

Επίδραση της σωματοστατίνης επί των
αστεροειδών κυττάρων του ήπατος

Στέφανος Κληρονόμος

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής

2014

Περιεχόμενα

I ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	3
1 Μηχανισμοί ινώσεως του ήπατος	5
1.1 Ηπατική ίνωση και κίρρωση του ήπατος	5
1.1.1 Η ίνωση ως διαδικασία επούλωσης	5
1.1.2 Ηπατική κίρρωση	6
1.2 Η θεμέλια ουσία στο φυσιολογικό και στο ινωτικό ήπαρ	11
1.2.1 Κολλαγονικές πρωτεΐνες	12
1.2.2 Μη κολλαγονικές γλυκοπρωτεΐνες	14
1.2.3 Γλυκοζαμινογλυκάνες και Πρωτεογλυκάνες	16
1.2.4 Ένζυμα και αναστολείς τους	17
1.3 Η κυτταρική και μοριακή βάση της ηπατικής ίνωσης	24
1.3.1 Σύσταση της θεμέλιας ουσίας στο ινωτικό ήπαρ	24
1.3.2 Τα αστεροειδή κύτταρα στην ηπατική ίνωση	26
2 Βιολογία των αστεροειδών κυττάρων του ήπατος	31
2.1 Ιστορικά στοιχεία	31
2.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά	32
2.3 Εμβρυολογική προέλευση	33
2.4 Ετερογένεια και φαινοτυπική πλαστικότητα	34

2.5	Λειτουργίες των αστεροειδών κυττάρων στο φυσιολογικό ήπαρ	36
2.5.1	Μεταβολισμός λιπιδίων και ομοιόσταση της βιταμίνης Α	36
2.5.2	Ομοιόσταση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας	37
2.5.3	Ηπατική εμβρυογένεση και αναγέννηση	38
2.5.4	Τροποποίηση της ανοσολογικής απάντησης	39
2.5.5	Παρακρινική, αυτοκρινική δάση, παραγωγή χημειοκινών, κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων	41
2.6	Λειτουργίες των αστεροειδών κυττάρων στην ηπατική βλάβη και την ίνωση	46
2.6.1	Μηχανισμοί ενεργοποίησης των αστεροειδών κυττάρων	46
2.7	Ο ρόλος των αστεροειδών κυττάρων στην υποστροφή της ίνωσης	51
2.8	Οπιοειδή και αστεροειδή κύτταρα του ήπατος	54
2.8.1	Τα ενδογενή και εξωγενή οπιοειδή	54
2.8.2	Οι υποδοχείς οπιοειδών	56
2.8.3	Δράσεις των ενδογενών οπιοειδών	57
2.8.4	Ρόλος των οπιοειδών στη βιολογία των αστεροειδών κυτ- τάρων	59
2.9	Κανναβινοειδή και αστεροειδή κύτταρα του ήπατος	60
2.10	Μελλοντικοί θεραπευτικοί στόχοι στην ηπατική ίνωση	69
3	Αυξητικοί παράγοντες και αστεροειδή κύτταρα	71
3.1	Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β (TGF-β)	72
3.1.1	Χημική δομή και ισομορφές	72
3.1.2	Σύνθεση, έκκριση και ενεργοποίηση του TGF-β	73
3.1.3	Υποδοχείς του TGF-β	74
3.1.4	Smads και ενδοκυττάριο μονοπάτι μεταγωγής του σήματος	75

3.1.5	Ο TGF-β στην ηπατική ίνωση	76
3.2	Ο προερχόμενος από αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας (PDGF)	77
3.2.1	Χημική δομή και ισομορφές	78
3.2.2	Σύνθεση, έκκριση και ενεργοποίηση	78
3.2.3	Οι υποδοχείς του PDGF	79
3.2.4	Ενδοκυττάρια μεταγωγή του σήματος	80
3.2.5	Ο ρόλος του PDGF στην ηπατική ίνωση	80
3.3	Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α)	82
3.3.1	Σύνθεση και χημικές μορφές	83
3.3.2	Οι υποδοχείς του TNF-α	84
3.3.3	Ενδοκυττάρια μεταγωγή του σήματος	85
3.3.4	Ο ρόλος του TNF-α στην ηπατική ίνωση	88
4	Σωματοστατίνη και κύτταρα του ηπατικού κολποειδούς	91
4.1	Σωματοστατίνη	91
4.1.1	Βιολογικές μορφές	91
4.1.2	Δράσεις της σωματοστατίνης	92
4.1.3	Κορτιστατίνη	93
4.1.4	Συνθετικά ανάλογα	95
4.1.5	Οι υποδοχείς σωματοστατίνης	96
4.2	Σωματοστατίνη και ηπατική ίνωση	100
II	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	105
5	Σκοπός αυτής της μελέτης	107

6	Υλικά και μέθοδοι	109
6.1	Υλικά και μέθοδοι	110
6.1.1	Κυτταρική απομόνωση και καλλιέργεια	110
6.1.2	Επίδραση με κυτταροκίνες, οκτρεοτίδη και αναστολείς PTP και STP	115
6.1.3	Απομόνωση RNA από αστεροειδή κύτταρα	116
6.1.4	Επίδραση με DNάση, ανάστροφη μεταγραφή (RT) και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	118
6.1.5	Ανοσοφθορισμός	122
6.1.6	Ανοσοστύπωμα western (western blot)	124
6.1.7	Ζυμογραφία σε πήκτωμα ακρυλαμίδης	134
6.1.8	Μετρήσεις κυτταρικού πολλαπλασιασμού	137
6.2	Στατιστική ανάλυση	138
7	Αποτελέσματα	141
7.1	Απομόνωση αστεροειδών κυττάρων	142
7.1.1	Ανοσοφθορισμός για GFAP και δεσμίνη	143
7.2	Μελέτη της έκφρασης υποδοχέων σωματοστατίνης	143
7.2.1	Ανίχνευση SSTRs με ανοσοφθορισμό	144
7.2.2	Ανίχνευση SSTRs με ανοσοστύπωμα western	146
7.3	Ανίχνευση υποδοχέων οπιοειδών (μ και δ) και υποδοχέων κανναβινοειδών	147
7.4	Ανίχνευση mRNA κορτιστατίνης από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα	148
7.5	Μελέτη της έκφρασης SSTRs υπό την επίδραση κυτταροκινών	148

7.6	Μελέτη της επίδρασης των κυτταροκινών και οκτρεοτίδης στην παραγωγή αSMA και α1-προκολλαγόνου	149
7.6.1	Επίδραση της οκτρεοτίδης στην έκφραση υποδοχέων TNFR-II στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα	150
7.6.2	Επίδραση της οκτρεοτίδης στην έκφραση SMAD7 στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα	151
7.6.3	Ο ρόλος των αναστολέων φωσφατασών στην παραγωγή α1-προκολλαγόνου	151
7.7	Μελέτη της επίδρασης της οκτρεοτίδης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.	152
7.7.1	Μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT	153
7.8	Μελέτη της επίδρασης της οκτρεοτίδης στην παραγωγή MMPs	154
7.9	Μελέτη της αναστολής PI3K στην έκφραση α1-προκολλαγόνου	157
8	Συζήτηση	175
8.0.1	Έκφραση υποδοχέων σωματοστατίνης από τα αστεροειδή κύτταρα	176
8.0.2	Επίδραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών στην έκφραση των υποδοχέων σωματοστατίνης	179
8.0.3	Έκφραση υποδοχέων οπιοειδών και κανναβινοειδών	181
8.0.4	Κορτιστατίνη και αστεροειδή κύτταρα	183
8.0.5	Επίδραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και της οκτρεοτίδης στην παραγωγή α1-προκολλαγόνου και αSMA	184
8.0.6	Επίδραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και της οκτρεοτίδης στον πολλαπλασιασμό των αστεροειδών κυττάρων	187

8.0.7	Αναστολείς PI3K και παραγωγή α1-προκολλαγόνου. . . .	189
8.0.8	Επίδραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και της οκτρε- οτίδης στην παραγωγή MMPs	190
9	Περίληψη	193
III	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	201

Κατάλογος σχημάτων

2.1	Κυτταροκίνες, υποδοχείς τους και δράσεις στα αστεροειδή κύτταρα ¹	45
2.2	Κυτταροκίνες, υποδοχείς τους και δράσεις στα αστεροειδή κύτταρα (συνέχεια)	46
2.3	Γνωστοί μεταγραφικοί παράγοντες στα αστεροειδή κύτταρα ¹	51
2.4	Συνθετικά μονοπάτια ανανταμιδίου (A) και 2-AG (B) ²	63
7.1	Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο. Μελέτη ανοσοφθορισμού για τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες δεσμίνη (πάνω), GFAP (μέσο) και αSMA (κάτω)	159
7.2	Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο. Μελέτη ανοσοφθορισμού για υποτύπους SSTR σε ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. A: Δείγμα μάρτυρα (μόνο 2ο αντίσωμα), B: SSTR1, C: SSTR2A, D: SSTR2B, E: SSTR3, F: SSTR4. Οι υποδοχείς 1, 2A, 2B και 4 δείχνουν κυρίως κυτταροπλασματική εντόπιση, ενώ ο υποδοχέας 3 δείχνει επίσης έντονη πυρηνική χρώση.	160
7.3	Ανοσοστυπώματα western για υποτύπους για υποτύπους SSTR σε ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα.	161
7.4	Ανοσοφθορισμός και ανοσοστυπώματα western με ειδικά αντισώματα κατά υποδοχέων οπιοειδών μ και δ.	162

-
- 7.5 Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού. Ανοσοφθορισμός με ειδικά αντισώματα κατά υποδοχέων κανναβινοειδών CB1 και CB2 σε ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα (HSC, μεγέθυνση 100x) και σε κύτταρα Kupffer (KC, μεγέθυνση 40x). 163
- 7.6 Μελέτη επίδρασης των κυτταροκινών TNF α , IFN γ , PDGF και TGF β στην έκφραση SSTR1, SSTR2A και SSTR2B από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. * p<0.05, ** p<0.01 (συνέχεια στην εικόνα 7.7) 164
- 7.7 Μελέτη επίδρασης των κυτταροκινών TNF α , IFN γ , PDGF και TGF β στην έκφραση SSTR3, SSTR4 από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. * p<0.05, ** p<0.01 165
- 7.8 Επίδραση της οκτρεοτίδης, των κυτταροκινών TNF α , PDGF, TGF β , καθώς και του συνδυασμού τους με οκτρεοτίδη στην παραγωγή α 1-προκολλαγόνου. * p < 0.01 166
- 7.9 Επίδραση της οκτρεοτίδης στην έκφραση μεμβρανικού TNFR-II * p < 0.05 167
- 7.10 Επίδραση της οκτρεοτίδης στην έκφραση SMAD7 * p < 0.05 . . . 168
- 7.11 Επίδραση της αναστολής PTP και STP στις δράσεις της οκτρεοτίδης στην έκφραση α 1-προκολλαγόνου από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα επωασμένα σε TNF α , PDGF και TGF β 169
- 7.12 Επίδραση της οκτρεοτίδης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων επωασμένων σε TNF α , PDGF και TGF β . * p<0.05 170

-
- 7.13 Επίδραση της αναστολής PTP και STP στις δράσεις της οκτρεοτίδης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αστεροειδών κυττάρων επωασμένων σε TNF α , PDGF και TGF β 171
- 7.14 Επίδραση των κυτταροκινών TNF α , PDGF, οκτρεοτίδης και αναστολέων PTP (SO) και STP (OA) στην παραγωγή μεταλλοπρωτεασών από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. Οι δέσμες της MMP-2 και MMP-9 βρίσκονται στα 72 kDa και στα 92 kDa αντίστοιχα. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (συνέχεια στην εικόνα 7.15). 172
- 7.15 (Συνέχεια εικόνας 7.14) Επίδραση TGF β , οκτρεοτίδης και αναστολέων PTP (SO) και STP (OA) στην παραγωγή μεταλλοπρωτεασών από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. ** $p < 0.01$ 173
- 7.16 Επίδραση των αναστολέων της κινάσης 3-φωσφορικής ινοσιτόλης και του συνδυασμού τους με οκτρεοτίδη στην έκφραση $\alpha 1$ -προκολλαγόνου από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. ** $p < 0.01$ 174

Κατάλογος πινάκων

4.1	Συγγένεια αγωνιστών υποδοχέων σωματοστατίνης στον άνθρωπο (προσαρμογή από Patel YC 1999)	103
4.2	Χαρακτηριστικά ανθρώπινων υποδοχέων σωματοστατίνης (προσαρμογή από Theodoropoulou M 2013, Patel YC 1999)	104
6.1	Σύσταση gel διαχωρισμού και σόρευσης για SDS-PAGE. Οι πο- σότητες αναγράφονται σε ml.	129
7.1	Αλληλουχίες αμινοξέων συνθετικών αντιγονικών πεπτιδίων που αντιστοιχούν στο καρβοξυτελικό άκρο των SSTR1-5	144
7.2	Ημέρα πρώτης ανίχνευσης υποδοχέων SSTR. Τα δεδομένα είναι από έξι διαφορετικά πειράματα και βασίζονται σε ανίχνευση με ανοσοφθορισμό. Fisher's exact test $p < 0.01$	145

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γαστρεντερολογίας/Ηπατολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Η εργασία αυτή δεν θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς την πολύτιμη καθοδήγηση του επιβλέποντα καθηγητή κ. Ηλία Κουρούμαλη. Τον ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον επίκουρο καθηγητή κ. Γεώργιο Νότα για την σημαντικότερη βοήθειά του στη διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους και την επιστημονική συγγραφή. Τον ευχαριστώ για την οξεία επιστημονική του σκέψη, τη συναδελφικότητα και την υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ευχαριστώ θερμά όλους τους συναδέλφους στο εργαστήριο Ηπατολογίας για την αφοσίωση και τη σκληρή δουλειά τους, την ομαδικότητα και τη συμπαράσταση τους στις δυσκολίες του ερευνητικού αυτού έργου.

Μέρος Ι

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1

Μηχανισμοί ινώσεως του ήπατος

1.1 Ηπατική ίνωση και κίρρωση του ήπατος

1.1.1 Η ίνωση ως διαδικασία επούλωσης

Ίνωση είναι η τελική φάση της απάντησης ενός ιστού σε βλάβη, κατά την οποία οι κατεστραμμένες περιοχές περιβάλλονται ή αντικαθίστανται από συνδετικό ιστό φτωχό σε κύτταρα και πλούσιο σε εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Η ίνωση είναι μία εξαιρετικά δυναμική εξεργασία η οποία τελείται υπό την επίδραση ενός μεγάλου αριθμού κυτταροκινών, χημειοκινών, παραγόντων με αγγειογενετική δράση καθώς και παραγόντων νευροενδοκρινικής προέλευσης. Ένας μεγάλος και ετερογενής πληθυσμός κυττάρων συμμετέχουν στην διαδικασία αυτή. Κεντρικό ρόλο έχουν κύτταρα με ινοβλαστικό ή μυοϊνοβλαστικό φαινότυπο, τα οποία και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή, σταθεροποίηση και οργάνωση της θεμέλιας ουσίας. Η ίνωση όπως αυτή πραγματοποιείται στο ήπαρ αποτελεί μοντέλο ιστικής επούλωσης και σε άλλους ιστούς όπως ο νεφρός, ο πνεύμονας και το δέρμα, καθώς εμπλέκονται σ' αυτήν οι ίδιες κατηγορίες κυττάρων και μεσολαβητών.

Ηπατική ίνωση αναπτύσσεται σχεδόν σε όλους τους ασθενείς με χρόνια ηπατική βλάβη αλλά ο ρυθμός ανάπτυξής της μπορεί να διαφέρει σημαντικά ανάλογα με την αιτιολογία της βλάβης, την ηλικία και το φύλο του ασθενούς και τις συνυπάρχουσες νόσους³⁻⁵. Η χρονιότητα της βλάβης και η μη δυνατότητα αυτοπεριορισμού της φαίνεται να είναι σημαντικοί παράγοντες για την ανάπτυξη ηπατικής ίνωσης. Αντίθετα, σε ασθενείς με αυτοπεριοριζόμενη νόσο όπως κεραυνοβόλο τοξική ή ιογενή ηπατίτιδα δεν αναπτύσσεται ίνωση παρά την εκτεταμένη ηπατική βλάβη και πλήθος “ινογόνων” ερεθισμάτων.

Η ηπατική ίνωση θεωρείται αναστρέψιμη όταν βρίσκεται στα πρώιμα στάδια της. Συνεχής ίνωση στα πλαίσια χρόνιας ηπατικής νόσου οδηγεί συνήθως σε κίρρωση του ήπατος. Η μετάπτωση από το στάδιο της ίνωσης στο στάδιο της κίρρωσης απαιτεί αρκετούς μήνες έως χρόνια συνεχόμενης ηπατικής βλάβης με εξαίρεση στους ασθενείς με θρόμβωτική νόσο του ηπατικού φλεβικού συστήματος και στους ασθενείς με μηχανική απόφραξη των χοληφόρων στους οποίους για άγνωστους λόγους η ίνωση έχει ταχύτερη εξέλιξη. Οι ακριβείς μηχανισμοί αναστολής και αναστροφής της ίνωσης δεν είναι πλήρως κατανοητοί και ως εκ τούτου δεν υπάρχει κάποιο καλώς ορισμένο κλινικά ή παθολογοανατομικά σημείο πέραν του οποίου να θεωρείται η ίνωση μη αναστρέψιμη. Ωστόσο ολοένα αυξανόμενα κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα υποστηρίζουν ότι ακόμη και η κίρρωση μπορεί να είναι αναστρέψιμη στα πρώιμα στάδιά της^{6,7}.

1.1.2 Ηπατική κίρρωση

Η κίρρωση είναι το τελικό αποτέλεσμα πολλών χρονίων νοσημάτων του ήπατος που χαρακτηρίζονται από ανώμαλη αναγέννηση και χρόνια ινωτική εξεργασία. Αν η αιτία της δεν αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά οδηγεί σε ηπατική ανεπάρ-

κεια και θάνατο. Σε προχωρημένα στάδια η κίρρωση προκαλεί επιπλοκές σε όλα τα όργανα/συστήματα όπως ασκίτη, κισσούς οισοφάγου, μεταβολικές διαταραχές, νευρολογικές (πολυνευροπάθεια, ηπατική εγκεφαλοπάθεια), νεφρολογικές (ηπατονεφρικό σύνδρομο), πνευμονολογικές (ηπατοπνευμονικό σύνδρομο), καρδιολογικές (κίρρωτική καρδιομυοπάθεια) αιματολογικές και ανοσολογικές διαταραχές. Αποτελεί επίσης σημαντικό προδιαθεσικό παράγοντα για την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος^{8:9}. Οι παραπάνω επιπλοκές είναι αφενός αποτέλεσμα της απώλειας υγιούς παρεγχύματος με συνέπεια την ανεπαρκή βιοχημική, μεταβολική, ανοσολογική και ενδοκρινική λειτουργία του ήπατος, και αφετέρου αποτέλεσμα της αιμοδυναμικής ανισορροπίας που δημιουργεί η προκληθείσα από την κίρρωση πυλαία υπέρταση⁸.

Επιδημιολογία

Διαθέσιμα επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν ότι στην περίοδο 2000 - 2002 περίπου 0,1% του Ευρωπαϊκού πληθυσμού έπασχε από κίρρωση του ήπατος, γεγονός που αντιστοιχεί σε 14-26 νέα κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού και σε 170.000 θανάτους το χρόνο. Υπάρχουν παρόλα αυτά μεγάλες διακυμάνσεις εντός του πληθυσμού: περίπου το 0,1% των Ούγγρων ανδρών πέθαναν από κίρρωση, σε σύγκριση με το 0,001% των Ελληνίδων γυναικών¹⁰. Η θνησιμότητα της κίρρωσης στη Μ. Βρετανία και σε άλλες χώρες της δυτικής Ευρώπης αυξήθηκε τα τελευταία 30 χρόνια, ενώ μειώθηκε στις περισσότερες άλλες ευρωπαϊκές χώρες και κυρίως αυτές της νοτίου Ευρώπης¹¹.

Οι συνηθέστερες αιτίες κίρρωσης του ήπατος στον δυτικό κόσμο

1. Χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες (ηπατίτιδα Β και C)

2. Αλκοολική νόσος του ήπατος
3. Αιμοχρωμάτωση
4. Μη αλκοολική λιπώδης νόσος (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)

Άλλες αιτίες κίρρωσης

1. Αυτοάνοση ηπατίτιδα
2. Πρωτοπαθής και δευτεροπαθής χολική κίρρωση
3. Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα
4. Φαρμακευτική ηπατίτιδα (εξαιτίας φαρμάκων όπως μεθοτρεξάτη ή ισονιαζίδη)
5. Νόσος του Wilson
6. Έλλειψη α1-αντιτρυψίνης
7. Ιδιοπαθής πυλαία ίνωση
8. Κοκκιωματώδης νόσος του ήπατος
9. Πολυκυστική νόσος του ήπατος
10. Λοιμώξεις (πχ βρουκέλλωση, σύφιλη, εχινοκόκκωση, σχιστοσωμίαση)
11. Δεξιά καρδιακή ανεπάρκεια
12. Κληρονομική αιμορραγική τηλαγγειεκτασία
13. Φλέβο-θρομβωτική νόσος

Παθολογοανατομία και παθοφυσιολογία της κίρρωσης του ήπατος

Η ανατομία του ηπατικού λοβίου Η ανατομική μονάδα του ήπατος, το ηπατικό λοβίο αποτελείται από ηπατικά κύτταρα οργανωμένα σε μια εξαεδρική δομή στις κορυφές της οποίας βρίσκονται τα πυλαία διαστήματα και στο κέντρο της οποίας βρίσκεται ένας τελικός κλάδος της ηπατικής φλέβας, η κεντρική φλέβα. Στα πυλαία διαστήματα περιέχονται οι ηπατικές τριάδες, αποτελούμενες από έναν τελικό κλάδο της ηπατικής αρτηρίας, ένα τελικό κλάδο της πυλαίας φλέβας και ένα χοληφόρο αγγείο. Τα ηπατοκύτταρα είναι οργανωμένα σε δοκίδες που σχηματίζουν αναστομωτικά φύλλα ανάμεσα στα οποία διατρέχουν τα ηπατικά κολποειδή που περιέχουν αίμα που προσάγεται από την ηπατική αρτηρία και την πυλαία φλέβα και απάγεται από την κεντρική φλέβα του λοβίου.

Ο χώρος ανάμεσα στα ηπατοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα του κολποειδούς ονομάζεται χώρος του Disse και περιέχει πλάσμα, πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια, αστεροειδή κύτταρα (ή κύτταρα του Ito), διάσπαρτα μονοκύτταρα, καθώς και τις μικρολάχνες της κορυφαίας επιφάνειας των ηπατοκυττάρων. Ο χώρος αυτός έχει σπουδαίο ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του ηπατοκυττάρου καθώς διευκολύνει την ανταλλαγή πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων μεταξύ του κυττάρου και του κολποειδικού αίματος.

Τα ηπατικά κολποειδή είναι αγγεία αποτελούμενα από ασυνεχές, θυριδωτό ενδοθήλιο με ιδιαίτερα πυκνές και μεγάλης διαμέτρου θυρίδες, πράγμα που εξυπηρετεί την εύκολη διάχυση πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων από και προς τα ηπατοκύτταρα. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του κολποειδούς αποτελεί η έλλειψη οργανωμένης βασικής μεμβράνης.

Προσκολλημένα στην αυλική επιφάνεια του κολποειδούς βρίσκονται τα ηπατικά μακροφάγα (ή κύτταρα του Kupffer) καθώς και πλήθος άλλων κυττάρων του

ανοσοποιητικού συστήματος μεταξύ των οποίων μεγάλοι αριθμοί NK, NK-T και T λεμφοκυττάρων.

Η κυτταρική μεμβράνη γειτονικών ηπατοκυττάρων σχηματίζει αυλάκωση που δημιουργεί κατά μήκος μικροσκοπικό αγωγό, τον χοληφόρο σωληνίσκο, το εσωτερικό του οποίου απομονώνεται από τον εξωκυττάριο χώρο με σφικτούς συνδέσμους (tight junctions). Οι χοληφόροι σωληνίσκοι εκβάλλουν στα κανάλια του Hering που με τη σειρά τους εκβάλλουν στους πυλαίους χώρους ή χολλαγγειόλια. Αυτά με τη σειρά τους εκβάλλουν σε μεγαλύτερους χοληφόρους πόρους του πυλαίου διαστήματος.

Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της κίρρωσης Η κίρρωση χαρακτηρίζεται από 3 βασικά μορφολογικά γνωρίσματα:

- Παρουσία ινωδών "γεφυρών" δηλαδή ταινιών πυκνού συνδετικού ιστού που εκτείνονται μεταξύ των πυλαίων διαστημάτων ή μεταξύ των πυλαίων διαστημάτων και των τελικών ηπατικών φλεβών. Το πάχος τους μπορεί να κυμαίνεται από λεπτές δεσμίδες ως εκτεταμένες ουλές.
- Διαταραχή της αρχιτεκτονικής ολόκληρου του ήπατος. Υπάρχει δηλαδή διάχυτη βλάβη και ινωτική απάντηση. Παρουσία μεμονωμένων βλαβών με εστιακή ίνωση δεν χαρακτηρίζεται ως κίρρωση.
- Παρουσία αναγεννητικών εστιών που περιέχουν ηπατοκύτταρα περικυκλωμένα από συνδετικό ιστό. Αυτές παίρνουν τη μορφή όζων με διαμέτρους από <math><0,3\text{ εκ}</math> ως μερικά εκατοστά σε διάμετρο. Με βάση αυτό το χαρακτηριστικό, η κίρρωση μπορεί να χαρακτηριστεί ως μικροοζώδης ή μακροοζώδης¹².

Τα βασικά παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της κίρρωσης είναι ο θάνατος ηπατοκυττάρων, η εναπόθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και η νεοαγγειογένεση.

νεση¹³. Η εκτεταμένη ίνωση οδηγεί σε διαταραχή της αγγειακής αρχιτεκτονικής του ήπατος. Η διαταραχή αυτή αφορά αφενός τα ίδια τα κολποειδή, των οποίων το ενδοθήλιο χάνει την φυσιολογική του θυρίδωση και τριχοειδοποιείται¹⁴ και αφετέρου τη δημιουργία παράπλευρης αγγείωσης εντός του ινωτικού ιστού που συνδέει τα αγγεία των πυλαίων διαστημάτων απευθείας με τελικές ηπατικές φλέβες με αποτέλεσμα την παρέκκλιση της πυλαίας και αρτηριακής ηπατικής αιματικής ροής απευθείας προς την κεντρική φλέβα¹². Κύριο αποτέλεσμα όλων των παραπάνω είναι η ανεπαρκής επικοινωνία των ηπατοκυττάρων με το κολποειδικό αίμα καθώς και η ανάπτυξη πυλαίας υπέρτασης⁸.

1.2 Η θεμέλια ουσία στο φυσιολογικό και στο ινωτικό ήπαρ

Η θεμέλια ουσία αποτελεί την μικροαρχιτεκτονική βάση πάνω στην οποία οργανώνεται ο ηπατικός ιστός. Δεν πρόκειται απλά για ένα άμορφο πλέγμα από μακρομόρια αλλά ένα δίκτυο με πολύπλοκη τρισδιάστατη δομή και σαφή μικροσκοπική οργάνωση. Η αλληλεπίδραση των μορίων της θεμέλιας ουσίας με μόρια προσκόλλησης αλλά και υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης παρέχει στα κύτταρα σήματα που καθοδηγούν την πόλωση, την μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση¹⁵.

Τα βασικά συστατικά της θεμέλιας ουσίας μπορούν να χωριστούν στις παρακάτω κατηγορίες

1. Κολλαγονικές πρωτεΐνες
2. Μη κολλαγονικές γλυκοπρωτεΐνες

3. Πρωτεογλυκάνες
4. Γλυκοσαμινογλυκάνες
5. Ένζυμα και αναστολείς τους

Για τις τρεις πρώτες κατηγορίες ο παραδοσιακός διαχωρισμός είναι κάπως αυθαίρετος αφού η πρωτεϊνική βάση των μορίων αυτών είναι χμαιοική, προϊόν ανάμιξης εξονίων (exon shuffling) που δημιούργησε πρωτεΐνες ειδικά προσαρμοσμένες στις ανάγκες του εκάστοτε οργανισμού^{16;17}.

1.2.1 Κολλαγονικές πρωτεΐνες

Τα κολλαγόνα είναι μια οικογένεια ινωδών πρωτεϊνών που εκφράζονται σε μεγάλη ποσότητα στον συνδετικό ιστό στο δέρμα και τα οστά. Είναι οι πρωτεΐνες σε μεγαλύτερη αφθονία στα θηλαστικά και αποτελούν περίπου το 25% της συνολικής πρωτεϊνικής μάζας σ' αυτά¹⁸. Το υψηλό όριο θραύσης και η αντοχή στην πρωτεόλυση είναι κύρια χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών αυτών. Η οργάνωσή τους σε ινίδια και δίκτυα προσφέρει στήριξη και αρχιτεκτονική σταθερότητα στη θεμέλια ουσία.

Στην τυπική, ώριμη μορφή του, ένα μόριο κολλαγόνου αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες (α-αλυσίδες) οι οποίες περιστρέφονται η μια γύρω απ' την άλλη δημιουργώντας μια τριπλή υπερ-έλικα. Η δομή αυτή επιτυγχάνεται χάρη στην υψηλή περιεκτικότητα των α-αλυσίδων σε προλίνη και γλυκίνη. Η μεν πρώτη σταθεροποιεί την ελικοειδή διάταξη της κάθε α-αλυσίδας, η δε δεύτερη χάρη στο μικρό της μοριακό βάρος, επιτρέπει την σφικτή αλληλεπίδραση των 3 αλυσίδων¹⁹.

Ως σήμερα έχουν περιγραφεί 28 διαφορετικοί τύποι α-αλυσίδας, καθένας μεταγράφημα διαφορετικού γονιδίου (COL1 - COL28). Ωστόσο, από τους θεωρη-

τικά χιλιάδες πιθανούς συνδυασμούς μόνο 20 διαφορετικοί τύποι κολλαγόνου, έχουν περιγραφεί.

Παραδοσιακά, τα διάφορα είδη κολλαγόνου χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

1. κολλαγόνα σχηματίζοντα ινίδια
2. κολλαγόνα μη σχηματίζοντα ινίδια

Η πρώτη υποκατηγορία είναι αρκετά ομογενής και κάθε μέλος της αποτελείται συνήθως από ένα κολλαγονικό μεταγράφημα (COL). Κύριοι αντιπρόσωποι είναι τα κολλαγόνα τύπου I, II, III, V και XI. Τα μόρια αυτά εκκρίνονται από το κύτταρο με τη μορφή προκολλαγόνου. Με τη δράση της πεπτιδάσης του προκολλαγόνου παράγεται η ενδιάμεση μορφή του τροποκολλαγόνου. Τα μόρια του τροποκολλαγόνου έχουν την τάση να αυτοοργανώνονται σε ινίδια²⁰. Με τη δράση της οξειδάσης λυσύλης (lysyl oxidase) τα μόρια του τροποκολλαγόνου σχηματίζουν μεταξύ τους ομοιοπολικές εγκάρσιες συνδέσεις, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση των ινιδίων στην τελική μορφή ινιδίων κολλαγόνου με διάμετρο 10-300nm και μήκος αρκετών εκατοντάδων μικρομέτρων. Τα ινίδια αυτά ενίοτε συσπειρώνονται σε μεγαλύτερες ίνες με διάμετρο αρκετών μικρομέτρων, ορατές στο οπτικό μικροσκόπιο, τις ίνες κολλαγόνου.

Η δεύτερη υποκατηγορία είναι ετερογενής, κάθε μέλος αποτελούμενο από κολλαγονικές (COL) και μη κολλαγονικές (NC) δομικές περιοχές. Τα μέλη αυτής της υποκατηγορίας δεν σχηματίζουν ινίδια με την τυπική μορφή που περιγράφηκε στην προηγούμενη υποκατηγορία. Περαιτέρω, η οικογένεια αυτή διαχωρίζεται σε:

1. κολλαγόνα που σχηματίζουν δίκτυα (IV, VIII, X)
2. κολλαγόνα που σχηματίζουν μικροινίδια με αναδιπλώσεις (beaded microfilaments) (VI)

3. κολλαγόνα που σχηματίζουν ινίδια αγκύρωσης (anchoring fibrils) (VII)
4. κολλαγόνα με διακοπτόμενη τριπλή έλικα, συσχετιζόμενα με ινίδια (fibril-associated collagens with interrupted triple helix, FACITs) (IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX)
5. διαμεμβρανικά κολλαγόνα (XVII)
6. πολυπλεξίνες (multiplexins) (XIII, XV, XVIII)

Από τους 20 διαφορετικούς τύπους κολλαγόνου, στο φυσιολογικό ήπαρ εκφράζονται οι 10 (I, III, V, IV, VI, VIII, XIV, XIX, XV, XVIII)²¹. Υπεύθυνα ως επι το πλείστον για την παραγωγή τους είναι τα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος και σε μικρότερο βαθμό άλλα κύτταρα όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολλοειδών και των πυλαίων φλεβιδίων (κυρίως κολλαγόνο τύπου III, IV, VI), επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων (κολλαγόνο τύπου IV και XVIII) και τα ηπατοκύτταρα (κολλαγόνο τύπου XVIII)¹⁵.

1.2.2 Μη κολλαγονικές γλυκοπρωτεΐνες

Η κατηγορία αυτή αποτελεί μια ετερογενή ομάδα πρωτεϊνών, κάθε μέλος της οποίας αποτελείται τυπικά από πολλαπλές δομικές περιοχές και διαθέτει ειδικές περιοχές πρόσδεσης για άλλα μακρομόρια της θεμέλιας ουσίας ή κυτταρικούς υποδοχείς. Οι πρωτεΐνες αυτές βοηθούν στην οργάνωση και σταθεροποίηση της θεμέλιας ουσίας καθώς και στην αλληλεπίδραση των κυττάρων με αυτήν.

Μερικές από τις πιο καλά μελετημένες πρωτεΐνες αυτής της κατηγορίας είναι η ελαστίνη, η ινωδονεκτίνη, η τενασίνη, οι λαμινίνες, το νιδογόνο (ή εντακτίνη), οι θρομβοσπονδίνες 1 και 2, η βιτρονεκτίνη και η οστεονεκτίνη.

Η ελαστίνη είναι το κύριο συστατικό των ελαστικών ινών της θεμέλιας ουσίας, ενός δικτύου ινών με ιδιαίτερα υψηλή ελαστικότητα που προσδίδει στη θεμέλια ουσία πλαστικότητα και αντοχή στο μηχανικό στρες. Η ελαστίνη αποτελεί τον πυρήνα της ελαστικής ίνας, γύρω από τον οποίο προσδένεται ένας αριθμός άλλων γλυκοπρωτεϊνών στις οποίες ανήκει η φμπριλλίνη, ρόλος της οποίας είναι η σταθεροποίηση της ελαστικής ίνας²¹.

Η ινωδονεκτίνη είναι ένα διμερές αποτελούμενο από δύο σχεδόν πανομοιότυπες υπομονάδες. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από επαναλήψεις τριών ξεχωριστών μονάδων (modules), I, II και III. Αυτές οι μονάδες αποτελούν λειτουργικά χωριστές δομικές περιοχές οι οποίες διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις με άλλα μακρομόρια της θεμέλιας ουσίας, κυτταρικούς υποδοχείς, καθώς και με άλλα μόρια ινωδονεκτίνης²². Η ινωδονεκτίνη κωδικοποιείται από ένα γονίδιο, το μεταγράφημα του οποίου μπορεί να ματιστεί σε 3 διαφορετικές θέσεις με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία των δύο βασικών μορφών ινωδονεκτίνης: τη διαλυτή μορφή, που παράγεται από τα ηπατοκύτταρα και εκκρίνεται στο πλάσμα, και την κυτταρική μορφή που παράγεται από ινοβλάστες ως συστατικό της θεμέλιας ουσίας.

Η ινωδονεκτίνη έχει πλήθος λειτουργιών. Εμπλέκεται στην κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση, στη διαφοροποίηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην διαδικασία επούλωσης των ιστών μετά από βλάβη²³.

Οι τενασίνες είναι μεγάλες ολιγομερείς γλυκοπρωτεΐνες με ατελώς κατανοητές λειτουργίες. Το πιο καλά μελετημένο μέλος, η τενασίνη-C έχει βρεθεί ότι διαθέτει μεγάλο αριθμό θέσεων πρόσδεσης διαφόρων κυτταρικών υποδοχέων καθώς και συστατικών θεμέλιας ουσίας. Μπορεί να ανταγωνίζεται την πρόσδεση των κυττάρων στην ινωδονεκτίνη και αναστέλλει την κινάση εστιακής προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinase, FAK) και κατά συνέπεια τα σηματοδοτικά μονοπάτια που με-

σολαβούνται από το Rho και που ενεργοποιούνται από την ινωδονεκτίνη²⁴.

Οι λαμινίνες και το νιδογόνο αποτελούν μαζί με το κολλαγόνο τύπου IV τα κύρια συστατικά της βασικής μεμβράνης^{25;26}. Ευοδώνουν την προσκόλληση, την μετανάστευση και την επιβίωση των κυττάρων. Βοηθούν στον καθορισμό της πολικότητας του κυττάρου και στην οργάνωση των πρωτεϊνών της προσκολλημένης κυτταρικής μεμβράνης, επηρεάζουν τον κυτταρικό μεταβολισμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση του προσκολλημένου κυττάρου.

Η ινωδονεκτίνη και η λαμινίνη παράγεται κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών καθώς και τα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων. Η παραγωγή συγκεκριμένου τύπου ινωδονεκτίνης υπό το ερέθισμα του TGF-β από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών είναι ένα από τα πιο πρώιμα ερεθίσματα που οδηγεί σε ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων του ήπατος όπως θα δούμε παρακάτω.

1.2.3 Γλυκοζαμινογλυκάνες και Πρωτεογλυκάνες

Οι γλυκοζαμινογλυκάνες είναι μη διακλαδιζόμενοι πολυσακχαρίτες αποτελούμενοι από δισακχαριδικές επαναλήψεις. Το ένα εκ των δύο σακχάρων είναι αμινοσάκχαρο (N-ακετυλογλυκοσαμίνη ή N-ακετυλογαλακτοσαμίνη) και το άλλο ουρονικό οξύ (γλυκουρονικό ή ίδουρονικό). Σε πολλές από τις σακχαριδικές υπομονάδες υπάρχουν θειϊκές ή καρβοξυλικές ομάδες, γεγονός που καθιστά τα μόρια αυτά έντονα αρνητικά φορτισμένα. Η ιδιαίτερα υδρόφιλη φύση τους και το γεγονός ότι το αρνητικό φορτίο τους εξουδετερώνεται από ένα μεγάλο αριθμό οσμωτικά ενεργών ιόντων νατρίου προκαλεί μεγάλη ποσότητα νερού να προσροφάται από τη θεμέλια ουσία, προκαλώντας αυξημένη πίεση σπαργής και αντοχή στο μηχανικό στρες.

Οι γλυκοζαμινογλυκάνες μπορούν να συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς με πρωτεϊνικά μόρια, δημιουργώντας έτσι τις πρωτεογλυκάνες. Οι πρωτεογλυκάνες ρυθμίζουν την κατασκευή της θεμέλιας ουσίας και παίζουν σημαντικό ρόλο στην διάταξη και οργάνωση των υπόλοιπων μακρομορίων της. Μπορούν να συνδέουν διάφορα είδη κολλαγόνου αλληλεπιδρώντας με ειδικές θέσεις σύνδεσης γλυκοσαμινογλυκανών σ' αυτά.

Οι πρωτεογλυκάνες παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην χημική σηματοδότηση μεταξύ κυττάρων. Μπορούν να δεσμεύουν εκκρινόμενα μόρια όπως πεπτιδικούς αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες και να διευκολύνουν ή αναστέλλουν την σηματοδοτική τους λειτουργία. Δύο παραδείγματα αποτελούν ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (fibroblast growth factor, FGF) και ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β (transforming growth factor beta, TGF-β). Ο μεν πρώτος δεσμεύεται από πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαράνης και αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί στον ολιγομερισμό του FGF διευκολύνοντας την πρόσδεσή του και ενεργοποίηση του κυτταρικού του υποδοχέα²⁷. Η δε πρόσδεση του TGF-β σε πρωτεογλυκάνες όπως η ντεκορίνη (decorin) οδηγεί στην αναστολή της δράσης του²⁸. Οι πρωτεογλυκάνες προσδέουν και ρυθμίζουν τη δράση κι άλλων τύπων πρωτεϊνών όπως ένζυμα και αναστολείς ενζύμων. Ορισμένοι τύποι πρωτεογλυκανών επίσης δεν εκκρίνονται αλλά ενσωματώνονται στην κυτταρική μεμβράνη λειτουργώντας ως συν-υποδοχείς, διευκολύνοντας τόσο τη σύνδεση με εξωκυττάρια σηματοδοτικές πρωτεΐνες όσο και με την εξωκυττάρια ουσία²⁸.

1.2.4 Ένζυμα και αναστολείς τους

Από το πλήθος των ενζύμων που βρίσκονται είτε ως συστατικό της θεμέλιας ουσίας είτε εκφράζονται κατόπιν ιστικής βλάβης ειδική μνεία αξίζει να γίνει για

τρεις κατηγορίες:

α) Τρανσγλουταμινάση-2 (transglutaminase-2, TG-2) β) Οξειδάση λυσύλης (lysyl oxidase, LOX) γ) Μεταλλοπρωτεάσες θεμέλιας ουσίας (matrix metalloproteases, MMPs) και τους αναστολείς αυτών (tissue inhibitors of MMPs, TIMPs)

Τρανσγλουταμινάση-2 Η τρανσγλουταμινάσες είναι οικογένεια ενζύμων με παρουσία σε όλους τους ιστούς. Καταλύουν την μετα-μεταφραστική τροποποίηση πρωτεϊνών με τη δημιουργία ισοπεπτιδικών δεσμών, δράση για την οποία απαιτείται ασβέστιο. Οι ισοπεπτιδικοί δεσμοί επιτυγχάνονται είτε με εγκάρσιες συνδέσεις μέσω δεσμών ε-(γ-γλουταμυλ)λυσίνης είτε μέσω της ενσωμάτωσης πρωτογενών αμινών σε συγκεκριμένα υπολείμματα λυσίνης πάνω στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Τα προϊόντα αυτής της τροποποίησης έχουν συνήθως υψηλό μοριακό βάρος και χαρακτηρίζονται από υψηλή αντοχή στο μηχανικό στρες και στην πρωτεόλυση.

Αντίθετα με τα άλλα μέλη της οικογένειας, η τρανσγλουταμινάση-2 ή ιστική τρανσγλουταμινάση (TG-2) λειτουργεί ως μεμβρανική G πρωτεΐνη παίζοντας ρόλο στην διαμεμβρανική σηματοδότηση καθώς επίσης και ως διαμεσολαβητής στην κυτταρική προσκόλληση. Όταν εκκρίνεται από το κύτταρο καταλύει τη δημιουργία εγκάρσιων συνδέσεων μεταξύ πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας και διαμεσολαβεί στην αλληλεπίδραση της ινωδονεκτίνης με τις ιντεγκρίνες^{29;30}.

Η TG-2 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα λεία μυϊκά κύτταρα ενώ σε άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς η έκφρασή της επάγεται από ειδικά ερεθίσματα όπως το ρετινοϊκό οξύ, ο TGF-β και ο NF-kB. Όλα τα ερεθίσματα σχετίζονται με την επαγωγή κυτταρικών αμυντικών μηχανισμών και την κυτταρική ωρίμανση.

Το ένζυμο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγέννηση κατεστραμμένων

ιστών, αλλά συμμετέχει σε πλήθος άλλων λειτουργιών πολλές από τις οποίες δεν είναι ακόμη εντελώς κατανοητές. Ποντίκια knockout (-/-) για το γονίδιο της TG-2 εμφανίζουν παθολογική ιστική αναγέννηση μετά από βλάβη, αυτοανοσία και σακχαρώδη διαβήτη^{29;30}.

Μελέτη της έκφρασης τρανσγλουταμινάσης-2 από ανενεργά και ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος έδειξε επαγωγή αυτού του ενζύμου στην ενεργή μορφή με την μεγαλύτερη ποσότητα του ενζύμου να βρίσκεται στη μεμβρανική του μορφή³¹.

Οξειδάση λυσύλης Η οξειδάση λυσύλης (LOX) μετατρέπει τα υπολείμματα λυσίνης πάνω στην πολυπεπτιδική αλυσίδα σε α-αμινοαδιπιδική-δ-ημιαλδεύδη. Οι αλδεύδες αυτές αντιδρούν αυτόματα με αντίστοιχες παραγόμενες από τη δράση της LOX ή με αυτούσια υπολείμματα λυσίνης δημιουργώντας ομοιοπολικές εγκάρσιες συνδέσεις με αυτά. Η δράση αυτή της LOX είναι εξαρτώμενη από χαλκό καθώς και ένα συνένζυμο, την λυσυλ-τυροσυλκινόνη (LTQ). Κύρια υποστρώματα της LOX είναι το κολλαγόνο και η ελαστίνη και η δράση της οδηγεί στο σχηματισμό σταθερών ινιδίων, απαραίτητων για τη δημιουργία της θεμέλιας ουσίας³².

Η δράση της LOX είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση της θεμέλιας ουσίας και κατ' επέκταση για την αναγέννηση των ιστών μετά από βλάβη. Η υπερέκφραση LOX σε πολλούς κακοήθεις όγκους όπως του παχέος εντέρου³³, του πνεύμονα³⁴ και του μαστού³⁵ είναι απαραίτητη για τη δημιουργία μεταστάσεων. Παραδόξως η έκφρασή της έχει συνδεθεί τόσο με ανάπτυξη του όγκου όσο και με καταστολή του³⁶.

Η LOX υπερέκφράζεται από τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα στο ινωτικό ήπαρ και η υπερέκφραση αυτή ξεκινάει νωρίς στη διαδικασία της ενεργοποίησης³⁷

Μεταλλοπρωτεάσες θεμέλιας ουσίας Παρόλο που διάφορα ένζυμα παίζουν ρόλο στην αποδόμηση των συστατικών της θεμέλιας ουσίας, οι μεταλλοπρωτεάσες θεμέλιας ουσίας (MMPs) είναι οι κύριοι υπεύθυνοι για τη λειτουργία αυτή. Τα ένζυμα αυτά παίζουν κεντρικό ρόλο σε πολλές βιολογικές λειτουργίες όπως στην εμβρυογένεση, στην αναγέννηση και αναδιαμόρφωση (remodelling) των ιστών και στην αγγειογένεση. Η δράση τους είναι στενά ελεγχόμενη σε επίπεδο μεταγραφής, ενεργοποίησης και αλληλεπίδρασης με άλλα συστατικά της θεμέλιας ουσίας καθώς και αναστολής από ειδικούς αναστολείς (TIMPs)³⁸.

Το πρώτο συνθετικό του ονόματος τους αναφέρεται στο γεγονός ότι τα ένζυμα αυτά εξαρτώνται από τον ψευδάργυρο για να ασκήσουν τη δράση τους. Η ακριβής τρισδιάστατη δομή έχει προσδιοριστεί για μερικά μόνο μέλη της οικογένειας με κρυσταλλογραφία ακτίνων X και μελέτες μαγνητικού συντονισμού (NMR). Οι πιο καλά περιγεγραμμένες είναι οι MMP-2, MMP-3 και MMP-9.

Τα ένζυμα αυτά αποτελούνται από τρεις ξεχωριστές α-έλικες με συνδετικούς βρόχους μεταξύ τους. Ο πρώτος βρόχος μεταξύ της έλικας 1 και 2 είναι μια ευαίσθητη σε πρωτεάσες περιοχή ονομαζόμενη και “περιοχή δολώματος”. Ένα εκτεταμένο πεπτιδικό τμήμα μετά την έλικα 3 αναδιπλώνεται μέσα στην ενεργή περιοχή του ενζύμου, όπου ένα υπόλειμμα κυστεΐνης συνδέεται με το άτομο ψευδάργυρου του ενεργού κέντρου καθιστώντας το προένζυμο ανενεργό. Με την πρωτεόλυση της περιοχής δολώματος, η κυστεΐνη αποσυνδέεται απελευθερώνοντας το ενεργό κέντρο και την περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος, καθιστώντας το ένζυμο ενεργό.

Οι MMPs διαχωρίζονται σε 6 κατηγορίες. Παρακάτω αναφέρονται οι κατηγορίες αυτές και οι σημαντικότεροι αντιπρόσωποι κάθε κατηγορίας.

1. Κολλαγενάσες (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18). Υδρολύουν κολλα-

γόνο τύπου I, II και III, αποδομούν και άλλα συστατικά της θεμέλιας ουσίας καθώς επίσης και πρωτεΐνες που δεν ανήκουν στη θεμέλια ουσία.

2. Γελατινάσες (MMP-2, MMP-9). Υδρολύουν μετουσιωμένα μόρια κολλαγόνου. Η MMP-2 αποδομεί μόρια κολλαγόνου τύπου I, II, III και IV. Η MMP-9 αποδομεί μόρια κολλαγόνου τύπου IV και V καθώς και άλλα μόρια της θεμέλιας ουσίας.
3. Στρομελυσίνες (MMP-3, MMP-10). Αποδομούν διάφορα μόρια της θεμέλιας ουσίας. Η MMP-3 ενεργοποιεί επίσης ένα πλήθος proMMPs, μεταξύ των οποίων η MMP-1 δράση πολύ σημαντική για τη δημιουργία πλήρως ενεργού MMP-1.
4. Ματριλυσίνες (MMP-7, MMP-26). Εκτός από τη δράση τους σε διάφορα μόρια της θεμέλιας ουσίας, τροποποιούν πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας (MMP-7) όπως η pro- α -defensin, pro-TNF- α , Fas-ligand, και E-cadherin.
5. Μεμβρανικού τύπου MMPs (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24, MMP-17, MMP-25). Οι πρώτες 4 είναι διαμεμβρανικές, οι δύο τελευταίες είναι συζευγμένες με γλυκοσυλφοφατιδυλοϊνοσιτόλη (GPI). Εκτός της αποδομητικής τους δράσης σε διάφορα μόρια θεμέλιας ουσίας, επιπλέον ενεργοποιούν την proMMP-2.
6. Άλλες MMPs (MMP-12, MMP-19, MMP-20). Δεν μπορούν να ενταχθούν στις παραπάνω κατηγορίες. Η MMP-12 εκφράζεται κυρίως στα μακροφάγα και είναι απαραίτητη για την μετανάστευσή τους. Αποδομεί την ελαστίνη και άλλες πρωτεΐνες. Η MMP-19 είναι αυτοαντιγόνο προερχόμενο από T-κύτταρα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Η MMP-20 παίζει ρόλο στο σχηματισμό οδοντικού σμάλτου.

Οι περισσότερες MMPs εκκρίνονται σε ανενεργή μορφή από το κύτταρο και ενεργοποιούνται εξωκυττάρια. Εξάίρεση αποτελεί η MMP-11 που ενεργοποιείται ενδοκυττάρια³⁹. In vivo οι MMPs ενεργοποιούνται από διάφορες πρωτεάσες. Η πλασμίνη πχ ενεργοποιεί τις proMMP-1, proMMP-3, proMMP-7, proMMP-9, proMMP-10 και proMMP-13⁴⁰. Η ενεργοποίηση από πρωτεόλυση συχνά συμβαίνει σε πολλά στάδια, εξασφαλίζοντας έτσι την ύπαρξη πολλαπλών σημείων ελέγχου και λεπτότερη ρύθμιση της διαδικασίας, δίνοντας έτσι την ευκαιρία στις TIMPs να ασκήσουν την ανασταλτική δράση τους προτού ο στόχος φτάσει στην πλήρως ενεργοποιημένη του μορφή^{41;42}.

Παρότι κύρια λειτουργία των MMPs είναι η αποδόμηση των συστατικών της θεμέλιας ουσίας, ο πραγματικός τους ρόλος είναι πολύ πιο πολύπλοκος από απλά καταβολικός. Η θεμέλια ουσία όπως είδαμε παραπάνω αποτελεί θέση αποθήκευσης και απόκρυψης πολλών αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών και άλλων μορίων με σηματοδοτική λειτουργία. Η απελευθέρωσή τους κατά την αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας του ιστού έχει σημαντικές επιδράσεις στη φυσιολογία, την επιβίωση και το φαινότυπο των κυττάρων που διαμένουν σ' αυτόν. Πολλά από τα ενδιάμεσα προϊόντα της αποδόμησης συστατικών της θεμέλιας ουσίας έχουν επίσης σηματοδοτική λειτουργία^{43;44}.

Αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών θεμέλιας ουσίας Οι αναστολείς των MMPs ή TIMPs είναι ευκαρυωτικά ένζυμα με αρχαία φυλογενετική ιστορία και πολύπλοκη εξέλιξη. Στους ανθρώπους και τα υπόλοιπα σπονδυλωτά έχουν περιγραφεί 4 είδη TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4). Είναι εκκρινόμενες πρωτεΐνες αλλά μπορούν να βρεθούν και προσδεδεμένες σε μόρια της κυτταρικής μεμβράνης (TIMP-2, -3, -4). Έχουν μοριακό βάρος περί τα 21kDa. Διαθέτουν 6 δι-σουλφιδικούς δεσμούς και αποτελούνται από ένα τμήμα τριών βρόχων στο N-

άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσού και ένα τμήμα τριών βρόχων στο C-άκρο. Οι περισσότερες λειτουργίες τους ευοδώνονται από τις αλληλουχίες του N-άκρου, ενώ το C-άκρο αλληλεπιδρά με τις καταλυτιές περιοχές ορισμένων MMPs.

Οι TIMPs προσδένονται με υψηλή συγγένεια αλλά χαμηλή ειδικότητα MMPs με 1:1 στοιχειομετρία. Η πρόσδεση έχει ως αποτέλεσμα την απόκρυψη και απενεργοποίηση του ενεργού κέντρου και κατά συνέπεια την αναστολή της δράσης των MMPs⁴⁵. Αν και οι διάφοροι TIMPs μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις περισσότερες MMPs διαφορετικές ανασταλτικές ιδιότητες ανάμεσα στα 4 μέλη έχουν περιγραφεί. Για παράδειγμα οι TIMP-2 και TIMP-3 αλλά όχι ο TIMP-1 αναστέλλουν τις μεμβρανικές MMPs, ενώ ο TIMP-3 αλλά κανείς από τους υπόλοιπους είναι αποτελεσματικός αναστολέας του μετατρεπτικού ενζύμου του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TACE)⁴⁶, μεταλλοπρωτεάση που δεν ανήκει στην οικογένεια των MMPs.

Οι TIMPs έχουν επιδράσεις στην κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση που δεν μπορούν να εξηγηθούν μονάχα από τη δράση τους ως αναστολείς των MMPs. Οι TIMP-1 και TIMP-2 για παράδειγμα επάγουν την ανάπτυξη της ερυθροειδούς σειράς^{47;48} και λειτουργούν ως αυξητικοί παράγοντες για ένα πλήθος διαφορετικών κυττάρων⁴⁹. Οι TIMP-1, TIMP-2, και TIMP-3 όταν υπερεκφράζονται καταστέλλουν την ανάπτυξη όγκων⁵⁰. Ο TIMP-3 έχει προαποπτωτική δράση για ορισμένα καρκινικά κύτταρα^{51;52}.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι ο λόγος της έκφρασης MMPs/TIMPs μπορεί να προάγει ή να αναστείλει την ηπατική ίνωση. Μελέτες με διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεξέφραζαν TIMP-1 για παράδειγμα έδειξε ότι παρόλο που η υπερέκφραση TIMP-1 δεν προκαλούσε από μόνη της ηπατική ίνωση, τα πειραματόζωα αυτά ήταν ιδιαίτερα ευαίσθητα στην ανάπτυξη ηπατικής ίνωσης κατόπιν χρό-

νιας έκθεσης στην τοξική δράση τετραχλωράνθρακα, σε σχέση με πειραματόζωα-μάρτυρες που υπέστησαν την ίδια βλάβη αλλά δεν υπερεξέφραζαν TIMP-1⁵³. Επίσης, το προφίλ της έκφρασης διαφόρων MMPs/TIMP s σε διάφορα μοντέλα ηπατικής βλάβης διαφέρει ανάλογα με την αιτιολογία της βλάβης και την ακριβή φάση της ιστικής απάντησης⁵⁴.

Υπεύθυνα για την έκκριση των MMPs και TIMPs είναι ως επί το πλείστον τα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος. Σε φυσιολογική κατάσταση, τα ανενεργά κύτταρα είναι υπεύθυνα για την ανανέωση (turnover) της θεμέλιας ουσίας, πράγμα που επιτυγχάνεται με πολύ στενά ελεγχόμενη παραγωγή των παραπάνω μορίων. Στην πλήρως ενεργοποιημένη, μυοϊνοβλαστική τους μορφή ελαττώνουν την παραγωγή MMPs και αυξάνουν την παραγωγή TIMPs, κυρίως TIMP-1 και TIMP-2¹⁵. Διατηρούν όμως την ικανότητα να υπερεκφράζουν MMPs υπό τα κατάλληλα ερεθίσματα και να προάγουν έτσι τη διάλυση του ινωτικού υποστρώματος. Η τελευταία ιδιότητά τους αποτελεί και έναν από τους θεραπευτικούς στόχους κατά της ηπατικής ίνωσης που τα κύτταρα αυτά προσφέρουν.

1.3 Η κυτταρική και μοριακή βάση της ηπατικής ίνωσης

1.3.1 Σύσταση της θεμέλιας ουσίας στο ινωτικό ήπαρ

Η ηπατική ίνωση επηρεάζει τόσο τη σύσταση όσο και την ποσότητα της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Στο φυσιολογικό ήπαρ η θεμέλια ουσία αντιστοιχεί στο 0,5% της υγρής μάζας και εμφανίζεται κυρίως στα πυλαία διαστήματα, γύρω από τις κεντρικές φλέβες, στο χώρο του Disse και στην περιβάλλουσα κάψα του Glisson. Η σύσταση της εξωκυττάριας ουσίας στο χώρο του Disse μοιάζει με αυτή

της βασικής μεμβράνης, σε αραιή διάταξη, αποτελούμενη κυρίως από κολλαγόνο τύπου IV και VI, λαμινίνη και πρωτεογλυκάνες όπως θειϊκή ηπαράνη. Αυτή η δομή διαταράσσεται κατόπιν ηπατικής βλάβης και παρατηρείται αντικατάσταση της από ινώδη κολλαγόνα κυρίως τύπου I και III και ινωδονεκτίνη⁵⁵.

Όπως αναφέραμε παραπάνω, η θεμέλια ουσία ενσωματώνει εκτός από δομικά μόρια και ένα πλήθος άλλων παραγόντων όπως κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες. Αναφέραμε ήδη το παράδειγμα της ντεκορίνης που δεσμεύει TGF-β. Άλλα παραδείγματα είναι η δέσμευση αυξητικού παράγοντα αιμοπεταλίων (PDGF), αυξητικού παράγοντα ηπατοκυττάρων (HGF) και ιντερλευκίνης-2 (IL-2) από το κολλαγόνο και η δέσμευση TNF-α από την ινωδονεκτίνη και την λαμινίνη. Η παρουσία των παραγόντων αυτών ευνοεί την επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και λειτουργεί αντιαποπτωτικά για κύτταρα όπως οι μυοϊνοβλάστες¹.

Η θεμέλια ουσία και τα κύτταρα του ηπατικού παρεγχύματος βρίσκονται σε συνεχή αλληλεπίδραση. Μετά από ηπατική βλάβη, η θεμέλια ουσία μπορεί να προάγει την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των αστεροειδών κυττάρων, την αγγειογένεση, τη διαφοροποίηση και τη μετανάστευση. Οι αλληλεπιδράσεις θεμέλιας ουσίας - κυττάρων επιτυγχάνονται μέσω μορίων προσκόλλησης όπως ιντεγκρίνες, μορίων ADAM (μεταλλοπρωτεάσες) και υποδοχέα τομέα δισκοϊδίνης-2 (discoidin domain receptor-2, DDR-2).

Οι κυτταρικές πηγές θεμέλιας ουσίας στην ηπατική ίνωση Η κυριότερη πηγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας είναι τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. Ένας ετερογενής πληθυσμός κυττάρων συμβάλλει κατά ένα μικρότερο μέρος στην ινωτική εξεργασία. Τα κύτταρα αυτά είναι κυρίως ινοβλάστες που διαμένουν στα πυλαία διαστήματα⁵⁶⁻⁻⁵⁸, ινοβλάστες προερχόμενοι από επιθηλιακή-μεσεγχυματική

μετάβαση ηπατοκυττάρων⁵⁹ και εξωγενή κύτταρα όπως κυκλοφορούντα ινοκύτταρα⁶⁰ και ινοβλάστες με προέλευση το μυελό των οστών⁶¹.

1.3.2 Τα αστεροειδή κύτταρα στην ηπατική ίνωση

Τα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος είναι πειρκύτταρα που βρίσκονται σε φυσιολογικές συνθήκες στο χώρο του Disse έχοντας στην ανενεργή τους μορφή χαρακτηριστικά πλούσιο σε λιπίδια κυτταρόπλασμα στα οποία αποθηκεύουν εστέρες ρετινόλης. Κύριος φυσιολογικός τους ρόλος είναι η αναγέννηση της θεμέλιας ουσίας αλλά εμπλέκονται σε πολλούς άλλους μηχανισμούς τόσο στη φυσιολογική λειτουργία του ηπατικού ιστού όσο και στη χρόνια ηπατική βλάβη. Αποτελούν σημαντικούς τροποποιητές της ανοσολογικής απάντησης του ήπατος^{1;62} με το να παράγουν πλήθος κυτταροκινών και χημειοκινών αυξάνοντας τη φλεγμονώδη απάντηση στον προσβεβλημένο ηπατικό ιστό και επιστρατεύοντας φλεγμονώδη κύτταρα στη βλάβη. Ανάμεσα στις χημειοκίνες που παράγονται από τα κύτταρα αυτά είναι οι MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, RANTES και IP-1, οι οποίες επιστρατεύουν μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα^{63;64}. Εκφράζουν τα ίδια υποδοχείς χημειοκινών όπως CCR5 και λειτουργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα για T λεμφοκύτταρα⁶⁵. Ανενεργά αστεροειδή κύτταρα εκφράζουν Toll-like υποδοχέα TLR-4 που διεγείρονται από μικροβιακά παράγωγα όπως ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) των Gram αρνητικών βακτηρίων, λειτουργώντας ως κύτταρα-φρουροί για την ανοσολογική απάντηση σε λοιμώξεις. Επιπλέον, αντιδρούν μέσω του TLR-9 σε μετουσιωμένα μόρια DNA που προέρχονται από ηπατοκύτταρα σε απόπτωση και η σηματοδότηση μέσω του ενεργοποιημένου TLR-9 οδηγεί σε διαφοροποίηση σε μυοϊνοβλαστικό φαινότυπο^{66;67}. Υπό την επίδραση κυτταροκινών όπως ο TNF-α τα αστεροειδή κύτταρα αυξάνουν την έκφραση TLR-2 συμμετέχοντας

στην ρύθμιση της φλεγμονώδους αντίδρασης κατόπιν ηπατικής βλάβης⁶⁸.

Η ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων ως κεντρικό γεγονός στην ηπατική ίνωση

Από τα πιο πρώιμα γεγονότα στην ινωτική εξεργασία είναι η ενεργοποίηση των ανενεργών αστεροειδών κυττάρων και η διαφοροποίησή τους σε μυοϊνοβλάστες, φαινότυπο που εμφανίζει έντονη αναπαραγωγικότητα και μεταναστευτικότητα, παράγει ένα πλήθος κυτταροκινών και κυρίως, παράγει και εναποθέτει τα συστατικά της θεμέλιας ουσίας που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του ινώδους ιστού. Η διαδικασία της ενεργοποίησης προάγεται από ερεθίσματα κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα του Kupffer, τα ηπατοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα των κολποειδών. Χαρακτηρίζεται από απώλεια των κυτταροπλασματικών σταγονιδίων λίπους και αλλαγή στην έκφραση κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών με απώλεια των μορίων GFAP (glial fibrillary acidic protein) και έκφραση αSMA (alpha-smooth muscle actin) και έκφραση πλήθους κυτταροκινών χημειοκινών.

Τα προϊνωτικά χαρακτηριστικά των ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων συνοψίζονται στα παρακάτω:

- Αυξημένη συσταλτικότητα, αναπαραγωγικότητα και μεταναστευτικότητα
- Αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου και άλλων συστατικών θεμέλιας ουσίας
- Αυξημένη παραγωγή TIMPs
- Ελαττωμένη παραγωγή MMPs
- Αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών

Ο ρόλος των κυττάρων Kupffer, των ενδοθηλιακών κυττάρων του κολλοειδούς και των ηπατοκυττάρων στην ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων

Τα κύτταρα Kupffer Ταυτόχρονα με την ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων παρατηρείται διείσδυση και ενεργοποίηση κυττάρων Kupffer. Τα κύτταρα αυτά παρέχουν σημαντικά ερεθίσματα που προάγουν την ενεργοποίηση και τη διατήρηση του μυοϊνοβλαστικού φαινοτύπου των αστεροειδών κυττάρων όπως TGF-β^{69,70}, TNF-α, MMP-9⁷¹ και ενεργές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS). Ταυτόχρονα παράγουν νιτρικό οξείδιο (NO) που αντισταθμίζει τις δρασίες των ROS στα αστεροειδή κύτταρα, ασκώντας ανασταλτική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη συστατικότητα.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολλοειδών Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολλοειδών (liver sinusoidal endothelial cells, LSEC) βρίσκονται σε στενή ανατομική και λειτουργική σχέση με τα αστεροειδή κύτταρα. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι ο ένας τύπος κυττάρου διατηρεί το φαινότυπο του άλλου σε φυσιολογικές συνθήκες. Η παραγωγή VEGF από τα αστεροειδή κύτταρα και εν μέρει από τα ηπατοκύτταρα διατηρεί τη διαφοροποίηση των LSEC⁷². Απώλεια αυτού του ερεθίσματος οδηγεί στην απώλεια των θυρίδων και σε ανάπτυξη οργανωμένης βασικής μεμβράνης γύρω από το ενδοθήλιο, δηλαδή την "τριχοειδοποίηση" του. Αντίστροφα, τα LSEC έχουν την ιδιότητα να διατηρούν τα αστεροειδή κύτταρα στην ανενεργή τους μορφή ή και να προάγουν την μετατροπή των ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων σε ανενεργά. Η ιδιότητα αυτή χάνεται στα "τριχοειδοποιημένα" LSEC⁷³. Επιπλέον, τα ενεργοποιημένα LSEC παρέχουν ερεθίσματα που προάγουν την ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων, σημαντικότερα των οποίων είναι ο TGF-β, ο PDGF-BB καθώς και συστατικά θεμέλιας ουσίας όπως

ινωδονεκτίνη και κολλαγόνο τύπου I.

Τα ηπατοκύτταρα Η απόπτωση ηπατοκυττάρων είναι συνηθισμένο χαρακτηριστικό στις χρόνιες ηπατικές νόσους. Τα αποπτωτικά σωματίδια απομακρύνονται ως επι το πλείστον από μακροφάγα. Ένα μέρος όμως ενδοκυτταρώνεται από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα που έχουν την ιδιότητα να δρουν ως μη επαγγελματικά φαγοκύτταρα. Η ενδοκυττάρωση προάγει την επιβίωση και την διατήρηση του μυοϊνοβλαστικού φαινότυπου⁷⁴. Εκτός από την μέσω απόπτωσης δράση τους στα αστεροειδή κύτταρα, τα ηπατοκύτταρα παράγουν σαν απάντηση στη βλάβη πλήθος κυτταροκινών και άλλων προφλεγμονωδών και προϊνωτικών παραγόντων. Από τους πιο καλά χαρακτηρισμένους παράγοντες με δράση στα αστεροειδή κύτταρα είναι οι παρακάτω⁷⁵:

- IGF (insulin-like growth factor)
- IGFBP (insulin-like growth factor binding protein)
- ROS (reactive oxygen species)
- HNE (hydroxynoneal)
- TGF-β (transforming growth factor beta)
- TGF-α (transforming growth factor alpha)
- TNF-α (tumor necrosis factor alpha)

2

Βιολογία των αστεροειδών κυττάρων του ήπατος

2.1 Ιστορικά στοιχεία

Τα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος περιγράφηκαν πρώτη φορά από τον Karl Wilhelm von Kupffer το 1876 όπου χρησιμοποιώντας μια χρώση χλωριούχου χρυσού παρατήρησε τα σταγονίδια λίπους πλούσια σε βιταμίνη Α στο κυτταρόπλασμα τους. Ονόμασε τα κύτταρα αυτά "sternzellen" ("αστεροειδή κύτταρα" στα Γερμανικά)^{76;77}. Το 1882 η παρουσία τους επιβεβαιώθηκε και από τον Rothe. Το 1952 ο Ιάπωνας ανατόμος Toshio Ito χαρακτήρισε τα κύτταρα αυτά ως κύτταρα αποθηκεύοντα λιπίδια.

