Ημερίδα Τροχαίου ατυχήματος. Ηράκλειο 18 Μαίου 1991

15) Συμβάλλει η άμεση οστεομεταμόσχευση στην γρήγορη πόρωση των ανοικτών καταγμάτων της κνήμης. Θ.Ε.Κανάκης, Ε.Παπαδάκης, Α.Κονίνης, Γ.Ανατολιωτάκης, **Κ.Παναγιωτάκη**, Μ.Ξυλούρης. 6ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο. Ρέθυμνο 12-15 Νοεμβρίου 1992

16) Διεγχειρητική και Μετεγχειρητική αναλγησία σε Λ.Χ. και Α.Χ. **Παναγιωτάκη Πόπη**, Μανουκάκης Δ., Τσαγκαράκη Γ., Δαυίδ Σ.,

Κανδυλάκης Σ., Βελεγράκης Μ.1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής Αθήνα 30/6-1/7/1993

17) Προεγχειρητική εκτίμηση στη Λ.Χ. με την δυναμική υπερηχοτομογραφία. Σ.Κανδυλάκης, Μ.Βελεγράκης, Ε.Σφακιανάκη, Σ.Μεγρέμης, **Κ.Παναγιωτάκη**, Θ.Κοκκινάκης, Α.Απαλάκης. 1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής Αθήνα 30/ 6- 1/7/1993

18) Πρώτη εμπειρία στη χρήση της τενοξικάμης στο μετεγχειρητικό πόνο σε ασθενείς που χειρουργήθηκαν για επεμβάσεις ισχίου. **Παναγιωτάκη Καλλιόπη**, Δαυίδ Σ., Τσαγκαράκη Γεωργία, Καραντινός Γ., Παρασύρη Μαρία, Αναστασιάδου Άλμουτ.10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας Αθήνα 15-19 Σεπτεμβρίου 1993

19) Τεχνητός αερισμός στη Λ.Χ.**Παναγιωτάκη Καλλιόπη**, Δαυίδ Σ., Τσαγκαράκη Γ., Αστρινάκη Ε., Αναστασιάδου Αλμουτ 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας Αθήνα 15-19 Σεπτεμβρίου 1993

20) Λ.Χ σε ασθενείς υψηλού κινδύνου Μ.Βελεγράκης, **Κ.Παναγιωτάκη**, Θ.Κοκκινάκης, Δ.Βαμβουκας, Ι.Καζάνης, Α.Απαλάκης. 13ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστροεντερολογίας, Ρόδος 13-17 Οκτωβρίου 1993

21) Λ.Χ. σε καρδιοαναπνευστικούς ασθενείς Μ.Βελεγράκης, **Κ.Παναγιωτάκη**, Δ.Μανουκάκης, Ε.Αγγελάκης, Α.Σαρούκος, Μ.Σαββίδου. XIX Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Θεσσαλονίκη 30 Οκτωβρίου - 3 Νοεμβρίου 1994

22) Φαύλοι Κύκλοι στην Ιατρική (Circulus Vitiosus) Χρυσοχόος Β., Καζάνης Ι., **Παναγιωτάκη Κ**., Σαββίδου Μ. XIX Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Θεσσαλονίκη 30 Οκτωβρίου-3 Νοεμβρίου 1994

23) Η εμπειρία των ασθενών μας μετά από περιοχική αναισθησία. **Κ.Παναγιωτάκη**, Σ.Δαυίδ, Ρ.Ρουχωτά, Εμμ.Χανιωτάκης, Μ.Παρασύρη, Γ.Τσαγκαράκη, Α.Παπαδάκη. 11ο Πανελλήνιο

Συνέδριο Αναισθησιολογίας Κέρκυρα 24-28 Μαίου 1995

24) Σύγκριση της αναλγητικής δράσης δύο διαφορετικών δόσεων τενοξικάμης στο μετεγχειρητικό πόνο σε επεμβάσεις ισχίου **Κ.Παναγιωτάκη**, Σ.Δαυίδ, Γ.Τσαγκαράκη, Δ.Μανουκάκης, Εμμ.Χανιωτάκης, Μ.Παρασύρη, Α. Παπαδάκη. 11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας Κέρκυρα 24-28 Μαίου 1995

25) Εάν στην ενδοφλέβια περιοχική αναισθησία προστεθεί τενοξικάμη ελαττώνεται το μετεγχειρητικό άλγος. **Π.Παναγιωτάκη**, Γ.Τσαγκαράκη, Ρ.Ρουχωτά, Δ.Μανουκάκης, Ε.Χανιωτάκης, Γ.Καραντινός, Α.Παπαδάκη. 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χ.Ο.Τ.Ε. ΚΡΗΤΗΣ Ηράκλειο 10-11 Ιουνίου 1995

26) Η δράση της τροπισετρόνης στην πρόληψη της μετεγχειρητικής ναυτίας και εμέτου, σε επεμβάσεις γενικής χειρουργικής.**Παναγιωτάκη Πόπη**, Δαυίδ Στυλιανός, Βασιλάκη Αταλάντη,Παπαδάκης Αντώνης, Τσαγκαράκη Γ., Μανουκάκης Δ., Ρουχωτά Ρ.,Καραντινός Γ. 8ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο - Αγ. Νικόλαος 24-27 Οκτωβρίου 1996

27) Η Μετεγχειρητική Αναλγησία σε Ασθενείς με Διακυστική Προστατεκτομή.
Ι.Χαιρέτης, Ν.Μακρυγιαννάκης, Ε.Λιανός, Ι.Καζάνης,Ι.Βελεγράκης, Γ.Αρετάκης, Δ.Μανουκάκης**, Κ.Παναγιωτάκη**, Α.Αναστασιάδου, Χ.Δημητρακόπουλος. 9ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο- Ηράκλειο 5-8 Νοεμβρίου 1998

28) Επισκληρίδια Μετεγχειρητική Αναλγησία με αντλία μιάς χρήσης σε Γυναικολογικές Επεμβάσεις. **Παναγιωτάκη Κ**.,Τσαγκαράκη Γ., Καραντινός Γ., Χανιωτάκης Εμμ., Ρουχωτά Ρ., Λουλάκη Θ, Δαυίδ Σ., Παντελή Χ.,Αναστασιάδουυ Α.9ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο - Ηράκλειο 5-8 Νοεμβρίου 1998

29) Συνεχής Ενδοφλέβια Μετεγχειρητική Αναλγησία με Αντλία μιάς Χρήσης **Παναγιωτάκη Κ**.,Τσαγκαράκη Γ., Καραντινός Γ., Χανιωτάκης Εμμ., Δαυίδ Σ., Λουλάκη Θ., Μανουκάκης Δ., Τζωρμπατζάκη

Μαρία Αναστασιάδου Α.9ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 5-8 Νοεμβρίου1998

30) Η in vivo τροποποίηση των κυττάρων του Kupffer ασκεί σημαντική επίδραση επί της αποπτώσεως των ηπατοκυττάρων.
Π.Παναγιωτάκη, Π.Παπακυριάκου, Κ.Ξυδάκης, Β.Βαλάτας, Η.Κουρούμαλης. 6ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο Θεσσαλονίκη 25-28 Μαρτίου 1999

31) Αποικισμός μικροβίων στούς επισκληρίδιους καθετήρες που χρησιμοποιήθηκαν για μετεγχειρητική αναλγησία.
Παναγιωτάκη Κ. Δαυίδ Σ., Πεδιαδίτης Ι. Τσαγκαράκη Γ., Καραντινός Γ. Χανιωτάκης Ε., Λουλάκη Θ., Παρασύρης Π., Μανουκάκης Δ. Ρουχωτά Ρ. 13ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας Κώς 12-16 Μαίου 1999

Α Ν Α Κ Ο Ι Ν Ω Μ Ε Ν Ε Σ Ε Ρ Γ Α Σ Ι Ε Σ Σ Ε Δ Ι Ε Θ Ν Η Σ Υ Ν Ε Δ Ρ Ι Α

1) L.C. in high risk patients 2o International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery (E.A.E.S.).M.Velegrakis, J.Kazanis, **K.Panagiotaki**, D.Manoukakis, E.Angelakis, A.Saroukos,M.Savidou Madrid - Spain, September 14-17, 1994.
2) In vivo modulation of Kupffer cells has a profound effect on liver cell apoptosis.
   P.Panagiotaki,P.Papakyriakou,K.Xidakis,V,Valatas,E.Kouroumalis Glasgow,Gut ,April 1999 supplement No 1,Vol.44
   P.Panagiotaki,P.Papakyriakou,K.Xidakis,V.Valatas,E.Kouroumalis
3) Halothane anaesthesia increases hepatocyte apoptosis after in vivo modulation of Kuppfer cells in the rat
   E.A.Kouroumalis,**C.Panagiotaki**,P.Papakyriakoy,C.Xydakis,V.Valatas Prague, J. of Hepatology Vol.34 supplement No 1,April 2001

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα πτητικά αναισθητικά, με εκπρόσωπο το αλοθάνιο, αποτελούν μέρος της αναισθησίας. Λίγο μετά την πρώτη μοντέρνα χορήγηση της Αναισθησίας, το1850, αναγνωρίστηκε ότι η αναισθησία μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα. Ο τρόπος με τον οποίο ένα πτητικό αναισθητικό προκαλεί οργανική τοξικότητα στα ζώα έχει μελετηθεί τα τελευταία χρόνια και πολλοί μηχανισμοί έχουν βρεθεί στο κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Η τοξικότητα δεν έχει αποδοθεί στο ίδιο το φάρμακο, αλλά σε μεταβολικά προϊόντα που παράγονται μέσω του κυττοχρώματος P-450.

Οι βλάβες που δημιουργούνται σε ένα κύτταρο, μπορεί να έχουν σχέση με την απόπτωση, δηλαδή τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και την έκφραση κάποιων γονιδίων. Όσον αφορά το αλοθάνιο, είναι γνωστή η ηπατοτοξικότητα που μπορεί να προκαλέσει, αλλά υπάρχουν πολλά ερωτηματικά, στο γιατί οι βλάβες δεν παρουσιάζονται σε όλους τους οργανισμούς αλλά επιλεκτικά σε ορισμένους. Ποιος είναι ο λόγος της επιλογής; Γνωρίζομε ότι στο μηχανισμό ηπατοτοξικότητας ενέχεται το ανοσοποιητικό σύστημα μέρος του οποίου είναι τα κύτταρα του Kupffer,

τα οποία είναι ηπατικά μακροφάγα. Τα κύτταρα του Kupffer έχουν πολλές ειδικές λειτουργίες όπως ενδοκυττάρωση, φαγοκυττάρωση,

παραγωγή μεταβιβαστών (κυτταροκίνες,εικοσανοειδή). Τι μπορεί να συμβεί άν τα ηπατικά μακροφάγα βρίσκονται υπό καταστολή ή διέγερση;

Θα έχομε εμφάνιση της απόπτωσης σε ομάδες με καταστολή των κυττάρων του Kupffer ή σε ομάδες με διέγερση των κυττάρων του Kupffer όταν χορηγηθεί αλοθάνιο;

Ποια είναι η έκφραση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την απόπτωση του ηπατικού κυττάρου όταν υπάρχει καταστολή ή διέγερση των κυττάρων του Kupffer και συγχρόνως χορηγηθεί αλοθάνιο;

Στα ερωτήματα αυτά προσπαθήσαμε να δώσουμε απάντηση μέσω της πειραματικής αυτής μελέτης.

Η παρούσα εργασία διαιρείται σε γενικό και ειδικό μέρος.

Στο γενικό μέρος επιχειρείται εκτεταμένη ανασκόπηση της βιβλιογρα-φίας περί κυττάρων των κολποειδών, φαρμακευτικής ηπατοπάθειας, φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής του αλοθανίου, περί ηπατοτο-ξικότητας από αλοθάνιο και τέλος περί ογκογονιδίων και απόπτωσης.
Στο ειδικό μέρος παρουσιάζεται η ερευνητική υπόθεση της εργασίας και διατυπώνονται οι ερευνητικές ερωτήσεις, η παρουσίαση του πρωτοκόλ-λου και των αποτελεσμάτων. Ακολουθεί συζήτηση επί των αποτελεσμά-των και εξαγωγή συμπερασμάτων.

Εμπνευστής του θέματος της παρούσης διατριβής είναι ο Καθηγητής της Γαστρεντερολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης κ.κ. Ηλίας Κουρούμαλης, ο οποίος με ενθάρρυνε, συμβούλευε και καθοδηγούσε σ'όλη τη διάρκεια της μελέτης.
Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό Κέντρο "Θ.Γαροφαλίδης" του Νοσοκομείου Ατυχημάτων Κηφισίας, που τελεί υπό την διεύθυνση του κ.Γ. Λυρίτη, Καθηγητού Ορθοπεδικής, τον οποίο ευχαριστώ ιδιαίτερα για την παραχώρηση ημέρας εργασίας στο Ερευνητικό Κέντρο.
Ευχαριστώ θερμά την κ.Ηλέκτρα Χατζηδάκη, διευθύντριά μου, για τις υποδείξεις κατά την διάρκεια του πειράματος. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κ.Μπαλτατζή Ειρήνη, Διευθύντρια Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου στο Νοσοκομείο Αγιος Σάββας
Ευχαριστώ θερμά τον αγαπητό συνάδελφο κ. Εμμανουήλ Ζώη Επιμελητή Α' του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου Βενιζέλειου Νοσοκομείου για την ενεργό συμπαράστασή του.
Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον εκλεκτό και αγαπητό συνάδελφο κ. Παπακυριακού Παναγιώτη, Παθολόγο, για την πολύτιμη συνδρομή του στην πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Γενικά περί κυττάρων των κολποειδών

Τα κύτταρα των κολποειδών παίζουν καθοριστικό ρόλο στην διατήρηση της ηπατικής λειτουργίας, κάτω από φυσιολογικές αλλά και σε παθολογικές συνθήκες.[1-5] Έχουν αναγνωρισθεί τέσσερεις τύποι κολποειδικών κυττάρων: ενδοθηλιακά κύτταρα, κύτταρα του Kupffer, λιποαποταμιευτικά ή κύτταρα Ito ή αστεροειδή κύτταρα (stelate) και κύτταρα pit.[6]

Στα ηπατικά λόβια, τα κύτταρα των κολποειδών έχουν ιδιαίτερη θέση, που είναι άμεσα σχετιζόμενη με την λειτουργία τους. Τα κύτταρα του Kupffer και τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι σε στενή επαφή με την κυκλοφορία, ενώ τα παρεγχυματικά κύτταρα βρίσκονται σε επαφή με το πλάσμα μόνο διά του χώρου του Disse. Τα διάτρητα ενδοθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν ένα φυσικό φραγμό, ο οποίος επιτρέπει την άμεση επαφή των παρεγχυματικών κυττάρων με τις περισσότερες πλασματικές πρωτεΐνες στο χώρο του Disse, αλλά εμποδίζουν την άμεση επαφή των παρεγχυματικών κυττάρων με τα αιματικά κύτταρα, τα μεγάλα χυλομικρά, τους ιούς και τα βακτήρια. Τα κύτταρα του Kupffer, που απο-τελούν το 80% - 90% των ακινήτων ιστικών μακροφάγων του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, είναι αγκιστρωμένα στα ενδοθηλιακά κύτταρα με μακρυές κυτταροπλασματικές αποφύσεις. Εντός των ηπατικών λοβίων (acinus) τα κύτταρα του Kupffer είναι τοποθετημένα ως επί το πλείστον στην περιπυλαία περιοχή. Και οι δύο τύποι, δηλαδή ενδοθηλιακά και κύτταρα του Kupffer, συνεισφέρουν σημαντικά στην ενδοκυτταρική ικανότητα του ήπατος με την παρουσία ειδικών υποδοχέων που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη.

Επιπλέον, τα κύτταρα του Kupffer είναι εντόνως φαγοκυτταρικά κύττα-ρα, δηλαδή ικανά να φαγοκυττώσουν μεγάλα σωματίδια (π.χ. ερυθρά αιμοσφαίρια και βακτήρια). Αμφότερα, η ενδοκυττάρωση και η φαγοκυττάρωση από τα κύτταρα των κολποειδών, προκαλούν την παραγωγή διαφόρων χυμικών μεταβιβαστών, όπως οι κυτταροκίνες ή τα εικοσανοειδή, που ακολούθως

προκαλούν μεταβολικές απαντήσεις του παρεγχύματος και των άλλων ηπατικών κυττάρων.

Μικροοργάνωση και προέλευση των κυττάρων του Kupffer

Τα κύτταρα του Kupffer έχουν ποικιλία σχημάτων, αλλά ως επί το πλείστον είναι αστεροειδή. Αποτελούν το 80%-90% του ολικού πληθυσμού των ακίνητων ιστικών μακροφάγων του σώματος. Αποτελούν το 15% των ηπατικών κυττάρων, αλλά περιέχουν μόνο το 2,5% των ηπατικών κυτταρικών πρωτεϊνών .

Άπτονται με τα ψευδοπόδια τους των ενδοθηλιακών κυττάρων, και μερικές από τίς αποφύσεις (processes) περνούν μέσα από παράθυρα των ενδοθηλιακών κυττάρων και φτάνουν στα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα.[7] Παρά το ότι τα κύτταρα του Kupffer θεωρούνται ακίνητα μακροφάγα, στην in vivo μικροσκόπηση φάνηκε ότι αυτά μπορούν να κινούνται με ταχύτητα 4,6μm/min.[8]

Βρίσκονται ώς επι το πλείστον στην περιπυλαία περιοχή, που είναι μια ιδανική θέση ελέγχου του εισερχόμενου στο ήπαρ αίματος: 43% των κυττάρων των Kupffer είναι στην περιπυλαία ζώνη, 32% στην μέση ζώνη, και 23% στην περιφλεβική περιοχή.[9-11]

Τα κύτταρα του Kupffer που βρίσκονται στην περιπυλαία ζώνη, φαίνονται να είναι μεγαλύτερα, να περιέχουν περισσότερο ετερογενή λυσοσωμάτια και να είναι πιο δραστήρια στη φαγοκυττάρωση. Τα μικρότερα κύτταρα του Kupffer στην περιφλεβική περιοχή φαίνονται ότι είναι περισσότερο δραστήρια στην παραγωγή κυτταροκινών και έχουν μεγαλύτερη κυτταροτοξική ικανότητα. Αμφότερα, η δραστηριότητα και ο αριθμός των κυττάρων του Kupffer, μπορούν να ποικίλουν, αναλόγως των ανοσολογικών και παθοφυσιολογικών συνθηκών του ήπατος.[12-13]

Υπάρχουν πολλοί πειραματικοί τρόποι για να μετακινήσουν, να δραστηριοποιήσουν ή να καταστείλουν την δράση των κυττάρων του Kupffer in vivo. Η ελάττωση των κυττάρων του Kupffer, μετά από μια πτήση στο διάστημα, μπορεί να έχει σημαντική εφαρμογή στο μέλλον.[14]

Τα κύτταρα του Kupffer έχουν τυπική μορφολογία και συμπεριφορά μακροφάγων.[15]
Το κυτταρικό τους σώμα έχει μικρολάχνες, λαμελοπόδια και ευκαιριακά νηματοπόδια.[16-17] Αυτά τα μικροδομικά χαρακτηριστικά μαζί με τα άφθονα λυσοσωμάτια, τις πινοκυτταρικές κύστεις και την ποικιλία των λυσοσωμικών ενζύμων που υπάρχουν στα κύτταρα του Kupffer,
αντανακλούν τον σημαντικό ρόλο αυτών των κυττάρων στη διάσπαση των σωματιδίων και ουσιών που προσλαμβάνονται από την κυκλοφορία. Ο χιτώνας (cell coat) των κυττάρων του Kupffer αποτελείται από ένα εξωτερικό στρώμα, πάχους 50-70 nm και ένα λεπτό στρώμα κοντά στην πλασματική μεμβράνη.[17-19] Τα κύτταρα του Kupffer έχουν αρκετές υπομικροσκοπικές δομές σχετικές με την πινοκυττάρωση,όπως:
α) μικροπινοκυτταρικές κύστεις με κάλυψη ινιδίων,που μοιάζουν με γουρουνότριχες, β) κύστεις με χνουδωτή κάλυψη γ) σπειροειδείς κατασκευές.
Την 13η ημέρα κυήσεως, αναγνωρίζονται στο ηπαρ εμβρύου των ποντικών κύτταρα του Kupffer με φαγοσωμάτια και φαγοκυτταρωμένα ερυθρά.[20-22] Τα κύτταρα του Kupffer διαφοροποιούνται από όλους τους άλλους τύπους ηπατικών κυττάρων και φαίνονται να είναι το τελικό στάδιο των μονοπύρηνων φαγοκυτταρικών σειρών.[18]
Πιθανόν να προέρχονται από μονοκύτταρα ή από αδιαφοροποίητα μητρικά κύτταρα του ερυθρού μυελού.[23] Η κινητική των κυττάρων του Kupffer έχει γίνει αντικείμενο ανοικτής συζήτησης μεταξύ αυτών που υποστηρίζουν την μία μονοκυτταρική προέλευση και αυτών που υποστηρίζουν την ικανότητα να αυτοπολλαπλασιαστούν. Κάτω από ορισμένες συνθήκες (χορήγηση ζυμοσάν, μερική ηπατεκτομή, ακτινοβολία) το 75% των κυττάρων Kupffer προήλθαν από αυτοπολλαπλασιασμό των τοπικών κυττάρων Kupffer ενώ τα υπόλοιπα προήλθαν από εξωηπατικές πηγές.[9, 23-26] Σε ποντίκια σε χειμερία νάρκη,
οι εξωηπατικοί πρόδρομοι συνεισφέρουν το 50% του ανεφοδιασμού του ήπατος σε κύτταρα του Kupffer.[27] Σε ασθενείς που υπέστησαν ηπατική μεταμόσχευση ή μεταμόσχευση του μυελού των οστών, παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα του Kupffer έχουν γονότυπο του μυελού των οστών, που σημαίνει ότι τα κύτταρα

του Kupffer έχουν σαν προέλευση τον μυελό των οστών.[28-31] Οι αναφορές στούς μιτοτικούς δείκτες των κυττάρων του Kupffer διαφέρουν σε κάθε αναφορά και ο μέσος όρος αντικατάστασης του ολικού πληθυσμού των κυττάρων του Kupffer διαφέρει από 21 ημέρες έως και 14 μήνες.[32]

Ιστοχημεία και κυτταρικοί δείκτες των κυττάρων του Kupffer

Α) Ενεργειακός Μεταβολισμός

Πολλές κυτταρικές λειτουργίες εξαρτώνται από την διαθεσιμότητα της ενέργειας (σε μορφή ATP) η οποία δημιουργείται από τον μεταβολισμό των κυττάρων. Παρά το ότι όλα τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να παράγουν ενέργεια, καμιά φορά, σε απουσία οξυγόνου, η οξείδωση των σακχάρων, των αμινοξέων και των λιπαρών οξέων είναι η βασική πηγή ενέργειας.

Υπάρχουν διάφορα κυτταροπλασματικά ενζυμικά συστήματα (π.χ. κύ-κλος του Krebs και γλυκόλυση) που δημιουργούν ενδιάμεσα αναγωγικά ισοδύναμα, όπως το NADH, που μπορεί με την οξείδωση στα μιτοχόν-δρια να μετατραπούν σε ATP ή άλλες ενώσεις πλούσιες σε ενέργεια.

Η γλουταμινική αφυδρογονάση και η glycerol-3-phosphate είναι άφθο-νες στα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα. Η χαμηλότερη δραστηριότητα των μιτοχονδριακών αυτών ενζύμων στα κύτταρα του Kupffer, είναι σε συμφωνία με την μικρή περιεκτικότητα σε μιτοχόνδρια αυτών των κυττά-ρων σε σύγκριση με τα παρεγχυματικά κύτταρα, αν και οι δραστηριότη-τες είναι αρκετά υψηλότερες από τις αναμενόμενες με βάση την πυκνό-τητα των μιτοχονδρίων.[33] Το ένζυμο γλυκόζο-6,φωσφορική αφυδρογονά-ση (G-6PDH), που είναι ένζυμο "κλειδί" στη παραγωγή της φωσφορικής πεντόζης μέσω του NADPH, δείχνει να έχει μεγάλη δραστηριότητα στα κύτταρα του Kupffer. Το μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης θεωρείται πολύ σημαντικό για την μεταβολική απάντηση στη φαγοκυττάρωση στά κύτταρα του Kupffer.[34]

Μελέτες σε κύτταρα του Kupffer έχουν δείξει ότι η σύνθεση και το περιεχόμενο των μιτοχονδριακών ενζύμων υποδηλώνει την μεγαλύτερη σημασία του άξονα της γλυκερόλ-3-φωσφατάσης από τον άξονα μαλεϊκής ασπαρτάμης για την μεταφορά των αναγωγικών ισοδυνάμων στα μιτοχόνδρια

σ'αυτά τα κύτταρα. Πρόσφατες μελέτες στη χρήση εξωγενών υποστρωμάτων από κύτταρα του Kupffer, έδειξαν ότι το 80% του παραγομένου ATP παρήχθη απο την οξείδωση της γλουταμίνης και του παλμιτικού οξέος.[35] Η αυξημένη χρήση της γλυκόζης από το ήπαρ κάτω από διάφορες συνθήκες (χορήγηση ενδοτοξινών, παράγοντα νέκρωσης των όγκων, ινσουλίνης ή φαγοκυτταρικά ερεθίσματα) οφείλε-ται, κυρίως, στο γεγονός ότι έχει διεγερθεί η πρόσληψη της γλυκόζης στα μη παρεγχυματικά κύτταρα.[36-37]
Η βασική (27,5±5,1 natoms 02/min) και ενεργοποιημένη (31,4±11,6 natoms 02/min) κατανάλωση οξυγόνου (για κάθε mg πρωτεΐνης) στα κύτταρα του Kupffer, είναι εντυπωσιακά υψηλή, σε σχέση με την χαμηλή πυκνότητα μιτοχονδρίων.[33]

Β) Λυσοσωμικά ένζυμα

Τα κύτταρα του Kupffer είναι εμπλουτισμένα με ένα μεγάλο αριθμό λυσοσωμιακών ενζύμων,[5, 38-41] και είναι, επομένως, καλά εξοπλισμένα για την διάσπαση των ουσιών οι οποίες έχουν προσληφθεί από αυτά τα κύτταρα. Μερικά από αυτά είναι: a-L-iduronidase, b-D-Glucuronidase, Cathepsin D, Arylsulfatase B, Acetylglucosaminidase, Acid phosphatase.
Πολλά απο τα λυσοσωμικά ένζυμα έχουν υψηλής ειδικότητας δραστηριότητες στα κύτταρα του Kupffer σε σύγκριση με τα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα.

Γ) Αποτοξίνωση

Τα ισοένζυμα του κυτταροχρώματος P-450 ($_2E_1$ και h) παρατηρήθηκαν στα κύτταρα του Kupffer.[42-43] Η ενεργοποίηση διαφόρων καρκινογόνων με δημιουργία μεταλλαξιογόνων μεταβολιτών, ίσως να συνεισφέρει στην κυτταροτοξικότητα των κυττάρων του Kupffer. Από την άλλη πλευρά,πολλά ισοένζυμα της γλουταθειόνης-S-τρανσφεράσης και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, ίσως να καθιστούν ικανά τα κύτταρα του Kupffer να αποτοξινώνουν δυναμικά τις ηπατοτοξικές ουσίες.[44]

Δ) Κυτταρικοί δείκτες

Τα κύτταρα του Kupffer περιέχουν πολλούς ειδικούς δείκτες. Στα ποντίκια, ο περισσότερο ευδιάκριτος δείκτης είναι η παρουσία της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης.[45] Άλλοι δείκτες είναι η παρουσία ή η επαγωγικότητα των αντιγόνων τάξεως II του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητος (MHC),[46] υποδοχείς για φουκόζη και γλυκοπρωτεΐνες εκτεθειμένες στη γαλακτάση και η ικανότητα να φαγοκυτταρώνει σωματίδια latex που έχουν σημανθεί με φθορισμό.[47,48]

Έχουν παρουσιαστεί αρκετά μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία επιτρέπουν διάκριση μεταξύ των κυττάρων του Kupffer και μονοκυττάρων: αντι-KCA-1,[49] ED2,[50] Ku-1,[51] UFT-1[52] και K1-M2R.[53] Η αναγνώριση των κυττάρων του Kupffer μπορεί να επιτευχθεί βασιζόμενη στην μικροοργάνωση του κυττάρου ή χρησιμοποιώντας βιοχημικούς δείκτες. Μερικοί από τους δείκτες των κολποειδικών κυττάρων δεν μπορούν πάντα να χρησιμοποιηθούν για τα απομονωμένα φρέσκα κύτταρα, καθώς αυτά χρειάζονται υποδοχείς σε άθικτες μεμβράνες και ενδοκυτταρική ικανότητα. Η εκλογή των δεικτών εξαρτάται από τις αναμενόμενες ιδιότητες των μολυσμένων κυττάρων. Μερικές φορές χρειάζονται δύο ή περισσότεροι δείκτες, δηλαδή, συγχρόνως, ένας θετικός και ένας αρνητικός (εστεράση και υπεροξειδάση).[54]

Απομόνωση, καθαρισμός και καλλιέργεια των κυττάρων του Kupffer

Μια από τις πρώτες μεθόδους, για να απομονωθούν τα κύτταρα του Kupffer, άρχισε με την in vivo πρόσληψη των σωματιδίων του σιδήρου από τα κύτταρα του Kupffer. Γίνεται έκπλυση των κυττάρων των κολποειδών με την χρήση ενός μαγνήτη.[55] Αυτή η μέθοδος δίνει μικρό αριθμό από κολποειδή κύτταρα.

Άλλη μέθοδος απομόνωσης, η οποία έχει καταγραφεί από τον Beppy και Friend και τον Seglen και Glessing[56,57], χρησιμοποιεί κολλαγενάση για την απεξάρθρωση του ήπατος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για απομόνωση παρεγχυματικών και κυττάρων κολποειδών, συγχρόνως από το ίδιο ήπαρ. Η

προνάση, που καταστρέφει ειδικά τα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πρώτο στάδιο για την καταστροφή των ηπατοκυττάρων ή σε δεύτερο στάδιο μετά από χρήση κολλαγενάσης. Και με τίς δύο μεθόδους θα έχομε παραγωγή μικτών πληθυσμών κυττάρων των κολποειδών.

Το 1976 βρέθηκε μια μέθοδος για να πάρουμε καθαρά κλάσματα κυττάρων του Kupffer και ενδοθηλιακών κυττάρων των κολποειδών.[58-59]

Αυτή η μέθοδος, βασισμένη στην έκπλυση δια φυγοκεντρίσεως, τελειοποιήθηκε αργότερα, όταν η πιθανότητα μόλυνσης των κλασμάτων των ενδοθηλιακών κυττάρων από τα λεμφοκύτταρα του αίματος έγινε μηδαμινή. Ακολουθεί φιλτράρισμα υψηλού βαθμού, ακολουθούμενο από προσκόλληση σε πλαστικά για τα κύτταρα του Kupffer. Η εκλογή για το ποια μέθοδο θα διαλέξουμε, εξαρτάται από τις κυτταρικές απαιτήσεις για το κάθε ειδικό πείραμα, για την απόδοση, την καθαρότητα, την ικανότη-τα να επιβιώσουν σε καλλιέργεια, την ακεραιότητα των επιφανειακών κυτταρικών υποδοχέων ή την ελάττωση του κυτταρικού μεταβολισμού κατά την απομόνωση.[60-61]

Η έκπλυση δια φυγοκεντρήσεως(centrifugal elutriation),γενικώς,είναι η μέθοδος εκλογής για περισσότερο καθαρισμό των κυττάρων του Kupffer.

Τα κύτταρα του Kupffer προσκολλώνται γρήγορα σε διάφορα είδη των καλλιεργητικών πλακιδίων και απλώνονται μετά την προσκόλληση. Αυτά τα καλλιεργημένα κύτταρα, είναι ακόμα ικανά να φαγοκυτταρώ-σουν τον κολλοειδή άνθρακα και σωματίδια από latex και μπορούν να διατηρήσουν την λειτουργία τους για κάποιο χρόνο και ιδιαίτερα την ενδοκυττάρωση.

Λειτουργίες των κυττάρων του Kupffer

Τα κύτταρα του Kupffer έχουν πολλές ειδικές λειτουργίες, που είναι απαραίτητες για την διατήρηση της ομοιόστασης στο ήπαρ,κάτω από διάφορες συνθήκες. Αυτές οι λειτουργίες, όπως η ενδοκυττάρωση, η φαγοκυττάρωση, η παραγωγή μεταβιβαστών (κυτταροκίνες, εικοσανοειδή), θα περιγραφούν με λεπτομέρεια.

Α) Ενδοκυττάρωση

Η ενδοκυττάρωση είναι ζωτικής σημασίας διεργασία για το ρόλο που παίζουν τα κύτταρα του Kupffer στη διατήρηση της ηπατικής ομοιόστασης. Η ενδοκυττάρωση δεν είναι σπουδαία μόνο για την απομάκρυνση αρκετών πρωτεϊνών του πλάσματος και ειδικά ξένων υλικών από το αίμα, αλλά η ίδια η πρόσληψη μέσω υποδοχέων αυτών των ουσιών είναι άμεσα συνυφασμένη με μια μεταβολική απάντηση, που φτάνει στην παραγωγή των κυτταροκινών και εικοσανοειδών. Τόσο οι κυτταροκίνες, όσο και τα εικοσανοειδή, μπορούν να δράσουν ακολούθως με αυτοκρινή ή παρακρινή μηχανισμό.

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ KUPFFER

Εκκαθαριστικοί Υποδοχείς

Τα κύτταρα του Kupffer προσλαμβάνουν μια μεγάλη ποικιλία από μόρια με καθαρό αρνητικό φορτίο, μέσω των καλουμένων υποδοχέων καθαρισμού. Πολλές ουσίες έχουν περιγραφεί να ενώνονται in vivo και in vitro σε αυτό το σύστημα υποδοχέων: ακετυλιωμένες - χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (ac - LDL),[62-65] κατεργασμένη με φορμαλδεύδη-αλβουμίνη,[66-67] νιτροζυλιωμένη υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη,[68] οξειδωμένη LDL,[69] μεθυλαμίνο-ενεργοποιημένη α2 μακροσφαιρίνη.[70] Η ένωση αυτών των ουσιών με τους υποδοχείς είναι ανεξάρτητη του Ca^{++} και ακολουθείται από γρήγορη ενδοκυττάρωση και διάσπαση στα λυσοσωμάτια.[62-65]

Η πρόσληψη της ac-LDL από τα μακροφάγα οδηγεί στο σχηματισμό των καλουμένων αφρωδών κυττάρων. Οι υποδοχείς ac-LDL των κυττάρων του Kupffer μπορούν να δημιουργήσουν ένα σύστημα προστασίας, με σκοπό να προλάβουν την πρόσληψη της τροποποιημένης LDL, με συνακόλουθη δημιουργία αφρωδών κυττάρων και διήθηση μακροφάγων στο αγγειακό ενδοθήλιο.[71] Για πολλά χρόνια, υπήρχε ανοικτή συζήτηση για το κατά πόσο οι ουσίες αυτές ενώνονται με ένα ή δύο θέσεις υποδο-χέων στα ηπατικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Τελευταία, ένας διαμεμβρανι-κός ειδικός υποδοχέας (MB 20.000) της ac-LDL, παρήχθη με κλωνισμό. Αυτός ο ac-LDL υποδοχέας είναι ένα τριμερές των 77κDa υπομονάδων, που περιέχει καρβοϋδρικές αλυσίδες συνδεδεμένες με ασπαραγίνη.[72] Παράλληλα με αυτόν τον τύπο I ac-

LDL υποδοχέα, βρέθηκε ένας υποδο-χέας τύπου II ac-LDL, που στερείται του πλουσίου σε κυστείνη τελικού τμήματος C αλλά έχει την ίδια ικανότητα στη σύνδεση και πρόσληψη της ac-LDL.[73-74]
Ο κλωνισμένος υποδοχέας φαίνεται να ενώνεται όχι μόνο με ac-LDL αλλά, επίσης, με τροποποιημένη αλβουμίνη, δείχνοντας ότι, υπάρχει πιθανόν,ένας υποδοχέας στα ηπατικά ενδοθηλιακά κύτταρα, υπεύθυνος για την σύνδεση των ουσιών για τούς οποίους μιλήσαμε πρίν. Μελέτες με τούς κλωνισμένους υποδοχείς δείχνουν ότι η Α-λιπιδική άλυσος των ενδοτοξινών μπορεί να ενωθεί με τον ac-LDL υποδοχέα, αλλά η ένωση αυτή στον ac-LDL υποδοχέα δεν φαίνεται να προκαλεί κανένα μεταβολικό αποτέλεσμα.[75]
Εκτός απο τούς λίγους ac-LDL υποδοχείς που περιέχουν τα κύτταρα του Kupffer, υπάρχει ένας άλλος υποδοχέας, που αναγνωρίζει ειδικά τις οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες. Ο υποδοχέας αυτός συνδέεται με τις τροποποιημένες με οξείδωση LDL (β), πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL) και λιποπρωτεΐνες (α).[76-78] Η σύνδεση αυτών των οξειδωμένων μορίων είναι ανεξάρτητη του Ca και ακολουθείται από ενδοκυττάρωση και πολύ αποτελεσματική διάσπαση.[76] Η ένωση των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών σ΄αυτούς τους υποδοχείς, δεν ανταγω-νίζεται με την σύνδεση στούς ac-LDL υποδοχείς, αλλά καταστέλλεται αποτελεσματικά από το πολυϊνοσικό οξύ. Τα ανθρώπινα κύτταρα του Kupffer έδειξαν ότι περιέχουν τον ίδιο τύπο ειδικό υποδοχέα της οξειδωμένης LDL.[79]
Αυτός ο οξειδωμένος ειδικός υποδοχέας, της LDL, μπορεί να δημιουργήσει ένα προστατευτικό σύστημα, εναντίον της παρατεταμένης κυκλοφορίας αυτών των αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών στη κυκλοφορία.

Υποδοχείς Μαννόζης /Ν-ακετυλογλυκοζαμινικός υποδοχέας

Πρώτοι οι Steer και Clarenburg [80] περιέγραψαν την παρουσία υποδοχέων οι οποίοι ενώνονται ειδικά με μαννόζη/Ν-ακετύλγλυκοζαμίνη και, συνεπώς, με πρωτεΐνες που φέρουν τα μόρια αυτά στα άκρα τους, στα κολποειδή ηπατικά κύτταρα. Μελέτες που έκαναν οι Hubbard et al στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο,[81] έδειξαν ότι τα ηπατικά ενδοθηλιακά κύτταρα είναι

ο πρώτος τόπος πρόσληψης αυτών των γλυκοπρωτεϊνών. Πολλές από τίς ουσίες που έχουν περιγραφεί οτι συνδέονται με τους υποδοχείς μαννόζης δεν είναι φυσιολογικές ουσίες (οβαλβουμίνη, νεογλυκοπρωτεΐνη,μανάνη,κονβερτάση,horseradish υπεροξειδάση).[80-83] Από την άλλη πλευρά, πολλά λυσοσωμικά ένζυμα, τα οποία έχουν πύλη εισόδου την πυλαία κυκλοφορία, φαίνεται να ενώνονται στούς υποδοχείς μαννόζης (β-γλυκουρονιδάση, α-μαννοσιδάση, β-εξοζαμινιδάση, β-N-ακετυλο-γλυκοσαμινιδάση).[80-82, 84] Ο ενεργοποιητής του ιστικού πλασμινογόνου ήταν η πρώτη φυσιολογική πρωτεΐνη του πλάσματος που ευρέθη να ενώνεται με τους υποδοχείς μαννόζης στα ηπατικά ενδοθηλιακά κύτταρα.[85-88] Οι υποδοχείς μαννόζης φάνηκε να εμπλέκονται στην πρόσληψη πολύ επικίνδυνων μικροοργανισμών, όπως βακτηρίων, μυκήτων και παρασίτων.[89-91] Η σύνδεση των ουσιών στούς υποδοχείς μαννόζης στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι Ca^{++} εξαρτώμενη και ακολουθείται από γρήγορη ενδοκυττάρωση, η οποία δίνει ημίσεια ζωή για τούς επιφανειακούς υποδοχείς μαννόζης 10 sec.[92]

Οι υποδοχείς μαννόζης (MB 175.000) έχουν απομονωθεί σε πολλούς ιστούς, μεταξύ των οποίων και το ανθρώπινο ήπαρ.[93] Ο υποδοχέας μαν-νόζης που βρίσκεται στα κύτταρα του Kupffer συμβάλλει έξι (6) φορές λιγότερο στην πρόσληψη διαφόρων ουσιών, επικαλυμμένων με μαννόζη απο την κυκλοφορία, σε σύγκριση με αυτή των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ίσως τα κύτταρα του Kupffer να σχετίζονται περισσότερο με την κάθαρση μεγάλων μορίων επικαλυμένων με μαννόζη, όπως επικίνδυνοι μικροοργανισμοί, δηλαδή βακτήρια και παράσιτα. Ένας υποδοχέας μαννόζης με το ίδιο μοριακό βάρος κλωνοποιήθηκε πρόσφατα στον ανθρώπειο πλακούντα. Αυτός ενώνει τις μαννόζο τελικό-γλυκοπρω-τεΐνες με τυπικές υδατανθρακικές περιοχές αναγνώρισης, που είναι αυστηρά Ca^{++} εξαρτώμενες.[94]

Υποδοχείς γαλακτόζης / Φρουκτόζης

Η κάθαρση των σωματιδίων με τελικό τμήμα την γαλακτόζη από την κυ-κλοφορία, γίνεται με ένα ειδικό μηχανισμό πρόσληψης από τα κύτταρα του Kupffer. Αυτός ο υποδοχέας έχει υψηλή συγγένεια πρός ουσίες που έχουν

γαλακτικές ομάδες, όπως τα ερυθροκύτταρα,[95,96] ή λιποσώματα που φέρνουν μια τελική γαλακτική ομάδα [97,98] και lac-LDL,[99] καρκινικό αντιγόνο,[100] ή τμήματα επικαλυμένα με γαλακτοσυλιωμένη αλβουμίνη, ινοδωγόνο του πλάσματος ή συναθροισμένη IgA(aggregated).[101] Τα σωματίδια που έχουν εκτεθεί σε γαλακτόζη, με μέγεθος τουλάχιστον 10nM, όπως το λακτοσιλικό (lactosylated) LDL(22nM) και τα αποαλυλιωμένα (desialylated) ερυθροκύτταρα των επιμύων, καθαίρονται από την κυκλοφορία από τους γαλακτοζαιμικούς υποδοχείς των κυττάρων του Kupffer.[99] Μικρότερα σωματίδια, όπως το λακτοσυλικό HDL(10nM) (lactosylated) καθαίρονται απο την κυκλοφορία με τους ασιαλο - γλυκοπρωτεϊνικούς υποδοχείς (ASGPr) στα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα.[97] Λόγω του ειδικού τους μεγέθους, αυτός ο ειδικός γαλακτοξικός υποδοχέας στα κύτταρα του Kupffer ονομάστηκε υποδοχέας των γαλακτοξικών σωματιδίων (Gpr).[97] Μερικοί ερευνητές, τον ταυτίζουν με μία λεκτίνη με ειδικότητα στην γαλακτόζη με ΜΒ 30.000, που απομονώθηκε από το ήπαρ, χρησιμοποιώντας υψηλή συγκέντρωση EDTA (20nM) με τον Gpr (galactose - particle receptor). Αυτή η λεκτίνη με ΜΒ 30.000, αναγνωρίστηκε σαν υποομάδα της C- αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) και αυτό υποδηλεί ότι η Gpr ίσως να είναι μια μεμβρανική ένωση αυτής της CRP υποομάδας.[95,96] Εκτός από τον Gpr, τα κύτταρα του Kupffer έχουν ένα άλλο ειδικό γαλακτοζικό υποδοχέα.[102,103] Αυτός ο υποδοχέας αναγνωρίζει τις γλυκοπρωτεΐνες με υψηλή πυκνότη-τα από ρίζες φουκοσυλίου,[102] αλλά, επίσης, αλληλεπιδρά με Ν/ακετύλ-γαλακτοσαμίνη και νεογλυκοπρωτεΐνη με τελική γαλακτόζη.[102-104]

Ο υποδοχέας έχει κλωνοποιηθεί και περιέχει δύο γλυκοζυλιωμένες υποομάδες (ΜΒ 7 και 88 kDa), που προκύπτουν από πρωτεόλυση ενός υποδοχέα με 550 αμινοξέα.[104] Η αναγνώριση των υδατανθράκων είναι παρόμοια με εκείνη των ασιαλογλυκο-πρωτεϊνικών υποδοχέων των παρεγχυματικών ηπατικών κυττάρων.[105] Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι αυτός ο υποδοχέας είναι ικανός να συνδέσει κύτταρα καλυμμένα με γαλακτόζη και φρουκτόζη.[106]

Υποδοχείς λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητος

Το ήπαρ παίζει σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση της χοληστερόλης από τον οργανισμό, καθώς αυτό είναι το μόνο όργανο που μπορεί εξ ολοκλήρου να απομακρύνει την LDL χοληστερόλη μέσω της έκκρισης από την χολή. Ο υποδοχέας LDL ο οποίος είναι υπεύθυνος για την πρόσληψη και διάσπαση της LDL έχει κλωνοποιηθεί.[107] Σε επίμυες, όπου τα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα έχουν ελάχιστους LDL υποδοχείς, η LDL προσλαμβάνεται αποκλειστικά από τα κύτταρα του Kupffer.[108] Σε ανθρώπους και κουνέλια, όπου τα παρεγχυματικά κύτταρα έχουν LDL υποδοχείς, η συμμετοχή των κυττάρων του Kupffer στο μετα-βολισμό της LDL είναι χαμηλή, αλλά στα κύτταρα του Kupffer στους ανθρώπους η διάσπαση της LDL είναι 18 φορές υψηλότερη από ό,τι στα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα και, συνεπώς, έχουν μεγάλη σημασία για την κάθαρση της LDL.[109,110] Μετά την πρόσληψη της LDL από τα κύτταρα του Kupffer, οι εστέρες της χοληστερόλης υδρολύονται με ταχύτητα, αλλά η μεταφορά στα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα και στη χολή δεν είναι αποτελεσματική.[111]

Ανοσοσυμπλέγματα - Fc Υποδοχείς

Τά ηπατοκύτταρα και τα κύτταρα του Kupffer συνδέουν στην επιφάνειά τους ανοσοσφαιρίνες IgG, οι οποίες πιθανόν να βοηθούν αρκετά στην άμυνα του οργανισμού.[112,113]

Η πρόσληψη ανοσοσυμπλεγμάτων IgA γίνεται μέσω ειδικών υποδοχέων των κυττάρων του Kupffer που αναγνωρίζουν το Fc, τμήμα των IgA.[114,115] Κάτω από ορισμένες παθολογικές συνθήκες, όπως η πρωτοπαθής χολική κίρρωση, ο αποφρακτικός ίκτερος και η κατανάλωση αιθανόλης, η ικανότητα των κυττάρων του Kupffer να προσλάβουν τα ανοσοσυμπλέγ-ματα είναι ελαττωμένη, πράγμα που μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της ικανότητας της άμυνας του ξενιστή.

Υποδοχείς συμπληρώματος

Λόγω του ότι το συμπλήρωμα είναι από τα κυριώτερα συστήματα άμυνας εναντίον διαφόρων παθογόνων, η παρουσία υποδοχέων για αρκετά απο τα

συστατικά του συμπληρώματος, είναι μεγάλης σημασίας για αυτό το σύστημα. Τα κύτταρα του Kupffer περιέχουν υποδοχείς για τα συστατι-κά του συμπληρώματος C1q C3b.[112,116-119] Οι παράγοντες του συμπληρώμα-τος, προσκολλώνται σε πολλές ουσίες όπως οι ανοσοσφαιρίνες αλλά και στο DNA, στα βακτήρια, στα αιμοπετάλια.[120,121] Αυτή η προσκόλληση ακολουθείται από ενδοκυττάρωση ή φαγοκυττάρωση και αυτή η διαδικα-σία, ως επί το πλείστον, γίνεται στα κύτταρα του Kupffer.[122] Τα ανθρώπι-να κύτταρα του Kupffer επίσης, έχουν αρκετούς υποδοχείς συμπληρώ-ματος και η παρουσία υποδοχέων για το C1, C3 και C4 δίνει στα κύτταρα του Kupffer μια σημαντική δυνατότητα να αφαιρέσουν τα συμπλέγματα που έχουν καλυφθεί με συμπλήρωμα από την κυκλοφορία.[123]

Υποδοχείς φιμπρονεκτίνης

Η φιμπρονεκτίνη είναι μία πρωτεΐνη του πλάσματος, η οποία όπως η ανοσοσφαιρίνη και το συμπλήρωμα, είναι ικανή για οψωνοποίηση ενδογενών και εξωγενών ουσιών στην κυκλοφορία. Η οψωνοποίηση σωματιδίων και μεγαλομορίων όπως αιμοπετάλια, DNA, κολλαγόνο, ακτίνη, βακτήρια και ινώδες, από την φιμπρονεκτίνη, ακολουθείται από την απομάκρυνση από την κυκλοφορία των ουσιών αυτών από ειδικούς υποδοχείς.[124,125]

Τα κύτταρα του Kupffer έχουν περίπου 3.000 φιμπρινονεκτικές ενώσεις-θέσεις σε κάθε κύτταρο, που έχουν συγγένεια συνδέσεως 7 nM.[126] Μετά την σύνδεση φιμπρονεκτικού οψωνοποιημένου υλικού σε αυτές τις θέσεις, τα κύτταρα του Kupffer επιτελούν την πρόσληψη αυτών των υλικών με την φαγοκυττάρωση.[126]

Υποδοχείς για τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων

Ο υποδοχέας για τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), δεν είναι μόνο ένας ισχυρός μεταβιβαστής στις φλεγμονώδεις και αλλεργικές αντιδράσεις, αλλά, επίσης, έχει μεγάλη δράση στον ηπατικό μεταβολισμό[127]. Η δράση του PAF στο ήπαρ, γίνεται δια μέσου των κυττά-ρων του Kupffer, τα οποία περιέχουν ειδική περιοχή σύνδεσης για τους PAF. Τα κύτταρα του Kupffer έχουν περίπου 10.000 ειδικές PAF συνδε-τικές θέσεις, με συγγένεια

σύνδεσης 0,45 nM.[128,129] Ένωση με τον PAF σ'αυτούς τους μη κυκλοφορούντες υποδοχείς, μπορεί να ενεργοποιήσει δύο (2) ανεξάρτητες G πρωτεΐνες και δύο ξεχωριστά κανάλια Ca^{++}.[130]

Καρκινοεμβρυικό αντιγόνο

Το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (CEA) είναι μια εντεροπαραγόμενη γλυκοπρωτεΐνη, η οποία καθαίρεται από την κυκλοφορία από τα κύτταρα του Kupffer.[131,132] Η σύνδεση του CEA γίνεται σε ένα 80 kDa υποδοχέα, ο οποίος αναγνωρίζει ειδικά αμινοξέα 107-112 στα CEA μόρια,[133] αλλά έχει περιγραφεί και η σύνδεση με τους υποδοχείς γαλακτόζης στα κύτταρα του Kupffer.[134] Η παρουσία αυτών των συνδετικών μορίων στα κύτταρα του Kupffer, πιθανόν να είναι σημαντική για την ανάπτυξη μεταστάσεων στο ήπαρ.[135]

Κάθαρση των ιστικών υπολειμμάτων

Σε πολλές κλινικές καταστάσεις, όταν υπάρχει κυτταρική νέκρωση, ελευθερώνονται πολλά κυτταρικά συστατικά, όπως DNA και ένζυμα.
Το DNA μπορεί να απομακρυνθεί απο την κυκλοφορία με οψωνοποίηση με φιμπρονεκτίνη και συμπλήρωμα, αλλά, επίσης, μπορεί να συνδεθεί με τους υποδοχείς στα κύτταρα του Kupffer χωρίς οψωνοποίηση.[136] Η διάσπαση των δεσμών του DNA από τα κύτταρα του Kupffer μπορεί να είναι εξωκυττάριος και μπορεί να μη γίνει πινοκυττάρωση των υποδοχέων σύνδεσης με DNA. Πολλά λυσοσωμικά ένζυμα μπορεί να απομακρυνθούν από την κυκλοφορία από τους υποδοχείς μαννόζης, αλλά τα κύτταρα του Kupffer φέρουν επιπλέον ένα χωριστό υποδοχέα για τα ιστικά ένζυμα.[137-139] Αυτός ο υποδοχέας συνδέει με μεγάλη συγγένεια πολλά ιστικά ένζυμα όπως η γαλακτική αφυδρογονάση, η αδενυλκυκλά-ση, η αλκοολική αφυδρογενάση και η κρεατινινική κινάση.

Λιποπολυσακχαριδικοί υποδοχείς

Οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) ή ενδοτοξίνες είναι το συστατικό από τις κυτταρικές μεμβράνες των Gram(-) βακτηρίων που είναι υπεύθυνα για την

αρχή του σηπτικού shock. Οι LPS καθαίρονται από την κυκλοφορία από το ήπαρ.[140-143] Τα κύτταρα του Kupffer παρετηρήθη ότι παίζουν ση-μαντικό ρόλο στην πρόσληψη απο το ήπαρ των LPS. Ο ρόλος των υπευ-θύνων υποδοχέων στα κύτταρα του Kupffer για την πρόσληψη των LPS αποτελεί θέμα συζήτησης, αλλά φαίνεται ότι οι εκκαθαριστικοί υποδο-χείς ευθύνονται στα κύτταρα του Kupffer για την πρόσληψη των LPS. Μετά την πρόσληψη από τα κύτταρα του Kupffer, οι LPS μπαίνουν σε μια διαδικασία η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια των πολυσακ-χαριτών.[144] Η πρόσληψη του LPS απο τα κύτταρα του Kupffer οδηγεί σε ενεργοποίηση των κυττάρων.

Υποδοχείς Κυτταροκινών

Πολλές κυτταροκίνες έχουν αυτοκρινική δράση στα κύτταρα του Kupffer και είναι πολύ πιθανόν ότι αυτά τα κύτταρα περιέχουν ειδικούς υποδοχείς για κυτταροκίνες, όπως ο παράγων νεκρώσεως όγκων (TNFa), ιντερλευκίνη-1 και ιντερλευκίνη-2. Μέχρι τώρα,αυτοί οι υποδοχείς δεν έχουν περιγραφεί με λεπτομέρεια. Όμως, έχει αναγνωρισθεί στα κύττα-ρα του Kupffer ένας υποδοχέας για τη σύνδεση του TGFβ. [145]

Β) Φαγοκυττάρωση

Η φαγοκυττάρωση είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των κυττάρων του Kupffer.[118,146-149] Ιοί, μικρόβια και ερυθρά αιμοσφαίρια, πιθανόν να φαγοκυτταρώνονται από τα κύτταρα του Kupffer. Πρίν τη φαγοκυττάρω-ση, αυτά τα ειδικά υλικά πιθανόν να υφίστανται οψωνοποίηση και να συνδέονται με ειδικούς υποδοχείς, αλλά αυτό δεν είναι απαραίτητο. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αντιθέτως, φαγοκυτταρώνουν μόνον όταν τα κύτταρα του Kupffer αδυνατούν.

Γ) Παραγωγή Μεταβιβαστών

α) Εικοσανοειδή

Το αραχιδονικό οξύ δημιουργείται απο τις κυτταρικές μεμβράνες με την δράση της φωσφολιπάσης A_2(PLA_2). Αυτό το ένζυμο ενεργοποιείται με την αύξηση

της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρίου Ca^{++}, ενώ υψηλά επίπεδα ενδοκυτταρικού cAMP αναστέλλουν την PLA_2. Το αραχιδονικό οξύ, ακολούθως, θα μετατραπεί από την κυκλοοξυγονάση και άλλα ένζυμα σε προσταγλανδίνες, ενώ η μετατροπή του αραχιδονικού από την λιποοξυγενάση και άλλα ένζυμα οδηγεί στην παραγωγή λευκοτριενών. Τα λευκοτριένια και οι προσταγλανδίνες ονομάζονται εικοσανοειδή. Τα κύτταρα του Kupffer μπορούν να παράγουν εικοσανοειδή στους επίμυες.[150] Υπολογίζεται ότι τα κύτταρα του Kupffer είναι υπεύθυνα για την παραγωγή εικοσανοειδών κατά το 65% της ολικής παραγωγής και τα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά 23%. Το κυριότερο προϊόν των κυττάρων του Kupffer είναι η προσταγλανδίνη D_2(PGD_2), που είναι το 55% των ολικών παραγομένων εικοσανοειδών.[150,151] Τα καλλιεργημένα κύτταρα του Kupffer έχουν ένα διαφορετικό μοντέλο στην παραγωγή και παράγουν σχετικά λιγότερη PGD_2.[152]

Τα ηπατικά ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν περίπου 4 φορές λιγότερο εικοσανοειδή (γιά κάθε mg κυτταρικής πρωτεΐνης) εν σχέσει πρός τα κύτταρα του Kupffer και η PGD_2 είναι, επίσης, το σημαντικότερο προϊόν αυτών των κυττάρων.[150,153] Τα κύτταρα του Kupffer στερούνται ικανότητας να παράγουν πολύ ισχυρές λευκοτρίενες, όπως η LTB_4 και η LTC_4.[150-153]

Σε μερικές παθολογικές καταστάσεις, μονοπύρηνα φαγοκύτταρα, τα οποία διηθούν το ήπαρ, είναι ικανά να παράγουν μεγάλα ποσά από LTB_4 και 5-υδροξυεικοσιτετρανοειδή οξέα (5-HETE). Η παραγωγή των μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέως μπορεί να είναι σημαντική για την ρύθμιση της ηπατικής λειτουργίας. Τα κύτταρα του Kupffer έχουν μεγάλη σημασία για την παραγωγή των εικοσανοειδών στο ήπαρ, ενώ τα παρεγχυματικά κύτταρα πιθανόν να θεωρούνται κύτταρα μεταβολικού στόχου για αυτές τις ουσίες.

Πολλές ουσίες, οι οποίες κυκλοφορούν κατά την διάρκεια παθοφυ-σιολογικών συνθηκών, είναι ικανές να προκαλέσουν την παραγωγή εικοσανο-ειδών στα κύτταρα του Kupffer και πιθανόν να διαμορφώνουν την κατανομή της παραγωγής των εικοσανοειδών.[154] Η ιντερφερόνη, οι λιποπολυσακχαρίτες, ο παράγων νεκρώσεως όγκων (TNFa), ο PAF, η φαγοκυττάρωση, το PMA (phorbol-myristate acetate), όλα αυτά είναι ικανά για την ενεργοποίηση της

παραγωγής των εικοσανοειδών στα κύτταρα του Kupffer.[150-156] Ένα ενδιαφέρον χαρακτήριστικό είναι, επίσης, ότι η ενεργοποίηση της ηπατικής συμπαθητικής νεύρωσης οδηγεί στην παραγωγή των εικοσανοειδών από τα κύτταρα των κολποειδών.[157,158]

Η παραγωγή των προσταγλανδινών από τα κύτταρα του Kupffer μπορεί επίσης να κατασταλεί από την απελευθέρωση παραγόντων από τα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα, τα οποία μπορούν να δημιουργήσουν ένα μηχανισμό feedback στην παραγωγή εικοσανοειδών από το ήπαρ.

Η παραγωγή εικοσανοειδών έχει σπουδαία μεταβολική επίδραση στο ήπαρ.

β) Νιτρικό οξείδιο

Το Νιτρικό Οξείδιο (NO) είναι ένα βραχύβιο ενδιάμεσο και παράγεται όταν η L-αργινίνη μετατρέπεται σε L-κιτρουλίνη. Το NO είναι ένα μικρό μόριο και η λιποφιλική του φύση δίνει δυνατότητα στην επικοινωνία με τα γειτονικά κύτταρα.[159] Το NO έχει μεγάλη μεταβολική επίδραση και αναγνωρίστηκε σαν παράγοντας προερχόμενος από το ενδοθήλιο. Στο ήπαρ,τα κύτταρα του Kupffer παράγουν μεγάλο ποσό από νιτρικό οξείδιο σε ανταπόκριση στις λιποσακχαρίδες.[160,161] Το νιτρικό οξείδιο που παράγεται από τα κύτταρα του Kupffer, πιθανόν να αναστέλλει την σύνθεση των πρωτεϊνών στα ηπατικά παρεγχυματικά κύτταρα, όπως παρατηρείται κατά την σήψη.

γ) Παραγωγή υπεροξειδίων

Τα κύτταρα του Kupffer είναι ικανά να παράγουν ανιόντα υπεροξειδίων, ως απάντηση σε διέγερση με PAF, LPS ή επαφή με φαγοκυτταρικά υλικά και TNF-a.[162,163]

Τα παραγόμενα υπεροξείδια από τα κύτταρα του Kupffer ως απάντηση σ’αυτές τις φλεγμονώδεις ουσίες, πιθανόν να βοηθούν στην καταστροφή φαγοκυτταρωμένων οργανισμών ή ουσιών και μπορεί να συμμετέχουν στην ανεπάρκεια οργάνων στα πλαίσια ενδοτοξιναιμίας ή σήψης.[162]

δ) Παράγων δραστηριοποίησης Αιμοπεταλίων

Τα κύτταρα του Kupffer είναι ικανά να παράγουν PAF ώς απάντηση σε διέγερση με LPS ή με το ιονοφόρο A23187.[164,165]

ε) Παραγωγή Πρωτεϊνών

Τα κύτταρα του Kupffer, παράγουν μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών.[166] Η έκκριση των πρωτεϊνών από τα κύτταρα του Kupffer αυξάνεται κατά 1,5 φορά με την παρουσία LPS.[167] Η ερυθροποιητίνη, ο ινσουλινοειδής πα-ράγων ανάπτυξης (GF-1), οι πρωτεογλυκάνες και η απολιποπρωτεΐνη Ε αναγνωρίστηκαν ώς εκκρινόμενα προϊόντα από τα κύτταρα του Kupffer.

στ) Παραγωγή Κυτταροκινών

Τα κύτταρα του Kupffer παράγουν ένα μεγάλο αριθμό από διαφορετικές κυτταροκίνες.

Σε καταστάσεις σήψης τα κύτταρα του Kupffer είναι η σημαντικότερη πηγή των TNF-a, IL-1, IL-6, που έχουν σημαντική παθοφυσιολογική επίδραση.[168] Ο TNF-a είναι ο αρχικός ενδιάμεσος του σηπτικού Shock και η LSP προάγει την παραγωγή του TNF-a στα κύτταρα του Kupffer.[169] Η LPS είναι πιθανόν να ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C στα κύτταρα του Kupffer, η οποία δίνει αυξημένη παραγωγή του TNF-a.[170] Η παραγωγή TNF-a από τα κύτταρα του Kupffer φαίνεται να καταστέλλεται από την PGE2 η οποία, επίσης, παράγεται από τα κύτταρα του Kupffer.[171] Επιπλέον, η IFN-γ και οι ιοί είναι ικανοί να αυξήσουν την παραγωγή των TNF-a από τα κύτταρα του Kupffer.[172] Αντιθέτως, η IFN-γ είναι ικανή να καταστείλει την παραγωγή της IL-1 από τα κύτταρα του Kupffer[172], ενώ η παραγωγή της IL-1 από τα κύτταρα του Kupffer διεγείρεται από ουσίες όπως η LPS, το ζυμοσάν και τα μόρια σιλικόνης.[173]

Τα κύτταρα του Kupffer παράγουν IL-6 σε απάντηση χαμηλών συγκε-ντρώσεων της LPS εντός μιάς ώρας.[174,175] Η παραγωγή της IL-6 δεν ρυθμί-ζεται από την PGE_2, αλλά μπορεί να ανασταλλεί από την δεξαμεθαζόνη[175] Ο ηπατοκυτταρικός παράγων ανάπτυξης (HGF) (ετεροδιμερές με

ΜΒ 34.000 και ΜΒ 69.000) είναι ένας πολύ ισχυρός παράγων ανάπτυξης, που παίζει σπουδαίο ρόλο στην ηπατική αναγέννηση και παράγεται από τα κύτταρα του Kupffer μετά την in vivo χορήγηση τετραχλωριούχου άνθρακα (CCl_4).[176] Τελικώς, τα κύτταρα του Kupffer παράγουν επίσης τον transforming growth factor-β (TGFβ), ο οποίος είναι ο ισχυρότερος διεγέρτης για την παραγωγή κολλαγόνου από τα λιποαποθηκευτικά κύτταρα ή αστεροειδή ή κύτταρα του Ito.[176]

Η δράση των μεσολαβητών των κυττάρων του Kupffer

Τα προϊόντα που περιγράφονται κατωτέρω και τα οποία παράγονται από ενεργοποιημένα κύτταρα του Kupffer, πιθανόν να έχουν πολλές παρακρινικές και αυτοκρινείς δράσεις στο ήπαρ. Αυτές οι δράσεις περιγράφονται εν συνεχεία για κάθε τύπο μεταβιβαστών. Επιπλέον, οι κυτταροκίνες που παράγονται απο τα κύτταρα του Kupffer έχουν πολλές συστηματικές επιδράσεις σ'όλο τον οργανισμό.

