

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:

***Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ  
ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ  
ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ***

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Ε. ΞΥΔΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2004

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΗΛΙΑΣ ΚΟΥΡΟΥΜΑΛΗΣ  
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ  
ΑΧΙΛΛΕΑΣ ΓΡΑΒΑΝΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

### **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΗΛΙΑΣ ΚΟΥΡΟΥΜΑΛΗΣ  
ΑΧΙΛΛΕΑΣ ΓΡΑΒΑΝΗΣ  
ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΤΣΙΦΤΣΗΣ  
ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΠΟΥΜΠΑΣ  
ΚΥΡΙΑΚΗ ΘΕΡΜΟΥ  
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΛΙΟΣ  
ΕΛΕΝΗ ΠΑΠΑΔΑΚΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γαστρεντερολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης με Διευθυντή τον Καθηγητή κ. Ηλία Κουρούμαλη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μέντορά μου, επιβλέποντα Καθηγητή κ. Ηλία Κουρούμαλη για την πολύτιμη καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη, την αμέριστη συμπαράσταση και τις ευκαιρίες που μου έδωσε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής. Τον ευχαριστώ για τη διεισδυτική επιστημονική του σκέψη και την ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια στο ξεκίνημα της επιστημονικής μου καριέρας. Ο Καθηγητής κ. Κουρούμαλης θα είναι πάντοτε για μένα πρότυπο Επιστήμονα και Ανθρώπου με υψηλό ηθικό ανάστημα.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γεώργιο Κολιό για τη συμβολή του και τη σημαντικότερη βοήθειά του στην ολοκλήρωση των πειραμάτων, στη συγγραφή των επιστημονικών άρθρων και της παρούσας διατριβής, του οποίου η πολυετής πείρα αποδείχθηκε ανεκτίμητη.

Τέλος, ευχαριστώ τους φίλους και συναδέλφους Γεώργιο Νότα και Βασίλειο Βαλάτα για την εμπιστοσύνη, την ομαδικότητα, τη σκληρή δουλειά και την ανεκτίμητη βοήθεια και συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια, η οποία ελπίζω πως θα έχει και συνέχεια.

*στη μνήμη της μητέρας μου*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	<b>8</b>
<b>ΑΠΟΠΤΩΣΗ</b> .....	<b>9</b>
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ: Ο ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ .....	11
Η Φιλοσοφία Του Προγραμματισμένου Κυτταρικού Θανάτου .....	13
Κασπάσες .....	16
<b>Τα μιτοχόνδρια, το κυτταρόχρωμα c και το Araf-1 στην απόπτωση</b> .....	22
Οι υποδοχείς κυτταρικού θανάτου .....	29
<b>Οι Υποδοχείς TNF</b> .....	37
<b>Οι υποδοχείς των πρωτεϊνών TRAIL</b> .....	42
ΟΙ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ .....	45
<b>Ο επαγόμενος από την ογκοπρωτεΐνη κυτταρικός θάνατος</b> .....	45
Η οικογένεια της Bcl-2 .....	50
<b>Η Bcl-2</b> .....	50
<b>Τα άλλα μέλη της οικογένειας του Bcl-2</b> .....	51
<b>Το Bcl-x<sub>L</sub></b> .....	52
<b>Το Bax</b> .....	54
<b>Το Bad και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας του Bcl-2 με μοναδικό τμήμα BH3</b> .....	56
<b>Η λειτουργία της οικογένειας του Bcl-2</b> .....	58
<b>Το P53 και η απόπτωση</b> .....	63
<b>ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ</b> .....	<b>71</b>
ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ .....	72
Μέθοδοι που μετρούν την αποδόμηση του DNA .....	73
ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΥ ΜΕΤΡΟΥΝ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ ΠΟΥ ΕΠΑΓΟΥΝ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ (ΚΑΣΠΑΣΕΣ) .....	76
ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΕ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ .....	78
<b>Η ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΗΜΑΝΣΗΣ TUNEL</b> .....	79
Μέθοδοι που Ανιχνεύουν τις μεμβρανικές μεταβολές .....	82
<b>ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ</b> .....	83
<b>ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ KUPFFER ΚΑΙ ΚΟΛΠΟΕΙΔΗ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ</b> .....	<b>85</b>
<b>ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΟΛΠΟΕΙΔΗ</b> .....	85
<b>ΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΙΚΟΥ ΚΟΛΠΟΕΙΔΟΥΣ</b> .....	86
Διήθηση .....	86
<b>Η Ρύθμιση της ροής του αίματος στο ηπατικό κολποειδές</b> .....	87
<b>Η Ενδοκυττάρια λειτουργία</b> .....	88
<b>ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ KUPFFER</b> .....	88
<b>Ιστορικά στοιχεία, Προέλευση, Διαφοροποίηση και Ωρίμανση των κυττάρων του         Kupffer</b> .....	91
<b>Πολλαπλασιασμός των κυττάρων του Kupffer</b> .....	93
Βιολογική συμπεριφορά των κυττάρων του Kupffer .....	95
<b>Άμυνα έναντι μικροβίων και καρκινικών κυττάρων - Φαγοκυττάρωση</b> .....	95
<b>Αφαίρεση της Ενδοτοξίνης</b> .....	97
<b>Βιολογικά δραστικές ουσίες των κυττάρων Kupffer - Ο ρόλος τους στην ανοσολογική         απάντηση στο ήπαρ</b> .....	99
<b>Συμμετοχή των κυττάρων Kupffer στην ηπατική βλάβη</b> .....	102
Ο ρόλος των κυττάρων Kupffer στην ρύθμιση της εξωκυττάριας ουσίας στην ηπατική ίνωση .....	105
<b>Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ KUPFFER ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΗΠΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟ</b> .....	108
Κύτταρα Kupffer και καρκίνος .....	109
Τα κύτταρα Kupffer και η αλκοολική ηπατική νόσος .....	110
Κύτταρα Kupffer και μεταμόσχευση ήπατος .....	112
<b>ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΙΝΩΣΗ</b> .....	<b>114</b>
<b>ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΑΣΕΣ ΤΟΥ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΙΣΤΟΥ</b> .....	114
Οι μεταλλοπρωτεάσες και η ηπατική ίνωση .....	116

Κολλαγενάσες.....	117
ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟ.....	118
tPA.....	118
uPA.....	119
TGF-β.....	121
ΛΕΠΤΙΝΗ.....	123
<b>ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ</b> .....	<b>125</b>
Σωματοστατίνη : Παραγωγή και Δράσεις.....	126
Οι υποδοχείς της σωματοστατίνης.....	128
Τα Συνθετικά ανάλογα της σωματοστατίνης.....	131
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>134</b>
<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	<b>135</b>
<b>Σκοπός</b> .....	<b>136</b>
<b>ΥΛΙΚΑ</b> .....	<b>137</b>
Πειραματόζωα.....	137
Κατασκευή Διαλυμάτων.....	145
Απομόνωση και καλλιέργεια κυττάρων του Kupffer.....	145
<b>ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>148</b>
<b>1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ KUPFFER ΑΠΟ ΗΠΑΡ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ</b> .....	<b>148</b>
Α. Ενζυμική πέψη του ηπατικού ιστού.....	148
Β. Φυγοκέντρηση με διάλυμα Iodixanol (Opripter™).....	151
Γ. Κλασματικός διαχωρισμός σε φυγόκεντρο εκλούσεως (εμπλουτισμός των κυττάρων του Kupffer).....	152
Δ. Προσκόλληση στον πυθμένα βοθρίων καλλιέργειας.....	155
<b>Συλλογή Δειγμάτων</b> .....	<b>157</b>
Συλλογή υπερκευμένου (μελέτη έκκρισης πρωτεΐνης εξωκυττάρια).....	157
Συλλογή κυτταρικού πληθυσμού με Trizol (μελέτη σε επίπεδο RNA-DNA) και με κυτταρόλυση (μελέτη σε επίπεδο πρωτεΐνης ενδοκυττάρια).....	157
<b>2. ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ</b> .....	<b>158</b>
Πρωτογενής ανοσολογική απάντηση των κυττάρων του Kupffer.....	158
Α. Βασική παραγωγή ινωτικών και αντί-ινωτικών παραγόντων.....	158
Β. Πρωτογενής ανοσολογική απάντηση των κυττάρων Kupffer. Η επίδραση της ενδοτοξίνης.....	158
Γ. Πρωτογενής ανοσολογική απάντηση των κυττάρων του Kupffer. Η επίδραση της οκτρεοτίδης.....	159
Δ. Ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτογενούς ανοσολογικής απαντήσεως παραγόντων που ενέχονται στην ίνωση.....	159
<b>3. ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ</b> .....	<b>161</b>
Απομόνωση RNA ομογενοποιημάτων σε διάλυμα φαινόλης (Trizol).....	161
Μέτρηση καθαρότητας RNA.....	161
Επίδραση με DNase.....	162
Ανάστροφη Μεταγραφή.....	162
Πολλαπλή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Multiplex PCR).....	163
Η έκφραση αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών γονιδίων.....	163
Παρασκευή Μείγματος Αντίδρασης Multiplex PCR.....	164
Ανίχνευση των προϊόντων της Multiplex PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.....	165
<b>4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ</b> .....	<b>166</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>167</b>
<b>1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑΤΑ BRADFORD.</b>	<b>167</b>

<b>2. ΠΡΩΤΟΓΕΝΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΚΥΡFFER. Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΝΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙ-ΙΝΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ.</b>	
.....	167
A. Έκκριση κολλαγενάσης (MMP-1).....	167
B. Παραγωγή uPA.....	169
Γ. Παραγωγή TGF-β1.....	170
Δ. Παραγωγή λεπτίνης.....	172
<b>3. ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ.....</b>	<b>173</b>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>180</b>
A. Η επίδραση του συνθετικού αναλόγου της σωματοστατίνης (οκτρεοτίδη) και του LPS στην έκκριση παραγόντων που σχετίζονται με την ίωση. Πρωτογενής ανοσολογική απάντηση των κυττάρων του Kupffer.....	180
B. Η επίδραση του συνθετικού αναλόγου της σωματοστατίνης (οκτρεοτίδη) και του LPS στην έκφραση αποπτωτικών γονιδίων από τα κύτταρα του Kupffer. ....	183
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>186</b>
<b>SUMMARY - CONCLUSIONS</b>	<b>188</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>190</b>

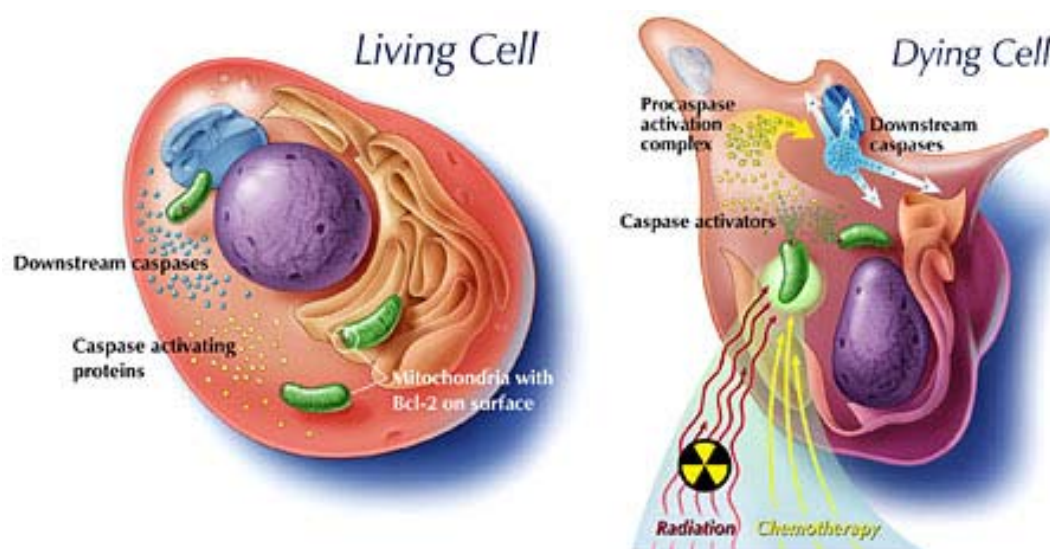
# ***ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***



# ΑΠΟΠΤΩΣΗ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο κυτταρικός θάνατος είναι μία φυσιολογική βιολογική διαδικασία των πολυκύτταρων οργανισμών και των ιστών που τους αποτελούν, με σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, συντήρηση και επιβίωση τους. Η διαδικασία αυτή εμφανίζεται καθ' όλη τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου των πολυκύτταρων οργανισμών και αποτελεί τη μόνη μη αναστρέψιμη βιοχημική πορεία στη μοίρα του κυττάρου (1).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του κυττάρου κατά τη φυσιολογική και αποπτωτική διαδικασία.

Η απόπτωση είναι η πλέον κυρίαρχη μορφή του φυσιολογικού κυτταρικού θανάτου. Αποτελεί μια ρυθμιζόμενη λειτουργία που ελέγχεται από πληθώρα ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων παραγόντων η οποία με τη σειρά της ελέγχει το θάνατο των υπεράριθμων, βλαβερών, κατεστραμμένων, ή κυττάρων που έχουν ολοκληρώσει το βιολογικό τους κύκλο. Η αποπτωτική διαδικασία περιλαμβάνει μηχανισμούς αποδόμησης και απορρόφησης των κυττάρων με τρόπο ώστε να αποφευχθεί η πρόκληση φλεγμονής στον περιβάλλοντα ιστό. Η λειτουργία αυτή έχει αποδειχθεί

σημαντικότερη στους ανώτερους οργανισμούς, όπου απαιτείται ο διαχωρισμός των φυσικά θανόντων κυττάρων από κύτταρα που πεθαίνουν λόγω κάποιου τραυματισμού, ως μέρος της διατήρησης της ομοιοστασίας (2).

Η βίαιη άρση της ομοιοστασίας σε οποιοδήποτε κύτταρο ή ιστό είναι δυνατό να προκαλέσει παθολογικές καταστάσεις στους πολυκύτταρους οργανισμούς. Η αλλαγή αυτή στον έλεγχο της ισορροπίας μεταξύ θανάτου και επιβίωσης συμμετέχει στην παθογένεση πολλών ασθενειών στον άνθρωπο (1;3). Ασθένειες που συνδέονται με τον περιορισμό της απόπτωσης είναι ο καρκίνος(4);(5), τα αυτοάνοσα νοσήματα (6);(7) και οι ιογενείς λοιμώξεις (8), ενώ η απόπτωση επικρατεί είναι AIDS (9), στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες (10);(11);(12), στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (13), στις ισχαιμικές βλάβες (14) και στις τοξικές βλάβες του ήπατος (15). Σε αρκετές περιπτώσεις, είναι ασαφές εάν οι διαταραχές στο μηχανισμό του κυτταρικού θανάτου οφείλονται στον οργανισμό ή είναι αποτέλεσμα της εξέλιξης της νόσου. Παρόλα αυτά, οι προσπάθειες που έχουν ως σκοπό τη θεραπεία αυτών των νόσων με τον έλεγχο της αποπτωτικής διαδικασίας είναι ενθαρρυντικές και έχουν προχωρήσει αρκετά τα τελευταία χρόνια (5);(16).

## ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ: Ο ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ

Ιστορικά, η απόπτωση έχει οριστεί βάσει της μορφολογίας της σε σχέση με τη

νέκρωση. Το νεκρωτικό κύτταρο

διαστέλλεται και η χρωματίνη του

παίρνει τη μορφή μιας πεπλατυμένης

μάζας της οποίας η διάλυση δίνει τη

θέση της σε ένα “πυρηνικό

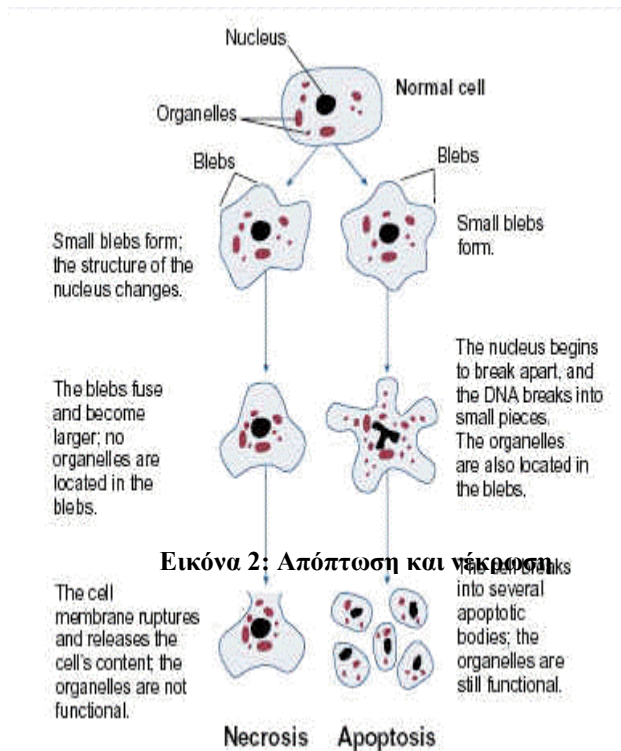
φάντασμα”.

Το DNA του αποπτωτικού κυττάρου

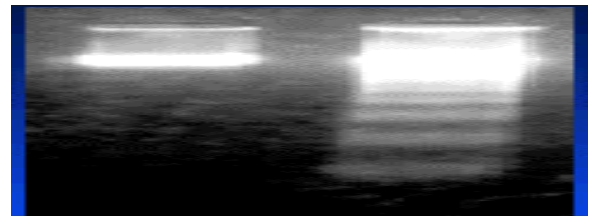
ακανόνιστα και παίρνει τη μορφή

νέφους

αγαρόζης.



Εικόνα 2: Απόπτωση και νέκρωση



Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά γεγονότα της απόπτωσης λαμβάνει χώρα στον

πυρήνα του κυττάρου, όπου η χρωματίνη συμπυκνώνεται, σχηματίζοντας

μικροσκοπικά σφαιρίδια

κοντά στην πυρηνική

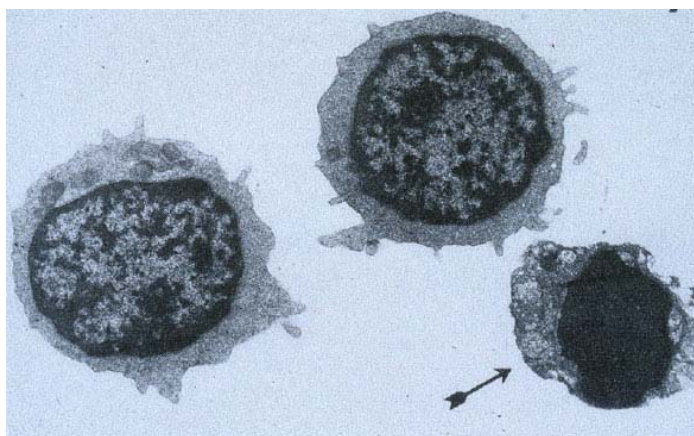
μεμβράνη, η οποία με τη

σειρά της συσπειρώνεται, ενώ

ο πυρηνίσκος εξαπλώνεται

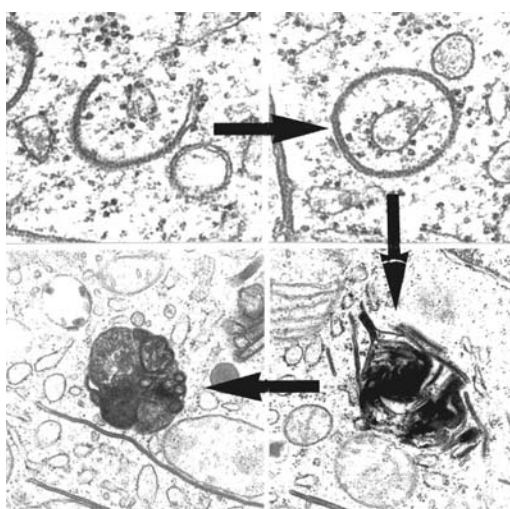
και φαίνεται ασυνήθιστα

κοκκιώδης (17). Η χρωματίνη



Εικόνα 3: Αποπίπτον κύτταρο, η συμπύκνωση της χρωματίνης

είναι αντικείμενο δράσης διαφορετικών ενδονουκλεασών, οι οποίες αρχικά τεμαχίζουν το DNA σε κλάσματα μεγέθους 50-300 kbp και έπειτα σε κλάσματα των 180 bp(18). Συγχρόνως, το αποπίπτον κύτταρο συρρικνώνεται σχηματίζοντας επιφανειακά μεμβρανικές φολίδες, ενώ τα περιβάλλοντα κύτταρα το περιστοιχίζουν δημιουργώντας στενό κυτταρικό κλοιό. Στη φάση αυτή, το αποπίπτον κύτταρο επιδεικνύει μεμβρανική αντοχή, ενώ τα οργανίδια εντός του συρρικνωμένου κυτταροπλάσματος διατηρούν τη φυσιολογική τους εμφάνιση με εξαίρεση του ενδοπλασματικού δικτύου και των μιτοχονδρίων τα οποία εμφανίζονται πλατύτερα του φυσιολογικού (19). Η μεταμόρφωση του αποπτωτικού κυττάρου είναι σύντομη και τυπικά διαρκεί μόνο 10-30 λεπτά, ενώ ολοκληρώνεται με τη φαγοκυττάρωση του αποπτωτικού κυττάρου από τα περιβάλλοντα κύτταρα ή από ειδικά φαγοκύτταρα (20;21). Η αναγνώριση και φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών κυττάρων από τα περιβάλλοντα κύτταρα ρυθμίζεται από ποικίλες αντιδράσεις μεταξύ ανεξάρτητων υποδοχέων και συνδετών (22). Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των αποπτωτικών κυττάρων που εμπλέκεται στη φαγοκυττάρωση τους είναι η ενεργοποίηση ενός ειδικού ενζύμου (φλιπάση) που διαμεσολαβεί στη μεταφορά της φωσφατιδυλσερίνης



**Εικόνα 4: Η διαδικασία της αυτοφαγίας**

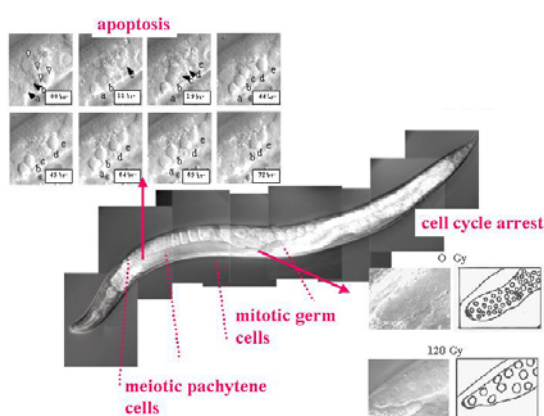
από την κυτταροπλασματική πλευρά στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης (23).

Μια άλλη διακριτή μορφή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου είναι η διαδικασία της αυτοφαγίας, ή αλλιώς της αποδόμησης των κυτταρικών πρωτεϊνών μέσω της αυτοσωμικής-λυσosomalικής οδού

(Golgi, λυσοσώματα) (19), η οποία ελέγχεται από στεροειδή και εικάζεται ότι είναι ανύπαρκτη στα καρκινικά κύτταρα (24).

### Η Φιλοσοφία Του Προγραμματισμένου Κυτταρικού Θανάτου.

Ο φυσιολογικά προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος έχει περιγραφεί σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς που έχουν μελετηθεί ως σήμερα (25;26). Ο οργανισμός *Caenorhabditis elegans* έχει αποδειχθεί ο πιο κατάλληλος για τη μελέτη του κυτταρικού θανάτου σε επίπεδο κυττάρου, γενετικού υλικού και μοριακού



Εικόνα 5: Η απόπτωση και η άρση του κυτταρικού κύκλου στο σκώληκα *Caenorhabditis elegans*

επιπέδου για δύο λόγους: επειδή είναι μακροσκοπικά διαφανής και εξελικτικά αμεταμόρφωτος. Το γεγονός αυτό έχει επιτρέψει την πλήρη περιγραφή καθενός από τα 1090 κύτταρα του που αναπλάθονται κατά τη μεταμόρφωσή του σε ενήλικο ερμαφρόδιτο. Στη συγκεκριμένη διαδικασία, 131 από τα κύτταρά του αποπίπτουν για να απομείνουν 959 κύτταρα στον ενήλικα οργανισμό. Η λεπτομερής γνώση της διαδικασίας του θανάτου των κυττάρων αυτών κατέστη η βάση για τη δυνατότητα ανίχνευσης και άμεσης σύγκρισης των μεταλλαγμένων μορφών τους. Η ανάλυσή τους κατέδειξε τα γονίδια που ελέγχουν τα τέσσερα στάδια της αποπτωτικής διαδικασίας: την αναγνώριση, την εκτέλεση του κυτταρικού θανάτου, την εγκόλπωση του νεκρού κυττάρου και την αποδόμηση του γενετικού του υλικού (27;28).

Τρία είναι τα γονίδια που εμπλέκονται στο κρίσιμο σημείο της “εκτέλεσης” του κυττάρου. Δύο από αυτά, το *ced* (**cell-death defective**)-3 και το *ced-4* είναι απαραίτητα για κάθε κυτταρικό θάνατο. Εάν τα γονίδια αυτά απενεργοποιηθούν με μεταλλαγή, δεν πεθαίνει κανένα από τα 131 κύτταρα που υπό κανονικές συνθήκες είναι καταδικασμένα σε απόπτωση(29). Το τρίτο γονίδιο, *ced-9*, δρα ως ανταγωνιστής των άλλων δύο γονιδίων (3). Τα κύτταρα που ενεργοποιούν το γονίδιο αυτό δεν πεθαίνουν, ενώ όταν αδρανοποιηθεί τεχνητά με μεταλλαγή, η αποπτωτική διαδικασία γίνεται ευρύτερη σε διαστάσεις και περιλαμβάνει περισσότερα από τα 131 κύτταρα. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει γνωστές πολλές από τις μοριακές λειτουργίες των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *ced-3*, -4 και -9. Το εκτελεστικό γονίδιο *ced-3*, κωδικοποιεί το ένζυμο Ced-3, μέλος της οικογένειας των κυστεϊνικών πρωτεασών οι οποίες δρουν στα σημεία της αλληλουχίας των πρωτεϊνών που έπονται μορίου ασπαρτικού οξέος και γι’ αυτό ονομάζονται κασπάσες (**Caspases - Cysteine aspartic acid proteases**). Η οικογένεια των κασπασών διακρίνεται για τις ομοιότητες στην μεταξύ τους αλληλουχία αμινοξέων που τις αποτελούν, αλλά και τη δομή και την ειδικότητα του υποστρώματος το οποίο διασπών (30) . Όλες οι κασπάσες αποτελούνται από τρία τμήματα (αμινομάδα, μείζον στέλεχος(~20kDa) και ελάσσον στέλεχος(~10kDa)) και συντίθενται ως ανενεργά ζυμογόνα (προκασπάσες) μεγέθους 30-50kDa των οποίων η ενεργοποίηση περιλαμβάνει την προτεολυτική επεξεργασία των στελεχών που τις απαρτίζουν, ακολουθούμενη από σύνδεση του μείζονος και του ελάσσονος στελέχους μεταξύ τους, τα οποία σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές (31). Το ετεροδιμερές ενώνεται με άλλη, ενεργοποιημένη κασπάση, σε ένα ενεργό τετραμερές μόριο  $\alpha_2\beta_2$ . Η πρωτεΐνη Ced-4 αντιδρά φυσιολογικά με τις πρωτεΐνες Ced-3 και Ced-9, ενώ εμφανίζεται ως τροποποιητική διευκολύνοντας την αυτοενεργοποίηση της Ced-3. Η Ced-4 φέρει μια θέση ΑΤΡάσης (ενωμένης με νουκλεοτίδιο) η οποία είναι

απαραίτητη για την ενεργοποίηση της Ced-3, αλλά, τυχόν αλληλεπίδραση της Ced-4 με τον αναστολέα της απόπτωσης Ced-9, αναστέλλει την ικανότητα της Ced-4 να ενεργοποιεί την Ced-3 (32).

Ο αποπτωτικός μηχανισμός των Ced-3, Ced-4 και Ced-9 είναι ιδιαίτερα καλά διατηρημένος στα μετόζωα. Η Ced-3 είναι ομόλογη με παρόμοια ένζυμα που συναντώνται σε έντομα και σπονδυλωτά, ενώ στα θηλαστικά έχει ως ομόλογο τον ενζυμικό μετατροπέα της IL-1β (Interleukin-1β Converting Enzyme –ICE) (9). Σήμερα είναι γνωστές 14 κασπάσες στα θηλαστικά (30).

Τα ομόλογα της Ced-9 στα θηλαστικά είναι η οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2, που θεωρούνται σημαντικές στη ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης (33). Έχει καταδειχθεί ο ρόλος της Ced-9 ως αναστολέα της απόπτωσης στον *C.elegans* με δύο ανεξάρτητους μηχανισμούς:

- Άμεσος, στην πρωτεάση της Ced-3 με αλληλεπίδραση που περιλαμβάνει τα σημεία διάσπασής της εντός του μορίου της Ced-9 και
- Έμμεσος, στην Ced-3 μέσω ενός μηχανισμού προστασίας παρόμοιου με αυτόν της Bcl-2 στα θηλαστικά. Η διάσπαση της Ced-3 από την Ced-9 παράγει ένα καρβοξυλικό προϊόν που προσομοιάζει στη μορφολογία και λειτουργία της Bcl-2. (34)

Το ομόλογο της Ced-4 στα θηλαστικά είναι το **Apaf-1** (Apoptotic protease activating factor), μια μεγάλη σε μέγεθος πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη ρύθμιση της λειτουργίας των κασπασών και, διαμεσολαβώντας του κυτταροχρώματος c, στην ενεργοποίηση της κασπάσης-9 (35;36).

## Κασπάσες

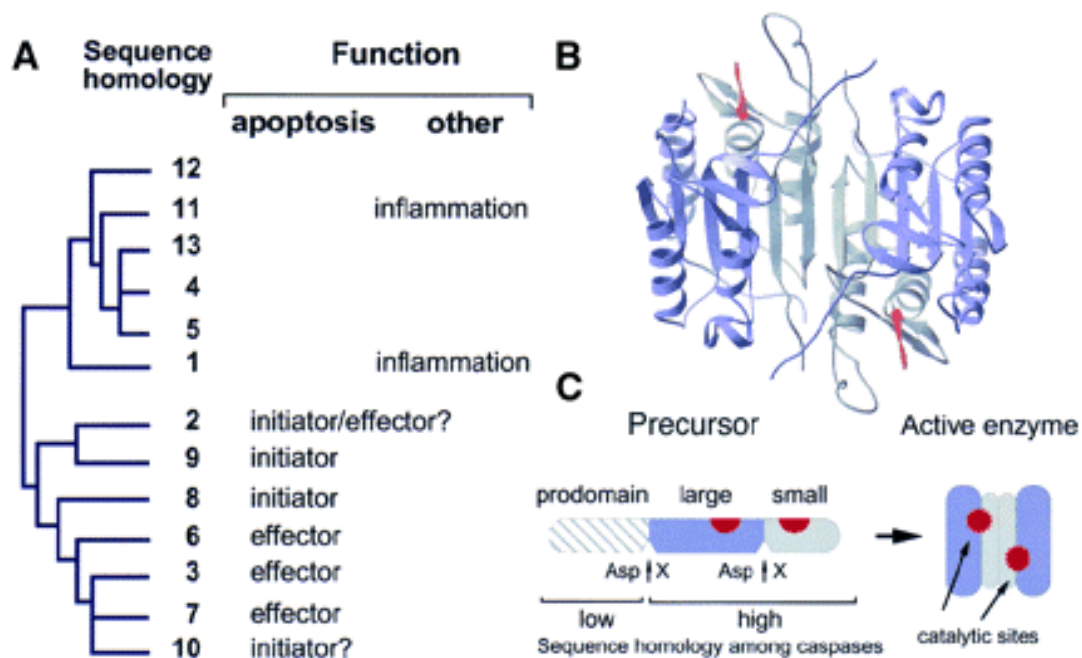
Οι κασπάσες, η οικογένεια των κυστεϊνικών πρωτεασών που σχετίζονται με το Ced-3, είναι κοινές στη δράση της κλασσικής απόπτωσης στα μετόζωα. Το πρώτο ομόλογο της Ced-3 που ανακαλύφθηκε στα θηλαστικά ήταν το ICE, που τώρα αποκαλείται κασπάση-1 (37). Οι κασπάσες 1 και 11 (και ίσως και οι 4 και 5) εμπλέκονται στην πρωτεολυτική ωρίμανση των κυτταροκινών όπως της ιντερλευκίνης-1β αλλά θεωρείται ότι έχουν ελάχιστη σχέση με την απόπτωση. Έχει αποδειχθεί η ύπαρξη άλλων 10 μελών της οικογένειας του ICE, εκ των οποίων οι κασπάσες -2, -3, -6, -7, -8, -9, -10, -12, -13 και -14, εμπλέκονται στη ρυθμιστική ή/και στην εκτελεστική λειτουργία της απόπτωσης: Nedd-2/ICH-1 (caspase-2), Yama/CPP32/apopain (caspase-3), Tx/ICH-2/ICErelII (caspase-4), ICErelIII (caspase-5), Mch-2 (caspase-6), ICE-Lap-3/Mch-3/CMH-1 (caspase-7), FLICE/MACH (caspase-8), ICE-LAP-6 (caspase-9), Mch-4/FLICE-2 (caspase-10), ICH-3 (caspase-11), caspase-12, ERICE (caspase-13) και MICE (caspase-14) (30).

Όταν οι κασπάσες ενεργοποιηθούν, είτε άμεσα (με αυτοενεργοποίηση – ως μέρος της σειράς των αντιδράσεων που προκαλούν) ή έμμεσα (από άλλες πρωτεάσες που δεν είναι κασπάσες, όπως το granzyme B) καταλύουν μια σειρά από υποστρώματα που μεσολαβούν ή συμμετέχουν στην αποπτωτική διαδικασία (38), ενώ οι αναστολείς των κασπασών (όπως οι ιϊκές πρωτεΐνες (2), οι αλδεϋδες (39), ή οι φθοριομεθυλκετόνες (29)) αποτρέπουν την έναρξη ή την πρόοδο της απόπτωσης στα θηλαστικά.

Οι κασπάσες έχουν πολλά κοινά στοιχεία μεταξύ τους σε δομικό και λειτουργικό επίπεδο. Όλες περιέχουν ένα πενταπεπτίδιο το οποίο είναι το ενεργό τους κέντρο αλληλουχίας Gln-Ala-Cys-X-Gly (όπου X είναι Arg, Gln ή Gly), με την κυστεΐνη να



εμπλέκεται άμεσα στην κατάλυση. Στο κυρίως μέρος τους, οι κασπάσες αναγνωρίζουν μια τετραμερή βασική αλληλουχία στο υπόστρωμά τους με διακριτή την ανάγκη για ένα μόριο ασπαρτικού οξέος σε αυτό στη θέση P1. Καθώς τα τετραπεπίδια τα οποία ανταποκρίνονται στο υπόστρωμα P4-P1 είναι συγκεκριμένα για να τα αναγνωρίζουν οι κασπάσες, έχουν αποτελέσει τη βάση για το σχεδιασμό μιας σειράς αναστολέων. Η φυλογενετική ανάλυση των κασπασών έχει οδηγήσει στο διαχωρισμό τους σε τρεις κατηγορίες, καθεμιά από τις οποίες διαφέρει στην ειδικότητα του υποστρώματος που σχετίζεται με τη δράση τους. (38) Η υποοικογένεια ICE ή των “επεξεργαστών των κυτταροκινών” (οι κασπάσες -1, -4, -5, και 11 – και λόγω της ομολογίας προς την κασπάση -1, οι κασπάσες -12, -13 και -14 εντάσσονται σ’ αυτήν την κατηγορία), η υποοικογένεια των “εκτελεστών της απόπτωσης” Ced-3/CPP32 (κασπάσες -3, -6 και -7) και η υποοικογένεια των “ενεργοποιητών της απόπτωσης” ICH-1/Nedd-2 (κασπάσες -2, -8, -9 και -10) (2).



Εικόνα 6: Η οικογένεια των κασπασών: Α. Η μεταξύ τους ομολογία αλληλουχίας και η λειτουργία τους, Β. Η Τριδιάστατη μορφή των κασπασών (τα βέλη δείχνουν τα ενεργά κέντρα) και C. Η προενζυμική και ενεργός μορφή των κασπασών.

Οι κασπάσες, όπως προελέχθη, συντίθενται ως προένζυμα τα οποία δέχονται πρωτεολυτική επεξεργασία για να ενεργοποιηθούν. Οι ενεργές κασπάσες συντίθενται από ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από ένα μεγάλο τμήμα (το P20 στην κασπάση-1, το P17 στην κασπάση-3) το οποίο περιέχει το μόριο κατάλυσης της κυστεΐνης, και ένα μικρότερο τμήμα (το P10 στην κασπάση-1, το P12 στην κασπάση-3) το οποίο περιέχει ένα μόριο προσδιορισμού που ελέγχει την ειδικότητα του υποστρώματος (40). Μελέτες κρυσταλλογραφίας της κασπάσης-1 έχουν καταδείξει την ύπαρξη δύο λειτουργικά ανεξάρτητων P20/P10 ετεροδιμερών που είναι άμεσα συνδεδεμένα για να σχηματίσουν το (P20/P10)<sub>2</sub> -τετραμερές στο οποίο τα δύο ενεργά κέντρα είναι τοποθετημένα αντιδιαμετρικά. Οι προκασπάσες ενεργοποιούνται με διάσπαση στο σημείο του ασπαρτικού που οι ίδιες αναγνωρίζουν στο υπόστρωμα. Αυτό σημαίνει ότι οι κασπάσες ακολουθούν μια ιεραρχία στην οποία υφίστανται αυτό- ή έτερο-ενεργοποίηση. Π.χ. υπάρχουν ερευνητικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η κασπάση-8 αυτοενεργοποιείται με κάποιο σύμπλοκο διαβιβαστή υποδοχέα θανάτου (41) (η πλήρης σε μήκος κασπάση-8 έχει την ικανότητα πρωτεολυτικής ενεργοποίησης και ως ζυμογόνο αυτοενεργοποιείται) και το ενεργό ένζυμο με τη σειρά του ενεργοποιεί τις κασπάσες -3 και -7 οι οποίες εκτελούν το αποπτωτικό πρόγραμμα. Η κασπάση-9 δεν είναι απαραίτητο να υποστεί πρωτεολυτική επεξεργασία, αλλά πρέπει να συνδεθεί με το Araf-1 με το οποίο σχηματίζει ολοένζυμο.

Οι προκασπάσες εμπεριέχουν αμινοξεική αλληλουχία της οποίας η αφαίρεση τις καθιστά ενεργά ένζυμα. Τα τμήματα αυτά ποικίλλουν σε μήκος και για ορισμένες κασπάσες φτάνουν τα 40 αμινοξέα, ενώ σε άλλες εμφανίζονται μεγαλύτερου μεγέθους με κοινές αλληλουχίες. Τα αμινοξεινικά τμήματα αυτά φαίνεται να έχουν

ρυθμιστικό ρόλο στη δράση των ενζύμων κατά τις καταστάσεις απόπτωσης ή λοίμωξης (42;43). Οι κασπάσες -8 και -10, εμφανίζουν ένα τέτοιο τμήμα-διαμεσολαβητή του κυτταρικού θανάτου, το οποίο όταν συνδεθεί με τον υποδοχέα TNF-R1/CD95 ενεργοποιείται εγείροντας διαδικασία απόπτωσης (44).

Ο επίτοπος CARD (**Caspase Recruitment Domain**), ο οποίος εμφανίζεται στις κασπάσες -1, -2, -4, -9, το Ced-3 αλλά και το Araf-1, εμπλέκεται σε ειδικές ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις της ενεργοποίησης των κασπασών. Τα CARDS και τα DEDs (**Death Effector Domains**) όπως και τα DDs (**Death Domains**) περιέχουν έξι αντιπαράλληλους α-έλικες (38).

Μελέτες γενετικού αποκλεισμού σε ποντίκια έχουν καταδείξει την ακριβή λειτουργία των κασπασών. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η επαγωγή της απόπτωσης ως αποτέλεσμα διαφορετικών ερεθισμάτων, έχει διαφορετική οδό κατά περίπτωση.

Τα ποντίκια που στερούνται κασπάσης-1 έχουν φυσιολογική ανάπτυξη, είναι γόνιμα, φαινοτυπικά υγιή και δεν δείχνουν καμία ανωμαλία στις λειτουργίες τους και στις διαδικασίες όπου εμφανίζεται το φαινόμενο της απόπτωσης. Όμως, τα θυμοκύτταρά τους είναι ανθεκτικά στην από το CD95 επαγόμενη απόπτωση, γεγονός που καταδεικνύει το ρόλο της κασπάσης-1 στην έναρξη της διαδικασίας όταν συμμετέχει το CD95.

Τα ποντίκια που στερούνται κασπάσης-11 δείχνουν ανάλογη συμπεριφορά, με έλλειψη στην παραγωγή IL-1β αλλά αναπτύσσονται φυσιολογικά και δεν έχουν σημαντικές διαφορές στην απόπτωση (2).

Τα ποντίκια χωρίς κασπάση-3 είναι μικρότερα σε μέγεθος από τα φυσιολογικά και πεθαίνουν εντός 1-3 εβδομάδων από τη γέννησή τους λόγω βλαβών στην ανάπτυξη του εγκεφάλου και του ΚΝΣ, όπου εμφανίζονται ποικίλες υπερπλασίες από την εμβρυϊκή ηλικία των 12 ημερών (45), ενώ τα θυμοκύτταρα των ζώων αυτών είναι φυσιολογικά, πράγμα που υποδηλώνει τη δυνατότητα των άλλων μελών της οικογένειας των κασπασών να αντικαθιστούν την κασπάση-3 στους περισσότερους ιστούς και τύπους κυττάρων (46).

Τα πειραματόζωα χωρίς κασπάση-8 ή -9 πεθαίνουν κατά τον τοκετό λόγω βλάβης των υπό ανάπτυξη κυττάρων, ενώ τα ποντίκια που δεν έχουν κασπάση-2 εμφανίζουν μειωμένη ή αυξημένη απόπτωση, αναλόγως κυτταρικού τύπου και προέλευσης.

Η κασπάση-12 εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και ενεργοποιείται από αυτό. Τα ποντίκια χωρίς κασπάση-12 δείχνουν ανθεκτικά στην απόπτωση που επάγεται από το ER, αλλά τα κύτταρα τους πεθαίνουν όταν έρθουν σε επαφή με άλλους παράγοντες επαγωγής της απόπτωσης (30).

Υπάρχουν πάνω από 60 διαφορετικά υποστρώματα που διασπώνται από τις κασπάσες κατά την αποπτωτική διαδικασία. Τα υποστρώματα αυτά μπορούν να διακριθούν σε κατηγορίες αναλόγως της λειτουργίας τους όπως περιγράφεται στον πίνακα 1. Οι κύριες κατηγορίες υποστρωμάτων είναι οι υπερ- και αντι αποπτωτικές πρωτεΐνες(47), οι πρωτεΐνες του αποπτωτικού μηχανισμού, οι δομικές πρωτεΐνες και τα συγγενή μόρια, καθώς και οι ομοιοστατικές πρωτεΐνες (οι διαβιβαστικές πρωτεΐνες κυτταρικής ανάπλασης και μακρομοριακής σύνθεσης) (48). Τυχόν διάσπαση αυτών των

**Πίνακας 1: Υποστρώματα των κασπασών**

<b>Υποστρώματος</b>	<b>Τύπος</b>	<b>Λειτουργία</b>	<b>Παραδείγματα</b>
Αποπτωτικές και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες		Signal amplification, Απενεργοποίηση των αναστολέων	Προκασπάσες, Bcl-2, Bcl-xL, Bid, p28Bap31
Συστατικά του αποπτωτικού μηχανισμού		Επαγωγή του αποπτωτικού φαινοτύπου	ICAD, gelsolin, PAK2, MEKK1, PKC8
Δομικές πρωτεΐνες και σχετικά μόρια		Διάλυση της κυτταρικής ακεραιότητας	Λαμίνες, NuMa, SAF-A, Fodrin, Gas2, κερατίνες, ακτίνη, Rabaptin-5, β-katenin, FAK
Ομοιοστατικές πρωτεΐνες		Διακοπή της σύνθεσης μακρομορίων καθώς και των μηχανισμών κυτταρικής ανακατασκευής. Τερματισμός των διαβιβαστών επιβίωσης	DNA-PK <sub>C75</sub> , PARP, U1-70kDa, RFC-140, HnRNPs, D4-GDI, μεταγραφικοί παράγοντες
Άλλοι		Άγνωστη. Επαγωγή της απόπτωσης ;;	Huntingtin, Presenilins, atrophin-1, ataxin-3, cPLA <sub>2</sub>

πρωτεϊνών εικάζεται ότι εμπλέκεται στις κυτταροπλασματικές και πυρηνικές μορφολογικές αλλαγές κατά τη διαδικασία της απόπτωσης. Οι πρωτεΐνες υπεύθυνες για την επιδιόρθωση του DNA, όπως η poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) και η εξαρτημένη από το DNA πρωτεϊνική κινάση (DNA-PK), επίσης διασπώνται, γεγονός που καταδεικνύει την ανάγκη αναστολής της αναπλαστικής λειτουργίας, ώστε να καθίσταται αμετάκλητος ο κυτταρικός θάνατος (49).

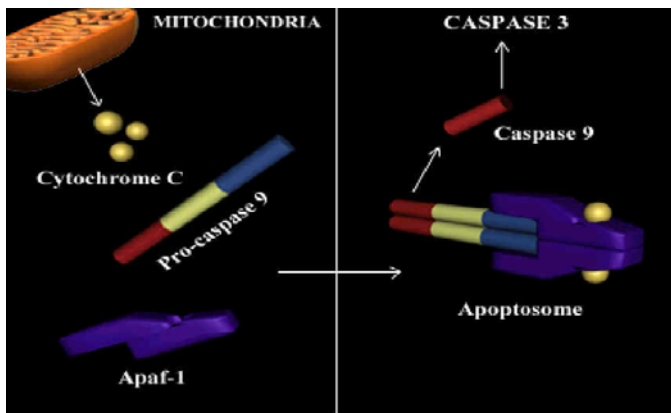
Πολλά υποστρώματα των κασπασών δεν έχουν φανερό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης. Όμως, λόγω του κεντρικού ρόλου των κασπασών στο αποπτωτικό πρόγραμμα, οι πρωτεάσες αυτές αποτελούν κύριο στόχο ελέγχου της διαδικασίας (50). Η υπερβολική δράση των κασπασών προωθεί την κυτταρική αυτοκτονία και

ίσως το γεγονός αυτό είναι η βάση των νευροεκφυλιστικών νόσων όπως αυτών του Huntington και του Alzheimer. Στη δεύτερη περίπτωση, εικάζεται ότι οι κασπάσες-3 και -12 εμπλέκονται στην πρωτεολυτική διάσπαση του β-αμυλοειδούς του οποίου το προϊόν - πεπτίδιο  $A\beta$  - επάγει την απόπτωση (51). Στη νόσο του Huntington, οι χαρακτηριστικές πολύ-γλουταμινικές επαναλήψεις επάγουν το θάνατο των νευρώνων μέσω της κασπάσης-8 (42). Η απώλεια της δράσης της κασπάσης-10 ως αποτέλεσμα μεταλλαγών, έχει συνδεθεί με το θάνατο κυττάρων στο σύνδρομο του αυτοάνοσου λεμφικού πολλαπλασιασμού. Η απενεργοποίηση των κασπασών είναι πιθανό να επάγει και τη διαδικασία της ογκογένεσης. Όμως, οι παράγοντες επαγωγής της απόπτωσης διατηρούν την ικανότητά τους να φονεύουν τα κύτταρα ακόμα κι αν ανασταλεί η δράση των κασπασών, παρόλο που δεν είναι σαφές ποιό είναι αυτοί οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανεξάρτητη από τις κασπάσες απόπτωση. Ο υποδοχέας CD95/Fas/Apo-1 έχει τη δυνατότητα να φονεύσει τα ενεργοποιημένα πρωτογενή T-κύτταρα απουσία των κασπασών (52). Αυτού του τύπου ο κυτταρικός θάνατος περιλαμβάνει νεκρωτικές μορφολογικές αλλαγές και εξαρτάται από την κίνηση RIP ως δραστικό μόριο (42).

#### **Τα μιτοχόνδρια, το κυτταρόχρωμα c και το Araf-1 στην απόπτωση**

Το κυτταρόχρωμα c απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια κατά τον κυτταρικό θάνατο και εμπλέκεται στο μηχανισμό της απόπτωσης (53). Εντοπίζεται στο διάστημα μεταξύ της εξωτερικής και της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων και έχει κύριο ρόλο στη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (17). Όταν τα κύτταρα εκτεθούν σε αποπτωτικό ερέθισμα, το κυτταρόχρωμα c απελευθερώνεται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα όπου γίνεται ένας από τους παράγοντες που

εμπλέκονται στην πρωτεολυτική ενεργοποίηση της κασπάσης-3 από την κασπάση-9 (31).



**Εικόνα 7:** Η απελευθέρωση κυτταροχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και η ένωσή του με το διμερισμένο Araf-1 με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κασπασών.

Περαιτέρω βιοχημική ανάλυση έχει αποκαλύψει δύο κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, τις Araf-1 και Araf-3, οι οποίες σχηματίζουν ένα σύμπλοκο με το κυτταρόχρωμα c το οποίο ενεργοποιεί την κασπάση-3. Η Araf-1 έχει μικρή ομολογία με το

γονιδιακό προϊόν του *C. elegans* ced-3 αλλά είναι μεγαλύτερη και πολυπλοκότερη πρωτεΐνη, ενώ η Araf-3 είναι η κασπάση-9. Το τμήμα του Ced-4 που μοιάζει με το Araf-1 πλευρίζεται από ένα τμήμα το οποίο έχει ισχυρή ομολογία με το μοτίβο CARD εντός των προ-τμημάτων του Ced-3 και των κασπασών -2 και -9 των θηλαστικών και από την άλλη πλευρά από διάφορες WD-επαναλήψεις (W=Trp, D=Asp) οι οποίες πιστεύεται ότι μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Τα τμήματα CARD μέσα στο Araf-1 και το προ-τμήμα της κασπάσης-9 αντιδρούν και στην παρουσία του κυτταροχρώματος c και ADP ή ATP, επάγεται αυτοκαταλυτική ενεργοποίηση της κασπάσης που με τη σειρά της ενεργοποιεί τις υπόλοιπες κασπάσες-2, -3, -6, -7, -8 και -10 (31). Ο διμερισμός του Araf-1 συγκρατείται από τη δική του καρβοξυλομάδα που περιέχει τις WD-40 επαναλήψεις. Εικάζεται ότι το κυτταρόχρωμα c ενώνεται με αυτές και επάγει μια αλλαγή στη στερεοδιάταξη η οποία επιτρέπει στο Araf-1 να ολιγομερισθεί και να προωθήσει έτσι τη συγκρότηση αυτής της κασπάσης για να ενεργοποιηθεί η κασπάση-9 (43).

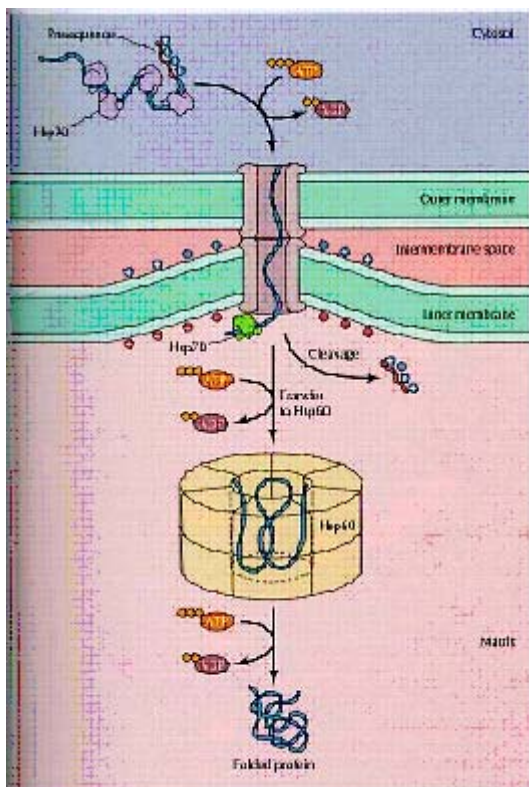
Η αντίδραση μεταξύ του Araf-1 και της κασπάσης -9 είναι παρόμοια με το μηχανισμό ενεργοποίησης μεταξύ των Ced-3 και Ced-4 στον *C.elegans*. Η ομοιότητα αυτή εκτείνεται και στο επίπεδο των ομολόγων του Ced-9 αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL στα θηλαστικά. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες εντοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και λειτουργούν ως αναστολείς της απόπτωσης αποτρέποντας την απελευθέρωση του κυτταροχρώματος c και/ή αποτρέποντας την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 αφού συνδέονται με το Araf-1. Τα υπερπαποπτωτικά μέλη της οικογένειας του Bcl-2 στα θηλαστικά (Bak, Bax και Bik) είναι πιθανό να επάγουν την απόπτωση αποσυνδέοντας το Araf-1 από τις Bcl-2 και Bcl-xL. Πάντως, παρόλο που η άμεση σύνδεση του Bcl-xL στο Araf-1 (η οποία έχει γίνει σε πειράματα) έχει αναφερθεί, τα αποτελέσματα αυτά (ή τουλάχιστον η φυσική τους σχέση), έχουν αμφισβητηθεί. Η αντί-αποπτωτική πρωτεΐνη Aven, η οποία έχει ταυτοποιηθεί στο σακχαρομύκητα, έχει δείξει να ενώνεται και με το Bcl-xL και με την Araf-1 και ίσως αυτό το μόριο ενώνει τις δύο πρωτεΐνες μεταξύ τους. Το γεγονός ότι η άμεση ένωση του Bcl-2 ή του Bcl-xL με το Araf-1 δεν ανιχνεύθηκε σε πειράματα, ίσως δείχνει ότι υπάρχουν και άλλα ομόλογα του Ced-4, τα οποία μπορούν να ενώνονται με τα μέλη της οικογένειας του αντί-αποπτωτικού Bcl-2. Η ιδέα της ύπαρξης και άλλων μελών της οικογένειας του Ced-4, υποστηρίζεται από τη δράση πρωτεΐνης Araf-1 σε ποντίκια, η οποία τελικώς οδηγεί σε εξασθένιση της απόπτωσης σε μερικούς αλλά όχι σε όλους τους τύπους κυττάρων. Η απενεργοποίηση της Araf-1 στα κύτταρα ποντικών συνήθως οδηγεί σε ανωμαλίες της ρύθμισης του αριθμού των κυττάρων στον εγκέφαλο και σε άλλους ιστούς όπως το περιφερικό νευρικό σύστημα, με αποτέλεσμα τον εμβρυϊκό θάνατο (54).