Ονοματολογία

Τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίστηκαν με ποικιλία ονομάτων από τους πρώτους ερευνητές που τα μελέτησαν. Οι περισσότερες ονομασίες βασίστηκαν στην ιδιό-

τητα των κυττάρων αυτών να αποθηκεύουν λιπίδια καθώς και στην ανατομική τους θέση γύρω από τα κολποειδή. Έτσι, έχουν χαρακτηριστεί ως περικότταρα, λιποκύτταρα, περικολλοειδικά κύτταρα, κύτταρα του Ito, παρακολποειδικά κύτταρα, κύτταρα αποθηκεύοντα βιταμίνη Α και ως διάμεσα κύτταρα⁷⁸. Η ονοματολογία τυποποιήθηκε το 1996 και η κοινώς αποδεκτή ονομασία είναι σήμερα "αστεροειδή κύτταρα του ήπατος".

Η διερεύνηση της λειτουργίας των αστεροειδών κυττάρων

Οι Nakane⁷⁹ και Wake⁷⁶ επιβεβαίωσαν ότι τα κύτταρα αυτά αποθηκεύουν βιταμίνη Α. Ο Kent⁸⁰ αναγνώρισε τη σχέση των κυττάρων αυτών με το σχηματισμό κολλαγόνου τύπου ΙΙΙ στο ινωτικό ήπαρ και χαρακτήρισε τα κύτταρα αυτά ως πρώιμες μορφές "ινοβλαστών" στις ηπατικές βλάβες, προκαλώντας το ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από το ρόλο αυτών των κυττάρων στις ηπατικές νόσους και οδηγώντας στην ανάπτυξη μέσα στη δεκαετία του 1980 τεχνικών απομόνωσης των κυττάρων αυτών από ήπαρ ποντικού⁸¹, αρουραίου⁸² και ανθρώπου⁸³.

2.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Τα αστεροειδή κύτταρα βρίσκονται στον υποενδοθηλιακό χώρο του Disse, μεταξύ της βασικοπλάγιας μεμβράνης των ηπατοκυττάρων και της αντι-αυλικής επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων των κολποειδών. Αποτελούν μείζονα πληθυσμό παρεγχυματικών κυττάρων, αποτελώντας περίπου το 15% του συνολικού αριθμού κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των ηπατοκυττάρων^{84;85}.

Είναι ατρακτοειδή κύτταρα με οβάλ πυρήνες, μετρίως ανεπτυγμένο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και μικρό σύμπλοκο Golgi που βρίσκεται δίπλα στον πυρήνα⁸⁶. Κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η παρουσία σταγονιδίων λίπους στο

κυτταρόπλασμα στα οποία αποθηκεύουν βιταμίνη Α με τη μορφή εστέρων ρετινόλης οι οποίοι προσδίδουν στα κύτταρα χαρακτηριστικό μικρής διάρκειας φθορισμό όταν διεγείρονται με 328nm μήκους κύματος φως. Δύο τύποι σταγονιδίων έχουν περιγραφεί. Τα σταγονίδια τύπου Ι έχουν ποικίλη διάμετρο συνήθως μικρότερη των 2μm και βρίσκονται προσδεδεμένα στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ τα σταγονίδια τύπου ΙΙ είναι μεγαλύτερα, περί τα 8μm, και βρίσκονται ελεύθερα στο κυτταρόπλασμα⁸⁷.

Τα αστεροειδή κύτταρα διαθέτουν κυτταροπλασματικές προσεκβολές που τυλίγονται γύρω από τα κολποειδή και τα ηπατοκύτταρα δίνοντας τη χαρακτηριστική μορφολογία από την οποία προέρχεται το όνομά τους. Καθεμία από τις προσεκβολές αυτές εμφανίζει μικροσκοπικούς ακανθοειδείς σχηματισμούς ο ρόλος των οποίων φαίνεται να είναι η πρόσληψη χημειοτακτικών σημάτων από το περιβάλλον. Τα σήματα αυτά στη συνέχεια μεταβιβάζονται στον κυτταροσκελετό ο οποίος παράγει συσταλτική δύναμη που οδηγεί σε χημειοταξία⁸⁸.

Κάθε αστεροειδές κύτταρο συνήθως εκτείνει προσεκβολές γύρω από περισσότερα του ενός κολποειδή, και πολλές προσεκβολές διασχίζουν το χώρο του Disse για να έρθουν σε επαφή με τα ηπατοκύτταρα^{89;90}. Η στενή αυτή ανατομική σχέση φαίνεται να εξυπηρετεί τη διακυτταρική μεταφορά κυτταροκινών και άλλων σηματοδοτικών μορίων⁸⁶. Σε κοντινή απόσταση από τα αστεροειδή κύτταρα βρίσκονται νευρικές απολήξεις^{91;92} και πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι τα κύτταρα αυτά απαντούν σε έναν αριθμό νευροδιαβιβαστών και νευροπεπτιδίων⁹³⁻⁻⁹⁵.

2.3 Εμβρυολογική προέλευση

Τα αστεροειδή κύτταρα εμφανίζονται το δεύτερο μισό του τρίτου μήνα της κύησης στους ανθρώπους.⁹⁶ Η ακριβής εμβρυολογική προέλευση τους παραμέ-

νει αβέβαιη. Τα περισσότερα διαθέσιμα δεδομένα σήμερα υποστηρίζουν ενδοδερμική⁹⁷⁻⁹⁹ ή μεσεγχυματική (septum transversum)¹⁰⁰ προέλευση. Χαρακτηριστικό που υποστηρίζει μεσεγχυματική προέλευση είναι η έκφραση βιμεντίνης και δεσμίνης καθώς και η έκφραση του μεσοδερμικού μεταγραφικού παράγοντα Foxf1, ενώ χαρακτηριστικό που υποστηρίζει την ενδοδερμική προέλευση είναι η παροδική, κοινή με τους ηπατοβλάστες έκφραση κυτοκερατινών⁸⁶. Επιπλέον σύγχυση προκαλεί το γεγονός ότι τα αστεροειδή κύτταρα εκφράζουν πλήθος μορίων χαρακτηριστικών για κύτταρα νευρο-εκτοδερμικής προέλευσης όπως ινιδιακή όξινη πρωτεΐνη των νευρογλοίων (GFAP), νεστίνη, νευροτροφίνες και τους υποδοχείς τους (p75, Trk-B, Trk-C), μόρια προσκόλλησης N-CAM, συναπτοφυσίνη, αυξητικό παράγοντα νεύρων (NGF), υποδοχείς αυξητικών παραγόντων νεύρων, νευροτροφικό παράγοντα προερχόμενο από τον εγκέφαλο (BDNF), Rho-N, N-καντχερίνη και πριονική πρωτεΐνη PrP^C⁷⁸. Παρόλα αυτά, μελέτες χαρτογράφησης κυττάρων κατά τα τελευταία στάδια κύησης δεν έδειξαν προέλευση από τη νευρική ακρολοφία^{96;101}.

2.4 Ετερογένεια και φαινοτυπική πλαστικότητα

Τα αστεροειδή κύτταρα εμφανίζουν σημαντική ετερογένεια τόσο στη μικροσκοπική τους μορφολογία όσο και στην έκφραση κυτταροσκελετικών και επιφανειακών χαρακτηριστικών μορίων ανάλογα με την ακριβή ανατομική τους θέση στο ηπατικό λοβίο, το είδος του οργανισμού, το αν ο υπό εξέταση ιστός είναι φυσιολογικός ή έχει υποστεί βλάβη και το είδος της βλάβης (παρεγχυματική ή χολική)⁸⁶.

Στο ανθρώπινο ήπαρ, η έκφραση N-CAM περιορίζεται στα περιτυλαία και μεσο-ζωνικά αστεροειδή κύτταρα¹⁰². Η δεσμίνη που θεωρείται βασικό γνώρισμα

των αστεροειδών κυττάρων αρουραίου και ποντικού δεν είναι απαραίτητο γνώρισμα στα ανθρώπινα κύτταρα. Επιπλέον ένα σημαντικό μέρος αστεροειδών κυττάρων δεν αποθηκεύουν βιταμίνη A^{103;104}.

Η ενδολοβιακή ετερογένεια είναι μια ένδειξη της φαινοτυπικής πλαστικότητας των κυττάρων αυτών και φαίνεται να σχετίζεται με τρία γνωρίσματα⁷⁸: α) την μικρο-ανατομική θέση του κυττάρου, β) την ηλικία του κυττάρου και γ) τη λειτουργική κατάσταση του κυττάρου.

Η έκφραση ακτίνης λείων μυϊκών ινών τύπου α (αSMA) είναι ο πιο αξιόπιστος δείκτης ενεργοποίησης των αστεροειδών κυττάρων. Η συγκεκριμένη ισομορφή ακτίνης είναι χαρακτηριστική για λεία μυϊκά κύτταρα και μυοϊνοβλάστες. Η έκφρασή της στα αστεροειδή κύτταρα είναι αναστρέψιμη και η αναστροφή της σχετίζεται με επαναφορά του κυττάρου στον ανενεργό φαινότυπο.

Οι Schnabl και συν¹⁰⁵ έδειξαν ότι ακόμη και σε ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα που φτάνουν σε αναπαραγωγικό γήρας, η γονιδιακή έκφραση συνεχίζει να αλλάζει, με την απόκτηση ενός φαινοτύπου με περισσότερο φλεγμονώδη και λιγότερο ινωτικό χαρακτήρα.

Μελέτη σε διαγονιδιακά ποντίκια κατέδειξε υποπληθυσμούς αστεροειδών κυττάρων που εξέφραζαν αSMA αλλά όχι κολλαγόνο τύπου I, άλλους που εξέφραζαν κολλαγόνο αλλά όχι αSMA, και άλλους που εξέφραζαν και τα δύο. Τα κύτταρα που εξέφραζαν μόνο αSMA ή συνδυασμό αSMA/κολλαγόνο έδειξαν μεγαλύτερη έκφραση συναπτοφυσίνης, ρεελίνης, MMP-13, TIMP-1 και ICAM-1 σε σχέση με τα κύτταρα που εξέφραζαν μόνο κολλαγόνο. Επίσης κατόπιν πρόκλησης ηπατικής ίνωσης με απολίνωση του χοληφόρου πόρου οι τρεις αυτοί πληθυσμοί έδειξαν διαφορετική ανατομική κατανομή στο ινωτικό ήπαρ.¹⁰⁶

Άλλη μελέτη έδειξε ότι η ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων και η πα-

ραγωγή κολλαγόνου σχετίζεται με αλλαγή από την έκφραση E-καντχερίνης σε έκφραση N-καντχερίνης υπονοώντας έτσι το ενδεχόμενο τα αστεροειδή κύτταρα να προέρχονται από επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση.¹⁰⁷

2.5 Λειτουργίες των αστεροειδών κυττάρων στο φυσιολογικό ήπαρ

2.5.1 Μεταβολισμός λιπιδίων και ομοιόσταση της βιταμίνης A

Στο ήπαρ αποθηκεύεται 50-80% της συνολικής ποσότητας βιταμίνης A στο σώμα. Το μεγαλύτερο μέρος (80-90%) αποθηκεύεται στα αστεροειδή κύτταρα με τη μορφή εστέρων ρετινόλης. Οι εστέρες ρετινόλης μεταφέρονται εντός των κυττάρων μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας και αρχικά προσλαμβάνονται από τα ηπατοκύτταρα. Στη συνέχεια υδρολύονται και η ελεύθερη ρετινόλη μεταφέρεται στα αστεροειδή κύτταρα μέσω σύνδεσής της με μια πρωτεΐνη που δεσμεύει ρετινόλη (retinol binding protein, RBP). Τα αστεροειδή κύτταρα μπορούν να προσλαμβάνουν ρετινοειδή προσδεδεμένα σε RBP και απευθείας από το αίμα⁸⁶. Ο ακριβής ρόλος των ρετινοειδών στη φυσιολογία του αστεροειδούς κυττάρου στην ηρεμία και στην ενεργοποιημένη κατάσταση παραμένει άγνωστος. Τα πειραματικά δεδομένα γύρω από τη δράση των ρετινοειδών στην προαγωγή ή αναστολή της ινωτικής απάντησης είναι αντιφατικά⁸⁶.

Τα αστεροειδή κύτταρα παράγουν απολιποπρωτεΐνη E^{108;109} και ίσως apo A-I και apo A-IV¹⁰⁹. Η λειτουργική σημασία των λιποπρωτεϊνών αυτών στη δράση των αστεροειδών κυττάρων μένει να διερευνηθεί. Παράγουν επίσης προσταγλανδίνες. Σε πρώιμο στάδιο καλλιέργειας, τα κύτταρα αυτά παράγουν προσταγλανδίνες F_{2α} και D₂¹¹⁰ ενώ τα πλήρως ενεργοποιημένα κύτταρα παράγουν PGI₂ και

PGE₂ υπό την επίδραση αιθανόλης¹¹¹ και έχει επίσης αναφερθεί η παραγωγή λευκοτριενίων C₄ και B₄¹¹².

2.5.2 Ομοιόσταση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας

Παρόλο που η ποσότητα της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας στο χώρο του Disse είναι σχετικά μικρή, η σύστασή της είναι μεγάλης σημασίας και έχει γίνει αντικείμενο εκτενούς μελέτης. Οι τύποι κολλαγόνου που βρίσκονται σ' αυτήν είναι οι I, III, IV, V, VI, XIV και XVIII. Άλλες σημαντικές γλυκοπρωτεΐνες είναι οι ινωδονεκτίνη, λαμινίνη, νιδογόνο, εντακτίνη, τενασίνη, οστεοποντίνη και SPARC. Γλυκοζαμινογλυκάνες όπωςθειϊκή ηπαράνη,θειϊκή χονδροϊδίνη καιθειϊκή δερματάνη ελεύθερες ή με μορφή πρωτεογλυκάνης, συζευγμένες με πρωτεϊνικούς κορμούς όπως η περλεκάνη, συνδεκάνη, διγλυκάνη και ντεκορίνη¹⁵ αποτελούν επίσης μείζονα κατηγορία μακρομορίων. Τα ηπατοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα ίδια τα αστεροειδή κύτταρα εξαρτώνται από τη θεμέλια ουσία για να εκφράσουν τον φαινότυπό τους και αλλαγές στη σύσταση της προκαλούν φαινοτυπικές αλλαγές στα κύτταρα αυτά¹¹³⁻⁻¹¹⁷. Η αλληλεπίδραση των κυττάρων με τη θεμέλια ουσία πραγματοποιείται κυρίως μέσω των ιντεγκρινών που αυτά εκφράζουν στη μεμβράνη τους. Οι σημαντικότερες από αυτές είναι οι α₁β₁ α₂β₁ και α₃β₁. Η επαφή τους με τη θεμέλια ουσία ενεργοποιεί ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια και αλλαγές του κυτταροσκελετού¹¹⁸.

Όλα τα κύτταρα που παίρνουν μέρος στο σχηματισμό του χώρου του Disse (ηπατοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, αστεροειδή κύτταρα) παράγουν συστατικά της θεμέλιας ουσίας. Τα ανενεργά αστεροειδή κύτταρα παράγουν κυρίως κολλαγόνο τύπου III και IV και λαμινίνη^{119;120}. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν κυρίως κολλαγόνο τύπου IV^{119;120} και τα ηπατοκύτταρα κυρίως ινωδονεκτίνη¹²¹.

Και οι τρεις πληθυσμοί παράγουν μικρές ποσότητες κολλαγόνου τύπου I.

Αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας Στο υγιές ήπαρ η σύνθεση και η αποδόμηση των συστατικών της θεμέλιας ουσίας είναι σε κατάσταση ισορροπίας. Ανενεργά αστεροειδή κύτταρα αμέσως μετά την απομόνωσή τους περιέχουν mRNA που κωδικοποιούν MMP-2, -3, -13 και -14 και άλλες μεταλλοπρωτεάσες όπως ADAMs. Επίσης περιέχουν mRNA που κωδικοποιεί TIMP-1 και -2⁷⁸. Μυοϊνοβλάστες, κύτταρα Kupffer και σε μικρότερο βαθμό ηπατοκύτταρα περιέχουν κάποια από αυτά τα μεταγραφήματα επίσης.

Τα αστεροειδή κύτταρα εκφράζουν υποδοχέα ενεργοποίησης του ουροπλασμινογόνου (uPA-R) καθώς και τον αναστολέα του ενεργοποιητή πλασμινογόνου (PAI)^{122;123}. Ο υποδοχέας αυτός συγκεντρώνει ενεργοποιητή πλασμινογόνου στην επιφάνεια του κυττάρου ευνοώντας τη μετατροπή του σε ενεργή πλασμίνη, απαραίτητη για την μετατροπή του ανενεργού TGF-β στη βιολογικά ενεργή του μορφή¹²⁴. Η πλασμίνη ενεργοποιεί επίσης ορισμένες MMPs όπως η MMP-9 και MMP-2 παίζοντας έτσι ρόλο βασικού τροποποιητή στην προϊνωτική δράση των αστεροειδών κυττάρων¹²⁵.

2.5.3 Ηπατική εμβρυογένεση και αναγέννηση

Αστεροειδή κύτταρα έχουν βρεθεί στο μικροπεριβάλλον των αρχέγονων κυττάρων (stem cell niche) του ήπατος που βρίσκεται κοντά στα κανάλια του Hering. Εκεί θεωρείται ότι προάγουν την ωρίμανση των ηπατοκυτταρικών προγόνων όντας σε συνεχή επαφή με αυτά¹²⁶⁻⁻¹²⁸. Έκπτυξη των προγονικών κυττάρων μπορεί να προκληθεί με παρασυμπαθητικό ερεθισμό¹²⁹. Επιπλέον τα αστεροειδή κύτταρα παράγουν μορφογενετικές πρωτεΐνες όπως επιμορφίνη και πλεομορφίνη οι οποίες φαίνεται να παίζουν ρόλο στην αναγέννηση ηπατοκυττάρων και εκφράζονται σε

αυξημένα επίπεδα κατόπιν ηπατικής βλάβης^{130;131}. In vitro και in vivo μελέτες δείχνουν ότι τα αστεροειδή κύτταρα παίζουν επίσης ρόλο στην ανάπτυξη των ενδοηπατικών χοληφόρων^{132;133}.

Ο ρόλος των αστεροειδών κυττάρων στην αναγέννηση του ήπατος κατόπιν βλάβης είναι αντικείμενο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας. Εκτός τις προαναφερθείσες πλειομορφίνη και επιμορφίνη, τα κύτταρα αυτά παράγουν πλήθος άλλων αυξητικών παραγόντων με μιτογόνο δράση για τα ηπατοκύτταρα όπως επιδερμικό αυξητικό παράγοντα¹³⁴⁻⁻¹³⁶, TGF-α και HGF^{137;138}. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί η παρατήρηση ότι τα αστεροειδή κύτταρα εκφράζουν CD133, ιδιότητα κυττάρων με φαινότυπο αρχέγονων κυττάρων που έχουν βρεθεί σε διάφορους ιστούς¹³⁹. Ενδέχεται τα αστεροειδή κύτταρα να έχουν δυνατότητες πολυδύναμων κυττάρων στο ήπαρ, ενδεχόμενο με μεγάλη κλινική σημασία για την εύρεση θεραπευτικών στόχων στα χρόνια ηπατικά νοσήματα.

2.5.4 Τροποποίηση της ανοσολογικής απάντησης

Τα αστεροειδή κύτταρα επικοινωνούν αμφίδρομα με κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, κυρίως ηπατικά μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και ουδετερόφιλα¹⁴⁰. Στα ερεθίσματα που δέχονται από αυτά τα κύτταρα περιλαμβάνονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS), νιτρικό οξείδιο (NO), πλήθος κυτταροκινών, εικοσανοειδή και πρωτεάσες. Τα αστεροειδή κύτταρα παράγουν χημειοκίνες προάγοντας την χημειοταξία και την προσκόλληση των λευκοκυττάρων όπως οι MCP-1¹⁴¹, CCL21¹⁴², και RANTES.

Λειτουργούν ως επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα επάγοντας έτσι πολλαπλασιασμό ή απόπτωση λεμφοκυττάρων^{65;143;144}.

Η δράση των ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων μπορεί να τροποποιεί-

ται από τις δράσεις λεμφοκυττάρων και διαφορετικοί πληθυσμοί λεμφοκυττάρων έχουν διαφορετική επίδραση. Έτσι, τα CD4+ T λεμφοκύτταρα φαίνεται να προκαλούν λιγότερο έντονα προϋνωτικό φαινότυπο στα αστεροειδή κύτταρα σε σχέση με τα CD8+ λεμφοκύτταρα, γεγονός που μάλλον εξηγεί την πιο δυσμενή πρόγνωση ασθενών με ταυτόχρονη λοίμωξη με HCV και HIV σε σχέση με αυτούς με μεμονωμένη HCV λοίμωξη.

Τα αστεροειδή κύτταρα εκφράζουν Toll-like υποδοχείς (TLRs). Μέσω του TLR-4 διεγείρονται από βακτηριακά προϊόντα όπως LPS και η διέγερση προκαλεί ενεργοποίηση και μεταγραφή πλήθους προϋνωτικών παραγόντων¹⁴⁵. Η σημασία των υποδοχέων αυτών γίνεται πιο εμφανής από τη μελέτη των Isayama et al. που έδειξε ότι η σηματοδότηση μέσω LPS είναι απαραίτητη για την πρόκληση ίνωσης σε πειραματικό μοντέλο ηπατικής ίνωσης με απολίνωση του χοληφόρου πόρου σε ποντίκια. Τα πειραματόζωα που ήταν knock-out για τα συστατικά του συμπλόκου ανίχνευσης του LPS (TLR-4 και CD14) είχαν φυσική προστασία στην ίνωση¹⁴⁶. Επίσης, οι Paik και συν. έδειξαν ότι τα αστεροειδή κύτταρα υπο την επίδραση κυτταροκινών αυξάνουν την παραγωγή προφλεγμονωδών παραγόντων υπό την επίδραση παραγώγων Gram θετικών βακτηρίων όπως πεπτιδογλυκάνη και λιποτεϊχοϊκό οξύ⁶⁸. Σημαντική επίσης είναι η παρατήρηση των Gäbele και συν που έδειξαν την παρουσία TLR-9 στα αστεροειδή κύτταρα καθώς και ότι η ενεργοποίησή του από CpG DNA οδηγεί σε παραγωγή MCP-1, μια από τις πιο ισχυρές χημειοκίνες για μακροφάγα και μονοκύτταρα.⁶⁷ Αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από το βακτηριακό DNA, πλούσιο σε CpG (μη μεθυλιωμένα δινουκλεοτίδια κυτοσίνης-γουανίνης) είναι και το μετουσιωμένο DNA στα αποπτωτικά σωματίδια ευκαρυωτικών κυττάρων. Είναι ήδη αποδεδειγμένος ο ρόλος της ενεργοποίησης του TLR-9 αυτοαντιδραστικών B λεμφοκυττάρων από αποπτωτικό DNA¹⁴⁷.

Με παρόμοιο ενδεχομένως μηχανισμό συμβαίνει και ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων από DNA αποπτωτικών ηπατοκυττάρων.

2.5.5 Παρακρινική, αυτοκρινική δάση, παραγωγή χημειοκινών, κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων

Τα αστεροειδή κύτταρα παράγουν πλήθος ουσιών για τις περισσότερες από τις οποίες διαθέτουν τα ίδια ειδικούς υποδοχείς, εκδηλώνοντας έτσι αυτοκρινή δράση. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα κύτταρα αυτά παράγουν εικοσανοειδή η σημασία των οποίων στη βιολογία του κυττάρου δεν είναι πλήρως κατανοητή. Αναφέραμε επίσης την παραγωγή χημειοκινών και το ρόλο της στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης. Πλήθος κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων εκκρίνονται από τα κύτταρα αυτά τόσο στην ανενεργή κατάσταση σε υγιή ιστό όσο και στην ενεργοποιημένη τους μορφή κατόπιν ηπατικής βλάβης. Στην εικόνα 2.1 παρουσιάζονται οι περισσότερες από τις γνωστές κυτταροκίνες και οι δράσεις τους στα αστεροειδή κύτταρα.

TGF- α , EGF, HGF, IGF-I, IGF-II, aFGF Όπως είδαμε παραπάνω, τα αστεροειδή κύτταρα παράγουν TGF- α και αυξητικό παράγοντα επιθηλιακών κυττάρων (EGF). Εκτός από μιτογόνο δράση στα ηπατοκύτταρα, οι δύο αυτοί παράγοντες προάγουν τον πολλαπλασιασμό των ίδιων των αστεροειδών κυττάρων^{135;148}. Ένα ακόμη ισχυρότερο μιτογόνο ερέθισμα στα ηπατοκύτταρα είναι ο αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων (HGF) που επίσης παράγεται από τα αστεροειδή κύτταρα¹³⁸. Η έκκριση του ελαττώνεται κατά την οξεία φάση ηπατικής βλάβης. Επιπλέον, παράγουν IGF I και II^{149;150}. Ο όξινος παράγοντας αύξησης των ινοβλαστών (aFGF) είναι άλλη μια κυτταροκίνη που παράγεται από τα αστεροειδή κύτ-

ταρα και έχει μιτογόνο δράση για αυτά^{151;152}.

Αυξητικός παράγοντας συνδετικού ιστού (CTGF) Ο CTGF (ή CCN2) προάγει την ινογένεση στο δέρμα, τον πνεύμονα και τον νεφρό. Εκφράζεται ισχυρά κατά την ηπατική ίνωση και μία από τις πηγές του είναι τα αστεροειδή κύτταρα με τα ηπατοκύτταρα να είναι μάλλον η σπουδαιότερη πηγή του. Η παραγωγή του φαίνεται να ρυθμίζεται από τον TGF-β⁸⁶.

VEGF Η παραγωγή VEGF από τα αστεροειδή κύτταρα και εν μέρει από τα ηπατοκύτταρα είναι απαραίτητο ερέθισμα για τη διατήρηση της διαφοροποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων των κολποειδών⁷². Απώλεια αυτού του ερεθίσματος προκαλεί μετάβαση του ενδοθηλιακού κυττάρου σε ένα ενεργοποιημένο φαινότυπο που χαρακτηρίζεται από αλλαγή της μορφολογίας με απώλεια των θυρίδων, ανάπτυξη οργανωμένης βασικής μεμβράνης (τριχοειδοποίηση) και αλλαγή στη μεταγραφική δραστηριότητα του κυττάρου με παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και παραγωγή διαφορετικής σύστασης και ποσότητας εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

Νευροτροφίνες Μέχρι σήμερα έχει επιβεβαιωθεί η παραγωγή από αστεροειδή κύτταρα των νευροτροφινών NGF, BDGF, NT-3 και NT-4/5. Καθώς και των υποδοχέων τους Trk-B, Trk-C και p75NTR. Ο ρόλος στη φυσιολογία των αστεροειδών κυττάρων δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος. Οι Assai και συν.¹⁵³ έδειξαν ότι ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα υπερεκκράζουν τον υποδοχέα p75NTR και η επίδραση με NGF οδηγεί τα κύτταρα αυτά σε απόπτωση.

Λιποκίνες Η λεπτίνη είναι μία λιποκίνη που παράγεται κυρίως από λιποκύτταρα και σκελετικούς μύες. Έχει πληθώρα μεταβολικών δράσεων, ρυθμίζει την όρεξη

και έχει επιδράσεις στη συμπεριφορά¹⁵⁴. Τα αστεροειδή κύτταρα παράγουν λεπτίνη¹⁵⁵ και η δράση της στο ήπαρ είναι προϊνωτική καθώς αυξάνει την παραγωγή α1-προκολλαγόνου. Το σηματοδοτικό μονοπάτι φαίνεται να είναι μέσω PI3K/Akt κατόπιν ενεργοποίησης της JAK1¹⁵⁶.

Ερυθροποιητίνη Ερυθροποιητίνη και ενδεχομένως άλλοι αιμοποιητικοί παράγοντες παράγονται από αστεροειδή κύτταρα του ήπατος¹⁵⁷.

MCP-1 και M-CSF, χημειοκίνες, ιντερλευκίνες Ο MCP-1 (ή CCL2) είναι μια χημειοκίνη που ανήκει στην οικογένεια CC και ρόλος της είναι η επιστράτευση μονοκυττάρων, T λεμφοκυττάρων μνήμης και δενδριτικών κυττάρων σε περιοχές φλεγμονής^{158;159}. Ο παράγοντας διέγερσης αποικίας μακροφάγων (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) διεγείρει τη διαφοροποίηση των πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών σε μακροφάγα καθώς επίσης ενισχύει την φαγοκυτταρική ικανότητα των τελευταίων και προκαλεί χημειοταξία¹⁶⁰. Η παραγωγή από τα αστεροειδή κύτταρα των παραπάνω παραγόντων αποτελεί ισχυρότατο ερέθισμα για την προσέλκυση μονοκυττάρων και την συντήρηση της φλεγμονώδους αντίδρασης στις ηπατικές βλάβες^{63;161;162}.

Άλλες χημειοκίνες που παράγονται από τα αστεροειδή κύτταρα είναι οι CCL21, RANTES, IL-8, CINC, C-X-C chemokine ligand, και η φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων-2 (MIP-2)⁸⁶.

Τα αστεροειδή κύτταρα συμμετέχουν στη ρύθμιση της αντίδρασης οξείας φάσης με την παραγωγή ιντερλευκίνης 6 (IL-6) η παραγωγή της οποίας αυξάνεται υπό το ερέθισμα TNF-α, IL-1β και LPS¹⁶³. Επίσης παράγουν IL-10 η οποία έχει αντιφλεγμονώδεις και αντιϊνωτικές ιδιότητες, καθώς ελαττώνει την έκφραση κολлагόνου τύπου I και επάγει την έκφραση κολλαγενάσης^{164;165}.

PDGF, TGF-β Ο αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων (PDGF) είναι το πιο ισχυρό μιτογόνο ερέθισμα που έχει μέχρι σήμερα αναγνωριστεί. Τα αστεροειδή κύτταρα παράγουν PDGF καθώς και τον υποδοχέα του. Κατόπιν ενεργοποίησης, η παραγωγή τόσο του PDGF όσο και του υποδοχέα του αυξάνουν^{166;167}.

Ο TGF-β είναι μια από τις σημαντικότερες κυτταροκίνες που εκφράζονται κατόπιν ηπατικής βλάβης και αποτελεί ένα από τα μείζονα προϊνωτικά ερεθίσματα. Η έκφραση TGF-β από τα αστεροειδή κύτταρα αυξάνεται μετά από ηπατική βλάβη μέσω πολλαπλών ερεθισμάτων και οι προϊνωτικές του δράσεις στα κύτταρα αυτά ασκούνται μέσω παρακρινών και αυτοκρινών μηχανισμών.

Τόσο ο PDGF όσο και ο TGF-β είναι αντικείμενα του επόμενου κεφαλαίου όπου εξετάζουμε σε βάθος τους υποδοχείς, τα σηματοδοτικά μονοπάτια και τις δράσεις των κυτταροκινών αυτών στα αστεροειδή κύτταρα.

Ενδοθηλίνη-1 (ET-1) Η ενδοθηλίνη είναι πεπτίδια που παράγονται κυρίως από αγγειακό ενδοθήλιο και ασκούν μεταξύ άλλων ισχυρή αγγειοσυσταλτική δράση¹⁶⁸. Έχουν περιγραφεί τρεις ισομορφές ενδοθηλίνης (ET-1, -2, -3) και υπάρχουν τουλάχιστον 4 διαφορετικοί υποδοχείς (ET_A, ET_{B1}, ET_{B2} και ET_C). Φυσιολογικός ανταγωνιστής της ενδοθηλίνης είναι το νιτρικό οξείδιο (NO)¹⁶⁹. Τα αστεροειδή κύτταρα παράγουν τόσο ET-1 όσο και την επαγόμενη μορφή συνθάσης του νιτρικού οξειδίου. Η ET-1 προάγει τη συσταλτικότητα των αστεροειδών κυττάρων ενώ επίσης φαίνεται να παίζει ρόλο στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού τους¹⁷⁰.

Οικογένεια	Κυτταροκίνη	Υποδοχέας	Δράσεις
TGFs	TGF- β 1/TGF- α ,BMP4, BMP6	υποδοχείς TGF- β τύπου I, II, III υποδοχέας 6 φωσφορικής μαννόζης	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
PDGFs	PDGF-B	β -PDGFR, α -PDGFR	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
EGF	άνγνωστη	υποδοχέας EGF	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
Stem cell factor	Stem cell factor	άνγνωστος	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
HGF	HGF	c-Met	Πολλαπλασιασμός, ίνωση, αναγέννηση, ανπινωτική
CTGF	CTGF (CCN2)	ιντεγκρίνη ανβ3, πρωτεΐνη συσχετισμένη με υποδοχέα LDL	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
FGFs	aFGF και bFGF	υποδοχέας FGF 2	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
ET-1	ET-1, ECE	υποδοχείς ET-A και ET-B	Πολλαπλασιασμός, ίνωση, χημειοταξία/φλεγμονή
Leptin	Leptin	OB-Ra και OB-Rb	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
Plasminogen	uPA/PAI-1	υποδοχέας uPA	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
VEGFs	VEGF	υποδοχείς VEGF 1 και 2	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
IGFs	IGF-I, IGF-II	IGF-IR	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
Thrombin	άνγνωστη	υποδοχέας θρομβίνης	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
RGD-containing and integrin ligands	—	ιντεγκρίνες α 1 β 1, α 2 β 1, α 6 β 4, α 5 β 1, α 8 β 1, ανβ1 και ανβ3 συνδεδεμένη με ιντεγκρίνη κινάση	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
Fibrillar collagens	Κολλαγόνα I, II	υποδοχείς τομέα διακοειδίνης 1 και 2	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
Cannabinoids	άνγνωστη	υποδοχέας CB1	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
Purines	πανταχού παρούσες	υποδοχείς P2Y	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
Adenosine	πανταχού παρούσα	υποδοχέας αδενοσίνης	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
Renin-angiotensin	αγγειοτενσίνη II, ρενίνη ,ACE	υποδοχείς αγγειοτενσίνης I 1 και 2	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
Serotonin	άνγνωστη	υποδοχείς SSR2,SSR3 και SSR5	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
Hedgehog	Indian hedgehog and sonic hedgehog	Patched	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
Galectins	Galectin-3	άνγνωστος	Πολλαπλασιασμός, ίνωση
AGE	άνγνωστη	υποδοχέας AGE	Χημειοταξία/φλεγμονή
M-CSF	M-CSF	άνγνωστος	Χημειοταξία/φλεγμονή
PAF	PAF	υποδοχέας PAF	Χημειοταξία/φλεγμονή
CD40	CD40 ligand	άνγνωστος	Χημειοταξία/φλεγμονή
TNF- α	TNF- α	υποδοχείς TNF-I p75NTR	Χημειοταξία/φλεγμονή
Chemokines	CXCL1,MCP-1, RANTES, MIP-1, eotaxin, IL-8	CXCR3	Χημειοταξία/φλεγμονή
Opioids	άνγνωστη	οπιοειδείς υποδοχείς δ 1 και δ 2	Χημειοταξία/φλεγμονή
Oxidized LDI	άνγνωστη	CD36	Χημειοταξία/φλεγμονή
TLR ligands	άνγνωστη	TLR4, CD14	Χημειοταξία/φλεγμονή
IL-6	IL-6	άνγνωστος	Αναγέννηση
NTs	NGF,BDNF,NT-4, NT-4/5	p75-NTR, Trk-B,Trk-C	Αναγέννηση
IL-10	IL-10	υποδοχέας IL-10	Ανπινωτική
Adiponectin	Adiponectin	υποδοχέας CB2	Ανπινωτική
Follistatin	Follostatin	άνγνωστος	Ανπινωτική

(συνεχίζεται)

Εικόνα 2.1: Κυτταροκίνες, υποδοχείς τους και δράσεις στα αστεροειδή κύτταρα¹

Οικογένεια	Κυτταροκίνη	Υποδοχέας	Δράσεις
σηματοδότηση Fas	άγνωστη	Fas	άγνωστη
Cystatin	Cystatin	άγνωστος	διάφορες
Κατεχολαμίνες	Νορεπινεφρίνη	αδρενεργικοί υποδοχείς α1Α και β	διάφορες
5-υδροξυταμίνη	άγνωστη	υποδοχείς 5-υδροξυταμίνης 1Α, 2Α και 2Β	διάφορες
Adrenomedullin	Adrenomedullin	άγνωστος	διάφορες
Συμπλήρωμα	άγνωστη	υποδοχέας C5a	διάφορες
Ναπουρητικά πεπτιδία	άγνωστη	υποδοχέας νατριουρητικού πεπτιδίου Β	διάφορες

Εικόνα 2.2: Κυτταροκίνες, υποδοχείς τους και δράσεις στα αστεροειδή κύτταρα (συνέχεια)

2.6 Λειτουργίες των αστεροειδών κυττάρων στην ηπατική βλάβη και την ίνωση

2.6.1 Μηχανισμοί ενεργοποίησης των αστεροειδών κυττάρων

Ο όρος ενεργοποίηση αναφέρεται στη φαινοτυπική μετάβαση από το αστεροειδές κύτταρο όπως μέχρι τώρα περιγράψαμε, σε ένα μυοϊνοβλαστικό κύτταρο με έντονα φλεγμονώδη και προϊνωτικό χαρακτήρα, βασικά χαρακτηριστικά του οποίου είναι η μετανάστευση, η συσταλτικότητα και ο αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Η διαδικασία της ενεργοποίησης πραγματοποιείται σε διακριτά μέρη, με τις αρχικές φάσεις να διαφοροποιούνται σημαντικά από τις μεταγενέστερες, ελέγχεται από πλήθος σηματοδοτικών μορίων που παράγονται από το ίδιο το αστεροειδές κύτταρο αλλά και από άλλα κύτταρα του ηπατικού κολποειδούς και του ανοσοποιητικού συστήματος και είναι τουλάχιστον κατά ένα μέρος αναστρέψιμη. Η ενεργοποίηση μπορεί να χωριστεί σε δύο φάσεις: έναρξη και συνέχιση.

Η έναρξη αναφέρεται στις πρώιμες φαινοτυπικές αλλαγές και στη αλλαγή στο μεταγραφικό προφίλ του κυττάρου που προετοιμάζει το κύτταρο και το ευαίσθη-

τοποιεί στις κυτταροκίνες και άλλα ερεθίσματα του περιβάλλοντος. Κατά το μεγαλύτερο μέρος η έναρξη πραγματοποιείται από παρακρινή σηματοδότηση, αλληλεπίδραση με αλλοιωμένης σύστασης εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, οξειδωτικές στρες και έκθεση σε προϊόντα κατεστραμμένων ή αποπτωτικών ηπατοκυττάρων.

Η συνέχιση αναφέρεται στην διατήρηση του μυοϊνοβλαστικού, φλεγμονώδους φαινοτύπου και την πρόκληση ίνωσης. Η συνέχιση βασίζεται επίσης σε παρακρινή αλλά και αυτοκρινή σηματοδότηση και χαρακτηρίζεται από έντονο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, συσταλτικότητα, εναπόθεση αλλά και αποδόμηση θεμέλιας ουσίας και φλεγμονώδη αντίδραση με προσέλκυση λευκοκυττάρων.

Στην εικόνα 2.3 παραθέτονται μερικοί από τους σημαντικότερους μεταγραφικούς παράγοντες και ο ρόλος τους στην ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων.

Έναρξη

Τα πιο πρώιμα ερεθίσματα για την έναρξη της ενεργοποίησης είναι η παραγωγή από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών ενός συγκεκριμένου τύπου ινωδονεκτίνης¹⁷¹ και ο TGF-β. Μάλιστα η παραγωγή του παραπάνω τύπου ινωδονεκτίνης εξαρτάται από τον TGF-β παράγοντα που καθιστά την κυτταροκίνη αυτή το πρωταρχικό και απαραίτητο ερέθισμα για την ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων.

Πηγές TGF-β για τα αστεροειδή κύτταρα αποτελούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα του Kupffer καθώς και τα αιμοπετάλια. Τα τελευταία συνεισφέρουν επίσης με άλλους παράγοντες όπως PDGF και EGF¹⁷².

Υπεροξειδωμένα λιπίδια που παράγονται από νεκρωτικά ηπατοκύτταρα αλλά και αποπτωτικά σωματίδια ηπατοκυττάρων είναι ισχυρά ερεθίσματα για την έναρξη

της ενεργοποίησης. Τα υπεροξειδωμένα λιπίδια φαίνεται να σηματοδοτούν μέσω του προκαλούντος απόπτωση, συσχετιζόμενου με TNF προσδέματος (TRAIL ligand) ενώ τα προϊόντα απόπτωσης ηπατοκυττάρων φαίνεται να σηματοδοτούν μέσω Fas και ενεργοποιούν κύτταρα Kupffer^{173;174}.

Συνέχιση

Στη δεύτερη φάση της ενεργοποίησης παρατηρούνται οι πιο δραστικές αλλαγές στο φαινότυπο του κυττάρου. Η μεταμόρφωση σε μυοϊνοβλάστη χαρακτηρίζεται από τις παρακάτω φαινοτυπικές αλλαγές:

1. Απώλεια των λιπιδίων και των εστέρων ρετινόλης
2. Αύξηση της συσταλτικότητας
3. Χημειοταξία
4. Αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού
5. Αύξηση της εναπόθεσης θεμέλιας ουσίας
6. Αύξηση της αποδόμησης θεμέλιας ουσίας
7. Αύξηση της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών

Απώλεια των λιπιδίων και των εστέρων ρετινόλης Από τα πιο πρώιμα γεγονότα στη δεύτερη φάση της ενεργοποίησης είναι η απώλεια των σταγονιδίων λίπους και βιταμίνης A από το κυτταρόπλασμα. Κατά πόσο αυτή η διαδικασία σχετίζεται με κάποιο ρυθμιστικό μηχανισμό της ενεργοποίησης ή απλά επέρχεται ως αποτέλεσμα της αλλαγής του μεταβολισμού του κυττάρου είναι ακόμη άγνωστο.

Αύξηση της συσταλτικότητας Ο πιο αξιόπιστος δείκτης ενεργοποίησης των αστεροειδών κυττάρων είναι η παραγωγή ακτίνης λείων μυϊκών ινών τύπου α (αSMA). Η έκφραση αυτή προηγείται της αύξησης έκφρασης των υποδοχέων του PDGF και TGF-β. ^{175;176}. Η αSMA προσδίδει στο κύτταρο αυξημένη συσταλτική ικανότητα. Η συστολή ή χαλάρωση των κυττάρων βρίσκεται υπό τον έλεγχο πλήθους ανταγωνιζομένων παραγόντων οι σημαντικότεροι των οποίων είναι η ET-1, το NO, το αγγειοτενσινογόνο II, εικοσανοειδή, ο νατριουρητικός παράγοντας τον κόλπων (ANP), η σωματοστατίνη και το μονοξειδίο του άνθρακα ⁸⁶. Η λειτουργία αυτή των ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων είναι κεντρικής σημασίας για την ανάπτυξη πυλαίας υπέρτασης στο κίρρωτικό ήπαρ.

Χημειοταξία Τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα εκδηλώνουν χημειοτακτισμό σε έναν αριθμό παραγόντων, από τους οποίους οι σημαντικότεροι είναι οι PDGF ^{177;178}, και MCP-1 ¹⁷⁹ και εκφράζουν τον CXCR3 υποδοχέα ¹⁸⁰. Η αδενοσίνη αντίθετα αναστέλλει τη χημειοταξία προάγοντας έτσι την ακινητοποίηση των κυττάρων σε υποξικούς, τραυματισμένους ιστούς ¹⁸¹.

Αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού Το ισχυρότερο μιτωτικό ερέθισμα για τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα είναι ο PDGF. Νωρίς στη διαδικασία της ενεργοποίησης τα κύτταρα αυτά αυξάνουν την έκφραση υποδοχέων PDGF κι έτσι αυξάνουν την ευαισθησία τους απέναντι σ'αυτόν τον παράγοντα. Επιπλέον μιτογόνα ερεθίσματα για τα αστεροειδή κύτταρα είναι η θρομβίνη ^{182;183}, ο VEGF ¹⁸⁴, EGF, TGF-α, ο αυξητικός παράγοντας κερατινοκυττάρων ¹⁸⁵, ο bFGF ¹⁸⁶ και ο IGF.

Αύξηση της εναπόθεσης θεμέλιας ουσίας Βασικό χαρακτηριστικό του μυοϊνοβλαστικού φαινοτύπου είναι η αυξημένη παραγωγή και εναπόθεση συστατικών της θεμέλιας ουσίας. Το πιο καλά μελετημένο από αυτά και αυτό που χρησιμοποιείται περισσότερο ως δείκτης ίνωσης είναι το κολλαγόνο τύπου I. Προϊνωτικοί αυξητικοί παράγοντες, λιποκίνες και αγγειοδραστικοί παράγοντες απαιτούνται για την ανάπτυξη ίνωσης¹⁸⁷.

Ο πιο ισχυρός προϊνωτικός παράγοντας για τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα είναι ο TGF-β. Η σημαντικότερη πηγή για την κυτταροκίνη αυτή στο ινωτικό ήπαρ είναι τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα^{55;188}, ενώ άλλες πηγές είναι τα κύτταρα του Kupffer και τα αιμοπετάλια¹⁸⁹. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών συμβάλλουν με την μετατροπή του ανενεργού TGF-β σε ενεργό. Άλλα σημαντικά προϊνωτικά ερεθίσματα είναι ο CTGF/CCN2 και η λεπτίνη.

Αύξηση της αποδόμησης θεμέλιας ουσίας Βασικό χαρακτηριστικό της ηπατικής ίνωσης είναι η αναδόμηση (remodelling) της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Κεντρικής σημασίας στην αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας είναι οι μεταλλοπρωτεάσες θεμέλιας ουσίας (MMPs) καθώς και μεταλλοπρωτεάσες της οικογένειας των disintegrins. Τα αστεροειδή κύτταρα παράγουν MMP-2^{190;191}, MMP-9¹⁹², MMP-3¹⁹³ και MMP-1¹⁹⁴, καθώς επίσης και άλλες μεταλλοπρωτεάσες όπως ADAMTS-13¹⁹⁵ που επιδεικνύουν πρωτεολυτική ικανότητα απέναντι σε ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Τα ειδικά υποστρώματα όμως και ο ακριβής ρόλος της υπερέκφρασής τους από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα δεν είναι ακόμη γνωστά.

Μεταγραφικοί Παράγοντες	Λειτουργία γονιδίου-στόχου
Διάφοροι	
NF- κβ	Φλεγμονή και ρύθμιση απόπτωσης/επιβίωσης
AP-1 (c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, Fra1, Fra2, Fos-B)	Ρύθμιση γονιδίων TGF-β, TIMP-1 και IL-6
AP-2	Ρύθμιση γονιδίου κολλαγόνου
Ets-1	Ενεργοποίηση
NF-1	Ρύθμιση γονιδίου κολλαγόνου
Smads	Ρύθμιση / σίγαση γονιδίου κολλαγόνου
C/EBP	Ρύθμιση γονιδίου κολλαγόνου
Mef2	Ενεργοποίηση
E-box factors	Ρύθμιση 6-φωσφο-μαννόζης/IGF-II
c-Myb	αSMA
CREB	Ενεργοποίηση
CRP2	Σίγαση (quiescence)
SREBP	Σίγαση (quiescence)
Lhx2	Σίγαση (quiescence)
KLFs	
KLF6	Διάφορες
Sp1, Sp3	Ρύθμιση γονιδίου κολλαγόνου
BTEB	Ρύθμιση γονιδίου κολλαγόνου
ZNF267	MMP-10
Egr-1	Ενεργοποίηση
Πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών	
FXR	Σίγαση (quiescence)
PPAR-γ	Σίγαση (quiescence)
LXR	Σίγαση (quiescence)
PXR	Σίγαση (quiescence)
Vitamin D receptor	Ενεργοποίηση
RAR-α, -β; RXR	Διάφορες
Παράγοντες Forkhead	
Foxf1	Ενεργοποίηση
FoxO1	Ενεργοποίηση

Εικόνα 2.3: Γνωστοί μεταγραφικοί παράγοντες στα αστεροειδή κύτταρα¹

2.7 Ο ρόλος των αστεροειδών κυττάρων στην υπο- στροφή της ίνωσης

Μείζονος σημασίας για την εξέλιξη της ίνωσης είναι η ανεπαρκής αποδόμηση των ινδιακών συστατικών της θεμέλιας ουσίας. Η οργάνωση και ωρίμανση των παραγόμενων μακρομορίων με τη δημιουργία εγκάρσιων συνδέσεων μεταξύ τους χάρη στη δράση της οξειδάσης λυσύλης και της ιστικής τρανσγλουταμινάσης κα-

θώς και μεταλλοπρωτεασών με μοτίβα θρομβοσπονδίνης όπως ADAMTS-2 είναι καθοριστικοί παράγοντες για την αντιστρεψιμότητα της ίνωσης. Η κλινική παρατήρηση ότι όσο πιο μακροχρόνια είναι η ινωτική διαδικασία τόσο δυσκολότερη η αναστροφή της υποστηρίζεται από πειραματικά μοντέλα στα οποία ακόμη και η προχωρημένη ίνωση είναι αναστρέψιμη όταν έχει πραγματοποιηθεί σε βραχύ χρονικό διάστημα.

Οι Issa και συν. παρατήρησαν ότι η μικροοζώδης κίρρωση σε αρουραίους που είχαν τραφεί με CCl_4 για 12 εβδομάδες μπορούσε να αναστραφεί αυτόματα και η υποστροφή της κίρρωσης συνδυαζόταν με αναδόμηση των αναγεννητικών μικροοζών και απόπτωση των ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων. Σε πειραματόζωα με πιο μακροχρόνια βλάβη αντίθετα, οι αλλοιώσεις ήταν μη αναστρέψιμες και σε μικροσκοπικό επίπεδο χαρακτηρίζονταν από εξωκυττάρια ουσία τις οποίας τα ινίδια σχημάτιζαν πλήθος εγκαρσίων συνδέσεων, αποτέλεσμα δράσης της ιστικής τρανσγλουταμινάσης¹⁹⁶.

Επιπλέον δεδομένα καταδεικνύουν την απόπτωση των ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων ως βασική προϋπόθεση για την υποστροφή της ίνωσης. Τόσο η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός όσο και η απόπτωση των κυττάρων αυτών ρυθμίζονται από την ίδια τη σύσταση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και από διαλυτούς παράγοντες¹⁹⁷. Η απόπτωση φαίνεται να ευνοεί την υποστροφή της ίνωσης αφενός αφαιρώντας τους κύριους υπεύθυνους για την παραγωγή του ινώδους υποστρώματος αλλά και αφαιρώντας την αναστολή στις μεταλλοπρωτεάσες θεμέλιας ουσίας που τα κύτταρα αυτά ασκούν μέσω της παραγωγής TIMP-1 και TIMP-2¹⁹⁸. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κύρια MMP υπεύθυνη για την αποδόμηση κολλαγόνου τύπου I είναι η MMP-1 που αν και mRNA της εκφράζεται σε ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα, είναι αμφίβολο αν τα κύτταρα αυτά παράγουν

λειτουργική μορφή του ενζύμου σε σημαντική ποσότητα, πράγμα που υπονοεί ότι η μεγαλύτερη ποσότητα της MMP-1 παράγεται από άλλα κύτταρα.

Αντιαποπτωτικά σήματα στο ινωτικό ήπαρ Ισχυρά αντιαποπτωτικά ερεθίσματα για τα αστεροειδή κύτταρα είναι η αλληλεπίδραση των ιντεγκρινών της κυτταρικής μεμβράνης (κυρίως $\alpha_2\beta_1$) με κολλαγόνο τύπου I, η παρουσία διαλυτών τροφικών παραγόντων όπως ο TGF- β , ο PDGF και ο IGF. Ο TIMP-1 έχει επίσης αντιαποπτωτική δράση ο μηχανισμός της οποίας φαίνεται να είναι μέσω της αναστολής των MMP¹⁹⁹.

Προαποπτωτικά σήματα στο ινωτικό ήπαρ Στις κυτταρικές καλλιέργειες τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα είναι ευαίσθητα σε απόπτωση μέσω CD95-L και TRAIL. NK και $T_{\gamma\delta}$ λεμφοκύτταρα μπορούν να επάγουν απόπτωση μέσω TRAIL, δράση που ενισχύεται από την ιντερφερόνη γ (IFN- γ)²⁰⁰. Επιπλέον πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την μέσω NK κυττάρων επαγόμενη απόπτωση αστεροειδών κυττάρων ως κλινικά σημαντικό παράγοντα στην υποστροφή της ίνωσης²⁰¹. Η κλινική παρατήρηση αυξημένης ηπατικής ίνωσης στους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς επίσης υποστηρίζει τον σημαντικό ρόλο αυτού του μηχανισμού²⁰². Επιπλέον προαποπτωτικά ερεθίσματα αποτελούν ο παραγόμενος από ηπατοκύτταρα NGF, ο φαρνεσοειδής υποδοχέας X (FXR), η λιπονεκτίνη, η σηματοδότηση μέσω ιντεγκρίνης $\alpha_3\beta_2$ η σηματοδότηση μέσω υποδοχέα κανναβινοειδών 2 (CB2)¹ και η σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα PPAR- γ ²⁰³.

2.8 Οπιοειδή και αστεροειδή κύτταρα του ήπατος

2.8.1 Τα ενδογενή και εξωγενή οπιοειδή

Το 1975 οι Hughes και συν. περιέγραψαν για πρώτη φορά δύο πενταπεπτίδια απομονωμένα από τον εγκέφαλο πειραματοζώων με ισχυρή δράση οπιοειδούς αγωνιστή²⁰⁴. Σήμερα είναι γνωστό ότι τα ενδογενή οπιοειδή και οι υποδοχείς τους εκφράζονται σε πολύ υψηλή συγκέντρωση σε περιοχές του ΚΝΣ, αλλά είναι επίσης ευρέως διαδεδομένα στην περιφέρεια, σε μη νευρικούς ιστούς²⁰⁵.

Μέχρι σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί 4 υποδοχείς οπιοειδών: μ (MOR) κ (KOR) δ (DOR) και NOP-R (αρχικά ονομαζόμενος LC132, ORL-1 ή υποδοχέας FQ νοσιπεπτινής/ορφανίνης)²⁰⁶⁻⁻²⁰⁸. Οι πρώτοι δύο ονομάστηκαν από τους αγωνιστές που πρόσδεσαν πιο ισχυρά (μορφίνη και κετοκυκλαζοσίνη αντίστοιχα), ενώ ο DOR εξαιτίας του ότι ανακαλύφθηκε στον σπερματικό πόρο (vas deferens) του ποντικού. Παρόλα αυτά η ύπαρξη μόνο τεσσάρων υποδοχέων οπιοειδών έρχεται σε αντίθεση με έναν μεγάλο όγκο φαρμακολογικών δεδομένων που υποστηρίζουν την ύπαρξη περισσότερων φαινοτύπων. Έτσι, υπάρχει η υπόθεση ότι εναλλακτική μεταγραφική τροποποίηση ("μάτισμα") του mRNA υποδοχέων οδηγεί στη δημιουργία διαφορετικών υποτύπων²⁰⁹ καθώς και το ότι ο ετεροδιμερισμός με άλλους υποδοχείς δημιουργεί διαφορετικές λειτουργικές μορφές²¹⁰. Με βάση τα παραπάνω, σήμερα είναι κοινώς αποδεκτό ότι ο DOR υποδοχέας εμφανίζει δύο υπότυπους (δ_1 , δ_2), ο KOR τρεις (κ_1 , κ_2 , κ_3) και ο MOR τρεις υποτύπους (μ_1 , μ_2 , μ_3). Ο NOP-R εμφανίζεται σε μία μοναδική μορφή (ORL₁)²¹¹⁻⁻²¹⁶. Οι αγωνιστές των υποδοχέων οπιοειδών χωρίζονται σε δύο πολύ διαφορετικές χημικά μορφές: αλκαλοειδή και πεπτίδια.

Αλκαλοειδή Γνωστές από την αρχαιότητα για την αναλγητική και υπναγωγό δράση τους, οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη κυρίως ως αναλγητικά φάρμακα. Το πρώτο αλκαλοειδές που απομονώθηκε σε καθαρή μορφή το 1803 από τον Seturner από τους σπόρους της υπνοφόρου παπαρούνας, η μορφίνη, είναι ακόμη σήμερα το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο οπιοειδές. Πλήθος άλλων φυσικών και συνθετικών αλκαλοειδών έχουν έκτοτε παρασκευαστεί και χρησιμοποιούνται κλινικά στην αναλγησία. Ασκούν τις δράσεις τους μέσω κυρίως του MOR υποδοχέα²¹⁷. Οι πιο γνωστοί αλκαλοειδείς ανταγωνιστές που έχουν περιγραφεί είναι η ναλοξόνη και ναλτρεξόνη²¹⁸, οι οποίες συνδέονται με όλους τους υποδοχείς αλλά έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για τους MOR²¹⁹.

Ενδογενή πεπτίδια Τα τυπικά πεπτίδια χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες καθεμία από τις οποίες προέρχεται από διαφορετικό πρόδρομο μόριο. Οι τέσσερις κατηγορίες είναι οι εγκεφαλίνες, οι δυνορφίνες, η β-ενδορφίνη και οι ενδομορφίνες^{220;221}. Οι τρεις πρώτες προέρχονται από τα πρόδρομα μόρια προ-εγκεφαλίνη, προ-δυνορφίνη και προ-οπιομελανοκορτίνη που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Οι ενδομορφίνες παράγονται επίσης από κάποιο πρόδρομο πεπτίδιο που δεν έχει μέχρι σήμερα ταυτοποιηθεί. Και τα τρία πρόδρομα μόρια εκφράζονται στο ΚΝΣ αλλά και στην περιφέρεια²²². Τα πεπτίδια αυτά έχουν διαφορετικές συγγένειες για τον κάθε υποδοχέα και αμελητέα συγγένεια για τον NOP-R αλλά κανένα δεν είναι ειδικό για έναν μόνο τύπο υποδοχέα. Ο NOP-R εμφανίζει υψηλή συγγένεια για την νοσισεπτίνη (ή ορφανίνη FQ) η οποία δεν προσδέεται σε κανέναν από τους υπόλοιπους υποδοχείς οπιοειδών και δεν θεωρείται οπιοειδές.

Εξωγενή πεπτίδια Εκτός από τα προαναφερθέντα ενδογενή πεπτίδια, αλληλουχίες οπιοειδούς αγωνιστή υπάρχουν σε πρωτεΐνες διαφόρων τροφίμων, από τη με-

ρική υδρόλυση των οποίων προκύπτουν μικρά πεπτίδια που μπορούν να δρουν ως ασθενείς οπιοειδείς αγωνιστές. Παράδειγμα αποτελούν η κασομορφίνη που παράγεται από την κασεΐνη του γάλακτος εξωμορφίνες και γλιαδορφίνη/γλουτεομορφίνη στη γλουτένη σιτηρών, σουμορφίνη-5 στη σόγια και ρουβισκολίνη στο σπανάκι. Επίσης ουσίες με ιδιότητα οπιοειδούς αγωνιστή παράγονται ως αποτέλεσμα μικροβιακού μεταβολισμού, όπως η δελτορφίνη I και II (από μύκητες)²²³ και η αγνώστου προελεύσεως δερμορφίνη. Είναι ακόμη αβέβαιο αν οι ουσίες αυτές έχουν κάποιο ρόλο στην υγεία ή νόσο, πάντως ορισμένες μελέτες έχουν δείξει συσχέτισμό αυξημένων επιπέδων κάποιων από αυτών των πεπτιδίων στο αίμα ασθενών με διάφορες ψυχικές νόσους όπως σχιζοφρένεια και αυτισμό²²⁴⁻⁻²²⁷.

2.8.2 Οι υποδοχείς οπιοειδών

Οι υποδοχείς των οπιοειδών ανήκουν στην κατηγορία των συζευγμένων με G-πρωτεΐνη υποδοχέων (GPCR) και συγκεκριμένα ανήκουν στην τάξη A (ροδοψίνης) G_i/G_o πρωτεϊνών. Κατόπιν ενεργοποίησης τόσο η α όσο και η $\beta\gamma$ υπομονάδα της G-πρωτεΐνης αλληλεπιδρούν με ενδοκυττάρια συστήματα μεταγωγής σήματος. Οι πιο καλά μελετημένες δράσεις αυτών των υποδοχέων είναι η αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης, των ελεγχόμενων από δυναμικό διαύλων Ca^{2+} (voltage gated calcium channels, VGCC), η ενεργοποίηση διαύλων K^+ και η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C β (PLC β)²²⁸⁻⁻²³³.

Υποδοχέας μ (MOR) Ο υποδοχέας MOR προσδένει με υψηλή συγγένεια τους αγωνιστές DAMGO και DADLE καθώς και πολλά αλκαλοειδή μεταξύ των οποίων η μορφίνη και η ναλοξόνη. Οι τρεις υπότυποι του MOR εμφανίζουν έντονες φαρμακολογικές διαφορές που πιθανότατα δεν εξηγούνται από την υπόθεση ότι αυτοί είναι προϊόν εναλλακτικού ματίσματος (splice variants) του mRNA μεταγραφής-

ματος, καθώς οι εναλλακτικές μορφές που παράγονται με αυτό τον τρόπο δεν διαφέρουν σημαντικά στις φαρμακολογικές τους ιδιότητες²³⁴⁻⁻²³⁶. Ο πιο πρόσφατα περιγεγραμμένος υπότυπος, ο μ_3 προσδένει αλκαλοειδή αλλά όχι οπιοειδή πεπτιδια²³⁷.

Υποδοχέας δ (DOR) Οι δύο υπότυποι δ_1 και δ_2 ενδέχεται να είναι προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του mRNA μεταγραφήματος, πράγμα που δεν έχει ακόμη αποδειχθεί. Ο διαχωρισμός έγινε με βάση τις φαρμακολογικές ιδιότητες των δύο υποτύπων: ο δ_1 εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τις εγκεφαλίνες DPDPE, DADLE, DALCE καθώς και την BTNX. Ο δ_2 εμφανίζει υψηλή συγγένεια για την εγκεφαλίνη DSLET, την deltorphin-II, την 5'-NTI και το NTB²³⁸⁻⁻²⁴⁰.

Υποδοχέας κ (KOR) Ο υποδοχέας κ έχει υψηλή συγγένεια για την ενδογενή δυνορφίνη A²⁴¹ καθώς και ένα πλήθος συνθετικών αγωνιστών όπως EKC, μπρεμαζοσίνη και κετοκυκλαζοσίνη. Ο υπότυπος κ_1 δεσμεύει δυνορφίνη αλλά όχι την DADLE, ο υπότυπος κ_2 (Arg⁶,Phe⁷)Met-εγκεφαλίνη και DADLE ενώ ο κ_3 δεσμεύει με υψηλή συγγένεια ναλοξόνη και βενζοϋλυδραζόνη²⁴².

2.8.3 Δράσεις των ενδογενών οπιοειδών

Κεντρικό νευρικό σύστημα Η μεσολάβηση στη ρύθμιση της αντίληψης του πόνου είναι από τις πιο μελετημένες δράσεις των οπιοειδών και οι περισσότερες μελέτες πάνω στα οπιοειδή έχουν να κάνουν με την αναλγησία²⁴³⁻⁻²⁴⁵. Πέρα από το ρόλο τους στην φυσιολογία του πόνου όμως, τα ενδογενή οπιοειδή έχουν πλήθος άλλων λειτουργιών στο ΚΝΣ. Από τις πιο εκτενώς μελετημένες είναι οι δράσεις στους στις γνωσιακές λειτουργίες και τη μνήμη^{246;247}, στη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής^{248;249}, στην συμπεριφορά και την παθοφυσιολογία της εξάρτησης^{250;251},

τη συμπεριφορά της μητρότητας²⁵² και τη σεξουαλική συμπεριφορά^{253;254} καθώς και ο ρόλος τους στις διαταραχές συναισθήματος²⁵⁵ και ενδεχομένως και σε άλλες ψυχιατρικές νόσους όπως η σχιζοφρένεια²⁵⁶. Υπο μελέτη είναι ο ρόλος τους σε νευρολογικές διαταραχές όπως διαταραχές κίνησης²⁵⁷. Ο ρόλος τους στην επιληψία είναι ακόμη αβέβαιος καθώς έχουν περιγραφεί τόσο προεπιληπτικές όσο και αντιεπιληπτικές δράσεις²⁵⁸⁻⁻²⁷⁰.

Ανοσοποιητικό σύστημα Τα ενδογενή οπιοειδή παίζουν σημαντικό ανοσορυθμιστικό ρόλο. Ολοένα αυξανόμενος όγκος δεδομένων δείχνει ότι τα πεπτίδια αυτά λειτουργούν ως κυτταροκίνες επάγοντας ανοσολογικές απαντήσεις μέσω μηχανισμών αλληλεπίδρασης του ανοσοποιητικού και του νευροενδοκρινικού συστήματος²⁷¹⁻⁻²⁷⁴. Η ευπάθεια των ατόμων εθισμένων στην ηρωίνη στις λοιμώξεις είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια και φαίνεται να συμφωνεί με ερευνητικά δεδομένα που καταδεικνύουν κυρίως ανοσοκατασταλτική δράση για τα περισσότερα οπιοειδή. Έτσι, η οξεία και χρόνια χορήγηση οπιοειδών σχετίζεται με ελαττωμένη φαγοκυτταρική ικανότητα και άμβλυνση της οξειδωτικής απάντησης των λευκοκυττάρων²⁷⁵⁻⁻²⁷⁹, ελάττωση της δράσης των NK λεμφοκυττάρων²⁸⁰, ελάττωση της έκφρασης υποδοχέων συμπληρώματος και ανοσοσφαιρινών από τα ουδετερόφιλα²⁷⁹, ελαττωμένη χημειοταξία²⁸¹. Η χορήγηση μορφίνης τροποποιεί την ενεργοποίηση των μακροφάγων και την έκφραση από αυτά προφλεγμονωδών κυτταροκινών σε απάντηση στην επίδραση LPS²⁸², ενώ η ναλτρεξόνη ελατώνει την θνησιμότητα σε πειραματόζωα με LPS-επαγόμενο σηπτικό σοκ ελατώνοντας την παραγωγή TNF-α από τα μακροφάγα²⁸³.

Καρδιοαναπνευστικό σύστημα Τα ενδογενή οπιοειδή παίζουν ρόλο στον έλεγχο της αναπνοής^{284;285}. Επίσης, οπιοειδή πεπτίδια υπάρχουν στο μυοκάρδιο²⁸⁶⁻⁻²⁹⁰

και η σύνθεσή, φύλαξη και απελευθέρωσή τους γίνεται από τα μυοκαρδιακά κύτταρα²⁹¹. Τα επίπεδα των οπιοειδών του μυοκαρδίου αυξάνονται μετά από στρες καθώς και μετά από ισχαιμία^{292;293}. δ- και κ-υποδοχείς έχουν βρεθεί σε συμπαθητικές νευρικές απολήξεις και γαγγλιακά κύτταρα στο μυοκάρδιο^{288;294}. Τα οπιοειδή φαίνεται να παρέχουν καρδιοπροστασία στην ισχαιμία, που μεσολαβείται από δ- και κ-υποδοχείς²⁹⁵⁻⁻²⁹⁷. Επιπλέον τα ενδογενή οπιοειδή παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της αιμοδυναμικής ισορροπίας και καρδιαγγειακής φυσιολογίας²⁹⁸⁻⁻³⁰¹.