Παρακρινείς Επιδράσεις

Α) Οι παραγόμενες προσταγλανδίνες στα κολποειδή προκαλούν βαθειές αλλαγές της μεταβολικής κατάστασης του ήπατος. Σαφώς θεμελιωμένη είναι η δράση των προσταγλανδινών στην διέγερση της γλυκογονόλυ-σης στα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα. Η LPS, η ζυμοσάνη, ο φωρβο-λικός εστέρας, τα ανοσοσφαιρινικά σύμπλοκα, ο PAF και η ενεργοποί-ηση της συμπαθητικής ηπατικής νευρώσεως αυξάνουν την εκρροή γλυκόζης από το μεμονωμένο ήπαρ, αλλά αυτό δεν γίνεται σε απομονω-μένα ηπατικά κύτταρα.[157,158,177-180] Παρατηρήθηκε ότι η πρόκληση της εξόδου γλυκόζης κάτω από αυτές τις συνθήκες αναστέλλεται από τους αναστολείς της κυκλοοξυγενάσης. Από την άλλη πλευρά, οι προστα-γλανδίνες είναι ικανές να αυξήσουν την έξοδο της γλυκόζης από το απομονωμένο ήπαρ αλλά και από τα απομονωμένα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα. Καταλήγουμε έτσι, ότι οι προαναφερθέντες ενεργοποιητές για την έξοδο γλυκόζης, εξασκούν την δράση τους, προκαλώντας την σύνθεση των προσταγλανδινών (PGD_2/PGE_2/TxB_2 και

PGF_{2a}) στα κύτταρα του Kupffer. Ακολούθως, οι προσταγλανδίνες προκαλούν την έξοδο γλυκόζης από τα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα. Η δράση των προσταγλανδινών στην έξοδο της γλυκόζης είναι το αποτέλεσμα της αυξημένης φωσφορυλάσης, μια δράση που οφείλεται στα υψηλότερα επίπεδα φωσφορυλιώσεως (phosphorylation level) αυτού του ενζύμου. Οι προσταγλανδίνες (E_2/D_2 /E_1) ειδικώς, ελαττώνουν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης μιας πρωτεΐνης ΜΒ 67.000 που καταστέλλει την οξεία φάση και αυξάνουν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης μιας πρωτεΐνης με ΜΒ 47.000.[177,178] Οι προσταγλανδίνες, επίσης, μεσολαβούν στην in vivo σύνθεση της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης από τα ηπατοκύτταρα μέσω του φορβολικού εστέρα.[179] Το ένζυμο αυτό ελέγχει τον ρυθμό συνθέσεως των πολυαμινών. Η PGD_2, το πιο σπουδαίο εικοσανοειδές που παράγεται από τα κύτταρα του Kupffer σαν απάντηση της ενεργοποίησης από τον φορβολεστέρα, είναι ικανή να ερεθίσει την σύνθεση της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης στα παρεγχυματικά κύτ-ταρα (μέχρι 40 φορές) με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η PGD_2 φαίνεται να είναι πιό σημαντικός διεγέρτης της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης στα παρεγχυματικά κύτταρα σε σχέση με την PGE_1 και την PGE_2.[179] Η PGE_2 ενεργοποιεί την σύνθεση του DNA στα πρωτογενώς καλλιεργημένα ηπατικά κύτταρα και γι' αυτό μπορεί να είναι σημαντική στην έναρξη και έλεγχο της αύξησης των παρεγχυματικών κυττάρων κατά την διάρκεια της ηπατικής αναγέννησης.[181]

Η IL-1, αναστέλλει την αύξηση των ηπατικών παρεγχυματικών κυττάρων.[182] Αυτό πιθανόν να δίνει στα κύτταρα του Kupffer την δυνατότητα να ελέγχουν την αναγέννηση του ήπατος με την παραγωγή διαφορετικών σχέσεων IL-1 και PGE2.[181,182] Αφού ασκήσουν την δράση τους στα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα μέσω της σύνδεσης τους με ειδικούς υποδοχείς, τα παρεγχυματικά κύτ-ταρα διασπούν τις προσταγλανδίνες. Η PGD_2 μεταβολίζεται σε τρία (3) προϊόντα, ένα από τα οποία ταυτοποιείται σαν 9α-11β- PGE_2. Περιγράφεται και η β-οξείδωση των PGE_2 και PGD_2, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή των δυνόρ- και τετρανορ-προσταγλανδίνης[183] Η $TχB_2$ και η PGE_{2a} μεταβολίζονται ταχέως από τα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα.[183]

Β) Οι κυτταροκίνες που παράγονται από τα ενεργοποιημένα κύτταρα του Kupffer, έχουν μεγάλη δράση τόσο στα επίπεδα, όσο και στο μοντέλο της σύνθεσης των πρωτεϊνών από παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα. Οι TNFa, IL-1 και IL-6 προκαλούν την λεγόμενη "αντίδραση οξείας φάσης" στα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ελαττωμένη σύνθεση, για παράδειγμα, της αλβουμίνης και αύξηση της σύνθεσης των πρωτεϊνών οξείας φάσης, όπως η α2 - μακροσφαιρίνες, η CRP, και η α_1 - αντιθριψίνη (πρωτεΐνες οξείας φάσης διαφορετικές σε κάθε είδος). Η α_2 μακροσφαιρίνη στον άνθρωπο δεν είναι πρωτεΐνη οξείας φάσεως.[184,185]

Είναι σαφές και πρέπει ναι γίνει κατανοητό ότι τα επίπεδα της σύνθεσης των πρωτεϊνών στα παρεγχυματικά κύτταρα, είναι υπό την επίβλεψη ενός μείγματος κυτταροκινών που παράγονται απο τα κύτταρα του Kupffer.[186,187] Οι κυτταροκίνες που παράγονται από τα κύτταρα του Kupffer, εκτός από την καταστολή της σύνθεσης NO (που παράγεται επίσης από τα κύτταρα του Kupffer), πιθανόν να αναστέλλουν την σύνθεση των πρωτεϊνών στα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος.[188] Το NO που παράγεται από τα κύτταρα του Kupffer μπορεί να αναστέλλει επίσης την σύνθεση των πρωτεϊνών στα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα.[189]

Οι κυτταροκίνες IL-1 και TNF-a προκαλούν την παραγωγή της IL-8 από τα παρεγχυματικά κύτταρα. Η παραγωγή της χημειοτακτικής IL-8, πιθανόν να παίζει ρόλο στην εισροή ουδετερόφιλων και λεμφοκυττάρων κατά την φλεγμονή.[190] Ο TNF-a και ο TGF-β, από μόνοι τους, δρουν σαν χημειοτακτικά και πιθανόν να παρέχουν σήματα στα μονοκύτταρα και στα ουδετερόφιλα που χρειάζονται στο αρχικό στάδιο της ηπατικής βλάβης.[191]

Τα κύτταρα του Kupffer καταστέλλουν τα επίπεδα του κυττοχρώματος P-450 και την σχετική βιομετατροπή των φαρμάκων στα παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα κατά την διάρκεια της φαγοκυττάρωσης ή μετά την χορήγηση της θειικής δεξτράνης. Ο υπεύθυνος παράγων για αυτή την καταστολή του P-450 δεν έχει βρεθεί.[192,193]

Τα κύτταρα φονείς (LAK) που είναι ενεργοποιημένα από τις λεμφοκίνες μπορεί να εισρεύσουν στο ήπαρ με την χορήγηση της IL-2. Αυτά τα LAK

κύτταρα αδρανοποιούνται από τις προσταγλανδίνες που παράγονται από τα κύτταρα του Kupffer. Η PGE_2 και όχι η PGD_2 είναι υπεύθυνη για αυτή την αναστολή.[194]

Η ενεργοποίηση και ο μετασχηματισμός των λιποαποταμιευτικών κυττά-ρων που αποθηκεύουν λίπος στον νεκροφλεγμονώδη ηπατικό ιστό, είναι σημαντικό στοιχείο για την ανάπτυξη της ίνωσης.[195] Οι παράγοντες που προέρχονται από τα κύτταρα του Kupffer έχουν παρακρινική δράση στα αστεροειδή κύτταρα ή κύτταρα Ito. Αυτοί προκαλούν υπερπλασία των κυττάρων αποθήκευσης λίπους και παραγωγή εξωκυττάριου υαλουρονι-κού οξέως, μιας πρωτεογλυκάνης.[196]

Αυτοκρινική δράση

Ο TNF-a έχει μεγάλη αυτοκρινική δράση στα κύτταρα του Kupffer. Διεγείρει την παραγωγή της PGE_2 που,με την σειρά της, αναστέλλει την παραγωγή του TNF-a στα κύτταρα του Kupffer.[197,198] Αυτή η αυτορυθμι-ζόμενη παραγωγική διαδικασία του TNF-a και της PGE_2 από τα κύτταρα του Kupffer, μπορεί να είναι σημαντική κατά τις φλεγμονώδεις εξεργα-σίες, με σκοπό να περιορίσει την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-a [197,198] και IL-1.

Η PGE_2, επίσης, αναστέλλει την παραγωγή της IL-1 και της IL-6, μολονότι αυτή η ρύθμιση είναι ακόμα υπό συζήτηση.[198,199] Ο TNF-a, επίσης, αυξάνει την σύνθεση του DNA των κυττάρων του Kupffer.[200]

Η έκφραση των MHC τάξεως II αντιγόνων από τα κύτταρα του Kupffer που αυξάνει κατά την σήψη, πιθανότατα οφείλεται στόν TNF-a.[201,202] Η παρουσία των MHC II αντιγόνων είναι σημαντική για τα κύτταρα του Kupffer, για να λειτουργήσουν ως αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα σε πολλές φλεγμονώδεις εξεργασίες στον οργανισμό.[203,204]

Η χλωροκίνη τροποποιεί την έκφραση των Ia αντιγόνων στα κύτταρα του Kupffer.[202]

Ο παραγόμενος PAF από τα κύτταρα του Kupffer σε απάντηση διεγέρ-σεως με φορβόλεστέρα, ελαττώνει τον αριθμό των υποδοχέων του PAF στα κύτταρα του Kupffer και προκαλεί παραγωγή των προσταγλανδινών σ’αυτά τα κύτταρα.

Ο ρόλος των κυττάρων του Kupffer στίς διάφορες παθήσεις.

Μεταμόσχευση ήπατος

Η επιτυχία της ορθοτοπικής μεταμόσχευσης ήπατος εξαρτάται μερικώς από την λειτουργία των κυττάρων του Kupffer στο μεταμοσχευμένο ήπαρ. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα βρέθηκαν να σχετίζονται με την ηπατική βλάβη κατά την επαναδιάχυση του ήπατος (lethal reperfusion injury)μετά από ισχαιμική αποθήκευση σε ψύξη.[205,206] Η οξεία και χρόνια ισχαιμική απόρριψη του ήπατος συνοδεύεται απο δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως μπορούμε να διαγνώσουμε από τίς υψηλές τιμές υαλουρονικού οξέως και του αντιγόνου του σχετιζομένου με τον παράγοντα VIII.[207] Η αποθήκευση του μεταμοσχευμένου ήπατος επίσης προκαλεί ενεργοποίηση των κυττάρων του Kupffer,[208] ενώ η καταστολή των κυττάρων του Kupffer με μεθύλπαλμιτικό οξύ αυξάνει τον χρόνο επιβίωσης των ηπατικών μοσχευμάτων[209].

Σηπτικό Shock

Το σηπτικό σύνδρομο προκαλείται,ως επί το πλείστον,από βακτηριακές φλεγμονές και συνοδεύεται από πυρετό και ανεπάρκεια πολλών οργάνων. Τα βακτήρια και τα λιποπολυσακχαριδικά παράγωγα που προέρχονται από τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων των Gram(-) βακτηρίων προκαλούν σηπτικά σύνδρομα. Καθώς περιγράψαμε, τα κύτταρα του Kupffer παίζουν σημαντικό ρόλο στην κάθαρση των LPS[210]. Συγχρόνως, τα κύτταρα του Kupffer παράγουν μεγάλες ποσότητες TNF-a και IL-1και είναι η μεγαλύτερη πηγή για αυτές τις κυτταροκίνες κατά την σήψη.[168] Ειδικά ο TNF-a είναι ικανός να προκαλεί όλο τον καταρράκτη των μεταβολικών αλλαγών που παρατηρούνται κατά την σήψη.[169] Τα κύτταρα του Kupffer μπορεί να παίξουν σπουδαίο ρόλο στην πρόκληση του σηπτικού συνδρόμου. Από την άλλη πλευρά, η αποτοξίνωση των LPS από τα κύτταρα του Kupffer είναι πολύ σημαντική. Η εξασθενημένη λειτουργία των κυττάρων του Kupffer πιθανόν να αυξάνει την ευαισθησία στίς LPS.

Χρειάζονται περισσότερες έρευνες, για να δείξουν εάν η εμπλοκή των κυττάρων του Kupffer στον μεταβολισμό των LPS είναι ωφέλιμη ή βλαπτική.

Χολόσταση

Σε ικτερικούς ασθενείς που υφίστανται χειρουργική επέμβαση υπάρχει συστηματική ενδοτοξιναιμία. Αυτή η παρατήρηση πιθανόν να είναι αποτέλεσμα μιας εξασθενημένης ικανότητας κάθαρσης εκ μέρους των κυττάρων του Kupffer, που οδηγεί στην ενδοτοξιναιμία.[211] Η IL-1 που παράγεται από τα κύτταρα του Kupffer προκαλεί σημαντική καταστολή της ροής της χολής, που πιθανόν οδηγεί σε χολόσταση.[212]

Ηπατική Κίρρωση

Καθώς υπογραμμίσαμε πρίν, τα κύτταρα του Kupffer παίζουν σημαντικό ρόλο στήν κίρρωση με την δράση που εξασκούν στα λιποαποταμιευτικά κύτταρα του Ito. Κατά την προχωρημένη κίρρωση η λειτουργία των κυττάρων του Kupffer είναι εξασθενημένη.[213]

AIDS/ HIV-1

Ένα ευρύ φάσμα βλαβών των ηπατικών κολποειδών αναφέρεται στο σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS). Τα κύτταρα του Kupffer είναι διαπερατά για τον ανθρώπειο ανοσοκατασταλτικό ιό
τύπου 1 (HIV-1).[214,215] Τα κύτταρα του Kupffer εκφράζουν το μόριο CD4 το οποίον συμπεριφέρεται ως υποδοχέας για τον HIV-1. Στίς βιοψίες ήπατος, βρέθηκαν να περιέχουν HIV-1 και πιθανόν να αποτελούν μια αποθήκη για τον HIV-1.[216,217]

Ηπατική μετάσταση

Οι καρκίνοι του παχέως εντέρου, συχνά, δίνουν μετάσταση στο ήπαρ. Τα κύτταρα του Kupffer πιθανόν να παίζουν ρόλο στην πρόληψη της μετάστασης.[218,219] Η καταστολή των κυττάρων του Kupffer από το χλωριούχο

γαδολίνιο ($GaCl_3$) προκαλεί αύξηση του αριθμού των ηπατικών μεταστάσεων, ενώ η ενεργοποίηση των κυττάρων του Kupffer προκαλεί ελάττωση.[220] Πολλές ουσίες, όπως η LPS, το κορυνοβακτηρί-διο parvum, το ζυμοσάν οδηγούν στην ενεργοποίηση αυτών των κυττά-ρων in vivo και in vitro, μετά την οποία τα κύτταρα του Kupffer είναι ικανά να σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα.[220-222] Μαζί με την ενεργοποί-ηση των pit κυττάρων, τα ενεργοποιημένα κύτταρα του Kupffer αποτε-λούν ένα σπουδαίο αμυντικό σύστημα εναντίον των ηπατικών μεταστάσεων.

Ποσοτικοποίηση της λειτουργίας των κυττάρων των κολποειδών in vivo

Καθώς οι λειτουργίες των κυττάρων του Kupffer είναι πολύ σπουδαίες σε διάφορες νόσους, είναι ενδιαφέρον να καταμετρήσουμε τις λειτουργίες τους. Πολλές προσεγγίσεις έχουν περιγραφεί για να ελέγξουν την λειτουργία των κυττάρων του Kupffer in vivo.[223] Τα κολλοειδή, τα οποία προσλαμβάνονται από τα κύτταρα του Kupffer με τον μηχανισμό μεσολάβησης των οψωνινών, έχουν συχνά χρησιμοποι-ηθεί για έλεγχο της λειτουργίας των κυττάρων του Kupffer. Ο κολλο-ειδής χρυσός, τα κολλοειδή λιπίδια, οι σταγόνες πολυστυρίτη, η μικροαθροισμένη (microaggregated) αλβουμίνη έχουν χρησιμοποιηθεί για έλεγχο της ηπατικής φαγοκυττάρωσης.[224-226] Από την ημίσεια ζωή αυτών των ουσιών στο πλάσμα και των προϊόντων αποδόμησης αυτών, μπορεί να υπολογισθεί η ικανότητα αποδόμησης και φαγοκυττάρωσης του ήπατος. Τα ραδιοσεσημασμένα με Cr^{51} ερυθροκύτταρα που καλύπτονται με IgG, IgM ή C3 μπορεί να χρησιμοποιηθούν ομοίως για έλεγχο της φαγοκυτταρικής ικανότητας των κυττάρων του Kupffer δια του Fc υποδοχέα και του υποδοχέα συμπληρώματος αντίστοιχα.[227,228] Μολονότι οι ενώσεις που έχουν περιγραφεί πρίν φαίνεται ότι προσ-λαμβάνονται από τα κύτταρα του Kupffer, πρέπει να έχουμε κατά νου ότι, κάτω από συνθήκες κατά τις οποίες η λειτουργία των κυττάρων του Kupffer έχει ελαττωθεί, τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορούν να συνεισφέρουν αρκετά στην πρόσληψη αυτών των ουσιών και αυτό οφείλεται στην παρουσία υποδοχέων σ’αυτά τα κύτταρα.

Ουσίες που αλληλεπιδρούν με υποδοχείς μοναδικούς στα κύτταρα του Kupffer,όπως οι υποδοχείς φουκτόζης / γαλακτόζης, πιθανόν να ελέγχουν καλύτερα την λειτουργία των κυττάρων του Kupffer.

Η καταστολή των κυττάρων του Kupffer έχει γίνει, επίσης, ένα σπουδαίο εργαλείο, με το οποίο μπορεί να μελετηθεί in vivo ο ρόλος των κυττάρων του Kupffer σε πολλές μεταβολικές διαδικασίες.[229] Πολλά υλικά που φαγοκυτταρώνονται έχουν χρησιμοποιηθεί για να υπερφορτώσουν τα κύτταρα του Kupffer και έτσι, προσωρινά, να αδρανοποιήσουν το σύστημα πρόσληψης των κυττάρων του Kupffer ή να τα σκοτώσουν.

Η θεϊκή δεξτράνη, σωματίδια άνθρακα και σιλικόνης καταστέλλουν την φαγοκυττάρωση από τα κύτταρα του Kupffer.[229-231] Πρόσφατα, το χλωρι-ούχο γαδολίνιο[232] και λιποσώματα που περιέχουν διφωσφο-νικό-διχλωρο-μεθυλαίνιο περιγράφησαν ότι σκοτώνουν τα περισσότερα από τα κύττα-ρα του Kupffer, τα οποία δίνουν δυνατότητα σε μελλοντικές μελέτες για τον ρόλο των κυττάρων του Kupffer σε πολλές μεταβολικές μελέτες. Πρόσφατα, μιά ειδική πρωτεΐνη περιγράφηκε ότι ελέγχει την λειτουργία των κολποειδικών ενδοθηλιακών κυττάρων.[233] Αυτή η πρωτεΐνη, που συνδέεται με τον υποδοχέα του υαλουρονικού οξέως, μπορεί πιθανόν να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της λειτουργίας των ενδοθηλιακών κυττάρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Φαρμακευτική Ηπατοπάθεια

Το ήπαρ κατέχει μιά θέση "κλειδί" στο μεταβολισμό των φαρμάκων. Η λειτουργία του είναι να μετατρέπει τίς λιποδιαλυτές ουσίες σε υδατοδιαλυτές, με σκοπό την απομάκρυνση από την χολή και τα νεφρά. Αυτό γίνεται με την χρήση μιας σειράς από οξειδωτικά ένζυμα,[234] ώς επί το πλείστον του κυτταροχρώματος P-450, που βρίσκεται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων. Η πρώτη αλλαγή που γίνεται από αυτό το ενζυμικό σύστημα είναι να ενώσει μια δραστική ομάδα στο μόριο του φαρμάκου (φάση I) και η δεύτερη είναι η σύνδεση του αντιδραστικού μεταβολίτη με μια ουσία όπως η γλυκουρονίδη ή η γλουταθειόνη. Αυτή η ένωση (φάση II) κάνει το φάρμακο υδατοδιαλυτό και, έτσι, ικανό για αποβολή, λόγω του ότι χάνει την ικανότητά του να επαναρροφάται από τα επιθήλια των νεφρικών σωληναρίων. Τό ίδιο αυτό ενζυματικό σύστημα χρησιμοποιείται για τον μεταβολισμό των στεροειδών, των ορμονών και της χολερυθρίνης. Φάρμακα που απορ-ροφώνται από τον εντερικό σωλήνα μπορούν να αποδραστηριοποιηθούν στο ήπαρ. Σε μερικές περιπτώσεις, όπως π.χ. τα νιτρικά, με την ονομα-ζόμενη "γρήγορη δράση" μπορεί να υπάρξει ολική αποδραστηριοποίηση του φαρμάκου. Όταν υπάρχει πυλαία παράκαμψη ή ηπατική κυτταρική δυσλειτουργία, αυτή η δράση πιθανόν να ελαττωθεί πολύ και τα φάρμακα που χορηγούνται per os πιθανόν να έχουν αυξημένη βιολογική δράση, λόγω του ότι υπάρχουν υψηλά επίπεδα στο αίμα.

Η βλάβη στο ήπαρ από φάρμακα, μπορεί να είναι αναμενόμενη ή μη αναμενόμενη. Η ηπατική βλάβη είναι μια "φυσιολογική συνέπεια" της χορήγησης φαρμάκων και δηλητηρίων. Η σοβαρότητα της βλάβης είναι συχνά σχετική με την δόση και όπου η βλάβη οφείλεται στούς μεταβολί-τες του φαρμάκου, περισσότερο από το ίδιο το φάρμακο, εξαρτάται από τόν ρυθμό μεταβολισμού του φαρμάκου. Σε μια μη αναμενόμενη βλάβη από φάρμακο, η επιβλαβής επίδραση στην κατασκευή του ήπατος και την λειτουργία, φαίνεται μόνο σε λίγους ασθενείς από το σύνολο αυτών που πήραν το φάρμακο. Η αιτία αυτού δεν είναι γνωστή. Τα δύο είδη της αντίδρασης του φαρμάκου είναι το

ίδιο διαφορετικά σε πειραματόζωα. Συχνά, οι αναμενόμενες βλάβες από φάρμακα μπορούν να αναπαραχθούν στα πειραματόζωα, ενώ οι μη αναμενόμενες δεν μπορούν.

Η θνησιμότητα σε ηπατικές φαρμακευτικές βλάβες είναι, συχνά, μεγάλη, ιδιαίτερα αν επέρχεται ηπατική ανεπάρκεια. Η ηπατική κυτταρική ανωμαλία μη αναμενόμενου τύπου, όπως η βαρειά ηπατική αντίδραση στο αλοθάνιο, μπορεί να είναι θανατηφόρος μέχρι και 50%. Μολονότι ένα εγκατεστημένο σύστημα μελέτης στα ζώα και ανθρώπους βεβαιώνει ότι η τοξική δράση των φαρμάκων είναι μικρή, η αντίδραση στον άνθρωπο δεν μπορεί να προβλεφθεί.

Επιπλέον, η διαρκής εισαγωγή ενός μεγάλου αριθμού νέων φαρμάκων σημαίνει ότι η πιθανότητα τοξικότητας των φαρμάκων αυξάνει. Οπωσδήποτε, το πρόβλημα της βλάβης των φαρμάκων θα εξετασθεί με προοπτική. Μερικοί ασθενείς που υποφέρουν από συστηματικές νόσους μπορεί να αναπτύξουν ανωμαλίες ηπατικής λειτουργίας από τα φάρμακα, οι οποίες δεν είναι διαρκείς. Είναι παραδεκτό ότι, στην νοσοκομειακή πρακτική, το 10% των περιστατικών ικτέρου οφείλονται στα φάρμακα, αλλά η εικόνα δεν είναι τόσο καθαρή, λόγω του ότι η αναγνώριση των ηπατοπαθειών από φάρμακα είναι νοσοκομειακή και εξαιρετικά δυσχερής.

Το Συμβούλιο Ασφάλειας της Υγείας της Αγγλίας (ΣΑΥ) έχει δημοσιεύσει ένα κατάλογο αντιδράσεων από φάρμακα, που πάρθηκαν από αναφορές στη λεγόμενη "κίτρινη κάρτα".

Αυτή δείχνει ότι σε τρείς περιόδους, από το 1964-76, 1977-81 και 1982-85 υπήρχαν αντίστοιχα 316, 66 και 95 θάνατοι από φαρμακευτική ηπατοπάθεια, περίπου 13-24 θάνατοι ενηλίκων κάθε χρόνο.

Σε σύγκριση, η συνταγογράφηση για την ινδομεθακίνη στη γενική πρακτική, μόνο στο Ηνωμένο Βασίλειο, είναι περίπου 3,2 x 10^6 κάθε χρόνο και οι θάνατοι από αυτοκινητικά δυστυχήματα 6.000 κάθε χρόνο.

Πίνακας Ι Ηπατοτοξικότητα βάσει του ΣΑΥ

1964-1976			1977-1981			1982-1985		
Σύνολο	Σύνολο ανά έτος	Θάνατοι	Σύνολο	Σύνολο ανά έτος	Θάνατοι	Σύνολο	Σύνολο ανά έτος	Θάνατοι

Ηπατική ανεπάρκεια	9	<1	8	45	9	14	40	10	32
Ηπατική νέκρωση	149	12	125	41	8	29	31	8	15
Φαρμα/κή ηπατίτις	154	12	31	177	35	4	201	50	13
Ηπατοκυτ/κή βλάβη	64	5	10	40	8	1	31	8	2
Ίκτερος	1390	107	141	433	87	12	281	70	18
Ίκτερος-Χολόσταση	101	9	4	34	7	6	139	35	15
Σύνολο	1867		319	770		66	723		95

Μέσα στον ολικό αριθμό των ασθενών με ηπατική βλάβη είναι διαφορετική η συχνότητα της βλάβης από φάρμακο σε φάρμακο. Τα φάρμακα που είναι περισσότερο πιθανά να δημιουργούν θανατηφόρο βλάβη στο ήπαρ φαίνονται στον πίνακα ΙΙ.

Πίνακας ΙΙ: Φάρμακα που προκαλούν θανατηφόρο ηπατοτοξική αντίδραση, όπως αναφέρονται από το ΣΑΥ

Φάρμακο	Αριθμ. Θανάτων	Αριθμ. Αντιδράσεων
Αλοθάνιο	170	409
Χλωροπρομαζίνη	55	321
Βενοξαπροφαίνη	33	106
Φαινελζίνη	22	42
Βαλπροικό Νάτριο	21	82
Μεθυλντόπα	15	186
Ριφαμπικίνη	14	136
Περφαιξυλίνη	14	74
Ιζονιαζίδη	14	84

Ατυχώς, η στατιστική του ΣΑΥ λαμβάνει υπ’οψιν της ό,τι της αναφέρουν οι γιατροί. Η "κίτρινη κάρτα" αναφέρει πληροφορίες και από άλλες πηγές, ιδιαίτερα από περιοδικά˙ έτσι, κάθε ηπατοτοξικότητα "στα νέα", μπορεί να αναφερθεί για λίγο καιρό και μετά να ξεχαστεί. Αυτό συμβαίνει όταν, π.χ., ένας

γιατρός δεν παραδέχεται ότι το αλοθάνιο προκαλεί ηπατοτοξικότητα και αναφέρει άλλους αναισθητικούς παράγοντες.

Είναι σπουδαίο να μπορούμε να αναγνωρίσουμε τον ίκτερο από φάρμα-κα. Σε περιπτώσεις χολόστασης, ο ασθενής μπορεί να υποβληθεί σε έρευνα και χειρουργική επέμβαση με συνέπειες. Σε ασθενείς με ηπατική βλάβη είναι απίθανο να γίνει έρευνα και χειρουργική επέμβαση, παρά μόνο αν υπάρχει διαγνωστική δυσκολία, αλλά η οξεία ηπατοκυτταρική βλάβη έχει κακή πρόγνωση περισσότερο από την ιογενή.

Πρέπει να λάβουμε υπ'οψιν μας ότι δεν είναι σπάνιο ένα φάρμακο να αυξήσει μια προϋπάρχουσα ηπατική βλάβη και να την κάνει χρόνια.

Πολλά φάρμακα αναγνωρίστηκαν ως η αιτία χρόνιας ηπατίτιδας και κίρρωσης σε ευαίσθητο πληθυσμό και υπάρχει, επίσης, μια καθαρή σχέση μεταξύ ορισμένων φαρμάκων και ηπατικής νεοπλασίας.

Ο κατάλογος των φαρμάκων που δημιουργεί ηπατικές και χοληφόρες ανωμαλίες είναι ένας μακρύς πίνακας.

Πίνακας ΙΙΙ. Φάρμακα που δημιουργούν χρόνια ηπατική ανεπάρκεια

Σίγουρη βλάβη	Πιθανή βλάβη
Δανδρολένιο	Ασπιρίνη
Ιζονιαζίδη	Ιπρονιαζίδη
Νιτροφουραντοίνη	Παπαβερίνη
α-Μεθύλ-ντόπα	Προπυλοθειουρακίλη
Οξυφαινισατίνη	
Τιενιλικό οξύ	
Βιταμίνη Α	

Παθολογική Ανατομική

Μολονότι πολλά φάρμακα παρεμβαίνουν στο μεταβολισμό της χολερυθρίνης και παράγουν ίκτερο με πολλούς μηχανισμούς, στην μικροσκοπική εξέταση του ήπατος βρίσκουμε μία ή δύο κατηγορίες παθολογικών αλλαγών: **χολόσταση ή ηπατοκυτταρική βλάβη**.

Οι φαρμακευτικές διαταραχές στο ήπαρ δημιουργούν ένα μεγάλο φάσμα,που κυμαίνεται από καθαρή χολόσταση χωρίς καμμιά κυτταρική εκφύλιση ή φλεγμονή, μέχρι φαρμακευτική ηπατίτιδα, με ή χωρίς χολο-στατικό χαρακτήρα, (που μοιάζει να είναι κοντά στην εικόνα οξείας ιογενούς ηπατίτιδας) και ηπατική νέκρωση, που μπορεί να είναι ζωνική ή ολική. Στην καθαρή χολόσταση που οφείλεται σε φάρμακα όπως το
17,α-υποκατάστατο τεστοστερόνης και νορτεστοστερόνης, οι χαρακτήρες είναι ή χολική κατακράτηση στα ηπατικά κύτταρα και τα κύτταρα του Kupffer.
Η αρχιτεκτονική του ήπατος μένει ανεπηρέαστη και δεν υπάρχει τμήμα της πυλαίας ή των κολποειδών με διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα.
Σε ασθενείς με μικτή εικόνα, όπως αυτές που οφείλονται στην φαινοθειαζίνη, υπάρχει μια συνοδός ηπατίτις που δείχνει φλεγμονώδη διήθηση των πυλαίων διαστημάτων, πολλές φορές με έντονο ηωσινοφιλικό περιεχόμενο. Υπάρχει επίσης ένδειξη ηπατικής βλάβης, με διόγκωση και πολυπύρηνα ηπατοκύτταρα. Παρουσιάζεται, επίσης, έντονη περιφλεβική χολόσταση. Τα κορτικοστεροειδή φάρμακα, που δόθηκαν κατά λάθος ως θεραπεία, πιθανόν να καταστείλουν την φλεγμονώδη διήθηση και να κάνουν την διάγνωση ακόμα πιο δύσκολη.

Σε ασθενείς με ηπατοκυτταρική βλάβη, πιθανόν να είναι πιο έντονη η λιπώδης εκφύλιση (π.χ τετρακυκλίνες) ή η ζωνική ηπατική νέκρωση ή η βλάβη μπορεί να προσομοιάζει με την ιογενή ηπατίτιδα ή να εμφανισθεί ως κοκκίωμα.

Η παρουσία των ηωσινόφιλων και η παρουσία των συνενώσεων των ζωνών της νέκρωσης υποδεικνύουν την φαρμακευτική αιτία, αλλά είναι πολύ δύσκολη η διάκριση από την ιογενή ηπατίτιδα. Σε μερικές περιπτώσεις, η παρουσία εστιών λιπώδους εκφυλίσεως ή ζωνοειδούς κατανομής των βλαβών φαίνεται να είναι ιδιαίτερα χρήσιμα σημεία, για να αποδοθεί η ηπατική βλάβη σ’ ένα φάρμακο.

Τα προβλήματα από το διάχωρισμό της οξείας δράσης των φαρμάκων στο ήπαρ και στο χοληφόρο δένδρο από βλάβες όπως η ιογενής ηπατική νέκρωση, είναι δύσκολα σε ασθενείς με προϋπάρχουσα χρόνια ηπατική βλάβη από φάρμακα. Βλάβες όπως η χρόνια ηπατίτις από φάρμακα, κίρρωση και όγκοι ήπατος, είναι,συνήθως, όμοιες ιστολογικά με ηπατικές βλάβες από άλλες αιτίες.

Μηχανισμοί

Είναι παραδεκτό ότι οι κυριώτεροι μηχανισμοί ηπατοτοξικότητας από φάρμακα δεν έχουν ακόμα ξεκαθαριστεί. Μολονότι μερικά φάρμακα δημιουργούν χολόσταση και άλλα μια εικόνα όμοια με την ηπατίτιδα, μια καθαρή διαφοροποίηση μεταξύ αυτών των δύο μηχανισμών δεν είναι δυνατή. Τα φάρμακα μπορούν να δημιουργούν ηπατικές βλάβες με ένα μείγμα παθολογικών χαρακτήρων, κάνοντας δύσκολη και την διάγνωση και την αιτιολογία. Σήμερα αναγνωρίζεται η σπουδαιότητα της εργασίας του Rappaport στο να αναγνωρίζονται περιοχές με ηπατικά acinus, που είναι σχετικές με την φαρμακευτική βλάβη και που εξηγούν την ζωνοειδή κατανομή της βλάβης . Οι περιπυλαίες, οι μεσοζωνικές και οι περιφλεβικές περιοχές διαφέρουν ως πρός την παροχή σε οξυγόνο και αίμα, καθώς και στην περιεκτικότητα σε μεταβολικά ένζυμα.

Οι αναμενόμενες ηπατοτοξίνες, όπως η παρακεταμόλη, είναι συνδεδεμένες με την περιφλεβική βλάβη, λόγω του ότι η περιοχή αυτή περιέχει μεγάλη ποσότητα μεταβολικών ενζύμων (κυτταρόχρωμα P-450), ενώ υφίσταται και σχετική ανοξία σ’αυτό το τμήμα του acinus. Ένας μικρός αριθμός φαρμάκων, όπως ο θειϊκός σίδηρος και τα φωσφορικά, δημιουργούν περιπυλαία νέκρωση, ενώ σε περίπτωση ιδιοσυγκρασικής βλάβης (μη αναμενόμενης), συνήθως η βλάβη είναι ολική.

Πίνακας IV: Είδος ηπατικής βλάβης που δημιουργούν τα φάρμακα

Ηπατοκυτταρική βλάβη	Αγγειακές Αλλαγές
Νέκρωση	Πορφύρα

Ηπατίτιδα
Λιπώδης εκφύλιση
Μελαγχρωστική
Κοκκίωμα

Ηπατική φλεβική απόφραξη
Διαταραχές ηπατικής αιματικής ροής

Ίνωση

Βλάβη Χοληφόρων

Χολολιθίαση

Χολόσταση

Σκληρυντική Χολαγγειίτις

Χολοστατική Ηπατίτιδα

Όγκοι

Διαταραχές ηπατικού μεταβολισμού

Καλοήθεις
Κακοήθεις

Χολόσταση

Αρχικώς, επιστεύετο ότι η εξαφάνιση των λαχνών στα μικρά ενδοηπατικά χοληφόρα τριχοειδή, ήταν η αιτία της χολοστατικής ηπατικής βλάβης.Τώρα, είναι γνωστό ότι πολλές από αυτές τις αλλοιώσεις, ιδιαίτερα αυτές στις μικρολάχνες, είναι το αποτέλεσμα παρά η αιτία της χολοστάσεως. Οι Schaffner και Popper έκαναν μια ενδιαφέρουσα υπόθεση, για να εξηγήσουν τους βιοχημικούς και ιστολογικούς χαρακτήρες της χολόστασης από φάρμακα.[235] Υπέθεσαν ότι η θέση της βλάβης είναι στα ηπατικά κύτταρα, στο λείο ενδοπλασμα-τικό δίκτυο, παρά στα χοληφόρα αυτά καθ'εαυτά. Εδώ, η βλάβη ήταν μια ποιοτική και ποσοτική ανεπάρκεια στην έκκριση των χολικών αλάτων στην χολή. Αυτό δημιουργεί μια ανεπάρκεια της χολικής ροής, με ένα δευτερεύοντα χολικό θρόμβο και αλλοίωση στις μικρολάχνες. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μπορούμε να δούμε βλάβη στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο και στους ανθρώπους με χολόσταση αλλά και πειραματικά. Το ΛΕΔ είναι υπερτροφικό, αλλά λειτουργεί αφύσικα, ειδικά σε σχέση με τα φάρμακα και τον μεταβολισμό των χολικών αλάτων. Η έννοια του υπερτροφικού αλλά υπολειτουργούντος ΛΕΔ σαν αιτία χολόστασης, με το φάρμακο να είναι υπεύθυνο για την βλάβη του ΛΕΔ και την χολόσταση να είναι αποτέλεσμα της εμποδιζόμενης χολικής ροής, είναι πολύ ελκυστική. Αν και μια υπόθεση δεν μπορεί να εξηγήσει όλες τις αιτίες χολόστασης, αυτό είναι αληθές στα φάρμακα που δημιουργούν καθαρή χολόσταση. Υπάρχει στενός συνδετικός

κρίκος μεταξύ της χολόστασης μερικών στεροειδών φαρμάκων και αυτής που φαίνεται καμιά φορά στην εγκυμοσύνη. Φαίνεται να υπάρχει άμεση παρεμβολή στην ροή των χολικών αλάτων. Φάρμακα όπως τα οιστρογό-να, είναι γνωστό ότι επηρεάζουν αυτό το τμήμα της χολικής έκκρισης.

Περισσότερες εργασίες στην πρόσληψη, μεταφορά και έκκριση των χολικών αλάτων στα χοληφόρα τριχοειδή και στην δομή των οργανιδίων σε αυτό το τμήμα των ηπατοκυττάρων, ερμηνεύουν την δράση άλλων φαρμάκων για την παραγωγή της χολόστασης.[236,237] Καθώς η χολική ροή συνδέεται με την έκκριση των χολικών αλάτων, κάθε παρεμβολή στην πρόσληψη και μεταφορά στα και από τα ηπατοκύτταρα μπορεί να είναι βασική αιτία χολόστασης. Έτσι, η δράση φαρμάκων φαίνεται να παρεμβαίνει στην αντλία Να / Κ-ΑΤΡ, που ευθύνεται για την πρόσληψη των χολικών αλάτων στα ηπατοκύτταρα ή στην ενδοκυτταρική μετα-φορά των χολικών αλάτων. Ο κυτταροσκελετός γύρω από τα χολικά τριχοειδή μετέχει στην κίνηση της χολής πρός τα τριχοειδή. Φάρμακα όπως η κυτταροχαλασίνη, βλάπτουν την λειτουργία του και δημιουργούν χολόσταση. Ομοίως, άλλα φάρμακα παρεμβάλλονται στην ακεραιότητα των στερεών δεσμών (tight junctions) και επιτρέπουν την παλινδρόμηση των χολικών αλάτων προς τα κολποειδή. Μια άλλη σπουδαία δράση φαρ-μάκων μπορεί να είναι η άμεση, τοξική δράση του φαρμάκου ή ενός των μεταβολιτών του στα μεταφορικά συστήματα, στις μεμβράνες των ηπατι-κών κυττάρων. Αυτή μπορεί να εκδηλωθεί στις μεμβράνες των χοληφό-ρων τριχοειδών, όπου μεγάλες συγκεντρώσεις φαρμάκων και των μετα-βολιτών τους μπορούν να αναστείλουν την μεταφορά των χοληκών αλά-των. Αυτό έχει αποδειχθεί στην χλωροπρομαζίνη, στα πειραματόζωα.

Ηπατοκυτταρική δυσλειτουργία

Ο ακριβής τρόπος με τον οποίο τα φάρμακα και οι τοξίνες δημιουργούν ηπατοκυτταρική βλάβη είναι άγνωστος. Έχει υποτεθεί γενικώς ότι, όσον αφορά την ηπατική δυσλειτουργία από φάρμακα, υπάρχει κάποια ιδιοσυγκρασία ή, καμιά φορά, ανοσολογική ή βιοχημική αιτία. Η επίδραση της υποπρωτεϊναιμίας προσφέρει πρόσθετες πληροφορίες για τον τρόπο δράσης.

Οι Mc Lean και Mc Lean[237] δημιούργησε ηπατοτοξικότητα στους ποντικούς με τετραχλωριούχο άνθρακα (CCl_4) και βρήκε ότι η ελάττωση των πρωτεϊνών δημιουργεί προστασία από την ηπατική βλάβη και ότι η φαινοβαρβιτάλη και άλλα φάρμακα που δημιουργούν επαγωγή ενζύμων αυξάνουν την ηπατοτοξικότητα. Φαίνεται από αυτή και άλλες μελέτες ότι οι μεταβολίτες των φαρμάκων ενέχονται στην ηπατοτοξικότητα περισσότερο από το ίδιο το φάρμακο.

Η διαφοροποίηση του μεταβολισμού των φαρμάκων, που εξαρτάται από την ελάττωση των πρωτεϊνών και την επαγωγή των ενζύμων που, ανάλογα, ελαττώνουν ή αυξάνουν τα ένζυμα του μεταβολισμού των φαρμάκων, έχει μεγάλη επίδραση στο βαθμό της δημιουργούμενης ηπατοτοξικότητας.

Οι τοξικοί μεταβολίτες φαρμάκων είναι υπεύθυνοι, ως ενδιάμεσοι παράγοντες, για την ηπατική βλάβη. Μερικοί μεταβολίτες φαίνονται να είναι πολύ αντιδραστικοί και, άν δεν καθαρθούν από το ήπαρ με σύνδεση, ενώνονται ομοιοπολικά με οργανίδια του κυττάρου και δημιουργούν ηπατική βλάβη και νέκρωση. Είναι γνωστό ότι υπάρχουν δύο μεγάλες τάξεις τοξικών μεταβολιτών, οι ηλεκτρόφιλοι και οι ελεύθερες ρίζες των φαρμάκων. Οι ηλεκρόφιλοι μεταβολίτες αναζητούν ηλεκτρόνια και δημιουργούν ενώσεις ηλεκτρονίων με τους δωρητές ηλεκτρονίων. Οι ηλεκτρόφιλοι μεταβολίτες διαφοροποιούνται στην αντίδρασή τους και επιτίθενται εναντίον διαφόρων ομάδων, όπως π.χ., η απώλεια θειολικών ομάδων, μετά από μείωση της γλουταθειόνης, είναι η αιτία της ηπατοτο-ξικότητας της παρακεταμόλης.

Άλλοι βιοχημικοί μηχανισμοί πιθανόν να είναι υπεύθυνοι για την ηπατοτοξικότητα. Η παραγωγή υπεροξειδίων σε βιολογικούς ιστούς, η αδυναμία απομάκρυνσης τους από τα προστατευτικά ένζυμα, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, έχει σαν αποτέλεσμα την βλάβη των λιπιδικών τμημάτων των κυττάρων[238]. Ανεπανόρθωτη βλάβη δημιουργείται, όταν υπάρχει ισχαιμία. Η λιπιδική υπεροξείδωση παρουσιάστηκε σε ασθενείς που πήραν αλοθάνιο αλλά όχι σε άλλους τύπους αναισθησίας.[239] Άλλα φάρμακα και τοξίνες δρουν όμοια. Τελευταίως, έχει αναγνωρισθεί κυτταρικός θάνατος που πιθανόν να οφείλεται σε ενδοκυτταρική συγκέντρωση του ασβεστίου.[240] Η

απώλεια των θειομάδων δημιουργεί απώλεια του ασβεστίου στίς κυτταρικές μεμβράνες, που έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη ροή ή την ελάττωση της αντλίας του ασβεστίου. Αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου προκαλεί δραστηριοποίηση της διάσπασης των ενζύμων στο κύτταρο και παρεμβαίνει στην μιτοχονδριακή λειτουργία. Ο μεταβολισμός των φαρμάκων επηρεάζεται από παράγοντες όπως η διατροφή και η επαγωγή ενζύμων. Γενετικοί παράγοντες του ενζυμικού κυτταροχρώματος
P-450 έχουν επίσης μεγάλη σημασία. Η ακετυλίωση και πολλές άλλες μεταβολικές διεργασίες είναι γνωστό ότι επηρεάζονται από γενετικές καταστάσεις. Αύξηση στην συχνότητα της ακετυλίωσης των φαρμάκων επιτρέπει γρήγορη παραγωγή των ακετυλιωμένων παραγώγων στο ήπαρ. Αν αυτά ενωθούν ομοιοπολικά με άλλες ουσίες που χορηγούνται συγχρόνως (π.χ. ιζονιαζίδη και αναστολείς των ΜΑΟ), η ηπατοτοξικότητα είναι πλέον ένα σοβαρό πρόβλημα, ιδιαίτερα αν χορηγούνται συγχρόνως και επαγωγείς ενζύμων (αιθανόλη). Ίσως αυτή να είναι μια εξήγηση για τον μεγάλο αριθμό νέγρων και κιτρίνων που υποφέρουν από ηπατίτιδα και ηπατική νέκρωση, όταν πάρουν ιζονιαζίδη, καθώς η ακετυλίωση σ'αυτά τα άτομα είναι ταχύτερη σε σχέση με τους καυκάσιους.[241] Ο γενετικός πολυμορφισμός στο μεταβολισμό των φαρμάκων παρουσιάστηκε πρώτα για το φάρμακο ντεμπριζοκίνη. Εδώ, οι γενετικές διαφορές στην λειτουργία του ενζυμικού μεταβολισμού βοηθούν ώστε να αλλάξει η φαρμακοκινητική και η τοξικότητα πολλών ουσιών. Βλαπτικός μεταβολισμός μπορεί να παρουσιαστεί σε φυσιολο-γικές δόσεις και σε υγιή άτομα, ενώ υπάρχει και οικογενειακή κληρονο-μικότητα.

Οι τρείς (3) πιο κοινοί τύποι του γενετικού πολυμορφισμού είναι:

α) ανωμαλίες της C- οξείδωσης (ντεμπριζοκίνη, μεφεντοίνη),

β) αφυδρογόνωση (αιθανόλη, ακεταλδεΰδη) και

γ) ακετυλίωση (ισονιαζίδη, σαλαζοπυρίνη, καφεΐνη).

Ο πολυμορφισμός της ντεμπριζοκίνης επηρεάζει 5-10% των καυκάσιων και δημιουργεί βλαπτική οξείδωση 20 φαρμάκων,μεταξύ των οποίων είναι οι β-αναστολείς,τα οπιοειδή και η περχεξιλίνη. Είναι ένα έντονο πρόβλημα αυτές οι

διαφορές στο μεταβολισμό του φαρμάκου για την δημιουργία ηπατοτοξικότητας.

Ανοσολογικοί παράγοντες

Σπουδαίοι παράγοντες για την παθογένεση της χολόστασης και της ηπατοτοξικής βλάβης είναι οι ανοσολογικοί παράγοντες. Ένα φάρμακο ή ένας μεταβολίτης, λειτουργώντας σαν αντιγόνο, μπορεί να δημιουργήσει μια βλαπτική ανοσολογική επίθεση εναντίον του ηπατοκυττάρου. Το φάρμακο ή ο μεταβολίτης μπορεί να ενωθεί με τα συστατικά της ηπατοκυτταρικής μεμβράνης, να δημιουργήσει ένα δραστικό αντιγονικό σύμπλεγμα, εναντίον του οποίου θα προκληθεί μια ανοσολογική επίθεση. Έχει αποδειχθεί ότι μερικά ηπατοτοξικά φάρμα-κα, όπως το αλοθάνιο, η μεθυλντόπα, το τιενιλικό οξύ, επιδρούν στις μεμβράνες των κυττάρων, τις αλλοιώνουν και, με την σειρά τους, οι ασθενείς αναπτύσσουν αντισώματα εναντίον των κυτταρικών μεμβρανών.[242]

Εάν η σύνδεση του φαρμάκου γίνεται στις μεμβράνες των χοληφόρων τριχοειδών, η ανοσολογική επίθεση προκαλεί μια χολοστατική εικόνα, ενώ η επίθεση σε άλλο μέρος της ηπατοκυτταρικής μεμβράνης χαρακτηρίζει μια κλινική εικόνα με χαρακτήρες ηπατοκυτταρικής βλάβης. Γενετικοί παράγοντες καθορίζουν ποια άτομα είναι ευαίσθητα στην ανοσολογική αντίδραση αυτού του τύπου. Όταν μια ανοσολογική αντίδραση αρχικά κατευθύνεται εναντίον συμπλέγματος πρωτεϊνών, φαρμάκων ή εναντίον μεταβολίτου συνδεδεμένου στην ηπατοκυτταρική μεμβράνη, αυτός ο μηχανισμός μπορεί να διευρυνθεί, εάν άλλα ενδοκυττάρια πρωτεϊνικά συμπλέγματα δράσουν δευτερογενώς ως νέα αντιγονικά ερεθίσματα.

Φάρμακα και τοξίνες που δημιουργούν ηπατική βλάβη

Οι ακόλουθες αμάδες φαρμάκων μπορούν να δημιουργήσουν ηπατική βλάβη, αν και καμιά φορά η ηπατοτοξικότητα έχει να κάνει λίγο με τις χημικές ιδιότητες ή φαρμακολογικές δραστηριότητες του κάθε φαρμάκου χωριστά.[243-247]

<u>Φάρμακα και Τοξίνες που δημιουργούν ηπατική βλάβη</u>

1. Αντιφυματικά

2. Στεροειδή και αντισυλληπτικά
3. Ψυχοτρόπα
4. Αντιβιοτικά και χημειοθεραπευτικά
5. Αναλγητικά και αντιφλεγμονώδη
6. Αναισθητικά και αντισπαστικά
7. Κυτταροτοξικά και ανοσοκατασταλτικά
8. Καρδιολογικά
9. Αντιδιαβητικά και φάρμακα ενδοκρινικών και μεταβολικών ανωμαλιών
10. Βιομηχανικές ουσίες και τοξίνες
11. Άλλα φάρμακα και θεραπευτικές ουσίες

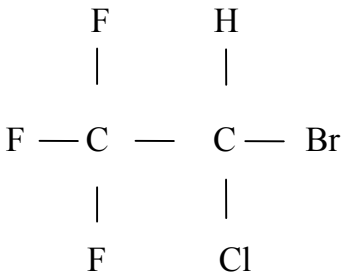
Πρακτικά, όλα τα κυκλοφορούντα φάρμακα μπορούν να προκαλέσουν ηπατοκυτταρική ή χολοστατική βλάβη. Οι διαφορές τους είναι μόνο ποσοτικές, δηλ. διαφορές συχνότητας προσβολής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Αλοθάνιο: Φαρμακοδυναμική και Φαρμακοκινητική

Γενικές Ιδιότητες

Το αλοθάνιο είναι 2,βρώμο-2,χλώρο-1,1,1,τριφθόριο-αιθάνιο, ένας αλογονομένος υδρογονάνθρακας. Ο μοριακός του τύπος είναι $CF_3CHClBr$ και ο συντακτικός τύπος είναι:



Το αλοθάνιο συνετέθη στα εργαστήρια της Imperial Chemical Industries (ICI) στο Manchester από τον C.W.Suckling το 1951 και μελετήθηκε φαρμακολογικώς από τον J.Raventos.[248] Στην κλινική αναισθησιολογία χρησιμοποιήθηκε από τον M.Johnstone και, μετά, από τον Bryce-Smith στήν Οξφόρδη το 1956.

Φυσικές Ιδιότητες του αλοθανίου

Το αλοθάνιο είναι υγρόν άχρουν, με χαρακτηριστική ευχάριστη και μη ερεθιστική οσμή. Τό μείγμα του αλοθανίου με το οξυγόνο δεν είναι εύφλεκτο ή εκρηκτικό σε καμία αναλογία. Με την επίδραση ελεύθερης φλόγας διασπάται και απελευθερώνει βρώμιο (Br).

Το αλοθάνιο μπορεί να αναμειχθεί με αφυδατωμένη αλκοόλη, χλωροφόρμιο, αιθέρα και με αιθέρια έλαια. Όταν αναμειγνύεται το αλοθάνιο με τον αιθέρα σε αναλογία 2:1 όγκους, τότε δημιουργείται ένα αζεοτρωπικό μείγμα.

Στον πίνακα V φαίνονται τα φυσικά χαρακτηριστικά του αλοθανίου.

Η διαλυτότητα ενός αναισθητικού στον αέρα, αίμα και ιστούς, μετράται ως συντελεστής κατανομής. Συντελεστής κατανομής είναι ο λόγος της συγκέντρωσης του αναισθητικού στίς δύο φάσεις σε ισορροπία.

Η διαλυτότητα ενός αναισθητικού χορηγούμενου με εισπνοή, επηρεάζε-ται από διάφορους παράγοντες. Ετσι, την διαλυτότητα αυξάνουν η υπερ-λιπαιμία, η στέρηση τροφής και ο αλκοολισμός, ενώ την ελαττώνουν η υπολευκωματιναιμία και η αυξημένη ωσμοτικότητα.

Πίνακας V: Φυσικά Χαρακτηριστικά Αλοθανίου

Όψις	καθαρό, άχρωμο
Οσμή	γλυκιά, ευχάριστη
Μ.Β	197,39
Σημείο Ζέσεως	50,3° C
Πίεση κεκορεσμένων ατμών	243 mmHg σε 20° C
ΕΒ	1,87 g ανα mol σε 20° C
Γλοιότης	0,353 cP(centipoises) σε 20° C
Δείκτης διάθλασης στο υγρό	1,3695 εως 1,3705 σε 20° C
MAC	0,75 %
Διαλυτότητα στο νερό	0,345% w/v σε 20° C
Διαλυτότητα στο αίμα	0,16% w/v σε 37° C
Οι συντελεστές κατανομής του Ostwald σε 37° C είναι οι παρακάτω	
Νερού / Αερίου	0,8
Ελαίου / Ύδατος	220
Αίματος / Αερίου	2,5
Ελαίου / Ύδατος	220
Λίπους / Αίματος	60
Εγκεφάλου / Αίματος	2,6
Μυών / Αίματος	3,5

Σταθερότητα

Η χημική σταθερότητα του αλοθανίου οφείλεται στην παρουσία ατόμων φθορίου στον πρώτο άνθρακα, το οποίο σταθεροποιεί τά άτομα χλωρίου και βρωμίου στον δεύτερο άνθρακα. Αποσυντίθεται από το φώς και σταθεροποιείται,αν προσθέσουμε 0,01% w/w θυμόλης. Παραμένει όμως

σταθερό, αν φυλάσσεται σε σκοτεινές φιάλες. Κατά την χρήση του μπορεί να αναπτύξει ένα καφέ-κίτρινο χρώμα, το οποίο οφείλεται στη θυμόλη ή σε χρώμα από τα λάστιχα του αναισθησιολογικού μηχανήματος. Γιά να αποφευχθεί αυτό, πρέπει να αφαιρείται το αλο-θάνιο απο τον εξαερωτή μετά την χρήση ή ξεπλένοντάς τον κατά καιρούς με ένα πτητικό οργανικό διαλύτη και μετά στεγνώνοντας με ατμό από αναισθητικά αέρια.

Αντίδραση με τη νατράσβεστο

Μπορεί άφοβα να χρησιμοποιηθεί με την νατράσβεστο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κλειστό κύκλωμα, για όση ώρα αναισθησίας θέλουμε.

Μέταλλα

Παρουσία υγρασίας προσβάλλει τον ψευδάργυρο, τον ορείχαλκο και το αλουμίνιο των εξατμιστήρων και του κυκλώματος των αναισθητικών συσκευών. Το ξηρό αλοθάνιο δεν έχει αυτή την ιδιότητα και στην κλινική πράξη δεν έχουν αναφερθεί ζημιές, παρά μόνο στα μεταλλικά κουτιά αποθήκευσης.

Πλαστικό και καουτσούκ

Το αλοθάνιο μπορεί να δημιουργήσει χαλάρωση μερικών πλαστικών και πλαστικοποιημένων με P.V.C. σωλήνων μετά από πολύχρονη χρήση. Όμως, στην κλινική πράξη δεν έχει αναφερθεί κάποια ιδιαίτερη καταστροφή. Το αλοθάνιο, υγρό ή ξηρό, δεν έχει καμιά επίδραση στην μελανίνη, την φορμαλδεύη, την πολυθένη, το νάυλον και στίς ίνες από κυτταρίνη.

Φαρμακοκινητική του Αλοθανίου

Η γενική αναισθησία με πτητικά αναισθητικά επιτυγχάνεται, όταν η μερική πίεση του φαρμάκου στο ΚΝΣ (που υποθέτουμε ότι είναι η ίδια με αυτή των κυψελίδων) είναι ικανή να δημιουργήσει αναισθησία. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωση αυτή στον εγκέφαλο ταξινομούνται παρακάτω:

1. Παράγοντες που επηρεάζουν την εισπνευστική συγκέντρωση (FI):
   - α. Ροή φρέσκων αερίων
   - β. Διαλυτότητα του φαρμάκου στο καουτσούκ
   - γ. Όγκος του αναπνευστικού κυκλώματος

2. Παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωση του πτητικού στις κυψελίδες (FA):

α. Πρόσληψη των πτητικών αναισθητικών

β. Κυψελιδικός Αερισμός

γ. Φαινόμενο της συγκέντρωσης και το φαινόμενο του δευτέρου αερίου

3. Παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωση του πτητικού στο αρτηριακό αίμα (Fa):

α. Διαταραχές αερισμού αιμάτωσης.

1. Το κύκλωμα του αναισθησιολογικού μηχανήματος μπορεί να επηρεάσει την πρόσληψη του πτητικού. Αν το κύκλωμα έχει μεγάλο όγκο και χωρητικότητα, η ισορροπία είναι αργή. Αν το αναισθητικό είναι διαλυτό στο καουτσούκ, όπως το αλοθάνιο, η εισπνευστική συγκέντρωση καθυστερεί και η εισαγωγή είναι αργή. Μεγάλη σημασία έχει και η ροή των φρέσκων αερίων. Οσο μεγαλύτερη ροή αερίων έχου-με, τόσο γρηγορότερα θα έχουμε ισορροπία μεταξύ εξαερωτού και FI.

2. Οσον αφορά τούς παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωση του πτητικού στις κυψελίδες, ο αερισμός αυξάνει την κυψελιδική συγκέντρωση του αναισθητικού, ενώ η πρόσληψη ελαττώνει την συγκέντρωση στίς κυψελίδες, γιατί το μετεφέρει στό αίμα. Όσο μεγαλύτερος ο αερισμός, τόσο ταχύτερη είναι η εξισορρόπηση μεταξύ κυψελίδας και αίματος.

Οι παράγοντες που ορίζουν την πρόσληψη του φαρμάκου από το αίμα είναι:

1. Η διαλυτότης του φαρμάκου **λ**
2. Η καρδιακή Παροχή **Q**
3. Η διαφορά μερικής τάσης αερίου μεταξύ κυψελίδων και αίματος **(Pa-Pv)**

$$\mathbf{C = \lambda\, Q\, [Pa - Pv]/BP}$$

‘Οσο πιό μεγάλη η διαλυτότητα του πτητικού αναισθητικού στό αίμα, τόσο μεγαλύτερη η πρόσληψη, άρα πιο αργά επιτυγχάνεται η απαραίτητη κυψελιδική συγκέντρωση και η αναισθησία. Αντίθετα, τα πτητικά αναισθητικά με μικρή

διαλυτότητα κάνουν γρήγορη εισαγωγή στην αναισθησία. Το αλοθάνιο έχει διαλυτότητα 2,3, δηλαδή σχετικά μικρή και γι αυτό η εισαγωγή στην αναισθησία είναι σχετικά γρήγορη.

Αλλος παράγων που επηρεάζει την FA είναι η διαφορά μερικής τάσης μεταξύ κυψελίδας και φλεβικού αίματος. Αυτή εξαρτάται από την πρόσληψη από τούς ιστούς.

Η μεταφορά αυτή με την σειρά της εξαρτάται από τρεις παράγοντες:

α. Διαλυτότητα του πτητικού στους ιστούς

β. Αιματική ροή στους ιστούς

γ. Διαφορά μερικής τάσης μεταξύ αίματος και ιστού

Οι ιστοί μπορούν να χωριστούν σε *τέσσερεις ομάδες* βάσει της διαλυτότητας και της αιμάτωσης. Η *πρώτη ομάδα*, πλούσια σε αιμάτωση (εγκέφαλος, καρδιά, ήπαρ, νεφρά, ενδοκρινείς αδένες) παίρνει το μεγαλύτερο μέρος τού πτητικού, όμως το γεγονός ότι έχει μικρό όγκο, την κάνει να κορεστεί πρώτη .

Η δεύτερη ομάδα, με μικρή αιμάτωση, (δέρμα και μύες), λόγω του μεγάλου όγκου, έχει μεγάλη χωρητικότητα και η πρόσληψη μπορεί να γίνεται για ώρες.

Η *τρίτη ομάδα*, το λίπος, έχει τεράστια διαλυτότητα και χωρητικότητα και μπορεί να πάρει ημέρες για να κορεστεί. Η *τελευταία ομάδα*, από ιστούς με χαμηλή αιμάτωση (οστά, σύνδεσμοι, δόντια, μαλλιά και χόνδροι), έχει ελαχίστη πρόσληψη. [249]

Η αύξηση της καρδιακής παροχής προκαλεί γρήγορη πρόσληψη του αερίου από τις κυψελίδες, με αποτέλεσμα την αργή εισαγωγή στην αναισθησία. Αντίθετα, στό shock μπορεί να έχουμε γρήγορη εισαγωγή στην αναισθησία ή υπερδοσολογία στα αέρια με μεγάλη διαλυτότητα. Η διαφορά μερικής τάσης μεταξύ κυψελίδων και αίματος είναι μεγάλη στην εισαγωγή και μετά ισορροπεί.[250]

Η συγκέντρωση του αερίου στην εισπνοή, επιδρά στην ταχύτητα αύξησης της κυψελιδικής συγκέντρωσης του αερίου. Μια μεγάλη εισπνευστική συγκέντρωση (FI) επιταχύνει την αύξηση συγκέντρωσης αερίου στίς κυψελίδες (Φαινόμενο συγκέντρωσης).

Επίσης, σημαντικό ρόλο στην αύξηση του FA παίζει το φαινόμενο του δευτέρου αερίου.[251] Το φαινόμενο του δευτέρου αερίου είναι το φαινόμενο κατά το οποίο, εάν στην εισαγωγή στην αναισθησία χρησιμοποιούνται δύο αέρια με διαφορετικό δείκτη διαλυτότητας στο αίμα, π.χ. αλοθάνιο και N_2O, τότε, μετά τις πρώτες εισπνοές, καθώς το πρωτοξείδιο (το αέριο με μεγαλύτερη διαλυτότητα στο αίμα) απορροφάται από την κυκλοφορία, τον χώρο στίς κυψελίδες κατα-λαμβάνει το δεύτερο αέριο (με μικρότερη διαλυτότητα) - στην περίπτω-σή μας το αλοθάνιο -, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση του αλοθανίου στις κυψελίδες να αυξάνει και η εισαγωγή στην αναισθησία να είναι πιο γρήγορη.

Οι αλλαγές στον αερισμό (MV) έχουν μικρή δράση στη συγκέντρωση αερίου στο αίμα στα πτητικά αναισθητικά με μικρή διαλυτότητα, αλλά έχουν μεγάλη δράση στα πτητικά με μεγάλη διαλυτότητα. Διπλασιάζοντας τον αερισμό, διπλασιάζεται η κυψελιδική συγκέντρωση του πτητικού αναισθητικού.

3. Παράγων που επηρεάζει την απορρόφηση του αερίου και την Fa είναι η διαταραχή στη σχέση αερισμού - αιμάτωσης του πνεύμονα. Ο παράγων αυτός είναι αντιστρόφως ανάλογος από την διαλυτότητα.

Στην αναισθησία ενός πνεύμονα, διπλασιάζοντας τον αερισμό, διπλα-σιάζεται η μερική κυψελιδική τάση σε πτητικό αναισθητικό με μεγάλη διαλυτότητα. Αυτό δεν ισχύει γιά τα πτητικά αναισθητικά με μικρή διαλυτότητα.

Φαρμακοδυναμική του αλοθανίου

Δράση στο καρδιαγγειακό

Το αλοθάνιο καταστέλλει την συσταλτικότητα του μυοκαρδίου, παρεμβαίνοντας σε πολλές ενδοκυττάριες φάσεις, που σχετίζοναι με την ομοιόσταση του ασβεστίου και την συστολή. Έτσι, μπορεί να προκαλέσει:

α) Μείωση της εισροής Ca^{++} διά μέσου των διαύλων του σαρκειλήματος κατά την εκπόλωσή του, είτε γιατί καταστέλλει την λειτουργία τους είτε γιατί μειώνει τον αριθμό των ανοικτών διαύλων Ca^{++}.

β) Μείωση της ικανότητας αποθήκευσης στό σαρκοπλασματικό ενδοθήλιο, είτε

λόγω της ελαττωμένης εισροής Ca^{++} είτε λόγω μιας αρχικής παροδικής διαρροής Ca^{++} από το σαρκοπλασματικό ενδοθήλιο.
γ) Μείωση της απελευθέρωσης Ca^{++} από το σαρκοπλασμικό ενδοθήλιο, διαδικασία που πυροδοτείται από την επαρκή συγκέντρωσή του σ' αυτό.
δ) Μείωση της ευαισθησίας των πρωτεϊνών συστολής έναντι του Ca^{++}, απαραίτητου για την ενεργοποίησή τους και την ακολουθούσα συστολή. Ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο το αλοθάνιο μειώνει την συστολή, φαίνεται να είναι η μειωμένη συγκέντρωση Ca^{++} στο σαρκοπλασματικό ενδοθήλιο.[252-260]
Δύο (2) MAC αλοθανίου ελαττώνουν κατά 50% την αρτηριακή πίεση και την καρδιακή παροχή. Η ελάττωση αυτή οφείλεται σε απευθείας καταστολή του μυοκαρδίου[261-268] ή σε γαγγλιοπληγική δράση του[269] ή σε διαταραχή του συμπαθητικού και παρασυμπαθητικού τόνου της καρδιάς και σε διαταραχή του καρδιοκινητικού κέντρου του εγκεφάλου.[270] Καθώς το αλοθάνιο είναι διασταλτικό των στεφανιαίων αγγείων, η ροή στα στεφανιαία αγγεία ελαττώνεται ανάλογα με την πτώ-ση της συστηματικής πίεσης[271-279] Ομως, συγχρόνως, έχουμε ελάττωση των αναγκών στο μυοκάρδιο και γι' αυτό η παροχή οξυγόνου είναι αρκετή.[280-282] Το αλοθάνιο δεν επηρεάζει τις συστηματικές αγγειακές αντιστάσεις συνολικά.[282-285] Το αλοθάνιο αναστέλλει το μηχανισμό μέσω του οποίου, δι'ερεθισμού των τασεοϋποδοχέων στο αορτικό τόξο και του διχασμού της καρωτίδος σε περίπτωση υπότασης, εκδηλώνεται ταχυκαρδία.
Ελαττώνοντας την κολπική αγωγιμότητα, μπορεί να δώσει κομβικό ρυθμό ή βραδυκαρδία. Το αλοθάνιο ευαισθητοποιεί το μυοκάρδιο στην αδρεναλίνη και για αυτό πρέπει να την αποφεύγουμε σε δόσεις μεγαλύτερες του 1,5 mg/Kg.