Με τη χρήση σεσημασμένου κυτταροχρώματος c με πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) που μεταφέρθηκε σε κυτταρικές σειρές HeLa, αποκαλύφθηκε πρόσφατα, ότι η απελευθέρωση του κυτταροχρώματος c-GFP πάντα προηγείται χρονικά της έκθεσης φωσφατιδυλσερίνης στην επιφάνεια των κυττάρων και της απώλειας της μεμβρανικής ακεραιότητας (23). Το χρονικό διάστημα που διαμεσολαβεί μεταξύ του αποπτωτικού ερεθίσματος και της απελευθέρωσης του κυτταροχρώματος c ποικίλει στα διάφορα είδη κυττάρων και εξαρτάται από την αποπτωτικό ερέθισμα. Η έναρξη της απόπτωσης σηματοδοτεί έκλυση του κυτταροχρώματος c από το σύνολο των μιτοχονδρίων του κυττάρου εντός 5 λεπτών. Η μελέτη αυτή έδειξε επίσης την πτώση της διαφοράς δυναμικού στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, που εμφανίζεται μετά από την έκλυση του κυτταροχρώματος c. Η διαδικασία εξαρτάται από την ενεργοποίηση των κασπασών και όχι από την απελευθέρωση του κυτταροχρώματος c. Τα αποτελέσματα αυτά θεωρούνται ένδειξη μεταβολής της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου που δεν συνοδεύεται από αλλαγές στην εσωτερική του μεμβράνη

(55).

Έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες για την ερμηνεία της αλλαγής διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης κατά την αποπτωτική διαδικασία. Ίσως η εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου να διαρρηγνύεται ως αποτέλεσμα της διαστολής του εσωτερικού του μιτοχονδρίου. Στη μία θεωρία, εικάζεται ότι η διαστολή αυτή οφείλεται στο άνοιγμα του μείζονος καναλιού που



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση του πόρου μεμβρανικής διαπερατότητας.

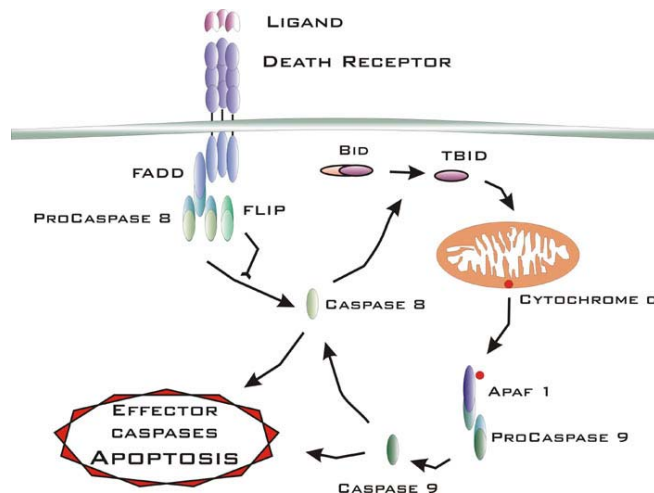
αποκαλείται Πόρος Μεταβλητής Διαπερατότητας (**P**ermeability **T**ransition **P**ore – **PTP**) (56). Ο μεταγωγός του νουκλεοτιδίου της αδενίνης (**A**denine **N**ucleotide **T**ranslocator –**ANT**), ο οποίος εντοπίζεται στην έσω μεμβράνη του μιτοχονδρίου, και το ιοντικό κανάλι (**V**oltage-**D**ependent **A**nion **C**hannel – **VDAC**) (57) εντοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και αποτελούν τα κύρια συστατικά του PTP, που θεωρείται ότι εκτείνεται στην εσωτερική και

**Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση του πόρου μεμβρανικής διαπερατότητας.**

εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου σε σημεία που οι δύο μεμβράνες είναι κοντά. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, οι ουσίες που ανοίγουν τον PTP περιλαμβάνουν το υπέρ-αποπτωτικό μέλος της οικογένειας του Bcl-2, Bax, και προκαλούν δυνατότητα διαπερατότητας από την εσωτερική μεμβράνη και την αποφόρτιση του μιτοχονδρίου με την ένωση του με τον ANT. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει την είσοδο μορίων νερού και άλλων ουσιών στο μιτοχόνδριο με αποτέλεσμα τη διαστολή του. Μια άλλη θεωρία υποστηρίζει ότι η διαστολή του μιτοχονδρίου οφείλεται σε βλάβη της ανταλλαγής ATP/ADP ως αποτέλεσμα του κλεισίματος του ιοντικού καναλιού (VDAC) και που οδηγεί στην υπερπόλωση της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου. Το σενάριο αυτό έρχεται σε αντίθεση με αναφορές που υποστηρίζουν ότι η κάμψη στο ηλεκτρικό δυναμικό της μεμβράνης ακολουθεί την απελευθέρωση κυτταροχρώματος c, τουλάχιστον σε κάποιους τύπους κυττάρων (2).

Άλλες θεωρίες δεν υποστηρίζουν την διάρρηξη της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου, αλλά το σχηματισμό πόρου ο οποίος επιτρέπει την απελευθέρωση κυτταροχρώματος c το κυτταρόπλασμα, με συμμετοχή του Bax. Τα ολιγομερή του Bax έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν μεγάλα κανάλια σε λιπιδικά υποστρώματα. Η άμεση προσθήκη Bax σε απομονωμένα μιτοχόνδρια προκαλεί αυξημένη έκκριση

κυτταροχρώματος c μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος είναι ανεξάρτητος των αναστολέων του PTP και δεν περιλαμβάνει μιτοχονδριακή διαστολή (58).



Εικόνα 9: Η πρωτεΐνη Bid και η απόπτωση.

Η ενεργοποίηση των κασπασών από τον ειδικό υποδοχέα κυτταρικού θανάτου (π.χ. κασπάση-8) και οδηγεί στην απελευθέρωση κυτταροχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, διαμεσολαβείται από το Bid, μια πρωτεΐνη που προσωμοιάζει με

το μόριο BH3 (59). Η κασπάση-3, η οποία ενεργοποιείται από σύμπλοκο των μηνυμάτων θανάτου (**Death-Inducing Signaling Complex – DISC**) διασπά το υπέρ-αποπτωτικό Bid. Το μόριο που προκύπτει (tBid) ενώνεται με το Bax οδηγώντας στον ολιγομερισμό του τελευταίου και την ενσωμάτωσή του στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου όπου δίνει το ερέθισμα για την εκκίνηση της παραγωγής του κυτταροχρώματος c. Το ίδιο μόριο με παρόμοιο τρόπο ενώνεται και ολιγομερίζει ένα άλλο υπέρ-αποπτωτικό του ομόλογο, το Bak, για να οδηγήσει στο ίδιο αποτέλεσμα. Παρότι μελέτες σε κύτταρα που δεν εκφράζουν το Bak δείχνουν ότι δεν απαιτείται από το tBid για να στοχεύσει κατά των μιτοχονδρίων, το Bak με το tBid είναι απαραίτητα για την επαγωγή της απελευθέρωσης κυτταροχρώματος c. Συμπερασματικά, τα κύτταρα που δεν έχουν *bax*<sup>-/-</sup>*bak*<sup>-/-</sup> είναι ανθεκτικά σε μεγάλο εύρος αποπτωτικών ερεθισμάτων (2).

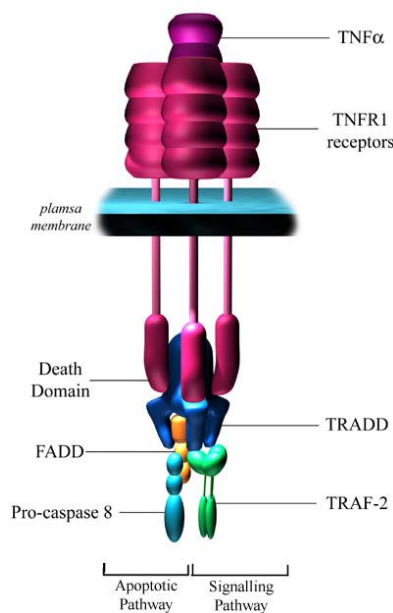
Άλλες πρωτεΐνες, πλέον του κυτταροχρώματος c, απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια κυττάρων που υφίστανται απόπτωση. Μεταξύ αυτών είναι το

Smac/Diablo, μόριο το οποίο ενώνεται και απενεργοποιεί τους IAP (Αναστολείς της απόπτωσης - **I**nhibitors of **A**pop**t**osis) (60). Οι IAP αναστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο όταν ενωθούν με κασπάσες σε ενεργή και ανενεργή μορφή και τις απενεργοποιούν. Το Smac/Diablo απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια μαζί με το κυτόχρωμα c κατά την απόπτωση και αποτρέπει την αναστολή της ενεργοποίησης της κασπάσης-9 απενεργοποιώντας τον IAP. Είναι πιθανό ότι σε κάποια κύτταρα το Smac/Diablo απαιτείται για να απενεργοποιήσει ο IAP αποτρέποντας μ' αυτόν τον τρόπο την άμεση ενεργοποίηση της κασπάσης-3 από την κασπάση-8. Σε αυτή την περίπτωση, η απελευθέρωση του κυτταροχρώματος c ίσως να μην σχετίζεται με τη διαδικασία του θανάτου, αλλά με την απελευθέρωση του Smac/Diablo στο κυτταρόπλασμα. Το Smac/Diablo και οι υπέρ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της *Drosophila* Reaper, Grim και Hid, λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο (αναστέλλουν την ενεργοποίηση του IAP) και έχει αναφερθεί ομοιότητα στην αλληλουχία τους (περιορίζεται στο άκρο της αμινομάδας τους σε 14 αμινοξέα), εικάζοντας ότι το μόριο αυτό και τα ανάλογά του ίσως είναι στα έντομα δομικά και λειτουργικά ομόλογα (40).

Η ακεραιότητα του μιτοχονδρίου είναι σημαντική όχι μόνο για τη απόσυρση του κυτταροχρώματος c και του Smac/Diablo, αλλά και για άλλους τρόπους που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των κασπασών και την απόπτωση. Μόνον ένα μέρος των κασπασών -3 και -9 περιορίζεται στο διάστημα μεταξύ των μεμβρανών των μιτοχονδρίων σε μερικούς τύπους κυττάρων και η κασπάση-2 έχει αναφερθεί ότι εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Αυτές οι κασπάσες, όπως και το κυτταρόχρωμα c, απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα κατά την επαγωγή της αποπτωτικής λειτουργίας. Μία άλλη πρωτεΐνη, η AIF (παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης -

Apoptosis Inducing Factor), επίσης αναδιανέμεται από τα μιτοχόνδρια και επάγει μέρος της μορφολογίας που συνδέεται με την απόπτωση που εξαρτάται από τις κασπάσες. Η γενετική απενεργοποίηση της AIF έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή εμβρυϊκών κυττάρων που είναι ανθεκτικά στον κυτταρικό θάνατο όταν στερηθούν ορρού (3).

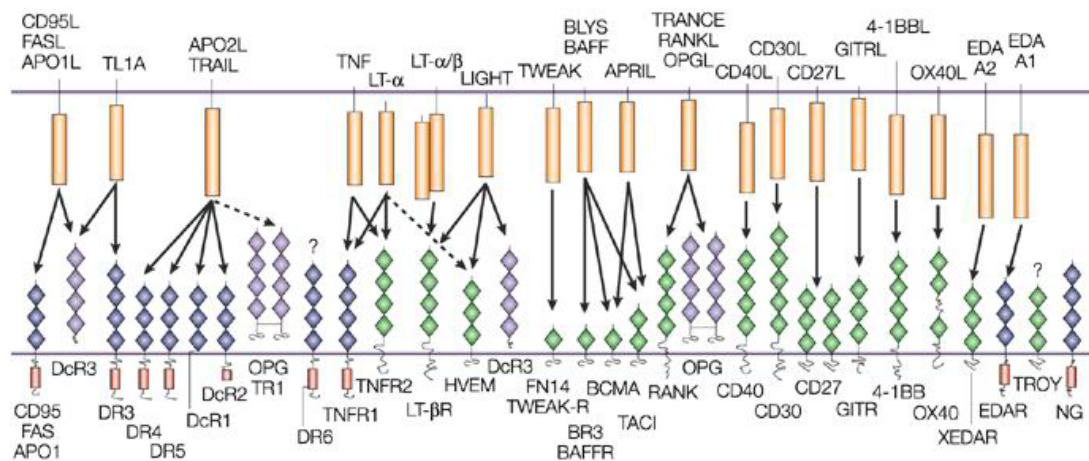
### Οι υποδοχείς κυτταρικού θανάτου



**Εικόνα 10: Ο διαμεμβρανικός υποδοχέας TNF.**

Υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ του αποπτωτικού ερεθίσματος και της ενεργοποίησης των βασικών κασπασών του αποπτωτικού μηχανισμού. Η ενεργοποίηση μιας ειδικής ομάδας διαμεμβρανικών υποδοχέων που ανήκουν στην οικογένεια του TNF, είτε με την παρουσία συνδέτη, ή (πειραματικά) με τη δέσμευση από αντισώματα-αγωνιστές, μπορεί να οδηγήσει σε άμεση ενεργοποίηση των κασπασών (61). Ο κατάλογος των μελών της οικογένειας των υποδοχέων του TNF συνεχώς αυξάνεται και

περιλαμβάνει τους εξής: TNF-R1 (P55), TNF-R2 (P75), TNF-R3 (TNF-RP), LT- $\alpha$ R, O $\alpha$ -40, CD27, CD28, CD30, CD40, 4-1BB, p75 NGF-R (low affinity nerve growth factor receptor), GIT-R, Rank, CD95, DR6 και τους TRAIL-R1 (DR4), -R2 (DR5), -R3 (DcR-1) και DcR-2. Η ενεργοποίηση των μελών αυτής της οικογένειας υποδοχέων ξεκινά μια πλειάδα κυτταρικών αποκρίσεων, που εξαρτώνται από τον κυτταρικό τύπο και τα χαρακτηριστικά του, μεταξύ των οποίων είναι η ενεργοποίηση και ο ερεθισμός των T-κυττάρων, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η επιβίωση και ο αποπτωτικός κυτταρικός τους θάνατος (62).



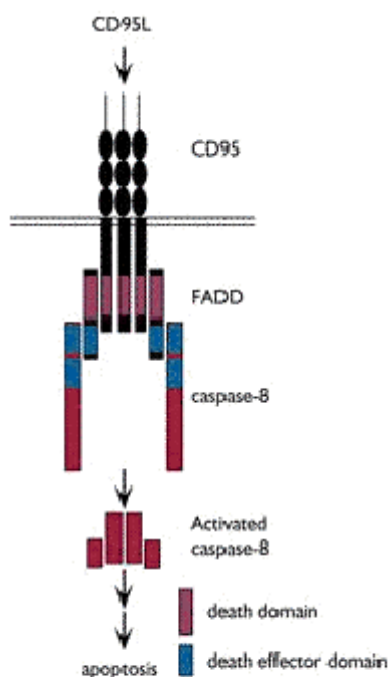
**Εικόνα 11: Τα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων του TNF.**

Μέλη της οικογένειας των υποδοχέων του TNF-R στα θηλαστικά είναι οι τύπου I μεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες χαρακτηρίζονται από τα εξωκυττάρια τμήματα τους που είναι πλούσια σε κυστεΐνη. Ο ενεργός υποδοχέας TNF έχει ένα τριμερές ή πολυμερές σύμπλοκο που σταθεροποιείται από δισουλφιδικούς δεσμούς, παρόλο που σε κάποιους από αυτούς όπως οι CD95, TNF-R1 και TNF-R2, υπάρχει επίσης μια διαλυτή μορφή που δημιουργείται από την πρωτεολυτική διάσπαση. Οι συνδέτες των υποδοχέων αυτών αποτελούν μία άλλη οικογένεια και περιλαμβάνουν τους TNF, LT-α (λεμφοτοξίνη-α), συνδέτη CD95 (FasL/CD95L), TRAIL, OX40L, CD27L, CD30L, CD40L, 4-1BBL και την LT-β. Κάθε ένας από αυτούς τους συνδέτες συντίθεται -εν τη γενέσει του- ως μεμβρανοδεσμευμένη πρωτεΐνη τύπου II και μοιράζεται μία χαρακτηριστική αλληλουχία 150 αμινοξέων στην καρβοξυλική του πλευρά με την οποία αντιδρά ο αντίστοιχος υποδοχέας. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι συνδέτες αυτοί υπάρχουν ως τριμερείς ή πολυμερείς μεμβρανικές πρωτεΐνες, αλλά είναι πιθανό να λειτουργούν και ως επαγωγοί της ένωσής τους με τους αντίστοιχους υποδοχείς, ενώ ορισμένοι (π.χ. ο TNF και ο CD95L) παραμένουν λειτουργικοί και σε διαλυτή μορφή. Τμήμα της αμινομάδας που ενώνεται με το τμήμα του συνδέτη στο εξωκυττάριο στέλεχος του TNF-1, του TNF-R2 και του CD95 φαίνεται ότι

διαμεσολαβεί στην δέσμευση των υποδοχέων πριν την ένωση του συνδέτη. Το γεγονός αυτό, που αποκαλείται **preligand binding assembly domain –PLAD**, είναι σημαντικό για τη σύνδεση των λειτουργικών συμπλόκων των υποδοχέων στην επιφάνεια του κυττάρου και οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μέλη της οικογένειας των υποδοχέων του TNF ίσως λειτουργούν ως προσχηματισμένα σύμπλοκα παρά ως ξεχωριστές υπομονάδες που ολιγομερίζονται μετά την ένωσή τους με συνδέτη (63).

### Το σύμπλοκο CD95/Fas/Apo-1

Το σύμπλοκο των CD95/Fas/Apo-1 (ή απλά CD95) εκφράζεται στα ενεργά



**Εικόνα 12: Τα CD95/CD95L.**

λεμφοκύτταρα και σε ιστούς όπως το ήπαρ, το μυοκάρδιο και ο πνεύμονας (9). Η ένωσή του CD95 (ligation) με το δικό του συνδέτη (CD95L) ή πειραματικά με αντίσωμα-αγωνιστή έναντι του συγκεκριμένου μορίου, δύναται να επάγει την απόπτωση σε ορισμένους τύπους κυττάρων. Ο CD95 εκφράζεται κυρίως σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, κύτταρα NK, ερυθροβλάστες, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (B και T) και σε αρκετά καρκινικά κύτταρα. Η αποπτωτική βιοχημική οδός που ακολουθείται από τα CD95/CD95L, λειτουργεί με τρόπο ώστε

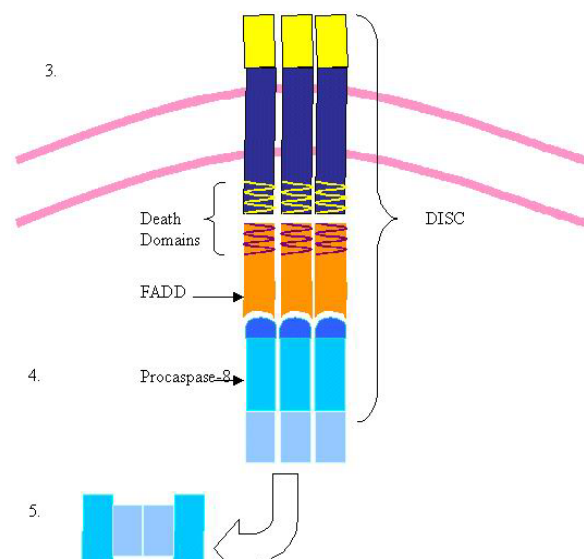
να τηρήσει την ομοιοστασία σε διάφορους ιστούς, εκ των οποίων το ήπαρ είναι ο πλέον μελετημένος στο επίπεδο αυτό. Το CD95 εμπλέκεται στο ανοσοποιητικό σύστημα σε περιφερικές διαγραφές κλώνων των T-λεμφοκυττάρων, στην κυτταρική αυτοκτονία των ωρίμων T-κυττάρων και στην κυτταροτοξική αντίδραση και επαγωγή



της απόπτωσης των Β-κυττάρων (64). Ο συνδέτης CD95L εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια και έχει ρόλο στην ανοσολογική επικράτηση σε κάποια όργανα φονεύοντας διηθημένα λεμφοκύτταρα και φλεγμονώδη κύτταρα τα οποία εκφράζουν τον υποδοχέα CD95. Έχουν ταυτοποιηθεί γονίδια σε ποντίκια που φέρουν μεταλλάξεις του CD95 (Ipr – γονίδιο υπεύθυνο για τον λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό) και του CD95L (gld – γονίδιο υπεύθυνο για την εμφάνιση της γενικευμένης λεμφοπολλαπλασιαστικής νόσου). Τα ποντίκια ομόζυγα σε κάποια εκ των δύο αυτών μεταλλαγών συσσωρεύουν περίσσεια μη παθογόνων CD3<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T-λεμφοκυττάρων σε σπλήνα και λεμφαδένες και πάσχουν από μια αυτοάνοση κατάσταση που μοιάζει με ερυθρωματώδη λύκο. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι οι διαβιβαστές των CD95/CD95L έχουν σημαντικό ρόλο στη διαγραφή των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων και στη διατήρηση της περιφερικής ανοχής (65).

Τυχόν μεταλλάξεις στο γονίδιο CD95 του ανθρώπου έχουν παρόμοια αποτελέσματα: οι ασθενείς με αυτοάνοσα σύνδρομα λεμφικού πολλαπλασιαστικού τύπου 1α έχουν ετερόζυγες μεταλλάξεις στο CD95 και τα λεμφοκύτταρά τους είναι ανθεκτικά στην

απόπτωση που επάγεται από αυτό (66).



**Εικόνα 13: Το DISC στον υποδοχέα CD95**

Δεν υφίστανται σημεία αναγνώρισης των στελεχών των υποδοχέων CD95/TNF-R1 στο κυτταρόπλασμα (22). Έτσι, το ενδοκυτταρικό “στέλεχος-κλειδί” της αντίδρασης, εντοπίζεται στην «ουρά» που



βρίσκεται εντός του κυττάρου όλων των υποδοχέων του κυτταρικού θανάτου και είναι το μεγέθους 65 αμινοξέων, στέλεχος θανάτου (**Death Domain – DD**), όνομα που του έχει αποδοθεί λόγω της ικανότητάς του να συγκεντρώνει τους παράγοντες που επάγουν την απόπτωση (21). Το όνομα που του έχει αποδοθεί είναι κάπως άδικο, διότι υπαινίσσεται ότι ο κυτταρικός θάνατος είναι η λειτουργία αυτού του μορίου, στην πραγματικότητα όμως, τα DD είναι στελέχη που διαμεσολαβούν στην ομο- και ετερο-τυπική αντίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών ώστε να διαβιβάζουν τα σήματα, αλλά βρίσκονται και σε διαβιβαστικές οδούς μηνυμάτων οι οποίες δεν έχουν σχέση με τον κυτταρικό θάνατο (67).

Τα DDs στον απολινωμένο (ligated) υποδοχέα TNF-R1/CD95 κάνουν χρήση του κυτταροπλασματικού προσαρμογέα FADD/MORT-1, που βρίσκεται στη καρβοξυλική πλευρά του DD (68). Ο FADD/MORT-1 στην αμινομάδα του έχει ένα στέλεχος (domain) το οποίο συνδέεται με μια διαφορετική πρωτεΐνη (**death effector domain - DED**), που διευκολύνει την αντίδραση με το προ-στέλεχος της αμινομάδας της κασπάσης-8 (69). Η προσέλευση της κασπάσης-8 από τον FADD/MORT-1 προς τον ενεργοποιημένο υποδοχέα CD95, δημιουργεί το DISC, το οποίο οδηγεί σε πρωτεολυτική αυτό-ενεργοποίηση της. Τελικά, η κασπάση-8 ενεργοποιεί τις υπόλοιπες κασπάσες, συμπεριλαμβανομένων και των -1 και -3, οι οποίες εκτελούν την αποπτωτική διάσπαση του κυττάρου (70). Τα μέλη της οικογένειας του υποδοχέα του TNF, τα οποία δεν έχουν DD (όπως οι TNF-R2, CD27, CD30, CD40) ίσως, υπό τις κατάλληλες συνθήκες, να επάγουν τον κυτταρικό θάνατο μέσω εναλλακτικών μηχανισμών.

Ο συνδέτης CD95L μέσω της χρήσης του DISC, δείχνει να έχει άμεση σχέση με αυτόν στο εξωτερικό του κυττάρου και κατά συνέπεια, με το βασικό μηχανισμό της απόπτωσης. Αυτός ο μοριακά άμεσος τρόπος φαίνεται να είναι εφικτός μόνο στα κύτταρα τύπου 1 (71). Στα άλλα κύτταρα (τύπου-2) το CD95 οδηγεί σε αλλαγές στα μιτοχόνδρια τα οποία ενεργοποιούν τις κασπάσες με διαφορετικό τρόπο. Το ποσό της κασπάσης-8 που ενεργοποιείται από τον υποδοχέα στα κύτταρα αυτού του τύπου (2) είναι πολύ χαμηλότερο από τα κύτταρα τύπου-1 και πιθανόν να είναι ανεπαρκές για την επαγωγή της διάσπασης των κασπασών. Όμως είναι αρκετό για να διασπάσει το Bid, μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών Bcl-2, που βρίσκεται στο μονό στέλεχος του BH3. Το διασπασμένο Bid, μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια όπου επάγει την απελευθέρωση του κυτταροχρώματος c και την κατά συνέπεια ενεργοποίηση των κασπασών με αποτέλεσμα την απόπτωση (72).

Τα DDs στο CD95 και τον TNF-R1 αντιδρούν με το τμήμα της καρβοξυλομάδας του DD μιας δεύτερης πρωτεΐνης που συνδέεται με αυτό και ονομάζεται RIP (73). Στην αμινομάδα του RIP υπάρχει ένα τμήμα κινάσης της τυροσίνης (74) το οποίο εμπλέκεται και στην διαμεσολαβούμενη από το CD95 signal transduction. Οι φαρμακευτικοί αναστολείς των πρωτεϊνικών κινασών μπλοκάρουν με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο την από το CD95 επαγωγή του κατακερματισμού του DNA και επιμηκύνουν τη ζωή του κυττάρου. Το DD του RIP, συνδέεται επίσης με την καρβοξυλομάδα του DD μιας άλλης «πρωτεΐνης-προσαρμογέα θανάτου», του RAIDD (RIP-associated ICH-1/Ced-3 homologous protein with a death domain). Στο αμινικό άκρο του, το RAIDD είναι ομόλογο με το προ-στέλεχος της κασπάσης-2 και ολιγομερίζεται με αυτό. Άρα, η κασπάση-2 μπορεί να προσελκυσθεί από τον υποδοχέα του CD95 μέσω διαδοχικών αλληλεπιδράσεων των RAIDD, RIP, FADD

και CD95. Ένας στενός συγγενής του RAIDD είναι το CRADD, το οποίο επίσης αλληλεπιδρά με τα RIP και κασπάση-2. Το RIP είναι απαραίτητο για την επαγόμενη από το TNF ενεργοποίηση του NF-κB. Τυχόν διάσπαση του RIP από την κασπάση-8 έχει ως αποτέλεσμα τη μη διαβίβαση των αντι-αποπτωτικών μηνυμάτων στα οποία διαμεσολαβεί ο NF-κB (24).

Μία άλλη πρωτεΐνη που συνδέεται με το CD95, είναι η Daxx. Η Daxx συνδέεται με το DD του CD95 αλλά δεν έχει δικό της DD. Η υπερέκφρασή της ενεργοποιεί την Jun N-terminal kinase (JNK) και ενδυναμώνει την απόπτωση που επάγεται από το CD95. Μ' αυτό σαν βάση, έχει προταθεί ότι το CD95 χρησιμοποιεί δυο ανεξάρτητους τρόπους επαγωγής του κυτταρικού θανάτου: μέσω των FADD/caspase-8/-2 και μέσω της ενεργοποίησης του Daxx/JNK. Το Daxx είναι πυρηνική πρωτεΐνη η οποία αλληλεπιδρά και συνυπάρχει με τον παράγοντα ελέγχου της πρωτεΐνης του όγκου προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (PML). Γονιδιακές μελέτες έχουν δείξει ότι το Daxx δύναται να αναστείλει την μεταγραφή. Η μετατρεπόμενη από το SUMO-1 PML αποσύρει το Daxx στον πυρήνα και αναστέλλει τη- διαμεσολαβούμενη από αυτό- μεταγραφική μείωση. Το πώς ακριβώς η ενεργοποίηση του CD95 δρα στον περιορισμό του Daxx, και επί της μεταγραφής, είναι ασαφές. Έχει παρατηρηθεί ότι η απενεργοποίηση του Daxx, αντί να μειώσει την απόπτωση την αυξάνει ραγδαία και έχει ως αποτέλεσμα τον εμβρυϊκό θάνατο στα ποντίκια (75).

Μεταξύ των πρωτεϊνών που συνδέονται με το κυτταροπλασματικό στέλεχος του υποδοχέα του CD95 είναι η αλληλεπιδρούσα με το Fas - Serine/Threonine kinase/homeodomain-interacting protein kinase (FIST/HIPK3). Το μόριο αυτό όχι μόνο συνδέεται με το CD95 αλλά αντιδρά και με το FADD σε ένα τριμοριακό

σύμπλοκο που αποτελείται από CD95, FADD και FIST. Η κινάση του FIST επάγει τη φωσφορυλίωση του FADD, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της JNK κινάσης από το CD95. Αυτή η αντίδραση περιορίζεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα και δίνει τη δυνατότητα στο Daxx να συνδεθεί με τρόπο που εξαρτάται από την κινάση.

Πλέον της ενεργοποίησης των κασπασών και του JNK, τα CD95 και TNF-R1, έχουν και άλλους τρόπους δράσης. Η διαβίβαση των αποπτωτικών μηνυμάτων που δημιουργεί ο CD95, ενεργοποιούν την όξινη σφιγγομυελινάση προκαλώντας έτσι συγκέντρωση της κεραμίδης, η οποία παρατηρείται στην απόπτωση που επάγεται από το CD95 και τον TNF-R1. Είναι αμφιλεγόμενο αν η παραγωγή κεραμίδης είναι ρυθμιστής της απόπτωσης στα κύτταρα (76).

Στις πρωτεΐνες FLIP (Fas-associated death domain-like ICE inhibitory proteins) υπάρχουν φυσικοί αναστολείς των διαβιβαστών των σημάτων θανάτου των CD95/TNF-R1 οι οποίοι επεμβαίνουν στη συγκέντρωση των κασπασών στα σύμπλοκα διαβίβασης των σημάτων των υποδοχέων CD95/TNF-R1. Ένας αριθμός ιών κωδικοποιούν τα FLIP ως μέρος της στρατηγικής τους να χαλιναγωγούν την κυτταρική αυτοκτονία και επιβίωση. Π.χ. ο ιός  $\gamma$ -herpesvirus κωδικοποιεί τα FLIPs τα οποία συμπληρώνουν δύο DED που αλληλεπιδρούν με το FADD/MORT και αναστέλλουν την ενεργοποίηση της κασπάσης-8. Το c-FLIP (ομόλογο του v-FLIP) είναι δομικά παρόμοιο με την κασπάση-8, αφού περιέχει δύο στελέχη DED και ένα ανενεργό στέλεχος που μοιάζει με κασπάση το οποίο δεν έχει μόριο κυστεΐνης. Αυτό το c-FLIP εκφράζεται σε δύο ισομερή (μεγάλο και μικρό), τα οποία συγκεντρώνονται στο CD95 DISC με τρόπο που εξαρτάται από το ερέθισμα. Το c-FLIP, μπλοκάρει την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 στο DISC και ως εκ τούτου αναστέλλει την απόπτωση που διαμεσολαβεί το CD95. Κατά τη διαδικασία αυτή η κασπάση-8 και το c-FLIP

υφίστανται διάσπαση ανάμεσα στις υπομονάδες τους p18 και p10, παράγοντας με αυτόν τον τρόπο δύο σταθερά υποπροϊόντα μοριακού βάρους 43kDa τα οποία παραμένουν ενωμένα με το DISC (2).

Τα B- και T- κύτταρα περιορίζουν το c-FLIP κατά την ενεργοποίησή τους *in vitro*, δίνοντας έτσι μια πιθανή εξήγηση στην παρατήρηση ότι τα περιφερικά T-κύτταρα όταν είναι σε ηρεμία είναι ανθεκτικά στην απόπτωση που επάγεται από το CD95 και γίνονται ευαίσθητα σε αυτό μόνο όταν διεγερθούν (77).

### **Οι Υποδοχείς TNF**

Ο TNF είναι γνωστός ως κυτταροκίνη η οποία παράγεται και ενεργοποιείται από τα T-κύτταρα και τα μακροφάγα, τα οποία διευθύνουν την φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού. Αυτό συμβαίνει διότι επηρεάζεται ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση των κυττάρων που εμπλέκονται στη φλεγμονή. Ο TNF και η λεμφοτοξίνη (LT) είναι οι συνδέτες των υποδοχέων TNF-R1 και TNF-R2. Ο TNF-R1 είναι ικανός να φέρει εις πέρας τις περισσότερες αν όχι όλες τις βιολογικές αντιδράσεις που προκαλεί ο TNF, ενώ ο TNF-R2 παρέχει βοηθητική λειτουργία με την ιδιότητά του να ενώνει τον TNF με το TNF-R1. Γενετικές διαγραφές και των δύο αυτών υποδοχέων έχουν δείξει διαφορές στη βιολογική λειτουργία τους εντός του οργανισμού. Και οι δύο δρουν ως ενδυναμωτές της άμυνας του οργανισμού κατά της λοίμωξης και μοιράζονται την κοινή ικανότητα να ενεργοποιούν τον πολύπλευρο παράγοντα μεταγραφής NF-κB. Ο TNF-R1 μόνος του μπορεί να επάγει την απόπτωση ενώ ο TNF-R2 δείχνει να προωθεί την κυτταρική επιβίωση, παρόλο που δύναται να φονεύσει κάποια κύτταρα που υπερεκφράζονται. Όμως, και ο TNF-R1

μπορεί να επάγει την κυτταρική επιβίωση, υπό ορισμένες συνθήκες, όπου αντί να ενεργοποιήσει την αλυσιδωτή αντίδραση των κασπασών, οδηγεί σε de novo σύνθεση των πρωτεϊνών επιβίωσης (78).

Η διαβίβαση των μηνυμάτων του TNF-R1, όπως και στο CD95, είναι δυνατό να ενεργοποιήσουν τη σειρά αντιδράσεων της ενεργοποίησης των κασπασών (caspase cascade reaction) αξιοποιώντας την κασπάση-8 μέσω του FADD/MORT. Το μόριο αυτό συμπεριλαμβάνεται στον ενεργοποιημένο υποδοχέα μέσω ενός ενδιάμεσου κυτταροπλασματικού υποδοχέα DD που ονομάζεται TRADD (TNF-R associated death domain). Το TRADD ενώνεται με το RIP, φέρνοντας έτσι σε επαφή το TNF-R1 με την κασπάση-2, η οποία ενεργοποιείται μέσω των RAIDD και CRADD. Οι TNF-R1 και TNF-R2 προσελκύουν τους μοριακούς διαβιβαστές TRAF (TNFR associated factors) 6 εκ των οποίων έχουν ταυτοποιηθεί. Τα TRAFs μεσολαβούν στην ενεργοποίηση των JNK ή NF-κB, το τελευταίο με αλληλεπίδραση με τις διαβιβαστικές κινάσες NIK. Οι NIK, με τη σειρά τους, ενεργοποιούν τις IκB κινάσες οι οποίες φωσφορυλιώνουν και απενεργοποιούν την IκB, τον ενδογενή κυτταρικό αναστολέα του NF-κB. Ο NF-κB δύναται να δράσει ως ισχυρός αναστολέας της απόπτωσης και σε αυτόν βασίζονται για την έκφρασή τους και αντί-αποπτωτική τους δράση τα cIAPs, TRAF-1 και TRAF-2 όπως και η A20 που θεωρείται ότι παίζει ρόλο στην διαμεσολαβούμενη από τον NF-κB αποτροπή της απόπτωσης (79).

Τα TRAF βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα σε λανθάνουσα (ανενεργή) φάση και συγκρατούνται από ολιγομερή σύμπλοκα με το I-TRAF. Οι TRAF-2, -5 και -6 έχουν δείξει να μεσολαβούν στην ενεργοποίηση των NF-κB και των SAPK/JNK (74). Η διαδικασία της ενεργοποίησης περιλαμβάνει εναλλασσόμενες αντιδράσεις πρωτεΐνης-

πρωτεΐνης και φωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών κινασών. Οι φαινότυποι ποντικών που είτε δεν έχουν το γονίδιο traf-2 και είτε εκφράζουν μία μεταλλαγή του TRAF-2, δείχνουν ότι είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων και την επιβίωση, ενώ υποχωρούν στην ενεργοποίηση του JNK παρόλο που η ενεργοποίηση του NF-κΒ παραμένει ανεπηρέαστη.

Ένας ιδιαίτερα περίπλοκος στόχος των TRAF είναι οι πρωτεΐνες IAP. Οι IAP είναι μόρια που περιορίζουν την απόπτωση των κυττάρων του ξενιστή. Τα γονίδια iap αποτελούν πια μια μεγάλη οικογένεια ιικών και κυτταρικών γονιδίων που έχουν διατηρηθεί στην εξέλιξη των οργανισμών. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν χαρακτηρίζονται από την παρουσία μοτίβων BIR (baculovirus IAP repeats)(80). Αυτές οι επαναλήψεις 65 αμινοξέων, εμφανίζονται τυπικά στο αμινικό άκρο των IAP και διευκολύνουν διάφορους τύπους αντιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών. Κάποια συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας αυτής περιέχουν έναν δακτύλιο στο καρβοξυλικό άκρο το οποίο θεωρείται ότι διαμεσολαβεί σε άλλες ειδικές αντιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών και δρα ως «πανταχού παρούσα» λιγάση, προωθώντας τον κατακερματισμό της X-συνδεδεμένης IAP (XIAP)(50). Όπως και τα ιικά ομόλογά τους, έτσι και κάποιες κυτταρικές IAP εμπλέκονται στον περιορισμό της απόπτωσης. Το γονίδιο που αποκωδικοποιεί ένα μέλος της οικογένειας IAP του ανθρώπου, το NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), είναι μερικώς διαγραμμένο σε άτομα με μυϊκή ατροφία της σπονδυλικής στήλης, νόσος που περιλαμβάνει απόπτωση σε κινητικούς νευρώνες (81). Επιπλέον, η cIAP-1 και η cIAP-2 στον άνθρωπο, έχουν βιοχημικά απομονωθεί ως μέρος του συμπλόκου διαβιβαστών του TNF-R2-TRAF, μια αντίδραση που περιλαμβάνει τα BIR, τμήματα των IAP και το στέλεχος της αμινομάδας του TRAF-2. Η επιρροή του μηχανισμού διαβιβαστών του TNF ίσως να

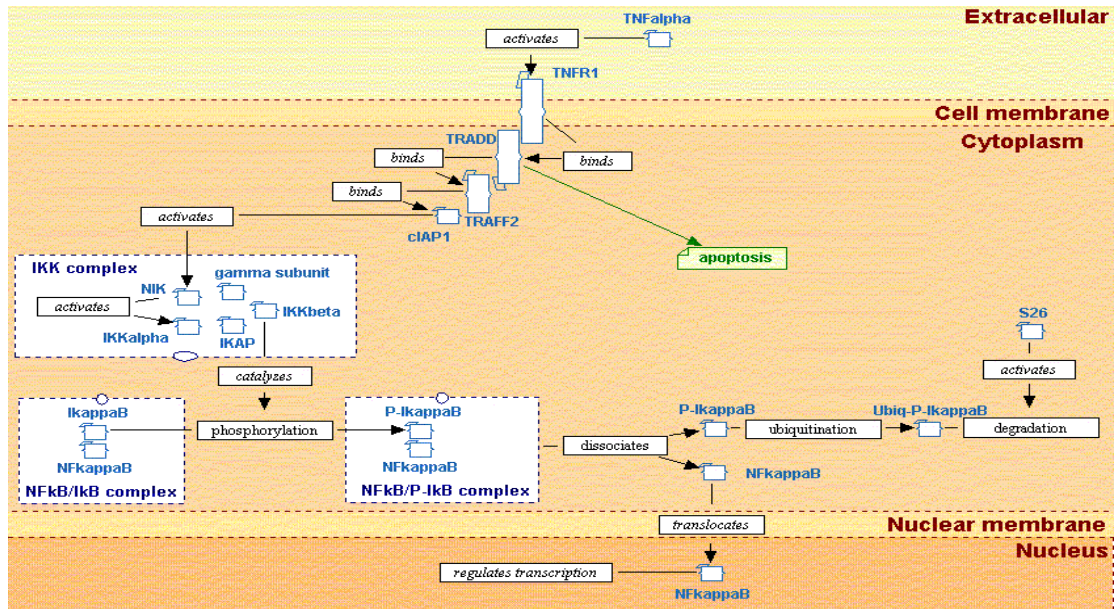
εξηγεί την αντι-αποπτωτική δράση του IAP στο κύτταρο, αλλά υπάρχει τουλάχιστον άλλο ένα ισχυρό αντί-αποπτωτικό ομόλογο του IAP στον άνθρωπο, το hILP, το οποίο δείχνει να μην αντιδρά με τις TRAF πρωτεΐνες in vitro. Ίσως κάποια IAP στο κύτταρο δρουν ως ελεγκτές της ενεργοποίησης του TRAF του αντί-αποπτωτικού παράγοντα μεταγραφής του NF-κΒ.

Ένα άλλο μέλος της οικογένειας του IAP, η σαρβιβίνη (survivin), έχει δείξει να υπερεκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα, ενώ παραμένει μη ανιχνεύσιμη σε διαφοροποιημένους ιστούς ενηλίκων (82). Η παρατήρηση αυτή τοποθετεί τη σαρβιβίνη στην ίδια κατηγορία των ογκογονιδίων που αναστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο όπως το bcl-2. Τα IAP έχουν ταυτοποιηθεί στη *Drosophila*, τον *C.elegans* και το σακχαρομούκητα. Όμως, ενώ ο αναστολέας της κασπάσης στην *Drosophila*, DIAP-1, είναι απαραίτητος για την κυτταρική επιβίωση καθώς οι IAP των θηλαστικών αναστέλλονται από το Smac/Diablo (όπως το κυτταρόχρωμα c που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια κατά την απόπτωση), τα IAP στο σακχαρομούκητα και το *C.elegans*, δεν δείχνουν να παίζουν ρόλο στην αναστολή του κυτταρικού θανάτου, αλλά μάλλον να εμπλέκονται στη ρύθμιση των κυτταροκινών και της κυτταρικής διαίρεσης, αντίστοιχα (80), ρόλος που έχει αποδοθεί και στη σαρβιβίνη στα θηλαστικά εκτός της αντι-αποπτωτικής της λειτουργίας.

Μια άλλη πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το TRAF, η TRIP, περιέχει ένα μοτίβο δακτυλίου και ένα επίμηκες σπειροειδές τμήμα, και συνδέεται με τα μέλη της οικογένειας υποδοχέων του TNF μέσω της αλληλεπίδρασής της με την TRAF. Όταν συνδεθεί, η TRIP αναστέλλει την διαμεσολαβούμενη από το TRAF ενεργοποίηση του αναστολέα της απόπτωσης NF-κΒ. Οι αλληλεπιδράσεις του TRAF με τις IAP είναι



δυνατό να αναστείλουν την απόπτωση ενώ η αλληλεπίδραση με το TRIP να την ενισχύσει. Το αποτέλεσμα της διαβίβασης μηνυμάτων του TNF που επικρατεί ίσως να εξαρτάται από την ύπαρξη διαθεσίμων μορίων cIAP και TRIP και από τις σχετικές δυνάμεις που προσελκύουν τα TRAF.

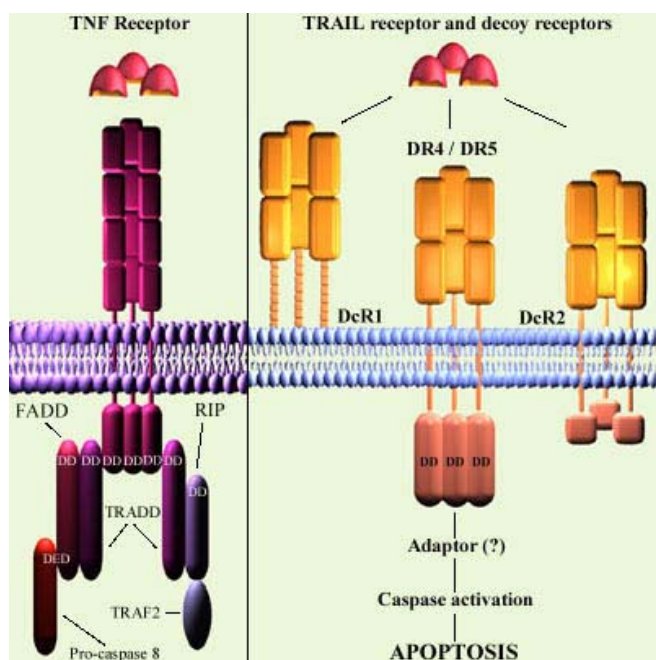


Εικόνα 14: Signal Transduction. Από τον υποδοχέα TNFR1 στο NF-κB

Έχει αναφερθεί ότι παρουσία της RIP κινάσης της σερίνης/θρεονίνης (που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του NF-κB από τον TNF-R1), ο TNF-R2 διαβιβάζει σήμα για κυτταρικό θάνατο στα T-κύτταρα, ενώ απουσία του RIP, ο TNF-R2 ενεργοποιεί τον NF-κB. Το RIP επάγεται κατά τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων ο οποίος καθοδηγείται από την ιντερλευκίνη-2, και η αναστολή του μειώνει την ευαισθησία για την εξαρτημένη από τον TNF απόπτωση.

## Οι υποδοχείς των πρωτεϊνών TRAIL.

Οι TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), που αποκαλούνται και Apo-2L, είναι ευρέως εκφραζόμενοι συνδέτες οι οποίοι δεν ενώνονται με το CD95 ή τον TNF-R1. Όπως και τα άλλα μέλη της οικογένειας των TNF/CD95L έτσι και ο TRAIL,



Εικόνα 15: Οι υποδοχείς TNF και TRAIL

συντίθεται ως μία προ-πρωτεΐνη που προσκολλάται στη μεμβράνη και η οποία μπορεί να διασπαστεί για να γίνει ένας διαλυτός συνδέτης. Πολλά νεοπλαστικά κύτταρα του ανθρώπου και κυτταρικές σειρές είναι ευαίσθητα στην επαγωγή της απόπτωσης από τον TRAIL που είναι προσκολλημένος στη μεμβράνη ή διαλυτός στο

περιβάλλον του κυττάρου. Όμως, τα φυσιολογικά κύτταρα, όπως τα θυμοκύτταρα του ποντικού ή τα πρωτογενή B-ή T- κύτταρα δεν είναι ευαίσθητα. Αυτή η εξαρτημένη από τον τύπο του κυττάρου αντίδραση ίσως ερμηνεύεται ως δείκτης της περιορισμένης κατανομής του υποδοχέα.. Παρ' όλα αυτά, οι υποδοχείς του TRAIL που έχουν ταυτοποιηθεί (ο DR4/TRAIL-R1 και ο DR4/TRICK-2/TRAIL-R2/KILLER/DR5) εκφράζονται στους πιο πολλούς ανθρώπινους ιστούς και σε μερικές κυτταρικές σειρές. Το TRAIL επάγει την απόπτωση μέσω αυτών των δύο υποδοχέων που περιέχουν επιτόπους θανάτου και που χρειάζονται FADD και κασπάση-8, όπως ακριβώς και ο κυτταρικός θάνατος όπου εμπλέκεται το CD95 (69). Έχουν ανακαλυφθεί άλλοι τρεις υποδοχείς TRAIL. Δύο από αυτούς, ο υποδοχέας-

“δόλωμα” (decoy receptor) 1 (DcR1/TRID/LIT/TRAIL-R3) και ο υποδοχέας- “δόλωμα 2” (DcR2/TRUNDD), στερούνται λειτουργικού DD, και έτσι είναι ανίκανοι να διαβιβάσουν το διαβιβαστή θανάτου (όπως μπορεί να κάνει ο τρίτος υποδοχέας, η οστεοπροτεγερίνη (osteoprotegerin), μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη). Έτσι, μπορούν να συμπεριφερθούν μόνο ως υποδοχείς-δολώματα με το να παρακάμπτουν το συνδέτη TRAIL από τις αποπτωτικές διαδικασίες μέσω DR4 και DR5 των οποίων η παρουσία μπορεί να ερμηνεύσει το γιατί κάποια κύτταρα επιλεκτικά θανατώνονται από το TRAIL ενώ άλλα όχι. Τα DcR1 και DcR2, εκφράζονται σε πολλούς ιστούς παρόλο που αυτό δεν συμβαίνει σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η απόπτωση βασίζεται στην έκφραση του ενός ή και των δύο υποδοχέων που περιέχουν επιτόπους θανάτου (DR4 και/ή DR5) αλλά η αντίσταση στην επαγόμενη από το TRAIL απόπτωση δεν συσχετίζεται με την έκφραση των υποδοχέων-“δολωμάτων”. Ίσως αντί να προσκολλάται σε όλους τους υποδοχείς με ισχυρές δυνάμεις, το TRAIL να έχει διαφορές στην προσκόλληση σε φυσιολογικές θερμοκρασίες και ο υποδοχέας επαγωγής του θανάτου DR5 να φαίνεται ότι είναι ισχυρότερα δεσμευμένος. Μ’ αυτόν τον τρόπο, η ικανότητα του TRAIL να φονεύει ειδικά τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να εξετασθεί περισσότερο (83).

Δεν είναι πολλά πράγματα γνωστά για τις φυσιολογικές βιολογικές λειτουργίες του TRAIL. Ένας μηχανισμός που εξαρτάται από αυτό της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας από τα μονοκύτταρα, προτείνει ότι το TRAIL ίσως να είναι σημαντικό μόριο-δράστης στην αντικαρκινική δραστηριότητα εντός του οργανισμού. Προκλινικές μελέτες σε ποντίκια και ανώτερα θηλαστικά, εκτός του ανθρώπου, έχουν δείξει ότι το TRAIL επάγει την μείωση των όγκων in vivo, σε αντίθεση με το TNF ή το CD95 συνδέτης/CD95 αντίσωμα, χωρίς σημαντικές παρενέργειες. Πάντως, τα

πρωτογενή ηπατοκύτταρα του ανθρώπου (σε αντίθεση με αυτά του ποντικού) δείχνουν να σκοτώνονται αποτελεσματικά από το TRAIL. Τα αστροκύτταρα του ανθρώπου είναι ένας άλλος κυτταρικός τύπος ευαίσθητος στον επαγόμενο από το TRAIL κυτταρικό θάνατο (84).

## ΟΙ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ

### **Ο επαγόμενος από την ογκοπρωτεΐνη κυτταρικός θάνατος.**

Ένας σημαντικός αριθμός ογκοπρωτεϊνών επάγει τον κυτταρικό θάνατο όταν υπερεκφραστεί σε κύτταρα. Τα καλύτερα τεκμηριωμένα αποτελέσματα είναι αυτά του μεταγραφικού παράγοντα c-Myc και της πρωτεΐνης του αδενοϊού E1A, αλλά ο κατάλογος περιλαμβάνει και τα c-Jun, c-Fos δύο από τα συστατικά του μεταγραφικού συμπλέγματος AP-1 (85), όπως και συστατικά του μηχανισμού προώθησης του κυτταρικού κύκλου G1, όπως τα E2F1 και κυκλίνη E (ενώ η επαγωγή της απόπτωσης φαίνεται να αντιπροσωπεύει την γενική κυτταρική αντίδραση κατά της υπερέκφρασης των ογκογονιδίων, σε συγκεκριμένες περιπτώσεις η μείωση της έκφρασης των c-Myc, Jun ή c-Fos, μέσω άγνωστου μηχανισμού, οδηγεί σε απόπτωση) (2). Επειδή όλες αυτές οι ογκοπρωτεΐνες προωθούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, η υπέρ-αποπτωτική τους λειτουργία συχνά ερμηνευόταν ότι ξεκινούσε σαν αποβλητική ή αποτυχημένη προσπάθεια στον κυτταρικό κύκλο – μια μιτωτική ή κατεστραμμένη φάση S. Η απόπτωση δεν είναι απαραίτητα αποτέλεσμα βλάβης στον κυτταρικό κύκλο(86). Η απόπτωση που επάγεται από τα ογκογονίδια ξεκινά από συμπλοκή των διαβιβαστών για την ανάπτυξη του κυττάρου: τα ογκογονίδια ενεργοποιούν την αποπτωτική διαδικασία εάν ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μπλοκαριστεί με κάποιο τρόπο ή ενεργοποιηθεί ατελώς ή χαλιναγωγηθεί. Πάντως, η θεωρία της συμπλοκής των διαβιβαστών, παρόλο πιθανή, δεν παρέχει εξήγηση της μοριακής φυσιολογίας, το πώς ξεκινά και πώς εξελίσσεται για να τελειώσει με την απόπτωση (87).

Η επαγωγή της απόπτωσης από την άποψη του Myc εκφράζεται με την υπόθεση των «διπλών διαβιβαστών», σύμφωνα με την οποία το Myc προωθεί δύο οδούς

αντιδράσεων που συμβαίνουν συγχρόνως – τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Η αποπτωτική οδός είναι μειωμένη για όσο χρόνο οι κατάλληλοι παράγοντες επιβίωσης μεταφέρουν τους αποπτωτικούς διαβιβαστές, κάτι που θα ταίριαζε στο γενικό μοντέλο της ρύθμισης της επιβίωσης/κυτταρικού θανάτου, σύμφωνα με το οποίο η «κανονική» μοίρα του κυττάρου θα ήταν ο θάνατός του, εκτός εάν αυτό ελεγχθεί από αντιαποπτωτικές κυτταροκίνες. Η σύζευξη των διαμετρικά αντίθετων οδών του πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού θανάτου υπό τον έλεγχο των πρωτεϊνών όπως της c-Myc, περιλαμβάνει έναν ισχυρό μηχανισμό ασφαλείας για τον έλεγχο της καρκινογένεσης, επειδή κάθε σημείο το οποίο ενεργοποιεί μιτωτική διαίρεση μπορεί να γίνει θανατηφόρο εάν το κύτταρο που υφίσταται την αλλαγή αυτή και ο πρόγονός του αναπτυχθούν σε περιβάλλον που επιτρέπει την επιβίωσή τους (88).