Γαστρεντερικό σύστημα Τα ενδογενή οπιοειδή παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της εντερικής κινητικότητας^{302;303} και των εντερικών εκρίσεων³⁰⁴. Παρόλο που υποδοχείς οπιοειδών εκφράζονται εκτενώς σε όλο το γαστρεντερικό σύστημα οι δράσεις τους πέρα από την εντερική λειτουργία παραμένουν ως επι το πλείστον άγνωστες.

2.8.4 Ρόλος των οπιοειδών στη βιολογία των αστεροειδών κυττάρων

Η παρατήρηση ότι οι ασθενείς με πρωτοπαθή χολική κίρρωση έχουν αυξημένα επίπεδα ενδογενών οπιοειδών οδήγησε αφενός στην υπόθεση ότι τα πεπτίδια αυτά είναι εν μέρει υπεύθυνα για κάποιες από τις επιπλοκές της νόσου, αφετέρου στο ερώτημα κατά πόσο τα ίδια τα οπιοειδή παίζουν ρόλο στην παθοφυσιολογία της ηπατικής ίνωσης^{305;306}.

Περαιτέρω έρευνες έδειξαν ότι η ναλτρεξόνη αμβλύνει την ινωτική αντίδραση σε μοντέλα χολοστατικής ίνωσης σε πειραματόζωα^{307;308}. Στα πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε ναλτρεξόνη υπήρχε ελαττωμένος αριθμός ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων, λιγότερη ίνωση και ελαττωμένη δράση της MMP-2. Ως

ένας πιθανός μηχανισμός δράσης προτάθηκε η παρεμπόδιση της επαγόμενης από τα οπιοειδή ελάττωσης στα επίπεδα γλουταθειόνης των ηπατοκυττάρων.³⁰⁸⁻⁻³¹⁰

Κατόπιν των παραπάνω παρατηρήσεων, το ερευνητικό ενδιαφέρον στράφηκε στη συνέχεια στην ανίχνευση και χαρακτηρισμό των υποδοχέων οπιοειδών στα αστεροειδή κύτταρα. Οι De Minicis και συν.³¹¹ μελέτησαν την έκφραση μ-, δ- και κ-υποδοχέων στα ανενεργά και ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα καθώς και το ενδοκυττάριο μονοπάτι μεταγωγής σήματος των υποδοχέων αυτών. Βρήκαν ότι τα αστεροειδή κύτταρα εκφράζουν και τους τρεις τύπους υποδοχέων και ότι κατόπιν ενεργοποίησης η έκφραση των μ- και κ-υποδοχέων αυξάνεται, ενώ των δ-υποδοχέων μειώνεται. Βρήκαν επίσης ότι η επίδραση με οπιοειδείς αγωνιστές προκάλεσε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού καθώς επίσης και αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου τύπου I από τα κύτταρα αυτά. Διερευνώντας το ενδοκυττάριο μονοπάτι μεταγωγής του σήματος από τους οπιοειδείς υποδοχείς βρήκαν ότι οι ειδικοί αγωνιστές για κάθε έναν από τους υποδοχείς δεν αύξησε την φωσφορυλίωση της JNK αλλά προκάλεσε αύξηση στη φωσφορυλίωση των ERK1/2 και Akt. Επίσης και οι τρεις ειδικοί αγωνιστές προκάλεσαν φωσφορυλίωση της PKCa. Σε *in vivo* μελέτη μοντέλου τοξικής (DMN επαγόμενης) ηπατικής ίνωσης παρατήρησαν ελάττωση της ίνωσης στα πειραματόζωα που χορηγήθηκε ναλοξόνη.

2.9 Κανναβινοειδή και αστεροειδή κύτταρα του ήπατος

Οι ψυχοδραστικές, αγχολυτικές και αναλγητικές ιδιότητες των ελαίων του φυτού *Cannabis sativa* είναι γνωστές στον άνθρωπο εδώ και περισσότερο από τρεις

χιλιετίες και το φυτό αυτό στις διάφορες μορφές του παραμένει το πιο ευρέως διαδεδομένο παράνομο ναρκωτικό στο δυτικό κόσμο. Παρόλο που σήμερα τα κανναβινοειδή και η φυσιολογία τους βρίσκονται στο επίκεντρο εκτενών μελετών και μεταξύ άλλων υπόσχονται νέους φαρμακευτικούς στόχους στην καταπολέμηση πολλών ασθενειών, η έρευνα πάνω στο αντικείμενο έχει ιστορία μόνο μερικών δεκαετιών.

Η έντονα υδρόφοβη φύση των ουσιών αυτών οδήγησε αρχικά στη λανθασμένη θεωρία ότι οι δράσεις τους οφείλονται απλά σε αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης³¹². Ο προσδιορισμός της χημικής δομής της βασικής δραστικής ουσίας, της Δ⁹-τετραυδροκανναβινόλης (THC) από τους Gaoni και Mechoulam (1964) και η μετέπειτα παρατήρηση τους ότι μόνο το Ι-στερεοϊσομερές είναι βιοδραστικό³¹³, οδήγησε στην απόρριψη της θεωρίας αυτής και άνοιξε το δρόμο για την μετέπειτα έρευνα. Μελέτες με συνθετικούς κανναβινοειδείς αγωνιστές οδήγησαν στην ανακάλυψη το 1990 του πρώτου υποδοχέα κανναβινοειδών, του CB1³¹⁴ με έντονη έκφραση στον εγκέφαλο αλλά και μικρότερη έκφραση σε ορισμένους περιφερικούς ιστούς, και τρία χρόνια αργότερα, του CB2³¹⁵ με έκφραση κυρίως σε κύτταρα της περιφέρειας αλλά και πιο περιορισμένα, στον εγκέφαλο. Η ανακάλυψη του πρώτου ενδογενούς προσδέματος έγινε από τους Devane και συν. το 1992³¹⁶. Παρόλο που ως σήμερα μόνο οι παραπάνω δύο υποδοχείς έχουν χαρακτηριστεί και κλωνοποιηθεί, φαρμακολογικά στοιχεία συνηγορούν στην ύπαρξη ακόμη ενός ή περισσοτέρων υποδοχέων³¹⁷.

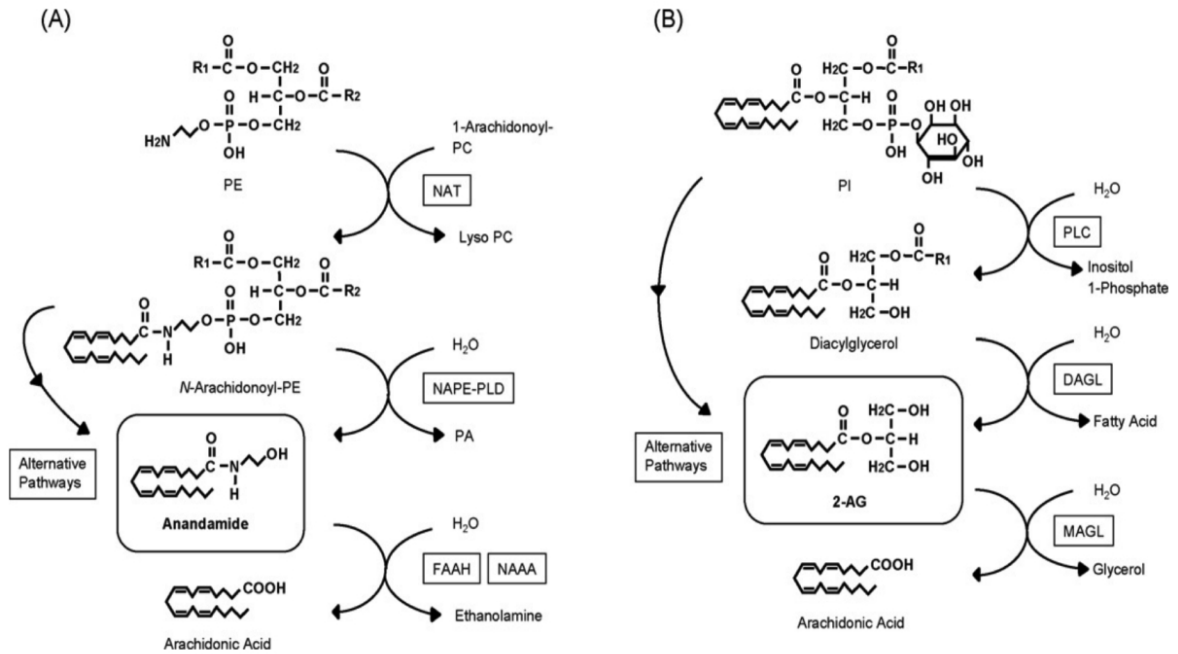
Ενδοκανναβινοειδή

Τα ενδοκανναβινοειδή είναι παράγωγα του αραχιδονικού οξέως που συνθέτονται με αρχικό υπόστρωμα ορισμένα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης.

Απαραίτητα υποστρώματα για τη σύνθεση ανανταμιδίου και 2-AG είναι η N-αραχιδονοϋλ-φωσφατιδυλεθανολαμίνη (NArPE) και η διακυλογλυκερόλες (DAGs) με αραχιδονικό οξύ στη θέση 2³¹⁸⁻⁻³²¹. Το συνθετικό μονοπάτι που ονομάζεται "μονοπάτι τρανσακυλίωσης-φωσφοδιεστεράσης" πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Απαραίτητο ένζυμο για το πρώτο στάδιο είναι η N-ακυλτρανσφεράση (NAT) και για το δεύτερο η N-ακυλφωσφατιδυλαιθανολαμινική φωσφολιπάση D (NAPE-PLD)² (Εικόνα 2.4).

Εκτός από το παραπάνω συνθετικό μονοπάτι, έχουν περιγραφεί δύο ακόμη μονοπάτια, το ένα εξαρτώμενο από τη δράση της φωσφολιπάσης C³²² και το άλλο από τη φωσφοδιεστεράση GDE1³²³, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι *in vivo* η σύνθεση των ενδοκανναβινοειδών ακολουθεί πιθανότατα πολλαπλά, παράλληλα μεταβολικά μονοπάτια το καθένα από τα οποία ρυθμιζόμενο από ξεχωριστούς μηχανισμούς.

Η απενεργοποίηση των ενδοκανναβινοειδών πραγματοποιείται ουσιαστικά με την υδρόλυση των αμιδικών ή εστερικών τους δεσμών και τα ένζυμα υπεύθυνα για τη δράση αυτή είναι η αμιδική υδρολάση λιπαρών οξέων (FAAH) για το ανανταμίδιο³²⁴ και η λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης (MAGL) για την 2-AG^{325;326}.



Εικόνα 2.4: Συνθετικά μονοπάτια ανανταμιδίου (A) και 2-AG (B)²

Ανανταμίδιο Το πρώτο ενδογενές κανναβινοειδές που απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε ήταν η N-αραχιδονοϋλεθανολαμίνη (AEA) ή όπως αργότερα ονομάστηκε, ανανταμίδιο³¹⁶. Το ανανταμίδιο επιδεικνύει υψηλή συγγένεια για τον CB1 υποδοχέα και μικρότερη για τον CB2. Παράγεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς³²⁷.

2-AG Λίγο μετά την ανακάλυψη του ανανταμιδίου ακολούθησε η παρατήρηση ότι ένας ήδη γνωστός ενδογενής μεταβολίτης, η 2-αραχιδονοϋλ-γλυκερόλη (2-AG) εμφανίζει υψηλή συγγένεια τόσο για τον CB1 όσο και για τον CB2 υποδοχέα.^{328;329}. Μαζί με το ανανταμίδιο αποτελούν τα σημαντικότερα και πιο καλά

μελετημένα ενδοκανναβινοειδή. Αντίθετα από το ανανταμίδιο, παράγεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Άλλα ενδοκανναβινοειδή Άλλα ενδογενή εικοσανοειδή παράγωγα με δράση κανναβινοειδούς αγωνιστή που έχουν περιγραφεί είναι ο 2-αραχιδονοϋλ-γλυκερολαιθέρας (2-AGE ή νολαδινικός αιθέρας)³³⁰, η N-αραχιδονοϋλ-ντοπαμίνη (NADA)^{331;332}, και η βιροδαμίνη³³³. Ο 2-AGE εμφανίζει υψηλότερη συγγένεια για τον CB1 από ότι για τον CB2 υποδοχέα^{330;334} και δρα επίσης ως μερικός αγωνιστής του διαύλου TRPV1³³⁵. Η NADA δρα ως αγωνιστής του CB1 υποδοχέα και είναι πολύ ισχυρός αγωνιστής του TRPV1³³². Η βιροδαμίνη είναι ανταγωνιστής του CB1 και αγωνιστής του CB2 υποδοχέα.

Υποδοχείς κανναβινοειδών

Οι υποδοχείς κανναβινοειδών ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες. Έχουν μικρή ομολογία, περίπου 44%, παρ όλες τις ομοιότητες στη δράση τους. Το διαμεμβρανικό τμήμα θεωρείται ότι είναι αυτό που δεσμεύει τους αγωνιστές³³⁶. Και οι δύο υποδοχείς είναι συζευγμένοι με Gα_{i/o} πρωτεΐνες. Η ενδοκυττάρια σηματοδότηση τους είναι εντυπωσιακά πολύπλοκη και αντικείμενο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος.

Διαφορετικοί αγωνιστές έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν διαφορετικά ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης και επιδεικνύουν επιλεκτικότητα για συγκεκριμένους υπότυπους G πρωτεΐνης. Ταυτόχρονα, οι ίδιοι οι υποδοχείς φαίνεται να διαθέτουν διαφορετικά τμήματα πρόσδεσης για διαφορετικούς αγωνιστές³³⁷. Άλλη μια εντυπωσιακή ιδιότητα των υποδοχέων είναι η έλλειψη συσχέτισης μεταξύ της πυκνότητας των υποδοχέων και της αποτελεσματικότητας πρόσδεσης των G-πρωτεϊνών³³⁸ το οποίο ενδεχομένως εξηγεί πως σημαντικές δράσεις προ-

κύπτουν από την διέγερση περιοχών με πολύ αραιή έκφραση υποδοχέων CB1 στον εγκέφαλο, όπως ο υποθάλαμος³³⁹ ή το εγκεφαλικό στέλεχος³⁴⁰.

Παρόλο που οι συγκεκριμένοι υπότυποι (i/o) G-πρωτεΐνης συνήθως προκαλούν αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης, τα κανναβινοειδή μπορούν επίσης να διεγείρουν τις ισομορφές 2, 4 και 7 μέσω της απελευθέρωσης των βγ υπομονάδων³⁴¹. Ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης έχει παρατηρηθεί επίσης όταν διεγείρεται ταυτόχρονα ο CB1 και ο ντοπαμινεργικός υποδοχέας D₂³⁴², πράγμα που ενδεχομένως οφείλεται σε ετεροδιμερισμό των δύο υποδοχέων³⁴³. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι οι υποδοχείς κανναβινοειδών μπορούν να συζευγνούνται με G_{q/11} πρωτεΐνες υπό το ερέθισμα συγκεκριμένων αγωνιστών³⁴⁴, ιδιότητα που θεωρείται ότι διευκολύνεται από τον διμερισμό των υποδοχέων.

Οι υποδοχείς κανναβινοειδών παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας ιονικών διαύλων. Μπορούν να αναστέλλουν διάφορους τύπους διαύλων ασβεστίου^{345;346} και ενεργοποιούν ορισμένους διαύλους καλίου³⁴⁷. Μπορούν να διεγείρουν και τις τρεις οικογένειες MAP κινασών, συμπεριλαμβανομένων των p44/42^{348;349}, p38^{350;351}, JUN-terminal kinase^{351;352} και ενεργοποιούν το μονοπάτι της PI3K³⁵³.

Δράσεις των ενδοκανναβινοειδών

Τα ενδοκανναβινοειδή και οι δράσεις τους είναι στο επίκεντρο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος. Οι θεραπευτικές δυνατότητες που ανοίγονται σήμερα³⁵⁴ ήταν ασύλληπτες πριν από μερικές δεκαετίες, ενώ η έρευνα είναι ακόμη σε πολύ πρώιμα στάδια. Μερικές από τις πιο καλά περιγεγραμμένες δράσεις τους αναφέρονται παρακάτω, ανά σύστημα.

Νευρικό σύστημα Γρήγορα μετά την ανακάλυψή του, το ανανταμίδιο χαρακτηρίστηκε ως πρώτης τάξεως νευριοδιαβιβαστής^{318;355}. Το σύστημα των ενδοκαν-

ναβινοειδών έχει πλήθος λειτουργιών στο κεντρικό και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Από τις πιο καλά μελετημένες είναι η ρύθμιση της συναπτικής πλαστικότητας³⁵⁶, η τροποποίηση της απάντησης στο στρες³⁵⁷⁻⁻³⁶², η ρύθμιση της διατροφικής συμπεριφοράς και της ενεργειακής ομοιόστασης^{363;364} η επεξεργασία κεντρικών και περιφερικών σημάτων πόνου^{365;366} καθώς και ο ρόλος τους στις γνωσιακές λειτουργίες και τη συμπεριφορά^{367;368}. Ολοένα αυξανόμενος όγκος δεδομένων εμπλέκουν το σύστημα των ενδοκανναβινοειδών σε ένα πλήθος νευρολογικών³⁶⁹⁻⁻³⁷² και ψυχιατρικών διαταραχών³⁷³.

Γαστρεντερικό σύστημα Υποδοχείς CB1 έχουν περιγραφεί στο ήπαρ και ένας από τους ρόλους τους είναι η λιπογένεση³⁷⁴. Οι CB2 υποδοχείς φαίνεται να παίζουν ρόλο στην κινητικότητα του εντέρου³⁷⁵.

Καρδιαγγειακό σύστημα Υποδοχείς CB1 υπάρχουν στο αγγειακό ενδοθήλιο³⁵¹. Αγωνιστές των CB1 υποδοχέων προκαλούν ελάττωση της αρτηριακής πίεσης³⁷⁶⁻⁻³⁷⁸, αλλά ο ακριβής μηχανισμός είναι πολύπλοκος και περιλαμβάνει δράση στα ίδια αγγεία^{346;378;379}, το μυοκάρδιο³⁸⁰⁻⁻³⁸², καθώς και επίδραση στο κεντρικό^{383;384} και περιφερικό νευρικό σύστημα³⁸⁵⁻⁻³⁸⁸. Στο μυοκάρδιο, CB1 υποδοχείς μεσολαβούν αρνητική ινότροπη δράση³⁸⁰ και μέσω της δράσεις των κανναβινοειδών στον TRPV1 υποδοχέα προκαλούν αρνητική χρονότροπη δράση³⁸⁹. Επίσης, οι CB1 υποδοχείς φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ισχαιμική προρύθμιση (ischemic preconditioning)^{390;391}, ενώ η ενεργοποίηση των CB2 υποδοχέων φαίνεται να επιβραδύνει την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας^{392;393}.

Ανοσοποιητικό σύστημα Τόσο CB1 όσο και CB2 υποδοχείς εκφράζονται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και το σύστημα των ενδοκανναβινοει-

δών μεσολαβεί σημαντικές ανοσορρυθμιστικές δράσεις³⁹⁴. Η έκφραση των υποδοχέων κανναβινοειδών στα κύτταρα του ανοσοποιητικού τροποποιείται κατά την ενεργοποίησή τους από κυτταροκίνες ή βακτηριακά προϊόντα όπως ο LPS τα οποία επίσης επάγουν τα ενζυμικά συστήματα υπεύθυνα για τη σύνθεση των ενδοκανναβινοειδών. Η ως τώρα έρευνα έχει καταδείξει κυρίως αντιφλεγμονώδεις δράσεις των ενδοκανναβινοειδών. Οι δράσεις τους είναι πολύπλοκες και περιλαμβάνουν τροποποίηση της έκφρασης κυτταροκινών όπως TNF-α, IL-12, IL-1, IL-6, IL-10 και χημειοκινών όπως CCL2, CCL5, CXCL8 και CXCL10, τροποποίηση της σηματοδότησης μέσω αδενοσίνης³⁹⁵, τροποποίηση της έκφρασης μορίων προσκόλλησης όπως ICAM-1 και P-selectin, ρύθμιση της μετανάστευσης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης^{394;396;397}.

Ρόλος των ενδοκανναβινοειδών στη βιολογία των αστεροειδών κυττάρων

Μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει ότι στο ήπαρ υπό φυσιολογικές συνθήκες εκφράζεται σε μικρή αλλά βιολογικά σημαντική ποσότητα υποδοχείς CB1^{374;398--402}. Συγκεκριμένα, CB1 υποδοχείς εκφράζονται στα ηπατοκύτταρα⁴⁰⁰⁻⁻⁴⁰², στα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών⁴⁰³⁻⁻⁴⁰⁶ και στα αστεροειδή κύτταρα⁴⁰⁷. CB2 υποδοχείς δεν ανιχνεύονται σε φυσιολογικές συνθήκες, αλλά εκφράζονται στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο⁴⁰⁸, στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση⁴⁰⁹, στην NAFLD (μη αλκοολική λιπώδη διήθηση)⁴¹⁰, στην ηπατική ίνωση⁴¹¹ και κατά την ηπατική αναγέννηση⁴¹².

Στο κίρρωτικό ήπαρ παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα ανανταμιδίου στη συστηματική κυκλοφορία αλλά παραδόξως όχι στις ηπατικές φλέβες ή το ηπατικό παρέγχυμα, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι δεν είναι το ήπαρ το σημείο παραγωγής τους⁴¹³. Κύρια πηγή ενδοκανναβινοειδών θεωρούνται τα μακροφάγα στα οποία η

σύνθεση ανανταμιδίου επάγεται από τον LPS και άλλα βακτηριακά προϊόντα^{414;415} που ως γνωστόν είναι αυξημένα στους κίρρωτικούς ασθενείς ως αποτέλεσμα αυξημένης βακτηριακής μετακίνησης.

Στο ινωτικό ήπαρ, η επίδραση με THC καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει απόπτωση στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα μέσω των CB2 υποδοχέων⁴¹¹ πράγμα που προσδίδει στους υποδοχείς αυτούς πιθανή αντιινωτική και ηπατοπροστατευτική δράση⁴¹⁶. Μελέτες ηπατικής ίνωσης σε CB2(-/-) ποντικούς έδειξαν σημαντικά μεγαλύτερη απάντηση σε προϊνωτικά ερεθίσματα⁴¹¹. Σε κίρρωτικούς αρρουραίους, η χρόνια χορήγηση του ειδικού CB2 αγωνιστή JWH-133 ελάττωσε τους κυτταρικούς δείκτες ίνωσης⁴¹⁷. Παραδόξως, η χρήση κάνναβης από ασθενείς με ηπατίτιδα C προήγαγε την ηπατική ίνωση⁴¹⁸. Από την τελευταία παρατήρηση δημιουργήθηκε η υπόθεση ότι η ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων ευθύνονταν για το προϊνωτικό αποτέλεσμα το οποίο υποστηρίζεται από τις παρατηρήσεις ότι τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα εκφράζουν CB1. Η γενετική ή φαρμακολογική εξάλειψη των CB1 υποδοχέων σχετίζεται με ελάττωση των ινωτικών δεικτών σε μοντέλα ηπατικής ίνωσης από τετραχλωράνθρακα σε πειραματόζωα^{407;419}.

Από τις παραπάνω μελέτες προκύπτει το συμπέρασμα ότι το σύστημα των ενδογενών καναβινοειδών είναι δυνητικός στόχος για μελλοντικές φαρμακευτικές παρεμβάσεις στην ηπατική ίνωση, με ενδεχόμενους στόχους την ενεργοποίηση με ειδικούς αγωνιστές CB2 υποδοχέων στο ήπαρ, τον φαρμακευτικό αποκλεισμό των προϊνωτικών CB1 υποδοχέων ή την διαμεσολάβηση για την ελάττωση της σύνθεσης του ισχυρού αγωνιστή του CB1, ανανταμιδίου.

2.10 Μελλοντικοί θεραπευτικοί στόχοι στην ηπατική ίνωση

Παρά τη σημαντική πρόοδο στην κατανόηση των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών της ηπατικής ίνωσης, σήμερα υπάρχει πολύ περιορισμένος αριθμός αντι-ινωτικών φαρμάκων για τη θεραπεία ασθενών με νόσο σε προχωρημένα στάδια. Αναστροφή της ίνωσης για παράδειγμα παρατηρείται σε ορισμένους ασθενείς με ηπατίτιδα C υπο θεραπεία με ιντερφερόνη⁴²⁰ αλλά πολλοί ασθενείς δεν ανταποδύν σ' αυτή τη θεραπεία και αναπτύσσουν κίρρωση. Διάφορα σκευάσματα όπως μαλοτιλάτη⁴²¹ και κολχικίνη⁴²² δοκιμάστηκαν στο παρελθόν, με μάλλον απογοητευτικά αποτελέσματα.

Η κατανόηση της βιολογίας των αστεροειδών κυττάρων και του ρόλου τους στην παθοφυσιολογία της ηπατικής ίνωσης και αναγέννησης προσφέρει νέους στόχους για μελλοντική φαρμακευτική αντιμετώπιση της ίνωσης στα χρόνια ηπατικά νοσήματα. Ιδανικά, η αντι-ινωτική θεραπεία θα είναι ειδική για το ήπαρ και θα στρέφεται κατά των προϊνωτικών μηχανισμών στοχεύοντας την εναπόθεση θεμέλιας ουσίας, προάγοντας την αποδόμηση του ινώδους ιστού και αναδόμηση της θεμέλιας ουσίας, την αναστολή της ενεργοποίησης των αστεροειδών κυττάρων ή την μετάβαση των ενεργοποιημένων κυττάρων σε ανενεργά, καθώς και την απόπτωση τους. Ενδεχόμενοι μοριακοί στόχοι αποτελούν μεταξύ άλλων ο TGF-β, ο PPAR-γ και τα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια τους.

Διάφοροι παράγοντες όπως οι προαναφερθέντες μαλοτιλάτη και κολχικίνη, η κουρκουμίνη και σιλυμαρίνη έχουν δείξει αποτελεσματικότητα *in vitro* και σε μοντέλα ίνωσης σε πειραματόζωα^{422;423}. Νεότερος στόχος είναι η ανάπτυξη siRNA με σκοπό την αποσιώπηση γονιδίων-κλειδιών στην ηπατική ίνωση. Η ανάπτυξη

siRNA και εν συνεχεία shRNA εναντίον του υποδοχέα TGF-β προκάλεσε αποτελεσματικό knock-down του υποδοχέα με επακόλουθη ελάττωση παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών, κολλαγόνου τύπου 1 και TIMP-1, υπονοώντας την ενδεχόμενη κλινική αποτελεσματικότητα των siRNAs και shRNAs στην ηπατική ίνωση⁴²⁴.

Υποσχόμενες επίσης είναι μελέτες με micro-RNA (miRNA). Τα μόρια αυτά είναι μικρά ενδογενή μόρια RNA που ρυθμίζουν τη μεταγραφική ή μετα-μεταγραφική έκφραση γονιδίων στοχεύοντας μη-κωδικοποιητικές περιοχές μεταγραφημάτων mRNA^{425;426}. Μελέτη του miRNA miR-29 σε ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα έδειξε ότι του μόριο αυτό μπορεί να προκαλεί αναστολή της σύνθεσης PDGF-C και IGF και ότι η ενεργοποίηση του αστεροειδούς κυττάρου σχετίζεται με υπο-έκφραση του miR-29⁴²⁷. Το αντικείμενο της επέμβασης στη γονιδιακή έκφραση με miRNA βρίσκεται ακόμη σε εμβρυϊκό στάδιο αλλά έχει ήδη προκαλέσει πολύ μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον και υπόσχεται επανάσταση στην φαρμακολογική θεραπεία χρόνιων νοσημάτων και μέχρι πρότινος αθεράπευτων γενετικών νοσημάτων όχι μόνο του ήπατος αλλά οποιουδήποτε οργάνου και συστήματος.

3

Αυξητικοί παράγοντες και αστεροειδή κύτταρα

Όπως είδαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο ένα πλήθος αυξητικών παραγόντων παίζουν σπουδαίο ρυθμιστικό ρόλο στις λειτουργίες τόσο των ανενεργών όσο και των ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων του ήπατος. Σ' αυτό το κεφάλαιο εξετάζουμε σε βάθος τους δύο σημαντικότερους από αυτούς: τον αυξητικό παράγοντα προερχόμενο από αιμοπετάλια (PDGF) και τον μεταμορφωτικό αυξητικό παράγοντα β (TGF-β). Εξετάζουμε επίσης και μία ακόμη κυτταροκίνη με σημαντικό ρόλο σε πολλές χρόνιες ηπατικές νόσους, τον παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α).

3.1 Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β (TGF- β)

Ο TGF- β είναι κεντρικής σημασίας αυξητικός παράγοντας για την εμβρυογένεση, ανάπτυξη και ωρίμανση των ιστών και τη διαφοροποίηση των κυττάρων σε όλα τα θηλαστικά. Έχει ευρύτατο φάσμα βιολογικών λειτουργιών και παράγεται από πλήθος κυττάρων σε όλους τους ιστούς. Όλα τα ανθρώπινα κύτταρα απαντούν στην επίδραση αυτού του παράγοντα. Ως αποτέλεσμα, εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία πλήθους ασθενειών από όλα τα όργανα και συστήματα. Ως εκ τούτου, η κυτταροκίνη αυτή και το σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω του οποίου ενεργεί είναι αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης για την εξεύρεση πιθανών θεραπευτικών στόχων έναντι των νοσημάτων αυτών. Έχει όπως είδαμε σε προηγούμενα κεφάλαια κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ηπατικής ίνωσης και στη βιολογία των αστεροειδών κυττάρων.

3.1.1 Χημική δομή και ισομορφές

Ο TGF- β ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια συγγενών μορίων με περισσότερα από 30 μέλη, που μπορούν να χωριστούν σε δύο υποοικογένειες. Παράγοντες όπως οι ακτιβίνες, nodals, lefty, μυστατίνη και ο TGF- β ανήκουν στη μία υποοικογένεια, ενώ οι μορφοποιητικές πρωτεΐνες οστού (BMPs), η αντι-μυλλεριανή ορμόνη (AMH) καθώς και πλήθος άλλων αυξητικών και διαφοροποιητικών παραγόντων (GDFs) συγκαταλέγονται στην άλλη υποοικογένεια^{428;429}. Οι ακτιβίνες, BMPs, GDFs, AMH και nodals παίζουν ρόλο στη διαφοροποίηση των πολυδύναμων εμβρυϊκών κυττάρων, το σχηματισμό του άξονα του σώματος, την δεξιά-αριστερή συμμετρία και την οργανογένεση. Στον ενήλικο οργανισμό έχουν πλήθος άλλων

λειτουργιών όπως ρύθμιση της ανάπτυξης και επιδιόρθωσης των οστών (BMPs), αναστολή της ανάπτυξης των μυών (myostatin) και ρύθμιση της λειτουργίας των γονάδων (ακτιβίνη, GDF9).

Στα θηλαστικά ο TGF-β υπάρχει σε τρεις ισομορφές: TGF-β1, -β2 και -β3. Ο TGF-β1 είναι πολυπεπτίδιο με 390 αμινοξέα ενώ οι TGF-β2 και -β3 έχουν 412 αμινοξέα έκαστος. Οι τρεις μορφές εμφανίζουν υψηλού βαθμού ομολογία. Η ισομορφή με πιο ευρεία κατανομή, σε μεγαλύτερη αφθονία και κατ'επέκταση πιο καλά μελετημένη, είναι ο TGF-β1. Ο TGF-β παράγεται από πλήθος κυττάρων, μεταξύ άλλων επιθηλιακών, μακροφάγων, αιμοπεταλίων και κυττάρων μεσεγχυματικής προέλευσης.

3.1.2 Σύνθεση, έκκριση και ενεργοποίηση του TGF-β

Ο TGF-β συντίθεται ως ομοδιμερής προ-πρωτεΐνη και το διμερές προπεπτίδιο διαχωρίζεται ενδοκυττάρια από τον TGF-β. Το ελεύθερο προπεπτίδιο έχει υψηλή συγγένεια για τον TGF-β τον οποίο και προσδένει με μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Ο TGF-β δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον υποδοχέα του σ' αυτή τη μορφή και για το λόγο αυτό το σύμπλοκο ονομάζεται "small latent complex" (SLC) και το προπεπτίδιο ονομάζεται "latency associated protein" (LAP). Το LAP διμερές είναι συνήθως συνδεδεμένο με δισουλφιδικούς δεσμούς με ένα δεύτερο πεπτίδιο που ονομάζεται "latent transforming growth factor-β binding protein" (LTBP) και αυτή η τριμοριακή δομή ονομάζεται "large latent complex" (LLC). Ο TGF-β εκκρίνεται από το κύτταρο σ' αυτή τη μορφή τριπεπτιδικού συμπλόκου. Η αποδέσμευση του TGF-β από το LLC έχει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στη βιολογική δράση του TGF-β.⁴³⁰ Τέσσερις ισομορφές LAP έχουν περιγραφεί (LAP-1, -2, -3, -4)⁴³¹. Μεταλλάξεις των LAP ή LTBP μπορούν να προκαλέσουν διαταραχές στη

σηματοδότηση του TGF-β⁴³².

Ενεργοποίηση του TGF-β μπορεί να πραγματοποιηθεί με επίδραση οξέος⁴³³, με επίδραση ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS)⁴³⁴ και με επίδραση ειδικών ενζύμων. Στα ένζυμα που μπορούν να ενεργοποιούν το LLC σύμπλοκο ελευθερώνοντας τον ενεργό TGF-β ανήκουν η θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1)⁴³⁵, οι μεταλλοπρωτεάσες θεμέλιας ουσίας (MMPs) όπως MMP-2 και MMP-9⁴³⁶ και πρωτεάσες του πλάσματος με σημαντικότερη την πλασμίνη⁴³⁷. Επίσης, ο TGF-β μπορεί να απελευθερώνεται από το σύμπλοκο μέσω αλληλεπίδρασης με ιντεγκρίνες και συγκεκριμένα ιντεγκρίνες που περιέχουν την αV αλυσίδα⁴³⁸.

3.1.3 Υποδοχείς του TGF-β

Ως σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 3 μεμβρανικοί υποδοχείς TGF-β (TGFR-I, -II, -III). Ο TGFR-III δεν αποτελεί υποδοχέα με την αυστηρή έννοια καθώς δεν προκαλεί ενδοκυττάρια σηματοδότηση. Πρόκειται για μια μεμβρανική πρωτεογλυκάνη θειϊκής ηπαράνης/θειϊκής χονδροϊτίνης η οποία προσδένει TGF-β και άλλα προσδέματα αυξάνοντας έτσι τοπικά τη συγκέντρωσή τους στην επιφάνεια του κυττάρου και διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση με τους TGFR-I και -II. Οι δύο τελευταίοι είναι πρωτεΐνες αποτελούμενες από περίπου 500 αμινοξέα. Το N- άκρο βρίσκεται στην εξωκυττάρια πλευρά της μεμβράνης και το C- άκρο βρίσκεται ενδοκυττάρια και έχει δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης⁴³⁹. Στους ανθρώπους κωδικοποιούνται 7 διαφορετικές μορφές TGFR-I και 5 μορφές TGFR-II. Οι TGFR-I και -II σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με άλλους υποδοχείς και ενεργοποιούνται από μεγάλο αριθμό διαφορετικών προσδεμάτων⁴⁴⁰.

Ενεργοποίηση Η πρόσδεση του TGF-β (ή άλλων αγωνιστών) με τον TGFR-II έχει σαν αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση του τελευταίου με τον TGFR-I η οποία

οδηγεί στη δημιουργία ενός ετεροτετραμερούς που αποτελείται από δύο TGFR-I και δύο TGFR-II μόρια. Ο TGFR-II φωσφορυλιώνει τον TGFR-I με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της δράσης κινάσης σερίνης/θρεονίνης του τελευταίου, καθώς και την τροποποίηση αυτής της περιοχής σε περιοχή πρόσδεσης των πρωτεϊνών Smad^{429;441--443}

3.1.4 Smads και ενδοκυττάριο μονοπάτι μεταγωγής του σήματος

Οι Smad είναι μικρές ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες που χαρακτηρίζονται από ομόλογες περιοχές στα N- και C- άκρα τους που ονομάζονται περιοχές ομολογίας Mad (MH-1 και MH-2). Ένας ενδιάμεσος συνδέτης ενώνει τις περιοχές MH-1 και MH-2. Η ενδιάμεση αυτή περιοχή μπορεί να επιστρατεύει λιγκάσες ουβικουιτίνης καθώς και να φωσφορυλιώνεται από κινάσες όπως MAPK και CDK⁴²⁹. Τρεις ομάδες SMADs έχουν περιγραφεί:

1. Smads υποδοχέα (R-Smads) που περιλαμβάνει τα Smad-1, -2, -3, -5 και -8
2. Ο μεσολαβητής Smad-4
3. Ανασταλτικά Smads (I-Smads) που περιλαμβάνει τα Smad-6 και -7

Τα R-Smads προσδένονται απευθείας στον TGFR-I με τη βοήθεια διαμεσολαβητικών πρωτεϊνών όπως SARA και HGS. και αποτελούν ειδικά υποστρώματα για φωσφορυλίωση από αυτόν. Τα Smad-2 και -3 είναι υποστρώματα του TGF-β υποδοχέα⁴⁴⁴⁻⁻⁴⁴⁶, ενώ τα Smad-1, -5 και -8 αποτελούν υποστρώματα των υποδοχέων BMP⁴⁴⁷⁻⁻⁴⁵⁰. Μετά τη φωσφορυλίωση από τον TGFR-I τα R-Smads δημιουργούν σύμπλοκο με το Smad-4⁴⁵¹ και το ετεροδιμερές μετατοπίζεται στον πυρήνα.

Το Smad σύμπλοκο αλληλεπιδρά με πολλούς άλλους ενεργοποιητές ή καταστολείς γονιδίων που τροποποιούν την αλληλεπίδρασή του με συγκεκριμένες περιοχές εκκινήσεως σε εκατοντάδες γονίδια ρυθμίζοντας την έκφραση τους^{441;452}. Έτσι η κατάσταση έκφρασης αυτών των ενεργοποιητών ή καταστολέων στο κύτταρο τροποποιεί την απάντηση του κυττάρου στο ερέθισμα του TGF-β με επιλεκτική μεταγραφή ή καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων. Τα ανασταλτικά Smads δρουν διακόπτοντας την μέσω προσδέματος σηματοδότηση. Συγκεκριμένα το Smad-6 προσδένει το φωσφορυλιωμένο Smad-1 εμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή του με το Smad-4 και το Smad-7 προσδένεται στον ενεργοποιημένο υποδοχέα TGF-β και εμποδίζει την πρόσδεση και ενεργοποίηση των R-Smads.

Σηματοδότηση ανεξάρτητη από Smad

Εκτός από το πιο πάνω περιγεγραμμένο σηματοδοτικό μονοπάτι ο TGF-β ενεργοποιεί πολλούς άλλους διαμεσολαβητές όπως MAPK, PI3K, TRAF6-TAK-p38/JNK, Rho-Rock μεταξύ άλλων. Αυτοί οι μεσολαβητές με τη σειρά τους τροποποιούν τη σηματοδότηση μέσω Smad.

3.1.5 Ο TGF-β στην ηπατική ίνωση

Από τις τρεις ισομορφές του TGF-β, μόνο ο TGF-β1 έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ηπατική ίνωση. Παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα και κύτταρα Kupffer, ενώ τόσο τα ενδοθηλιακά κύτταρα όσο και τα ηπατοκύτταρα συνεισφέρουν προάγοντας τη μετατροπή του ανενεργού TGF-β1 στην βιολογικά ενεργή του μορφή.

Η κυτταροκίνη αυτή παίζει κεντρικό ρόλο στην ίνωση. Προκαλεί απόπτωση ηπατοκυττάρων, ενεργοποίηση και επιστράτευση φλεγμονωδών κυττάρων και λεμ-

φοκυττάρων στο ήπαρ, διαφοροποίηση ενδογενών κυττάρων (ινοβλάστες, αστεροειδή κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα) σε μυοϊνοβλάστες που παράγουν θεμέλια ουσία και προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Αναστέλλει την απόπτωση των ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων και την αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας.

Αποτελεί το πιο πρώιμο και απαραίτητο ερέθισμα για την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των αστεροειδών κυττάρων. Υπό το ερέθισμα του TGF-β1 τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα και άλλα μυοϊνοβλαστικά κύτταρα παράγουν κολλαγόνο τύπου I, III και IV, πρωτεογλυκάνες όπως διγλυκάνη και ντεκορίνη, γλυκοπρωτεΐνες όπως ινωδονεκτίνη, λαμινίνη, τενασίνη και γλυκοζαμινογλυκάνες, ελαττώνουν την παραγωγή MMPs και αυξάνουν την παραγωγή TIMPs. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι η έντονη αύξηση της έκφρασης υποδοχέων PDGF στο ενεργοποιημένο αστεροειδές κύτταρο είναι εξαρτώμενη από τον TGF-β1⁴⁵³.

Μοντέλα ηπατικής ίνωσης στα οποία η παραγωγή TGF-β1 μπορούσε τεχνητά να ανασταλεί στα πειραματόζωα έδειξαν ότι η ίνωση μπορούσε να σταματήσει όταν σταματούσε η παραγωγή TGF-β1⁴⁵⁴. Η έκφραση TGF-β1 είναι αυξημένη στο ινωτικό ήπαρ ασθενών και πειραματόζωων με κίρρωση και η συγκέντρωση του TGF-β1 συσχετίζεται με το βαθμό της ίνωσης^{455;456}.

3.2 Ο προερχόμενος από αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας (PDGF)

Ο PDGF είναι αυξητικός παράγοντας με ιδιαίτερα ισχυρή μιτογόνο δράση σε κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης όπως λεία μυϊκά κύτταρα και νευρογλοιακά κύτταρα. Στο αναπτυσσόμενο έμβρυο παίζει μεταξύ άλλων ρόλο στην οργανογένεση, με ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του προσωπικού κρανίου

και των τριχοθυλάκων, την ανάπτυξη του πνεύμονα, του εντέρου, την αγγειογένεση και την ανάπτυξη των ολιγοδενδροκυττάρων. Στον ανεπτυγμένο οργανισμό ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση, τη σπερματογένεση και την αναγέννηση κατεστραμμένων ιστών. Όπως ο TGF-β, εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων όπως η συστηματική σκλήρυνση, η ηπατική ίνωση και σε διάφορους όγκους όπως τα κακοήγη γλοιώματα του κεντρικού νευρικού συστήματος⁴⁵⁷.

3.2.1 Χημική δομή και ισομορφές

Ο PDGF περιγράφηκε ως αυξητικός παράγοντας που μπορούσε να προκαλεί πολλαπλασιασμό σε καλλιεργημένους ινοβλάστες. Μετέπειτα μελέτες έδειξαν ότι αποτελεί ισχυρότατο μιτογόνο για μεσεγχυματικής προέλευσης κύτταρα.^{458;459} Απομονώθηκε σε καθαρή μορφή το 1979⁴⁶⁰. Αρχικά αναγνωρίστηκαν δύο ισομορφές, οι PDGF-A και -B προερχόμενες από διαφορετικά γονίδια. Δεκαετίες αργότερα, με βάση μελέτες γονιδιακής ομολογίας, ανακαλύφθηκαν δύο ακόμη ισομορφές, επίσης από διαφορετικά γονίδια, οι PDGF-C και -D.

Η βιολογικά ενεργή μορφή του PDGF αποτελείται από δισουλφιδικά συνδεδεμένα ομοδιμερή A-, B-, C- και D- πεπτιδικών αλυσών, καθώς και το ετεροδιμερές PDGF-AB.

3.2.2 Σύνθεση, έκκριση και ενεργοποίηση

Όλες οι ισομορφές PDGF παράγονται ως προ-πρωτεΐνες. Οι PDGF-AA, -BB και -AB κόβονται από το προ-πεπτίδιο ήδη ενδοκυττάρια, μέσα στα εκκριτικά κυστίδια, ενώ οι PDGF-CC και -DD εκκρίνονται στην ανενεργή τους μορφή. Η ενεργοποίησή τους γίνεται έτσι εξωκυττάρια και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθ-

μιση της λειτουργίας των μορίων αυτών. Η ενεργοποίηση γίνεται με πρωτεόλυση από πλασμίνη ή tPA για τον PDGF-CC ή uPA ή ματριπτάση (MT-Sp1) για τον PDGF-DD^{457;461--464}.

3.2.3 Οι υποδοχείς του PDGF

Δύο ξεχωριστοί υποδοχείς PDGF είναι γνωστοί σήμερα, ο PDGFRα και ο PDGFRβ. Οι δύο υποδοχείς έχουν παρόμοια δομή και αποτελούνται από ένα εξωκυττάριο τμήμα με 5 τομείς με δομή παρόμοια με αυτής των ανοσοσφαιρινών (Ig-like domains) και ένα ενδοκυττάριο τμήμα με περιοχές κινάσης το οποίο περιέχει χαρακτηριστικά ενδιάμεσα τμήματα περι τα 100 αμινοξέα χωρίς ομολογία με κινάσες. Η σύνδεση με τον PDGF συμβαίνει κυρίως στους Ig-like domains 2 και 3. Η σύνδεση προκαλεί διμερισμό των υποδοχέων και η αλληλεπίδραση των δύο υποδοχέων σταθεροποιείται χάρη στη δράση της Ig-like domain 4^{465;466}. Οι PDGF-AA, -AB, -BB και -CC προκαλούν τη δημιουργία ομοδιμερών υποδοχέων αα ενώ οι PDGF-BB και -DD προκαλούν τη δημιουργία ββ ομοδιμερών και ο PDGF-DD αβ ετεροδιμερών υποδοχέων. Οι διαφορετικές ισομορφές του υποδοχέα είναι δομικά και λειτουργικά συγγενείς και μέχρι σήμερα οι μικρές διαφορές που έχουν περιγραφεί στη λειτουργία τους δεν φαίνεται να έχουν μεγάλη σημασία στη φυσιολογία του κυττάρου.

Η ακριβής τρισδιάστατη δομή του υποδοχέα δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστή και τα γεγονότα που ακολουθούν την πρόσδεση του PDGF και προκαλούν την ενεργοποίηση του υποδοχέα δεν είναι πλήρως κατανοητά. Παρόλα αυτά είναι γνωστό ότι η αλληλεπίδραση και διμερισμός των υποδοχέων είναι κρίσιμης σημασίας για την ενδοκυττάρια μετάδοση του σήματος καθώς προκαλεί αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα η οποία αφενός αλλάζει τη χωροδιάταξη του ενδοκυττάρου

τμήματος του υποδοχέα και ενεργοποιεί την περιοχική κινάσης και αφετέρου δημιουργεί περιοχές πρόσδεσης για σηματοδοτικά μόρια περιέχοντα SH2- τομείς⁴⁵⁷.

3.2.4 Ενδοκυττάρια μεταγωγή του σήματος

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα PDGF έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση δράσης φωσφοτυροσινικής κινάσης αλλά και αναστολή της δράσης φωσφατάσων. Η τελευταία φαίνεται να σχετίζεται με PDGF-εξαρτώμενη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου⁴⁶⁷. Η οξειδωση ενός κρίσιμου υπολείμματος κυστεΐνης φαίνεται να προκαλεί απενεργοποίηση της φωσφατάσης⁴⁶⁸.

Ήδη μέσα σε μερικά λεπτά από την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα στο κύτταρο έχουν ενεργοποιηθεί πολλά σηματοδοτικά συστήματα. Μέλη τουλάχιστον 10 διαφορετικών οικογενειών πεπτιδίων με SH2- περιοχές προσδέονται σε φωσφορυλιωμένα υπολείμματα του υποδοχέα PDGF. Αυτές περιλαμβάνουν κινάσες, όπως της οικογένειας Src, φωσφατάσες όπως η τυροσινική φωσφατάση SHP-2, φωσφολιπάσες όπως PLC-γ, η ενεργοποιητική GTPάση του Ras καθώς και μέλη της οικογένειας STAT. Επίσης στον υποδοχέα προσδέονται μόρια χωρίς ενζυματική δράση τα οποία σχηματίζουν συμπλέγματα ή τροποποιούν με άλλους τρόπους τη δράση άλλων σηματοδοτών. Παραδείγματα αποτελούν η p85 που προσδέεται στην PI3K, η Grb2 που προσδέεται στο SOS1 το οποίο ενεργοποιεί το Ras και κατ'έπекταση το Erk και το μονοπάτι των MAP-κινάσων, και πλήθος άλλων μορίων όπως Shc, Nck, Crk, GAB, κ.α.⁴⁵⁷.

3.2.5 Ο ρόλος του PDGF στην ηπατική ίνωση

Κύρια πηγή του PDGF στο ινωτικό ήπαρ είναι τα κύτταρα του Kupffer. Επίσης όμως παράγεται από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα στα οποία και δρα

αυτοκρινώς. Αποτελεί το ισχυρότερο μιτογόνο ερέθισμα για τους μυοϊνοβλάστες και παρέχει ισχυρό αντι-αποπτωτικό σήμα στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα¹⁸⁷. Επιπλέον τα κύτταρα αυτά εκδηλώνουν χημειοταξία υπό το ερέθισμα του PDGF¹⁷⁸.

Η παραγωγή PDGF καθώς και του υποδοχέα του είναι αυξημένη στους ασθενείς με χρόνια ηπατική νόσο^{469;470}. Νεότερα δεδομένα εμπλέκουν την αυξημένη παραγωγή PDGF-C στο κίρρωτικό ήπαρ με την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος⁴⁷¹, εξηγώντας εν μέρει την αυξημένη επίπτωση αυτής της μορφής καρκίνου στους ασθενείς με κίρρωση.

Μελέτες με συνθετικούς αναστολείς του PDGF υποδοχέα σε πειραματικά μοντέλα ίνωσης έχουν δείξει ελάττωση ή καθυστέρηση της ίνωσης και της νεοαγγεογένεσης στο κίρρωτικό ήπαρ, ελάττωση της φλεγμονώδους διήθησης και της αναδόμησης της θεμέλιας ουσίας⁴⁷²⁻⁻⁴⁷⁴. Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι οι παραπάνω δράσεις παρατηρούνται κυρίως όταν η αναστολή του PDGF υποδοχέων συμβεί στα αρχικά στάδια της ίνωσης, ενώ σε πιο προχωρημένα στάδια η δεν έχει το ίδιο δραματικά αποτελέσματα⁴⁷⁵.

Ο ρόλος των φωσφοτυροσινικών φωσφατασών

Η ρύθμιση της δράσης των PDGF υποδοχέων βρίσκεται υπό στενό έλεγχο στο φυσιολογικό κύτταρο. Πλήθος μηχανισμών έχουν αναγνωρισθεί, άλλοι από τους οποίους επαυξάνουν τη σηματοδότηση και άλλοι από τους οποίους αναστέλλουν τη σηματοδότηση ή απενεργοποιούν τον υποδοχέα⁴⁵⁷.

Ένας από τους μηχανισμούς τροποποίησης του σήματος είναι μέσω φωσφοτυροσινικών φωσφατασών (pTyr-φωσφατάσες) οι οποίες αποφωσφορυλιώνουν πολλά από τα υποστρώματα του PDGFR αλλά και τον ίδιο τον υποδοχέα, απενερ-

γοποιώντας τον. Παραδείγματα τέτοιων φωσφατασών είναι οι PTP1B, TC-PTP, PTPRJ/DEP-1, η SHP-1 και η SHP-2⁴⁵⁷. Οι pTyr-φωσφατάσες δρουν επαυξάνοντας ή αναστέλλοντας συγκεκριμένα μονοπάτια της ενδοκυττάριας σηματοδότησης, ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο τη σηματοδότηση πλήθους υποδοχέων όπως ο PDGFR και ο IGFR. Δύο από τις πιο καλά μελετημένες είναι οι SHP-1 και SHP-2, μέλη της οικογένειας φωσφατασών που περιέχουν ομολογίες Src-2.

Η SHP-1 δρα κυρίως ως αρνητικός τροποποιητής του σήματος του PDGFR ενώ η SHP-2 μπορεί να απενεργοποιεί τον υποδοχέα και έναν αριθμό υποστρωμάτων του, δρα όμως και αυξητικά για τα μονοπάτια Erk 1/2 και Akt^{457;476}. Στα αστεροειδή κύτταρα, η SHP-1 φαίνεται ότι δρα ανασταλτικά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και η επίδραση με ουσίες που επάγουν την έκφρασή της όπως το βοσουελλικό οξύ (φυσικό παράγωγο του φυτού *Boswellia serrata*) έχει συνεργιστική δράση με τον συνθετικό αναστολέα του PDGFR imatinib⁴⁷⁶.

3.3 Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α)

Ο TNF-α είναι μία από τις σημαντικότερες κυτταροκίνες στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης στη φλεγμονή. Παίζει βασικό ρόλο στην ενεργοποίηση των μακροφάγων και λεμφοκυττάρων αλλά έχει πλήθος άλλων λειτουργιών μεταξύ των οποίων η προαγωγή της απόπτωσης αλλά και της διαφοροποίησης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού υπο ορισμένες συνθήκες. Εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία πολλών χρόνιων νοσημάτων όπως μεταξύ άλλων η ρευματοειδής αρθρίτιδα, οι φλεγμονώδεις εντεροπάθειες αλλά και πολλά χρόνια ηπατικά νοσήματα.

Η ύπαρξη ενός διαλυτού παράγοντα με την ιδιότητα να ενισχύει την ανοσολογική απάντηση απέναντι σε κακοήθεις όγκους είχε αναγνωριστεί ήδη προ 100 χρό-

νων από τον ιατρό William B Coley. Το 1975 αναγνωρίστηκε από τους Carwell και συν. μία διαλυτή κυτταροκίνη η οποία παράγεται κατόπιν ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος και η οποία έχει τη δυνατότητα να προκαλεί ισχυρή κυτταροτοξικότητα σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές και νέκρωση όγκων σε πειραματόζωα. Η κυτταροκίνη αυτή ονομάστηκε "παράγοντας νέκρωσης όγκων". Το 1984 με κλωνοποίηση του cDNA του TNF αναγνωρίστηκε η δομική και λειτουργική ομολογία με την λεμφοτοξίνη (LT) α. Αργότερα περιγράφηκαν δύο υποδοχείς του TNF και αναγνωρίστηκε ότι ο TNF είναι το πρωτότυπο μέλος μιας μεγάλης οικογένειας κυτταροκινών, της οικογένειας των TNF προσδεμάτων^{477;478}.

3.3.1 Σύνθεση και χημικές μορφές

Στην αρχική του μορφή, ο TNF-α παράγεται ως μια μεμβρανική πρωτεΐνη 26kDa (tmTNF-α). Η διαλυτή μορφή του (sTNF-α) είναι 17kDa και παράγεται με τη δράση μιας εξωκυττάριας μεταλλοπρωτεϊνάσης, του μετατρεπτικού ενζύμου του TNF-α (TACE; ADAM17)⁴⁷⁹⁻⁻⁴⁸¹. Η μεμβρανική μορφή του TNF-α λειτουργεί επίσης ως προσδέτης για τον υποδοχέα του TNF ή και ως υποδοχέας, μεταγόντας εξωκυττάρια σήματα στο κύτταρο⁴⁸². Και οι δύο μορφές είναι βιολογικά ενεργές και η μεμβρανική μορφή είναι δραστικότερη. Στην ενεργή τους μορφή σχηματίζουν ομοτριμερή με χαρακτηριστική κωνική μορφή⁴⁸³.

Ο TNF-α παράγεται κυρίως από μακροφάγα και T-λεμφοκύτταρα αλλά πολλά άλλα κύτταρα μπορούν να παράγουν την κυτταροκίνη αυτή όπως ουδετερόφιλα, NK-κύτταρα, B-λεμφοκύτταρα, κερατινοκύτταρα, λιποκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, κ.α.⁴⁷⁸.

Ισχυρό ερέθισμα για την παραγωγή του είναι η ενδοτοξίνη των Gram αρνητικών βακτηρίων (λιποπολυσακχαρίτης, LPS) αλλά παράγεται επίσης από πλήθος

άλλων ερεθισμάτων όπως IL-1, IFN- γ , GM-CSF, TGF- β , ιικά και μυκωτικά αντιγόνα, εντεροτοξίνες, το C5a κλάσμα του συμπληρώματος, ανοσοσυμπλέγματα, καθώς και υπό το ερέθισμα του ίδιου του TNF- α μέσω αυτοκρινών μηχανισμών. Η παραγωγή του ελαττώνεται από την IL-4 και άλλους παράγοντες που ελαττώνουν το επίπεδο του ενδοκυττάριου cAMP^{478;484;485}.

Η σύνθεση της κυτταροκίνης αυτής γίνεται πάντοτε κατόπιν ερεθισμού, δεν υπάρχει απόθεμα υπο φυσιολογικές συνθήκες στα κύτταρα, και υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν υπάρχουν συνήθως ανιχνεύσιμα επίπεδα της στο αίμα⁴⁸⁶. Η σύνθεση ελέγχεται σε μεταγραφικό, μεταφραστικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο και η παραγωγή TNF- α προκαλεί τη μεταγραφή αντιφλεγμονωδών παραγόντων όπως IL-10, κορτικοστεροειδή και προστανοειδή, οι οποίοι με τη σειρά τους ασκούν αρνητική ρύθμιση στην περερταίρω παραγωγή TNF- α ⁴⁷⁸.

3.3.2 Οι υποδοχείς του TNF- α

Δύο υποδοχείς έχουν περιγραφεί για τον TNF- α : ο TNFR-I (CD120a, p55/60), πρωτεΐνη 55/60 kDa και ο TNFR-II (CD120b, p75/80), πρωτεΐνη 75/80 kDa. Ανήκουν στην υπεροικογένεια των TNFR υποδοχέων χαρακτηριστικό των οποίων είναι μία πλούσια σε κυστεΐνη εξωκυττάρια περιοχή πρόσδεσης με περίπου 28% ομολογία μεταξύ των διαφόρων μελών της υπεροικογένειας⁴⁸⁷. Το ενδοκυττάριο τμήμα των TNFR-I και -II αντίθετα δεν παρουσιάζει ομολογία ούτε και εμφανίζει εγγενή ενζυματική δράση. Και οι δύο δεσμεύουν τόσο μεμβρανικό όσο και διαλυτό TNF- α αλλά ο TNFR-II ενεργοποιείται πλήρως μόνο από τον μεμβρανικό TNF- α . Οι δύο υποδοχείς ενεργοποιούν διαφορετικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος^{488;489}. Και οι δύο υποδοχείς μπορούν να βρίσκονται σε διαλυτή μορφή (sTNFR-I, sTNFR-II) που προκύπτει από τη δράση του ενζύμου TACE στη μεμ-

βρανική μορφή του υποδοχέα. Ο ρόλος των διαλυτών υποδοχέων είναι αφενός η αρνητική ρύθμιση της σηματοδότησης του TNF-α αλλά και η σταθεροποίηση και προστασία από ενζυματική λύση του TNF-α^{490;491}.

Ο TNFR-I εκφράζεται συστασιακά στους περισσότερους ιστούς ενώ η έκφραση του TNFR-II εμφανίζεται κυρίως σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και βρίσκεται υπο στενή ρύθμιση. Για τα περισσότερα κύτταρα, ο TNFR-I είναι ο κύριος μεσολαβητής στη σηματοδότηση του TNF-α. Ο TNFR-II έχει χαμηλότερη συγγένεια για τον διαλυτό TNF-α και η δράση του φαίνεται να είναι συνεργιστική με του TNFR-I. Ο ρόλος του εν μέρει θεωρείται ότι είναι η μέσω αλληλεπίδρασης με τον TNF-α αύξηση της τοπικής συγκέντρωσης του τελευταίου κοντά στον TNFR-I ("ligand passing") για τη διευκόλυνση της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης^{478;492;493}.

3.3.3 Ενδοκυττάρια μεταγωγή του σήματος

TNFR-I

Η πρόσδεση του TNF-α στον TNFR-I οδηγεί στη δημιουργία δύο σηματοδοτικών συμπλόκων που ενεργοποιούν διαμετρικά αντίθετα μονοπάτια για το κύτταρο: το σύμπλοκο I οδηγεί σε προαγωγή της κυτταρικής επιβίωσης και μεταγραφή προφλεγμονωδών γονιδίων, ενώ το σύμπλοκο II οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο με ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών. Η ένταση του TNF-α σήματος, η συνέκφραση συγκεκριμένων σηματοδοτικών μεσολαβητών και η αλληλεπίδραση με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια καθορίζουν τελικά ποιο από τα μονοπάτια θα επικρατήσει.

Σύμπλοκο I (TRADD, RIP-1, TRAF-2) Όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των "υποδοχέων θανάτου", ο TNFR-I περιέχει στο ενδοπλασματικό κομμάτι του μορίου του έναν τομέα θανάτου (death domain, DD). Όταν ο υποδοχέας είναι σε ανενεργή κατάσταση, η DD περιοχή καλύπτεται από τον "σιγαστήρα του τομέα θανάτου" (silencer of the death domain, SODD), ένα μόριο-προσαρμογέα που εμποδίζει την ενεργοποίηση του DD και κατ'επέκταση του σηματοδοτικού μονοπατιού. Μετά την ενεργοποίηση του TNFR-I από τον TNF-α, ο SODD απομακρύνεται και η DD περιοχή μπορεί να αλληλεπιδρά ελεύθερα με ανάλογες DD περιοχές άλλων μορίων^{486;489}.

Η ελεύθερη DD περιοχή, επιτρέπει την πρόσδεση ενός μορίου-προσαρμογέα, του TRADD (TNFR-I associated death domain protein), πράγμα που εν συνεχεία οδηγεί στην αλληλεπίδραση με δύο άλλα μόρια, τον RIP-1 (receptor interacting protein-1) και τον TRAF-2 (TNF receptor-associated factor-2). Η πρόσδεση των παραπάνω δύο πρωτεϊνών έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν στην μεταγραφή προ-φλεγμονωδών γονιδίων. Από τους σημαντικότερους και πιο καλά μελετημένους μεταγραφικούς παράγοντες που παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία αυτή είναι ο NF-κB.

Η οικογένεια του NF-κB έχει πέντε μέλη με μεγάλη ομολογία μεταξύ τους - RelA (ή p65), RelB, cRel, p50 και p52. Τα τρία πρώτα σχηματίζουν ομοδιμερή και σ' αυτή τη μορφή μετατοπίζονται στον πυρήνα όπου και προκαλούν μεταγραφή πλήθους γονιδίων. Η μεταγραφική ικανότητα των δύο τελευταίων (p50, p52) εξαρτάται από τον ετεροδιμερισμό με κάποιο από τα τρία πρώτα μέλη⁴⁹⁴⁻⁻⁴⁹⁷.

Στο κυτταρόπλασμα τα διμερή του NF-κB βρίσκονται σε ανενεργή μορφή, σε σύμπλοκο με τους αναστολείς IκBα, IκBβ ή IκBε οι οποίοι κρύβουν τις περιοχές από τις οποίες εξαρτάται η μετατόπιση στον πυρήνα. Η φωσφορυλίωση των ανα-

στολέων από την κινάση του IκB, IKK, οδηγεί σε αποδέσμευση και ενεργοποίηση του NF-κB. Η IKK ενεργοποιείται από τους συζευγμένους στον TNFR-I, TRAF-2 και RIP-1.

Σύμπλοκο II (TRADD, RIP-1, TRAF-2, FADD, προκασπάση 8) Στη δημιουργία του συμπλόκου II η πρόσδεση των TRAF-2 και RIP-1 είναι παροδική, οδηγώντας στη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ του TRADD του μορίου FADD (Fas-associated death domain protein) και της προκασπάσης 8. Αυτό οδηγεί σε τοπικά υψηλή συγκέντρωση κασπάσης 8 που προκαλεί ενεργοποίηση της κασπάσης 3 και εν τέλει του μέσω αυτής αποπτωτικού μηχανισμού. Γενικά, το μέσω συμπλόκου II αποπτωτικό ερέθισμα είναι ασθενέστερο αυτού που παράγεται μέσω άλλων μελών της οικογένειας υποδοχέων θανάτου (όπως πχ το Fas) και η δημιουργία του συμπλόκου II γίνεται υπο τη συνθήκη ότι η ενεργοποίηση του NF-κB μέσω του συμπλόκου I έχει αποτύχει⁴⁹⁸.

TNFR-II

Η ενεργοποίηση του TNFR-II οδηγεί ως επί το πλείστον σε ενεργοποίηση, μετανάστευση και πολλαπλασιασμό του κυττάρου⁴⁸⁶. Ο TNFR-II δεν διαθέτει τομέα θανάτου στο ενδοκυττάριο τμήμα του. Μετά την πρόσδεση του μεμβρανικού TNF-α και τον τριμερισμό του TNFR-II, το κυτταροπλασματικό τμήμα του υποδοχέα αλληλεπιδρά με τους TRAF-1 και TRAF-2. Ο TRAF-2 ενεργοποιεί τον NF-κB ενώ ταυτόχρονα αλληλεπιδρά με τους αναστολείς απόπτωσης -1 και -2 (cIAP-1 και cIAP-2)

Ο TNFR-II διαθέτει επίσης την ικανότητα να ενεργοποιεί ενδοθηλιακές και επιθηλιακές πρωτεϊνικές κινάσες (Etk) που παίζουν ρόλο στην προσκόλληση, μετανάστευση, πολλαπλασιασμό και επιβίωση, ανεξάρτητα από τον TRAF-2. Στα

κύτταρα αυτά, θεωρείται ότι το αντιαποπτωτικό ερέθισμα μέσω TNFR-2 εξισορροπεί το προαποπτωτικό ερέθισμα του TNFR-I^{499;500}.

3.3.4 Ο ρόλος του TNF-α στην ηπατική ίνωση

Η κύρια πηγή του TNF-α στο ινωτικό ήπαρ είναι τα κύτταρα του Kupffer. Τα επίπεδα παραγωγής του TNF-α φαίνεται να σχετίζονται με το βαθμό της ηπατικής φλεγμονής και βλάβης στην ηπατίτιδα C, με τα υψηλότερα επίπεδα τόσο στον ηπατικό ιστό όσο και στο πλάσμα να παρατηρούνται στους ασθενείς με κίρρωση⁵⁰¹. Ο TNF-α έχει κεντρικό ρόλο στην πρόκληση και συνέχιση της φλεγμονώδους εξεργασίας και φαίνεται να παίζει ρόλο επίσης στην νεοαγγειογένεση⁵⁰². Τα επίπεδα του TNF-α είναι αυξημένα στο κίρρωτικό ήπαρ ανεξάρτητα της αιτιολογίας της κίρρωσης και τα επίπεδα του διαλυτού υποδοχέα TNF-α σχετίζονται με το βαθμό της ηπατικής δυσλειτουργίας⁵⁰³.

Μέσω της ενεργοποίησης του NF-κB στα αστεροειδή κύτταρα, ο TNF-α οδηγεί σε μεταγραφή προφλεγμονωδών και προϊνωτικών παραγόντων όπως IL-6, IL-8, MCP-1 και του μορίου προσκόλλησης ICAM-1¹. Στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα παρατηρείται έντονη καταστολή της έκφρασης IκBa που μεσολαβείται από τους μεταγραφικούς αναστολείς CBF1 και MeCP2⁵⁰⁴⁻⁻⁵⁰⁶. Η παραγωγή TIMP-1 αυξάνεται επίσης υπό το ερέθισμα του TNF-α⁵⁰⁷ ενώ η σηματοδότηση μέσω TNFR-I είναι απαραίτητη για την έκφραση MMP-9⁵⁰⁸.

Παρόλα αυτά, ο ακριβής ρόλος του TNF-α στα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος δεν είναι πλήρως κατανοητός και φαίνεται ότι κάποιες από τις ρυθμιστικές του δράσεις συμβαίνουν σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Για παράδειγμα, η εξωγενής επίδραση με TNF-α ελαττώνει τα επίπεδα mRNA του προκολλαγόνου α1 σε καλλιιεργημένα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα, όμως σε μοντέλο χολοστα-

τικής ίνωσης διαγονιδιακών TNF- α (-/-) ή TNFR-I (-/-) ποντικών η ανεπάρκεια στη σηματοδότηση TNF- α ελαττώνει την ίνωση χωρίς να ελαττώνει το βαθμό της ηπατικής βλάβης⁵⁰⁷⁻⁻⁵⁰⁹.