Δράση στο αναπνευστικό σύστημα

Οι κυριότερες επιδράσεις των εισπνεομένων αναισθητικών στο αναπνευστικό αφορούν:
α) την ρύθμιση της αναπνοής
β) την δράση στούς αεραγωγούς (ανώτερους και κατώτερους)
γ) την πνευμονική κυκλοφορία

α) Όσον αφορά την ρύθμιση της αναπνοής, η μερική τάση του CO_2 στο αρτηριακό αίμα αποτελεί τον πιό ευαίσθητο δείκτη της αναπνευστικής επίδρασης των εισπνεομένων αναισθητικών. Το αλοθάνιο προκαλεί γρή-γορη, επιπόλαιη αναπνοή. Η αύξηση της αναπνευστικής συχνότητας δεν είναι ικανή να αυξήσει τον αναπνεόμενο όγκο και, έτσι, ο κατά λεπτόν αναπνεόμενος όγκος ελαττώνεται και το PCO_2 αυξάνει. Ο απνοϊκός ουδός, δηλαδή η υψηλότερη τιμή του Pa_{CO_2} στον οποίο ο ασθενής γίνεται απνοϊκός, επίσης αυξάνει, λόγω του ότι η διαφορά μεταξύ αυτού και του υπολοιπόμενου Pa_{CO_2} δεν αλλοιώνεται με τη γενική αναισθησία.
Όμως, οι περιφερικοί χημειοϋποδοχείς καταστέλλονται ακόμα και από μικρές συγκεντρώσεις αλοθανίου, μερικώς ή ολικώς, με αποτέλεσμα το προστατευτικό αυτό αντανακλαστικό να μην μπορεί να λειτουργήσει σε περίπτωση υποξαιμίας.[286,289]

Οι μηχανισμοί δράσης του αλοθανίου στο αναπνευστικό είναι διπλοί:
Α)Κεντρική (Καταστολή του προμήκη)[290]
Β) Περιφερική (Δυσλειτουργία των μεσοπλευρίων μυών). [291,292]
Ο όγκος του θωρακικού κλωβού δεν επηρεάζεται πολύ από την αναισθησία από αλοθάνιο, παρά το ότι οι μεσοπλεύριοι μύες χάνουν την δραστηριότητά τους. Η ελάττωση της FRC οφείλεται στην προς τα έσω κίνηση των πλευρών στην τελοεκπνευστική θέση. Το διάφραγμα δεν παίζει κανένα ρόλο στην ελάττωση της FRC, λόγω του ότι το κεφαλικό μέρος κινείται πρός τα εμπρός και το ουριαίο πρός τα πίσω.[293] Αυτές οι αλλαγές γίνονται έντονες από προϋπάρχουσες νόσους του αναπνευστι-κού.
Η αύξηση του Pa_{CO_2} και η ελάττωση της διαθωρακικής πίεσης που συνοδεύει την αυτόματη αναπνοή με αλοθάνιο, αναστέλλει μερικώς την πτώση της καρδιακής παροχής και τη βραδυκαρδία.

β) Αεραγωγοί

Το αλοθάνιο είναι βρογχοδιασταλτικό και μπορεί να αναστείλει τον βρογχόσπασμο. Αυτή του η δράση είναι ιδιαίτερα έντονη σε αεραγωγούς με

διάμετρο μικρότερη των 3mm και μικρότερη σε αεραγωγούς διαμέτρου μεγαλύτερης των 7mm και σε συγκέντρωση πτητικού 1,1 MAC αλοθανίου. Ο βαθμός βρογχοδιαστολής εξαρτάται από την αιτία που προκάλεσε την βρογχοσυστολή. Αν η αιτία είναι η σεροτονίνη ή μουσκαρινικοί αγωνιστές, το αποτέλεσμα είναι άριστο. Λιγότερο καλά αποτελέσματα θα έχουμε, αν αίτιο είναι η ακετυλχολίνη, ενώ δεν θα έχουμε κανένα αποτέλεσμα, αν η βρογχοσυστολή προκλήθηκε από KCl.[294,295]

Οι μηχανισμοί με τους οποίους το αλοθάνιο προλαμβάνει ή εμποδίζει το βρογχόσπασμο είναι πολύπλοκοι. Βασικά, όμως, αφορούν την αναστολή των νευρικών οδών των αεραγωγών. Αφ' ενός, εμποδίζει την αύξηση του μυϊκού τόνου, αναστέλλοντας την αύξηση του ενδοκυτταρίου Ca^{++} και αφ' ετέρου, χαλαρώνοντας τους συσπασμένους μύες, αναστέλλοντας την είσοδο του εξωκυτταρίου Ca^{++} και μειώνοντας την ευαισθησία της συσκευής σύσπασης του μυικού κυττάρου στο Ca^{++}[296].

Το αλοθάνιο ελαττώνει την κάθαρση της βλένης από το βρογχικό δένδρο και έτσι μπορεί να επιδεινώσει την μετεγχειρητική υποξαιμία και ατελεκτασία.

γ) Πνευμονική κυκλοφορία

Φαίνεται πως τα πτητικά αναισθητικά αναστέλλουν την υποξική πνευμονική αγγειοσύσπαση κατά 20% και αυτό αποδεικνύεται στο πειραματικό μοντέλο του Benumof J. σε ασθενείς κατά την διάρκεια θωρακοτομής. Αυτό δεν κάνει το αλοθάνιο επικίνδυνο στην χρήση του σε αναισθησία ενός πνεύμονα.[297]

Δράση στον εγκέφαλο

Οι μεταβολές που προκαλεί το αλοθάνιο στην αιμοδυναμική του εγκεφάλου έχουν ιδιαίτερη σημασία στους αρρώστους με χωροκατακτητικές βλάβες, που πρόκειται να υποστούν μια επέμβαση. Το αλοθάνιο προκαλεί ελάττωση των εγκεφαλικών αγγειακών αντιστάσεων, με αγγειοδιαστολή των αγγείων του εγκεφάλου, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την εγκεφαλική αιματική ροή. Η αυτορύθμιση του εγκεφάλου αλ-λοιώνεται και έχουμε αύξηση της ενδοκρανίου

πιέσεως. Η εγκεφαλική δραστηριότητα ελαττώνεται και ελαττώνονται οι ανάγκες σε οξυγόνο.

Παρά το ότι το 1969, πρώτος ο Jennet δημοσίευσε την μελέτη του για την αύξηση της ενδοκρανίου πιέσεως από το αλοθάνιο, που υπήρξε το βασικό επιχείρημα για τη μη χρήση του αλοθανίου στην κλινική πράξη στην νευροαναισθησία, η πολυχρόνια κλινική εμπειρία έδειξε ότι μικρές δόσεις αλοθανίου δεν προκαλούν κανένα πρόβλημα στην εξέλιξη των νευροχειρουργικών ασθενών που το έλαβαν. Αντίθετα, η κλινική πείρα δείχνει ότι σε μικρές δόσεις είναι ιδεώδης παράγων.

Δράση στην νευρομυϊκή σύναψη

Το αλοθάνιο έχει χαλαρωτική δράση στούς σκελετικούς μύες και αυξάνει την δράση των μη αποπολωτικών μυοχαλαρωτικών. Η επίδραση στον νευρομυϊκό αποκλεισμό εξαρτάται από τον χρόνο και τη δόση χορήγησης του πτητικού αναισθητικού.

Το αλοθάνιο είναι ένας από τούς trigger παράγοντες, που μπορεί να προκαλέσει κακοήθη υπερπυρεξία. Σε πειραματόζωα απεδείχθη ότι το αλοθάνιο έχει το μικρότερο trigger time (Pa_{C0_2} 70mmHg) για την κακοήθη υπερπυρεξία, που είναι 20±5min.[298,299] Ο μηχανισμός με τον οποίο το αλοθάνιο έχει αυτή την δράση δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως, όμως είναι γνωστό ότι το αλοθάνιο σε κλινικές συγκεντρώσεις αυξάνει τη διαπερατότητα του σαρκοπλασματικού δικτύου, αναστέλλει την σύνδεση του Ca^{++} με τους διυδροπιριδικούς υποδοχείς στα L-κανάλια.[300,301]

Τέλος, φαίνεται ότι υπάρχει γονιδιακή προδιάθεδη για την κακοήθη υπερπυρεξία και ίσως το αλοθάνιο να δημιουργεί διαφοροποίηση της σύσπασης.

Δράση στο νεφρικό σύστημα

Το αλοθάνιο, προκαλώντας πτώση της αρτηριακής πιέσεως, προκαλεί πτώση της νεφρικής αιματικής ροής, της σπειραματικής διήθησης και της παραγωγής ούρων. Λόγω του ότι η πτώση της νεφρικής αιματικής ροής είναι μεγαλύτερη

από την πτώση της σπειραματικής διήθησης, έχουμε αύξηση του πλάσματος διήθησης. Η προεγχειρητική ενυδάτωση ελαττώνει αυτές τις αλλαγές.

Δράση στο ήπαρ

Είναι γνωστό ότι το αλοθάνιο μεταβολίζεται στό ήπαρ και παράγει μεταβολίτες, οι οποίοι μπορούν να συνδεθούν με ηπατικές πρωτεΐνες με ομοιοπολικούς δεσμούς που θα δημιουργήσουν ηπατοτοξικότητα.
Το αλοθάνιο δημιουργεί ελάττωση της αρτηριακής πίεσης, ελαττώνει την αιματική ροή στο ήπαρ[302] και η ελάττωση είναι ανάλογη της δόσης του αλοθανίου. Έτσι, η ηπατική οξυγόνωση ελαττώνεται, με αποτέλεσμα βλάβη στα ηπατικά κύτταρα και ελάττωση της κάθαρσης των φαρμάκων από το ήπαρ.[303-304] Το αλοθάνιο σε δόση 1,3 MAC ελαττώνει την σύνθεση των πρωτεϊνών (αλβουμίνης, τρανσφεράσης, ινωδογόνο) στο ήπαρ. Η κλινική συνέπεια αυτής της δράσης δεν είναι γνωστή.[305,306]

Μεταβολισμός του αλοθανίου

Λίγο μετά την εισαγωγή του αλοθανίου στην κλινική πράξη και ενώ επιστεύετο ότι ήταν ανενεργές πτητικό αναισθητικό, βρέθηκε ότι το 46,1% περίπου μεταβολίζεται στο ήπαρ και, συγκεκριμένα, στο κυτταρόχρωμα P-450.[307-309] Το χρωστικό μονοξείδιο των μικροσωμάτων του ήπατος βρέθηκε από το 1958 ότι είναι μια αιμοπρωτεΐνη τύπου b και βρέθηκε με φωτοχημικό φάσμα να έχει σχέση με την οξείδωση φαρμάκων και ορμονών. Η διάλυση και ο διαχωρισμός των συστατικών αυτού του ενζυματικού συστήματος από τις μικροζωμιακές μεμβράνες επέτρεψε την αναγνώριση ενός δραστικού συστήματος που αποτελείται από κυτταρόχρωμα P-450, αναγωγικό NADPH-κυτταρόχρωμα P-450 και φωσφατιδοχολίνη, που επιτρέπει την κάθαρση και τον χαρακτηρισμό αυτών των συστατικών. Το κυτταρόχρωμα P-450 είναι ένα πολύπλοκο ενζυματικό - καταλυτικό σύστημα που βρίσκεται σε πολλούς ιστούς αλλά, ως επί το πλείστον, στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια και, σε μεγάλη ποσότητα, στο ήπαρ.[310]

Το ηπατικό μικροσωμικό P-450 αποτελείται από μια φλαβοπρωτεΐνη και από μια οικογένεια από συγγενείς αλλά διαφορετικές αιμοπρωτεΐνες. Η φλαβοπρωτεΐνη είναι καταλύτης της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το NADPH στην αιμοπρωτεΐνη. Αυτή είναι η πραγματική μονοοξυγενάση. Γιά να γίνει σύσταση του κατάλληλου καταλυτικού συστήματος από τις πρωτεΐνες, χρειάζεται μια φωσφατίδυλχολίνη. Η ακριβής λειτουργία των λιπιδίων δεν είναι γνωστή, αλλά ίσως δημιουργεί το μικροπεριβάλλον το οποίο είναι απαραίτητο, για να γίνει η αλληλεπίδραση των συστατικών των πρωτεϊνών. Η αναγωγική (NADPH-κυτταρόχρωμα P-450) που καθαρίστηκε από τα ομογενοποιήματα διαφόρων ειδών, είναι μια μονομερής φλαβοπρωτεΐνη, που περιέχει FAD και FMN σε σχέση 1:1 για κάθε μόριο ενζύμου. Οι φλαβοπρωτεΐνες που βρίσκονται σε διάφορους ιστούς από το ίδιο είδος, φαίνονται να είναι όμοιες και, μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει απόδειξη ότι στο ήπαρ υπάρχουν διαφορετικές φλαβοπρωτεΐνες απ' ό,τι στους άλλους ιστούς του ιδίου είδους. Η αναγωγή είναι ειδική για το NADPH, αλλά πάρα πολλές οξειδωτικές ουσίες μπορούν να δεχθούν ηλεκτρόνια.

Όλα τα ισοένζυμα του ηπατικού κυτταροχρώματος P-450 είναι ακέραιες πρωτεϊνικές μεμβράνες και έχουν μονομερή μοριακή μάζα από 48.000 έως 58.000. Κάθε μονομερές αποτελείται από ένα μόριο αίμης, το οποίο συνδέεται με την πρωτεΐνη στο σίδηρο και έχει ένα ξεχωριστό φάσμα απορρόφησης, που κορέννυται με μονοξείδιο του άνθρακα. Η απορρόφηση του συμπλέγματος σίδηρος - P-450 - CO, που είναι πλησίον των 450nm, χαρακτηριστική για όλα τα ισοένζυμα, είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την αναγνώριση των μονοοξυγενασών στα ομογενοποιήματα των ιστών. Αντίθετα από το αναγωγικό NADPH, η τελική οξειδάση P-450 βρίσκεται σε όλα τα είδη και έχει αρκετά ισοένζυμα. Μέχρι σήμερα, στο ανθρώπινο ήπαρ έχουν βρεθεί 18 ισοένζυμα του P-450, από τα οποία τα 10 ή και περισσότερα παίρνουν μέρος στον οξειδωτικό μεταβολισμό. Λόγω του ότι είναι καταλύτες στην οξείδωση φαρμάκων και τροφών, υπόκεινται σε επαγωγή ή καταστολή και, έτσι, είναι δυνατόν να βρούμε διαφορετικές συγκεντρώσεις του κυτταροχρώματος P-450.

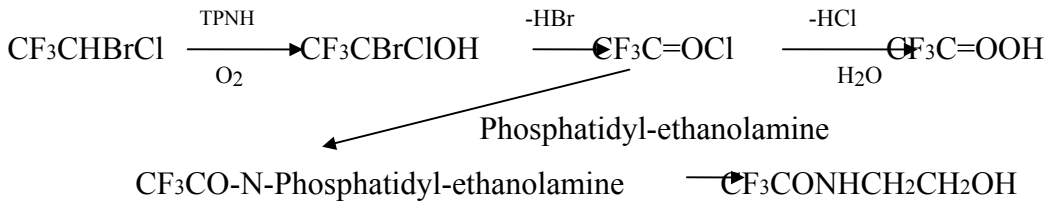
Όσον αφορά την ονομασία του P-450, υπάρχει πρόβλημα λόγω της πολυπλοκότητας του ενζύμου. Ορίστηκε μια επιτροπή η οποία έδωσε όνομα από την σειρά των αμινοξέων στις πρωτεΐνες.Έτσι, λοιπόν, το όνομα του γονιδίου P-450 περιέχει την ρίζα σε λατινικά σύμβολα CYP για το P-450, ακολουθούμενο από ένα αραβικό αριθμό, που δείχνει την οικογένεια του P-450, ένα γράμμα για την υποοικογένεια και, τελικώς, ένα άλλο αραβικό αριθμό για το κάθε χωριστό γονίδιο.

Δεν είναι υπερβολή να πούμε ότι το κυτταρόχρωμα P-450 είναι ο πιο γνωστός πολύπλευρος βιολογικός καταλύτης. Σήμερα, στον άνθρωπο έχουν αναγνωρισθεί περίπου 14 ισομερή του P-450. Κάθε ένα είναι υπεύθυνο για διαφορετική λειτουργία. Υπεύθυνα για το μεταβολισμό του αλοθανίου στα ποντίκια φαίνεται να είναι τα ισομερή CYP_2B και CYP_2E_1. Ποιο ισοένζυμο ή ισοένζυμα είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό του αλοθανίου στον άνθρωπο δεν έχει ακόμα καθορισθεί.

Το ενζυματικό σύστημα κυτταρόχρωμα P-450 μεταβολίζει το αλοθάνιο μέσω της οξειδωτικής οδού σε φυσιολογικές συνθήκες. Σε συνθήκες υποξίας, το αλοθάνιο μεταβολίζεται δια της αναγωγικής οδού.

Οξειδωτική οδός μεταβολισμού

Κατά τον οξειδωτικό μεταβολισμό, μέσω υδροξυλίωσης του υδρογόνου, στον δεύτερο άνθρακα σχηματίζεται ένας ενδιάμεσος μεταβολίτης, το $CF_3CBrClOH$ [1,βρώμο-1,χλώρο-2,2,2,τριφθόροαιθανόλη], που στη συνέχεια διασπάται σε CF_3COCl [τριφθόροακετυλοχλωρίδιο] και το οποίο υδρολύεται σε $CF_3C{=}OOH$ [τριφθο-ροοξεικό οξύ], με ελευθέρωση ανόργανου βρωμίου. Και οι δύο (2) μεταβολίτες αποβάλλονται από τα ούρα ή δεσμεύονται με ε-αμινοομάδες των ηπατικών πρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων, με ομοιοπολικούς δεσμούς.



Η δέσμευση του τριφθόροακέτυλοχλωρίδιου με τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια, αν και πολύ περιορισμένη, δημιουργεί CF_3CO-τροποποιημένες πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια. Ανοσολογική απάντηση σε αυτές τις τροποποιημένες πρωτεΐνες, πιθανόν να είναι η κύρια πηγή ηπατοτοξι-κότητας που παρατηρείται σε ασθενείς που έλαβαν αλοθάνιο.

Αναγωγική οδός μεταβολισμού

Η αναγωγική οδός είναι περιορισμένη σε έκταση και ενισχύεται μόνο σε συνθήκες υποξίας. Το κυτταρόχρωμα P-450 μπορεί να ανάγει το αλοθάνιο με δύο (2) τύπους αναγωγής, αφαιρώντας είτε ένα είτε δύο ηλεκτρόνια. Στην αναγωγή ενός ηλεκτρονίου, ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στο αλοθάνιο και δημιουργεί μία πολύ δραστική ρίζα, την $CF_3CHClBr$. Αυτή με την σειρά της μπορεί να χάσει ένα ιόν Br, δημιουργώντας έτσι μία άλλη ρίζα, την CF_3CHCl^-. Αυτή η ρίζα έχει τρεις δυνατότητες: α) να ενωθεί με ηπατικές πρωτεΐνες και λιπίδια με ομοιοπολικούς δεσμούς (άμεση αιτία ηπατοτοξικότητας), β) να πάρει ένα ιόν Η και να γίνει ένας πτητικός μεταβολίτης το 2,χλώρο-1,1,1,τριφλοροαιθάνιο (CF_3CH2Cl), που αυτό γίνεται η αρχή της υπεροξείδωσης των λιπιδίων και γ) μπορεί να υποστεί, μέσω κυτταροχρώματος P-450, δεύτερη αναγωγή και να δώσει ένα τριφλοροαι-θυλ-καρβανιόν, το (CF_3CH^{--}), που σημαίνει ότι έχει δύο (2) ηλεκτρόνια ελεύθερα. Αυτό το καρβανιόν με την σειρά του μπορεί: α) να ενωθεί χημικά με ηπατικά μεγαλομόρια και β) να απελευθερώσει ιόντα F, τα οποία βρίσκουμε στα ούρα και είναι χρήσιμος δείκτης του αναγωγικού μεταβολισμού του αλοθανίου, δίνοντας έτσι ένα τρίτο πτητικό μεταβολίτη τον 2,χλώρο-1,1, διφλοροαιθυλένιο (CF_2CHCl).[311,312]

$$CF_3CHBrCl \xrightarrow{+\,e^-\ (P\text{-}450)} CF_3CHBrCl^- \xrightarrow{-\,Br^-} CF_3CHCl^-$$

α) CF_3CHCl^- + πρωτεΐνες και λιπίδια

β) $CF_3CHCl^- \xrightarrow{+\,H^+} CF_3CH_2Cl$

$+\,e^-$ (P-450)

γ) $CF_3CHCl^- \xrightarrow[-\ Cl^-]{} CF_3CH^{--}$

i) CF_3CH^{--} + ηπατικά μεγαλομόρια

ii) $CF_3CH^{--} \xrightarrow[+\ Cl^-]{-\ F^-} CF_2{=}CHCl$

Έναν άλλο δρόμο που μπορεί να πάρει ο μεταβολισμός του αλοθανίου είναι να αναχθεί από το κυτταρόχρωμα P-450 στην πρώτη ρίζα CF3CHBrCl και αμέσως μετά να χάσει ένα ιόν F και να γίνει 2,βρώμο-2,χλώρο-1,1,διφλοροαιθυλένιο (CF_2=CBrCl), που μπορεί να συνδεθεί με γλουταθειόνη ή ηπατικά μακρομόρια και σαν N-ακετύλ-2(2,βρώμο-2,χλώρο-1,1,διφλοροαιθύλ) - L-κυστεΐνη να βρεθεί στα ούρα.[313-316]

Στα εκπνευστικά αέρια ασθενών που αναισθητοποιήθηκαν με ημίκλειστο σύστημα αναισθησίας βρέθηκε 2,βρώμο-2,χλώρο-1,1,διφθοροαιθυλένιο από αντίδραση του αλοθανίου με την νατράσβε-στο. Η νατράσβεστος απορροφά ένα πρωτόνιο από το αλοθάνιο, δημιουργώντας ένα καρβανιόν, το οποίο διασπάται με ελευθέρωση ενός ιόντος F και δίνει απευθείας 2,βρώμο-2,χλώρο-1,1,διφθοροαι-θυλένιο

$$CF_3CHBrCl \xrightarrow[-\ H_2O]{+\ ^-OH} CF_3CBrCl^- \xrightarrow{-\ F^-} CF_2{=}CBrCl$$

Η ένωση αυτή αλληλεπιδρά χημικώς με τα ηπατικά μακρομόρια ή την γλουταθειόνη και δίνει το N-ακετύλ-[2,βρώμο-2,χλώρο-1,1,διφθορο-αιθυλ] - L-κυστεΐνη, που αποβάλλεται από τα ούρα.

Η σιμετιδίνη, H_2-αναστολέας, εκλεκτικά, αναστέλλει την αναγωγική οδό μεταβολισμού του αλοθανίου και, μερικώς, προστατεύει από την ηπατοτοξικότητα.

Οι Cohen et al, με χημική εξαγωγή, ηλεκτροφόρηση, αλλαγή ιόντων, υψηλής πίεσης υγρή χρωματογραφία και αέρια χρωματογραφία, βρήκαν στα ούρα τρεις (3) μεταβολίτες, το τριφθορο-οξικό οξύ (CF_3C=OOH), το N-τριφλορο-ακετύλ-2,αμινοαιθανόλη και το N-ακετύλ-S-[2,βρώμο-2,χλώρο-1,1,διφθορο-αιθύλ] - L-κυστεΐνη. Συγχρόνως, βρέθηκαν και μικρότερες ραδιενεργές αιχμές, οι οποίες

δηλώνουν την παρουσία ενδιάμεσων μεταβολιτών. Η σύνδεση μερικών ενδιάμεσων μεταβολιτών με πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια δίνει αύξηση σε υψηλού μοριακού βάρους ενώσεις οι οποίες βρέθηκαν στο ήπαρ.[317]
Οι Sharp et al., με αέρια χρωματογραφία, φασματογραφία μάζης στα εκπνευστικά αέρια, βρήκαν δύο πτητικούς μεταβολίτες τον 2,χλώρο-1,1,1,τριφλουορο-αιθάνιο (CF_3CH2Cl) και τον 2,χλώρο-1,1,διφλορο-αιθύλιο (CF_2=CHCl) και ένα προϊόν διάσπασης, το 2,βρώμο-2,χλώρο-1,1,διφλοροαιθυλένιο (CF_2CBrCl). Ιόντα F^- παράγονται από τον αναγωγικό μεταβολισμό, ενώ ιόντα Br^- παράγονται από τον αναγωγικό και τον οξειδωτικό μεταβολισμό του αλοθανίου. Στα ούρα των ασθενών βρίσκονται ελεύθερα ιόντα Br^-, ενώ τα περισσότερα ιόντα F^- είναι ενωμένα με οργανικές ενώσεις.
Παράγοντες που επηρεάζουν τον μεταβολισμό του αλοθανίου είναι η επαγωγή ενζύμων, η υποξία και η παχυσαρκία.
Η επαγωγή ενζύμων αυξάνει την ποσότητα του αλοθανίου που μεταβο-λίζεται στο ήπαρ, και αυτό έχει βρεθεί όχι μόνο σε πειραματόζωα, αλλά και σε αναισθησιολόγους που εισπνέουν συχνά αλοθάνιο, σε σχέση με ομάδα φαρμακοποιών που απετέλεσαν την ομάδα ελέγχου.
Οι Bentley et al και οι Young et al σε μελέτη τους σε παχύσαρκα άτομα, βρήκαν ότι το ανόργανο F^-, το οποίο είναι προϊόν αναγωγικού μεταβολισμού, αυξήθηκε πάρα πολύ σε σχέση με μη παχύσαρκα άτομα. Επίσης, βρήκαν ότι τα ιόντα Br^- και το τριφθοριοξεικό οξύ ήταν ηυξημένα και στίς δύο ομάδες, αλλά στα παχύσαρκα άτομα παρέμειναν υψηλά και μετά από 48 και 72 ώρες.[318] Όπως γνωρίζουμε, ο αναγωγικός μεταβολισμός του αλοθανίου ευνοείται από την υποξία. Το ηπατικό κύτταρο των παχυσάρκων έχει τρεις (3) λόγους να έχει ελαττωμένη παροχή οξυγόνου: α) υπάρχει κατάληψη των ηπατικών κυττάρων από λίπος - και αυτό συμβαίνει στο 80% των παχυσάρκων -, β) ελάττωση της αρτηριακής πίεσης από το ίδιο το αλοθάνιο, με αποτέλεσμα την ελάττω-ση της αιματικής ροής και παροχής οξυγόνου και γ) μεγάλες αναπνευ-στικές διαταραχές που εύκολα δημιουργούν υποξία. Έτσι λοιπόν, η σύνθεση των

τριών αυτών παραγόντων προκαλεί ελάττωση της παροχής στο ηπατικό κύτταρο, με αποτέλεσμα την στροφή σε αναβολική οδό μεταβολισμού. Άλλος παράγων είναι ο χρόνος έκθεσης στο αλοθάνιο. Το μεγαλύτερο επίπεδο ιόντων Br^- ευρίσκεται τρείς ημέρες μετά την έκθεση στο αλοθάνιο. Δεδομένου ότι τα παχύσαρκα άτομα αποθηκεύουν περισσότερη ποσότητα αλοθανίου στο λιπώδη ιστό, αυτό κάνει τα παχύσαρκα άτομα να δίδουν μεγαλύτερες τιμές Br^- και F^- και για περισσότερο χρονικό διάστημα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Αλοθάνιο και Ηπατοτοξικότητα

Όπως προαναφέρθηκε (σελ. 55), το αλοθάνιο παρασκευάστηκε το 1951 και χρησιμοποιήθηκε στην κλινική πράξη από το 1956 στην Αγγλία και από το 1958 στην Αμερική. Ήδη, από το 1958 έως το 1963 έχουν δημοσι-ευθεί πολλές αναφορές για μετεγχειρητικό ίκτερο και ηπατική νέκρωση. Αυτές οι αναφορές οδήγησαν σέ πολλές μελέτες, οι οποίες καταλήγουν ότι δεν υπάρχει αυξημένη πιθανότητα σε μετεγχειρητική κλινική ηπατι-κή βλάβη.

Λόγω του ότι καμιά μελέτη δεν ήταν τέλεια, αλλά κάθε μιά είχε κάποια έλλειψη (μικρός αριθμός, έλλειψη ομάδας ελέγχου κ.τ.λ), έγινε η μεγά-λη Εθνική Αμερικανική μελέτη γιά το αλοθάνιο το 1959. Στη μελέτη έλαβαν μέρος 34 ιατρικά κέντρα με το ίδιο πρωτόκολλο και κράτησε τέσσερα χρόνια, από τον Ιούνιο 1959 έως 1962 και κατέληξε ότι η μαζική ηπατική νέκρωση μετά από αλοθάνιο είναι ένα πολύ σπάνιο σύμβαμα και μπορεί να εξηγηθεί από την κυκλοφορική καταπληξία, την σήψη ή προ-ηγούμενη ηπατική βλάβη. Βρέθηκε ότι η συχνότητα της μαζικής ηπατι-κής νέκρωσης είναι περίπου 1 στις 35.000 ή 7 στις 250.000 αναισθησίες με αλοθάνιο. Η επιτροπή κατέληξε ότι "περίπτωση ανεξήγητου πυρετού και ικτέρου κατόπιν αναισθησίας με αλοθάνιο, πρέπει να είναι αντένδει-ξη για επόμενη χρήση του φαρμάκου" [319-324]

Συμπτωματολογία της ηπατίτιδας από αλοθάνιο

Το αλοθάνιο είναι υπεύθυνο για δύο (2) πρότυπα ηπατικής βλάβης:

α) Μικρή ηπατική βλάβη, η οποία δίνει ελαφρά και παροδική αύξηση των επιπέδων των τρανσαμινασών και αυτή είναι σχετικά συχνή στούς ασθενείς που πήραν αλοθάνιο (περίπου 1 στούς 4 ασθενείς).

Αυτή η ηπατική βλάβη, η οποία ίσως αποδίδεται σε παροδική και μικρή βλάβη της ηπατοκυτταρικής ακεραιότητας, υποχωρεί μόνη της, χωρίς περαιτέρω προβλήματα.

β) Το άλλο πρότυπο ηπατικής βλάβης είναι βαρύς τύπος ηπατίτιδας, η λεγόμενη ηπατίτις από αλοθάνιο, που είναι πολύ σπάνια (από 1 στις 3.000 έως 1 στις 35.000), αλλά, συχνά, μπορεί να φθάσει σε μαζική ηπατοκυτταρική

νέκρωση και μεγάλη αύξηση των τρανσαμινών του ορού, ίκτερο και σε θάνατο από ηπατική ανεπάρκεια. Αυτό παραμένει ένα μεγάλο κλινικό θέμα, παρά την ελαττωμένη διαρκώς χρήση του αλοθανίου.

Στην τυπική ηπατίτιδα από αλοθάνιο, ο πυρετός προηγείται του ικτέρου για πολλές ημέρες και πολλές φορές μπορεί να αποδοθεί, εσφαλμένως, σε ατελεκτασία ή φλεγμονές. Η εκδήλωση του ικτέρου είναι συχνά δια-φορετική, αλλά, πολλές φορές, παρουσιάζεται από τρεις (3) έως δέκα (10) ημέρες από την επέμβαση. Η ηπατίτις που παρουσιάζεται περισσό-τερες από τρεις (3) εβδομάδες μετά την επέμβαση δεν είναι πιθανό να είναι σχετική με την χορήγηση αλοθανίου. Ο ίκτερος μετά από μία έκθε-ση στο αλοθάνιο, παρουσιάζεται συνήθως δύο (2) εβδομάδες μετά το χειρουργείο, ενώ, μετά από πολλαπλές εκθέσεις, παρουσιάζεται μετά από μια εβδομάδα.

Εκτός από πυρετό και ίκτερο, ο ασθενής πιθανόν να παρουσιάσει ναυτία, καχεξία, ανορεξία και πόνο στο δεξιό υποχόνδριο. Αυτά τα συμπτώματα ίσως είναι δύσκολο να εξηγηθούν στην πρώιμη μετεγχειρητική περίοδο μετά από μια μεγάλη επέμβαση. Η κλινική εξέταση δεν είναι χαρακτη-ριστική. Ίσως να υπάρχει ελαφρά ηπατομεγαλία, εκτός από την περί-πτωση κεραυνοβόλου ηπατίτιδος, όπου το ήπαρ έχει μικρύνει σε μέγεθος.[325,326]

Εργαστηριακός Έλεγχος

Άμεσος χολερυθρίνη από 3-30 mg/100ml ή 50-500 μmol/l

SGOT > 500 Units/l *SGPT* > 500 Units/l

Αλκαλική φωσφατάση > υπερδιπλάσια του φυσιολογικού

Ανικτερικά περιστατικά σημαίνουν ανάρρωση, ενώ χολερυθρίνη περισσότερο από 10mg/ml σημαίνει κακή πρόγνωση. Όμως, ο πιο χαρακτηριστικός δείκτης βαρύτητας της ηπατίτιδας από αλοθάνιο είναι η *υποθρομβιναιμία* και η κλινική και βιολογική ένδειξη και απόδειξη ηπα-τικής εγκεφαλοπάθειας. Συνήθως, υπάρχει *ηωσινοφιλία* και εκδορές από κνησμό στο δέρμα, που αποδίδονται σε χρόνια αλλεργία από φάρμακα. Έχουν βρεθεί *αντιμιτοχονδριακά αντισώματα*, *αντισώματα κατά των μυϊκών ινών* και *αντιπυρηνικά αντισώματα* σε ασθενείς με ηπατίτιδα από αλοθά-νιο. Επίσης, έχουν βρεθεί υψηλού *βαθμού αντιηπατικά,*

αντινεφρικά και αντιθυροειδικά αντισώματα σε ασθενείς με ανεξήγητη ηπατίτιδα από αλοθάνιο.

Πίνακας VI: Χαρακτήρες της βλάβης απο αλοθάνιο

Μικρή Βλάβη
Συχνότητα (1:3 -1:4) Μικρή ηπατική δυσλειτουργία Μέση αύξηση των AST, ALT, GST Εστιακή ηπατική νέκρωση *Αποφυγή επανειλημμένων εκθέσεων σε αλοθάνιο*
Βαρύς τύπος ηπατίτιδος (*ηπατίτης εξ αλοθανίου*)
Συχνότης (1:3000-1:30000) Βαρειά ηπατική ανεπάρκεια Μεγάλη αύξηση των AST, ALT Οξεία ηπατική / μαζική ηπατική νέκρωση Ίκτερος Συχνά ηπατική ανεπάρκεια και θάνατος Συνδεδεμμένη με πολλαπλές εκθέσεις σε αλοθάνιο Ασθενείς ώς επί το πλείστον γυναίκες, παχύσαρκες, μέσης ηλικίας Ανοσολογικές ανωμαλίες Ηωσινοφιλία Αντισώματα Κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα Σύνδεση αυτοάνοσων συμπλεγμάτων Αντισώματα σε ηπατικά αντιγόνα από αλοθάνιο

Ιστοπαθολογία της ηπατίτιδας από αλοθάνιο

Οι βλάβες που βρίσκομε στην ηπατίτιδα από αλοθάνιο είναι οξεία ηπατοκυτταρική νέκρωση, συχνά περιφλεβική και λίγες φλεγμονώδεις διηθήσεις. Τα ηπατοκύτταρα περιβάλλουν κενοτοπιώδη εκφύλιση (balloning) και οξεόφιλα σώματα παρουσιάζονται συχνά. Αυτές οι αλ-λοιώσεις είναι δύσκολο να διακριθούν από εκείνες που υπάρχουν στην οξεία ιογενή ηπατίτιδα.

Σε πολλές περιπτώσεις, έχουμε σύμπτυση του ινώδους δικτύου του ήπατος και αιμορραγίες στο παρέγχυμα. Σε 10-15% έχουμε λιπώδη διήθηση .
Το φλεγμονώδες διήθημα αποτελείται από λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, πολυμορφοπύρηνα ως επί το πλείστον στην περιοχή της πυλαίας. Το αφοριστικό πέταλο διασπάται και το διήθημα φτάνει μέχρι το παρέγ-χυμα. Πολλές φορές παρουσιάζεται ηωσινοφιλία και υπερπλασία των μικρών ενδοηπατικών χοληφόρων.

Κλινική πορεία της ηπατίτιδας από αλοθάνιο

Η κλινική πορεία της ηπατίτιδας από αλοθάνιο είναι όμοια με αυτή της ιογενούς ηπατίτιδας, αλλά η συχνότητα θανάτου είναι πολύ υψηλή. Η θανατηφόρος συχνότητα είναι 10-40% των περιστατικών μετεγχειρητι-κού ικτέρου από αλοθάνιο. Όμως, ανατρέχοντας την βιβλιογραφία, δεν αποκλείουμε περιστατικά με μόνη πυρετική αντίδραση και μικρή ανωμα-λία στη λειτουργία του ήπατος. Ο θάνατος επέρχεται μία (1) ή δύο (2) εβδομάδες από την εμφάνιση του ικτέρου. Το τελικό στάδιο χαρακτηρί-ζεται από βαθύ κώμα, νεφρική ανεπαρκεια, αιμορραγίες, σήψη. Καθώς δεν υπάρχει ειδική θεραπεία για την ηπατίτιδα από αλοθάνιο, η φροντίδα του αρρώστου είναι όμοια με την μαζική ηπατική νέκρωση από κάθε άλ-λη αιτία. Αν υπάρξει ανάρρωση από την ηπατίτιδα, αυτή είναι τέλεια, χωρίς να αναπτυχθεί κίρρωση ή χρόνια ηπατίτιδα.

Διαφορική διάγνωση

Η διαφορική διάγνωση γίνεται από την ιογενή ηπατίτιδα, τη φαρμακευτι-κή ηπατίτιδα και τη νέκρωση του ήπατος από καταπληξία. Το διάστημα μεταξύ έκθεσης στο αλοθάνιο και το χρόνο εκδήλωσης της ηπατίτιδας είναι συνήθως δύο (2) εβδομάδες ή λιγότερο, ενώ ο χρόνος επώασης της Α, Β, C ιογενούς ηπατίτιδας είναι περισσότερος. Έγιναν σκέψεις μήπως οι ασθενείς με ηπατίτιδα από αλοθάνιο ευρίσκοντο σε χρόνο επωάσεως ιογενούς ηπατίτιδος. Όμως, δεν

βρέθηκε επιφανειακό αντιγόνο Β στην ηπατίτιδα από αλοθάνιο ή αντίσωμα κατά του HCV. Είναι επίσης απίθα-νο ότι υποκλινική ηπατίτις Α βρίσκεται πίσω από ηπατίτιδα από αλοθά-νιο, λόγω του ότι η ηπατίτις Α είναι πολύ κοινή στα παιδιά και νέους, ενώ η ηπατίτις από αλοθάνιο παρουσιάζεται στην 4η και 5η δεκαετία. Άλλα πιθανά αίτια ιογενούς ηπατίτιδας (κυτταρομεγαλοιός, ΕΒ ηπατίτις), που μπορούν να αναπτύξουν συγχρόνως μετεγχειρητικό ίκτερο, διαφο-ροποιούνται, λόγω του ότι αυτές οι ιογενείς ηπατίτιδες δεν αναπτύσσουν κεραυνοβόλο ηπατίτιδα.

Είναι πολύ δύσκολο να γίνει Δ.Δ. από ηπατική νέκρωση δευτερογενή από υποξαιμία, shock και δεξιά καρδιακή ανεπάρκεια. Πρέπει να γίνει προσεκτική ανασκόπηση στο αν υπήρξε διεγχειρητικά υπόταση ή ανοξία. Η μετεγχειρητική παρουσία ηπατικής και νεφρικής ανεπάρκειας συγχρόνως μπορεί να είναι αποτέλεσμα shock, αλλά ποτέ ηπατίτιδας από αλοθάνιο.

Η βιοψία είναι χρήσιμη για να λύσει το μυστήριο.

Άλλα αίτια ηπατοκυτταρικής νέκρωσης είναι η χορήγηση άλλων φαρμά-κων. Γιά το λόγο αυτό, πρέπει πάντα να έχουμε ένα λεπτομερές ιστορικό για το ποια φάρμακα λαμβάνει ο ασθενής.

Πειραματικά μοντέλα

Η ανεξήγητη και μη αναμενόμενη ηπατίτις, μετά από γενική αναισθησία με αλοθάνιο, έχει γίνει το αντικείμενο πολλών ερευνών για πολλά χρόνια.

Αν συνενώσουμε όλες αυτές τις πειραματικές μελέτες που έγιναν και αφορούν την ηπατοτοξικότητα του αλοθανίου, θα τις ταξινομήσουμε με την εξής σειρά, που δείχνει τον ευνοούμενο σήμερα μηχανισμό για την ηπατοτοξικότητα:[327-330]

1) Η βιομετατροπή του αλοθανίου δημιουργεί ένα ενδιάμεσο μεταβολίτη, το τριφθοροακετύλχλωρίδιο, ο οποίος έχει μικρό βαθμό αντίδρασης με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. 2) Ο μεταβολίτης αυτός συνδέεται με ομοιοπολικό δεσμό με τις ηπατικές πρωτεΐνες και δημιουργούν ένα απτένιο και 3) Δημιουργείται μια ανοσολογική απάντηση σ' αυτό το απτένιο, αλλά μόνο σε ορισμένα άτομα που καταλήγουν σε ηπατοκυττα-ρική βλάβη. Έχουμε λοιπόν την θεωρία της άμεσης ηπατοκυτταρικής βλάβης από προϊόντα του

μεταβολισμού και σύνδεση με τις πρωτεΐνες των ηπατικών κυττάρων με ομοιοπολικούς δεσμούς και, τέλος, την θεωρία της ανοσολογικής απάντησης στα συμπλέγματα αυτά.

Πρίν αναλύσουμε τις θεωρίες που μέχρι σήμερα αναπτύχθηκαν για την ηπατίτιδα από αλοθάνιο, θα κάνουμε μια κατάταξη των πειραματικών μοντέλων που αναπτύχθηκαν σχετικά με το θέμα.

Στην προσπάθεια να δοθεί λύση στην αιτία της ηπατίτιδας από αλοθάνιο, δημιουργήθηκαν πολλά πειραματικά μοντέλα. Θα προσπαθήσουμε να τα ταξινομήσουμε σε κάποιες κατηγορίες, που θα εξηγούν τήν πιθανή αιτία της ηπατικής βλάβης.

Μετά την παρατήρηση του Van Dyke ότι η φαινοβαρβιτάλη, προκα-λώντας επαγωγή ενζύμων, επεμβαίνει στο μεταβολισμό, δόθηκε μεγάλη σημασία στα πειραματικά μοντέλα με ουσίες που κάνουν επαγωγή ενζύ-μων. Τέτοια είναι το διφενύλπολυχλωρίδιο, που δόθηκε σε πειραματό-ζωα από τους Sipes και Brown. Όμως, το διφενύλπολυχλωρίδιο μπορεί από μόνο του να προκαλέσει ηπατοτοξικότητα.[331,332]

Άλλη επαγωγική ουσία είναι η φαινοβαρβιτάλη, η οποία μπορεί σε υπο-ξικό περιβάλλον να προκαλέσει ηπατοτοξικότητα. Οι Cousin et al έδει-ξαν ποσοτικές και ποιοτικές ομοιότητες στο μεταβολισμό μεταξύ επι-μύων και ανθρώπων, στις ιστολογικές βλάβες που έγιναν στο ήπαρ.[328-330]

Η χρήση των πειραματοζώων δημιούργησε πολλά προβλήματα, γιατί υπάρχει μεγάλη διαφορά στην έκταση μεταβολισμού μεταξύ των ειδών αλλά και της ηλικίας και του φύλου.

Άλλα μοντέλα δημιούργησαν ηπατική νέκρωση μόνον με την επαγωγή ενζύμων και υποξία. Επιπλέον, η ηπατική βλάβη ήταν μεγάλη σε PB/υποξικά μοντέλα στα οποία δόθηκε υψηλή πυκνότητα αλοθανίου για μικρό διάστημα, ενώ αντίθετο αποτέλεσμα είχαμε στα πειραματικά μοντέλα που έπαιρναν μικρές πυκνότητες για πολύ χρονικό διάστημα.

Είναι δύσκολο να βγάλουμε συμπεράσματα από τα πειραμοτόζωα τα οποία θα εφαρμόσουμε στον άνθρωπο, λόγω του ότι, στον άνθρωπο, η ηπατοτοξικότητα

εξελίσσεται γρήγορα και μπορεί να είναι θανατηφό-ρος, ενώ στους επίμυες οι ηπατικές βλάβες θεραπεύονται, παρά τό ότι αυτό γίνεται αργά.
Άλλα πειραματικά μοντέλα χρησιμοποιήσαν T_3 ή χρόνια χορήγηση αιθανόλης.[336-339]
Σ'αυτά συμβαίνει ηπατική νέκρωση χωρίς υποξία. Ο υπερθυροειδισμός αυξάνει το μεταβολισμό του αλοθανίου αλλά και τους ενδιάμεσους μεταβολίτες. Όμως, μπορεί και να αυξήσει τις ανάγκες του κυττάρου σε οξυγόνο. Η χρόνια χρήση αιθανόλης με 10% οξυγόνο προκαλεί επαγωγή ενζύμων και αυξάνει την πιθανότητα βλάβης σε υποξία.
Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε ισονιαζίδη και κατόπιν εκτέθηκαν σε αλοθάνιο σε αέρα, ανέπτυξαν ηπατοκυτταρική νέκρωση. Η αιτία φαίνεται να είναι ο οξειδωτικός μεταβολισμός.[340-342]
Έχει δοθεί μεγάλη σημασία στα ινδικά χοιρίδια, λόγω του ότι φαίνεται να είναι πιο κοντά στις ανθρώπινες συνθήκες. Στα ινδικά χοιρίδια φαίνεται ότι μπορεί να προκληθεί ηπατοτοξικότητα χωρίς επαγωγή ενζύμων ή υποξία. Φαίνεται δε ότι τα ινδικά χοιρίδια μεταβολίζουν το αλοθάνιο δια της οξειδωτικής οδού.[343-347]
Παραθέτουμε ένα συνοπτικό πίνακα (Πίνακας VII) των πειραματικών μοντέλων που αναπτύχθηκαν, τις συνθήκες κάτω από τις οποίες έγιναν τα πειράματα, τούς μηχανισμούς ηπατοτοξικότητας και το είδος του πειραματόζωου.

Πίνακας VII: Πειραματικών Μοντέλων Ηπατοτοξικότητας απο Αλοθάνιο

Είδος	Συνθήκες	Ηπατοτοξικότητας Μηχανισμός	Βιβλιογρ
Επίμυες	Χορηγ. διφενύλπολυχλωρινίου Μέση υποξία (14% 0_2)	Αναγωγικοί μεταβ. και υποξία	**331-332**
Επίμυες	Χορηγ. φαινοβαρβιτάλης Μέση υποξία (14% 0_2)	Αναγωγικοί μεταβ. και υποξία	**333-334**
Επίμυες	Χορήγ. T_3	Υποξία	**336-338**

Επίμυες	Χορηγ. φαινοβαρβιτάλης Βαρειά υποξία (8%-12% 0_2)	Υποξία	339
Επίμυες	Χορηγ. Ισονιαζίδης	Οξειδωτικοί μεταβολίτες	340
Ινδικά Χοιρίδια	Καμία	Οξειδωτικοί μεταβολίτες	343-346

ΘΕΩΡΙΕΣ ΗΠΑΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Μεταβολική θεωρία

Η ανακάλυψη ότι το αλοθάνιο μεταβολίζεται, άνοιξε την πόρτα σε μια απλή αλλά λογική υπόθεση, ότι κάποιο ή κάποια από τα προϊόντα του μεταβολισμού είναι υπεύθυνο για την ηπατοτοξικότητα.

Αυτή η ιδέα τράφηκε περισσότερο από το γεγονός ότι στα πειραματικά μοντέλα, για να δημιουργηθεί ηπατική βλάβη, χρειάζεται πρώτα να χορηγηθεί φαινοβαρβιτάλη, για να γίνει επαγωγή του κυτταροχρώματος P-450 και έτσι να έχουμε μεγαλύτερη ποσότητα μεταβολισμένου αλοθανίου αλλά και, συγχρόνως, μέση υποξία (14%) κατά την χορήγηση του αλοθανίου.

Όπως είναι γνωστό, το αλοθάνιο, σε επάρκεια ιστικού ηπατικού οξυγό-νου, μεταβολίζεται μόνο από την οξειδωτική οδό, παράγοντας σαν προϊόντα μεταβολισμού τριφθοροοξεικό οξύ και ιόντα Br. Όμως, η χορήγηση TFAA στο περιτόνεο των επιμύων δεν έδωσε καμία τοξικότητα. Επίσης, υψηλή συγκέντρωση Br στο αίμα δεν δίνει ηπατοτοξικότητα.

Ο Cohen, το 1969, έδειξε ότι υπάρχουν φθοριομένοι μη πτητικοί μεταβο-λίτες στο αίμα, που είναι ενωμένοι με ομοιοπολικούς δεσμούς με ηπατι-κά κύτταρα, αλλά δεν δίνουν καμία ηπατική βλάβη. Η ανακάλυψη από τους Uehleke et al της αναγωγικής οδού μεταβολισμού και η αυξημένη in vitro ένωση του μεταβολισμένου αλοθανίου με μικροσωματικές πρωτεΐνες, άνοιξαν νέους δρόμους. Αν το οξυγόνο στους ιστούς κατεβεί κάτω από 6mmHg, τότε το αλοθάνιο παίρνει το αναγωγικό μονοπάτι του μεταβολισμού. Η χορήγηση φαινοβαρβιτάλης αλλά και διφενύλπολυ-χλωριδίου, όχι μόνο αυξάνει το κυτταρόχρωμα P-450, αλλά κάνει επαγω-γή των ισοενζυμικών τύπων του P-

450 (CYP_2B) και (CYP_2E_1), που γίνονται καταλύτες της αναγωγής της αλοθάνης, αυξάνοντας την ποσό-τητα του κάθε μεταβολίτη, δημιουργώντας μεγάλη βλάβη. Αντίθετα, ου-σίες όπως η μετυραπόνη και η σιμετιδίνη, ίσως προφυλάσσουν τους επί-μυες από ηπατική βλάβη από αλοθάνιο, ελαττώνοντας τη δραστικότητα του κυτταροχρώματος P-450 και το μεταβολισμό του αλοθανίου ή ελατ-τώνοντας όλο τον ηπατικό μεταβολισμό και τις απαιτήσεις σε οξυγόνο, κάτι το οποίο ευνοεί τη σχέση παροχής/απαίτησης σε ηπατικό οξυγόνο.

Η ύπαρξη N-ακετύλ-2,βρώμο-2,χλώρο-1,1,διφλοροαιθύλ L-κυστείνης ίσως προέρχεται από την ένωση του 2,βρώμο-2 χλώρο,-1,1,διφθοροαιθυ-λενίου με γλουταθειόνη. Αν και θα μπορούσε το 2,βρώμο-2,χλώρο-1,1,δι-φθοροαιθυλένιο, αν δεν συνδεθεί με γλουταθειόνη, να είναι ηπατοτοξι-κό, όμως η ελάττωση της γλουταθειόνης δεν δημιουργεί ηπατοτοξικό-τητα.

Άλλο αναγωγικό μεταβολικό μονοπάτι δίνει ελεύθερες ρίζες και καρβανιόντα, τα οποία είναι αυξημένα σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Όλοι αυτοί οι ενδιάμεσοι μεταβολίτες μπορούν να δημιουργήσουν ηπατική βλάβη άμεσα ή έμμεσα, δημιουργώντας υπεροξειδωτική διάσπαση των λιπαρών οξέων στα φωσφολιπιδικά μέρη των κυτταρικών μεμβρανών, με ακόλουθο θάνατο των ενδοκυτταρικών οργανιδίων, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο και μιτοχόνδρια. Η ένωση αυτή αυξάνει με επαγωγή ενζύμων και υποξία. Φαίνεται ότι η λιπο-υπεροξείδωση λιπιδίων είναι το αποτέλεσμα και όχι η αιτία της ηπατικής βλάβης.

Στη θεωρία αυτή εντάσσονται και τα πειραματικά μοντέλα με ινδικά χοιρίδια, τα οποία δεν χρειάζονται προηγούμενη επαγωγή ενζύμων από φάρμακα ή χημικές ουσίες και τα οποία αναπτύσσουν βλάβη με οξειδωτι-κούς μεταβολίτες[348].

Μεγάλη δόση και σύντομη έκθεση σε αλοθάνιο δημιουργούν μεγαλύτε-ρη ηπατική βλάβη απ' ό,τι μικρές συγκεντρώσεις αλοθανίου για μεγάλο χρονικό διάστημα. Μακροχρόνιες εκθέσεις αυξάνουν το σύνολο του μεταβολισμένου αλοθανίου, ενώ μεγάλες δόσεις ελαττώνουν την δράση του κυτταροχρώματος P-450.

Το ένα ή το άλλο από αυτά τα πειραματικά μοντέλα πιθανόν εξηγούν το μέσο τύπο ηπατικής βλάβης που γίνεται από το αλοθάνιο στους ανθρώπους. Τα πειραματικά μοντέλα δεν φαίνεται να δημιουργούν βαρύ τύπο ηπατικής ανεπάρκειας που γίνεται στους ασθενείς. Αντίθετα, αυτός φαίνεται να αναπτύσσεται μέσω ανοσολογικού μηχανισμού.

Υποξική θεωρία

Η απόδειξη ότι η υποξία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της ηπατι-κής βλάβης σε πειραματικά μοντέλα επιμύων που είχαν πάρει φαινοβαρ-βιτάλη και η σχέση μεταξύ υποξίας και αναγωγικού μεταβολισμού οδη-γούν στην υπόθεση ότι η αύξηση του αναγωγικού μεταβολισμού μετά από υποξία είναι η αιτία της ηπατοτοξικότητας στους ανθρώπους.

Οι Eger et al έδειξαν ότι η υποξία, που γίνεται σε πολλά πειραματικά μοντέλα in vivo σε ποντίκια, είναι από μόνη της ικανή, χωρίς την παρουσία αλοθανίου, να προκαλέσει ηπατική βλάβη.

Μεγάλη δόση και σύντομη έκθεση σε αλοθάνιο δημιουργούν μεγαλύτε-ρη ηπατική βλάβη απ' ό,τι μικρές συγκεντρώσεις αλοθανίου για μεγάλο χρονικό διάστημα. Όλα αυτά ταιριάζουν με την υπόθεση της υποξίας .

Η υπόθεση αυτή απλώς λέει, ότι η ηπατική βλάβη οφείλεται σε ελάττω-ση της σχέσης παροχής/απαίτησης σε οξυγόνο στο ηπατικό κύτταρο, είτε γιατί έχουμε ελάττωση της παροχής είτε λόγω του ότι έχουμε αύξη-ση των απαιτήσεων. Σ'αυτή την περίπτωση ο πόλος του μεταβολισμού του αλοθανίου είναι αμελητέος ή δεν υπάρχει.

Οι λόγοι για τους οποίους αυξάνουν οι απαιτήσεις σε οξυγόνο στο ηπα-τικό κύτταρο είναι ο υπερθυροειδισμός, η χρόνια χορήγηση αιθανόλης, η υπερθερμία και, ίσως, η επαγωγή ενζύμων. Η ελάττωση της παροχής οξυγόνου είναι δευτερεύουσα σε καρδιαγγειακή καταστολή αλλά και σε αναπνευστική καταστολή. Ο Harper et al έδειξαν ότι η απολίνωση της ηπατικής αρτηρίας προκαλεί ηπατικές βλάβες, όμοιες με αυτές που έγιναν σε υποξικούς επίμυες που είχαν πάρει φαινοβαρβιτάλη. Οι επεμβάσεις άνω κοιλίας, λόγω του ότι ελαττώνουν την ηπατική ροή, δίνουν πιο εύκολα ηπατική βλάβη σε σχέση με

τις επεμβάσεις κάτω κοιλίας και τις επεμβάσεις στά άκρα. Αναισθησία με αλοθάνιο σε σκυλιά προκαλεί ελάττωση της ηπατικής ροής, όμοια με αυτή που γίνεται σε πτώση της καρδιακής παροχής. Φυσιολογικά, η ηπατική ροή ρυθμίζεται σε απάντηση των αλλαγών που γίνονται στην πυλαία κυκλοφορία. Αλλά, όπως έχουν δείξει πολλές μελέτες σε ζώα, η αναισθησία με αλοθάνιο ελαττώνει την ροή στην πυλαία και την ηπατική αρτηρία.

Παρά όλες αυτές τίς μελέτες όμως και παρά του ότι η υποξία, από μόνη της, μπορεί να δημιουργήσει ηπατική νέκρωση, η συχνότητα της ηπατι-κής ανεπάρκειας σε ασθενείς υγιείς μετά από αναισθησία από αλοθάνιο είναι πολύ σπάνια. Πιο συχνά, είναι δευτερεύουσα σε καρδιακή, νεφρι-κή και εγκεφαλική βλάβη. Από την άλλη πλευρά, είναι δυνατόν μικρή επέμβαση, με μη εμφανή υπόταση και υποξία, να δημιουργήσει ηπατική νέκρωση.

Η χορήγηση τριιοδιοθυρονίνης (T_3) πριν την έκθεση σε αλοθάνιο, χωρίς υποξία ή χορήγηση φαινοβαρβιτάλης, δίνει ηπατική νέκρωση, παρά το γεγονός ότι η T_3 ελαττώνει το κυτταρόχρωμα P-450 και έτσι και το μεταβολισμό του αλοθανίου.

Από την άλλη πλευρά, πολλές πειραματικές παρατηρήσεις, που είχαν εξηγηθεί μόνο από την άποψη της της μεταβολικής θεωρίας, μπορούν να εξηγηθούν με επιτυχία, με την υπόθεση της υποξίας.

Ηπατοτοξικότητα μέσω Ανοσολογικού Μηχανισμού

Οι ασθενείς με ηπατίτιδα από αλοθάνιο φαίνεται ότι παρουσιάζουν μια ποικιλία συμπτωμάτων, τα οποία δεν εμφανίζονται σε ασθενείς με ελα-φρύ τύπο ηπατικής βλάβης από αλοθάνιο, που δείχνουν ότι, ίσως, η τοξικότητα δημιουργείται μέσω ανοσολογικών μηχανισμών.[347-351]

Αυτά είναι ο πυρετός με καθυστέρηση, εξάνθημα, αρθραλγίες, ηωσινοφιλία και αύξηση των ανοσολογικών συμπλεγμάτων στον ορό και αυτοαντισώματα σε φυσιολογικά συστατικά των ιστών. Πολλοί ασθενείς με ηπατίτιδα από αλοθάνιο έχουν πάρει αλοθάνιο πολλές φορές και ο χρόνος που παρουσιάζουν συμπτώματα είναι αντιστρόφως ανάλογος με το διάστημα μεταξύ αναισθησιών, καθώς και την βαρύτητα ηπατικής βλάβης. Επιπλέον, οι ασθενείς

παρουσιάζουν κυτταρική και χυμική ανοσολογική ευαισθησία σε νέα αντιγόνα, δημιουργημένα από το αλοθάνιο.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας VIII) μπορούμε να δούμε ποιες μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για την έρευνα αντισωμάτων από αλοθάνιο.

Πίνακας VIII: Τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την έρευνα αντισωμάτων στην ηπατίτιδα από αλοθάνιο

Μέθοδος	Αντιγονικό test
Μετανάστευση Λεμφοκυττάρων	Ομογενοποιημένο ήπαρ
Έμμεσος Ανοσοφθορισμός (κυτταρική κυτταροτοξικότητα)	Απομονωμένα ηπατοκύτταρα (ηπατικά κύτταρα ποντικών)
Κυτταρική κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από αντισώματα ELISA	Απομονωμένα ηπατοκύτταρα
Ανοσοαποτύπωμα	Κλάσματα Ηπατικών κυττάρων (Κεκαθαρμένες πρωτεΐνες)
Ανοσοκαθίζηση	Κλάσματα Ηπατικών κυττάρων

Πρώτοι οι Vergani και συνεργάτες, το 1978, με μελέτες σε λεμφοκύττα-ρα, απέδειξαν ότι τα λευκά αιμοσφαίρια των ασθενών, όταν καλλιεργού-νται in vitro με αντιγόνα που υπάρχουν σε ομογενοποιημένα ηπατικά κύτταρα κουνελιών που πήραν αλοθάνιο, τότε μεταναστεύουν, αλλά αυτό δεν συμβαίνει με το ήπαρ των κουνελιών από την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, οι ίδιοι μελετητές απέδειξαν ότι ο ορός των ασθενών περιέχει IgG αντισώματα σε νέα αντιγόνα, που βρίσκονται στην επιφάνεια των ηπατικών κυττάρων σε ποντικούς και κουνέλια που πήραν αλοθάνιο.[349-352]

Η ανοσολογική ευαισθητοποίηση στα αντιγόνα που δημιουργήθηκαν από αλοθάνιο είναι ειδική στους ασθενείς που έχουν ηπατίτιδα από αλοθάνιο. Αυτή δεν παρουσιάζεται σε ασθενείς που πήραν αλοθάνιο χωρίς να αναπτύξουν ηπατική βλάβη ή σε ιογενή ηπατίτιδα που πήραν πρόσφατα αναισθησία με αλοθάνιο ή σε οποιαδήποτε άλλη νόσο του ήπατος.

Απομονωμένα ηπατικά κύτταρα κουνελιών που έχουν τα νέα αντιγόνα έδειξαν να είναι ευαίσθητα σε κυτταροτοξικό θάνατο, όταν τεθούν in vitro παρουσία αντισωμάτων ασθενών και φυσιολογικά ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Αυτά τα

ευρήματα υπαγορεύουν ότι υπάρχει ανοσολογι-κή απάντηση στο μηχανισμό της ηπατικής βλάβης σε ασθενείς in vivo.
Έχουν γίνει πολλές μελέτες για την φύση των αντιγόνων αυτών.
Τα δημιουργούμενα από αλοθάνιο αντιγόνα βρέθηκαν σε ήπαρ κουνελιών και ποντικών που πήραν αλοθάνιο in vivo και σε βιοψίες που πάρθηκαν από ήπαρ αναισθητοποιημένων με αλοθάνιο ασθενών, αλλά και σε απομονωμένα ηπατοκύτταρα που εκτέθηκαν σε αλοθάνιο in vitro.
Ανάλυση ιστών, που προέρχονται από ποντικούς που είχαν πάρει αλοθάνιο, έδειξε ότι τα αντιγόνα είναι ειδικά για το ήπαρ και υπάρχουν στα ηπατικά κύτταρα. Βιοχημικές και ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν ότι τα αντιγόνα είναι, ως επί το πλείστον, ενδοκυτταρικά στο ενδοπλα-σματικό δίκτυο ή στην επιφάνεια της ηπατοκυτταρικής μεμβράνης. Αναγνωρίσθηκαν δύο (2) διαφορετικά είδη αντιγόνων. Μια ομάδα αναγνωρίστηκε μόνο με ανοσοαποτύπωμα και είναι, ως επί το πλείστον, αντιγόνα των πρωτεϊνών της περιφερικής μεμβράνης. Η δεύτερη ομάδα αναγνωρίζεται με ενζυμική ανοσοαπορρόφηση (ELISA) αλλά όχι με ανοσοαποτύπωμα, και αυτά φαίνονται να είναι αντιγόνα των πρωτεϊνών ολόκληρης της μεμβράνης. Φαίνεται ότι αυτά τα αντιγόνα, που βρέθηκαν πολύ πρόσφατα, δείχνουν ότι το αλοθάνιο δημιουργεί επιτόπους, οι οποίοι έχουν ισχυρό προστατευτικό συστατικό και καταστρέφονται με σχετικά σκληρές συνθήκες κατά το ανοσοαποτύπωμα.[353-363]

Αντιγόνα που ανιχνεύονται με ανοσοαποτύπωμα

Τα αντιγόνα που ανιχνεύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα είναι πολυπεπτίδια που παρουσιάζουν υποομάδες από μοριακές μάζες, από 100, 82, 80, 63, 59, 58, 57 και 54kd, όταν αναλύονται με 12,σουλφοπολυακριλαμιδικό νάτριο (SDS), με gel ηλεκτοφόρηση κάτω από αναγωγικές συνθήκες και βρίσκονται στο ήπαρ κουνελιών, ποντικών και ανθρώπων που πήραν αλοθάνιο.Αυτά τα πολυπεπτιδικά αντιγόνα βρίσκονται in vitro, όταν ηπατικά μικροσωμικά κλάσματα ποντικών τεθούν να επωασθούν με αλοθάνιο κάτω από ορισμένες συνθήκες και όταν απομονωμένα ηπατικά κύτταρα ποντικών καλλιεργηθούν

παρουσία αλοθανίου. Η παρουσία τους σημαίνει οξειδωτικό μεταβολισμό του αλοθανίου σε τριφθοροακετύλ-χλωρίδιο, που ενώνεται ομοιοπολικά με πολυπεπτίδια διαμέσου ε-αμινι-κών ομάδων σε υπόλοιπα λυσίνης. Αυτή η ομάδα αντιγόνων αντιπροσω-πεύει την μεγαλύτερη CF_3CO-τροποποιημένη πρωτεΐνη, που βρέθηκε στα ηπατικά κύτταρα ποντικών που πήραν αλοθάνιο. Πειράματα που έχουν γίνει με ήπαρ ποντικών που πήραν επαγωγικές ουσίες και αλοθάνιο δείχνουν ότι ο μεταβολισμός του αλοθανίου από το κυτταρό-χρωμα P-450 ισοένζυμο-$2E_1$ (CYP_2E_1) είναι υπευθυνο για την δημιουργία αυτών των αντιγόνων. [364-366]

Στα αντιγόνα που αναγνωρίστηκαν με ELISA, βρέθηκε ότι υπεύθυνος για την δημιουργία τους είναι η τριφθοροακετυλίωση των πρωτεϊνών. Η εμφάνιση των αντιγόνων βρέθηκε ότι ελαττώνεται, όταν οι ποντικοί πήραν δευτέριο αλοθάνιο αντί αλοθανίου και η αντικατάσταση του δευτερίου έδειξε να ελαττώνει τον οξειδωτικό μεταβολισμό του αλοθανίου σε τριφθοροακετύλχλωρίδιο.

Όλα αυτά τα αντιγόνα, που ανιχνεύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα, βρέθηκαν και αποκαθάρθηκαν από ήπαρ ποντικών που πήραν αλοθάνιο. Η ανάλυση των καθαρών αυτών αντιγόνων sequencing αμινοξέων ή κλωνοποιημένο DNA, έδειξε ότι αυτά είναι CF_3CO-τροποποιημένοι τύποι πρωτεϊνών, που βρέθηκαν και από άλλους ερευνητές. Καμιά από αυτές τις πρωτεΐνες δεν λαμβάνει μέρος στο μεταβολισμό του αλοθανίου. Όλες είναι κοινές, άφθονες πρωτεΐνες μεμβρανών, που, φυσιολογικά, βρίσκονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και πάρα πολλές είναι γνωστές, μακράς διάρκειας ημιζωής πρωτεΐνες.

Λόγω του ότι το κυτταρόχρωμα P-450 αποτελείται από πρωτεΐνες ενωμένες με την μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου, είναι δυνατόν η CF_3CO-τροποποίησή των πρωτεϊνών να γίνεται σ'αυτά τα οργανίδια και δεν είναι πολύ ειδικό γεγονός.

Πίνακας IX: CF_3CO-τροποποιημένα πρωτεϊνικά αντιγόνα που αναγνωρίζονται με ανοσοαποτύπωμα

Πρωτεϊνικοί μεταφορείς	Υποομάδες (kD)
Ενδοπλασμίνες ER 99/GRP94	100
BiP/GRP94	82
ERp72	80

Καλτρετικουλίνη	63
Μικροσωμική καρβοξυλεστεράση(E.C.3.1.1.1)	59
Άγνωστη λειτουργία	58
Πρωτεϊνική δισουλφιδική ισομεράση (E.C. 5.4.3.1)	57

Αυτή η εξήγηση υποστηρίζεται από μελέτες που δείχνουν ότι η δημιουρ-γία των αντιγόνων είναι μια αργή διεργασία, με περίπου 6 ώρες μέσο όρο και ότι τα αντιγόνα, αφού δημιουργηθούν, έχουν πολλές ημέρες ζωής. Η ύπαρξη των αντιγόνων της επιφάνειας των ηπατοκυττάρων ίσως περιλαμ-βάνει την ροή των μεμβρανών από το ενδοπλασματικό δίκτυο στη πλα-σματική μεμβράνη δια εκκριτικής οδού. Αυτό συμβαίνει, λόγω του ότι η CF_3CO-τροποποίηση δημιουργεί διαταραχή στη δομή των πρωτεϊνών, που κανονικά κρατά αυτές στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Λόγω του ότι τα περισσότερα αντιγόνα που ανιχνεύθηκαν με ανοσοαπο-τύπωμα είναι πρωτεΐνες περιφερικών μεμβρανών, αυτά διαλύονται, όταν αφαιρούνται τα μικροσωμικά σφαιρίδια, χρησιμοποιώντας χαμηλές συγ-κεντρώσεις δεσοξυχολικού νατρίου, που δρά ως γαλάκτωματοποιητής στις in vitro συνθήκες.