Οι πρωτεΐνες Myc και E2F μπορούν, σε συγκεκριμένες συνθήκες, να δράσουν ως αναστολείς της καρκινογένεσης. Π.χ. τα ποντίκια που δεν έχουν E2F-1 αναπτύσσουν δυσπλασίες και λεμφολυτικές υπερπλασίες, εν μέρει λόγω της μειωμένης απόπτωσης (πάντως η απώλεια του E2F-1 μειώνει την καρκινογένεση και επιμηκώνει το χρόνο ζωής των ετερόζυγων Rb-1(+/-) ποντικών που δεν το φέρουν, δείχνοντας έτσι ότι το E2F-1 ρυθμίζει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου) (2).

Μελέτες μεταλλαξογένεσης δείχνουν ότι τα σημεία της πρωτεΐνης c-Myc που είναι απαραίτητα για την επαγωγή της απόπτωσης αλληλεπικαλύπτονται με σημεία σημαντικά για τη μεταμόρφωση και περιλαμβάνουν τον αζωτούχο επίτοπο και τον καρβοξυλικό bHLH-LZ επίτοπο, ο οποίος λαμβάνει μέρος στην ειδικής-αλληλουχίας σύνδεση του DNA και το διμερισμό του με το Max (89). Η πρωτεΐνη Max

(απαραίτητη για τη σύνδεση του Myc με το DNA) είναι προαπαιτούμενη για την επαγωγή της απόπτωσης από το c-Myc στους ινοβλάστες, ενώ η υπερέκφραση του Mad-1 (το οποίο ανταγωνίζεται με τη λειτουργία του Myc μειώνοντας τη γονιδιακή μεταγραφή) αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση.

Κάποια υποψήφια γονίδια που ελέγχονται από το Myc έχουν ταυτοποιηθεί. Δύο γονίδια που έχουν προταθεί ως στόχοι του Myc, με βάση την έκφρασή τους είναι η ornithine decarboxylase (ODC) και η cdc25A. Η ODC είναι ένα ένζυμο-ρυθμιστής της ταχύτητας αντίδρασης στη βιοσύνθεση της πολυαμίνης, απαραίτητο για τη σύνθεση του DNA, ενώ η Cdc25A κωδικοποιεί την φωσφατάση της τυροσίνης που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των κυρίων επαγωγών της μίτωσης, τα σύμπλοκα της κινάσης που εξαρτώνται από την κυκλίνη (CDK). Και οι δύο αυτοί υποψήφιοι στόχοι του Myc, όταν υπερεκφραστούν, επάγουν της απόπτωση στα κύτταρα που δεν διαθέτουν παράγοντες επιβίωσης, όπως κάνει η υπερέκφραση του Myc. Έτσι, φαίνεται δυνατόν, οι οδοί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης να διχάζονται υπό την επήρεια του Myc. Επιπλέον, έχει καταδειχθεί η πρωτεΐνη TRAP-1 που συνδέεται με τον TNF-R και με το μέλος της οικογένειας του Bcl-2, το Bax, να είναι οι άλλοι στόχοι του Myc και οι οποίοι πιθανόν εμπλέκονται στη επαγόμενη από αυτό απόπτωση.

Το c-Myc (και η E1A) ενεργοποιεί επίσης το P53 μέσω της p19<sup>ARF</sup>, μιας πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το εναλλακτικό τμήμα ανάγνωσης του γονιδίου-κατασταλτή του όγκου -p16, και αυτός είναι ένας άλλος πιθανός μηχανισμός που συνδέει το c-Myc με την επαγωγή της απόπτωσης. Η E2F-1 δείχνει να επάγει την απόπτωση με τη ρύθμιση του ομολόγου του P53, P73.

Η απόπτωση που επάγεται από το c-Myc μπορεί να αλληλεπιδρά με τα CD95 και CD95L στην επιφάνεια του κυττάρου, έτσι οι δύο αυτές αποπτωτικές οδοί που θεωρούνταν ανεξάρτητες μεταξύ τους (του Myc και των CD95/CD95L), συνενώθηκαν ίσως συνενώνονται. Κατά την απόπτωση που επάγεται από το Myc σε ινοβλάστες στερημένους ορμού, το c-Myc δρα ρυθμίζοντας τον υποδοχέα CD95 και ευαισθητοποιώντας έτσι τα κύτταρα στον διαβιβαστή θανάτου CD95, παρόλο που το c-Myc μπορεί να δράσει και διαφορετικά, με το να επάγει την έκφραση των γονιδίων των CD95/CD95L.

Η έκφραση του c-Myc ευαισθητοποιεί τα κύτταρα σε σωρεία υπέρ-αποπτωτικών ερεθισμάτων, μέσω της απελευθέρωσης του μιτοχονδριακού κυτταροχρώματος c στο κυτταρόπλασμα(53). Η απελευθέρωση αυτή εξαρτάται από τις κασπάσες και αναστέλλεται από τον παράγοντα επιβίωσης insulin-like growth factor (IGF)-1 (90). Η αναστολή της επαγόμενης από το c-Myc απελευθέρωσης του κυτταροχρώματος c από την IGF-1, αλλά όχι του εξαρτώμενου από το c-Myc κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αντιπροσωπεύει ένα επιπλέον στοιχείο ότι οι μιτογενείς και αποπτωτικές οδοί που ελέγχει ο Myc είναι διαφορετικές. Το c-Myc (και η E1A) ευαισθητοποιούν τα κύτταρα-στόχους στην κυτταροτοξική δραστηριότητα των ενεργοποιημένων κυττάρων NK, και άρα πιθανόν κατευθύνουν την κυτταροτοξικότητα των NK προς τα μολυσμένα από ιούς ή τα καρκινικά κύτταρα (85).

Οι ακριβείς συνέπειες της υπερέκφρασης του Myc *in vivo* δείχνουν να εξαρτώνται από το είδος του ιστού και τη δυνατότητά του να μειώσει την απόπτωση με



διαβιβάσεις μηνυμάτων επιβίωσης. Π.χ. η διαγονιδιακή έκφραση της πρωτεΐνης c-Myc στα κερατινοκύτταρα της κατώτερης βάσης της επιδερμίδας του ποντικού έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία προκαρκινικών εστιών στο δέρμα που συνοδεύονται από αγγειογένεση. Η εκτοπική ενεργοποίηση του Myc στο δέρμα προκαλεί πολλαπλασιασμό των κυττάρων χωρίς ανιχνεύσιμη απόπτωση, παρόλο που η Myc είναι ισχυρή στο να ξεκινά την απόπτωση *in vitro* σε απομονωμένα κερατινοκύτταρα που είναι στερημένα ορμού από τα ίδια ποντίκια. Η απόπτωση που επάγεται από το Myc στο άθικτο δέρμα ίσως αναστέλλεται από την περίσσεια σημάτων επιβίωσης όπως οι κυτταροκίνες ή οι δεσμοί του εξωκυττάρου υλικού. Η επικρατούσα απώλεια των κερατινοκυττάρων που είναι ενεργοποιημένα από το c-Myc, ίσως είναι ενδεικτική της σπανιότητας στην κακοήγη ανάπτυξη της ακτινικής κεράτωσης (παρόλο που το c-Myc από μόνο του είναι αρκετό για να επάγει προκαρκινικές εστίες στο δέρμα).

Σε αντίθεση με το δέρμα, το κύριο αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του Myc στα β-κύτταρα του παγκρέατος διαγονιδιακών ποντικών είναι η απόπτωση, πράγμα που σημαίνει ότι η c-Myc είναι απίθανο να δημιουργεί καρκίνο στα β-κύτταρα χωρίς την παρουσία κάποιας αντί-αποπτωτικής εστίας (91).

## Η οικογένεια της Bcl-2

### Η Bcl-2.

Το πρωτο-ογκογονίδιο bcl-2 ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά ως γονίδιο-στόχος που ήταν παρόν στο σημείο μετάθεσης της t (14;18) θέσης χρωμοσωμικής μετάθεσης σε καρκινικά κύτταρα που εντοπίζονται στο 80% των ασθενών που πάσχουν από λέμφωμα των Β-κυττάρων. Οι θέσεις στις οποίες το γονίδιο bcl-2 μεταναστεύει με τη βοήθεια της βαρείας αλυσίδας του γονιδιακού επαγωγέα της 5' ανοσοσφαιρίνης (Εμ, χρωμόσωμα 14) ένα στοιχείο που είναι πολύ ενεργό μεταγραφικά στα Β-λεμφοειδή κύτταρα (2). Μελέτες της λειτουργίας του απορρυθμισμένου bcl-2 σε καλλιεργημένα λεμφοκύτταρα δείχνουν ότι το γονίδιο αυτό αντί να προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή να αναστέλλει τη διαφοροποίηση, περιορίζει την απόπτωση στα λεμφοκύτταρα (92).

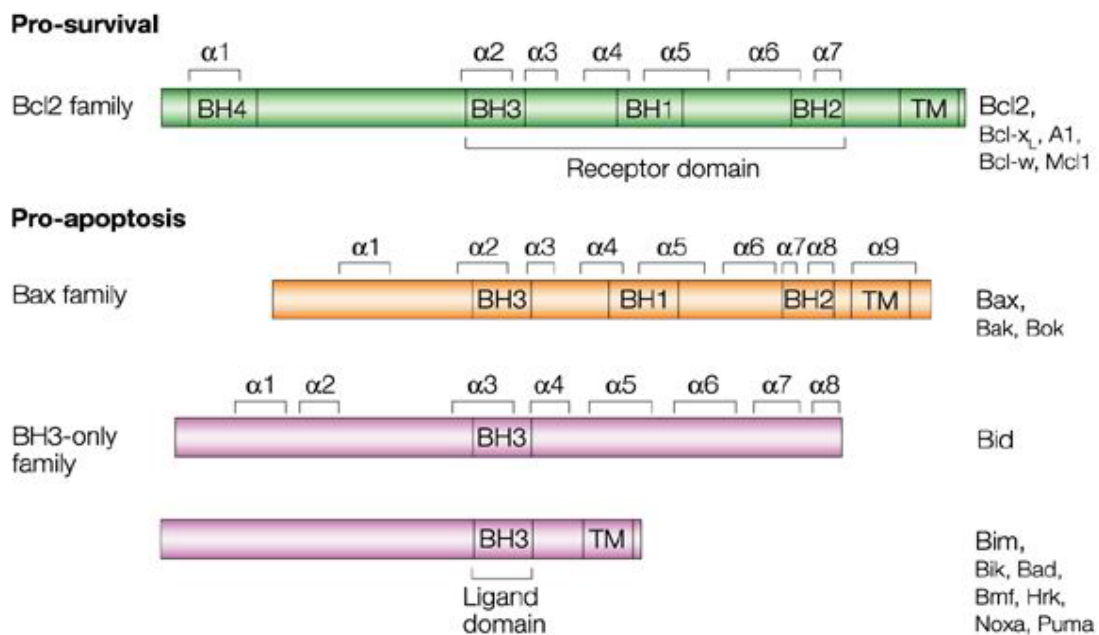
Η αντί-αποπτωτική δραστηριότητα της Bcl-2 εξηγεί την ογκογονική συνέργεια που παρατηρείται ανάμεσα στο Bcl-2 και το c-Myc. Η συνέκφρασή τους επάγει την ταχύτερη δημιουργία λεμφώματος, που συμβαίνει λόγω της αποτελεσματικής αναστολής της απόπτωσης που επάγεται από το c-Myc, από το bcl-2, χωρίς να επηρεάζεται σημαντικά η ικανότητα του c-Myc να καθοδηγεί τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό (93).

Η Bcl-2 εκφράζεται σε πληθώρα διαφορετικών εμβρυϊκών ιστών αλλά όταν εμφανίζεται σε ενήλικες τείνει να περιορίζεται σε κύτταρα ταχέως διαιρούμενα και διαφοροποιούμενα.

Τα πειραματόζωα που έχουν στερηθεί της bcl-2 δείχνουν σχεδόν φυσιολογικά κατά τη γέννησή τους αλλά αργότερα εμφανίζουν αποχρωματισμό των μικροτριχιδίων τους (λόγω του θανάτου των μελανοκυττάρων), παραμόρφωση του λεπτού τους εντέρου και πολυκυστική νόσο στους νεφρούς. Οι νεφροί αυτών των ζώων είναι μικρότεροι και περιέχουν λιγότερους νεφρώνες από ότι τα φυσιολογικά ζώα, το ανοσοποιητικό τους σύστημα είναι στερημένο B- και T-κυττάρων λόγω της απόπτωσης και αυτό οδηγεί τελικά σε εκτεταμένες επιπλοκές στη σπλήνα και το θύμο. Επιπλέον, τα ποντίκια που στερούνται Bcl-2, εμφανίζουν σημαντικό εκφυλισμό των νευρώνων, των αισθητήρων και του συμπαθητικού νευρικού συστήματος μετά τη γέννησή τους.

### Τα άλλα μέλη της οικογένειας του Bcl-2

Το Bcl-2 είναι το πρωτότυπο μιας διευρυμένης οικογένειας συγγενικών πρωτεϊνών στα θηλαστικά και τους ιούς. Η οικογένεια αυτή μπορεί να χωριστεί σε αναστολείς



Εικόνα 16: Τα αποπτωτικά και αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας του Bcl-2.

(Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, A1, E1B19K, LMW5-HL και EBV BHRF1) και υποκινητές (Bax, Bak, Bcl-x<sub>S</sub>, Bad, Bid, Bik, Hrk, Bim και Bok) της απόπτωσης. Αρκετά μέλη της οικογένειας του Bcl-2 μοιράζονται τέσσερα συντηρημένα τμήματα (BH1-BH4). Τα BH1, BH2 και BH4 μαζί με το υδρόφοβο διαμεμβρανικό τμήμα του που βρίσκεται στην καρβοξυλική ομάδα (μεμβρανική άγκυρα), εντοπίζονται στα περισσότερα μέλη της οικογένειας αυτής και είναι σημαντικές για τη λειτουργική τους δράση. Το τμήμα BH3 φαίνεται να είναι μη απαραίτητο για την ανασταλτική λειτουργία των αντί-αποπτωτικών ομολόγων του Bcl-2, παρόλο που η παρουσία του είναι απαραίτητη για την κυτταροτοξική αντίδραση στα αποπτωτικά μέλη της οικογένειας (94).

### Το Bcl-x<sub>L</sub>



Εικόνα 17: το Bcl-x<sub>L</sub>

Το Bcl-x<sub>L</sub> είναι ο κοντινότερος συγγενής της Bcl-2 που υπάρχει στα θηλαστικά και έχει κι αυτό την ικανότητα να δρα ως αναστολέας του κυτταρικού θανάτου. Το μεγέθους 2,7kbp γονίδιο bcl-x κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με 44% ταυτόσημη αλληλουχία με το bcl-2 του ανθρώπου και του ποντικού.

Το bcl-x κωδικοποιεί δύο πολυπεπτίδια προερχόμενα από εναλλακτική διάσπαση. Το μακρύτερο τμήμα του mRNA του κωδικοποιεί ένα ομόλογο της Bcl-2 που λειτουργεί σαν αναστολέας θανάτου (το Bcl-x<sub>L</sub>) το οποίο αποτελείται από 233 αμινοξέα με MB 28kDa και περιέχει και τα τέσσερα τμήματα BH (BH1-BH4) που υπάρχουν στο Bcl-2. Το μικρότερο τμήμα mRNA κωδικοποιεί την Bcl-x<sub>S</sub> η οποία αποτελείται από 170 αμινοξέα και έχει MB 18kDa. Η συσχέτιση των Bcl-x<sub>L</sub> και Bcl-x<sub>S</sub> δείχνει ότι το τελευταίο έχει 63 λιγότερα αμινοξέα τα οποία είναι τα BH1 και BH2 τμήματα και

ίσως αυτό δρα ως ρυθμιστικός παράγοντας επικράτησης της μιας ή της άλλης, ή ακόμα και των δύο αυτών πρωτεϊνών.

Το Bcl-x είναι εκφράζεται ευρέως και βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στον εγκέφαλο, τους νεφρούς και το θύμο των ενηλίκων. Η έκφρασή του στις διάφορες υποομάδες των T-κυττάρων είναι διαφορετική σε σχέση με το Bcl-2, του οποίου η έκφραση είναι υψηλότερη στα CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (DN) T-κύτταρα, περιορίζεται από τα CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP) θυμοκύτταρα και αυξάνεται στα CD4<sup>+</sup> ή CD8<sup>+</sup> (SP) T-κύτταρα.. Το Bcl-x<sub>L</sub> είναι μεταγραφικά ενεργοποιήσιμο από τον NF-κB ή το STAT 5.

Η τρανσγενετική απορρύθμιση του Bcl-x<sub>L</sub> σε λεμφοειδή κυτταρική σειρά, έχει επιπτώσεις παρόμοιες με αυτές της υπερέκφρασης του Bcl-2: τα λεμφοκύτταρα προστατεύονται σε διάφορους βαθμούς από την ενδεχόμενη θανάτωση τους από τη δεξαμεθαζόνη, γ-ακτινοβολία, την ιονομυκίνη και τη σύνδεση με το CD3, αλλά η διαγραφή των κλώνων των T-κυττάρων παραμένει αμετάβλητη. Επιπλέον, το Bcl-x<sub>L</sub> διασώζει τα ώριμα T-κύτταρα στα ποντίκια που στερούνται Bcl-2. Η παρόμοια λειτουργικότητα των Bcl-2 και Bcl-x<sub>L</sub> και το γεγονός ότι και τα δύο ετεροδιμερίζονται με τα αποπτωτικά μέλη της οικογένειας του Bcl-2, όπως τα Bax και Bak, δείχνουν ότι η Bcl-x<sub>L</sub> και η Bcl-2 λειτουργούν στο ίδιο πεδίο για να ανταγωνίζονται στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η διαφορετικότητά τους στην έκφραση δείχνει ότι ο ρόλος τους στη φυσιολογία είναι διαφορετικός. Αυτό το στοιχείο είναι πολύ εμφανές στα ποντίκια που έχουν στερηθεί του Bcl-x<sub>L</sub> και που, σε σχέση με τα ποντίκια που έχουν στερηθεί Bcl-2, έχουν εμβρυϊκή θνησιμότητα περίπου στη 13<sup>η</sup> μέρα της εμβρυογένεσης κατά την οποία λαμβάνει μέρος μεγάλη σε όγκο απόπτωση στον εγκέφαλο και στο αιμοποιητικό σύστημα (91).

## To Bax

Το Bax είναι το μέλος της οικογένειας του Bcl-2 και δρά επιταχύνοντας ή ενεργοποιώντας την απόπτωση αντί να την αναστέλλει. Το Bax και ο στενός του συγγενής το Bak, έχουν τα BH1, 2 και 3 τμήματα άλλα το BH4 τους είναι σπανίως σταθερό. Η κυτταροτοξικότητα των δύο αυτών πρωτεϊνών εξαρτάται από ένα μικτό τμήμα της κάθε πρωτεΐνης που συνθέτει το BH3. Το ίδιο τμήμα μεσολαβεί στον διμερισμό ανάμεσα στο Bax/Bak και το Bcl-2, την Bcl-x<sub>L</sub>, την E1B 19K, το Bid και τον εαυτό τους. Το Bax επιταχύνει την απόπτωση στα κύτταρα FL5.12 με απομάκρυνση της IL-2 και ρυθμίζει την αναστολή του θανάτου στο Bcl-2 (όσο ανεβαίνουν τα επίπεδα έκφρασης του Bax σε σχέση με τη Bcl-2, τόσο πιο έντονη γίνεται η αναστολή της δράσης του Bcl-2). Σ' αυτό το μοντέλο «ροοστάτη» για τη λειτουργία των Bax/ Bcl-2, η ροπή προς τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο θεωρείται ότι εξαρτάται από την αναλογία των Bax/Bax ομοδιμερών, των Bax/ Bcl-2 ετεροδιμερών και των Bcl-2/ Bcl-2 ομοδιμερών. Η περίσσεια των Bax ομοδιμερών έχει ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο, ενώ η ένωση του Bax με την Bcl-2 προωθεί την επιβίωση. Όμως δεν είναι σαφές εάν το Bax προωθεί τον κυτταρικό θάνατο, ή εάν απλώς αναστέλλει το προστατευτικό αποτέλεσμα του Bcl-2, η ακόμα εάν το Bax και η Bcl-2 ελέγχουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων με την αλληλεπίδραση τους με άλλους, μη εμφανείς, ρυθμιστικούς παράγοντες. Σε κάθε περίπτωση, η Bcl-2 και η Bcl-x δείχνουν να μπορούν να αναστείλουν την απόπτωση, ο Bax να την προωθήσει με ένα μηχανισμό ανεξάρτητο του ετεροδιμερισμού και ο Bak να επιταχύνει τον κυτταρικό θάνατο που επάγουν τα χημειοθεραπευτικά, ανεξαρτήτως του ετεροδιμερισμού του με τα Bcl-x<sub>L</sub> και Bcl-2.

Το Bax εκφράζεται σε πληθώρα ιστών συμπεριλαμβανομένων των λεμφοειδών οργάνων, των πνευμόνων, του στομάχου και των νεφρών. Η διαγονιδιακή έκφρασή του στα T-κύτταρα ποντικών, επιβεβαιώνει την αποπτωτική του ιδιότητα με τα επηρεασμένα κύτταρα να επιδεικνύουν επιτάχυνση της απόπτωσης ως αντίδραση στη γ-ακτινοβολία, τη δεξαμεθαζόνη και την ετοποσίδη. Όταν τα bax διαγονιδιακά ποντίκια διασταυρωθούν με bcl-2 διαγονιδιακά ζώα, η αναλογία του Bax προς το Bcl-2 που υπάρχει στα πρωτογενή T-κύτταρα διευθύνει το επίπεδο ευαισθησίας σε αποπτωτικά ερεθίσματα (95). Η προσθήκη Bax σε απομονωμένα μιτοχόνδρια επάγει την απελευθέρωση κυτταροχρώματος c, μέσω ενός μηχανισμού που αναστέλλεται όταν προστεθεί Bcl-x<sub>L</sub>. Η ακτινοβολία γ επάγει την αύξηση της Bax, με αποτέλεσμα την απόπτωση σε ευαίσθητα κύτταρα ποντικών (72). Η επαγόμενη από το P53 βλάβη στο DNA επιτυγχάνεται εν μέρει μέσω Bax. Υπάρχει στο P53 μια συμβατική αλληλουχία σύνδεσης στο ανθρώπινο και το γονίδιο bax του ποντικού. Οι νευρώνες σε ποντίκια χωρίς το γονίδιο bax δείχνουν μείωση της απόπτωσης σε μεγάλο βαθμό, μετά από βλάβη στο DNA ή έκθεση σε excitotoxin, αφού και τα δύο ενεργοποιούν το P53. Πάντως το Bax δεν μπορεί να είναι ο μόνος αποπτωτικός παράγοντας που επηρεάζει το P53, επειδή τα θυμοκύτταρα και άλλοι κυτταρικοί τύποι των ποντικών που στερούνται Bax συμπεριφέρονται φυσιολογικά σε σχέση με τις εξαρτώμενες από το P53 ανταποκρίσεις σε βλάβες του DNA. Η διαγονιδιακή έκφραση του Bax είναι ανίκανη να αντικαταστήσει την απουσία του P53 στα θυμοκύτταρα που εκτίθενται σε γονοτοξίνες (46).

Τα ποντίκια δίχως bax φαίνεται να αναπτύσσονται φυσιολογικά, υποδηλώνοντας έτσι, όπως και στην περίπτωση του bcl-2, ότι σημαντικό μέρος της δράσης του bax καλύπτεται από άλλες δραστικές πρωτεΐνες στο κύτταρο (τα bak -/- ποντίκια είναι

φυσιολογικά στην ανάπτυξή τους, ενώ τα *bax*<sup>-/-</sup>*bak*<sup>-/-</sup> ποντίκια έχουν πολλά προβλήματα, υποδηλώνοντας τους αλληλοκαλυπτόμενους ρόλους των *Bax* και *Bak* στη ρύθμιση της απόπτωσης κατά την ανάπτυξη στα θηλαστικά) (31). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αρσενικά ποντίκια που στερούνται *bax* είναι στείρα λόγω απουσίας σπερματογένεσης (96).

### **Το Bad και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας του Bcl-2 με μοναδικό τμήμα BH3**

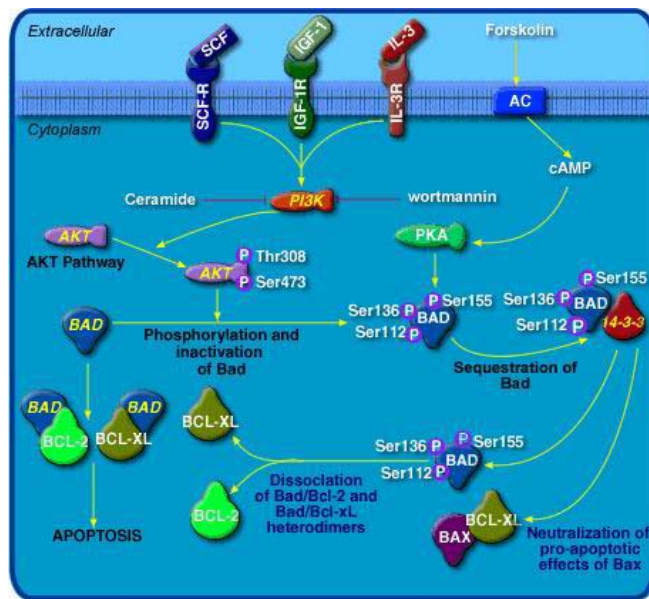
Η Egl-1 του *C.elegans* και τουλάχιστον άλλες επτά πρωτεΐνες των θηλαστικών (*Bad*, *Bik*, *Blk*, *Hrk*, *Bid*, *Bim*, *Noxa*) μοιράζονται ένα κοινό (από 9-16 αμινοξέα) τμήμα BH3 με την υπόλοιπη οικογένεια του Bcl-2 (33).

Το *Bim*, είναι απαραίτητο στην αιμόσταση του αιμοποιητικού μηχανισμού και είναι η ασφαλιστική δικλείδα της αυτοανοσίας. Επιπλέον, τα ειδικά ερεθίσματα θανάτου εμφανίζονται να ενεργοποιούν την απόπτωση μέσω των ξεχωριστών, BH3-μονών πρωτεϊνών (97).

Το *Bad* ταυτοποιήθηκε αρχικά από υβρίδια του σακχαρομύκητα, ως πρωτεΐνη 204 αμινοξέων (22,1kDa) η οποία συνδέεται με το Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> και προωθεί την απόπτωση (97). Το *Bad* διαφέρει από τα άλλα μέλη της οικογένειας του Bcl-2, και όπως το *Bid*, δεν έχει καμιά αναγνωρίσιμη αλληλουχία στο καρβοξυλικό άκρο του (μεμβρανική άγκυρα) και πιθανώς δεν είναι μεμβρανική πρωτεΐνη. Η θέση του στο κύτταρο ελέγχεται δυναμικά από τις συνδέσεις και αποσυνδέσεις του με τα άλλα μέλη της οικογένειας του. Το 1,1 kbp mRNA του, συνεκφράζεται με το Bcl-x<sub>L</sub> σε πολλούς ιστούς του ποντικού και η διϋβριδική ανάλυση και μελέτη ανοσοκαθίζησης δίνουν την ένδειξη ότι αυτή η πρωτεΐνη ετεροδιμερίζεται με το Bcl-2 και το Bcl-x<sub>L</sub>



αλλά όχι με τα Bcl-x<sub>S</sub>, Bax, Mcl-1, A1 ή τον εαυτό του. Το Bad ελέγχει την ιδιότητα



Εικόνα 18: Το Bad και η φωσφορύλιωση στο κυτταρόπλασμα.

του Bcl-x<sub>L</sub> να καταστέλλει το θάνατο και ίσως επιτείνει την αποπτωτική του δράση με το να συναγωνίζεται με το Bax για να ενωθεί με το Bcl-x<sub>L</sub> (98).

Η ρύθμιση της λειτουργίας του Bad έχει συνδεθεί με τη φωσφορύλιωση. Το Bad φωσφορύλιώνεται σε τρία σημεία (Ser-112, Ser-136 και

Ser-155). Όταν αυτό συμβεί, το Bad ενώνεται με την πρωτεΐνη 12-3-3 του κυτταροπλάσματος και απενεργοποιείται.

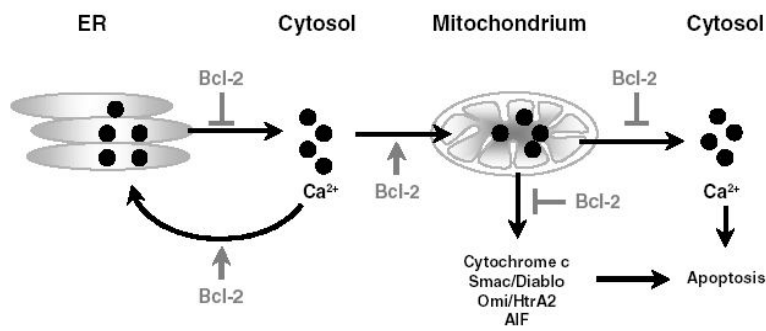
Σε αντιπαράθεση με το Bax, η Bid που είναι επίσης μονή-BH3, ρυθμίζεται από την πρωτεολυτική διάσπαση και όχι από τη φωσφορύλιωση. Αυτή η πρωτεΐνη διασπάται από την κασπάση-8 και η ακρωτηριασμένη της μορφή μεταναστεύει στα μιτοχόνδρια, όπου ενεργοποιεί το Bax και το Bak, επάγοντας τον ολιγομερισμό αυτών των υπεραποπτωτικών μελών της οικογένειας του Bcl-2. Πάντως, στα κύτταρα HeLa που χορηγήθηκε σταυροσπορίνη για να υποστούν απόπτωση, φάνηκε ότι το πλήρες Bid είναι αυτό που μεταναστεύει στα μιτοχόνδρια, αποδεικνύοντας έτσι ότι η επαγόμενη από τις κασπάσες διάσπαση του Bid δεν είναι προαπαιτούμενη για τη μετανάστευσή του στα μιτοχόνδρια (99).

Η Noxa, μια άλλη μονή-BH3 πρωτεΐνη θεωρείται ότι ρυθμίζεται από το P53. Όπως και τα άλλα μέλη της οικογένειας του Bcl-2, βρίσκεται στα μιτοχόνδρια μετά από το αποπτωτικό ερέθισμα και είναι δυνατόν να αλληλεπιδράσει με άλλα μέλη της οικογένειάς της. (100).

#### **Η λειτουργία της οικογένειας του Bcl-2**

Το Bcl-2 έχει ταυτοποιηθεί ως ογκογονίδιο - αναστολέας της απόπτωσης. Εντοπίζεται στην εξωτερική επιφάνεια του μιτοχονδρίου, την πυρηνική μεμβράνη και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η θέση του Bcl-2 στο μιτοχόνδριο είναι ιδιαίτερα ενδεικτική του ρόλου του μιτοχονδρίου στην απόπτωση. Αρχικά, αυτή η θέση έθρεψε την υπόνοια ότι ίσως είχε κάποιο ρόλο στην οξειδωτική φωσφορλίωση, άποψη που ενισχυόταν από την ικανότητά του να αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από την οξειδωτική βλάβη (ίσως με το να απομονώνει τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου). Όμως, η ανάλυση των κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε έντονα ανοξικές συνθήκες και κυττάρων που δεν είχαν μιτοχονδριακό DNA (και, άρα μιτοχονδριακή αναπνοή), έδειξαν ότι δεν υπήρχε άμεσος συσχετισμός ανάμεσα στη λειτουργία της αντι-αποπτωτικής δραστηριότητας του Bcl-2 και της οξειδωτικής φωσφορλίωσης. Επιπλέον, τα επίπεδα του ATP του κυττάρου ή η κατανάλωση οξυγόνου δεν επηρεάζονται από το Bcl-2 (101).

Το Bcl-2 δύναται να επηρεάσει την ενδοκυττάρια ομοιόσταση των επιπέδων ασβεστίου. Οι αλλαγές στα επίπεδα του ασβεστίου στο κύτταρο επηρεάζουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και έτσι παραμένει πιθανό ότι το Bcl-2 είτε ρυθμίζει άμεσα τα κανάλια ασβεστίου, είτε δρα με τέτοιο τρόπο ώστε να προστατεύσει τις λιπιδικές μεμβράνες από καταστροφή από ρίζες υπεροξειδίου οι



Εικόνα 19: Το Bcl-2 και τα ιόντα ασβεστίου.

οποίες είναι γνωστό ότι διακόπτουν την ομοιόσταση των ιόντων ασβεστίου (102;103).

Τα Bcl-2 και Bcl-x<sub>L</sub> αλληλεπιδρούν άμεσα

με σωρεία ενδοκυττάρων πρωτεϊνών. Στους γνωστούς παράγοντες περιλαμβάνονται τα αποπτωτικά μέλη της οικογένειας του Bcl-2 (όπως τα Bax, Bak και Bik), η Raf-1 πρωτεϊνική κινάση, η πρωτεϊνική φωσφατάση καλσινευρίνη, οι R-Ras και H-Ras, η πρωτεΐνη P53-BP2 που ενώνεται με την P53, η πρόδρομος πρωτεΐνη Pr-1 και αρκετές άλλες πρωτεΐνες με ασαφείς λειτουργίες. Η λειτουργικότητα πολλών από αυτές τις αλληλεπιδράσεις είναι ακόμα αμφιλεγόμενη, π.χ. η σύνδεση που έχει παρατηρηθεί μεταξύ της Bcl-2 και της πρωτεΐνης του *C.elegans* Ced-4, ή αυτή του θηλαστικού της ομολόγου Araf-1. Και ενώ κάποιες ομάδες επιστημόνων μπορούν να δείξουν μια τέτοια αλληλεπίδραση, άλλες απέτυχαν. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της Bcl-2 και των υπερ-αποπτωτικών μελών της οικογένειας της, θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική (104).

Προς το παρόν, υπάρχουν τρία μοντέλα που εξηγούν τη λειτουργία της Bcl-2. Όλα περιγράφουν τις πρωτεΐνες Bcl-2 ως ιοντικά κανάλια, ή ως πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των κασπασών ή ως αναστολείς της έκκρισης του κυτταροχρώματος c από τα μιτοχόνδρια.

Η πιθανότητα τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Bcl-2 να δρουν ως μεμβρανικά κανάλια ξεκίνησε από την αποκάλυψη της λεπτομερούς τριδιάστατης δομής της Bcl-x<sub>L</sub>, η οποία μοιάζει με πεπτίδια των βακτηριακών τοξινών που εισέρχονται στη

μεμβράνη όπως αυτά των τοξινών της διφθερίτιδας και της κολικίνης (colicin). Τα πεπτίδια αυτά περιέχουν δύο έλικοειδής σχηματισμούς που απαρτίζονται από άπολα στελέχη τα οποία έχουν τη δυνατότητα να ανοίγουν τη μεμβράνη. Λόγω της ιδιότητας της τοξίνης της διφθερίτιδας να σχηματίζει πόρους στην επιφάνεια της μεμβράνης αναλόγως του pH, έχει προταθεί ότι η Bcl-2 και τα ομόλογά της δρουν με ανάλογο τρόπο σχηματίζοντας πόρους στις κυτταροπλασματικές και μιτοχονδριακές μεμβράνες (πιθανώς αναλόγως των διαβιβαστών που εξαρτώνται από το ηλεκτρικό δυναμικό ή το pH). Η δραστηριότητα αυτού του ιοντικού καναλιού έχει ανιχνευθεί με το Bcl-2, το Bcl-x<sub>L</sub> και με το υπερ-αποπτωτικό Bax σε απομονωμένα λιπιδικά στρώματα in vitro, παρόλο που επί του παρόντος, δεν υπάρχει άμεση απόδειξη για το σχηματισμό καναλιών in vivo. Το Bax δύναται να αλληλεπιδράσει με το VDAC ή/και το ANT, για να απελευθερώσει κυτταροχρώμα c. Μετά από τον ολιγομερισμό του, ίσως σχηματίζει και πόρους απελευθέρωσης κυτταροχρώματος c μόνο του. Η απελευθέρωση αυτή του κυτταροχρώματος c είναι δυνατό να ανασταλεί από τα μέλη της οικογένειας του Bcl-2 που περιέχουν το τμήμα BH4 όπως η Bcl-2 και το Bcl-x<sub>L</sub> (57).

Αναλογικά προς το βασικό αποπτωτικό μηχανισμό του *C.elegans*, προτείνεται ένας δεύτερος μηχανισμός δράσης του Bcl-2 μέσω ενεργοποίησης των κασπασών. Στον σκώληκα αυτό, η πρωτεΐνη-προσαρμογέας Ced-4 συνδέεται με την Ced-3 και επάγει την εξαρτημένη από το ATP αυτοενεργοποίηση του Ced-3 ζυμογόνου. Η Ced-9, το ομόλογο μόριο της Bcl-2 στον *C.elegans*, αλληλεπιδρά με φυσιολογικό τρόπο με τη Ced-4, και μπλοκάρει την ενεργοποίησή του από το Ced-3. Παρόλο που η γενετική μελέτη του σκώληκα έχει αποκαλύψει μόνο τις Ced-3, Ced-4 και Ced-9 ως τους πρωταγωνιστές αυτής της διαδικασίας, είναι πιθανό να υπάρχουν και άλλα μέλη που

να συμμετέχουν σε αποπτωτικά σύμπλοκα τα οποία δεν μπορούν να διαχωριστούν γενετικά για το λόγο ότι είναι σημαντικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε κάποια άλλη, υποχρεωτική βιολογική διαδικασία – το κυτταρόχρωμα c είναι ένα από αυτά. Σε αναλογία με τη νηματόδα οι Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> ίσως αναστέλλουν την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 με το ομόλογο του Ced-4, Araf-1.

Σε ένα τέτοιο μοντέλο, ο ρόλος των υπερ-αποπτωτικών μελών της οικογένειας των πρωτεϊνών του Bcl-2 είναι να απομακρύνει τις Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> από το σύμπλοκο των Araf-1/cytochrome c/caspase-9 και μ' αυτόν τον τρόπο να ξεκινήσει η αυτοενεργοποίηση της κασπάσης-9.

Σε αντίθεση με τα Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub>, το Bax –τουλάχιστον σε μερικούς τύπους κυττάρων- δείχνει μια ποικιλία στον εντοπισμό του στο κυτταρόπλασμα. Όμως, με την επαγωγή απόπτωσης, επιστρέφει γρήγορα στη βάση του ώστε να εμφανίζει κατανομή στα μιτοχόνδρια όπου υποτίθεται ότι ενώνεται με τις Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub>. Αυτό δημιουργεί μια πειστική απάντηση ότι η επιστροφή του Bax είναι μέρος της έναρξης της διαδικασίας της απόπτωσης, παρόλο που η μοριακή βάση της κίνησης αυτής είναι άγνωστη.

Η βιοχημική ανάλυση έχει δείξει ότι η απελευθέρωση του κυτταροχρώματος c από τα μιτοχόνδρια είναι διαδικασία –κλειδί για το σχηματισμό του αποπτωσώματος – του πολυμερούς συμπλόκου που απαρτίζεται από κασπάση-9, Araf-1, dATP και κυτταρόχρωμα c και το οποίο εγείρει την αυτοκαταλυτική διάσπαση και ενεργοποίηση της κασπάσης-9 (105). Το κυτταρόχρωμα c εντοπίζεται ανάμεσα στο μεσοδιάστημα μεταξύ εξωτερικής και εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και ο μοριακός μηχανισμός της έκκρισής του παραμένει αδιευκρίνιστος. Εικάζεται ότι τα

Bcl-2 και Bcl-xL που εδράζουν στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, αναστέλλουν της απελευθέρωση του κυτταροχρώματος c (106).

Είναι πιθανό οι πρωτεΐνες Bcl-2/x<sub>L</sub> να δρουν μέσω και των τριών αυτών μηχανισμών. Ίσως η δραστηριότητα των πρωτεϊνών Bcl-2/x<sub>L</sub> στη δημιουργία ιοντικού καναλιού κατευθύνει την απελευθέρωση κυτταροχρώματος c, ενώ άλλα σημεία της πρωτεΐνης αλληλεπιδρούν με το Araf-1. Το Bcl-2 έχει ταυτοποιηθεί ως στόχος των κασπασών ο οποίος διασπάται κατά την απόπτωση για να δημιουργήσει ένα προϊόν της διάσπασης του καρβοξυλίου του που προωθεί την απόπτωση (21).

Παραμένει ασαφές εάν τα υπερ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών του Bcl-2 επάγουν τον κυτταρικό θάνατο δρώντας ως ενεργά μόρια του αποπτωτικού μηχανισμού ή εάν εξουδετερώνουν τη δράση των αντι-αποπτωτικών μελών της ίδιας οικογένειας, τα οποία αντιπροσωπεύουν πρωτεΐνες που έχουν ενεργό συμμετοχή στις φυσιολογικές διαδικασίες της κυτταρικής επιβίωσης. Επιστημονικά δεδομένα των τελευταίων ετών υποστηρίζουν την πρώτη θεωρία: τα κύτταρα που στερούντο των γονιδίων bax και bak δείχνουν ανθεκτικά στη ραδιενεργό ακτινοβολία και την φαρμακευτικώς επαγόμενη απόπτωση, αλλά παραμένουν ευαίσθητα στον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από το CD95. Η υπερέκφραση πρωτεϊνών που περιέχουν μόνο BH3 και συνδέονται με τα αντι-αποπτωτικά ομόλογα του Bcl-2 δεν προκαλούν απόπτωση όταν απουσιάζουν τα Bax και Bak. Υπό τις συνθήκες αυτές, ίσως τα Bcl-2 και Bcl-xL να μην έχουν λειτουργικό ρόλο όταν απουσιάζουν μόρια ομόλογα με τα Bax και Bak, όπως έχει αποκαλυφθεί στο σακχαρομύκητα (107).

Το Bcl-2 και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειάς του όχι μόνον αναστέλλουν ή επάγουν την απόπτωση, αλλά δύνανται να επηρεάζουν την ανάπτυξη του κυττάρου. Έχει καταδειχθεί η σχέση των Bcl-2 και Bcl-xL αλλά και άλλων πρωτεϊνών, ομολόγων προς αυτά (BHRF1-Epstein-Barr, E1B (19kDa) Adenovirus, MCL-1) που υπό συνθήκες υπερέκφρασης επιβραδύνουν την είσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο και επιταχύνουν την έξοδό τους από αυτόν. Αντίθετα, η υπερέκφραση της υπερ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax επιταχύνει την είσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο. Υπάρχουν δεδομένα που ενισχύουν την άποψη ότι η αντι-αποπτωτική δράση του Bcl-2 είναι εφικτό να διαχωριστεί γενετικά από την ανασταλτική της δράση στην είσοδο του κυττάρου στον κυτταρικό κύκλο. Η μοριακή βάση που επιτρέπει τον έλεγχο της διαδικασίας αυτής παραμένει ασαφής, αλλά στην περίπτωση του MCL-1 ευτό έχει επιτευχθεί με τη σύνδεση του υπό πολλαπλασιασμό κυττάρου με πυρηνικό αντιγόνο (PCNA), αναστέλλοντας έτσι την ικανότητα του PCNA να επάγει την ανάπτυξη στη φάση S του κυτταρικού κύκλου (108).

### **Το P53 και η απόπτωση**

Το γονίδιο-αναστολέας της ανάπτυξης του όγκου, p53, είναι λειτουργικά ενεργοποιήσιμο στο 70% των όγκων στον άνθρωπο. Το γονίδιο αυτό μπορεί να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας και οι καλύτερα μελετημένες λειτουργίες του είναι ή η επαγωγή της άρσης της ανάπτυξης του κυττάρου ή η απόπτωση. Τα επίπεδα του αυξάνονται κατακόρυφα όταν προκληθεί βλάβη στο DNA, κυρίως λόγω του ότι το -υπό κανονικές συνθήκες- βραχύβιο P53, σταθεροποιείται και αποτελεί σημαντικό τμήμα της άρσης της ανάπτυξης G1 και της απόπτωσης, η οποία έπεται της βλάβης στο DNA. Η διακοπή της λειτουργίας από το P53 οφείλεται στην ιδιότητά του ως μεταγραφικού ενεργοποιητή συγκεκριμένης αλληλουχίας και η πρωτεΐνη P21

(WAF1CIP-1), φαίνεται πως είναι κύριος δράστης στην περίπτωση αυτή. Το P53<sup>WAF1CIP-1</sup> συνδεεται και αναστέλλει τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες, προκαλώντας έτσι την άρση της λειτουργίας του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (109).

Το πως η P53 ρυθμίζει την απόπτωση είναι σχετικά ασαφές και φαίνεται ότι περιλαμβάνει τόσο οδούς που εξαρτώνται από την μεταγραφική ενεργοποίηση όσο και οδούς ανεξαρτήτου αυτής. Και οι δυο αυτές λειτουργίες δείχνουν να είναι δυνατό να αναλυθούν γενετικά: ένα μεταλλαγμένο στέλεχος από καρκίνο στον άνθρωπο ταυτοποιήθηκε το οποίο είχε συγκεκριμένα χάσει την αποπτωτική του ιδιότητα αλλά όχι την ικανότητά του να συμμετέχει στον κυτταρικό κύκλο. Έχει προταθεί η ύπαρξη ενός μοντέλου στο οποίο οι ρυθμιστές της λειτουργίας (όπως το γονιδιακό παράγωγο atm το οποίο είναι ελαττωματικό στην ataxia telangiectasia και το οποίο είναι μέρος της βιοχημικής οδού που ανταποκρίνεται σε βλάβες στο DNA ως αποτέλεσμα ιοντικής ακτινοβολίας) επιλεκτικά ενεργοποιούν το P53 για να ρυθμίσει ειδικά σημεία στη βιοχημική οδό, μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος ελέγχει τον κύκλο του κάθε κυττάρου και την αποπτωτική του αντίδραση (110).

Η απόφαση εάν ένα ξεχωριστό κύτταρο υποβάλλεται σε άρση της ανάπτυξής του ή απόπτωση μετά από την ενεργοποίηση του P53, φαίνεται πως εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες, όπως οι συνθήκες στο περιβάλλον του και ο κυτταρικός του τύπος. Είναι σχετικά ασφαλές να υποθέσουμε ότι, στην περίπτωση της βλάβης στο DNA του κυττάρου, που έπεται ο διακοπτόμενος κυτταρικός κύκλος από το P53, υπάρχει κάποιος μηχανισμός ελέγχου ο οποίος αξιολογεί το εάν η βλάβη είναι



αποκαταστάσιμη σχετικά σύντομα ή τόσο σοβαρή που το κύτταρο πρέπει να υποβληθεί σε απόπτωση.

Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης που ρυθμίζει το μόριο αυτό χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτίδια, έχει δείξει ότι η φύση της απάντησης του P53 σε διαφόρων ειδών ερεθίσματα, εξαρτάται από τα επίπεδα της P53 πρωτεΐνης στο κύτταρο, το είδος του ερεθίσματος ή τη χημική του σύσταση και τον κυτταρικό τύπο που εμπλέκεται σ' αυτήν. Από τα περίπου 6000 γονίδια που έχουν εξετασθεί για ρυθμιστικές αντιδράσεις στο P53, 107 επάγομενα και 54 ανασταλλόμενα γονίδια χωρίστηκαν σε κατηγορίες απόπτωσης και αναστολής της ανάπτυξης, κυτταροσκελετικές ιδιότητες, παράγοντες ανάπτυξης και αναστολείς τους και μόρια προσκόλλησης.

Εικάζεται ότι υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί όπου η πρωτεΐνη P53 επεμβαίνει στον αποπτωτικό μηχανισμό: Το υπέρ-αποπτωτικό Bax μέλος της οικογένειας του Bcl-2, δείχνει ότι επάγεται μεταγραφικά από το P53 κατόπιν της βλάβης στο DNA σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Όμως, το Bax φαίνεται να συνεισφέρει μόνο μερικώς στον κυτταρικό θάνατο μέσω του P53: η υπερ-αποπτωτική λειτουργία του P53 φαίνεται πως δεν επηρεάζεται στα ποντίκια που στερούνται του bax και η απόπτωση διαγονιδιακών θυμοκυττάρων που εκφράζουν το Bax ούτε αυξάνεται αλλά ούτε και επιταχύνεται σε p53<sup>-/-</sup> κύτταρα. Επιπλέον, η γενετική ανίχνευση με DMS αποκάλυψε ότι η δράση του υποκινητή του Bax στα ποντίκια ρυθμίζεται από τις Sp1/3 και E-box πρωτεΐνες σύνδεσης αλλά όχι από το P53 (2).

Κατά ένα διαφορετικό σενάριο που έχει προταθεί, στον επαγόμενο κυτταρικό θάνατο από το P53, η βλάβη στο DNA και η υπερέκφραση του αρχέγονου γονιδίου p53

προκαλεί επαγωγή της μεταγραφής του υποδοχέα TRAIL, DR5, μέσω μίας ιντρονικής θέσης σύνδεσης με ειδική αλληλουχία του DNA. Η βλάβη στο DNA αποτυγχάνει στην επαγωγή έκφρασης του DR5 με μεταλλαγμένο p53. Η υπερέκφραση του DR5 (με επιμόλυνση) προκαλεί απόπτωση με ανεξάρτητο τρόπο από τον συνδέτη TRAIL, υποδηλώνοντας ότι η έκφραση του DR5 που ακολουθεί την επαγωγή του P53 μπορεί να ενεργοποιήσει την απόπτωση.

Η απόπτωση που επάγεται από UV- και X-ακτινοβολία εξαρτάται από το P53 και φαίνεται πως διαμεσολαβείται από ενεργοποίηση του CD95, παρέχοντας έναν ακόμα δυναμικό κρίκο μεταξύ του P53 και ενός υποδοχέα θανάτου (της επιφάνειας του κυττάρου). Ο υποδοχέας CD95 θεωρείται ήδη ως γονιδιακός στόχος για την ενεργοποίηση της μεταγραφής από το P53 (111).

Άλλα γονίδια που είναι ικανά να επάγουν την απόπτωση έχουν προταθεί ως στόχοι του P53 : η μεταγραφή του c-fos πρωτο-ογκογονιδίου ξεκινά από το P53 σε κύτταρα που υφίστανται απόπτωση που μεσολαβείται από αυτό και το MCG10 έχει ταυτοποιηθεί ως νέος P53 γονιδιακός στόχος που κωδικοποιεί το KH στέλεχος της πρωτεΐνης που ενώνεται με το RNA και είναι ικανή να επάγει την απόπτωση και την άρση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2-M. Η Pidd, μια νέα πρωτεΐνη που περιέχει DD, έχει δείξει να επάγεται από το P53 και να προωθεί την απόπτωση. Αυτό το μόριο ίσως συνδέει υποδοχείς θανάτου μεταξύ τους, όπως τον CD95 (ο οποίος περιέχει επίσης έναν υποδοχέα θανάτου ως μοτίβο αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών) στον P53-διαμεσολαβούμενο κυτταρικό θάνατο. Με την κλωνοποίηση των αλληλουχιών στις οποίες συνδέεται το P53 στο DNA του ανθρώπου, έχει ανακαλυφθεί άλλο ένα γονίδιο το p53AIP1 (P53-regulated apoptosis-inducing

protein1), το οποίο είναι επαγόμενο από το αρχέγονο P53. Η πρωτεΐνη P53AIP1 εντοπίζεται μέσα στα μιτοχόνδρια και η υπερέκφρασή της οδηγεί στην διακοπή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι η φωσφορυλίωση της Ser-46 εντός του P53 ρυθμίζει την ενεργοποίηση της μεταγραφής αυτού του γονιδίου που επάγει την απόπτωση.

Ενώ γενικά η επαγωγή της απόπτωσης από ογκογονίδια φαίνεται να είναι εξαρτημένη από το P53, είναι υπό αμφισβήτηση το εάν ισχύει το ίδιο για τον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από το Myc. Παρόλο που δεδομένα από τα κύτταρα που στερούνται του γονιδίου p53 υποστηρίζουν ανεξαρτησία του P53 στη φονική δράση του Myc, υπάρχουν και άλλα παραδείγματα του P53-ανεξάρτητου και c-Myc-επαγόμενου κυτταρικού θανάτου(110).

Το P53 επάγει την απόπτωση όχι μόνο μέσω μηχανισμού ανεξάρτητου της παράλληλης ενεργοποίησης, αλλά και μέσω μη-μεταγραφικής οδού. Στα λεία μυϊκά κύτταρα του ανθρώπου, η ενεργοποίηση του P53 αύξησε δραστικά την επιφάνεια της έκφρασης του CD95 με την μεταφορά του από το σύστημα Golgi. Αυτή η ανακατανομή χώρου στο κυτταρόπλασμα για το CD95 ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στην επαγόμενη από το CD95 απόπτωση και γίνεται χωρίς σύνθεση RNA.

Το P53 μπορεί επίσης να συνεισφέρει στην απόπτωση με άμεση μεταφορά διαβιβαστών στο μιτοχόνδριο: ένα κλάσμα της επαγόμενης πρωτεΐνης του P53 μετά από βλάβη στο DNA ή ταξιδεύει προς τα μιτοχόνδρια. Αυτός ο μιτοχονδριακός εντοπισμός προηγείται της απελευθέρωσης κυτταροχρώματος c και της ενεργοποίησης της προκάσπασης-3 και μπλοκάρεται από την υπερέκφραση των αντι-

αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2. Εάν το P53 αφαιρεθεί από τον πυρήνα και κατευθυνθεί προς τα μιτοχόνδρια με τη χρήση μιτοχονδριακών πεπτιδίων που επιτρέπουν την είσοδό τους σε αυτό, είναι αρκετό για την επαγωγή της απόπτωσης σε κύτταρα που στερούνται P53, ακόμα και μ' ένα μεταλλαγμένο και μεταγραφικά ανενεργό p53.

Η ρύθμισή της ενεργότητας του P53 είναι μάλλον πολύπλοκη και συμβαίνει σε πολλά διαφορετικά επίπεδα. Η ογκοπρωτεΐνη Mdm2 ενώνεται με το P53 και είναι ένας φυσιολογικός περιοριστικός ρυθμιστής της ενεργότητας του P53. Το Mdm2 δύναται να αναστείλει της λειτουργία του P53 ως παράγοντα μεταγραφής με την ένωσή του σε αυτό στο σημείο της αμινομάδας του, και έτσι αποτρέπει να αντιδράσει το P53 με τον μεταγραφικό μηχανισμό και να αναστείλει την ενεργοποίηση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για αυτό (110).