4

Σωματοστατίνη και κύτταρα του ηπατικού κολποειδούς

4.1 Σωματοστατίνη

4.1.1 Βιολογικές μορφές

Η παρουσία μιας ουσίας που είχε την ιδιότητα να αναστέλλει την έκκριση αυξητικής ορμόνης από την υπόφυση του αρουραίου περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Krulich και συν. το 1968⁵¹⁰. Το 1973 οι Brazeau και συν. απομόνωσαν από τον υποθάλαμο προβάτου τον παράγοντα αυτόν που αναγνωρίστηκε ως πεπτιδίο⁵¹¹. Το ίδιο έτος οι Burgus και συν. περιέγραψαν την πρωτοταγή δομή του πεπτιδίου αυτού, που ονομάστηκε για την ιδιότητά του να αναστέλλει την απελευθέρωση αυξητικής ορμόνης, σωματοστατίνη (somatotropin release inhibiting factor, SRIF)⁵¹².

Η σωματοστατίνη παράγεται σε δύο βιολογικά ενεργές μορφές: μία με 14 και μία με 28 αμινοξέα (SRIF-14 και SRIF-28 αντίστοιχα). Και οι δύο προέρχονται

από ένα κοινό προπεπτίδιο με 92 αμινοξέα^{513;514}. Το προπεπτίδιο της σωματοστατίνης παράγεται από το μεταγράφημα γονιδίου που στον άνθρωπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3. Από τη μετάφραση του mRNA αυτού προκύπτει ένα προπροπεπτίδιο από το οποίο με περιορισμένη πρωτεόλυση παράγεται το προπεπτίδιο των 92 αμινοξέων. Η σωματοστατίνη παράγεται σε πολλές περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος αλλά και από πολλά κύτταρα της περιφέρειας, που κυρίως ανήκουν στο γαστρεντερικό, ενδοκρινικό και ανοσοποιητικό σύστημα.

4.1.2 Δράσεις της σωματοστατίνης

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα παρατηρείται ιδιαίτερα μεγάλος αριθμός σωματοστατινεργικών νευρώνων στον περικοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου, τη μονήρη δεσμίδα του προμήκη μυελού και σε διάφορες δομές του μεταϊχμιακού συστήματος συμπεριλαμβανομένου του ιπποκάμπου, αλλά διάμεσοι σωματοστατινεργικοί νευρώνες παρατηρούνται και σε πλήθος άλλων περιοχών όπως ο φλοιός, τα βασικά γάγγλια, ο αμφιβληστροειδής και ο οσφρητικός βολβός. Η σωματοστατίνη συνεντοπίζεται συχνά με τον σημαντικότερο ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση της νευροδιαβίβασης με δράση στα κινητικά, αισθητικά, γνωσιακά συστήματα και στο αυτόνομο νευρικό σύστημα^{515;516}. Ως ρυθμιστής των εκκρίσεων της αδενούπόφυσης, η σωματοστατίνη αναστέλλει την απελευθέρωση αυξητικής ορμόνης (GH), προλακτίνης και θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH)^{517;518}.

Στην περιφέρεια η σωματοστατίνη δρα ενδοκρινώς, πάρακρινώς και αυτοκρινώς. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι μόνο μερικά λεπτά καθώς αποδομείται γρήγορα από πεπτιδάσες στους ιστούς και το αίμα. Από τις πρώτες βιολογικές δράσεις της σωματοστατίνης είναι η ισχυρή αναστολή της έκκρισης σχεδόν όλων των ορ-

μονών του γαστρεντερικού όπως χολοκυστοκίνη, γαστρίνη, σεκρετίνη, μοτιλίνη, εντερογλυκαγόνη, VIP, GIP, αλλά και ινσουλίνης και των εκκρίσεων της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος και του λεπτού εντέρου. Η σωματοστατίνη ρυθμίζει την κινητικότητα και την αιματική ροή στο γαστρεντερικό σύστημα⁵¹⁹. Στον νεφρό αναστέλλει την απελευθέρωση ρενίνης και παρεμποδίζει την επαναρρόφιση νερού υπό το ερέθισμα της αντιδιουρητικής ορμόνης (ADH)⁵¹⁶. Πλήθος κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος όπως λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, θυμοκύτταρα και κύτταρα του αρθρικού υμένα παράγουν σωματοστατίνη σε μικρές ποσότητες κατόπιν ενεργοποίησης. Σ' αυτά τα κύτταρα επηρεάζει πλήθος λειτουργιών όπως η χημειοταξία, η αγγειογένεση, η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και απόπτωση^{516;520--523}. Η δράση της ως αναστολέας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού έχει περιγραφεί εδώ και αρκετά χρόνια τόσο σε φυσιολογικά κύτταρα όσο και σε καρκινικές σειρές τόσο νευροενδοκρινικής όσο και μη νευροενδοκρινικής προέλευσης όπως ο καρκίνος του μαστού, του προστάτη και του παχέος εντέρου⁵²⁴.

4.1.3 Κορτιστατίνη

Η κορτιστατίνη (CST) είναι ένα φυσικό σωματοστατινεργικό πεπτίδιο με μεγάλη δομική και λειτουργική ομοιότητα με την σωματοστατίνη. Δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια και ενεργοποιεί όλους τους υποδοχείς της σωματοστατίνης καθώς και τον υποδοχέα MrgX2⁵²⁵. Το γονίδιο της κορτιστατίνης βρίσκεται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 1 και από το μεταγράφημά του προκύπτει ένα προπροπεπτίδιο από το οποίο παράγεται τελικά ένα προπεπτίδιο 105 αμινοξέων. Από το τελευταίο, προκύπτει η CST-17 και η CST-29. Μόνο η πρώτη είναι βιολογικά ενεργή^{526;527}.

Όπως και η σωματοστατίνη, η κορτιστατίνη απομονώθηκε αρχικά το 1996 από το κεντρικό νευρικό σύστημα στο οποίο παρατηρείται σε ιδιαίτερα ψηλή συγκέντρωση στο φλοιό, παρατήρηση από την οποία προέκυψε το όνομά της. Αργότερα βρέθηκε ότι παράγεται και από πλήθος κυττάρων της περιφέρειας και κυρίως από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα ελαττώνει την διεγερσιμότητα του φλοιού και ρυθμίζει τον κύκλο ύπνου-αγρυπνίας⁵²⁶. Έχει αντεπιληπτογόνο δράση^{528;529} και παίζει ρόλο στο συγχρονισμό της δράσης του φλοιού. Προστατεύει τους νευρώνες από την ισχαιμία⁵³⁰ και παίζει ρόλο στους μηχανισμούς της μακροχρόνιας μνήμης και τη φυσιολογία του ιπποκάμπου^{529;531--533}. Όπως και η σωματοστατίνη, αναστέλλει την έκκριση αυξητικής ορμόνης⁵³⁴.

Αυξανόμενα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η κορτιστατίνη έχει σημαντικό ρόλο στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς μεταξύ του νευροενδοκρινικού και του ανοσοποιητικού συστήματος. Πλήθος κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος παράγουν κορτιστατίνη. Οι Dalm και συν. μελέτησαν την παραγωγή σωματοστατίνης και κορτιστατίνης σε ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και μονοκύτταρα και παρατήρησαν ότι η παραγωγή pre-proCST mRNA αυξάνεται κατά τη διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων και κατόπιν ερεθισμού με LPS⁵³⁵. Στα κύτταρα αυτά δεν ανιχνεύθηκε SRIF mRNA, οδηγώντας στην υπόθεση ότι για αυτά τα κύτταρα η κορτιστατίνη και όχι η σωματοστατίνη είναι ο φυσικός προσδέτης των υποδοχέων σωματοστατίνης^{536;537}. Παρόλο που οι ακριβείς λειτουργίες της κορτιστατίνης στα κύτταρα του ανοσοποιητικού δεν είναι πλήρως γνωστές, τα μέχρι τώρα δεδομένα καταδεικνύουν έναν εντυπωσιακό αντιφλεγμονώδη ρόλο. Η κορτιστατίνη φαίνεται να λειτουργεί σαν ιδανικός ανοσοκατασταλτικός μεσολαβητής καθώς αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των Th1 λεμφοκυττάρων και την

απελευθέρωση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-2 και IFN- γ ενώ ταυτόχρονα επάγει την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-10⁵³⁸. Ο θεραπευτικός ρόλος της κορτιστατίνης σε φλεγμονώδη μοντέλα όπως αρθρίτιδα και ελκώδη κολίτιδα έχει περιγραφεί από τους Gonzalez-Rey και συν.^{539;540}.

4.1.4 Συνθετικά ανάλογα

Οκτρεοτίδη Η οκτρεοτίδη είναι ένα συνθετικό οκταπεπτίδιο με παρόμοιες βιολογικές δράσεις αλλά διαφορετική φαρμακοκινητική και μακρότερο χρόνο ημίσειας ζωής από την σωματοστατίνη (1,7 ώρες έναντι μερικών λεπτών για την σωματοστατίνη). Παρασκευάστηκε για πρώτη φορά από τον Wilfried Bauer το 1979 για την Novartis. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία όγκων της υπόφυσης αλλά και άλλων νευροενδοκρινικών όγκων, στην αντιμετώπιση της αιμορραγίας από κίρσους οισοφάγου και στην αντιμετώπιση διαφόρων διαρροϊκών συνδρόμων. Χρησιμοποιείται επίσης διαγνωστικά για την ανίχνευση νευροενδοκρινικών όγκων με σπινθηρογράφημα κατόπιν ραδιοσήμανσης με ίνδιο-111 (octreoscan).

Λανρεοτίδη Η λανρεοτίδη είναι πιο πρόσφατο συνθετικό ανάλογο της σωματοστατίνης και έχει παρόμοιες δράσεις με την οκτρεοτίδη καθώς ενεργοποιεί τους ίδιους υποδοχείς με αυτήν. Έχει λίγο μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής από την οκτρεοτίδη (δύο ώρες έναντι 1,7). Χρησιμοποιείται κυρίως στην αντιμετώπιση όγκων της υπόφυσης και άλλων νευροενδοκρινικών όγκων, καθώς επίσης και του καρκινοειδούς συνδρόμου.

Βαπρεοτίδη Ένα ακόμη οκταπεπτίδιο με χρόνο ημίσειας ζωής 30 λεπτά, η βαπρεοτίδη χρησιμοποιείται κυρίως στην αντιμετώπιση κίρσορραγίας και στην σχετιζόμενη με AIDS διάρροια.

Μη πεπτιδικοί αγωνιστές Εκτός από τα παραπάνω συνθετικά πεπτίδια, έχουν συντεθεί ένας αριθμός αγωνιστών με διαφορετική συγγένεια για τον κάθε υποδοχέα σωματοστατίνης. Οι μετρήσεις συγγένειας μερικών φυσικών και συνθετικών αγωνιστών για τον κάθε υπότυπο υποδοχέα σωματοστατίνης στον άνθρωπο παραθέτονται στον πίνακα 4.1.

4.1.5 Οι υποδοχείς σωματοστατίνης

Οι υποδοχείς σωματοστατίνης είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες που ανήκουν στην κατηγορία των συζευγμένων με G-πρωτεΐνες υποδοχέων (seven transmembrane G coupled receptor superfamily)^{516;541}. Πέντε υποδοχείς σωματοστατίνης έχουν περιγραφεί (SSTR1-5), οι οποίοι είναι προϊόντα μεταγραφής πέντε γονιδίων στις θέσεις 14q13, 17q24, 22q13.1, 20p11.2 και 16p13.3 αντίστοιχα. Το mRNA του SSTR2 ματίζεται με δύο εναλλακτικούς τρόπους παράγοντας έτσι δύο ισομορφές, τον SSTR2A και SSTR2B^{542;543}. Όλοι οι υποδοχείς είναι συζευγμένοι με Gi πρωτεΐνες⁵⁴⁴ και οι περισσότεροι μπορούν να αλληλεπιδρούν με περισσότερες από μία κατηγορίες Gi πρωτεϊνών.

Ομοδιμερισμός και ετεροδιμερισμός υποδοχέων σωματοστατίνης

Μια ενδιαφέρουσα ιδιότητα των συζευγμένων με G πρωτεΐνες υποδοχέων είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν ομο- ή ετεροδιμερή μεταξύ τους ή με άλλους υποδοχείς⁵⁴⁵⁻⁻⁵⁵⁰. Ολοένα και μεγαλύτερος αριθμός μελετών μάλιστα προτείνουν ότι η λειτουργική μορφή του υποδοχέα είναι στην πραγματικότητα το διμερές που προκύπτει^{545--548;550;551}. Οι υποδοχείς της σωματοστατίνης έχουν βρεθεί σε διμερή μεταξύ τους ή με υποδοχείς οπιοειδών, καθώς και τον D2 υποδοχέα ντοπαμίνης⁵⁵²⁻⁻⁵⁵⁷. Το φαινόμενο του διμερισμού των υποδοχέων και οι επιπτώσεις

που αυτός έχει στην φαρμακολογία, σηματοδότηση, ενδοκυττάρωση και ανακύκλωση των υποδοχέων σωματοστατίνης παραμένει ατελώς κατανοητό. Τα περισσότερα κύτταρα που εκφράζουν υποδοχείς σωματοστατίνης εκφράζουν περισσότερους του ενός υποτύπους^{558;559}, παρατήρηση που οδηγεί στην υπόθεση ότι το φαινόμενο αυτό είναι ενδεχομένως κεντρικής σημασίας για τη φυσιολογία των υποδοχέων σωματοστατίνης στο κύτταρο.

Ενδοκυττάριο μονοπάτι μεταγωγής σήματος

Στο ενδοκυττάριο μονοπάτι μεταγωγής του σήματος εμπλέκονται πολλά συστήματα δευτέρου αγγελιοφόρου. Βασικό γνώρισμα όλων των υποτύπων υποδοχέων σωματοστατίνης είναι ότι αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση και ελατώνουν με αυτό τον τρόπο τα επίπεδα cAMP στο κύτταρο. Επιπλέον ενζυμικά συστήματα που εμπλέκονται είναι μεταξύ άλλων η φωσφολιπάσες C και A2, φωσφοτυροσινικές φωσφατάσες, η κινάση της φωσφατιδικής ινοσιτόλης-3 (PI3K) και οι MAP-κινάσες. Σημαντική δράση επίσης έχουν στη λειτουργία των διαύλων καλίου και ασβεστίου. Στον πίνακα 4.2 συνοψίζονται οι σημαντικότερες ενδοκυττάρια δράσεις που είναι ως σήμερα γνωστές^{516;560}.

Η ενεργοποίηση φωσφοτυροσινικών φωσφατασών (PTP) και η αποφωσφορλίωση πολλών υποστρωμάτων ενεργοποιημένων υποδοχέων αυξητικών παραγόντων ήταν ο πρώτος μηχανισμός αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που περιγράφηκε για τους υποδοχείς σωματοστατίνης⁵⁶¹⁻⁻⁵⁶⁴. Μέσω της ενεργοποίησης των PTP η κυτταρική διαίρεση σταματάει στη G1/S (SSTR1,2,4,5) ή στη G2/M (SSTR3) φάση^{565;566}. Επιπλέον, οι SSTR2 και SSTR3 επάγουν απόπτωση⁵⁶⁷⁻⁻⁵⁶⁹. Οι SSTR1,3 και 4 προκαλούν οξέωση στο κύτταρο αναστέλλοντας τον ανταλλαγέα Na^+/H^+ (NHE1) και μ' αυτόν τον τρόπο διευκολύνουν την

απόπτωση μέσω SHP-1 εξαρτώμενων μηχανισμών⁵⁷⁰⁻⁻⁵⁷². Με τον ίδιο μηχανισμό (μέσω του NHE1) αναστέλλουν τη Rho GTPάση αναστέλλοντας έτσι την κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση, την προσκολλητικότητα και την κινητικότητα⁵⁷³. Επίσης οι SSTR1,2,3 και 5 αναστέλλουν τη συνθάση νιτρικού οξειδίου (NOS)^{574;575}.

SSTR1 Ο SSTR1 συζευγνύονται με $G_{\alpha_{i3}}$ και $G_{\alpha_{i1/2}}$ πρωτεΐνες⁵⁷⁶⁻⁻⁵⁷⁸ και αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση⁵⁷⁹. Ενεργοποιεί τη δράση των PTP⁵⁸⁰⁻⁻⁵⁸² και κυρίως της SHP-2 οδηγώντας στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών⁵⁸³. Συνήθως η ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού γίνεται από αυξητικούς παράγοντες και προκαλεί ενεργοποίηση μιτογόνων σημάτων και αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η ενεργοποίηση όμως ταυτόχρονα της SHP-2 προκαλεί αποφωσφορυλίωση σε μια ανασταλτική περιοχή (υπόλειμμα Tyr529) του c-src, πράγμα που ευνοεί την φωσφορυλίωση σε μία διεγερτική περιοχή (υπόλειμμα Tyr418) που επιτρέπει στη συνέχεια τη φωσφορυλίωση από το c-src του Raf-1, που με τη σειρά του ενεργοποιεί το MEK/MAPK μονοπάτι οδηγώντας στην επαγωγή του αναστολέα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού p21/Cip⁵⁸⁴.

Ο SSTR1 είναι μονομερές και σε αντίθεση με άλλους SSTRs δεν ετεροδιμερίζεται⁵⁵⁴. Μετά την επίδραση αγωνιστή ενδοκυτταρώνεται με μηχανισμό που δεν εξαρτάται από την β-αρεστίνη και στη συνέχεια ανακυκλώνεται στην επιφάνεια του κυττάρου χωρίς ο προσδέτης να υποστεί λυσοσωμιακή αποδόμηση^{585;586}.

SSTR2 Τόσο ο SSTR2A όσο και ο SSTR2B αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση^{578;587;588} ελαττώνοντας έτσι το επίπεδο cAMP και τη δράση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) στο κύτταρο. Επιπλέον, ο SSTR2 ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C (PLC) και κατ' επέκτασιν τη σηματοδότηση μέσω Ca^{2+} ⁵⁸⁹. Ο βασικός μηχανισμός με τον οποίο ελαττώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι μέσω

της ενεργοποίησης της φωσφοτυροσινικής φωσφατάσης SHP-1 μέσω $G\alpha_{i3}$ ⁵⁹⁰. Ο SSTR2 παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωση μέσω υποδοχέων αυξητικών παραγόντων των MAPK μέσω της SHP-1 και της δεσμευμένης στη μεμβράνη φωσφοτυροσινικής φωσφατάσης PTPη⁵⁹¹⁻⁻⁵⁹⁴. Ταυτόχρονα όμως ενεργοποιεί MAPK καθώς και την p35-MAPK και οδηγεί έτσι σε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού⁵⁹⁵. Αναστέλλει την PI3K^{596;597} και μέσω αυτού του μηχανισμού αναστέλλει την ενεργοποίηση της κινάσης σερίνης/θρεονίνης Akt, μπλοκάροντας έτσι το αντιαποπτωτικό σήμα πολλών αυξητικών παραγόντων. Επάγει τον αναστολέα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού p27/Kip1^{575;598} και μέσω του p53, τον μεταγραφικό ρυθμιστή Zac1 που προάγει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου⁵⁹⁹. Νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι ο SSTR2 δεν είναι μόνο κυτταροστατικός, αλλά επάγει την απόπτωση με το να αυξάνει την έκφραση του υποδοχέα TNFR-I, του υποδοχέα θανάτου 4 και με το να ελαττώνει την έκφραση του αντιαποπτωτικού Bcl2⁶⁰⁰.

SSTR3 Ο SSTR3 βρίσκεται συζευγμένος με $G\alpha_{i1}$ και αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση⁵⁸⁸. Ενεργοποιεί την SHP-2 και μέσω αυτής το Raf-1^{601;602}. Δρα προαποπτωτικά επάγοντας το p53 και το Bax^{570;603} και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω αναστολής του ERK1/2⁶⁰⁴. Ένα ακόμα προαποπτωτικό μονοπάτι που έχει περιγραφεί σε ορισμένα κύτταρα είναι μέσω ενεργοποίησης της SHP-1 και της κασπάσης 8⁶⁰⁵. Από όλους τους υποδοχείς σωματοστατίνης ασκεί την ισχυρότερη αντιαγγειογενετική δράση⁶⁰⁴ και μέσω αυτού του μηχανισμού στο ενδοθήλιο, αναστέλλει την ανάπτυξη σαρκόματος Kaposi, όγκος του οποίου τα κύτταρα δεν παράγουν υποδοχείς σωματοστατίνης⁶⁰⁶.

SSTR4 Ο SSTR4 είναι ο λιγότερο μελετημένος από όλους τους υποτύπους υποδοχέων σωματοστατίνης. Εκτός την ανασταλτική δράση στην αδενυλική κινάση,

ενεργοποιεί τη δράση των PTP και επίσης MAPK μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης A2 (PLA2)^{602;607}. Είναι ο μόνος από τους SSTRs που ευνοεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενεργοποιώντας την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και την STAT3⁶⁰⁸. Η ενεργοποίηση της διάνοιξης διαύλων καλίου που προκαλεί είναι ιδιαίτερα μακροχρόνια, στο οποίο έχει αποδοθεί η αντιεπιληπτογόνος δράση της σωματοστατίνης στον εγκεφαλικό φλοιό⁶⁰⁹.

SSTR5 Ο SSTR5 αναστέλλει όπως και οι υπόλοιποι SSTRs την αδενυλική κυκλάση. Συζευγνύεται με G_i πρωτεΐνη και έχει πολύ υψηλή συγγένεια για τη SRIF-28⁶¹⁰. Ενεργοποιεί τους διαύλους K⁺ και με τον τρόπο αυτό κλείνει τα VGCC κανάλια ασβεστίου⁶¹¹. Ενεργοποιεί την PLC, πράγμα που οδηγεί στην ενεργοποίηση της PKC. Υπερέκφραση SSTR5 φαίνεται να ενεργοποιεί την IP3 και τελικά οδηγεί σε αύξηση του ενδοκυττάριου Ca²⁺^{612;613}. Οι αντιμιτωτικές δράσεις του SSTR5 πραγματοποιούνται μέσω της ελάττωσης του ενδοκυττάριου Ca²⁺ αλλά επίσης και μέσω της αναστολής του cGMP και μετέπειτα κινάσες συζευγμένων με G πρωτεΐνες υποδοχέων που επάγουν το c-fos και αναστέλλουν τις MAPK και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό⁶¹⁴.

4.2 Σωματοστατίνη και ηπατική ίνωση

Η παρατήρηση ότι η σωματοστατίνη δρα ως αντιμιτωτικός παράγοντας σε καρκινικά κύτταρα νευροενδοκρινικών αλλά και μη νευροενδοκρινικών όγκων οδήγησε στη μελέτη της δράσης της στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Οι Κουρούμαλης και συν. μελέτησαν τη δράση της οκτρεοτίδης σε ασθενείς με ανεγχείρητο ηπατοκυτταρικό καρκίνο και βρήκαν σημαντική αύξηση της επιβίωσης σε σχέση με ασθενείς που δεν έλαβαν θεραπεία⁶¹⁵. Μερικά χρόνια αργότερα οι Δημητρου-

λόπουλος και συν. μελέτησαν τη δράση της οκτρεοτίδης σε ασθενείς με ηπάτωμα αφού προηγουμένως είχαν επιβεβαιώσει την παρουσία υποδοχέων σωματοστατίνης χρησιμοποιώντας octreoscan⁶¹⁶ και η μελέτη τους επιβεβαίωσε την αυξημένη επιβίωση στους ασθενείς που έλαβαν οκτρεοτίδη.

Το ενδιαφέρον γύρω από την ύπαρξη υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα του ηπατικού κολποειδούς και του λειτουργικού τους ρόλου στο υγιές και νοσούν ήπαρ, οδήγησε σε περαιτέρω έρευνες στις οποίες μελετήθηκαν τόσο καρκινικές κυτταρικές σειρές ηπατοκυττάρων όπως HepG2 και Hep3B όσο και κύτταρα από πρωτογενείς καλλιέργειες. Η HepG2 σειρά βρέθηκε ότι εκφράζει λειτουργικούς υποδοχείς σωματοστατίνης SSTR2,3 και 5 καθώς και ότι τα κύτταρα αυτά παράγουν κορτιστατίνη⁶¹⁷. Επίσης, βρέθηκε ότι η μέσω οπιοειδών αντιμιτωτική δράση στα κύτταρα αυτά μεσολαβείται μέσω αλληλεπιδράσεων με τους υποδοχείς σωματοστατίνης⁶¹⁸.

Στα κύτταρα του Kupffer υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν την έκφραση των υποδοχέων SSTR1-4⁶¹⁹ αλλά ο λειτουργικός τους ρόλος είναι μέχρι στιγμής άγνωστος. Στα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι δεν υπάρχει έκφραση υποδοχέων σωματοστατίνης στην ανενεργή κατάσταση, αλλά η ενεργοποίηση ακολουθείται από έκφραση πολλών υποτύπων. Οι Reynaert και συν. ανέφεραν την ύπαρξη και των πέντε υποτύπων υποδοχέων στα ενεργοποιημένα κύτταρα⁶²⁰, ενώ οι Song και συν. ανέφεραν την ύπαρξη των SSTR2,3 και 4⁶²¹. Οι δράσεις των υποδοχέων στα αστεροειδή κύτταρα είναι ακόμη ατελώς κατανοητές. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η σωματοστατίνη έχει αντιμιτωτική και προαποπτωτική δράση στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα⁶²², αλλά και ενδείξεις για το ότι ελαττώνει την παραγωγή κολλαγόνου από αυτά, χωρίς να έχει δράσεις στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό⁶²³. Φαίνεται επίσης να ελαττώνει την

παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών⁶²⁴, καθώς και ενδοθηλίνης-1⁶²⁵ και η τελευταία δράση φαίνεται να μεσολαβείται από τον SSTR1. Για τα ενδοθηλιακά κύτταρα των ηπατικών κολποειδών δεν υπάρχουν δεδομένα για το κατά πόσο εκφράζουν υποδοχείς σωματοστατίνης.

Τα παρόντα δεδομένα δίνουν μια ατελή εικόνα για το ρόλο της σωματοστατίνης στη βιολογία των κυττάρων του ηπατικού κολποειδούς. Πολύ λίγα είναι γνωστά για τον ενδεχόμενο ρόλο της σωματοστατινεργικής σηματοδότησης στη λειτουργία αυτών των κυττάρων στη φυσιολογική κατάσταση του ήπατος. Η παρατήρηση ότι σωματοστατινεργικές νευρικές απολήξεις βρίσκονται σε στενή ανατομική σχέση με τα κύτταρα του ηπατικού κολποειδούς⁶²⁶ δημιουργούν ερωτήματα για τον ενδεχόμενους κεντρικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς και το ρόλο που αυτοί παίζουν στη φυσιολογία του ήπατος αλλά και την παθοφυσιολογία των ηπατικών νοσημάτων.

	IC ₅₀ (nM)				
	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Ενδογενή πεπτίδια					
SRIF-14	0.1-2.26	0.2-1.3	0.3-1.6	0.3-1.8	0.2-0.9
SRIF-28	0.1-2.2	0.2-4.1	0.3-6.1	0.3-7.9	0.05-0.4
hCST-17	7	0.6	0.6	0.5	0.4
Συνθετικά πεπτίδια					
Octreotide	290-1140	0.4-2.1	4.4-34.5	>1000	5.6-32
Lanreotide	500-2330	0.5-1.8	43-107	66-2100	0.6-14
Vapreotide	>1000	0.1-1.5	27-36	127->1000	2-23
Μη πεπτιδικοί συνθετικοί αγωνιστές					
L-797,591	1.4	1875	2240	170	3600
L-779,976	2760	0.05	729	310	4260
L-796,778	1255	>10000	24	8650	1200
L-803,087	199	4720	1280	0.7	3880
L-817,818	3.3	52	64	82	0.4

Πίνακας 4.1: Συγγένεια αγωνιστών υποδοχέων σωματοστατίνης στον άνθρωπο (προσαρμογή από Patel YC 1999)

	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Χρωμοσωμικός εντοπισμός	14q13	17q24	22q13.1	20p11.2	16p13.3
Μοριακό μέγεθος (kDa)	53-72	71-95	65-85	45	52-66
Σύζευξη με G πρωτεΐνη	Gα ₁₃ Gα _{11/2}	Gα ₁₃	Gα ₁₁	Gi	Gi(Gq)
cAMP	-	-	-	-	-
cGMP		+			-
Κανάλια K ⁺	+	+	+	+	+
Κανάλια Ca ²⁺	-	-	=		-
PLC		+			-
PLA				+	
PTP1C/SHP-1		+	+		
PTP1D/SHP-2	+	+	+	+	=
PTPη	+	+			
Raf κινάσες		+	-		
Src	+	+			
MAPK	+	+/-		+	-
JAK2	+	+			
p38 MAPK		+			
PI3K	+	+/-		+	
IRS1		-			
Akt		-			
GSK3β		+			
mTOR		-			
p70/S6K		-			
JNK					+
NOS	-(eNOS)	-(eNOS)	-(eNOS)		-(nNOS)
NHE1	-		-	-	
Κυτταρικός κύκλος					
p21/Cip1	+				
p27/Kip1		+			
p53		+			
Απόπτωση					
p53		+	+		
Bcl2		-			
Bax			+		
Κασπάσες			+		
DR4		+			
TNFR1		+			
Μεταγραφικοί ρυθμιστές					
Zac1		+			
Stat5		-	-		
AIP		+			
Αυξητικοί παράγοντες					
IGF-1		-	-		
VEGF			-		

Πίνακας 4.2: Χαρακτηριστικά ανθρώπινων υποδοχέων σωματοστατίνης
(προσαρμογή από Theodoropoulou M 2013, Patel YC 1999)

Μέρος II

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5

Σκοπός αυτής της μελέτης

Στην παρούσα μελέτη επιχειρούμε να απαντήσουμε στα παρακάτω ερωτήματα:

- Ποιοι από τους υπότυπους υποδοχέων σωματοστατίνης υπάρχουν στα απομονωμένα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος του αρουραίου.
- Ποια είναι η επίδραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών TNF α , PDGF, TGF β και IFN γ στην έκφραση υποδοχέων σωματοστατίνης στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα.
- Ποια είναι η επίδραση της σωματοστατίνης στην παραγωγή α 1-προκολλαγόνου και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα.
- Ποια είναι η επίδραση της σωματοστατίνης στην παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών θεμέλιας ουσίας (MMPs) από τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος.
- Υπάρχουν υποδοχείς οπιοειδών στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα;
- Υπάρχουν υποδοχείς κανναβινοειδών στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα;
- Παράγουν τα αστεροειδή κύτταρα κορτιστατίνη;
- Ποια η σημασία των φωσφοτυροσινικών φωσφατασών και των φωσφατασών σερίνης θρεονίνης στην παραγωγή α 1-προκολλαγόνου και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων;
- Ποια η σημασία του σηματοδοτικού μονοπατιού της κινάσης της τριφωσφορικής ινοσιτόλης στην παραγωγή α 1-προκολλαγόνου από τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα;

6

Υλικά και μέθοδοι

6.1 Υλικά και μέθοδοι

6.1.1 Κυτταρική απομόνωση και καλλιέργεια

Υλικά, πειραματόζωα και συσκευές

- Υγιείς αρουραίοι Sprague-Dawley ηλικίας άνω των 45 εβδομάδων και βάρους 450-600g, σε ελεύθερη διαίτα.
- Ηπαρίνη (Leo-Pharma, Ballerup, Denmark)
- Πεντοθάλη 2% διάλυμα σε 50ml WFI (Abbott, Chicago, Illinois, USA)
- Προνάση 7 U/mg (Roche, Mannheim, Germany)
- DNase I >2000 U/mg (Roche)
- Καταλάση 10.000 U/mg (Roche)
- Κολλαγενάση B >0,15 U/mg (Roche)
- Nycodenz (Axis-Shield PoC Oslo, Norway)
- HBSS με/χωρίς $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Invitrogen/GIBCO Carlsbad, CA, USA)
- DMEM (Invitrogen/GIBCO)
- non-essential aminoacids, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη (Invitrogen/GIBCO)
- FBS (fetal bovine serum) (Invitrogen/GIBCO)
- Διάλυμα τρυψίνης/EDTA (Gibco)
- Τρυβλία και φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold Site)

Χρησιμοποιήθηκε μέθοδος πέψης του ήπατος με μίγμα κολλαγενάσης-προνάσης και στη συνέχεια φυγοκέντρισης σε διάλυμα Nycodenz.

Η διαδικασία απομόνωσης HSC βασίζεται στη διαδικασία που έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλά εργαστήρια ανά τον κόσμο. Και πραγματοποιείται σε τρία στάδια:

1. Ενζυμική πέψη του ήπατος με *in situ* διήθηση με διάλυμα ενζύμων μέσω της πυλαίας φλέβας.
2. Φυγοκέντρηση του κυτταρικού εναιωρήματος σε βαθμιδωτής πυκνότητας διάλυμα Nycodenz
3. Προσκόλληση των κυττάρων σε επιφάνεια πλαστικού προς καλλιέργεια

Ενζυμική πέψη του ηπατικού ιστού

Αναισθησία Τα πειραματόζωα αναισθητοποιούνται με ενδοπεριτοναϊκή ένεση διαλύματος πεντοθάλης 2% σε αναλογία 0,6 ml/kg σωματικού βάρους.

Καθαρισμός Η κοιλιακή χώρα πλύνεται προσεκτικά με ιοδιούχο ποβιδόνη για την αποτροπή μολύνσεων κατά τη διαδικασία της διήθησης του ήπατος.

Χειρουργική αποκάλυψη της πυλαίας φλέβας Το αναισθητοποιημένο πειραματόζωο τοποθετείται σε αποστειρωμένο χειρουργικό πεδίο και ακολουθεί μέση υπερ/υπομφάλιος τομή στο τρίχωμα της κοιλιακής χώρας. Το τρίχωμα παραμερίζεται και αποκαλύπτεται το κοιλιακό τοίχωμα. Ακολουθεί τομή του κοιλιακού τοιχώματος και αποκάλυψη της πυλαίας φλέβας.

Καθετηριασμός της πυλαίας φλέβας Χρησιμοποιώντας πλαστικό καθετήρα 22G, η πυλαία φλέβα καθετηριάζεται και εισάγονται με βραδύ ρυθμό στο ήπαρ 5ml διαλύματος 1000 IU ηπαρίνης σε φυσιολογικό ορό (0,9% NaCl). Ο καθετήρας σταθεροποιείται επί της πυλαίας φλέβας με ράμματα Mersilk 3.0 και η έξοδος του συστήματος διήθησης εισάγεται στον καθετήρα για την έναρξη της *in situ* ενζυμικής πέψης.

***In situ* πέψη του ηπατικού παρεγχύματος** Το ηπατικό παρέγχυμα υφίσταται ενζυμική πέψη με τη μέθοδο της διπλής διήθησης του ηπατικού ιστού. Σε θερμοκρασία 37°C και ροή διηθήσεως σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, εισάγονται στο ήπαρ του αρουραίου διαλύματα με την εξής σειρά:

1. 200ml HBSS χωρίς Ca^{2+} , Mg^{2+}
2. 60 ml διαλύματος 0,2% Προνάσης σε HBSS με Ca^{2+} , Mg^{2+}
3. 225 ml διαλύματος 0,012% Κολλαγενάσης B σε HBSS με Ca^{2+} , Mg^{2+}

Τα διαλύματα εισέρχονται από τον καθετήρα στην πυλαία φλέβα, διατρέχουν το αγγειακό δέντρο της και τελικώς εξέρχονται εκ της κάτω κοίλης φλέβας που έχει εν τω μεταξύ τμηθεί. Κατά τη διάρκεια της διήθησης και δίχως αυτή να διακοπεί, το ήπαρ αποσπάται από τον αρουραίο και τοποθετείται σε τρυβλίο Petri για να συνεχισθεί και ολοκληρωθεί η διήθηση *ex situ*.

Ομογενοποίηση του ηπατικού ιστού Αφού ολοκληρωθεί η διήθηση, το ήπαρ μεταφέρεται σε στείρο περιβάλλον όπου ομογενοποιείται μηχανικά και η κάψα αφαιρείται. Ακολουθεί περαιτέρω ενζυμική πέψη με το ομογενοποίημα να εισάγεται σε στείρο δοχείο στο οποίο προστίθενται διαλύματα Pronase 0,03%, DNase

0,01% σε HBSS με $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, τελικού όγκου 100ml και θερμοκρασίας 37°C και το οποίο υφίσταται ισχυρή ανάδευση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C.

Διήθηση ηπατικού ομογενοποιημάτος Το ομογενοποιημένο ήπαρ διηθείται σε αποστειρωμένη γάζα (διαμέτρου πόρου 120μm) και αφαιρείται ο ιστός που δεν έχει υποστεί πέψη. Το κυτταρικό εναιώρημα αναμειγνύεται με ίσο όγκο HBSS με $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ και το νέο διάλυμα φυγοκεντρείται στα 400g, 7 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα που προκύπτει επαναδιαλύεται σε 24ml HBSS με $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ και επαναφυγοκεντρείται στα 400g.

Φυγοκέντρωση σε διάλυμα βαθμιδωτής πυκνότητας

Η προκύπτουσα πελέττα κυττάρων είναι εμπλουτισμένη σε κολποειδικά κύτταρα, αφού τα περισσότερα ηπατοκύτταρα έχουν καταστραφεί από την προnáση. Για τον διαχωρισμό των HSC από το διάλυμα χρησιμοποιείται φυγοκέντρωση δύο σταδίων σε διάλυμα Nycodenz. Η διαδικασία εκμεταλλεύεται το χαμηλό ειδικό βάρος των HSC σε σχέση με τα άλλα κύτταρα του κολποειδούς ώστε να απομονωθούν πληθυσμοί υψηλής καθαρότητας σε HSC.

Η πελέττα που προκύπτει από το προηγούμενο στάδιο επαναδιαλύεται σε 50 ml διαλύματος 17% Nycodenz σε HBSS στο οποίο προστίθεται 10μg/ml DNase I. Το προκύπτον διάλυμα διαχωρίζεται σε 4 15-ml σωληνάρια και φυγοκεντρείται στα 1400g για 15 λεπτά στους 4°C. Η προκύπτουσα αιωρούμενη φάση συλλέγεται, πλένεται μία φορά σε HBSS και στη συνέχεια επαναδιαλύεται σε διάλυμα Nycodenz 10% σε HBSS με 10 μg/ml DNase I και φυγοκεντρείται ξανά στα 1400 g για 15 λεπτά στους 4°C. Η προκύπτουσα αιωρούμενη φάση αποτελείται από υψηλής καθαρότητας HSC ενώ η πελέττα αποτελείται από κύτταρα Kupffer, ενδοθηλιακά και άλλα κολποειδικά κύτταρα.

Η παραπάνω μέθοδος αποδίδει περι τα 30×10^6 κύτταρα με $> 98\%$ βιωσιμότητα όπως αυτή μετράται χρησιμοποιώντας Trypan Blue και $> 95\%$ καθαρότητα όπως αυτή υπολογίζεται ανιχνεύοντας τον αυτοφθορισμό των εστέρων ρετινόλης καθώς και με ανοσοιστοχημική χρώση για δεσμίνη.

Καλλιέργεια αστεροειδών κυττάρων

Τα προκύπτοντα HSC επαναδιαλύονται σε DMEM υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη, με συμπλήρωμα GLUTAMAX™, 20% FBS, 0.1 mM μη απαραίτητα αμινοξέα, 1000 U/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη και στη συνέχεια επωάζονται σε φλάσκες ή τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας σε πυκνότητα 30.000 κυττάρων/cm² και καλλιεργούνται σε συνθήκες 37°C, 5% CO₂ και 100% υγρασία. Το καλλιεργητικό μέσο αλλάζεται κάθε 48 ώρες και η περιεκτικότητα σε FBS μειώνεται σε 10% μετά τις πρώτες 48 ώρες καλλιέργειας.

Ανακαλλιέργεια Όταν τα κύτταρα φτάσουν σε κατάσταση πληρότητας στην επιφάνεια του καλλιεργητικού μέσου περι του 80-90% το θρεπτικό μέσο αφαιρείται και τα κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα HANKS χωρίς Ca²⁺, Mg²⁺ και στη συνέχεια προστίθενται 3ml διαλύματος τρυψίνης/EDTA. Μετά από επώαση 3 λεπτών στους 37°C προστίθεται θρεπτικό μέσο το οποίο απενεργοποιεί την τρυψίνη, και το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 150g για 10 λεπτά στους 25°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10 ml θρεπτικού υλικού και διαμοιράζονται εκ νέου σε φλάσκες ή τρυβλία καλλιέργειας.

Κατόπιν 7 ημερών σε καλλιέργεια τα κύτταρα είναι θετικά σε ανοσοφθορισμό για αSMA. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μεταξύ της 3ης και 5ης ανακαλλιέργειας.

6.1.2 Επίδραση με κυτταροκίνες, οκτρεοτίδη και αναστολείς PTP και STP

Κύτταρα σε περίπου 70% πληρότητα πλένονται με HBSS και τοποθετούνται σε καλλιεργητικό μέσο χωρίς FBS 24 ώρες πριν από κάθε επίδραση. Η επίδραση με τις κυτταροκίνες, οκτρεοτίδη και αναστολείς γίνεται χρησιμοποιώντας τις παρακάτω συγκεντρώσεις:

- TNF- α (R&D Minneapolis, MN) 70 ng/ml
- TGF- β (R&D) 5 ng/ml
- PDGF (R&D) 32 ng/ml
- IL-1 α (R&D) 20 ng/ml
- IFN γ (R&D) 300 U/ml
- Octreotide (Novartis, Basel, Switzerland) 10^{-10} , 10^{-8} και 10^{-6} (mmol l $^{-1}$).
- Ορθοβαναδικό νάτριο (Na_3VO_4 , SO) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Το Na_3VO_4 είναι ισχυρός αναστολέας των φωσφοτυροσινικών φωσφατασών (PTP). Τα στερημένα από ορό κύτταρα προεπιάζονται σε θρεπτικό χωρίς ορό με SO σε συγκέντρωση 0.1 – 1 μM για 1 ώρα. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απορρίπτεται και ακολουθεί η εκάστοτε επίδραση με ταυτόχρονη προσθήκη SO στην προαναφερθείσα συγκέντρωση.
- Οκαδαϊκό οξύ (OA) (Sigma Aldrich). Το OA είναι ισχυρός αναστολέας των φωσφατασών σερίνης θρεονίνης (STP). Τα στερημένα από ορό κύτταρα προεπιάζονται σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό με OA σε συγκέντρωση 0.1 μM για 1 ώρα. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απορρίπτεται και ακολουθεί

η εκάστοτε επίδραση με ταυτόχρονη προσθήκη OA στην προαναφερθείσα συγκέντρωση.

- Βορτμανίνη (Sigma Aldrich). Η βορτμανίνη είναι ισχυρός, μη αναστρέψιμος αναστολέας των PI3K κινασών. Χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 300nM. Η επίδραση με βορτμανίνη έγινε με την ίδια μέθοδο που αναφέρεται στους αναστολείς PTP και STP παραπάνω.
- LY294002 (Sigma Aldrich). Το LY294002 είναι ισχυρός, αναστρέψιμος συνθετικός αναστολέας των PI3K κινασών. Χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 50μM. Η επίδραση με LY294002 έγινε όπως αναφέρεται παραπάνω για τους αναστολείς PTP και STP.

Οι τελικές επώσεις πριν τη συλλογή δειγμάτων γίνονται για 12 ώρες εκτός τα πειράματα με αναστολείς PI3K στα οποία η συλλογή έγινε μετά τις 6 ώρες επώασης.

6.1.3 Απομόνωση RNA από αστεροειδή κύτταρα

Υλικά και συσκευές

- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας 25 ml (Nunc, USA)
- Φαινολικό διάλυμα ομογενοποίησης Trizol (Invitrogen)
- Αποστειρωμένο νερό άνευ RNAασών - RNase Free Water
- Φυγόκεντρος
- Χλωροφόρμιο (Sigma Aldrich)
- Ισοπροπανόλη (Sigma Aldrich)

- Αιθανόλη (Sigma Aldrich)
- Φωτόμετρο (Hitachi, Japan)
- 0,1N NaOH (Sigma) διάλυμα σε RNase Free Water

Μέθοδος Αστεροειδή κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκες έξι βοθρίων. Κατόπιν των επιδράσεων στις προαναφερθείσες συνθήκες το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και σε κάθε βοθρίο προστίθεται 1 ml διαλύματος Trizol το οποίο και αφήνεται να επιδράσει για 1-2 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται ελαφριά απόξεση των κυττάρων από την επιφάνεια των βοθρίων και το ομογενοποίημα τοποθετείται σε αποστειρωμένο σωληνάριο eppendorf και φυλάσσεται στους -80°C έως το επόμενο στάδιο.

Τα ομογενοποιήματα σε Trizol αποψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 15 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται χλωροφόρμιο υπο στείρες συνθήκες σε αναλογία 0,1 ml/ml Trizol και κατόπιν ισχυρής ανάδευσης το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για άλλα 5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση υπο 12000g για 15 λεπτά σε 4°C . Σ' αυτό το στάδιο τα βαρέα συστατικά (πρωτεΐνες, DNA) καθιζάνουν και σχηματίζουν πελέττα από την οποία είναι δυνατόν να απομονωθεί στη συνέχεια πρωτεΐνη με μέθοδο που θα αναφερθεί παρακάτω. Το RNA παραμένει διαλυμένο στο χλωροφόρμιο το οποίο σχηματίζει άχρωμο υπερκείμενο. Αυτό συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέο αποστειρωμένο μικροσωληνάριο eppendorf στο οποίο προστίθεται στη συνέχεια ίσος όγκος ισοπροπανόλης και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για 10 δευτ. και αφήνεται να σχηματίσει ίζημα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12000g για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C μετά την οποία είναι ορατός ο σχηματισμός ιζήματος. Το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεκτικά και ακολουθεί έκπλυση με 1 ml κρύας (4°C) αιθανόλης 75% κατ' όγκο σε RNase Free νερό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα

7000g για 8 λεπτά στους 4°C, αφαίρεση του υπερκείμενου και επανάληψη της έκπλυσης μία ακόμη φορά. Μετά την δεύτερη αφαίρεση του υπερκείμενου, το εναπομένον ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε απαγωγό και τέλος επαναδιαλύεται σε RNase Free νερό.

Στη συνέχεια γίνεται μέτρηση καθαρότητας του RNA του δείγματος με χρήση φωτόμετρου που έχει ρυθμιστεί να μετράει σε δύο μήκη κύματος, υπολογίζοντας το λόγο 260/280nm. Ο λόγος αυτός εξαρτάται από την περιεκτικότητα του δείγματος σε RNA (μέγιστη απορρόφηση στα 260nm) και πρωτεΐνη (μέγιστη απορρόφηση στα 280nm) και ιδανική τιμή είναι ο λόγος 2. Δύο μl RNA διαλύματος διαλύεται σε 0.1N NaOH. Τέλος, η ποσότητα του RNA υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$\text{RNA}_{(\mu\text{g})} = A_{260\text{nm}} \times \Phi \times V$$

Όπου:

$A_{260\text{nm}}$ η απορρόφηση στα 260nm

Φ ο συντελεστής αραίωσης [=500 (2μl δείγματος σε 1000μl NaOH)]

V ο όγκος του εναπομείναντος διαλύματος RNA σε ml

6.1.4 Επίδραση με DNάση, ανάστροφη μεταγραφή (RT) και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Υλικά

- DNase I (Gibco)
- Θερμικός κυκλοποιητής

-
- Ολιγονουκλεοτίδια θυμιδίνης 12-18 - Oligo d(T)₁₂₋₁₈ ή Pd(T)₁₂₋₁₈ ομο-ολιγομερές (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)
 - Αντίστροφη μεταγραφάση - Superscript II™RNase H⁻ (Roche)
 - Αναστολέας ριβονουκλεασών - RNAsin®(Promega, Madison, Wisconsin, USA)
 - Δεοξυνουκλεοτίδια - dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Roche)
 - Πολυμεράση DNA - Taq DNA Polymerase (Roche)
 - 100bp DNA ladder (Gibco)
 - Ολιγονουκλεοτίδια έναρξης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης - primers MWG (Ebersberg, Germany)
 - Αγαρόζη, βορικό οξύ, EDTA, Bromophenol blue, ficoll (type 400), ethidium bromide (Sigma Aldrich)
 - Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (BioRad, Hercules, California, USA)
 - Συσκευή και λογισμικό ανάγνωσης πηκτωμάτων (Molecular Analyst Software, BioRad)
 - Διάλυμα 5x TBE (για 1lt: 54g Tris, 27,5g Βορικό οξύ, 20ml 0,5M EDTA, απιονισμένο νερό μέχρι τον όγκο του 1lt, pH 8)
 - Loading buffer (0,25% Bromophenol blue, 15% Ficoll σε νερό)
 - Διάλυμα DNA ladder (1μl stock 100bp ladder, 7μl 1xTBE, 3μl loading buffer)

Επίδραση με DNase

Η επίδραση γίνεται για να αποφευχθεί η επιμόλυνση με γενομικό DNA και η λήψη ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Σε προσημειωμένα μικροσωληνάρια erppendorf όγκου 0,2ml με την ένδειξη + (με μεταγραφάση) και - (χωρίς μεταγραφάση) εισάγεται όγκος δείγματος που αντιστοιχεί σε 1μg RNA και ο όγκος συμπληρώνεται στα 8μl με RNase free νερό. Σε κάθε δείγμα (+ και -) προστίθεται αρχικά 1μl 10xDNAse I Reaction Buffer και στη συνέχεια 1μl DNase. Τα δείγματα αφήνονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα προστίθεται 1μl διαλύματος 25mM EDTA. Τα δείγματα τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή και υφίστανται θερμική επεξεργασία για 10 λεπτά στους 65°C, μετά τη λήξη της οποίας τοποθετούνται σε πάγο.

Ανάστροφη μεταγραφή

Σε κάθε δείγμα προστίθενται 2μl ολιγονουκλεοτιδίων με 12 έως 18 μόρια θυμίνης (Pd(T)₁₂₋₁₈) το οποίο δρα δημιουργώντας πλαίσια έναρξης της ανάστροφης μεταγραφής σε αντίστοιχα πολυαδενυλιωμένα τμήματα RNA του δείγματος. Τα δείγματα επανατοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή και θερμαίνονται στους 70°C για 10 λεπτά. Η θέρμανση προκαλεί ξεδίπλωμα των αλύσων ώστε να επιτευχθεί καλύτερη εφαρμογή των ολιγονουκλεοτιδίων. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο και ακολουθεί η προσθήκη σε κάθε δείγμα 4μl 5x RT-buffer, 1μl DTT, 1μl dNTPs και 1μl RNAsin. Τέλος, στα δείγματα με την ένδειξη + προστίθεται 1μl reverse transcriptase ενζύμου ενώ στο δείγμα - προστίθεται ίσος όγκος RNase free νερού. Τα - δείγματα χρησιμεύουν για να ελέγχουμε τυχόν μόλυνσεις που ενδεχομένως δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Τα δείγματα τοποθετούνται στον κυκλοποιητή και ακολουθεί η διαδικασία της ανάστροφης μετα-

γραφής σε θερμοκρασία 42°C για 60 λεπτά, στη συνέχεια στους 95°C για 5 λεπτά και τέλος κρύωμα στους 4°C. Τα δείγματα cDNA αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι την εκτέλεση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για κάθε δείγμα λαμβάνεται 1μl cDNA στο οποίο προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα PCR, 0,2mM dNTPs, 0,5mM forward και reverse primers και 0,05U/μl Taq DNA πολυμεράση. Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για την CST έχουν περιγραφεί αλλού⁶¹⁷. Οι συνθήκες αντίδρασης ήταν 5 λεπτά στους 94°C, 35 κύκλοι (30 δευτερολέπτων στους 94°C, 30 δευτερολέπτων στους 56-60°C και 30 δευτερολέπτων στους 72°C) που ακολουθούνται από επιμήκυνση του προϊόντος για 7 λεπτά στους 72°C.

Ανίχνευση προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Παρασκευάζεται 2% πηκτή αγαρόζης σε 0,5x TBE (2g αγαρόζης σε 100ml) το μείγμα θερμαίνεται ώστε να επιτευχθεί η ομοιογενής διάλυσή του και αμέσως προτού χυθεί στο ειδικό δοχείο πήξεως με χτένι, προστίθενται 40μl διαλύματος ethidium bromide 1mg/ml. Μετά την πήξη του, αφαιρείται το χτένι το οποίο έχει σχηματίσει βοθρία στα οποία θα τοποθετηθούν τα προς ηλεκτροφόρηση προϊόντα της PCR. Η πηκτή τοποθετείται στη συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Σε καθένα από τα προϊόντα της PCR προστίθεται διάλυμα loading buffer σε αναλογία 5:1 και 10 μl από το καθένα τοποθετείται στο βοθρίο που έχει σχηματιστεί από το χτένι στο πήκτωμα αγαρόζης. Στην πρώτη θέση φορτώνεται διάλυμα DNA ladder που χρησιμεύει ως μάρτυρας του μοριακού βάρους των προϊόντων. Το πήκτωμα ηλεκτροφορείται σε 0,5xTBE στα 100V για 45-60 λεπτά. Η ανίχνευση των

δεσμών γονιδιακού σήματος γίνεται υπο υπεριώδη ακτινοβολία. Το πήκτωμα φωτογραφίζεται ηλεκτρονικά και οι δέσμες αντιστοιχίζονται στο ανάλογο γονίδιο με τη βοήθεια της κλίμακας μοριακού βάρους ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται γενομικό DNA.

6.1.5 Ανοσοφθορισμός

Υλικά και συσκευές

- Βοθρία κυτταροκαλλιέργειας Permanox™ chamber slides (Nunc)
- PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,5mM KH₂HPO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,5)
- TBS (50mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,6)
- PFA διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4% σε νερό
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι GFAP αρουραίου (Chemicon) σε αραιώση 1:1000
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι δεσμίνης αρουραίου (Chemicon) σε αραιώση 5 µg/ml
- Πολυκλωνικά αντισώματα κονίκλου έναντι SSTR1-5 αρουραίου (Gramsch Laboratories, Schwabhausen, Germany) σε αραιώση 1:1000 (το anti-SSTR3 σε 1:500)
- Συνθετικά πεπτίδια που αντιστοιχούν στο αντιγονικό τμήμα κάθε υποδοχέα σωματοστατίνης SSTR1-5 (Gramsch)

-
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού εναντι αSMA ανθρώπου (αντιδρά επίσης και έναντι αρουραίου) (Chemicon International Concord Road, Billerica, MA) σε αραίωση 5 µg/ml
 - Πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι υποδοχέα οπιοειδών µ αρουραίου (Chemicon) σε αραίωση 1:1000
 - Πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι υποδοχέα οπιοειδών δ αρουραίου (Chemicon) σε αραίωση 1:1000
 - Διάλυμα PBS
 - Quench buffer (20mM γλυκίνη σε TBS)
 - Blocking buffer (TBS µε 0,2% TritonX-100, 1% Fish skin gelatin (Sigma Aldrich), 2mM MgCl₂)
 - Πολυκλωνικό, φθορίζον αντίσωμα αίγας έναντι IgG κονίκλου Alexa Fluor[®] 488 (Invitrogen) σε αραίωση 5 µg/ml
 - Πολυκλωνικό, φθορίζον αντίσωμα αίγας έναντι IgG ποντικού Alexa Fluor[®] 568 (Invitrogen) σε αραίωση 5 µg/ml
 - TO-PRO[®]-3 iodide (Invitrogen/Molecular Probes) σε αραίωση 1:1000
 - UltraCruz[™]mounting medium (Santa Cruz, CA 95060)
 - Μικροσκόπιο συνεστίασης Confocal laser scanning module (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany)

Μέθοδος Αστεροειδή κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκες Permapox 8 βοθρίων. Όταν φτάσουν πληρότητα περι του 70% της καλλιεργητικής επιφάνειας, το καλλιεργητικό μέσο αφαιρείται και τα κύτταρα πλένονται με κρύο PBS. Στη συνέχεια γίνεται επίδραση με διάλυμα PFA 4% σε PBS για 10 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα πλένονται με TBS δύο φορές και γίνεται επίδραση με quench buffer για 5 λεπτά ώστε να τερματιστεί εντελώς η δράση της παραφορμαλδεΰδης. Στη συνέχεια γίνεται επίδραση με blocking buffer για 10 λεπτά. Εν συνεχεία γίνεται επίδραση με το εκάστοτε πρώτο αντίσωμα. Το αντίσωμα αφήνεται να επιδράσει για 8-12 ώρες στους 4°C. Στη συνέχεια γίνεται εκ νέου επίδραση με blocking buffer για 10 λεπτά και ακολουθεί επώαση στο δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, τα κύτταρα πλένονται με TBS και γίνεται η τελική επίδραση με TO-PRO για 5 λεπτά. Τέλος, τα κύτταρα πλένονται με TBS, τα τοιχώματα της πλάκας Permapox αφαιρούνται προσεκτικά και προστίθεται μικρή ποσότητα mounting medium προτού οι πλάκες σφραγιστούν με λεπτή γυάλινη διαφάνεια. Μέχρι τη φωτογράφιση στο συνεστιακό μικροσκόπιο, τα κύτταρα φυλάσσονται μακριά από φως, στους 4°C.

6.1.6 Ανοσοστύπωμα western (western blot)

Υλικά και συσκευές

- Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης και συσκευή πρωτεϊνικής μεταφοράς (BioRad Hercules, California, U.S)
- Μembrάνη νιτροκυτταρίνης, φίλτρα whatman (BioRad)
- Μεθανόλη, ακρυλαμίδα, bis-ακρυλαμίδα, ουρία, CHAPS, θειοουρία, DTT, υδροχλωρική γουανιδίνη αιθανόλη, SDS, bromophenol blue, glycerol, Bovine

serum albumin (BSA), μερκαπτοαιθανόλη, υπερθειϊκό αμμώνιο (APS), TEMED, Fish Skin Gelatin (FSG), Tween20, Sodium Azide (Sigma Aldrich)

- Αναστολείς πρωτεασών - Complete Mini, EDTA-free (Roche)
- Stacking gel buffer (0,5M Tris, 0,4% SDS)
- Separating gel buffer (1,5M Tris, 0,4% SDS)
- Διάλυμα ακρυλαμίδης/bis-ακρυλαμίδης (για 100ml: 30gr ακρυλαμίδη, 0,8gr bis-ακρυλαμίδη, απιονισμένο νερό ως τα 100ml)
- Διάλυμα TGS (Για 1lt 10x διαλύματος: 30.3g Tris, 144g Γλυκίνη, 10g SDS)
- Πρωτεϊνικός δείκτης μοριακού βάρους - Broad range protein standards 6500 - 200,000 MW (BioRad)
- Πολυκλωνικά αντισώματα κονίκλου έναντι SSTR1-5 αρουραίου (Gramsch Laboratories, Schwabhausen, Germany) σε αραίωση 1:1000 (το anti-SSTR3 σε 1:500)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι αSMA ανθρώπου (αντιδρά επίσης και έναντι αρουραίου) (Chemicon) σε αραίωση 5 µg/ml
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι υποδοχέα οπιοειδών µ αρουραίου (Chemicon) σε αραίωση 1:1000
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι υποδοχέα οπιοειδών δ αρουραίου (Chemicon) σε αραίωση 1:1000
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι προκολλαγόνου τύπου I αρουραίου (Santa Cruz, CA 95060) σε αραίωση 1:200

-
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι β-ακτίνης αρουραίου (Santa Cruz, CA 95060) σε αραίωση 1:1000
 - Πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι Smad7 αρουραίου (Santa Cruz, CA 95060) σε αραίωση 1:200
 - Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας έναντι IgG ποντικού συζευγμένο με υπεροξειδάση (Chemicon) σε αραίωση 1:5000
 - Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας έναντι IgG κονίκλου συζευγμένο με υπεροξειδάση (Chemicon) σε αραίωση 1:5000
 - BCA reagent (BioRad)
 - Διάλυμα συλλογής πρωτεΐνης - lysis buffer (CHAPS 4%, 20mM TrisHCl, pH7, αναστολείς πρωτεϊνασών)
 - Διάλυμα συλλογής πρωτεΐνης από Trizol - (CHAPS 4%, 8M Ουρία, 3M Θειουρία, 1% DTT, αναστολείς πρωτεϊνασών)
 - Διάλυμα φορτώματος - sample buffer (Για 2x διάλυμα: 4% SDS, 20% Γλυκερόλη, 10% Μερκαπτοαιθανόλη)
 - Διάλυμα έκπλυσης (0.3M υδροχλωρική γουανιδίνη σε 95% αιθανόλη)
 - Διάλυμα μεταφοράς - Transfer buffer (για 1lt: 700ml απεσταγμένο νερό, 200ml μεθανόλη, 100ml 10x TGS)
 - Διάλυμα TBST (TBS με προσθήκη 0,05% Tween20)
 - Διάλυμα blocking buffer (BSA 5% σε TBST με προσθήκη 0,5% FSG)
 - Υπόστρωμα χημειοφωταύγειας - ECL Plus (Pierce, Rockford, IL)

- Φωτογραφικό φιλμ (Fujifilm, Tokyo, Japan)
- Λογισμικό επεξεργασίας εικόνας ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012)
- Διάλυμα αποδέσμευσης αντισώματος (stripping buffer) (100 mM glycine, pH 2,5, 200 mM NaCl, 0.1% Tween 20 (v/v), 0.1% (v/v) β-mercaptoethanol)

Συλλογή πρωτεΐνης

Συλλογή από κυτταρικές καλλιέργειες Το υπερκείμενο των καλλιιεργειών απορρίπτεται και τα κύτταρα πλένονται δύο φορές με παγωμένο PBS. Στη συνέχεια συλλέγονται σε lysis buffer με ελαφρά απόξεση πάνω σε πάγο. Τα ομογενοποιημένα φυγοκεντρώνονται στα 10.000g για 5 λεπτά και συλλέγονται τα υπερκείμενα. Η συγκέντρωση πρωτεΐνης γίνεται στη συνέχεια με τη μέθοδο BCA. Τέλος, τα δείγματα αναμιγνύονται με sample buffer και θερμαίνονται στους 85°C ώστε να επιτευχθεί η τελική διαταραχή της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών, με θραύση των δεσμών υδρογόνου από την υψηλή θερμοκρασία, διευκόλυνση της αναγωγής των δισουλφιδικών δεσμών από τα αναγωγικά συστατικά του διαλύματος (DDT, Me-OH) και διευκόλυνση της δράσης του SDS και της διαταραχής των υδρόφοβων δεσμών. Μετά από αυτό το στάδιο, τα δείγματα μπορούν να φυλαχθούν στους -20°C για μετέπειτα ανάλυση, αλλά η συχνή απόψυξη πρέπει να αποφεύγεται.

Συλλογή από το φαινολικό ομογενοποίημα σε Trizol Μετά την επίδραση χλωροφορμίου και την φυγοκέντρωση του ομογενοποιημένου Trizol, και κατόπιν της συλλογής της ανώτερης φάσης που περιέχει το mRNA, η κατώτερη φάση του

DNA και των πρωτεϊνών που απομένει μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση πρωτεΐνης. Για κάθε 1ml Trizol αρχικού διαλύματος προστίθεται 1,5ml ακετόνη. Κατόπιν ισχυρής ανάδευσης τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται στα 12.000g για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και η πρωτεϊνική πελέττα πλένεται τρεις φορές σε διάλυμα έκπλυσης υδροχλωρικής γουανιδίνης. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 2ml από το διάλυμα έκπλυσης ανά ml αρχικού όγκου Trizol. Σε κάθε κύκλο έκπλυσης, η πελέττα αφήνεται 20 λεπτά στο διάλυμα έκπλυσης σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 7500g για 5 λεπτά στους 4°C. Μετά την τελική έκλυση, η πελέττα αναδεύεται ισχυρά σε 2ml αιθανόλης και αφήνεται 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, φυγοκεντρείται σε 7500g για 5 λεπτά στους 4°C. Η αιθανόλη απορρίπτεται και η πελέττα αφήνεται να στεγνώσει τελείως. Η προκύπτουσα πρωτεϊνική πελέττα είναι εξαιρετικά δυσδιάλυτη σε συνήθη διαλύματα ιονικών ή μη τασιενεργών (δοκιμάστηκε SDS σε συγκέντρωση ως 1%) αλλά διαλύεται εύκολα σε διαλύματα με βάση το CHAPS και την ουρία όπως αυτό που αναγράφεται στα παραπάνω υλικά. Η ποιότητα της πρωτεΐνης είναι ικανοποιητική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για western blot ή άλλες πρωτεϊνικές μεθόδους. Διαλύματα με υψηλή συγκέντρωση ουρίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε SDS-PAGE μεθόδους εφόσον πρώτα αναμιχθούν με sample buffer. Σ' αυτή την περίπτωση πρέπει να αποφεύγεται η θέρμανσή τους πάνω από τους 37°C καθώς η ουρία υδρολύεται αυτόματα σε κυάνιο το οποίο μπορεί να προκαλέσει καρβαμοϋλίωση πλαγίων αλύσων αμινοξέων στις πρωτεΐνες του δείγματος δημιουργώντας ενδεχομένως προβλήματα στις μετέπειτα ανοσολογικές μεθόδους ανίχνευσης.

SDS-PAGE

Αρχικά κατασκευάζουμε την πηκτή σώρευσης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (separating gel). Οι συστάσεις των πηκτών αναγράφονται στον πίνακα 6.1

	Gel διαχωρισμού (10%)	Gel σώρευσης (3,9%)
Διάλυμα ακρυλαμίδης	5	0,65
Gel buffer	3,75 (separating)	1,25 (stacking)
H ₂ O	6,25	3,05
10% APS	0.05	0,025
TEMED	0.01	0,005

Πίνακας 6.1: Σύσταση gel διαχωρισμού και σώρευσης για SDS-PAGE. Οι ποσότητες αναγράφονται σε ml.

Αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα του gel διαχωρισμού. Το TEMED ξεκινάει τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, οπότε αναμιγνύεται τελευταίο από όλα τα υλικά. Μόλις προστεθούν όλα τα υλικά το μίγμα αναδεύεται ισχυρά αλλά με προσοχή να μην δημιουργηθεί αφρός από το SDS που περιέχει. Το διάλυμα χύνεται στο γυάλινο εκμαγείο της συσκευής κάθετης ηλεκτροφόρησης και αμέσως επιστοιβάζεται μικρή ποσότητα διαλύματος 75% αιθανόλης ώστε η φάση ανάμεσα σ' αυτό το gel και το επόμενο να γίνει όσο το δυνατόν πιο λεία και ομοιόμορφη. Το

gel πήζει αρκετά μέσα σε 2-3 λεπτά ώστε να επιτρέπει την απόρριψη της αιθανόλης με αναποδογύρισμα του εκμαγείου. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το διάλυμα του gel σώρευσης με πανομοιότυπο τρόπο όπως το προηγούμενο. Το διάλυμα χύνεται πάνω από το πηγμένο gel διαχωρισμού και τοποθετείται αμέσως το χτένι που δημιουργεί τα βοηθία φορτώματος δειγμάτων. Τα gel πήζουν εντελώς σε 5-10 λεπτά. Όταν πήζουν, αφαιρείται ο στηρικτικός σκελετός από το γυάλινο εκμαγείο και το τελευταίο μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου τα εκμαγεία τοποθετούνται απέναντι το ένα στο άλλο ώστε ανάμεσά τους και στα τοιχώματα της συσκευής να δημιουργείται κλειστός χώρος. Ο χώρος αυτός γεμίζει με διάλυμα 1x TGS, αρκετό ώστε να φτάνει το μέσο περίπου του οριζόντιου (άνωτερου) τμήματος των χτενιών. Επίσης ικανή ποσότητα TGS διαλύματος γεμίζεται στον περίξ των εκμαγείων χώρο της συσκευής. Στη συνέχεια τα χτένια αφαιρούνται ώστε το διάλυμα του TGS γεμίζει ταυτόχρονα τα βοηθία. Έτσι δημιουργείται ένα κλειστό ηλεκτρολυτικό κύκλωμα στο οποίο το ρεύμα μπορεί να περνάει μονάχα μέσα από το gel προκαλώντας έτσι τη μετακίνηση των πρωτεϊνών. Τυχόν διαρροές ή υπερχείλιση του διαλύματος TGS βραχυκυκλώνουν τη ροή του ρεύματος και τότε η ηλεκτροφόρηση είναι αναποτελεσματική.