Νέα Αντιγόνα

Μια νέα ομάδα αντιγόνων έχει βρεθεί πρόσφατα, η οποία αναγνωρίζεται με την τεχνική ELISA και η οποία βρέθηκε να είναι αδιάλυτη σε 0,1% δεσοξυχολικού νατρίου και διαλυτή σε 2% δεοξυχολικού νατρίου. Το νέο αυτό αντιγόνο δεν ανιχνεύεται με ανοσοαποτύπωμα, λόγω του ότι καταστρέφεται, όταν τα μικροσωμικά τμήματα υφίστανται βρασμό.[367-368] Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι:

1. Αυτά τα αντιγόνα είναι ολόκληρες πρωτεϊνικές μεμβράνες
2. Οι επίτοποι που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα ασθενών εξαρ-τώνται από την στερεοχημική δομή και καταστρέφονται σε μη φυσικές συνθήκες που δημιουργούνται κατά την SDS-PAGE (πολυακριλαμιδική ηλεκτροφόρηση σε γέλη) και το ανοσοαποτύπωμα.[369,370]

Τα νέα αυτά αντιγόνα φαίνονται να αφορούν μια επιπλέον ομάδα CF_3CO-τροποποιημένη ηπατική μικροσωμική πρωτεΐνη, που περιλαμβάνει υποομάδες μοριακών μαζών από περίπου 50κDa. Τα αντιγόνα μπορεί να περιέχουν επαγωγικά τροποποιημένους τύπους από το κυτταρόχρωμα P-450 $_2E_1$ και μικροσωμικά εποξείδια υδρολάσης. Αυτοαντισώματα, τα οποία αναγνωρίζουν αυτές τις πρωτεΐνες, έχουν ευρεθεί σε ορό από ασθενείς με ηπατίτιδα από αλοθάνιο[363,364] Έρευνες για τα ισοένζυμα τα οποία καταλύουν τον οξειδωτικό μεταβολισμό του αλοθανίου έχουν γίνει σε πολλά εργαστήρια. Φάνηκε ότι αυτή η διαδικασία μπορεί να αναστα-λεί in vivo, αν οι χειρουργικοί ασθενείς λάβουν δισουλφουράμη, που in vivo μετατρέπεται τον ισχυρό αναστολέα του CYP_2E_1 διεθύλδυοθειο-καρμπαμάτη. Επί πλέον, μελέτες in vivo που έγιναν σε μικροσώματα ποντικών και ανθρώπων και σε σειρές κυττάρων που εκφράζουν το ανθρώπειο CYP_2E_1, υποδηλούν ότι αυτό είναι ένα πρωταρχικό ανθρώπειο ηπατικό ισοένζυμο, που καταλύει την δημιουργία CF_3CO-πρωτεϊνικού αντιγόνου. Πειράματα, που έγιναν με σειρές κυττάρων από ηπατώματα ποντικών που εκφράζουν CYP_2E_1, έδειξαν, επιπλέον, ότι ένα μικρό τμήμα από το ολικό ηπατοκυτταρικό CYP_2E_1 εμφανίστηκε στην επιφάνεια των ηπατικών κυττάρων.

Το ισοένζυμο παίζει λοιπόν ένα διπλό ρόλο στο μηχανισμό της ηπατίτιδας από αλοθάνιο:

1. Το CYP_2E_1 καταλύει την δημιουργία CF_3CO-πρωτεϊνών
2. Η πρωτεΐνη καθίσταται επίτοπος της ηπατικής κυτταρικής επιφάνειας και προκαλεί την ανοσολογική απάντηση των ασθενών. Ενώ οι δραστη-ριότητες του CYP_2E_1 έχουν παρατηρηθεί να διαφέρουν στο ανθρώπινο πληθυσμό περισσότερο από 20 πτυχές (είδη), η δραστηριότητα του CYP_2E_1 έχει καθοριστικό ρόλο στην ηπατίτιδα από αλοθάνιο. Αυτό μπο-ρεί να εξηγήσει γιατί οι παχύσαρκοι ασθενείς έχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν ηπατίτιδα από αλοθάνιο και τείνουν να έχουν κακή πρόγνωση. Οι παχύσαρκοι έχουν αυξημένη δραστικότητα του CYP_2E_1.

Πρακτικά, φαίνεται ότι ο αληθινός μεταβολικός ευαίσθητος παράγων είναι η ισορροπία μεταξύ της βιομετατροπής από το CYP_2E_1 και της

αποτοξίνωσης του τριφλουοροακετύλχλωριδίου από τα κυτταρικά πυρηνόφιλα, όπως η γλουταθειόνη, της οποίας τα επίπεδα επίσης εμφανίζουν έντονη διαφοροποίηση μεταξύ των ατόμων.

Πίνακας Χ: Αντιγόνα που αναγνωρίστηκαν με την μέθοδο ELISA

Πρωτεΐνη	Υποομάδα (kDa)
Cytochrome P-450 $_2E_1$ (E.C. 1.14.14.1.)	52
Μικροσωμική υποξική υδρολάση (E.C. 4.2.1.63)	50

Αντισωματική απάντηση στα αντιγόνα του αλοθανίου

Η αντισωματική απάντηση στα διάφορα αντιγόνα από αλοθάνιο είναι πολύπλοκη. Περίπου το 70% του ορού από ασθενείς με ηπατίτιδα από αλοθάνιο περιέχουν αντισώματα σ' ένα ή δύο αντιγόνα, τα οποία μπορούν να ανιχνευθούν με ανοσοαποτύπωμα. Αυτά τα αντισώματα είναι ειδικά για τους ασθενείς με ηπατίτιδα από αλοθάνιο και η αναγνώρισή τους είναι μεγάλης διαγνωστικής αξίας. Οι ανοσοαποτυπωματικές μελέτες έδειξαν ότι τα αντισώματα αυτά αναγνωρίζουν επιτόπους που έχουν το CF_3CO-απτένιο, συν βασικά δομικά χαρακτηριστηκά από πρωτεΐνες. Επιπλέον μελέτες με ELISA, που χρησιμοποίησαν κεκα-θαρμένες ηπατικές πρωτεΐνες σαν αντιγόνα, έδειξαν ότι περισσότερο από 90% από τους ορούς περιείχαν αντισώματα σε μη CF_3CO-τροποποιημένους επιτόπους που βρίσκονται στην ίδια πρωτεΐνη. Είναι ενδεχόμενο αυτά τα αντισώματα να είναι αυτοαντισώματα, τα οποία αυξάνονται λόγω του ομοιοπολικού δεσμού της CF_3CO^- ομάδας που προκαλεί απώλεια της ανοχής των Τ-κυττάρων. Εχει βρεθεί ποικιλομορ-φία ως προς τα αντιγόνα μεταξύ των ατόμων. Η αιτία αυτής της ποικιλο-μορφίας είναι άγνωστη, καθώς άγνωστη είναι και η σημασία της.

Λεπτομερής ανάλυση των αντιγόνων της ομάδας που ανιχνεύθηκαν με ELISA και όχι με ανοσοαποτύπωμα, δεν έχει γίνει και πρέπει να γίνει καθαρισμός των σχετικών αντιγόνων στόχων. Όμως, μελέτες που έγιναν πρόσφατα με ορούς ασθενών υποδηλώνουν ότι αυτή η ομάδα αντιγόνων είναι σπουδαίος στόχος στην ανοσολογική απάντηση στο αλοθάνιο, σε ασθενείς με ηπατίτιδα από αλοθάνιο.

Μια επιπλέον σειρά από μελέτες με ELISA έδειξαν ότι το 70% των ορών των ασθενών με ηπατίτιδα από αλοθάνιο περιέχουν αντισώματα, τα οποία αναγνωρίζουν, αλλά με πολύ μικρή συγγένεια, το CF_3CO-απτένιο, το οποίο συνδέεται με μια άσχετη μη ηπατική πρωτεΐνη. Οι τιμές των αντισωμάτων εναντίον της CF_3CO-αλβουμίνης του ορού είναι πολύ χαμηλότερες των αντισωμάτων στις ειδικές CF_3CO-ηπατικές πρωτεΐνες.

Τελευταίως, έχουν αναγνωρισθεί με ανοσοαποτύπωμα σε ορούς από ασθενείς με ηπατίτιδα από αλοθάνιο αυτοαντισώματα εναντίον σειρών ολόκληρης από μη CF_3CO-τροποποιημένων ηπατικών πολιπεπτιδίων ανθρώπων, ξεχωριστών από τα CF_3CO-αντιγόνα. Αυτά τα αυτοαντισώμα-τα δεν εμφανίζονται σε ορούς ασθενών που είχαν πάρει αλοθάνιο, αλλά δεν ανέπτυξαν ηπατίτιδα, πράγμα που δείχνει ότι η παραγωγή τους είναι συνδεδεμένη με ανοσολογική απάντηση στους μεταβολίτες του αλοθα-νίου. In vitro μελέτες έδειξαν ότι και αυτά τα αντισώματα έχουν λόγο στην δημιουργία της ηπατικής βλάβης.

Ένα βασικό θέμα που πρέπει να λυθεί είναι, γιατί μόνο μια μικρή αναλογία ασθενών που πήραν αλοθάνιο δημιουργούν μια ανοσολογική απάντηση στα αντιγόνα που δημιουργούνται από τον μεταβολισμό του αλοθανίου σε CF_3COCl και παράγουν αντισώματα. Ίσως είναι υπεύθυνη κάποια διαφορά μεταξύ των ατόμων στα επίπεδα των δημιουργημένων αντιγόνων, που ίσως οφείλεται στα διαφορετικά επίπεδα του ηπατικού κυτταροχρώματος $P\text{-}450_3E_1$ ή και στις πρωτεΐνες-στόχος αυτές καθεαυτές ή σε ειδική ανοσολογική ανοχή, που φαίνεται να είναι υπεύθυνος.

Η φυσική ανοχή στα επιτόπια CF_3CO-τροποποιημένης πρωτεΐνης ίσως εξηγεί γιατί δεν έχει κατορθωθεί να παράγουμε μοντέλο ανοσοτροποποίησης στα ζώα, για βλάβη από αλοθάνιο στο ήπαρ.

Ένας άλλος δυναμικά ευαίσθητος παράγων είναι η ποικιλία στην υποκυτταρική μεταφορά της CF_3CO- πρωτεΐνης από τον τόπο της δημιουργίας (ενδοπλασματικό δίκτυο) στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Ογκογονίδια και Απόπτωση

Απόπτωση

Ο θάνατος ενός κυττάρου σε έναν πολυκύτταρο οργανισμό μπορεί να είναι τυχαίος ή προγραμματισμένος. Υπάρχουν πειραματικά δεδομένα, τα οποία υποστηρίζουν τη θέση ότι στα κύτταρα των σπονδυλωτών υπάρ-χει ένα "πρόγραμμα αυτοκτονίας", το οποίο ενεργοποιείται, όταν για κάποιο λόγο ο θάνατος ενός συγκεκριμμένου κυττάρου είναι επιθυμητός για το καλό της υπόλοιπης ομάδας κυττάρων. Ο μορφολογικός θάνατος αυτού του είδους είναι αυτός της απόπτωσης και όχι της νέκρωσης.[371,372]

Μέχρι τώρα, έχουν περιγραφεί δύο (2) είδη κυτταρικού θανάτου στους ιστούς των σπονδυλωτών. Η μία μορφή είναι η νέκρωση και η άλλη η απόπτωση.

1) Νέκρωση

Η νέκρωση αναφέρεται στο κυτταρικό θάνατο από μια ξαφνική και σοβα-ρή αιτία, όπως ισχαιμία, παρατετεμένη υπερθερμία ή έντονος φυσικός ή χημικός τραυματισμός. Ο θάνατος αυτός, συνήθως, αναφέρεται ως τυχαίος κυτταρικός θάνατος. Οι μεταβολές που συμβαίνουν στη νέκρωση είναι πρώιμες και αφορούν τη μορφολογία και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, με αποτέλεσμα το κύτταρο να χάνει την ικανότητα να διατηρεί την ομοιοστασία του. Η βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη είναι μεγάλη. Η κυτταρική μεμβράνη χάνει την ικανότητα να ρυθμίζει την ωσμωτική πίεση, με αποτέλεσμα να διογκώνεται και να διαλύεται. Το περιεχόμενο του κυττάρου διασπείρεται στούς ιστούς και γίνεται αφορμή να προκληθεί έντονη φλεγμονώδης αντίδραση.

2) Απόπτωση

Η απόπτωση είναι μιά μορφή κυτταρικού θανάτου σε μια διαδικασία λεπτομερέστερη και ευφυέστερη από αυτή της νέκρωσης. Συχνά, η απόπτωση εξισούται με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, αλλά είναι χρήσιμο να ξεχωρίσουμε τις δύο έννοιες, διότι η απόπτωση έχει περισσότερο μορφολογική έννοια, ενώ ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος εσχατολογική. Στα σπονδυλωτά ο κυτταρικός θάνατος γίνεται αποδεκτός, είναι σύνηθες

φαινόμενο, μπορεί να υπολογισθεί με υψηλή ακρίβεια, αλλά δεν είναι προγραμματισμένος, υπό την έννοια που ο κυτταρικός θάνατος μεμονωμένων κυττάρων των ασπόνδυλων είναι προγραμματισμένος και γνωστός από πριν. Είμαστε υποχρεωμένοι να δεχθούμε την καταφανώς παράδοξη κατάσταση, κατά την οποία ο θάνατος ενός κυττάρου μπορεί να είναι και προγραμματισμένος αλλά και απρόβλεπτος.

Ένας σημαντικός αριθμός φυσιολογικών λειτουργιών ρυθμίζεται με την διαδικασία της απόπτωσης. Οι πιό βασικές από αυτές είναι ο φυσιολογι-κός θάνατος και η αντικατάσταση του θανόντος κυττάρου λόγω γήραν-σης από νέα κύτταρα (γαστρεντερικό σύστημα). Η ιστική ατροφία λόγω της ορμονικής δράσης γίνεται με την διαδικασία της απόπτωσης, όπως η ατροφία του φλοιού των επινεφριδίων και του θύμου αδένα από την επίδραση των στεροειδών ορμονών. Επίσης, κυτταρικός θάνατος με την διαδικασία της απόπτωσης μπορεί να συμβεί από την έλλειψη ορμονών, όπως στην ατροφία του προστάτη από την ανεπάρκεια των ανδρογόνων, στην ατροφία του μαστικού αδένα κατά το στάδιο του θηλασμού, στην απόπτωση του ενδομητρίου κατά την έμμηνο ρύση και στο θάνατο των Τ-λεμφοκυττάρων, μετά την ανοσολογική απάντηση, λόγω έλλειψης της ιντερλευκίνης-2 (IL-2). Κυτταρικός θάνατος με απόπτωση είναι σύνηθες φαινόμενο κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, όπου τα ικανά και υγιή κύτταρα επιβιώνουν, ενώ τα άλλα αποπίπτουν. Το ίδιο συμβαίνει και με τα κύρια λεμφικά όργανα, τη συγχώνευση της δευτερογενούς υπερώας και τη δημιουργία των φαλάγγων των δακτύλων.

Η απόπτωση παρατηρείται επίσης σε περιπτώσεις τυχαίου θανάτου, όπως στην περίπτωση επίδρασης τοξικών ουσιών, χημικών, ισχυρής ακτινοβολίας, υπερθερμίας, υποθερμίας, που προκαλούν φυσική βλάβη, με αποτέλεσμα τη δευτερογενή ενεργοποίηση της απόπτωσης.[373]

Τέλος, προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος φαίνεται να είναι η κυριότερη αιτία θανάτου των Τ4-λεμφοκυττάρων από την προσβολή τους από τον ιό Η.Ι.V., ο νευρωνικός εκφυλισμός των ασθενειών Huntington, Parkinson και

Alzheimer, καθώς επίσης και η εκφύλιση και ο θάνατος των κυττάρων των νησιδίων του Langerhanς, του παγκρέατος.[374-376]
Ίσως, λοιπόν, η απόπτωση να είναι ο κυριότερος και συνηθέστερος τρόπος κυτταρικού θανάτου στη φύση.

Μηχανισμός πυροδότησης του κυτταρικού θανάτου με τη διαδικασία της απόπτωσης.

Ο λόγος για τον οποίο ένα κύτταρο πρέπει να πεθάνει διαφέρει από τόν ένα τύπο κυττάρου στόν άλλο, καθώς επίσης και το αποσταλέν μήνυμα για την ενεργοποίηση της διαδικασίας του θανάτου με απόπτωση. Συχνά, το μήνυμα προέρχεται από το περιβάλλον του κυττάρου (παρουσία ή απουσία κάποιας ορμόνης, αυξητικού παράγοντα ή την περίσσεια ή έλλειψη θρεπτικού υλικού του κυττάρου). Στην περίπτωση της απόπτωσης ο θάνατος του κυττάρου εξαρτάται από την δραστηριότητα ενός άλλου παράγοντα, που άλλες φορές βρίσκεται μέσα στο κύτταρο και άλλες φορές μακριά από αυτό.[377-379]
Υπάρχουν όμως ενδοκυττάριοι μοριακοί μηχανισμοί, οι οποίοι παραλαμβάνουν το εξωκυττάριο μήνυμα και συνεχίζουν την διαδικασία της απόπτωσης. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι:

α) Το ασβέστιο: Το ασβέστιο διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης, λόγω του ότι ενεργοποιεί το ένζυμο ενδονουκλεάση, που είναι υπεύθυνο για τον κατακερματισμό του DNA. Παράγοντες που αυξάνουν τα επίπεδα του ενδοπλασματικού Ca++,αυξάνουν το ρυθμό της απόπτωσης, ενώ παράγοντες που εμποδίζουν την αύξησή του, όπως αναστολείς των διαύλων ασβεστίου,μειώνουν τη δράση των ενδονουκλεασών και τον κυτταρικό θάνατο. Επίσης,αναστολείς της καλμοντουλίνης, αναστέλλουν τη δράση της ενδονουκλεάσης, διότι το σύστημα της αντλίας Ca^{++} στην πυρηνική μεμβράνη, που λειτουργεί με ενέργεια ATP, έχει ανάγκη την παρουσία της καλμοντουλίνης για να δράσει.[380,381]

β) Η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (c-AMP): Οι προσταγλανδίνες της σειράς E (PGE) αυξάνουν τα επίπεδα του c-AMP και άλλων χημικών παραγόντων που ενεργοποιούν τη δράση της ενδονουκλεάσης. Λόγω του ότι το

c-AMP δρα κυρίως στο επίπεδο αντιγραφής του γονιδίου, είναι πιθανόν μεταβολές στην έκφραση του γονιδίου mRNA-πρωτεΐνη να είναι υπεύθυνες για την απαρχή της απόπτωσης.[382]

γ) Η πρωτεϊνική κινάση (PKC) :

Η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης παίζει ανασταλτικό ρόλο επί της απόπτωσης των φυσιολογικών κυττάρων, ενώ η ενεργοποίησή της παίζει αποπτωτικό ρόλο επί των καρκινικών κυττάρων.Ανταγωνιστές του ενζύμου, όπως η αντλία Na^+/H^+, η ενδονουκλεάση αυτή καθ' εαυτή και η ενεργοποίηση του ογκογονιδίου Fas, αναστέλλουν τον προστατευτικό ρόλο της PKC στο κύτταρο.[383]

δ) Δευτερογενείς αγγελιοφόροι (Ρίζες οξυγόνου, NO και άλλα):

Σπουδαίοι δευτερογενείς αγγελιοφόροι είναι τα σφιγγολιπίδια και οι μεταβολίτες τους, που αναστέλλουν την πρωτεϊνική κινάση ή εμπλέκονται στη δράση των στεροειδών ορμονών, της ιντερφερόνης και του TNF, τα οποία ενεργοποιούν την απόπτωση.[384]

Άλλοι σπουδαίοι μεσολαβητές της απόπτωσης είναι οι ρίζες Οξυγόνου και το NO . Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου προκαλούν βλάβη στο DNA, με αποτέλεσμα την αναστολή συνθέσεως του ATP .Στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης προκαλούν οξείδωση των λιπιδίων και απόπτωση.

ε) Κασπάσες:

Τελευταίως, έχει δοθεί μεγάλη έμφαση στο ρόλο που παίζουν στην εκτέλεση της απόπτωσης ειδικές πρωτεΐνες, οι κασπάσες. Οι κασπάσες είναι πενταπεπτίδια, που έχουν απόλυτη ειδικότητα για το ασπαρτικό οξύ στην θέση P1.

Συντίθενται σαν ανενεργή προένζυμα, ενώνοντας ένα N-τελικό πεπτίδιο με μία μικρή και μία μεγάλη υποομάδα. Έχουν μέχρι τώρα απομονωθεί και ταξινομηθεί 10 ομάδες κασπασών. Η δραστηριοποίηση των κασπα-σών κατά την απόπτωση οδηγεί στον κατατεμαχισμό των κυτταρικών υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων και των πολυμερασών, ούτως ώστε να αρχίσουν οι δραματικές μορφολογικές αλλαγές της απόπτωσης. Φαίνεται ότι υπάρχει ιεραρχία στη σειρά με την οποία δραστηριοποιού-νται οι κασπάσες. Και

φαίνεται ότι η κασπάση Νο 8 και ίσως η κασπάση Νο 10 είναι στην κορυφή της αποπτωτικής πυραμίδας.[385]

στ) Έκφραση γονιδίων :

Σημασία στη διαδικασία της απόπτωσης έχει η έκφραση γονιδίων που πυροδοτούν την απαρχή της διαδικασίας ή την αναστολή της. Για κάθε κύτταρο που οδηγείται σε απόπτωση υπάρχουν διάφορες οδοί ενεργοποίησης της διαδικασίας αυτής. Η ενεργοποίηση του άξονα εκτέλεσης του κυττάρου είναι διαφορετική για κάθε τύπο κυττάρου. Όταν όμως ενεργοποιηθεί ο τελικός μηχανισμός κυτταρικού θανάτου, η οδός είναι η ίδια για όλους τους τύπους κυττάρων.[386]

Μεταβολές στη μορφολογία και λειτουργία του κυττάρου στην απόπτωση

Οι κυτταρικές μεταβολές στη διαδικασία της απόπτωσης είναι πολλα-πλές, αλλά ακόμα δεν γνωρίζουμε ποια απ' όλες οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο ή ποιά από όλες είναι η σημαντικότερη .

Υπάρχουν μεταβολές στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία γίνεται κυματοειδής και φυσαλιδώδης, σε σχέση με το φαινόμενο της νέκρωσης, όπου το κύτταρο διογκώνεται και η κυτταρική μεμβράνη διατείνεται. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ζύμωση, διότι μοιάζει με την εμφάνιση της ζύμωσης του μούστου. Αυτό οδηγεί στον κατακερματισμό του κυττάρου σε δεκάδες μικρά σωματίδια, τα λεγόμενα αποπτωτικά, τα οποία όμως περικλείονται από κυτταρική μεμβράνη, η οποία διατηρεί τις ωσμωτικές διαφορές μεταξύ του εντός και εκτός αυτής χώρου. Έτσι, δέν υπάρχει διαφυγή ενδοκυττάριου περιεχόμενου στο περιβάλλον, όπως συμβαίνει με την νέκρωση και γι' αυτό δεν δημιουργείται φλεγμονή των γύρω ιστών. Είναι πιθανόν τα αποπτωτικά σωματίδια να διατηρούν ανέπαφη την κυτταρική τους μεμβράνη κάτω από την επίδραση ορισμένων ενζύμων, όπως των τρανσγλουταμινασών

Όσον αφορά τις μεταβολές σε κυτταροπλασματικό επίπεδο, τα κύτταρα τα οποία υφίστανται την διαδικασία της απόπτωσης συστέλλονται και

στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρουσιάζουν ένα συμπυκνωμένο κυτταρόπλασμα. Τα διάφορα οργανίδια, μιτοχόνδρια, σωμάτιο Golgi, ενδοπλασματικό δίκτυο κ.τ.λ., αν και είναι συμπυκνωμένα, δεν χάνουν το φυσιολογικό τους σχήμα. Αυτό ίσως να γίνεται, λόγω του ότι το κύτταρο χάνει συγχρόνως νερό και ιόντα ισοωσμωτικά. Μέχρι τώρα, δεν έχουν παρατηρηθεί ιδιαίτερες βλάβες στα κυτταροπλασματικά οργανίδια αλλά μόνο διόγκωση των δεξαμενών του ενδοπλασματικού δικτύου [371]
Σε βιοχημικό επίπεδο, το κύτταρο, ταχύτατα, ελαττώνει τη σύνθεση του RNA και των πρωτεϊνών, καταστρέφοντας τις ήδη υπάρχουσες, αλλά αυτό που δεν γνωρίζουμε είναι ποια είναι η χρονική περίοδος κατά την οποία συμβαίνουν αυτά.[371]
Όσον αφορά τις μορφολογικές μεταβολές που συμβαίνουν στον πυρήνα, ίσως είναι ο χώρος των πιο εντυπωσιακών αλλαγών κατά την διάρκεια της απόπτωσης.
Οι μεταβολές αυτές έχουν μελετηθεί με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μεταβίβασης. Ο πυρήνας συστέλλεται πάρα πολύ, η χρωματίνη γίνεται πυκνή, κατακερματίζεται σε πολλά σωματίδια, τα οποία παίρνουν διάφο-ρα σχήματα, μπαλώματα ημισεληνοειδή, που είναι ισχυρά προσκολλημέ-να στην πυρηνική μεμβράνη. Τελικό αποτέλεσμα είναι ο κατακερματι-σμός του πυρήνα, μαζί με την κατεστραμμένη χρωματίνη, σε ένα ή περισσότερα σφαιρικά σωματίδια. Ακολουθεί κατακερματισμός του DNA σε ασύμμετρα τμήματα με διπλή έλικα. Έτσι, δημιουργούνται περισσότερα απο ένα εκατομμύριο (1.000.000) τμήματα DNA σε κάθε αποπτωτικό κύτταρο, διεργασία που δεν μπορεί να επισκευασθεί απο τους πυρηνικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA και η οποία έχει σαν αποτέλεσμα το τέλος της αντιγραφής του. Δεν υπάρχει, παρ'όλα αυ-τά, ομοφωνία, για τον ακριβή ρόλο που το κατεστρεμμένο DNA διαδρα-ματίζει στην τελική κυτταρική καταστροφή. Πιθανόν άλλες διαδικασίες, ταχύτερες από τον κατακερματισμό του DNA, επισυμβαίνουν μέσα στο κύτταρο και ίσως μια από αυτές να είναι το κρίσιμο σημείο στην απόπτωση.

Ρυθμιστικά γονίδια της απόπτωσης

Ο έλεγχος της απόπτωσης ασκείται με την έκφραση ενός συνεχώς αυξανόμενου αριθμού γονιδίων με προϊόντα παρόμοιας δομής και λειτουργίας, καλά διατηρημένα κατά την εξέλιξη των οργανισμών. Ορισμένα από αυτά έχουν επαγωγική δράση και άλλα ανασταλτική.

Στον πίνακα XI μπορούμε να δούμε ορισμένα ρυθμιστικά γονίδια για τα επιμέρους στάδια της απόπτωσης, όπως θα τα δούμε παρακάτω.

Στο πρώτο στάδιο της απόπτωσης το κύτταρο δέχεται το εξωτερικό, αρχικό σήμα, που μπορεί να είναι, εκτός των άλλων, αυξητικός παράγων ή ορμόνη. Χαρακτηριστικά, αναφέρονται τα μέλη της οικογένειας του TGF-β, η αντιμυλλέρειος ορμόνη, τα γλυκοκορτικοειδή.[387]

Στο δεύτερο στάδιο, ενδοκυττάρια μόρια μεσολαβούν για την μεταγωγή του σήματος στον πυρήνα και τον έλεγχο της μεταγραφής. Μεταγωγείς του σήματος, μεταγραφικοί παράγοντες και πρωτεΐνες ελέγχου του κυτταρικού κύκλου συμμετέχουν μάλλον σ'αυτή τη διαδικασία.[388]

Το τρίτο στάδιο αφορά στην εκτέλεση του αποπτωτικού προγράμματος. Στην διαδικασία εμπλέκονται πρωτεάσες, νουκλεάσες και άλλες πρωτεΐνες, απαραίτητες για τον κατακερματισμό του κυττάρου.[389]

Στο τελευταίο στάδιο, τα αποπτωτικά σωμάτια φαγοκυτταρώνονται και αποδομούνται απο τα μακροφάγα. Στη διεργασία της φαγοκυττάρωσης συμβάλλουν μόρια αναγνώρισης - υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης των αποπτωτικών σωματίων ή και των φαγοκυττάρων, ενώ στην αποδόμηση συμμετέχουν επιπλέον πρωτεάσες και νουκλεάσες, συμπικιτίνες ή άλλες καταβολικές πρωτεΐνες.

Πίνακας XI: Ρυθμιστικά γονίδια της απόπτωσης.

Επαγωγικά	Ανασταλτικά	Παράγοντες μεταγραφής
bax	bcl-2	p53
bcl-x2	bcl-xl	c-myc
bak	mcl-1	waf-1/cip 1
bad	A1	E2F
Nbk	ced-9	c-fos
ced-3	BHRF-1	jun
ced-4	LMW5	Fas/Fas ligand
lce	bcl-w	cdc25
lch-2/TX/lce rel II	ElB-19K	ces-2
lce rel III/ TY	CrmA	

CPP32 lch-1/Nedd-2 Mch-2 Mch-3/ICE-LAP3	lch-L5 p35 lceε	

Εκτός από τα μόρια που παίρνουν μέρος στίς τέσσερεις βασικές βαθμίδες της απόπτωσης, υπάρχουν και γονιδιακά προϊόντα που προστατεύουν το κύτταρο από την απόπτωση. Δεν γνωρίζομε όμως, ακόμη, σε ποιο ακριβ-ώς σημείο της αποπτωτικής οδού λειτουργούν. Μπορούμε να τα δούμε στον πίνακα. XI [390,391]

Ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 και απόπτωση

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 κωδικοποιεί μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη 393 αμινοξέων, που ανακαλύφθηκε το 1979 από τους Linzer-Levine και Crawford, σε εξαλαγέντα, από τον ιό SV 40, κύτταρα τρωκτικών, ως σύμπλοκο με την Τ-ογκοπρωτεΐνη του ιού[392]. Επειδή το Τ-αντιγόνο είναι απαραίτητο για την διατήρηση του εξαλλαγέντος φαινο-τύπου, υποστηρίχθηκε, καταρχήν, ότι και η p53 παίζει ρόλο "κλειδί" την καρκινική εξαλλαγή και χαρακτηρίστηκε ως καρκινικό αντιγόνο. Αργότερα, η εισαγωγή του κλωνοποιημένου γονιδίου p53, μαζί με το ενεργοποιημένο γονίδιο ras σε καλλιέργεια ινοβλαστών, οδήγησε στην ανάπτυξη εστιών εξαλλαγής[393]. Αυτό επέτρεψε το χαρακτηρισμό του ως ογκογονίδιου. Εντούτοις, αργότερα, διαπιστώθηκε οτι το p53 δρα ως ογκογονίδιο, μόνον όταν έχει υποστεί μεταλλαγή[394]. Το 1989 αποδείχτηκε ότι ο φυσικός τύπος του γονιδίου παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική αύξηση και καταστέλλει την καρκινική εξαλλαγή που προκαλλούν άλλα ογκογονίδια.Έκτοτε, καθιερώθηκε ως ογκοκατασταλτικό ογκογονίδιο[395]. Όμως, σε αρκετούς όγκους στον άνθρωπο,παρατηρείται συχνά αναστολή του γονιδίου. Στους μηχανισμούς που εμπλέκονται σ' αυτή την αδρανοποίηση του p53, περιλαμβάνονται ελλείψεις ή σημειακές μεταλλαγές, υπερέκφραση της MDM-2 και δημιουργία συμπλόκων με ιογενείς πρωτεΐνες .

Η πιό σπουδαία ανακάλυψη για το γονίδιο p53 είναι η δράση του μετά από βλάβη του DNA. Στα κύτταρα που έχουν ακτινοβοληθεί ή υποστεί την επίδραση της ακτινομυκίνης D, το γονίδιο ενεργοποιείται και η προκαλούμενη

υπερέκφραση του φυσικού τύπου της πρωτεΐνης p53 σταματά τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1[396]. Τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου μπορεί να ακολουθήσει:α) αποκατάσταση της βλάβης και διατήρηση της γενετικής σταθερότητας, β)απόπτωση των κυττάρων. Το αποτέλεσμα εξαρτάται από το βαθμό της βλάβης και το στάδιο του κύκλου κατά το οποίο γίνεται, την ύπαρξη μεταλλαγών σε άλλα στοιχεία του μηχανισμού ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου ή την ευαισθησία ορισμένων κυττάρων στην απόπτωση, ως μέρους της φυσιολογικής τους ανάπτυξης και ωρίμανσης[397].

Η έκφραση του φυσικού τύπου της p53 μπορεί να προκαλέσει απόπτωση και στα καρκινικά κύτταρα που έχουν ακτινοβοληθεί, αλλά, συνήθως, ο κυτταρικός κύκλος συνεχίζεται, επειδή συνυπάρχουν και άλλες μεταλλαγές, που επιτρέπουν τη διαφυγή από τον έλεγχο της p53 [398] . Κύτταρα που έχουν εξαλλαγεί και στερούνται της φυσικής μορφής της p53 λόγω έλλειψης ή μεταλλαγής, συνεχίζουν τον κυτταρικό κύκλο και περνούν στη φάση S. Στα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν παρατη-ρούνται επιπλέον μεταλλαγές, είτε λόγω διπλασιασμού του DNA που έχει υποστεί τη βλαπτική επίδραση της ακτινοβολίας είτε λόγω διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων πριν από την αποκατάσταση της βλάβης. Η παράταση της επιβίωσης και ο πολλαπλασιασμός αυτών των κυττάρων οδηγεί σε αύξηση των μεταλλαγών, γενετική αστάθεια και μεγαλύτερη πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής[399]. Η εισαγωγή του φυσικού γονιδίου σε καρκινικά κύτταρα προκαλεί διακοπή του πολλαπλασιασμού αυτών και αποκατάσταση του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι η p53 είναι ο κύριος ρυθμιστής της διακοπής του κυτταρικού κύκλου μετά από καταστροφή του DNA[400].

Ο Lane πρότεινε ένα μοντέλο, στο οποίο η p53 δρά σαν ένας μοριακός φρουρός, υπεύθυνος για την γενετική σταθερότητα[401]. Στα φυσιολογικά κύτταρα με κανονική διαίρεση, η p53 μπορεί να μην είναι απαραίτητη, αλλά σε κύτταρα που έχουν υποστεί τη δράση βλαπτικών παραγόντων στο DNA, η p53 δραστηριοποιείται και, με την προκαλούμενη διακοπή του κύκλου, δίνεται η δυνατότητα στο κύτταρο να επανορθώσει την βλάβη. Ο ρόλος αυτός της p53, ως πρωτεΐνης επείγουσας ανάγκης, που κινητοποιείται μόνο σε περίπτωση

κρίσης, συμφωνεί και με το γεγονός ότι τα ποντίκια που στερούνται της p53 αναπτύσσονται κανονικά[402]. Κατά την ομαλή πορεία της εμβρυϊκής ανάπτυξης, οι περιπτώσεις καταστρο-φής του DNA περιορίζονται στο ελάχιστο. Ωστόσο, η τάση των ζώων αυτών να αναπτύσσουν όγκους σημαίνει ότι η έλλειψη της πρωτεΐνης επηρεάζει την ικανότητά τους να ανθίστανται στην καρκινογένεση. Το ερώτημα είναι, με ποιο τρόπο ο φυσικός τύπος της p53 διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο. Η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης δίνει μερικά στοιχεία, δεδομένου ότι αποτελείται από ένα όξινο αμινοτελικό άκρο και ένα εξόχως βασικό καρβοξυτελικό τμήμα, παρόμοια δηλαδή με αυτά που έχουν ορισμένες ρυθμιστικές πρωτεΐνες της μεταγραφής. Το αμινο-τελικό τμήμα αλλά και ολόκληρη η p53 έχουν την ιδιότητα να ενεργο-ποιούν την μεταγραφή ορισμένων γονιδίων, που περιέχουν τουλάχιστον δύο (2) αντίγραφα από συγκεκριμένο στοιχείο 10-ζευγών βάσεων της αλληλουχίας του DNA. Η πρωτεΐνη p53 συνδέεται με αυτό το στοιχείο και προκαλεί τη μεταγραφική ενεργοποίηση του αντίστοιχου γονιδίου[403]. Η σύνδεση της p53 με ανάλογο στοιχείο σύνδεσης του γονιδίου bcl-2, καταστέλλει την έκφρασή του in vivo και in vitro[404]. Τότε, η υφιστάμενη αναλογία μεταξύ bcl-2 και bax εκτρέπεται προς όφελος της bax, με συνέ-πεια την απόπτωση.

Σε μια ομάδα κυτταρικών και ιογενών υποκινητών που στερούνται του ειδικού στοιχείου σύνδεσης, η p53 εμποδίζει τη μεταγραφή. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται οι υποκινητές του MDR-1 (Multidrug-Resistance), του c-fos και της β-ακτίνης[405]. Σε ορισμένες περιπτώσεις, έχει επίσης αναφερθεί ότι η p53 αναστέλλει τη μεταγραφή μικροσκοπικών υποκινητών που περιέχουν μόνο την αλληλουχία TATA. Συνεπώς, η διακοπή της αύξησης, που προκαλείται από την p53, οφείλεται στην ταυτόχρονη ενεργοποίηση και καταστολή επιλεγμένων ομάδων γονιδίων, που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Μεταξύ των γονιδίων που διαθέτουν το συγκεκριμένο στοιχείο σύνδεσης με την p53, περιλαμβά-νονται τα MDM-2 (Murine Double Minute-2), Waf-1/cip-1, προϊόν του οποίου είναι η p21[406].

Από πρόσφατα δεδομένα, συνάγεται ότι η p53, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου, μπορεί να επάγει την απόπτωση με δύο (2) μηχανισμούς:

Ο πρώτος εξαρτάται από τη μεταγραφή και αδρανοποιείται από την πρωτεϊνοσύνθεση και τους μεταγραφικούς αναστολείς.
Ο δεύτερος ενεργοποιείται από την πρωτεϊνοσύνθεση και τους αναστολείς της μεταγραφής[407].

Πρωτεΐνη Waf/ p 21

Το προϊόν του Waf-1/cip- 1 είναι η πρωτεΐνη p 21, η οποία συνδέεται με τίς κινάσες που εξαρτώνται από την κυκλίνη και αναστέλλουν την δράση τους και, επομένως, σταματά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό[408]. Αυτό εξη-γείται, αν ληφθεί υπ΄όψιν ότι οι περισσότερες κινίνες συγκεντρώνονται σε συμπλέγματα μεταξύ των οποίων είναι και η p21. Ο βασικός ρόλος της p 21 είναι ο συντονισμός της δράσης των κυκλινών με τις διεργασίες διπλασιασμού του DNA κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου[409]. Στην περίπτωση επίδρασης για το DNA βλαπτικών παραγόντων, τα επίπεδα της p 53 αυξάνουν, με αποτέλεσμα την επαγωγή της p 21 και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου.

Οικογένεια bcl-2

Με την ανακάλυψη ότι το πρωτοογκογονίδιο bcl-2 έχει τη μοναδική ιδιό-τητα μεταξύ των ογκογονιδίων να προάγει την ογκογένεση, αναστέλ-λοντας, μάλλον, την απόπτωση, παρά ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του μοριακού ελέγχου της από-πτωσης. Το bcl-2 ενεργοποιείται κατά τη χρωμοσωματική αντιμετάθεση t (14;18)(q32;q21), που παρατηρείται στον άνθρωπο στα λεμφώματα Β-κυττάρων[410]. Στα διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν την αντιμετάθεση, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 ακολουθείται από παράταση της επιβίωσης των μικρών Β-λεμφοκυττάρων και λεμφοϋπερπλαστική αδενοπάθεια, συνδυαζόμενη, συχνά, με αντιμετάθεση και του c-myc[411].
Η πρωτεΐνη bcl-2 έχει μοριακό βάρος 26 kDa, κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα 18 και εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτο-χονδρίων, τις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και του πυρήνα, οι οποίες είναι και θέσεις παραγωγής ενεργών ειδών οξυγόνου (Reactive Oxygen Speciew,

ROS)[412]. Η bcl-2 δεν φαίνεται να επηρεάζει τη δημιουργία ελεύθερων ριζών οξυγόνου, εμποδίζει όμως την οξειδωτική βλάβη των στοιχείων του κυττάρου, περιλαμβανομένης και της λιποστιβάδας των μεμβρανών. Τα ζώα, στα οποία η έκφραση της πρωτεΐνης έχει κατασταλεί, συμπληρώνουν την ανάπτυξή τους και έχουν φυσιολογική, σχετικά, αιμοποίηση, αλλά παρουσιάζουν μαζική απόπτωση των λεμφοκυττάρων στο σπλήνα και στο θύμο[413]. Επιπλέον, παρουσιάζουν δύο (2) παθολογικές εικόνες, που συνδέονται, πιθανώς, με την οξείδωση, την πολυκυστική νόσο των νεφρών και την υπόχρωση του τριχώματος[412].

Στην οικογένεια των bcl-2 σχετικών γονιδίων περιλαμβάνονται τα bax, bc-x, bad, A1 και mcl-1, bac, bcl-w, ced-9. Στον πίνακα XII περιλαμβά-νονται τα γονιδιακά προϊόντα των μελών της οικογένειας bcl-2 και η λειτουργία αυτών[407]. Η ομοιότητα μεταξύ των πρωτεϊνών είναι μεγαλύτερη σε δύο τμήματα, τα BH_1 και BH_2. Επιπλέον, υπάρχει ένα υδρόφοβο,

Πίνακας XII Μέλη της οικογένειας Bcl-2 και λειτουργία αυτών.

Γονιδιακό προϊόν	Λειτουργία
bcl-2	Αναστέλλει την απόπτωση, συνδέεται με τίς bax και bak
bcl-x	Η μορφή L αναστέλλει την απόπτωση, ενώ η μορφή S την επιταχύνει. Συνδέεται με τις bax και bak
bcl-w	Αναστέλλει την απόπτωση
bax	Επιταχύνει την απόπτωση. Συνδέεται με τις bcl-2, bcl-xL, E1B 19K
bak	Επιταχύνει την απόπτωση πλην της κυτταρικής σειράς EBV. Συνδέεται με τις bcl-2, bcl-x, E1B 19K
mcl-1	Αναστέλλει την απόπτωση
A1	Παρόμοιας δομής με την bcl-2. Το A1 ομοιάζει πρός τα γονίδια άμεσης επαγωγής.
bad	Επιταχύνει την απόπτωση, συνδέεται με τις bcl-2, bcl-xL
Nbk, BiK1	Επιταχύνει την απόπτωση, Συνδέεται με τις bcl-2, bcl-xL, E1B 19K, BHRF1
ced-9	Ομόλογη της bcl-2 στα κύτταρα του C. elegans
ASFV LMW5	Ομόλογη της bcl-2 στον ιό ASF (African Swine Fever)
EBV BHRF1	Ομόλογη της bcl-2 στον ιό EB (Epstein-Barr)
E1B 19K	Ομόλογη της bcl-2 πρωτεΐνης του αδενοϊού E1B, αναστέλλει την απόπτωση κατά την φλεγμονή και την εξαλλαγή

καρβοξυλικό τμήμα, υπεύθυνο για την σύνδεση των πρωτεϊνών στην, πρός το κυτταρόπλασμα, πλευρά της μεμβράνης. Από την ανάλυση των μεταλλαγών

της bcl-2 διαπιστώνεται ότι, για την λειτουργία της καταστο-λής της απόπτωσης, απαιτούνται και τα δύο τμήματα BH, ενώ το υδρόφο-βο τμήμα δεν είναι απαραίτητο.

Τρόπος δράσης της bcl-2

Υπάρχουν πολλά μοντέλα τα οποία έχουν προταθεί, για να εξηγήσουν τον τρόπο με τον οποίο η bcl-2 αναστέλλει την απόπτωση. Είναι πιθανό να παρεμβαίνει αμέσως ή εμμέσως στη λειτουργία ή την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών που εκπέμπουν τα αποπτωτικά σήματα. Πράγματι, διαπι-στώθηκε ότι η p53 αναστέλλει την απόπτωση που προκαλείται στα κύτ-ταρα του θύμου από το φυσικό τύπο της p53. Τα κύτταρα που εκφράζουν συγχρόνως την bcl-2 και την p53 παραμένουν εν ζωή, αλλά λόγω της p53, έχουν σταματήσει στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου[414,415]. Ωστόσο, η σύγχρονη έκφραση του bcl-2 και του c-myc ανταγωνίζεται τη δράση της p53 και επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό αυτών.

Λόγω της εντόπισης της bcl-2 στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχον-δρίων, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η πρωτεΐνη προστατεύει από την απόπτωση, μεταβάλλοντας τη μιτοχονδριακή λειτουργία. Όμως, σε κυτταρικές σειρές που έχουν προέλθει από μεταλλαγή και στερούνται μιτοχονδριακού DNA και, συνεπώς, λειτουργικής αναπνευστικής αλυσίδας, τα κύτταρα συνεχίζουν να προστατεύονται από την απόπτωση, με υπερέκφραση της bcl-2[416] .

Επειδή η bcl-2 εντοπίζεται και στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου, μπορεί να ελέγχει τη ροή των Ca^{++}, δεδομένου ότι, σε ορισμένα κύτταρα, παρατηρείται κατά την απόπτωση απελευθέρωση Ca^{++} από το ενδοπλασματικό δίκτυο[417]. Κατά παρόμοιο τρόπο, η υπερέκφραση της bcl-2 στα κύτταρα που εξαρτώνται από την IL-3, αναστέλλει την απόπτωση και εμποδίζει την ελάττωση της συγκέντρωσης Ca^{++} που παρατηρείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο μετά τη στέρηση της IL-3. Όμως, μελέτες σε μια κυτταρική σειρά νευρικών κυττάρων έδειξαν ότι δεν απαιτείται αύξηση των ελευθέρων Ca^{++} για την απόπτωση και ότι η bcl-2 εμποδίζει την απόπτωση, ανεξάρτητα αν αυτή επάγεται από αύξηση ή όχι της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{++}.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Απόπτωση ονομάζουμε τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, ο οποί-ος είναι μιά ειδική μορφή κυτταρικού θανάτου, διαφορετική από την νέ-κρωση σε πολλά μορφολογικά και βιοχημικά επίπεδα. Η απόπτωση είναι ένα φυσιολογικό κυτταρικό φαινόμενο, που εξαρτάται από την έκφραση γονιδίων ικανών να διεγείρουν ή να την αναστείλουν. Αλλά η απόπτωση μπορεί επίσης να διεγερθεί από πολλούς εξωτερικούς παράγοντες και έχει περιγραφεί σε πολλές νόσους.[371] Οι μορφολογικές αλλαγές που συμβαίνουν στην απόπτωση περικλείουν κατακερματισμό της χρωματίνης, αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας και της πυκνότητας του πυρήνα και διάσπαση του κυττάρου σε πολλά αποπτωτικά σωματίδια, τα οποία περικλείονται από κυτταρική μεμβράνη.[388,389] Αυτές οι αλλαγές επηρεάζονται από βιοχημικές
αλλαγές, όπως η δραστηριοποίηση ειδικών υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης, ενδοκυττάρια ενζυμικά συστήματα, αύξηση του ενδοκυτ-τάριου Ca^{++}, αύξηση των ενδοκυττάριων οξειδωτικών και δραστηριο-ποίηση διαφορετικών γονιδίων, όπως p53, Fas /Fas ligand, apo 1, c-myc, bcl-2, TRPM-2.[380,381,387]

Οι διαφορετικές συνθήκες στις οποίες εμφανίζεται απόπτωση υπαγο-ρεύουν ότι οι μηχανισμοί, όπου έχουμε δραστηριοποίηση απόπτωσης -έκφρασης γονιδίων, είναι διάφοροι[390].

Όπως συμβαίνει σε άλλα κύτταρα, απόπτωση εμφανίζεται και στα ηπατικά κύτταρα, καταρχήν στη φάση της ανάπτυξης και, αργότερα, για την ανανέωση των ηπατοκυττάρων.[371]

Το αλοθάνιο είναι ένας αλογονωμένος αναισθητικός παράγων, που χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη από το 1958. Η χρήση του συνδέ-θηκε με την εμφάνιση μετεγχειρητικής ηπατίτιδας σε μικρό αριθμό ασθενών.[319] Υπεύθυνος φαίνεται να είναι ένας ενδιάμεσος μεταβολίτης Πιστεύεται ότι δημιουργείται μια ανοσολογική απάντηση σε ένα σύμπλεγμα μεταβολίτου - πρωτεΐνης, που δρα σαν αντιγόνο.

Υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι και η απόπτωση είναι ένας πιθανός μηχανισμός κυτταρικού θανάτου κατά την αναισθησία με αλοθάνιο.[326,349,418]
Τα κύτταρα του Kupffer, δηλαδή τα μόνιμα μακροφάγα του ήπατος, μπορούν να ενεργοποιηθούν από πολυσακχαρίδια και άλλα ερεθίσματα και να παράγουν κυτταροκίνες. Μεταξύ των άλλων, ο TNFa μπορεί να προκαλέση απόπτωση στα ίδια τα κύτταρα του Kupffer, που αναγνωρίζεται με την μέθοδο TUNEL[419]. Δεν έχει καλά μελετηθεί, μια πιθανή δράση των κυττάρων του Kupffer στην απόπτωση των ηπατοκυττάρων.Υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι τα μακροφάγα, συμπεριλαμβανομένων και των κυττάρων του Kupffer, ρυθμίζουν την βιωσιμότητα και την αύξηση των κυττάρων, που με την σειρά τους ρυθμίζουν τον κυτταρικό θάνατο.[420-422]
Χρησιμοποιήσαμε εμβόλιο BCG και PVP (πολυβινύλπυρρολιδόνη) για να διεγείρουμε ή να καταστείλουμε τα κύτταρα του Kupffer αντιστοίχως,[423,424] προκειμένου να ερευνήσουμε αν η διέγερση ή η καταστολή των κυττάρων του Kupffer ενέχεται στην ηπατοκυτταρική βλάβη με τον μηχανισμό της απόπτωσης, σε επίμυες που είχαν λάβει αναισθησία με αλοθάνιο.

Αντικείμενο της διατριβής

Σκοπός της παρούσης διατριβής ήταν να μελετηθεί η πιθανή δράση του αλοθανίου επί της αποπτώσεως των ηπατοκυττάρων και των κυττάρων των κολποειδών σε επίμυες, κατόπιν καταστολής ή διέγερσης των κυττάρων του Kuppfer.

Υλικό - Μέθοδος:

1) Πειραματόζωα

Υλικό της μελέτης απετέλεσαν 30 ενήλικες επίμυες γένους Wistar, βάρους 250 γραμμαρίων περίπου έκαστος, που χωρίστηκαν σε έξι (6) ομάδες, από πέντε (5) επίμυες εκάστη. Τα πειραματόζωα είχαν ελεύθερη λήψη τροφής και νερού όλο το χρονικό διάστημα των δέκα (10) εβδομά-δων που διήρκεσε η μελέτη. Ζούσαν σε μεταλλικά κλουβιά, σε κλιματι-ζόμενο χώρο, σε συνθήκες κανονικού ημερησίου κύκλου.

2) Υλικά

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε Πολυβινύλ-πυρρολιδόνη (PVP 40) (SIGMA Chemical Company), ουσία υπεύθυνη για την καταστολή των κυττάρων του Kupffer[423],η οποία εχορηγείτο ενδοπεριτοναϊκώς σε δόση 250 mg, διαλυμένη σε 3 ml φυσιολογικού ορού, με βελόνη 27 G.

Για την διέγερση των κυττάρων του Kupffer[424] χρησιμοποιήθηκε Εμβόλιο BCG (0,1 ml) για ενδομυϊκή χορήγηση, το οποίο προμηθευτήκαμε δωρεάν, κατόπιν αιτήσεώς μας, από την Νομαρχία Ανατολικής Αττικής, Τμήμα Υγιεινής.

Χρησιμοποιήθηκε επίσης πτητικό αναισθητικό αλοθάνιο, προκειμένου να λάβουν αναισθησία οι επίμυες. Για τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις χρησιμοποιήθηκαν τα μονοκλωνικά αντισώματα κατά της bcl-2(DAKO), της Waf/p21 (DAKO) και του p53 (ONGOGENE) και το αντίσωμα X-902 (DAKO).

Για την μέθοδο TUNEL,[425] όλα τα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από την εταιρεία Boehringer Menheim.Όλα τα χημικά αντιδραστήρια ήταν της Εταιρείας Sigma.

3) Καθορισμός της MAC (Ελαχίστη Κυψελιδική Συγκέντρωση)

Καθορίστηκε η MAC του αλοθανίου για τους δικούς μας επίμυες με τον εξής τρόπο: αφού έμειναν χωρίς τροφή από την προηγούμενη ημέρα , όλα μαζί τοποθετήθηκαν στο κουτί από plexiglass και τους χορηγήθηκε αναισθησία με αλοθάνιο και 0_2 σε δύο (2) διαφορετικές πυκνότητες 2% και 1%, για 15 λεπτά εκάστη[426-428.] Στην πυκνότητα 2%, περισσότερα από τα μισά πειραματόζωα,20 στον αριθμό, δεν αντέδρασαν στο επώδυνο ερέθισμα που τους προκαλέσαμε, δηλαδή στην πίεση της ουράς για ένα ολόκληρο λεπτό με μία λαβίδα, ενώ στην πυκνότητα του 1% δεν αντέδρασαν 10 πειραματόζωα. Έτσι, καθορίσαμε ότι η MAC των δικών μας πειραματοζώων είναι περίπου 1,5%.

Για την χορήγηση αναισθησίας χρησιμοποιήθηκε μηχάνημα αναισθη-σίας τύπου BOC,το οποίο ανήκε στο Ερευνητικό Κέντρο "Θ.Γαροφαλί-δης" του Νοσοκομείου ΚΑΤ Κηφισιάς, όπου και έγινε το πείραμα.

Το μηχάνημα προσαρμόστηκε για χορήγηση αναισθησίας με αλοθάνιο 1 MAC (1,5 %) και 2 Litr. 0_2 για διατήρηση της MAC, με 0_2 98,5% περίπου και για μισή ώρα. Το αλοθάνιο χορηγήθηκε με εξατμιστήρα τύπου Fluotec 3.Οι

επίμυες ετοποθετούντο σε ένα κουτί από Plexiglass διαστάσεων 40x30x30 cm, πάνω στο οποίο υπήρχαν τρείς (3) οπές
(Φωτογ. 1/σελ.143). Η μία χρησίμευε για την παροχή των αναισθητικών αερίων, η δεύτερη για την απομάκρυνση των αναισθητικών αερίων και η τρίτη για την εφαρμογή του αναλυτή εισπνεόμενης συγκέντρωσης 0_2, τύπου Criticon, ούτως ώστε να είμαστε σίγουροι ότι δεν είχαμε ποτέ υποξικό μείγμα.Η συγκέντρωση του 0_2 στο κουτί του plexiglass εκυμαίνετο μεταξύ 50%-55% ώστε δεν είχαμε υποξικό μείγμα.

4) Καταστολή και διέγερση των κυττάρων του Kupffer

Για την καταστολή των κυττάρων του Kupffer εχρησιμοποιήθη πολυβινυλπυρρολιδόνη(PVP) για ενδοπεριτοναική χορήγηση. Για την διέγερση εχορηγήθη εμβόλιο BCG ενδομυικώς.

Πρωτόκολλο Μελέτης

<u>Ομάδα 1</u> (ΑΛΟΘΑΝΙΟ και ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΟΡΟΣ): Οι επίμυες ελάμ-βαναν αναισθησία για μισή ώρα με αλοθάνιο (1MAC). Μόλις οι επίμυες είχαν αναισθητοποιηθεί, εχορηγούντο ενδοπεριτοναϊκά 3 ml Φυσιολογι-κού ορού 0,9%, με βελόνη 27G.

<u>Ομάδα 2</u> (PVP): Οι επίμυες, αμέσως μόλις επέρχετο η αναισθησία με 1 MAC αλοθανίου, ελάμβαναν 250mg PVP 40 ενδοπεριτοναϊκά και ανένη-πταν χωρίς να χορηγηθεί αλοθάνη για μισή ώρα **(Φωτογ. 2/σελ. 143).**

<u>Ομάδα 3</u> (PVP + ΑΛΟΘΑΝΙΟ): Οι επίμυες ελάμβαναν αλοθάνη 1 MAC, όπως και προηγουμένως και ενδοπεριτοναϊκά 250 mg PVP 40 (Πολυβι-νύλ-Πυρρολιδόνη) διαλυμένο σε 3 ml φυσιολογικού ορού 0,9% με βελό-νη 27G. Εν συνεχεία, ανέπνεαν αλοθάνιο επί μισή ώρα.

<u>Ομάδα 4</u> (BCG): Οι επίμυες, αμέσως μόλις επέρχετο η αναισθησία με 1MAC αλοθανίου, ελάμβαναν ενδοδερμικώς 0,1ml εμβολίου BCG στο γλουτιαίο μυ του ενός από τα οπίσθια άκρα , με βελόνη 27G και ανένηπταν χωρίς να χορηγηθεί αλοθάνιο για μισή ώρα.

<u>Ομάδα 5</u> (BCG + ΑΛΟΘΑΝΙΟ): Οι επίμυες ελάμβαναν αλοθάνιο 1MAC για μισή ώρα. Μόλις είχαν αναισθητοποιηθεί, εχορηγείτο 0,1ml εμβολί-ου BCG ενδομυϊκά στον γλουτιαίο μυ του ενός από τα οπίσθια άκρα , με βελόνη 27G. Εν συνεχεία, ανέπνεαν αλοθάνιο επί μισή ώρα.

<u>Ομάδα 6</u> (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΟΡΟΣ): Στην ομάδα αυτή οι επίμυες ελάμβανον ενδοπεριτοναϊκά 3 ml φυσιολογικού ορού και δεν αναισθητοποιούντο περαιτέρω.

Το πείραμα διήρκεσε 10 εβδομάδες και οι ομάδες των πειραματοζώων ελάμβαναν την ανωτέρω αγωγή μία φορά εβδομαδιαίως.

Στο τέλος των δέκα (10) εβδομάδων οι επίμυες θυσιάστηκαν υπό αναισθησία με αλοθάνιο και το ήπαρ χωρίστηκε σε τέσσερα μέρη:

1. Ένα τμήμα για απλό μικροσκόπιο
2. Ένα τμήμα για ηλεκτρονική μικροσκοπία
3. Ένα τμήμα για ανοσοϊστοχημεία.
4. Ένα τμήμα για ιστοχημεία TUNEL

1. Προετοιμασία για Απλό Μικροσκόπιο

Στο απλό μικροσκόπιο, αφού έγινε μονιμοποίηση του ιστού σε 10% φορμαλδεύδη και έγκλειση του ιστού σε παραφίνη κατά την κλασική μέθοδο, έγιναν τομές και χρώσεις ως εξής:

α. Χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη

β. Χρώση δικτυωτών ινών (ρετικουλίνης)

γ. Χρώση P.A.S.

δ. Χρώση P.A.S.-Διαστάση

ε. Χρώση Masson τριχρωμική

ς. Χρώση Perl

2. Προετοιμασία για Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο

Το τμήμα του ιστού που μελετήθηκε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο υπέ-στη την ακόλουθη διεργασία,για μονιμοποίηση και έγκλειση σε ρητίνες.

α. Γλουταραλδεύδη 2,5%, σε ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού νατρίου, με pH 7,5, για μία ώρα.

β. Πλύσιμο με ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού νατρίου, για 10 min.

γ. Τετροξείδιο του οσμίου 1% σε διάλυμα κακοδυλικού νάτρίου 0,05 M pH 7,5, για μία ώρα.

δ. Πλύσιμο με ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού νατρίου, για 10 min και για δύο (2) φορές.

ε. Κατόπιν, τοποθέτηση σε 30%, 50%, 70%, 90% αιθανόλη, για 10 min η κάθε μία.

ς. Στη συνέχεια, 100% αιθανόλη για 10 min και για δύο (2) φορές.

ζ. Μείγμα 1:1 100% αιθανόλη: ρητίνη για μία ώρα.

η. Μείγμα 1:3 100% αιθανόλη: ρητίνη περισσότερο από μία νύχτα (overnight), σε περιστροφικό αναδευτήρα.

Την επόμενη ημέρα:

i. Τοποθέτηση σε καθαρή ρητίνη 30 min για 5 φορές.

ii. Στρώση του δείγματος σε καθαρή ρητίνη και επώαση σε κλίβανο 60^0C για 16 ώρες.

3. Ανοσοϊστοχημεία

Στο τμήμα του ιστού που μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά για την έκφραση των πρωτεινών που σχετίζονται με την απόπτωση,ακολουθήθηκε η παρακάτω σειρά:

Οι τομές παραφίνης που ελαμβάνοντο από τον κύβο παραφίνης ετοποθετούντο σε ξηρό κλίβανο με αέρα στους 37°C, για περισσότερες από 16 ώρες. Στη συνέχεια, αφήνονταν για μία (1) ώρα στούς 56°C.

Ακολουθούσε:

1) Στάδιο πλήρους αποπαραφίνωσης και ενυδάτωσης:

α) Εμβάπτιση σε ξυλόλη για 5 λεπτά (τρία μπάνια)

β) Κατιούσα Εμβάπτιση στο οινόπνευμα: Εμβάπτιση τρεις (3) φορές στα ακόλουθα διαλύματα οινοπνεύματος

α) 100% , για 5 λεπτά

β) Τρεις (3) εμβαπτίσεις σε 96%

γ) Μία (1) εμβάπτιση σε 80%

δ) Μία (1) εμβάπτιση σε 70%

Αμέσως μετά, επλένοντο με νερό βρύσης για 2-3 λεπτά.

2) Μικροκύματα: Αμέσως μετά, ετοποθετούντο στο φούρνο μικροκυμά-των στα 500 Watt, εμβαπτισμένα σε διάλυμα κιτρικού νατρίου ph 6, για 5 λεπτά και για τρεις φορές. Μεταξύ εκάστης φοράς, αφήνονταν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

3) Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε το αντίσωμα X-902 (Rabbit Serrum), για να εξουδετερώσει τη μη ειδική χρώση από ενδογενείς ανοσοσφαιρίνες, αραιωμένο με 1:20 TBS (Tris Buffer Saline). Ακολούθησε επώαση με τα ειδικά αντισώματα ως εξής:

p-53: Αραίωση 1/100 σύν BSA 1% . Ακολουθούσε επώαση μίας (1) ώρας και διπλή ενίσχυση ως εξής :

Z 259(1/25) + BSA (5%) για 30 min και πλύσιμο με TBS

D 625 (1/25) + BSA (5%) για 30 min και πλύσιμο με TBS

Z 259(1/25) + BSA (5%) για 10 min και πλύσιμο με TBS

D625 (1/25) + BSA (5%) για 10 min και πλύσιμο με TBS

Z259 (1/25) + BSA (5%) για 5 min και πλύσιμο με TBS

D 625(1/25) + BSA (5%) για 5 min και πλύσιμο με TBS

Ακολουθούσε τοποθέτηση στην αλκαλική φωσφατάση για μισή ώρα, ξέπλυμα με άφθονο νερό βρύσης, πέντε (5) εμβαπτίσεις στην αιματοξυ-λίνη και καλυπτρίδα με μία σταγόνα γλυκερίνης.

Bcl-2: Αραίωση 1/20-30 σύν BSA 1%. Ακολουθούσε επώαση στο πλακί-διο για δύο (2) ώρες, ξέπλυμα σε TBS τρεις (3) φορές από πέντε (5) λεπτά και διπλή ενίσχυση ως εξής:

Z 259(1/25) + BSA (5%) επώαση για 30 min και πλύσιμο με TBS

D651(1/25) + BSA (5%) επώαση για 30 min και πλύσιμο με TBS

Z259(1/25) + BSA (5%) επώαση για 10 min και πλύσιμο με TBS

D651(1/25) + BSA (5%) επώαση για 10 min και πλύσιμο με TBS

Z259(1/25) + BSA (5%) επώαση για 5 min και πλύσιμο με TBS

D651 (1/25) + BSA (5%) επώαση για 5 min και πλύσιμο με TBS

Ακολουθούσε τοποθέτηση στην αλκαλική φωσφατάση για μισή ώρα, ξέπλυμα με άφθονο νερό βρύσης, εμβάπτιση στην αιματοξυλίνη και τοποθέτηση καλυπτρίδας με γλυκερίνη.

Waf/p21: Αραίωση 1/25 συν BSA 1%. Ακολουθούσε επώαση για μία ώρα και διπλή ενίσχυση, όπως προηγουμένως. Κατόπιν, ετοποθετείτο σε αλ-καλική φωσφατάση για μισή ώρα και γινόταν ξέπλυμα με άφθονο νερό βρύσης, εμβάπτιση στην αιματοξυλίνη και σκέπασμα με καλυπτρίδα γλυκερίνης.

Σε όλα τα ανωτέρω, γινόταν ποσοτική έκφραση δια μετρήσεως 400 ηπα-τοκυττάρων (200 περί τα πυλαία διαστήματα και 200 περί την κεντρική φλέβα) και προσδιοριζόταν το ποσοστό επί τοις % των θετικών κυττάρων.