Η σύνδεση του Mdm2 επίσης στοχεύει το P53 για την αποδόμηση από τη Ubiquitin. Κατά τη βλάβη στο DNA, η διακοπή της αντίδρασης των Mdm2/P53 είναι μηχανισμός που αυξάνει την ημιζωή του P53 αναλόγως με το μέγεθος της βλάβης . Το Mdm2 ρυθμίζεται μόνο του από τη μικρή, παρόμοια με τη ubiquitin, πρωτεΐνη μετατροπέα SUMO-1: η σύζευξη του Mdm2 και του SUMO-1 αφαιρεί την ικανότητά του να είναι πανταχού παρόν και αυξάνει την ικανότητα του Mdm1να καταστήσει πανταχού παρούσα την P53. Η μειωμένη σύνδεση των Mdm2 και SUMO-1, όταν υπάρχει βλάβη στο DNA, συνεισφέρει στη σταθερότητα του P53 (82).

Υπάρχουν κι άλλοι μηχανισμοί που μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα του P53: το μεταλλαγμένο γονίδιο της ataxia telangiectasia (ATM) που είναι μια κινάση

σερίνης/θρεονίνης και ισορρόπησης του P53 σε ερέθισμα ιοντικής ακτινοβολίας, λειτουργεί εν μέρει λόγω της εξαρτημένης από το ATM φωσφορυλίωσης του P53 στη Σερίνη-15, και μ' αυτόν τον τρόπο διακόπτεται το σύμπλοκο του Mdm2/P53 και αυξάνεται η ημιζωή του P53 σε παρουσία βλάβης στο DNA. Η πρωτεϊνική κινάση που εξαρτάται από το DNA (DNA-PK), είναι μια άλλη υποψήφια κινάση για να φωσφορυλιώσει το P53 στη σερίνη-15. Όπως έχει προαναφερθεί, η φωσφορυλίωση της σερίνης-46 στο P53 ρυθμίζει τη μεταγραφική του ενεργοποίηση στο υπερ-αποπτωτικό του P53 γονίδιο-στόχο p53AIP1. Η άρση της ανάπτυξης των κυττάρων από το P53 και η απόπτωση ρυθμίζονται επίσης από ακετυλίωση και αποακετυλίωση. Η υποξία επάγει την συγκέντρωση αρχέγονου P53 μέσω του επαγόμενου από την υποξία, παράγοντα 1<sup>α</sup> (HIF-1a) ο οποίος ελέγχει την αύξηση της δραστηριότητας της πρωτεΐνης P53. Ο HIF-1a ενώνεται και σταθεροποιεί το P53 αλλά δεν έχει άμεσο αποτέλεσμα στην μεταγραφική δραστηριότητά του.

Η απώλεια της λειτουργίας του αναστολέα του όγκου Rb ίσως συμμετέχει στην P53-επαγόμενη απόπτωση. Στην υποφωσφορυλιωμένη της μορφή, η Rb ενώνεται με τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας του E2F και τους απενεργοποιεί. Στον κυτταρικό κύκλο η πρωτεΐνη αυτή είναι φωσφορυλιωμένη από τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση των δεσμευμένων παραγόντων του E2F, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη μετάβαση στη φάση G1/S. Τυχόν απώλεια της Rb, έχει ως αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και την εξαρτημένη από το P53 απόπτωση γεγονός που ίσως μπορεί να εξηγήσει το γιατί πολλοί τύποι καρκίνων εμφανίζουν μεταλλάξεις τόσο στην έκφραση της πρωτεΐνης P53 όσο και στο γονίδιο p53.

Το ομόλογο του P53, P73 φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στην απόπτωση που επάγεται από το E2F-1. Η ενεργοποίησή της P73 δίνει τα μέσα στο E2F-1 να επάγει κυτταρικό θάνατο επί απουσίας του P53 και ίσως αυτός να είναι ένας αντικαρκινικός μηχανισμός ασφαλείας που εξαρτάται από το P53 (109).

## **ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ**

Για να είναι δυνατόν να μελετηθούν και οι δύο μορφές του κυτταρικού θανάτου, η νέκρωση και η απόπτωση, χρησιμοποιούνται μέθοδοι ανίχνευσης της κυτταροτοξικότητας. Οι μέθοδοι αυτές είναι δύο τύπων:

- Ραδιενεργές και μη, οι οποίες μελετούν την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης (112), αφού τα κύτταρα που πεθαίνουν γίνονται διαπερατά.
- Φωτομετρικές μέθοδοι, οι οποίες μετρούν τη μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας των μιτοχονδρίων, αφού τα μιτοχόνδρια των νεκρών κυττάρων δεν μεταβολίζουν χρωμογόνα υποστρώματα (113).

Όμως, με την πάροδο του καιρού και την πληθώρα των πληροφοριών σχετικά με την απόπτωση που συνέρρεαν, οι ερευνητές κατάλαβαν ότι οι μελέτες κυτταροτοξικότητας υποτιμούσαν σε μεγάλο βαθμό το μέγεθος και το χρόνο της απόπτωσης. π.χ. Στις πρώιμες φάσεις της απόπτωσης δεν διαταράσσεται η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, ούτε μεταβάλλεται η μιτοχονδριακή δραστηριότητα. Παρόλο που οι κυτταροτοξικές μέθοδοι ανάλυσης δείχνουν κατάλληλες για την ανίχνευση μεταγενέστερων σταδίων της απόπτωσης, υπήρχε ανάγκη να αναπτυχθούν νέες τεχνικές που θα μπορούσαν να ανιχνεύουν πρώιμα στάδια της διαδικασίας (114).

Σε συμφωνία με την αυξημένη κατανόηση των φυσιολογικών γεγονότων που συμβαίνουν κατά την απόπτωση, έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι για την ανίχνευσή της. Π.χ. οι ακόλουθες μέθοδοι μπορούν να μετρήσουν μία εκ των ακόλουθων αποπτωτικών παραμέτρων:

- Τον κατακερματισμό του DNA σε πληθυσμούς κυττάρων ή σε ξεχωριστά κύτταρα, των οποίων το DNA έχει διασπαστεί σε κομμάτια διαφορετικού μήκους (115).
- Τις αλλαγές στην ασυμμετρία της κυτταρικής μεμβράνης. Η φωσφατιδυλσερίνη μεταφέρεται από την κυτταροπλασματική στην εξωκυττάρια επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης (116).
- Την ενεργοποίηση των αποπτωτικών κασπασών. Της οικογένειας αυτής των πρωτεασών οι οποίες ξεκινούν μια σειρά από γεγονότα τα οποία απενεργοποιούν πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες (30).
- Της απελευθέρωση του κυτταροχρώματος c και του AIF στο κυτταρόπλασμα από τα μιτοχόνδρια (96).

## **ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ**

Σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι που ανιχνεύουν την αποπτωτική διαδικασία σε κυτταρικούς πληθυσμούς. Το ενδιαφέρον μας θα εστιαστεί σε δύο κύρια αποπτωτικά γεγονότα στο κύτταρο:

Η απόπτωση και η διαμεσολαβούμενη από το κύτταρο κυτταροτοξικότητα χαρακτηρίζονται από τη διάσπαση του γονιδιώματος σε τμήματα προ της αποδιάταξης της μεμβράνης. Λόγω του ότι η διαδικασία αυτή είναι σημαντική στην απόπτωση, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι ανίχνευσης της προ-λυτικής διάσπασης του DNA οι οποίες είναι ιδιαίτερες χρήσιμες στη διάκριση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. Τα τμήματα του DNA μπορούν να ανιχνευθούν με δύο τρόπους:

A. είτε ως κλίμακες (με πολλαπλά αντίγραφα των 180 ζευγών βάσεων, ως «σκαλοπάτια») οι οποίες προέρχονται από πληθυσμούς κυττάρων (18)



B. είτε με ποσοτικοποίηση των κομματιών του DNA που έχουν συνδεθεί με ιστόνες, χρησιμοποιώντας ELISA (117).

Επιπλέον, έχει ανακαλυφθεί ότι οι πρωτεάσες εμπλέκονται στα πρώιμα στάδια της απόπτωσης (118). Η εμφάνιση αυτών των κασπασών ξεκινά μια σειρά αντιδράσεων η οποία απενεργοποιεί τις κυτταρικές λειτουργίες. Η ενεργοποίηση των κασπασών δύναται να αναλυθεί με διάφορους τρόπους:

Με ενζυμική μέθοδο *in vitro*. Η δραστηριότητα μιας συγκεκριμένης κασπάσης, π.χ. της κασπάσης-3, δύναται να μετρηθεί σε σπασμένα κυτταρικά εναιωρήματα με τη δέσμευση της κασπάσης και τη μέτρηση της πρωτεολυτικής της ικανότητας με κατάλληλο υπόστρωμα (38).

Με ανίχνευση της διάσπασης σε υπόστρωμα της κασπάσης *in vivo*. Π.χ. η κασπάση-3 ενεργοποιείται στα αρχικά στάδια της απόπτωσης. Το υπόστρωμά της PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) και τα αποδομημένα παράγωγα της αντίδρασης δύναται να ανιχνευθούν με αντίσωμα έναντι του PARP (49).

#### Μέθοδοι που μετρούν την αποδόμηση του DNA

Ένα κύριο χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι ο κατακερματισμός του γονιδιώματος του κυττάρου. Μια μη αναστρέψιμη διαδικασία που καθιστά το εξαναγκάζει το κύτταρο να πεθάνει. Αυτή η διαδικασία έχει ανακαλυφθεί ότι είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της ενδογενούς ενδονουκλεάσης που εξαρτάται από τα μόρια ασβεστίου και μαγνησίου (119). Το ένζυμο αυτό έχει την ιδιότητα να διασπά το DNA στα σημεία που βρίσκονται μεταξύ των νουκλεοσωματίων (DNA σύνδεσης) παράγοντας μονονουκλεοσωμάτια και ολιγονουκλεοσωμάτια. Τα μικρά αυτά τμήματα του DNA αποκάλυψαν μετά την ανάλυσή τους με ηλεκτροφόρηση

αγαρόζης, μια κλίμακα αγαρόζης που αποτελείται από πολλαπλά στελέχη των 180 ζευγών βάσεων (120).

Έχουν αναπτυχθεί ραδιενεργές και οι μη ραδιενεργές μέθοδοι για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του διαμελισμού του DNA σε κυτταρικούς πληθυσμούς. Γενικά, οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στην ανίχνευση ή/και την ποσοτικοποίηση είτε του μικρού μοριακού βάρους DNA το οποίο αυξάνεται στα αποπτωτικά κύτταρα, είτε του μεγάλου μοριακού βάρους το οποίο μειώνεται. Η βασική αρχή αυτών των μεθόδων είναι ότι το DNA το οποίο υφίσταται εκτεταμένο διαμελισμό δύναται να διαχωριστεί εύκολα από τα μεγάλα τμήματα με χρωμοσωμικό μήκος, για παράδειγμα με φυγοκέντρηση και διήθηση (121).

Για την ποσοτικοποίηση του διαμελισμού του DNA, οι περισσότερες μέθοδοι περιλαμβάνουν σήμανση του DNA των κυττάρων. Προ της προσθήκης του παράγοντα επαγωγής του κυτταρικού θανάτου ή των κυττάρων διαμεσολαβητών αυτού, τα κύτταρα-στόχοι επωάζονται είτε με τριτυλιωμένη θυμιδίνη ( $[^3\text{H}]\text{-dT}$ ) είτε με το νουκλεοτιδικό ανάλογο 5-βρώμο-2'-δεοξουριδίνη (BrdU). Κατά τη σύνθεση του DNA, τα μόρια αυτά ενσωματώνονται στο γονιδίωμα. Εν συνεχεία, τα σεσημασμένα κύτταρα επωάζονται με παράγοντες επαγωγής του κυτταρικού θανάτου ή κύτταρα-φονείς και το μόριο είτε διαμελίζεται είτε παραμένει ανέπαφο στον πυρήνα του κυττάρου. Στο τέλος ποσοτικοποιείται το διαμελισμένο και μη DNA. Λόγω του ότι το κυτταρικό DNA πρέπει να σημανθεί πριν από την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου, αυτή η μέθοδος ονομάζεται και προσήμανση. Η προσήμανση κάποιου κυτταρικού πληθυσμού (π.χ. των κυττάρων-στόχων) επιτρέπει τη λεπτομερή

παρακολούθηση των σεσημασμένων κυττάρων όταν αυτά αναμειχθούν με άλλο κυτταρικό πληθυσμό.

Σε μελέτη έμμεσης κυτταροτοξικότητας, τα κύτταρα-στόχοι σημαίνονται πριν την ανάμειξή τους με τα κύτταρα-φονείς. Λόγω του σχηματισμού πόρων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων, το διαμελισμένο DNA χαμηλού μοριακού βάρους εξέρχεται από το κυτταρόπλασμα του κυττάρου στο υπερκείμενο της καλλιέργειας. Το δυναμικό της κυτταροτοξικότητας του κυττάρου-φονέως μετράται με την ποσοτικοποίηση του παράγοντα σήμανσης που απελευθερώνεται από τα κατεστραμμένα κύτταρα-στόχους (122).

Επειδή αυτού του τύπου η μεταβολική προσήμανση του γονιδιώματος απαιτεί σύνθεση του DNA, μόνο τα κύτταρα που έχουν τη δυνατότητα να αναπαράγονται *in vitro* (π.χ. κυτταρικές σειρές) μπορούν να χρησιμοποιηθούν μ' αυτόν τον τρόπο. Τα μη αναπαραγόμενα κύτταρα *in vitro* (π.χ. οι πρωτογενείς καλλιέργειες και τα *ex vivo* καρκινικά κύτταρα) δεν συνθέτουν DNA και ως εκ τούτου δεν ενσωματώνουν σεσημασμένα ολιγονουκλεοτίδια.

Για να ανιχνευθεί το διαμελισμένο DNA αυτών των κυττάρων, πρέπει να απομονωθεί από τα κύτταρα υπό μελέτη και να αναλυθεί με ηλεκτροφόρηση αгарόζης. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανοσοϊστοχημική μέθοδος ανίχνευσης του DNA με χαμηλό μοριακό βάρος (το οποίο έχει ενωθεί με ιστόνη).

Κάθε μία από τις μεθόδους ανίχνευσης της απόπτωσης έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της. Λόγω της πολυπλοκότητας των μηχανισμών που οδηγούν σε

απόπτωση, οι περισσότερες μέθοδοι που δημοσιεύονται δεν επαρκούν από μόνες τους να πιστοποιήσουν την διαδικασία.

Για να γίνει αυτό πρέπει να ικανοποιηθούν κάποια επιπλέον κριτήρια όπως για παράδειγμα της κυτταρικής μορφολογίας. Τα μορφολογικά κριτήρια της απόπτωσης περιλαμβάνουν, π.χ. συμπύκνωση της χρωματίνης με συσσωματώματα κατά μήκος του πυρήνα και φυσαλιδοειδείς σχηματισμού της κυτταρικής μεμβράνης, παρατηρήσεις που ακολουθούνται από το σχηματισμό αποπτωσωμάτων. Όταν ο ενδονουκλεοσωμικός κατακερματισμός του DNA συνοδεύεται από αυτά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, τότε παρέχονται οι αναγκαίες αποδείξεις ώστε ο θάνατος του κυττάρου να θεωρείται αποπτωτικός (26).

#### ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΥ ΜΕΤΡΟΥΝ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ ΠΟΥ ΕΠΑΓΟΥΝ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ (ΚΑΣΠΑΣΕΣ)

Αρκετός αριθμός κασπασών θεωρείται ότι διαμεσολαβεί στα πολύ πρώιμα στάδια της απόπτωσης. Π.χ. μία από αυτές, η κασπάση-3 (CPP32) απαιτείται για την επαγωγή της απόπτωσης από συγκεκριμένους παράγοντες (ειδικά τον TNF και τον cytotoxic T-cell ligand effector – CD95 (που αποκαλείται και Fas))(123).

Αυτές οι πρωτεάσες διασπών έναν μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων στο καρβοξυλικό άκρο των μορίων ασπαρτικού οξέος. Όλες συντίθενται ως προένζυμα, των οποίων η ενεργοποίηση περιλαμβάνει διάσπαση των μορίων. Καθώς οι κασπάσες είναι πιθανώς τα σημαντικότερα μόρια επίδρασης για την εκκίνηση μιας σειράς βιοχημικών αντιδράσεων που οδηγούν σε αποπτωτικό θάνατο, οι μέθοδοι που επικεντρώνονται σ'

αυτές μπορούν να ανιχνεύσουν την απόπτωση νωρίτερα χρονικά από άλλες μεθόδους (30).

Η πιο διαφωτιστική μέθοδος ανίχνευσης των κασπασών περιλαμβάνει μέτρηση των πρωτεολυτικών υποπροϊόντων που βρίσκονται στα αποπτωτικά κύτταρα με τη χρήση Western Blot. Ένα εμπορικώς διαθέσιμο αντίσωμα έναντι του PARP, το anti-PARP, δύναται να χρησιμοποιηθεί σε αυτή τη μέθοδο. Το αντίσωμα αυτό ανιχνεύει τις ανέπαφες και διασπασμένες μορφές του ενζύμου της Poly-ADP-Ribose Polymerase, το οποίο είναι ο στόχος μερικών από τις κασπάσες (122).

Για την ειδική και ποσοτική μέτρηση της ενεργότητας των κασπασών η Western Blot δεν είναι η πλέον κατάλληλη μέθοδος. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί νέες μέθοδοι οι οποίες βασίζονται στην ανίχνευση των διασπασμένων υποστρωμάτων των κασπασών (38). Όμως, τα πιο πολλά υποστρώματα των κασπασών δεν διασπώνται ειδικά από κάποια συγκεκριμένη κασπάση, η οποία απλώς εμφανίζει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για το συγκεκριμένο υπόστρωμα, ενώ οι υπόλοιπες δρουν σ' αυτό σε πιο περιορισμένη κλίμακα.

## ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΕ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια για τη μελέτη της απόπτωσης σε ξεχωριστά κύτταρα. Το ενδιαφέρον μας θα εστιαστεί στη μελέτη δύο κύριων αποπτωτικών γεγονότων στο κύτταρο:

1. Στον κατακερματισμό του DNA ο οποίος χρησιμεύει στη μελέτη του κυτταρικού θανάτου σε πληθυσμούς κυττάρων ο οποίος μπορεί να χρησιμεύσει και για ξεχωριστά κύτταρα. Όπως έχει περιγραφεί και προηγουμένως, ο διαμελισμός του DNA είναι σημαντικό γεγονός της απόπτωσης και οι μέθοδοι που τον χρησιμοποιούν ως δείκτη της είναι ιδιαίτερα δημοφιλείς.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για να μετρηθεί η έκταση των κομματιών DNA, βασίζονται στη σήμανση/χρώση του κυτταρικού γονιδιώματος. Το DNA αυτό στη συνέχεια αναλύεται με κυτταρομετρία ροής, μικροσκοπία φθορισμού ή απλό μικροσκόπιο.

Σε γενικές γραμμές, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο διαφορετικές μέθοδοι σήμανσης για να ταυτοποιηθεί το DNA στα αποπτωτικά κύτταρα:

- Με ενζυμική σήμανση: όπου το κυτταρικό DNA σημαίνεται με τροποποιημένα ολιγονουκλεοτίδια (π.χ. συζεύξεις Biotin-dUTP, DIG-dUTP, fluorescein-d-UTP), χρησιμοποιώντας εξωγενή ένζυμα (όπως terminal transferase, DNA polymerase). Μ' αυτόν τον τρόπο ανιχνεύεται η έκταση του διαμελισμού του DNA (124).

- Η χρώση με φθοριοχρώματα: το DNA του κυττάρου βάφεται με φθορίζουσες χρωστικές, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να ενώνονται με το DNA και να επιδρούν σε αυτό. Με την ένωσή τους με το DNA αυτές οι χρωστικές καθίστανται ιδιαίτερα

φθορίζουσες. Τα αποπτωτικά κύτταρα ενώνονται σε χαμηλότερο βαθμό με αυτές τις χρωστικές καθώς χάνουν το DNA τους κατά τη διαδικασία της χρώσης (125).

2. Πλέον αυτών, τα ξεχωριστά κύτταρα που υφίστανται απόπτωση μπορούν να μελετηθούν με μεθόδους που ανιχνεύουν αλλαγές στην κυτταρική τους μεμβράνη (διαφοροποιήσεις στην ασυμμετρία ή τη διαπερατότητα των μεμβρανών κυττάρων, οι οποίες λαμβάνουν χώρα όταν η μεμβράνη συρρικνώνεται και καθίσταται σημαντικά διαπερατή). Π.χ. κατά την απόπτωση, η φωσφατιδυλσερίνη μετακινείται από την κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης στην εξωκυττάρια και δύναται να ανιχνευθεί με Annexin-V (112) .

### **Η ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΗΜΑΝΣΗΣ TUNEL**

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η εκτεταμένη αποδόμηση του DNA είναι χαρακτηριστικό φαινόμενο που συμβαίνει συχνά σε πρώιμα στάδια της απόπτωσης. Η διάσπαση του παράγει ζεύγη βάσεων DNA χαμηλού μοριακού βάρους από DNA μεγάλου μοριακού βάρους. Αυτά τα κομμάτια της αλληλουχίας του DNA μπορούν να ανιχνευθούν με ενζυμική σήμανση των ελευθέρων ριζών υδροξυλίου με τροποποιημένα νουκλεοτίδια (X-dUTP, X-biotin, συζευγμένα με διγοξυγενίνη ή fluorescein). Κατάλληλα υποψήφια ένζυμα σήμανσης περιλαμβάνουν την DNA Polymerase (nick translation) και την terminal deoxynucleotidyl transferase (end labeling) (122).

Η DNA polymerase I καταλύει την προσθήκη τμημάτων DNA στα τυχαία σημεία που έχει δημιουργηθεί ρήξη του μορίου. Η αντίδραση αυτή (που ονομάζεται In Situ Nick Translation, ISNT) ανιχνεύοντας όχι μόνον το αποπτωτικό DNA αλλά και την τυχαία

του αποδόμηση από πολλαπλά μόρια ενδονουκλεασών που εμφανίζονται κατά την κυτταρική νέκρωση.

Με τη χρήση της

terminal

deoxynucleotidyl

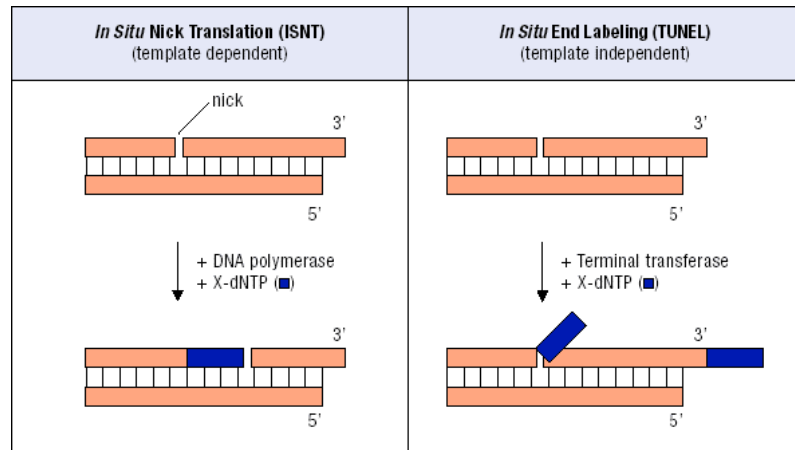
transferase (TdT)

δύναται να

σημανθούν τα τυφλά

μέρη του DNA διπλής

έλικας ανεξάρτητα



**Εικόνα 20: Σχηματική αναπαράσταση των μεθόδων *In Situ* Nick Labelling (ISNT) και *In Situ* End Labeling (TUNEL)**

από την αλληλουχία των βάσεων που το αποτελούν. Η μέθοδος nick end-labeling έχει επίσης ονομασθεί TUNEL (TdT-mediated X-dUTP nick end labeling) (126). Η μέθοδος αυτή είναι περισσότερο ευαίσθητη και γρήγορη από την ISNT. Επιπλέον, τα κύτταρα που υφίστανται απόπτωση σε πρώιμο στάδιο σημαίνονται ευκολότερα με TUNEL, ενώ τα νεκρωτικά κύτταρα με ISNT. Η έως τώρα εμπειρία δείχνει ότι η TUNEL είναι πιο ειδική για την απόπτωση και η συνδυασμένη χρήση της με τη nick translation μπορεί να δώσει τη δυνατότητα να ταυτοποιηθούν και να διαχωριστούν τα νεκρωτικά από τα αποπτωτικά κύτταρα (127).

Για να επιτραπεί στα εξωγενή ένζυμα να εισέλθουν στο κύτταρο, πρέπει η κυτταρική μεμβράνη να καταστεί διαπερατή πριν από την ενζυμική αντίδραση. Για να αποφευχθεί η απώλεια DNA μικρού μοριακού βάρους από τα κύτταρα που έχουν γίνει διαπερατά, συνίσταται η μονιμοποίηση των κυττάρων αυτών με φορμαλδεϋδη ή γλουταραλδεϋδη πριν από την διαπερατοποίηση. Η μέθοδος αυτή εμπλέκει το DNA



χαμηλού μοριακού βάρους με άλλα κυτταρικά συστατικά και περιλαμβάνει την εκχύλιση του κατά τη διαδικασία της διαπερατοποίησης (128). Όταν σημειωθούν τα ελεύθερα τέλη 3' του DNA με biotin-dUTP ή DIG-dUTP, τα ενσωματωμένα ολιγονουκλεοτίδια ανιχνεύονται σε δεύτερο στάδιο επώασης με (στρεπ्ट)αβιδίνη ή με αντίσωμα έναντι της διγοξυγενίνης το οποίο έχει συζευχθεί με μοριακό δείκτη (π.χ. Fluorescein, AP, POD)(129).

Σε αντίθεση με αυτό, η χρήση συζευγμένης fluorescein-dUTP για να σημειωθούν τα κομμένα μέλη του DNA δίνει τη δυνατότητα να ενσωματωθούν άμεσα τα ολιγονουκλεοτίδια με μικροσκόπιο φθορισμού ή κυτταρομετρητή ροής. Η άμεση σήμανση με fluorescein-dUTP προσφέρει και άλλα πλεονεκτήματα, όπως την ελαχιστοποίηση της παραγωγής μη ειδικής αντίδρασης με ευαισθησία ίση με την έμμεση σήμανση και άρα, είναι τόσο ισχυρή όπως και η έμμεση μέθοδος στην ανίχνευση της απόπτωσης (116). Επιπλέον, ο φθορισμός μπορεί να μετατραπεί σε φωτομετρικό σήμα εάν χρησιμοποιηθεί στο δείγμα συζευγμένο με δείκτη αντίσωμα έναντι της φλουορεσκεΐνης.

Παρόλο που οι μέθοδοι ενζυμικής σήμανσης είναι αρκετά χρονοβόρες (λόγω του αυξημένου χρόνου επώασης και των πλύσεων που απαιτούν) έχουν το πλεονέκτημα της μεγάλης ευαισθησίας και ειδικότητας (117).

## Μέθοδοι που Ανιχνεύουν τις μεμβρανικές μεταβολές

Σε αντίθεση με τη νέκρωση, η απόπτωση δεν προκαλεί φλεγμονή (1). Στα τελικά στάδια της απόπτωσης, τα αποπτωσώματα προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα και άλλα φαγοκύτταρα *in vivo*. Έτσι, τα αποπτωτικά κύτταρα αφαιρούνται ομαλά από τον κυτταρικό πληθυσμό χωρίς την έκκριση των περιεχομένων τους και δεν προκαλούν φλεγμονώδη αντίδραση (130).

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το αποπτωτικό κύτταρο καθίσταται στόχος των φαγοκυττάρων δεν έχει διευκρινιστεί. Πάντως, έχει αποδειχθεί ότι ένας αριθμός αλλαγών λαμβάνουν μέρος στην επιφάνεια του κυττάρου κατά την απόπτωση, κάθε μία από τις οποίες μπορεί να αποτελεί μήνυμα για την αφαίρεσή του από τα φαγοκύτταρα. Οι μεμβρανικές αλλαγές περιλαμβάνουν:

- Απώλεια των μορίων σιαλικού οξέος από τις πλευρικές αλυσίδες των γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας, εκθέτοντας έτσι νέα μόρια σακχάρων.
- Η αποκάλυψη επιφανειακών γλυκοπρωτεϊνών που ίσως δρουν ως υποδοχείς των εκκρινόμενων από τα μακροφάγα συνδετικών μορίων, όπως η θρομβοσπονδίνη.
- Η απώλεια της ασυμμετρίας των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την άρση της υδροφοβικότητας και του ηλεκτρικού δυναμικού της.

Θεωρητικά, κάθε μία από αυτές τις αλλαγές στη σύσταση της μεμβράνης θα μπορούσε να αποτελεί στόχο ανίχνευσης των αποπτωτικών κυττάρων. Στην πραγματικότητα, όμως, μόνο μία από αυτές χρησιμοποιείται: η άρση της κατανομής των φωσφολιπιδίων (23).

Στα φυσιολογικά κύτταρα η κατανομή των φωσφολιπιδίων είναι ασύμμετρη, με την έσω πλευρά της μεμβράνης να περιέχει ανιονικά φωσφολιπίδια (όπως τη φωσφατιδυλσερίνη) και την εξωτερική πλευρά να περιέχει κυρίως ουδέτερα φωσφολιπίδια. Στα αποπτωτικά κύτταρα, το ποσό της φωσφατιδυλσερίνης (PS) στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης αυξάνεται, εκθέτοντάς την στο εξωτερικό περιβάλλον.

Η Annexin-V, μία πρωτεΐνη που εξαρτάται από την παρουσία ασβεστίου για να συνδεθεί με φωσφολιπίδιο, έχει ειδική προσκολλητική ικανότητα στην PS (112). Παρόλο που δεν προσκολλάται στα ζωντανά κύτταρα, η Annexin V συνδέεται με την PS που βρίσκεται στην μεμβρανική επιφάνεια του αποπτωτικού κυττάρου. Άρα, έχει αποδειχθεί κατάλληλος δείκτης για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων (131).

#### ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ.

Όπως ανελύθη στο προηγούμενο κεφάλαιο, υπάρχουν αρκετά γονίδια που ρυθμίζουν γενετικά τη διαδικασία της απόπτωσης. Οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για να ανιχνεύουν τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά των μεθόδων που έχουν ήδη περιγραφεί.

Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών αυτών που ρυθμίζουν την αποπτωτική διαδικασία έχουν αναπτυχθεί μια σειρά αντισωμάτων έναντι της p53 καθώς και έναντι της ογκοπρωτεΐνης Bcl-2, τα οποία είναι εμπορικά διαθέσιμα.

Το μόριο Fas (CD95/APO-1) ταυτοποιήθηκε αρχικά ως υποδοχέας της επιφάνειας του κυττάρου ο οποίος διαμεσολαβεί στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο των διαφοροποιημένων κυττάρων και προκαλεί τον περιορισμό των καρκινικών όγκων

που έχουν προκληθεί πειραματικά και αναπτύσσονται σε πειραματόζωα. Το Anti-Fas το οποίο είναι εμπορικά διαθέσιμο είναι κατάλληλο για την επαγωγή της απόπτωσης και την ανίχνευσή του από τον υποδοχέα Fas (132).

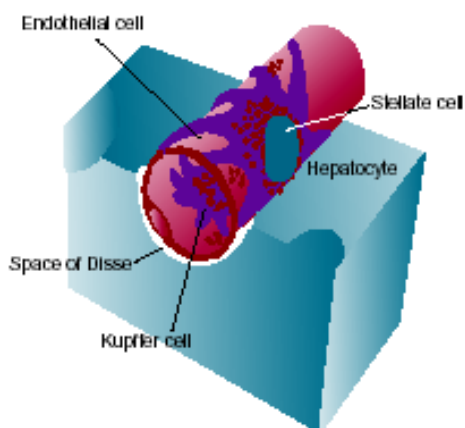
# ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΚΥΡΦΦΕΡ ΚΑΙ ΚΟΛΠΟΕΙΔΗ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

## ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΟΛΠΟΕΙΔΗ

Το ήπαρ αποτελείται από τα ηπατοκύτταρα και τα κολλοειδικά κύτταρα. Τα ηπατοκύτταρα έχουν ως βασική λειτουργία τη ρύθμιση του μεταβολισμού του οργανισμού. Τα κύτταρα του ηπατικού κολλοειδούς συμμετέχουν στη διατήρηση της ηπατικής ομοιοστασίας και στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης του οργάνου(133).

Το ηπατικό κολλοειδές αποτελείται από πλευράς κυτταρικής σύστασης από: α. τα ενδοθηλιακά κύτταρα, β. τα κύτταρα του Ito, γ. τα κύτταρα του Kupffer και δ. τα κύτταρα pit, που έχουν το ρόλο κυττάρων φυσικών φονέων (natural killer cells NKC's). Μέσα στο κολλοειδές του ήπατος, κάθε ομάδα από τις προαναφερόμενες έχει συγκεκριμένη εντόπιση, η οποία σχετίζεται άμεσα με τις βιολογικές λειτουργίες που καλούνται να επιτελέσουν. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα του Kupffer, βρίσκονται μπροστά από τον υπενδοθηλιακό χώρο του Disse και σε άμεση επαφή με

την πυλαία κυκλοφορία, δημιουργώντας ένα φυσικό φραγμό που εμποδίζει την άμεση επαφή των ηπατοκυττάρων με το αίμα της πυλαίας (134).



Εικόνα 21: Τα κύτταρα του ηπατικού κολλοειδούς

## ΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΙΚΟΥ ΚΟΛΠΟΕΙΔΟΥΣ

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα του κολποειδούς αποτελούν το 15-20% του ολικού αριθμού των κυττάρων του ήπατος και σχηματίζουν μια μονοκυττάρια στοιβάδα μπροστά από το χώρο του Disse (135). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν ιδιαίτερα σημαντικές λειτουργίες και μορφολογικά χαρακτηριστικά.

### Διήθηση

Το κύριο μορφολογικό χαρακτηριστικό των ενδοθηλιακών κυττάρων του κολποειδούς είναι οι θυρίδες που διαθέτουν (fenestrae). Οι θυρίδες αυτές έχουν διάμετρο περίπου 100nm και είναι διατεταγμένες σε ομάδες των 10-50, δημιουργώντας έτσι μικρές επιφάνειες με μορφή κόσκινου(136). Η χωροδιάταξή τους στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων επιτρέπει την άμεση επικοινωνία μεταξύ του κολποειδούς και του διαστήματος του Disse. Η έλλειψη βασικής μεμβράνης φέρνει σε άμεση επαφή το διάστημα του Disse με τα ηπατοκύτταρα, γεγονός που επιτρέπει την αποτελεσματική μεταφορά μεταβολιτών από το πλάσμα στα ηπατοκύτταρα (137). Η έλλειψη βασικής μεμβράνης είναι μοναδικό χαρακτηριστικό του κολποειδούς και αποτελεί πλεονέκτημα στη συγκεκριμένη λειτουργία. Παρόλαυτά σημειώνεται ότι η βασική μεμβράνη κάνει την εμφάνιση της κατά την ηπατική βλάβη, φαινόμενο που συχνά σχετίζεται με τη μείωση του αριθμού των θυρίδων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, επάγοντας, πιθανώς, την ηπατική βλάβη (138). Μορφομετρικές μελέτες των θυρίδων του κολποειδούς έχουν δείξει λοβιώδη ετερογένεια σε σχέση με τον αριθμό και τη διάμετρο τους. Συγκεκριμένα, ο αριθμός και η διάμετρος των θυρίδων εμφανίζονται αυξημένοι στη ζώνη 3 (περιφερικά ή κεντρολοβιδώς) σε σχέση με τη ζώνη 1 (περιπυλαία) του ήπατος (136).

## **Η Ρύθμιση της ροής του αίματος στο ηπατικό κολποειδές.**

Έχει αναγνωρισθεί ο βασικός ρόλος του κολποειδούς στην ηπατική μικροκυκλοφορία, αλλά ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ρυθμίζεται παραμένει άγνωστος (138).

Ίσως στη ρύθμιση να εμπλέκονται τα μικροφλεβίδια της ηπατικής φλέβας, και το ενδοθηλιακό κύτταρο που επίσης παίζει κάποιο ρόλο. Ο Oda και συνεργάτες, που μελέτησαν λεπτομερώς τη ρύθμιση της κυκλοφορίας του ηπατικού κολποειδούς χρησιμοποιώντας *in vivo* μικροσκοπία και αγγειοενεργές ουσίες, ανακάλυψαν ότι το διαμέτρημα του κολποειδούς άλλαζε παράλληλα με τη διαστολή των μικροφλεβιδίων της ηπατικής φλέβας. Επιπλέον, παρατήρησαν ότι το φαινόμενο αυτό συνοδευόταν με μείωση του μεγέθους των θυρίδων των ενδοθηλιακών κυττάρων και ότι αυτή η μεταβολή συσχετίζεται με τη ροή του αίματος στο κολποειδές(138). Όμως, παραμένει αδιευκρίνιστο αν οι θυρίδες έχουν ρυθμιστικό ρόλο εντός του κολποειδούς συστήματος. Έχει καταδειχθεί πειραματικά ότι οι αγγειοσυσταλτικές και οι αγγειοδιασταλτικές ουσίες έχουν αγγειοσυσπαστική δράση σε κυτταροκαλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων του κολποειδούς του ήπατος (139). Το γεγονός αυτό καθιστά υπεύθυνες τις θυρίδες που αυτά φέρουν, οι οποίες εμπλέκονται στη ρύθμιση της ροής του αίματος εντός του κολποειδούς.

## **Η Ενδοκυττάρια λειτουργία**

Περαιτέρω μορφομετρικές μελέτες στα ενδοθηλιακά κύτταρα του κολποειδούς, αποκάλυψαν την αφθονία ειδικών οργανιδίων για την ενδοκυττάρωση, όπως μικρά πινοκυττικά κυστίδια, ενδοσωμάτια και λυσοσωμάτια (140). Παρόλο που τα κύτταρα του Kupffer είναι γνωστό ότι διαθέτουν έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα του κολποειδούς του ήπατος επιδεικνύουν αυξημένη ικανότητα ενδοκυττάρωσης σε σχέση με τα Kupffer για συγκεκριμένες ουσίες όπως η ηπαρίνη, η αλβουμίνη, το κολλοειδές του θείουχου αντιμονίου, οι λιποπρωτεΐνες, η σερουλοπλασμίνη, η σιδηροτρανσφερίνη, η λακτοφερίνη και το υαλουρονικό οξύ (141).

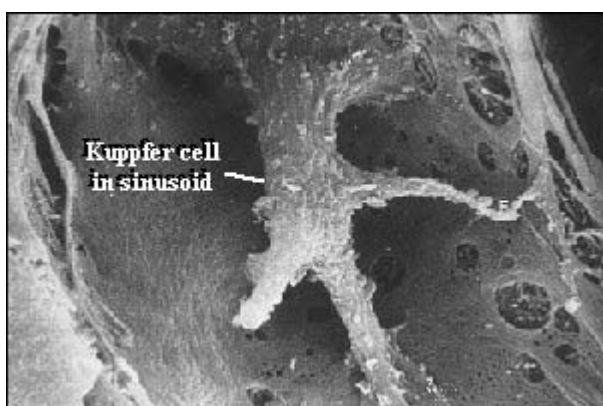
Το μέγεθος των σωματιδίων που εμπεριέχονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι σημαντικό για την ικανότητα τους να προσροφούν τις ουσίες. Ενώ η απορρόφηση σωματιδίων μεγέθους τουλάχιστον 0,8μm αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των κυττάρων του Kupffer, σε περίπτωση βλάβης των τελευταίων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα του κολποειδούς του ήπατος μπορούν να φαγοκυτταρώνουν ακόμη και μεγάλα μόρια (142).

## **ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ KUPFFER**

Τα κύτταρα Kupffer εντοπίζονται αγκιστρωμένα στο πλέγμα των ενδοθηλιακών κυττάρων και έρχονται σε επαφή με τα ηπατοκύτταρα με μακρούς κυτταροπλασματικούς σχηματισμούς που διασχίζουν τη στοιβάδα των ενδοθηλίων και τον υπενδοθηλιακό χώρο του Disse (143). Η συγκεκριμένη χωροδιάταξη και δομή



των κυττάρων του Kupffer υποδηλώνει τη σημασία του ρόλου τους στην άμυνα του ήπατος, αφού έρχονται σε άμεση επαφή με την πυλαία κυκλοφορία, το αίμα της οποίας φέρει αντιγονικούς παράγοντες, ιούς, βακτήρια, τοξίνες, ακόμη και καρκινικά κύτταρα που προέρχονται από το πεπτικό σύστημα (144). Το γεγονός αυτό καθιστά τα κύτταρα Kupffer βασικούς παράγοντες στην ανοσολογική ρύθμιση, αφού στη μεν πυλαία κυκλοφορία η ταχύτητα ροής του αίματος είναι περίπου 25ml/s, στο επίπεδο του ηπατικού κολποειδούς δε, τα λευκά αιμοσφαίρια αναγκάζονται να διέλθουν από



Εικόνα 22: Κύτταρο Kupffer εντός του ηπατικού κολποειδούς

ιδιαίτερα στενά κολποειδή διαμέτρου μερικών μm με πολύ μικρή ταχύτητα (0,4μm/s), αναγκάζοντάς τα να έλθουν σε παρατεταμένη επαφή με αυτά (145).

Τα κύτταρα Kupffer αποτελούν το 80-90% των ιστικών μακροφάγων του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος και περίπου το 15% του συνολικού αριθμού των κυττάρων του ήπατος. Από αυτά, τα περισσότερα εντοπίζονται περιπυλαία (ζώνη 1), όμως σημαντικός αριθμός υπάρχει στην ενδιάμεση ζώνη του ηπατικού λοβίου (ζώνη 2) και τα υπόλοιπα βρίσκονται περιφλεβικά (ζώνη 3)(143). Μορφολογικά, τα κύτταρα του Kupffer είναι τυπικά μακροφάγα, έχοντας ανομοιογενές περίγραμμα, ψευδοπόδια και λάχνες (146). Εσωτερικά, η σύσταση των οργανιδίων τους υποδεικνύει τον σημαντικό τους ρόλο ως φαγοκύτταρα, έχοντας μεγάλο αριθμό λυσοσωμάτων με ποικίλα λυσοσωμικά ένζυμα (καθεψίνες, γλουκουρονιδάση, αρυλ-σουλφατάση, όξινη φωσφατάση) και πινοκυτταρικά κυστίδια (147). Τα κύτταρα Kupffer της ζώνης 1 (περιπυλαία), εμφανίζονται μεγαλύτερα σε μέγεθος, με πολλά και ετερογενή λυσοσώματα, ενώ επιδεικνύουν

έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα (139). Αντίθετα, τα περιφλεβικά (ζώνη 3) κύτταρα Kupffer είναι μικρότερα σε μέγεθος από αυτά του περιπυλαίου πληθυσμού και εμφανίζουν εντονότερη κυτταροτοξική δραστηριότητα και παραγωγή βιολογικά ενεργών ουσιών (κυτταροκινών, χημειοκινών, κ.α.) (148).

Κατόπιν της εισαγωγής ξένων ουσιών στο ήπαρ, τα κύτταρα Kupffer διαστέλλονται σε μεγάλο βαθμό, προκαλώντας μ' αυτόν τον τρόπο ακόμα και εμπόδιο στο κολποειδές του ήπατος και ίσως εξελίσσονται σε πολυπύρρηνα γιγαντιαία κύτταρα (149). Αρκετά είδη παθογόνων όπως ιοί, βακτήρια, μύκητες και παράσιτα μπορούν να εξουδετερωθούν από τα κύτταρα αυτά, που έχουν ακόμη και τη δυνατότητα να εξουδετερώνουν ανοσολογικά συμπλέγματα, καρκινικά κύτταρα, λιποσώματα, λιπιδικά μικροσφαιρίδια, σίδηρο και άλλα κυτταρικά και μοριακά συμπλέγματα (150). Η κάθαρση της εμπεριεχομένης στην κυκλοφορία ενδοτοξίνης αποτελεί μια από τις βασικότερες τους λειτουργίες (151). Η ενδοτοξίνη είναι ο σημαντικότερος παράγοντας ενεργοποίησης των κυττάρων του Kupffer, τα οποία με τη σειρά τους επάγουν την παραγωγή ιστο-τοξικών διαμεσολαβητών, όπως οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1), ο TNF- $\alpha$  (152), οι ρίζες ενεργού οξυγόνου και οι προερχόμενες από αυτά πρωτεάσες (153), με φυσικό επακόλουθο την ιστική βλάβη, ιδιαίτερα κατά την υπερέκφραση τους.

Συμπερασματικά, τα κύτταρα Kupffer παίζουν βασικό ρόλο στην αμυντική δυνατότητα του ξενιστή δρώντας ως βιολογικό φίλτρο που εντοπίζεται στην προσυστηματική κυκλοφορία. Ενώ η υπερπαραγωγή διαμεσολαβητών από αυτά επάγει την ηπατική βλάβη (154).

### **Ιστορικά στοιχεία, Προέλευση, Διαφοροποίηση και Ωρίμανση των κυττάρων του Kupffer.**

Από τα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα και για τρεις περίπου δεκαετίες, ο Γερμανός ανατόμος Carl von Kupffer περιέγραψε δύο τύπους κυττάρων του ηπατικού κολποειδούς: τα επωνομαζόμενα σήμερα κύτταρα Ito, που τότε ονόμασε αστροκύτταρα (Sternzellen) και τα μακροφάγα του ήπατος (τα οποία κατόπιν ονομάστηκαν κύτταρα Kupffer προς τιμήν του) ως “ενδοθηλιακά κύτταρα - προσλαμβάνοντα ινική” (Perivascularäre Bindgewebszellen) (155).



**Εικόνα 23: Carl von Kupffer**

Στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, ο Kiyono, παρατηρώντας κύτταρα τα οποία βάφονταν με lithium carmine σε διάφορους ιστούς, κατηγοριοποίησε τα κύτταρα Kupffer ως “κύτταρα που προέρχονται από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα των κολποειδών”. Λίγα χρόνια αργότερα, ο Aschoff περιέγραψε το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα ως “σύστημα κυττάρων διασπαρμένων στον οργανισμό, τα οποία έχουν κοινή μορφολογία, λειτουργία και μεσεγχυματική προέλευση, αποτελούμενη από δικτυοενδοθήλια (φαγοκυτταρικά ενδοθήλια) και ιστιοκύτταρα (μακροφάγα), κατηγοριοποιώντας με αυτόν τον τρόπο τα Kupffer και τα ενδοθηλιακά κύτταρα ως μία κυτταρική μονάδα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος στο ήπαρ (156).

Πενήντα χρόνια αργότερα, ο Wisse, χρησιμοποιώντας τεχνικές μονιμοποίησης με ιστική διήθηση και ιστοχημική χρώση κατέδειξε τη διαφορετικότητα μεταξύ των δύο πληθυσμών των κυττάρων του κολποειδούς με τα κύτταρα του Kupffer να αντιπροσωπεύουν τα ιστικά μακροφάγα του ήπατος (157). Τα κύτταρα του Kupffer ορίζονται ως μακροφάγα του ηπατικού κολποειδούς που εμφανίζουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα
- θετικότητα για μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των μακροφάγων
- ικανότητα πολλαπλασιασμού
- ενδογενή υπεροξειδάση με συγκεκριμένη ενδοκυττάρια εντόπιση

(περιπυρηνικά και στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο), που αντιστοιχεί σε ιστικά μακροφάγα.

Σύμφωνα με την πλέον επικρατούσα θεωρία προέλευσης του συστήματος των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων του van Furth, τα κύτταρα αυτά προέρχονται από προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών, τα οποία, αφού μεταναστεύσουν από εκεί στους διάφορους ιστούς του σώματος, μετατρέπονται σε ιστικά μακροφάγα (158). Παρά το γεγονός ότι η διαφοροποίηση των μακροφάγων των περιφερικών ιστών με τα μακροφάγα του ήπατος στο ιστοχημικό και το ανοσοϊστοχημικό επίπεδο προηγείται χρονικά της έναρξης της αιμοποιητικής διαδικασίας στον μυελό των οστών, η πρόταση αυτή παραμένει η καλύτερη εξήγηση της προέλευσης των συγκεκριμένων κυττάρων που έπεται της γέννησης.

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, τα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών δημιουργούν αποικίες μακροφάγων (Macrophage-Colony Forming Cells M-CFC's), οι οποίες με τη σειρά τους παράγουν μονοβλάστες. Οι μονοβλάστες

υποκείμενοι στην επίδραση παραγόντων ανάπτυξης και διαφοροποίησης (IL-3, IL-6, GM-CSF, M-CSF) διαιρούνται, δημιουργώντας αρχικά πρώιμες μορφές μονοκυττάρων που εξελίσσονται σε μονοκύτταρα(159). Από αυτούς, ο σημαντικότερος παράγοντας για τη δέσμευση της διαφοροποίησης σε μονοκύτταρα είναι ο παράγοντας διέγερσης της αποίκησης των μακροφάγων (Macrophage-Colony Stimulating Factor M-CSF). Μελέτες σε ποντίκια έχουν καταδείξει την εντός 24ώρου είσοδο των μονοκυττάρων στη συστηματική κυκλοφορία - όπου ο χρόνος ημίσειας ζωής τους είναι 17,4 ώρες - και την μετέπειτα μετανάστευσή τους στους ιστούς και κυρίως στο ήπαρ, τον πνεύμονα, την περιτοναϊκή κοιλότητα και τον σπλήνα, όπου υφίστανται *in situ* διαφοροποίηση σε ιστικά μακροφάγα (160).

Ο βιολογικός κύκλος των κυττάρων του Kupffer είχε αρχικά υπολογισθεί σε 3,8 ημέρες. Όμως, μελέτες με ηπατικά μοσχεύματα σε αρουραίους αναφέρουν ότι τα κύτταρα Kupffer του δότη αντικαθίστανται πλήρως 15-30 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση, ενώ οι μελέτες σε ανθρώπινα μοσχεύματα δείχνουν ότι τα κύτταρα Kupffer του δότη ανιχνεύονται έως και ένα χρόνο μετά τη μεταμόσχευση (161). Περαιτέρω μελέτες σε ποντίκια με μονοκυτταροπενία μετά τη χορήγηση ραδιενεργού στροντίου (<sup>89</sup>S) δείχνουν τη δυνατότητα των κυττάρων Kupffer να επιζούν για 6 εβδομάδες χωρίς ανανέωση από το περιφερικό αίμα αποδεικνύοντας έτσι ότι αποτελούν πληθυσμό ιστικών μακροφάγων με μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής (162).

### **Πολλαπλασιασμός των κυττάρων του Kupffer**

Είναι ευρέως αποδεκτή η άποψη ότι τα ιστικά μακροφάγα δεν πολλαπλασιάζονται αλλά υφίστανται συνεχή ανανέωση από τα περιφερικά μονοκύτταρα. Ωστόσο, τα πειραματικά δεδομένα δεν συμφωνούν με την άποψη αυτή. Μελέτες που

πραγματοποιήθηκαν με θυμιδίνη σεσημασμένη με τρίτιο ( $^3\text{H}$ ), έχουν δείξει ότι τα κύτταρα του Kupffer αναπαράγονται υπό φυσιολογικές συνθήκες με μικρό ρυθμό, της τάξης του 2% (163). Η χορήγηση διεγερτών (π.χ. γλυκάνης ή ζυμοσάνης) ή ο ερεθισμός τους με ηπατεκτομή αυξάνει το ρυθμό αναπαραγωγής τους(164). Πειράματα εξάλειψης των κυττάρων Kupffer έχουν καταδείξει τη δυνατότητα των κυττάρων του κολποειδούς και των ηπατοκυττάρων να παράγουν *in vitro* τους παράγοντες GM-CSF και M-CSF, αλλά και μόνο M-CSF τοπικά, ενώ επάγουν με τη σειρά τους τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων που έχουν εισέλθει στο ήπαρ. Τα μόρια M-CSF, εκτός από τη διαλυτή τους μορφή, υπάρχουν και μεμβρανικά συνδεδεμένα στην εξωκυττάρια ουσία. Το ήπαρ, παρουσία των M-CSF, δημιουργεί το κατάλληλο μικροπεριβάλλον το οποίο συνεισφέρει στη δυνατότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων του Kupffer(165).

Το τέλος της βιολογικής ζωής των κυττάρων του Kupffer, παραμένει αντικείμενο πειραματικής διερεύνησης. Παρότι η παραγωγή μονοκυττάρων από το μυελό είναι διαρκής και μεγαλύτερη της ανάγκης ανανέωσης των ιστικών μακροφάγων, δεν έχει παρατηρηθεί συσσώρευσή τους στο ήπαρ υπό φυσιολογικές συνθήκες. Τα κύτταρα αυτά μεταναστεύουν αρχικά στα πυλαία διαστήματα και αργότερα στους ηπατικούς λεμφαδένες. Τα περιφερικά μονοκύτταρα και τα κύτταρα Kupffer, έχοντας ολοκληρώσει το βιολογικό τους κύκλο, αποπίπτουν και τα αποπροσώματα που προκύπτουν φαγοκυτταρώνονται από άλλα κύτταρα Kupffer (139).

### Βιολογική συμπεριφορά των κυττάρων του Kupffer

Όπως όλα τα μακροφάγα, έτσι και τα κύτταρα Kupffer, εμφανίζουν τρεις κύριες λειτουργίες: φαγοκυττάρωση, αντιγονοπαρουσίαση και έκκριση βιολογικά δραστικών ουσιών. Η αυξημένη ικανότητα τους για φαγοκυττάρωση και παραγωγή ριζών οξυγόνου, αποτελούν ιδιαιτερότητες των κυττάρων αυτών που έτσι συγκεκριμενοποιούν το ρόλο τους ως ανοσολογικοί φύλακες και συντηρητές της πυλαίας κυκλοφορίας του ήπατος, χωρίς να προκαλούν βλάβες στα γειτονικά ηπατοκύτταρα (154).

### **Άμυνα έναντι μικροβίων και καρκινικών κυττάρων - Φαγοκυττάρωση**

Τα κύτταρα Kupffer αφού προσκολληθούν σε μικροοργανισμούς, τους φαγοκυτταρώνουν καταστρέφοντας το υλικό που έχει υποστεί ενδοκυττάρωση με τη χρήση ριζών οξυγόνου (166) ή μέσω σύντηξης με λυσοσώματα (167).

Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) είναι δραστικότερα μόρια που παράγονται από τα Kupffer με σκοπό την καταστροφή των κυττάρων εισβολέων. Η σύνθεση αυτών των μορίων επάγεται από διάφορους παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των ιντερφερονών, των προσταγλανδινών και της ενδοτοξίνης (168). Η προσκόλληση και η φαγοκυττάρωση των κυτταρικών εισβολέων διευκολύνεται από τους υποδοχείς αναγνώρισής τους στην επιφάνεια των κυττάρων Kupffer (169) ή με τη χρήση των υποδοχέων οψωνινών που αυτά φέρουν, για την αναγνώριση και φαγοκυττάρωση οψωνοποιημένου υλικού (170) (Πίνακας 2).

Η επίδραση βακτηρίων, ιών, και ενδοτοξίνης επάγει τη φαγοκυττάρωση στα Kupffer(171) . Η υπερανάπτυξη βακτηρίων στο έντερο και η εισαγωγή ενδοτοξίνης

στην πυλαία κυκλοφορία, σχετίζονται άμεσα με την αύξηση του αριθμού και της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας των κυττάρων Kupffer. Η αναστολή της φαγοκυτταρικής τους ικανότητας μπορεί να είναι αποτέλεσμα μέγιστου φαγοκυτταρικού φόρτου από τοξικές ουσίες όπως το αλκοόλ (172), τα χολικά άλατα (173) ή οι καταστάσεις υποξείας (174). Σε μοντέλα ηπατικής βλάβης (θερμική, από τετραχλωράνθρακα (CCl<sub>4</sub>)) έχει καταδειχθεί η καταστολή της φαγοκυτταρικής ικανότητας των κυττάρων Kupffer (175).

**Πίνακας 2:** Υποδοχείς των κυττάρων Kupffer

Υποδοχέας	Μόριο Δέσμευσης	Λειτουργία
Υποδοχέας Γαλακτόζης/Φουκόζης	Σωματίδια που εκφράζουν ομάδες γαλακτόζης/φουκόζης	Κάθαρση ερυθροκυττάρων, LDL, καρκινικών αυτοαντιγόνων, φμπρονεκτίνης πλάσματος, συσσωματώματα IgA
Υποδοχέας μαννόζης/ N-ακετυλογλυκοζαμίνης	Σωματίδια που εκφράζουν μαννόζη	Βακτήρια, ζύμες, παράσιτα
Υποδοχέας LDL Scavenger υποδοχέας	LDL Οξειδωμένη LDL, VLDL, λιποπρωτεΐνη α	Κάθαρση LDL-χοληστερόλης Κάθαρση οξειδωμένης LDL, VLDL
Υποδοχέας Fc Υποδοχείς συμπληρώματος	FcIgG C1q, C3b	Κάθαρση ανοσοσυμπλεγμάτων Φαγοκυττάρωση οψωνοποιημένων βακτηρίων, DNA, αιμοπεταλίων
Υποδοχέας Φμπρονεκτίνης	Φμπρονεκτίνη	Φαγοκυττάρωση οψωνοποιημένων αιμοπεταλίων, κολλαγόνου, ακτίνης, βακτηρίων, ινικής, DNA
PAF-R	PAF	Ενεργοποίηση πολλαπλασιασμός
Υποδοχέας CEA	CEA	
TLR4-CD14	LPS	Απομάκρυνση LPS, ενεργοποίηση
Υποδοχείς Κυτταροκινών		
TNF-RI, TNF-RII	TNFα	Αντίστοιχη δράση
IL-1 R	IL-1	Αντίστοιχη δράση
IL-2 R	IL-2	Αντίστοιχη δράση
Υποδοχέας TGF-β	TGF-β	Αντίστοιχη δράση

Τα κύτταρα Kupffer συμμετέχουν και στην άμυνα έναντι νεοπλασματικών κυττάρων. Η ενδοπυλαία εισαγωγή καρκινικών κυττάρων έχει δείξει ότι η αναστολή της δράσης των κυττάρων Kupffer (χορήγηση GdCl<sub>3</sub>) αυξάνει το ρυθμό ανάπτυξης των ηπατικών μεταστάσεων (176). Περαιτέρω διερεύνηση του φαινομένου έχει καταδείξει την ανάμειξη σε αυτό κυτταροκινών (IL-1, TNF-α) (177) και μεμβρανικά συνδεδεμένου TNF-α που επάγεται με την παρουσία της IFN-γ (178). Απάντηση στην ενδοτοξίνη τον TNF-α και την προσταγλανδίνη E<sub>2</sub> αποτελεί και η παραγωγή μονοξειδίου του



αζώτου (Nitric Oxide - NOx) από κύτταρα Kupffer (179) που χρησιμοποιείται από αυτά έναντι μικροβίων και καρκινικών κυττάρων.

### **Αφαίρεση της Ενδοτοξίνης**

Μια από τις σημαντικότερες λειτουργίες των κυττάρων Kupffer είναι η απομάκρυνση του λιποπολυσακχαριδίου (Lipopolysaccharide - LPS) από την πυλαία κυκλοφορία (180). Το λιποπολυσακχαρίδιο, δομικό στοιχείο της κάψας των Gram(-) βακτηρίων, αποτελεί την κυριότερη ενδοτοξίνη (181). Τα κύτταρα Kupffer προσλαμβάνουν την ενδοτοξίνη, την απενεργοποιούν και την μεταφέρουν στα ηπατοκύτταρα τα οποία την απεκκρίνουν στη χολή(182). Τα κύτταρα Kupffer είναι εφοδιασμένα στην επιφάνεια τους με ειδικούς (TLR4-CD14) (183) και μη-ειδικούς (scavenger receptor A, SR-A) υποδοχείς δέσμησης του LPS (184). Η σύνδεση του LPS κυρίως με τον υποδοχέα TLR4 (Toll-like receptor-4) στην επιφάνεια των κυττάρων Kupffer τα ενεργοποιεί αυξάνοντας τη φαγοκυτταρική τους ικανότητα και επάγοντας την παραγωγή φλεγμονωδών μεταβιβαστών από αυτά (εικοσανοειδή, κυτταροκίνες, χημειοκίνες, φιμπρονεκτίνη, PAF, κ.τ.λ.) (185)

Αυτός ο μηχανισμός ενεργοποίησης των κυττάρων Kupffer είναι ο κυριότερος στην πρωτογενή ανοσολογική αντίδραση, αποδεικνύοντας τη σημασία του ρόλου τους στην άμυνα έναντι μικροβιακών εισβολέων αλλά και στην ηπατοκυτταρική καταστροφή. Πειραματικά αποτελέσματα σε μοντέλα αρουραίων με *in vitro* σήψη με απολίνωση και διάτρηση του τυφλού (186) ή ακόμα και με την άμεση χορήγηση ενδοτοξίνης ενδοπυλαία, έχουν καταδείξει ότι ενώ η ενδοτοξίνη δεν είναι τοξική για τα ηπατοκύτταρα, οι υψηλές συγκεντρώσεις της στην πυλαία κυκλοφορία *in vivo* προκαλεί σοβαρές διαταραχές της μικροκυκλοφορίας στο ήπαρ με επακόλουθα την έντονη λευκοκυτταρική διήθηση και την ηπατοκυτταρική βλάβη. Τα απομονωθέντα

κύτταρα Kupffer από αυτά τα ζώα, έδειξαν αυξημένα επίπεδα TNF-α και IL-1 πριν την εμφάνιση της ηπατικής βλάβης και παρουσίασαν αυξημένη έκφραση στην επιφάνειά τους αντιγόνων της τάξης II του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC II (Ia)). Αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των μακροφάγων σε αυτά τα πειραματικά μοντέλα είναι η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων του ενδοθηλίου των κολποειδών (έκφραση ICAM-1) και προσέλκυση λευκοκυττάρων του αίματος στο ήπαρ με τελική κατάληξη την ηπατοκυτταρική καταστροφή (139).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαπίστωση ότι προηγούμενη έκθεση των κυττάρων Kupffer σε μικρές δόσεις ενδοτοξίνης προστατεύει το ήπαρ από βλάβη, καθιστώντας τα κύτταρα Kupffer ανεκτικότερα σε αυξημένες συγκεντρώσεις ενδοτοξίνης (187). Η σημασία του ρόλου της αλληλεπίδρασης της ενδοτοξίνης με τα κύτταρα Kupffer στην παθοφυσιολογία της ηπατικής βλάβης έχει καταδειχθεί πειραματικά, όπου η επαγωγή ανοχής στο LPS, η προφυλακτική κολεκτομή ή η χορήγηση αντιβιοτικών με αντι-ενδοτοξινική δράση (πολυμιξίνη Β), προφυλάσσει το ήπαρ από την ηπατική βλάβη (188).

## Βιολογικά δραστικές ουσίες των κυττάρων Kupffer - Ο ρόλος τους στην ανοσολογική απάντηση στο ήπαρ

Η παραγωγή μεταβιβαστών με ποικίλη δραστικότητα όπως τα εικοσανοειδή, οι κυτταροκίνες και οι χημειοκίνες (Πίνακας 3) καθιστά τα κύτταρα Kupffer ρυθμιστές της ανοσολογικής και φλεγμονώδους απάντησης στο ήπαρ.

**Πίνακας 3.** Προϊόντα των κυττάρων Kupffer

<b>Βιολογικά δραστικές ουσίες των κύτταρων Kupffer</b>	
<b>Λυσοσωμικά ένζυμα</b>	Καθεψίνες, β-γλυκουρονιδάση, β-ακέτυλ-γλυκοζαμινιδάση, υπεροξειδάση, εστεράσες, ακετυλάσες
<b>Ουδέτερες πρωτεάσες</b>	Ενεργοποιητής πλασμιγόνου, 95kDa τύπου IV κολλαγενάση-γελatinaση, Κολλαγενάση του διάμεσου ιστού
<b>Πρωτεογλυκάνες</b>	
<b>Φιμπρονεκτίνη</b>	
<b>Μεταβιβαστές φλεγμονής</b>	
Εικοσανοειδή	Προσταγλανδίνες: PGI <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub> , TXA <sub>2</sub> Λευκοτριένες: LTB <sub>4</sub> , LTE <sub>4</sub>
Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF)	
Κυτταροκίνες	IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, INFα, INFβ, TNFα, TGFβ
Χημειοκίνες	
CC χημειοκίνες	MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, RANTES
CXC χημειοκίνες	IL-8/CINC, MIP-2, KC
<b>Άμυνα -κυτταροτοξικότητα</b>	Ρίζες οξυγόνου, Μονοξειδίο του αζώτου, Λυσοζύμη
<b>Άλλα ένζυμα</b>	Απολιποπρωτεΐνη E , α <sub>1</sub> -Ιδουρονιδάση, Φωσφολιπάση A <sub>2</sub>

### Προσταγλανδίνες

Η προσταγλανδίνη D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), το σημαντικότερο προϊόν των κυκλοοξυγενασών, εκκρίνεται μετά από φαγοκυτταρική ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer (189). Η παραγωγή της συνοδεύεται από την έκκριση PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> καθώς και μικροποσοτήτων προστακυκλίνης (190). Η υπερέκκριση PGE<sub>2</sub> από τα Kupffer αποτελεί απάντηση στη διέγερση με IFN-γ, ενδοτοξίνη, TNFα και ιούς, λειτουργία που έχει ηπατοπροστατευτικό ρόλο έναντι της ιστικής βλάβης (191). Ωστόσο, πειραματικά μοντέλα ηπατοτοξικότητας με τη χορήγηση γαλακτοζαμίνης, CCl<sub>4</sub> και η

πρόκληση ηπατικής ισχαιμικής βλάβης σε αρουραίους έχουν δείξει αναστολή της ηπατοκυτταρικής νέκρωσης από τις προσταγλανδίνες PGE<sub>1</sub> και PGE<sub>2</sub> (192;193).

Η διέγερση των κυττάρων Kupffer παράγει επίσης προϊόντα της λιποοξυγενάσης. Η λευκοτριένη B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) με κύρια φλεγμονώδη δράση παράγεται από κύτταρα Kupffer in vitro ως αποτέλεσμα της επίδρασης βακτηριδίων, calcium inophore, PAF, φαγοκυττάρωσης και IFN-γ. Πέραν της άμεσης φλεγμονώδους δράσης της, η LTB<sub>4</sub> καταστέλλει και την έκκριση της PGE<sub>2</sub> από τα διεγερμένα κύτταρα Kupffer με ζυμοσάνη (194).

#### **Κυτταροκίνες – Χημειοκίνες**

Οι κυτταροκίνες που παράγονται από τα κύτταρα Kupffer, δρουν ως μεταβιβαστές με ποικίλη αυτοκρινή, παρακρινή αλλά και συστηματική δράση.

Η ιντερλευκίνη-1 (IL-1), ως κεντρικός μεταβιβαστής στις ανοσορρυθμιστικές διαδικασίες των T-λεμφοκυττάρων, επάγει την απάντηση οξείας φάσεως στο ήπαρ και ενεργοποιεί με αυτοκρινή μηχανισμό τα κύτταρα Kupffer (195).

Η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) έχει περισσότερο συστηματική δράση ως ενεργοποιητής της απάντησης οξείας φάσεως (196).

Ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου (TNF-α) είναι ισχυρά κυτταροτοξική κυτταροκίνη με κεντρικό ρόλο στην αποπτωτική διαδικασία (197). Πλέον αυτού, αποτελεί ισχυρό επαγωγέα της φλεγμονής μέσω της αύξησης της έκφρασης των αντιγόνων MHC τάξεως I και των μορίων προσκόλλησης του ενδοθηλίου. Ο TNF-α

είναι σημαντικός διεγέρτης της σύνθεσης DNA, καθώς και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων Kupffer και των ηπατοκυττάρων (198).

Η ιντερλευκίνη-12 (IL-12) έχει σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων και την ενεργοποίηση των κυττάρων NK (199).

Οι ιντερφερόνες ασκούν αντιϊκή και αντικαρκινική δράση, επάγουν την έκφραση αντιγόνων μείζονος ιστοσυμβατότητας και επιδρούν στην κυτταρική διαφοροποίηση (200). Η παραγωγή IFN από τα κύτταρα Kupffer επάγεται με τη διέγερση RNA διπλής έλικας (201) αλλά και με την έκθεση σε ενδοτοξίνη (202) διαφοροποιώντας μ' αυτόν τον τρόπο την έκκριση άλλων κυτταροκινών όπως η IL-1 και ο TNF- $\alpha$  (203).

Οι παραγόμενες από τα κύτταρα Kupffer χημειοκίνες CC (MIP-1, RANTES, MCP-5) και CXC (MIP-2, IL-8, KC) έχουν σημαντικό ρόλο στην προσέλκυση μονοκυττάρων και πολυμορφοκυττάρων στο ήπαρ (204;205).

Αντίθετα με τους παραπάνω μεταβιβαστές που επάγουν την φλεγμονώδη αντίδραση και την ιστική καταστροφή χάριν της άμυνας του ξενιστή, βρίσκονται οι ηπατοπροστατευτικοί μεταβιβαστές όπως η PGE<sub>2</sub> και οι κυτταροκίνες με αντιφλεγμονώδη-ανοσορυθμιστική δράση όπως η IL-10, IL-13 και ο TGF- $\beta$  που επάγονται από τα ίδια ερεθίσματα ενεργοποίησης των κυττάρων Kupffer και από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως ο TNF- $\alpha$  (206;207).

Το ήπαρ είναι όργανο με ιδιάζουσα ανοσολογική συμπεριφορά η οποία ευνοεί περισσότερο την ανοσολογική ανοχή από την ανοσολογική επαγρύπνηση και αντίδραση, γεγονός συμβατό με το ρόλο του ως όργανο που συμμετέχει στην κάθαρση του εντερικού αντιγονικού φορτίου (182). Η έγχυση αντιγονικού φορτίου από το έντερο στην πυλαία κυκλοφορία αποτρέπει την επιβραδυνόμενου τύπου

αντίδραση υπερευαισθησίας σε δεύτερο αντιγονικό ερέθισμα. Ενώ, η παροχέτευση της ροής του αίματος στην πυλαία κυκλοφορία από αλλογενετικά μοσχεύματα καθιστά το ήπαρ ανοσολογικά ανεκτικό προς το αντιγόνο οδηγώντας στην απόρριψη του μοσχεύματος (208). Παρά τη συνεχή παρουσία ενδοτοξίνης στην πυλαία κυκλοφορία σε συγκεντρώσεις ικανές να διεγείρουν τα μονοκύτταρα ή τα μακροφάγα του μυελού των οστών ( $10^9$ - $10^{11}$ g/ml), δεν έχει παρατηρηθεί αντίστοιχη ανοσολογική αντίδραση στο ήπαρ (187). Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται στην αυξημένη παραγωγή IL-10 από τα κύτταρα Kupffer σε απάντηση στο LPS το οποίο καταστέλλει την ενεργοποίηση των  $CD4^+$  λεμφοκυττάρων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (ενδοθηλιακά και Kupffer) (206). Η επίδραση της IL-10 σε πειραματικά μοντέλα, αναστέλλει την αντιγονική πρόσληψη, καθώς και την έκφραση αντιγόνων MHC τάξης II και των συνδιεγερτικών μορίων CD80 και CD86 στα ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος (209). Ενώ, ο πιθανώς αντιφλεγμονώδης ρόλος του TGF- $\beta$  που προέρχεται από τα κύτταρα Kupffer και συμμετέχει στις διεργασίες της ανοσολογικής ανοχής του ήπατος, αποτελεί αντικείμενο διερεύνησης (207).

Συμπερασματικά, η παραγωγή μεταβιβαστών (κυτταροκίνες, χημειοκίνες, εικοσανοειδή) από τα κύτταρα του ηπατικού κολποειδούς και τα διερχόμενα από αυτό κύτταρα του αίματος, σχηματίζουν ένα πολύπλοκο δίκτυο διακυτταρικής επικοινωνίας με ρυθμιστικό ρόλο στο είδος και την ένταση της ανοσολογικής απάντησης.

### **Συμμετοχή των κυττάρων Kupffer στην ηπατική βλάβη**

Σε πολλά πειραματικά μοντέλα ηπατοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων του τετραχλωράνθρακα ( $CCl_4$ ), της ενδοτοξίνης, της γαλακτοζαμίνης και της ακεταμινοφαίνης, τα κύτταρα Kupffer θεωρούνται υπεύθυνα για την παθογένεια της

ηπατικής βλάβης (205;210;211). Στην ηπατοκυτταρική νέκρωση τα κύτταρα Kupffer παρουσιάζουν μορφολογικούς χαρακτήρες ενεργοποίησης απελευθερώνοντας υπεροξείδιο, μονοξείδιο του αζώτου, εικοσανοειδή, κυτταροκίνες, χημειοκίνες, λυσοσωμικά και πρωτεολυτικά ένζυμα και εμφανίζουν αυξημένη κυτταροτοξικότητα και χημειοταξία (195).

Οι ρίζες ενεργού οξυγόνου (Reactive Oxygen Species- ROS) είναι ένα από τα δραστικότερα βακτηριοκτόνα μόρια που επιστρατεύουν τα κύτταρα Kupffer (168). Η σύνθεση των ROS επάγεται από διάφορους παράγοντες μεταξύ των οποίων είναι οι ιντερφερόνες, η ενδοτοξίνη και οι προσταγλανδίνες (153). Οι ROS είναι μόρια με ισχυρή ηπατοτοξική δράση, φαινόμενο που παρατηρείται κατόπιν χορήγησης συνδυασμού ενδοτοξίνης με *Corynebacterium parvum* που οδηγεί σε μαζική ηπατική νέκρωση. Στο μοντέλο αυτό τα προϊόντα της οξείδωσης των μεμβρανικών λιπιδίων των ηπατοκυττάρων ανιχνεύονται στην συστηματική κυκλοφορία και σχετίζονται με τον βαθμό ηπατοκυτταρικής νέκρωσης. Η χορήγηση του ενζύμου υπεροξειδισμούτάσης που καταβολίζει το υπεροξείδιο, μειώνει τον βαθμό ηπατικής βλάβης και την θνησιμότητα στο μοντέλο αυτό (212). Κύτταρα Kupffer που απομονώθηκαν από το ήπαρ μετά από χορήγησης *C. parvum*, παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου, η οποία αυξάνεται επιπλέον παρουσία ενδοτοξίνης (213). Η τοξικότητα των ROS έναντι των ηπατοκυττάρων έχει καταδειχθεί *in vitro* μετά από εξωγενή χορήγηση σε ιστικές καλλιέργειες. Ωστόσο, σε πειράματα συγκαλλιέργειας ηπατοκυττάρων και κυττάρων Kupffer διεγερμένων με ενδοτοξίνη παρατηρείται μειωμένη τοξικότητα (214). Το φαινόμενο εξαρτάται από την παροχή αργινίνης και αποδίδεται στην ταυτόχρονη παραγωγή από τα κύτταρα Kupffer μονοξειδίου του αζώτου ή στην επαγωγή της παραγωγής του στα ηπατοκύτταρα (215).

Τα κύτταρα Kupffer και τα ηπατοκύτταρα παράγουν μονοξειδίο του αζώτου (NOx) στο ήπαρ μετά από την επίδραση μεταβιβαστών παραγομένων από τα Kupffer (216). Ο ρόλος του NOx στους μηχανισμούς ηπατικής βλάβης έχει ποικίλα αποτελέσματα, λόγω του ότι υπάρχουν καταστάσεις όπου δρα προστατευτικά στα ηπατοκύτταρα μέσω αναστολής των κασπασών και της απόπτωσης (ενδοτοξιναιμία, CCl<sub>4</sub>) (216). Ενώ υπό διαφορετικές συνθήκες, το NOx επιτείνει το οξειδωτικό stress αλληλεπιδρώντας με τις ROS και σχηματίζοντας περοξυνιτρίτη ή επάγοντας την έκφραση φλεγμονωδών μεταβιβαστών όπως ο TNFα και η IL-1 (ισχαιμία/επαναιμάτωση, αιμορραγικό shock) (217;218).

Οι κυτταροκίνες και χημειοκίνες, προϊόν της ενεργοποίησης των κυττάρων του Kupffer, παίζουν σημαντικό ρόλο την παθογένεια της ηπατικής βλάβης (204;219). Η συμμετοχή του TNF-α στην ηπατική βλάβη από το αλκοόλ και ενδοτοξίνη έχει καταδειχθεί πειραματικά(220), ενώ και η χημειοκίνη MCP-1 φαίνεται πως εμπλέκεται στην παθογένεια της οξείας ηπατικής βλάβης από τετραχλωράνθρακα και ακεταμινοφαίνη (205). Κατά τη διαδικασία αυτή, τα παραγόμενα λυσοσωμικά ένζυμα και οι ουδέτερες πρωτεάσες, φαίνεται να παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην ηπατοτοξικότητα (221).

Ο κεντρικός ρόλος των κυττάρων Kupffer στην επαγωγή ηπατοκυτταρικής βλάβης υπογραμμίζεται από πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι ο βαθμός ενεργοποίησης των κυττάρων Kupffer επηρεάζει το βαθμό της ηπατοκυτταρικής καταστροφής. Για παράδειγμα, προηγηθείσα ενεργοποίηση με ενδοτοξίνη επιτείνει την βλάβη από τετραχλωράνθρακα ενώ η χορήγηση πολυμιξίνης B ή ενδοτοξίνης σε δόσεις που επάγουν ανοσολογική ανοχή δρουν προστατευτικά στο ίδιο μοντέλο. Η χορήγηση ενδοτοξίνης σε αρουραίους όπου είχε προηγηθεί ενεργοποίηση των κυττάρων



Kupffer λόγω ηπατεκτομής επάγει καταστροφή του ενδοθηλίου, απόφραξη των κολποειδών από ινώδη και θανατηφόρα μαζική ηπατοκυτταρική νέκρωση. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα καταδεικνύουν ότι διεγερμένα κύτταρα Kupffer εκφράζουν CD95L και μπορούν να επάγουν απόπτωση σε CD95<sup>+</sup> λεμφοκύτταρα και ηπατοκύτταρα (222).

Τα κύτταρα Kupffer, ωστόσο, συμμετέχουν και σε προστατευτικούς μηχανισμούς π.χ. μέσω μεταβιβαστών που επάγουν την σύνθεση αντι-οξειδωτικών παραγόντων (γλουταθειόνης) ή την παραγωγή PGE<sub>2</sub> και NO<sub>x</sub> (223). Η παραγωγή ELR-CXC χημειοκινών όπως η MIP-2 οι οποίες επάγουν τον ηπατοκυτταρικό πολλαπλασιασμό έχει και αυτή προστατευτικό ρόλο σε μοντέλα ηπατοτοξικότητας όπως η βλάβη από ισχαιμία/επαναιμάτωση (204) .

Συμπερασματικά, η επαγόμενη από τα κύτταρα Kupffer ηπατοτοξικότητα δεν είναι αποτέλεσμα μόνο της αντίδρασης στις ηπατοτοξίνες αλλά και της υπέρμετρης ενεργοποίησης ή καταστολής των ηπατοπροστατευτικών μηχανισμών.

#### Ο ρόλος των κυττάρων Kupffer στην ρύθμιση της εξωκυττάριας ουσίας στην ηπατική ίνωση

Η ηπατική ίνωση χαρακτηρίζεται από την άρση της αρχιτεκτονικής αλλά και τη διαταραχή της σύστασης της εξωκυττάριας ουσίας στο ήπαρ . Η εξωκυττάρια ουσία του υπενδοθηλιακού χώρου του Disse αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου IV, λαμινίνη και πρωτεογλυκάνες (224). Τα συστατικά αυτά αντικαθίστανται προοδευτικά κατά την ίνωση από την άναρχη εναποθέτηση ινώδους κολλαγόνου τύπων I και III, με αποτέλεσμα την αλλοίωση της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του ηπατικού λοβίου (134).

Η κύρια κυτταρική προέλευση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας στο ήπαρ είναι τα κύτταρα του Ito, τα οποία κατά την έναρξη της ινωτικής διαδικασίας, διεγείρονται και μεταμορφώνονται φαινοτυπικά σε μυοϊνοβλάστες (225). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής ινώδους κολλαγόνου, ενώ τη διαταραχή του μηχανισμού ομοιοστασίας της εξωκυττάριας ουσίας στο ήπαρ ακολουθεί η μείωση της έκφρασης των πρωτεολυτικών ενζύμων που την καταβολίζουν, με παράλληλη αύξηση των αναστολέων τους (224). Κατά συνέπεια, μειώνεται η παραγωγή μεταλλοπρωτεασών και αυξάνεται η παραγωγή ειδικών (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, TIMPs) και μη ( $\alpha$ 1-αντιθρυψίνη) αναστολέων τους (226).

Τα κύτταρα Kupffer συμμετέχουν στις ινωτικές διεργασίες του ήπατος, επηρεάζοντας την έναρξη και την πρόοδο της ίωσης με την παραγωγή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι επάγουν την φαινοτυπική αλλαγή των κυττάρων Ito αλλά και μέσω παραγωγής των μεταλλοπρωτεασών και των αναστολέων τους (210). Ο TGF- $\beta$ <sub>1</sub> που παράγεται κατά την ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer επάγει την αλλαγή του φαινοτύπου των κυττάρων Ito σε μυοϊνοβλάστες (227). Το γεγονός αυτό οδηγεί σε αύξηση της σύνθεσης κολλαγόνου και πρωτεογλυκάνης καθιστώντας τον TGF- $\beta$ <sub>1</sub> ως την κύρια κυτταροκίνη που σχετίζεται με την ίωση σε ποικίλα μοντέλα ηπατικής βλάβης σε πειραματόζωα (228). Σε αυτά τα μοντέλα συμπεριλαμβάνονται η αλκοολικής ίωση (229), η ίωση κατά την ηπατική σχιστοσωμίαση (230) και η ίωση που έπεται της χορήγησης τετραχλωράνθρακα (210).

Τα κύτταρα του Kupffer επάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Ito, αυξάνοντας την έκφραση υποδοχέων του PDGF σε αυτά, αφού ο PDGF αποτελεί την

κυριότερη μιτογόνο κυτταροκίνη για τα κύτταρα Ito (226). Ο TNF- $\alpha$ , η IL-1 και ο MCP-1 που παράγονται κατά την ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer παρουσιάζουν επίσης μιτογόνο και χημειοτακτική δράση στα κύτταρα Ito (231) (232). Τόσο ο TGF- $\beta_1$ , όσο και η IL-6 επάγουν την έκφραση mRNA των αναστολέων των μεταλλοπρωτεασών και συγκεκριμένα του TIMP-1 στα ηπατοκύτταρα, τα κύτταρα Kupffer και Ito (233).

Ένας επιπλέον μηχανισμός που μπορεί να οδηγήσει σε φαινοτυπική αλλαγή τα κύτταρα Ito είναι η παραγωγή γελατινινασών από τα κύτταρα Kupffer. Οι πρωτεΐνες της εξωκυτταρίου ουσίας παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας των ηπατοκυττάρων και των κυττάρων του Ito, η καλλιέργεια των οποίων σε υπόστρωμα κολλαγόνου τύπου I ή σε πλαστικό τα ενεργοποιεί και μεταμορφώνει σε μυοϊνοβλάστες. Όμως, η καλλιέργεια των Ito σε υπόστρωμα κολλαγόνου τύπου IV διατηρεί τον αρχικό τους φαινότυπο και δεν τα επηρεάζει. Θεωρείται πιθανό η ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer να αποτελεί μιτογόνο ερέθισμα για τα κύτταρα Ito, λόγω της απελευθέρωσης από τα Kupffer της γελατινινασής-2 (MMP-9) η οποία καταλύει ενζυμικά το κολλαγόνο τύπου IV επάγοντας με τον τρόπο αυτό την διαδικασία φαινοτυπικής αλλαγής των κυττάρων του Ito (234).

## Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ KUPFFER ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΗΠΙΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟ

### Τα κύτταρα Kupffer στις λοιμώξεις του ήπατος

Πειραματικά μοντέλα σήψης έχουν αποκαλύψει το ρόλο των κυττάρων Kupffer στην πρωτογενή ανοσολογική απάντηση του ξενιστή και την τελική πρόγνωση της λοίμωξης (235). Έχει παρατηρηθεί βελτίωση της πρόγνωσης και μείωση μικροβιακού φορτίου σε ποντίκια που υποβλήθηκαν σε πειραματική σηψαιμία από σαλμονέλα κατόπιν χορήγησης LPS η οποία σχετίζεται με την αύξηση του αριθμού των κυττάρων Kupffer (236). Αντίθετα, σε μοντέλα αποφρακτικού ίκτερου που χαρακτηρίζονται από μειωμένη φαγοκυτταρική ικανότητα και παραγωγή ROS των κύτταρων Kupffer, έχει παρατηρηθεί αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις(237).

Στην λιστερίωση των ποντικών, η συσσώρευση του βακίλου στο ήπαρ εξαρτάται από την αλληλεπίδραση λεκτινών της μεμβράνης των κυττάρων Kupffer με υδατανθρακικές αλυσούς του τοιχώματος του βακίλου(238). Η αναστολή της ανάπτυξης της λιστέριας στο ήπαρ (επίκεντρο της αναπαραγωγής της), εξαρτάται από την παραγωγή μεταβιβαστών όπως οι IL-6, IL-12, IL-1β, TNF-α και NOx από τα κύτταρα Kupffer που επάγουν την φλεγμονή και την βακτηριοκτόνο δράση άλλων κυτταρικών πληθυσμών στο ήπαρ, ενώ η πειραματική αδρανοποίηση των κυττάρων Kupffer συνεπάγεται αδυναμία αντιμετώπισης της λοίμωξης (239).

Σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση της λοίμωξης παίζουν επίσης και οι παραγόμενες από τα κύτταρα Kupffer χημειοκίνες MIP-1α, MIP-1β, και MCP-1 και MIP-2 που αποτελούν σημαντικούς μεταβιβαστές προσέλκυσης μονοπύρηνων και πολυμορφοπύρηνων κυττάρων στο ήπαρ, (240) (241) καθώς και στην ενεργοποίηση της απάντησης οξείας φάσης των ηπατοκυττάρων από την IL-6 (204). Μελέτες των παρασιτικών λοιμώξεων σε πειραματόζωα καταδεικνύουν και τη συμμετοχή των

κυττάρων Kupffer στις διαδικασίες λεμφοκυτταρικής διαφοροποίησης προς T<sub>H</sub>1 ή T<sub>H</sub>2 επικρατούσα ανοσολογική απάντηση (242).

Τα κύτταρα Kupffer εκτός της αντιμετώπισης εμπλέκονται και στην παθογένεια των ηπατικών λοιμώξεων. Ιοί όπως ο κυτταρομεγαλοϊός και παράσιτα όπως τα *Plasmodium bergeri* και η *Leishmania* εισβάλλουν πρώτα στα κύτταρα του Kupffer όπου πολλαπλασιάζονται πριν να εισβάλλουν στο ηπατικό παρέγχυμα (243;244).

Στον άνθρωπο, φαινόμενα όπως η αυξημένη συχνότητα σηψαιμίας και shock από Gram(-) βακτήρια τα οποία παρατηρούνται σε ασθενείς με οξεία ηπατική ανεπάρκεια έχουν αποδοθεί στη μειωμένη ικανότητα των κυττάρων Kupffer να αποκαθαίνουν μικροοργανισμούς και ενδοτοξίνη από την πυλαία κυκλοφορία (245). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι σημαντικό ποσοστό των ασθενών με χρόνια ηπατική νόσο παρουσιάζουν συστηματική ενδοτοξιναιμία και υψηλούς τίτλους αντισωμάτων έναντι βακτηριδίων του εντέρου σε αντίθεση με φυσιολογικούς όπου η ενδοτοξίνη ανιχνεύεται μόνο στην πυλαία κυκλοφορία (246).

#### Κύτταρα Kupffer και καρκίνος

Το ήπαρ αποτελεί συχνά το επίκεντρο της αιματογενούς μετάστασης και ιδιαίτερα των καρκίνων του γαστρεντερικού συστήματος. Απομονωμένα κύτταρα Kupffer είναι κυτταροτοξικά έναντι κυττάρων του κολονικού αδενοκαρκινώματος και ιδιαίτερα παρουσία IFN- $\gamma$  και ενδοτοξίνης (214). Για την κυτταροτοξικότητα αυτή έχει ενοχοποιηθεί η έκφραση από τα κύτταρα Kupffer του μεμβρανικού TNF- $\alpha$ , αφού είναι αναγκαία η άμεση κυτταρική επαφή και η οποία αναστέλλεται με την χορήγηση αντί-TNF- $\alpha$  (247). Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, τα κύτταρα Kupffer επάγουν την

έκφραση Fas σε καρκινικά κύτταρα ευαισθητοποιώντας τα έτσι σε αποπτωτικό θάνατο παρουσία κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων ή διαλυτού TNF-α (248).

Μελέτες σε πειραματόζωα, δείχνουν ότι ο βαθμός ενεργοποίησης και καταστολής των κυττάρων Kupffer επηρεάζει τον αριθμό και το μέγεθος των ηπατικών μεταστάσεων, κατόπιν ενδοπυλαίας ένεσης καρκινικών κυττάρων. Χορήγηση αναστολέων των Kupffer όπως GdCl<sub>3</sub>, έχει σαν αποτέλεσμα αύξηση του μεγέθους των μεταστάσεων και διεγέρτες όπως η ζυμοσάνη, *C.parvum*, και η γλυκάνη μειώνουν το μέγεθος των ηπατικών μεταστάσεων (249).

Δεδομένα από *in vivo* μικροσκοπία δείχνουν ότι τα κύτταρα Kupffer έχουν τη δυνατότητα να φαγοκυτταρώνουν καρκινικά κύτταρα. Το NO<sub>x</sub>, ως δραστικό μόριο που παράγεται από τα κύτταρα Kupffer σε απάντηση στην ενδοτοξίνη (250), τον TNF-α και την PGE<sub>2</sub>(179), χρησιμοποιείται από τα Kupffer για την άμυνα έναντι μικροβίων και καρκινικών κυττάρων(251) .

Πλέον όλων των προαναφερθέντων, η παραγωγή της IL-12 αποτελεί έναν έμμεσο μηχανισμό άμυνας που επάγει την κυταροτοξικότητα των NK κυττάρων έναντι NK-ευαίσθητων αλλά και NK-ανθεκτικών καρκινικών κυττάρων.

#### Τα κύτταρα Kupffer και η αλκοολική ηπατική νόσος

Η συστηματική κατανάλωση αλκοόλ αυξάνει την κατανάλωση οξυγόνου στο ήπαρ και προκαλεί λιπώδη εκφύλιση, ηπατομεγαλία και χρόνια φλεγμονή του ηπατικού παρεγχύματος με πιθανότερο τελικό αποτέλεσμα την ίνωση και κίρρωση(252). Κατά την οξεία και χρόνια αλκοολική νόσο παρατηρείται αύξηση του αριθμού των κυττάρων Kupffer στα πυλαία διαστήματα, ενώ μελέτες σε πειραματόζωα έχουν

καταδειξεί ότι η χορήγηση αιθανόλης αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων Kupffer που εμφανίζουν μορφολογικές ενδείξεις ενεργοποίησης, αυξημένη παραγωγή IL-1 και TNF- $\alpha$  (253) . Η αδρανοποίηση των Kupffer με GdCl<sub>3</sub> μειώνει την παρατηρούμενη φλεγμονή και ηπατοκυτταρική νέκρωση από το αλκοόλ. Η ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer από το αλκοόλ πιστεύεται ότι οφείλεται σε διαταραχή της βακτηριακής χλωρίδας του εντέρου με αύξηση των Gram(-) βακτηριδίων και σε αύξηση της διαπερατότητας του εντερικού τοιχώματος σε μακρομόρια όπως η ενδοτοξίνη. Ταυτόχρονα, το αλκοόλ επηρεάζει άμεσα τα Kupffer λόγω διαταραχών που προκαλεί στους μεμβρανικούς διαύλους ασβεστίου(254).

Αυξημένη συγκέντρωση TNF- $\alpha$  παρατηρείται σε ασθενείς με αλκοολική ηπατική νόσο (220). Η οξεία χορήγηση αιθανόλης σε πειραματόζωα επάγει την παραγωγή TNF- $\alpha$  και την έκφραση του CD14, ενώ στον άνθρωπο έχει παρατηρηθεί άμεση αύξηση του NOx στο περιφερικό αίμα. Η χρόνια χορήγηση αιθανόλης, τέλος, αυξάνει την παραγωγή ROS από τα κύτταρα Kupffer.

Σε ασθενείς με αλκοολική ηπατίτιδα έχουν παρατηρηθεί αυξημένα ποσά MCP-1 στην κυκλοφορία και αυξημένη έκφραση στο ηπατικό παρέγχυμα, οι οποίες σχετίζονται με τα επίπεδα SGPT και τον βαθμό φλεγμονωδών διηθήσεων. Σε τέτοιους ασθενείς έχουν ανιχνευθεί υψηλά επίπεδα IL-8 που έχουν συσχετισθεί με αυξημένη έκφραση ICAM-1 και VCAM όπως και με τον βαθμό πολυμορφοπυρηνικών διηθήσεων στο ήπαρ.

Συνοψίζοντας, τα κύτταρα Kupffer ενεργοποιούνται υπό την επίδραση αλκοόλης. Οι τοξικοί μεταβιβαστές (ROS), οι κυτταροκίνες και οι χημειοκίνες που παράγονται από αυτά πιστεύεται ότι συμμετέχουν στην παθογένεια της αλκοολικής ηπατικής νόσου.

### Κύτταρα Kupffer και μεταμόσχευση ήπατος

Τα κύτταρα Kupffer ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα έχουν σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες ιστοσυμβατότητας κατά την ηπατική μεταμόσχευση. Τα κύτταρα Kupffer εκφράζουν αντιγόνα MHC τάξης II και έχουν την ικανότητα *in vitro* αντιγονοπαρουσίασης. Οι μεταμοσχεύσεις σε μοντέλα αρουραίων δείχνουν επαγωγή των MHC τάξης II στα κύτταρα Kupffer που σχετίζεται με τον βαθμό της ανοσολογικής αντίδρασης. Στον άνθρωπο έχει παρατηρηθεί ότι ο ρυθμός αντικατάστασης των κυττάρων Kupffer του δότη από αυτά του μεταμοσχευθέντος αυξάνεται στην φάση της απόρριψης. Η απόρριψη, όπως και το σύνδρομο εξαφάνισης των χοληφόρων, παρουσιάζονται με αυξημένη συχνότητα σε μεταμοσχεύσεις όπου δεν υπάρχει ιστοσυμβατότητα για τα MHC τάξης II παρά μόνο για τα MHC τάξης I, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί σε παρουσίαση από τα κύτταρα Kupffer του δότη των MHC I αντιγόνων των χοληφόρων στον δέκτη.

Η ηπατική βλάβη, από την διαδοχική επίδραση της ισχαιμίας και επαναιμάτωσης στο ήπαρ ως συνέπεια της διαδικασίας εξωσωματικής διατήρησης του οργάνου, οδηγεί σε πρωτογενή δυσλειτουργία του οργάνου και είναι σημαντικός επιβαρυντικός παράγοντας στην έκβαση της μεταμόσχευσης. Αυτό αποδίδεται στην ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer, την παραγωγή ROS από αυτά που οδηγούν σε βαριές διαταραχές της ηπατικής μικροκυκλοφορίας. Η χορήγηση  $GdCl_3$  το οποίο καταστέλλει την λειτουργία των κυττάρων Kupffer, αναστέλλει την ηπατική βλάβη από ισχαιμία/επαναιμάτωση, ενώ η χορήγηση σωματιδίων latex που διεγείρει τα κύτταρα Kupffer, επιδεινώνει την βλάβη από ισχαιμία επαναιμάτωση. Εκτός από την παραγωγή ROS, υπεύθυνη για τις παρατηρούμενες διαταραχές της μικροκυκλοφορίας



είναι και η παραγωγή από τα κύτταρα Kupffer των TNF-α και MIP-2. Αυξημένη έκφραση των τελευταίων έχει παρατηρηθεί στο ηπατικό παρέγχυμα και σε συγκεντρώσεις στον ορρό σε πειραματικά μοντέλα μεταμόσχευσης σε ποντίκια κατά την φάση της επαναιμάτωσης του μοσχεύματος, σχετίζονται έτσι τον μεν TNF-α με την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου και την επαγωγή της έκφρασης β<sub>2</sub>-ιντεγκρινών, τις δε χημειοκίνες με την προσέλκυση πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων στο ηπατικό παρέγχυμα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, τα κύτταρα Kupffer παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή τόσο άμεσα όσο και διαμέσου τροποποίησης της ανοσολογικής απάντησης. Εκτός της συμμετοχής τους στις ζωτικής σημασίας αυτές φυσιολογικές λειτουργίες, τα κύτταρα Kupffer συνθέτουν και εκκρίνουν μια μεγάλη ποικιλία δυνητικά επιβλαβών βιολογικών μεταβιβαστών που υποδεικνύουν την συμμετοχή τους στην παθογένεια της ηπατικής βλάβης και της ίνωσης.

## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΙΝΩΣΗ

### ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΑΣΕΣ ΤΟΥ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΙΣΤΟΥ

Οι μεταλλοπρωτεάσες του διάμεσου ιστού, είναι μία οικογένεια ενζύμων που φέρουν ιόν/μόριο ψευδαργύρου ( $Zn^{2+}$ ) στο ενεργό τους κέντρο (255). Τα ένζυμα αυτά έχουν ευρεία συμμετοχή στις διαδικασίες αποδόμησης του εξωκυττάριου ιστού, και έως σήμερα έχουν ανακαλυφθεί περίπου 26 μέλη (256). (Πίνακας 4)

**Πίνακας 4:** Η οικογένεια των μεταλλοπρωτεασών του διάμεσου ιστού.

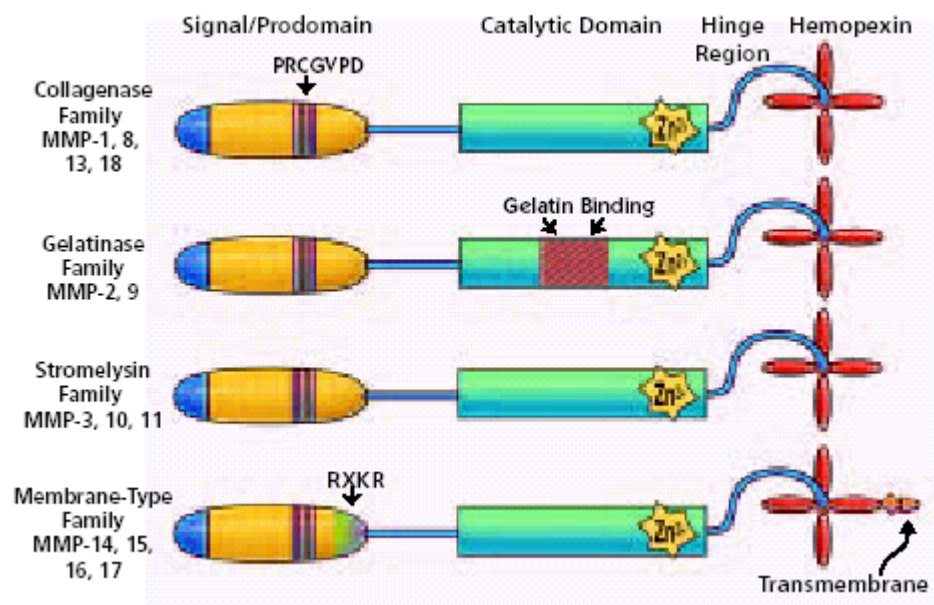
#### The Matrix Metalloproteinase (MMP) Family

Enzyme	E.C. No.	Pseudonyms	Mol. Wt. (Latent/Active)	Collagen Substrates	Additional Substrates
MMP-1	3.4.24.7	Collagenase-1, Fibroblast Collagenase, Interstitial Collagenase, Tissue Collagenase	55,000/45,000	I, II, III, VII, VIII, X	Aggrecan, Gelatin, MMP-2, MMP-9
MMP-2	3.4.24.24	72 kDa Gelatinase, 72 kDa Gelatinase/Type IV Collagenase, Gelatinase A, TBE-1	72,000/66,000	I, II, III, IV, V, VII, X, XI	Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Gelatin, Laminin, MMP-9, MMP-13
MMP-3	3.4.24.17	Procollagenase, PTR1 protein, SL-1, Stromelysin-1, Transin-1	57,000/45,000	II, III, IV, IX, X, XI	Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Gelatin, Laminin, MMP-7, MMP-8, MMP-13
MMP-7	3.4.24.33	Matriysin, Matrin, PUMP-1 Protease, Uterine Metalloproteinase	28,000/19,000	IV, X	Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Gelatin, Laminin, MMP-1, MMP-2, MMP-9
MMP-8	3.4.24.34	Collagenase-2, Neutrophil Collagenase, PMNL Collagenase	75,000/58,000	I, II, III, V, VII, VIII, X	Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Gelatin, Laminin
MMP-9	3.4.24.25	92 kDa Gelatinase, 92 kDa Gelatinase/Type IV Collagenase, Gelatinase B	92,000/86,000	IV, V, VII, X, XIV	Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Gelatin
MMP-10	3.4.24.22	SL-2, Stromelysin-2, Transin-2	57,000/44,000	III, IV, V	Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Gelatin, Laminin, MMP-1, MMP-8
MMP-11		SL-3, Stromelysin-3, ST-3	51,000/44,000		Aggrecan, Fibronectin, Laminin
MMP-12	3.4.24.65	HME, Macrophage Metalloelastase MME	54,000/45,000 and 22,000	IV	Elastin, Fibronectin, Gelatin, Laminin
MMP-13		Collagenase-3	60,000/48,000	I, II, III, IV	Aggrecan, Gelatin
MMP-18		Xenopus Collagenase-4, xCol4	70,000/53,000		
MMP-19		RASI-1	54,000/45,000	IV	Fibronectin, Aggrecan, COMP, Laminin, Gelatin
MMP-20		Enamelysin	54,000/22,000		Aggrecan, Amelogenin, COMP
MMP-23		CA-MMP			
MMP-26		Matriysin-2, Endometase	28,000/19,000	IV	Gelatin, Fibronectin
MMP-28		Epilysin			
MT1-MMP		MMP-14, Membrane-Type Metalloproteinase-14	66,000/56,000	I, II, III	Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Gelatin, Laminin, MMP-2, MMP-13
MT2-MMP		MMP-15, Membrane-Type Metalloproteinase-15	72,000/60,000		Fibronectin, Gelatin, Laminin, MMP-2
MT3-MMP		MMP-16, Membrane-Type Metalloproteinase-16	64,000/52,000		MMP-2
MT4-MMP		MMP-17, Membrane-Type Metalloproteinase-17	57,000/53,000		Fibrin, Gelatin
MT5-MMP		MMP-24	-/62,000		
MT6-MMP		MMP-25, Leukolysin		IV	Gelatin, Fibronectin, Laminin-I

Οι μεταλλοπρωτεάσες (MMPs) είναι πρωτεολυτικά ένζυμα, τα οποία παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων από τα οποία αποτελούνται. Όλα τα μέλη της οικογένειας, εντός των μεμβρανικών μεταλλοπρωτεασών, εκκρίνονται ως ανενεργά προένζυμα (ζυμογόνα), τα οποία απαιτούν πρωτεολυτική ενεργοποίηση (257).

Οι MMPs παίζουν σημαντικό ρόλο στις φυσιολογικές διαδικασίες αναδομήσεως του συνδετικού ιστού όπως η αγγειογένεση, η ωοθηλακιορρηξία, η εμβρυική ανάπτυξη και η επούλωση τραύματος, αλλά και στις παθολογικές συνθήκες όπου εμφανίζεται διαταραχή της ομοιοστασίας της εξωκυτταρίου ουσίας όπως η ηπατική ίνωση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο λύκος, το γλαύκωμα, καθώς και οι διαδικασίες καρκινικής διηθήσεως και μεταστάσεως (258).

Οι μεταλλοπρωτεάσες, κατηγοριοποιούνται κυρίως σε τρεις ομάδες με κριτήριο τη δραστικότητα τους έναντι διαφορετικών υποστρωμάτων. Οι ομάδες αυτές είναι: 1. οι Κολλαγενάσες, με ισχυρότερη δραστικότητα έναντι του ινώδους κολλαγόνου, 2. οι Γελατινάσες, με δράση έναντι της γελατίνης (κολλαγόνο τύπου IV) και 3. οι Στρομελυσίνες οι οποίες έχουν ευρύτερη δραστικότητα έναντι των προηγούμενων (259). Οι μεμβρανικές μεταλλοπρωτεάσες (MT-MMPs) αποτελούν ξεχωριστή κατηγορία λόγω της θέσης τους στην κυτταρική επιφάνεια και της εντοπισμένης δράσης τους γύρω από αυτήν (260).



Εικόνα 24: Οι υποοικογένειες των μεταλλοπρωτεασών και τα χαρακτηριστικά τους

Η δραστηριότητα των μεταλλοπρωτεασών είναι πολυεπίπεδα ελεγχόμενος διαδικασία και περιλαμβάνει τη γονιδιακή έκφραση και την αναστολή ή επαγωγή της πρωτεολυτικής τους ενεργοποίησης από ειδικούς (Ιστικοί Αναστολείς των Μεταλλοπρωτεασών -TIMPs) και μη ειδικούς (α2-μακροσφαιρίνη) αναστολείς. Έως σήμερα έχουν ανακαλυφθεί τέσσερις TIMPs οι οποίοι έχουν διαφορετική ανασταλτική δραστηριότητα για κάθε μία εκ των μεταλλοπρωτεασών (261).

#### Οι μεταλλοπρωτεάσες και η ηπατική ίνωση

Η ηπατική ίνωση χαρακτηρίζεται από πολλαπλές διαταραχές της ομοιοστασίας της εξωκυτταρίου ουσίας σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο και συνεπάγεται την αυξημένη εναπόθεση συνδετικού ιστού στον εξωκυττάριο χώρο (262). Ο συνδυασμός της ινωτικής διαδικασίας με την ανεπαρκή αποδόμηση του συνδετικού ιστού έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του ήπατος και την κίρρωση(263).

Η διαδικασία της σύνθεσης και εναπόθεσης συνδετικού ιστού με αυτήν της αποδόμησης της εξωκυτταρίου ουσίας είναι αλληλένδετες και η πρόοδος της ίνωσης εξαρτάται από τη μεταξύ τους ισορροπία(226).

Τον κύριο λόγο στη ρύθμιση της εξωκυτταρίου ουσίας έχουν τα κύτταρα του Ito. Τα κύτταρα αυτά υπό φυσιολογικές συνθήκες, βρίσκονται στον υπενδοθηκιακό χώρο του Disse σε επαφή με την εξωκυττάρια ουσία που είναι πλούσια σε κολλαγόνο τύπου IV, λαμινίνη, φιβρονεκτίνες και πρωτεογλυκάνες (264). Κατά τη διαδικασία της ίνωσης, τα κύτταρα του Ito υπό την επίδραση κυτταροκινών, αλλάζουν το φαινότυπό τους και «μεταμορφώνονται» σε κύτταρα τύπου μυοϊνοβλάστη, παράγοντας μεγάλες ποσότητες ινώδους κολλαγόνου αλλάζοντας έτσι την αρχιτεκτονική διάταξη του κολποειδούς συστήματος και την κατανομή των ουσιών από τις οποίες αυτό

αποτελείται(264). Στη λειτουργία αυτή έχει καταδειχθεί η εμπλοκή των MMP-9, MMP-2 (265), Κολλαγενάσης τύπου I, uPA(266), TGF-β1 (267).

#### Κολλαγενάσες

Η ομάδα των κολλαγενασών αποτελείται από τις μεταλλοπρωτεάσες MMP-1, MMP-8, MMP-13 και MMP-18, που έχουν την ικανότητα να διασπούν το κολλαγόνο των τύπων I, III, και X. Οι κολλαγενάσες δεν διασπούν τα κολλαγόνα των τύπων IV, V και VI, αλλά ούτε και άλλες ουσίες που συνθέτουν τον εξωκυττάριο ιστό όπως οι πρωτεγλυκάνες και οι γλυκοπρωτεΐνες (257). Η δράση των κολλαγενασών ρυθμίζεται από συγκεκριμένους μηχανισμούς σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο, όπως τη γονιδιακή έκφραση από τις κυτταροκίνες ή τις ορμόνες, την εξωκυττάρια ενεργοποίηση των προενζυμικών μορφών τους, ή ακόμα και την ειδική αναστολή των ενεργών κολλαγενολυτικών ενζύμων από τους TIMPs (268). Περαιτέρω ανάλυση της ομολογίας στην αλληλουχία των γονιδίων αρουραίου απεκάλυψε ότι, εκτός της MMP-13 στον άνθρωπο, δεν υπάρχει αλληλουχία στον αρουραίο που να δίνει ομολογία άνω του 90% με αυτήν της MMP-1 στον άνθρωπο. Ως εκ τούτου, θεωρείται ότι η κολλαγενάση του διάμεσου ιστού του αρουραίου (MMP-1) είναι ταυτόσημη με την MMP-13 του ανθρώπου (269).