Στα βοηθία που έχουν δημιουργηθεί από το χτένι φορτώνονται τα δείγματα. Συνήθως φορτώνεται ποσότητα 20-50μg πρωτεΐνης. Στο πρώτο βοηθίο φορτώνεται συνήθως ο δείκτης μοριακού βάρους. Στη συνέχεια η συσκευή ηλεκτροφόρησης γεμίζει με διάλυμα 1x TGS και ξεκινά η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης η οποία γίνεται στα 150V και περίπου 70mA. Ο χρόνος που διαρκεί η ηλεκτροφόρηση εξαρτάται από το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει ή αν πρόκειται να ανιχνεύσουμε περισσότερες της μίας πρωτεΐνες το πόσο κοντά είναι τα μοριακά τους βάρη (πρωτεΐνες που είναι κοντότερα χρειάζονται περισσότερο

χρόνο ώστε οι δέσμες τους να διαχωριστούν ικανοποιητικά). Η συνήθης διάρκεια για gel διαχωρισμού 10% ακρυλαμίδης είναι περί τη 1 ώρα.

Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Σε πλατύ δοχείο με αρκετή επιφάνεια ώστε να χωράει τις κασέτες της συσκευής μεταφοράς προσθέτουμε αρκετό διάλυμα μεταφοράς ώστε η πλευρά των κασετών στην οποία θα τοποθετηθεί το gel από την ηλεκτροφόρηση να είναι εντελώς εμβαπτισμένη. Μέσα στο διάλυμα εμβαπτίζονται πλήρως φίλτρα whatman, δύο για κάθε κασέτα καθώς και μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για κάθε gel, ίσων διαστάσεων με το gel διαχωρισμού. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης τα gel αφαιρούνται με προσοχή από τη συσκευή και το gel σώρευσης αποκόπτεται με τη βοήθεια μικρής σπάτουλας και απορρίπτεται. Το gel διαχωρισμού τοποθετείται αμέσως στο δοχείο με το διάλυμα μεταφοράς ώστε να αποφευχθεί η αποξήρανσή και παραμόρφωσή του. Οι κασέτες της συσκευής πρωτεϊνικής μεταφοράς ανοίγουν με την πλευρά στην οποία θα τοποθετηθεί το gel πλήρως εμβαπτισμένη στο διάλυμα διαχωρισμού. Όλη η παρακάτω διαδικασία ολοκληρώνεται χωρίς καθόλου οι μεμβράνες ή τα gel να αφαιρεθούν από το διάλυμα. Πάνω στην κασέτα τοποθετείται ίσων διαστάσεων λεπτό σφουγγάρι, επίσης πλήρως εμβαπτισμένο στο διάλυμα μεταφοράς. Πάνω στο σφουγγάρι τοποθετείται φίλτρο whatman και πάνω στο τελευταίο τοποθετείται προσεκτικά το gel. Από πάνω εφαρμόζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ώστε να εφαρμόζει ακριβώς στο gel. Από πάνω τοποθετείται το δεύτερο φίλτρο whatman και πάνω από αυτό δεύτερο σφουγγάρι. Η κασέτα κλείνει προσεκτικά, παραμένοντας διαρκώς εμβαπτισμένη στο διάλυμα μεταφοράς. Στη συνέχεια, τοποθετείται στη συσκευή μεταφοράς στην οποία εφαρμόζει παγοκύστη ώστε να κρατάει τη θερμοκρασία του διαλύματος χαμηλή καθ

όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Η συσκευή γεμίζει στη συνέχεια με διάλυμα μεταφοράς ώστε όλες οι κασέτες να είναι πλήρως εμβαπτισμένες. Ο χρόνος της μεταφοράς εξαρτάται από το μέγεθος των πρωτεϊνών που ενδιαφέρουν, για τις συνηθισμένες πρωτεΐνες αρκεί 1 ώρα σε 100V και 400mA.

Επίδραση αντισωμάτων

Μετά το πέρας της μεταφοράς, οι κασέτες ανοίγονται προσεκτικά, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης αφαιρούνται με λεπτή λαβίδα και τοποθετούνται αμέσως σε διάλυμα blocking, σε τρυβλίο, πάνω σε αναδευτήρα. Σημειώνεται με λεπτό μαρκαδόρο η πλευρά που ήταν προς το gel. Η "καλή" αυτή πλευρά τοποθετείται προς τα πάνω. Οι μεμβράνες αφήνονται στην επίδραση του blocking buffer για 30 λεπτά. Στη συνέχεια το blocking buffer αφαιρείται (μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί, φυλάσσεται στους 4°C) και ακολουθεί η επίδραση του πρώτου αντισώματος.

Το πρώτο αντίσωμα αραιώνεται στις προαναφερθείσες αραιώσεις σε blocking buffer στο οποίο προστίθεται ως συντηρητικό sodium azide σε τελική συγκέντρωση 0,02%. Φυλάσσονται στους 4°C και παραμένουν σ' αυτή τη μορφή ενεργά για πολλούς μήνες. Για κάθε μεμβράνη απαιτούνται περίπου 2,5ml διαλύματος αντισώματος. Μετά την εμβάπτιση των μεμβρανών στο διάλυμα του πρώτου αντισώματος, αφήνονται ολονυκτίως πάνω στον αναδευτήρα σε θερμοκρασία 4°C. Την επόμενη μέρα το διάλυμα του πρώτου αντισώματος συλλέγεται και φυλάσσεται. Οι μεμβράνες πλένονται τρεις φορές σε TBST και αφήνονται κάθε φορά 15 λεπτά στον αναδευτήρα. Στη συνέχεια γίνεται η επίδραση με το δεύτερο αντίσωμα το οποίο αραιώνεται στην προαναφερθείσα αραιώση σε blocking buffer. Η επίδραση γίνεται για 45-60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα του δεύτερου αντισώματος απορρίπτεται και οι μεμβράνες ξεπλένονται ακόμη 3 φορές σε

TBST, με κάθε πλύση να διαρκεί 15 λεπτά στον αναδευτήρα.

Στη συνέχεια ετοιμάζεται το υπόστρωμα της χημειοφωταύγειας σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το υπόστρωμα τοποθετείται στις μεμβράνες και αφήνεται να επιδράσει για 5-7 λεπτά. Στη συνέχεια οι μεμβράνες τοποθετούνται στην κασέτα εμφάνισης, κάτω από φύλλο διαφανούς πλαστικού και η υπόλοιπη διαδικασία ολοκληρώνεται σε σκοτεινό θάλαμο. Εκεί, τοποθετείται φωτογραφικό φιλμ πάνω από το πλαστικό φύλλο, η κασέτα κλείνει και το φιλμ αφήνεται αρκετή ώρα ώστε η φωταύγεια από το υπόστρωμα λουμινόλης να αφήσει ίχνος πάνω του. Ο ακριβής χρόνος εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η ποσότητα της πρωτεΐνης στο δείγμα, η έκφραση της υπο αντίχνευση πρωτεΐνης και η δραστηριότητα των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Μετά την έκθεση, ακολουθεί εμφάνιση του φιλμ σε ειδικό μηχάνημα εμφάνισης.

Αποδέσμευση αντισωμάτων, επαναχρησιμοποίηση μεμβρανών Οι μεμβράνες μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν μετά την εμφάνιση. Το ήδη υπάρχον πρώτο και δεύτερο αντίσωμα είναι καλύτερο να απομακρύνονται ώστε να βελτιωθεί η ποιότητα του σήματος στην επόμενη επίδραση. Για το σκοπό αυτό οι μεμβράνες επιάζονται σε διάλυμα αποδέσμευσης αντισώματος για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια πλένονται με άφθονο TBST. Εν συνεχεία απαιτείται επίδραση εκ νέου με blocking buffer και η διαδικασία της επίδρασης με τα αντισώματα μπορεί στη συνέχεια να επαναληφθεί.

Μέτρηση έντασης του παραγόμενου σήματος

Από την παραπάνω διαδικασία παράγονται δέσμες ίχνους που αντιστοιχεί στην θέση του gel στην οποία βρίσκεται η υπο διερεύνηση πρωτεΐνη. Ο δείκτης μοριακού βάρους βοηθάει στον υπολογισμό του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης. Η

πυκνότητα του παραγόμενου σήματος και το μέγεθος της δέσμης είναι ανάλογα της έκφρασης της πρωτεΐνης που μελετάται. Με λογισμικό επεξεργασίας εικόνας όπως το ImageJ είναι δυνατόν να ποσοτικοποιηθεί το σήμα με πυκνομετρία (densitometry) και λαμβάνουμε έτσι άμεσα συγκρίσιμες αριθμητικές τιμές.

6.1.7 Ζυμογραφία σε πήκτωμα ακρυλαμίδης

Υλικά και συσκευές

- Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης (BioRad)
- Γελατίνη δέρματος χοίρου, καζεΐνη γάλακτος Tris, γλυκερόλη, SDS, bromophenol blue, coomasie blue, μεθανόλη, οξικό οξύ, sodium azide, χλωριούχο ασβέστιο, χλωριούχος ψευδάργυρος, TritonX-100 (Sigma Aldrich)
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης - sample buffer (5x) (0,2M TrisCl pH 6,8, 5% SDS, 20% γλυκερόλη, 0,1% bromophenol blue)
- Διάλυμα χρωστικής Coomasie blue (0,5% Coomasie blue R-250, 30% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ)
- Διαλύματα γελατίνης και καζεΐνης (Για 100ml: ποσότητα ξηρής γελατίνης ή καζεΐνης ζυγίζεται ώστε η τελική συγκέντρωση στο gel που θα παραχθεί να είναι 1mg/ml. Διαλύεται με θέρμανση στους 57°C σε διάλυμα 40 ml 2M TrisCl, pH 8,8 με απεσταγμένο νερό ως τα 100ml)
- Διάλυμα ακρυλαμίδης/bis-ακρυλαμίδης (για 100ml: 30gr ακρυλαμίδα, 0,8gr bis-ακρυλαμίδα, απιονισμένο νερό ως τα 100ml)
- Διάλυμα TGS (Για 1lt 10x διαλύματος: 30.3g Tris, 144g Γλυκίνη, 10g SDS)

- Διάλυμα αποχρωματισμού (30% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 60% νερό)
- Διάλυμα TritonX-100 (10x: 25% TritonX-100, 30mM NaN₃)
- Διάλυμα έκπλυσης 1: 2,5% TritonX-100, 3mM NaN₃
- Διάλυμα έκπλυσης 2: 2,5% TritonX-100, 50mM TrisCl, pH7,5, 3mM NaN₃
- Διάλυμα έκπλυσης 3: 2,5% TritonX-100, 50mM TrisCl, pH7,5, 3mM NaN₃, 5mM CaCl₂, 1μM ZnCl₂
- Διάλυμα έκπλυσης 4: 50mM TrisCl, pH7,5, 3mM NaN₃, 5mM CaCl₂, 1μM ZnCl₂

Μέθοδος

Υπερκείμενα καλλιιεργειών HSC κατόπιν επιδράσεων συλλέγονται για τον προσδιορισμό της δραστικότητας των MMP1–10. Το κάθε δείγμα ανακατεύεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (sample buffer) σε αναλογία 1 μέρος δείγμα, 4 μέρη 5x διάλυμα και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Το προκύπτον διάλυμα δεν θερμαίνεται καθώς αυτό θα κατέστρεφε τα υπο μελέτη ένζυμα.

Εν τω μεταξύ παρασκευάζονται τα gel διαχωρισμού και σώρευσης. Για το gel διαχωρισμού αναμειγνύονται 10ml διαλύματος γελατίνης ή καζεΐνης, 6,6ml διαλύματος ακρυλαμίδης, 2g γλυκερόλη, 0,2ml 10% SDS, 67μl APS, 13,3μl TEMED. Το διάλυμα αναδεύεται και χύνεται στο εκμαγείο της συσκευής κάθετης ηλεκτροφόρησης. Επιστοιβάζεται μικρή ποσότητα αιθανόλης 75% η οποία απορρίπτεται μόλις το gel στερεοποιηθεί αρκετά σε 3-5 λεπτά. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το διάλυμα του gel σώρευσης, αναμειγνύοντας 1ml διαλύματος ακρυλαμίδης, 1,44ml 0,5M TrisCl, pH 6,8, 75μl SDS 10%, 4,92ml απεσταγμένο νερό, 60μl APS και

8μl TEMED. Το διάλυμα χύνεται προσεκτικά πάνω από το στερεοποιημένο gel διαχωρισμού και τοποθετείται αμέσως το χτένι ώστε να δημιουργηθούν τα βοηθία φορτώματος των δειγμάτων. Όταν το δεύτερο gel πήξει, σε 7-10 λεπτά, αφαιρείται το χτένι και φορτώνονται τα δείγματα. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται στα 200V έως ότου το μέτωπο της βρωμοφαινόλης φτάσει στο κατώτερο τμήμα του gel. Στη συνέχεια τα εκμαγεία ανοίγονται και τα gel αφαιρούνται και τοποθετούνται σε διάλυμα έκπλυσης 1. Στη συνέχεια γίνεται πλύση των gel επί 20 λεπτά σε αναδευτήρα μετά το τέλος της οποίας το gel μεταφέρεται στο διάλυμα έκπλυσης 2 και η πλύση επαναλαμβάνεται. Το ίδιο στάδιο επαναλαμβάνεται για τα διαλύματα έκπλυσης 3 και 4. Μετά την τελευταία έκπλυση, το διάλυμα (4) αντικαθίσταται με φρέσκο και το gel επωάζεται στους 37°C για 1-24 ώρες, αναλόγως τη δραστηκότητα και ποσότητα του υπο μελέτη ενζύμου.

Η παραπάνω διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή έκπλυση του SDS από το gel και την επαναδίπλωση των περιεχόμενων σ' αυτό πρωτεϊνών, σε λειτουργική μορφή. Η προσθήκη ασβεστίου και ψευδαργύρου στα τελευταία διαλύματα έκπλυσης είναι απαραίτητη για την ενζυμική δράση των MMPs. Από τη στιγμή που τα ένζυμα ανακτήσουν την ενζυμική τους δραστηριότητα ξεκινούν την αποδόμηση του πρωτεϊνικού υποστρώματος (γελατίνη ή καζεΐνη) το οποίο στο επόμενο βήμα γίνεται ορατό ως δεσμίδα κενή από χρωστική.

Το gel μεταφέρεται σε μικρή ποσότητα διαλύματος χρωστικής coomassie blue για 30 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται επίδραση με διάλυμα αποχρωματισμού για όσο χρόνο χρειαστεί ώστε οι δέσμες που εμφανίζονται κενές χρώσης να έχουν το καλύτερο δυνατόν contrast για τη φωτογράφιση.

Όπως και με τη μέτρηση της πυκνότητας σήματος στις δέσμες της western blot, έτσι και στη ζυμογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθεί λογισμικό επεξεργασίας

εικόνας όπως το ImageJ για την ποσοτικοποίηση του σήματος.

6.1.8 Μετρήσεις κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Υλικά και συσκευές

- Πλάκες καλλιέργειας 24 βοθρίων (Nunc)
- MTT thiazol blue [3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma Aldrich)
- Προπανόλη I (Sigma Aldrich)
- Μικροπλάκες ELISA επίπεδου πυθμένα (Corning & Costar, USA)
- Φωτόμετρο ELISA (Anthos Reader 2001)
- RPMI 1640 Medium (Gibco)
- διάλυμα MTT σε RPMI (5mg/ml τελικό διάλυμα διηθείται από μικροφίλτρο ώστε να αποστειρωθεί)

Μέθοδος

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των μιτοχονδρίων ζωντανών κυττάρων να μεταβολίζουν το άλας του τετραζολίου και να παράγουν μπλε κρυστάλλους. Οι κρύσταλλοι διαλύονται σε προπανόλη και προκύπτει έτσι ένα μωβ διάλυμα η ένταση του χρώματος του οποίου είναι ανάλογη με τον αριθμό των ζώντων κυττάρων. Η απορρόφηση του φωτός από το διάλυμα μετράται στο φωτόμετρο και έτσι η μέθοδος προσφέρει έναν απλό τρόπο για τον προσδιορισμό έμμεσα του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή απόπτωσης/νέκρωσης.

Κύτταρα μεταξύ ανακαλλιιεργειών 2-5 στρώνονται σε πυκνότητα 2×10^4 ανά βοθρίο. Αφήνονται 24 ώρες ώστε να ξεπεράσουν τη βλάβη και τις μεταβολικές συνέπειες της ανακαλλιέργειας και στη συνέχεια γίνεται η επίδραση στα κύτταρα με τους εκάστοτε παράγοντες προς μελέτη. Μετά το πέρας του χρόνου των επιδράσεων το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και προστίθεται σε κάθε βοθρίο 0,5ml διαλύματος MTT και οι πλάκες μεταφέρονται στον επωαστήρα στους 37°C , 5% CO_2 , 100% υγρασία για 3 ώρες. Μετά το πέρας των τριών ωρών, δουλεύοντας σε σκοτεινό χώρο, προστίθεται σε κάθε βοθρίο 0,5ml προπανόλη-1 και το διάλυμα αναδεύεται με τη βοήθεια πιπέττας ώστε να διαλυθούν καλά οι κρύσταλλοι που σχηματίστηκαν. Στη συνέχεια, μεταφέρονται 200μl από κάθε βοθρίο σε πλάκα ELISA με επίπεδο πυθμένα και πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 595nm. Οι τιμές απορρόφησης στα δείγματα κυττάρων στα οποία είχε γίνει επίδραση διαιρούνται με την μέση απορρόφηση στα δείγματα μάρτυρα για να προκύψει η κανονικοποιημένη τιμή για κάθε δείγμα εκφρασμένη ως ποσοστό απορρόφησης (x100).

6.2 Στατιστική ανάλυση

Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές χρησιμοποιώντας κύτταρα από διαφορετικό πειραματόζωο σε κάθε επανάληψη. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας για όλες τις αναλύσεις επιλέχθηκε το $p < 0.05$. Για την στατιστική επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ANOVA. Η κανονικότητα των δεδομένων ελέγχθηκε με το τεστ Shapiro-Wilk και η ομοσκεδαστικότητα των δεδομένων με το τεστ Fligner-Killeen. Για την post-hoc ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το Tukey HSD τεστ. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας τη γλώσσα προγραμματισμού και στατιστικής ανάλυσης R⁶²⁷. Σε όλα τα γραφήματα

οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικό σφάλμα εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά.

7

Αποτελέσματα

7.1 Απομόνωση αστεροειδών κυττάρων

Η μέθοδος της απομόνωσης βασίστηκε σε μέθοδο *in situ* καθετηριασμού και πέψης του ήπατος όπως αυτή χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν για την απομόνωση κυττάρων Kupffer αλλά και αστεροειδών κυττάρων από διάφορα εργαστήρια. Η μέθοδος αποδίδει 30×10^6 κύτταρα υψηλής καθαρότητας (>90-95%) και βιωσιμότητας (>98%). Παρόλα αυτά είναι μια μέθοδος εξαιρετικά χρονοβόρα και πολυπλοκή. Για την απομόνωση από ένα μόνο πειραματόζωο απαιτούνται περίπου 8 ώρες συνολικής εργασίας αν υπολογιστεί ο χρόνος προετοιμασίας υλικών, διαλυμάτων και συσκευών.

Αντί της παραπάνω μεθόδου δοκιμάστηκε εναλλακτική μέθοδος η οποία παρακάμπτει το κομμάτι της *in situ* πέψης, βασιζόμενο σε αρχικά μηχανική ομογενοποίηση του ηπατικού ιστού με τη βοήθεια λεπτής λεπίδας. Το πειραματόζωο θανατώνεται με θανατηφόρο δόση πεντοθάλης και το ήπαρ αφαιρείται αφού προηγηθεί ένεση με αργή ροή 20ml 1000 IU ηπαρίνης σε φυσιολογικό ορό ώστε να εκπλυθούν τα κολποειδή από το κυκλοφορούν αίμα. Στη συνέχεια το ήπαρ αποσπάται και μεταφέρεται σε τρυβλίο σε στείρες συνθήκες στην περιοχή εργασίας (hood). Εκεί προστίθενται 5ml μίγματος προνάσης 0,03% και 0,001% κολλαγενάσης σε HBSS με Ca^{2+} , Mg^{2+} στους 37°C και το ήπαρ ομογενοποιείται μηχανικά χρησιμοποιώντας λεπτή αποστειρωμένη λεπίδα. Η υπόλοιπη διαδικασία είναι ίδια όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 6.

Με τη μέθοδο αυτή ελαττώνεται δραματικά ο χρόνος τόσο της προετοιμασίας όσο και της εκτέλεσης της απομόνωσης. Μπορούν εύκολα να απομονωθούν κύτταρα από δύο πειραματόζωα ταυτόχρονα και με κατάλληλο προγραμματισμό μπορούν να γίνουν περισσότερες από μία απομονώσεις μέσα σε μία εργάσιμη μέρα. Η μέθοδος αποδίδει περί τα $10-12 \times 10^6$ κύτταρα από κάθε πειραματόζωο.

7.1.1 Ανοσοφθορισμός για GFAP και δεσμίνη

Τα απομονωμένα κύτταρα εξετάστηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού στο οποίο διαπιστώθηκε ο εξαιρετικά βραχύχρονος αυτοφθορισμός των εστέρων ρετινόλης που περιέχουν στο κυτταρόπλασμά τους. Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της ταυτότητας των κυττάρων έγινε ανίχνευση με ανοσοφθορισμό των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών δεσμίνη, GFAP και αSMA, συνδυασμός που χαρακτηρίζει αποκλειστικά και μόνο τα αστεροειδή κύτταρα στον ηπατικό ιστό (εικόνα 7.1).

Συμπέρασμα

Από τη μέθοδο απομόνωσης τόσο με *in situ* πέψη όσο και με μηχανική ομογενοποίηση απομονώνονται υψηλής καθαρότητας και βιωσιμότητας αστεροειδή κύτταρα. Οι μέθοδοι έχουν συγκρίσιμη αποτελεσματικότητα αλλά η μέθοδος της μηχανικής ομογενοποίησης είναι σημαντικά απλούστερη.

7.2 Μελέτη της έκφρασης υποδοχέων σωματοστατίνης

Οι μέχρι τώρα λίγες υπάρχουσες μελέτες δεν συμφωνούν στα αποτελέσματά τους. Υπάρχουν αναφορές για την έκφραση και των πέντε υποτύπων υποδοχέων σωματοστατίνης⁶²⁰ από ένα εργαστήριο, και μόνο των υποτύπων SSTR2-4 από άλλο εργαστήριο⁶²¹. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν ειδικά για κάθε υπότυπο αντισώματα, με δοκιμασμένη ειδικότητα και ευαισθησία από πολλές προηγούμενες μελέτες^{553;555;628--631}. Η ειδικότητα του σήματος τόσο στη western blot όσο και στον ανοσοφθορισμό ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας συνθετικά πεπτίδια η δομή των οποίων αντιστοιχεί στο αντιγονικό τμήμα του κάθε SSTR. Αντισώματα

που είχαν προεπωαστεί στο εκάστοτε συνθετικό πεπτίδιο, δεν έδιναν σήμα στη μετέπειτα επίδραση στα κυτταρικά δείγματα. Τα συνθετικά πεπτίδια αναγράφονται στον πίνακα 7.1.

Υποδοχέας	Αμινοξέα	Αλληλουχία αμινοξέων
SSTR1	377-391	SGGVFRNGTSRITTL
SSTR2A	355-369	ETQRTLLNGDLQTSI
SSTR2B	342-356	SCLDMIFRNNKNRKK
SSTR3	381-395	TSTSGQERPPSRVAS
SSTR4	374-388	EPGRKRIPLTRTTTF
SSTR5	350-364	AHRAAANGLMQTSKL

Πίνακας 7.1: Αλληλουχίες αμινοξέων συνθετικών αντιγονικών πεπτιδίων που αντιστοιχούν στο καρβοξυτελικό άκρο των SSTR1-5

7.2.1 Ανίχνευση SSTRs με ανοσοφθορισμό

Μελετήθηκαν ανενεργά κύτταρα αμέσως μετά την απομόνωση και κύτταρα στην 3η, 7η και 10η μέρα καλλιέργειας. Όλοι οι ανοσοφθορισμοί εξετάστηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο από το οποίο ελήφθησαν οι εικόνες που παρουσιάζονται.

Στα ανενεργά κύτταρα αμέσως μετά την απομόνωση καθώς και στα κύτταρα στα πρώιμα στάδια ενεργοποίησης (3 ημέρα) δεν ανιχνεύθηκε κανένας υπότυπος SSTR με ανοσοφθορισμό. Την έβδομη ημέρα, τα περισσότερα κύτταρα ήταν θε-

τικά για τους υποτύπους SSTR2A και 2B, σε μερικά ανιχνεύονταν SSTR3 και SSTR4 αλλά σε κανένα δεν ανιχνεύονταν SSTR1 ή SSTR5. Τη δέκατη ημέρα καλλιέργειας στην οποία τα κύτταρα θεωρούνται πλέον πλήρως ενεργοποιημένα εκφράζονταν οι υπότυποι SSTR1, 2A, 2B, 3 και 4 αλλά όχι ο 5 (πίνακας 7.2).

Ημέρα πρώτης εμφάνισης	SSTR1	SSTR2A	SSTR2B	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Ημέρα 0	0	0	0	0	0	0
Ημέρα 3	0	0	0	0	0	0
Ημέρα 7	0	3	5	3	1	0
Ημέρα 10	6	3	1	3	5	0

Πίνακας 7.2: Ημέρα πρώτης ανίχνευσης υποδοχέων SSTR. Τα δεδομένα είναι από έξι διαφορετικά πειράματα και βασίζονται σε ανίχνευση με ανοσοφθορισμό. Fisher's exact test $p < 0.01$

Οι έκφραση των διαφόρων υποτύπων υποδοχέων ήταν διαφορετική τόσο στη χρονική της έναρξη όσο και στον εντοπισμό τους στο κύτταρο. Οι υποδοχείς SSTR1, 2A, 2B και 4 εμφάνιζαν μεμβρανική και κυτταροπλασματική κατανομή, ενώ ο SSTR3 εμφάνιζε κυτταροπλασματική και έντονη πυρηνική εντόπιση (εικόνα 7.2). Η λειτουργική σημασία αυτής της παρατήρησης είναι άγνωστη αλλά παρόμοια ιδιόμορφη κατανομή στους υποδοχείς σωματοστατίνης έχει περιγραφεί και σε μελέτες άλλων κυττάρων⁶¹⁷ και συνηγορεί στο ότι οι διάφοροι υπότυποι εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες όσο αφορά την ενδοκυττάρωση και ανακύκλωσή τους.

7.2.2 Ανίχνευση SSTRs με ανοσοστύπωμα western

Η έκφραση υποδοχέων μελετήθηκε με τη μέθοδο του ανοσοστυπώματος western σε ομογενοποιημένα αστεροειδών κυττάρων στις ίδιες χρονικές στιγμές (ημέρες 0, 3, 7, 10) που ελήφθησαν τα δείγματα του ανοσοφθορισμού. Η έκφραση των υποδοχέων σωματοστατίνης όπως αυτή διαπιστώθηκε στα ανοσοστυπώματα συμφωνεί με τα δεδομένα από τον ανοσοφθορισμό. Μετά την 7η ημέρα σε καλλιέργεια όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν θετικά για τους υποδοχείς SSTR1, 2A, 2B, 3 και 4, ενώ κανένας υποδοχέας δεν ανιχνεύθηκε στα ομογενοποιημένα των ημερών 0 και 3. Ο υποδοχέας SSTR5 δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα πείραμα. Στην εικόνα 7.3 φαίνονται οι μείζονες δέσμες ίχνους στο ανοσοστύπωμα western. Τυπική είναι η παρουσία πολλαπλών δεσμών που υποδηλώνει έντονη μετα-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών αυτών και ιδίως του υποδοχέα SSTR2A και 2B.

Αξίζει να αναφερθεί ότι στο συγκεκριμένο κομμάτι της μελέτης των υποδοχέων στάθηκε σημαντικό εμπόδιο και η λήψη μη ειδικού σήματος. Συνήθως το διάλυμα δέσμευσης των μη ειδικών θέσεων (blocking buffer) στο οποίο επωάζεται η μεμβράνη που φέρει τις υπο διερεύνηση πρωτεΐνες, αποτελείται από 5% σκόνη άπαχου γάλακτος σε διάλυμα TBST. Το παραπάνω διάλυμα ήταν ανεπαρκές στη μελέτη των συγκεκριμένων υποδοχέων. Αντί αυτού χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 5% αλβουμίνης ορού βοός (BSA) με προσθήκη 0.5% γελατίνη δέρματος ιχθύος (Fish skin gelatin) σε TBST με πολύ καλύτερο αποτέλεσμα.

Η ειδικότητα του τελικού σήματος ελέγχθηκε με χρήση των συνθετικών αντιγονικών πεπτιδίων η πρωτοταγής δομή των οποίων αντιστοιχεί στο αντιγονικό τμήμα του κάθε υποδοχέα έναντι του οποίου στρέφεται το εκάστοτε αντίσωμα. Ανάμιξη του κάθε συνθετικού πεπτιδίου σε συγκέντρωση 10μg/ml στο διάλυμα του αντίστοιχου πρώτου αντισώματος εκμηδένισε το ίχνος στο μετέπειτα ανοσοστυ-

πωμα western.

Συμπέρασμα

Τα ανενεργά αστεροειδή κύτταρα δεν εκφράζουν κανέναν υπότυπο υποδοχέα σωματοστατίνης. Τα πλήρως ενεργοποιημένα κύτταρα εκφράζουν τους υποδοχείς SSTR1,2A,2B,3 και 4. Η έκφραση των υποδοχέων είναι όψιμο γεγονός κατά τη διαδικασία της ενεργοποίησης. Ο πρώτος υποδοχέας που εκφράζεται είναι SSTR2 (A και B, με ελαφρά προτίμηση στον B τουλάχιστον στα αρχικά στάδια της έκφρασης). Ακολουθεί η έκφραση του SSTR3 και τέλος του SSTR4 και SSTR1. Η σημασία αυτής της παρατήρησης και ο ενδεχόμενος ρόλος του σωματοστατινεργικού σηματοδοτικού μηχανισμού στη διαδικασία της ενεργοποίησης του αστεροειδούς κυττάρου είναι άγνωστη.

7.3 Ανίχνευση υποδοχέων οπιοειδών (μ και δ) και υποδοχέων κανναβινοειδών

Για την ανίχνευση υποδοχέων οπιοειδών μ και δ χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του ανοσοφθορισμού καθώς και η μέθοδος του ανοσοστυπώματος western όπως αυτές περιγράφεται στο κεφάλαιο 6. Για τους υποδοχείς κανναβινοειδών CB1 και CB2 έγινε μόνο ανοσοφθορισμός. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν πλήρως ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα (πέραν της 10ης ημέρας σε καλλιέργεια).

Τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα παράγουν υποδοχείς οπιοειδών μ και δ. Τόσο τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα όσο και τα κύτταρα του Kupffer παράγουν υποδοχείς CB1 και CB2 (εικόνες 7.4, 7.5).

7.4 Ανίχνευση mRNA κορτιστατίνης από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα

Προηγούμενη μελέτη έχει δώσει ενδείξεις ότι τα κύτταρα του Kupffer παράγουν κορτιστατίνη (μελέτη σε επίπεδο mRNA)⁶¹⁹. Για την ανίχνευση παραγωγής κορτιστατίνης απομονώθηκε mRNA από πλήρως ενεργοποιημένα κύτταρα και χρησιμοποιήθηκε RT-PCR όπως αυτή περιγράφηκε στο κεφάλαιο 6. Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής primers Forward: GCAAATTCGCTCTAAACACAGGA, Reverse: TTGGGAAGGAGGAGAGGAAAGAT και οι συνθήκες όπως αναφέρονται σε ανάλογη μελέτη στην κυτταρική σειρά HepG2⁶¹⁷. Το αναμενόμενο προϊόν ήταν στα 701bp.

Δεν ανιχνεύθηκε mRNA κορτιστατίνης σε δείγματα από 3 διαφορετικές απομονώσεις.

7.5 Μελέτη της έκφρασης SSTRs υπό την επίδραση κυτταροκινών

Πλήρως ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό για 24 ώρες και στη συνέχεια έγινε επίδραση με μίας εκ των κυτταροκινών TNF α , IFN γ , PDGF ή TGF β για 12 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα τασιενεργών ακολουθώντας τη μέθοδο που προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο 6. Με τη μέθοδο του ανοσοστυπώματος western έγινε ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της έκφρασης των υποδοχέων SSTR1-4. Για την πυκνομετρία του ίχνους στα ανοσοστυπώματα μετρήθηκαν για κάθε υποδοχέα όλες οι μείζονες δέσμες (εικόνες 7.6, 7.7).

Συμπέρασμα

Από τις υπό μελέτη προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, ο PDGF αυξάνει την έκφραση του SSTR1, SSTR3 και SSTR4, η IFN γ αυξάνει την έκφραση του SSTR4 ενώ ο TGF β ελαττώνει την έκφραση του SSTR2B. Ο TNF α δεν φαίνεται να έχει κάποια επίδραση στους υποδοχείς σωματοστατίνης.

7.6 Μελέτη της επίδρασης των κυτταροκινών και οκτρεοτίδης στην παραγωγή α SMA και α 1-προκολλαγόνου

Πλήρως ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό για 24 ώρες και στη συνέχεια έγινε επίδραση με μίας εκ των κυτταροκινών TNF α , PDGF, TGF β με ή χωρίς οκτρεοτίδη καθώς και με οκτρεοτίδης μόνης της σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10}).

Η οκτρεοτίδη ελάττωσε την παραγωγή α 1-προκολλαγόνου με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Ο TNF ελάττωσε την παραγωγή α 1-προκολλαγόνου και η οκτρεοτίδη ανέστειλε αυτή τη δράση. Ο PDGF προκάλεσε ισχυρή επαγωγή της παραγωγής α 1-προκολλαγόνου και η οκτρεοτίδη δεν άσκησε σημαντική δράση σ' αυτό το μηχανισμό. Ο TGF β ήταν το ισχυρότερο ερέθισμα για την παραγωγή α 1-προκολλαγόνου, επάγοντας τριπλασιασμό σχεδόν της παραγωγής σε σχέση με τα δείγματα μάρτυρα. Η οκτρεοτίδη σε χαμηλή συγκέντρωση άσκησε σημαντική αναστολή σε αυτή τη δράση. Καμία κυτταροκίνη ούτε και η οκτρεοτίδη ή ο συνδυασμός τους δεν είχαν επίδραση στην έκφραση α SMA. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στην εικόνα 7.8.

Συμπέρασμα

Οι κυτταροκίνες TNF α , PDGF και TGF β καθώς και η οκτρεοτίδη μπορούν να επηρεάζουν την παραγωγή α 1-προκολλαγόνου από τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. Αντίθετα, η παραγωγή α SMA φαίνεται να σχετίζεται αποκλειστικά και μόνο με την κατάσταση του κυττάρου (διαφοροποίηση σε μυοϊνοβλάστη ή ανενεργή κατάσταση) και δεν υπόκειται σε ποσοτικές μεταβολές υπό τα συγκεκριμένα ερεθίσματα. Οι επίδραση της οκτρεοτίδης στην παραγωγή α 1-προκολλαγόνου διαφέρει ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται το κύτταρο και τα υπόλοιπα ερεθίσματα που αυτό δέχεται.

7.6.1 Επίδραση της οκτρεοτίδης στην έκφραση υποδοχέων TNFR-II στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα

Μετρήθηκε η έκφραση TNFR-II σε πλήρως ενεργοποιημένα κύτταρα κατόπιν επίδρασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις οκτρεοτίδης (10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10}). Η έκφραση του TNFR-II βρέθηκε να ελαττώνεται με την επίδραση της οκτρεοτίδης σε υψηλή συγκέντρωση (εικόνα 7.9). Κατά πόσο πρόκειται για ελάττωση της έκφρασης του υποδοχέα ή μετατροπή του σε διαλυτή μορφή, είναι άγνωστο.

Συμπέρασμα

Ένας πιθανός τρόπος που η οκτρεοτίδη ασκεί την ανασταλτική της δράση στην επίδραση του TNF α είναι μέσω ελάττωσης των μεμβρανικών TNFR-II υποδοχέων.

7.6.2 Επίδραση της οκτρεοτίδης στην έκφραση SMAD7 στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα

Μετρήθηκε η έκφραση του ανασταλτικού για τις δράσεις του TGFβ, SMAD7, σε πλήρως ενεργοποιημένα κύτταρα που είχαν επωαστεί σε θρεπτικό υλικό με οκτρεοτίδη σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10}). Η έκφραση του SMAD7 επάγεται από την οκτρεοτίδη στις συγκεντρώσεις 10^{-6} και 10^{-8} (εικόνα 7.10).

Συμπέρασμα

Ένας πιθανός τρόπος που η οκτρεοτίδη ασκεί την ανασταλτική της δράση στην επίδραση του TGFβ είναι μέσω επαγωγής του ανασταλτικού SMAD7.

7.6.3 Ο ρόλος των αναστολέων φωσφατασών στην παραγωγή α1-προκολλαγόνου

Το ορθοβαναδικό νάτριο (sodium orthovanadate, SO) είναι αναστολέας των φωσφοτυροσινικών φωσφατασών (PTP) και το οκαδαϊκό οξύ (okadaic acid, OA), μία τοξίνη που παράγεται από τον σπόγγο *Halichondria okadae* είναι ισχυρός αναστολέας των φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης (STP).

Με τη βοήθεια των δύο αυτών αναστολέων μελετήθηκε ο ρόλος των PTP και των STP στη δράση της οκτρεοτίδης. Πλήρως ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό για 24 ώρες και στη συνέχεια έγινε επίδραση με μίας εκ των κυτταροκινών TNFα, PDGF, TGFβ με ή χωρίς οκτρεοτίδη καθώς και με οκτρεοτίδης μόνης της σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10}). Δύο σειρές κυττάρων είχαν προεπωαστεί για 1 ώρα

σε συγκέντρωση 1 μ M SO και 0,1 μ M OA αντίστοιχα, και στις επιδράσεις με οκτρεοτιδίη και κυτταροκίνες που ακολούθησαν το θεραπευτικό αυτών των κυττάρων περιείχε τον εκάστοτε αναστολέα στην προαναφερθείσα συγκέντρωση. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 12 ώρες και στη συνέχεια ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα τασιε-νεργών. Η παραγωγή α 1-προκολλαγόνου ποσοτικοποιήθηκε με ανοσοστύπωμα western.

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στην εικόνα 7.11. Το SO σε συγκεντρώσεις 0.1 μ M – 1 μ M ανέστειλε την κατασταλτική δράση της οκτρεοτιδής στην παραγωγή προκολλαγόνου. Τόσο η αναστολή των PTP όσο και η αναστολή των STP αναστέλλει τις δράσεις της οκτρεοτιδής. Το OA ανέστειλε σημαντικά την παραγωγή α 1-προκολλαγόνου σε όλες τις επιδράσεις που χρησιμοποιήθηκε.

Συμπέρασμα

Η αναστολή των PTP φαίνεται να αναστέλλει τις δράσεις της οκτρεοτιδής όταν αυτή επιδρά μόνη στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. Η αναστολή της ενδοκυττάριας σηματοδότηση μέσω STP ενδέχεται να έχει κλινικά σημαντικό ρόλο ως θεραπευτικός στόχος στην ηπατική ίνωση.

7.7 Μελέτη της επίδρασης της οκτρεοτιδής στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 4, η οκτρεοτιδίη λειτουργεί προαποπτωτικά ή αναστέλλοντας τη μίτωση σε ένα μεγάλο αριθμό καρκινικών αλλά και φυσιολογικών κυττάρων. Τα μέχρι τώρα πειραματικά δεδομένα είναι αντικρουόμενα. Μία ομάδα ερευνητών ανέφερε ότι η σωματοστατίνη δεν έχει ανασταλτικές δράσεις

στον πολλαπλασιασμό των ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων⁶²³, ενώ μια άλλη ομάδα παρατήρησε προαποπτωτική δράση της σωματοστατίνης σε αυτά τα κύτταρα⁶²².

7.7.1 Μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT

Πλήρως ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλάκες 8 βοθρίων όπου και καλλιεργήθηκαν μέχρι 70-80% πληρότητα της επιφάνειας του κάθε βοθρίου. Στη συνέχεια επώαστηκαν σε μία εκ των κυτταροκινών TNF α , PDGF και TGF β με ή χωρίς οκτρεοτίδη σε τρεις συγκεντρώσεις (10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10}). Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT όπως αυτή περιγράφηκε στο κεφάλαιο 6 και συγκρίθηκε με δείγματα μάρτυρα από κύτταρα που δεν είχαν επωαστεί σε καμία από τις παραπάνω ουσίες.

Στη συνέχεια, για την εκτίμηση της δράσης των PTP και STP, τα πειράματα επαναλήφθηκαν όπως αναφέρεται παραπάνω αλλά αυτή τη φορά τα κύτταρα χωρίστηκαν σε τρεις σειρές. Στην πρώτη επαναλήφθηκαν οι επιδράσεις που αναφέρονται παραπάνω, στη δεύτερη και την τρίτη, προ των επιδράσεων τα κύτταρα προεπώαστηκαν για 1 ώρα σε 1 μ M ορθοβαναδικό νάτριο (SO) και 0,1 μ M οκταδαϊκό οξύ (OA) αντίστοιχα. Στη συνέχεια ακολούθησαν οι επιδράσεις με οκτρεοτίδη και κυτταροκίνες όπως παραπάνω, με τη διαφορά ότι στις προεπωασμένες σειρές προστέθηκε ο εκάστοτε αναστολέας φωσφατάσης στην ίδια συγκέντρωση όπως στην προεπώαση.

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στις εικόνες 7.12 και 7.13. Η οκτρεοτίδη μόνη της δεν άσκησε καμία σημαντική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο TNF α ελαττώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και η οκτρεοτίδη αναστέλλει αυτή του

τη δράση. Ο PDGF είναι έντονα μιτογόνος και η οκτρεοτίδη φαίνεται να ενισχύει τη δράση του, με μέγιστη ενίσχυση στη συγκέντρωση 10^{-8} . Ο TGFβ αύξησε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και η οκτρεοτίδη δεν είχε καμία σημαντική δράση σ' αυτή την επίδραση.

Η αναστολή των PTP ανέστειλε τη δράση της οκτρεοτίδης μόνο κατά του TNFα, ενώ η αναστολή των STP ανέστειλε τη δράση της οκτρεοτίδης κατά του PDGF, του TNFα και ελάττωσε τον επαγόμενο από τον TGFβ κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Συμπέρασμα

Οι επιδράσεις της οκτρεοτίδης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εξαρτώνται από το μικροπεριβάλλον του αστεροειδούς κυττάρου και τον ταυτόχρονο ερεθισμό από κυτταροκίνες. Οι φωσφατάσες σερίνης θρεονίνης ελαττώνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό που επάγει ο TGFβ, παρατήρηση με ενδεχομένως κλινική σημασία για την ηπατική ίνωση.

7.8 Μελέτη της επίδρασης της οκτρεοτίδης στην παραγωγή MMPs

Με τη μέθοδο της ζυμογραφίας σε πηκτή ακρυλαμίδης μπορεί να μετρηθεί η ενζυμική δραστηριότητα σε ένα δείγμα με ικανοποιητική ειδικότητα και ευαισθησία. Η μέθοδος βασίζεται στην ηλεκτροφόρηση του δείγματος παρουσία SDS σε πηκτή που περιέχει κατάλληλο υπόστρωμα για τα υπο εξέταση ένζυμα. Αντίθετα με τη διαδικασία που ακολουθείται προ του ανοσοστυπώματος western, το διάλυμα του δείγματος δεν περιέχει αναγωγικό μέσο, ούτε και θερμαίνεται ώστε να

μην καταστραφούν τα υπο εξέταση ένζυμα. Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο διαχωρίζεται κατά μοριακό βάρος με ηλεκτροφόρηση και στη συνέχεια με αλληπάλληλες πλύσεις της πηκτής σε διάλυμα μη ιονικού τασιενεργού (TritonX-100) το SDS απομακρύνεται, επιτρέποντας το ένζυμο να αναδιπλωθεί στην ενεργή του μορφή. Κατόπιν, το pH της πηκτής ρυθμίζεται στο βέλτιστο για τη λειτουργία του εκάστοτε ενζύμου και η πηκτή επωάζεται στους 37°C ώστε το ένζυμο να δράσει στο υπόστρωμα για χρονικό διάστημα που καθορίζεται ανάλογα με την πυκνότητα της πρωτεΐνης στα δείγματα και τη δραστηριότητα του εκάστοτε ενζύμου. Στη συνέχεια η πηκτή χρωματίζεται με χρωστική που δεσμεύεται από αμινοξέα πρωτεϊνών (coomassie blue) παίρνοντας ένα βαθύ κυανό χρώμα. Τέλος με σταδιακό αποχρωματισμό σε διάλυμα μεθανόλης και οξικού οξέως επιτυγχάνεται αντίθεση μεταξύ του χρωματισμένου υποστρώματος και των θέσεων στις οποίες το υπόστρωμα έχει υδρολυθεί από το ένζυμο. Λαμβάνονται με αυτό τον τρόπο δεσμίδες κενές χρώματος που εύκολα διακρίνονται και ποσοτικοποιούνται με λογισμικό επεξεργασίας εικόνας όπως το πρόγραμμα ImageJ. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο 6.

Οι διάφορες μεταλλοπρωτεϊνάσες θεμέλιας ουσίας (MMP) παρουσιάζουν διαφορετική δραστηριότητα για τη γελατίνη και την καζεΐνη. Για τη μελέτη των MMP-2 και MMP-9 χρησιμοποιείται υπόστρωμα γελατίνης ενώ για την ανίχνευση δραστηριότητας των MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-8 και MMP-10 χρησιμοποιείται υπόστρωμα καζεΐνης.

Πλήρως ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλάκες 8 βοθρίων όπου και καλλιεργήθηκαν μέχρι 70–80% πληρότητα της επιφάνειας του κάθε βοθρίου. Στη συνέχεια επωάστηκαν σε μία εκ των κυτταροκινών TNF α , PDGF και TGF β με ή χωρίς οκτρεοτίδη σε τρεις συγκεντρώσεις (10^{-6} , 10^{-8}),

10^{-10}). Επίσης ίδιες επιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα προεπωασμένα για 1 ώρα σε $1\mu\text{M}$ ορθοβαναδικού οξέως (SO) ή $0,1\mu\text{M}$ οκαδαϊκού οξέως (OA) και τα οποία περιείχαν τους αναστολείς αυτούς στις αναφερόμενες συγκεντρώσεις καθ' όλη τη διάρκεια των επιδράσεων. Υπερκείμενα των καλλιιεργειών συλλέχθηκαν και η ποσότητα της πρωτεΐνης μετρήθηκε με τη μέθοδο BCA προτού τα υπερκείμενα αναμιχθούν με διάλυμα δείγματος ζυμογραφίας (sample buffer) και ηλεκτροφορηθούν σε πηκτή ακρυλαμίδης που περιείχε γελατίνη ή καζεΐνη σε τελική συγκέντρωση 1mg/ml .

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στις εικόνες 7.14, 7.15. Στις πηκτές καζεΐνης δεν ανιχνεύθηκε καμία ενζυματική δράση ακόμη και μετά από επώαση 72 ωρών. Στις πηκτές ζελατίνης αντίθετα ανιχνεύθηκε δράση στα 72 kDa και 92 kDa που αντιστοιχεί στα μοριακά βάρη της MMP-2 και MMP-9 αρουραίου αντίστοιχα.

Ο TNF α επάγει την παραγωγή MMP-9. Η οκτρεοτίδη δεν έχει σημαντικές δράσεις στην επίδραση αυτή. Η επίδραση με οκαδαϊκό οξύ αντιθέτως επάγει πολύ ισχυρά τόσο την MMP-2 όσο και την MMP-9.

Ο PDGF επάγει την MMP-2 και την MMP-9. Η επίδραση μόνης της οκτρεοτίδης δεν επηρεάζει αυτό το αποτέλεσμα. Η επίδραση με οκτρεοτίδη όμως κατόπιν προεπώασης σε ορθοβαναδικό νάτριο αυξάνει την επαγωγή MMP-2 και MMP-9 από τον PDGF. Το οκαδαϊκό οξύ επάγει ισχυρότητα τόσο την MMP-2 όσο και την MMP-9.

Ο TGF β δεν έχει κάποια επίδραση στην παραγωγή MMP-2 ή MMP-9 μόνος ή με οκτρεοτίδη. Το οκαδαϊκό οξύ αντιθέτως επάγει ισχυρά και τις δύο μεταλλοπρωτεΐνάσες.

Συμπέρασμα

Το σημαντικότερο συμπέρασμα από αυτή τη σειρά πειραμάτων είναι η παρατήρηση ότι η αναστολή των φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης από το οκαδαϊκό οξύ αυξάνει σημαντικά την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών θεμέλιας ουσίας, και κυρίως της MMP-9. Ο TNF α επίσης επάγει και τις δύο μεταλλοπρωτεάσες.

7.9 Μελέτη της αναστολής PI3K στην έκφραση α 1-προκολλαγόνου

Για τη μελέτη της σημασίας του σηματοδοτικού μονοπατιού της κινάσης της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K) χρησιμοποιήθηκαν δύο αναστολείς αυτού του ενζύμου, η βορτμανίνη και το LY294002. Η βορτμανίνη (wortmannin) είναι στεροειδής μεταβολίτης του μύκητα *Talaromyces wortmannii* με χαρακτηριστική ιδιότητα ισχυρού αναστολέα όλων των κατηγοριών PI3K ενζύμων με τις οποίες σχηματίζει σταθερά (ομοιοπολικά) σύμπλοκα. Το LY294002 είναι συνθετική ένωση που έχει την ιδιότητα να αναστέλλει αναστρέψιμα τις PI3K. Είναι ασθενέστερος αναστολέας από τη βορτμανίνη (IC₅₀ 1,4 μ M σε σύγκριση με 5 nM για τη βορτμανίνη).

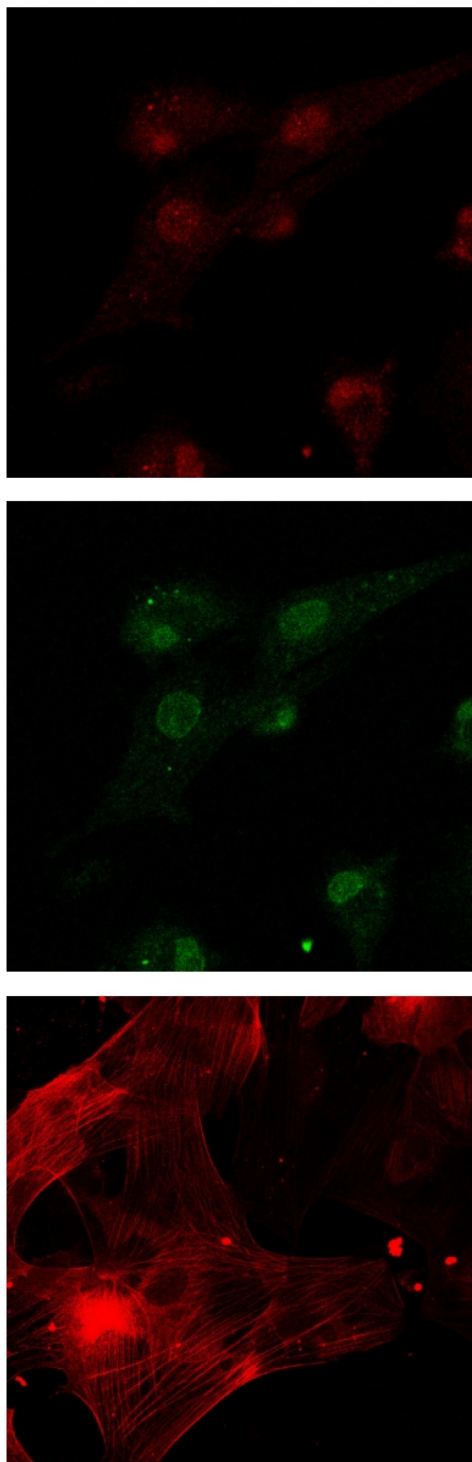
Πλήρως ενεργοποιημένα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό και στη συνέχεια επώαστηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε LY294002 (50 μ M) ή βορτμανίνη (300nM) με ή χωρίς οκτρεοτίδη για 6 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα τασιενεργών και η παραγωγή α 1-προκολλαγόνου ελέγχθηκε με τη μέθοδο του ανοσοστυπώματος western.

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στην εικόνα 7.16. Το LY294002 προκαλεί ισχυρή αναστολή της έκφρασης α 1-προκολλαγόνου που όπως φαίνεται δεν εξαρ-

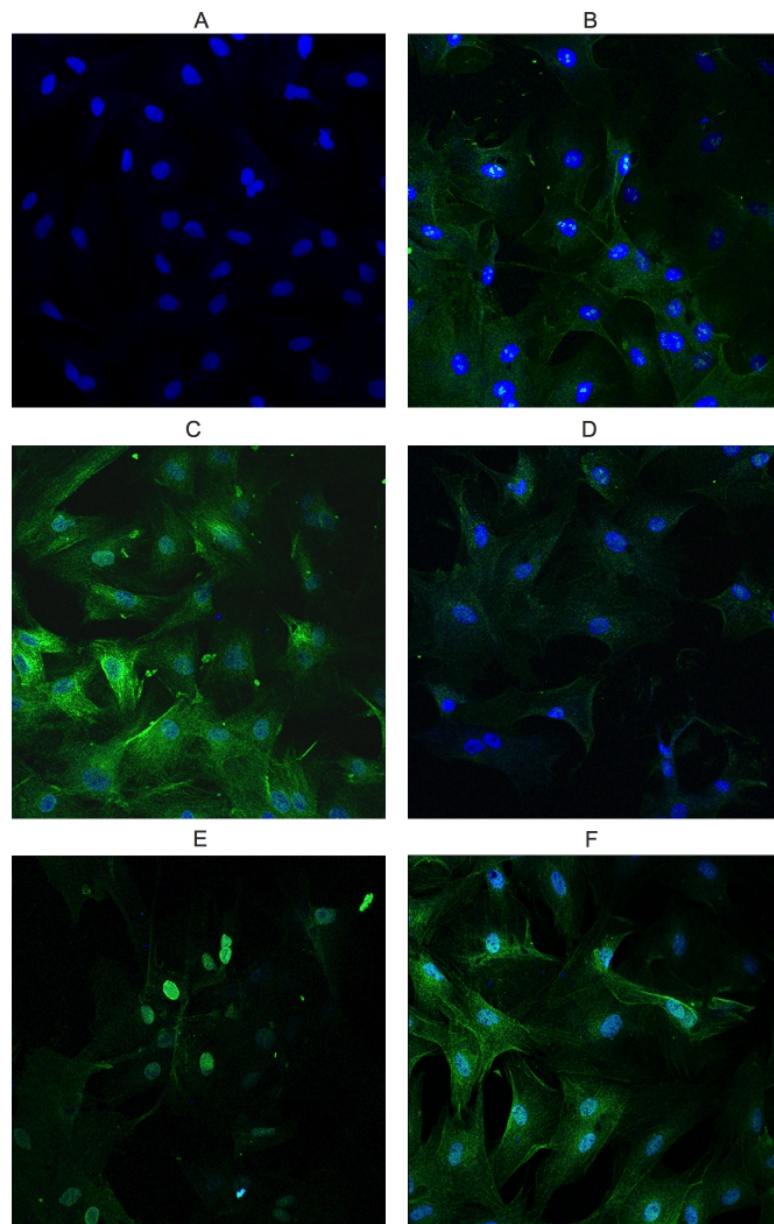
τάται από την αναστολή των PI3K. Η οκτρεοτίδη δεν επηρέασε αυτό το αποτέλεσμα.

Συμπέρασμα

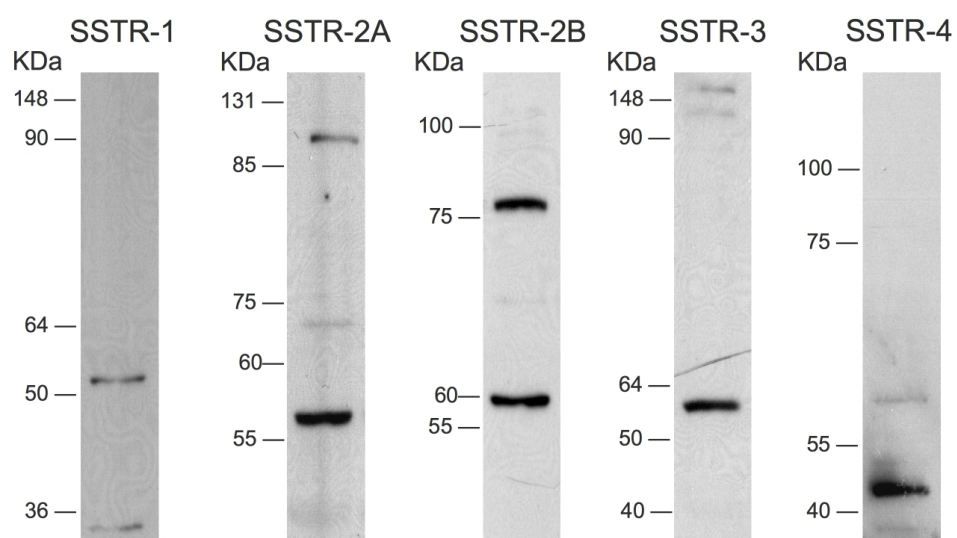
Το LY294002 αναστέλλει ισχυρά την παραγωγή α1-προκολλαγόνου με μη εξαρτώμενο από τις PI3K τρόπο. Η επίδραση με οκτρεοτίδη δεν φαίνεται να έχει κάποια βιολογική δράση στα κύτταρα στα οποία έχει αποκλειστεί το μονοπάτι των PI3K κινασών.



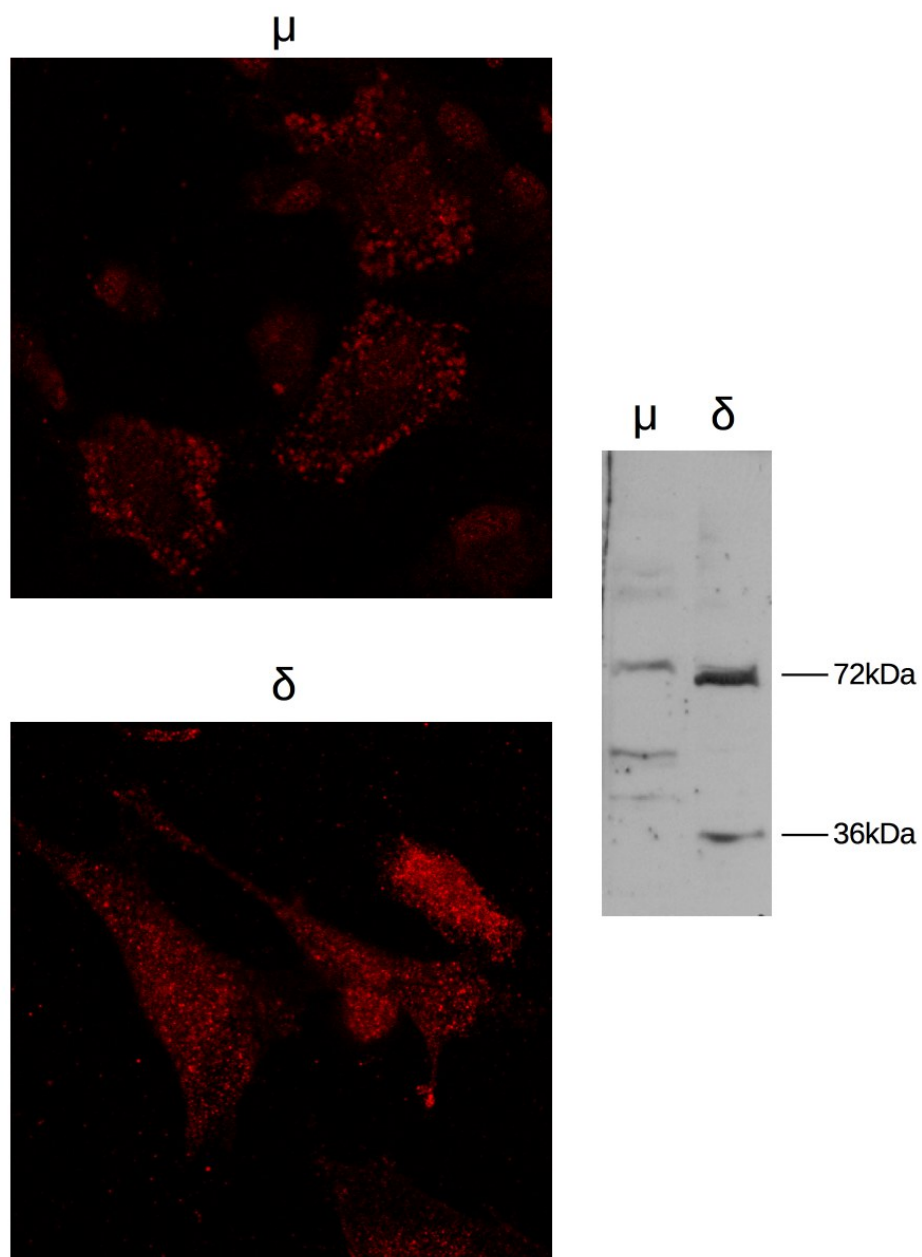
Εικόνα 7.1: Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο. Μελέτη ανοσοφθορισμού για τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες δεσμίνη (πάνω), GFAP (μέσο) και αSMA (κάτω)



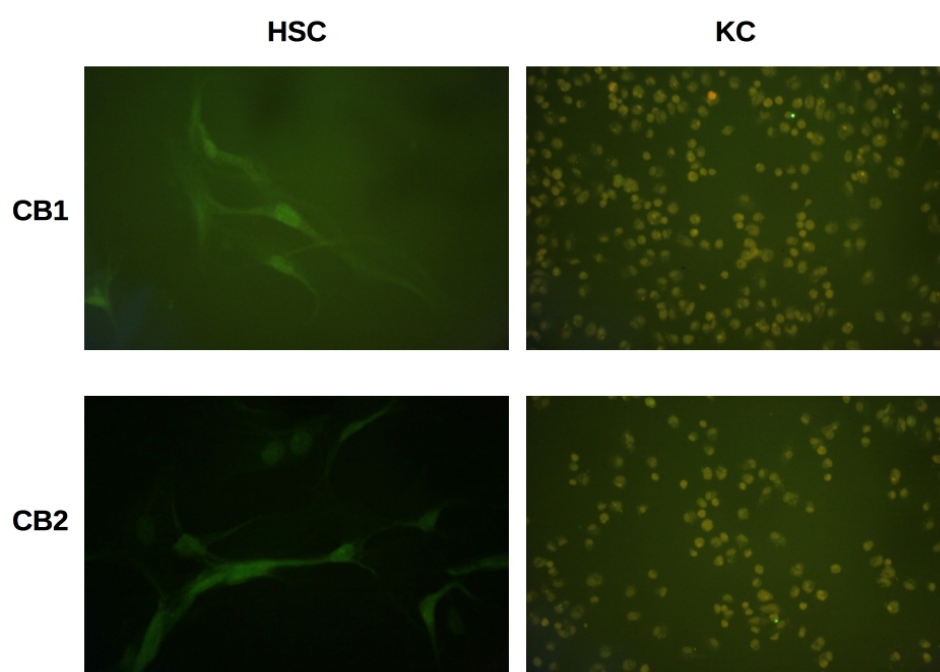
Εικόνα 7.2: Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο. Μελέτη ανοσοφθορισμού για υποτύπους SSTR σε ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. A: Δείγμα μάρτυρα (μόνο 2ο αντίσωμα), B: SSTR1, C: SSTR2A, D: SSTR2B, E: SSTR3, F: SSTR4. Οι υποδοχείς 1, 2A, 2B και 4 δείχνουν κυρίως κυτταροπλασματική εντόπιση, ενώ ο υποδοχέας 3 δείχνει επίσης έντονη πυρηνική χρώση.



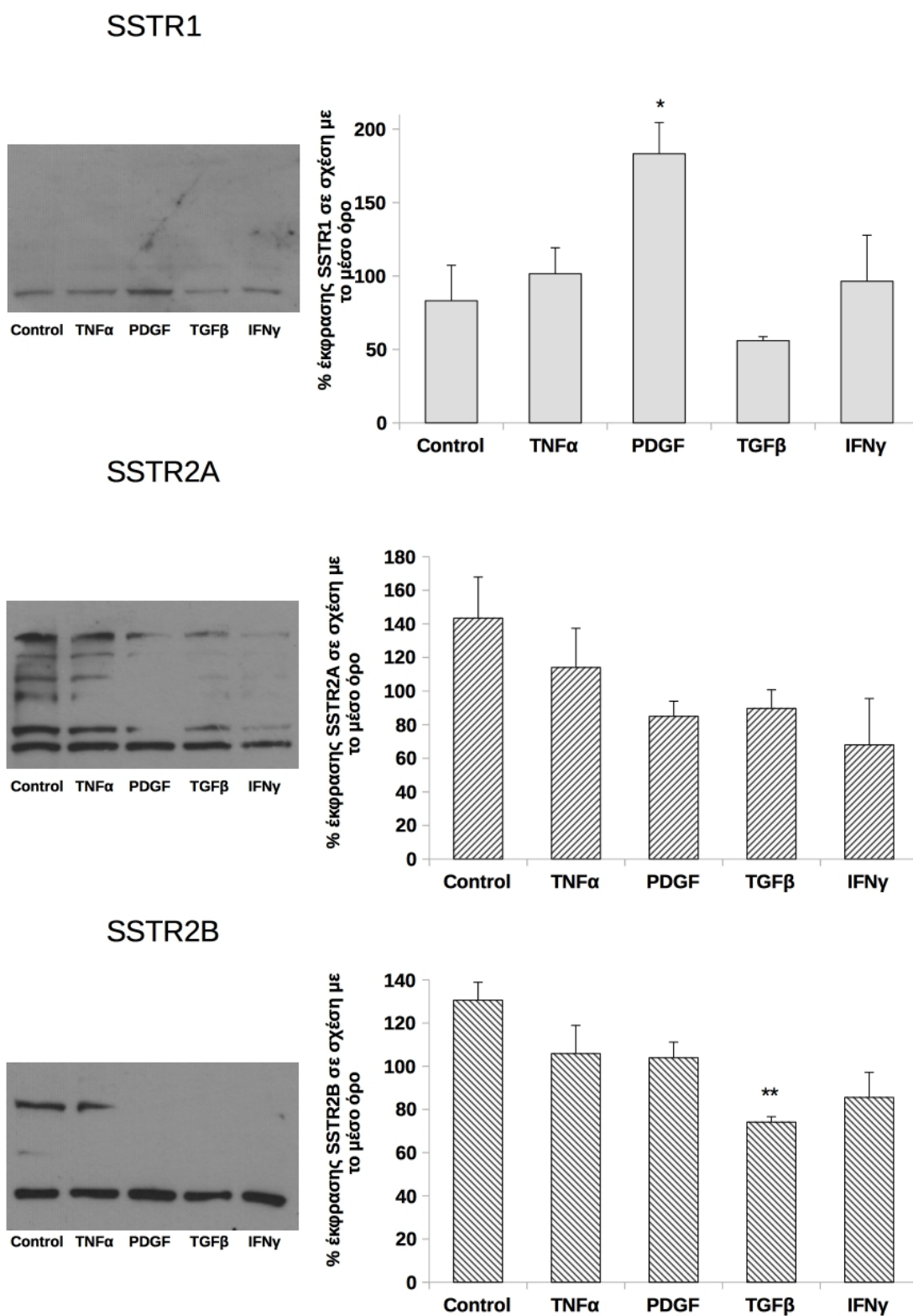
Εικόνα 7.3: Ανοσοστυπώματα western για υποτύπους για υποτύπους SSTR σε ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα.