4)Ιστοχημεία TUNEL

Τομές παραφίνης επεστρώθησαν σε πλάκες super frost plus (Fisher scientific, Pittsburgh PS)[425]. Οι τομές αποπαραφινοποιήθηκαν με εμβάπτιση στην ξυλόλη και, ακολούθως, σε διαδοχικές αραιώσεις αλκοόλης, όπως προηγουμένως. Κατόπιν πλύθηκαν και επωάσθηκαν με πρωτεϊνάση Κ 20 μg/ml γιά 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε ξέπλυμα και αποκλεισμός της

ενδογενούς υπεροξειδάσης, με επώαση σε 2% υπεροξειδίου του υδρογόνου, για 5 λεπτά. Ακολούθησε επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 6,6, που περιέχει 200 mM κακοδυλικού καλίου, βόεια λευκωματίνη 0,25 mg/ml, EDTA 0,2 mM και 25mM Tris -HCl, για 10 λεπτά. Οι τομές εν συνεχεία επωάστηκαν σε 37°C για 90 λεπτά, με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, στο οποίο προσετέθη 1mM χλωριούχο κοβάλτιο(1mM), τελική τρανσφεράση (0,5u/μl) και τριφοσφωρική διγοξιγενίνη-11-δεοξυουριδίνη (d UTP 0,4μM). Η αντίδραση ετερματί-σθη με διάλυμα 300 mM χλωριούχου νατρίου, 30 mM κιτρικού νατρίου και οι τομές πλύθηκαν σε νερό. Ακολούθησε πλύσιμο σε διάλυμα 2 % βοείου λευκωματίνης και, κατόπιν, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα,pH 7,5. Η διάκριση της ενσωματωμένης διγοξιγενίνης -11-dUTP επε-τεύχθη με την επώαση των τομών με Fab τμήματα αντι-διγοξιγενικών αντισωμάτων συνεζευγμένων με υπεροξειδάση,σε αραίωση αντισώματος 1:300. Τα αντισώματα ήσαν διαλελυμένα σε 25 mM Tris-HCL, ρυθμιστι-κό διάλυμα pH 7,5,που περιείχε 150 mM χλωριούχου νατρίου. Η επώαση εγένετο σε θερμοκρασία δωματίου επί 30 λεπτά. Οι τομές πλύθηκαν εν συνεχεία πρώτα σε νερό και μετά σε 0,1 M οξεικό ρυθμιστικό διάλυμα pH 6 και εκτέθηκαν σε διάλυμα 1% διαμινοβενζιδίνης για 20 λεπτά, του οποίου η παρασκευή εγένετο αμέσως προ της χρώσεως. Ακολουθούσε χρώση με εμβάπτιση σε διάλυμα methyl green ή αιματοξυλίνης και τοποθέτηση καλυπτρίδας μετά την αφυδάτωση των τομών. Ως θετικοί μάρτυρες εχρησιμοποιούντο τομές κατεργασμένες με DNAση σε συγκέντρωση 1mg /ml, που είχαν σαν αποτέλεσμα όλα τα κύτταρα να χρώννυνται θετικά. Στους αρνητικούς μάρτυρες παρελεί-πετο είτε η τελική τρανσφεράση είτε η διγοξιγενίνη-dUTP. Ακολουθούσε μέτρηση 400 τουλάχιστον ηπατοκυττάρων (200 περιπυ-λαίων και 200 περί την κεντρική φλέβα) και ο αριθμός των θετικών κυττάρων ανά 100 κύτταρα εξεφράζετο ως δείκτης απόπτωσης (%).

Ποσοτική εκτίμηση δεν ήταν δυνατή για τα κύτταρα των κολποειδών, δεδομένου ότι δεν υπάρχει χρώση ικανή να αναδείξει όλα τα κύτταρα των κολποειδών. Ως εκ τούτου, η εκτίμηση ήταν ημιποσοτική και η απόπτωση εχαρακτηρίσθη ως ήπια(↑), μετρία(↑↑) ή μεγάλη(↑↑↑).

5) Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με την δοκιμασία Χ2 και Fisher's exact test για την σύγκριση των αποπτωτικών δεικτών μεταξύ των διαφορετικών ομάδων, χρησιμοποιώντας την ομάδα Ι σαν ομάδα ελέγχου, δεδομένου ότι τα ευρήματά της ήσαν απολύτως όμοια με την ομάδα που είχαν λάβει μόνον φυσιολογικό ορρό. Τα αποτελέσματα της ομάδας αυτής,χάριν ευκρινείας, παραλείπονται από τούς πίνακες των αποτελεσμάτων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΑΠΛΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

<u>Ομάδα 1</u>: ΑΛΟΘΑΝΙΟ + ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΟΡΟΣ

Άφθονα ηπατοκύτταρα με μικροκενοτοπιώδη εκφύλιση, αραιά διπύρηνα κύτταρα, απουσία κυττάρων με ηωσινόφιλο πρωτόπλασμα, κύτταρα Kupffer φυσιολογικά (όχι υπερτροφικά)

PAS διαστάση: Αραιά θετικά κύτταρα,Ρετικουλίνη και τριχρωμική: εντός των φυσιολογικών ορίων.Perl =αρνητική

<u>Ομάδα 2</u>: PVP

Διπύρινα άφθονα κύτταρα, υπερτροφικά κατά τόπους κύτταρα του Kuppfer. Αραιά κύτταρα με ηωσινόφιλο πρωτόπλασμα και διαταραχές του πυρήνα, πιθανόν αποπτωτικά. Ελαχίστη κενοτοπιώδης εκφύλιση. Κύτταρα του Kupffer: Κατά τόπους περιέχοντα κοκκία PVP **(Εικόνα 1 σελ.144)**

Perl: Αρκετά θετικά μακροφάγα στα πυλαία διαστήματα, κοκκία σιδή-ρου σε αρκετά κύτταρα του Kupffer **(Εικόνα 1 - σελ. 144)**

Φυσιολογική χρώση ρετικουλίνης **(Εικόνα 2 - σελ. 144)**

<u>Ομάδα 3</u>: PVP + ΑΛΟΘΑΝΙΟ

Όλα τα κύτταρα με κενοτοπιώδη εκφύλιση, **(Εικόνα 3 - σελ. 145),** άφθο-να διπύρηνα, αρκετά με ηωσινόφιλο πρωτόπλασμα. Perl: Λιγότερος Fe μέσα σε κύτταρα. Kupffer κύτταρα με κοκκία PVP **(Εικόνα 4 - σελ. 145)** Υπερτροφικά κύτταρα του Kupffer. Ρετικουλίνη φυσιολογική **(Εικόνα 5 - σελ. 146)**

<u>Ομάδα 4 :</u> BCG

Άφθονος κενοτοπιώδης εκφύλιση ηπατοκυττάρων, άφθονα διπύρηνα κύτταρα.Perl: Σίδηρος μέσα στα κύτταρα των κολποειδών.

Ρετικουλίνη: φυσιολογική. Τριχρωμική χρώση: χωρίς ευρήματα

<u>Ομάδα 5</u>: BCG + ΑΛΟΘΑΝΙΟ

Άφθονα κύτταρα με κενοτοπιώδη εκφύλιση.Perl:Απολύτως αρνητικά ηπατοκύτταρα και κύτταρα του Kupffer.Ρετικουλίνη,τρίχρωμη: Φυσιολο-γικά.Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα εμφανίζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1
ΑΠΛΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

κύτταρα	ΟΜΑΔΑ (1) **HALOTHANE + ΦΥΣΙΟΛΟ -ΓΙΚΟ ΟΡΟ**	ΟΜΑΔΑ (2) **PVP**	ΟΜΑΔΑ (3) **HALOTHANE + PVP**	ΟΜΑΔΑ (4) **BCG**	ΟΜΑΔΑ (5) **HALOTHANE + BCG**
ηπατο-κύτταρα με μικρο-κενοτο-πιώδη εκφύλιση	Αρκετά - Κατά τόπους	Ελαχίστη κατά τόπους - κατά τόπους κεντρο-λοβιακή	Όλα	Άφθονα	Άφθονα
διπύρηνα	αραιά	ελάχιστα	άφθονα	άφθονα	αραιά
με ηωσι-νόφιλο πρωτό-πλασμα	απουσία	αραιά	αρκετά	απουσία	απουσία
κύτταρα Kupffer	φυσιολο-γικά	υπερτροφι-κά κατά τόπους	Υπερτροφι-κά, με κοκ-κία PVP	φυσιολο-γικά	φυσιολο-γικά
κύτταρα Kupffer PAS διαστάση	θετικά	θετικά	θετικά	θετικά	θετικά
Ρετικου-λίνη	ουδέν	ουδέν	ουδέν	ουδέν	Φυσιολογι-κός ινώδης ιστός στα κολποειδή
Perl	ουδέν	Αρκετά θετικά - Κύτταρα κολποειδών θετικά για κοκκία σιδήρου	Αρνητική	Κύτταρα κολποειδών θετικά για κοκκία σιδήρου	Αρνητική
χρωμική τρι-	ουδέν	Υπερτροφι-κά κύτταρα κολποειδών με κοκκία PVP	Κενοτο-πιώδης εκφύλιση	ουδέν	Φυσιολογι-κός ινώδης ιστός στα κολποειδή

2. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

<u>Ομάδα 1</u>: ΑΛΟΘΑΝΙΟ + ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΟΡΟΣ

Φυσιολογικός χώρος Disse, με ελάχιστες ίνες συνδετικού ιστού (βέλη). Διακρίνονται οι προσεκβολές των ενδοθηλιακών κυττάρων **(Εικόνα 6 - σελ. 147).**

<u>Ομάδα 2</u>: PVP

Εικόνα 7 (σελ. 147). Φυσιολογικό κολποειδές. Διακρίνονται ενδοθηλια-κό κύτταρο με τις προσεκβολές του (κεφαλές βελών) και κύτταρο Kupffer (μεγάλο βέλος). Ερυθρό αιμοσφαίριο εντός του κολποειδούς.

Εικόνα 8 (σελ. 148). Αύξηση του συνδετικού ιστού εντός του χώρου του Disse (βέλη).

Εικόνα 9 (σελ. 148). Κύτταρο Ito υφιστάμενο απόπτωση (βέλη). Ο πυρή-νας έχει διαλυθεί και η μεμβράνη υφίσταται λύση σε πολλαπλά σημεία.

<u>Ομάδα 3</u>: PVP + ΑΛΟΘΑΝΙΟ

Εικόνα 10 (σελ. 149). Μεγάλη αύξηση συνδετικού ιστού εντός του κολποειδούς (βέλη).Πολλαπλά ηπατοκύτταρα υφιστάμενα απόπτωση **<u>Ομάδα 4</u>: BCG**

Εικόνα 11 (σελ. 149). Φυσιολογικό ηπατοκύτταρο και κολποειδές. Άφθονα μιτοχόνδρια εντός του ηπατοκυττάρου (μικρά βέλη).Πυρήνας με φυσιολογική πυρηνική μεμβράνη και χρωματίνη. Προσεκβολές ενδοθηλιακού κυττάρου κατά μήκος του κολποειδούς (κεφαλές βελών).

Εικόνα 12 (σελ. 150). Ηπατοκύτταρο υφιστάμενο απόπτωση. Διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης σε πολλαπλά σημεία(βέλη). Οι συνεκτικοί δεσμοί διατηρούνται ακόμη.

<u>Ομάδα 5</u>: BCG + ΑΛΟΘΑΝΙΟ

Εικόνα 13 (σελ 150). Κύτταρο του Ito ή λιποκύτταρο. Διακρίνονται τα κοκκία λίπους που αποταμιεύουν τη βιταμίνη Α (βέλη).

Εικόνα 14 (σελ.151). Ηπατοκύτταρο υφιστάμενο απόπτωση. Η μεμβράνη του ηπατοκυττάρου έχει διασπασθεί (κεφαλές βελών). Διατηρείται ακόμη συνεκτικός δεσμός.

Εικόνα 15 (σελ. 151). Ηπατοκύτταρο υφιστάμενο απόπτωση. Ο πυρήνας έχει υποστεί συρρίκνωση με ομογενοποίηση της χρωματίνης, δημιουργία εισολκών (μεγάλα βέλη) και έχει δημιουργηθεί περιπυρηνική άλως (μικρά βέλη).

Εν συνόψει, πέραν των κυττάρων με χαρακτηριστικά αποπτώσεως,που παρουσιάζονται ιδιαιτέρως συχνά στίς ομάδες με PVP και αλοθάνιο ή BCG και αλοθάνιο(πίνακας 3) το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκαλύπτει σημαντική αύξηση του συνδετικού ιστού εντός του χώρου του Disse, στις ομάδες όπου τα κύτταρα του Kupffer έχουν υποστεί καταστολή από PVP **(Εικόνες 8 - σ. 148 και 10 - σ. 149).**

3. ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Tunel

<u>Ομάδα 1</u>: ΑΛΟΘΑΝΙΟ + ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΟΡΟΣ

Θετικά κύτταρα στα πυλαία διαστήματα.Ολίγα θετικά κύτταρα χοληφόρων και μερικά θετικά λεμφοκύτταρα στα πυλαία διαστήματα. Αρκετά θετικά κύτταρα κολποειδών **(Εικόνα 16 Μικρά βέλη - σελ. 152).** Διάσπαρτα αραιά θετικά ηπατοκύτταρα **(Εικόνα 16 κεφαλές βελών-σελ. 152).**Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 5±1,2% SD.

<u>Ομάδα 2</u>: PVP

Κατά περιοχές αρκετά θετικά ηπατοκύτταρα, ενώ στις περισσότερες πε-ριοχές είναι αρνητικά. Κύτταρα κολποειδών πολλαπλά θετικά **(Εικόνα 17 - σελ. 152).** Στην εικονιζόμενη περιοχή σχεδόν όλα τα κύτταρα των κολποειδών είναι θετικά και όλα τα ηπατοκύτταρα είναι αρνητικά. Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 1±0,2% SD.

Σε περιοχές που τα κύτταρα των κολποειδών είναι θετικά, τα ηπατοκύτ-ταρα είναι αρνητικά και αντιστρόφως.

<u>Ομάδα 3</u>: PVP + ΑΛΟΘΑΝΙΟ

Αφθονότατα θετικά ηπατοκύτταρα. **(Εικόνα18 - σελ. 153).** Θετικά κύττα-ρα χοληφόρων **(Εικόνα 19 - σελ. 153),** κύτταρα κολποειδών αρνητικά. Αριθμός θετικών κυττάρων 45±17% SD($p<0,01$)

<u>Ομάδα 4</u>: BCG

Κύτταρα χοληφόρων θετικά **(Εικόνα 20 - σελ. 154),** σπάνια ηπατοκύττα-ρα θετικά. Στην εικόνα αυτή τα ηπατοκύτταρα είναι αρνητικά. Κύτταρα κολποειδών αρνητικά **(Εικόνα 21 - σελ. 154).**

Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 3,1±1,3% SD

<u>Ομάδα 5</u>: BCG + ΑΛΟΘΑΝΙΟ

Κατά περιοχές άφθονα θετικά ηπατοκύτταρα **(Εικόνα 22 - σελ. 155).** Θετικά κύτταρα χοληφόρων. Αρκετά θετικά κύτταρα κολποειδών .

Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 15±7,2% SD($p<0,05$)

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα φαίνονται στούς πίνακες 2 και 3.

Πίνακας 2

Tunel

κύτταρα	ΟΜΑΔΑ (1) **HALOTHANE + ΦΥΣΙΟΛΟ-ΓΙΚΟ ΟΡΟ**	ΟΜΑΔΑ (2) **PVP**	ΟΜΑΔΑ (3) **HALOTHANE + PVP**	ΟΜΑΔΑ (4) **BCG**	ΟΜΑΔΑ (5) **HALOTHANE + BCG**
ηπατικά	Διάσπαρτα, αραιά θετικά	Σε περιοχές που τα κύτ-ταρα των κολποειδών είναι θετικά, τα ηπατο-κύτταρα είναι αρνητικά και αντιστρό-φως.	Αφθονό-τατα, θετικά	σπάνια θετικά	Κατά περιοχές άφθονα θετικά
κολποειδών	Αρκετά θετικά	πολλαπλά θετικά	αρνητικά	αρνητικά	Αρκετά θετικά
χοληφόρων	θετικά	αραιά θετικά	θετικά	θετικά	θετικά

Πίνακας 3

κύτταρα	ΟΜΑΔΑ (1) **HALOTHANE +**	ΟΜΑΔΑ (2)	ΟΜΑΔΑ (3) **HALOTHANE**	ΟΜΑΔΑ (4)	ΟΜΑΔΑ (5) **HALOTHANE**

	ΦΥΣΙΟΛΟ-ΓΙΚΟ ΟΡΟ	**PVP**	**+ PVP**	**BCG**	**+ BCG**
ηπατικά	**5 ±1,2%**	**1±0,2%**[1]	**45±17%**[2]	**3±1,3%**[1]	**15±7,2%**[3]
κολποειδών	+	↑↑↑	-	-	↑
χοληφόρων	+	+	+	+	+

[1] **Δεν ήταν στατιστικά σημαντικό**

[2] **p<0,01**

[3] **p<0,05**

4. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Bcl-2

<u>Ομάδα 1</u>: ΑΛΟΘΑΝΙΟ + ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΟΡΟΣ

Κυτταροπλασματική έκφραση της πρωτεΐνης. Διάσπαρτα κατά τόπους θετικά ηπατοκύτταρα, κύτταρα χοληφόρων ασθενώς θετικά, κύτταρα κολποειδών αρνητικά **(Εικόνες 23 - σ.155 και 24 - σ.156).**

Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 6±2,1% SD

<u>Ομάδα 2</u>: PVP

Κυτταροπλασματική έκφραση της πρωτείνης. Αφθονότατα ηπατοκύτ-ταρα, εντόνως θετικά γύρω από κεντρικές φλέβες. Στο υπόλοιπο λοβίο διάσπαρτα θετικά κύτταρα. Κύτταρα κολποειδών ελάχιστα θετικά **(Εικόνα 25 - σελ. 156).** Κύτταρα χοληφόρων ασθενώς θετικά.

Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 14±3,3% SD ($p<0,05$).

<u>Ομάδα 3</u>: PVP + ΑΛΟΘΑΝΙΟ

Άφθονα θετικά ηπατοκύτταρα και κατά σωρούς **(Εικόνα 26 - σελ. 157).** Κύτταρα κολποειδών πολύ αραιά θετικά. Κυρίως θετικά ηπατοκύτταρα, γύρω από κεντρικές φλέβες και περιπυλαίες περιοχές **(Εικόνα 27 -σελ. 157).** Χρώση κυτταροπλασματική. Κύτταρα χοληφόρων εντόνως θετικά **(Εικόνα 27 - σελ. 157).**

Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 36±4,6% SD ($p<0,01$).

<u>Ομάδα 4</u>: BCG

Κύτταρα κολποειδών εντονότατα θετικά **(Εικόνα 28 και Εικόνα 29 - σελ. 158).** Ηπατοκύτταρα πάρα πολλά θετικά, με έντονη διάχυτη κυτταροπλασματική εντόπιση και πολλαπλά κοκκία στο κυτταρόπλασμα **(Εικόνα 29 - σελ. 158).** Κύτταρα χοληφόρων θετικά.

Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 17±5,2% SD ($p<0,05\%$).

<u>Ομάδα 5</u>: BCG + ΑΛΟΘΑΝΙΟ

Εντονότατα θετικά κύτταρα χοληφόρων. Αρκετά ηπατοκύτταρα θετικά, κυρίως γύρω από πυλαίες περιοχές **(Εικόνα 30 - σελ. 159).** Κύτταρα κολποειδών κατά το πλείστον ασθενώς θετικά, χωρίς όμως την έντονη θετικότητα της προηγούμενης ομάδος.

Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 13±4,5% SD ($p<0.05$).

Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα φαίνονται στους πίνακες 4 και 7 **(σελ. 127).**

Πίνακας 4

Bcl-2

κύτταρα	ΟΜΑΔΑ (1) **HALOTHANE + ΦΥΣΙΟΛΟ -ΓΙΚΟ ΟΡΟ**	ΟΜΑΔΑ (2) **PVP**	ΟΜΑΔΑ (3) **HALOTHANE + PVP**	ΟΜΑΔΑ (4) **BCG**	ΟΜΑΔΑ (5) **HALOTHANE + BCG**
ηπατικά	Διάσπαρτα θετικά	τατα Αφθονό-ηπατοκύττα-ρα,εντόνως θετικά γύρω από κεντρικές φλέβες	Αφθονα θετικά και κατά σωρούς. Κυρίως γύρω από κεντρικές φλέβες	πάρα πολλά θετικά με διάχυτο κυτταρο-πλασματική εντόπιση και πολλαπλά κοκκία στο κυτταρό-πλασμα	Αρκετά θετικά, κυρίως γύρω από πυλαίες περιοχές
κολποειδών	αρνητικά	ελάχιστα θετικά	πολύ αραιά θετικά	εντονότατα θετικά	κατά το πλείστον ασθενώς θετικά
χοληφόρων	Ασθενώς θετικά	Ασθενώς θετικά	Εντονότατα θετικά	Θετικά	Εντονότατα θετικά

WAF /p21

<u>Ομάδα 1</u>: ΑΛΟΘΑΝΙΟ + ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΟΡΟΣ

Πυρηνική και Κυτταροπλασματική έκφραση της πρωτεΐνης

Πολλαπλά θετικά ηπατοκύτταρα, κυρίως γύρω από κεντρικές φλέβες. Αρκετά κύτταρα κολποειδών θετικά **(Εικόνα 31 - σελ. 159).**

Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 46±5% SD

<u>Ομάδα 2</u>: PVP

Ασθενής κυτταροπλασματική έκφραση.

Πολλαπλοί πυρήνες ηπατοκυττάρων θετικοί, διάσπαρτοι στο λοβίο. Αρνητικά κύτταρα κολποειδών **(Εικόνα 32 - σελ. 160).**

Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 55±3,5% SD, p μη σημαντικό.

<u>Ομάδα 3</u>: PVP + ΑΛΟΘΑΝΙΟ

Κύτταρα κολποειδών αρνητικά. Άφθονα θετικά ηπατοκύτταρα, κυρίως γύρω από κεντρικές φλέβες.Έκφραση κυρίως κυτταροπλασματική **(Εικόνα 33 - σελ. 160).** Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 86±4,5% SD (p<0,01)

<u>Ομάδα 4</u>: BCG

Κύτταρα κολποειδών εντονότατα θετικά, σε ολόκληρο το λοβίο. Κυριολεκτικά διαγράφονται τα κολποειδή **(Εικόνα 34 και Εικόνα 35 - σελ. 161).** Πρωτοπλασματική, έντονη εντόπιση της πρωτεΐνης, κυρίως γύρω από κεντρικές φλέβες αλλά μείωση της έκφρασης της πρωτείνης στα πλείστα ηπατοκύτταρα.

Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 35±4% SD

<u>Ομάδα 5</u>: BCG + ΑΛΟΘΑΝΙΟ

Διάσπαρτα ηπατοκύτταρα θετικά σε ολόκληρο το λοβίο, κυρίως γύρω από πυλαία διαστήματα. Η εντόπιση της πρωτεΐνης είναι κυρίως πρωτο-πλασματική **(Εικόνα 36 - σελ. 162).** Κατά περιοχές, κύτταρα κολποειδών θετικά.Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 52±3% SD

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα φαίνονται στούς πίνακες 5 (σελ. 125) και 7 (σελ. 127).

p53

<u>Ομάδα 1</u>: ΑΛΟΘΑΝΙΟ + ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΟΡΟΣ

Διάσπαρτα, αραιά ηπατοκύτταρα με θετικούς πυρήνες, περιοχές όπου και τα κύτταρα των κολποειδών είναι ασθενώς θετικά **(Εικόνα 37 - σελ. 162).** Στην πλειονότητα του λοβίου και κυρίως γύρω από τα πυλαία διαστήματα, αρνητικά.

Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 7±1,5% SD

<u>Ομάδα 2</u>: PVP

Πολλαπλά ηπατοκύτταρα με πυρηνική εντόπιση της πρωτεΐνης. Κατά τόπους, ομάδες ηπατοκυττάρων με εντόνως πυρηνική εντόπιση **(Εικόνα 38 - σελ. 163).** Κύτταρα κολποειδών θετικά στις περιοχές με πυρηνική εντόπιση και αρνητικά

σε περιοχές όπου δεν υπάρχει πυρηνική εντόπιση. Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 28±3% SD (p <0,01).

Πίνακας 5

WAF

κύτταρα	ΟΜΑΔΑ (1) **HALOTHANE + ΦΥΣΙΟΛΟ-ΓΙΚΟ ΟΡΟ**	ΟΜΑΔΑ (2) **PVP**	ΟΜΑΔΑ (3) **HALOTHANE + PVP**	ΟΜΑΔΑ (4) **BCG**	ΟΜΑΔΑ (5) **HALOTHANE + BCG**
ηπατικά	Πολλαπλά θετικά, κυρίως γύρω από κεντρικές φλέβες	Πολλαπλοί πυρήνες θετικοί, διάσπαρτοι στο λοβίο	Άφθονα θετικά, κυρίως γύρω από κεντρικές φλέβες	Πρωτοπλα-σματική έντονος εντόπιση της πρωτε-ΐνης,κυρίως γύρω από κεντρικές φλέβες. Μείωση της έκφρασης στα περισ-σότερα ηπα-τοκύτταρα	Διάσπαρτα θετικά σε ολόκληρο το λοβίο, κυρίως γύρω από πυλαία διαστήματα
κολποειδών	Αρκετά θετικά	αρνητικά	αρνητικά	εντονότατα θετικά, σε ολόκληρο το λοβίο	Κατά περιοχές θετικά
χοληφόρων	αρνητικά	αρνητικά	αρνητικά	αρνητικά	αρνητικά

<u>Ομάδα 3</u>: PVP + ΑΛΟΘΑΝΙΟ

Πολλαπλά ηπατοκύτταρα θετικά αλλά με κυτταροπλασματική εντόπιση, της πρωτεΐνης κυρίως. Κύτταρα κολποειδών εντόνως θετικά **(Εικόνα 39 -σελ. 163).** Πυλαία διαστήματα αρνητικά.

Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 35±4% SD (p<0,01)

<u>Ομάδα 4</u>: BCG

Πολλαπλά θετικά κύτταρα κολποειδών διάσπαρτα στο λοβίο. Η συντρι-πτική πλειοψηφία των ηπατοκυττάρων αρνητική **(Εικόνα 40 - σελ. 164**).

Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 1±1,5% SD (p<0,05)

<u>Ομάδα 5</u>: BCG + ΑΛΟΘΑΝΙΟ

Ελάχιστα ηπατοκύτταρα θετικά με πυρηνική εντόπιση. Κύτταρα κολ-ποειδών αρνητικά **(Εικόνα 41- σελ 164).** Αριθμός θετικών ηπατοκυττάρων 0,5±1% SD ($p<0,05$). Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα φαίνονται στους πίνακες 6 και 7.

Πίνακας 6

p53

κύτταρα	ΟΜΑΔΑ (1) **HALOTHANE + ΦΥΣΙΟΛΟ-ΓΙΚΟ ΟΡΟ**	ΟΜΑΔΑ (2) **PVP**	ΟΜΑΔΑ (3) **HALOTHANE + PVP**	ΟΜΑΔΑ (4) **BCG**	ΟΜΑΔΑ (5) **HALOTHANE + BCG**
ηπατικά	Διάσπαρτα,αραιά ηπα-τοκύτταρα θετικά, σε περιοχές όπου και τα κύτταρα των κολποειδών είναι θετικά. Στην πλειονότητα του λοβίου και κυρίως γύρω από τα πυλαία διαστήματα,αρνητικά	Πολλαπλά με πυρηνική εντόπιση της πρωτεΐνης.Κατά τόπους ομάδες με εντόνως πυρηνική εντόπιση	Πολλαπλά θετικά αλλά με κυτταρο-πλαστική εντόπιση πρωτεΐνης	Η συντριπτική πλειοψηφία αρνητική	Ελάχιστα θετικά με πυρηνική εντόπιση
κολποειδών	Διάσπαρτα θετικά	θετικά στις περιοχές με πυρηνική εντόπιση και αρνη-τικά σε περιοχές όπου δεν υπάρχει πυρηνική εντόπιση	Εντόνως θετικά	Πολλαπλά θετικά διάσπαρτα στο λοβίο	αρνητικά
χοληφόρων	αρνητικά	αρνητικά	αρνητικά	αρνητικά	αρνητικά

Πίνακας 7

Κύτταρα	ΟΜΑΔΑ (1) HALOTHANE + ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΟΡΟ			ΟΜΑΔΑ (2) PVP			ΟΜΑΔΑ (3) HALOTHANE + PVP			ΟΜΑΔΑ (4) BCG			ΟΜΑΔΑ (5) HALOTHANE + BCG		
	Bcl-2	WAF	p53	Bcl-2	WAF	p53	Bcl-2	WAF	p53	Bcl-2	WAF	p53	Bcl-2	WAF	p53
Ηπατικά	6±2,1%	46±5%	7±1,5%	14±3,35%	55±3,5%	28±3%	36±4,6%	86±4,5%	35±4%	17±5,2%	35±4%	1±1,5%	13±4,5%	52±3%	0,5±1,2%
Κολποειδών	-	++	+	±	↓	↑	±	↓	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	±	↑	↓
Χοληφόρα	+	-	-	+	-	-	↑↑	-	-	+	-	-	↑↑	-	-

Όλα τα στοιχεία συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα της Ομάδας 1, μας δίνουν:

Δεν ήταν στατιστικά σημαντικό

$p<0,01$

$p<0,05$

Ηπατικά κύτταρα	ΟΜΑΔΑ (2) PVP	ΟΜΑΔΑ (3) HALO-THANE + PVP	ΟΜΑΔΑ (4) BCG	ΟΜΑΔΑ (5) HALO-THANE + BCG
Bcl-2	$p<0,05$	$p<0,01$	$p<0,05$	$p<0,05$
WAF	μή σημα-ντικό	$p<0,01$	μή σημα-ντικό	μή σημα-ντικό
p53	$p<0,01$	$p<0,01$	$p<0,05$	$p<0,05$

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα κύτταρα του Kupffer, δηλαδή τα μόνιμα μακροφάγα του ήπατος, εμπλέκονται στην ηπατοκυτταρική βλάβη σε ποικίλες ηπατοπάθειες, όπως η φαρμακευτική ηπατίτις, η αλκοολική νόσος του ήπατος, η βλάβη από ανοξία και επανοξυγόνωση κατά την μεταμόσχευση, η ενδοτοξιναι-μία και οι ιογενείς ηπατίτιδες.[429-435]

Σε πειραματικά μοντέλα ηπατοπαθειών, η βλάβη των ηπατοκυττάρων βελτιούται, όταν ανασταλεί ή περιορισθεί η λειτουργία των κυττάρων του Kupffer, ενώ η βλάβη επιδεινούται, όταν αυτά ενεργοποιηθούν. Έτσι, η καταστολή των κυττάρων του Kupffer από μεθυλ-παλμιτικό άλας περιορίζει κατά πολύ την ηπατίτιδα που προκαλεί η γαλακτοζαμίνη σε επίμυες, ενώ η ενεργοποίησή τους με γλυκάνη αυξάνει σημαντικά τις βλάβες της γαλακτοζαμίνης.[436]

Τα κύτταρα του Kupffer διαθέτουν αρκετούς μηχανισμούς με τους οποίους μπορούν να προκαλέσουν ηπατοκυτταρική βλάβη. Τα ενεργο-ποιημένα κύτταρα παράγουν κυτταροκίνες,[437,438] μερικές των οποίων στρατολογούν και άλλα φλεγμονώδη κύτταρα, ενώ άλλες είναι άμεσα κυτταροτοξικές. Μία τέτοια κυτταροτοξική κυτταροκίνη είναι ο παράγων νεκρώσεως των όγκων (TNFa) που ενεργοποιεί την παραγωγή ριζών οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια και είναι κυτταροτοξικός σε πολλές κυτταρικές σειρές.[439] Οι κυτταροκίνες μπορούν ακόμα να προκαλέσουν την παραγωγή NO από τα ίδια τα κύτταρα του Kupffer, που, υπό προϋποθέσεις, είναι και αυτό κυτταροτοξικό [440,441] και μπορεί να προκαλεί απόπτωση.[442]

Από την άλλη πλευρά, το NO μπορεί να είναι προστατευτικός για την απόπτωση παράγων,τουλάχιστον για τα ενδοθηλιακά κύτταρα.[384]

Άλλος άμεσος κυτταροτοξικός μηχανισμός των κυττάρων του Kuppfer είναι η παραγωγή πρωτεασών και φωσφολιπάσης A_2[443,444.]

Ένας μηχανισμός βλάβης των ηπατοκυττάρων που δεν έχει επαρκώς μελετηθεί είναι η απόπτωση. Το φαινόμενο της απόπτωσης έχει ενοχο-ποιηθεί ως τρόπος κυτταρικού θανάτου, ακόμη και σε περιπτώσεις όπου, στο παρελθόν,

επιστεύετο ότι μόνον η νέκρωση είναι καθοριστικός παράγων, όπως στην περίπτωση της ηπατοκυτταρικής βλάβης από τετρα-χλωράνθρακα.[373]
Ιδίως, δεν έχει μέχρι σήμερα μελετηθεί η τυχούσα επίδραση που έχει επί της αποπτώσεως η ενεργοποίηση και η καταστολή της λειτουργίας των κυττάρων του Kupffer.
Ένα **πρώτο** λοιπόν ερώτημα που ετέθη στην παρούσα εργασία ήταν εάν η διέγερση και η καταστολή των κυττάρων του Kupffer είχε ως αποτέλε-σμα την αύξηση ή την μείωση της αποπτώσεως των ηπατοκυττάρων.
Ένα **δεύτερο** ερώτημα είχε σχέση με την δράση της αλοθάνης. Το αναι-σθητικό αυτό, όπως αναπτύσσεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο 4 του γενι-κού μέρους, έχει ενοχοποιηθή για την δημιουργία ηπατοκυτταρικής βλά-βης σε σημαντικό αριθμό ασθενών. Παρά ταύτα, ο ακριβής μηχανισμός της βλάβης δεν είναι σαφώς γνωστός. Έχουν ενοχοποιηθεί άμεση κυττα-ροτοξικότητα ή ανοσολογικοί μηχανισμοί, αλλά οριστική απάντηση δεν έχει δοθεί.

Η σύνδεση της ηπατίτιδας από αλοθάνιο και των κυττάρων του Kupffer έχει γίνει εμμέσως παλαιότερα. Το αλοθάνιο βιοενεργοποιείται από το κυτταρόχρωμα P-450 σε τριφθοριοακετύλ-χλωρίδια (σελ. 68), που εύκολα μπορούν να ακυλιώσουν ηπατικές πρωτείνες. Στους επίμυες, η κυρία πηγή αυτών των ακυλιωμένων παραγώγων (adducts) επιστεύετο ότι είναι τα ηπατοκύτταρα, χωρίς την συμμετοχή των κυττάρων του Kupffer.[445] Και τούτο, παρά το γεγονός ότι, σε προηγούμενη εργασία, τα κύτταρα του Kupffer επιμύων έφεραν τέτοια παράγωγα.[446]Πρόσφατες έρευνες όμως σε ινδικά χοιρίδια, έδειξαν ότι τα κύτταρα του Kupffer, αλλά όχι άλλα μακροφάγα του σώματος, περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία τριφθοριοακετυλιωμένων πρωτεϊνών, με ευρύ φάσμα μοριακού βάρους 25-152 κDa.[447] Αυτά μπορούν να δράσουν ως αντιγόνα παρουσιαζόμενα από τα κύτταρα του Kupffer, σε ζώα που έχουν εκτεθεί σε αλοθάνιο και, έτσι, να ξεκινά ο ανοσολογικός μηχανισμός που οδηγεί στην ηπατίτιδα.[448,449]

Στην παρούσα εργασία,εξετάστηκε η πιθανότητα το αλοθάνιο να ενέχεται στην ηπατοκυτταρική βλάβη μέσω μηχανισμού απόπτωσης.

Το **τρίτο** ερώτημα,στο οποίο αποπειράθηκε να απαντήσει η παρούσα εργασία, ήταν να διαπιστωθεί εάν η καταστολή και διέγερση των κυττάρων του Kupffer είχαν επίδραση επί της έκφρασης πρωτεϊνών που συσχετίζονται με την απόπτωση, είτε μειώνοντάς την, όπως η bcl-2, είτε αυξάνοντάς την, όπως η Waf/p21 και η p53.

Τέταρτο ερώτημα ήταν εάν το αλοθάνιο είχε επίδραση στην έκφραση των πρωτεϊνών αυτών.

Και, τέλος, το **πέμπτο** ερώτημα ήταν αν η τυχούσα αύξηση ή μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών μπορούσε να εξηγήσει τα ευρήματα της αποπτώσεως.

Για την απάντηση στο πρώτο και δεύτερο ερώτημα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική TUNEL, που επιτρέπει την εντόπιση των ηπατοκυττάρων που βρίσκονται σε στάδιο απόπτωσης. Ως επιπρόσθετες τεχνικές χρησιμο-ποιήθηκαν η απλή μικροσκόπιση κατόπιν ειδικών χρώσεων και η ηλε-κτρονική μικροσκοπία. Ομοίως, για την απάντηση στο τρίτο και τέταρτο ερώτημα χρησιμοποι-ήθηκαν ανοσοϊστοχημικές τεχνικές, που επιτρέπουν την μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών στα ηπατοκύτταρα, τα κύτταρα των κολποειδών και τα κύτταρα των ενδοηπατικών χοληφόρων.

Από την μελέτη αυτή προέκυψαν ορισμένα σημαντικά ευρήματα:

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα με το απλό μικροσκόπιο, η κατα-στολή των κυττάρων του Kupffer με PVP μειώνει σημαντικά την κενοτο-πιώδη εκφύλιση των ηπατοκυττάρων, ενώ η προσθήκη στο PVP παρατε-ταμένης αναισθησίας με αλοθάνιο την αυξάνει δραματικά. Αντιθέτως, η διέγερση των κυττάρων του Kupffer με BCG αυξάνει την κενοτοπιώδη εκφύλιση και η αύξηση αυτή δεν επιτείνεται από το αλοθάνιο. Η κενοτο-πιώδης εκφύλιση, λίαν προσφάτως, έχει συνδυαστεί με την απόπτωση.[450]

Όπως δε προκύπτει από τον πίνακα 3 (σελ. 121) ,τα ευρήματα της κενοτοποιώδους εκφύλισης συμβαδίζουν σχεδόν με τα ευρήματα της Tunel η οποία δείχνει αμεσώτερα την απόπτωση. Επομένως τα ευρήματα μας συνηγορούν για την ορθότητα της αναφερθείσης παρατηρήσεως [450]

Σημαντικό στοιχείο, πέραν των τεθέντων ερωτημάτων, είναι ότι η κατα-στολή με PVP κυρίως αλλά και η διέγερση με BCG των κυττάρων του Kupffer αυξάνει την εναπόθεση σιδήρου στα κύτταρα των κολποειδών και ιδίως στα κύτταρα του Kupffer που περιέχουν κοκκία PVP. Το αλο-θάνιο ουδεμία επίδραση έχει στο φαινόμενο αυτό.

Τα ευρήματα αυτά πιθανόν να σχετίζονται με τις διαταραχές της εναπό-θεσης σιδήρου, που παρατηρούνται στην δευτεροπαθή αιμοσιδήρωση του ήπατος αλλά και στην πρωτογενή αιμοχρωμάτωση και, σίγουρα, χρειάζονται ειδική μελέτη.

Ένα έτερο σημαντικό στοιχείο που ανέδειξε το ηλεκτρονικό μικροσκό-πιο, πέραν των εικόνων που επιβεβαιώνουν την απόπτωση των ηπατοκυτ-τάρων, είναι η σημαντική αύξηση του συνδετικού ιστού εντός του χώρου του Disse στις ομάδες όπου τα κύτταρα του Kupffer έχουν υποστεί κατα-στολή από PVP. Το εύρημα αυτό πιθανόν να σχετίζεται με μείωση της παραγωγής μεταλλοπρωτεασών στην ομάδα αυτή και, λόγω της προφα-νούς σημασίας του στην παθογένεια της ινώσεως, πρέπει να αποτελέσει επίσης αντικείμενο περαιτέρω μελέτης.

Όσον αφορά στην απόπτωση, τα ευρήματα της μελέτης αυτής έδειξαν πέραν αμφιβολίας ότι το αλοθάνιο, ενώ καθ'εαυτό δεν αυξάνει την από-πτωση, όταν προηγηθεί καταστολή των κυττάρων του Kupffer με PVP, αυξάνει δραματικά την απόπτωση. Την ίδια αλλά μικρότερη επίδραση έχει το αλοθάνιο και όταν έχει προηγηθεί διέγερση των κυττάρων του Kupffer με BCG.

Αυτή καθ'εαυτή η καταστολή των κυττάρων του Kupffer μειώνει την από-πτωση των ηπατοκυττάρων σε μικρό βαθμό μή στατιστικώς σημαντικό, ενώ η διέγερση με BCG δεν έχει σημαντική επίπτωση.

Αντιθέτως, η καταστολή με PVP των κυττάρων του Kupffer αυξάνει σημαντικά την απόπτωση των κυττάρων των κολποειδών, ενώ η διέγερ-ση με BCG τη μειώνει. Η προσθήκη αλοθανίου αναστρέφει το αποτελέ-σμα, μειώνοντας την απόπτωση στην καταστολή των κυττάρων του Kupffer και αυξάνοντάς την στην διέγερση. Σε κάθε περίπτωση φαίνεται ότι η μειωμένη απόπτωση των κυττάρων των κολποειδών αυξάνει την απόπτωση των

ηπατοκυττάρων, ενώ η αυξημένη απόπτωση των κυττάρων των κολποειδών προστατεύει τα ηπατοκύτταρα από την απόπτωση.

Η εξήγηση των ανωτέρω ευρημάτων είναι δυσχερής, δεδομένου ότι η απόπτωση είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο, όπου συμμετέχουν παρά-γοντες προαποπτωτικοί, παράγοντες αντιαποπτωτικοί, αλλά και παρά-γοντες που επηρεάζουν την φαγοκυττάρωση ή ενδοκυττάρωση των αποπτωτικών κυττάρων. Οι μοριακοί μηχανισμοί αναγνώρισης των αποπιπτόντων κυττάρων δεν είναι σαφώς κατανοητοί. Στην αναγνώριση αυτή ενέχονται τουλάχιστον τέσσερεις (4) τάξεις υποδοχέων της επιφα-νείας των φαγοκυττάρων. Έχει προταθεί ότι στην κατάποση των αποπε-πτωκότων ηπατοκυττάρων ενέχονται οι υποδοχείς ασιαλογλυκοπρωτε-ϊνών και γαλακτόζης στις επιφάνειες των ηπατοκυττάρων και των κυττάρων των κολποειδών.[451,452] Ως εκ τούτου, είναι κατανοητό ότι μια μείωση της εκφράσεως των υποδοχέων αυτών, προκαλούμενη από την αναστολή των κυττάρων του Kupffer από το PVP, πιθανόν επιτεινόμενη από το αλοθάνιο, θα οδηγούσε στην αυξημένη αναγνώριση αποπεπτω-κότων ηπατοκυττάρων λόγω μειωμένης καθάρσεως. Στο φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να συμβάλει και η καταστολή από το PVP και των ενδοθη-λιακών κυττάρων.

Έχει παρατηρηθεί ότι αποπίπτοντα λεμφοκύτταρα απομακρύνονται από τα κολποειδή μέσω δύο υποομάδων ενδοθηλιακών κυττάρων, των μεν με μεγάλους πόρους και υψηλό αριθμό υποδοχέων συνδέσεως με υδατάν-θρακες, των δε με χαμηλό αριθμό υδατανθρακικών υποδοχέων.[452]

Έτσι, μείωση αυτών των κυττάρων είτε αμέσως, λόγω ηυξημένης απο-πτώσεώς τους από το PVP, είτε εμμέσως, λόγω καταστολής τους από το PVP, θα είχε αποτέλεσμα ίδιο με το προηγούμενο. Η σχετικά μειωμένη, εν σχέσει πρός το PVP, αύξηση της απόπτωσης που παρατηρείται, όταν της χορηγήσεως του αλοθανίου προηγείται η διέγερση με BCG, μπορεί επίσης να εξηγηθεί, διότι η φαγοκυτταρική κατάποση των αποπεπτωκό-των ηπατοκυττάρων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, επιτείνεται από την ιντερλευκίνη 1.[453] Είναι γνωστό ότι IL-1 παράγεται στο ήπαρ κατ΄απο-κλειστικότητα από τα κύτταρα του Kupffer

μετά την διέγερσή τους. Έτσι, η δράση του αλοθανίου είναι δυνατόν να περιορίζεται.

Όμως, πέραν των ανωτέρω, φαίνεται ότι τα ευρήματα από την έκφραση των πρωτεϊνών που συνδέονται με την απόπτωση, εξηγούν τις περισσό-τερες - αλλά όχι όλες -τις μεταβολές της απόπτωσης. Έτσι, μετά χορή-γηση PVP, η αρχική μείωση της απόπτωσης των ηπατοκυττάρων μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη έκφραση του bcl-2, που, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αναστέλλει την απόπτωση.[454,455]

Η ευνοϊκή της απόπτωσης πρωτεΐνη Waf/p21 δεν επηρεάζεται από το PVP.[421]Μετά την συγχορήγηση αλοθανίου, η αυξημένη απόπτωση μπορεί να ερμηνευθή από την συνοδό μεγάλη αύξηση του Waf/p21.

Ειδική μνεία πρέπει να γίνει για τις μεταβολές της πρωτεΐνης p53.

Στις ιστολογικές τομές αναδεικνύεται μόνον το μεταλλαγμένο ή το συνδεδεμένο με κάποια πρωτεΐνη p53, ενώ δεν ανιχνεύεται η αρχέγονη πρωτεΐνη. Ειναι καλά θεμελιωμένο βιβλιογραφικά ότι η αρχέγονη πρωτεΐνη ευνοεί την επαγωγή και έκφραση του Waf/p21 και την απόπτωση, ενώ το μεταλλαγμένο p53 δεν προάγει την επαγωγή του Waf/p21 και, πιθανόν, ούτε την απόπτωση. [456,457]

Υπάρχει μιά σειρά καταστάσεων όπου η έκφραση του p 53 μπορεί να μη σχετίζεται με τη παρουσία του μεταλλαγμένου,δίνοντας έτσι μια σειρά από ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα [458]

Φαίνεται ότι σε περιπτώσεις που έχουμε είτε ανοσοϊστοχημική αύξηση της έκφρασης είτε μείωση της έκφρασης του μεταλλαγμένου p53, το αρχέγονο p53 μπορεί να αυξάνεται ή να μειούται παραλλήλως προς το μεταλλαγμένο, αλλά μπορεί να ακολουθεί και την αντίθετη πορεία, να μειούται,δηλαδή, όταν αυξάνει το μεταλλαγμένο και αντιστρόφως.

Μία έμμεση απάντηση μπορεί να δοθεί από την παρακολούθηση του Waf/p21,το οποίο ώς προανεφέρθη επάγεται μόνον από το αρχέγονο p 53.

Μέχρις ότου πλέον άμεσες μελέτες επιλύσουν το πρόβλημα αυτό, έμμε-ση απάντηση δίνεται από τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας, που ευνοούν

την δεύτερη πιθανότητα για δύο (2) λόγους. Πρώτον, εάν το αρχέγονο p53 ακολουθούσε τις ίδιες μεταβολές με το μεταλλαγμένο, θα έπρεπε και το Waf/p21, επαγόμενο από το αρχέγονο p53, να ακολουθεί τις ίδιες μεταβολές. Αυτό όμως δεν συμβαίνει στην παρούσα εργασία. Φυσικά, υπάρχει ο αντίλογος, ότι το Waf/p21 θα μπορούσε και να επάγε-ται από ανεξάρτητο του p53 μηχανισμό, εξ ου και η μη απόλυτη συνταύ-τιση.[459]

Όμως, ένα δεύτερο εύρημα φαίνεται επίσης να υποδηλώνει ότι η αύξηση του μεταλλαγμένου συνδυάζεται μάλλον με μείωση του αρχέγονου. Οι περισσότερες από τις μεταβολές της απόπτωσης της παρούσης μελέτης συμφωνούν με μια τέτοια εξήγηση.

Έτσι, όταν χορηγηθεί PVP, η μικρή μείωση της αποπτώσεως μπορεί να εξηγηθεί από την συνακόλουθη αύξηση του bcl-2, αλλά σε αυτό συνη-γορεί και η αύξηση του μεταλλαγμένου p53, δηλ. η συνακόλουθη μείωση του αρχέγονου p53.

Ομοίως, η αύξηση της αποπτώσεως που ακολουθεί την προσθήκη αλο-θανίου στο BCG, εξηγείται λόγω της μείωσης του μεταλλαγμένου p53,
άρα της συνακόλουθης αυξήσεως του αρχέγονου p53, ομού με την μικρό-τερη αύξηση του bcl-2.

Η απόπτωση που επάγεται από το αρχέγονο p53 αναστέλλεται από την ιντερλευκίνη 6.[461] Η αναστολή αυτή πιθανόν δικαιολογείται από την αύξηση του λόγου bcl-2/bax, ευνοϊκού δηλαδή γεγονότος αναστολής της απόπτωσης που προκαλεί η ιντερλευκίνη 6.Σημειωτέον ότι η ιντερλευκίνη 6 παράγεται στο ήπαρ κατ'αποκλειστικότητα από τα κύτταρα του Kupffer και είναι ενδεχόμενο οι μεταβολές της απόπτωσης και της έκφρασης του bcl-2 που ανευρέθησαν στην παρούσα μελέτη να προκαλούνται, τουλάχιστον εν μέρει, από διέγερση ή μείωση της παραγωγής της ιντερλευκίνης 6.[462]Το σημείο αυτό απαιτεί περαιτέρω μελέτες.

Σχεδόν όλες οι μεταβολές της απόπτωσης εξηγούνται από τις μεταβολές στην έκφραση των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν.

Υπάρχει όμως μια σημαντική εξαίρεση. Η χορήγηση PVP αυξάνει κατά πολύ την απόπτωση των κυττάρων των κολποειδών, ενώ οι μικρές μετα-βολές των

πρωτεϊνών προδιαθέτουν προς το αντίθετο. Αυτό το εύρημα θέτει την πιθανότητα ότι άλλοι παράγοντες, που ευνοούν ή μειώνουν την απόπτωση, επηρεάζονται επίσης από την διέγερση ή καταστολή των κυττάρων του Kupffer, πράγμα που ασφαλώς απαιτεί περαιτέρω μελέτες.

Έτσι, η διέγερση και καταστολή των κυττάρων του Kupffer θα μπορούσε να επηρεάζει το σύστημα Fas-Fas ligand, η διέγερση του οποίου οδηγεί σε μεγάλη απόπτωση των ηπατοκυττάρων σε επίμυες,[463] αλλά ενέχεται και στην επαγωγή της απόπτωσης σε ανθρώπινες ηπατίτιδες, όπως η χρονία ιογενής ηπατίτις.[464-466] Ένας τέτοιος μηχανισμός θα εξηγούσε την αδυναμία συσχετίσεως αυξημένης απόπτωσης των κυττάρων των κολπο-ειδών μετά χορήγηση PVP με την έκφραση των μελετηθεισών πρωτεϊνών. Σε επιβεβαίωση της εξήγησης αυτής, η in vivo διέγερση των κυττάρων του Kupffer από λιποπολυσακχαρίδια (LPS) οδηγεί σε τριπλά-σια έως πενταπλάσια αύξηση της έκφρασης του CD 95L. Η δεξαμεθαζό-νη μειώνει την αύξηση αυτή.[467]

Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η διέγερση του συστήματος Fas-Fas ligand (ή CD95-CD95 ligand) οδηγεί σε αύξηση της απόπτωσης των κυττάρων του Ito και τερματίζει έτσι τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών,πράγμα που έχει σημαντική επίπτωση στην διαδικασία της ίνωσης.[468] Πράγματι, ηυξημένη απόπτωση των κυττάρων του Ito έχει παρατηρηθεί κατά την διαδικασία της λύσεως της πειραματικής ίνωσης σε επίμυες.

Τρεις (3) άλλοι μηχανισμοί, που είναι δυνατόν να εξηγήσουν τις μεταβο-λές της απόπτωσης που διαπιστώθηκαν στην παρούσα εργασία, είναι η παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα κύτταρα του Kupffer, η παραγωγή TNFa και η παραγωγή προσταγλαδινών.

Έχει αναφερθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που ελευθερώνουν τα διεγερμένα κύτταρα του Kupffer προκαλούν απόπτωση[469], μολονότι πειραματικές ενδείξεις δείχνουν ότι τα κύτταρα που κυρίως αποπίπτουν στην περίπτωση αυτή είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα των κολποειδών.[470] Η διαδικασία αυτή αναστρέφεται με την χρήση αναγωγικών ουσιών.

Ένας άλλος πιθανός παράγων επηρεασμού της απόπτωσης λόγω διέγερσης ή καταστολής των κυττάρων του Kupffer, είναι ίσως η αύξηση ή μείωση της παραγωγής TNFa, ο οποίος είναι επαγωγός της απόπτω-σης. [471,472] Η υπερπαραγωγή TNFa από ενεργοποιημένα με λιποπολυ-σακχαρίδια (LPS) κύτταρα του Kupffer είναι επίσης επαγωγός της από-πτωσης τόσο για τα ίδια τα κύτταρα του Kupffer, όσο και για τα ενδοθη-λιακά κύτταρα.

Ένας τρίτος πιθανός μηχανισμός είναι η παραγωγή προσταγλαδίνης E_2 Έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα του Kupffer προξενούν απόπτωση των λεμφοκυττάρων μέσω της PGE_2, όταν διεγερθούν από ξένα αντιγόνα που χορηγούνται μέσω της πυλαίας. Η αυξημένη PGE_2 δημιουργείται λόγω της αυξήσεως μιας τρανσακυλάσης, που δεν εξαρτάται από την παρουσία συνενζύμου Α.[473] Και τα σημεία αυτά χρειάζονται περαιτέρω μελέτη.

Ένα άλλο σημείο που χρήζει προσοχής είναι η αξιολόγηση της μεθόδου TUNEL. Ψευδώς θετικά αποτελέσματα έχουν περιγραφεί σε ηπατικό ιστό με την μέθοδο αυτή και αυτό απεδόθη στον χρόνο επωάσεως με την πρωτεϊνάση Κ, που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενδογενών ενδονουκλεασών.[474] Επιπλέον, έχει ανακοινωθεί αδυναμία της μεθόδου να διακρίνει την απόπτωση από την νέκρωση και την αυτόλυση.[475]

Το γεγονός ότι στο απλό μικροσκόπιο η χορήγηση αλοθανίου αυξάνει την κενοτοπιώδη εκφύλιση των ηπατοκυττάρων, που συνδυάζεται με την απόπτωση, αίρει εν μέρει, αλλά δεν εξαλείφει παντελώς τις επιφυλάξεις ως πρός την ακρίβεια της TUNEL.

Όμως, το γεγονός ότι συνυπάρχει διαταραχή εκφράσεως των πρωτεϊνών που συσχετίζονται με την απόπτωση και, μάλιστα, ότι σε όλες, πλήν της μιας συζητηθείσης περιπτώσεως, οι μεταβολές αυτές είναι συμβατές με τα ευρήματα της TUNEL, συνηγορεί ότι, τουλάχιστον στην παρούσα μελέτη, τα ευρήματα της TUNEL πράγματι εκφράζουν μεταβολές στην απόπτωση.

Η έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 χρήζει επίσης σχολιασμού. Στο φυσιο-λογικό ήπαρ η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται στα κύτταρα των ενδοηπατι-κών χοληφόρων και όχι στα ηπατοκύτταρα.[476,477] Στην δική μας μελέτη, έκφραση της bcl-2 παρουσιάστηκε σε μικρό αριθμό ηπατοκυττάρων,

χωρίς προηγούμενη καταστολή ή διέγερση των κυττάρων του Kupffer. Προσφάτως, ανακοινώθηκε έκφραση της bcl- 2 σε ηπατοκύτταρα επι-μύων, που τους έγινε απολίνωση των χοληφόρων.[478]

Δεν είναι σαφής ο λόγος της αντιθέσεως αυτής. Η ειδικότητα του αντι-σώματος που χρησιμοποιήθηκε μπορεί, ίσως, να εξηγήσει αυτή την δια-φορά. Είναι γεγονός αναμφισβήτητο όμως ότι η καταστολή ή η διέγερση των κυττάρων του Kupffer προκαλούν σημαντική υπερέκφραση της bcl-2 στα ηπατοκύτταρα και, μάλιστα, στην περίπτωση του BCG,με έντονη πρωτοπλασματική εντόπιση.

Εν συμπεράσματι λοιπόν, η διέγερση και η καταστολή των κυττάρων του Kupffer προκαλούν μεταβολές τόσο της απόπτωσης των ηπατοκυτ-τάρων, όσο και της εκφράσεως πρωτεϊνών, όταν έχει προηγηθεί είτε καταστολή είτε διέγερση των κυττάρων του Kupffer. Τα ευρήματα της παρούσης μελέτης προτείνουν λοιπόν έναν εναλλακτικό μηχανισμό για την δημιουργία της ηπατίτιδας από αλοθάνιο και, επίσης, καταδεικνύουν την αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων του Kupffer και ηπατοκυττάρων.

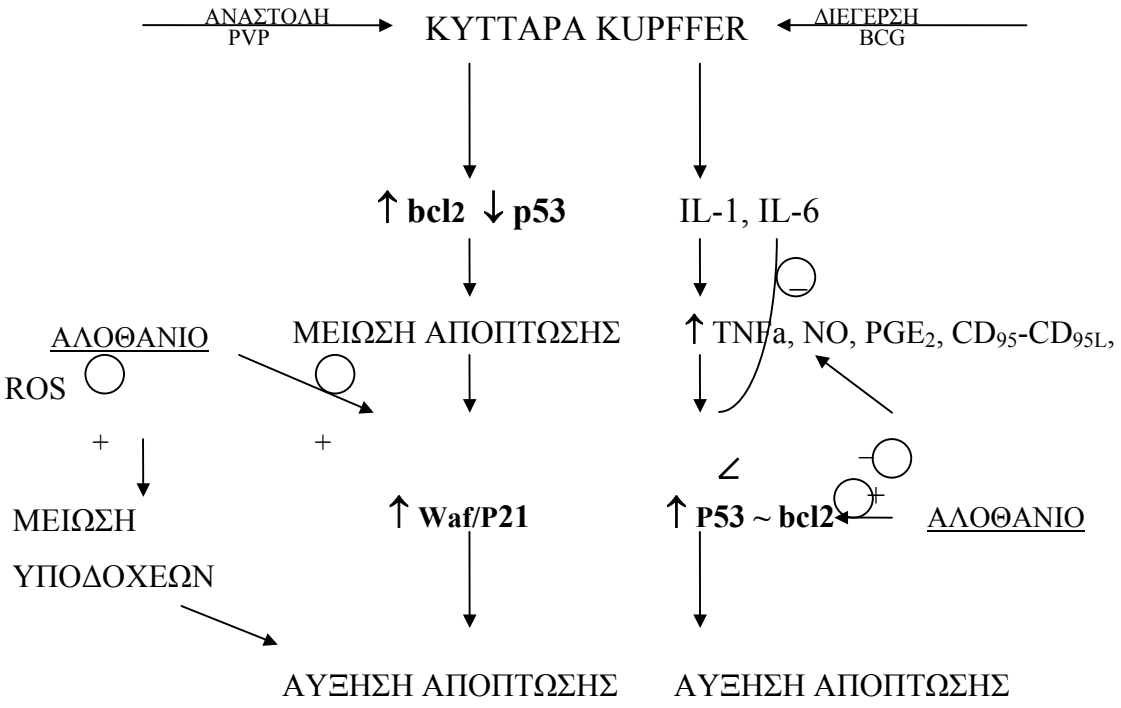
Μια τέτοια αλληλεπίδραση έχει παρατηρηθεί in vitro, όπου η συγκαλ-λιέργεια κυττάρων του Kupffer με κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώ-ματος οδηγεί σε αυξημένη απόπτωση των τελευταίων. Είναι ενδιαφέρον
το ότι αυτή η αυξημένη απόπτωση απεδόθη σε υπερπαραγωγή του NO από τα κύτταρα του Kupffer, δεδομένου ότι ανεστάλη από αναστολείς της συνθετάσης του NO. Για την αυξημένη σύνθεση του NO, ήταν απαραίτητη η συμμετοχή του μορίου προσκολλητικότητος ICAM-1.[436]

Ομοίως, η συγκαλλιέργεια ενεργοποιημένων με ενδοτοξίνη κυττάρων του Kupffer και ηπατοκυττάρων προκάλεσε αυξημένη απόπτωση των ηπατοκυττάρων μέσω παραγωγής TNFa.[479] Η παρούσα εργασία, χωρίς να αποκλείει τον πιθανό ρόλο του NO και του TNFa, προτείνει την μεταβολή στην έκφραση των σχετικών με την απόπτωση πρωτεϊνών ως ένα επιπρόσθετο παράγοντα, με τον οποίο τα κύτταρα του Kupffer επηρεάζουν την απόπτωση των ηπατοκυττάρων. Είναι όμως πιθανόν αυτή η μεταβολή της εκφράσεως των

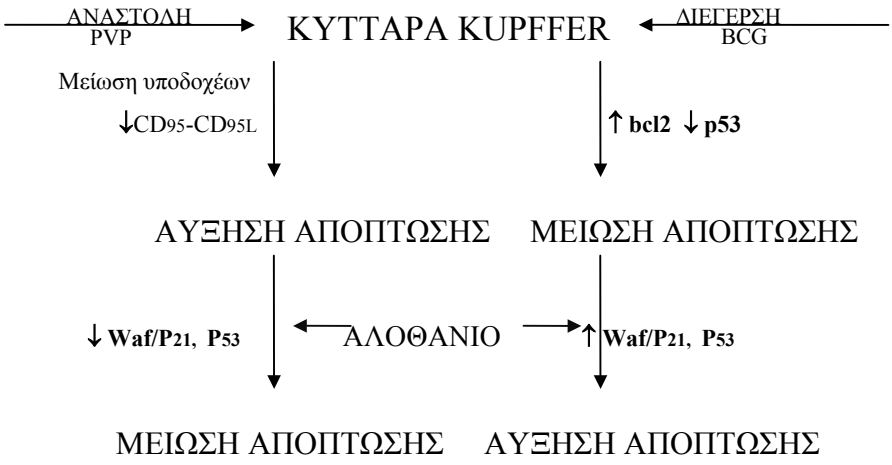
πρωτεϊνών να προκαλείται είτε από το NO είτε από τον TNFa, πράγμα που απαιτεί περαιτέρω μελέτη.

Εν συνόψει, προτείνεται ένα πιθανό σχήμα, που εξηγεί τις μεταβολές της απόπτωσης που περιεγράφησαν στην παρούσα εργασία.

ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΟ ΠΙΘΑΝΟ ΣΧΗΜΑ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΤΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ KUPFFER



ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΟ ΠΙΘΑΝΟ ΣΧΗΜΑ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΩΝ ΚΟΛΠΟΕΙΔΩΝ ΜΕΤΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ KUPFFER



Με έντονα γράμματα σημειούνται τα ευρήματα της παρούσης εργασίας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το αλοθάνιο προκαλεί σημαντική αύξηση της απόπτωσης των ηπατοκυτ-τάρων μόνον μετά προηγούμενη καταστολή ή, σε μικρότερο βαθμό, μετά διέγερση των κυττάρων του Kupffer. Ειδικότερα, παρατηρούνται τα ακόλουθα:

Α**.ΑΠΛΟ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ** : Η κενοτοπιώδης εκφύλιση των ηπατοκυττάρων επηρεάζεται σημαντικά από την καταστολή ή διέγερση των κυττάρων του Kupffer και συμβαδίζει με τα ευρήματα της TUNEL . Η καταστολή με PVP των κυττάρων του Kuppfer οδηγεί σε αύξηση του συνδετικού ιστού στους χώρους του Disse.

Β**. ΑΠΟΠΤΩΣΗ**

1. Ηπατοκύτταρα:

Η χορήγηση PVP μειώνει, αλλά όχι στατιστικώς σημαντικά, την από-πτωση, ενώ η χορήγηση BCG δεν έχει ουσιαστικό αποτέλεσμα. Η συγ-χορήγηση αλοθανίου αυξάνει λίαν σημαντικά την απόπτωση επί κατα-στολής με PVP και διεγέρσεως με BCG, λιγότερο όμως στην τελευταία περίπτωση.

2. Κύτταρα κολποειδών:

Η χορήγηση PVP αυξάνει πολύ την απόπτωση, ενώ η προσθήκη αλοθα-νίου την μειώνει ελαφρά. Η αυξημένη απόπτωση των κυττάρων των κολποειδών συνδυάζεται με την μείωση της απόπτωσης στα ηπατοκύττα-ρα και η μείωση με την μεγάλη αύξηση της τελευταίας.Αντιθέτως, το BCG μειώνει την απόπτωση των κυττάρων των κολποειδών, ενώ η προσθήκη αλοθανίου αυξάνει ελαφρά την απόπτωση και, επίσης, συν-δυάζεται με την σχετικά μειωμένη (εν σχέσει προς τον συνδυασμό PVP και αλοθανίου) αύξηση της απόπτωσης των ηπατοκυττάρων.

3. Ενδοηπατικά χοληφόρα:

Ουδεμία επίδραση.

Γ. ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

1. Ηπατοκύτταρα:

Η έκφραση του bcl-2 αυξάνεται σημαντικά μετά καταστολή με PVP ή διέγερση με BCG. Η συγχορήγηση αλοθανίου αυξάνει έτι περαιτέρω την έκφραση μετά PVP, αλλά όχι μετά BCG.

Η έκφραση του Waf/p21 δεν επηρεάζεται μετά PVP ή BCG, ενώ η προσθήκη αλοθανίου αυξάνει κατά πολύ το Waf μετά PVP, αλλά όχι μετά BCG. Η έκφραση του p53, αυξάνει σημαντικά μετά PVP και μειούται μετά BCG. Η συγχορήγηση αλοθανίου επιτείνει περαιτέρω τις μεταβολές αυτές.

2. Κύτταρα κολποειδών:

Το PVP, με ή χωρίς αλοθάνιο, ουδεμία επίδραση έχει στην έκφραση του bcl-2. Αντιθέτως, η χορήγηση BCG αυξάνει σημαντικά την έκφραση του bcl-2, ενώ η αύξηση αυτή παραμένει μεν, αλλά μειούται μετά συγχορή-γηση αλοθανίου.

Η έκφραση του Waf/p21 μειούται μετά PVP, με ή χωρίς αλοθάνιο και αυξάνεται μετά BCG. Το αλοθάνιο μειώνει κατά τι την αύξηση αυτή.

Η έκφραση του p53, αντιθέτως, αυξάνει μετά PVP και περισσότερο μετά συγχορήγηση αλοθανίου, ενώ αυξάνει ομοίως μετά BCG, αλλά μειούται μετά συγχορήγηση αλοθανίου.

3. Ενδοηπατικά χοληφόρα:

Ουδεμία επίδραση στην έκφραση Waf/p21 και p53. Αντιθέτως, η έκφρα-ση του bcl-2 αυξάνει σημαντικά μετά χορήγηση αλοθανίου, είτε μετά χο-ρήγηση PVP είτε BCG, τα οποία από μόνα τους ουδεμία επίδραση έχουν.

Δ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

1. Ηπατοκύτταρα:

α. PVP:

Η μείωση της απόπτωσης εξηγείται από την αύξηση του bcl-2, χωρίς ταυτόχρονη αύξηση του Waf/p21. Η αύξηση του p53 πιθανόν υποδηλοί μείωση του αρχέγονου p53. Η προσθήκη αλοθανίου αυξάνει την απόπτω- ση, πιθανόν

λόγω μεγάλης αύξησης του Waf/p21, παρά την αύξηση του bcl-2 και του p53 (δηλ. πιθανή μείωση του αρχέγονου p53).

β.BCG: Αφ'ενός αυξάνει το bcl-2 και μειούται το p53 (άρα πιθανόν αυ-ξάνει η αρχέγονος μορφή), ενώ το Waf/p21 δεν επηρεάζεται.

Αποτέλεσμα μηδαμινό. Η προσθήκη αλοθανίου μειώνει την αύξηση του bcl-2 και μειώνει σημαντικά το μεταλλαγμένο p53 (πιθανόν αυξάνει το αρχέγονο). Αποτέλεσμα η τελική αύξηση της απόπτωσης.