Μόνο οι MMPs -1, -8 και -13 μπορούν να διασπούν το σταθερότατο μόριο του κολλαγόνου τύπου I, το οποίο είναι ο κύριος τύπος κολλαγόνου που συσσωρεύεται κατά την ανάπτυξη της ίνωσης (270) (271).

## ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟ

Η σειρά των αντιδράσεων των πρωτεασών που ενεργοποιούν το πλασμινογόνο και ο ρόλος τους στην ομοιοστασία του εξωκυτταρίου ιστού κατά τις φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες αποτελούν αντικείμενο μελέτης τα τελευταία χρόνια. Η αντίδραση ενεργοποίησης του πλασμινογόνου ευθύνεται για την μετατροπή του ενζυμικά ανενεργού πλασμινογόνου σε πλασμίνη, η οποία είναι ενζυμικά δραστική σερινική πρωτεάση (272). Η πλασμίνη, είναι γενικώς, ισχυρότατη πρωτεάση που καταλύει ποικίλα πρωτεϊνικά υποστρώματα και προκαλεί την άμεση διάσπαση των ουσιών που αποτελούν τον εξωκυττάριο ιστό, συμπεριλαμβανομένης της φιβρονεκτίνης και της λαμινίνης. Η πλασμίνη έχει τη δυνατότητα να συμμετέχει και εμμέσως στη διάσπαση του κολλαγόνου με την ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεασών(273). Η δημιουργία της πλασμίνης εξαρτάται από τη δραστικότητα των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (PA) από τους οποίους έχουν ταυτοποιηθεί δύο: ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου της ουροκινάσης (uPA) και ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου του ιστού (tPA)(274).

### **tPA**

Ο φυσικός tPA, αποτελείται από ένα πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 70kDa, ο οποίος βρίσκεται μεμβρανικά συνδεδεμένος στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο tPA εκκρίνεται με τη μορφή μιας πρωτεϊνης μονής αλυσίδας η οποία κατά τη διαδικασία περιορισμένης πρωτεόλυσης μετατρέπεται σε σύμπλοκο διπλής αλυσίδας που συνδέεται με δισουλφιδικό δεσμό της αλυσού A με τη B. Η αλυσίδα A περιέχει ένα ομόλογο τμήμα με τον παράγοντα ανάπτυξης της επιδερμίδας (Epidermal Growth Factor –EGF), ενώ η αλυσίδα B περιέχει το ενεργό κέντρο του μορίου της σερινικής πρωτεάσης (274).

Το tPA μονής αλύσου δύναται να ενεργοποιεί το πλασμινογόνο, αλλά είναι λιγότερο αποδοτικό του tPA της διπλής αλύσου. Η ενζυμική δραστηριότητα του tPA εξαρτάται από τη σύνδεση με ινική, γεγονός που συμφωνεί με τη λειτουργική του σημασία ως ινολυτικού παράγοντα (275).

## **uPA**

Ο uPA απομονώθηκε αρχικά σε ούρα ανθρώπου και εμφανίζεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα (~1ng/ml). Παράγεται από πολλούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μεταστατικών καρκίνων, ως προένζυμο μονής αλύσου (pro-uPA με MB=55000). Σε αντίθεση με το tPA της μονής αλύσου, το προένζυμο uPA είναι ελάχιστα ως καθόλου ικανό να ενεργοποιήσει το φυσικό του υπόστρωμα, το πλασμινογόνο (272). Παρά την έλλειψη ενζυμικής δραστηριότητας, το pro-uPA φαίνεται πως είναι η κυριότερη εξωκυττάρια μορφή που βρίσκεται εντός υγιούς οργανισμού. Κατά την απελευθέρωσή του από το κύτταρο, το pro-uPA ενεργοποιείται με τη διάσπαση ποικιλίας πρωτεασών στις οποίες περιλαμβάνεται η πλασμίνη, ένζυμο όπως την τρυψίνη και οι καθεψίνες. Η διάσπαση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενζυμικά ενεργού uPA διπλής αλύσου με μεγάλο MB (HMW-uPA, MB=55000). Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από δύο αλυσίδες πεπτιδίων (A και B) που συγκρατούνται μεταξύ τους από έναν δισουλφιδικό δεσμό (276). Η αλυσος A στον άνθρωπο περιέχει ένα τμήμα τύπου EGF, το οποίο διαμεσολαβεί για τη σύνδεση του uPA με τον υποδοχέα του, και ένα κυκλικό τμήμα αγνώστου λειτουργίας. Η αλληλουχία της αλύσου B διατηρεί τα δομικά χαρακτηριστικά των σερινικών πρωτεασών όπως αυτά της πλασμίνης και της τρυψίνης. Η HMW-uPA πρωτεολύεται επιπλέον, από ένζυμο όπως η πλασμίνη, σε

ενεργό uPA χαμηλού μοριακού βάρους (LMW-uPA, MB=33000) και σε ενζυματικά ανενεργό τμήμα της αμινομάδας (amino-terminal fragment ATF, MB=22000) (277).

Η δημιουργία πλασμίνης μέσω του uPA, συμμετέχει στις διαδικασίες ιστικής αναδόμησης, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η ωοθηλακορρηξία, η περιέλιξη του μαστικού αδένα, η μεταμόσχευση τροφοβλάστη και ο καρκίνος (278).



## TGF-β

Ο TGF-β είναι κυτταροκίνη με κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών αντιδράσεων, τις λειτουργίες ανάπλασης του ηπατικού ιστού και συμμετοχή στην ίνωση, την ανάπτυξη, την καταστολή (καρκίνος) και απόπτωση των κυττάρων του ήπατος (279).

Ο TGF-β εμφανίζεται στα θηλαστικά σε τρεις ομόλογες μορφές (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3), οι οποίες έχουν παρόμοια δραστηριότητα. Και οι τρεις αυτές μορφές υπάρχουν στο ήπαρ, αλλά η έκφρασή τους δεν είναι ομοιόμορφη στους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς οι οποίοι το απαρτίζουν (267).

Ο TGF-β παράγεται ως ανενεργή μορφή κυτταροκίνης η οποία απαιτεί πρωτεόλυση για την ενεργοποίησή της. Μεταξύ των πρωτεασών οι οποίες καλούνται να αναλάβουν αυτό το έργο συμπεριλαμβάνονται η πλασμίνη, ή οι ειδικές κυτταρικές μεμβρανικά συνδεδεμένες πρωτεάσες. Πλέον της πρωτεολυτικής ενεργοποίησης του ανενεργού TGF-β, υπάρχει ένας πληθυσμός περικυτταρικών παραγόντων που δρουν για να προωθήσουν ή να αναστείλουν τη δράση της συγκεκριμένης κυτταροκίνης. Οι παράγοντες αυτοί αποτελούνται από πρωτεΐνες σύνδεσης (συμπεριλαμβανομένου του εξωκυτταρίου ιστού), οι ιντεγκρίνες (που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του υποδοχέα του TGF-β) και οι ρυθμιστές των διακυτταρίων διαβιβαστών από τον υποδοχέα (280).

Ο TGF-β επάγει την παραγωγή εξωκυτταρίου ιστού όχι μόνο στα κύτταρα του Ito αλλά και στα ενδοθηλιακά κύτταρα του κολποειδούς του ήπατος (281). Όμως, οι δράσεις του TGF-β ποικίλλουν σε κάθε περίπτωση. Κατά την αναγέννηση του ηπατικού ιστού, ο TGF-β επιδεικνύει δράση κυρίως έναντι του πολλαπλασιασμού παρά υπέρ της ινώσεως. Ο TGF-β δρα κατά του πολλαπλασιασμού και στα λεμφοκύτταρα. Πειραματικά δεδομένα σε αρουραίους που υπολείπονταν TGF-β

είχαν ως αποτέλεσμα ιστολογική φλεγμονή και μονοκυτταρική διήθηση στο ήπαρ και σε άλλους ιστούς (282).

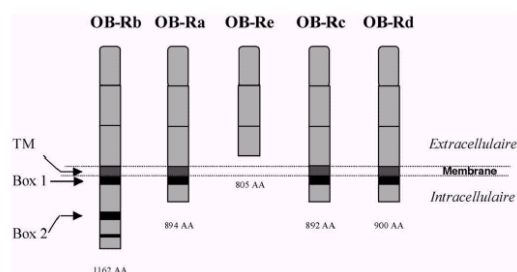
Εάν ο TGF- $\beta$  παρατηρηθεί απολειστικά ως ρυθμιστικός παράγοντας των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως αντιφλεγμονώδης και δυνητικά αντι-ινωτικός, ιδιότητα που τον χαρακτηρίζει στη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, σε αντίθεση με τον προ-ινωτικό ρόλο που έχει στο ήπαρ και τους άλλους ιστούς (283).

Τα διεγερμένα κύτταρα Kupffer παράγουν TGF- $\beta$ 1, ο οποίος είναι ισχυρός αναστολέας του πολλαπλασιασμού των ηπατοκυττάρων (264). Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα αναφέρουν ότι ο TGF- $\beta$  παράγεται από τα κύτταρα Kupffer - όταν διεγερθούν με LPS / ηπατεκτομή - σε ανενεργή μορφή και απαιτείται μια σειρά αντιδράσεων που περιλαμβάνει την έκκριση TNF- $\alpha$  από αυτά, με συνέπεια την διέγερση παραγωγής καλλικρεΐνης (PKA), η οποία ενεργοποιεί πρωτεολυτικά τον TGF- $\beta$ (284). Ο παραγόμενος από τα κύτταρα Kupffer TGF- $\beta$ 1, συμμετέχει στην ινωτική διαδικασία του ήπατος επάγοντας την παραγωγή αναστολέων των πρωτεασών (TIMPs) από τα κύτταρα Ito (285).

## ΛΕΠΤΙΝΗ

Η λεπτίνη είναι μια πρωτεΐνη μεγέθους 16kDA, που αποτελεί έκφραση του γονιδίου ob και παράγεται κυρίως στα κύτταρα του λιπώδους ιστού, αλλά και σε μικρότερες ποσότητες στους σκελετικούς μύες στο θόλο του στομάχου, τον εντερικό σωλήνα και τον πλακούντα. Οι συγκεντρώσεις της λεπτίνης στο πλάσμα είναι ανάλογες της συγκέντρωσης λιπώδους ιστού στον οργανισμό (286).

Οι υποδοχείς της λεπτίνης (OB-Rs) έχουν μεμβρανική εντόπιση και η δομή τους μοιάζει με αυτή των κυτταροκινών κλάσεως I, ανήκουν στην οικογένεια των

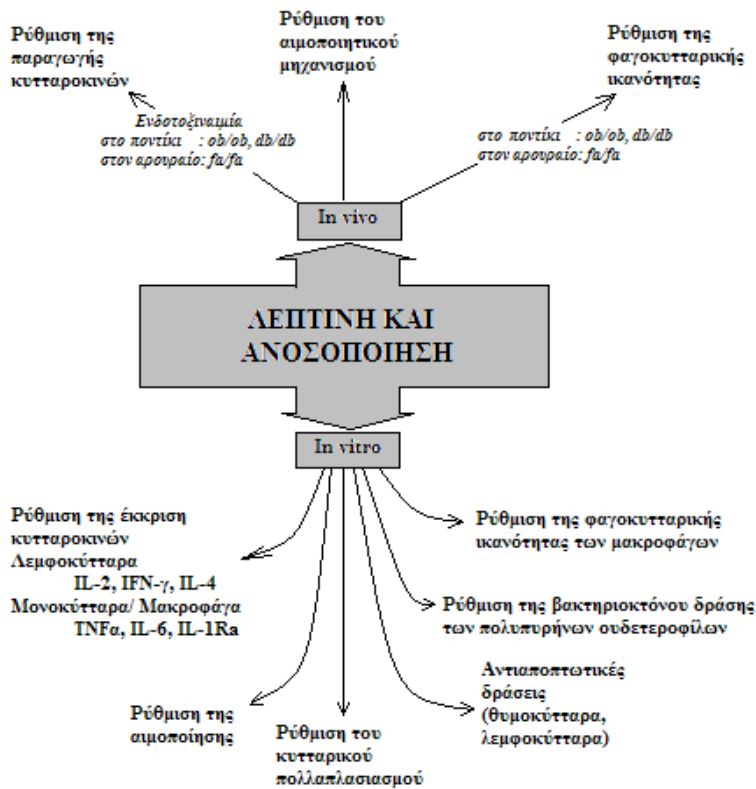


Εικόνα 25: Οι υποδοχείς της λεπτίνης

υποδοχέων αιμοποίησης και εμφανίζουν στενή σχέση με τους μεμβρανικούς διαβιβαστές του τύπου της IL-6 (287). Έως σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί 5 υπότυποι υποδοχέων λεπτίνης (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd και Ob-Re), οι οποίοι έχουν την ίδια εξωκυττάρια και διαμεμβρανική δομή, με τη μεταξύ τους διαφορά να εστιάζεται στο κυτταροπλασματικό τους τμήμα (288).

### Ο Ρόλος της Λεπτίνης

Η λεπτίνη φαίνεται να έχει ρόλο-κλειδί στην προσαρμογή της νευρο-ενδοκρινούς απάντησης κατά τις καταστάσεις νηστείας στον οργανισμό, δύναται δε να δράσει άμεσα έναντι συγκεκριμένων περιφερικών ιστών ή κυττάρων και έχει ρυθμιστικό ρόλο στις ακόλουθες λειτουργίες:



Εικόνα 26: Ο ρόλος της λεπτίνης στην ανοσοποίηση.

α. στην αιμοποίηση (σε συνεργασία με άλλα ρυθμιστικά μόρια όπως ο SCF, η GM-CSF, η αιμοποιητίνη και οι κυτταροκίνες κυρίως IL-3 και IL-6) (289),  
 β. στην ανοσολογική απάντηση (επιδρώντας επαγωγικά ή ανασταλτικά στην παραγωγή και

απελευθέρωση κυτταροκινών/ χημειοκινών) (290) και

- i. στις λειτουργίες των μακροφάγων και πολυμορφοκυττάρων (291)
- ii. στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (292) και
- iii. στην απόπτωση (293) (294).

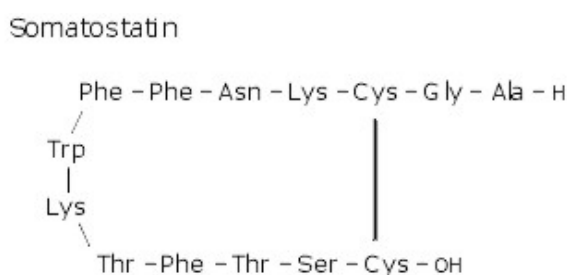
Παρά τα κενά που υπάρχουν ακόμα σχετικά με τις λειτουργίες της λεπτίνης σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, τα ανωτέρω δεδομένα την καθιστούν σημαντικό παράγοντα στην φυσιολογική και παθολογική κατάσταση του οργανισμού.

## **ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ**

Η σωματοστατίνη (SST) ανακαλύφθηκε πριν από τρεις δεκαετίες ως βιοδραστικό ολιγοπεπτίδιο μήκους δεκατεσσάρων αμινοξέων (SST-14), το οποίο αναστέλει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης από την υπόφυση και έχει προέλευση τον υποθάλαμο (295). Στους ανώτερους οργανισμούς υπάρχουν δύο μέλη αυτής της οικογένειας πεπτιδίων με βιολογική δραστηριότητα: η σωματοστατίνη δεκατεσσάρων αμινοξέων (SST-14) και η σωματοστατίνη 28 αμινοξέων (SST-28), με την τελευταία να έχει επιπρόσθετη αμινοξεϊκή αλληλουχία στο αμινοτελικό άκρο του SST-14 (296). Τα μόρια αυτά συμμετέχουν στη ρύθμιση των φυσιολογικών λειτουργιών εντός του οργανισμού με ρόλο στην κυτταρική έκκριση, το μεταβολισμό, τη συσταλτικότητα των λείων μυϊκών ινών, τη νευρορρύθμιση και τον κυτταρικό κύκλο (297). Οι σωματοστατίνες SST-14 και SST28 παράγονται από διάφορες κυτταρικές ομάδες και δρουν ως νευρομεταβιβαστές, ως μεταβιβαστές με παρακρινή, αυτοκρινή ή και ευρεία δράση, μέσω της κυκλοφορίας (298) (299) (300;301). Η σωματοστατίνη ρυθμίζει την έκκριση της αυξητικής και της θυρεοειδούς ορμόνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και συμμετέχει στην ρύθμιση της παγκρεατικής λειτουργίας, στην κινητικότητα του πεπτικού συστήματος, στον αγγειακό τόνο και την ανοσολογική απάντηση (302), ενώ ο ρόλος της κατά τη φλεγμονή και στην παθογένεια νόσων όπως η νεοπλασία, η επιληψία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η νόσος Alzheimer, το AIDS και η χορεία του Huntington είναι σημαντικότερος (303) .

## Σωματοστατίνη : Παραγωγή και Δράσεις

Τα κύτταρα που παράγουν σωματοστατίνη υπάρχουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε όλη την έκταση του ΚΝΣ και περιφερικού νευρικού συστήματος, στην ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος, στο έντερο και σε μικρότερες ποσότητες στον θυροειδή αδένα, στα επινεφρίδια, στους υπογνάθιους σιελογόνους αδένες, τους νεφρούς, στον προστάτη και στον πλακούντα (302). Μορφολογικά, τα κύτταρα αυτά έχουν ομοιότητα με τους νευρώνες, επιδεικνύοντας πολλαπλές διακλαδώσεις ή μοιάζουν με εκκριτικά κύτταρα, συχνά με μικρές κυτταροπλασματικές προεκβολές. Νευρώνες και νευρωνικές ίνες θετικές στη σωματοστατίνη, βρίσκονται διάσπαρτες στο ΚΝΣ με εξαίρεση την παρεγκεφαλίδα (304). Οι περιοχές στον εγκέφαλο που είναι πλούσιες σε σωματοστατίνη, περιλαμβάνουν τον υποθάλαμο, τις βαθύτερες στοιβάδες του φλοιού, την φαιά ουσία γύρω από τον υδραγωγό, το νεοραβδωτό σώμα και το μεταχιακό σύστημα, καθώς και όλες τις μείζονες αισθητικές οδούς (305). Στο πεπτικό σύστημα, τα κύτταρα που παράγουν σωματοστατίνη είναι είτε δ κύτταρα στα νησίδια του παγκρέατος και στον εντερικό βλεννογόνο, είτε νευρώνες της υποβλεννογονίου στοιβάδας και του μυεντερικού πλέγματος (306). Σωματοστατίνη παράγουν επίσης, αφού διεγερθούν, πολλά καρκινικά κύτταρα, καθώς και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου και τα κύτταρα του αρθρικού υμένα (307-310).



Εικόνα 27: Η σωματοστατίνη-14

Η σωματοστατίνη έχει ανασταλτική δράση έναντι της θυρεοτροπινоекλυτίνης (TRH) και της ορμόνης απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (CRH) από τον υποθάλαμο. Η σωματοστατίνη αναστέλλει ακόμα και την έκκριση της αυξητικής ορμόνης (GH), της θυρεοτροπίνης (TSH), των ορμονών των παγκρεατικών νησιδίων, της προλακτίνης και σχεδόν όλων των ορμονών του γαστρεντερικού συστήματος (311). Η ανασταλτική της δράση επηρεάζει την κινητικότητα και εξωκρινική λειτουργία (γαστρικό οξύ, πεψίνη, χολή) του γαστρεντερικού συστήματος, ενώ στην σπλαχνική κυκλοφορία δρά αγγειοσυσπαστικά. Στον θυρεοειδή αδένα, η σωματοστατίνη αναστέλλει την απελευθέρωση T3, T4 και καλσιτονίνης, στους νεφρούς την παραγωγή ρενίνης και την επαναρρόφηση ύδατος από την αλκοολική αφυδρογονάση (ADH), και στα επινεφρίδια την παραγωγή κατεχολαμινών και αλδοστερόνης (303;312).

Η σωματοστατίνη στο ΚΝΣ έχει ρόλο νευροδιαβιβαστή και επηρεάζει διεγερτικά την απελευθέρωση της ντοπαμίνης στα βασικά γάγγλια. Η σωματοστατίνη παράγεται στους νευρώνες του περιφερικού νευρικού συστήματος στα γάγγλια της ραχιαίας ρίζας του νωτιαίου μυελού. Σε τυχόν αλγογόνο βλαπτικό ερέθισμα, οι περιφερικοί αισθητικοί νευρώνες αναλαμβάνουν τη μεταφορά της στις τελικές αισθητικές νευρικές ίνες, από όπου απελευθερώνεται (301). Η ουσία P, η οποία είναι σημαντικός μεταβιβαστής της νευρογενούς φλεγμονής και του άλγους και επάγει τις κυτταροκίνες και άλλους φλεγμονώδεις μεταβιβαστές, έχοντας μεν την ίδια ιστική προέλευση με τη σωματοστατίνη, αλλά αντιστρόφως ανάλογη δράση από αυτήν (313) (314) της οποίας η χορήγηση (κυρίως συνθετικά ανάλογα της σωματοστατίνης) έχει αναλγητική δράση (315-317) (318;319).

Πέραν της προαναφερόμενης νευρορρυθμιστικής δράσης της, η σωματοστατίνη έχει και άμεση επίδραση καταστολής στην φλεγμονή, αναστέλλοντας τον λεμφοκυτταρικό

πολλαπλασιασμό (320), μειώνοντας την κυτταροτοξικότητα των κυττάρων NK(321), αναστέλλοντας την παραγωγή ανοσοσφαιρινών από τα Β-λεμφοκύτταρα, και μειώνοντας την χημειοταξία των λευκοκυττάρων (322), την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και ιντερφερόνης από τα μονοκύτταρα (323;324) και επίσης αναστέλλει την απελευθέρωση ισταμίνης και την παραγωγή λευκοτριένης D<sub>4</sub> από ανοσολογικά διεγερθέντα βασεόφιλα κύτταρα (325).

Ποικιλία μορίων συμπεριλαμβανομένων ιόντων, θρεπτικών ουσιών, νευροπεπτιδίων, νευρομεταβιβαστών, κλασσικών ορμονών, αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών επηρεάζουν την έκκριση της σωματοστατίνης. Η γλυκόζη, τα αμινοξέα και τα λιπίδια επηρεάζουν την έκκριση σωματοστατίνης από τα κύτταρα δ, ενώ το γλυκογόνο, η GHRH, η νευροτενσίνη, η CRH, το CGRP και η μπομπεσίνη διεγείρουν την παραγωγή της σε διάφορους ιστούς, αλλά αναστέλλεται με το GABA και τα οπιοειδή (303) (326). Από τις ορμόνες που έχουν μελετηθεί η GH και οι θυρεοειδικές ορμόνες επίσης αυξάνουν την παραγωγή σωματοστατίνης από τον υποθάλαμο ενώ τα γλυκοκορτικοειδή σε μικρές δόσεις την αυξάνουν και σε μεγαλύτερες την αναστέλλουν. Η ινσουλίνη διεγείρει την έκκριση της σωματοστατίνης στον υποθάλαμο και την αναστέλλει στο έντερο και το πάγκρεας (327). Τέλος οι κυτταροκίνες IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  και IL-10 επάγουν την έκφραση του mRNA της σωματοστατίνης (328) ενώ ο TGF- $\beta$  και η λεπτίνη την αναστέλλουν (329;330).

### **Οι υποδοχείς της σωματοστατίνης**

Μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν αποκαλύψει ειδικούς υποδοχείς της σωματοστατίνης στην υπόφυση, το θυρεοειδή αδένα, τα επινεφρίδια, την ενδοκρινή και εξωκρινή μοίρα του παγκρέατος, τον γαστρεντερικό σωλήνα, τον εγκέφαλο, τους



νεφρούς και τα λεμφοκύτταρα (303), καθώς επίσης και σε μεγάλο αριθμό καρκινικών κυτταρικών σειρών (302) (331). Μέχρι σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί πέντε υπότυποι υποδοχέων της σωματοστατίνης (Somatostatin Receptor – SSTR1 SSTR2, SSTR3, SSTR4 και SSTR5) (332). Όλοι οι υποδοχείς είναι μεμβρανικοί, συνδέονται με πρωτεΐνες G και παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια σύνδεσης με τα φυσικά πεπτίδια SST-14 και SST-28 (333).

Μελέτες της ιστικής κατανομής του mRNA των SSTR υποδοχέων σε αρουραίους έχουν καταδείξει την ύπαρξη ειδικής κατανομής για κάθε υπότυπό τους σε διαφορετικούς ιστούς (334). Έτσι, στο ΚΝΣ εκφράζονται όλοι οι υπότυποι, ενώ υπάρχουν εστίες ειδικής έκφρασης του κάθε υπότυπου. Στην υπόφυση και το σπλήνα επίσης εκφράζονται όλοι οι υποδοχείς της σωματοστατίνης σε αναλογίες:

SSTR2> SSTR1= SSTR3> SSTR5>SSTR4 για την υπόφυση

SSTR3> SSTR1= SSTR4= SSTR5> SSTR2 για τον σπλήνα

Ο στόμαχος εκφράζει όλους τους υποδοχείς εκτός του SSTR5 και το λεπτό έντερο όλους εκτός του SSTR2. Οι νεφροί εκφράζουν SSTR3 και SSTR4 μόνο, ενώ το ήπαρ τον SSTR3 και το πάγκρεας τον SSTR2 (334). Τα ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος (μακροφάγα, B και T λεμφοκύτταρα, θυμοκύτταρα) του ποντικού εκφράζουν κυρίως τον SSTR2 (335), ενώ έχει ανιχνευθεί η έκφραση πλέον του ενός υποδοχέων από πολλούς τύπους νεοπλασιών (303).

#### Η Σύνδεση με G πρωτεΐνες - Ενδοκυττάρια μεταβίβαση πληροφορίας

Οι υποδοχείς της σωματοστατίνης (SSTRs) επάγουν την κυτταρική απάντηση μέσω μορίων συνδεδεμένων με G πρωτεΐνες που συμπεριλαμβάνουν την αδενυλική κυκλάση, τους διαύλους  $K^+$  και  $Ca^{2+}$ , την αντλία  $Na/H^+$ , τη γουανυλική κυκλάση, τις φωσφολιπάσες  $A_2$  και C, τη MAP κινάση (MAPK) και τις φωσφατάσες σερίνης-

θρεονίνης και τυροσίνης (332). Τα μόρια αυτά μεσολαβούν στη δημιουργία δευτέρων μηνυμάτων, όπως είναι το cAMP, το Ca<sup>++</sup>, το cGMP και άλλα, τα οποία επάγουν τη φυσιολογική δράση της σωματοστατίνης.

Οι υποδοχείς της σωματοστατίνης έχουν ισχυρή ανασταλτική ικανότητα έναντι της αδενυλικής κυκλάσης, γεγονός που συνεπάγεται τη μείωση του ενδοκυττάριου cAMP μέσω όλων των Gα<sub>i</sub> υπομονάδων (Gα<sub>i1</sub>, Gα<sub>i2</sub> και Gα<sub>i3</sub>) (303). Τα διμερή Gα<sub>13</sub> και βγ τα οποία συνδέονται με την Gα<sub>13</sub> υπομονάδα ενεργοποιούν τους διαύλους K<sup>+</sup> προκαλώντας υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης. Το φαινόμενο έχει ως αποτέλεσμα την αυτόματη εξουδετέρωση του φορτίου και την είσοδο μορίων Ca<sup>2+</sup> μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο την ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca<sup>2+</sup> (336). Περαιτέρω μείωση των επιπέδων του ενδοκυττάριου ασβεστίου επιτυγχάνεται άμεσα, απενεργοποιώντας τους διαύλους υψηλού δυναμικού Ca<sup>2+</sup> από την Gα<sub>o2</sub> ή από την φωσφορυλίωση της cGMP πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από τους SSTRs (337). Πάντως, έχει αναφερθεί ότι ενεργοποίηση των SSTRs δύναται να προκληθεί από την αποφωσφορυλίωση των φωσφατασών Ser/Thr, με επακόλουθη ενεργοποίηση των διαύλων ασβεστίου (338).

Οι υποδοχείς σωματοστατίνης ενεργοποιούν και άλλες οδούς ενδοκυττάριας μεταβίβασης σήματος όπως η παραγωγή αραχιδονικού οξέος μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης A<sub>2</sub> και η παραγωγή τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP<sub>3</sub>) με ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C (339). Είναι ενδιαφέρον ότι διαφορετικοί υποδοχείς σωματοστατίνης δύνανται να ενεργοποιούν πλέον της μίας G-πρωτεϊνών, ενεργοποιώντας μ' αυτόν τον τρόπο ποικίλα και αλληλοεπηρεαζόμενα ενδοκυττάρια μονοπάτια μεταβίβασης σήματος.

Περαιτέρω διερεύνηση των ιδιοτήτων των υποδοχέων της σωματοστατίνης έχουν αποκαλύψει την παρουσία μικρής ειδικότητας που επιδεικνύουν αυτές προς τα

ενδοκυττάρια μονοπάτια που μπορούν να ενεργοποιούν (Πίνακας 3), ενώ υφίσταται η δυνατότητα σχηματισμού ομοδιμερών και ετεροδιμερών συμπλεγμάτων από τους υποδοχείς, αλλάζοντας έτσι τις φυσικές τους ιδιότητες τόσο ως προς τη σύνδεση με τη σωματοστατίνη και τα ανάλογα αυτής όσο και στη διαβίβαση πληροφορίας (303).

**Πίνακας 4:** Χαρακτηριστικά των υποτύπων των υποδοχέων σωματοστατίνης του ανθρώπου

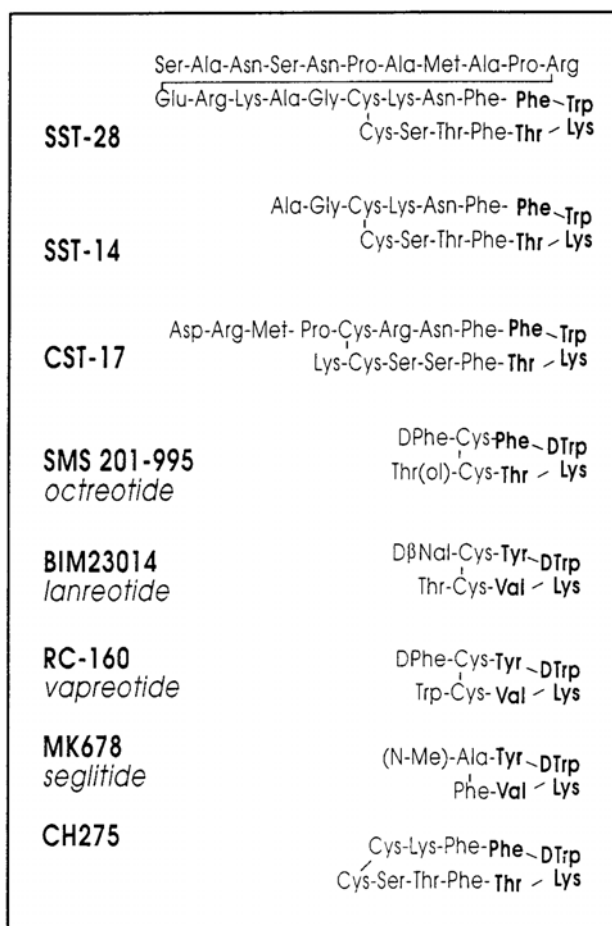
	SSTR1	SSTR2A	SSTR3	SSTR4	SSTR5
<b>Γονιδιακή εντόπιση</b>	14q13	17q24	22q13.1	20p11.2	16p13.3
<b>Μοριακό βάρος (kDa)</b>	53-72	71-95	65-85	45	52-66
<b>Σύνδεση με πρωτεΐνες G</b>	+	+	+	+	+
<b>Ενδοκυττάρια μεταβίβαση πληροφορίας</b>					
Αδενυλική κυκλάση	↓	↓	↓	↓	↓
Φωσφατάση τυροσίνης	↑	↑	↑	↑	↑
Κινάση MAP	↑	↓	↑↓	↑	↓
Διάλυοι K <sup>+</sup>		↑	↑	↑	↑
Διάλυοι Ca <sup>2+</sup>	↓	↓			
Αντλία Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	↑				
Διάλυοι AMPA/kainite glutamate	↑	↓			
Φωσφολιπάση A <sub>2</sub>		↑			↓↑
Φωσφολιπάση C/IP3		↑		↑	

#### Τα Συνθετικά ανάλογα της σωματοστατίνης

Η πολυποίκιλη δράση της σωματοστατίνης ως πεπτιδίου σε πειραματικά μοντέλα δεν βρήκε την ανάλογη κλινική χρήση, κυρίως λόγω του μικρού χρόνου ημισείας ζωής της στο πλάσμα, την ανάγκη συνεχούς ενδοφλέβιας έγχυσής της και τα φαινόμενα που ακολουθούν τη χορήγησή της όπως αυτό της παλίνδρομης επαγωγής ορμονών (GH, glucagen, insulin) (340). Οι λόγοι αυτοί, καθώς και η ανάγκη για περισσότερη ειδικότητα του μορίου έναντι συγκεκριμένων υποδοχέων έναντι αυτού, οδήγησαν στην παρασκευή συνθετικών αναλόγων του μορίου.

Μελέτες στην δομή του μορίου της σωματοστατίνης (SST-14) αποκάλυψαν την αναγκαιότητα ενός τετραπεπτιδίου (Phe<sup>7</sup>, Trp<sup>8</sup>, Lys<sup>9</sup> και Thr<sup>10</sup>) για τη βιοδραστικότητα της SST-14, το οποίο σχηματίζει μία β-στροφή (loop) με σημαντικότερα τις Trp<sup>8</sup> και Lys<sup>9</sup>. Ως εκ τούτου, ακολουθήθηκε μία στρατηγική διατήρησης αυτής της αλληλουχίας και της προσθήκης αμινοξέων με κυκλικές ή όχι πλευρικές ομάδες, δημιουργώντας αλληλουχίες που θα σταθεροποιούσαν τη loop αλλά και θα καθιστούσαν το μόριο ανθεκτικότερο στην πρωτεόλυση (Εικόνα 28).

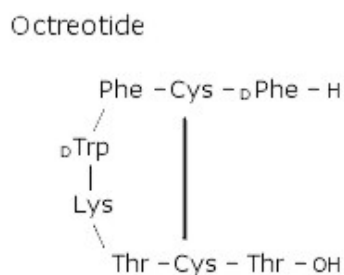
Το πρώτο συνθετικό ανάλογο της σωματοστατίνης που παρασκευάστηκε μέσω αυτής της στρατηγικής και χρησιμοποιήθηκε στην κλινική πράξη είναι το SMS201-995



(SMS, οκτρεοτίδη). Η οκτρεοτίδη έχει την ιδιότητα να αναστέλλει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης, της γλυκαγόνης και της ινσουλίνης σε ισχυρότερο βαθμό από ότι η σωματοστατίνη, ο χρόνος ημίσειας ζωής της μετά από υποδόρια ένεση είναι 2 ώρες και δεν παρατηρείται το φαινόμενο της παλίνδρομης επαγωγής ορμονών μετά από τη χορήγησή της (341;342). Η οκτρεοτίδη, όπως και τα υπόλοιπα συνθετικά ανάλογα της σωματοστατίνης με ακόμα μεγαλύτερους χρόνους ημίσειας

ζωής που ακολούθησαν (BIM23014 ή Λανρεοτίδη και RC160 ή Βαπρεοτίδη)

επιδεικνύουν υψηλή συγγένεια έναντι των υποδοχέων SSTR2 και 5, μέτρια για τον υποδοχέα SSTR3 και χαμηλή για τους υποδοχείς SSTR1 και 4 (303).



**Εικόνα 29: Η Οκτρεοτίδη**

Η οκτρεοτίδη το κλινικώς ευρύτερα χρησιμοποιούμενο συνθετικό ανάλογο της σωματοστατίνης και έως σήμερα έχει χορηγηθεί θεραπευτικά με επιτυχία σε ορμονοπαραγωγά αδενώματα υπόφυσης, μεταστατικό καρκινοειδές ή όγκους παγκρεατικών νησιδίων, νευροενδοκρινικούς όγκους και αδενοκαρκινώματα θετικά για υποδοχείς σωματοστατίνης, αιμορραγία κίρσων οισοφάγου καθώς και για καταστάσεις που συνοδεύονται από ανθεκτική στην αντιβιοτική αγωγή διάρροια (π.χ. AIDS) (343;344) (345;346) (347).

# ***ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Το ήπαρ αποτελείται από παρεγχυματικά (ηπατοκύτταρα) και μη παρεγχυματικά (κύτταρα του κολποειδούς: Kupffer, Ito, ενδοθηλιακά) κύτταρα, των οποίων η συνεχείς αλληλεπιδράσεις συνεισφέρουν στην ομοιοστασία του ήπατος (264).

Η άμεση επαφή των κυττάρων του ηπατικού κολποειδούς με την πυλαία κυκλοφορία την οποία και περιβάλλουν, τα εκθέτει σε ιούς, βακτήρια, τοξικές ουσίες ακόμα και καρκινικά κύτταρα, καθιστώντας τα ως την πρώτη γραμμή άμυνας του ήπατος (348).

Υπό τις συνθήκες αυτές, τα κύτταρα του κολποειδούς καλούνται να επιτελέσουν ρόλο στη ρύθμιση της εξωκυττάριας ουσίας (224), την αντιγονοπαρουσίαση (349), την ρύθμιση της φλεγμονώδους αντίδρασης (245), τη φαγοκυττάρωση (350;351) και την απόπτωση (352).

Η μελέτη της ανοσολογικής αντίδρασης των κυττάρων του κολποειδούς του ήπατος, απαιτεί την δυνατότητα απομόνωσης και πρωτογενούς καλλιέργειας *in vitro* αμιγούς πληθυσμού κυττάρων από αξιόπιστο πειραματικό μοντέλο. Με αυτόν τον τρόπο προσφέρεται ευρύ πεδίο διερεύνησης της επίδρασης φαρμακευτικών ή άλλων ουσιών στην ηπατική ανοσολογία.

Επιπλέον, πρέπει να καταδειχθεί ο ρόλος των κυττάρων αυτών στην απόπτωση, την παραγωγή κυτταροκινών και παραγόντων ίνωσης για να ερμηνευθεί και να κατανοηθεί ευρύτερα η εμπλοκή τους στην πρωτογενή ανοσολογική αντίδραση του ήπατος.

## Σκοπός:

- Η απομόνωση και καλλιέργεια αμιγούς πληθυσμού κυττάρων του Kupffer από ήπαρ αρουραίου.
- Η διερεύνηση της επίδρασης της οκτρεοτίδης (συνθετικού αναλόγου της σωματοστατίνης), του λιποπολυσακχαρίτη (LPS – ενδοτοξίνη) και των συνδυασμών τους:
  - στη γονιδιακή έκφραση της απόπτωσης,
  - στην παραγωγή κυτταροκινών, και πρωτεολυτικών ενζύμων που παράγονται ως αποτέλεσμα της πρωτογενούς ανοσολογικής απαντήσεως των κυττάρων του Kupffer. Επελέγησαν παράγοντες που σχετίζονται με την ίνωση.

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι ακόλουθοι παράγοντες:

α. MMP-1 (Type I Collagenase),

β. uPA,

γ. TGF-β1, και

δ. Λεπτίνη,

δηλαδή, επελέγησαν δύο παράγοντες που επάγουν την ίνωση (TGF-β1 και λεπτίνη)

και δύο που ευνοούν την ινόλυση (MMP-1 και uPA).

Η μελέτη έγινε στο υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων του Kupffer που είχαν απομονωθεί από αρουραίους και είχαν υποστεί επώαση με λιποπολυσακχαρίδιο, οκτρεοτίδη (συνθετικό ανάλογο της σωματοστατίνης) και τον συνδυασμό τους.



## **ΥΛΙΚΑ**

### **Πειραματόζωα**

Σύμφωνα με τις επιταγές της Ελληνικής και Ευρωπαϊκής Νομοθεσίας (Ν.1197/81§4, Ν.2015/92 και Π.Δ.160/91) για την υγεία και την ορθή μεταχείριση των ζώων, ελήφθη έγκριση (Αρ. Πρωτ. 423, 11-2-2000) από τη Διεύθυνση της Κτηνιατρικής Υπηρεσίας Ηρακλείου του Υπουργείου Γεωργίας για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης.

Ως πειραματικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν αρουραίοι Sprague-Dawley, αρσενικού φύλου, ηλικίας άνω των 45 εβδομάδων και βάρους 460-550 g, οι οποίοι είχαν ελεύθερη διαίτα.

### **Ηπαρίνη**

Συγκέντρωση:	1000 U/ml
Εμπορική Διάθεση:	Leo-Pharma, Ballerup, Denmark

### **Πεντοθάλη (PENTOTHAL®)**

Ποσότητα:	1 g
Συγκέντρωση:	2% διάλυμα, κατόπιν διάλυσης σε 50ml WFI
Εμπορική Διάθεση:	Abbott, Chicago, Illinois, USA

### **Προνάση (Pronase)**

Ενζυμική δραστηριότητα:	7 U/mg
Βαθμός καθαρότητας:	100% nuclease-free
Προέλευση:	<i>Streptomyces griseus</i>
Εμπορική Διάθεση:	Roche, Mannheim, Germany
Συνθήκες Αποθήκευσης:	4°C , σκοτάδι
Ανασύσταση:	Διάλυση σε HBSS με Ca, Mg.

## **DNase I**

Ενζυμική δραστηριότητα:	>2000 U/mg
Βαθμός καθαρότητας:	Grade II
Προέλευση:	Πάγκρεας Μόσχου (Bovine pancreas)
Εμπορική Διάθεση:	Roche, Mannheim, Germany
Συνθήκες Αποθήκευσης:	4°C , σκοτάδι
Ανασύσταση:	Διάλυση σε HBSS με Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>

## **Catalase**

Ενζυμική δραστηριότητα:	10.000 U/mg
Βαθμός καθαρότητας:	71%
Προέλευση:	Ήπαρ Μόσχου (Bovine liver)
Εμπορική Διάθεση:	Sigma, St. Louis, USA
Συνθήκες Αποθήκευσης:	-20°C
Ανασύσταση:	Διάλυση σε στείρο H <sub>2</sub> O

## **Collagenase B**

Ενζυμική δραστηριότητα:	>0,15 U/mg
Βαθμός καθαρότητας:	μη-στείρα
Προέλευση:	<i>Clostridium Histolyticum</i>
Εμπορική Διάθεση:	Roche, Mannheim, Germany
Συνθήκες Αποθήκευσης:	4°C , σκοτάδι
Ανασύσταση:	Διάλυση σε HBSS με Ca, Mg.

## **Optiprep™**

Διάλυμα:	60% Iodixanol σε H <sub>2</sub> O
Πυκνότητα:	1,32 g/ml σε θερμοκρασία 20 °C
Οσμωτικότητα:	170 ± 15 mOsm
Εμπορική Διάθεση:	Axis-Shield PoC, Oslo, Norway
Συνθήκες Αποθήκευσης:	4°C , σκοτάδι
Ανασύσταση:	Διάλυση σε HBSS με Ca, Mg.

## **Trizol®**

Διάλυμα:	Phenol and Guanidine Isothiocyanate.
Εμπορική Διάθεση:	Gibco BRL, Paisley, UK
Συνθήκες Αποθήκευσης:	4°C , σκοτάδι

## Μονοκλωνικό Αντίσωμα ED2

Τύπος: IgG1 (rat)  
Ειδικότητα: ειδικό αντίσωμα έναντι της γλυκοπρωτεϊνης επιφανείας CD163 μακροφάγων κυττάρων αρουραίου  
Ποσότητα / συγκέντρωση: 0,25 mg / 1 mg/ml  
Εμπορική Διάθεση: Serotec, Kindlington, Oxford, UK  
Συνθήκες Αποθήκευσης: -20°C

## Ορρός υγιών κονίκλων (Normal rabbit serum)

Εμπορική Διάθεση: Dako, Glostrup, Denmark  
Συνθήκες Αποθήκευσης: 4°C

## Πολυκλωνικό Αντίσωμα Κονίκλου έναντι ποντικού συζευγμένο με ένζυμο αλκαλικής φωσφατάσης (Rabbit anti-mouse secondary antibody - AP conjugated)

Τύπος: πολυκλωνική ανοσοσφαιρίνη  
Ειδικότητα: συνδέεται με όλες τις ανοσοσφαιρίνες G (IgG) καθώς και την IgM ποντικού  
Εμπορική Διάθεση: Dako, Glostrup, Denmark  
Συνθήκες Αποθήκευσης: 4°C

## DAKO® Fast Red Substrate System

Τύπος: kit με ενζυμικό υπόστρωμα και χρωμογόνο ουσία έναντι της αλκαλικής φωσφατάσης.  
Ειδικότητα: ειδικό για κυτταρικά εναιωρήματα και προσκολλημένα κύτταρα σε slide μικροσκοπίου  
Εμπορική Διάθεση: Dako, Glostrup, Denmark  
Συνθήκες Αποθήκευσης: 4°C

## Λιποπολυσακχαρίτης (LPS)

Προέλευση: *Escherichia coli*, υπότυπος 026:B6  
Εμπορική Διάθεση: Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany  
Συνθήκες Αποθήκευσης: -20°C  
Ανασύσταση: 2,5 mg/ml σε DMEM

## Οκτρεοτίδη (Sandostatin)

Τύπος: Συνθετικό ανάλογο σωματοστατίνης  
Συγκέντρωση: 0,1 mg/ml  
Εμπορική Διάθεση: Novartis, Basel, Switzerland  
Συνθήκες Αποθήκευσης: 4°C

### **ELISA kit rat Leptin**

Τύπος: Ειδικό τεστ ανίχνευσης λεπτίνης σε υπερκείμενο καλλιέργειας ή ορρό αρουραίου  
Εμπορική Διάθεση: Assay Designs Inc., Ann Arbor, Michigan, USA

### **ELISA kit rat TGF-β1**

Τύπος: Ειδικό τεστ ανίχνευσης TGF-β1 σε υπερκείμενο καλλιέργειας ή ορρό αρουραίου  
Εμπορική Διάθεση: Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany

### **ELISA kits uPA Activity Assay και Matrix Metalloproteinase type I Activity Assay**

Τύπος: Ειδικά τεστ ανίχνευσης ενεργότητας uPA και MMPs τύπου I σε υπερκείμενο καλλιέργειας ή ορρό αρουραίου.  
Εμπορική Διάθεση: Chemicon International Inc., Temecula, California, USA

### **HEPES (4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid).**

Συγκέντρωση: 1 M σε σε H<sub>2</sub>O  
Εμπορική Διάθεση: MERCK, Darmstadt Germany  
Συνθήκες Αποθήκευσης: 4°C (ως διάλυμα)

### **Chloroform, Isopropanol, Hydrochloric Acid, Phosphoric Acid, Sodium Hydroxide, EDTA, Tris-Base, Boric Acid, Agarose, Bromophenol Blue, Ethidium Bromide, Coomassie Brilliant Blue G-250, Bovine Serum Albumin (BSA), Ethanol (PCR Grade), Ficoll (type 400)**

Εμπορική Διάθεση: Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

### **HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) with / without Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>**

Τύπος: Ισότονο διάλυμα καλλιέργειας 10x πυκνό  
Εμπορική Διάθεση: Gibco BRL, Paisley, UK  
Συνθήκες Αποθήκευσης: 4°C

### **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)**

Ισότονο διάλυμα καλλιέργειας 1x πυκνό, εμπλουτισμένο με L-Glutamine, 4500 mg/ml D-Glucose, 25mM HEPES

Εμπορική Διάθεση: Gibco BRL, Paisley, UK  
Συνθήκες Αποθήκευσης: 4°C

### **Penicillin / Streptomycin**

Τύπος: Διάλυμα αντιβιοτικών 100x πυκνό (10,000 U)  
Εμπορική Διάθεση: Gibco BRL, Paisley, UK  
Συνθήκες Αποθήκευσης: -20°C

### **Fetal Bovine Serum (FBS)**

Τύπος: Ορρός Εμβρύου Μόσχου  
Εμπορική Διάθεση: Gibco BRL, Paisley, UK  
Συνθήκες Αποθήκευσης: -20°C

### **DNase I, Amplification Grade**

Ενζυμική δραστηριότητα: >10,000 units/mg  
Βαθμός καθαρότητας: RNase-Free  
Προέλευση: Πάγκρεας Μόσχου (Bovine pancreas)  
Συσκευασία: Συνοδεύεται με 10X DNase I Reaction Buffer και 25mM EDTA (pH 8.0)  
Εμπορική Διάθεση: Gibco BRL, Paisley, UK  
Συνθήκες Αποθήκευσης: -20°C  
Συγκέντρωση: 1 U/μl

### **Reverse Transcriptase (Superscript II™ RNase H<sup>-</sup>)**

Ενζυμική ειδικότητα: ειδική DNA πολυμεράση (τρανσκριπτάση) για τη σύνθεση συμπληρωματικής έλικας DNA από μονής έλικας RNA, DNA ή υβριδίου RNA:DNA  
Βαθμός καθαρότητας: RNase-Free  
Προέλευση: *Escherichia coli*, *pol* gene M-MLV  
Συσκευασία: Συνοδεύεται με 5X First-Strand Buffer και 0,1M DTT (pH 8.0)  
Εμπορική Διάθεση: Gibco BRL, Paisley, UK  
Συνθήκες Αποθήκευσης: -20°C  
Συγκέντρωση: 200 U/μl

### 100 bp DNA Ladder

Τύπος: ειδικής κλίμακας DNA (100-1500 ζευγών βάσεων) για τον προσδιορισμό μεγέθους των προϊόντων της PCR  
Εμπορική Διάθεση: Gibco BRL, Paisley, UK  
Συνθήκες Αποθήκευσης: -20°C

### dNTPs (Σετ δεοξυνουλεοτιδίων)

Βαθμός καθαρότητας: DNase-Free, >99%  
Συσκευασία: 4 δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) συσκευασμένα χωριστά σε διάλυμα dd. H<sub>2</sub>O (pH 8.3)  
Εμπορική Διάθεση: Roche, Mannheim, Germany  
Συνθήκες Αποθήκευσης: -20°C  
Συγκέντρωση: 100 μM, κάθε ένα.

### Taq DNA Polymerase

Ενζυμική ειδικότητα: ειδική πολυμεράση για PCR υψηλής καθαρότητας, σταθερό σε θερμοκρασίες έως 95°C  
Προέλευση: ανασυνδυασμένο ένζυμο με προέλευση το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* κλωνοποιημένο σε *Escherichia coli*  
Συσκευασία: Συνοδεύεται με ξεχωριστά συσκευασμένα 10X PCR Reaction Buffer με και χωρίς MgCl<sub>2</sub> και διάλυμα stock MgCl<sub>2</sub>  
Εμπορική Διάθεση: Roche, Mannheim, Germany  
Συνθήκες Αποθήκευσης: -20°C  
Συγκέντρωση: 1 U/μl

### Oligo d(T)<sub>12-18</sub> ή Pd(T)<sub>12-18</sub> ομο-ολιγομερές

Τύπος: ειδικής αλληλουχίας φωσφορυλιωμένο επικουρικό ολιγονουκλεοτίδιο για την έναρξη της PCR  
Εμπορική Διάθεση: Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden  
Συνθήκες Αποθήκευσης: -20°C

### CytoXpress Rat Apoptosis Set 2, Quantitative Multiplex PCR<sup>®</sup> Detection kit

Τύπος: Ειδικό kit ανίχνευσης της έκφρασης των γονιδίων bcl-2, bcl-xL, bcl-xS, bax και LICE (κασπάση-3), με housekeeping γονίδιο την GAPDH.  
Συσκευασία: Συνοδεύεται με ξεχωριστά συσκευασμένα μίγμα primers έναντι των ανωτέρω γονιδίων, PCR Buffer, dd. H<sub>2</sub>O, dNTPs, ανασυνδυασμένο DNA ελέγχου (θετικό control) και κλίμακα DNA 100 ζευγών βάσεων.  
Εμπορική Διάθεση: Biosource, Camarillo, California, USA  
Συνθήκες Αποθήκευσης: -20°C

### **RNAasin<sup>®</sup>, ειδικός αναστολέας ριβονουκλεασών**

Ενζυμική ειδικότητα: ειδικός ένζυμο-αναστολέας RNAσών  
Προέλευση: ανασυνδυασμένο ένζυμο κλωνοποιημένο σε *Escherichia coli*  
Εμπορική Διάθεση: Promega, Madison, Wisconsin, USA  
Συνθήκες Αποθήκευσης: -20°C  
Συγκέντρωση: 40 U/μl

### **RNAse-free H<sub>2</sub>O**

Εμπορική Διάθεση: USB, Cleveland Ohio, USA

### **Τρυβλία Καλλιέργειας, πλάκες ELISA 96-θέσεων, Chamber-Slides 2 και 8 βοθρίων**

Εμπορική Διάθεση: Nalge Nunc, Rochester, New York, USA

### **Πιπέττες καλλιέργειας 1, 5, 10, 25 ml και στείρα φίλτρα διήθησης 250, 1000ml**

Εμπορική Διάθεση: Corning-Costar, Acton, USA

### **Eppendorf tubes 1,5 ml και 0,2 ml, Ρύγχη 5-50 μl (gel loading tips), 0,1-20 μl (microtips), 10-200 μl (yellow tips), 100-1000 μl (blue tips), Pasteur pipettes**

Εμπορική Διάθεση: G.Kisker GbR, Steinfurt, Germany

### **Ράμματα**

Τύπος: Mersilk 3.0, μήκους βελόνας 24mm (κυλινδρική), μήκους ίνας 45cm.  
Εμπορική Διάθεση: Ethicon, Cornelia, Georgia, USA

### **Φλεβοκαθετήρες, Χειρουργικά εργαλεία**

Τύπος: OPTIVA\*2, 22G  
Εμπορική Διάθεση: Johnson & Johnson, New Brunswick, New Jersey, USA

### **Σύριγγες**

Τύποι: 1, 5, 10 και 20 ml  
Εμπορική Διάθεση: DIMES, ΕΛ.ΒΙΟ.Ν.Υ., Μαγούλα Αττικής, Ελλάς

**Water For Injection (WFI), Φυσιολογικός Ορός (0,9% NaCl)**

Τύπος: 10ml, 500ml και 1000ml

Εμπορική Διάθεση: ΒΙΟΣΕΡ, Ταξίαρχες Τρικάλων, Ελλάς

**Χειρουργικά Πεδία**

Τύπος: SecuDrape® μεγέθους 75x75 cm

Εμπορική Διάθεση: Sengewald, Rohrdorf-Thansau, Germany



## **Κατασκευή Διαλυμάτων**

### **Απομόνωση και καλλιέργεια κυττάρων του Kupffer**

Η παρασκευή και ανασύσταση όλων των διαλυμάτων και υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στις διαδικασίες απομόνωσης και καλλιέργειας των κυττάρων του Kupffer υφίσταντο αποστείρωση και χειρισμούς σε στείρες συνθήκες.