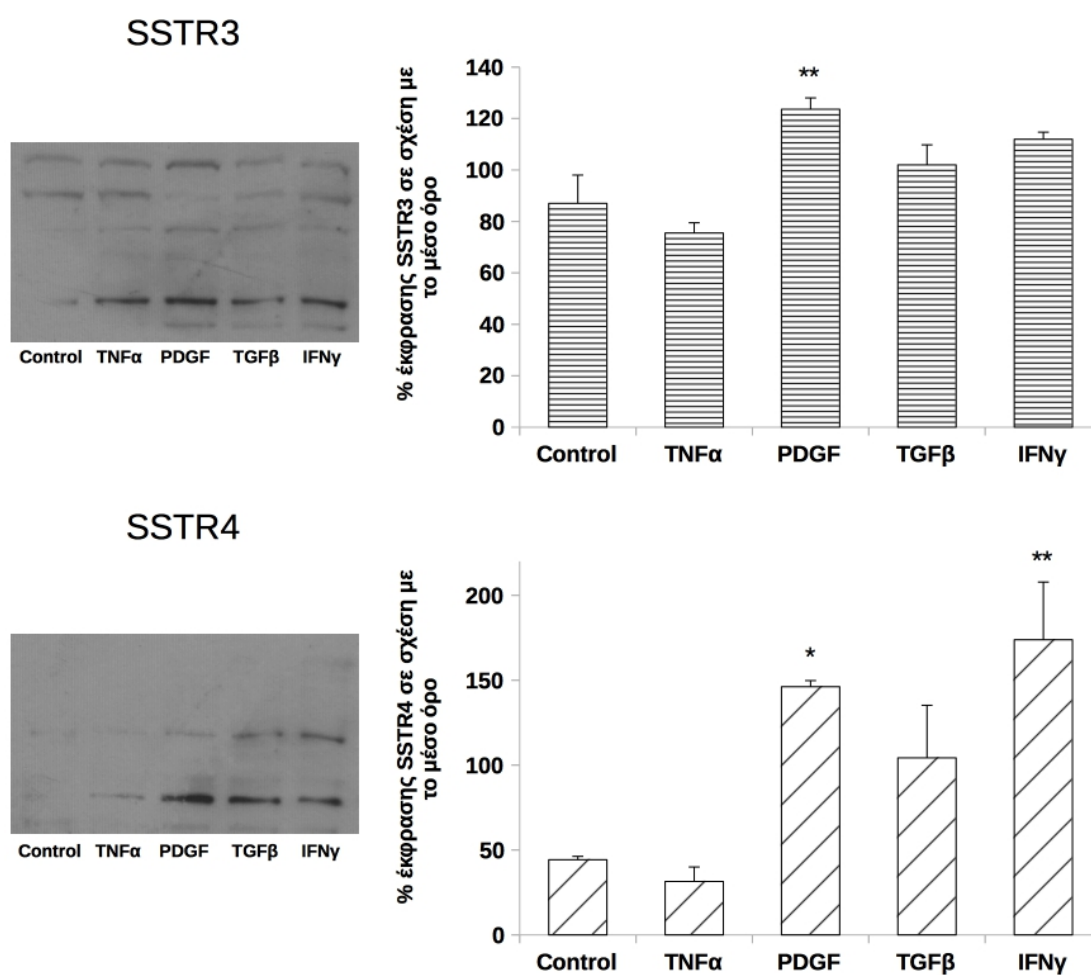
Εικόνα 7.4: Ανοσοφθορισμός και ανοσοστυπώματα western με ειδικά αντισώματα κατά υποδοχέων οπιοειδών μ και δ .



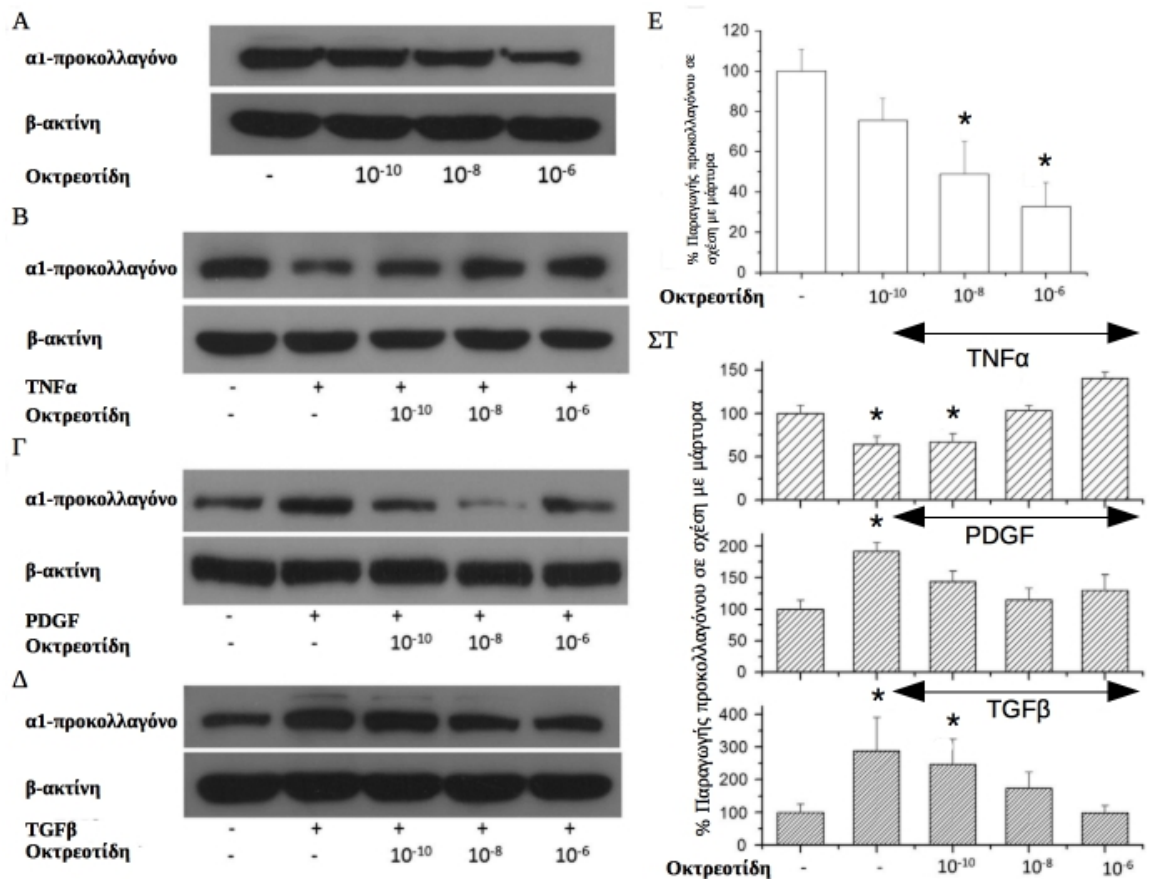
Εικόνα 7.5: Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού. Ανοσοφθορισμός με ειδικά αντισώματα κατά υποδοχέων κανναβινοειδών CB1 και CB2 σε ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα (HSC, μεγέθυνση 100x) και σε κύτταρα Kupffer (KC, μεγέθυνση 40x).



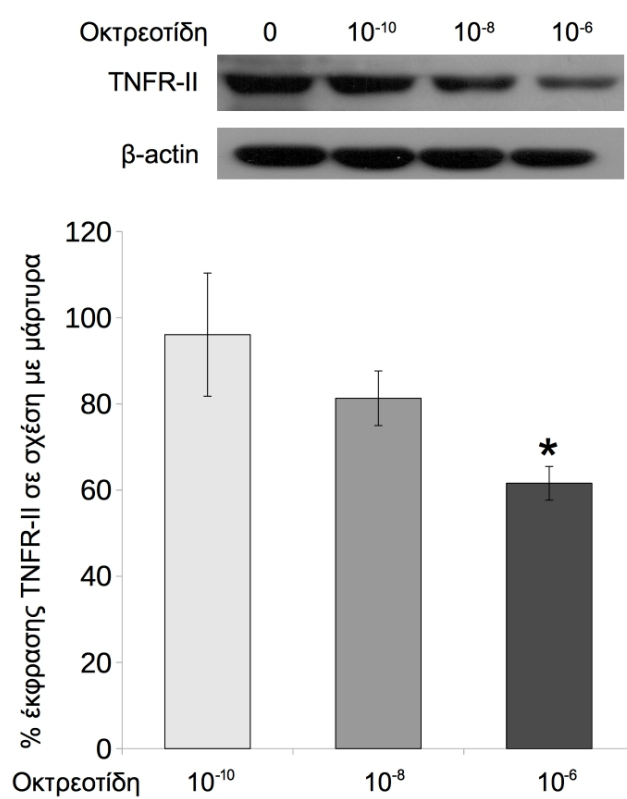
Εικόνα 7.6: Μελέτη επίδρασης των κυτταροκινών TNFα, IFNγ, PDGF και TGFβ στην έκφραση SSTR1, SSTR2A και SSTR2B από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (συνέχεια στην εικόνα 7.7)



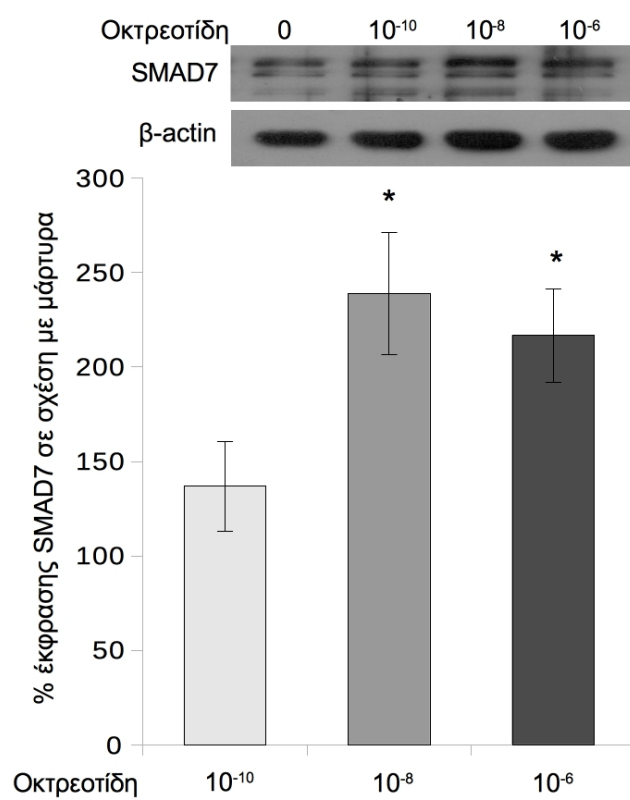
Εικόνα 7.7: Μελέτη επίδρασης των κυτταροκινών TNFα, IFNγ, PDGF και TGFβ στην έκφραση SSTR3, SSTR4 από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$



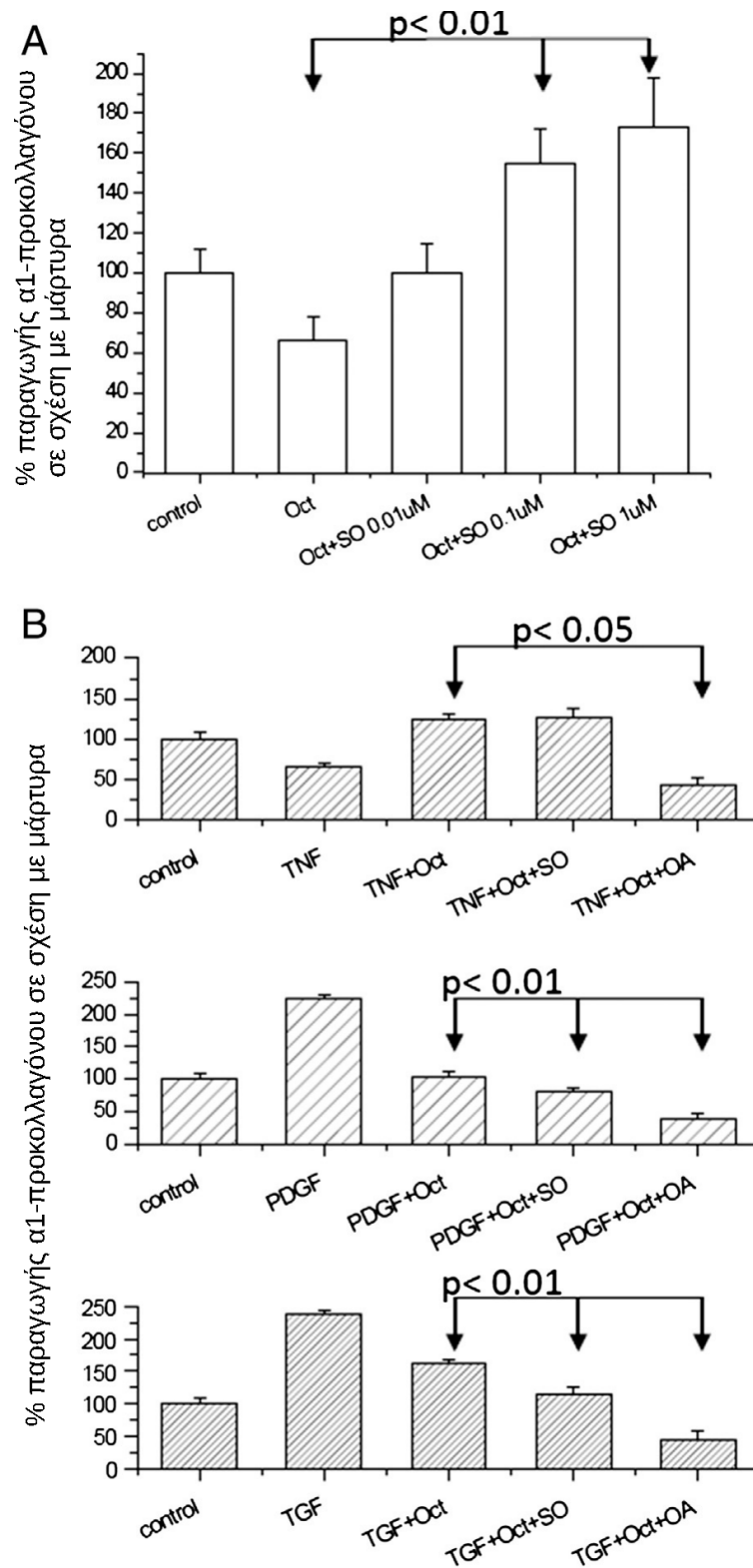
Εικόνα 7.8: Επίδραση της οκτρεοτίδης, των κυτταροκινών TNFα, PDGF, TGFβ, καθώς και του συνδυασμού τους με οκτρεοτίδη στην παραγωγή α1-προκολλαγόνου. * p < 0.01



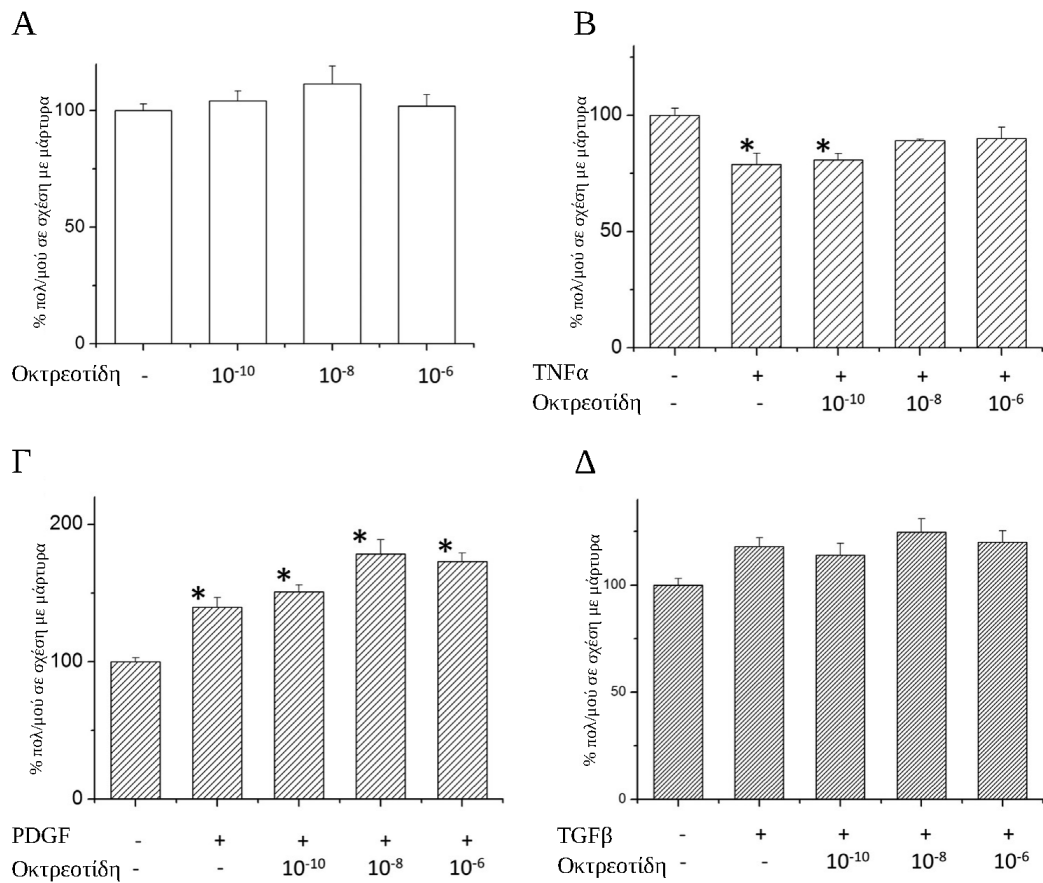
Εικόνα 7.9: Επίδραση της οκτρεοσίδης στην έκφραση μεμβρανικού TNFR-II * $p < 0.05$



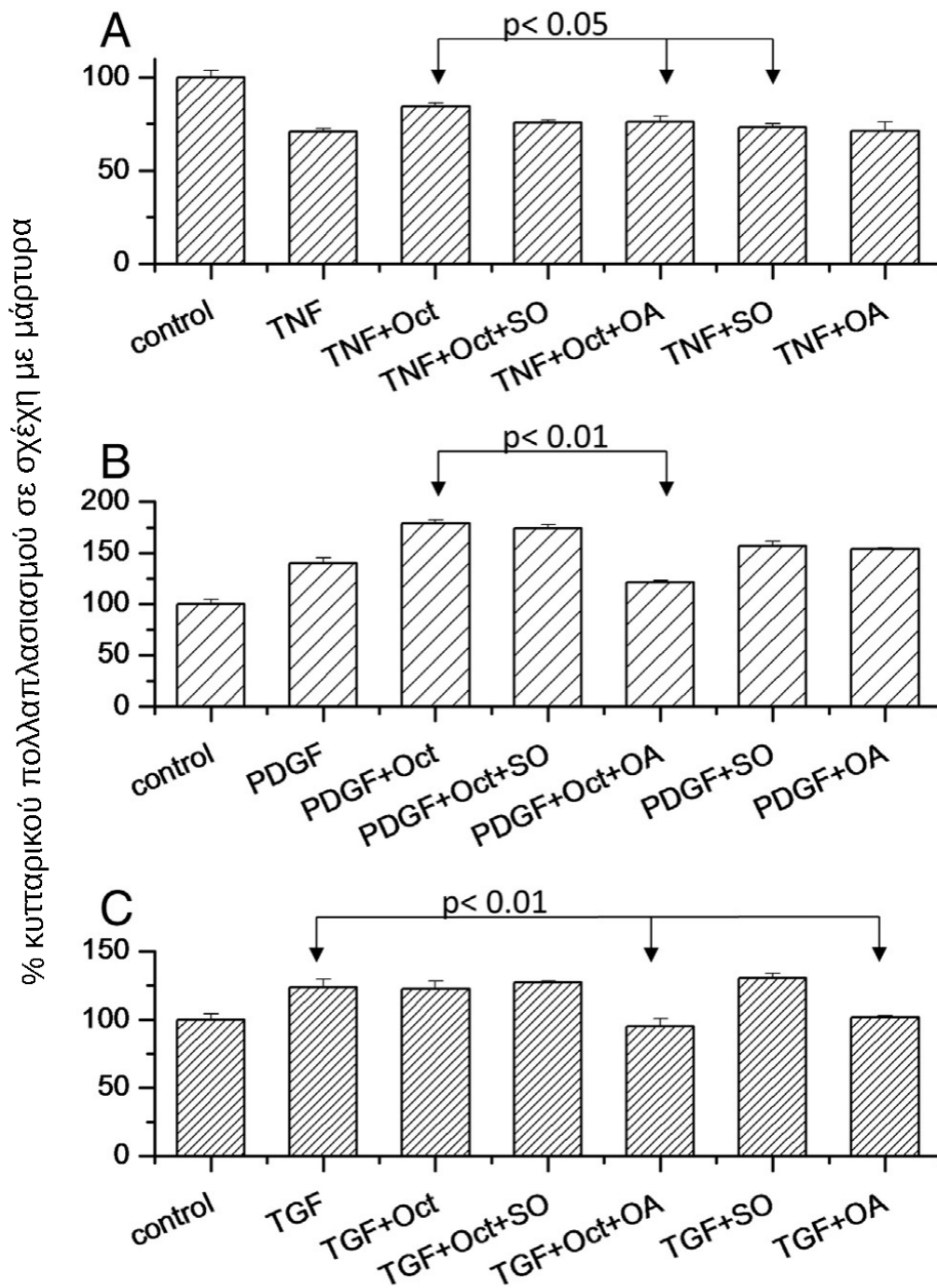
Εικόνα 7.10: Επίδραση της οκτρεοτίδης στην έκφραση SMAD7 * $p < 0.05$



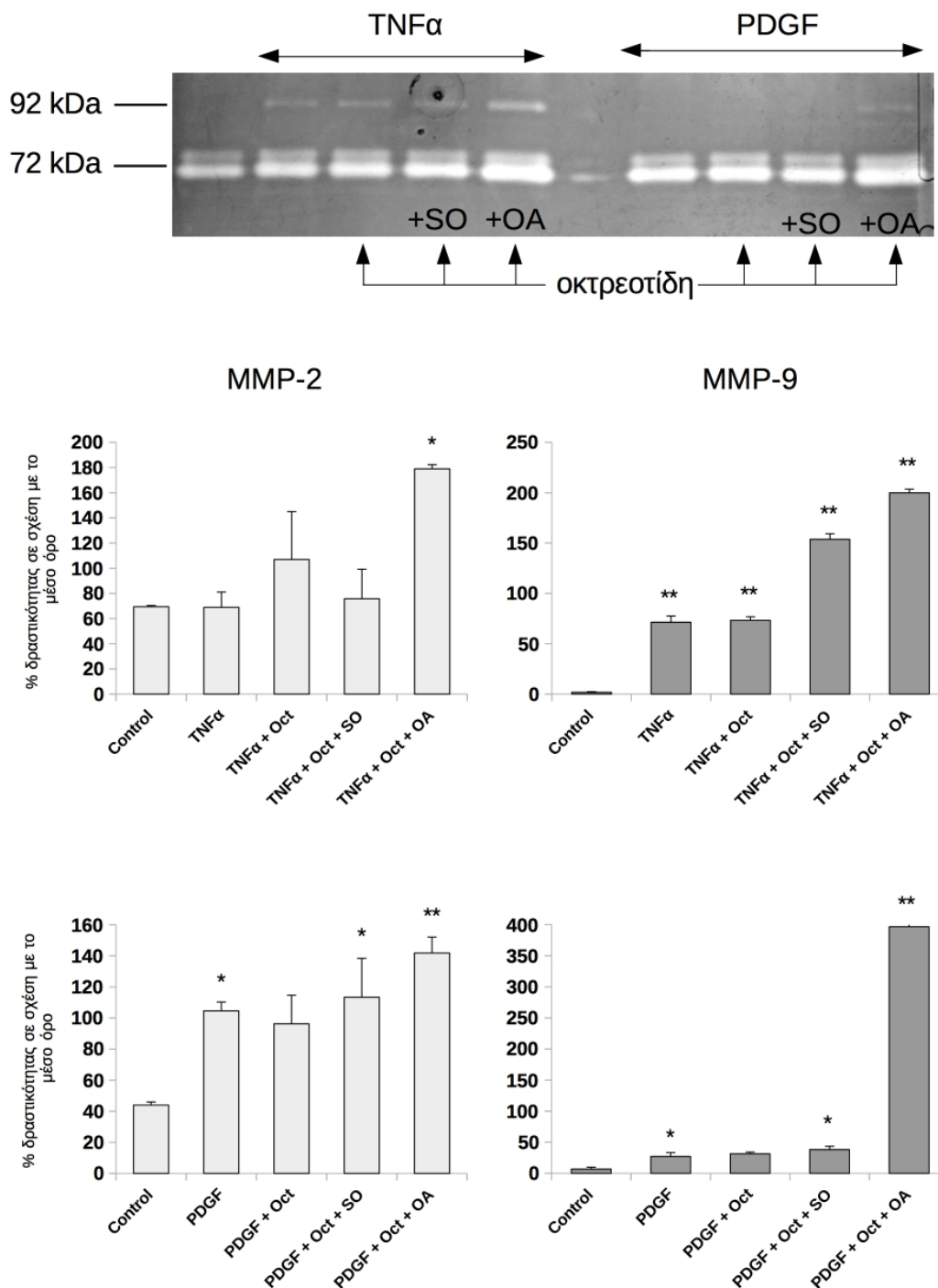
Εικόνα 7.11: Επίδραση της αναστολής PTP και STP στις δράσεις της οκτρεοτίδης στην έκφραση α1-προκολλαγόνου από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα επωασμένα σε TNF α , PDGF και TGF β .



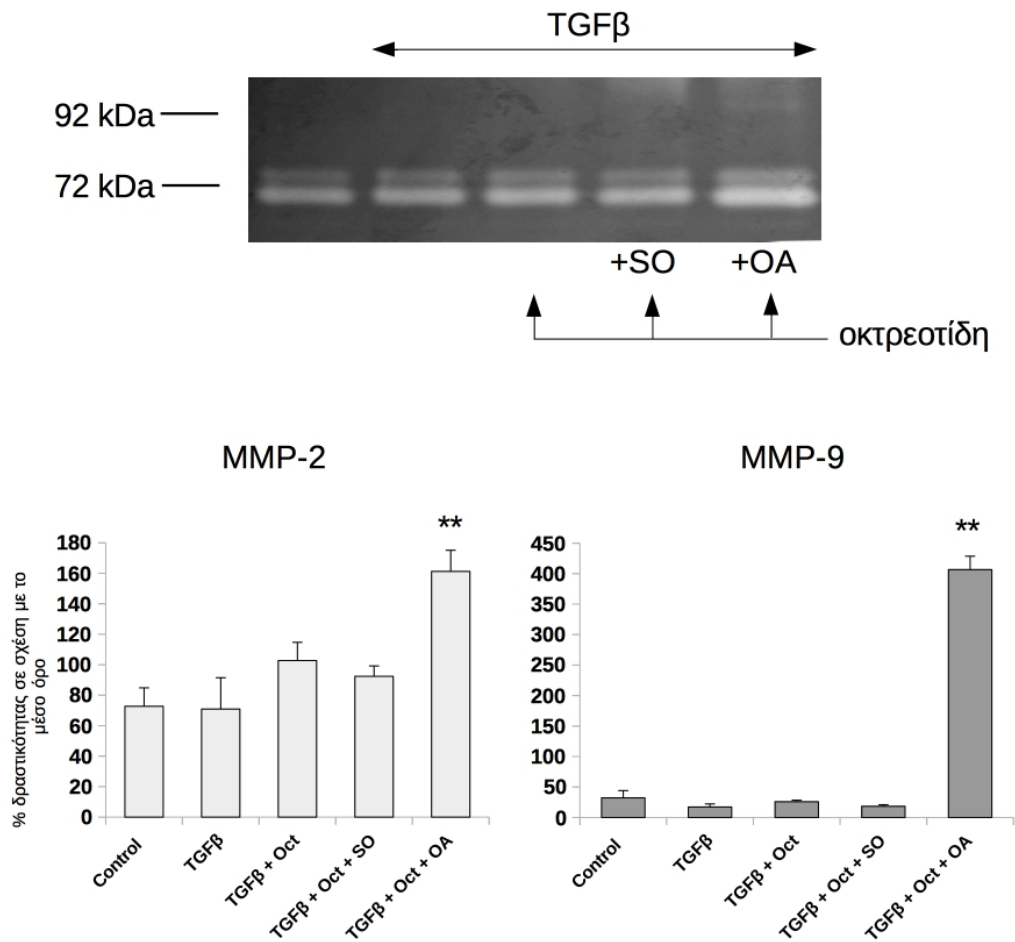
Εικόνα 7.12: Επίδραση της οκτρεοτίδης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων επωασμένων σε TNFα, PDGF και TGFβ. * $p < 0.05$



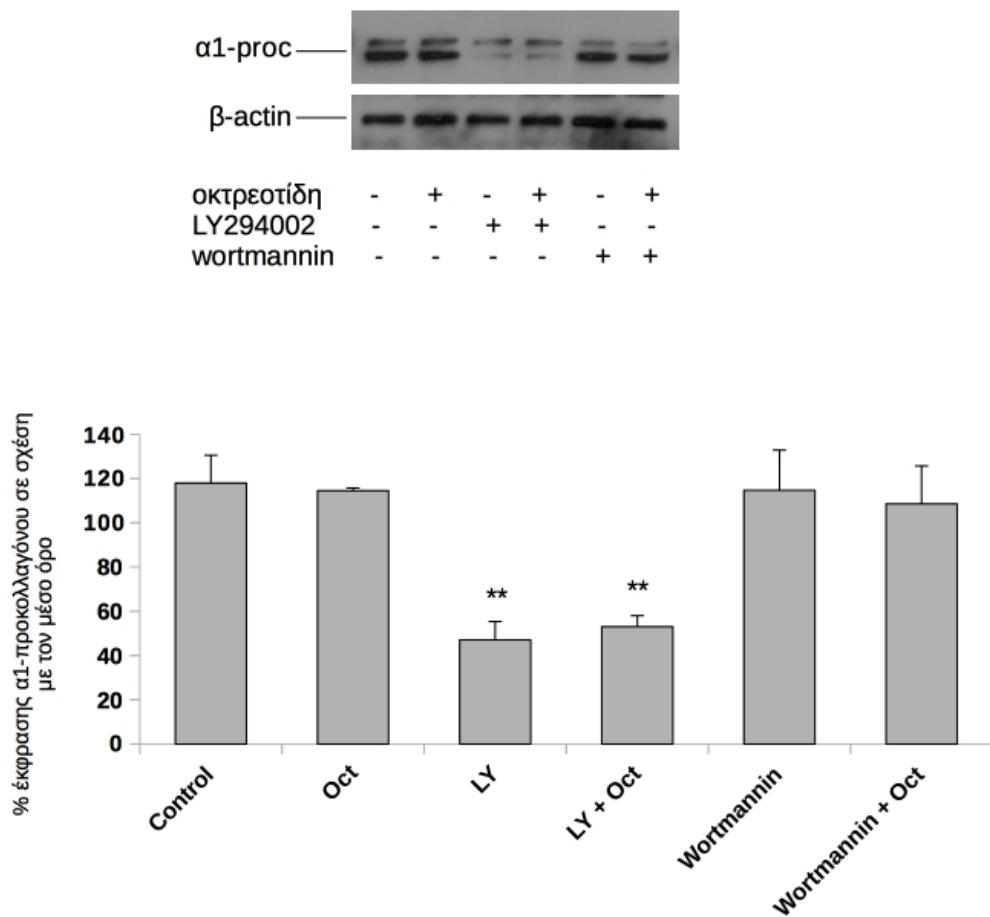
Εικόνα 7.13: Επίδραση της αναστολής PTP και STP στις δράσεις της οκτρεοτίδης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αστεροειδών κυττάρων επωασμένων σε TNF α , PDGF και TGF β .



Εικόνα 7.14: Επίδραση των κυτταροκινών TNFα, PDGF, οκτρεοτίδης και αναστολέων PTP (SO) και STP (OA) στην παραγωγή μεταλλοπρωτεασών από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. Οι δέσμες της MMP-2 και MMP-9 βρίσκονται στα 72 kDa και στα 92 kDa αντίστοιχα. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (συνέχεια στην εικόνα 7.15).



Εικόνα 7.15: (Συνέχεια εικόνας 7.14) Επίδραση TGFβ, οκτρεοτίδης και αναστολέων PTP (SO) και STP (OA) στην παραγωγή μεταλλοπρωτεασών από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. ** $p < 0.01$



Εικόνα 7.16: Επίδραση των αναστολέων της κινάσης 3-φωσφορικής ινοσιτόλης και του συνδυασμού τους με οκτρεοτίδη στην έκφραση $\alpha 1$ -πρωκολλαγόνου από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. ** $p < 0.01$

8

Συζήτηση

8.0.1 Έκφραση υποδοχέων σωματοστατίνης από τα αστεροειδή κύτταρα

Τα μέχρι τώρα δεδομένα σχετικά με την έκφραση υποδοχέων σωματοστατίνης συμφωνούν ως προς το ότι στα ανενεργά κύτταρα δεν εκφράζεται κανένας υπότυπος αλλά διαφωνούν ως προς το ποιοι υπότυποι τελικά εκφράζονται. Η μελέτη των Song και συν.⁶²¹ έδειξε έκφραση mRNA όλων των υποδοχέων εκτός του SSTR1 ενώ η μελέτη των Reynaert και συν.⁶²⁵ έδειξε την ύπαρξη των υποδοχέων SSTR1-3 σε επίπεδο πρωτεΐνης και μάλιστα ότι η ενεργοποίηση του SSTR1 προκαλεί αναστολή της μέσω ενδοθηλίνης επαγόμενης κυτταρικής συστολής. Επίσης η πρώτη μελέτη έδειξε μεμβρανικό και κυτταροπλασματικό αλλά όχι πυρηνικό εντοπισμό της συζευγμένης με FITC οκτρεοτίδης.

Στην παρούσα μελέτη έγινε χρήση ειδικών αντισωμάτων για κάθε υποδοχέα και το σήμα του κάθε ίχνους στις μελέτες με ανοσοσύτρωμα western ελέγχθηκε στο αναμενόμενο για τον κάθε υποδοχέα μοριακό βάρος. Θετικό αποτέλεσμα έδωσαν οι SSTR1-4. Ο ανοσοφθορισμός για κάθε τύπο SSTR κατέδειξε μεμβρανική και κυτταροπλασματική εντόπιση για τους υποδοχείς 1,2 και 4 και κυτταροπλασματική και έντονα πυρηνική εντόπιση για τον SSTR3. Η παρατήρηση αυτή στο φως των στοιχείων της προαναφερθείσας μελέτης που δεν έδειξε εντοπισμό οκτρεοτίδης στον πυρήνα προκαλεί εύλογα ερωτήματα.

Μία ενδεχόμενη εξήγηση είναι ότι κατόπιν ενδοκυττάρωσης ο SSTR3 υφίσταται τροποποίηση εντός του ενδοσώματος μέρος της οποίας είναι η αποδέσμευση της οκτρεοτίδης, ή ότι το τμήμα που μετατοπίζεται στον πυρήνα (που περιέχει το αντιγονικό, καρβοξυτελικό άκρο) βρίσκεται σε αλληλεπίδραση με άλλη μεμβρανική ή μη πρωτεΐνη και ακολουθεί την κινητική αυτής της πρωτεΐνης.

Οι μέχρι τώρα μελέτες συμφωνούσαν ως προς το ότι οι υποδοχείς σωματοστα-

τίνης εκφράζονται στα πλήρως ενεργοποιημένα κύτταρα αλλά δεν ήταν γνωστό με ποια σειρά εμφανίζονται ή αν η έκφρασή τους γινόταν ταυτόχρονα. Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι οι πέντε υπότυποι εμφανίζονται με συγκεκριμένη σειρά μετά την πρώτη εβδομάδα καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, πρώτα εκφράζεται ο SSTR2 με προτίμηση στην ισομορφή SSTR2B, ακολουθεί ο SSTR3 και τέλος οι SSTR1 και SSTR4. Οι λειτουργική σημασία αυτής της παρατήρησης είναι άγνωστη εφόσον οι δράσεις του κάθε υπότυπου υποδοχέα παραμένουν ως επί το πλείστον άγνωστες στα αστεροειδή κύτταρα και τυχόν διαφορές στη λειτουργία τους, αν υπάρχουν, μένει να διερευνηθούν. Η μελέτη των Reynaert και συν. πάντως έδειξε ότι η δράση της οκτρεοτίδης στην αναστολή της μέσω ενδοθηλίνης-1 κυτταρικής συστολής πραγματοποιείται μέσω του SSTR1⁶²⁵, δίνοντας έτσι μια ένδειξη ότι πράγματι οι διαφορετικοί υπότυποι σηματοδοτούν διαφορετικές λειτουργίες. Η διαφορετική έκφραση σε διαφορετικές χρονικές στιγμές οδηγεί επίσης στην υπόθεση αυτή.

Είναι άγνωστο αν η σωματοστατινεργική σηματοδότηση παίζει κάποιο ρόλο στην ίδια τη διαδικασία ενεργοποίησης των αστεροειδών κυττάρων. Η παρατήρηση ότι οι υποδοχείς σωματοστατίνης εκφράζονται αργά στη διαδικασία αυτή, όταν το αστεροειδές κύτταρο έχει ήδη πραγματοποιήσει τη φαινοτυπική μετάβαση σε μυοϊνοβλάστη, όπως αυτό γίνεται εμφανές από την έκφραση αSMA και α1-προκολλαγόνου ήδη μετά τις 7 ημέρες της καλλιέργειας συνηγορεί εναντίον κάποιου ρόλου στην πρόιμη φάση της ενεργοποίησης. Παρ όλα αυτά, ο ακριβής ρόλος των υποδοχέων σωματοστατίνης σ' αυτή τη διαδικασία μένει να διερευνηθεί.

Η απλούστερη πειραματική μεθοδολογία προς αυτή την κατεύθυνση θα ήταν η χρήση ειδικών αγωνιστών για καθέναν από τους 5 υπότυπους που τα κύτταρα εκφράζουν στις πρώτες 7 ημέρες καλλιέργειας και σύγκριση του κυτταρικού φαι-

νοτύπου που προκύπτει με κύτταρα χωρίς επίδραση αγωνιστή, ως προς την παραγωγή των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών GFAP και αSMA καθώς η έκφραση αυτών αλλάζει χαρακτηριστικά κατά τη φαινοτυπική μετάβαση. Γνωρίζοντας όμως την ιδιαίτερη φύση των υποδοχέων σωματοστατίνης, μια τέτοια μελέτη θα έδινε μόνο μερική κατανόηση της λειτουργίας τους. Είναι πλέον γνωστό ότι η ιδιότητα των συζευγμένων με G πρωτεΐνες υποδοχέων (GPCRs) να σχηματίζουν διμερή ή ολιγομερή με άλλους υποδοχείς αποτελεί βασικό γνώρισμα της βιολογίας τους και είναι καθοριστικής σημασίας για τη ρύθμιση των λειτουργιών τους. Πέρα από την ενεργοποίηση των ίδιων των υποδοχέων σωματοστατίνης επομένως, σημαντικές βιολογικές δράσεις μπορεί να προκαλούνται μέσω της αλλαγής στη φαρμακολογία, ενδοκυττάρωση και ανακύκλωση στην κυτταρική μεμβράνη υποδοχέων ή άλλων μεμβρανικών μορίων με τα οποία οι υποδοχείς αυτοί αλληλεπιδρούν. Μελέτες με συγκαλλιέργεια κυττάρων ή *in vivo* μοντέλα ηπατικής ίνωσης με επίδραση ειδικών αγωνιστών αλλά και ανταγωνιστών για τον κάθε υποδοχέα θα προσέφεραν περισσότερο χρήσιμες πληροφορίες και πιο ολοκληρωμένη εικόνα για το ρόλο τους στη βιολογία του αστεροειδούς κυττάρου.

Άγνωστη επίσης παραμένει η θέση σύνθεσης των σωματοστατινεργικών αγωνιστών στο ινωτικό ήπαρ. Δεν θα ήταν παράλογο να υποθεθεί ότι κύριος προσδέτης των υποδοχέων σωματοστατίνης ενδέχεται να μην είναι η ίδια η σωματοστατίνη αλλά άλλα νευροπεπτίδια με συγγενή δομή και φαρμακοκινητική όπως η κορτιστατίνη. Η παρατήρηση ότι η κορτιστατίνη είναι πιθανότατα ο κύριος προσδέτης των υποδοχέων σωματοστατίνης σε κύτταρα του ανοσοποιητικού⁶³² και οι ενδείξεις ότι τα ενεργοποιημένα κύτταρα του Kupffer παράγουν κορτιστατίνη⁶¹⁹ ενισχύουν αυτή τη θεωρία.

8.0.2 Επίδραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών στην έκφραση των υποδοχέων σωματοστατίνης

Αφού εξακριβώθηκε το ποιοι υπότυποι υποδοχέων σωματοστατίνης εκφράζονται, το επόμενο ερώτημα ήταν αν η έκφραση των διαφόρων υπότυπων επηρεάζεται από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Οι κυτταροκίνες που ερευνήθηκαν, TNF α , PDGF, TGF β και IFN γ , έχουν σημαντικό ρόλο στα περισσότερα χρόνια ηπατικά νοσήματα και την ηπατική ίνωση. Οι πιο καλά μελετημένες από τις παραπάνω σε σχέση με τα αστεροειδή κύτταρα είναι οι πρώτες τρεις, με την καθεμία να έχει ιδιαίτερο ρόλο στην ενεργοποίηση και διατήρηση του προϊνωτικού φαινοτύπου των αστεροειδών κυττάρων, όπως αναπτύχθηκαν στα κεφάλαια 2 και 3.

Η μελέτη της έκφρασης των υποδοχέων σωματοστατίνης υπο το ερέθισμα των τεσσάρων κυτταροκινών έδειξε ότι η κυτταροκίνη που περισσότερο επηρεάζει την έκφραση των υποδοχέων σωματοστατίνης είναι ο PDGF. Συγκεκριμένα, ο PDGF επάγει ισχυρά την έκφραση του SSTR1 και επίσης επάγει σε σημαντικό βαθμό τους SSTR3 και SSTR4 αλλά δεν έχει επίδραση στον SSTR2A ή 2B. Ο TGF β φαίνεται να ελαττώνει την έκφραση του SSTR2B αλλά περιέργως όχι του SSTR2A, και τέλος η IFN γ αύξησε την έκφραση του SSTR4. Ο TNF α δεν φάνηκε να επηρεάζει την έκφραση κανενός υποδοχέα.

Η λειτουργική σημασία αυτής της τροποποιημένης έκφρασης δεν είναι εύκολο να διαλευκανθεί. Το παραδοσιακό μοντέλο του ότι το είδος του ενδοκυττάριου σήματος εξαρτάται αποκλειστικά και μόνο από το είδος του υποδοχέα που διεγείρεται έχει πλέον αποδειχθεί ότι δεν ισχύει για τους υποδοχείς της σωματοστατίνης όπως και για πολλούς άλλους GPCRs. Στους υποδοχείς αυτούς, διαφορετικοί αγωνιστές έχουν την ικανότητα να προκαλούν μεταγωγή διαφορετικού σήματος από τον ίδιο υποδοχέα, επάγοντας και σταθεροποιώντας διαφορετικές δομικές μορφές

του υποδοχέα κατά την ενεργοποίησή του, που με τη σειρά τους εμφανίζουν συγγένεια για ξεχωριστά είδη G-πρωτεϊνών και άλλων δευτέρων αγγελιοφόρων⁶³³. Το φαινόμενο αυτό έχει χαρακτηριστεί μεταξύ άλλων και ως "biased agonism" και οδηγεί στο συμπέρασμα ότι για την σε βάθος κατανόηση της βιολογίας των υποδοχέων αυτών δεν απαιτείται απλά χρήση ειδικών αγωνιστών για τον κάθε υποδοχέα, αλλά ακόμη πιο εξειδικευμένα, χαρακτηρισμός του ποια ακριβώς ενδοκυττάρια μονοπάτια μεταγωγής σήματος ενεργοποιεί ο κάθε ένας αγωνιστής. Επιπλέον, είναι άγνωστο αν οι διαφορές στην ποσοτική έκφραση μεταφράζονται άμεσα σε διαφορές στη βιολογική ενεργότητα καθώς όπως έχει επί παραδείγματι αποδειχθεί στους υποδοχείς κανναβινοειδών CB1, κάτι τέτοιο δεν ισχύει³³⁸.

Γνωρίζουμε ότι ο PDGF είναι αφενός ισχυρό μιτωτικό ερέθισμα για τα αστεροειδή κύτταρα και αφετέρου ότι τα ενεργοποιημένα κύτταρα εκδηλώνουν χημειοτακτισμό προς αυτόν τον παράγοντα¹⁷⁸. Οι SSTR2 και SSTR4 έχουν περιγραφεί ως υποδοχείς που προάγουν τη χημειοταξία σε διάφορα κύτταρα μεταξύ των οποίων τα ηπατικά οβάλ κύτταρα κατά την ηπατική αναγέννηση⁶³⁴. Δεν αποκλείεται παρόμοιο ρόλο να παίζουν και στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα, τροποποιώντας την χημειοταξία. Ο SSTR4 είναι ο μοναδικός από τους υποδοχείς σωματοστατίνης που προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού δείξαμε ότι η οκτρεοτίδη άσκησε συναγωνιστική δράση στις δράσεις του PDGF. Παρόλα αυτά, είναι αμφίβολο αν η επαγωγή του SSTR4 ήταν ο μηχανισμός υπεύθυνος για αυτή τη δράση καθώς η οκτρεοτίδη είναι ασθενής αγωνιστής των SSTR4 υποδοχέων και επιδρά σε υψηλές συγκεντρώσεις ($IC_{50} > 1000nM$) ενώ στην προαναφερθείσα μελέτη η μέγιστη δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση $10^{-8}M$, που δεν έχει βιολογικό αποτέλεσμα στους υποδοχείς αυτούς.

Η IFN γ έχει περιγραφεί ως αντινωτικός παράγοντας στο ήπαρ⁶³⁵ και σε άλλα όργανα^{636,637}, ιδιότητα που οφείλεται τουλάχιστον εν μέρει στις κατασταλτικές δράσεις αυτής της κυτταροκίνης στην ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό ινοβλαστών και μυοϊνοβλαστών. Η επαγωγή του SSTR4 υπο το ερέθισμα της IFN γ ενδεχομένως εξυπηρετεί ως ελεγκτικός μηχανισμός της αντιμωτικής δράσης της, είναι άγνωστο όμως αν δρα συνεργιστικά σε άλλες βιολογικές δράσεις της IFN γ .

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, το χαρακτηριστικό ίχνος που ο κάθε υπότυπος άφηνε στο ανοσοστύπωμα διέφερε από επίδραση σε επίδραση. Οι μείζονες δέσμες δηλαδή που λαμβανόταν διέφεραν σε ένταση σε διαφορετικές θέσεις, ανάλογα με την κυτταροκίνη που επιδρούσε, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι η κάθε κυτταροκίνη επάγει διαφορετικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις με ενδεχομένως σημαντικά βιολογικά αποτελέσματα στη λειτουργία του κάθε υποδοχέα ακόμη και στην περίπτωση που η ποσοτική έκφρασή του παραμένει σταθερή. Δεν είναι απίθανο διαφορετικές κυτταροκίνες και οι τροποποιήσεις που επάγουν να διευκολύνουν την αλληλεπίδραση με συγκεκριμένους τύπους άλλων υποδοχέων και μέσω αυτού του τρόπου να επιτυγχάνονται διαφορετικές βιολογικές δράσεις χωρίς αλλαγή στο επίπεδο γονιδιακής έκφρασης.

8.0.3 Έκφραση υποδοχέων οπιοειδών και κανναβινοειδών

Τη χρονική στιγμή που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα για την ανίχνευση υποδοχέων οπιοειδών και κανναβινοειδών δεν υπήρχαν ακόμη πειραματικά στοιχεία στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Η μελέτη εστιάστηκε στους υποδοχείς οπιοειδών μ και δ καθώς οι πιο καλά περιγεγραμμένες δράσεις των οπιοειδών και ιδιαίτερα αυτές που είχαν περιγραφεί σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αφορούσαν αυτούς τους δύο τύπους. Και οι δύο βρέθηκαν να εκφράζονται στα

ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. Στα πειράματα του ανοσοφθορισμού η μορφή του σήματος που λαμβάνονταν στα υπο μελέτη κύτταρα έμοιαζε πολύ με την αντίστοιχη που έδιναν οι υποδοχείς σωματοστατίνης: μεμβρανική και κυτταροπλασματική εντόπιση, με ασθενέστερη πυρηνική εντόπιση κυρίως για τον υποδοχέα δ.

Ο ρόλος των υποδοχέων αυτών στα αστεροειδή κύτταρα ξεκίνησε να αποσαφηνίζεται από την μελέτη των De Minicis και συν.³¹¹. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι και οι τρεις τύποι υποδοχέων οπιοειδών (μ, δ, κ) εκφράζονται *in vitro* και *in vivo* στα αστεροειδή κύτταρα και από τους τρεις τύπους μόνο η έκφραση του δ ελαττώνεται κατά την ενεργοποίηση. Η ενεργοποίηση με οπιοειδή πεπτίδια οδήγησε σε αύξηση τόσο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όσο και της παραγωγής κολλαγόνου από τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. Στα *in vivo* πειράματα αυτής της μελέτης παρατηρήθηκε σημαντικά ελαττωμένη ενεργοποίηση αστεροειδών κυττάρων και ελάττωση της παραγωγής κολλαγόνου σε πειραματόζωα στα οποία είχε χορηγηθεί ναλοξόνη.

Οι παραπάνω μελέτη δημιουργεί περαιτέρω ερωτήματα γύρω από το ρόλο των ενδογενών οπιοειδών στη λειτουργία των αστεροειδών κυττάρων:

1. Ποιος ο ακριβής ρόλος του κάθε υποδοχέα και ποια η λειτουργική σημασία του υψηλού λόγου μ,κ/δ υποδοχέων;
2. Ποια ενδεχόμενα αποτελέσματα θα είχε η επιλεκτική αναστολή καθενός από τους παραπάνω υποδοχείς;
3. Ποια είναι η πηγή των ενδογενών οπιοειδών στο νοσούν ήπαρ; Παράγουν τα ίδια τα αστεροειδή κύτταρα τα πεπτίδια αυτά;
4. Ποιες ενδεχόμενες αλληλεπιδράσεις υπάρχουν με τα ηπατικά μακροφάγα

και τα άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που εδράζονται στα ηπατικά κολποειδή;

Για τους υποδοχείς κανναβινοειδών, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι σε φυσιολογικές συνθήκες στο ήπαρ υπάρχει χαμηλή έκφραση CB1 υποδοχέων και καθόλου έκφραση CB2 ενώ οι τελευταίοι παρουσιάζονται σε μη παρεγχυματικά κύτταρα στην ηπατική ίνωση και κίρρωση⁴¹¹. Οι υποδοχείς CB1 έχειδειχθεί ότι έχουν προϊνωτική δράση ενώ οι CB2 αντινωτική. Η μελέτη με ανοσοφθορισμό στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα συμφωνεί με τα υπάρχοντα δεδομένα ότι στα κύτταρα αυτά εκφράζονται και οι δύο υποδοχείς. Επίσης μελετήθηκαν τα κύτταρα Kupffer τα οποία επίσης βρέθηκε ότι εκφράζουν και τους δύο τύπους υποδοχέα. Μεταγενέστερη μελέτη έδειξε ότι στα κύτταρα Kupffer η ενεργοποίηση των CB2 υποδοχέων ευνοεί την επικράτηση του M2 φαινοτύπου έναντι του περισσότερο φλεγμονώδους M1 φαινοτύπου, δίνοντας άλλη μια εξήγηση στην αντιφλεγμονώδη και αντινωτική δράση αυτών των υποδοχέων στο ήπαρ⁶³⁸.

8.0.4 Κορτιστατίνη και αστεροειδή κύτταρα

Μέχρι σήμερα είναι άγνωστο αν η κορτιστατίνη παράγεται σε σημαντική ποσότητα και αν παίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ηπατικής ίνωσης. Οι δράσεις της πάντως στο ανοσοποιητικό σύστημα έχουν ως ένα βαθμό διαλευκανθεί και από τις μέχρι τώρα μελέτες προκύπτει ιδιαίτερα σημαντικός ανοσορυθμιστικός ρόλος⁶³² ώστε έχει διατυπωθεί η θεωρία ότι για τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος η κορτιστατίνη και όχι η σωματοστατίνη είναι ο κύριος ενδογενής προσδέτης των υποδοχέων σωματοστατίνης. Τα κύτταρα του Kupffer υπάρχουν ενδείξεις ότι παράγουν κορτιστατίνη και σωματοστατίνη⁶¹⁹ και δεν είναι απίθανο να αποτελούν την κύρια πηγή σωματοστατινεργικών ερεθισμάτων για

τα αστεροειδή κύτταρα. Δεν είναι γνωστό αν σωματοστατίνη ή κορτιστατίνη παράγονται σε σημαντικές ποσότητες από τα ηπατοκύτταρα ή τα ενδοθηλιακά κύτταρα του κολποειδούς. Η μελέτη της παραγωγής κορτιστατίνης από αστεροειδή κύτταρα ελέγχθηκε με RT-PCR χρησιμοποιώντας ποσότητα cDNA, εκκινητές και θερμικούς κύκλους που έχουν περιγραφεί σε προηγούμενη μελέτη⁶¹⁹. Δεν ανιχνεύθηκε παραγωγή mRNA κορτιστατίνης σε αυτές τις συνθήκες από ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα.

8.0.5 Επίδραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και της οκτρεοτίδης στην παραγωγή α1-προκολλαγόνου και αSMA

Στην *in vitro* μελέτη της ηπατικής ίνωσης χρησιμοποιούνται παραδοσιακά δύο δείκτες για να ποσοτικοποιηθεί η ινωτική συμπεριφορά των ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων, η έκφραση ακτίνης λείων μυϊκών ινών τύπου α (αSMA) και η έκφραση α1-προκολλαγόνου. Στις περισσότερες μελέτες, η έκφραση της πρώτης φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με τη φαινοτυπική μετάβαση του κυττάρου από την ανενεργή στην ενεργοποιημένη κατάσταση (και το αντίστροφο) και δε φαίνεται να εμφανίζει σημαντικές διακυμάνσεις διαφορετικά. Η έκφραση α1-προκολλαγόνου αντίθετα εμφανίζει πολύ πιο δυναμική ρύθμιση και πλήθος κυτταροκινών ή μεταγραφικών παραγόντων φαίνεται να επηρεάζουν το επίπεδο έκφρασής του.

Μελετήθηκαν τρεις από τις σημαντικότερες κυτταροκίνες (TNFα, PDGF, TGFβ) για τη βιολογία των αστεροειδών κυττάρων ως προς το ρόλο τους στην παραγωγή της αSMA και του α1-προκολλαγόνου. Μελετήθηκε επίσης ο ρόλος της οκτρεοτίδης, ενός συνθετικού αγωνιστή των υποδοχέων σωματοστατίνης τόσο στην ίδια την παραγωγή αSMA και α1-προκολλαγόνου, όσο και στην επίδραση που

έχει στις δράσεις των τριών προαναφερθέντων κυτταροκινών. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις συγκεντρώσεις οκτρεοτίδης, 10^{-10} , 10^{-8} και 10^{-6} M. Στην πρώτη συγκέντρωση ενεργοποιούνται μόνο οι SSTR2 υποδοχείς, στη δεύτερη οι SSTR2 και SSTR3 και στην τρίτη όλοι οι παρόντες στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα υποδοχείς, SSTR1-4.

Βρέθηκε ότι ενώ η αSMA δεν εμφανίζει διακυμάνσεις υπό τα ερεθίσματα των παραπάνω παραγόντων, η παραγωγή α1-προκολλαγόνου αντίθετα επηρεαζόταν σημαντικά από όλες τις υπο μελέτη ουσίες. Ο TNFα ελάττωσε την παραγωγή ενώ ο PDGF και ο TGFβ την αύξησαν σημαντικά. Για τον TNFα έχει παρατηρηθεί ότι προάγει την μετάβαση του ενεργοποιημένου αστεροειδούς κυττάρου σε έναν περισσότερο προφλεγμονώδη και λιγότερο προϊνωτικό φαινότυπο και η παρατήρησή της ελάττωσης της παραγωγής α1-προκολλαγόνου συμφωνεί με αυτά τα δεδομένα. Οι PDGF και TGFβ είναι έντονα προϊνωτικοί και επάγουν την έκφραση α1-προκολλαγόνου όπως και επιβεβαιώθηκε από τα πειράματα της παρούσας μελέτης. Η οκτρεοτίδη μόνη της προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη καταστολή της έκφρασης α1-προκολλαγόνου αλλά σε συνδυασμό με τις 3 κυτταροκίνες εμφάνισε διαφορετική δράση. Συγκεκριμένα, μπορούσε να αναστείλει τη δράση του TNFα ολοκληρωτικά, επάγοντας παραγωγή α1-προκολλαγόνου, που σε ορισμένες πειραματικές επαναλήψεις ξεπερνούσε την παραγωγή των κυττάρων μάρτυρα (κύτταρα χωρίς καμία επίδραση). Οι δράσεις του PDGF δεν φάνηκε να επηρεάζονται από την οκτρεοτίδη, ενώ η επαγωγή α1-προκολλαγόνου από τον TGFβ αναστρέφονταν μερικώς από την συνεπίδραση οκτρεοτίδης σε χαμηλή συγκέντρωση υποδηλώνοντας ότι ο υπεύθυνος υποδοχέας για αυτή τη δράση ήταν ο SSTR2.

Δράση της οκτρεοτίδης στην έκφραση TNFR-II Ο TNFR-II θεωρείται σήμερα ότι έχει κυρίως επικουρικό ρόλο στη σηματοδότηση μέσω TNFα. Αφενός

μπορεί να διευκολύνει την αλληλεπίδραση του TNFα με τον TNFR-I δεσμεύοντάς τον και δημιουργώντας τοπικά υψηλές συγκεντρώσεις στην κυτταρική μεμβράνη, ή να ελαττώνει την πρόσδεση, μεταπίπτοντας στη διαλυτή μορφή και δεσμεύοντας TNFα, μην αφήνοντάς τον έτσι να αλληλεπιδράσει με τον TNFR-I. Στα πειράματα που έγιναν βρέθηκε σημαντική ελάττωση του (μεμβρανικού) TNFR-II από την οκτρεοτίδη μόνο όταν επιδρούσε σε υψηλή συγκέντρωση (10^{-6} M). Η δράση αυτή δεν μπορεί να εξηγήσει την σημαντική επίδραση σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις υπονοώντας ότι υπάρχουν άλλοι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης μεταξύ της σωματοστατινεργικής σηματοδότησης και των μονοπατιών σηματοδότησης του TNFα. Επίσης δεν είναι γνωστό αν η ελάττωση του ανιχνευόμενου TNFR-II αντικατοπτρίζει μείωση της παραγωγής του υποδοχέα αυτού ή επαγωγή της διαλυτής μορφής του με αύξηση της έκφρασης του ενζύμου TACE που είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή του μεμβρανικού TNFR-II σε διαλυτή μορφή αλλά και επίσης για τη μετατροπή του ίδιου του μεμβρανικού TNFα σε διαλυτή μορφή.

Δράση της οκτρεοτίδης στην έκφραση SMAD7 Το SMAD7 είναι ένα από τα δύο ανασταλτικά SMADs (το άλλο είναι το SMAD6). Οι δράσεις του έχουν να κάνουν με την ικανότητά του να δεσμεύεται πάνω στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα TGFβ και να παρεμποδίζει την πρόσδεση των receptor SMADs κι έτσι την μετέπειτα ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου μονοπατιού σηματοδότησης. Λειτουργεί δηλαδή ως ενδοκυττάριος αναστολέας του υποδοχέα TGFβ. Στα πειράματα που έγιναν βρέθηκε επαγωγή του SMAD7 από την οκτρεοτίδη σε υψηλή συγκέντρωση (10^{-6} M). Όπως και στην περίπτωση του TNFα, η δράση αυτή δεν εξηγεί την σημαντική επίδραση της οκτρεοτίδης σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στις δράσεις του TGFβ ως προς την παραγωγή α1-προκολλαγόνου.

8.0.6 Επίδραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και της οκτρεοτίδης στον πολλαπλασιασμό των αστεροειδών κυττάρων

Η οκτρεοτίδη από μόνη της δεν επηρέασε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε καμία από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τα πειράματα των Reynaert και συν⁶²³ που δεν βρήκαν επίδραση της σωματοστατίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων, και έρχεται σε αντίθεση με τη μελέτη των Pan και συν⁶²² που παρατήρησαν προαποπτωτική δράση της οκτρεοτίδης στα κύτταρα αυτά.

Ο TNFα ελάττωσε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και η οκτρεοτίδη ανέστειλε αυτή τη δράση του με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Αντίθετα, η οκτρεοτίδη ενίσχυσε τη ισχυρή μιτωτική δράση του PDGF, με μέγιστο αποτέλεσμα στη συγκέντρωση 10^{-8} M. Περιγράψαμε ήδη την επαγωγή του προμιτωτικού SSTR4 από τον PDGF. Θα περιμέναμε επομένως ο μέγιστος κυτταρικός πολλαπλασιασμός να παρουσιαστεί στη μέγιστη συγκέντρωση οκτρεοτίδης που είναι και η μόνη ικανή να διεγείρει τον SSTR4. Η παραπάνω παρατήρηση επομένως οδηγεί στο συμπέρασμα ότι είτε οι προμιτωτικές δράσεις του SSTR4 δεν ενεργοποιούνται από την οκτρεοτίδη αλλά ενδεχομένως από άλλους αγωνιστές, ή ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις οκτρεοτίδης επάγουν ενδοκυττάρια σήματα που αντισταθμίζουν την προμιτωτική δράση του υποδοχέα αυτού, ενδεχομένως μέσω άλλων SSTRs. Τέλος, η οκτρεοτίδη δεν φάνηκε να έχει κάποια δράση στα κύτταρα σε επίδραση με TGFβ.

Δράσεις των αναστολέων φωσφοτυροσινικής φωσφατάσης (PTP) και φωσφατάσης σερίνης/θρεονίνης (STP)

Όπως είναι γνωστό οι PTP και STP είναι ένζυμα με κεντρικό ρόλο στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος και ρυθμίζουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών όπως ο κυτταρικός κύκλος, η μίτωση, η διαφοροποίηση, η κυτταροσκελετική οργάνωση, η έκκριση ουσιών, ανακύκλωση και ρύθμιση μεμβρανικών υποδοχέων, κ.α. Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος των PTP στη σηματοδότηση μέσω του PDGF υποδοχέα. Επίσης και οι δύο κατηγορίες ενζύμων παίζουν ρόλο στη σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων σωματοστατίνης^{564;639}. Για να μελετηθεί ο ρόλος των δύο κατηγοριών ενζύμων στη σηματοδότηση των υποδοχέων σωματοστατίνης στα αστεροειδή κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς για καθεμία κατηγορία. Το ορθοβαναδικό νάτριο (SO) είναι μη ειδικός αναστολέας των PTP ενώ το οκαδαϊκό οξύ (OA) είναι μη ειδικός αναστολέας των STP.

Στις μετρήσεις παραγωγής α1-προκολλαγόνου, το OA ελάττωσε σημαντικά τη παραγωγή σε όλα ανεξαιρέτως τα πειράματα, ενώ το SO ενίσχυσε την καταστολή που άσκησε η οκτρεοτίδη στις επιδράσεις με PDGF και TGFβ. Εντυπωσιακό ήταν ότι η επίδραση με SO σε κύτταρα επωασμένα σε οκτρεοτίδη αύξησε την παραγωγή α1-προκολλαγόνου με δόσοεξαρτώμενο τρόπο.

Στις μετρήσεις κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τόσο το SO όσο και το OA ελάττωσαν τη δράση της οκτρεοτίδης στις επιδράσεις με TNFα ενώ μόνο το OA ελάττωσε τις δράσεις της στις επιδράσεις του PDGF. Στις επιδράσεις με TGFβ το OA ελάττωσε σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Συμπεράσματα από τις παραπάνω παρατηρήσεις είναι ότι το βιολογικό αποτέλεσμα της σηματοδότησης μέσω υποδοχέων σωματοστατίνης εμφανίζει πολύ έντονη διαφοροποίηση ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται το κύτταρο

και την συνεπίδραση με κυτταροκίνες, άλλες φορές δρώντας προινωτικά και προμιτωτικά και άλλες φορές αντινωτικά και αντιμιτωτικά. Σημαντική παρατήρηση είναι η δράση του οκαδαϊκού οξέος που ήταν ανασταλτικό τόσο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όσο και της παραγωγής προκολλαγόνου, οδηγώντας στην υπόθεση ότι τα μονοπάτια σηματοδότησης μέσω φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης είναι ενδεχομένως σημαντικός κλινικός στόχος για φαρμακευτική παρέμβαση στην ηπατική ίνωση.

8.0.7 Αναστολείς PI3K και παραγωγή α1-προκολλαγόνου.

Ο ρόλος του μονοπατιού των κινασών τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K) στην παραγωγή α1-προκολλαγόνου από τα αστεροειδή κύτταρα έχει εξεταστεί σε σχέση με την επίδραση οπιοειδών³¹¹ και λευκίνης⁶⁴⁰ κι έχει βρεθεί ότι και στις δύο περιπτώσεις η αυξημένη παραγωγή α1-προκολλαγόνου οφείλεται σε ενεργοποίηση των μονοπατιών που σηματοδοτούνται από τις PI3K. Για να μελετηθούν τυχόν αλληλεπιδράσεις με τα μονοπάτια σηματοδότησης μέσω των υποδοχέων σωματοστατίνης χρησιμοποιήθηκαν δύο αναστολείς των PI3K, βορτμανίνη και LY294002.

Η βορτμανίνη είναι ισχυρός, μη αναστρέψιμος και μη ειδικός αναστολέας των PI3K ενώ το LY294002 προκαλεί αναστρέψιμη αναστολή και είναι λιγότερο ισχυρός από τη βορτμανίνη (IC₅₀ 1,4μM έναντι 5nM). Η πρώτη έκπληξη από αυτή τη σειρά πειραμάτων ήταν ότι παρά την αναστολή των PI3K από τη βορτμανίνη κατόπιν 6 ωρών επίδρασης δεν παρατηρήθηκε ελάττωση στην παραγωγή α1-προκολλαγόνου σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία δεν είχε γίνει επίδραση, υποδηλώνοντας έτσι ότι στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα υπάρχει ένα βασικό επίπεδο παραγωγής προκολλαγόνου η οποία συμβαίνει ανεξάρτητα από την λειτουργικότητα ή μη του PI3K μονοπατιού. Η δεύτερη, μεγαλύτερη έκπληξη

ήταν ότι στα κύτταρα στα οποία είχε επιδράσει LY294002 παρά του ότι ο αναστολέας αυτός είναι αναστρέψιμος και λιγότερο ισχυρός από τη βορτμανίνη ως προς τις δράσεις του στις PI3K, παρατηρήθηκε ισχυρότατη ελάττωση της έκφρασης $\alpha 1$ -προκολλαγόνου, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι κάποιος άλλος μηχανισμός είναι υπεύθυνος για αυτό το αποτέλεσμα.

Στο παρελθόν έχει περιγραφεί μια ακόμη ιδιότητα του LY294002, αυτή του αναστολέα ενεργοποίησης υποδοχέων αδενοσίνης A_1 ⁶⁴¹. Οι υποδοχείς αδενοσίνης A_{2A} έχουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ηπατικής ίνωσης και αναστολή τους φαίνεται να σχετίζεται με αναστολή της ηπατικής ίνωσης⁶⁴². Είναι άγνωστο αν το LY294002 έχει ανταγωνιστική δράση και στους A_{2A} υποδοχείς ή αν η παραπάνω παρατήρηση έχει διαφορετική βιολογική βάση.

8.0.8 Επίδραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και της οκτρεοτίδης στην παραγωγή MMPs

Στα πειράματα με ζυμογραφία παρατηρήθηκε παραγωγή MMP-2 και MMP-9 από τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. Από τις τρεις κυτταροκίνες που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε ότι ο TNF α επάγει ισχυρά την MMP-9 και ο συνδυασμός οκτρεοτίδης με SO ενισχύει σημαντικά αυτή την επαγωγή. Ο PDGF βρέθηκε ότι επάγει τόσο την MMP-2 όσο και την MMP-9 και ότι ο συνδυασμός οκτρεοτίδης με SO ενισχύει αυτή τη δράση και για τις δύο μεταλλοπρωτεάσες. Ο TGF β από μόνος του δεν φάνηκε να επηρεάζει την παραγωγή κάποιας από τις μεταλλοπρωτεάσες. Η πιο εντυπωσιακή παρατήρηση ήταν ότι ανεξαρτήτως της κυτταροκίνης που επιδρούσε, το οκαδαϊκό οξύ προκαλούσε ισχυρότατη επαγωγή και των δύο μεταλλοπρωτεασών. Πρόσφατα περιγράφηκε η επαγωγή MMP-9 από ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες (συμπεριλαμβανομένων και ενεργοποιημένων αστεροει-

δών κυττάρων) υπό την επίδραση οκαδαϊκού οξέος και βρέθηκε ότι η επαγωγή εξαρτάται από την p38-MAPK⁶⁴³, σηματοδοτικό μονοπάτι που επίσης ενεργοποιείται από τον SSTR2.