2. Κύτταρα κολποειδών:

α. PVP:

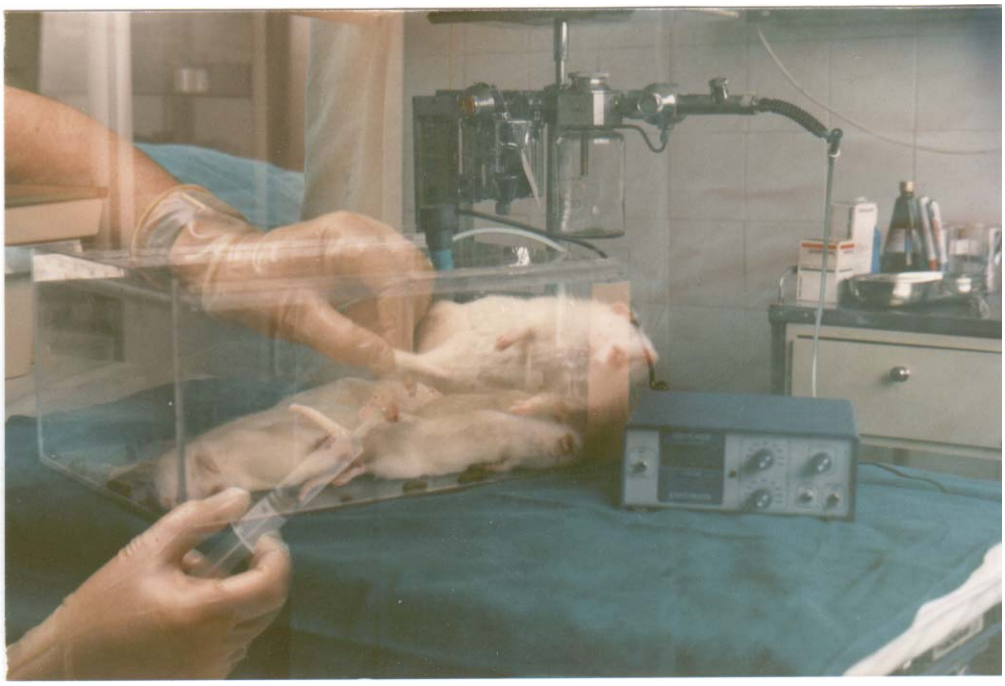
Η αύξηση της απόπτωσης δεν εξηγείται από τις μεταβολές των πρωτεϊ-νών, ενώ η αύξηση του μεταλλαγμένου p53 μετά χορήγηση αλοθανίου πιθανόν συνεισφέρει στη μείωση της απόπτωσης.

β. BCG:

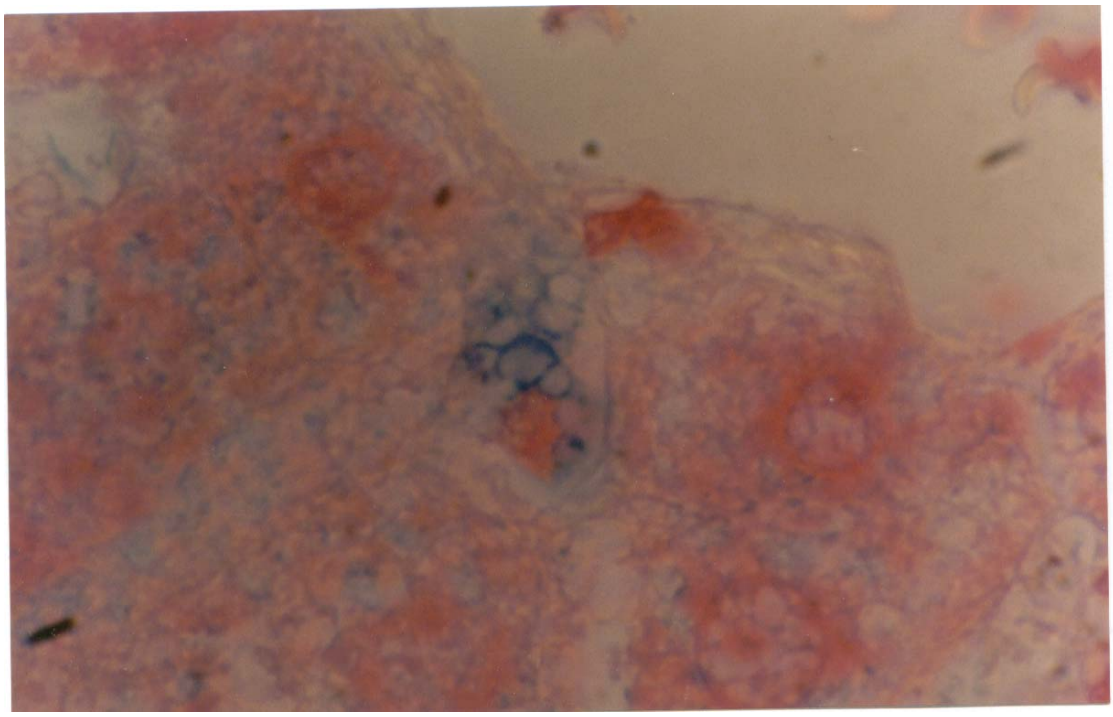
Η μείωση της απόπτωσης εξηγείται από την μεγάλη αύξηση του bcl-2 και του μεταλλαγμένου p53, που, προφανώς,ε ξουδετερώνει την αύξηση του Waf/p21. Η μικρή αύξηση της απόπτωσης μετά χορήγηση αλοθανίου δικαιολογεί-ται από την μη περαιτέρω αύξηση του bcl-2, ενώ αυξάνεται το Waf/p21 και μειούται το μεταλλαγμένο p53 (άρα πιθανόν αυξάνει το αρχέγονο).

3. Χοληφόρα: Η αύξηση του bcl-2 μετά χορήγηση αλοθανίου δεν φαίνε-ται να έχει ανιχνεύσιμα ιστοχημικώς αποτελέσματα επί της απόπτωσης.

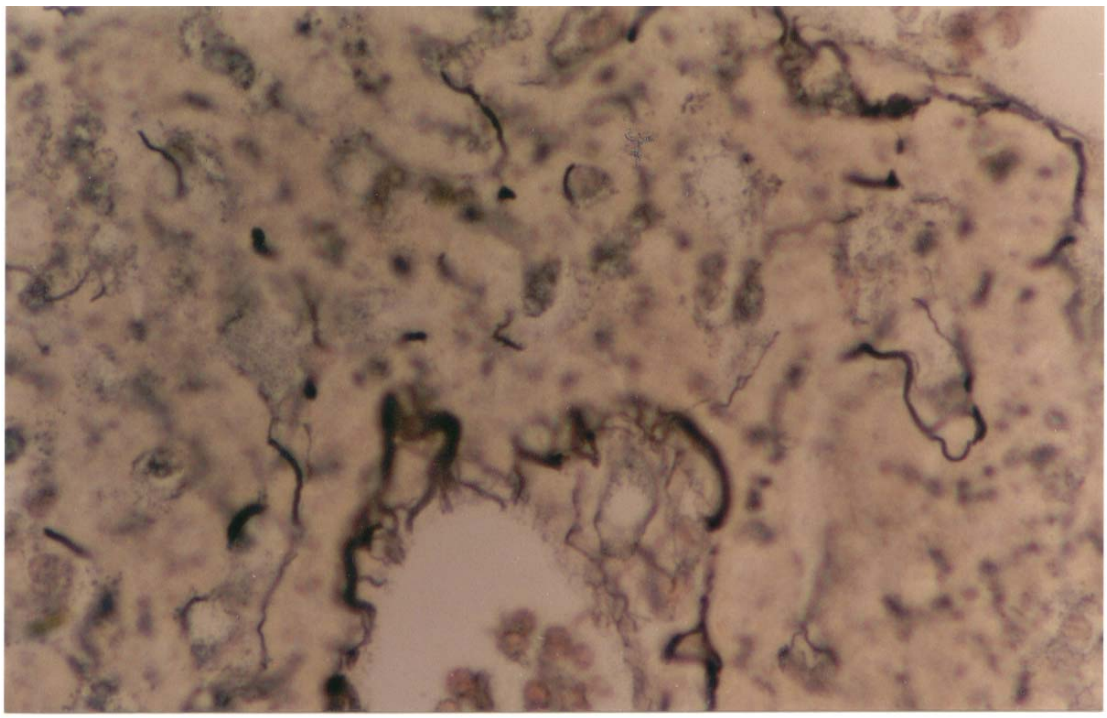
Φωτογραφία 1. Από την εκτέλεση του πειράματος



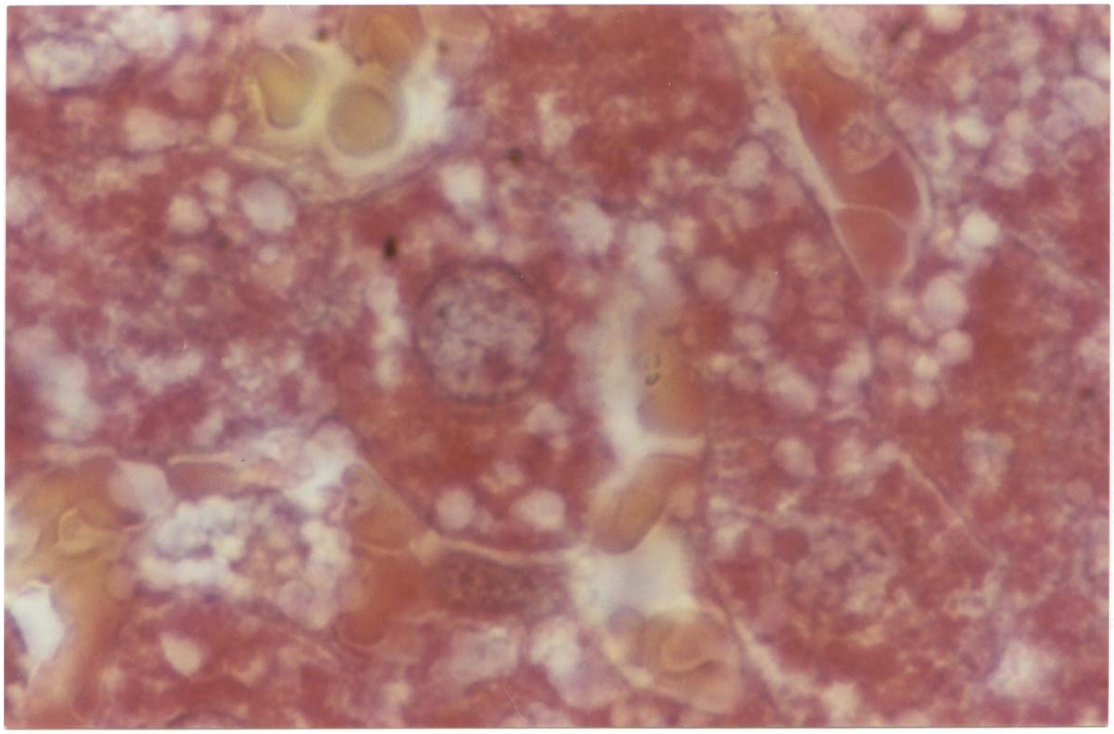
Φωτογραφία 2. Από την εκτέλεση του πειράματος



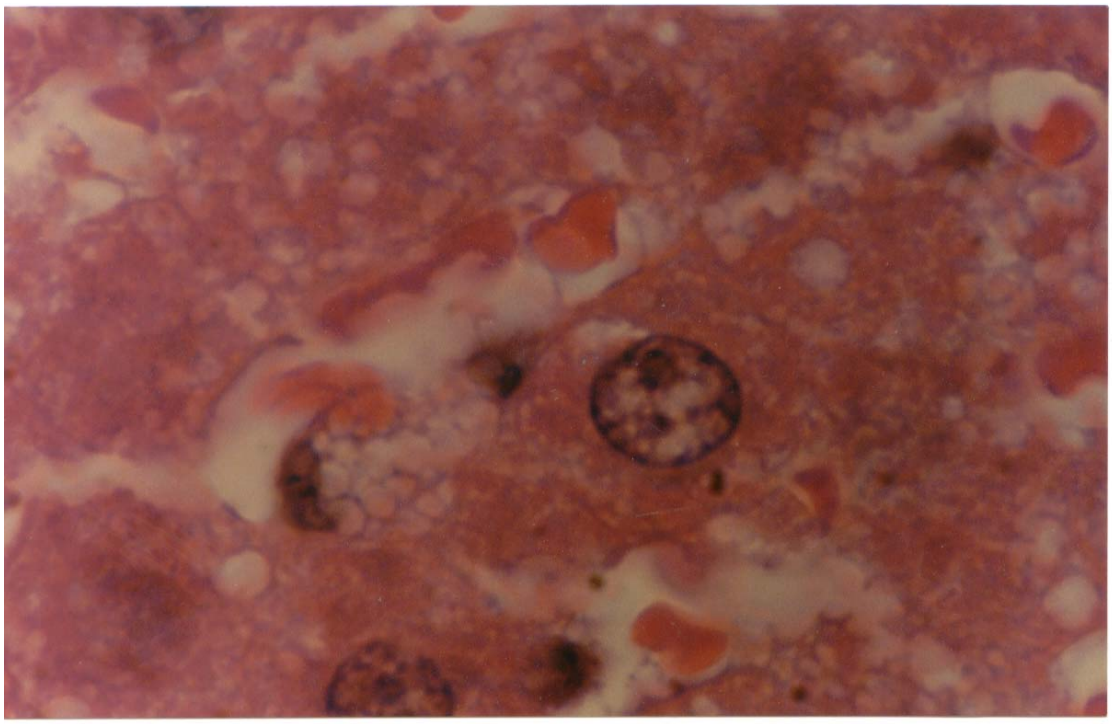
Εικόνα 1. Απλό Μικροσκόπιο Μεγέθυνση x1000. Χρώση Perl



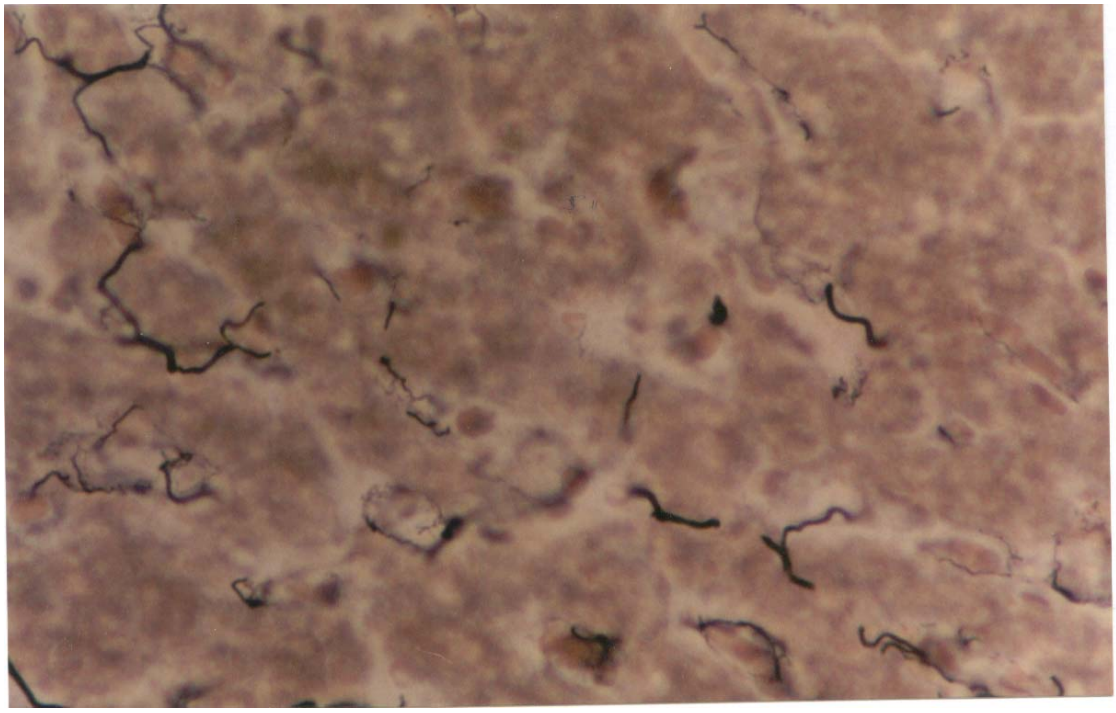
Εικόνα 2. Απλό Μικροσκόπιο Μεγέθυνση x400. Χρώση ρετικουλίνης



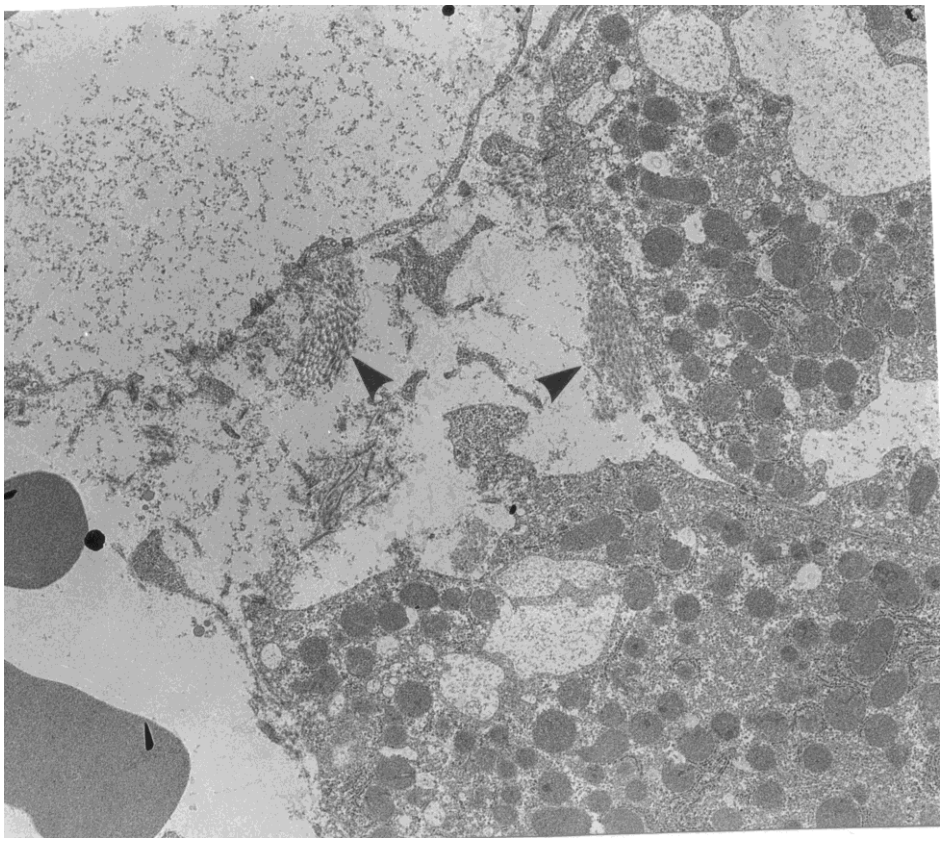
Εικόνα 3. Απλό Μικροσκόπιο Μεγέθυνση x1000. Χρώση Masson



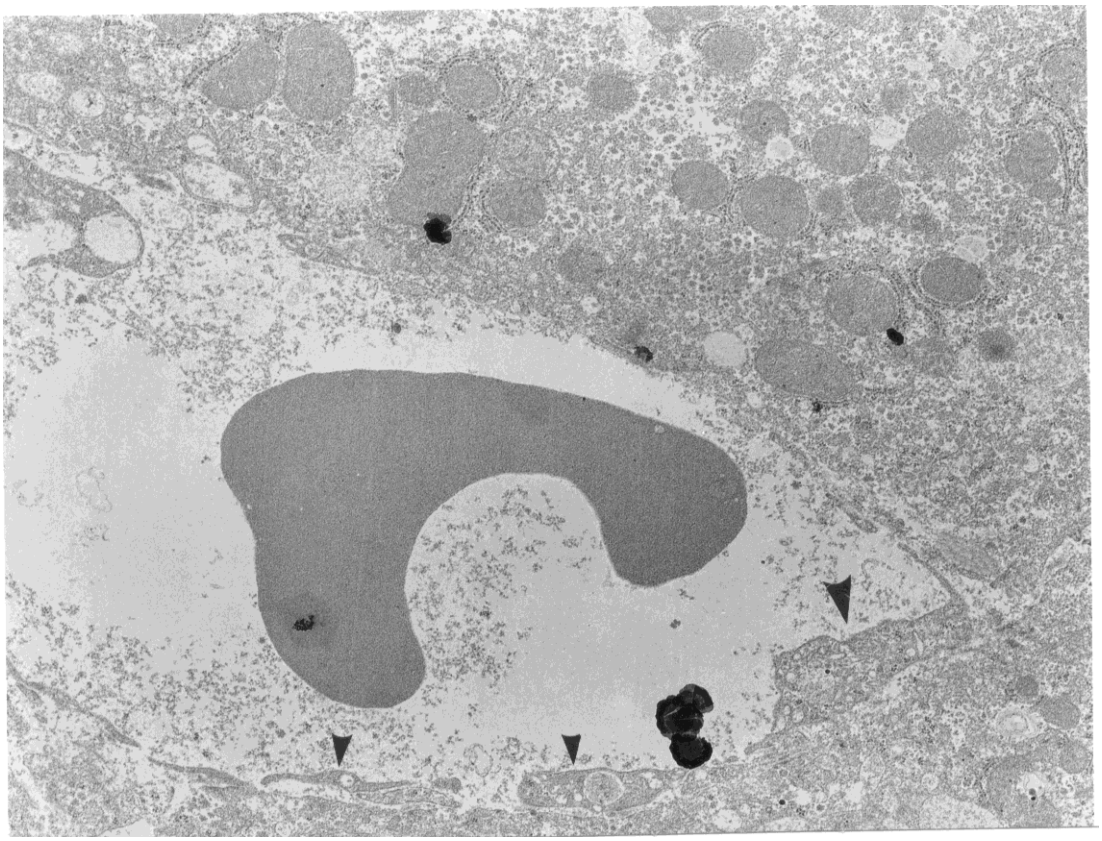
Εικόνα 4. Απλό Μικροσκόπιο Μεγέθυνση x1000 Χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης



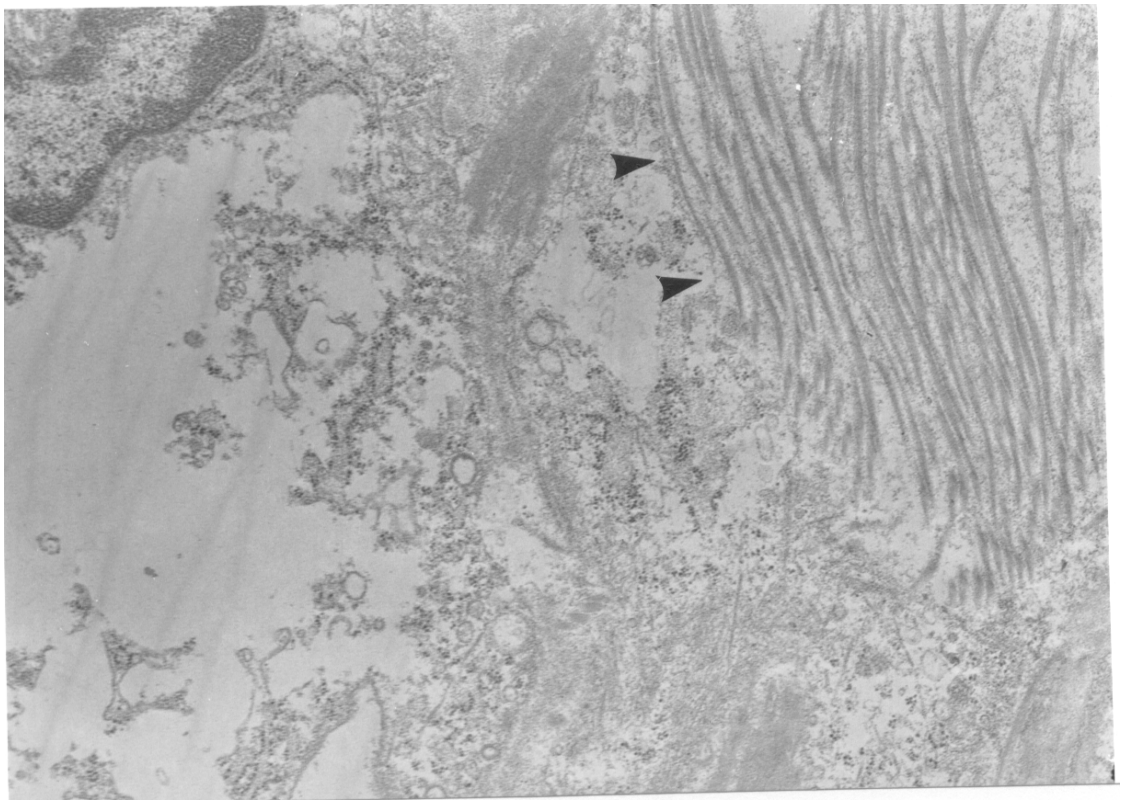
Εικόνα 5. Απλό Μικροσκόπιο Μεγέθυνση x400. Χρώση ρετικουλίνης



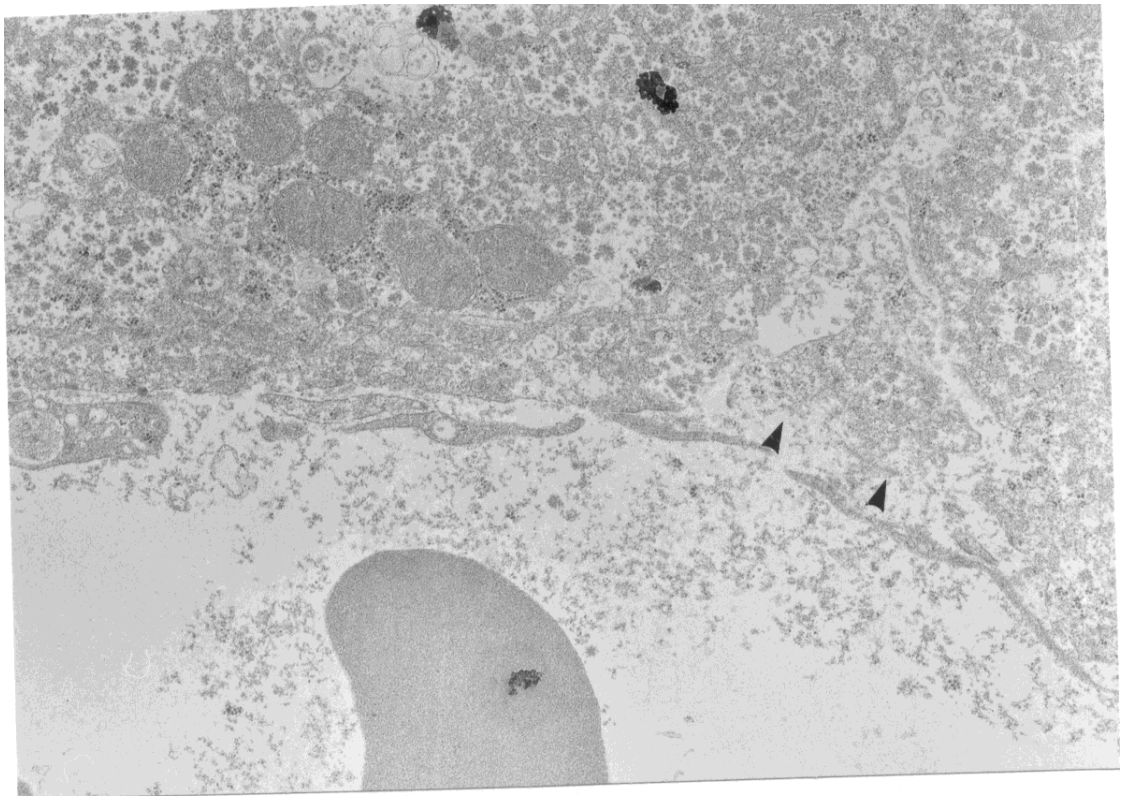
Εικόνα 6. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο (Ομάδα 1)



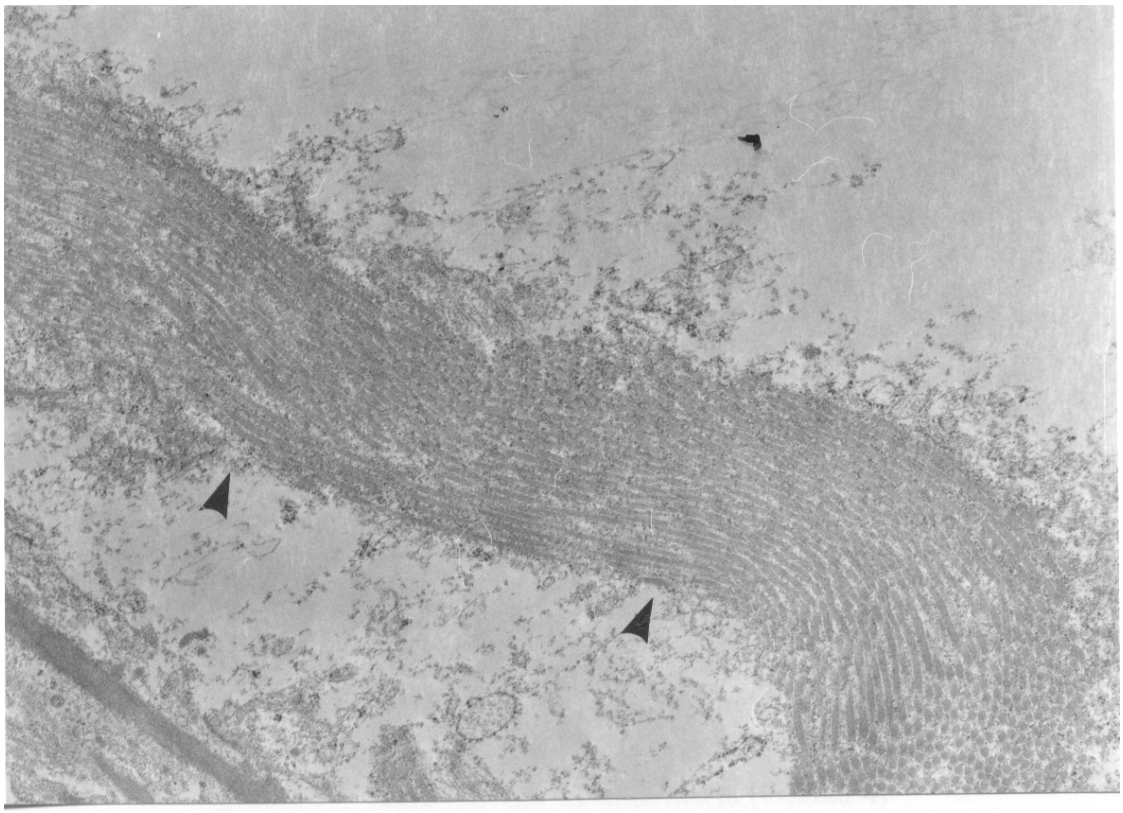
Εικόνα 7. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο (Ομάδα 2)



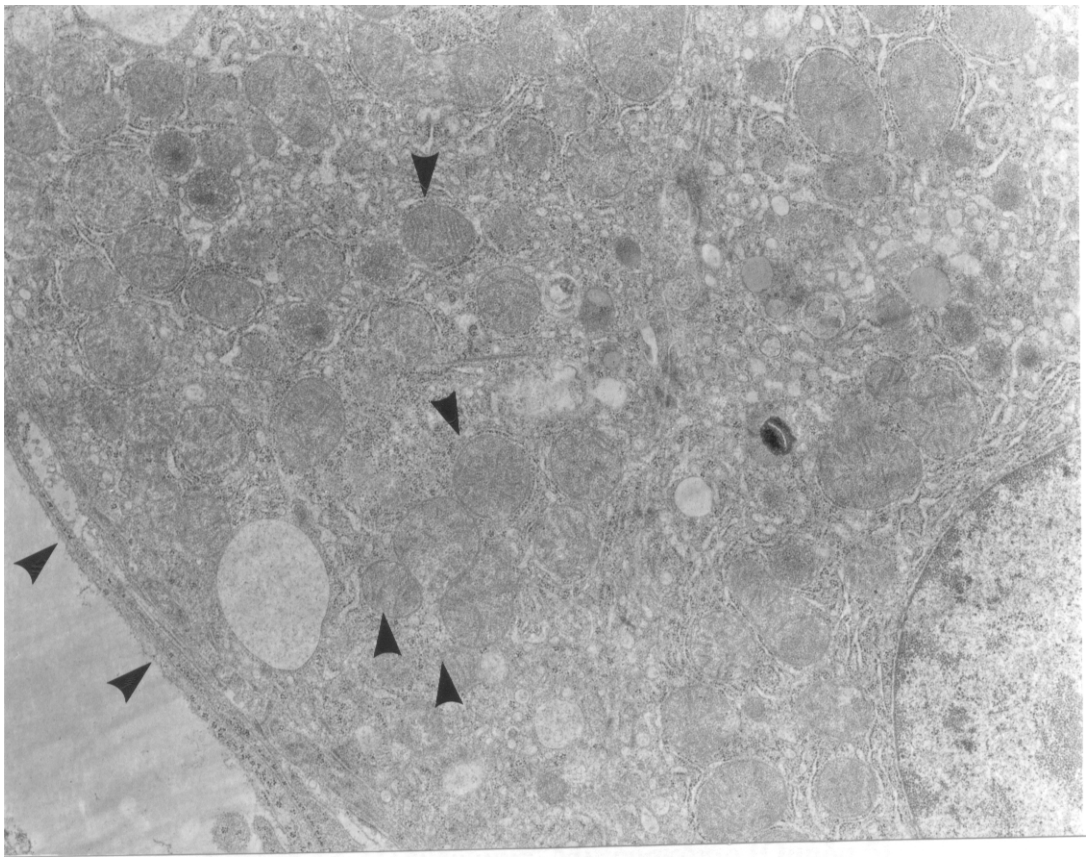
Εικόνα 8. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο (Ομάδα 2)



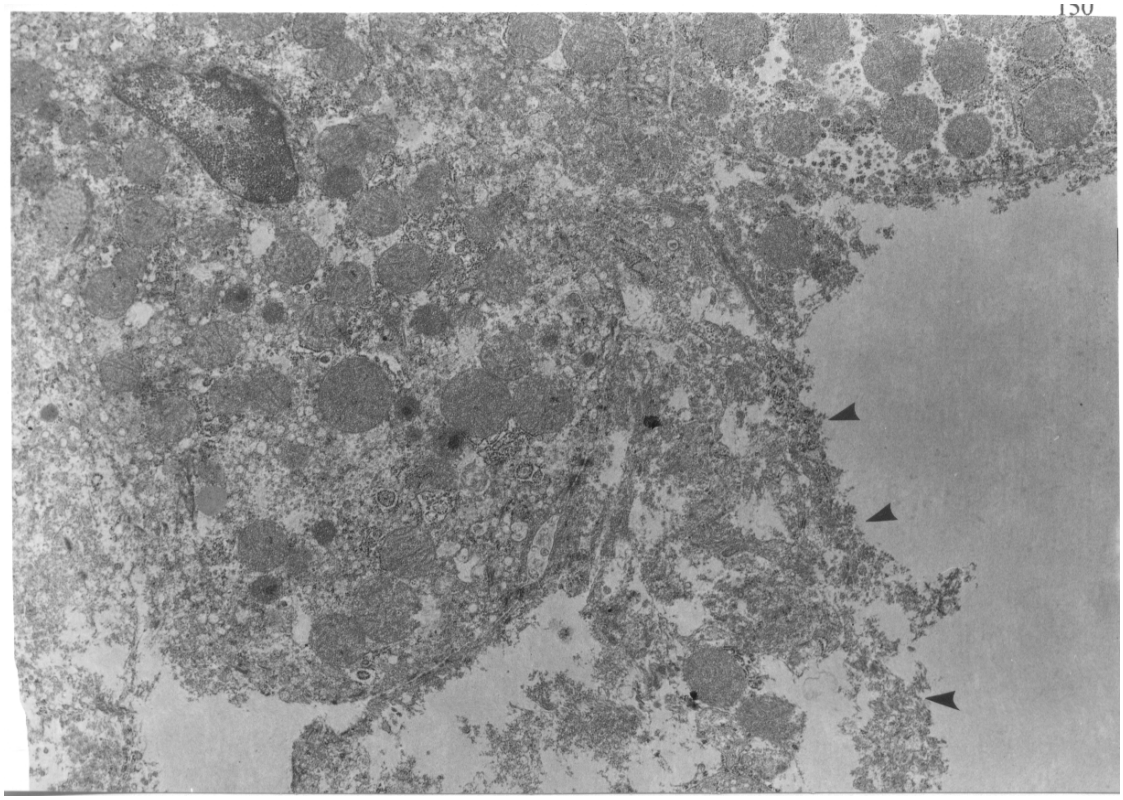
Εικόνα 9. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο (Ομάδα 2)



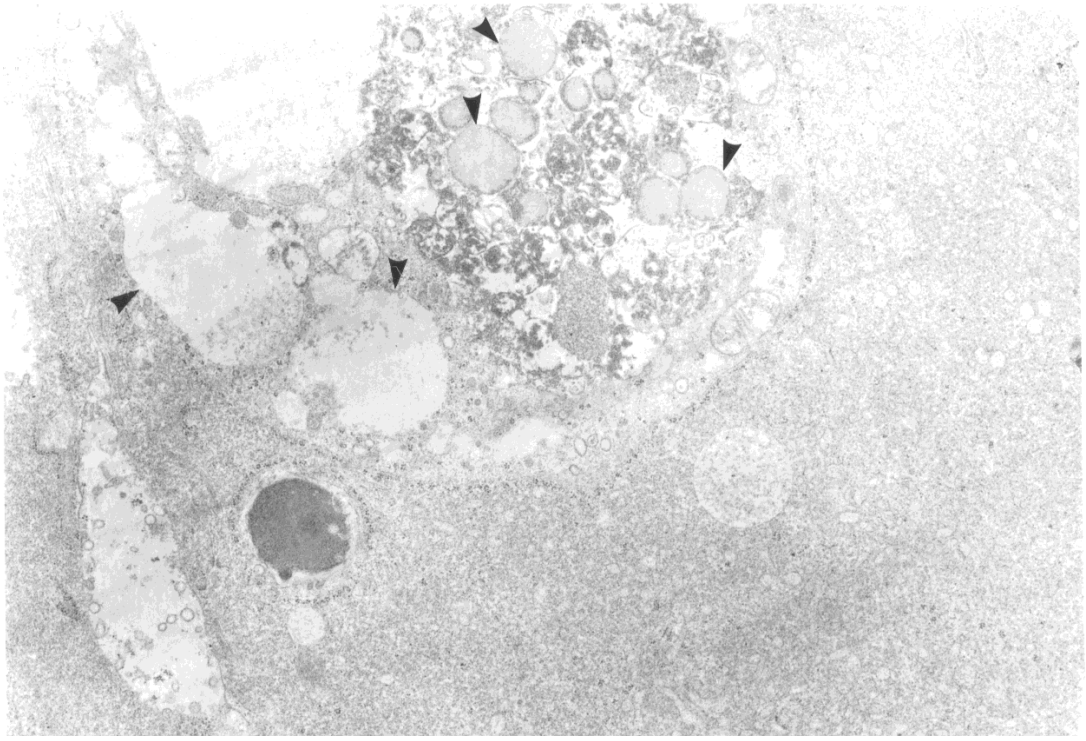
Εικόνα 10. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο (Ομάδα 3)



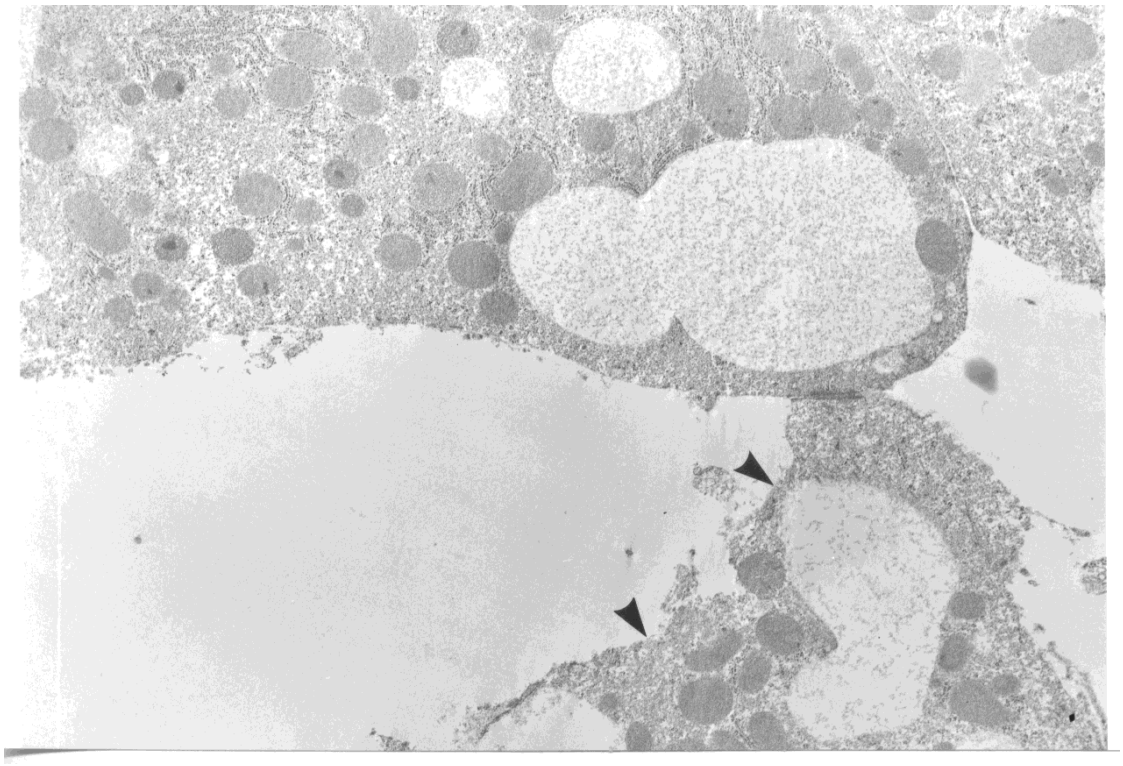
Εικόνα 11. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο (Ομάδα 4)



Εικόνα 12. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο (Ομάδα 4)

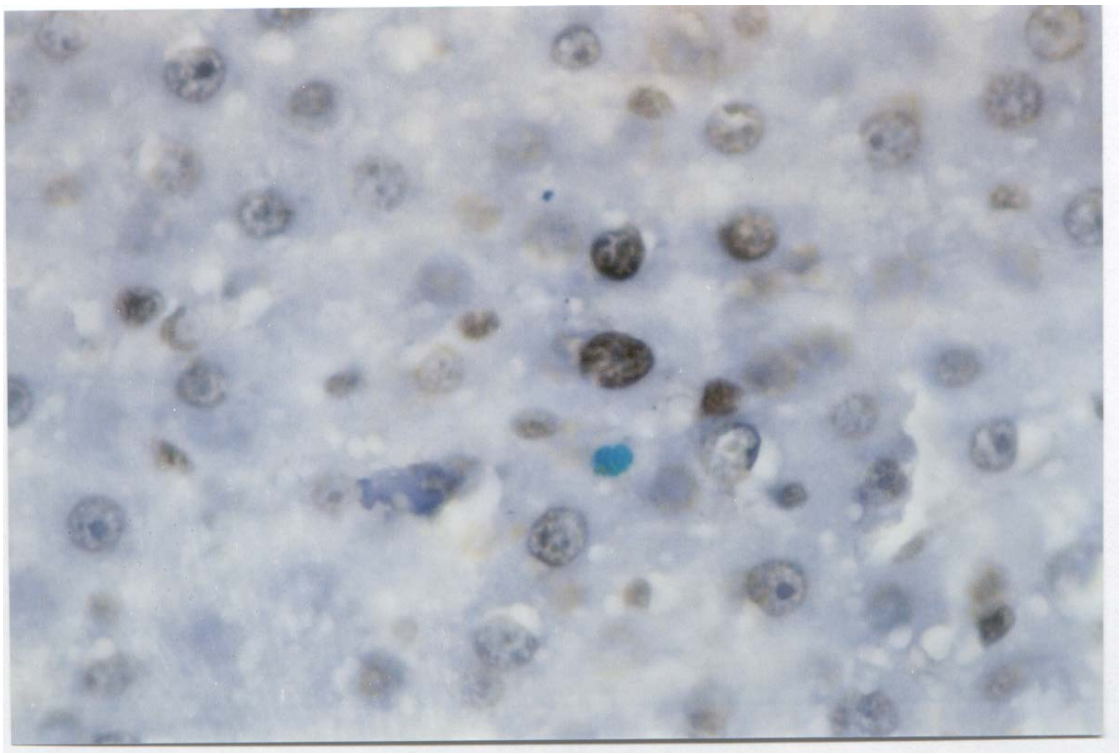


Εικόνα 13. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο (Ομάδα 5)

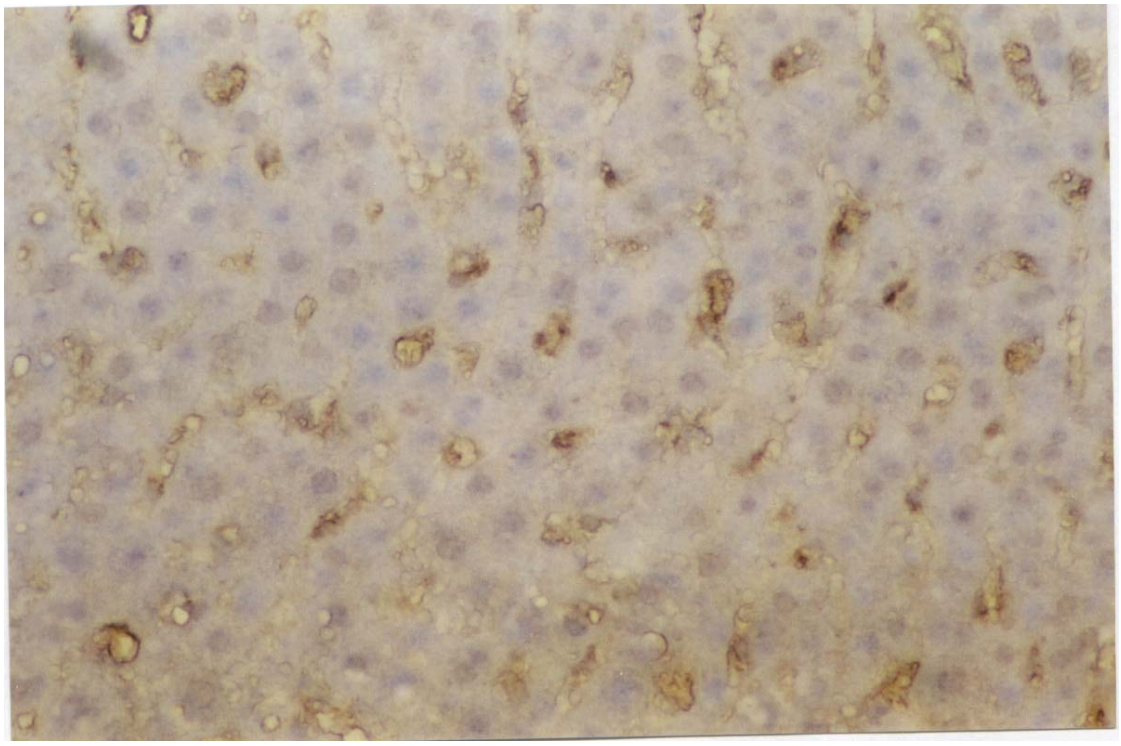


Εικόνα 14. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο (Ομάδα 5)

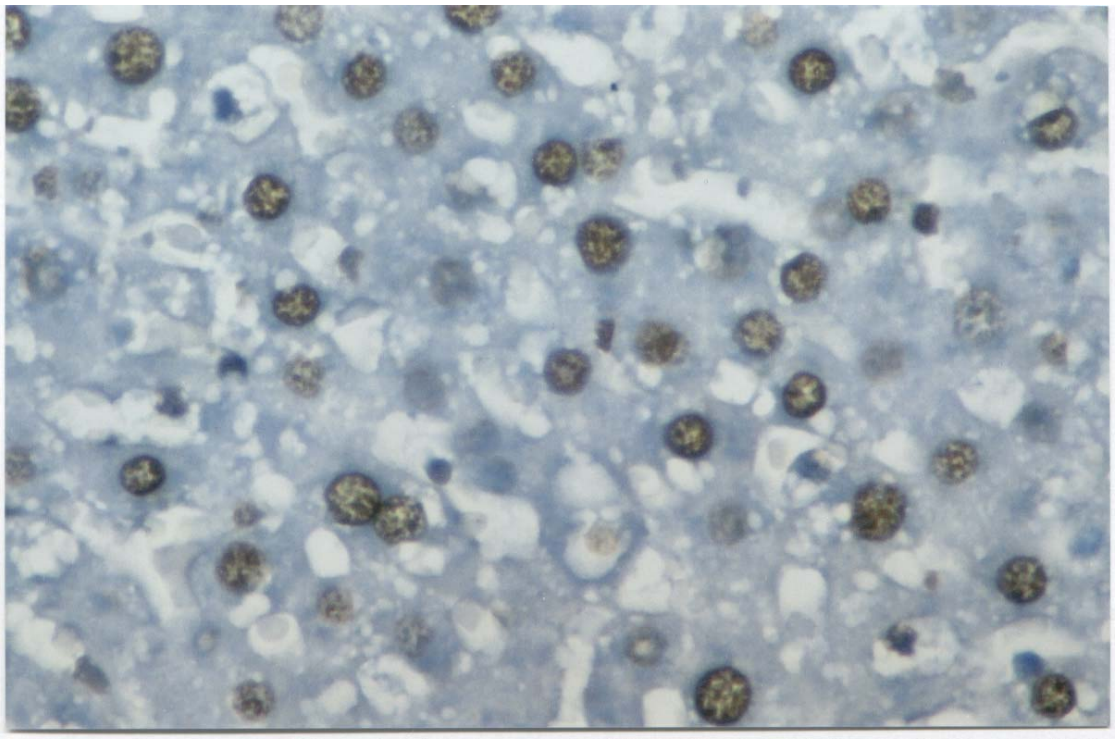
Εικόνα 15 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο (Ομάδα 5)



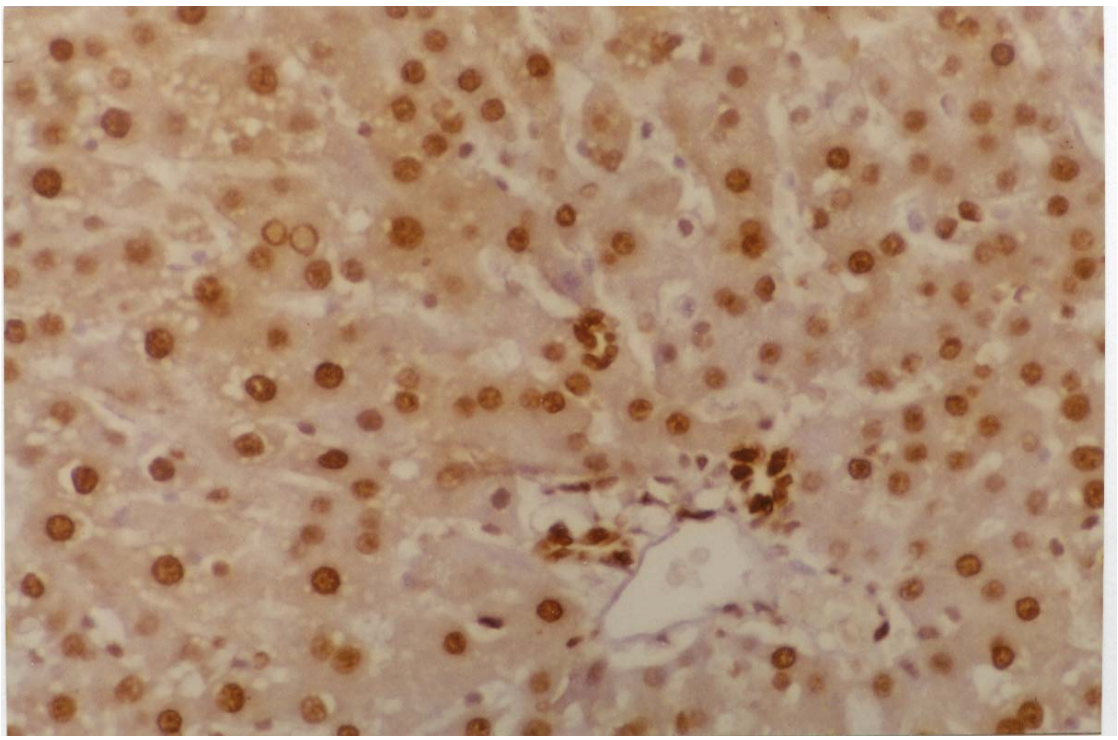
Εικόνα 16 Tunel (Ομάδα 1)



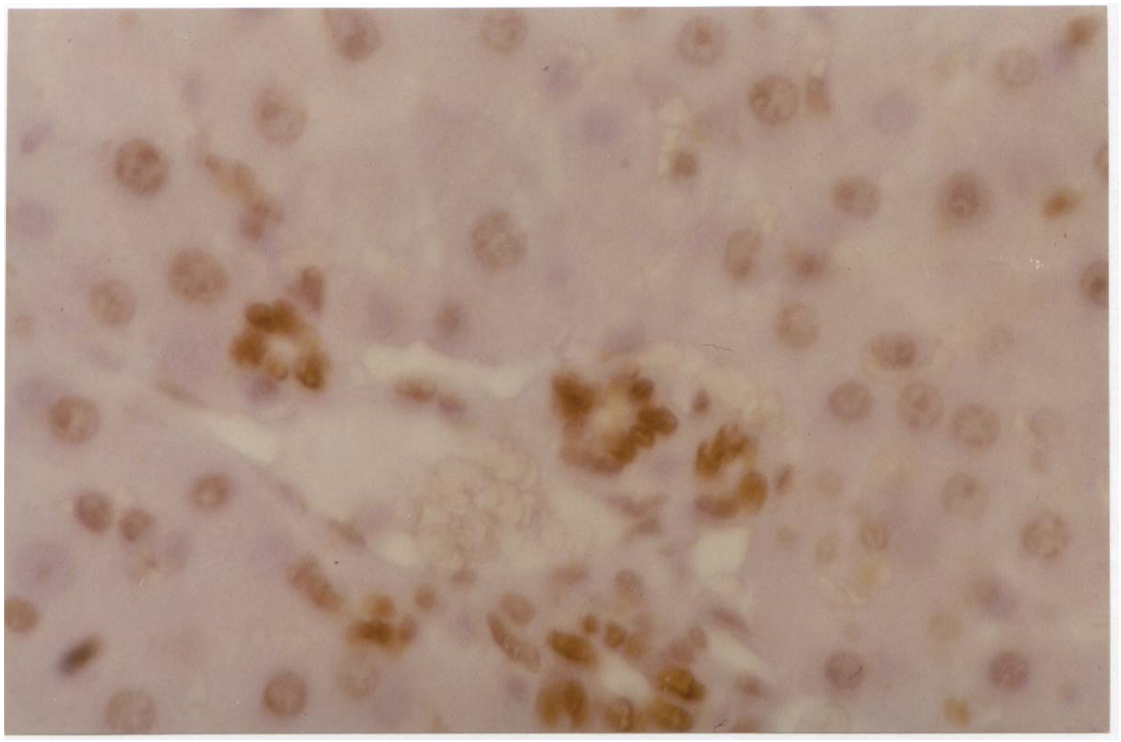
Εικόνα 17. Tunel (Ομάδα 2)



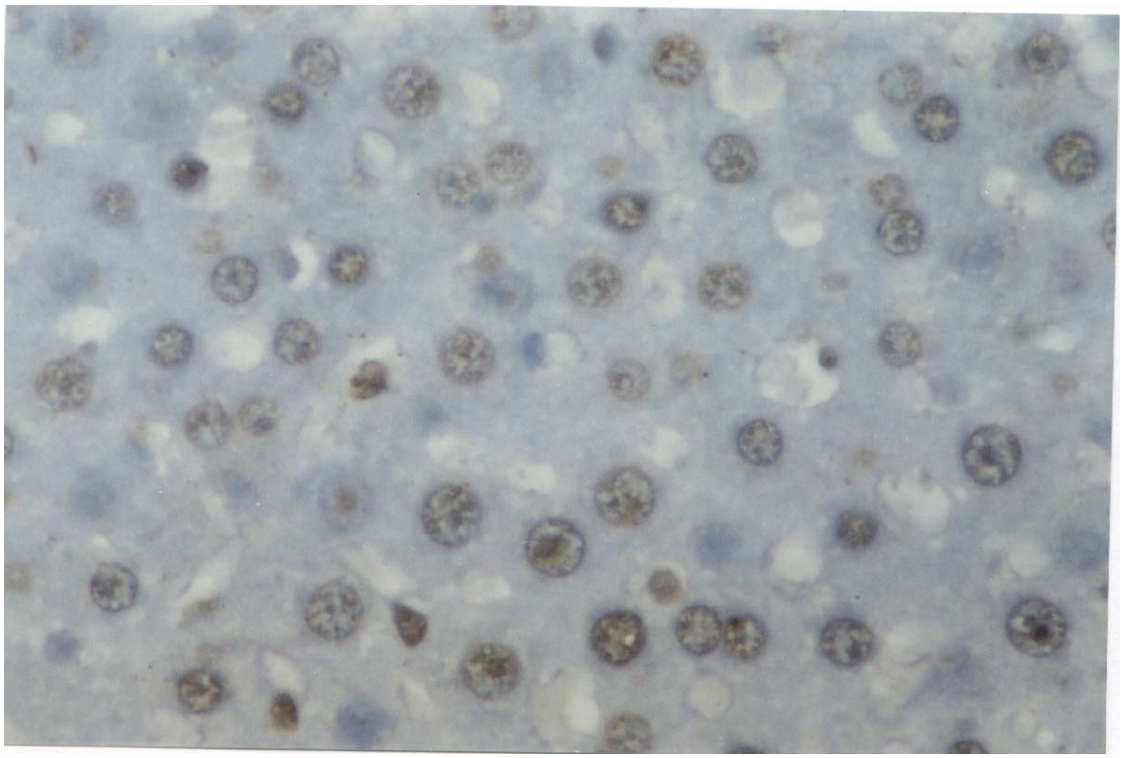
Εικόνα 18. Tunel (Ομάδα 3)



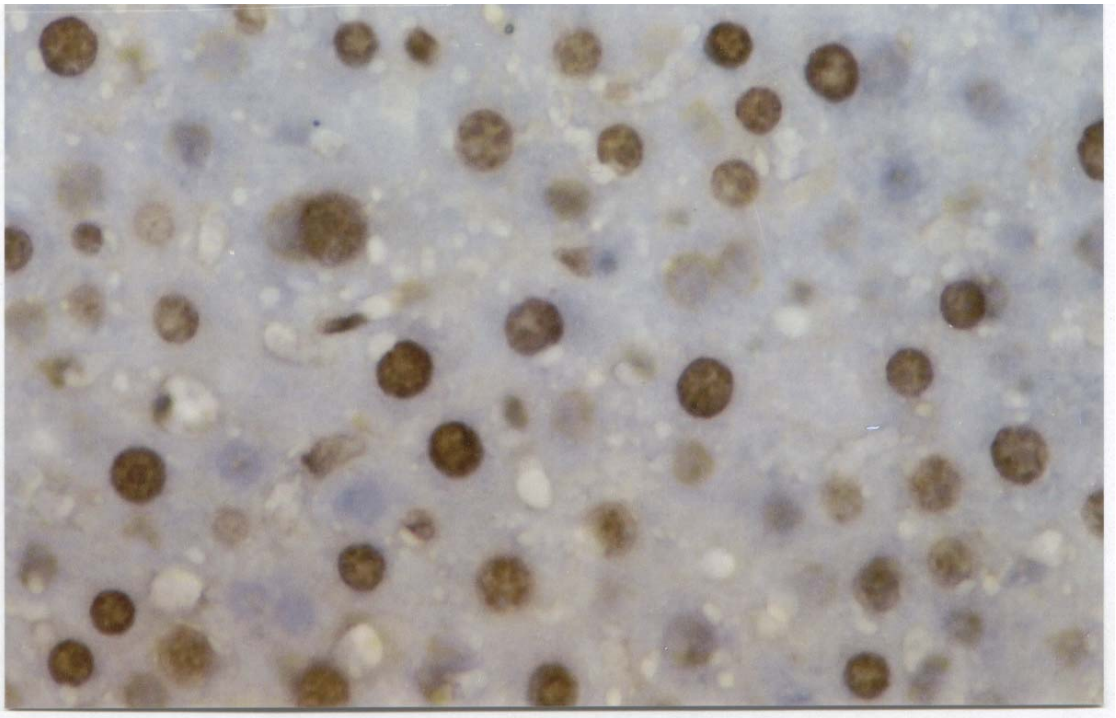
Εικόνα 19. Tunel (Ομάδα 3)



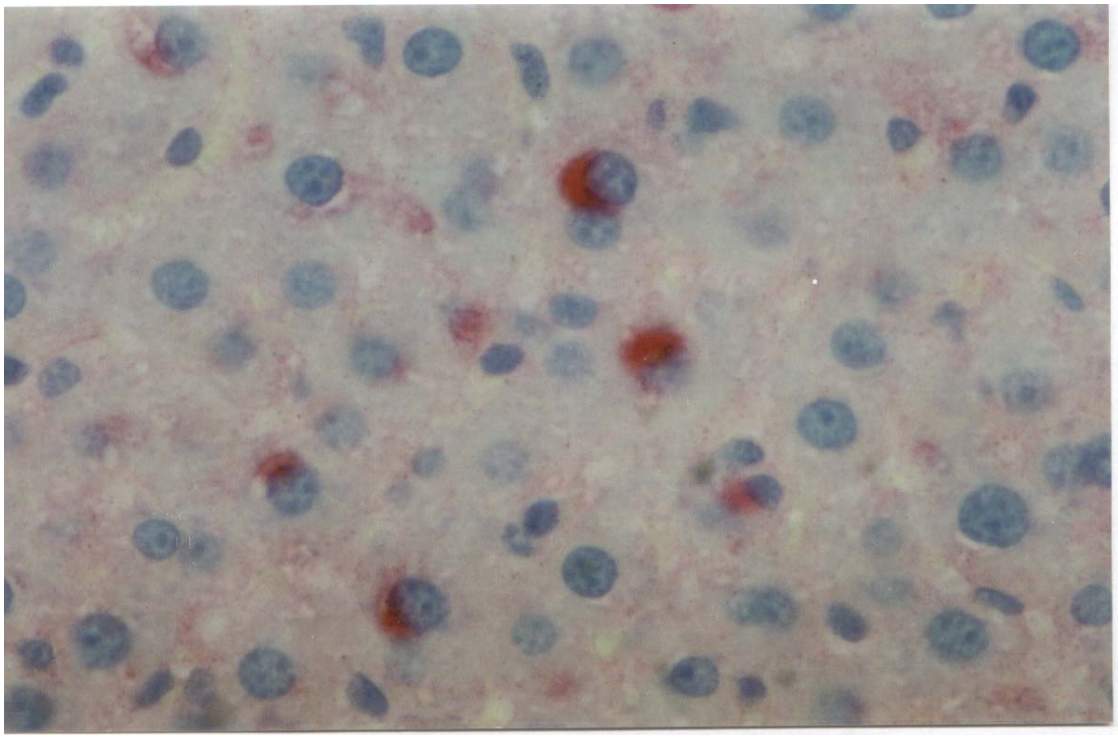
Εικόνα 20. Tunel (Ομάδα 4)



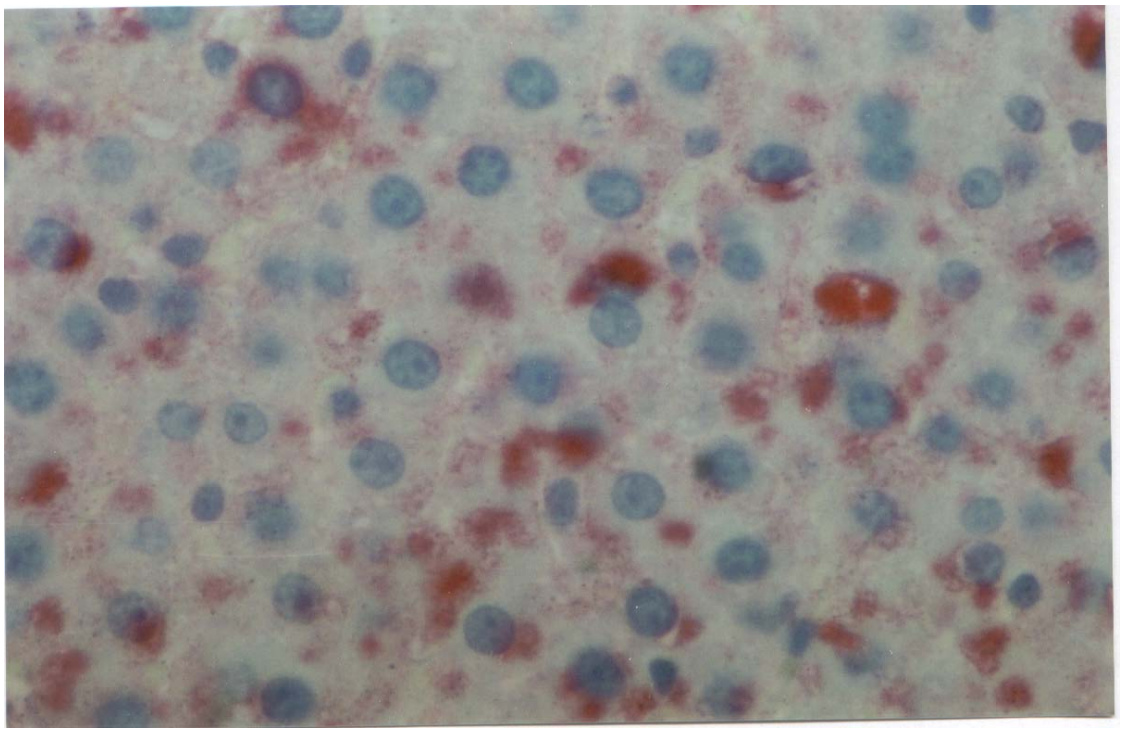
Εικόνα 21. Tunel (Ομάδα 4)