#### **HBSS with Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>**

Σύσταση : 100ml 10x HBSS with Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>  
: 4ml 1M HEPES  
: 9,3 ml από 7,5 % NaHCO<sub>3</sub>  
: Συμπλήρωση στο 1 L με WFI  
: pH 7.4

#### **HBSS without Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>**

Σύσταση : 100ml 10x HBSS without Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>  
: 4ml 1M HEPES  
: 9,3 ml από 7% NaHCO<sub>3</sub>  
: Συμπλήρωση στο 1 L με WFI  
: pH 7.4

#### **DMEM**

Σύσταση : 445 ml DMEM  
: 50 ml FBS (Heat Inactivated)  
: 5 ml Penicillin/Streptomycin

#### **Bradford Reagent (διάλυμα για τη μέτρηση πρωτεΐνης)**

Σύσταση : 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250  
: 50 ml ethanol  
: 100 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%)  
: Συμπλήρωση στα 250 ml με WFI

#### **PBS**

Σύσταση : 140 mM NaCl  
: 2,7 mM KCl  
: 1,5 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
: 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
: pH 7,5 (ρύθμιση με NaOH)

### **DAB**

Σύσταση : 50mg DAB σε 50 ml HBSS  
: pH 7,5 (ρύθμιση με 7.5% NaHCO<sub>3</sub>)  
: 50 μl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (αμέσως πριν τη χρώση)

### **CAF**

Σύσταση : 25 ml κιτρικό οξύ (18 mM κιτρικό οξύ, 9 mM κιτρικό νάτριο,  
12 mM NaCl, pH:3,6)  
: 65 ml ακετόνη  
: 8 ml φορμαλδεΰδη 37%

### **NCAE (Naphthol AS-D chloroacetate)**

Σύσταση : 1 ml διαλύματος 0,1 mol/L Sodium Nitrate  
: 1 ml διαλύματος 15 mg/ml Fast Red violet LB Base  
: 0,4 mol/L HCl  
: 40 ml d. H<sub>2</sub>O  
: 5 ml διαλύματος 1 mol/L TRISMA<sup>®</sup> maleate pH: 6,3  
: 1 ml διαλύματος 8mg/ml Naphthol AS-D chloroacetate

### **Παραφορμαλδεΰδη 4%**

Σύσταση : 4 gr παραφορμαλδεΰδη  
: 100 ml διαλύματος PBS, pH: 7,4  
: θέρμανση στους 100°C / ανάδευση 15 λεπτά

### **TBS (Tris Buffered Saline)**

Σύσταση : 50mM Tris  
: 150mM NaCl  
: pH 7,6 (ρύθμιση με HCl)

### **Methyl-green 2% (w/v)**

Σύσταση : 2 gr methyl-green  
: 100 ml d. H<sub>2</sub>O  
: 100 ml Chloroform  
: κατόπιν έντονης ανάδευσης αφαιρείται η άνω φάση (Chloroform)

### **5x TBE Stock (ανά 1L)**

Σύσταση : 54g Tris Base  
: 27,5g Boric Acid  
: 20ml 0,5M EDTA (pH 8)

### **Διάλυμα ανάμειξης δείγματος (Loading Buffer)**

Σύσταση : 0,25% Bromophenol blue  
: 15% Ficoll (Type 400) σε νερό

## **ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ KUPFFER ΑΠΟ ΗΠΑΡ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ**

Η διαδικασία απομονώσεως των κυττάρων του Kupffer από ήπαρ αρουραίου που αναπτύχθηκε αποτελεί συνδυασμό των μεθόδων οι οποίες χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια ανά τον κόσμο και έχουν ως βάση τα χαρακτηριστικά (βιολογικά και φυσικοχημικά) των συγκεκριμένων κυττάρων όπως αυτά έχουν δημοσιευθεί.

Η διαδικασία απομονώσεως περιλαμβάνει τέσσερις τεχνικές:

- A. Την ενζυμική πέψη, με *in situ* διήθηση του ηπατικού ιστού μέσω της πυλαίας φλέβας (353)
- B. Τη φυγοκέντρηση του κυτταρικού εναιωρήματος σε διάλυμα Iodixanol (Optiprep) (354)
- Γ. Τη φυγοκέντρηση σε φυγόκεντρο έκλουσης (355) και
- Δ. Την προσκόλληση κυττάρων σε επιφάνεια πλαστικού προς καλλιέργεια (356).

#### A. Ενζυμική πέψη του ηπατικού ιστού

##### **1. Αναισθησία.**

Στον αρουραίο εισάγεται ενδοπεριτοναϊκώς διάλυμα θειοπεντάλης 2% (Pentothal) σε αναλογία 0,6 ml/kg σωματικού βάρους.

##### **2. Καθαρισμός.**

Ακολουθεί πλύσιμο του τριχώματος της κοιλιακής και θωρακικής χώρας του αρουραίου με Betadine Solution για να αποτραπεί η τυχόν μόλυνση των αποστειρωμένων πεδίων και χειρουργικών εργαλείων.

##### **3. Χειρουργική διαδικασία.**

Μετά την τοποθέτηση του αρουραίου σε αποστειρωμένο χειρουργικό πεδίο, ακολουθεί μέση υπερ/υπομφάλιος τομή στο κοιλιακό τρίχωμα. Το τρίχωμα

παραμερίζεται και ακολουθεί ομοιοτρόπως τομή στο κοιλιακό τοίχωμα και τελικώς η αποκάλυψη της πυλαίας φλέβας.

#### **4. Καθετηριασμός της πυλαίας φλέβας.**

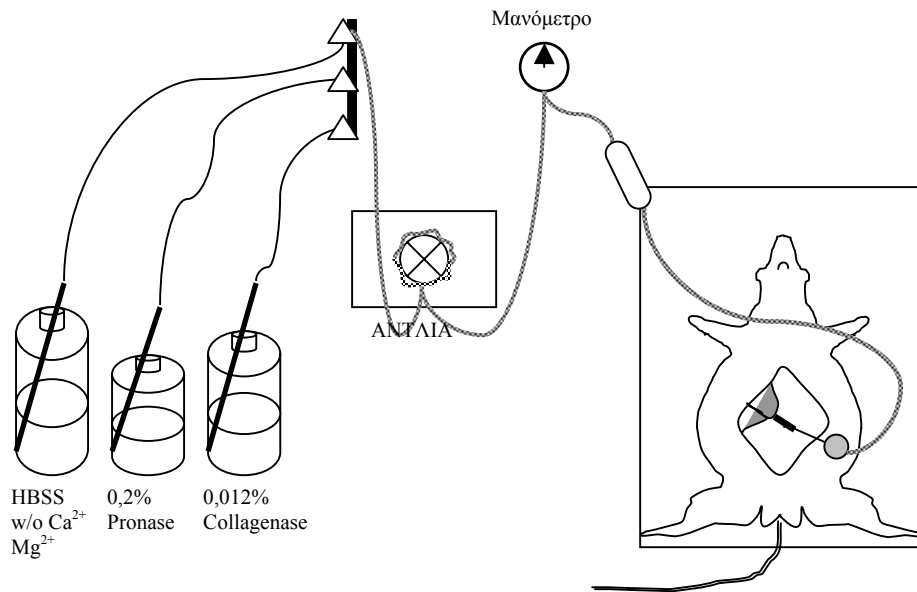
Χρησιμοποιώντας πλαστικό καθετήρα 22G, η πυλαία φλέβα καθετηριάζεται και διαμέσω αυτού εισάγονται με βραδύ ρυθμό στο ήπαρ 5ml διαλύματος 1000 IU ηπαρίνης σε φυσιολογικό ορό (0,9% NaCl). Ο καθετήρας σταθεροποιείται επί της πυλαίας φλέβας με ράμματα Mersilk 3.0 και η έξοδος του συστήματος διήθησης εισάγεται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

#### **5. *In situ* ενζυμική πέψη του ηπατικού ιστού.**

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:

- i. 200ml HBSS χωρίς  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$
- ii. 60ml διαλύματος 0,2% Pronase σε HBSS με  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$
- iii. 225ml διαλύματος 0,012% Collagenase σε HBSS με  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$

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*.



**Σχήμα 1: Ο σχεδιασμός της διαδικασίας διήθησης του ηπατικού ιστού του αρουραίου.**

## 6. 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 Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>, τελικού όγκου 100ml και θερμοκρασίας 37°C και το οποίο υφίσταται ισχυρή ανάδευση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C.

## 7. Διήθηση ηπατικού ομογενοποιήματος.

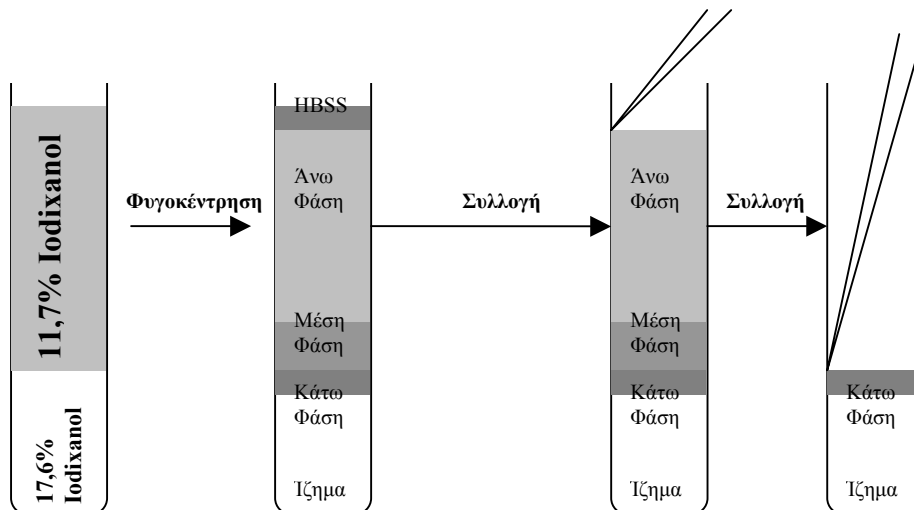
Το ομογενοποιημένο ήπαρ διηθείται σε αποστειρωμένη γάζα (Ø πόρου = 120μm) και αφαιρείται ο ιστός που δεν έχει υποστεί πέψη. Το κυτταρικό εναιώρημα αναμειγνύεται με ίσο όγκο HBSS με Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> και το νέο διάλυμα φυγοκεντρείται στα 400g, 7 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα που προκύπτει επαναδιαλύεται σε 24ml HBSS με Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> και ακολουθεί ο διαχωρισμός σε διάλυμα Iodixanol (Optiprep).

## B. Φυγοκέντρωση με διάλυμα Iodixanol (Optiprep™)

Η πέψη προνάσης που έχει προηγηθεί, έχει καταστρέψει τον περισσότερο αριθμό των ηπατοκυττάρων του ομογενοποιημένου και στο επόμενο στάδιο απαιτείται η αφαίρεσή τους από το ομογενοποίημα. Με τον τρόπο αυτό το προκύπτον διάλυμα εμπλουτίζεται σε κολποειδικά κύτταρα, που περιέχουν και τα κύτταρα Kupffer. Για το διαχωρισμό των τραυματισμένων από την προνάση ηπατοκυττάρων χρησιμοποιείται η μέθοδος φυγοκέντρωσης σε διάλυμα Iodixanol (Optiprep™). Το εναιώρημα που προέκυψε από την επαναδιάλυση του ιζήματος των ηπατικών κυττάρων σε 24 ml HBSS με  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  στο προηγούμενο στάδιο αναμιγνύεται με 16 ml διαλύματος 29,4% Iodixanol (συνολικός όγκος 40 ml, με τελική συγκέντρωση Iodixanol 11,7% (κ.ο.) και ειδικό βάρος (d) 1,066 g/ml. Το μείγμα του κυτταρικού ομογενοποιημένου σε Iodixanol επιστοιβάζεται προσεκτικά σε προπαρασκευασμένο διάλυμα 17,6% (κ.ο.) Iodixanol (d=1,0974 g/ml). Με αυτόν τον τρόπο το διάλυμα που προκύπτει έχει δύο διακριτές φάσεις διαφορετικής πυκνότητας. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 1400g για 17 λεπτά, στους 4°C.

Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, στο σωλήνα διακρίνονται 5 επίπεδα κυτταρικών στοιβάδων:

- α. HBSS - HBSS με  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  το οποίο συμπληρώθηκε προ της φυγοκέντρωσης
- β. άνω φάση - διάλυμα 11,7% Iodixanol που περιέχει κολποειδικά κύτταρα χαμηλού ειδικού βάρους και κυτταρικά συστατικά του αίματος.
- γ. μέση φάση - μεταξύ διαλυμάτων 11,7% και 17,6% (κ.ο.) που περιέχει μεγάλα κολποειδικά κύτταρα, κύτταρα Kupffer και μικρά σώα ηπατοκύτταρα.
- δ. κάτω φάση - διάλυμα Iodixanol 17,6% (κ.ο.) που περιέχει μικρά ζώντα και τραυματισμένα ηπατοκύτταρα
- ε. ίζημα - διάλυμα Iodixanol 17,6% (κ.ο.) που περιέχει τραυματισμένα και νεκρά ηπατοκύτταρα



**Σχήμα 2: Φυγοκέντρηση σε διάλυμα Iodixanol.**

Στο επόμενο στάδιο συλλέγονται οι ανώτερες στοιβάδες ως τη μέση φάση. Τα συλλεχθέντα κύτταρα επαναδιαλύονται σε HBSS με  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  και υφίστανται νέα φυγοκέντρηση υπό 400g για 7 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$ , για την απομάκρυνση του Iodixanol. Μετά τη φυγοκέντρηση, τα κολποειδικά κύτταρα που περιέχονται στο ίζημα, αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, επαναδιαλύονται σε HBSS με  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  το οποίο περιέχει 0,05% (κ.β.) DNase. Τέλος, το εναιώρημα αναρροφάται με βελόνη 22G για να αποτραπεί ο σχηματισμός κυτταρικών συσσωματωμάτων και να διαλυθούν τυχόν υπάρχοντα.

#### Γ. Κλασματικός διαχωρισμός σε φυγόκεντρο εκλούσεως (εμπλουτισμός των κυττάρων του Kupffer)

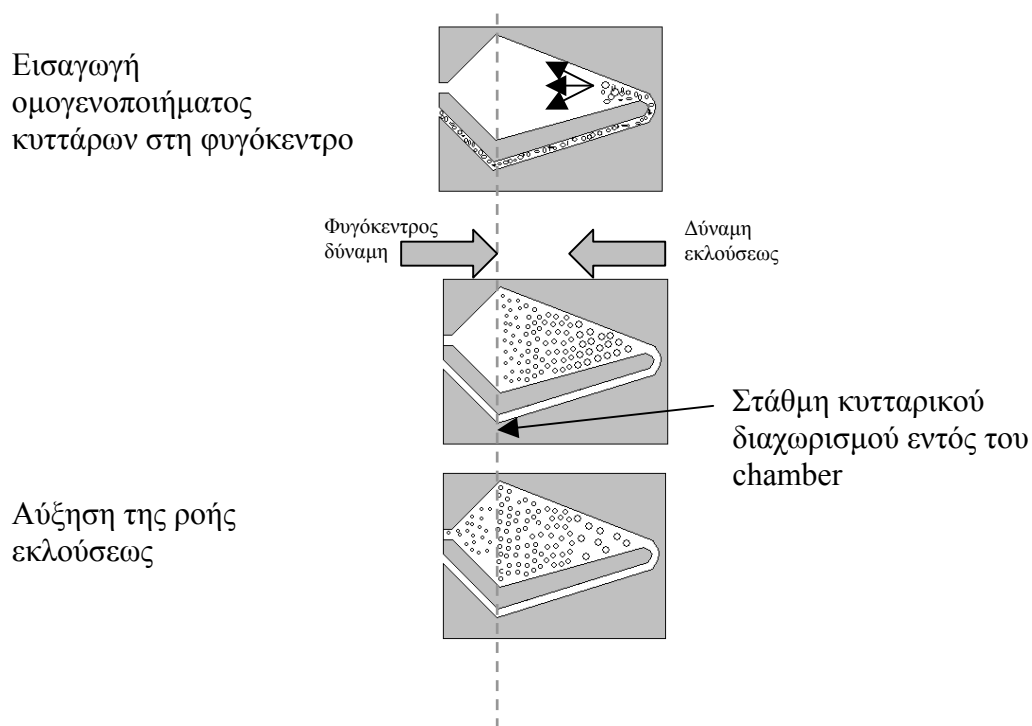
Ο εμπλουτισμός των κυττάρων του Kupffer από το εναιώρημα των κολποειδικών κυττάρων επετεύχθη με τη μέθοδο του κλασματικού διαχωρισμού χρησιμοποιώντας ειδική φυγόκεντρο εκλούσεως (centrifugal elutriator), η οποία διαχωρίζει τα κύτταρα με βάση το μέγεθος και το ειδικό τους βάρος.

Το σύστημα της φυγοκέντρου εκλούσεως που χρησιμοποιήθηκε αποτελείτο από φυγόκεντρο τύπου J2-MC (Beckman, Palo Alto, Ca) εξοπλισμένη με κεφαλή ρότορα JE-6B εντός της οποίας βρίσκεται ένα φιαλίδιο διαχωρισμού σταθερής χωρητικότητας (standard chamber). Το σύστημα συμπληρώθηκε με αντλία ακριβείας

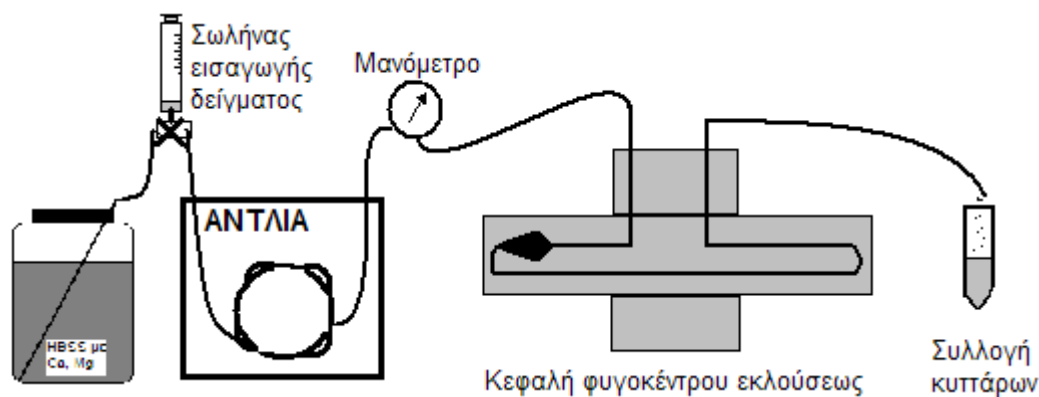


Masterflex 7521-25 (Cole Parmer, Chicago, IL). Για να αποτραπεί τυχόν μόλυνση των προς απομόνωση κυττάρων, το σύστημα αποστειρώνεται πριν τη χρήση αρχικά με διάλυμα 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και στη συνέχεια με διάλυμα 0,02% (κ.β.) Catalase.

Η μέθοδος του κλασματικού διαχωρισμού με φυγόκεντρο εκλούσεως είναι ευρύτατα διαδεδομένη διότι επιτρέπει το διαχωρισμό κυτταρικών πληθυσμών, όπως αυτόν των κυττάρων του κολοειδούς, με γνώμονα το μέγεθος και το ειδικό βάρος των κυττάρων. Η μέθοδος αυτή διατηρεί τα κύτταρα ανέπαφα, συνδυάζοντας χαμηλή ένταση φυγοκέντρωσης με ανάστροφη ροή μεταβαλλόμενη δύναμη εκλούσεως. Η ρυθμιζόμενη από την αντλία μεταβολή στη ροή επιτυγχάνει το διαχωρισμό κυττάρων εντός του φιαλιδίου διαχωρισμού από το οποίο εξέρχονται τα κλάσματα εκλούσεως των κυττάρων.



Σχήμα 3: Σχηματική απεικόνιση της αρχής της μεθόδου φυγόκεντρο εκλούσεως



Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας διαχωρισμού κυττάρων με τη φυγόκεντρο εκλούσεως.

Η ροή εκλούσεως της κάθε ομάδας κυττάρων ομογενοποίηση, υπολογίζεται τον τύπο:

$$F = xD^2 \left( \frac{R}{1000} \right)^2$$

$F$ : η ροή της αντλίας (ροή εκλούσεως)

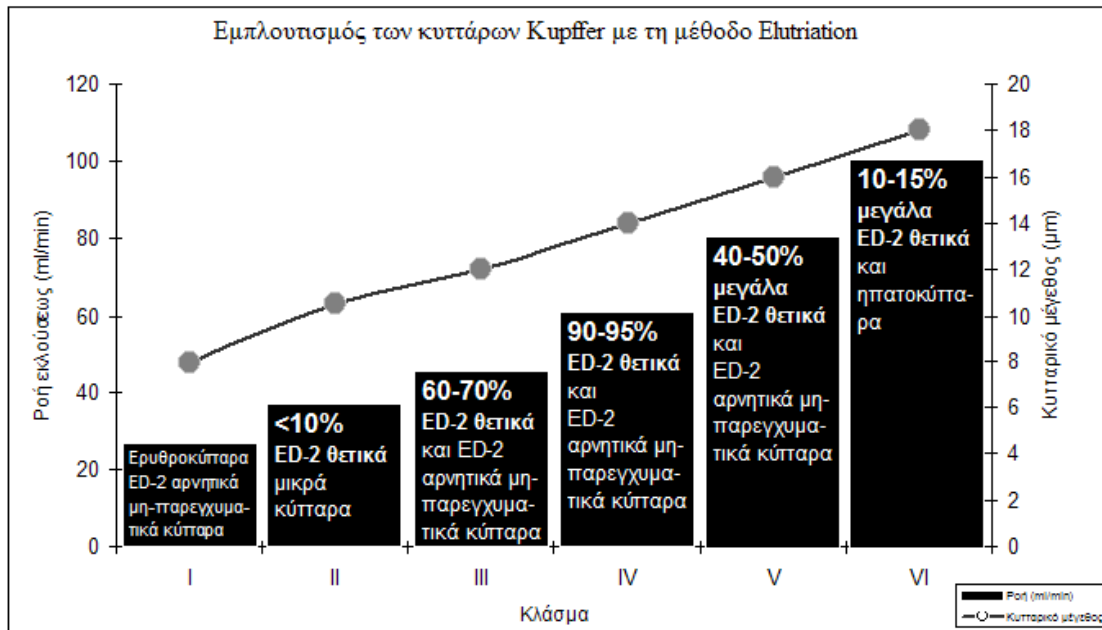
$x$ : η σταθερά του φιαλιδίου διαχωρισμού (0,0511)

$D$ : η κυτταρική διάμετρος και

$R$ : οι στροφές ανά λεπτό

Ο διαχωρισμός των κυττάρων του Kupffer στη φυγόκεντρο εκλούσεως γίνεται υπό συνθήκες 2500rpm, 25°C και στα 18,5 ml/min αρχικής ροής εισαγωγής εναιωρήματος και υγρού μέσου (HBSS).

Αρχικά αφήνονται να περάσουν 200ml HBSS και έπειτα το εναιώρημα κυττάρων εισάγεται στο σύστημα. Ακολουθεί η έκλυση των κυττάρων υπό συνθήκες 2500rpm, 25°C με σταδιακή αύξηση της ροής στην αντλία στα 25, 35, 45, 60, 80 και 100 ml/min και συλλέγονται 100ml όγκου ανά στάδιο. Τα επιμέρους στάδια ανά ροή εκλούσεως, κυτταρικού περιεχομένου και μεγέθους συνοψίζονται στο γράφημα που ακολουθεί.



**Γράφημα 1:** Τα στάδια συλλογής από τη φυγόκεντρο εκλούσεως. Αναφέρεται η ροή εκλούσεως, το κυτταρικό μέγεθος και είδος, καθώς και η θετικότητα των κυττάρων στο ειδικό αντίσωμα ED-2 ανά κλάσμα συλλογής.

Τα αποτελέσματα αυτά συνετέλεσαν στη συλλογή των κλασμάτων III και IV τα οποία περιείχαν τον μεγαλύτερο αριθμό ED-2 θετικών κυττάρων (357).

#### **Φυγοκέντρωση – Επαναδιάλυση σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας**

Τα κύτταρα αυτών των κλασμάτων υφίστανται φυγοκέντρωση στα 400g για 7 λεπτά στους 4°C και αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο, το εναπομείναν ίζημα που περιέχει τα κύτταρα του Kupffer επαναδιαλύεται σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (DMEM) που περιέχει αντιβιοτικά και ορρό εμβρύου μόσχου (FBS).

#### **Υπολογισμός πληθυσμού – βιωσιμότητας των κυττάρων του Kupffer**

Ακολουθεί η μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού σε κυτταρομετρική πλάκα Neubauer και υπολογισμός της βιωσιμότητάς τους με κυανούν του τρυπανίου (Trypan Blue). Ο μέσος αριθμός των απομονωθέντων κυττάρων κυμαινόταν μεταξύ  $6-9 \times 10^6$  κύτταρα ανά απομόνωση (αουραίο) και η βιωσιμότητά τους έγγιζε το 95%.

#### Δ. Προσκόλληση στον πυθμένα βοθρίων καλλιέργειας

Τα κύτταρα του Kupffer έχουν ως χαρακτηριστική ιδιότητα να προσκολλώνται στις πλαστικές επιφάνειες εντός δύο ωρών από την πρώτη τους επαφή με αυτές. Αυτό τους το χαρακτηριστικό διατηρείται ακόμη και μετά την ενζυμική πέψη του ιστού με κολλαγενάση και προνάση (358). Το χαρακτηριστικό τους αυτό αξιοποιήθηκε για το τελευταίο στάδιο της απομόνωσης, κατά το οποίο τα επιστοιβαγμένα κύτταρα Kupffer στα καλλιεργητικά βοθρία επωάζονται σε συνθήκες καλλιέργειας (37° C σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub>) για δύο ώρες και έπειτα το υλικό καλλιέργειας απομακρύνεται και αντικαθίσταται με νέο. Με τον τρόπο αυτό απομακρύνονται τα κατεστραμμένα και ανίσχυρα κύτταρα Kupffer και ο σχεδόν αμιγής πληθυσμός που προκύπτει (>95% κύτταρα Kupffer) αφήνεται επί 24 ώρες να ηρεμήσει και να επανέλθει στην φυσιολογική του μορφολογία (κυτταροπλασματικές προσεκβολές και ακανόνιστο κυτταρικό σχήμα).

#### **Καλλιέργεια-Διέγερση**

Τα κύτταρα Kupffer που βρίσκονται πλέον αγκιστρωμένα στον πυθμένα του βοθρίου καλλιέργειας καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας DMEM εμπλουτισμένο με αντιβιοτικά και 10% FBS για 24 ώρες σε θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO<sub>2</sub>. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό (DMEM) αντικαθίσταται με νέο, που περιέχει αντιβιοτικά και δεν περιέχει ορρό εμβρύου μόσχου. Αφού τα κύτταρα επωαστούν για 4 ώρες, το θρεπτικό τους υλικό αντικαθίσταται με νέο DMEM (FBS-free) που περιέχει τις υπό διερεύνηση ουσίες.

## **Συλλογή Δειγμάτων**

**Συλλογή υπερκειμένου (μελέτη έκκρισης πρωτεΐνης εξωκυτάρια)**

Μετά από την παρέλευση του επιθυμητού χρόνου επώασης (0, 6, 12, 24, 48 h) των κυττάρων με την παρουσία ή όχι των υπό διερεύνηση ουσιών, το υπερκείμενο καλλιέργειας συλλέγεται, υφίσταται φυγοκέντρηση υπό συνθήκες 700g, 10 min, 4°C για να καθιζάνουν τα αιωρούμενα κυτταρικά συσσωματώματα και μοιράζονται σε 2 ή περισσότερα μέρη ( $\leq 1$  ml) τα οποία αποθηκεύονται σε υπερκατάψυξη ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) μέχρι τη μέτρησή τους.

**Συλλογή κυτταρικού πληθυσμού με Trizol (μελέτη σε επίπεδο RNA-DNA) και με κυτταρόλυση (μελέτη σε επίπεδο πρωτεΐνης ενδοκυτάρια)**

Κατόπιν της λήψης του υπερκειμένου καλλιέργειας, τα προσκολλημένα στον πυθμένα του βοθρίου κύτταρα ομογενοποιούνται με 1 ml Trizol<sup>®</sup> ή με τη μέθοδο πρωτεϊνικής ομογενοποίησης και τα διαλύματα που προκύπτουν συλλέγονται σε στείρα μικροσωληνάρια και αποθηκεύονται σε υπερκατάψυξη ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) ως το χρόνο απομόνωσης ολικού RNA ή πρωτεϊνών, αντίστοιχα.

Σημειώνεται ότι το διάστημα που μεσολάβησε ως την επεξεργασία των δειγμάτων δεν υπερέβη τους 6 μήνες, ενώ τα ομογενοποιήματα και τα υπερκείμενα των κυττάρων του Kurpffer δεν υπέστησαν απόψυξη πλέον της μίας φορές.

## **2. ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ**

### **Πρωτογενής ανοσολογική απάντηση των κυττάρων του Kupffer**

#### **A. Βασική παραγωγή ινωτικών και αντί-ινωτικών παραγόντων.**

Εξετάσθηκε η έκκριση παραγόντων που επηρεάζουν την ίνωση από τα κύτταρα Kupffer. Οι καλλιέργειες απομονωμένων από αρουραίο κυττάρων του Kupffer σε θρεπτικό μέσο DMEM με αντιβιοτικά και 10% FBS, τέθηκαν σε πλάκες καλλιέργειας 6 βοθρίων, όπως έχει προαναφερθεί, σε πυκνότητα  $3 \times 10^6$  κυττάρων Kupffer / βοθρίο (2 ml DMEM), σε επωαστικό κλίβανο κυτταρικής καλλιέργειας (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Μετά την έλευση 24 ωρών, το υλικό καλλιέργειας αντικαθίσταται με νέο (DMEM FBS-free), ακολουθεί 4ωρη επώαση στις ίδιες συνθήκες και νέα αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού κατά την επίδραση των υπό διερεύνηση ουσιών. Τα υπερκείμενα των καλλιεργειών που συλλέχθηκαν από τα καλλιεργητικά βοθρία σε χρονικά διαστήματα 0, 6, 12, 24 και 48 ωρών, φυγοκεντρήθηκαν (10 min, 700g, 4°C) για την απομάκρυνση τυχόν κυτταρικών εναιωρημάτων και αποθηκεύθηκαν σε aliquots των 500μl σε υπερκατάψυξη (-70°C). Στα δείγματα αυτά μελετήθηκε ο παράγοντας μετασχηματισμού της ανάπτυξης (TGF-β1), ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (uPA), η MMP-1 (κολλαγενάση) και η παραγωγή λεπτίνης.

#### **B. Πρωτογενής ανοσολογική απάντηση των κυττάρων Kupffer. Η επίδραση της ενδοτοξίνης**

Τα κύτταρα Kupffer μελετήθηκαν σε *in vitro* καλλιέργειες με την παρουσία ενδοτοξίνης (LPS) στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Από προηγούμενες μελέτες καθορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση του LPS ως διεγέρτη επαρκούς ανοσολογικής απάντησης των κυττάρων Kupffer στο επίπεδο του 1 μg/ml (357).

Τα κύτταρα Kupffer καλλιεργούνται αρχικά σε καλλιεργητικές πλάκες 6 θέσεων (βοθρίων) σε πυκνότητα  $3 \times 10^6$  κύτταρα /βοθρίο για 24 ώρες με 2ml DMEM /βοθρίο εμπλουτισμένου αντιβιοτικών και 10% FBS σε περιβάλλον πλήρους υδρατμών, με 5% CO<sub>2</sub> και θερμοκρασία 37°C. Ακολουθούσε αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με ίσο όγκο DMEM χωρίς FBS και επώαση στις ίδιες συνθήκες για τέσσερις ώρες,

μετά το πέρας των οποίων το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με νέο DMEM χωρίς FBS που συμπεριελάμβανε ή όχι τη βέλτιστη συγκέντρωση του LPS (1μg/ml). Τα υπερκείμενα, RNA και ολική πρωτεΐνη συλλέγονταν σε διαστήματα 0, 6, 12, 24 και 48 ωρών. Ακολουθούσε η ανάλογη επεξεργασία για κάθε δείγμα και αποθήκευση σε κλάσματα σε υπερκατάψυξη (-70°C). Στο υπερκείμενο των καλλιιεργειών μελετήθηκε η παραγωγή από τα κύτταρα Kupffer παραγόντων που σχετίζονται με την ίνωση (TGF-β1, uPA, MMP-1 και λεπτίνη), ενώ στο επίπεδο γονιδιώματος, η έκφραση των γονιδίων της απόπτωσης.

### **Γ. Πρωτογενής ανοσολογική απάντηση των κυττάρων του Kupffer. Η επίδραση της οκτρεοτίδης.**

Η επίδραση του συνθετικού αναλόγου της σωματοστατίνης (οκτρεοτίδη) μελετήθηκε σε *in vitro* καλλιέργεια των κυττάρων του Kupffer. Από προηγούμενες μελέτες είχε καθοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση της οκτρεοτίδης στο επίπεδο του 1ng/ml (10<sup>-9</sup>g/ml) (357). Τα υπερκείμενα, το RNA και η ολική πρωτεΐνη συλλέγονταν σε διαστήματα 0, 6, 12, 24 και 48 ωρών. Ακολουθούσε η ανάλογη επεξεργασία για κάθε δείγμα και αποθήκευση σε κλάσματα σε υπερκατάψυξη (-70°C).

Η δράση της οκτρεοτίδης στην επαγόμενη από ενδοτοξίνη παραγωγή σχετιζομένων με την ίνωση παραγόντων μελετήθηκε υπό ίδιες συνθήκες με την παρουσία LPS (1μg/ml) με ή χωρίς οκτρεοτίδη στην προκαθορισμένη συγκέντρωση (1ng/ml). Στα συλλεγθέντα δείγματα (υπερκείμενα, RNA, πρωτεΐνη) εξετάστηκε η παραγωγή από τα κύτταρα Kupffer παραγόντων που σχετίζονται με την ίνωση (TGF-β1, uPA, MMP-1 και λεπτίνη), ενώ στο επίπεδο γονιδιώματος, η έκφραση των γονιδίων της απόπτωσης.

### **Δ. Ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτογενούς ανοσολογικής απαντήσεως παραγόντων που ενέχονται στην ίνωση.**

Οι σχετιζόμενοι με την ίνωση παράγοντες, TGF-β1, uPA, MMP-1 και λεπτίνη μελετήθηκαν στο υπερκείμενο καλλιιεργείας κυττάρων του Kupffer από αρουραίο με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA). Χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα kit και εφαρμόστηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Στον πίνακα 5 αναφέρεται η

προέλευση, η ειδικότητα και ευαισθησία των kit καθώς και οι αραιώσεις των υπό μελέτη δειγμάτων του υπερκειμένου των καλλιιεργειών.

**Πίνακας 5:** Ειδικότητα και ευαισθησία των ανοσοενζυμικών ELISA.

<b>ELISA</b>	<b>Μόριο σύνδεσης</b>	<b>Ευαισθησία</b>	<b>Αραίωση</b>	<b>Προέλευση kit</b>
<b>Leptin</b>	Φυσικό και ανασυνδυασμένο μόριο αουραίου	<41 pg/ml	OXI	Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA
<b>TGF-β1</b>	Φυσικό και ανασυνδυασμένο μόριο αουραίου	1,9 ng/L	NAI (1:12)	Immundiagnostik, Bensheim, Germany
<b>uPA</b>	Φυσικό μόριο uPA (ενεργότητα)	< 0,05 U	OXI	Chemicon, Temecula, CA, USA
<b>MMP-1</b>	Φυσικά μόρια MMP-1 (ενεργότητα)	< 5 ng/ml	NAI (1:30)	Chemicon, Temecula, CA, USA



### **3. ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ**

#### Απομόνωση RNA ομογενοποιημάτων σε διάλυμα φαινόλης (Trizol)

Τα ομογενοποιημένα σε Trizol δείγματα λαμβάνονται από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  και αποψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου για  $\sim 15$  min. Προστίθεται χλωροφόρμιο υπό στείρες συνθήκες σε αναλογία 0,1ml/ml Trizol, το δείγμα υφίσταται ισχυρή ανάδευση ( $\sim 30$  sec) και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση υπό 12000g για 15 λεπτά σε θερμοκρασία  $4^{\circ}\text{C}$ .

Η φυγοκέντρηση βοηθά τα βαρεια συστατικά να καθιζάνουν (πρωτεΐνες, DNA) με τη φαινόλη, ενώ το RNA παραμένει διαλυμένο στο χλωροφόρμιο, το οποίο σχηματίζει άχρωμο υπερκείμενο (άνω φάση) και μεταφέρεται σε νέο (RNase-Free) μικροσωληνάριο. Στο διάλυμα αυτό προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης ( $\sim 500\mu\text{l}$ ) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για σύντομο χρόνο ( $\sim 10\text{sec}$ ) και αφήνεται να σχηματίσει ίζημα (15 min, RT). Ακολουθεί φυγοκέντρηση υπό 12000g για 15 λεπτά σε θερμοκρασία  $4^{\circ}\text{C}$ , μετά από την οποία είναι ορατός ο σχηματισμός ιζήματος. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και ακολουθεί έκπλυση με 1ml κρύας ( $4^{\circ}\text{C}$ ) αιθανόλης 75% (κ.ο.) σε RNase Free  $\text{H}_2\text{O}$ . Ακολουθεί φυγοκέντρηση υπό 7000g για 8 λεπτά σε θερμοκρασία  $4^{\circ}\text{C}$ , αφαίρεση του υπερκειμένου και επανάληψη. Μετά από την απομάκρυνση του υπερκειμένου, το σχηματισμένο λευκόφαιο ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε απαγωγό και επαναδιαλύεται σε 20μl RNase Free  $\text{H}_2\text{O}$ .

#### Μέτρηση καθαρότητας RNA

Ακολουθεί η μέτρηση καθαρότητας του RNA στο δείγμα με τη χρήση φωτομέτρου το οποίο έχει ρυθμιστεί να μετρά σε δύο μήκη κύματος το λόγο 260/280nm. Ο λόγος αυτός προσδιορίζει την περιεκτικότητα του δείγματος σε RNA (260nm) και πρωτεΐνης (280nm) με ιδανική τιμή το λόγο 2. Το προς εξέταση δείγμα διαλύεται σε 0.1M NaOH το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί για να μηδενιστεί το φωτόμετρο. Διαλύονται συνολικά 2μl δείγματος RNA σε 1ml 0.1M NaOH. Η απορρόφηση του δείγματος μετράται και το αποτέλεσμα αντιστοιχίζεται στο μαθηματικό τύπο υπολογισμού του βάρους του RNA (260nm).

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

$A_{260nm}$  η απορρόφηση του δείγματος στα 260nm

$\Phi$  ο συντελεστής αραίωσης [= 500 (2μl δείγματος σε 1000μl NaOH)]

$V$  ο όγκος του εναπομείναντος διαλύματος σε ml [= 0,018]

### **Επίδραση με DNase**

Κατόπιν του υπολογισμού της καθαρότητας (λόγος 260/280nm) και του βάρους του RNA που εμπεριέχεται στο δείγμα, ακολουθεί η επεξεργασία με DNase για την αποδόμηση του DNA που εμπεριέχεται σ' αυτό.

Σε προσημειωμένα μικροσωληνάρια όγκου 0,2ml (microependorfs) με την ένδειξη (+ =με μεταγραφάση) και (- =χωρίς μεταγραφάση) , εισάγεται όγκος δείγματος που αντιστοιχεί σε 1μg RNA και ο όγκος του συμπληρώνεται στα 8μl με RNase Free H<sub>2</sub>O. Σε κάθε δείγμα (+ και -) προστίθενται αρχικά 1μl 10xDNase I Reaction Buffer και έπειτα 1μl DNase. Τα δείγματα αφήνονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα προστίθεται επιπλέον 1μl από το διάλυμα 25mM EDTA. Ακολουθεί τοποθέτηση των microependorfs στο θερμικό κυκλοποιητή και υφίστανται θερμική επεξεργασία για 10 λεπτά στους 65°C, με τη λήξη της οποίας τοποθετούνται σε πάγο (4°C) και προστίθενται σε καθένα δείγμα 2μl ολιγονουκλεοτιδίου με 12 έως 18 μόρια Θυμίνης (Pd(T)<sub>12-18</sub>) το οποίο δρα επικουρικά στην έναρξη της διαδικασίας ανάστροφης μεταγραφής (reverse transcription). Τα μίγματα επανατοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή και θερμαίνονται στους 70°C για 10 λεπτά, χρόνος μετά τον οποίον επανατοποθετούνται σε πάγο (4°C).

### **Ανάστροφη Μεταγραφή**

Ακολουθεί προσθήκη σε κάθε δείγμα:

4μl 5x RT-buffer

1μl DTT

1μl dNTPs

1μl RNAsin

Τέλος, στο δείγμα με την ένδειξη (+) προστίθεται 1μl ενζύμου (reverse transcriptase), ενώ αντ' αυτού, στο δείγμα (-) προστίθεται ίσος όγκος RNase Free H<sub>2</sub>O, ελέγχοντας

μ' αυτόν τον τρόπο τυχόν μόλυνση των υπό διερεύνηση δειγμάτων για επιμόλυνση με DNA. Τα δείγματα τοποθετούνται στον κυκλοποιητή και ξεκινά η διαδικασία της ανάστροφης μεταγραφής σε θερμοκρασία 42°C για 60 min, έπειτα στους 95°C για 5 min και τέλος στους 4°C, έως την έναρξη της multiplex PCR.

#### ***Πολλαπλή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Multiplex PCR)***

Για την ανίχνευση των γονιδίων της απόπτωσης (bcl-2, bcl-xL, bcl-xS, bax και LICE) στο ανασυνδυασμένο DNA (cDNA) αρουραίου που απέδωσε η προηγούμενη αντίδραση, χρησιμοποιείται η πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με εμπορικά διαθέσιμους primers (Multiplex PCR<sup>®</sup> kit, Biosource, Camarillo, CA, USA) - για τα προαναφερθέντα γονίδια. Οι primers αυτοί είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να συμπίπτουν τα σημεία ζέσεως και προσδέσεώς τους, δίνοντας με τον τρόπο αυτό τη δυνατότητα να συμπεριλαμβάνονται σε ένα μείγμα (MPCR Primers) περισσότεροι του ενός forward (5'-3') και reverse (3'-5') ζεύγη primers.

#### ***Η έκφραση αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών γονιδίων***

Η έκφραση προ-αποπτωτικών (bax, bcl-xS), αντί-αποπτωτικών γονιδίων (bcl-2, bcl-xL) καθώς και η έκφραση στο γονιδιακό επίπεδο της κασπάσης 3 (LICE), μελετήθηκαν με ειδικό kit ανίχνευσης αυτών με Multiplex PCR. Τα συλλεχθέντα σε Trizol ομογενοποιημένα (διεγερμένων και μη) κυττάρων μετά από καθαρισμό, επίδραση με DNase, ανάστροφη μεταγραφή (για μετατροπή σε ανασυνδυασμένο DNA), υφίστανται PCR με σκοπό την ανίχνευση της έκφρασης των ανωτέρω 5 γονιδίων. Ως γονιδιακός μάρτυρας στη διαδικασία, χρησιμοποιείται το GAPDH το οποίο εκφράζεται στον αρουραίο. Στον κατωτέρω πίνακα, αναφέρεται αναλυτικά το σημείο ζέσεως (Tm) του κάθε primer καθώς και το μέγεθος του γονιδιακού προϊόντος.

**Πίνακας 6:** Οι Primers ανίχνευσης της αποπτώσεως σε αρουραίο.

<b>Όνομα Primer</b>	<b>Μόριο-Στόχος</b>	<b>Tm</b>	<b>Μέγεθος Προϊόντος</b>
rAPO2G-LICE	Rat LICE	66 °C, 70 °C	320 bp
rAPO2G-BCL2	Rat bcl-2	70,7 °C, 71 °C	235 bp
rAPO2G-BAX	Rat Bax	70 °C, 70 °C	272 bp
rAPO2G-BCLXS	Rat bcl-xS	69 °C, 70 °C	183 bp
rAPO2G-BCLXL	Rat bcl-xL	69 °C, 70 °C	371 bp
rAPO2G-BAC	Rat GAPDH	66 °C, 68,8 °C	532 bp

### Παρασκευή Μείγματος Αντίδρασης Multiplex PCR

Παρασκευάζεται μείγμα για τη Multiplex PCR, το οποίο περιλαμβάνει τα εξής:

	<b>Διάλυμα Stock</b>	<b>ποσότητα / δείγμα προς διερεύνηση</b>
Μείγμα dNTP	3,12 mM	0,5 μl
MPCR buffer + Mg <sup>2+</sup>	10x	2,5 μl
MPCR Primers	10x	2,5 μl
RNAse Free H <sub>2</sub> O		15,25 μl
Taq DNA Polymerase	5 U/μl	0,25 μl

Το μείγμα μοιράζεται σε νέα microependorfs σε καθένα εκ των οποίων προστίθεται 1 μl δείγματος (+) ή (-) ή Control cDNA, εκτός στείρας απαγωγού σε θερμοκρασία 4°C.

Τα microependorfs τοποθετούνται στις ειδικές υποδοχές του θερμικού κυκλοποιητή και γίνεται εκκίνηση του προγράμματος:

Συνθήκες Multiplex PCR:

	<b>Στάδιο</b>	<b>Θερμοκρασία</b>	<b>Χρονική Διάρκεια</b>	<b>Κύκλοι</b>
•	Προθέρμανση	96°C	1 λεπτό	
•	Μετουσίωση	96°C	1 λεπτό	2
•	Σύνδεση	59°C	4 λεπτά	
•	Μετουσίωση	94°C	1 λεπτό	33
•	Σύνδεση	59°C	2,5 λεπτά	
•	Τελικό	70°C	10 λεπτά	

Ακολουθεί συντήρηση των προϊόντων στους 4° C ως την ανίχνευσή τους σε πήκτωμα αγαρόζης.

Κατόπιν ανίχνευσης των προϊόντων της Multiplex PCR σε πηκτή αγαρόζης, η έκφραση των γονιδίων ποσοτικοποιήθηκε σε μονάδες οπτικής πυκνότητας με την χρήση συστήματος ψηφιακής φωτογράφησης (Gel-doc 2000™, BioRad, Hercules, CA, USA) και ανάλυσης (Quantiscan™, Biosoft, Cambridge, UK) – ο λόγος της έκφρασης του γονιδίου προς την έκφραση του GAPDH.

*Ανίχνευση των προϊόντων της Multiplex PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.*

Παρασκευάζεται 2% (κ.β.) πηκτή αγαρόζης σε 0,5x TBE (2g αγαρόζης σε 100ml για μεσαίου μεγέθους πήκτωμα). Το μείγμα τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων για να επιτευχθεί η ομοιογενής διάλυσή του και προ της έγχυσης στο ειδικό δοχείο πήξεως (με χτένι) προστίθενται 40μl διαλύματος ethidium bromide (1mg/ml). Μετά την πήξη του, αφαιρείται από το πήκτωμα το χτένι, έχοντας σχηματίσει βοθρία / θέσεις όπου θα εισέλθουν τα δείγματα προς διερεύνηση, και το σύστημα τοποθετείται στη συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Παράλληλα, ετοιμάζεται η κλίμακα μοριακού βάρους DNA (100bp) ως εξής:

1μl από το stock διάλυμα 100bp ladder (Gibco)

7μl 1 x TBE

3μl διαλύματος ανάμειξης δείγματος (μπλε υγρό)

Σε καθένα εκ των προϊόντων της Multiplex PCR προστίθεται διάλυμα ανάμειξης δείγματος σε αναλογία 5:1 και 10μl από το καθένα εισέρχεται στο βοθρίο που έχει σχηματιστεί από το χτένι στο πήκτωμα της αγαρόζης. Το gel ηλεκτροφορεύεται σε 0.5x TBE στα 100V για 90 min. Η ανίχνευση των δεσμών γονιδιακού σήματος (bands) είναι εφικτή υπό υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Σε αυτό το σημείο το πήκτωμα φωτογραφίζεται ηλεκτρονικά και οι δέσμες αντιστοιχίζονται στο ανάλογο γονίδιο με τη βοήθεια της κλίμακας μοριακού βάρους και ως πρότυπο το θετικό cDNA που παρέχεται από το kit.

#### **4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ**

Οι προκύπτουσες τιμές των αποτελεσμάτων των πειραμάτων *in vitro* εκφράζονται ως η μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα στα υπερκείμενα και γονίδια που μελετήθηκαν, όπως αυτά προέκυψαν από 12 πειράματα απομόνωσης / καλλιέργειας κυττάρων του Kupffer.

Η στατιστική επεξεργασία περιελάμβανε τις μεθόδους: Oneway-ANOVA με LSD post hoc ανάλυση για τη σύγκριση μεταβλητών, διακυμαινομένων συναρτήση του χρόνου Student-t για ανεξάρτητες μεταβλητές χωρίς διακύμανση, ενώ κατά περίπτωση χρησιμοποιήθηκε και Paired Student t Test, για τον έλεγχο της δίπλευρης στατιστικής σημαντικότητας  $P$  στα αποτελέσματα. Η τιμή του  $P < 0,05$  ελήφθη ως το όριο σημαντικότητας. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα Microsoft<sup>®</sup> Excel version 2002 και Microcal<sup>™</sup>Origin<sup>™</sup> version 5.0.

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## 1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑΤΑ BRADFORD

Τα κύτταρα Kupffer μετά από καλλιέργεια με και χωρίς διεγέρτες (LPS, Octreotide) συλλέχθηκαν για ολική πρωτεΐνη μετά από 24 και 48 ώρες. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7: Μέτρηση Ολικής πρωτεΐνης κατά Bradford.

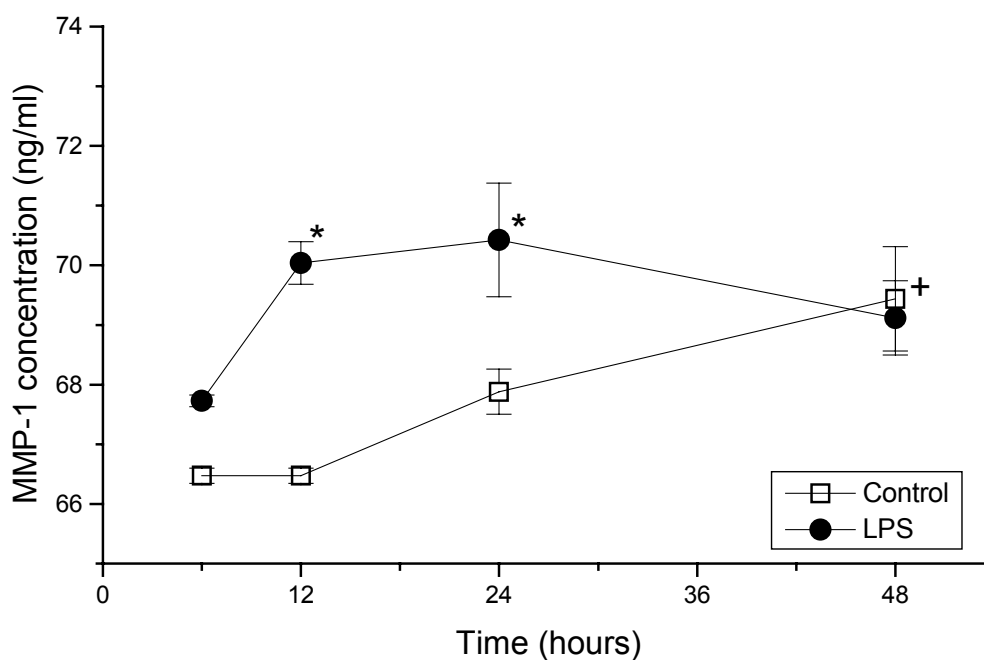
ΔΙΕΓΕΡΣΗ	OD (595nm)	Συγκέντρωση Ολικής Πρωτεΐνης (μg/ml)
CONTROL 24 h	0,7455	177,1
LPS 24 h	0,806	209,8
OCT 24 h	0,8075	210,6
LPS/OCT 24 h	0,8345	225,2
CONTROL 48 h	0,777	194,1
LPS 48 h	0,857	237,4
OCT 48 h	0,8775	248,5
LPS/OCT 48 h	0,8795	249,6

Τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι δεν υφίσταται μείωση του αριθμού των κυττάρων του Kupffer κατά την βραχυχρόνια καλλιέργεια.

## 2. ΠΡΩΤΟΓΕΝΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΚΥΡΦΦΕΡ. Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΝΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙ-ΙΝΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ.