Οι παρατηρήσεις αυτές για το οκαδαϊκό οξύ, καθώς και οι δράσεις του στην παραγωγή προκολλαγόνου και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό που αναφέρθηκαν παραπάνω δημιουργούν πολλά ερωτήματα γύρω από τον ως τώρα ανεξερεύνητο ρόλο των φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης στην παθοφυσιολογία της ηπατικής ίνωσης. Το οκαδαϊκό οξύ είναι ισχυρός αναστολέας των ενζύμων PP1, PP2A και PP2B⁶⁴⁴, αλλά όχι της PP2C. Η σημασία της τελευταίας παρατήρησης κάνει τα ένζυμα αυτά ακόμη πιο ελκυστικό στόχο για περαιτέρω μελέτη υπο το φως μιας πρόσφατης δημοσίευσης ότι η ενεργοποίηση της ισομορφής PP2Ca έχει ισχυρή αντινωτική δράση σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα ηπατικής ίνωσης⁶⁴⁵.

9

Περίληψη

Περίληψη

Τα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος είναι περικύτταρα ευρισκόμενα γύρω από τα κολποειδή, στο χώρο του Disse και βρίσκονται σε στενή σχέση με το ενδοθήλιο αυτών καθώς και τα ηπατοκύτταρα. Στο υγιές ήπαρ αποθηκεύουν εστέρες ρετινόλης, ρυθμίζουν την αιματική ροή στα κολποειδή και παίζουν ρόλο στην ανοσολογική απάντηση λειτουργώντας ως επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Υπό τη δράση βλαβερών ερεθισμάτων έχουν την ιδιότητα να μεταμορφώνονται σε μυοϊνοβλαστικά κύτταρα με έντονα φλεγμονώδη χαρακτήρα και παρουσιάζουν αυξημένη μεταναστευτικότητα, κυτταρικό πολλαπλασιασμό και παραγωγή πλήθους προφλεγμονωδών και προϊνωτικών παραγόντων. Η διαδικασία αυτή έχει χαρακτηριστεί ως ενεργοποίηση και παίζει σημαντικότερο ρόλο στην φλεγμονώδη εξεργασία αλλά και στην αναγεννητική αντίδραση στο ήπαρ κατόπιν βλάβης.

Τα αστεροειδή κύτταρα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή κολλαγόνου και άλλων συστατικών της θεμέλιας ουσίας στο ήπαρ, καθώς επίσης και ενζύμων που αποδομούν τη θεμέλια ουσία όπως μεταλοπρωτεϊνάσες θεμέλιας ουσίας (MMPs) και τους αναστολείς τους (TIMPs). Είναι επομένως κύτταρα κεντρικής σημασίας στις χρόνιες ηπατικές νόσους καθώς είναι υπεύθυνα για την αναδιοργάνωση του ηπατικού ινώδους σκελετού και την παραγωγή ινώδους ιστού. Τα ερεθίσματα εκείνα που προάγουν την ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό των αστεροειδών κυττάρων και την παραγωγή κολλαγόνου και TIMPs ευνοούν την ηπατική ίνωση ενώ παράγοντες που προκαλούν απόπτωση ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων, ή αυξημένη έκφραση MMPs και ελάττωση έκφρασης κολλαγόνου και λοιπών μορίων θεμέλιας ουσίας έχουν αποδειχθεί σε *in vivo* μοντέλα ηπατικής ίνωσης ότι ευνοούν την αναστροφή της ινωτικής διαδικασίας ακόμη και

στα πρώιμα στάδια της κίρρωσης του ήπατος. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, τα κύτταρα αυτά είναι αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας και θεωρούνται πιθανός θεραπευτικός στόχος στην ηπατική ίνωση και κίρρωση.

Η σωματοστατίνη είναι ένα νευροπεπτίδιο με πλήθος βιολογικών δράσεων τόσο στο νευρικό σύστημα όσο και την περιφέρεια. Ασκεί τις δράσεις της μέσω πέντε διαφορετικών υποδοχέων (SSTR1-5) οι δράσεις των οποίων και τα ακριβή ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν παραμένουν ατελώς κατανοητά.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η έκφραση των υπότυπων υποδοχέων σωματοστατίνης στα αστεροειδή κύτταρα αρουραίου καθώς και η δράση της οκτρεοτίδης, ενός συνθετικού αναλόγου της σωματοστατίνης με διαφορετική συγγένεια για τον κάθε υπότυπο υποδοχέα, σε σχέση με την παραγωγή $\alpha 1$ -προκολλαγόνου και MMPs από τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα καθώς και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών. Διερευνήθηκε επίσης η επίδραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών TNF α , PDGF και TGF β στις προαναφερθείσες δράσεις των ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων, καθώς και η επίδραση του συνδυασμού τους με οκτρεοτίδη σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Τα ανενεργά αστεροειδή κύτταρα δεν παράγουν κανέναν υπότυπο υποδοχέα σωματοστατίνης. Τα ενεργοποιημένα κύτταρα παράγουν τους υπότυπους SSTR1, 2A, 2B, 3 και 4. Η έκφραση των υποδοχέων επηρεάζεται από διάφορες κυτταροκίνες και κυρίως τον PDGF ο οποίος αυξάνει την έκφραση των υποδοχέων SSTR1, 3 και 4 και την IFN γ η οποία επάγει την έκφραση του SSTR4.

Ο TNF α αναστέλλει την παραγωγή $\alpha 1$ -προκολλαγόνου και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την παραγωγή MMP-2 και MMP-9. Ο PDGF αυξάνει την παραγωγή $\alpha 1$ -προκολλαγόνου και είναι το ισχυρότερο μιτω-

τικό ερέθισμα για τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα. Επίσης αυξάνει την παραγωγή MMP-2 και MMP-9. Ο TGFβ είναι το ισχυρότερο προϊνωτικό ερέθισμα για τα ενεργοποιημένα κύτταρα, αυξάνοντας ισχυρά την παραγωγή α1-προκολλαγόνου. Η οκτρεοτίδη έχει διαφορετικές δράσεις ανάλογα με την κυτταροκίνη που επιδρά στο κύτταρο. Όταν επιδρά μόνη της αναστέλλει την παραγωγή α1-προκολλαγόνου με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, ενώ δεν έχει σημαντικές δράσεις στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή την παραγωγή MMPs. Σε κύτταρα όμως υπο το ερέθισμα του TNFα, προκαλεί αύξηση τόσο της παραγωγής α1-προκολλαγόνου όσο και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επίσης, ελαττώνει την παραγωγή α1-προκολλαγόνου που επάγει ο TGFβ και ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό που επάγει ο PDGF.

Τέλος, για τη διερεύνηση του ρόλου των φωσφοτυροσινικών φωσφατασών (PTP) και των φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης (STP) στην παραγωγή α1-προκολλαγόνου, MMPs και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, χρησιμοποιήθηκαν ο αναστολέας των PTP ορθοβαναδικό νάτριο και ο αναστολέας των STP οκαδαϊκό οξύ. Το ορθοβαναδικό νάτριο έδειξε συνεργιστική δράση με την οκτρεοτίδη στην επαγωγή των MMP-2 και MMP-9 σε κύτταρα υπο την επίδραση TNFα και PDGF, ενώ το οκαδαϊκό οξύ προκάλεσε καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της παραγωγής α1-προκολλαγόνου και ισχυρότατη επαγωγή τόσο της MMP-2 όσο και της MMP-9 επιδεικνύοντας έτσι έντονα αντινωτικές δράσεις.

Συμπερασματικά, οι δράσεις του σωματοστατινεργικού συστήματος στα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα φαίνεται ότι εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται το κύτταρο και τη δράση των κυτταροκινών και ενδεχομένως άλλων παραγόντων σ' αυτά. Στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση που προκαλείται από την ενεργοποίηση των υποδοχέων σωματοστατίνης παίζουν ση-

μαντικό ρόλο τόσο οι φωσφοτυροσινικές φωσφατάσες όσο και οι φωσφατάσες σερίνης/θρεονίνης και οι τελευταίες φαίνεται ότι μπορεί να αποτελέσουν σημαντικό στόχο για ανάπτυξη αντιιωτικών φαρμάκων στο μέλλον.

Abstract

Hepatic stellate cells are pericytes which are situated around liver sinusoids in the space of Disse and are intimately associated with sinusoidal endothelial cells and hepatocytes. In the healthy liver they store retinol esters, regulate sinusoidal blood flow and have important immunologic functions acting as dedicated antigen presenting cells. Following noxious stimuli in the liver they can transdifferentiate into myofibroblasts with intensely inflammatory phenotype and exhibit increased mobility, proliferation and produce many proinflammatory and profibrotic factors. This transdifferentiation has been termed activation and plays a crucial role in the inflammatory and regenerative response in the liver following injury.

Hepatic stellate cells produce collagen along with other components of extracellular matrix in the liver as well as the enzymes responsible for the degradation of these components, such as matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs). Thus, they are cells of great importance in chronic liver diseases as they are responsible for the remodelling of the hepatic fibrous skeleton and the production of fibrous tissue. Stimuli that lead to increased activation and proliferation of hepatic stellate cells and increased production of collagen and TIMPs lead to increased fibrosis whilst those that lead to increased apoptosis or increased expression of MMPs and decreased expression of collagen and other components of extracellular matrix have been shown in in vivo models of hepatic fibrosis to favor the reversal and resolution of fibrosis even when it has progressed to the early stages of cirrhosis.

Based on these observations, hepatic stellate cells are under intense research as they are regarded as potential therapeutic targets against hepatic fibrosis and cirrhosis.

Somatostatin is a neuropeptide with vast biological actions both in the CNS and in peripheral tissues. It mediates its effects through 5 distinct receptor types SSTR1-5 the precise biological functions of which are still incompletely understood.

In this work we studied the expression of the various subtypes of somatostatin receptors in rat hepatic stellate cells as well as the actions of octreotide, a synthetic somatostatin analogue with different affinity for the different subtypes of SSTRs, in regard to production of α 1-procollagen and MMP expression from activated hepatic stellate cells as well as the proliferation of these cells. We also studied the effect of the proinflammatory and profibrotic cytokines $\text{TNF}\alpha$, PDGF and $\text{TGF}\beta$ in regard to the above mentioned actions as well as the effect of their combination with octreotide in various concentrations.

Quiescent hepatic stellate cells do not express any subtype of somatostatin receptor. Activated cells express the subtypes SSTR1, 2A, 2B, 3 and 4. Receptor expression level is influenced by different cytokines, mainly PDGF which increases the expression of SSTR1, 3 and 4 and $\text{IFN}\gamma$ which increases the expression of SSTR4.

$\text{TNF}\alpha$ inhibits the production of α 1-procollagen as well as proliferation of activated hepatic stellate cells, while it up-regulates the production of MMP-2 and MMP-9. PDGF increases the expression of α 1-procollagen and is also the most potent mitotic stimulus for these cells. It also up-regulates MMP-2 and MMP-9 expression. $\text{TGF}\beta$ is the most potent profibrotic stimulus for activated hepatic stellate cells and strongly induces the production of α 1-procollagen. Octreotide differentially modulates the effects of the three cytokines. By itself it dose dependently

decreases the production of $\alpha 1$ -procollagen and has no effect on MMP production or proliferation. Under the co-stimulus of $\text{TNF}\alpha$ though, it up-regulates $\alpha 1$ -procollagen and increases proliferation. It down-regulates $\alpha 1$ -procollagen expression under the co-stimulus of $\text{TGF}\beta$ and it acts synergistically to the increased proliferation induced by PDGF.

To study the effect of phosphotyrosine phosphatases (PTP) and serine/threonine phosphatases (STP) in $\alpha 1$ -procollagen and MMP production and cellular proliferation, we employed the PTP inhibitor sodium orthovanadate and the STP inhibitor okadaic acid. Sodium orthovanadate showed synergistic action to octreotide in inducing MMP-2 and MMP-9 in $\text{TNF}\alpha$ and PDGF treated cells while okadaic acid reduced proliferation, $\alpha 1$ -procollagen production and potentially up-regulated MMP-2 and MMP-9 production regardless of cytokine treatment, thus exhibiting strong antifibrotic action.

In conclusion, the actions of the somatostatinergic system in activated rat hepatic stellate cells is strongly dependent on the signalling context the cell finds itself into, with different cytokines inducing different actions. The SSTR intracellular signalling is influenced by both PTP and STP, and the latter could potentially be an important target for antifibrotic treatments in the future.

Μέρος ΙΙΙ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία

- [1] Hernandez-Gea V and Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol.*, 6:425--56, 2011.
- [2] Wang J and Ueda N. Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 89(3–4):112–119, 2009.
- [3] Poynard T, Mathurin P, Lai CL, Guyader D, Poupon R, Tainturier MH, Myers RP, Muntenau M, Ratziu V, Manns M, Vogel A, Capron F, Chedid A, and Bedossa P. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol*, 38(3):257--65, 2003.
- [4] Bataller R, North KE, and Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology*, 37(3):493--503, 2003.
- [5] Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*, 7(8):425--36, 2010.
- [6] Bonis PA, Friedman SL, and Kaplan MM. Is liver fibrosis reversible? *N Engl J Med*, 344(6):452--4, 2001.
- [7] Mallet V, Gilgenkrantz H, Serpaggi J, Verkarre V, Vallet-Pichard A,

-
- Fontaine H, and Pol S. Brief communication: the relationship of regression of cirrhosis to outcome in chronic hepatitis C. *Ann Intern Med*, 149(6):399-403, 2008.
- [8] Sanyal AJ, Bosch J, Blei A, and Arroyo V. Portal hypertension and its complications. *Gastroenterology*, 134(16):1715--28, 2008.
- [9] Schuppan D and Nezam HA. Liver Cirrhosis. *Lancet*, 371(9615):838--851, 2008.
- [10] Martin Blachier, Henri Leleu, Dominique-Charles Valla Markus Peck-Radosavljevic, and Françoise Roudot-Thoraval. The Burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *EASL*, pages 8--11, 2013.
- [11] David A Leon and Jim McCambridge. Liver cirrhosis mortality rates in Britain from 1950 to 2002: an analysis of routine data. *Lancet*, 367(9504):52--6, 2006.
- [12] Vinay Kumar et al. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA 19103-2899, 2010.
- [13] Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, 134(6):1655--69, 2008.
- [14] Horn T, Christoffersen P, and Henriksen JH. Alcoholic liver injury: defenestration in noncirrhotic livers - a scanning electron microscopic study. *Hepatology*, 7:77--82, 1987.
- [15] Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, and Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis*, 21(3):351--72, 2001.

- [16] Schuppan D and Rühl M. Matrix in signal transduction and growth factor modulation. *Braz J Med Biol Res*, 27:2125–2141, 1994.
- [17] Schuppan D and Gressner AM. *Function and metabolism of collagens and other extracellular matrix proteins*. Oxford University Press, New York, 1999.
- [18] Di Lullo, Gloria A., and et al. Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen. *J. Biol. Chem.*, 277(6):4223--4231, 2002.
- [19] Shoulders MD and Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu. Rev. Biochem.*, 78:929--958, 2009.
- [20] Hulmes DJ. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *J Struct Biol*, 137(1-2):2--10, 2002.
- [21] Kielty CM, Sherratt MJ, and Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J. Cell. Sci.*, 115:2817--28, 2002.
- [22] Mao Y and Schwarzbauer JE. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, 24(6):389--99, 2005.
- [23] Grinnell. Fibronectin and wound healing. *J. Cell Biochem*, 26(2):107–116, 1984.
- [24] Jones F and Jones P. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn*, 218(2):235--59, 2000.

-
- [25] Chung AE and Durkin ME. Entactin: structure and function. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 3(4):275--82, 1990.
- [26] Timpl R et al. Laminin – a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*, 254(19):9933–7, 1979.
- [27] Rapraeger AC, Krufka A, and Olwin BB. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science*, 252:1705--1708, 1991.
- [28] Kresse H and Schönherr E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J Cell Physiol.*, 189(3):266--74, 2001.
- [29] Fesus L and Piacentini M. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem Sci.*, 27(10):534--9, 2002.
- [30] Park D, Choi SS, and Ha K-S. Transglutaminase 2: a multi-functional protein in multiple subcellular compartments. *Amino Acids*, 39(3):619--31, 2010.
- [31] Schnabel C, Sawitza I, Tag CG, Lahme B, and Gressner AM and Breitkopf K. Expression of cytosolic and membrane associated tissue transglutaminase in rat hepatic stellate cells and its upregulation during transdifferentiation to myofibroblasts in culture. *Hepatol Res*, 28(3):140--145, 2004.
- [32] Kagan HM and Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J. Cell. Biochem.*, 88(4):660--72, 2003.
- [33] Baker AM, Cox TR, Bird D, Lang G, Murray GI, Sun XF, Southall SM, Wilson JR, and Erler JT. The role of lysyl oxidase in SRC-dependent

-
- proliferation and metastasis of colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 103(5):407--24, 2011.
- [34] Shi W, Yang B, Li X, Sun S, Wang L, and Jiao S. The effect of lysyl oxidase polymorphism on susceptibility and prognosis of nonsmall cell lung cancer. *Tumour Biol.*, 33(6):2379–83, 2012.
- [35] El-Haibi CP, Bell GW, Zhang J, Collmann AY, Wood D, Scherber CM, Csizmadia E, Mariani O, Zhu C, Campagne A, Toner M, Bhatia SN, Irimia D, Vincent-Salomon A, and Karnoub AE. Critical role for lysyl oxidase in mesenchymal stem cell-driven breast cancer malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109(43):17460–5, 2012.
- [36] Payne SL, Hendrix MJ, and Kirschmann DA. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer--a prospect. *J Cell Biochem.*, 101(6):1338--54, 2007.
- [37] Inge Mannaerts, Ben Schroyen, Stefaan Verhulst, Leentje Van Lommel, Frans Schuit, Marc Nyssen, and Leo A. van Grunsven. Gene Expression Profiling of Early Hepatic Stellate Cell Activation Reveals a Role for Igfbp3 in Cell Migration. *PLoS One*, 8(12):84071, 2013.
- [38] R. Visse and H. Nagase. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.*, 92:827--839, 2003.
- [39] Pei D and Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin 3 zymogen. *Nature*, 375:244--247, 1995.
- [40] Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost.*, 86:324–333, 2001.

-
- [41] Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem.*, 378:151--160, 1997.
- [42] Suzuki K, Kan CC, Hung W, Gehring MR, Brew K, and Nagase H. Expression of human pro-matrix metalloproteinase 3 that lacks the N-terminal 34 residues in *Escherichia coli*: autoactivation and inter-action with tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1). *Biol Chem.*, 379:185--191, 1998.
- [43] Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, and Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science*, 277:225--228, 1997.
- [44] Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, and Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol.*, 153:893--904, 2001.
- [45] Brew K, Dinakarpandian D, and Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.*, 1477:267--283, 2000.
- [46] A. Amour PM, Slocombe A, Webster M, Butler CG, Knight BJ, Smith PE, Stephens C, Shelley M, Hutton V, Knáuper AJ, Docherty G, and Murphy. TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett.*, 435:39--44, 1998.
- [47] Gasson JC, Golde DW, Kaufman SE, Westbrook CA, Hewick RM, Kaufman RJ, Wong GG, Temple PA, Leary AC, Brown EL, and et al.

Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. *Nature*, 315:768--771, 1985.

- [48] Stetler-Stevenson WG, Bersch N, and Golde DW. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-potentiating activity. *FEBS Lett.*, 296:231--234, 1992.
- [49] Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, and Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells: a possible new growth factor in serum. *FEBS Lett.*, 298:29--32, 1992.
- [50] Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, and Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.*, 74:111--122, 1997.
- [51] Bond M, Murphy G, Bennett MR, Newby AC, and Baker AH. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-dependent type II apoptotic pathway. *J Biol Chem.*, 277:13787--13795, 2002.
- [52] Ahonen M, Poukkula M, Baker AH, Kashiwagi M, Nagase H, Erikson JE, and Kähäri VM. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors. *Oncogene*, 22:2121--2134, 2003.
- [53] Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgeirsson UP, Gomez DE, Kawata M, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, Nakatani T, Thorgeirsson SS, and Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes

-
- liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology*, 32(6):1248--54, 2000.
- [54] Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, and Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol*, 113(6):443--53, 2000.
- [55] Gressner AM. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J Hepatol*, 22:28--36, 1995.
- [56] Wells RG, Kruglov E, and Dranoff JA. Autocrine release of TGF-beta by portal fibroblasts regulates cell growth. *FEBS Lett*, 559:107--110, 2004.
- [57] Jhandier MN, Kruglov EA, Lavoie EG, and et al. Portal fibroblasts regulate the proliferation of bile duct epithelia via expression of NTPDase2. *J Biol Chem*, 280:22986--22992, 2005.
- [58] Beaussier M, Wendum D, Schiffer E, and et al. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. *Lab Invest*, 87:292--30, 2007.
- [59] Zeisberg M, Yang C, Martino M, and et al. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem*, 282:23337--23347, 2007.
- [60] Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, and et al. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol*, 45:429--438, 2006.
- [61] Forbes SJ, Russo FP, Rey V, and et al. A significant proportion

- of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology*, 126:955–963, 2004.
- [62] Schuppan D and Yong Ook Kim. Evolving therapies in liver fibrosis. *J Clin Invest*, 123(5):1887--901, 2013.
- [63] Marra F, Valente AJ, Pinzani M, and Abboud HE. Cultured human liver fat-storing cells produce monocyte chemotactic protein-1. Regulation by proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*, 92:1674–1680, 1993.
- [64] Seki E, De Minicis S, Gwak GY, Kluwe J, Inokuchi S, Bursill CA Llovet JM, Brenner DA, and Schwabe RF. CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. *J Clin Invest*, 119:1858–1870,, 2009.
- [65] Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R, Weber S, Cassan C, Sieling PA, Modlin RL, Liblau RS, Gressner AM, and Kaufmann SH. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity*, 26:117–129, 2007.
- [66] A. Watanabe, A. Hashmi, D.A. Gomes, T. Town, A. Badou, R.A. Flavell, and W.Z. Mehal. Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via Toll-like receptor 9. *Hepatology*, 46:1509–1518, 2007.
- [67] E.Gabele, M.Muhlbauer, C.Dorn, T.S.Weiss, M.Frohe, B.Schnabl, J. R.Wiest, Scholmerich, F. Obermeier, and C. Hellerbrand. Role of TLR9 in hepatic stellate cells and experimental liver fibrosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 376:271--276, 2008.
- [68] Y.H. Paik, K.S. Lee, H.J. Lee, K.M. Yang, S.J. Lee, D.K. Lee, K.H. Han, C.Y. Chon, S.I. Lee, Y.M. Moon, and D.A. Brenner. Hepatic

stellate cells primed with cytokines upregulate inflammation in response to peptidoglycan or lipoteichoic acid. *Lab. Invest.*, 86:676–686, 2006.

- [69] Gressner AM, Lotfi S, Gressner G, Haltner E, and Kropf J. Synergism between hepatocytes and Kupffer cells in the activation of fat storing cells (perisinusoidal lipocytes). *J Hepatol*, 19:117--32, 1993.
- [70] Matsuoka M and Tsukamoto H. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor beta: implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology*, 11:599–605, 1990.
- [71] Winwood PJ, Schuppan D, Iredale JP, Kawser CA, Docherty AJ, and Arthur MJ. Kupffer cell-derived 95 kd type IV collagenase/gelatinase B: characterization and expression in cultured cells. *Hepatology*, 22:304--15, 1995.
- [72] DeLeve LD, Wang X, Hu L, and et al. Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is under paracrine and autocrine control. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.*, 287:757--763, 2004.
- [73] DeLeve LD, Wang X, and Guo Y. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology*, 48:920--930, 2008.
- [74] Jiang JX, Mikami K, Venugopal S, Li Y, and Torok NJ. Apoptotic body engulfment by hepatic stellate cells promotes their survival by the JAK/STAT and Akt/NF-kappaB-dependent pathways. *J Hepatol*, 51:139–148, 2009.

-
- [75] Jing-Ting, Li, Zhang-Xiu Liao, Jieping, Danxu, and Hui Wang. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. *J Gastroenterol*, 43:419--28, 2008.
- [76] Wake K. "Sternzellen" in the liver: perisinuosoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat*, 132:429--462, 1971.
- [77] Aterman K. The parasinusoidal cells of the liver: a historical account. *Histochem J*, 18:279--305, 1986.
- [78] A.Geerts. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.*, 21:311--335, 2001.
- [79] Nakane PK. Ito's fat storing cell of the mouse liver. *Anat Rec*, 145:265--266, 1963.
- [80] Kent G, Gay S, Inouye T, Bahu R, Minick OT, and Popper H. Vitamin A containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73:3719--3722, 1976.
- [81] Chen W, Gendrault JL, Steffan AM, Jeandidier E, and Kirn A. Isolation, culture and main characteristics of mouse fat-storing cells: interaction with viruses. *Hepatology*, 9:352--362, 1989.
- [82] Knook DL, Seffelaar AM, and de Leeuw AM. Fat-storing cells of the rat liver. Their isolation and purification. *Cell Res*, 139:468--471, 1982.
- [83] Friedman SL, Rockey DC, McGuire RF, Maher JJ, Boyles JK, and Yamasaki G. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. *Hepatology*, 15:234--243, 1992.

-
- [84] Giampieri MP, Jezequel AM, and Orlandi F. The lipocytes in normal human liver. *Digestion*, 22:165–169, 1981.
- [85] Jezequel AM, Novelli G, Venturini C, and Orlandi F. Quantitative analysis of the perisinusoidal cells in human liver; the lipocytes. *Front Gastrointestinal Res*, 8:85--90, 1984.
- [86] Friedman SL. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol Rev.*, 88(1):125--172, 2008.
- [87] Wake K. Development of vitamin A-rich lipid droplets in multivesicular bodies of rat liver stellate cells. *J Cell Biol*, 63:683–691, 1974.
- [88] Melton AC and Yee HF. Hepatic stellate cell protrusions couple platelet-derived growth factor-BB to chemotaxis. *Hepatology*. *Hepatology*, 45:1446–1453, 2007.
- [89] Wake K, Motomatsu K, and Ekataksin W. *Postnatal development of the perisinusoidal stellate cells in the rat liver*. Leiden: Kupffer Cell Foundation, 1991.
- [90] Wake K. *Structure of the sinusoidal wall in the liver*. Leiden: The Kupffer Cell Foundation, 1995.
- [91] Bioulac-Sage P, Lafon ME, Saric J, and Balabaud C. Nerves and perisinusoidal cells in human liver. *J Hepatol*, 10:105–112, 1990.
- [92] Ueno T, Sata M, Sakata R, Torimura T, Sakamoto M, Sugawara H, and Tanikawa K. Hepatic stellate cells and intralobular innervation in human liver cirrhosis. *Hum Pathol*, 28:953–959, 1997.

-
- [93] Laleman W, Van Landeghem L, Severi T, Vander Elst I, Zeegers M, Bisschops R, Van Pelt J, Roskams T, Cassiman D, Fevery J, and Nevens F. Both Ca²⁺ -dependent and -independent pathways are involved in rat hepatic stellate cell contraction and intrahepatic hyperresponsiveness to methoxamine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292:556--564, 2007.
- [94] Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, and Diehl AM. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut*, 53:438–445, 2004.
- [95] Roskams T, Cassiman D, De Vos R, and Libbrecht L. Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 280:910–923, 2004.
- [96] Geerts A. On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuroectodermal? *2004*, 40(2):331--4, J Hepatol.
- [97] Kiassov AP, Van Eyken P, van Pelt JF, Depla E, Fevery J, and Yap SH. Desmet VJ. Desmin expressing nonhematopoietic liver cells during rat liver development: an immunohistochemical and morphometric study. *Differentiation*, 59:253 – 258, 1995.
- [98] Vassy J, Rigaut JP, Briane D, and Kraemer M. Confocal microscopy immunofluorescence localization of desmin and other intermediate filament proteins in fetal rat livers. *Hepatology*, 17:293 – 300, 1993.
- [99] Suskind DL and Muench MO. Searching for common stem cells of the hepatic and hematopoietic systems in the human fetal liver: CD34+

-
- cytokeratin 7/8+ cells express markers for stellate cells. *J Hepatol*, 40:261–268, 2004.
- [100] Rubbia-Brandt L, Mentha G, Desmouliere A, Alto Costa AM, Giostra E, Molas G, Enzan H, and Gabbiani G. Hepatic stellate cells reversibly express alpha-smooth muscle actin during acute hepatic ischemia. *Transplant Proc*, 29:2390–2395, 1997.
- [101] Cassiman D, Barlow A, Vander Borgh S, Libbrecht L, and Pachnis V. Hepatic stellate cells do not derive from the neural crest. *J Hepatol*, 44:1098–1104, 2006.
- [102] Nakatani K, Seki S, Kawada N, and et al. Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in perisinusoidal stellate cells of the human liver. *Cell Tissue Res*, 283:159--165, 1996.
- [103] Ballardini G, Groff P, Badiali dGL, Schuppan D, and Bianchi FB. Ito cell heterogeneity: desmin-negative Ito cells in normal rat liver. *Hepatology*, 19:440–446, 1994.
- [104] Ramm GA, Britton RS, O'Neill R, Blaner WS, and Bacon BR. Vitamin A-poor lipocytes: a novel desmin negative lipocyte subpopulation, which can be activated to myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 269:532–541, 1995.
- [105] Schnabl B, Purbeck CA, Choi YH, Hagedorn CH, and Brenner D. Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype. *Hepatology*, 37:653–664, 2003.

-
- [106] Magness ST, Bataller R, Yang L, and Brenner DA. A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations. *Hepatology*, 40:1151–1159, 2004.
- [107] Lim YS, Lee HC, and Lee HS. Switch of cadherin expression from E- to N-type during the activation of rat hepatic stellate cells. *Histochem Cell Biol*, 127:149–160, 127.
- [108] Friedman G, Liu LM, Friedman SL, and Boyles JK. Apolipoprotein e is secreted by cultured lipocytes of the rat liver. *J Lipid Res*, 32:107–114, 1991.
- [109] Ramadori G, Knittel T, Schwogler S, Bieber F, Rieder H, and Meyer ZBK. Dexamethasone modulates alpha 2-macroglobulin and apolipoprotein E gene expression in cultured rat liver fatstoring (Ito) cells. *Hepatology*, 14:875–882, 1991.
- [110] Athari A, Hanecke K, and Jungermann K. Prostaglandin F2 alpha and D2 release from primary Ito cell cultures after stimulation with noradrenaline and ATP but not adenosine. *Hepatology*, 20:142–148, 1994.
- [111] Flisiak R, Baraona E, Li J, and Lieber CS. Effects of ethanol on prostanoid production by liver fat-storing cells. *Hepatology*, 18:153–159, 1993.
- [112] Beno DW, Mullen J, and Davis BH. Lipoxygenase inhibitors block PDGF-induced mitogenesis: a MAPK-independent mechanism that blocks fos and egr. *Am J Physiol Cell Physiol*, 268:604–610, 1995.
- [113] Bissel DM, Stamatoglou SC, Nermut MV, and Hughes RC. Interactions of rat hepatocytes with type IV collagen, fibronectin and laminin matrices.

-
- Distinct matrix-controlled modes of attachment and spreading. *Eur J Cell Biol*, 40:72--78, 1986.
- [114] Bissel DM, Arenson DM, Maher JJ, and Roll FJ. Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *J Clin Invest*, 79:801--812, 1987.
- [115] Bissel DM and Choun MO. The role of extracellular matrix in normal liver. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 151:1--7, 1988.
- [116] Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, and et al. Maintenance of differentiated phenotype of cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matrix. *J Biol Chem*, 264:10756--10762, 1989.
- [117] Eyhorn S, Schlayer HJ, Henninger HP, and et al. Rat hepatic sinusoidal endothelial cells in monolayer culture. Biochemical and ultrastructural characteristics. *J Hepatol*, 6:23--35, 1988.
- [118] Sato M, Kojima N, Miura M, and et al. Induction of cellular processes containing collagenase and retinoid by integrin-binding to interstitial collagen in hepatic stellate cell culture. *Cell Biol Int*, 22:115--125, 1998.
- [119] Maher JJ and McGuire RF. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *J Clin Invest*, 86:1641--1648, 1990.
- [120] Geerts A, Greenwel P, Cunningham M, and et al. Identification of connective tissue gene transcripts in freshly isolated parenchymal, endothelial, Kupffer and fat-storing cells by northern hybridization analysis. *J Hepatol*, 19:148--158, 1993.

-
- [121] Ramadori G, Rieder H, Knittel T, and et al. Fat storing cells (FSC) of rat liver synthesize and secrete fibronectin. Comparison with hepatocytes. *J Hepatol*, 4:190--197, 1987.
- [122] Knittel T, Fellmer P, and Ramadori G. Gene expression and regulation of plasminogen activator inhibitor type I in hepatic stellate cells of rat liver. *Gastroenterology*, 111:745--754, 1996.
- [123] Leyland H, Gentry J, Arthur MJ, and Benyon RC. The plasminogen-activating system in hepatic stellate cells. *Hepatology*, 24:1172--1178, 1996.
- [124] Kojima S, Hayashi S, Shimokado K, and et al. Transcriptional activation of urokinase by the Kruppel-like factor Zf9/COPEB activates latent TGF-beta1 in vascular endothelial cells. *Blood*, 95:1309--1316, 2000.
- [125] Martínez-Rizo A, Bueno-Topete M, González-Cuevas J, and Armendáriz-Borunda J. Plasmin plays a key role in the regulation of profibrogenic molecules in hepatic stellate cells. *Liver Int*, 30(2):298--310, 2010.
- [126] Roskams T. Different types of liver progenitor cells and their niches. *J Hepatol*, 45:1--4, 2006.
- [127] Yin L, Lynch D, and Sell S. Participation of different cell types in the restitutive response of the rat liver to periportal injury induced by allyl alcohol. *J Hepatol*, 31:497--507, 1999.
- [128] Yin L, Lynch D, Ilic Z, and Sell S. Proliferation and differentiation of ductular progenitor cells and littoral cells during the regeneration of the rat liver to CCl4/2-AAF injury. *Histol Histopathol*, 17:65--81, 2002.

-
- [129] Cassiman D, Libbrecht L, Sinelli N, Desmet V, Deneef C, and Roskams T. The vagal nerve stimulates activation of the hepatic progenitor cell compartment via muscarinic acetylcholine receptor type 3. *Am J Pathol*, 161:521–530, 2002.
- [130] Asahina K, Sato H, Yamasaki C, Kataoka M, Shiokawa M, Katayama S, Tateno C, and Yoshizato K. Pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule as a mitogen of rat hepatocytes and its role in regeneration and development of liver. *Am J Pathol*, 160:2191–2205, 2002.
- [131] Yoshino R, Miura K, Segawa D, Hirai Y, Goto T, Ohshima S, Mikami K, Yoneyama K, Shibuya T, Watanabe D, Kataoka E, Takeuchi S, Endoh A, Sato W, and Watanabe S. Epimorphin expression and stellate cell status in mouse liver injury. *Hepatol Res*, 34:238–249, 2006.
- [132] Libbrecht L, Cassiman D, Desmet V, and Roskams T. The correlation between portal myofibroblasts and development of intrahepatic bile ducts and arterial branches in human liver. *Liver*, 22:252–258, 2002.
- [133] Kruglov EA, Nathanson RA, Nguyen T, and Dranoff JA. Secretion of MCP-1/CCL2 by bile duct epithelia induces myofibroblastic transdifferentiation of portal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290:765–771, 2006.
- [134] Bachem MG, Meyer D, Melchior R, Sell KM, and Gressner AM. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. . 1992, 89:19–27, *J Clin Invest*.

-
- [135] Meyer DH, Bachem MG, and Gressner AM. Modulation of hepatic lipocyte proteoglycan synthesis and proliferation by Kupffer cell-derived transforming growth factors type beta 1 and type alpha. *Biochem Biophys Res Commun*, 171:1122–1129, 1990.
- [136] Mullhaupt B, Feren A, Fodor E, and Jones A. Liver expression of epidermal growth factor RNA. Rapid increases in immediate-early phase of liver regeneration. *J Biol Chem*, 269:19667–19670, 1994.
- [137] Maher JJ. Cell-specific expression of hepatocyte growth factor in liver. Upregulation in sinusoidal endothelial cells after carbon tetrachloride. *J Clin Invest*, 91:2244–2252, 1993.
- [138] Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, Dienes HP, and Rogler CE. Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology*, 15:5–11, 1992.
- [139] Kordes C, Sawitza I, Muller-Marbach A, Ale-Agha N, Keitel V, Klonowski-Stumpe H, and Haussinger D. CD133(+) hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 352:410–417, 2007.
- [140] Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis*, 21:417–426, 2001.
- [141] Marra F and Pinzani M. Role of hepatic stellate cells in the pathogenesis of portal hypertension. *Nefrologia*, 22(5):34–40, 2002.
- [142] Bonacchi A, Petrai I, Defranco RM, Lazzeri E, Annunziato F, Efsen E, Cosmi L, Romagnani P, Milani S, Failli P, Batignani G, Liotta F,

-
- Laffi G, Pinzani M, Gentilini P, and Marra F. The chemokine CCL21 modulates lymphocyte recruitment and fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 125:1060–1076, 2003.
- [143] Vinas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Berenguer C, Enrich C, Nicolas JM, Ercilla G, Gallart T, Vives J, Arroyo V, and Rodes J. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology*, 38:919–929, 2003.
- [144] Unanue ER. Ito cells, stellate cells, myofibroblasts: new actors in antigen presentation. *Immunity*, 26:9–10, 2007.
- [145] Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C, and Brenner DA. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 37:1043–1055, 2003.
- [146] F. Isayama, I.N. Hines, M. Kremer, R.J. Milton, C.L. Byrd, A.W. Perry, S.E. McKim, C. Parsons, R.A. Rippe, and M.D. Wheeler. LPS signaling enhances hepatic fibrogenesis caused by experimental cholestasis in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, 290:1318–1328, 2006.
- [147] Viglianti GA, Lau CM, Hanley TM, Miko BA, Shlomchik MJ, and Marshak-Rothstein A. Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity*, 19:837–847, 2003.
- [148] Win KM, Charlotte F, Mallat A, Cherqui D, Martin N, Mavier P, Preaux AM, Dhumeaux D, and Rosenbaum J. Mitogenic effect of transforming growth factor-beta 1 on human Ito cells in culture: evidence for mediation

- by endogenous platelet-derived growth factor. *Hepatology*, 18:137–145, 1993.
- [149] Pinzani M, Abboud HE, and Aron DC. Secretion of insulin-like growth factor-I and binding proteins by rat liver fat-storing cells: regulatory role of platelet-derived growth factor. *Endocrinology*, 127:2343–2349, 1990.
- [150] Zindy F, Lamas E, Schmidt S, Kirn A, and Brechot C. Expression of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-II, IGF-I and insulin receptors mRNAs in isolated non-parenchymal rat liver cells. *J Hepatol*, 14:30–34, 1992.
- [151] Marsden ER, Hu Z, Fujio K, Nakatsukasa H, Thorgeirsson SS, and Evarts RP. Expression of acidic fibroblast growth factor in regenerating liver and during hepatic differentiation. *Lab Invest*, 67:427–433, 1992.
- [152] Rosenbaum J and Blazejewski S. J Hepatol. Regulation of Ito cell proliferation by soluble factors. *J Hepatol*, 22:65–70, 1995.
- [153] Asai K, Tamakawa S, Yamamoto M, Yoshie M, Tokusashi Y, Yaginuma Y, Kasai S, and Ogawa K. Activated hepatic stellate cells overexpress p75NTR after partial hepatectomy and undergo apoptosis on nerve growth factor stimulation. *Liver Int*, 26(5):595–603, 2006.
- [154] Brennan AM and Mantzoros CS. Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology--emerging clinical applications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2(6):318–327, 2006.
- [155] Bethanis SK and Theocharis SE. Leptin in the field of hepatic fibrosis: a pivotal or an incidental player? *Dig Dis Sci*, 51:1685–96, 2006.

-
- [156] Niu L, Wang X, Li J, Huang Y, Yang Z, Chen F, and et al. Leptin stimulates alpha 1(I) collagen expression in human hepatic stellate cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signalling pathway. *Liver Int*, 27:1265–72, 2007.
- [157] Maxwell PH, Ferguson DJ, Osmond MK, and et al. Expression of a homologously recombined erythropoietin-SV40 T antigen fusion gene in mouse liver: evidence for erythropoietin production by Ito cells. *Blood*, 84:1823--1830, 1994.
- [158] Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, and Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *PNAS USA*, 91(9):3652–3656, 1994.
- [159] Xu LL, Warren MK, Rose WL, Gong W, and Wang JM. Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. *Journal of leukocyte biology*, 60(3):365–371, 1996.
- [160] Nemunaitis J. Macrophage function activating cytokines: potential clinical application. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 14(2):153–71, 1993.
- [161] Czaja MJ, Geerts A, Xu J, Schmiedeberg P, and Ju Y. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) expression occurs in toxic rat liver injury and human liver disease. *J Leukoc Biol*, 55:120–126, 1994.
- [162] Pinzani M, Abboud HE, Gesualdo L, and Abboud SL. Regulation of macrophage colony-stimulating factor in liver fat-storing cells by peptide growth factors. *Am J Physiol Cell Physiol*, 262:876–881, 1992.

-
- [163] Tiggelman AM, Boers W, Linthorst C, Brand HS, Sala M, and Chamuleau RA. Interleukin-6 production by human liver (myo) fibroblasts in culture. Evidence for a regulatory role of LPS, IL-1 beta and TNF alpha. *J Hepatol*, 23:295–306, 1995.
- [164] Louis H, Le Moine O, Peny MO, Quertinmont E, Fokan D, Goldman M, and Deviere J. Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology*, 25:1382–1389, 1997.
- [165] Thompson K, Maltby J, Fallowfield J, McAulay M, Millward-Sadler H, and Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology*, 28:1597–1606, 1998.
- [166] Pinzani M, Milani S, Grappone C, Weber FJ, Gentilini P, and Abboud HE. Expression of platelet-derived growth factor in a model of acute liver injury. *Hepatology*, 19:701–707, 1994.
- [167] Wong L, Yamasaki G, Johnson RJ, and Friedman SL. Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *J Clin Invest*, 94:1563–1569, 1994.
- [168] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, and Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332:411–415, 1988.
- [169] Rockey DC and Chung JJ. Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility. *J Clin Invest*, 95:1199–1206, 1995.

-
- [170] Rockey DC, Fouassier L, Chung JJ, Carayon A, Vallee P, Rey C, and Housset C. Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: potential for autocrine and paracrine effects on stellate cells. *Hepatology*. *Hepatology*, 27:472–480, 1998.
- [171] Jarnagin WR, Rockey DC, Koteliensky VE, and et al. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol*, 127:2037--2048, 1994.
- [172] Bachem MG, Melchior R, and Gressner AM. The role of thrombocytes in liver fibrogenesis: effects of platelet lysate and thrombocyte-derived growth factors on the mitogenic activity and glycosaminoglycan synthesis of cultured rat liver fat storing cells. *J Clin Chem Clin Biochem*, 27:555–565, 1989.
- [173] Canbay A, Higuchi H, Bronk SF, Taniai M, Sebo TJ, and Gores GJ. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology*, 123:1323–1330, 2002.
- [174] Canbay A, Friedman S, and Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology*, 39:273--278, 2004.
- [175] Ramadori G, Veit T, Schwogler S, Dienes HP, Knittel T, Rieder H, and Meyer zum Buschenfelde KH. Expression of the gene of the alpha-smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 59:349–357, 1990.
- [176] Rockey DC, Boyles JK, Gabbiani G, and Friedman SL. Rat hepatic

- lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 24:193--20, 1992.
- [177] Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawada N, and Kaneda K. In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepatology*, 29:1760–1767, 1999.
- [178] Kinnman N, Hultcrantz R, Barbu V, Rey C, Wendum D, Poupon R, and Housset C. PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Lab Invest*, 80:697--707, 2000.
- [179] Marra F, Romanelli RG, Giannini C, Failli P, Pastacaldi S, Arrighi MC, Pinzani M, Laffi G, Montalto P, and Gentilini P. Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 29:140–148, 1999.
- [180] Bonacchi A, Romagnani P, Romanelli RG, Efsen E, Annunziato F, Lasagni L, Francalanci M, Serio M, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P, and Marra F. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem*, 276:9945–9954, 2001.
- [181] Hashmi AZ, Hakim W, Kruglov EA, Watanabe A, Watkins W, Dranoff JA, and Mehal WZ. Adenosine inhibits cytosolic calcium signals and chemotaxis in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292:395–401, 2007.
- [182] Marra F, Grandaliano G, Valente AJ, and Abboud HE. Thrombin

- stimulates proliferation of liver fat-storing cells and expression of monocyte chemotactic protein-1: potential role in liver injury. *Hepatology*, 22:780–787, 1995.
- [183] Marra F, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pinzani M, Pellegrini G, Laffi G, and Gentilini P. Expression of the thrombin receptor in human liver: up-regulation during acute and chronic injury. *Hepatology*, 27:462–471, 1998.
- [184] Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, Wu Y, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Masaki T, and Fukui H. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut*, 52:1347–135, 2003.
- [185] Steiling H, Muhlbauer M, Bataille F, Scholmerich J, Werner S, and Hellerbrand C. Activated hepatic stellate cells express keratinocyte growth factor in chronic liver disease. *Am J Pathol*, 165:1233–1241, 2004.
- [186] Yu C, Wang F, Jin C, Huang X, Miller DL, Basilico C, and McKeehan WL. Role of fibroblast growth factor type 1 and 2 in carbon tetrachloride-induced hepatic injury and fibrogenesis. *Am J Pathol*, 163:1653–1662, 2003.
- [187] Bataller R and Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*, 115:209–18, 2004.
- [188] Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, and Roll FJ. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest*, 96:447–55, 1995.
- [189] Chen A and Davis BH. The dna binding protein bteb mediates acetaldehyde-

- induced jun n-terminal kinase-dependent $\alpha 1(i)$ collagen gene expression in rat hepatic stellate cells. *Mol Cell Biol*, 20:2818–26, 2000.
- [190] Milani S, Herbst H, Schuppan D, Grappone C, Pellegrini G, Pinzani M, Casini A, Calabro A, Ciancio G, Stefanini F, Burroughs AK, and Surrenti C. Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol*, 144:528–537, 1994.
- [191] Arthur MJ, Stanley A, Iredale JP, Rafferty JA, Hembry RM, and Friedman SL. Secretion of 72 kDa type IV collagenase/gelatinase by cultured human lipocytes. Analysis of gene expression, protein synthesis and proteinase activity. *Biochem J*, 287:701–707, 1992.
- [192] Han YP, Yan C, Zhou L, Qin L, and Tsukamoto H. A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in transdifferentiation in the three-dimensional extracellular matrix. *J Biol Chem*, 282:12928–12939, 2007.
- [193] Vyas SK, Leyland H, Gentry J, and Arthur MJ. Rat hepatic lipocytes synthesize and secrete transin (stromelysin) in early primary culture. *Gastroenterology*, 109:889–898, 1995.
- [194] Schaefer B, Rivas-Estilla AM, Meraz-Cruz N, Reyes-Romero MA, Hernandez-Nazara ZH, Dominguez-Rosales JA, Schuppan D, Greenwel P, and Rojkind M. Reciprocal modulation of matrix metalloproteinase-13 and type I collagen genes in rat hepatic stellate cells. *Am J Pathol*, 162:1771–1780, 2003.
- [195] Niiya M, Uemura M, Zheng XW, Pollak ES, Dockal M, Scheifflinger F,

-
- Wells RG, and Zheng XL. Increased ADAMTS-13 proteolytic activity in rat hepatic stellate cells upon activation in vitro and in vivo. *J Thromb Haemost*, 4:1063–1070, 2006.
- [196] Issa R, Zhou X, Constandinou CM, and et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology*, 126:1795–1808, 2004.
- [197] Issa R, Williams E, Trim N, Kenall T, Arthur MJP, Benyon RC Reichen J, and Iredale JP. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut*, 48:548–557, 2001.
- [198] Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Pawley S Northrop M, Hovell C, and Arthur MJP. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis: hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*, 102:538–549, 1998.
- [199] Murphy FR, Issa R, Zhou X, Rhatnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, and Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by TIMP-1 is mediated via effects on MMP inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem*, 277:11069–11076, 2002.
- [200] Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, and Gao B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology*, 130:435–452, 2006.
- [201] Melhem A, Muhanna N, Bishara A, Alvarez CE, Ilan Y, Bishara T, Horani

- A, Nassar M, Friedman SL, and Safadi R. Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *J Hepatol*, 45:60--71, 2006.
- [202] Hudnall SD. Cyclosporin A renders target cells resistant to immune cytolysis. *Eur J Immunol*, 21:221--226, 1991.
- [203] Zheng S and Chen A. Activation of PPARgamma is required for curcumin to induce apoptosis and to inhibit the expression of extracellular matrix genes in hepatic stellate cells in vitro. *Biochem J*, 384:149--57, 2004.
- [204] Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, and Moriss HR. Identification of Two Related Pentapeptides from the Brain with Potent Opiate Agonist Activity. *Nature*, 258:577--580, 1975.
- [205] Wittert G, Hope P, and Pyle D. Tissue Distribution of Opioid Receptor Gene Expression in the Rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 218:877--881, 1996.
- [206] Bunzow JR, Saez C, Mortrud M, Bouvier C, Williams JT, Low M, and Grandy DK. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett*, 347(2-3):284--8, 1994.
- [207] Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, and Meunier JC. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett*, 341(1):33--8, 1994.
- [208] Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B, and et al. Isolation and

-
- structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature*, 377(6549):532--5, 1995.
- [209] Pasternak GW. Insights into mu opioid pharmacology the role of mu opioid receptor subtypes. *Life Sci*, 68(19-20):2213--9, 2001.
- [210] Jordan BA and Devi LA. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*, 399(6737):697--700, 1999.
- [211] Traynor J. Trends. Subtypes of k-opioid receptor: fact or fiction? *Trends Pharmacol Sci*, 10(2):52--3, 1989.
- [212] Traynor J and Elliot J. δ opioid receptor subtypes and cross talk with μ receptors. *Trends PharmacolSci*, 14(3):84--5, 1993.
- [213] Borsodi A and Tóth G. Characterization of opioid receptor types and subtypes with new ligands. *Ann NY Acad Sci*, 757:339--52, 1995.
- [214] Zaki PA, Bilsky EJ, Vanderah TW, Lai J, Evans CJ, and Porreca F. Opioid receptor types and subtypes: the delta receptor as a model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36:379--401, 1996.
- [215] Butelman ER, Ko MC, Sobczyk-Kojiro K, and et al. Kappa-Opioid Receptor Binding Populations in Rhesus Monkey Brain: relationship to an Assay of Thermal Antinociception. *J Pharmacol Exp Ther*, 285(2):595--601, 1998.
- [216] Caudle RM, Finegold AA, Mannes AJ, Tobias MD, Kenshalo DR, and Iadarola MJ. Spinal kappa1 and kappa2 opioid binding sites in rats, guinea pigs, monkeys and humans. *Neuroreport*, 9(11):2523--5, 1998.

-
- [217] Takemori AE and Portoghese PS. Evidence for the Interaction of Morphine with Kappa and Delta Opioid Receptors to Induce Analgesia in Beta-funaltrexamine-treated Mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 243:91--94, 1987.
- [218] Blumberg H and Dayton HB. Naloxone, Naltrexone, and Related Noroxymorphones. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 8:33--43, 1973.
- [219] Magnan J, Paterson SJ, Tavani A, and Kosterlitz HW. The Binding Spectrum of Narcotic Analgesic Drugs with Different Agonist and Antagonist Properties. Naunyn. Schmiedebergs. *Arch Pharmacol*, 319:197-205, 1982.
- [220] Herz A. Endogenous opioids systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology*, 129:99--111, 1997.
- [221] Zadina JE, Hackler L, Ge LG, and Kastin AJ. A potent and selective endogenous agonist for the mu opiate receptor. *Nature*, 386:499--502, 1997.
- [222] Hoellt V. Multiple Endogenous Opioid Peptides. *Trends in Neuroscience*, 6:24--26, 1983.
- [223] Kreil G, Barra D, Simmaco M, and et al. Deltorphan, a novel amphibian skin peptide with high selectivity and affinity for delta opioid receptors. *Eur J Pharmacol*, 162(1):123--8, 1989.
- [224] Kaminski S, Cielinska A, and Kostyra E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on health. *Journal of Applied Genetics*, 48(3):189--198, 2007.
- [225] Cade R, Privette M, Fregly MJ, Rowland NE, Sun Z, Zele V, and et al.

-
- Autism and schizophrenia: intestinal disorders. *Nutritional Neurosci*, 3:57–72, 2000.
- [226] Sun Z, Cade R, Fregly MJ, and Privette RM. Casomorphin induces fos-like immunoreactivity in discrete brain regions relevant to schizophrenia. *Autism*, 3(1):67–83, 1999.
- [227] Sun Z and Cade R. A peptide found in schizophrenia and autism causes behavioral changes in rats. *Autism*, 3(1):85–95, 1999.
- [228] New DC and Wong YH. The ORL1 receptor: molecular pharmacology and signalling mechanisms. *Neurosignals*, 11(4):197--212, 2002.
- [229] Loh HH and Smith AP. Molecular characterization of opioid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 30:123--47, 1990.
- [230] Ikeda K, Kobayashi T, Kumanishi T, Yano R, Sora I, and Niki H. Molecular mechanisms of analgesia induced by opioids and ethanol: is the GIRK channel one of the keys? . *Neurosci Res*, 44(2):121--131, 2002.
- [231] Connor M and Christie MD. Opioid receptor signalling mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26(7):493--9, 1999.
- [232] Williams JT, Christie MJ, and Manzoni O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev*, 81:299–343, 2001.
- [233] Borgland SL. Acute opioid receptor desensitization and tolerance: is there a link? *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 28(3):147--54, 2001.
- [234] Koch T, Schulz S, Schröder H, Wolf R, Raulf E, and Höllt V. Carboxyl-terminal splicing of the rat mu opioid receptor modulates agonist-mediated

- internalization and receptor resensitization. *J Biol Chem*, 273(22):13652--7, 1998.
- [235] Koch T, Schulz S, Pfeiffer M, Klutzny M, Schröder H, Kahl E, and Höllt V. C-terminal splice variants of the mouse mu-opioid receptor differ in morphine-induced internalization and receptor resensitization. *J Biol Chem*, 276(33):31408--14, 2001.
- [236] Wolf R, Koch T, Schulz S, Klutzny M, Schröder H, Raulf E, Bühling F, and Höllt V. Replacement of threonine 394 by alanine facilitates internalization and resensitization of the rat mu opioid receptor. *Mol Pharmacol*, 55(2):263--8, 1999.
- [237] Cadet P, Mantione KJ, and Stefano GB. Molecular identification and functional expression of μ_3 , a novel alternatively spliced variant of the human μ opiate receptor gene. *J Immunol*, 170 (10):5118--23, 2003.
- [238] Jiang Q, Takemori AE, Sultana M, Portoghese PS, Bowen WD, Mosberg HI, and Porreca F. Differential antagonism of opioid delta antinociception by [D-Ala²,Leu⁵,Cys⁶]enkephalin and naltrindole 5'-isothiocyanate: evidence for delta receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, 257(3):1069--75, 1991.
- [239] Portoghese PS, Sultana M, Nagase H, and Takemori AE. A highly selective delta 1-opioid receptor antagonist: 7-benzylidenenaltrexone. *Eur J Pharmacol*, 218(1):195--6, 1992.
- [240] Vanderah T, Takemori AE, Sultana M, Portoghese PS, Mosberg HI, Hruby VJ, Haaseth RC, Matsunaga TO, and Porreca F. Interaction of [D-Pen²,D-

-
- Pen5]enkephalin and [D-Ala2,Glu4]deltorphin with delta-opioid receptor subtypes in vivo. *Eur J Pharmacol*, 252(2):133--7, 1994.
- [241] Chavkin C, James IF, and Goldstein A. Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. *Science*, 215(4531):413--5, 1982.
- [242] Akil H and Watson SJ. Cloning of kappa opioid receptors: functional significance and future directions. *Prog Brain Res*, 100:81--6, 1994.
- [243] Kieffer BL and Gavériaux-Ruff C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol*, 66(5):285--306, 2002.
- [244] Eisinger DA and Schulz R. Mechanism and consequences of delta-opioid receptor internalization. *Crit Rev Neurobiol*, 17(1):1--26, 2005.
- [245] Hanlon KE, Herman DS, Agnes RS, and et al. Novel peptide ligands with dual acting pharmacophores designed for the pathophysiology of neuropathic pain. *Brain Res*, 1395:1--11, 2011.
- [246] Rostami F, Oryan S, Ahmadiani A, and Dargahi L. Morphine preconditioning pro-TECTS agonist LPS-induced neuroinflammation and memory deficit. *J Mol Neurosci*, 48:22--34, 2012.
- [247] Di Feliceantonio AG and Berridge KC. Which cue to 'want'? Opioid stimulation of central amygdala makes goal trackers show stronger goal-tracking, just as sign-trackers show stronger sign-tracking. *Behav Brain Res*, 230:399--408, 2012.
- [248] C. Duraffourd, F. De Vadder, D. Goncalves, F. Delaere, A. Penhoat, B. Brusset, F. Rajas, D. Chassard, A. Duchampt, A. Stefanutti, A. Gautier-Stein, and G. Mithieux. Mu-opioid receptors and dietary protein stimulate a

gut-brain neural circuitry limiting food intake. *Cell*, 150(2):377--388, 2012.

cited By (since 1996)14.

[249] A.D. Lawrence. Affective neuroscience: Food 'wanting' hotspot in dorsal striatum. *Current Biology*, 22(20):R878--R880, 2012. cited By (since 1996)1.

[250] H. Kemppainen, N. Raivio, V. Suo-Yrjo, and K. Kiianmaa. Opioidergic modulation of ethanol self-administration in the ventral pallidum. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 36(2):286--293, 2012. cited By (since 1996)8.

[251] Kaminski BJ, Duke AN, and Weerts EM. Effects of naltrexone on alcohol drinking patterns and extinction of alcohol seeking in baboons. *Psychopharmacology*, 223(1):55--66, 2012.

[252] Teodorov E, Ferrari MFR, Fior-Chadi DR, Camarini R, and Felício LF. Behavioral meaningful opioidergic stimulation activates kappa receptor gene expression. *Braz J Med Biol Res*, 45(10):982--987, 2012.

[253] Christensen A and Micevych P. CAV1 siRNA Reduces Membrane Estrogen Receptor- α Levels and Attenuates Sexual Receptivity. *Endocrinology*, 153(8):3872--7, 2012.

[254] Roa J and Herbison AE. Direct Regulation of GnRH Neuron Excitability by Arcuate Nucleus POMC and NPY Neuron Neuropeptides in Female Mice. *Endocrinology*, 153(11):5587--99, 2012.

[255] Scarr E, Money TT, Pavey G, Neo J, and Dean B. Mu opioid receptor

-
- availability in people with psychiatric disorders who died by suicide: a case control study. *BMC Psychiatry*, 12:126, 2012.
- [256] Stefano GB, Králíčková M, Ptacek R, Kuzelova H, Esch T, and Kream RM. Low dose morphine adjuvant therapy for enhanced efficacy of antipsychotic drug action: Potential involvement of endogenous morphine in the pathophysiology of schizophrenia. *Med Sci Monit*, 18(7):23--26, 2012.
- [257] Marti M, Rodi D, Li Q, Guerrini R, Fasano S, Morella I, Tozzi A, Brambilla R, Calabresi P, Simonato M, Bezard E, and Morari M. Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Agonists Attenuate l-DOPA-Induced Dyskinesias. *J Neurosci*, 32:16106--19, 2012.
- [258] Pinsky C, Bose R, and Frederickson RC. Mu- and delta-opioid modulation of electrically induced epileptic seizures in mice. *NIDA Res Monogr*, 75:543--6, 1986.
- [259] Tortella FC, Robles L, and Holaday JW. The anticonvulsant effects of DADLE are primarily mediated by activation of delta opioid receptors: interactions between delta and mu receptor antagonists. *Life Sci*, 37(6):497--503, 1985.
- [260] Tortella FC, Echevarria E, Robles L, Mosberg HI, and Holaday JW. Anticonvulsant effects of mu (DAGO) and delta (DPDPE) enkephalins in rats. *Peptides*, 9(5):1177--81, 1988.
- [261] Tortella FC and Long JB. Endogenous anticonvulsant substance in rat

-
- cerebrospinal fluid after a generalized seizure. *Science*, 228(4703):1106–8, 1985.
- [262] Grecksch G, Becker A, Schroeder H, and Höllt V. Involvement of delta-opioid receptors in pentylenetetrazol kindling development and kindling-related processes in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 360(2):151–6, 1999.
- [263] Yajima Y, Narita M, Takahashi-Nakano Y, and et al. Effects of differential modulation of mu-, delta- and kappa-opioid systems on bicuculline-induced convulsions in the mouse. *Brain Res*, 862(1–2):120–6, 2000.
- [264] Bregola G, Zucchini S, Frigati L, and et al. Involvement of the neuropeptide orphanin FQ/nociceptin in kainate and kindling seizures and epileptogenesis. *Epilepsia*, 43(Suppl 5):18–9, 2002.
- [265] Feng Y, Chao DM, Li WM, Cao YX, Wang YQ, and Wu GC. Inhibition of nociceptin/orphanin FQ on penicillin-induced seizures in rats. *Brain Res*, 1020(1–2):214–9, 2004.
- [266] Bausch B, Garland JP, and Yamada J. The delta opioid receptor agonist, SNC80, has complex, dose-dependent effects on pilocarpine-induced seizures in Sprague-Dawley rats. *Brain Res*, 1045(1–2):38–44, 2005.
- [267] Danielsson I, Gasior M, Stevenson GW, Folk JE, Rice KC, and Negus SS. Electroencephalographic and convulsant effects of the delta opioid agonist SNC80 in rhesus monkeys. *Pharmacol Biochem Behav*, 85(2):428–34, 2006.

-
- [268] Solbrig MV, Adrian R, Baratta J, Lauterborn JC, and Koob GF. Kappa opioid control of seizures produced by a virus in an animal model. *Brain*, 129(pt3):642–54, 2006.
- [269] Saboory E, Derchansky M, Ismaili M, and et al. Mechanisms of morphine enhancement of spontaneous seizure activity. *Anest Analg*, 105(6):1729–35, 2007.
- [270] Zhang HN and Ko MC. Seizure activity involved in the up-regulation of BDNF mRNA expression by activation of central mu opioid receptors. *Neuroscience*, 161(1):301–10, 2009.
- [271] Sheng WS, Hu S, Gekker G, Zhu S, Peterson PK, and Chao CC. Immunomodulatory role of opioids in the central nervous system. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 45(5–6):359–66, 1997.
- [272] Welters ID. Is immunomodulation by opioid drugs of clinical relevance? *Curr Opin Anaesthesiol.*, 16(5):509–13, 2003.
- [273] Čeřido MA and Idova GV. Role of serotonin receptors in the delta-opioid immunosuppression. *RossFiziol Zh Im I M Sechenova*, 96(12):1234–40, 2010.
- [274] Bai HB, Du JZ, and Zheng XX. Beta-endorphin involved in the regulation of humoral immune function of rats during acute hypoxia. *Acta Physiol Sinica*, 51(3):258–62, 1999.
- [275] Menzebach A, Hirsch J, Nost R, Mogk M, Hempelmann G, and Welters ID. Morphine inhibits complement receptor expression, phagocytosis

-
- and oxidative burst by a nitric oxide dependent mechanism. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 39(4):204–11, 2004.
- [276] Eisenstein TK, Rahim RT, Feng P, Thingalaya N, and Meissler JJ. Effects of opioid tolerance and withdrawal on the immune system. *J Neuroimmune Pharmacol*, 1(3):237–49, 2006.
- [277] Zou W, Guo Q, Wang E, Cai J, and Cheng Z. Intrathecal morphine suppresses immune function in rats with inflammatory-induced pain. *J Int Med Res*, 35(5):626–36, 2007.
- [278] Jamali A, Bamdad T, Soleimanjahi H, Pakdel FG, and Arefian E. Acute morphine administration reduces white blood cells' capability to induce innate resistance against HSV-1 infection in BALB/c mice. *Neuroimmunomodulation*, 14(1):16–23, 2007.
- [279] Welters ID, Menzebach A, Goumon Y, and et al. Morphine suppresses complement receptor expression, phagocytosis, and respiratory burst in neutrophils by a nitric oxide and mu(3) opiate receptor-dependent mechanism. *J Neuroimmunol*, 111(1–2):139–45, 2000.
- [280] Carr D, Gebhart B, and Paul D. Alpha adrenergic and mu-2 opioid receptors are involved in morphine-induced suppression of splenocyte natural killer activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 264(3):1179–86, 1993.
- [281] Grimm MC, Ben-Baruch A, Taub DD, and et al. Opiates transdeactivate chemokine receptors: delta and mu opiate-receptor mediated heterologous desensitization. *J Exp Med*, 188(2):317–25, 1998.

-
- [282] Roy S, Cain KJ, Chapin RB, Charboneau RG, and Barke RA. Morphine modulates NF kappa B activation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 245(2):392–6, 1998.
- [283] Greeneltch KM, Haudenschild CC, Keegan AD, and Shi Y. The opioid antagonist naltrexone blocks acute endotoxic shock by inhibiting tumor necrosis factor-alpha production. *Brain Behav Immun*, 18(5):476–84, 2004.
- [284] Mutolo D, Bongianini F, Einum J, Dubuc R, and Pantaleo T. Opioid-induced depression in the lamprey respiratory network. *Neuroscience*, 150(3):720–9, 2007.
- [285] Haji A, Takeda R, and Okazaki M. Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacol Ther*, 86(3):277–304, 2000.
- [286] Forman LJ, Estilow S, and Hock CE. Localization of beta-endorphin in the rat heart and modulation by testosterone. *Proc Soc Exp Biol Med*, 190(3):240–5, 1989.
- [287] Lang RE, Hermann K, Dietz R, and et al. Evidence for the presence of enkephalins in the heart. *Life Sci*, 32(4):399–406, 1983.
- [288] Weihe E, McKnight AT, Corbett AD, Hartschuh W, Reinecke M, and Kosterlitz HW. Characterization of opioid peptides in guinea-pig heart and skin. *Life Sci*, 33, 1983.
- [289] Weihe E, McKnight AT, Corbett AD, and Kosterlitz HW. Proenkephalin- and prodynorphin- derived opioid peptides in guinea-pig heart. *Neuropeptides*, 5(4–6):453–6, 1985.

-
- [290] Barron BA, Gu H, Gaugl JF, and Caffrey JL. Screening for opioids in dog heart. *J Mol Cell Cardiol*, 24(1):67–77, 1992.
- [291] Barron BA, Jones CE, and Caffrey JL. Pericardial repair depresses canine cardiac catecholamines and met-enkephalin. *Regul Pept*, 59(3):313–20, 1995.
- [292] Eliasson T, Mannheimer C, Waagstein F, and et al. Myocardial turnover of endogenous opioid and calcitonin-gene-related peptide in the human heart and the effects of spinal cord stimulation on pacing-induced angina pectoris. *Cardiology*, 89(3):170–7, 1998.
- [293] Peart JN, Gross ER, and Gross GJ. Opioid-induced preconditioning: recent advances and future perspectives. *Vascul Pharmacol*, 42(5–6):211–8, 2005.
- [294] Steele PA, Aromataris EC, and Riederer BM. Endogenous opioid peptides in parasympathetic, sympathetic and sensory nerves in the guinea-pig heart. *Cell Tissue Res*, 284(2):331–9, 1996.
- [295] Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Jabehdar-Maralani P, and et al. Cholestatic liver disease modulates susceptibility to ischemia/reperfusion -induced arrhythmia, but not necrosis and hemodynamic instability: the role of endogenous opioid peptides. *J Hepatol*, 43(3):491–8, 2005.
- [296] Schultz JJ, Hsu AK, and Gross GJ. Ischaemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (δ)-opioid receptor in the intact rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 29(8):2187–95, 1997.
- [297] Wu S, Li HY, and Wong TM. Cardioprotection of Preconditioning by

- metabolic inhibition in the rat ventricular myocyte. Involvement of kappa-opioid receptor. *Circ Res*, 84(12):1388–95, 1999.
- [298] Faden AI and Holaday JW. Opiate antagonists: a role in the treatment of hypovolemic shock. *Science*, 205(4403):317–8, 1979.
- [299] Holaday JW. Opiate antagonists in shock and trauma. *Am J Emerg Med*, 2(1):8–12, 1984.
- [300] Cavun S, Resch GE, Evec AD, Rapacon-Baker MM, and Millington WR. Blockade of delta opioid receptors in the ventrolateral periaqueductal gray region inhibits the fall in arterial pressure evoked by hemorrhage. *J Pharmacol Exp Ther*, 297(2):612–9, 2001.
- [301] Gutkowska J, Jankowski M, Pawlak D, Mukaddam-Daher S, and Izdebski J. The cardiovascular and renal effects of a highly potent mu-opioid receptor agonist, cyclo [Ne,Nb-carbonyl-D-Lys2,Dap5] enkephalinamide. *Eur J Pharmacol*, 496(1–3):167–74, 2004.
- [302] H.J. Breslin, C.J. Diamond, R.W. Kavash, C. Cai, A.B. Dyatkin, T.A. Miskowski, S.-P. Zhang, P.R. Wade, P.J. Hornby, and W. He. Identification of a dual δ or antagonist/ μ or agonist as a potential therapeutic for diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (ibs-d). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22(14):4869--4872, 2012. cited By (since 1996)5.
- [303] Donskow Łysoniewska K, Majewski P, Brodaczewska K, Jozwicka K, and Doligalska M. Heligmosmoides polygyrus fourth stages induce protection against DSS-induced colitis and change opioid expression in the intestine. *Parasite Immunology*, 34(11):536--546, 2012.