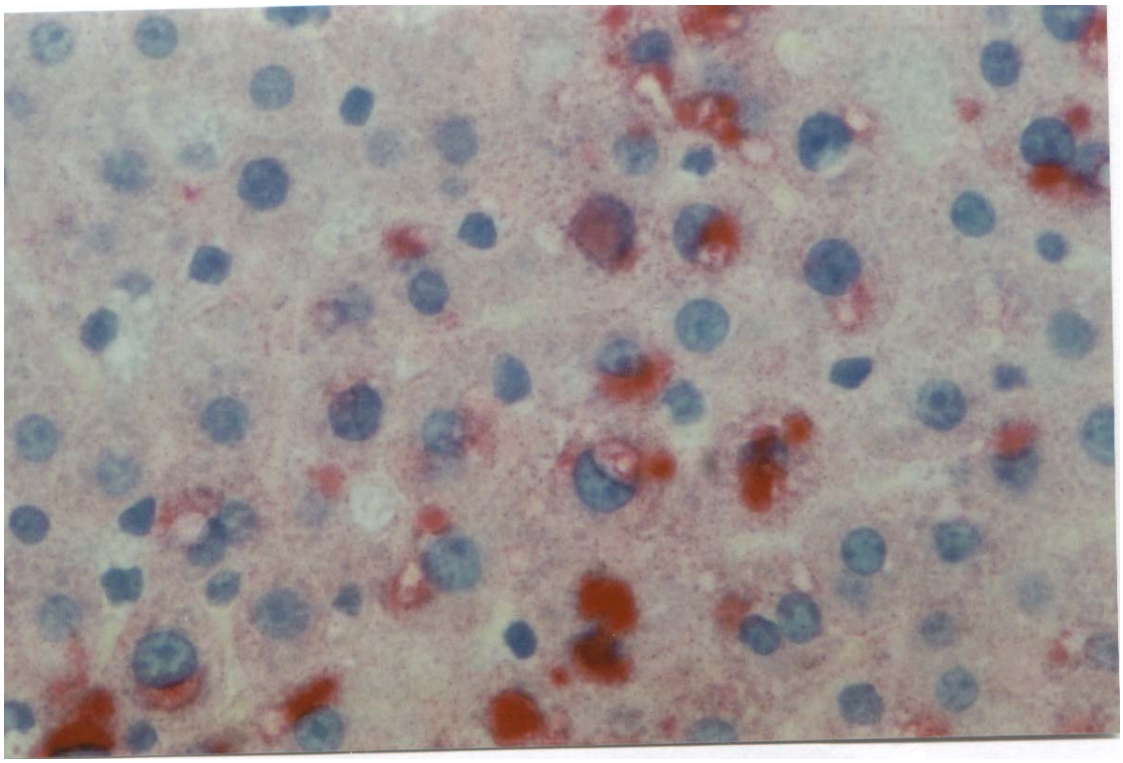
Εικόνα 22. Tunel (Ομάδα 5)



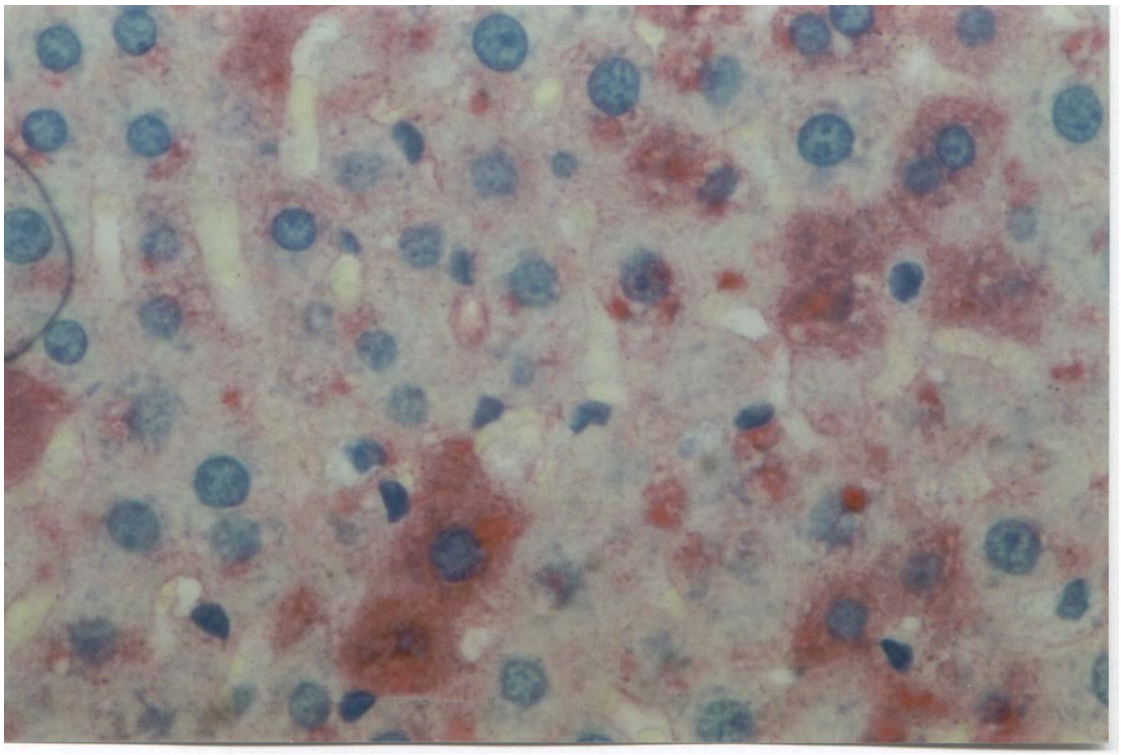
Εικόνα 23. Bcl-2 (Ομάδα 1) Μεγέθυνση x400



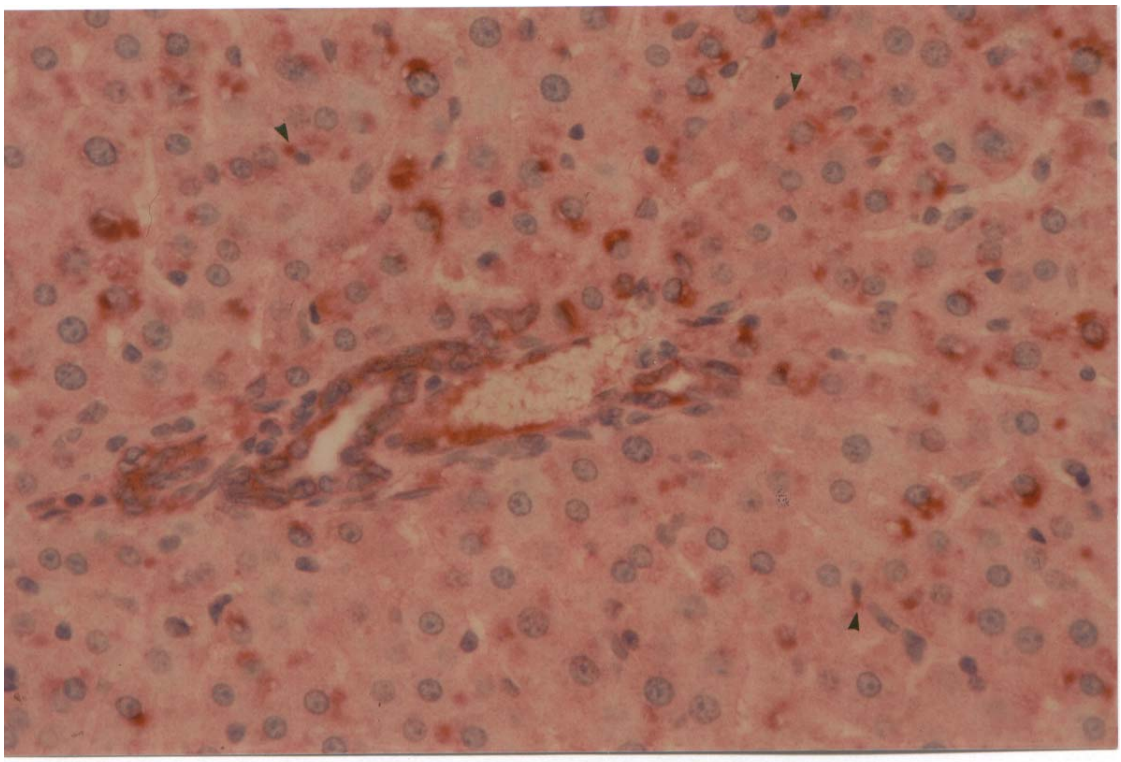
Εικόνα 24. Bcl-2 (Ομάδα 1) Μεγέθυνση x400



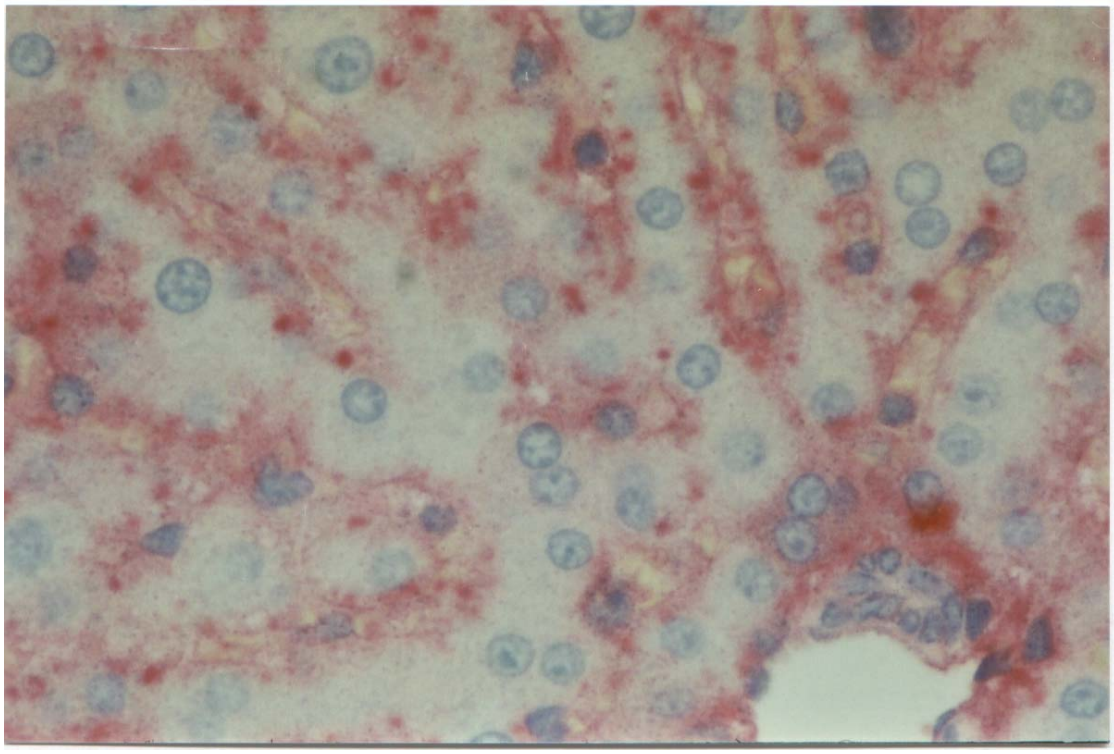
Εικόνα 25. Bcl-2 (Ομάδα 2) Μεγέθυνση x400



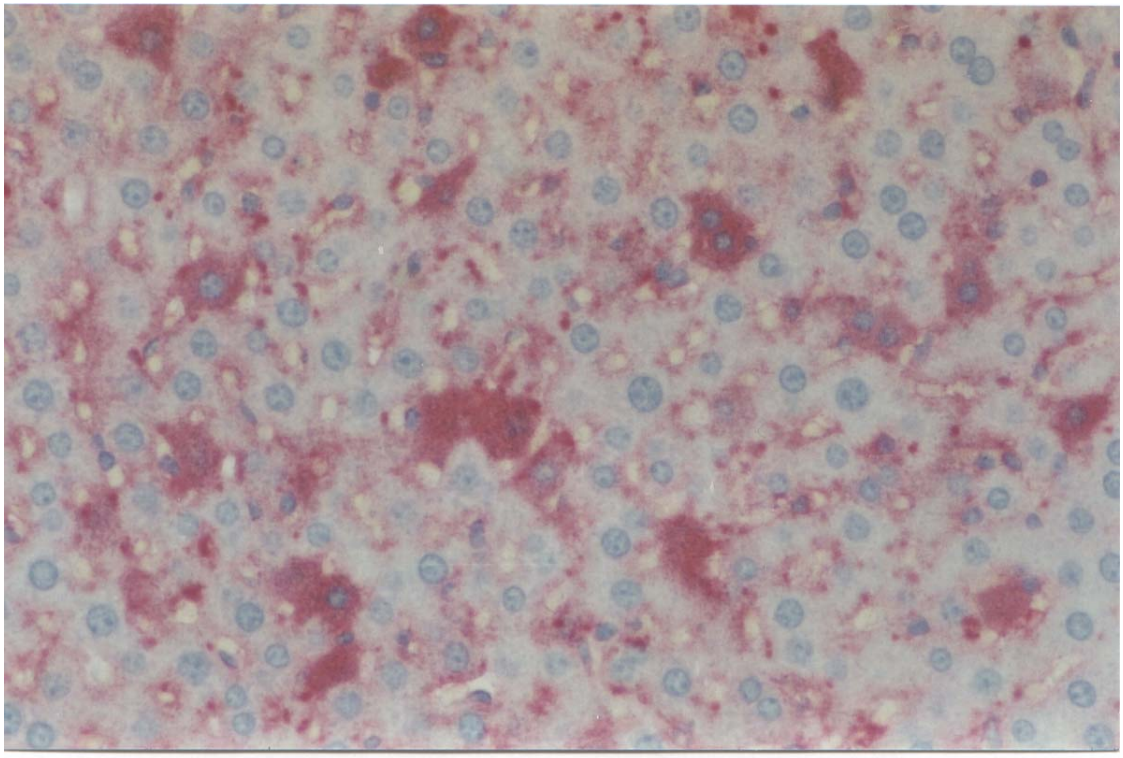
Εικόνα 26. Bcl-2 (Ομάδα 3) Μεγέθυνση x400



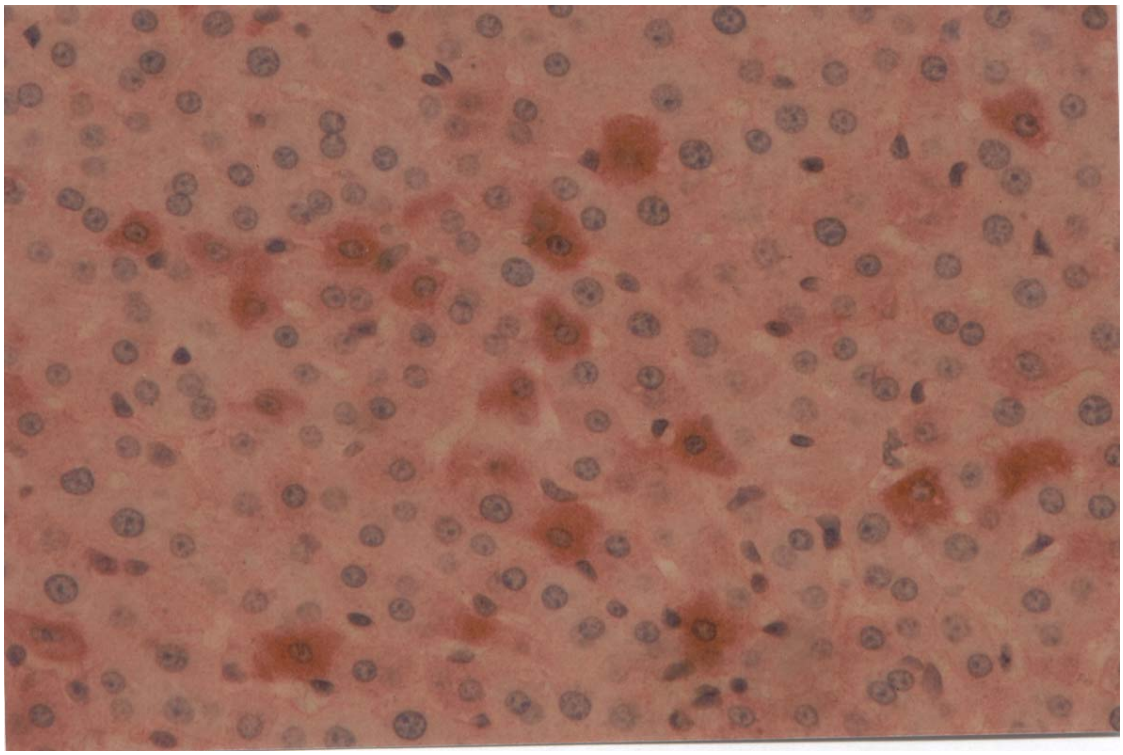
Εικόνα 27. Bcl-2 (Ομάδα 3) Μεγέθυνση x200



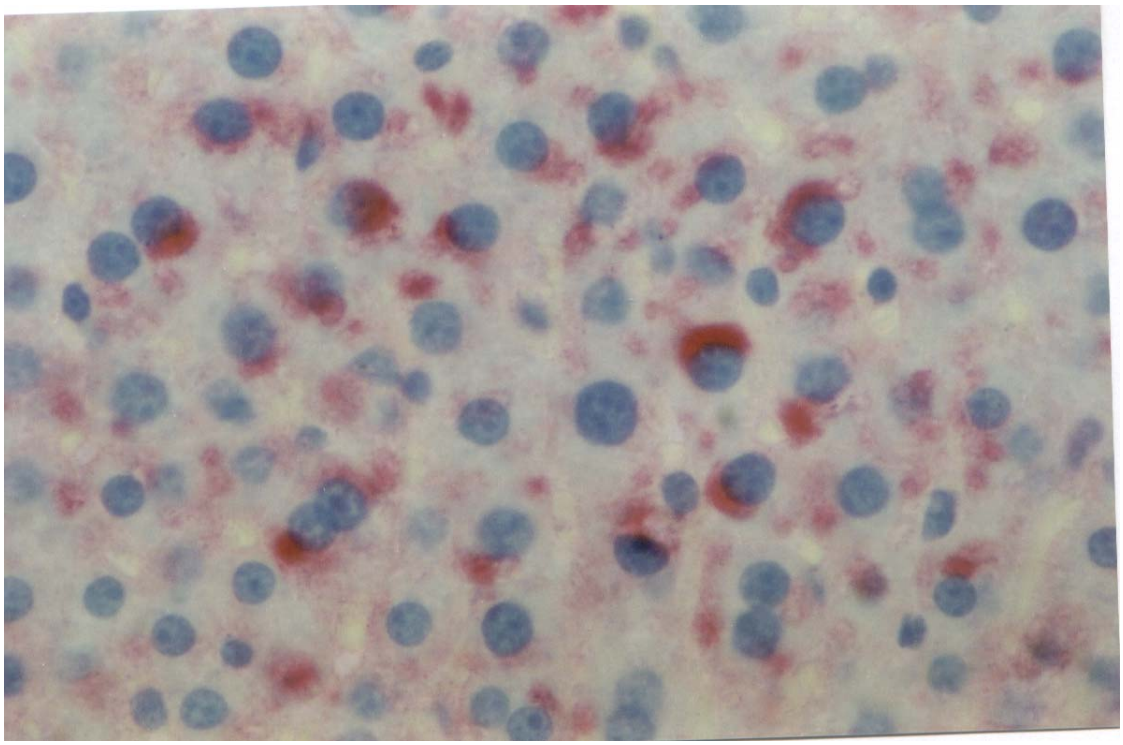
Εικόνα 28. Bcl-2 (Ομάδα 4) Μεγέθυνση x400



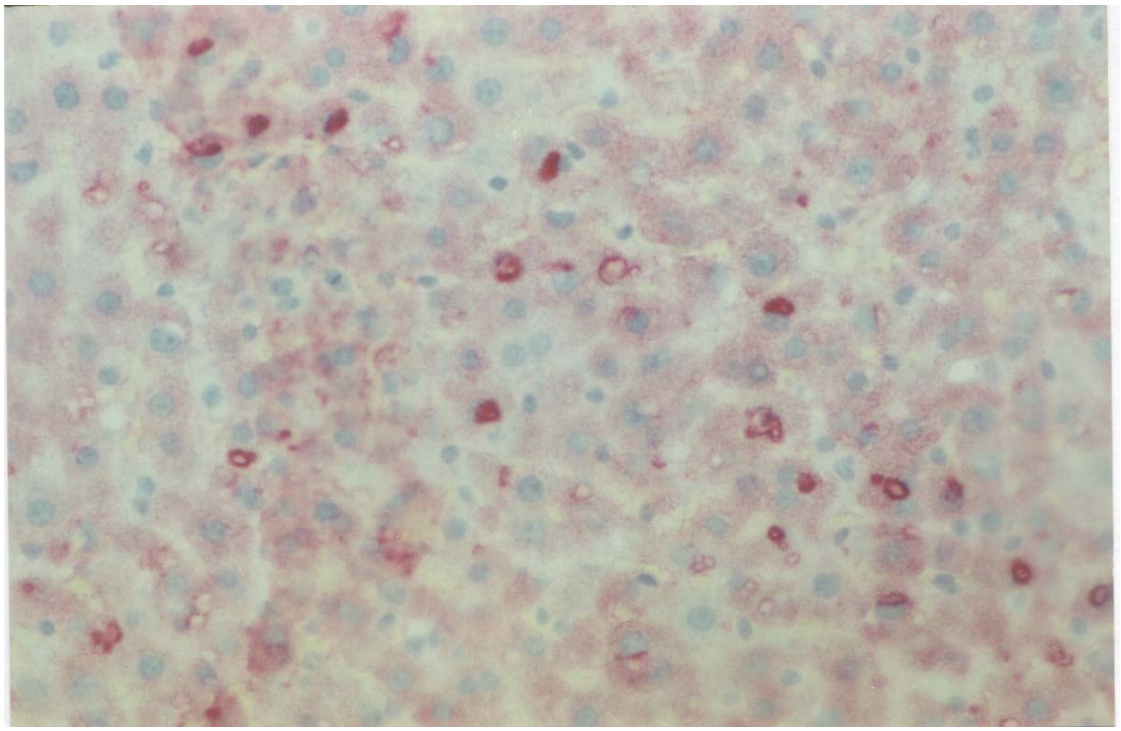
Εικόνα 29. Bcl-2 (Ομάδα 4) Μεγέθυνση x200



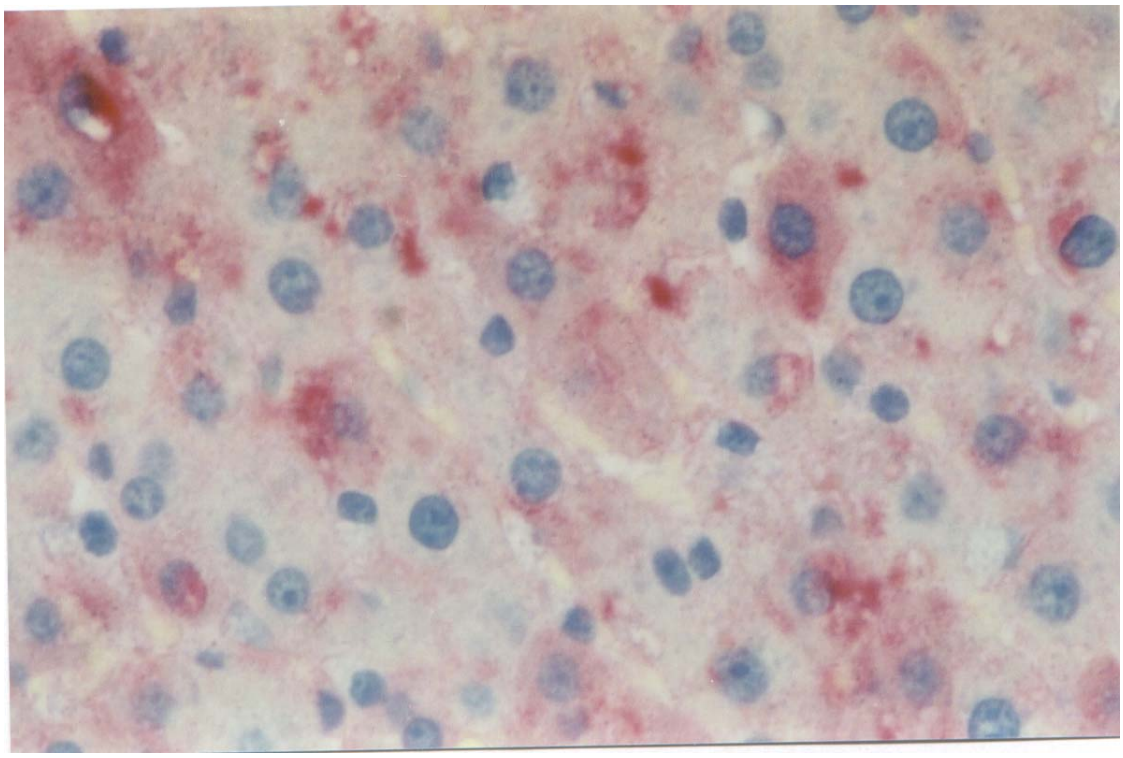
Εικόνα 30. Bcl-2 (Ομάδα 5) Μεγέθυνση x200



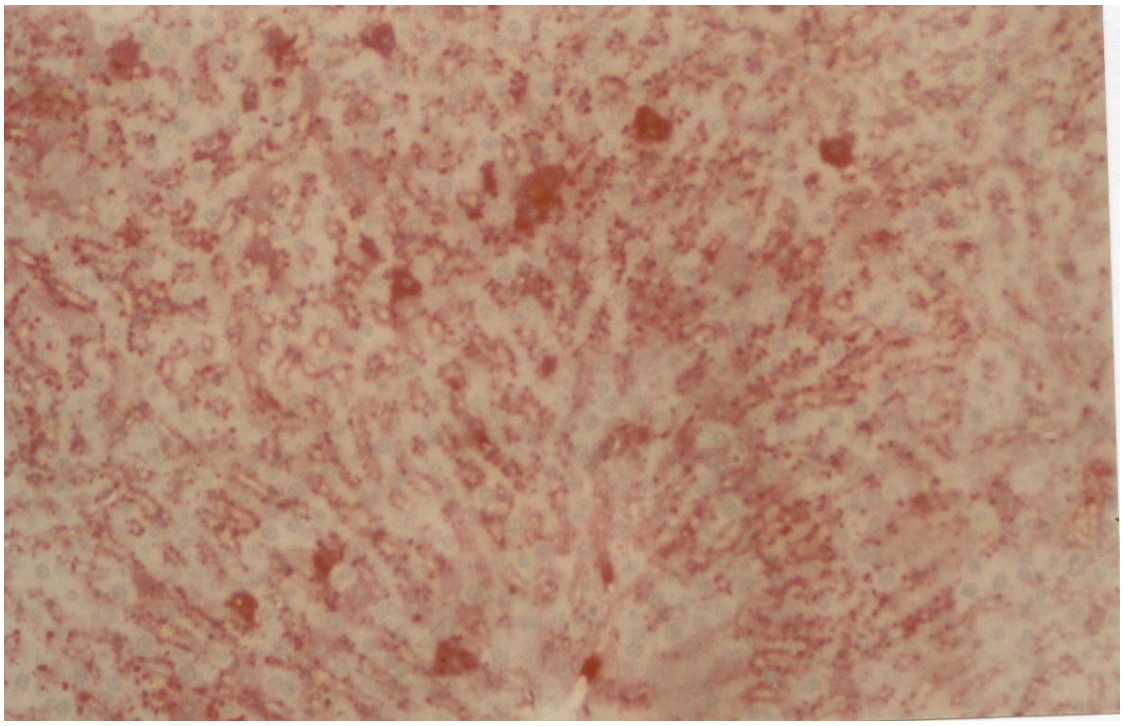
Εικόνα 31. WAF (Ομάδα 1) Μεγέθυνση x400



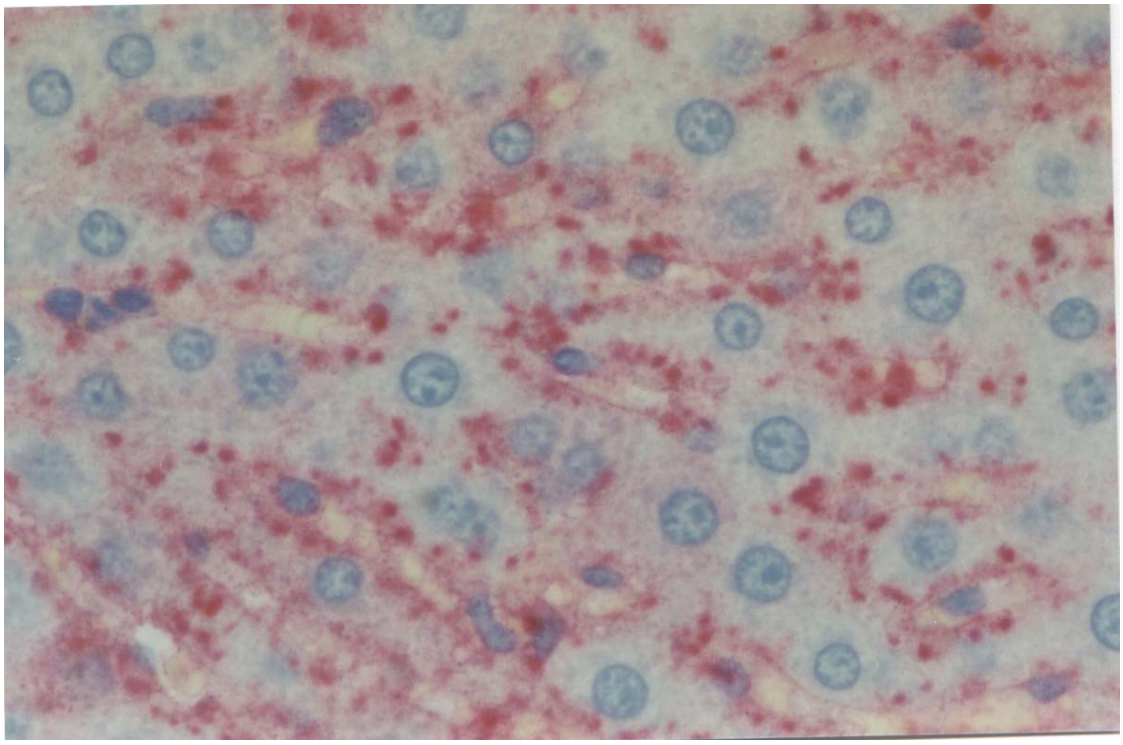
Εικόνα 32. WAF (Ομάδα 2) Μεγέθυνση x200



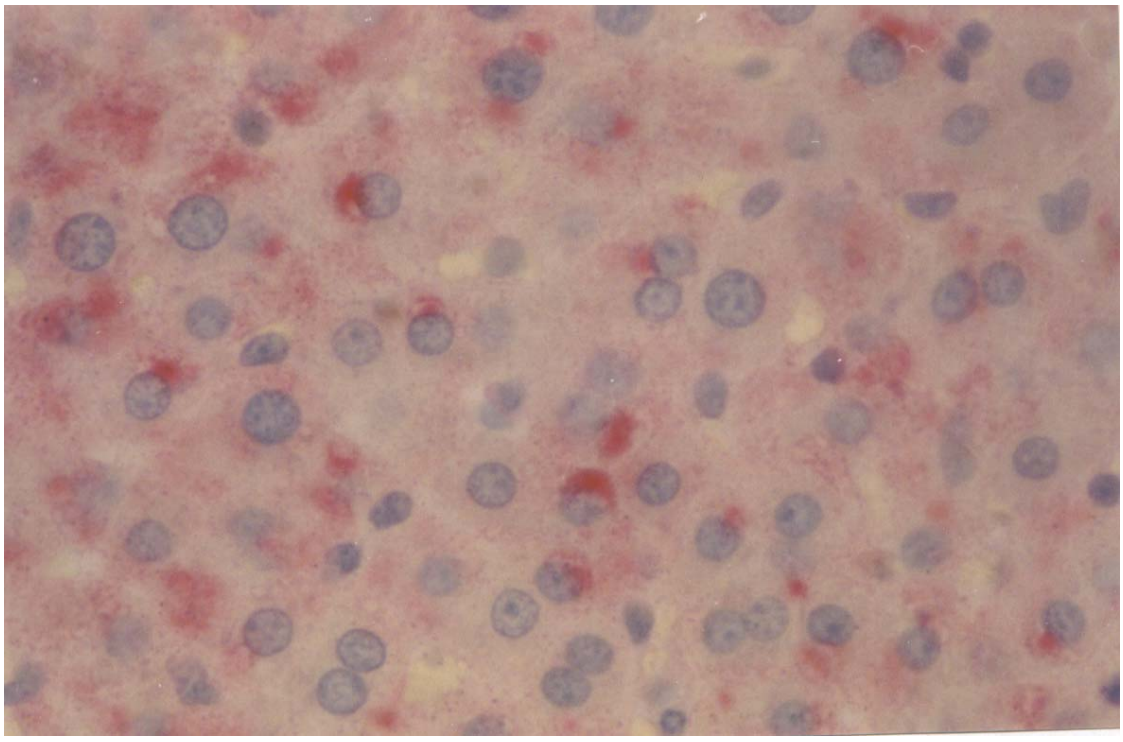
Εικόνα 33. WAF (Ομάδα 3) Μεγέθυνση x400



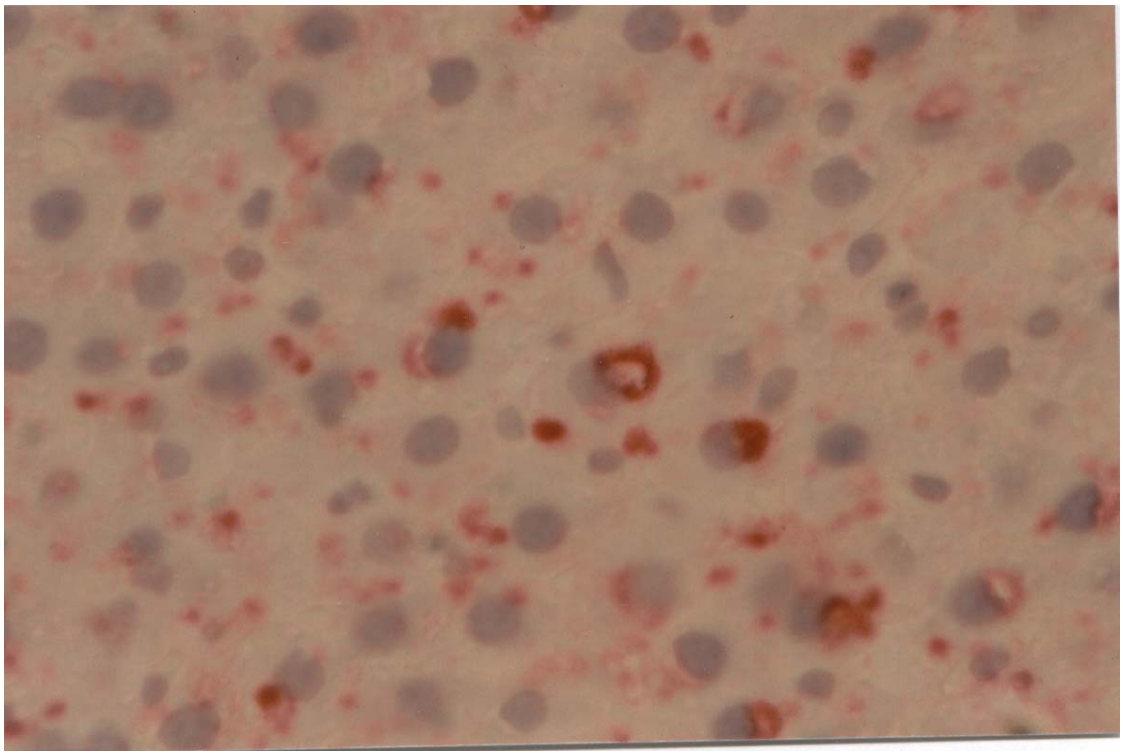
Εικόνα 34. WAF (Ομάδα 4) Μεγέθυνση x100



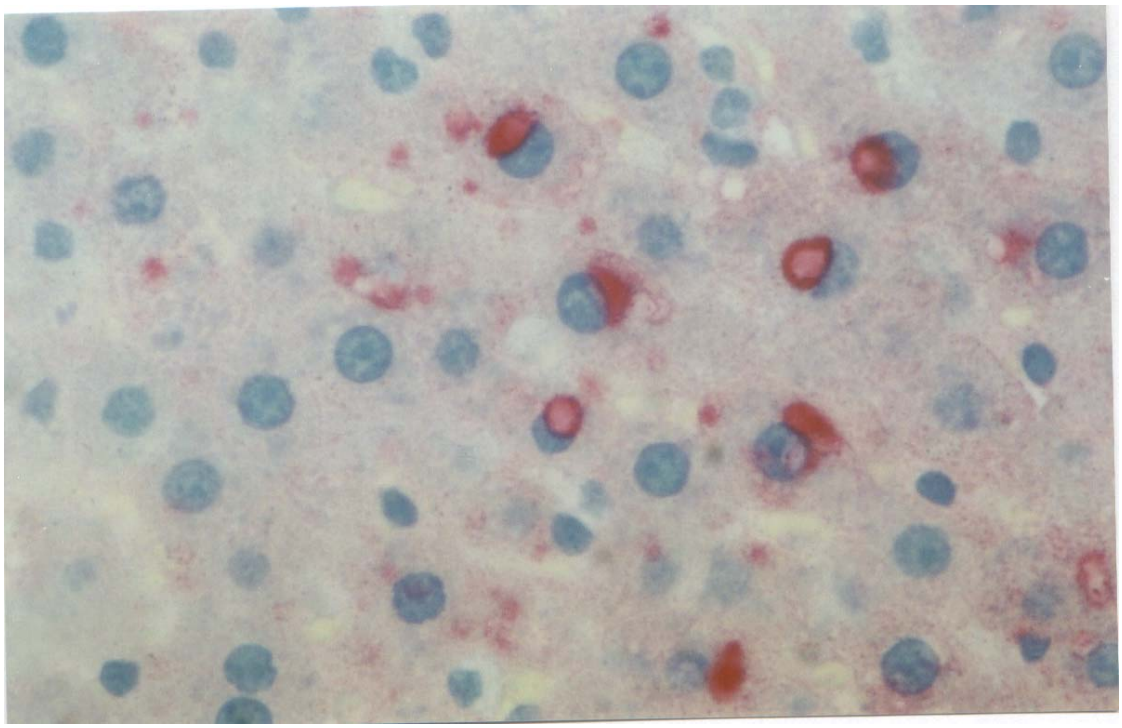
Εικόνα 35. WAF (Ομάδα 4) Μεγέθυνση x400



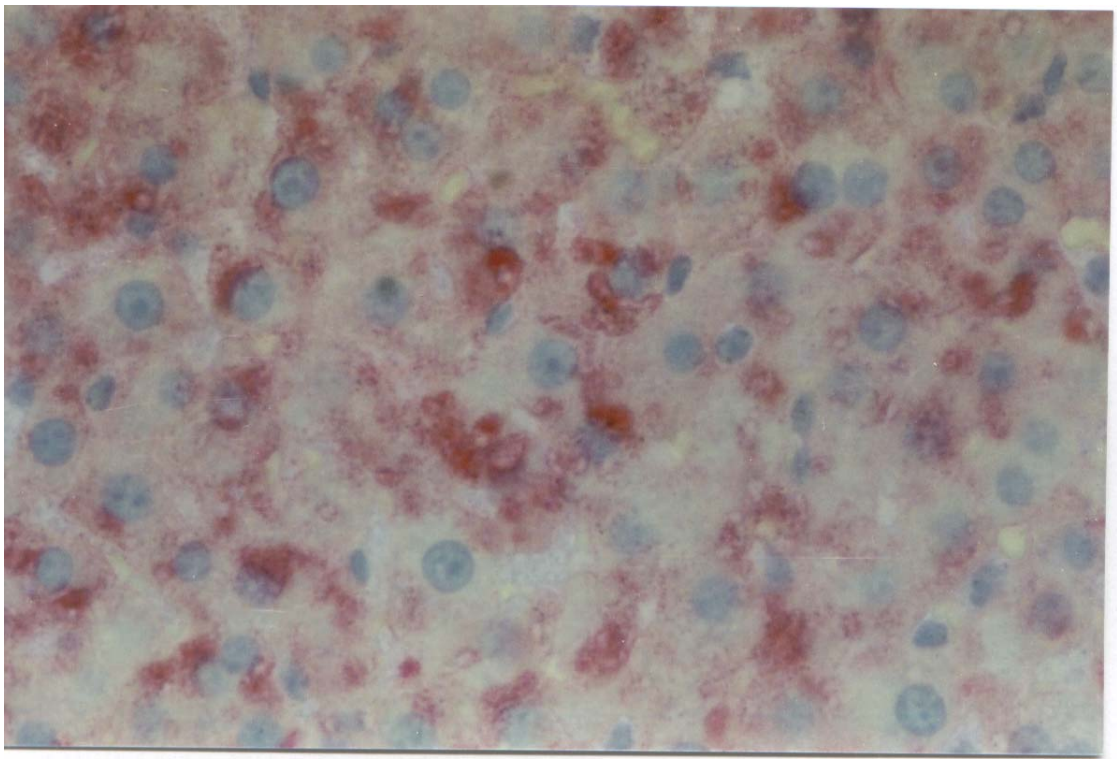
Εικόνα 36. WAF (Ομάδα 5) Μεγέθυνση x400



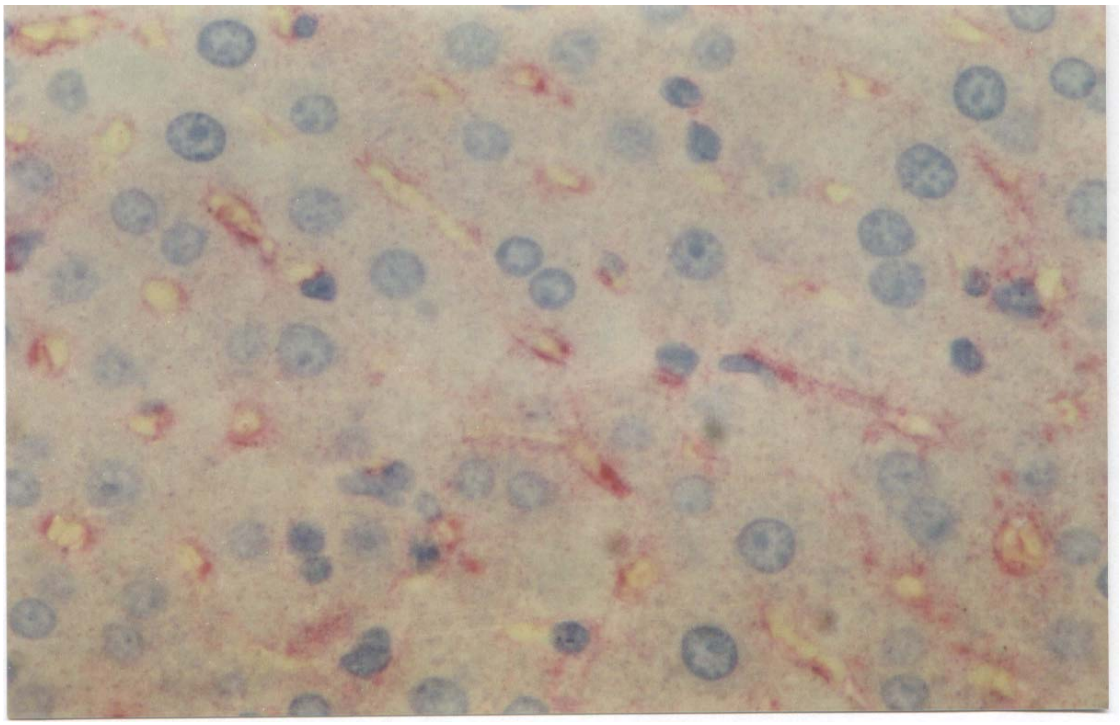
Εικόνα 37. p 53 (Ομάδα 1) Μεγέθυνση x400



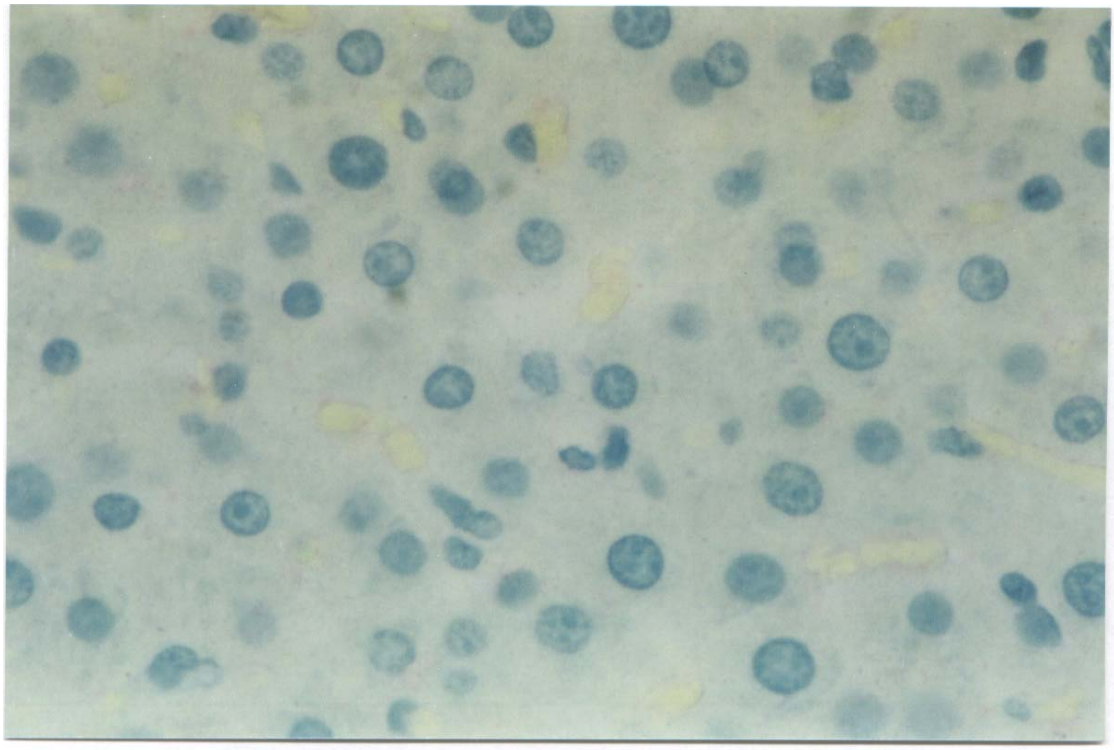
Εικόνα 38. p 53 (Ομάδα 2) Μεγέθυνση x400



Εικόνα 39. p 53 (Ομάδα 3) Μεγέθυνση x400



Εικόνα 40. p 53 (Ομάδα 4) Μεγέθυνση x400



Εικόνα 41. p 53 (Ομάδα 5) Μεγέθυνση x400

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1.Wisse E.Knook DL(eds).(1977) Kupffer cells and other liver sinusoidal cells. Amsterdam. Elsevier/North Holland

2. FahimiHD.(1982)Sinusoidal endotelial cells and perisinusoidal fat-storing cells:structure and function.In: Arias I,Popper H,Schachter D,Shafritz DA,(eds)The liver biology and pathobiology.New York:Raven Press.p495-506,

3. Wisse E.Knook DL.(1979)The investigation of sinusoidal cells:a new approach to the study of liver function.In : Popper H,Schaffner F.eds.Liver diseases.New York:Grune & Stratton. p153-171

4.Toth CA,Thomas P.(1992)Liver endocytosis and Kupffer cells.Hepatology 16:255-266

5.Van Berkel TJC.(1981)Functions of hepatic non parenchymal cells.In: Sies H. ed.Metabolic compartmentation. London: Academic Press.p437-482

6. Wisse E,Knook DL(1979) The investigation of sinusoidal cells:a new approach to the liver function.Prog.Liver Dis.6:p153-171

7. Wisse E,(1977) Ultrastructure and function of Kupffer cells and other sinusoidal cells in the liver.In:Wisse E,Knook DL,eds.Kupffer cells anf other liver sinusoidal cells .Amsterdam:Elsevier,:36-60

8.MacPhee PJ,Schmidt EE.(1992)Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoid,from high Resolution in vivo microscopy.Am J Physiol :236:G17-23

9. Bouwens L,Backeland M(1986),Quantitation tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver.Hepatology 6:p718-722

10. Kaneda K,Wake K,(1983)Distribution and morphological characteristics of the pit cells in the liver ofthe rat Cell Tissue Res.233:p485-505

11.Sleyster EC,KnookDL,(1982)Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells.Lab Inves :47:484-490

12.Itoh Y,Okanoue T,Morimoto M(1992) Functional heterogeneity of rat liver macrophages:interleukin 1 secretion and la antigen expression in contrast with phagacytic activity.Liver 12,:26-33
13.Daemen T,Veninga A,Roerdink FH(1989)Endocytic and tumoriricidal heterogeneity of rat liver macrophage populations.Sel Cancer Ther 5,157-167
14.Racine RN,Cormier SM(1992)Effect of spaceflight on rat hepatocytes:a morphometric study .J.Appl.Physiol, 73p136S-142S
15.Motta PM (1984)The three dimensional microanatomy of the liver.Arch Histol Jpn 47:1-30
16. Smedsrod B,Pertoft H,EggertsenG.(1985)Functional and morphological characterization of cultures of Kupffer cellsand liver endothelial cells prepared by means of density separation in Percoll and selective substrate adherence.Cell Tissue Res 241:639-649
17.Wisse E,de Zanger RB.(1980)On the morphology and other aspects of Kupffer cell function:observations and speculations concerning pinocytosis and phagocytosis. In:Liehr H,Grunn M eds.The reticuloendothelial system and the pathogenesis of the liver disease.Amsterdam:Elsevier,3-9
18.Bradfield JW,(1984)Liver sinusoidal cells,J.Pathol. 142:5-6
19 Emeis JJ(1976)Morphological and cytochemical heterogeneity of the cell coat of rat liver Kupffer cells.J Reticuloendothelial Soc 20:31-50
20.Motta PM,Makabe S.(1980)Foetal and adult liver sinusoidals and Kupffer cells as revealed by scanning electron microscopy.In:Liehr H,Grun M,eds.The Reticuloendothelial System and the Pathogenesis of Liver Disease .Amsterdam :Elsevier 11-16
21. Bankstrom PW,Pino RM.(1980)The development of the sinusoids of fetal liver;morphology of endothelial cells.Kupffer cells and the transmural migration of blood cells into the sinusoids.Am J.Anat 159:1-5
22.Naito M.Takahashi K.Nishikawa S(1980).Development differentiation and maturation of macrophages in the mouse liver J Leuk Biol 48:27-37
23.Bouwens L,Wisse E(1985),Proliferation kinetics and fate of monocytes in rat liver during a zymosan-induced inflammation J Leuk Biol 37:531-543

24. Bouwens L, Baekeland M.Wisse E,(1984) Importance of local proliferation in the expanding Kupffer cell population of rat liver after zymosan stimulation and partial hepatectomy Hepatology 4:213-219
25.Bouwens L,Baekeland M,Wisse E,(1986)Cytokinetic analysis of the expanding Kupffer cell population in rat liver Cell Tissue Kinet 19:217-226
26.Bouwens L,Knook DL,Wisse E(1986).Local proliferation and extraepatic recruitment of liver macrophages(Kupffer cell) in partial -body irradiated rats J Leuk Biol.39:687-697
27.Wacker HH,Radzun HJ, Parwaresh MR,(1986)Kinetics of Kupffer cells as shown by parabiosis and combined autoradiography/immunohistoche-mical analysis.Virchowr Arch 51;71-78
28.Portman B.Schindler A-M,Maurray -Lyon IM (1976),Sarcoma arising after liver transplantation.Gastroenterology 70:92-94
29.Gala RP, Sparkes RS,Golde DW(1978),Bone marrow origin or hepatic macrophages (Kupffer cells) in humans.Science 201:937-938
30.Gassel HJ,EngemannR.Thiede A.Hamelmann H(1987),Replacement of donor Kupffer cells by recipient cells after orthotopic rat liver transplantation Transplant Proc. 19;351-353
31. Gouw AS, Houthoff HJ,Huitema S.(1987),Expression of major histocompatibility complex antigens and replacement of donor cells by recipient ones in human liver grafts Transplantation 43:291-296
32.Morton RW,Diesselhoff-Den Dulk NMC.(1978) The origin ,kinetics and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state J.Exp.Med 148:1-17
33.Blouin A,Bolender RP,Weibel ER(1977), Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma J.Cell. Biol. 72:441-455
34.Knook DL,Steyster EC,Teutsch HF(1980) High activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in Kupffer cells isolated from rat liver. Histochemistry 69:211-216

35.Spolarics Z,Lang CH(1991)Glutamine and fatty acid oxidation are the main sources of energy for Kupffer endotelial cells.Am J Physiol. 261:G185-190
36.Spolarics Z,Baghy GJ,Lang CH,Spitzer JJ,(1991)Up regulation of glucose metabolism in Kupffer cells following infusion of tumour necrosis factor .Biochem J 278:515-519
37.Spolarics Z,Ottlakan A,Lang CH,Spitzer JJ(1992)Kupffer cells play a major role in insuline- mediated hepatic glucose uptake in vivo.Biochem Biophys Res Commun 186:455-460
38. Knook DL(1974),Distribution of lysosomal enzyme activities between parenchymal and non-parenchymal cells from ray liver.Hoppe Seylers Physiol Che 255:1217-1219
39.Knook DL,Sleyster EC(1980),Isolated parenchymal Kupffer and endotelial rat liver cells characterized by their lysosomal enzyme content Biochem Biophys Res Commun 96:250-257
40.Reiner RG,Tanner AR,Keyhani AN,Wright R(1981),A comparative study of lysosomal enzyme activity in monocytes and Kupffer cells isolated simultaneously in a rat model of liver injury Clin Exp Immunol 43:376-380
41 Yokota S,Tsuji H,Kato K(1985)Localization of cathepsin D in rat liver immunoenzyme and protein A-gold techniques Histochemistry 82:141-148
42 Steinberg P,Schlemper B, Molitor E(1990),Rat liver endothelial and Kupffer cell mediated mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and aflatoxin BI Environ Health Perspect 88:71-76
43.Koop DR,Chernosky A,Brass EP(1991),Identification and induction of cytochrome P 450 2E1 in ray Kupffer cells .J Pharmacol Exp Ther 258:1072-1076
44.Steinberg P,Schramm H1989),The distribution,induction and isoenzymeprofile of glutathione S transferase and glutathione peroxidase in isolated rat liver parenchymal Kupffer and endothelial cells Biochem J 264:737-744

45.Janossy G,Bofill M,Poulter LW(1986)Separate ontogeny of two macrophage-like accessory cell populations in the human fetus. J Immunol 136:4354-4261

46.Ramadori G,Dienes HP Burger R,(1986)Expression of Ia -antigens on guinea pig Kupffer cells .Studies with monoclonal antibodies J Hepatol 2:208-217

47.McCuskey RS,Vonnahme FJ,Grun M(1983)In vivo and electron microscopic observations of the hepatic microvasculature in the rat following protocaval anastomosis Hepatology 3:96-104

48.Widmann JJ,Cotran RS,Fahimi HH(1972)Mononuclear phagocytes(Kupffer cells) and endothelial cells ,Identification of two functional cell types in rat liver sinusoids by endogenous peroxidase activity J Cell Biol 52:159-170

49.Sugihara S,Martin SR,Hsuing CK,Maruiwa M(1990) Antibodies to rat Kupffer cells Anti KCA I distinguishes Kupffer cells from other macrophages.Am J Pathol 136:345-355

50.Koudstaal J,DijkhuisFWJ,Hardonk MJ(1991)Selective depletion of Kupffer cells after intravenous injection of gadolinium chloride.In :Knook DL,Wisse E,McCuskey RS, eds.Cells of the hepatic sinusoid .Kupffer cell Foundation 87-91

51.Bodenheimer HC,Jr Fans RA,Charland C,Hixson DC(1988) Characterization of a new monoclonal antibody to rat macrophages and Kupffer cells.Hepatology 8;1667-1672

52.Ukai K,Terashima K,Fujii Y,Imai Y(1988) new monoclonal antibody UFT 4,reacting with rat Kupffer cells.Immunohistochemical and immunoelectron microscopical analysis with reestimation of the reticuloendothelial system .Acta Pathol Jpm 38:1391-1403

53.Wacker HH,Radzun HJ,Parwaresh MR(1985)KI-M2R ,a new specific monoclonal antibody discriminates tissue- macrophages from reticulum cells and monocytes in vivo and in vitro.J Leuk Biol 38:509-520

54. Brouwer A,Barelds RJ,Knook DL(1984)Centrifugal separations of mammalian cells .In:Rickwood D ed, Centrifugation a practical approach Oxford:irl press183-218
55.Rous P,Beard JW (1934)Selection with the magnet and cultivation of reticuloendothelial cells(Kupffer cells) J Exp Med 59:577-591
56.Berry MN,Friend DS(1969)A high yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells J Cell Biol 43:506-520
57.Seglen PO,Gjessing R(1978)Effects of temperature and divalent cations on the substratum attachment of rat hepatocytes in vivo J Cell Sci 34:117-131
58.Knook DL,Sleyster EC(1977)Isolation and characterization of Kupffer and endothelial cells from the rat liver .Exp Cell Res 99:444-449
59.Knook DL,Blansjaar N,Sleyster EC(1977)Isolation and characterization og Kupffer cells from the rat liver Exp Cell Res 109:317-329
60.Brouwer A,De Leeuw AM(1982) Isolation and culture of sinusoidal liver cells :summary of a round table discussion In:Knook DL,Wisse E eds .Sinusoidal liver cells.Amsterdam:Elsevier/North Holland 509-516
61.Knook DL,Praaning -vn Dalen DP,DeLeeuw AM(1986)Selection criteria for the choice of isolation methods for rat liver Kupffer,endothelial and fat-storing cells.In:Kirn A,Knook DL,Wisse E,eds. Cells of the hepatic sinusoid .Rijswijk :Kupffer Cell Foundation,445-450
62.Nagelkerke JF,Barto K,van Berkel TJC.(1983)In vivo and in vitro uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein by rat liver endothelial Kupffer and parenchymal cells J Biol Chem 258:12221-12227
63.Blomhoff R,Drevon C,Eskild W,Helgerud P,Norum K,Berg T(1984) Clearance of acetyl low density lipoprotein by rat liver endothelial cells J Biol Chem 254:8898-8903
64.Bakkeren HF,Kuipers F,Vonk VJ,Van Berkel TJC(1990) Evidence for reverse cholesterol transport in vivo from liver endothelial cells to parenchymal cells and bile by high density lipoprotein Biochem J 268 :685-691

65.Mommaas -Kienhuis AM,Magelkerke JF,Vermeer BJ(1985)Visualization of the interaction of native and modified low density lipoproteins with isolated rat liver cells .Eur J Cell Biol 38:42-50
66.Eskild W,Smedsrod B,Berg T(1986), Receptor mediated endocytosis of formaldehyde treated albumin yeast invertase and chondroitin sulfate in suspensions of rat liver endothelial cells Int J Biochem 18:647-651
67.Jansen RW,Molema G,Harms G,Kruijt JK,van Berkel TJC,Hardonk MJ,Meijer DK(1991)Formaldehyde treated albumine contains monomeric and polymeric forms that are differently cleared by endothelial and Kupffer cells of the liver evidence for scavenger receptor heterogeneity .Biochem Biophys Res Commun 180:23-32
68.Kleinherenbrink -Stins MF,Schouten D,van der BoomJ, Brouwer A,Knook DL,vanBerkel TJC(1989),Nitrosylated high density lipoprotein is recognized by a scavenger receptor in rat liver .J Lipid Res 30:511-520
69.van Berkel TJC,de Rijke YB,Kruyt JK(1992)Recognition of modified lipoproteins by various scavenger receptors on Kupffer and endothelial liver cells In:Windler E,Greten H eds.Hepatic endocytosis of lipids and proteins .Munchen FEG:Zuckschwerdt Verlag 442-456
70.van Dijk MCM,Boers W,Linthorst C,van Berkel TJC(1992)Role of the scavenger receptor in the uptake of methylamine-activated alfa2-macroglobulin by rat liver.Biochem J 287:447-455
71 Nagelkerke JF,Havekes L,van Hinsbergn VW(1984)In vivo and in vitro catabolism of native and biologically modified LDL .FEBS Lett 171:149-153
72.Kodama T,Reddy P,Kishimoto C,Krieger M(1988),Purification and characterization of a bovine acetyl low density lipoprotein receptor Proc Natl Acad Sci USA 85:9238-9342
73.Rohrer L,Freeman M,Kodama T,Penman M,Krieger M(1990)Coiled -coil fibrous domains mediate ligand bindihg by macrophage scavenger receptor type II Nature 343:570-572
74.Kodama Y,Freeman M,Rohrer L Zabrecky J,Matsudaira P,Krieger M(1990)Type I macrophage scavenger receptor contains a- helical and

collagen -like coiled coils.Nature 343:531-535
75.Hampton RY,Golenbock DT,Penman M,Krieger M,Raetz CRH(1991)Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors Nature 352:342-344
76.Van Berkel TJC ,De Rijke Kruijt JK(1991)Different fate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein in rats .Recognition by various scavenger receptors on Kupffer and endothelial liver cells. J Biol Chem 266:2282-2289
77. de Rijke YB,Hessels EM,van Berkel TJC(1992)Recognition sites on rat liver cells for oxidatively modifield b-very low density lipoproteins .Arterioscler Thromb 12:41-49
78.De Rijke YB,Jurgens G,Hessels EM,Herman A,van Berkel TJC(1992) In vivo fate and scavenger receptor recognition of oxidized lipoprotein (a) isoforms in rats J Lipid Res 33:1315-1325
79.Kamps JAAM,Kruijt JK,Kruiper J,van Berkel TJC(1992) Characterisation of the interaction of acetylated LDL and oxidatively modified LDL with human liver parenchymal and Kupffercells in culture Arterioscler. Thromb 12:1079-1087
80.Steer CJ,Clarenburg R(1979)Unique distribution of glycoprotein receptors on parenchymal and sinusoidal cells of rat liver J Biol Chem 254:4457-4461
81.Hubbard AL,Wilson G,Ashwell G,Stukenbrok H(1979)An electron microscopic autoradiographic study of the carbohydrate recognition systems in rat liver I Distribution of I-ligands among the liver cell types .J Cell Biol 83:47-64
82. Ashwell G,Harford J(1982)Carbohydrate-specific receptors of the liver Annu Rev Biochem 51;531-554
83.Praaning -van Dalen DP,de Leeuw AM(1987),Rat liver endothelial cells have a greater capacity than Kupffer cells to endocytose N-acetylglucosamine and mannose terminated glycoproteins .Hepatology 7:672-679

84.Sano A,Taylor ME,Leaning MS,Summerfield JA(1990)Uptake and processing of glycoproteins by isolated rat hepatic endothelial and Kupffer cells J Hepatol 10:211-216
85.Seydel W,Stang E,Roos N,Krause J(1991) Endocytosis of the recombinant tissue plasminogen activator alteplase by hepatic endothelial cells Arzneimittelforschung41;182-186
86.Stang E, Krause J,Seydel W,Berg T,Roos N(1992)Endocytosis and intracellular processing of tissue -type plasminogen activator by rat liver cells in vivo Biochem J 282:841-851
87.Kuiper J,Otter M,Rijken DC,van Berkel TJC(1988)Characterization of the interactionin vivo of tissue type plasminogen activator with liver cells J Biol Chem 263:18220-18224
88.Rijken DC,Otter M,Kuiper J,van Berkel TJC(1990)Receptor-mediated endocytosis of tissue type plasminogen activator (t-PA) by liver cells Thromb Res Suppl 10:63-71
89.Ezekowitz RAB,Williams DJ ,Koziel H,Armstrong MYK(1991) Uptake of Pneumocystis carinii mediated by the macrophage mannose receptor . Nature 351:155-158
90.Sung S-S,Nelson RS,Silverstein SC(1983)Yeast mannans inhibit binding and phagocytosis og zymosan by mouse peritoneal macrophages J Cell Biol 96:160-166
91.Chakraborthy P,Dass PK(1988)Role of mannose /N-acetylglucosamine receptors in blood clearance and cellular attachment of Leishmania donovani.Mol Biochem Parasitol 28:55-62
92.Magnusson S,Berg T(1989)Extremely rapid endocytosis mediated by the mannose receptor of sinusoidal endothelial rat liver cells Biochem J, 257:651-656
93.Otter M,Barrett -Bergshoeff MM, Rijken DC(1991)Binding of tissue- type plasminogen activator by the mannose receptor J Biol Chem,266:13931-13935

94.Taylor ME,Conary JT,Lennartz MR,Stahl PD,DrickamerK(1990) Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains J Biol Chem 265:12156-12162
95.Kempka G,Ross PH,Kolh -Bachofen V(1990)A membrane associated form of C-reactive protein is the galactose-specific particle receptor on rat liver macrophages. J Jmmunol 144:1004-1009
96.Kolb -Bachofen V.A(1991) membrane bound form of the acute-phase protein C-reactive protein is the galactose -specific particle receptore on rat liver macrophages .Pathobiology 59:272-275
97.Van Berkel TJC,Kruijt JK,Spanier HH,Nagelkrke JF,Harkes L,Kempen HJM(1983) The efficacy of a water -soluble tris-galactoside -terminated cholesterol derivative on the fate of low density lipoproteins and liposomes J Biol Chem 260:2694-2699
98. Spanjer HH,van Berkel TJ Scherphof GL,Kemper HJ(1985) The effect of a water-soluble tris-galactoside terminated cholesterol derivative on the in vivo fate of asmall unilamellar vescicles in rats. Biochim Biophys Acta 816:396-402
99.Bijsterbosch MK,van Berkel TJC(1990)Uptake of lactosylate low density lipoproteins by galactose specific receptors in rat liver Biochem J 270:233-239
100.Schlepper -Schafer J,Springer GF(1989)Carcinoma autoantigens T and Tn and their cleavage products interact with Gal /Gal Nac-specific receptors on rat Kupffer cells and hepatocytes.Biochim Biophys Acta 1013:226-272
101.Bogers WM,Gorter A,Stuurman ME,Van Es LA,Daha MR(1989)Clearance kinetics and tissue distribution of aggregated human serum Ig-A in rats .Immunology 67:274-280
102.Lehrman MA,Haltiwanger RS,HillRL(1986)The binding of fucose-containing glycoproteins by hepatic lectins J Biol Chem 261:7426-7432
103.Hoyle GW,Hill R(1988)Molecular cloning and sequencing of a cDNA for a carbohydrate binding receptor unique to rat Kupffer cells J Biol Chem 263:7487-7492

104.Hoyle GW,Hill RL (1988)Molecular cloning and sequencing of a cDNA for a carbohydrate binding receptor unique to rat Kupffer cells .J Biol Chem 263:7487 -7492

105.Hoyle GW,Hill RL(1991)Structure of the gene for a carbohydrate-bindihg receptor unique to rat Kupffer cells J Biol Chem266:1850-1857

106.Biessen EAL,Bakkeren HF,Beuting DM,Kuiper J,van BerkelTJC(1993) Recognition of neoglycoproteins by the hepatic fucose/galactose receptor depends on the article size In: Knook DL,Wisse E eds Cells of the hepatic sinusoid 4.Rijswijk :Kupffer Cell Foundation 455-457

107. Kovanen PT,Brown MS,Goldstein JL(1979)Increased binding of low - density lipoprotein to liver membranes from rats treated with 17-alpha ethinyl estradiol .J Biol Chem 253:11367-11373

108.Harkes L,van Berkel TJC(1984)Quantitative role of parenchymal and non-parenchymal liver cells in the upteke of C-sucrose labeled low-density lipoprotein in vivo Biochem J 224:21-27

109.Kamps JAAM,Kruijt JK,Kuiper J ,Van Berkel,TJC,(1991)Uptake and degradation of human low-density lipoprotein by human liver parenchymal and Kupffer cells in culture .Biochem J 276:135-140