-
- [304] De Luca A and Coupar IM. Insights into opioid action in the intestinal tract. *Pharmacol Ther*, 69:103–15, 1996.
- [305] Thornton JR. Losowsky MS. Opioid peptides and primary biliary cirrhosis. *BMJ*, 297:1501–4, 1988.
- [306] Gaskari SA, Mani AR, Ejtemaei-Mehr S, and et al. Do endogenous opioids contribute to the bradycardia of rats with obstructive cholestasis? *Fundam Clin Pharmacol*, 16:273–9, 2002.
- [307] Kiani S, Ebrahimkhani MR, Sharifabrizi A, Doratotaj B, Payabvash S, Riazi K, Dehghani M, Honar H, Karoon A, Amanlou M, Tavangar SM, and Dehpour AR. Opioid system blockade decreases collagenase activity and improves liver injury in a rat model of cholestasis. *J Gastroenterol Hepatol*, 22(3):406--13, 2007.
- [308] Seyedmehdi Payabvash, Saman Kiumehr, Behtash Ghazi Nezami, Ali Zandieh, Pasha Anvari, Seyed Mohammad Tavangar, and Ahmad Reza Dehpour. Endogenous opioids modulate hepatocyte apoptosis in a rat model of chronic cholestasis: the role of oxidative stress. *Liver International*, 27(4):538--547, 2007.
- [309] Roberts SM, Skoulis NP, and James RC. A centrally-mediated effect of morphine to diminish hepatocellular glutathione. *Biochem Pharmacol*, 36:3001–5, 1987.
- [310] Zhang YT, Zheng QS, Pan J, and et al. Oxidative damage of biomolecules in mouse liver induced by morphine and protected by antioxidants. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 95:53–8, 2004.

-
- [311] De Minicis S, Candelaresi C, Marzioni M, Saccomano S, Roskams T, Casini A, Risaliti A, Salzano R, Cautero N, di Francesco F, Benedetti A, and Svegliati-Baroni G. Role of endogenous opioids in modulating HSC activity in vitro and liver fibrosis in vivo. *Gut*, 57(3):352--64, 2008.
- [312] Lawrence DK and Gill EW. The effects of Δ 1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids on spin-labeled liposomes and their relationship to mechanisms of general anesthesia. *Mol Pharmacol*, 11:595–602, 1975.
- [313] Gaoni Y and Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc*, 86:1646–1647, 1964.
- [314] Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young CA, and Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature (Lond)*, 346:561–564, 1990.
- [315] Munro S, Thomas KL, and Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365:61–65, 1993.
- [316] Devane WA and et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258:1946–1949, 1992.
- [317] Begg M, Pacher P, Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Offertáler L, Mo F-M, Liu J, and Kunos G. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther*, 106:133–145, 2005.
- [318] Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, and Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372:686--691, 1994.

-
- [319] Di Marzo V, De Petrocellis L, Sugiura T, and Waku K. Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 227:281–8, 1996.
- [320] Bisogno T, Sepe N, Melck D, Maurelli S, De Petrocellis L, and Di Marzo V. Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochem J*, 322:671–7, 1997.
- [321] Stella N, Schweitzer P, and Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388:773–8, 1997.
- [322] Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, and et al. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103:13345–13350, 2006.
- [323] Simon GM and Cravatt BF. Anandamide Biosynthesis Catalyzed by the Phosphodiesterase GDE1 and Detection of Glycerophospho-N-acyl Ethanolamine Precursors in Mouse Brain. *J Biol Chem*, 283:9341–9349, 2008.
- [324] Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, and Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384:83–7, 1996.
- [325] Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, Tornqvist H, and Holm C. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases,

-
- lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem*, 272:27218–23, 1997.
- [326] Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, and et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:10819–24, 2002.
- [327] Martin BR, Mechoulam R, and Razdan RK. Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. *Life Sciences*, 65(6–7):573, 1999.
- [328] Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, and et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50:83–90, 1995.
- [329] Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, and et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 215:89–97, 1995.
- [330] Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, and et al. 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:3662–5, 2001.
- [331] Bisogno T, Melck D, Bobrov MYu, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L, and et al. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J*, 351:817–24, 2000.

-
- [332] Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, and et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:8400–5, 2002.
- [333] Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, and et al. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 301:1020–4, 2002.
- [334] Shoemaker JL, Joseph BK, Ruckle MB, Mayeux PR, and Prather PL. The endocannabinoid noladin ether acts as a full agonist at human CB2 cannabinoid receptors. *J. Pharmacol Exp Ther*, 314(2):868–75, 2005.
- [335] Duncan M, Millns P, Smart D, Wright JE, Kendall DA, and Ralevic V. Noladin ether, a putative endocannabinoid, attenuates sensory neurotransmission in the rat isolated mesenteric arterial bed via a non-CB1/CB2 Gi/o linked receptor. *Br J Pharmacol*, 142(3):509–18, 2005.
- [336] Lutz B. Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids*, 66:123–142, 2002.
- [337] Reggio PH. Pharmacophores for ligand recognition and activation/inactivation of the cannabinoid receptors. *Curr Pharm Des*, 9:1607–1633, 2003.
- [338] Breivogel CS, Sim LJ, and Childers SR. Regional differences in cannabinoid receptor/G-protein coupling in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 282:1632–1642, 1997.

-
- [339] Jamshidi N and Taylor DA. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol*, 134:1151–1154, 2001.
- [340] Rademacher DJ, Patel S, Hopp FA, Dean C, Hillard CJ, and Seagard JL. Microinjection of a cannabinoid receptor antagonist into the NTS increases baroreflex duration in dogs. *Am J Physiol*, 284:1570–1576, 2003.
- [341] Rhee MH, Beywitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, and Vogel Z. Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem*, 71:1525–1534, 1998.
- [342] Glass M and Felder CC. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci*, 17:5327–5333, 1997.
- [343] Kearns CS, Blake-Palmer K, Daniel E, Mackie K, and Glass M. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol*, 67:1697–1704, 2005.
- [344] Lauckner JE, Hille B, and Mackie K. The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:19144–19149, 2005.
- [345] Hille B Mackie K. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:3825–3829, 1992.

-
- [346] Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, and Harder DR. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol*, 266:2085–2093, 1999.
- [347] Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, and Mitchell R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci*, 15:6552–6561, 1995.
- [348] Wartmann M, Campbell D, Subramanian A, Burstein SH, and Davis RJ. The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett*, 359:133–136, 1995.
- [349] Davis MI, Ronesi J, and Lovinger DM. A predominant role for inhibition of the adenylyl cyclase/protein kinase A pathway in ERK activation by cannabinoid receptor 1 in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 278:48973–48980, 2003.
- [350] Derkinderen P, Ledent C, Parmentier M, and Girault JA. Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB1 receptors in hippocampus. *J Neurochem*, 77:957–960, 2001.
- [351] Liu J, Gao B, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makriyannis A, and Kunos G. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J*, 346:835–840, 2000.
- [352] Rueda D, Galve-Roperh I, Haro A, and Guzman M. The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Pharmacol*, 58:814–820, 2000.

-
- [353] Gómez Del Pulgar T, De Ceballos ML, Guzman M, and Velasco G. Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem*, 277:36527–36533, 2002a.
- [354] Pacher P, Batkai S, and Kunos G. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*, 58(3):389--462, 2006.
- [355] Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, and Piomelli D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci*, 2:358--363, 1999.
- [356] Puente N, Cui Y, Lassalle O, Lafourcade M, Georges F, Venance L, Grandes P, and Manzoni OJ. Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala. *Nat Neurosci*, 14:1542--1549, 2011.
- [357] Bortolato M, Mangieri RA, Fu J, Kim JH, Arguello O, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, and Piomelli D. Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. *Biol Psychiatry*, 62:1103--1110, 2007.
- [358] Dlugos A, Childs E, Stuhr KL, Hillard CJ, and de Wit H. Acute stress increases circulating anandamide and other N-acyl ethanolamines in healthy humans. *Neuropsychopharmacology*, 37:2416--2427, 2012.
- [359] Gobbi G, Bambico FR, Mangieri R, Bortolato M, Campolongo P, Solinas M, Cassano T, Morgese MG, Debonnel G, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Mor M, Trezza V, Goldberg SR, Cuomo V, and Piomelli D. Antidepressant-like

- activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 102:18620--18625, 2005.
- [360] Gunduz-Cinar O, MacPherson KP, Cinar R, Gamble-George J, Sugden K, Williams B, Godlewski G, Ramikie TS, Gorka AX, Alapaguja SO, Nikas SP, Makriyannis A, Poulton R, Patel S, Hariri AR, Caspi A, Moffit TE, Kunos G, and Holmes A. Convergent translational evidence of a role for anandamide in amygdala-mediated fear extinction, threat processing and stress-reactivity. *Mol Psych*, 18(7):813--23, 2013.
- [361] Hill MN, McLaughlin RJ, Bingham B, Shrestha L, Lee TTY, Gray JM, Hillard CJ, Gorzalka BB, and Viau V. Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaption. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 107:9406--9411, 2010.
- [362] Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valiño F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, and Piomelli D. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med*, 9:76--81, 2003.
- [363] Bojanowska E and Radziszewska E. Combined stimulation of glucagon-like peptide-1 receptor and inhibition of cannabinoid CB1 receptor act synergistically to reduce food intake and body weight in the rat. *J Physiol Pharmacol*, 62:395, 2011.
- [364] Gatta-Cherifi B, Matias I, Vallée M, Tabarin A, Marsicano G, Piazza PV, and Cota D. Simultaneous postprandial deregulation of the orexigenic

-
- endocannabinoid anandamide and the anorexigenic peptide YY in obesity. *Int J Obes (Lond)*, 36:880, 2012.
- [365] Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, Krey JF, Walker JM, Holmes PV, Crystal JD, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, and Piomelli D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature*, 435:1108--1112, 2005.
- [366] Clapper JR, Moreno-Sanz G, Russo R, Guijarro A, Vacondio F, Duranti A, Tontini A, Sanchini S, Sciolino NR, Spradley JM, Hohmann AG, Calignano A, Mor M, Tarzia G, and Piomelli D. Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nat Neurosci*, 13:1265-1270, 2010.
- [367] Viveros MP, Llorente R, Moreno E, and Marco EM. Behavioural and neuroendocrine effects of cannabinoids in critical developmental periods. *Behav Pharmacol*, 16(5-6):353--62, 2005.
- [368] Moreira FA and Lutz B. The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol*, 13(2):196--212, 2008.
- [369] Ibrahim MM, Deng H, Zvonok A, Cockayne DA, Kwan J, Mata HP, Vanderah TW, Lai J, Porreca F, Makriyannis A, and Malan TP Jr. Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 100:10529--10533, 2003.
- [370] Ashton JC and Glass M. The cannabinoid CB2 receptor as a target for

-
- inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol*, 5:73–80, 2007.
- [371] Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, and et al. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, 310:329–32, 2005.
- [372] Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Meozzi PA, Myers L, and et al. Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects. *PLoS ONE*, 3:1640, 2008.
- [373] Marco EM, García-Gutiérrez MS, Bermúdez-Silva FJ, Moreira FA, Guimarães F, Manzanares J, and Viveros MP. Endocannabinoid System and Psychiatry: In Search of a Neurobiological Basis for Detrimental and Potential Therapeutic Effects. *Front Behav Neurosci*, 5(5):63, 2011.
- [374] Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, and et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fattyacid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest*, 115:1298–305, 2005.
- [375] Mathison R, Ho W, Pittman Q, Davison J, and Sharkey K. Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. *Br J Pharmacol*, 142(8):1247–1254, 2004.
- [376] Varga K, Lake K, Martin BR, and Kunos G. Novel antagonist implicates the CB1 cannabinoid receptor in the hypotensive action of anandamide. *Eur J Pharmacol*, 278:279–283, 1995.

-
- [377] Varga K, Lake KD, Huangfu D, Guyenet PG, and Kunos G. Mechanism of the hypotensive action of anandamide in anesthetized rats. *Hypertension*, 28:682–686, 1996.
- [378] Wagner JA, Jarai Z, Batkai S, and Kunos G. Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilation mediated by cannabinoid CB(1) receptors. *Eur J Pharmacol*, 423:203–210, 2001.
- [379] Wagner JA, Abesser M, Karcher J, Laser M, and Kunos G. Coronary vasodilator effects of endogenous cannabinoids in vasopressin-precontracted unpaced rat isolated hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*, 46:348–355, 2005.
- [380] Bonz A, Laser M, Kullmer S, Kniesch S, Babin-Ebell J, Popp V, and Wagner JA Ertl G. Cannabinoids acting on CB1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*, 41:657–664, 2003.
- [381] Maslov LN, Lasukova OV, Krylatov AV, Uzhachenko RV, and Pertwee R. Selective cannabinoid receptor agonist HU-210 decreases pump function of isolated perfused heart: role of cAMP and cGMP. *Bull Exp Biol Med*, 138:550–553, 2004.
- [382] Sterin-Borda L, Del Zar CF, and Borda E. Differential CB1 and CB2 cannabinoid receptor-inotropic response of rat isolated atria: endogenous signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol*, 69:1705–1713, 2005.
- [383] Niederhoffer N and Szabo B. Cannabinoids cause central

-
- sympathoexcitation and bradycardia in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther*, 294:707–713, 2000.
- [384] Pfitzer T, Niederhoffer N, and Szabo B. Central effects of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on respiratory and cardiovascular regulation in anaesthetised rats. *Br J Pharmacol*, 142:943–95, 2004.
- [385] Niederhoffer N, Schmid K, and Szabo B. The peripheral sympathetic nervous system is the major target cannabinoids in eliciting cardiovascular depression. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 367:434–443, 2003.
- [386] Malinowska B, Godlewski G, Boucher B, and Schlicker E. Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of the neurogenic vasopressor response in the pithed rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 356:197–202, 1997.
- [387] Szabo B, Nordheim U, and Niederhoffer N. Effects of cannabinoids on sympathetic and parasympathetic neuroeffector transmission in the rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther*, 297:819–82, 2001.
- [388] Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, and Kunos G. Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol*, 118:2023–2028, 1996.
- [389] Pacher P, Bátkai S, and Kunos G. Haemodynamic profile and responsiveness to anandamide of TRPV1 receptor knock-out mice. *J Physiol (Lond)*, 558:647–657, 2004.

-
- [390] Lagneux C and Lamontagne D. Involvement of cannabinoids in the cardioprotection induced by lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol*, 132:793–796, 2001.
- [391] Joyeux M, Arnaud C, Godin-Ribuot D, Demenge P, Lamontagne D, and Ribuo C. Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res*, 55:619–625, 2002.
- [392] Roth MD. Pharmacology: marijuana and your heart. *Nature (Lond)*, 434:708–709, 2005.
- [393] Steffens S, Veillard NR, Arnaud C, Pelli G, Burger F, Staub C, Karsak M, Zimmer A, Frossard JL, and Mach F. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature (Lond)*, 434:782–786, 2005.
- [394] Klein TW. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol*, 5:400–411, 2005.
- [395] Carrier EJ, Auchampach JA, and Hillard CJ. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:7895–7900, 2006.
- [396] Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, and Friedman H. The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol*, 74:486–496, 2003.
- [397] Walter L and Stella N. Cannabinoids and neuroinflammation. *Br J Pharmacol*, 141:775–785, 2004.

-
- [398] DeMorrow S, Francis H, Gaudio E, Ueno Y, Venter J, Onori P, Franchitto A, and et al. Anandamide inhibits cholangiocyte hyperplastic proliferation via activation of thioredoxin 1/redox factor 1 and AP-1 activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294:506–519, 2008.
- [399] Jourdan T, Djaouti L, Demizieux L, Gresti J, Verges B, and Degrace P. CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes*, 59:926–934, 2010.
- [400] Jeong WI, Osei-Hyiaman D, Park O, Liu J, Batkai S, Mukhopadhyay P, Horiguchi N, and et al. Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver. *Cell Metab*, 7:227–235, 2008.
- [401] Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, Godlewski G, Harvey-White J, Jeong WI, Batkai S, and et al. Hepatic CB(1) receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest*, 118:3160–3169, 2008.
- [402] Mukhopadhyay B, Liu J, Osei-Hyiaman D, Godlewski G, Mukhopadhyay P, Wang L, Jeong WI, and et al. Transcriptional regulation of cannabinoid receptor-1 expression in the liver by retinoic acid acting via retinoic acid receptor-gamma. *J Biol Chem*, 285:19002–19011, 2010.
- [403] Batkai S, Jarai Z, Wagner JA, Goparaju SK, Varga K, Liu J, Wang L, and et al. Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med*, 7:827–832, 2001.

-
- [404] Biecker E, Sagesser H, and Reichen J. Vasodilator mRNA levels are increased in the livers of portal hypertensive NO-synthase 3-deficient mice. *Eur J Clin Invest*, 34:283–289, 2004.
- [405] Domenicali M, Ros J, Fernandez-Varo G, Cejudo-Martin P, Crespo M, Morales-Ruiz M, Briones AM, and et al. Increased anandamide induced relaxation in mesenteric arteries of cirrhotic rats: role of cannabinoid and vanilloid receptors. *Gut*, 54:522–527, 2005.
- [406] Moezi L, Gaskari SA, Liu H, Baik SK, Dehpour AR, and Lee SS. Anandamide mediates hyperdynamic circulation in cirrhotic rats via CB(1) and VR(1) receptors. *Br J Pharmacol*, 149:898–908, 2006.
- [407] Siegmund SV, Qian T, de Minicis S, Harvey-White J, Kunos G, Vinod KY, Hungund B, and et al. The endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol induces death of hepatic stellate cells via mitochondrial reactive oxygen species. *Faseb J*, 21:2798–2806, 2007.
- [408] Xu X, Liu Y, Huang S, Liu G, Xie C, Zhou J, Fan W, and et al. Overexpression of cannabinoid receptors CB1 and CB2 correlates with improved prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 171:31–38, 2006.
- [409] Floreani A, Lazzari R, Macchi V, Porzionato A, Variola A, Colavito D, Leon A, and et al. Hepatic expression of endocannabinoid receptors and their novel polymorphisms in primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol*, 45(1):68--76, 2010.
- [410] Mendez-Sanchez N, Zamora-Valdes D, Pichardo-Bahena R, Barredo-Prieto

-
- B, Ponciano-Rodriguez G, Bermejo-Martinez L, Chavez-Tapia NC, and et al. Endocannabinoid receptor CB2 in nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int*, 27:215–219, 2007.
- [411] Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, Van Nhieu JT, Li L, Karsak M, Zimmer A, and et al. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology*, 128:742–755, 2005.
- [412] Teixeira-Clerc F, Belot MP, Manin S, Deveaux V, Cadoudal T, Chobert MN, Louvet A, and et al. Beneficial paracrine effects of cannabinoid receptor 2 on liver injury and regeneration. *Hepatology*, 52(3):1046--59, 2010.
- [413] Caraceni P, Viola A, Piscitelli F, Giannone F, Berzigotti A, Cescon M, Domenicali M, and et al. Circulating and hepatic endocannabinoids and endocannabinoid-related molecules in patients with cirrhosis. *Liver Int*, 30:816–825, 2010.
- [414] Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, and Kunos G. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *Faseb J*, 12:1035–1044, 1998.
- [415] Liu J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Wagner JA, Cravatt BF, Gao B, and et al. Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor. . *J Biol Chem*, 278:45034–45039, 2003.
- [416] Lotersztajn S, Teixeira-Clerc F, Julien B, Deveaux V, Ichigotani Y, Manin

-
- S, Tran-Van-Nhieu J, and et al. CB2 receptors as new therapeutic targets for liver diseases. *Br J Pharmacol*, 153:286–289, 2008.
- [417] Munoz-Luque J, Ros J, Fernandez-Varo G, Tugues S, Morales-Ruiz M, Alvarez CE, Friedman SL, and et al. Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 324:475–483, 2008.
- [418] Hezode C, Roudot-Thoraval F, Nguyen S, Grenard P, Julien B, Zafrani ES, Pawlotsky JM, and et al. Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 42:63–71, 2005.
- [419] Batkai S, Mukhopadhyay P, Harvey-White J, Kechrid R, Pacher P, and Kunos G. Endocannabinoids acting at CB1 receptors mediate the cardiac contractile dysfunction in vivo in cirrhotic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293:1689–1695, 2007.
- [420] Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M, Yano M, Arakawa Y, Yokosuka O, Kuroki T, Nishiguchi S, Sata M, Yamada G, Fujiyama S, Yoshida H, and Omata M. Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Intern Med*, 132(7):517--524, 2000.
- [421] Takase S, Takada A, Yasuhara M, Sato H, and Matsuda Y. Effects of malotilate treatment on the serum markers of hepatic fibrogenesis in liver cirrhosis. *Gastroenterol Jpn.*, 23(6):639–645, 1988.
- [422] Brenner DA and Alcorn JM. Therapy for hepatic fibrosis. *Semin Liver Dis.*, 10(1):75–83, 1990.

-
- [423] George J, Suguna L, Jayalakshmi R, and Chandrakasan G. Efficacy of Silymarin and Curcumin on dimethyl nitrosamine induced liver fibrosis in rats. *Biomedicine.*, 26(3–4):18–26, 2006.
- [424] Cheng K, Yang N, and Mahato RI. TGF-beta1 gene silencing for treating liver fibrosis. *Mol Pharm. Mol Pharm.*, 6(3):772–779, 2009.
- [425] Guo CJ, Pan Q, Cheng T, Jiang B, Chen GY, and Li DG. Changes in microRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways. *FEBS J.*, 276(18):5163–5176, 2009.
- [426] Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, Tacke F, Trautwein C, and Luedde T. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology*, 53(1):209–218, 2011.
- [427] Kwiecinski M, Elfimova N, Noetel A, Töx U, Steffen HM, Hacker U, Nischt R, Dienes HP, and Odenthal M. Expression of platelet-derived growth factor-C and insulin-like growth factor I in hepatic stellate cells is inhibited by miR-29. *Lab Invest.*, 92(7):978--87, 2012.
- [428] Rik Derynck and Rosemary J. Akhurst. Differentiation plasticity regulated by TGF- β family proteins in development and disease. *Nature Cell Biology*, 9:1000 -- 1004, 2007.
- [429] Massagué J. TGFbeta in Cancer. *Cell*, 134(2):215--30, 2008.
- [430] Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *J Biol Chem*, 280(9):7409–12, 2005.

-
- [431] Saharinen J., Hyytiäinen M., Taipale J., and Keski-Oja J. Latent transforming growth factor-beta binding proteins (LTBPs) structural extracellular matrix proteins for targeting TGF-beta action. *Cytokine Growth Factor Review*, 10:99–117, 1999.
- [432] Sterner-Kock A, Thorey IS, Koli K, Wempe F, Otte J, Bangsow T, Kuhlmeier K, Kirchner T, Jin S, and Keski-Oja J et al. Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor-beta binding protein 4 (LTBP-4) causes abnormal lung development, cardiomyopathy, and colorectal cancer. . *Genes Dev*, 16:2264--2273, 2002.
- [433] Lyons RM, Keski-Oja J, and Moses HL. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J. Cell Biol.*, 106:1659--1665, 1988.
- [434] Barcellos-Hoff MH and Dix TA. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol. Endocrinol.*, 10:1077--1083, 1996.
- [435] Schultz-Cherry S and Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor- beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J. Cell Biol.*, 122:923--932, 1993.
- [436] Yu Q and Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*, 14:163--176, 2000.
- [437] Venkatraman L, Chia SM, Narmada BC, White JK, Bhowmick SS, Forbes Dewey C Jr, So PT, Tucker-Kellogg L, and Yu H. Plasmin triggers a switch-

-
- like decrease in thrombospondin-dependent activation of TGF- β 1. *Biophys J*, 103(5):1060--8, 2012.
- [438] Munger JS, JG Harpel, FG Giancotti, and DB Rifkin. Interactions between growth factors and integrins: latent forms of transforming growth factor- β are ligands for the integrin $\alpha\beta$ 1. *Mol Biol Cell*, 9:2627–2638, 1998.
- [439] Derynck R and Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425(6958):577–84, 2003.
- [440] Doré Jr JJ, Edens M, Garamszegi N, and Leof EB. Heteromeric and homomeric transforming growth factor-beta receptors show distinct signaling and endocytic responses in epithelial cells. *J Biol Chem*, 273(48):31770–31777, 1998.
- [441] Shi Y and Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6):685–700, 2003.
- [442] Groppe J, Hinck CS, Samavarchi-Tehrani P, and et al. Cooperative assembly of TGF-beta superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding. *Mol Cell.*, 29(2):157–68, 2008.
- [443] Mishra L, Derynck R, and Mishra B. Transforming growth factor-beta signaling in stem cells and cancer. A comprehensive review on TGF β signaling – focus on stem cells and cancer. *Science*, 310(5745):68–71, 2005.
- [444] Liu F, Poupponnot C, and Massague J. Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta inducible transcriptional complexes. *Genes Dev.*, 11(23):3157–67, 1997.

-
- [445] Macias-Silva M, Abdollah S, Hoodless PA, and et al. MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell*, 87(7):1215–24, 1996.
- [446] Souchelnytskyi S, Tamaki K, Engstrom U, and et al. Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem.*, 272(44):28107–15, 1997.
- [447] Chen Y, Lebrun JJ, and Vale W. Regulation of transforming growth factor beta- and activin-induced transcription by mammalian mad proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 93(23):12992–7, 1996.
- [448] Hoodless PA, Haerry T, Abdollah S, and et al. MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell*, 85(4):489–500, 1996.
- [449] Kretzschmar M, Doody J, and Massague J. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature*, 389(6651):618–22, 1997.
- [450] Nishihara A, Hanai JI, Okamoto N, and et al. Role of p300, a transcriptional coactivator, in signalling of TGF-beta. *Genes Cells*, 3(9):613–23, 1998.
- [451] Zhang Y, Musci T, and Derynck R. The tumor suppressor Smad4/DPC 4 as a central mediator of Smad function. *Curr Biol*, 7(4):270–6, 1997.
- [452] Padua D and Massague J. Roles of TGFbeta in metastasis. A comprehensive review on TGFβ signaling in the metastatic process, emphasizing its role in EMT. *Cell Res*, 19(1):89–102, 2009.

-
- [453] Shah R, Reyes-Gordillo K, Arellanes-Robledo J, Lechuga CG, Hernández-Nazara Z, Cotty A, Rojkind M, and Lakshman MR. TGF- β 1 up-regulates the expression of PDGF- β receptor mRNA and induces a delayed PI3K-, AKT-, and p70(S6K) -dependent proliferative response in activated hepatic stellate cells. *Alcohol Clin Exp Res*, 37(11):1838--48, 2013.
- [454] Kisseleva T and Brenner D. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*, 22:73--78, 2007.
- [455] Czaja MJ, Flanders KC, Biempica L, Klein C, Zern MA, and Weiner FR. Expression of tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1 in acute liver injury. *Growth Factors*, 1(3):219--26, 1989.
- [456] Castilla A, Prieto J, and Fausto N. Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy. *N Engl J Med*, 324(14):933--40, 1991.
- [457] Heldin CH. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun Signal*, 11:97, 2013.
- [458] Hannink M and Donoghue DJ. Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins. *Biochim Biophys Acta*, 989(1):1--10, 1989.
- [459] Heldin CH. Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. *EMBO J*, 11(12):4251--9, 1992.
- [460] Antoniades HN, Scher CD, and Stiles CD. Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(4):1809--13, 1979.

-
- [461] LaRochelle WJ, Jeffers M, McDonald WF, Chillakuru RA, Giese NA, Lokker NA, and et al. PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nat Cell Biol*, 3(5):517–21, 2001.
- [462] Bergsten E, Uutela M, Li X, Pietras K, Heldin CH Ostman A, and et al. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol*, 3(5):512–6, 2001.
- [463] Kazlauskas A. A new member of an old family [news comment]. *Nat Cell Biol*, 2(5):78–9, 2000.
- [464] Heldin CH, Wasteson A, and Westermark B. Platelet-derived growth factor. *Mol Cell Endocrinol*, 39:169–87, 1985.
- [465] Omura T, Heldin C-H, and Östman A. Immunoglobulin-like domain 4-mediated receptor-receptor interactions contribute to platelet-derived growth factor-induced receptor dimerization. *J Biol Chem*, 272:12676–12682, 1997.
- [466] Yang Y, Yuzawa S, and Schlessinger J. Contacts between membrane regions of the PDGF receptor ectodomain are required for receptor activation but not for receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:7681–7686, 2008.
- [467] Sundaresan M. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, 270(5234):296–9, 1995.
- [468] Tonks NK, Meng TC, Fukada T. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell*, 9(2):387–99, 2002.

-
- [469] Pinzani M, Milani S, Herbst H, and et al. Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis. *Am J Pathol*, 148:785–800, 1996.
- [470] Kura Y, Morimoto H, Ogami M, and et al. Expression of platelet-derived growth factor and its receptor in livers of patients with chronic liver disease. *J Gastroenterol*, 32:496–501, 1997.
- [471] Wright JH, Johnson MM, Shimizu-Albergine M, Bauer RL, Hayes BJ, Surapisitchat J, Hudkins KL, Riehle KJ, Johnson SC, Yeh MM, Bammler TK, Beyer RP, Gilbertson DG, Alpers CE, Fausto N, and Campbell JS. Paracrine activation of hepatic stellate cells in platelet-derived growth factor C transgenic mice: evidence for stromal induction of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 134(4):778--88, 2014.
- [472] Sonia Tugues, Guillermo Fernandez-Varo, Javier Munoz-Luque, Josefa Ros, Vicente Arroyo, Juan Rodes, Scott L. Friedman, Peter Carmeliet, Wladimiro Jimenez, and Manuel Morales-Ruiz. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology*, 46(6):1919--1926, 2007.
- [473] Dominique Thabut, Chittaranjan Routray, Gwen Lomberk, Uday Shergill, Kevin Glaser, Robert Huebert, Leena Patel, Tetyana Masyuk, Boris Blechacz, Andrew Vercnocke, Erik Ritman, Richard Ehman, Raul Urrutia, and Vijay Shah. Complementary Vascular and Matrix Regulatory Pathways Underlie the Beneficial Mechanism of Action of Sorafenib in Liver Fibrosis. *Hepatology*, 54:573--585, 2011.
- [474] Mohamed E. Shaker, Gamal E. Shiha, and Tarek M. Ibrahim. Comparison of

- early treatment with low doses of nilotinib, imatinib and a clinically relevant dose of silymarin in thioacetamide-induced liver fibrosis. *Eur J Pharmacol*, 670:593--600, 2011.
- [475] Markus Neef, Monika Ledermann, Hans Saegesser, Vreni Schneider, Nicolas Widmer, Laurent Arthur Decosterd, Bertrand Rochat, and Juerg Reichen. Oral imatinib treatment reduces early fibrogenesis but does not prevent progression in the long term. *J Hepatol*, 44(1):167--175, 2006.
- [476] Tibaldi E1, Zonta F1, Bordin L1, Magrin E1, Gringeri E2, Cillo U2, Idotta G3, Pagano MA4, and Brunati AM. The tyrosine phosphatase SHP-1 inhibits proliferation of activated hepatic stellate cells by impairing PDGF receptor signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1843(2):288--98, 2014.
- [477] Wajant H, Pfizenmaier K, and Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, 10(1):45--65, 2003.
- [478] Hana Zelova and Jan Hosek. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm. Res*, 62:641--651, 2013.
- [479] Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, and Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*, 1:45--53, 1988.
- [480] Luettig B, Decker T, and Lohmann-Matthes ML. Evidence for the existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: an integral protein and a molecule attached to its receptor. *J Immunol*, 12:4034--8, 1989.
- [481] Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Wolfson MF Slack JL,

-
- Castner BJ, and et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 6618:729–33, 1997.
- [482] Eissner G, Kolch W, and Scheurich P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev*, 5:353–66, 2004.
- [483] Eck MJ and Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem*, 29:17595–605, 1989.
- [484] Camussi G, Albano E, Tetta C, and Bussolino F. The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Biochem*, 1:3–14, 1991.
- [485] Sullivan KE. Regulation Of Inflammation. *Immunol Res*, 2–3:529–38, 2003.
- [486] Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*, 2:149–60, 2008.
- [487] Locksley RM, Killeen N, and Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104:487–501, 2003.
- [488] Ledgerwood EC, Pober JS, and Bradley JR. Recent advances in the molecular basis of TNF signal transduction. *Lab Invest*, 9:1041–50, 1999.
- [489] Ihnatko R and Kubes M. TNF signaling: early events and phosphorylation. *Gen Physiol Biophys*, 3:159–67, 2007.
- [490] Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, and Wallach D.

-
- Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med*, 2:323–9, 1992.
- [491] Hajeer AH and Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc Res Tech*, 3:216–28, 2000.
- [492] Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Georgopoulos S, Maxeiner B, and et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 5:793–802, 1995.
- [493] Grell M, Wajant H, Zimmermann G, and Scheurich P. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2:570–5, 1998.
- [494] Siebenlist U, Franzoso G, and Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol.*, page 405–455, 1994.
- [495] Li Q and Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.*, 10:725–34, 2002.
- [496] Dejardin E. The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol.*, 9:1161–79, 2006.
- [497] Siebenlist U, Brown K, and Claudio E. Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. *Nat Rev Immunol*, 6:435–45, 2005.
- [498] Gaur U and Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol*, 66(8):1403–8, 2003.

-
- [499] Zhang R, Xu Y, Ekman N, Wu Z, Wu J, Alitalo K, and Min W. Etk/Bmx transactivates vascular endothelial growth factor 2 and recruits phosphatidylinositol 3-kinase to mediate the tumor necrosis factor-induced angiogenic pathway. *J Biol Chem*, 51:51267–76, 2003.
- [500] Zhou Z, Gengaro P, Wang W, Wang XQ, Li C, Faubel S, Rivard C, and et al. Role of NF-kappaB and PI 3-kinase/Akt in TNF-alpha-induced cytotoxicity in microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 4:932–41, 2008.
- [501] Hammam O, Mahmoud O, Zahran M, Sayed A, Salama R, Hosny K, and Farghly A. A Possible Role for TNF- α in Coordinating Inflammation and Angiogenesis in Chronic Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. *Gastrointest Cancer Res*, 6(4):107--14, 2013.
- [502] Mantovani A, Schioppa T, Porta C, and et al. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev*, 25:315–322, 2006.
- [503] Trebicka J, Krag A, Gansweid S, Appenrodt B, Schiedermaier P, and et al. Endotoxin and tumor necrosis factor-receptor levels in portal and hepatic vein of patients with alcoholic liver cirrhosis receiving elective transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 23:1218–1225, 2011.
- [504] Oakley F, Mann J, Ruddell RG, Pickford J, Weinmaster G, and Mann DA. Basal expression of I κ B α is controlled by the mammalian transcriptional repressor RBP-J (CBF1) and its activator Notch1. *J Biol Chem*, 278:24359–70, 2003.

-
- [505] Mann J, Oakley F, Akiboye F, Elsharkawy A, Thorne AW, and Mann DA. Regulation of myofibroblast transdifferentiation by DNA methylation and MeCP2: implications for wound healing and fibrogenesis. *Cell Death Differ*, 14:275–85, 2007.
- [506] Elsharkawy AM and Mann DA. Nuclear factor- κ B and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis. *Hepatology*, 46:590–97, 2007.
- [507] Osawa Y, Hoshi M, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, and Kozawa O. Tumor necrosis factor- α promotes cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in hepatic stellate cells. *PLoS One*, 8(6), 2013.
- [508] Tarrats N, Moles A, Morales A, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC, and et al. Critical role of tumor necrosis factor receptor 1, but not 2, in hepatic stellate cell proliferation, extracellular matrix remodeling, and liver fibrogenesis. *Hepatology*, 54:319–327, 2011.
- [509] Sudo K, Yamada Y, Moriwaki H, Saito K, and Seishima M. Lack of tumor necrosis factor receptor type 1 inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Cytokine*, 29:236–244, 2005.
- [510] Krulich L, Dhariwal AP, and McCann SM. Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology*, 83(4):783--90, 1968.
- [511] Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., Guillemin, and R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, 179:77--79, 1973.

-
- [512] Burgus R, Ling N, Butcher M, and Guillemin R. Primary structure of somatostatin, a hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70:684–8, 1973.
- [513] Brown M, Rivier J, and Vale W. Somatostatin-28 selective action on the pancreatic beta-cell and brain. *Endocrinology*, 108:2391–2393, 1981.
- [514] Schally AV, Huang WY, Chang RCC, Arimura A, Redding TW, Millar RP, Hunkapiller MW, and Hood LE. Isolation and structure of pro-somatostatin: a putative somatostatin precursor from pig hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77:4489–4493, 1980.
- [515] Martel G, Dutar P, Epelbaum J, and Viollet C. Somatostatinergic systems: an update on brain functions in normal and pathological aging. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3:154, 2012.
- [516] Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*, 20(3):157–198, 1999.
- [517] Lamberts SW. The role of somatostatin in the regulation of anterior pituitary hormone secretion and the use of its analogs in the treatment of human pituitary tumors. *Endocr Rev*, 9:417–436, 1988.
- [518] Schettini G. Brain Somatostatin: receptor-coupled transducing mechanisms and role in cognitive functions. *Pharmacol Res*, 23:203–215, 1991.
- [519] Lamers CB. Clinical and pathophysiological aspects of somatostatin and the gastrointestinal tract. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*, 286:19–25, 1987.
- [520] Patel PC, Barrie R, Hill N, Landeck S, Kurozawa D, and Woltering

- EA. Postreceptor signal transduction mechanisms involved in octreotide-induced inhibition of angiogenesis. *Surgery*, 116:1148–1152, 1994.
- [521] Peluso G, Petillo O, Melone MA, Mazzarella G, Ranieri M, and Tajana GF. Modulation of cytokine production in activated human monocytes by somatostatin. *Neuropeptides*, 30:443–451, 1996.
- [522] Armani C, Catalani E, Balbarini A, Bagnoli P, and Cervia D. Expression, pharmacology, and functional role of somatostatin receptor subtypes 1 and 2 in human macrophages. *J Leukoc Biol*, 81(3):845--55, 2007.
- [523] Varecza Z, Elekes K, László T, Perkecz A, Pintér E, Sándor Z, Szolcsányi J, Keszthelyi D, Szabó A, Sándor K, Molnár TF, Szántó Z, Pongrácz JE, and Helyes Z. Expression of the somatostatin receptor subtype 4 in intact and inflamed pulmonary tissues. *J Histochem Cytochem*, 57(12):1127--37, 2009.
- [524] Bousquet C, Puente E, Buscail L, Vaysse N, and Susini C. Antiproliferative effect of somatostatin and analogs. *Chemotherapy*, 47 (Suppl. 2):30–39, 2001.
- [525] Robas N, Mead E, and Fidock M. MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *J Biol Chem*, 278(45):44400--4, 2003.
- [526] de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, Gautvik KM, Schweitzer P, Danielson PE, Dunlop CL, Siggins GR, Henriksen SJ, and Sutcliffe JG. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature*, 381(6579):242--5, 1996.

-
- [527] de Lecea L, Ruiz-Lozano P, Danielson PE, Peelle-Kirley J, Foye PE, Frankel WN, and Sutcliffe JG. Cloning, mRNA expression, and chromosomal mapping of mouse and human preprocortistatin". *Genomics*, 42(3):499–506, 1997.
- [528] Wilson DN, Chung H, Elliott RC, Bremer E, George D, and Koh S. Microarray analysis of postictal transcriptional regulation of neuropeptides. *J Mol Neurosci*, 25:285–298, 2005.
- [529] Tallent MK and Siggins GR. Somatostatin acts in CA1 and CA3 to reduce hippocampal epileptiform activity. *J Neurophysiol*, 81:1626–1635, 2005.
- [530] Rauca C, Schafer K, and Holtt V. Effects of somatostatin, octreotide and cortistatin on ischaemic neuronal damage following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 360:633–638, 1999.
- [531] Flood JF, Uezu K, and Morley JE. The cortical neuropeptide, cortistatin-14, impairs post-training memory processing. *Brain Res*, 775:250–252, 1997.
- [532] Sanchez-Alavez M, Gomez-Chavarin M, Navarro L, Murillo-Rodriguez E Jimenez-Anguiano A, Prado-Alcala RA, Drucker-Colin R, and Prospero-Garcia O. Cortistatin modulates memory processes in rats. *Brain Res*, 858:78–83, 2000.
- [533] Winsky-Sommerer R, Spier AD, Fabre V, de Lecea L, and Criado JR. Overexpression of the human beta-amyloid precursor protein downregulates cortistatin mRNA in PDAPP mice. *Brain Res*, 1023:157–162, 2004.

-
- [534] Broglio F, Koetsveld Pv P, Benso A, Gottero C, Prodam F, Papotti M, Muccioli G, Gauna C, Hofland L, Deghenghi R, Arvat E, Van Der Lely AJ, and Ghigo E. Ghrelin secretion is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 87:4829–4832, 2002.
- [535] Dalm VA, van Hagen PM, van Koetsveld PM, Achilefu S, Houtsmuller AB, Pols DH, van der Lely AJ, Lamberts SW, and Hofland LJ. Expression of somatostatin, cortistatin, and somatostatin receptors in human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285:344–353, 2003.
- [536] Dalm VA, van Hagen PM, van Koetsveld PM, Langerak AW, van der Lely AJ, Lamberts SW, and Hofland LJ. Cortistatin rather than somatostatin as a potential endogenous ligand for somatostatin receptors in the human immune system. *J Clin Endocrinol Metab*, 88:270–276, 2003.
- [537] Ferone D, Boschetti M, Resmini E, Giusti M, Albanese V, Goglia U, Albertelli M, Vera L, Bianchi F, and Minuto F. Neuroendocrine-immune interactions: the role of cortistatin/somatostatin system. *Ann NY Acad Sci*, 1069:129–144, 2006.
- [538] Rubio A, Avila J, and de Lecea L. Cortistatin as a therapeutic target in inflammation. *Expert Opin Ther Targets*, 11:1–9, 2007.
- [539] Gonzalez-Rey E, Chorny A, Robledo G, and Delgado M. Cortistatin, a new antiinflammatory peptide with therapeutic effect on lethal endotoxemia. *J Exp Med*, 203:563–571, 2006.
- [540] Gonzalez-Rey E, Varela N, Sheibanie AF, Chorny A, Ganea D, and Delgado

-
- M. Cortistatin, an antiinflammatory peptide with therapeutic action in inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 103:4228–4233, 2006.
- [541] Hoyer D, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, Meyerhof W, O'Carroll AM, and et al. *Somatostatin receptors*. IUPHAR, 2000.
- [542] Vanetti M, Kouba M, Wang XM, Vogt G, and Holtt V. Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (Sstr2B). *FEBS Lett*, 311:290–294, 1992.
- [543] Patel YC, Greenwood M, Kent G, Panetta R, and Srikant CB. Multiple gene transcripts of the somatostatin receptor SSTR2: tissue selective distribution and cAMP regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 192:288–294, 1993.
- [544] Patel YC, Greenwood MT, Warszynska A, Panetta R, and Srikant CB. All 5 cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl-cyclase. *Biochem Biophys Res Commun*, 198:605–612, 1994.
- [545] Bai M. Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction. *Cell Signal*, 16:175–186, 2004.
- [546] Terrillon S and Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep*, 5:30–34, 2004.
- [547] Prinster SC, Hague C, and Hall RA. Heterodimerization of G protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev*, 57:289–298, 2005.

-
- [548] Pflieger KD and Eidne KA. Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem J*, 385:625–637, 2005.
- [549] Milligan G. G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology. *Mol Pharmacol*, 66:1–7, 2004.
- [550] Milligan G. G protein-coupled receptor dimerisation: molecular basis and relevance to function. *Biochim Biophys Acta*, 1768:825–835, 2007.
- [551] Bouvier M, Bulenger S, Marullo S. Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci*, 26:131–137, 2005.
- [552] Patel RC, Lange DC, and Patel YC. Photobleaching fluorescence resonance energy transfer reveals ligand-induced oligomer formation of human somatostatin receptor subtypes. *Methods*, 27:340--8, 2002.
- [553] Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Laugsch M, Holtt V, and Schulz S. Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem*, 277:19762--72, 2002.
- [554] Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, and Patel YC. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science*, 288:154--7, 2000.
- [555] Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Klutzny M, Kirscht S, Kreienkamp HJ, Holtt V, and Schulz S. Homo- and heterodimerization of

-
- somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A). *J Biol Chem*, 276:14027--36, 2001.
- [556] Gordon D. Physical and chemical cooperation between somatostatin and dopamine receptors. *Gastroenterology*, 119:4, 2000.
- [557] Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC, and Patel YC. Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem*, 275:7862--9, 2000.
- [558] Moller LN, Stidsen CE, Hartmann B, and Holst JJ. Somatostatin receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1616:1–84, 2003.
- [559] Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, and Meyerhof W. Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem*, 89:1057–1091, 2004.
- [560] Theodoropoulou M and Stalla GK. Somatostatin receptors: From signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrin*, 34:228--252, 2013.
- [561] Florio T and Schettini G. Multiple intracellular effectors modulate physiological functions of the cloned somatostatin receptors. *J Mol Endocrinol*, 17:89–100, 1996.
- [562] Lee MT, Liebow C, Kamer AR, and Schally AV. Effects of epidermal growth factor and analogs of luteinizing-hormone-releasing hormone and somatostatin on phosphorylation and dephosphorylation of tyrosine residues of specific protein substrates in various tumors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 88:1656–1660, 1991.
- [563] Tsuzaki S and Moses AC. Somatostatin inhibits deoxyribonucleic acid

-
- synthesis induced by both thyrotropin and insulin-like growth factor- α in FRTL5 cells. *Endocrinology*, 126:3131–3138, 1990.
- [564] Pan MG, Florio T, and Stork PJS. G-protein activation of a hormone-stimulated phosphatase in human tumor-cells. *Science*, 256:1215–1217, 1992.
- [565] Cheung NW and Boyages SC. Somatostatin-14 and its analog octreotide exert a cytostatic effect on GH3 rat pituitary tumor cell proliferation via a transient G0/G1 cell cycle block. *Endocrinology*, 136:4174–4181, 1995.
- [566] Srikant CB and Shen SH. Octapeptide somatostatin analog SMS 201-995 induces translocation of intracellular PTP1C to membranes in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells. *Endocrinology*, 137:3461–3468, 1996.
- [567] Sharma K and Srikant CB. Induction of wild-type p53, Bax, and acidic endonuclease during somatostatin-signaled apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Cancer*, 76:259–266, 1998.
- [568] Teijeiro R, Rios R, Costoya JA, Castro R, Bello JL, Devesa J, and Arce VM. Activation of human somatostatin receptor 2 promotes apoptosis through a mechanism that is independent from induction of p53. *Cell Physiol Biochem*, 12:31–38, 2002.
- [569] Ferrante E, Pellegrini C, Bondioni S, Peverelli E, Locatelli M, Gelmini P, Luciani P, Peri A, Mantovani G, Bosari S, Beck-Peccoz P, Spada A, and Lania A. Octreotide promotes apoptosis in human somatotroph tumor cells by activating somatostatin receptor type 2. *Endocr Relat Cancer*, 13:955–962, 2006.

-
- [570] Thangaraju M, Sharma K, Leber B, Andrews DW, Shen SH, and Srikant CB. Regulation of acidification and apoptosis by SHP-1 and Bcl-2. *J Biol Chem*, 274:29549–29557, 1999.
- [571] Lin X, Voino-Yasenetskaya TA, Hooley R, Lin CY, Orlowski J, and Barber DL. G alpha 12 differentially regulates Na⁺–H⁺ exchanger isoforms. *J Biol Chem*, 271:22604–22610, 1996.
- [572] Lin CY, Varma MG, Joubel A, Madabushi S, Lichtarge O, and Barber DL. Conserved Motifs in Somatostatin, D2-dopamine, and α 2B-Adrenergic Receptors for Inhibiting the Na-H Exchanger, NHE1. *J Biol Chem*, 278:15128–15135, 2003.
- [573] Buchan AMJ, Lin CY, Choi J, and Barber DL. Somatostatin, acting at receptor subtype 1, inhibits Rho activity, the assembly of actin stress fibers, and cell migration. *J Biol Chem*, 277:28431–28438, 2002.
- [574] Arena S, Pattarozzi A, Corsaro A, Schettini G, and Florio T. Somatostatin receptor subtype-dependent regulation of nitric oxide release: involvement of different intracellular pathways. *Mol Endocrinol*, 19:255–267, 2005.
- [575] Lopez F, Ferjoux G, Cordelier P, Saint-Laurent N, Esteve JP, Vaysse N, Buscail L, and Susini C. Neuronal nitric oxide synthase is a SHP-1 substrate involved in sst2 somatostatin receptor growth inhibitory signaling. *FASEB J*, 15:2300–2302, 2001.
- [576] Hadcock JR, Strnad J, and Eppler CM. Rat somatostatin receptor type-1 couples to G-proteins and inhibition of cyclic-AMP accumulation. *Mol Pharmacol*, 45:410–416, 1994.

-
- [577] Kubota A, Yamada Y, Kagimoto S, Yasuda K, Someya Y, Ihara Y, Okamoto Y, Kozasa T, Seino S, and Seino Y. Multiple effector coupling of somatostatin receptor subtype SSTR1. *Biochem Biophys Res Commun*, 204:176–186, 1994.
- [578] Kubota A, Yamada Y, Kagimoto S, Seino S, and Seino Y. Effector coupling of somatostatin receptor subtypes on human endocrine tumors. *Metabolism*, 45:42–5, 1996.
- [579] Hershberger RE, Newman BL, Florio T, Bunzow J, Civelli O, Li XJ, Forte M, and Stork PJS. The somatostatin receptors SSTR1 and SSTR2 are coupled to inhibition of adenylyl cyclase in chinese hamster ovary cells via pertussis toxin sensitive pathways. *Endocrinology*, 134:1277–1285, 1994.
- [580] Lopez F, Esteve JP, Buscail L, Delesque N, SaintLaurent N, Vaysse N, and Susini C. Molecular mechanisms of antiproliferative effect of somatostatin: involvement of a tyrosine phosphatase. *Metabolism*, 45:14–16, 1996.
- [581] Buscail L, Delesque N, Esteve JP, SaintLaurent N, Prats H, Clerc P, Robberecht P, Bell GI, Liebow C, Schally AV, Vaysse N, and Susini C. Stimulation of tyrosine phosphatase and inhibition of cell proliferation by somatostatin analogs: mediation by human somatostatin receptor subtypes SSTR1 and SSTR2. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 91:2315–2319, 1994.
- [582] Buscail L, Esteve JP, SaintLaurent N, Bertrand V, Reisine T, OCarroll AM, Bell GI, Schally AV, Vaysse N, and Susini C. Inhibition of cell proliferation by the somatostatin analog RC-160 is mediated by somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 through different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 92:1580–1584, 1995.

-
- [583] Florio T, Yao H, Carey KD, Dillon TJ, and Stork PJS. Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1). *Mol Endocrinol*, 13:24–37, 1999.
- [584] Florio T, Thellung S, Arena S, Corsaro A, Bajetto A, Schettini G, and Stork PJS. Somatostatin receptor 1 (SSTR1)-mediated inhibition of cell proliferation correlates with the activation of the MAP kinase cascade: role of the phosphotyrosine phosphatase SHP-2. *J Physiol Paris*, 94:239–250, 2000.
- [585] Tulipano G, Stumm R, Pfeiffer M, Kreienkamp HJ, Holtt V, and Schulz S. Differential beta-arrestin trafficking and endosomal sorting of somatostatin receptor subtypes. *J Biol Chem*, 279:21374–21382, 2004.
- [586] Roosterman D, Kreuzer OJ, Brune N, Cottrell GS, Bunnett NW, Meyerhof W, and Steinhoff M. Agonist-induced endocytosis of rat somatostatin receptor 1. *Endocrinology*, 148:1050–1058, 2007.
- [587] Kagimoto S, Yamada Y, Kubota A, Someya Y, Ihara Y, Yasuda K, Kozasa T, Imura H, Seino S, and Seino Y. Human somatostatin receptor, Sstr2, is coupled to adenylyl cyclase in the presence of Gi alpha 1 protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 202:1188–1195, 1994.
- [588] Law SF, Yasuda K, Bell GI, and Reisine T. Gi alpha-3 and G(o) alpha selectively associate with the cloned somatostatin receptor subtype SSTR2. *J Biol Chem*, 268:10721–10727, 1993.
- [589] Tomura H, Okajima F, Akbar M, Majid MA, Sho KM, and Kondo Y. Transfected human somatostatin receptor-type-2, sstr2, not only

- inhibits adenylate-cyclase but also stimulates phospholipase C and Ca²⁺ mobilization. *Biochem Biophys Res Commun*, 200:986–992, 1994.
- [590] Lopez F, Esteve JP, Buscail L, Delesque N, Saint-Laurent N, Theveniau M, Nahmias C, Vaysse N, and Susini C. The tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the sst2 somatostatin receptor and is an essential component of sst2-mediated inhibitory growth signaling. *J Biol Chem*, 272:24448–24454, 1997.
- [591] Barbieri F, Pattarozzi A, Gatti M, Porcile C, Bajetto A, Ferrari A, Culler MD, and Florio T. Somatostatin receptors 1, 2, and 5 cooperate in the somatostatin inhibition of C6 glioma cell proliferation in vitro via a phosphotyrosine phosphatase- η -dependent inhibition of extracellularly regulated kinase-1/2. *Endocrinology*, 149:4736–4746, 2008.
- [592] Cattaneo MG, Amoroso D, Gussoni G, Sanguini AM, and Vicentini LM. A somatostatin analogue inhibits MAP kinase activation and cell proliferation in human neuroblastoma and in human small cell lung carcinoma cell lines. *FEBS Lett*, 397:164–168, 1996.
- [593] Douziech N, Calvo E, Coulombe Z, Muradia G, Bastien J, Aubin RA, Lajas A, and Morisset J. Inhibitory and stimulatory effects of somatostatin on two human pancreatic cancer cell lines: a primary role for tyrosine phosphatase SHP-1. *Endocrinology*, 140:765–777, 1999.
- [594] Pola S, Cattaneo MG, and Vicentini LM. Anti-migratory and anti-invasive effect of somatostatin in human neuroblastoma cells – involvement of Rac and MAP kinase activity. *J Biol Chem*, 278:40601–40606, 2003.

-
- [595] Sellers LA, Alderton F, Carruthers AM, Schindler M, and Humphrey PP. Receptor isoforms mediate opposing proliferative effects through gbetagamma activated p38 or Akt pathways. *Mol Cell Biol*, 20:5974–5985, 2000.
- [596] Cuevas BD, Lu YL, Mao ML, Zhang JY, LaPushin R, Siminovitch K, and Mills GB. Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 276:27455–27461, 2001.
- [597] Najib S, Saint-Laurent N, Esteve JP, Schulz S, Boutet-Robinet E, Fourmy D, Lattig J, Mollereau C, Pyronnet S, Susini C, and Bousquet C. A switch of G protein-coupled receptor binding preference from phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-p85 to filamin a negatively controls the PI3K pathway. *Mol Cell Biol*, 32:1004–1016, 2012.
- [598] Pages P, Benali N, Saint-Laurent N, Esteve JP, Schally AV, Tkaczuk J, Vaysse N, Susini C, and Buscail L. Sst2 somatostatin receptor mediates cell cycle arrest and induction of p27(Kip1) – evidence for the role of SHP-1. *J Biol Chem*, 274:15186–15193, 1999.
- [599] Theodoropoulou M, Zhang J, Laupheimer S, Paez-Pereda M, Erneux C, Florio T, Pagotto U, and Stalla GK. Octreotide, a somatostatin analogue, mediates its antiproliferative action in pituitary tumor cells by altering phosphatidylinositol 3-kinase signaling and inducing Zac1 expression. *Cancer Res*, 66:1576–1582, 2006.
- [600] Guillermet J, Saint-Laurent N, Rochaix P, Cuvillier O, Levade T, Schally AV, Pradayrol L, Buscail L, Susini C, and Bousquet C. Somatostatin

-
- receptor subtype 2 sensitizes human pancreatic cancer cells to death ligand-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 100:155–16, 2003.
- [601] Reardon DB, Wood SL, Brautigan DL, Bell GI, Dent P, and Sturgill TW. Activation of a protein tyrosine phosphatase and inactivation of Raf-1 by somatostatin. *Biochem J*, 314:401–404, 1996.
- [602] Reardon DB, Dent P, Wood SL, Kong T, and Sturgill TW. Activation in vitro of somatostatin receptor subtypes 2, 3, or 4 stimulates protein tyrosine phosphatase activity in membranes from transfected ras-transformed NIH 3T3 cells: coexpression with catalytically inactive SHP-2 blocks responsiveness. *Mol Endocrinol*, 11:1062–1069, 1997.
- [603] Sharma K, Patel YC, and Srikant CB. Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3. *Mol Endocrinol*, 10:1688–1696, 1996.
- [604] Florio T, Morini M, Villa V, Arena S, Corsaro A, Thellung S, Culler MD, Pfeffer U, Noonan DM, Schettini G, and Albini A. Somatostatin inhibits tumor angiogenesis and growth via somatostatin receptor-3-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase and mitogen-activated protein kinase activities. *Endocrinology*, 144:1574–1584, 2003.
- [605] Liu D, Martino G, Thangaraju M, Sharma M, Halwani F, Shen SH, Patel YC, and Srikant CB. Caspase-8-mediated intracellular acidification precedes mitochondrial dysfunction in somatostatin-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 275:9244–9250, 2000.
- [606] Albini A, Florio T, Giunciuglio D, Masiello L, Carlone S, Corsaro A,

-
- Thellung S, Cai T, Noonan DM, and Schettini G. Somatostatin controls Kaposi's sarcoma tumor growth through inhibition of angiogenesis. *FASEB J*, 13:647–655, 1999.
- [607] Smalley KSM, Feniuk W, Sellers LA, and Humphrey PPA. The pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in the human somatostatin sst(4) receptor-mediated stimulation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase and extracellular acidification. *Biochem Biophys Res Commun*, 263:239–243, 1999.
- [608] Sellers LA, Feniuk W, Humphrey PP, and Lauder H. Activated g protein coupled receptor induces tyrosine phosphorylation of STAT3 and agonist-selective serine phosphorylation via sustained stimulation of mitogen-activated protein kinase. Resultant effects on cell proliferation. *J Biol Chem*, 274:16423–16430, 1999.
- [609] Qiu C, Zeyda T, Johnson B, Hochgeschwender U, de Lecea L, and Tallent MK. Somatostatin receptor subtype 4 couples to the M-current to regulate seizures. *J Neurosci*, 28:3567–3576, 2008.
- [610] O'Carroll AM, Raynor K, Lolait SJ, and Reisine T. Characterization of cloned human somatostatin receptor SSTR5. *Mol Pharmacol*, 46:291–298, 1994.
- [611] Lussier BT, Wood DA, French MB, Moor BC, and Kraicer J. Free intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) and growth hormone release from purified rat somatotrophs. II. Somatostatin lowers [Ca²⁺]_i by inhibiting Ca²⁺ influx. *Endocrinology*, 128:583–591, 1991.

-
- [612] Wilkinson GF, Feniuk W, and Humphrey PPA. Characterization of human recombinant somatostatin sst5 receptors mediating activation of phosphoinositide metabolism. *Brit J Pharmacol*, 121:91–96, 1997.
- [613] Wilkinson GF, Feniuk W, and Humphrey PPA. Homologous and heterologous desensitisation of somatostatin-induced increases in intracellular Ca²⁺ and inositol 1,4,5-trisphosphate in CHO-K1 cells expressing human recombinant somatostatin sst5 receptors. *Eur J Pharmacol*, 340:277–285, 1997.
- [614] Cordelier P, Esteve JP, Bousquet C, Delesque N, OCarroll A., Schally AV, Vaysse N, Susini C, and Buscail L. Characterization of the antiproliferative signal mediated by the somatostatin receptor subtype sst5. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 94:9343–9348, 1997.
- [615] Kouroumalis E, Skordilis P, Thermos K, Vasilaki A, Moschandrea J, and Manousos ON. Treatment of hepatocellular carcinoma with octreotide: a randomised controlled study. *Gut*, 42(3):442--7, 1998.
- [616] Dimitroulopoulos D, Xinopoulos D, Tsamakidis K, Zisimopoulos A, Andriotis E, Markidou S, Panagiotakos D, Chrysohoou C, Bazinis A, and Paraskevas E. The role of sandostatin LAR in treating patients with advanced hepatocellular cancer. *Hepatogastroenterology*, 49(47):1245--50, 2002.
- [617] Notas G, Kolios G, Mastrodimou N, Kampa M, Vasilaki A, Xidakis C, Castanas E, Thermos K, and Kouroumalis E. Cortistatin production by HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line and distribution of somatostatin receptors. *J Hepatol*, 40(5):792--8, 2004.

-
- [618] Notas G, Kampa M, Nifli AP, Xidakis K, Papasava D, Thermos K, Kouroumalis E, and Castanas E. The inhibitory effect of opioids on HepG2 cells is mediated via interaction with somatostatin receptors. *Eur J Pharmacol*, 555(1):1--7, 2007.
- [619] Xidakis C, Mastrodimou N, Notas G, Renieri E, Kolios G, Kouroumalis E, and Thermos K. RT-PCR and immunocytochemistry studies support the presence of somatostatin, cortistatin and somatostatin receptor subtypes in rat Kupffer cells. *Regul Pept*, 143(1-3):76--82, 2007.
- [620] Reynaert H, Rombouts K, Vandermonde A, Urbain D, Kumar U, Bioulac-Sage P, Pinzani M, Rosenbaum J, and Geerts A. Expression of somatostatin receptors in normal and cirrhotic human liver and in hepatocellular carcinoma. *Gut*, 53(8):1180--9, 2004.
- [621] Song SH, Leng XS, Li T, Qin ZZ, Peng JR, Zhao L, Wei YH, and Yu X. Expression of subtypes of somatostatin receptors in hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol*, 10(11):1663--5, 2004.
- [622] Pan Q, Li DG, Lu HM, Lu LY, Wang YQ, and Xu QF. Antiproliferative and proapoptotic effects of somatostatin on activated hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol*, 10(7):1015--8, 2004.
- [623] Reynaert H, Rombouts K, Jia Y, Urbain D, Chatterjee N, Uyama N, and Geerts A. Somatostatin at nanomolar concentration reduces collagen I and III synthesis by, but not proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol*, 146(1):77--88, 2005.
- [624] Lang A, Sakhnini E, Fidler HH, Maor Y, Bar-Meir S, and Chowers Y.

-
- Somatostatin inhibits pro-inflammatory cytokine secretion from rat hepatic stellate cells. *Liver Int*, 25(4):808--16, 2005.
- [625] Reynaert H, Vaeyens F, Qin H, Hellemans K, Chatterjee N, Winand D, Quartier E, Schuit F, Urbain D, Kumar U, Patel YC, and Geerts A. Somatostatin suppresses endothelin-1-induced rat hepatic stellate cell contraction via somatostatin receptor subtype 1. *Gastroenterology*, 121(4):915--30, 2001.
- [626] McCuskey RS. Anatomy of efferent hepatic nerves. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 280(1):821--6, 2004.
- [627] R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013.
- [628] Schultz S and et al. Differential distribution of alternatively spliced somatostatin receptor 2 isoforms (sst2A and sst2B) in rat spinal cord. *Neurosci Lett*, 257:37--40, 1998.
- [629] Schultz S and et al. Immunocytochemical detection of Somatostatin receptors sst1, sst2A, sst2B and sst3 in Paraffin embedded breast cancer tissue using subtype-specific antibodies. *Clin Can Res*, 4:2047--2052, 1998.
- [630] Schultz S and et al. Immunocytochemical localization of somatostatin receptor sstr2A in the rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci*, 10:3700--3708, 1998.
- [631] Schultz S and et al. Immunohistochemical determination of five somatostatin receptors in meningioma reveals frequent overexpression of

-
- somatostatin receptor subtype sstr2A. *Clin Cancer Res*, 6:1865--1874, 2000.
- [632] van Hagen PM, Dalm VA, Staal F, and Hofland LJ. The role of cortistatin in the human immune system. *Mol Cell Endocrinol*, 286(1-2):141--7, 2008.
- [633] Schonbrunn A. Selective agonism in somatostatin receptor signaling and regulation. *Mol Cell Endocrinol*, 286(1-2):35--9, 2008.
- [634] Jung Y1, Oh SH, Witek RP, and Petersen BE. Somatostatin stimulates the migration of hepatic oval cells in the injured rat liver. *Liver Int*, 32(2):312--20, 2012.
- [635] Rockey DC and Chung JJ. Interferon gamma inhibits lipocyte activation and extracellular matrix mRNA expression during experimental liver injury: implications for treatment of hepatic fibrosis. *J Investig Med*, 42:660--670, 1994.
- [636] Bouros D, Antoniou KM, Tzouveleakis A, and Siafakas NM. Interferon- γ 1b for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Opin Biol Ther*, 6(10):1051--1060, 2006.
- [637] Oldroyd SD1, Thomas GL, Gabbiani G, and El Nahas AM. Interferon-gamma inhibits experimental renal fibrosis. *Kidney Int*, 56(6):2116--27, 1999.
- [638] Louvet A, Teixeira-Clerc F, Chobert MN, Deveaux V, Pavoine C, Zimmer A, Pecker F, Mallat A, and Lotersztajn S. Cannabinoid CB2 receptors protect against alcoholic liver disease by regulating Kupffer cell polarization in mice. *Hepatology*, 54(4):1217--26, 2011.

-
- [639] Petrich A1, Mann A, Kliewer A, Nagel F, Strigli A, Märtens JC, Pöll F, and Schulz S. Phosphorylation of threonine 333 regulates trafficking of the human sst5 somatostatin receptor. *Mol Endocrinol*, 27(4):671--82, 2013.
- [640] Pérez de Obanos MP, López Zabalza MJ, Prieto J, Herraiz MT, and Iraburu MJ. Leucine stimulates procollagen alpha1(I) translation on hepatic stellate cells through ERK and PI3K/Akt/mTOR activation. *J Cell Physiol*, 209(2):580--6, 2006.
- [641] Searl TJ and Silinsky EM. LY294002 inhibits adenosine receptor activation by a mechanism independent of effects on PI-3 kinase or casein kinase II. *Purin Sign*, 1(4):389--394, 2005.
- [642] Chan ES, Montesinos MC, Fernandez P, Desai A, Delano DL, Yee H, Reiss AB, Pillinger MH, Chen JF, Schwarzschild MA, Friedman SL, and Cronstein BN. Adenosine A(2A) receptors play a role in the pathogenesis of hepatic cirrhosis. *Br J Pharmacol*, 148(8):1144--55, 2006.
- [643] Rietz A, Volkov Y, Davies A, Hennessy M, and Spiers JP. Okadaic acid induces matrix metalloproteinase-9 expression in fibroblasts: crosstalk between protein phosphatase inhibition and β -adrenoceptor signalling. *Br J Pharmacol*, 165(1):274--88, 2012.
- [644] Garcia A, Cayla X, Guergnon J, Dessauge F, Hospital V, Rebollo MP, Fleischer A, and Rebollo. Serine / threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. *A Biochimie*, 85 (8):721--726, 2003.
- [645] Wang L, Wang X, Chen J, Yang Z, Yu L, Hu L, and Shen X. Activation

of protein serine/threonine phosphatase PP2C α efficiently prevents liver fibrosis. *PLoS One*, 5(12):e14230, 2010.