110.Kleinherenbrink-Stins MF,vander Boom J,Bakkeren HF,Roholl PJ(1990)Light-and immunoelectron microscopic visualization of in vivo endocytosis of low density lipoprotein by hepatocytes and Kupffer cells in rat liver Lab Invest 63:73-86

111. Nagelkerke JF,Bakkeren HF,Kuipers F,Vonk RJ(1986)Hepatic processing of the cholesteryl ester from low density lipoprotein in the rat.J Biol Chem 261:8908-8913

112.Loegering DJ(1986).Kupffer cell complement receptor clearance function and host defense Circ Shock 20;321--333

113.Muro H,Shirasawa H,Maeda M,Nakamura S(1987)Receptors of liver sinusoidal endothelium in normal rats and humans :a histological study with soluble immune complexes .Gastroenterology 93:1078-1085

114.Rifai A,Mannik M(1984)Clearance of circulating IgA immune complexes is mediated by a specific receptor on Kupffer cells in mice J Exp Med 160:125-137
115. Sancho J ,Gonzalez E,Egido J(1986)The importance of the Fc receptors for Iga in the recognition of IgA by mouse liver cells:its comparision with carbohydrate and secretory component receptors.Immunology 57:37-42
116.Steffan AM,Kirn A(1986)C3-mediated phagocytosis induced in murine Kupffer cells by in vitro activation with endotoxin.Gastroenterol Clin Biol 10:117-121
117.Dilon BC,Estes JE,Saba TMM,Blumenstock FA,Cho E Lees SK,Lewis EP(1983)Actin-induced reticuloendothelial phagocytic depression as mediated by its interaction with fibronection. Exp Mol Pathol 38:208-223
118.Munthe-Kass AC(1976).Phagocytosis in rat Kupffer cells in vitro Exp Cell Res 99:319-327
119.Shaw RG,Johnson AR,Schulz WW,Zahlten RN,Cobes B(1984)Sinusoidal endothelial cells from normal guinea pig liver;isolation culture and characterization Hepatology 4:591-602
120.Uwatakos S,Mannik M(1990)The location of binding sites on C1q for DNA .Immunol 144:3484-3485.
121.Benz S.Isliker H(1981)Antibody independent interaction between E.coli and human complement components J Immunol 127:1748-1754
122.Erdei A(1990),Clq receptor on murine cells J Immmunol 145;1754-1760
123.Hinglais N,Kazatchkine MD,Mandet C,Appay MD,Bariety J(1989)Human liver Kupffer cells express CR1,CR3,and CR4,complement receptor antigens. An immunohistochemical study Lab Invest 61;509-514
124.Mosher D(1986)Fibronectin and liver disease Hepatology 6;1419-1421
125.Cardarelli P,Blumenstock FA,Saba TM, Rourke FJ(1984) Fibronectine-enhanced attachment of gelatin coated erythrocytes to isoleted hepatic Kupffer cellsJ Leuk Biol 36:477-492

126.Cardarelli P,Blumenstock FA,McKeown -Longo PJ,Saba TM, Mazurkiewcz JE,Dias JA(1990)High affinity binding of fibronectin to cultured Kupffer cells J Leukoc Biol 48:426-437
127.Chao W,Liu H,DeBuysere M,Hanahan DJ,Olson MS(1989) Identification of receptors for platelet activating factor in rat Kupffer cells J Biol Chem 264;13591-13598
128.Gandhi CR,Hanahan DJ,Olson MS(1990)Two distinct pathways of platelet activating factor induced hydrolysis of phosphoirositides in primary cultures of rat Kupffer cells J Biol Chem 265:18234-18241
129.Chao W,Liu H,Hanahan DJ Olson MS(1989)Regulation of platelet activating factor receptors in rat Kupffer cells J Biol Chem 264:20448-20457
130.Chao W,Liu H,Hanahan DJ,Olson MS(1992)Protein tyrasine phosphorylation and regulation of the receptor for platelet -activating factor in rat Kupffer cells Effect of sodium vanadate.Biochem J 288:777-784
131.Toth CA,Thomas P,Broitman SA,Zamcheck N(1982) A new Kupffer cell receptor mediating plasma clearance og carcinoembryonic antigen by rat Biochem J 204:377-381
132.Toth CA,Thomas P,Broitman SA,Zamcheck N(1982)Receptor mediated endocytosis of carcinoembryonic antigen by rat liver Kupffer cells Cancer Res 45:392-397
133.Thomas P,Petrick AT,Toth CA,Fox ES.Elting JJ,Steele G.Jr(1992) A peptide sequence on carcinoembryonic antigen binds to a 80 kD protein on Kupffer cells Biochm Biophys Res Commun 188:671-677
134.Schlepper -Schafer J,Springer GF(1989)Carcinoma autoantigens T and Tn and their cleavage products interact with Gal/GalNAc specific receptors on rat Kupffer cells and hepatocytes .Biochim Biophys Acta 1013:226-272
135.Gjoen T,Seljelid R,Kolset SO(1989)Binding of metastatic colon carcinoma cells to liver macrophages .J Leuk Biol 45:362-369
136.Emlen W,Rifai A,Magilavy D,Mannik M(1988) Hepatic binding of DNA is mediated by a receptor on nonparenchymal cells. Am J Pathol 133:54-60

137. Smit MJ,Duursma AM,Koudstaal J,Hardonk MJ, Bouma JMW(1990) Infection of mice with lactate dehydrogenase elevating virus destroys the subpopulation of Kupffer cells involved in receptor mediated endocytosis of lactate dehydrogenase and other enzymes Hepatology 12:1192-1199
138.Bijsterbosch MK,Duursma AM,Bouma JM,Gruber M(1983)Plasma clearance and endocytosis of cytosolic dehydrogenase in the rat Biochem J,210:419-428
139.Fox ES,Thomas P,Broitman SA(1989)Clearance of gut -derived endotoxins by the liver.Gastroenterology 96:451-461
140.Hampton RY,Golenbock DT,Penman M,Krieger M,Raetz CRH,(1991) Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors Nature 352:342-344
141.van Bossuyt H,Desmaretz C ,Wisse E(1989)The fate of lipopolysaccharide in cultured rat Kupffer cells.Virchows Arch B Cell Pathol 58:89-93
142. Parent JB,(1990)Membrane receptors on rat hepatocytes for the inner core region of bacterial lipopolysaccharides J Biol Chem 265:3455-3461
143.Freudenberg MA,Freudenberg N,Galanos C(1982)Time course of cellular distribution of endotoxin in liver,lungs and kidneys of rats. Br J Exp Pathol 63:65-65
144.Fox ES,Thomas P,Broitman SA(1988)Uptake and modification of I-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells Hepatology 8:1550-1554
145.Kossmann T,Manthey CL,Brandes ME(1992)Kupffer cells express type I TGF- beta receptors, migrate to TGF-beta and participate in streptococcal cell wall induced hepatic granulomaformation Growth Factors 7:73-83
146.Munthe-Kaas AC(1977)Uptake of macromolecules by rat Kupffer cells in vitro Exp Cell Res 107:55-62
147.Walton KW,Almond TJ,Robinson M,Scott DL(1984)An experimental model for the study of the opsonic activity of fibronectin in the clearance of intravascular complexes J Exp Pathol 65:191-200
148.Gendrault JL,Steffan AM,Bingen A,Kirn A(1980)Uptake of frog virus 3 by Kupffer cells in vivo and in vitro .In:Liehr H,Grun M,eds.The

reticuloendothelial system and the pathogenesis of liver disease Amsterdam:Elsevier 221:221-228
149.Horn RG,Koenig MG,Goodman JS,Collins RD(1969)Phagocytosis of Staphylococcus aureus by hepatic reticuloendothelial cells,an ultra-structural study Lab Invest 21:406-414
150.Kuiper J-Zijlstra FJ,Kamps JAAM,van Berkel TJC(1988)Identification of prostaglandin D2 as the major eicosanoid from liver endothelial and Kupffer cells Biochem Biophys Acta 959:143-152
151.Ouwendijk RJ ,Zijlstra FJ(1988)Comparition of the production of eicosanoids by human and rat peritoneal macrophages and rat Kupffer cells. Prostaglandins35:437-446
152.Brouwer A,Barelds RJ,de Leeuw AM,Blauw E,PlasA,Yap SH, van der Broek AM,Knook DL(1988)Isolation and culture of Kupffer cells from human liver.J Hepatol 6:36-49
153.Eyhorn S,Schlayer HJ,Henninger HP(1988)Rat hepatic sinusoidal endothelial cells in monolayer culture.Biochemical and ultrastructural characteristics. J Hepatol 6:23-36
154.Grewe M,Duyster J,Dieter P,Henninger H,Schulze -SpeckingA,Decker K(1992)Prostaglandin D2and E2 synthese in rat Kupffer cells are antagonistically regulated by lipopolysaccharide and phorbol ester Biol Chem Hoppe Seyler 373:655-664
155.Dieter P,Schulze Specking A,DeckerK,(1988)Ca requirement of prostanoid but not of superoxide production by rat Kupffer cells.Eur J Biochem 177:61-67
156.Latocha G,Dieter P,Schulze-Specking A,Deckel K(1989)Fc receptors mediate prostaglandin andsuperoxide synthesis in cultured rat Kupffer cells Biol Chem Hoppe Seyler 370:1055-1061
157.Iwai M,Gardermann A,Pushel G,Jungermann K(1988)Potential role for prastaglandin F2a ,D,E2, and thromboxene A2 in mediating the metabolic and hemodynamic actions of sympathic nerves inperfused rat liver Eur J Biochem 175:45-50

158.Iwai M,Jungermann K(1987)Possible involvement of eicosanoids in the actions of sympathic hepatic nerves on carbohydrate metabolism and hemodymamics in perfused rat liver FEBS Lett 221:155-160
159.Ignarro LJ,(1990)Nitric OxideA novel signal transduction mechanism for transcellular communication Hypertension 16:477-483
160.Gaillard T,Mulsch A,BusseR,Klein H,Decker K(1991)Regulation of nitric oxide production by stimulated rat Kupffer cells.Pathobiology 59:280-283
161.Gailard T,Mulsch A,Busse R, Klein H,Decker K(1992) Regulation by prostaglandin E2 of cytokine-elicited nitric oxide synthesis in rat liver macrophages .Biol Chem Hoppe Seyler373:897-902
162.Bautista AP,Spitzer JJ,(1992)Platelet activating factor stimulates and primes the liver Kupffer cells and neutrophils to release superoxide anion Free Radic Res Commun 17:196-209
163.Hashimoto S,Nomoto K,Matsuzake T,Yokokura T,Mutai M(1984)Oxygen radical production by peritoneal macrophages and Kupffer cells elicited with Lactobacillus casei Infect Immun 44:61-67
164.Chao W,Kapadai A,Olson MS,Hanahan DJ(1989)Biosynthesis of platelet -activating factor by cultured rat Kupffer cells stimulated with calcium ionophore A23187 Biochem J 257:823-829
165. C hao W,Kapadai A,Hanahan DJ,Olson MS(1989)Metabolism of platelet activating factor(PAF,l-0-alkyl -2-acetyl -sn-glycero-3-phosphocholine)and lyso-PAF (l-0-alkyl -2-lyso-sn-glycero -3-phosphocholine)by cultured rat Kupffer cells Biochem J 261:77-81
166.Kuiper J,Kamps JAAM,Van Berkel TJC(1989)Identification of the inhibitor of the plasminogen activator as the major protein secreted by endothelial rat cells FEBS Lett 245:229-234
167.Van Bossuyt H,Desmaretz C,Rombaut B,Wisse E,(1988)Response of cultured rat Kupffer cells to lipopolysaccharide .Arch Toxicol 62:316-324
168.Censue SW,Terebuh PD,Remick DG,Scales WE,Kunkel SL(1991)In vivo biologic and immunohistochemical analysis of interleukin a,b, and tumor necrosis factor during experimental endotoxemia .Am J Pathol 138:395-403

169.Mozes T,Zijlstra FJ,Heiligers JPC,Tal CJA,Ben-Afraim S,Bonta IL,Saxena PR(1991)Sequential release of tumor necrosis factor ,platelet activating factor and eicosanoids during endotoxic shock in anaesthetized pigs :protective effects of indomethacin Br J Pharmacol 104:691-699
170.Bankey P,Carlson A,Ortiz M, Singh R,Cerra F(1990)Tumor necrosis factor production by Kupffer cells requires protein kinase C activation J Surg Res 49:256-261
171.Peters T,Karck U,Decker K(1990)Interdependence of tumor necrosis factor,prostaglandin E2,and protein synthesis in lipopolysaccharide-exposed rat Kupffer cells Eur J BioCHEM 191:583-589
172.Kawada N,Mizoguchi Y,Kobayashi K,Morisawa S,Monna T,Yamamoto S(1991)Interferon gamma modulates production of interleukin 1 and tumor necrosis factor by murine Kupffer cells.Liver 11:42-47
173.Shirahama M,Ishibashi H,Tsuchiya Y,Kurokawa S,Okumura Y,Niho Y(1988)Kinetics and parameters of the induction of interleukin 1 secretion by rat Kupffer cells J Clin Lab Immunol 27:127-132
174.Callery MP,Kamei T,Flye MW(1992)Endotoxin stimulates interleukin -6-production by human Kupffer cells Circ Shock 37:185-188
175.Busam KJ,Bauer TM,Bauer J,Gerok W,Decker K(1990)Interleukin-6-release by rat liver macrophages J Hepatol 11:367-373
176.Gressner AM,(1992)Hepatic fibrogenesis :the puzzle of interacting cells,fibrogenic cytokines ,regulatory loops and extracellular matrix molecules Z.Gastroenterol 30:5-16
177.Casteleijn E,Kuiper J,van Rooij HC,Kamps JAAM,Koster JF,van Berkel TJC(1988)Hormonal control of glycogenolysis in parenchymal liver cells by Kupffer and endothelial liver cells J Biol Chem 263:2699-2703
178.Casteleijn E,Kuiper J,Van Rooij HC,Koster JF,Van Berkel TJC(1988)Conditioned media of Kupffer and endothelial liver cells influence protein phosphorylation in parenchymal liver cells.Involvement of prostaglandins.Biochem J 252:601-605

179.Kuiper J,Kamps JAAM,Van Berkel TJC(1989) Induction of ornithine decarboxylase in rat liver by phorbol ester is mediated by prostanoids from Kupffer cells J Biol Chem 264;6874-6878
180.Haussinger D,Stehle T,Tran -Thi TA,Decker K,Gerok W(1987)Prostaglandin responses in isolated perfused rat liver :Ca and K fluxes,hemodynamic and metabolic effects Biol Chem Hoppe Seyler 368:1509-1513
181.Callery MP,Mangino MJ,Flye MW(1991)Kupffer cell prostaglandin-E2 production is amplified during hepatic regeneration Hepatology 14:368-372
182.Nakamura T,Arakaki R,Ischihara A(1988) Interleukin 1-beta is a potent growth inhibitor of adult rat hepatocytes in primary culture Exp Cell Res 179:488-497
183.Tran -Thi TA,Gyufko K,Henninger H,Busse R,Decker K(1987)Studies on the synthesis and degradation of eicosanoids by rat hepatocytes in primary cultures J Hepatol 5:322-331
184.Bauer J,Tran-Thi TA,Northoff H,Hirsch F,Schlayer HJ,Gerok W,Heinrich PC(1986)The acute-phase induction of alpha 2-macroglobulin in rat hepatocyte primary cultures:action of a hepatocyte-stimulating factor.Eur J Cell Biol 40:86-93
185.Santers KD,Fuller GM(1983)Kupffer cell regulation of fibrinogen synthesis in hepatocytes.Thromb Res 32:133-145
186.West MA,Keller GA,Hyland BJ,Cerra FB,Simmons RL(1986)Further characterisation of Kupffer cell/macrophage -mediated alterations in hepatocyte protein synthesis .Surgery 100:416-423
187.West MA,Billiar TR,Mazuski JE,Curran RJ,Cerra FB(1988),Simmons RL,Endotoxin modulation of hepatocyte secretory and cellular protein synthesis is mediated by Kupffer cells Arch Surg 123:1400-1405
188.Curran RD,Billiar TR,Stuehr DJ,Hofmann K,Simmons RL(1989) Hepatocytes produce nitrogen oxides from L arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells.J Exp Med 170:1769-1774

189.Curran RD,Billiar TR,Stuehr DJ,Ochoa JB,Harbrecht BG,Flint SC,Simmons RL(1990)Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis Ann Surg 212:462-469

190.Thornton AJ,Ham J,Kunkel SL(1991)Kupffer cell-derived cytokines induce the synthesis pg a leukocyte chemotactic peptide interleukin -8,in human hepatoma and primary hepatocyte cultures.Hepatology 14:1112-1122

191.Armendariz-Borunda J,Seyer JM,Postlethwaite AE,Kang AH(1991)Kupffer cells from carbon tetrachloride-injured rat livers produce chemotactic factors for fibroblasts and monocytes:the role of tumor necrosis factor-alpha. Hepatology 14:895-900

192.Peterson TC,Renton KW(1986)Kupffer cell factor mediated depression of hepatic parenchymal cell cytochrome P-450.Biochem Pharmacol 35:1491-1497

193.Peterson TC,Renton KW(1986)The role of lymphocytes,macrophages and interferon in the depression of drug metabolism by dextran sulfate.Immunopharmacology 11:21-28

194.Tzung SP,GainesKC,Lance P,Ehrke MJ,Cohen SA(1990)Suppression of hepatic lymphokine-activated killer cell induction by murine Kupffer cells and hepatocytes .Hepatology 12:644-652

195.Meyer DH,Bachem MG,Gressner AM(1990)Modulation of hepatic lypocyte proteoglycan synthesis and proliferation by Kupffer cell-derivated transforming growth factors type beta 1 and type alpha.Biochem Biophys Res Commun 171:1122-1129

196.Gressner AM,Zerbe O(1987)Kupffer cell-mediated induction of synthesis and secretion of proteoglycans by rat liver fat-storing cells in culture. J Hepatol 5:299-310

197. Callery MP,Mangino MJ,Flye MW(1991)A biologic basis for limited Kupffer cell reactivity to portal-derived endotoxin .Surgery 110:221-230

198.Peters T,Gaillard T,Decker K(1990)Tumor necrosis factor alpha stimulates prostaglandin but not superoxide synthesis inrat Kupffer cells Eicosanoids 3:115-120

199.Goss JA,Mangino MJ,Flye MW(1992)Kupffer cells autoregulation of IL-1 production by PGE 2 during hepatic regeneration J Surg Res 52:422-428
200.Feingold KR,Barker ME,Jones AL,Grunfeld C(1991)Localization of tumor necrosis factor-stimulated DNA synthesis in the liver. Hepatology 13:773-779
201.Ertel W,Morrison MH,Ayala A,Perrin MM,Chaudry JH(1991)Anti-TNF monoclonal antibodies prevent heamorrhage-induced suppression of Kupffer cell antigen presentation and MHC,class II antigen expression.Immunology 74:290-297
202.Ertel W,Morrison MH,Ayala A,Chaudry JH(1991)Chloroquine attenuates hemorrhagic shock-induced suppression of Kupffer cell antigen presentation and major histocompatibility complex class II antigen expression through blockade of tumor necrosis factor and prostaglandin release .Blood 78:1781-1788
203.Richman LR,Klingenstein RJ,Rochman JA,Strober W,Berzofsky JA(1979) The murine Kupffer cell: characterization of the cell serving accessory function in antigen -specific T cell proliferation .J Immunol 123:2602-2609
204.Rogoff TM,Lipsky PE(1980)Antigen presentation by isolated guinea pig Kupffer cells J Immunol 124:1740-1744
205.Currin RT,Toole JG,Thurman RG,Lemasters JJ(1990)Evidence that Carolina rinse solution protects sinusoidal endothelial cells against reperfusion injury after cold ischemic storage of rat liver.Transplantation 50:1076-1078
206.Caldwell-Kenkel JC,Currin RT,Tanaka Y,Thurman RG(1989)Lemasters JJ.Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers.Hepatology 10:292-299
207.Adams DL,Wang L,Hubscher SC,Neuberger JM(1989)Hepatic endothelial cells.Targets in liver allograft rejection?Transplantation 47:497-482
208.Lindert KA,Caldwell-Kenkel JC,Nukina S,Lemasters JJ,Thurman RG(1992)Activation of Kupffer cells on reperfusion following hypoxia;particle phagocytosis in a low-flow,reflow model.Am J Physiol 262:G345-350

209.Marzi I,Cowper K,Takei Y,Lindert K,Lemasters JJ,Thurman RG(1992) Methyl palmitate prevents kupffer cell activation and improves surgival after orthotopic liver transplantation in the rat. Transplant. Int 4:215-220
210.Treon SP;Thomas P,Broitman SA(1993)Lipopolysaccharide (LPS) processing by Kupffer cells re;eases a modified LPS with increased hepatocyte binding and decreased tumor necrosis factor :alpha stimulatory capacity .Proc.Soc Exp Biol Med 202:153-158
211.Clements WD,Halliday MI,McCaigueMD,Barclay RG,Rowland BJ(1993) Effects of extrahepatic obstructive jaundice on Kupffer cell clearance capacity Arch Surg 128:200-204
212.Ott MT,Vore M,Barker DE,Strodel WE,Mc Clain CJ(1989)Monokine depression of bile flow in the isolated perfused rat liver J Surg Res 47:248-250
213.Arii S,Monden K,Itai S,Sasaoki T,Adachi Y,Funaki N,Higashitsuji H,Tobe T(1990)Depressed function of Kupffer cells in rats with CC14-induced liver cirrhosis Res Exp Med (Berl)190:173-182
214.Schmitt MP,Gendrault JL,Schweitzer C,Steffan AM,Beyer C,Royer C,Jaeck D,Pasquali JL,Kirn A,Aubertin AM(1990)Permissivity of primary cultures of human Kupffer cells for HIV-1 AIDS.Res Hum Retroviruses 6:987-991
215.Steffan AM,Lafon ME,Gendrault JL,Schweitzer C,Royer C,Jaeck D,Arnaud JP,Schmitt MP,Aubertin AM,Kirn A(1992)Primary cultures of endothelial cells from the human liver sinusoid are permissive for human immunodeficiency virus type I.Proc Natl Acad Sci USA 89:1582-1586
216.Cao YZ,Dieterich D,Thomas PA,Huang YX,Mirabile M,Ho DD(1992)Identification and quantitation of HIV -1 in the liver of patients with AIDS .AIDS 6:65-70
217.Hoda SA,White JE,Gerber MA(1992)Immunohistochemical studies of human immunodeficiency virus -1 in liver tissues of patients with AIDS Mod Pathol 4:578-581

218.Roos E,Dingemans KP(1977)Phagocytosis of tumor cells by Kupffer cells in vivo and in the perfused mouse liver.In:Wisse E,Knook DL,eds.Kupffer cells and other liver sinusoidal cells Amsterdam:Elsevier 183-190
219.Pulford K,Souhami RL(1985)The cytostatic activity of cultured Kupffer cells.Br J Cancer 51:31-36
220.Pearson HJ,Anderson J,Chamberlain J,Bell PR(1986)The effect of Kupffer cell stimulation or depression on the development of liver metastases in the rat Cancer Immunol Immunother 23;214-216
221.Xu Z,Fidler IJ(1984)The in situ activation of cytotoxic properties in murine Kupffer cells by the systemic administration of whole Mycobacterium bovis organisms or muramyl tripeptide.Cancer Immunol 18:118-122
222.Scherwood ER,Williams DL,DiLuzio NR(1986)Comparision of the in vitro cytolytic effect of hepatic,splenic and peritoneal macrophages from glucan-treated mice on sarcoma M5076.Methods Find Exp Clin Pharmacol 8:157-161
223.Bradfield JWB.Can we measure Kupffer cell function in man?In: Liehr H,Grun M,eds.(1980)The reticuloendothelial system and the pathogenesis of liver disease.Amsterdam :Elsevier 309-316
224.Biozzi G,Stiffel C(1965)The physiopathology of the reticuloendothelial cells of the liver and spleen Prog Liver Dis 2;166-191
225.Sheagren JN,Block JB,Wolff SM(1976)Reticuloendothelial system phagocytic function in patients with Hodgkin's disaese . J Clin Invest 46:855-862
226.Cooksley WGE,Powell LW,Halliday JW(1973)Reticuloendothelial phagocytic function in human liver disease and its relation to haemolysis Br J Haematol 25:147-164
227.Jones EA,Frank MM,Jaffe CJ,Vierling JM(1979),Primary biliary cirrhosis and the complement system.Ann Intern Med 90:72-84
228.Schreiber AD,Frank MM(1972)Role of antibody and complement in the immune clearance and destruction of erythrocytes .In vitro effects of IgG,and IgM,complement fixing sites .J Clin Invest 51:575-582

229.Bradfield JWB(1977)Reticuloendothelial blockade:a reassessment .In:Wisse E,Knook DL,eds Kupffer cells and other liver sinusoidal cells Amsterdam :Elsevier 365-372
230.Murray OM(1963)The mechanism of blockade of the reticuloendothelial system J Exp Med 117:139-147
231.Chadwick SJ,Aldridge M,Dudley HA(1985)Detection of reticuloendothelial blockage with low-dose test agent Br J Exp Pathol 66:483-491
232.Horn RG,Koening MG,Goodman JS,Collins(1969) Phagocytosis of Staphylococcus aureus by hepatic reticuloendothelial cells.an ultra-structural study Lab Invest 21:406-414
233.Deaciuc IV,Bagby GJ,Lang CH,Spitzer JJ(1993)Hyaluronic acid uptake by the isolated,perfused rat liver:an index of hepatic sinusoidal cell function Hepatolofy 17:266-272
234.Remmer H(1970) The role of the liver in drug metabolism .American Journal of Medicine 49:617-629
235.Schaffner F,Popper H(1969)Cholestasis is the result of hypoactive hypertrophic smooth endoplasmic reticulum in the hepatocyte Lancet 2;355-359
236.Elias E,Boyer JL(1979) Chloropromazine and its metabolites after the polymerization and gelation of actin Science 206:1404-1406
237.McLean AEM, McLean EK(1966)The effect of diet and DDT on microsomal hydroxylation and on sensitivity of rats to CCl4 poisoning.Biochemical Journal 100:564-571
238.Hempel V,Remmer H,May R,Diaz deToranzo EG(1981)Halothane-associated hepatitis:role of lipid peroxidation in man In Davis M,Tredger JM,Williams R eds. Drug Reactions and the Liver 232-236
239.Bellomo G,Orrenius S(1985)Altered thiol and calciumm homeostasis in oxidative hepatocellular injury .Hepatology 5:876-882
240.Black M,Mitchell JR,Zimmerman HJ(1975)Isoniazid associated hepatitis in 114 patients .Gastroenterology 69:289-302

241.Neuberger J,Williams R.(1989) Immune mechanisms in tienilic acid associated hepatotoxicity Gut 30:515-519
242. Raventos J. Goodall R.R.(1956) The action of Fluothane - A new volatile Anaesthetic Survey of Anesthesiology May. 31, 183-208
243.Brummer D.L. (1971) Isoniazid and liver desease.Annals of Internal Medicine ,75,643
244.Simpson D.G.&Walker J.H. (1960)Hypersensitivity to paraamino-salicylic acid.American Journal of Medicine 29,297-306
245.Vardiva-Barriga V,Feldman & Orellana J,(1963) Generalised hypersensitivity with hepatitis and jaundice after the use of penicillin and streptomycin Gastroenterology 45,114-117.
246.Zimmerman,HJ,Lewis JH,Ishak KG et al(1984)Ticrynaten- associated hepatic injury :analysis of 340 cases.Hepatology 4,315-323
247.Svoboda D.,Grady HJ,&Higginson J,(1996) Aflatoxin B injury in rat and monkey liver .American Journal of Pathology,49,1023-1051
248. G.Edward Morgan,M.Mikhail ,Clinical Anesthesiology
Inhalation Anesthetics 7”99-115 199
249. Edmond I ,Eger II(1981) Uptake and Distribution of Inhaled Anesthetics Anesthesia by R.Miller MD. 11,309-328
250. Macintosh ,Mushin & Epstein Solution of Gases
Physics for the Anaesthetist ,Fourth Edition 14,306-322,1987
251. Eugenie Shalhoub Casella(1987) The Effect of Volatile Anesthetics on the pH Dependence of Calcium Uptake by Cardiac Sarcoplasmatic Reticulum Anesthesiology 67,386-390
252 . Hirochika Komai(1987)Negative inotropic Effect of isoflyrane and Halothane in Rabbit Papillary Muscles Anesth.Analg 66,29-33
253. Thomas J.J. Blanck(1988) Halothane Decreases Calcium Channel Antagonist Binding to Cardiac Membranes Anesth.Analg 67,1032-5
254. Carl Lynch III (1988) Combined Depressant Effects of Diltiazem and Volatile Anesthetics on Contractility in Isolated Ventricular Myocardium Anesth Analg 67,1036-46

255. Zeljko J.Bosniak (1992)Differential Effects of Halothane ,Enflurane, and Isoflurane on Ca 2+ Transients and Papillary Muscle Tension in Guinea Pigs Anesthesiology 76,123-131
256. Benjamin Drenger(1994)Halothane Modifies Ischemia -associated injury to the voltage-sensitive calcium channels in cannine heart sarcolemma Anesthesiology 81:221-228
257. G.Alec Rooke(1993)The effect of Halothane on the Sarcoplasmic Reticulum in Normal and Right Ventricular Hypertrofy in Rabbits. Anesth Analg 77,1091-7
258. David L. Lee(1994) The Effects of Halothane on Voltage-dependent Calcium Channels in Isolated Channels in Isolated Langendorff-perfused Rat Heart Anesthesiology 81,1212-1219
259. Danid M.Wheeler(1994)Volatile Anesthetic Effects on Sarcoplasmic Reticulum Ca Content and Sarcolemmal Ca Flux in Isolated Rat Cardiac Cell Suspensions Anesthesiology 80, 372-382
260. CliffordR. Swanson(1988)Simultaneous Evaluation of Left Ventricular End-systolic Pressure -volume Ratio and Time Constant of Isovolumic Pressure Decline in Dogs Exposed to Equivalent MAC Halothane and Isoflurane Anestesiology 68,764-770
261. L.Sahlman(1988)Effects of Halothane ,Enflurane and Isoflurane on Coronary Vascular Tone Myocardial Performance ,and Oxygen Consumption during Cntrolled Changes in Aortic and Left Atrial Pressure Anesthesiology 69,1-10
262.Yuichi Hattori(1987)Negative Inotropic Effects of Halothane, Enflurane,and Isoflurane in Papillary Muscles from Diabetic Rats Anesth Analg. 66,23-8
263. David Murray(1988)Nitrous Oxide:Cardiovascular Effects in Infants and Small Children During Halothane and Isoflurane Anesthesia Anesth.Analg 67,1059-64
264. Thomas J.J.Blanck(1992)Halothane Does not Alter Ca Affinity of Troponin C Anesthesiology 76,100-105

265. Benoit M.Tavernier(1994)Halothane and Isoflurane Decrease Calcium Sensitivity and Maximal Force,in Human Skinned Cardiac Fibers Anesthesiology 80,625-633
266. David J.Murray(1992)Comparative Hemodynamic Depression of Halothane Versus Isoflurane in Neonates and Infants: An Echocardiographic Study Anesth.Analg 74,329-37
267 Neil E.Farber(1995)The effects of Halothane on Cardiovascular Responswew in the Neuraxis of Cats Anesthesiology 82,153-156
268. Jean Marty(1987)The effect of Halothane on the Human Beta- adrenergic Receptor of Lymphcyte Membranes Anesthesiology 67,974-978
269. Mads Gilbert(1988)Comparative Coronary Vascular Reactivity and Hemodynamics during Halothane and Isoflurane Anesthesia in Swine Anesthesiology 68,243-253
270. Hoshang J.Khambatta(1988)Global and Regional Myocardial Blood Flow and Metabolism during Equipotent Halothane and Isoflurane Anesthesia in Patients with Coronary Artery Disease Anesth Analg 67,936-42
271. Davy C.H.Cheng(1992)Dose-Response Relationship of Isoflurane and Halothane versus Coronary Perfusion Pressures Anesthesiology 76,113-122
272. Peter F.Conzen(1992)Coronary Microcirculation during Halothane, Enflurane ,Isoflurane,and Adenosine in Dogs Anesthesiology 76,261-270
273. Gilbert Blaise(1994)Does Halothane Interfere with the Release, Action or Stability of Endothelium -derived Relaxing Factor /Nitric Oxide? Anesthesiology 80,417-426
274. Ronnie Mignella(1995)Inhaled Anesthetics Alter the Determinants of Coronary Collateral Blood Flow in the Dog Anesthesiology 83,799-808
275. Masahiro Kakuyama(1994)Halothane and Enflurane Costrict Canine Mesenteric Arteries by Releasing Ca from Intracellular Ca Stores Anesthesiology 80,1120-1127
276. Jorg Meyer(1993) Effects of Halothane Anesthesia on Vasoconstrictor Response to NG- Nitro -L-Arginine Methyl Ester ,an Inhibitor of Nitric Oxide Synthesis ,in Sheep Anesth Analg 77,1215-21

277. Alex L.Loeb(1994)Halothane Inibits Bradykinin -Stimulated Prostacyclin Production in Endotelial Cells Anesthesiology 81,931-938
278. Douglas A.Hettrick(1995)Differential Effects of Isoflurane and Halothane on Aortic Input Impedance Quantified Using a Three -element Windkessel Model Anesthesiology 83,361-373
279.V.Lanza(1988)Effects of Halothane, Enflurane ,and Nitrous Oxide on Oxyhemoglobin Affinity Anesthesiology 68,591-594
280. John B.Pollard(1988)Myocardial Tolerance to Total Ischemia in the Dog Anesthetized with Halothane or Isoflurane Anesthesiology ,69,17-23
281. Marcel E.Durieux(1992)Effects of Hypoxemia on Regional Blood Flows during Anesthesia with Halothane ,Enflurane,or Isoflurane Anesthesiology 76,402-408
282. David F.Stowe(1988)Effects of Halothane With and Without Histamine and/op Epinephrine on Automaticity,Intracardiac Conduction Times,and Development of Dysrhytmias in the Isolated Guinea Pig Heart Anesthesiology 68,695-706
283. Yukio Hayashi(1988)Synergistic Interaction of a1-and b-Adrenoceptor Agonists on Induction Arrhythmias during Halothane Anesthesia in Dogs Anesthesiology 68,902-907
284. Nediljka Buljubasic(1992)Halothane Reduces Dysrhythmias and Improves Contractile Function After Global Hypoperfusion in Isolated Hearts Anesth.Analg 74,384-94
285. Ulrich Schmidt(1995)Interaction of Halothane with Inhibitory G-Proteins in the Human Myocardium Anesthesiology 83,353-360
286. Dahan A.(1994) Effects of subanesthetic Halothane on the ventilatory responses to hypercapnia and acute hypoxia in healthy volunteers Anesthesiology 80 ,727-738
287. Dahan A.(1994)Influence of a subanesthetic concentration of halothane on the ventilatory response to step changes into and out of sustained isocapnic hypoxia in healthy volunteers Anesthesiology 81,850-859

288. Canet J(1994)Effects of halothane and isoflurane on ventilation and occlusion pressure Anesthesiology 81,563-571
289.Ryoichi Ochiai(1992) Differential Sensitivity to Halothane Anesthesia of the Genioglossus, Intercostals,and Diaphragm in Kittens.Anesth Analg 74:338-44
290.David O.Warner(1995) Chest Wall Function while Awake and during Halothane AnesthesiaI.Quiet Breathing Anesthesiology 82 6-19
291.David O Warner MD,Mark A.Warner MD (1995) Human Chest Wall Function while Awake and during Halothane Anesthesia II Carbon Dioxide Rebreathing Anesthesiology 82 20-31
292. David O.(1995) Warner Chest wall responses to rebreathing in halothane anesthetized Dogs Anesthesiology 83, 835-843
293. Landers F(1989) Calcium ,Calmodulin, and Anesthesiology Review Article Anesth. Analg. 69,100-12
294. Robert H.(1993)Brown Comparison of Low Concentrations of Halothane and Isoflurane as Bronchodilators Anesthesiology 78 1097- 1101
295.Kozo Yamamoyo(1993) Factor Influencing the Direct Actions of Volatile Anesthetics on Airway Smooth Muscle Anesthesiology 78 1102-1111
296. Hedenstierna G.(1994) Phrenic Nerve stimulation during Halothane Anesthesia Anesthesiology 80,751-760
297. Benumof L.Jonathan(1987) Halothane and Isoflurane only slighyly impair arterial oxygenation during One -lang ventilation in patients untergoing thoracotomy Anesthesiology 67,910-915
298.Denise J.Wedel(1993) Delayed Onset of Malignant Hyperthermia Induced by Isoflurane and Desflurane Comparef with Halothane in Susceptible Swine Anesthesiology 78 1138-1144
299. Blanck JJ(1992) Halothane ,Enflurane,And Isoflurane stimulate calcium leakege from rabbit sarcoplasmic reticulum Anesthesiology 76, 813-821
300. Charles F L (1994)Volatile anesthetics inhibit dihydropyridine dlinding to malignant hyperthermia susceptible and normal pig sceletal musclemembranes Anesthesiology 80, 618-624

301. Urwyler A.(1994) Genetic effects on the variability of the halothane and caffeine muscle contracture tests Anesthasiology 80,1287-1295
302. Benumof JL(1976)Diminished hepatic arterial flow during halothane administration Anesthesiology V 45:No 5,Nov
303. Gelman Simon(1984)Liver circulation and function during isoflurane and halothane anesthesia Anesthesiology 61:726-730
304. Huges RL(1980)Effects of enflurane and halothane on liver blood and oxygen consumption in the greyhound Br J Anaesth 52:1079-86.
305.Horber Ffritz(1988) Anesthesia with Halothane and nitrous oxide alters protein and amino acid metabolism in dogs
Anesthesiology 69:319-326
306. Franks JJ(1988)Halothane decreases albumine and transferine synthesis: Studies in the isolated perfused rat liver and in the intact rat Anesthesiology 68:529-533
307.Rehder Kai(1967) Halothane Biotrasformation in Man:A quantitative study Anesthesiology July- August
308. Carpenter L Randall(1986) The extent of metabolism of inhaled anesthetics in humans Anesthesiology65:201-5
309. Arias M I The liver biology and Pathobiology Third Edition
Chapter 24 :420-427
310. Porter Todd(1991) Minireview Cytochrome P-450 The journal of Biological Chemistry Vol 266 No 21 Issue of July 25. pp 13469-13472
311.Sharp J.Howard (1979)Volatile Metabolites and Decomposition Products of Halothane in man Anesthesiology 50:2-8
312.Van Dyke Russell(1975) Metabolism of Halothane Anesthesiology V43,No 4 Oct
313. Cohen Ellis(1971) Metabolism of volatile Anesthetics Anesthesiology August Vol 35 n 2
314.Ahr HJ(1982)The mechanism of reductive dehalogenation of Halothane by liver cytocrome P -450 Biochemical Pharmacology Vol.31 No3 pp 383-390
315. Cohen Ellis(1975) Urinary metabolites of Halothane in Man

Anesthesiology V 43 No 4 Oct
316. Nastainczyk W(1982) The reductive metabolism of Halogenated Alkanes by liver microsomal cytochrome P-450 Biochemical Pharmacology Vol 31,No 3 pp 391-396
317.Maiorino M.R.(1981) Factors affecting the formation of chlorotrifluoroethane and chlorodifluoroethylene from Halothane Anesthesiology 54:383-389
318. Bentley John(1982) Halothane Biotrasformation in obese and nonobese patients.Anesthesiology 57:94-97
319. Summary of National Halothane Study(1966) JAMA Sept.5 Vol.197 No 10
320.R.Wright(1975).Controlled prospective study of the effect on liver function of multiple exposures to Halothane The Lancet.Saturday 12 April,817-820
321.J.Trowell(1975) Controlled trial of repeated Halothane Anaesthetics in patients with carcinoma of the uterine cervix treated with radium The Lancet ,April 12, 821-823.
322.J.P.H.Fee(1979) A prospective study of liver enzyme and other changes following repeat administation of Halothane and enflurane. Br.J.Anaesth.51,1133
323.D.C.Ray(1991) Halothane Hepatitis Br.J.Anaesth. 67:84-99
324.J.T LaMont Postoperative Jaundice Chapter 52
325.R.H.Elliott(1993) Hepatotoxicity of volatile Anaesthetics Review Articles Br.J.Anaesth 70:339-348
326.J.G.Kenna(1994) The metabolism and toxicity of inhaled anaesthetic agents. Anaesthetic Rharmacology Review 2:29-42
327.Burnell R(1977)Brown Biotransformation and Hepatotoxicity of Halothane Bioch.Pharmacology Vol.26 pp.2091-2094 Pergam.Press
328. L.D.Gruenke Characterization of Halothane Oxidation by Hepatic Microsomes and purified cytochromes P-450 using a gas chromatographic mass spectrometric assay The Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics Vol.246:2 454-459

329.G.Sipes(1980)Comparison of the Biotransformation and Hepatotoxicity of Halothane and Deuterated Halothane The J. Pharmacol.and Exp.Ther.Vol 214:716-720
330.I.G.Sipes(1976) An Animal model of Hepatotoxicity associated with Halothane anesthesia Anesthesiology V 45 No 6,622-628
331.E.S.Reynolds(1977) Halothane Hepatotoxicity:Enhancement by Polychlorinated Biphenyl Pretreatment Anesthesiology 47:19-27
332.G.E.McLain(1979).An Animal model of Halothane Hepatotoxicity: Roles of Enzyme induction and hypoxia Anesthesiology 51:321-326
333.G.L.Becker(1986) Energy deficits in Hepatocytes isolated from Phenobarbital-traeted or fasted rats and briefly exposed to halothane and hypoxia in vitro Anesthesiology 65:379-384
334.G.L.Becker(1987)Halogenated anesthetics increase oxygen consumption in isolated hepatocytes from phenobarbital- treated rats. Anesthesiology 67:185-190
335.M.Wood(1980) Halothane -induced hepatic necrosis in triiodothyronine - pretreated rats. Anesthesiology 52:470-476
336.R.C.Rumbaugh(1978) Dose dependent actions of thyroxine on hepatic drug metabolism in male and female rats Biochem.Pharm.Vol27,pp 2027-2031
337.A. C.Smith(1983).Characterization of Hyperthyroidism enhancement of halothane induced hepatotoxicity Bioch. Pharmac.Vol.32,No23pp3531-3539
338.C.P.Siegers(1983) Halothane hepatotoxicity in hyperthyroid rats as compared to the phenobarbital-hypoxia model Tox.and A.Pharm.69,257-264
339.W.T.Ross(1979) Hepatic necrosis caused by halothane and hypoxia in phenobarbital -treated rats Aanesthesiology 31:327-333
340.M.A.Jenner Influence of isoniazid phenobarbital, phenytoin, pregnenolone 16-a Carbonitrile and β-naphthoflavine on halothane metabolism and hepatotoxicity Drug metabolism and dispos. V 18 No 5,819-821
341.R.C.Lind(1990) Covalent blinding of oxidative biotrasformation intermediates is associated with halothane hepatotoxicity in guinea pigs Anesthesiology 73:1208-1213

342.R.C.Lind(1992) Subanesthetic halothane is hepatotoxic in the guinea pig Anesth.Analg.74:559-63
343.H.C.Huges(1972)Hepatic necrosis produced by repeated administration of halothane to guinea pigs Anesthesiology V36,No 5,May 1972,466-471
344.J.G.Reves(1975) Halothane in the guinea pig Anesthesiology 42:230-231
345.R.Lind(1988) Hypoxia and Anesthetic-asociated liver injury in guinea pigs Anesthesiology 68:974-976
346. D.Hursh(1987) Hepatic oxygen supply during halothane or isoflurane anesthesia in guinea pigs Anesthesiology 67:701-706
347.W.H.W.Inman(1974) Jaundice after repeatad exposure to halothane :An analysis of reports to the committee on safety of medicines Br.Med.J.1,5-10
348.B.Walton(1976) Unexplained hepatitis following halothane Br.Med. J 1,1171-1176
349.J.G.Kenna(1995) Immunopathogenesis and Treatment of Halothane hepatitis Clin.Immunother. 3:108-124
350. D.W Vergani(1978) Sensitisation to Halothane altered liver components in severe hepatic necrosis after halothane anaesthesia The Lancet 801-803
351.D.Vergani . Antibodies to the surface of halothane altered rabbit hepatocytes in patients with severe halothane associated hepatitis The N.England J Med.303,2:66-71
352.J.G.Kenna(1988) Metabolic basis for a drug hypersensitivity:Antibodies in sera from patients with halothane hepatitis recognize liver neoantigens that contain the trifluoroacetyl group derived from halothane The J Pharm.Exp.Ther.245,3,1103-1109
353.F.Van Pelt(1994) Formation of trifluoroacetylated protein antigens in cultured rat hepatocytes exposed to halothane in vitro Bioch.Pharm.48,3:pp461-471
354.G.P.llyin(1994) Human hepatocytes express trifluoroacetylated neoantigens after in vitro exposure to halothane Immun 148:561-567

355.J.G.Kenna (1990). Factors affecting the expression of trifluoroacetylated liver microsomal protein neoantigens in rats treated with halothane Drug Metab. and Disposition18:5,788-793
356.H. Satoh(1985) Immunological studies on the mechanism of halothane induced hepatotoxicity :Immunohistochemical evidence of tpifluoroacetylated hepatocytes The J.Pharm.Exper.Ther. 233,3:857-862
357.J.G.Kenna(1992) The topography of trifluoroacetylated protein antigens in liver mocrosomal fractions from halothane treated rats Bioch.Pharm.44 ,4:621-629
358.T.L.Knight(1994) Sera from patients with halothane hepatitis contain antibodies to halothane induced liver antigens which are not detectable by immunoblotting The J.Pharm.Exper.Therap.270,3:1325-1333
359.J.W.Harris(1991).Tissue acylation by the chlorofluorocarbon substitute 2,2 dichloro-1,1,1-trifluoroethane 88,pp.1407-1410
360.G.Smith(1993) Autoantibodies to hepatic microsomal carboxylesterase in halothane hepatitis The Lancet 342:963-964
361.H.Satoh(1989) Human anti-endoplasmic reticulum antibodies in sera of patients with halothane induced hepatitis are directed against a trifluoroacetylated carboxylesterase Proc. Natl.Acad.Sci. USA 86,pp.322-326
362.J.Martin(1991)A metabolite of halothane covalently binds to an endoplasmic reticulum protein that is higly homologous yo phosphatidylinositol specific phospholipase C-a but has no activity
Bich.Bioph.Research.Comm.178,2:679-685
363 J.L.Martin(1990) Antibody assays for the detection of patients sensitized to Halothane Anesth.Analg. 70:154-9
364.J.LMartin(1993). Association of anti -58 kDa endoplasmic reticulum antibodies with halothane hepatitis Bioch.Pharm.46,7:1247-1250
365.A.K.Hubbard(1988) Halothane hepatitis patients generate an antibody response toward a covalently bound metabolite of halothane Anesthesiology 68,5:791-796

366.G.L.A.Bird(1989) Detection of antibodies to a halothane metabolite hapten in sera from patients with halothane associated hepatitis J.Hepatology 9,366-373

367.G.Eksrom(1989) Human liver mocrosomal cytochrome P-450 IIE1.Immunological evaluation of its contribution to microsomal ethanol oxidation,carbon tetrachloride reduction and NADPH oxidase activity Bich.Pharm.38,4:689-693

368.A.H.Callis(1987)Charaterization of Halothane inducsd humoral immune response in rabbits Clin.Exp.Immunol. 67:343-351

369.M.A(1997)Robin Plasma membrane cytochromes P-450 as neoantigens and autoimmune targets in drug-induced hepatitis Journal of Hepatology 26(supp 1 23-30)

370.J.G.Kenna(1997) Immunoallergic drug-induced hepatitis:lessons from Halothane J.of Hepatology 26(supp 1) 5-12

371.G.Feldman(1997) Liver apoptosis J Hepatology26(Suppl 2):1-11

372. Καραμπάτσος Ηλίας Απόπτωση Ιατρικά Χρονικά Τόμος ΙΘ Τεύχος 10 ,547-559

373.J Shi,K.Aisaki,Y.Ikawa K(1998)Wake Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of Carbon Tetrachloride Am J Pathol 153:515-525

374.Meyaard L,Otto SA,Jonker RR et al (1992) Programmed death of T cells in HIV -1 infection Science ,257:217-220

375.Gougeon ML,Montagnier L,(1993) Apoptosis in AIDS.Science 260:1269-1271

376.Martin JB,(1982) Huntington's disease :Genetically programmed cell death in the human central nervous system Nature,299:250-252

377.J.Shi,H.Fujieda Y,Kokubo K(1996)Wake Apoptosis of neutrophilis and their elimination by Kupffer cells in rat liver Hepatology 24:1256-1263

378. J.P.Iredale, R.C. Benyon,J.Pickering,M.McCullen ,M.Northrop, S.Pawley,C.Hovell,M.J.P(1998)Arthur Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis J.Clin Invest 102:538-549

379.J.Lawson,M.Fisher,C.Simmons,A.Farhood,H.Jaeschk(1998) Parenchymal cell apoptosis as a signal for sinusoidal sequestration and transendothelial migration of neutrophils in murine models of endotoxin and fas-antobody-induced liver injury Hepatology 28:761-767

380. McCabe MJ,Nicotera P.,Orrenius S(1992)Calcium-dependent cell death.Role of the endonuclease,protein kinase C and chromatin conformation .Ann NY Acad Sci 663:269-78

381.Trump BF,Berzesky IK(1992)The role of cytosolic Ca^{2+} in cell injury,necrosis and apoptosis. Curr Opin Cell Biol 4:227-232

382.McConkey DJ,Orrenius S,.(1994)Signal transduction pathways to apoptosis.Trends Cell Biol ; 4:370-5

383.Sanchez V,Lukas M,Sanz A.,Goberna R.,(1992)Decreased protein kinase C activity is associated with programmed cell death (apoptosis) in freshly isolated rat hepatocytes .Biosci Rep ;12:199-205.

384.Rossig L,Haendeler J,Herman C,Malchow P,Urbich C,Zeiher AM,Dimmeler S(2000) Nitric oxide downregulates MKP-3mRNA levels :Involvement in endothelial cell protection from apoptosis J Biol Chem 8

385.G.M.Cohen(1997) Review Article. Caspases : the executioners of apoptosis Biochem.J.326,1-16

386. P Αγγελοπούλου(1997) Ρυθμιστικά γονίδια της απόπτωσης Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής14:375-388

387. Martin SJ,Green DR,Cotter TG(1994)Dicing with death :dissecting the componentes of the apoptosis machinery. TIBS 19:26-30

388. Arends MJ,Wyllie AH.(1991)Apoptosis mechanisms and roles in pathology. Int.Rev Exp Pathol 32:223-54

389. Gores GJ,Hermans B,Lemasters JJ(1990)Plasma membrane bleb formation and rupture:a common feature of hepatocellular injury Hepatology 11:690-698

390.Gallaber BW,Berthold A,Klammt J,Kratzsch J,Bartsch M,Kiess W (2000)Expression of apoptotic and cell cycle related genes in proliferating and colcemid arrested of divergent lineage.Cell Mol Biol 46:79-88

391.T.Patel,G.Gores(1995) Apoptosis and Hepatobiliary disease Hepatology 21:1725-1240
392.Lane DP,Crawford LV.,(1979)T-antigen is bound to a host protein in SV 40 -transformed cells .Nature ,278:261-263
393.Eliyahu D,Raz A,Gruss P.,Givol D.,Oren M.(1984)Participation of p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells Nature,312:646-649
394.Hinds PW.,Finlay CA.,Levine A(1989) Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation.J Virol ,63:793-746.
395.Finlay CA,Hinds PW,Levine A.(1989) The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation.Cell ,57:1083-1093
396.Kastan MB,Onyekwere O.,Sidransky D.,Vogelstein B.,Craig RW(1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage .Cancer Res ,51:6304-6311
397.Deisseroth AB.,DeVita VT.,(1995)The cell cycle .Probing new molecular determinants of resistance and sensitivity to cytotoxic agents.
Cancer J Sci Am 1995,1:15-21.
398.Livingstone LR.,White A.,Sprouse E.,Livanow E.,Jacks T.,Tlsty TD,(1992) Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild -type p53.Cell ,70:937-948
399.Yn Y,Tainsky M,Bischoff FZ,Strong LC,Whahl GM,(1992) Wild -type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amlification in cells with mutant p53 alleles Cell,70:937-948
400.Bonehower LA,(1994) Tumor suppressor gene p53 and apoptosis . Cell Bull ,46:161-166
401.Lane DP(1992) P53 ,guardian of the genome.Nature ,358:15-16
402.Donehower LA,Harvey M,Slagle BS,McArthur MJ,Montgomery CA,Butel JS et al(1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneus tumours . Nature 356:215-221

403.Unger T.,Mietz JA,Scheffner M,Yee CL,Howley PM(1993) Functional domains of wild-type and mutant p53 involved in transcriptional regulation,transdominant inhibition and transformation suppression Moll Cell Biol ,13:5186-5194
404.Miyashita T,Krajeski S,Krajewska M,Wang HG,Lin HK,Liebermann DA,et al(1994) Tumor suppressor p53 is a regulatop of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo . Oncogene 9:1799-1805
405.Ginsberg D,Mechta F,Yanin M,Oren M,(1991)Wild -type p53 can down-modulate the activity of various promoters Proc Natl Acad Sci , 88:9979-9983
406.Oliver JD,Kinzler KW,Melzer PS,George DL,Vogelstein B,(1992) Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas Nature, 358:80-83
407.White E.,(1996)Life, death,adn the pursuit of apoptosis Genes Dev, 10:1-15
408.Xiong Y,Hannon GJ, Zhang H, Casso D,Kobayashi R,Beach D.(1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature 366:701-704
409.Sherr CJ,Roberts JM,(1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin- dependent kinases .Genes Dev ,9:1149-1163
410.Tzujimoto Y,Croce CM,(1986) Analysis of the structure ,transcripts and proteins products of bcl-2 ,the gene involved in human follicular lymphoma . Proc Natl Acad Sci ,83;5214-5218
411.Mc Donnell TJ,Korsmeyer SJ,(1991) Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgene for the t (14;18) Nature 349:254-256
412.Hockenbery DM,Nunez G,Milliman CL,Schreber RD,Korsmeyer SJ (1990)Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature ,348:334-336
413.Nunez G,London L,Hockenbery D,Alexander M,McKaern JP,Korsmeyer SJ (1990) Deregulated bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor -deprived hemopoietic cell lines J Immunol 144:3602-3610

414.Lotem J,Sachs L,(1993) Regulation by bcl-2 and p53 of susceptibility to induction of apoptosis by heat shock and cancer chemotherapy compounds in differentiation competent and defective myeloid leukemic cells.Cell Growth Differ ,4:41-47

415.Bissonnette RP.,Echeverri F,Mahboubia A,Green DR, (1992) Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2.Nature 359:552-554

416.Jacobson MD,Burne JF,King MP,Miyashita T,Reed JC,Raff MC(1995) Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. Nature,361:365-369

417.Lam M ,Dubyak G,Chen L,Nunez G,Miesfeld RL,Distelhorst CW(1994) Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca^{++}fluxes ,Proc Natl Acad Sci , 91:6569-6573

418.Trudy L et al (1994) Sera from patients with Halothane Hepatitis contain antibodies to halothane -induced antigents whith are not detactable by immunoblotting J PET 270:1325-1333

419.Takei Y.,Kawano S.,Nishimura Y.,Goto M.,Nagai H.,Chen SS.,Omae A.,Fusamoto H.,Kamada T.,Ikeda K.,et al(1995) Apoptosis :a new mechanism of endothelial and Kupffer cell killing J.Gastroenterol Hepatol, Suppl 1:S 65-7

420. Stein CS, Stejan GH(1993)Rat splenocytes inhibit antigen-specific lymphocyte proliferation through a reactive nitrogen intermediate (RNI)-dependent mechanism and exhibit increased RNI production in response to IFN -gamma. Cell Immunol 150 :281- 297

421. Ronald CR ,Mangino MJ,Flye MW.(1993) Lanthanide 'blockade"of antigen-presenting cells suppresses lymphocyte proliferation by inducing nitric oxide synthesis.J.Surg.Res.54:401-410

422. Denham S,Rowland IJ(1992) Inhibition of the reactive proliferation lymphocytes by activated macrophages :the role of nitric oxide Clin.Exp Immunol 87:157-162

423.Morgan AG,Soothil JF(1975) Measurement of the clearance function of macrophages with I-labelled polyvinyl pyrrolidone Clin Exp Immunol 20:489-497
424. Thomas HC,Salmeron J and Tsitsikas K (1980) Immunostimulants in the therapy of chronic liver disease.In Liehr H and Grun M(Eds)
The reticuloendothelial system and the pathogenesis of liver disease. Elsevier, North-Holland Biomedical Press.Amsterdam.pp 385-393
425. Gavrieli Y,Shernan Y,Ben-Sasson SA.(1992) Indentification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.J.Cell Biol 119:439-501
426. Davis NL,Nunnally RL,Malinin TI Determination of the minimun alveolar concentration (MAC) of halothane in the white New Zealand rabbit. Br J Anaesthesia 1975 ;47(3):341-5
427.Drummond JC .MAC of Halothane ,enflurane,and isoflurane in the New Zealand white rabbit:and a test for the validity of MAC determinations.Anaesthesiology 1985;62(3)336-8
428.Mazze RI,Rice SA,Baden JM.Halothane,isoflurane,and enflurane MAC in pregnant and nonpregnant female and male mice and rats
Anesthesiology 1985;62(3):339-41
429. Lemasters JJ,Ji S.Thurman RG et al.(1981)Centrolobular injury following hypoxia in isolated,perfused rat liver Science 213:661-663
430. Jaescke H,Farhood A(1991) Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia -reperfusion injury in rat liver.Am.J Physiol 260;G355-G362
431. Caldwell-Kenkel JC,Currin RT,Tanaka Y et al(1991)Kupffer cell activation and endothelial damage after storage of rat liver:effects of reperfusion Hepatology 13:83-95
432. McFarlane IG(1991)Autoimmunity and the liver. Semin Liver Dis 11:223-233
433. MacKay LR.(1991)Pathogenesis of autoimmune chronic active hepatitis .In :Krawit EL,Wiesner RH(eds) Autoimmune diseases.

Raven Press,New York pp 1-42
434.Shiratori Y,Tanaka M,Hai K,et al(1990)Role of endotoxin-responsive macrophages in hepatic injury. Hepatology 11: 183-192
435. Thurmam RG,Bunzendahl H,Lemasters JJ.(1993)Role of sinusoidal lining cells in hepatic reperfusion injury following cold storage and transplantation.Senin Liver Dis.13:93-100
436. Tuwaizri AA,Akdamar K,Di Luzio NR(1981)Modification of Galactosamine induced liver injury in rats by reticuloendothelial system stimulation or depression. Hepatology 2:107-113
437. Doherty PC(1993) Cell-mediated cytotoxicity. Cell 75:607-612
438.Jonsson JR,Edwards-Smith CJ,Catania SC,Morotomi Y,Hogan PG,Clouston AD,Bansal AS,Lynch SV,Strong RW,PowellEE(2000)Expression of cytokines and factors modulating apoptosis by human sinusoidal leucocytes.J Hepatol 32:392-8
439. Schulze-Osthoff K,Bakker AC Vanhaesebroec B et al(1992)Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. J Biol.Chem 267:5317-5323
440.Spitzer JA,(1994) Cytokine stimulation of nitric oxide formation and differential regulation in hepatocytes and non parenchymal cells of endotoxinemic rats.Hepatology 19:217-228.
441. Harbrecht BG,Billiar TR,Stadler J et al (1992) Inhibition of nitric oxide synthesis during endotoxemia promotes intrahepatic thrombosis and an oxygen radical-mediated hepatic injury .J.Leukoc Biol 52:390-394.
442. Kurose I,Higuchi H,Yonei Y,Ebinnua H,Watanase N,Hokari R,Fukumura D,Miura S,Takaishi A, Saito H,Nakatsuni RC,(1996)
Rat Kupffer cells-derived Nitric Oxide suppresses proliferation and induces apoptosis of syngeneic hepatoma cells Gastroenterology 111:1058-70
443.Harrison DC,Lemasters JJ,Herman B(1991) A pH-dependent phospholipase A2 contributes to loss of plasma membrane intergrity during chemical hypoxia in rat hepatocytes . Biochem Biophys Res Commun 174:656-59

444.Tanner A,Keyhani A,Reiner R,et al(1981) Proteolytic enzymes released by liver macrophages may promote hepatic injury in a rat model of hepatic damage. Gastroenterology 80:647-654
445.Sci J.,Aisaki K.,Ikawa Y.,Wake K. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride Am.J.Pathol 1998;15392):515-25
446.Amouzadeh HR,Pohl L.R Processing of endoplasmic reticulum luminar antigens associated with halothane hepatitis in rat hepatocytes Hepatology 1995 ;22(3)936-43
447.Christen U,Burgin M,Gut J .Halothane metabolism:Kupffer cells carry and partially process trifluoroacetylated protein adducts.Biochem Biophys.Res.Commun 1991 ;18;175(1):256-62
448.Furst SM ,Luedke D,Gandolfi AJ Kupffer cells from halothane-exposed guinea pigs carry trifluoroacetylated protein adducts Toxicology 1997 ,27;120(2):119-32
449.Furst SM,Gandolfi AJ Interaction of lymphocytes with Kupffer cells from halothane -exposed guinea pigs. Int Arch.Allergy Immunol 1997, 114(1):46-53
450.Payne CM,Glasser L,Tischer ME,Wychoff D,Cromey D,et al(1994) Rrogrammed cell death of the normal human neutrophil:an in vitro model of senescence .Microsc Res Tech,28:327-344
451. Dini L.,Ruzittu MT,Falasca L(1996)Recognition and phagocytosis of apoptotic cells Scanning Microsc 10:239-51
452. Dini L.Carla EC(1998) Hepatic sinusoidal endothelium heterogeneity with respect to the recognition of apoptotic cells Exp Cell Res 240:388-93.
453. Dini L.,Lentini A.,Diez GD,Rocha M,Falasca L.,Serafino L.,Vidal-Vanaclocha F(1995) Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells J .Cell Sci Mar;108 (Pt 3) :967-73
454. Hockenbery D,Nupez G,Milliman C,Schreber RD, Kosmeyer SJ(1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial menbrane protein that blocks programmed cell death.Nature 384:334-336

455. Reed JC (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death.J. Cell Biol 124:1-6
456.El- Deiry WS,Tokino T,Velculescu VE et al(1993) Waf 1,a potential mediator of p53 tumor suppression Cell 75:817-825
457.Cox LS (1997) Multiple pathways control cell growth and transformation:overlapping and independent activities of p53 and p21 J.Pathol 183:134-140
458. P.Hall and D.P.Lane(1994) Editorial .p 53. In tumor pathology:can we trust immunohistochemistry?-Revisited! J.Pathology,vol.172:1-4
459.Prives C,Hall P,(1999).The p53 pathway .J.Pathol 187:112-126
460.Micheli P,Chedid M,Lin D,Pierce JH,et al(1994) Induction of Waf1/CIP1 by a p53-independent pathway.Cancer Res 54:3386-3395
461. Yonish -Ronach E,Resnitzky D,Lotem J,Sachs L,Kimchi A Oren Mitety (1991)Wild type p53 induce apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by IL-6. Nature 352:345-47
462. Patel T,La Russo NF,Gores GJ,(1997) Interleukin 6 suppresses cholahgiocyte apoptosis by down regulation of Bax. Hepatology 26:226A
463.Ni R,Tomita Y,Matsuda K,et al (1994) Fas-mediated apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes. Exp Cell Res 215:332-7
464.Hiramatsu N,Hayashi N,Katayama K,et al. (1994) Immunohistochemical detection of fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. Hepatology 19:1354-9
465.Mita E,Hayashi N,Lio S,et al (1994)Role of fas-ligand in apoptosis induced by Hepatitis C virus infection.Biochem Biophys Res Commun 204:469-74
466. Kerr JFR,Searle J,Haliday WJ et al (1979) The nature of piecemeale necrosis in chronic active hepatitis Lancet 11:827-8
467.Muschen M. Warskulat U.,Douillard P.,Gilbert E.,Haussinger D(1998) Regulation of CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand expression by lipopolysaccharide and dexamethasone in parenchymal and nonparenchymal rat liver cells Hepatology 27:200-8

468.Sail B,Knittel T,Matthes N,Schott P,Ramadori G(1997)CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell .A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair Am.J.Pathol.151:1265-1272

469.Motoyama S.Minamiya Y.Saito S, Saito R.,Matsuzaki I,Abo S.,Inaba H.,Enomoto K, Kitamura M(1998) Hydrogen peroxide derived from hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell apoptosis in perfused hypoxic rat liver.Gastroenterology 14:152-63

470. Kinoshita K., Kanai M., Awane M.,Furuke K.,Shirakata Y.,Gomi T., Nakamura Y., Ikai I.,Yamauchi A.,Inamoto T.,Ohmori K.,Yamaoka Y(1997)Reducing environment protects sinusoidal lymphocytes isolated from normal human liver from apoptosis J.Hepatol 26:103-10

471.Hamada E,Nishida T,Uchiyama Y,Nakamura J,Isahara K,Kazuo H, Huang TP,Momoi T,Ito T and Matsuda H(1999) Activation of Kupffer cells and caspase-3 involved in rat hepatocyte apoptosis induced by endotoxin.Journal of Hepatology 30:807-818

472. Holden PR,Hasmall SC,James NH,West DR,Brindle RD,Gonzalez FJ,Peters JM,Roberts RA (2000)Tumor necrosis factor alpha (TNF alfa):role in suppression of apoptosis by the peroxisome proliferator nafenopin .Cell Mol Biol 46:29-39

473.Perez R.,Johnson J., Winkler JD, Rudich S,Carter L,Katznelson S,German JB(1998) Kupffer cell-mediated lymphocyte apoptosis a PGE2-dependent mechanism of portal venous transfusion-induced immunosuppression ?J.Surg Res 78:37-41

474. Stahelin BJ,Matrin U,Solioz M,ZimmermannH,Reichen J.(1998) False positive staining in the TUNEL assay to detect apoptosis in liver and intestine is caused by endogenous nucleases and inhibited by diethyl pyrocarbonate.Mol. Pathol 51:204-8

475.Grasl-Kraupp B,Ruttkay -Nedecky B,Koudelka H,Bukowska K,Bursch W,Schulte-Hermann R(1995) In situ detection of fragmented DNA (TUNEL)

fails to discriminate among apoptosis, necrosis and autolytic cell death:a cautional note.Hepatology 21:1465-8
476.Zhao M,Zhang NX,Economou M et al.(1994) Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in liver lesions :bcl-2 protein is expressed in hepatocellular carcinomas but not in liver cell dysplasia.Histopathology 25:237-245
477.Charlotte F,L Hermine A,Martin N,Geleyn Y,Nollet M,Gaulard P,Zafrani ES(1994) Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver Am J Pathol 144:460-465
478.Kurosawa H,Que F,Roberts RL,Fesmier PJ ,Gores GJ (1997) Hepatocytes in the bile duct ligated rat express Bcl-2 Am J Physiol 35:G1587-G1593
479.Hartung T.,Sauer A.,Hermann C.,Brockhaus F.,Wendel A.(1997) Overactivation of the immune system by translocated bacteria and bacterial products.Scand J Gastroenterol Suppl 222:98-9