### Α. Έκκριση κολλαγενάσης (MMP-1)

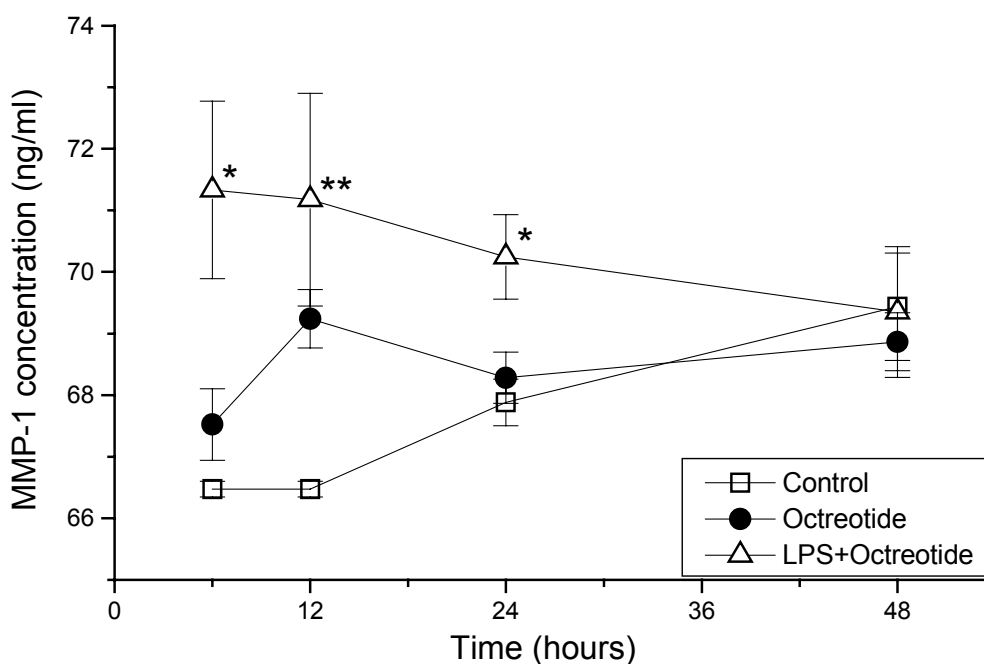
Τα αδιέγερτα κύτταρα Kupffer βρέθηκε ότι εκφράζουν μεγάλη ποσότητα MMP-1, η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική στις 48 ώρες (Γράφημα 2,  $P < 0,02$ ). Η διέγερση με LPS προκάλεσε πρόωμη αύξηση της παραγωγής της MMP-1 στις 12 και 24 ώρες σε σχέση με τα αδιέγερτα κύτταρα (Γράφημα 2, 12 ώρες  $P < 0,02$ , 24 ώρες  $P < 0,02$ ), που όμως δεν συνεχίσθηκε στις 48 ώρες, καταδεικνύοντας ότι η παρουσία του LPS επήγαγε την πρόωμη επαγωγή της παραγωγής της MMP-1 από τα κύτταρα Kupffer. Η



**Γράφημα 2:** Η παραγωγή κολλαγενάσης (MMP-1) από τα κύτταρα του Kupffer μετά από διέγερση με LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο  $\pm$  το στατιστικό σφάλμα 12 μετρήσεων. Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως <sup>+</sup> για  $P < 0.02$  μεταξύ των 6 και 48 ωρών και ως \*  $P < 0.02$  σε σχέση με τις τιμές των αδιέγερτων κυττάρων.

επώαση με οκτρεοτίδη είχε παρόμοιο αποτέλεσμα επάγοντας ελαφρά την αύξηση της παραγωγής της MMP-1 στις 12 ώρες η οποία όμως δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (Γράφημα 3). Ο συνδυασμός LPS και οκτρεοτίδης είχε συνεργιστική δράση που οδήγησε σε παρατεταμένη επαγωγή της παραγωγής MMP-1 από τα κύτταρα του Kupffer από τις 6 έως και τις 24 ώρες μετά τη διέγερση η οποία ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τα αδιέγερτα κύτταρα Kupffer ή τη διέγερση με την οκτρεοτίδη (Σχήμα 6,  $P < 0,01$  στις 6 ώρες,  $P < 0,004$  στις 12 ώρες και  $P < 0,03$  στις 24 ώρες). Δεν βρέθηκαν διαφορές στις 48 ώρες μετά τη διέγερση (Γράφημα 3).

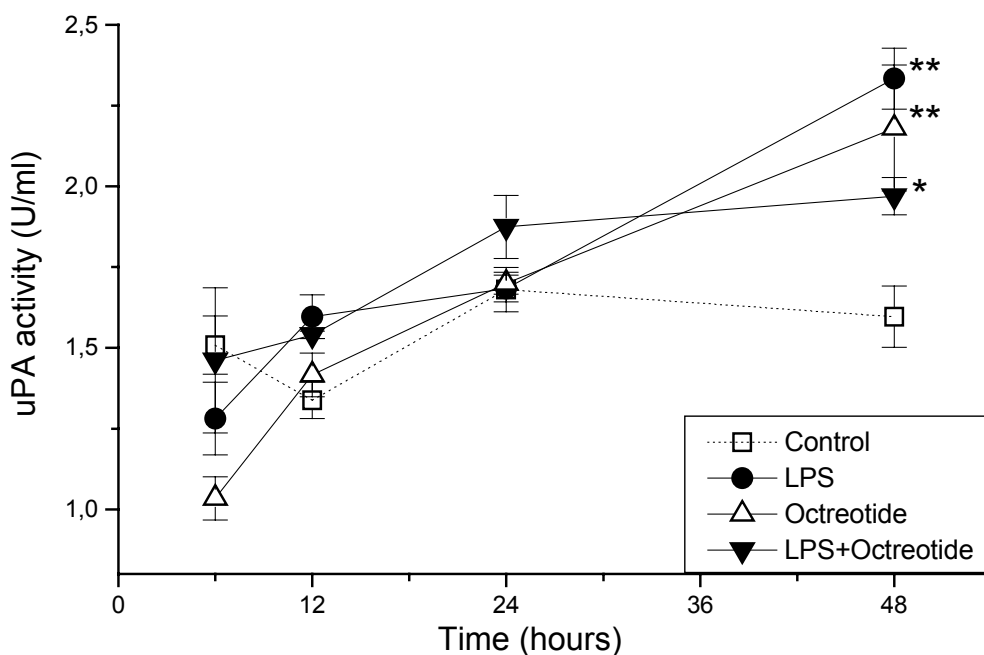




**Γράφημα 3:** Η παραγωγή κολλαγενάσης (MMP-1) από κύτταρα Kupffer που έχουν διεγερθεί είτε με οκτρεοτίδη (1 ng/ml), ή με συνδυασμό οκτρεοτίδης με 1 μg/ml LPS. Το κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ± το στατιστικό σφάλμα 12 διαφορετικών μετρήσεων. \* και \*\*: Βλέπε κείμενο για τις τιμές των P.

## B. Παραγωγή uPA

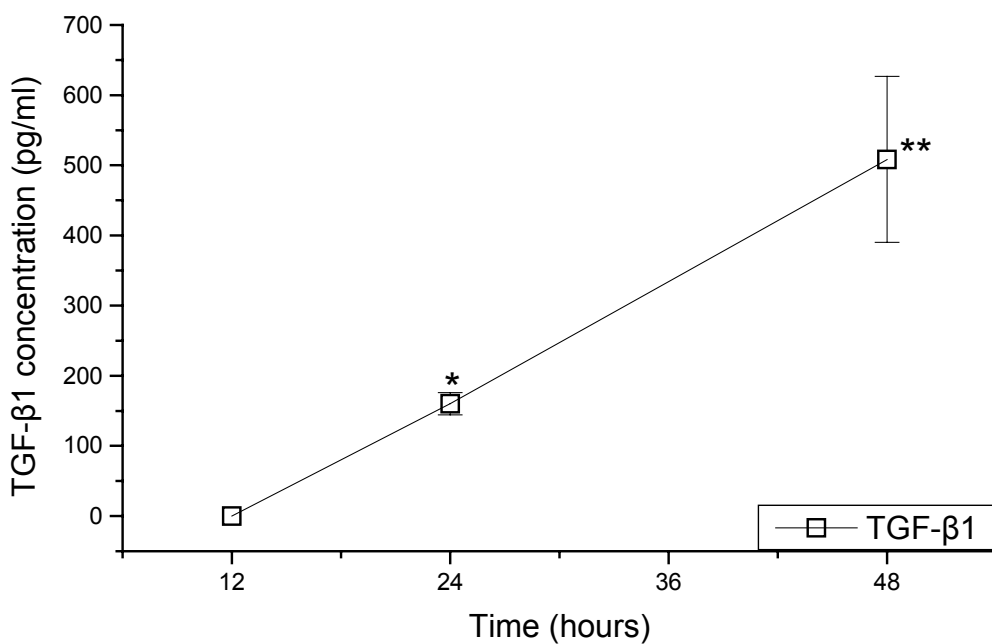
Τα αδιέγερτα κύτταρα Kupffer παράγουν βασική ποσότητα uPA η οποία είναι σταθερή στη διάρκεια των 48 ωρών. Η διέγερση με LPS ή οκτρεοτίδη επάγει την αύξηση της παραγωγής uPA και φτάνει σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα στις 48 ώρες (Γράφημα 4,  $P < 0,001$ ). Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν με το συνδυασμό οκτρεοτίδης και LPS στα οποία παράγονται αυξημένα επίπεδα uPA, που γίνονται στατιστικώς σημαντικά 48 ώρες μετά τη διέγερση (Γράφημα 4,  $P < 0,003$ ). Ο συνδυασμός οκτρεοτίδης και LPS επάγει την παραγωγή uPA φτάνοντας σε στατιστικώς σημαντική διαφορά στις 48 ώρες (Γράφημα 4,  $P < 0,03$ ).



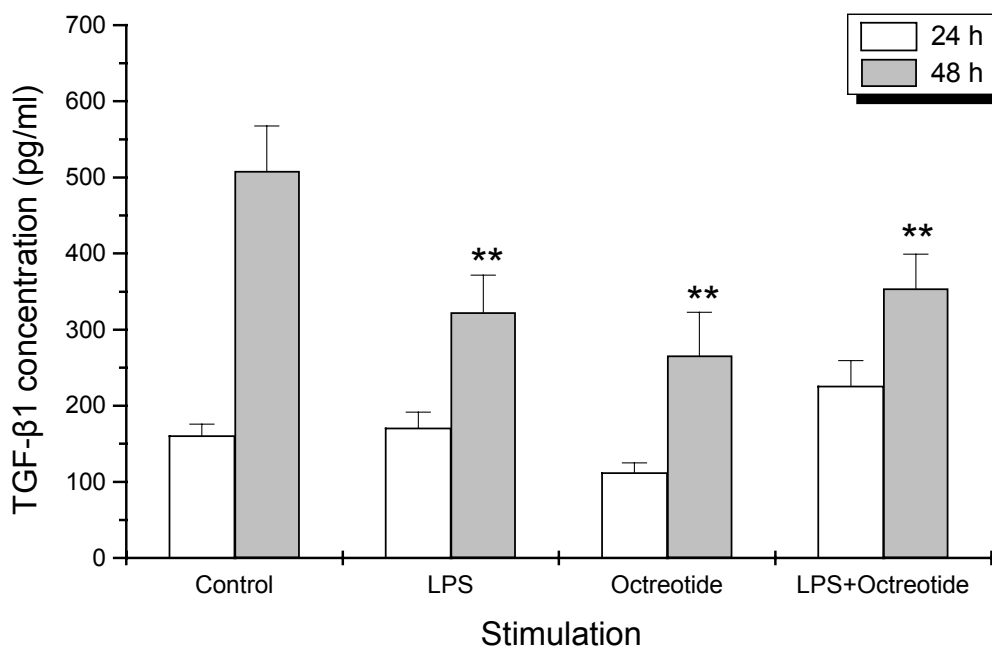
**Γράφημα 4:** Η παραγωγή του uPA που παράγεται από τα κύτταρα Kupffer στο υπερκείμενο καλλιέργειών προ και μετά από επώαση με LPS και οκτρεοτίδη. Τα αποτελέσματα είναι παρόμοια όταν διεγερθούν με οκτρεοτίδη ή/και με LPS. Το κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο  $\pm$  το στατιστικό σφάλμα 12 διαφορετικών μετρήσεων. Οι αστερίσκοι συμβολίζουν τη στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τις τιμές της ομάδας ελέγχου (αδιέγερτα κύτταρα). Βλέπε κείμενο για τις τιμές των P.

### Γ. Παραγωγή TGF- $\beta$ 1

Τα αδιέγερτα κύτταρα Kupffer παράγουν υψηλή ποσότητα TGF- $\beta$ 1 η οποία αυξάνεται κατά τη διάρκεια των 48 ωρών και η οποία είναι εμφανής 12 ώρες μετά την επώαση (Γράφημα 5,  $P < 0,05$  στις 24 ώρες και  $P < 0,0003$  στις 48 ώρες). Η παρουσία LPS και οκτρεοτίδης, είτε μεμονωμένων είτε σε μεταξύ τους συνδυασμό, αναστέλλει σημαντικά την αρχική παραγωγή TGF- $\beta$ 1 από τα κύτταρα του Kupffer στις 48 ώρες (Γράφημα 6,  $P < 0,01$ ).



**Γράφημα 5:** Η παραγωγή TGF-β1 από αδιέγερτα κύτταρα Kupffer σε συνάρτηση με το χρόνο. . Το κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ± το στατιστικό σφάλμα 12 διαφορετικών μετρήσεων. Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως \* για  $P < 0.05$  και \*\* για  $P < 0.003$  σε σχέση με τις τιμές στις 12 ώρες από τη διέγερση.



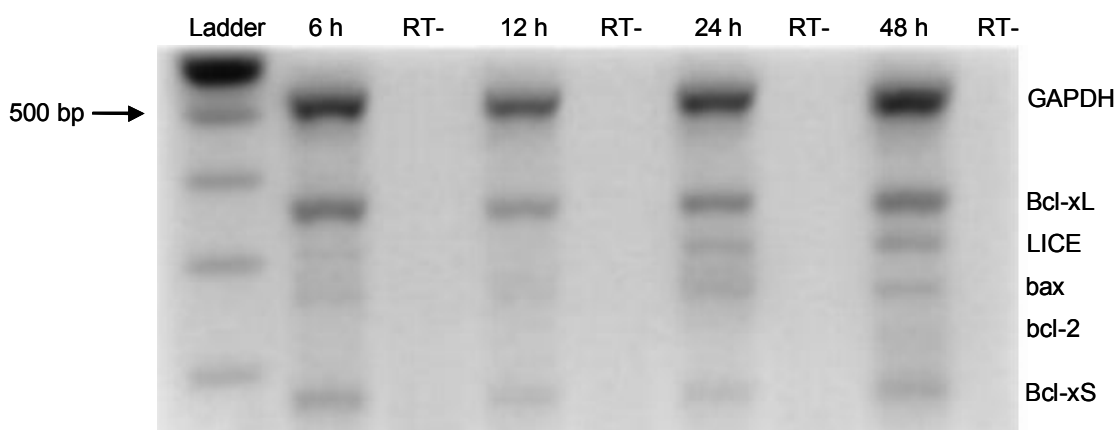
**Γράφημα 6:** Η παραγωγή TGF-β1 από τα κύτταρα Kupffer 24 και 48 ώρες μετά την επώαση με LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) ή/και οκτρεοτίδη (1  $\text{ng/ml}$ ). Το κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ± το στατιστικό σφάλμα 12 διαφορετικών μετρήσεων. Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως \*\* για  $P < 0.01$  σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

#### **Δ. Παραγωγή λεπτίνης**

Τα κύτταρα Kupffer δεν παρήγαγαν λεπτίνη πριν ή μετά από τη διέγερσή τους με LPS, οκτρεοτίδη ή τον συνδυασμό αυτών.

### 3. ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ.

Τα αδιέγερτα κύτταρα Kupffer βρέθηκε ότι εκφράζουν αποπτωτικά γονίδια (Εικόνα 30). Η έκφραση των γονιδίων *bax* και *bcl-xS* βρέθηκε να αυξάνεται σε σχέση με το χρόνο ως τις 48 ώρες (Γράφημα 7α και 8α). Τα ευρήματα αυτά συνοδεύτηκαν από αύξηση της έκφρασης της κασπάσης 3 (Γράφημα 9α). Είναι ενδιαφέρον ότι μετά από 48 ώρες τα κύτταρα Kupffer εξέφρασαν για πρώτη φορά το αντιαποπτωτικό γονίδιο *bcl-2* (Γράφημα 10α).



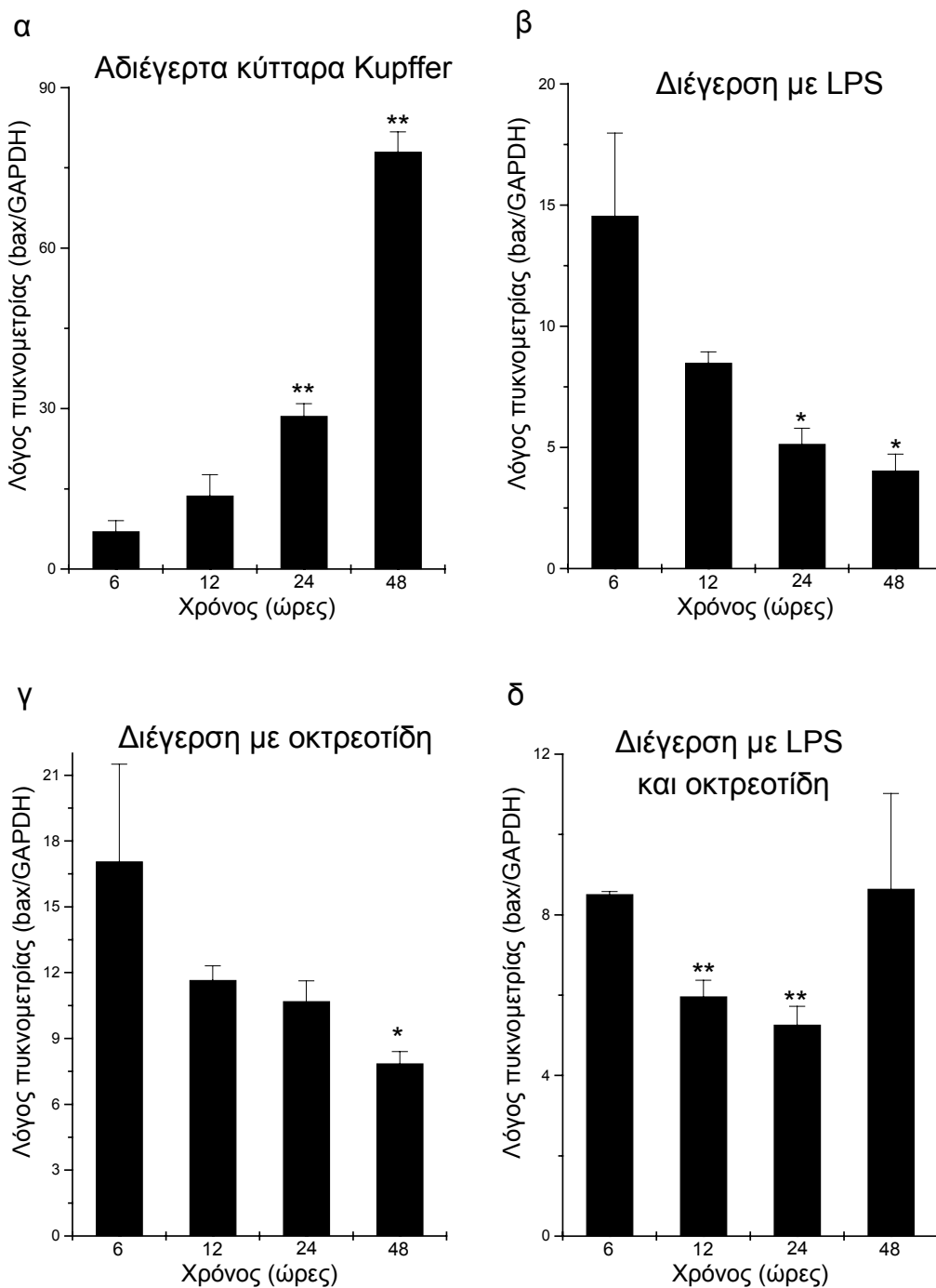
**Εικόνα 30:** Αποτελέσματα mPCR: Έκφραση αποπτωτικών γονιδίων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, από αδιέγερτα κύτταρα Kupffer εντός 48 ωρών. Η έκφραση του γονιδίου *bcl-2* είναι ορατή στις 48 ώρες.

Η διέγερση με LPS προκάλεσε αναστολή της έκφρασης των γονιδίων *bax* και *bcl-xS* η οποία ήταν αυξημένη στις 12, 24 και 48 ώρες. (Γραφήματα 7β και 8β, αντίστοιχα). Η έκφραση του αντιαποπτωτικού γονιδίου *bcl-xL* παρέμεινε χωρίς αλλαγή (Γράφημα 11β), ενώ το γονίδιο *bcl-2* σταμάτησε να εκφράζεται στις 48 ώρες (Γράφημα 10β). Το γονίδιο LICE (κασπάση 3) επέδειξε μειωμένη έκφραση σε σχέση με το χρόνο (Γράφημα 9β).

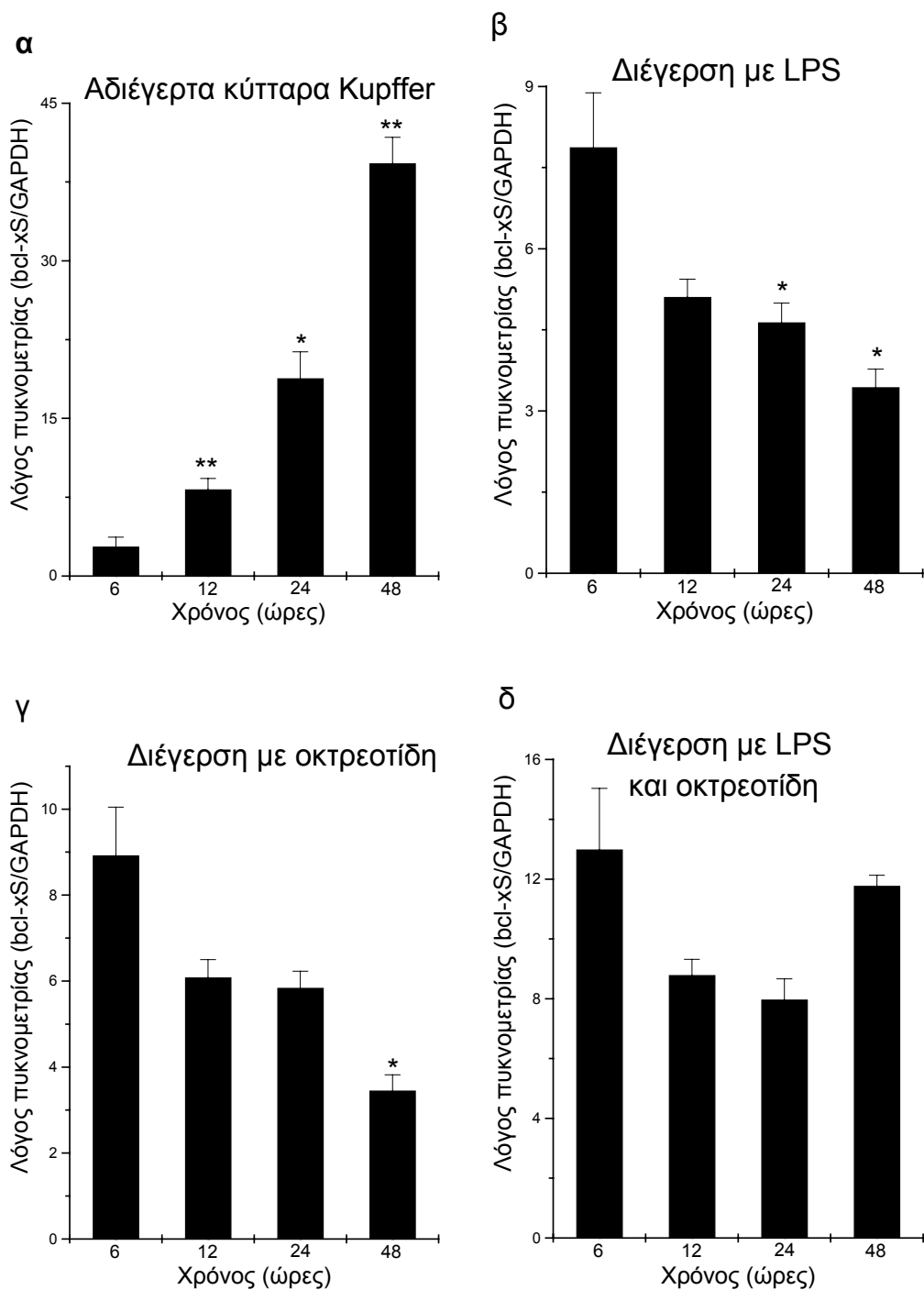
Η διέγερση με οκτρεοτίδη έδειξε να δρα με διαφορετικό τρόπο στην έκφραση των αποπτωτικών γονιδίων από τα κύτταρα του Kupffer, αναλόγως της διάρκειας της έκθεσης των κυττάρων σε αυτήν. Η μελέτη στα δείγματα αυτά έδειξε ότι η διέγερση με οκτρεοτίδη προκάλεσε μείωση της έκφρασης των γονιδίων που προάγουν την απόπτωση (*bax* και *bcl-xS*, Γραφήματα 7γ και 8γ), η οποία σχετιζόταν με το χρόνο και συνοδευόταν από παρόμοια μείωση της έκφρασης του γονιδίου της κασπάσης 3

(Γράφημα 9γ). Παρατηρήθη επίσης πρόιμη επαγωγή της έκφρασης (στις 6 και 12 ώρες) του ανασταλτικού γονιδίου bcl-2 (Γράφημα 10γ), και καθυστερημένη χρονικά (24 και 48 ώρες) μείωση της έκφρασης του γονιδίου bcl-xL (Γράφημα 11γ).

Η διέγερση των κυττάρων του Kupffer με το συνδυασμό LPS και οκτρεοτίδης, έδειξε διαφοροποιημένη δράση της οκτρεοτίδης στην όψιμη έκφραση της αναστολής του γονιδίου bcl-xL καθώς και του γονιδίου του bcl-2 στις 12 ώρες (Γραφήματα 11δ και 10δ, αντίστοιχα). Η σύγκριση της συνδυασμένης (με LPS και οκτρεοτίδη) διέγερσης σε σχέση με την οκτρεοτίδη μόνη της, έδειξε παρόμοια συμπεριφορά στην αναστολή της έκφρασης των γονιδίων bax και bcl-xS, τα οποία προάγουν την απόπτωση (Σχήματα 7δ και 8δ, αντίστοιχα), με εξαίρεση την όψιμη χρονικά (48 ώρες) αύξηση και των δύο. Με παρόμοιο τρόπο, η έκφραση του γονιδίου της κασπάσης 3 εμφανίζεται μειωμένη στις 6, 12 και 24 ώρες, ενώ αυξάνεται στις 48 ώρες (Γράφημα 9δ).

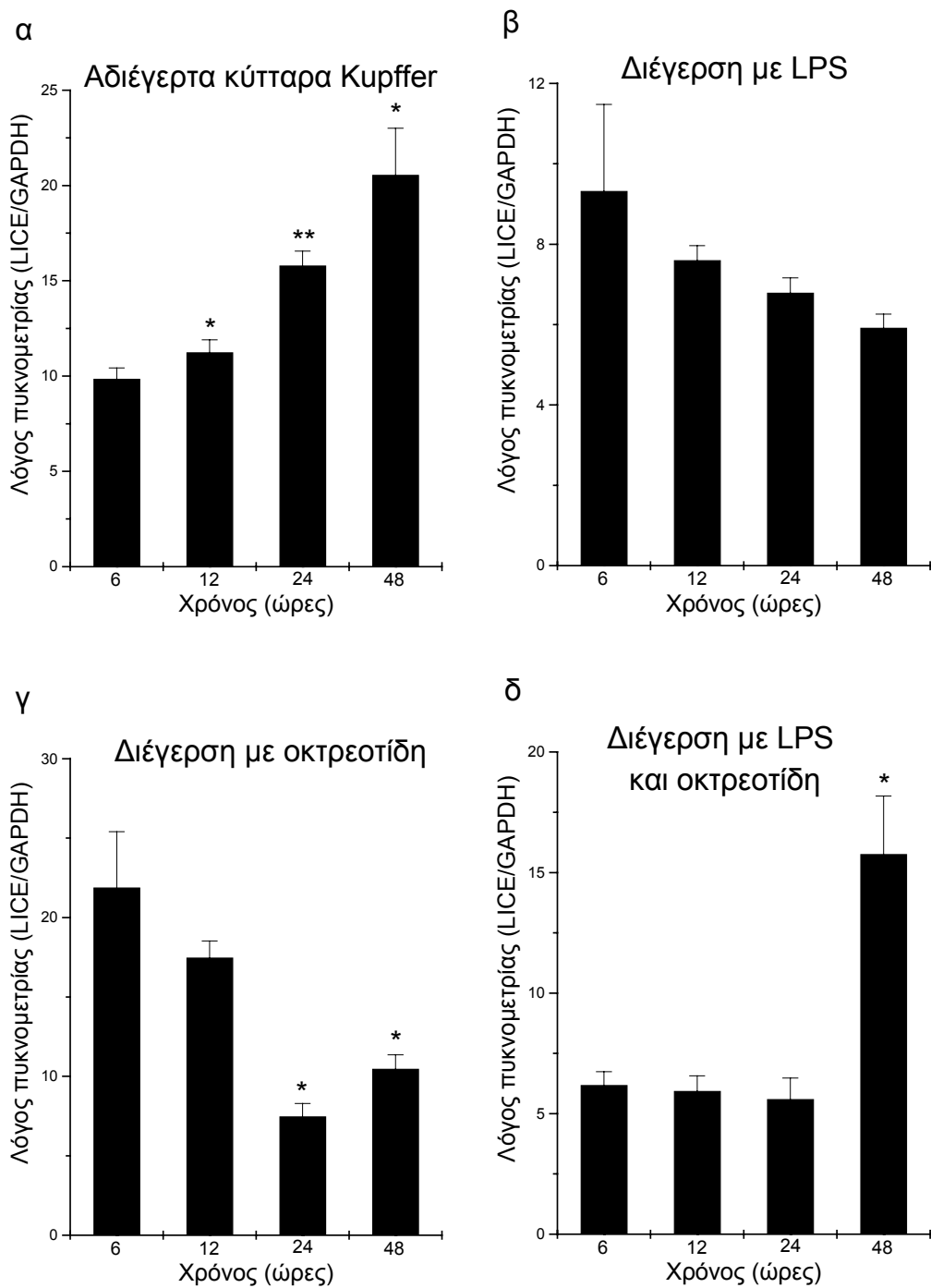


**Γραφήματα 7α-7δ:** Πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων mPCR για την έκφραση του γονιδίου bax από τα κύτταρα του Kupffer. Οι μετρήσεις έχουν εκφρασθεί ως ο λόγος του bax προς το housekeeping γονίδιο (GAPDH). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± στατιστικό σφάλμα, και είναι ενδεικτικά 12 συνολικά μετρήσεων. Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως \* για  $P < 0.05$  και \*\* για  $P < 0.01$  σε σύγκριση την έκφραση στις 6 ώρες.

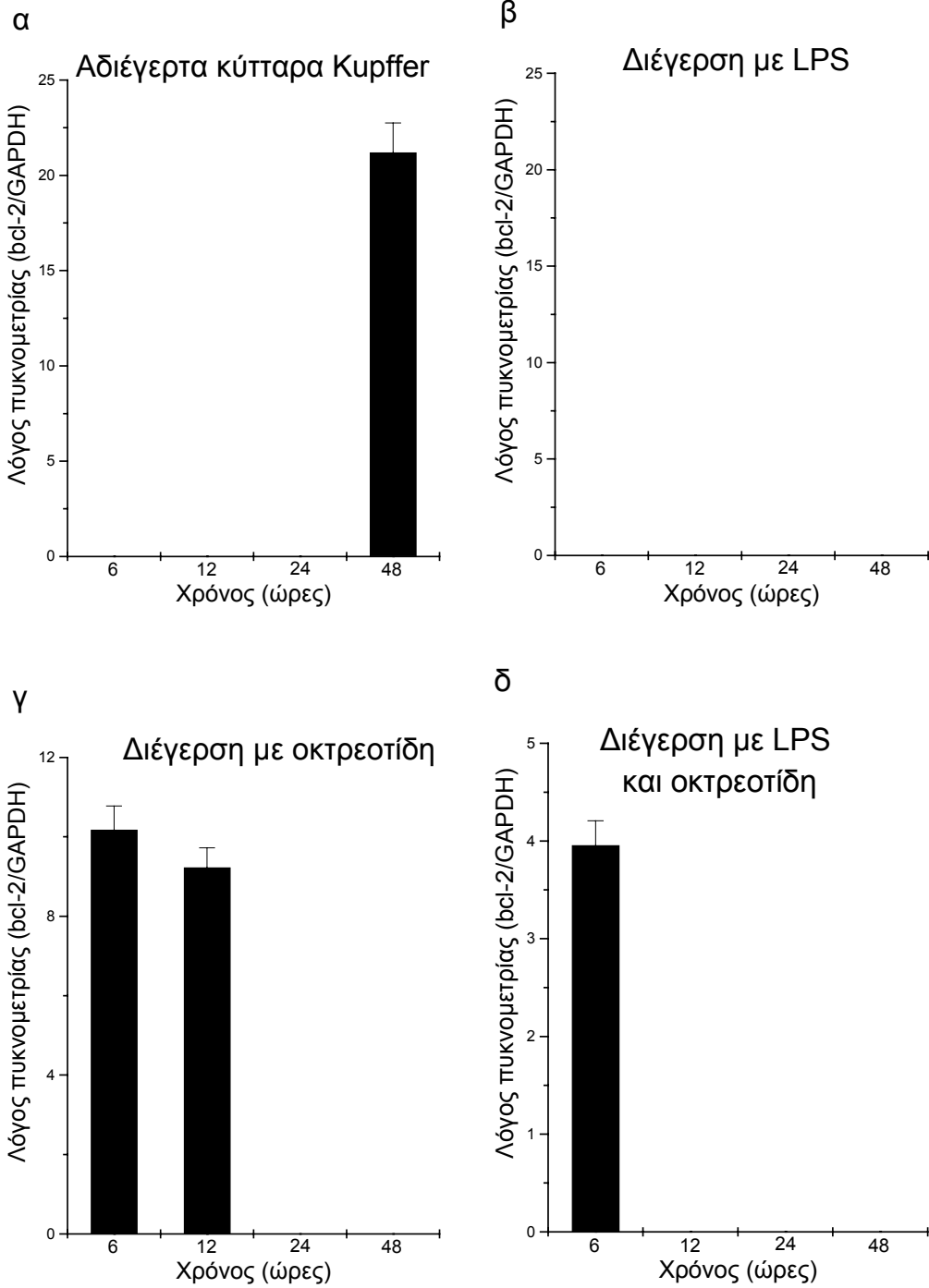


**Γραφήματα 8α-8δ:** Πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων mPCR για την έκφραση του γονιδίου bcl-xS από τα κύτταρα του Kupffer. Οι μετρήσεις έχουν εκφρασθεί ως ο λόγος του bcl-xS προς το housekeeping γονίδιο (GAPDH). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± στατιστικό σφάλμα, και είναι ενδεικτικά 12 συνολικά μετρήσεων. Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως \* για  $P < 0.05$  και \*\* για  $P < 0.01$  σε σύγκριση με την έκφραση στις 6 ώρες.

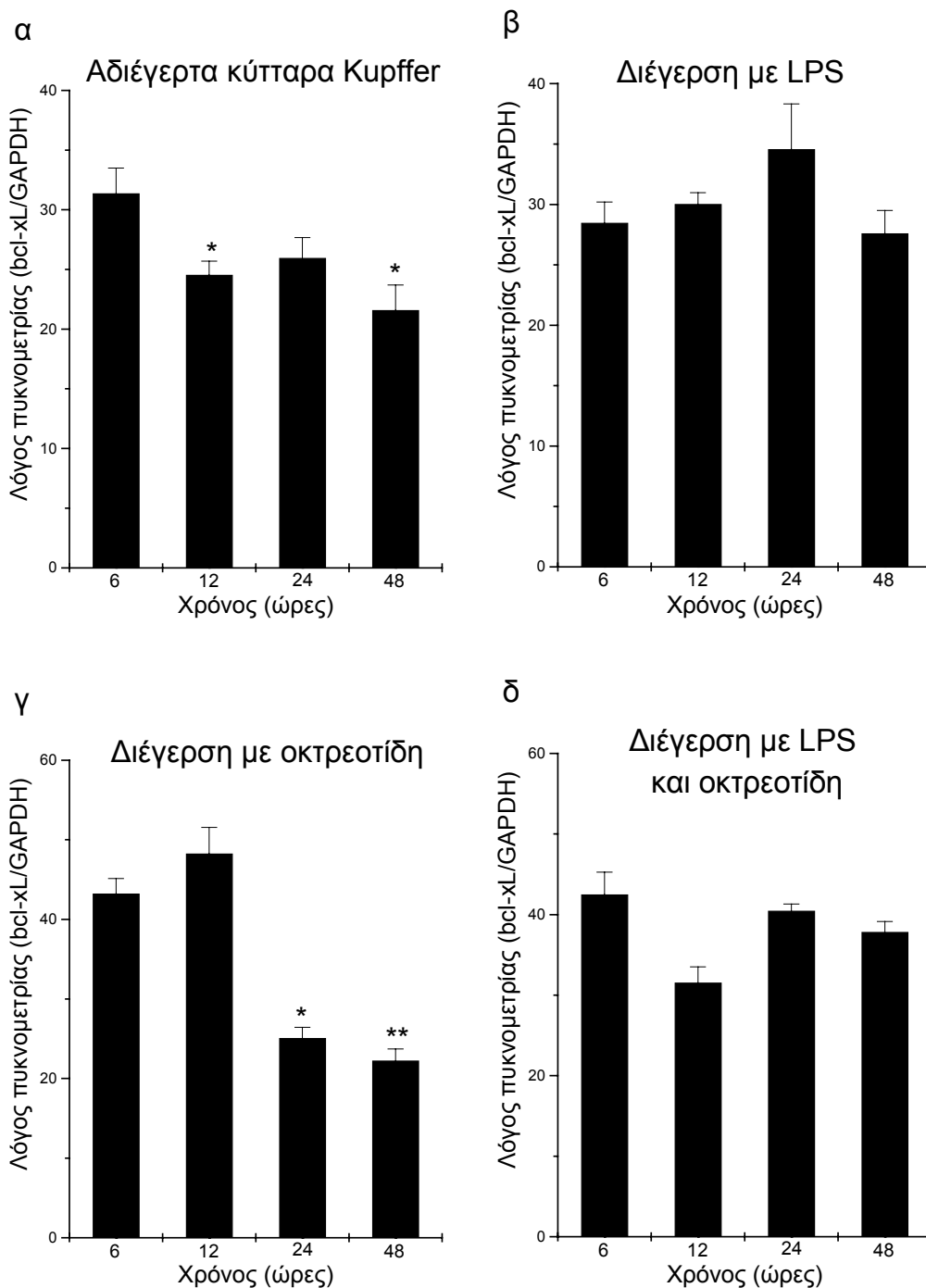




**Γραφήματα 9α-9δ:** Πικνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων mPCR για την έκφραση του γονιδίου LICE (Κασπάση 3) από τα κύτταρα του Kupffer. Οι μετρήσεις έχουν εκφρασθεί καταστεί ως ο λόγος του LICE προς το housekeeping γονίδιο (GAPDH). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± στατιστικό σφάλμα, και είναι ενδεικτικά 12 συνολικά μετρήσεων. Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως \* για  $P < 0.05$  και \*\* για  $P < 0.01$  σε σύγκριση με την έκφραση στις 6 ώρες.



**Γραφήματα 10α-10δ:** Πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων mPCR για την έκφραση του γονιδίου bcl-2 από τα κύτταρα του Kupffer. Οι μετρήσεις έχουν εκφρασθεί ως ο λόγος του bcl-2 προς το housekeeping γονίδιο (GAPDH). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  στατιστικό σφάλμα, και είναι ενδεικτικά 12 συνολικά μετρήσεων. Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως \* για  $P < 0.05$  και \*\* για  $P < 0.01$  σε σύγκριση με την έκφραση στις 6 ώρες.



**Γραφήματα 11α-11δ: Πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων *mPCR* για την έκφραση του γονιδίου *bcl-xL* από τα κύτταρα του Kupffer. Οι μετρήσεις έχουν εκφρασθεί ως ο λόγος του *bcl-xL* προς το housekeeping γονίδιο (*GAPDH*). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  στατιστικό σφάλμα, και είναι ενδεικτικά 12 συνολικά μετρήσεων. Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως \* για  $P < 0,05$  και \*\* για  $P < 0,01$  σε σύγκριση με την έκφραση στις 6 ώρες.**

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

### **A. Η επίδραση του συνθετικού αναλόγου της σωματοστατίνης (οκτρεοτίδη) και του LPS στην έκκριση παραγόντων που σχετίζονται με την ίνωση. Πρωτογενής ανοσολογική απάντηση των κυττάρων του Kupffer.**

Η ηπατική ίνωση είναι μια περίπλοκη διαδικασία στην οποία εμπλέκονται πολλά κύτταρα των κολποειδών του ήπατος. Συσχετισμοί που καθορίζονται από την νόσο υπάρχουν επίσης μεταξύ διαφόρων κυτταροκινών που παράγονται κυρίως από τα κύτταρα του ηπατικού κολποειδούς. Ο ρόλος του ενεργοποιητού του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης (urokinase-type Plasminogen Activator (uPA)) έχει διερευνηθεί διεξοδικά. Η πλασμίνη ενεργοποιεί την πρόωμη μορφή της Γελατινάσης Β (pro-MMP-9) σε ενεργό MMP-9 ένζυμο. Η πλασμίνη σχηματίζεται από το uPA στην παρουσία του πλασμινογόνου. Το uPA έχει αναφερθεί ότι παράγεται από τα κύτταρα του Ito (359).

Οι μεταλλοπρωτεάσες του διάμεσου ιστού (MMPs) και η δράση του uPA έχουν αναφερθεί ότι αυξάνονται κατά τα πρώιμα στάδια της ίνωσης (360). Όμως, στο στάδιο της κίρρωσης, τα αυξημένα επίπεδα του αναστολέα του πλασμινογόνου PAI-1 μαζί με τα μειωμένα επίπεδα uPA και tPA σχετίζονται με την καθολική αναστολή του καταβολισμού της εξωκυτταρίου ουσίας, ενώ η παραγωγή μεταλλοπρωτεασών είναι μειωμένη (361). Παρότι τα αστροκύτταρα του ήπατος (κύτταρα Ito) θεωρούνται ως σημαντική πηγή του PAI και των μεταλλοπρωτεασών κατά την ινόλυση του ήπατος (362), (270), έχει παρατηρηθεί ότι τα διεγερμένα κύτταρα του Kupffer εκκρίνουν μεταλλοπρωτεάσες. Έτσι, η επίδραση με gadolinium chloride επί των κυττάρων του Kupffer οδηγεί σε αυξημένη έκφραση MMP-13 και MMP-9 στο επίπεδο του mRNA και μερικώς αντιρροπούμενη ηπατική ίνωση που προκαλείται από επίδραση διμεθυλονιτροζαμίνης (363). Επιπλέον, έμμεσα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι τα κύτταρα του Kupffer παράγουν αντί-ινωτικούς παράγοντες και οι προσπάθειες να ανασταλεί η απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, ίσως οδηγούν σε μείωση της ινώσεως. (364;365). Τα κύτταρα του Kupffer έχουν σημαντικό ρόλο και στην ίνωση λόγω της παραγωγής του TGF-β, του HGF (366), (367), (368) και της παραγωγής του TNF-α καθώς και του νιτρικού οξειδίου τα οποία με τη σειρά τους

ενεργοποιούν τα κύτταρα του Ito (αστροκύτταρα) (284). Η απενεργοποίηση των κυττάρων του Kupffer αποδυναμώνει τη διαδικασία της ίνωσης, πιθανόν μέσω της μείωσης της παραγωγής TGF- $\beta$  (369).

Ο TGF- $\beta$  είναι μία ισχυρή ινογόνος κυτταροκίνη που παράγεται κυρίως από τα κύτταρα του Kupffer και εν μέρει από τα αστροκύτταρα του ήπατος (370). Στη φυσιολογικό και ινωτικό ήπαρ, το mRNA του TGF- $\beta$ 1 εκφράζεται κυρίως από τα κύτταρα του Kupffer, έχοντας τιμές που προσεγγίζουν τις 9-πλάσιες από αυτές των αστροκυττάρων (371).

Ένας άλλος παράγοντας που έχει πρόσφατα συσχετισθεί με την ίνωση είναι η λεπτίνη. Τελευταία ερευνητικά δεδομένα έχουν καταδείξει τη συμμετοχή της λεπτίνης στην ινωτική αντίδραση του ήπατος και έχουν αποδείξει ότι τα κύτταρα του Kupffer εμπεριέχουν υποδοχείς λεπτίνης (Ob-Rb), μέσω των οποίων η λεπτίνη ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση του διάμεσου ιστού, συμπεριλαμβανομένου και του TGF- $\beta$ 1 (372).

Στην παρούσα μελέτη, έχει διερευνηθεί η παραγωγή δύο ινωτικών (TGF- $\beta$ 1 και λεπτίνης) και δύο αντί-ινωτικών παραγόντων (MMP-1 και uPA) από απομονωμένα κύτταρα Kupffer αρουραίου πριν και μετά την επίδραση με λιποπολυσακχαρίδη (LPS). Επιπλέον, διερευνήθηκε η δράση της οκτρεοτίδης, του συνθετικού αναλόγου της φυσικής σωματοστατίνης, η οποία χρησιμοποιείται ευρύτατα στην καταστολή της κίρσορραγίας και στη θεραπεία του ηπατοκυτταρικού καρκίνου (373;374).

Τα ευρήματα της μελέτης αυτής, δείχνουν ότι τα κύτταρα του Kupffer δεν παράγουν λεπτίνη είτε αδιέγερτα είτε διεγερμένα με LPS. Όμως είναι σημαντική πηγή παραγωγής του TGF- $\beta$ 1 ακόμη και αδιέγερτα, εύρημα που έχει αναφερθεί και στο παρελθόν (366), (367), (368).

Η επίδραση με LPS είχε ως αποτέλεσμα την στατιστικώς σημαντική μείωση της παραγωγής TGF- $\beta$ 1, αλλά το πιο σημαντικό εύρημα της μελέτης ήταν η σημαντική μείωση που προκλήθηκε στην παραγωγή του TGF- $\beta$  από την επώαση με οκτρεοτίδη. Η δράση της οκτρεοτίδης στην απελευθέρωση του TGF- $\beta$  είναι μείζονος σημασίας.

Στα αποτελέσματα της μελέτης αυτής φαίνεται ότι η οκτρεοτίδη αναστέλλει την παραγωγή του TGF- $\beta$  τουλάχιστον στον αρουραίο και κατά συνέπεια, εάν το ίδιο καταδειχθεί και στα κύτταρα Kupffer του ανθρώπου, θα μπορούσε να καταστήσει την οκτρεοτίδη ως την εναλλακτική θεραπεία στη μείωση της ηπατικής ίνωσης.

Στη μελέτη αυτή, τα ευρήματα στη διαδικασία της παραγωγής κολλαγενάσης (MMP-1), σημαντικότετου ενζύμου στην αποσύνθεση του κολλαγόνου που έχει εναποτεθεί στο ήπαρ είναι πολύ σημαντικά. Η οκτρεοτίδη προκαλεί μια πρόιμη, σημαντική επαγωγή της παραγωγής κολλαγενάσης από τα κύτταρα του Kupffer και υπάρχει συνεργιστικό αποτέλεσμα όταν αυτή συνδυαστεί με τη δράση του LPS. Έχοντας υπόψη ότι η ενδοτοξιναιμία είναι ένα κοινό εύρημα στους κίρρωτικούς ασθενείς, τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η οκτρεοτίδη ίσως έχει ευεργετική δράση στην ηπατική ίνωση και με έτερο πλην της αναστολής του TGF- $\beta$ 1 μηχανισμό, αφού επηρεάζει εκλεκτικά την κολλαγονολυτική διαδικασία. Η οκτρεοτίδη επηρεάζει την παραγωγή MMP-1 από τα κύτταρα του Kupffer και το εύρημα αυτό είναι παρόμοιο με την προαναφερθείσα αύξηση της παραγωγής των MMP-13 και MMP-9 από τα κύτταρα του Kupffer που έπεται της επώασης με gadolinium chloride (375).

Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε επίσης σταθερή παραγωγή uPA από τα κύτταρα του Kupffer, η οποία ήταν σημαντικά ηυξημένη μετά την επώαση με LPS ή οκτρεοτίδη. Το uPA εμπλέκεται, όπως προανφέρθη, στην ενεργοποίηση της proMMP-9 σε MMP-9 μέσω της πλασμίνης (376). Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τη μελέτη αυτή καθώς η επίδραση του LPS προκαλεί αύξηση της παραγωγής του uPA και της MMP-9. Υπ' αυτά τα αποτελέσματα είναι δικαιολογημένο να εικάζεται ότι το uPA που παράγεται από τα κύτταρα του Kupffer εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της MMP-9, του σημαντικού αυτού ενζύμου στην αποδιάταξη της εξωκυτταρίου ουσίας. Όμως, η δράση της οκτρεοτίδης στην παραγωγή της MMP-9 είναι διαφορετική όταν συγκριθεί με αυτήν της MMP-1, καθώς η οκτρεοτίδη μειώνει την παραγωγή MMP-9 άσχετα από την αύξηση των επιπέδων του uPA. Η άμεση αναστολή της παραγωγής της MMP-9 ίσως να είναι η λύση που απαιτείται σε μελλοντικές μελέτες. Η MMP-9 εμπλέκεται στην μετάδοση των ηπατικών όγκων μέσω της καταστροφής του κολλαγόνου της βασικής μεμβράνης. Ως εκ τούτου, η δράση της οκτρεοτίδης ίσως εν

μέρει δύναται να εξηγήσει την αντίδραση της οκτρεοτίδης σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνο, όπως έχει στο παρελθόν αναφερθεί (373) (374).

Συμπερασματικά, τα ανωτέρω ευρήματα δείχνουν ότι ίσως ο ρόλος των κυττάρων του Kupffer επεκτείνεται όχι μόνο στην εναπόθεση εξωκυτταρίου ουσίας μέσω της υπερπαραγωγής TGF-β1, αλλά και στην ινόλυση μέσω της παραγωγής μεταλλοπρωτεασών του διάμεσου ιστού και uPA. Επιπλέον, η οκτρεοτίδη ίσως αποτελεί χρήσιμο θεραπευτικό μέσο για τη μείωση της ινώσεως στη νόσο του ήπατος και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

### **B. Η επίδραση του συνθετικού αναλόγου της σωματοστατίνης (οκτρεοτίδη) και του LPS στην έκφραση αποπτωτικών γονιδίων από τα κύτταρα του Kupffer.**

Τα κύτταρα Kupffer, ως μακροφάγα κύτταρα του ήπατος, έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και συμμετέχουν ενεργά στην αμυντική διαδικασία του οργανισμού κατά των ιών και των καρκινικών κυττάρων. Η ενεργοποίηση των κυττάρων του Kupffer εικάζεται ότι είναι ο κύριος μηχανισμός της αντικαρκινικής δράσης του ήπατος (377).

Πρώιμα πειραματικά δεδομένα έχουν καταδείξει ότι η οκτρεοτίδη, το συνθετικό ανάλογο της φυσικής σωματοστατίνης, αναστέλλει το ινωσάρκωμα και τις ηπατικές μεταστάσεις του αδενοκαρκινώματος (378;379;379). Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω με πειραματικά μοντέλα, συμπεριλαμβανομένου αυτού της επαγόμενης ηπατοκαρκινογένεσης με νιτροσομορφολίνη (380) και της συνεπώσεως σε ήπαρ αρουραίων κυττάρων ηπατώματος του Morris 3924A (381). Κατά το πρόσφατο παρελθόν, έχει αναφερθεί ότι η οκτρεοτίδη έχει βελτιώσει σημαντικά τη βιωσιμότητα ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (373) (374). Όμως ο τρόπος δράσης της οκτρεοτίδης παραμένει άγνωστος. Σε μία ενδιαφέρουσα μελέτη, εισήχθη νευροενδοκρινής πληθυσμός κυττάρων σε γυμνά ποντίκια τα οποία στη συνέχεια έλαβαν θεραπεία με οκτρεοτίδη και ιντερφερόνη-α. (382). Παρατηρήθηκε τριπλασιασμός των αποπτωτικών κυττάρων στην ομάδα που ελάμβανε οκτρεοτίδη, ενώ στην ομάδα που ελάμβανε ιντερφερόνη-α δεν υπήρξε μεταβολή. Η οκτρεοτίδη αναφέρθηκε ότι επάγει τη δράση των κυττάρων του Kupffer και η δράση της αυτή συνοδεύτηκε από τη σημαντική μείωση της ανάπτυξης

ηπατικών όγκων που είχαν προκληθεί πειραματικά (383;384). Φαίνεται ότι οιαδήποτε μεταβολή της απόπτωσης στα κύτταρα του Kupffer δύναται να επηρεάσει αυτή την αντικαρκινική τους δράση. Στην παρούσα μελέτη, μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών οι οποίες σχετίζονται με την απόπτωση σε απομονωμένα κύτταρα Kupffer, τα οποία καλλιιεργήθηκαν παρουσία LPS ή/ και οκτρεοτίδης. Ως δείκτης της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε η κασπάση-3 (LICE στον αρουραίο), ένζυμο σημαντικότερο στη ρύθμιση της αποπτωτικής διαδικασίας.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα αδιέγερτα κύτταρα Kupffer εκφράζουν στο επίπεδο του RNA τις αποπτωτικές πρωτεΐνες bax και bcl-xS, και ότι η έκφραση τους αυτή επαγόταν συνεχώς με το πέρασ του χρόνου. Η παρατήρηση αυτή ήταν αναμενόμενη λόγω της κλιμακούμενης αποπτώσεως που λαμβάνει χώρα φυσιολογικά στο σύστημα καλλιιεργείας. Επιπλέον, η αύξηση αυτή συνοδεύτηκε από παρόμοια επαγωγή στην έκφραση του LICE. Μετά από 48 ώρες καλλιιεργείας, εμφανίστηκε το αντιαποπτωτικό γονίδιο bcl-2 να έχει αυξημένη έκφραση, γεγονός που ίσως είναι ενδεικτικό της ικανότητας των κυττάρων του Kupffer να σταματούν την πρόοδο της αποπτωτικής διαδικασίας με την έκφραση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών. Στο σημείο αυτό απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

Η διέγερση των κυττάρων του Kupffer με λιποπολυσακχαρίδη, οδηγεί σε αναστολή της έκφρασης του RNA των αποπτωτικών πρωτεϊνών bax και bcl-xS και αυτό πιθανόν εξηγεί την αυξημένη δραστηριότητα των κυττάρων του Kupffer υπό αυτές τις συνθήκες, όπως έχει αναφερθεί (357;385;386). Η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη bcl-2, η οποία εμφανίστηκε στις 48 ώρες καλλιιεργείας αδιέγερτων κυττάρων Kupffer, δεν εμφανίστηκε μετά από την επίδραση με LPS. Η έκφραση του LICE βρέθηκε ελαφρώς μειωμένη στις 6, 12 και 24 ώρες, ενώ στις 48 ώρες παρατηρήθηκε σημαντική μείωση, δείχνοντας με αυτόν τον τρόπο ότι η επίδραση του LPS πιθανόν να μειώνει την απόπτωση στα κύτταρα Kupffer.

Το πιο ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας μελέτης της απόπτωσης στο επίπεδο του RNA είναι η επίδραση της οκτρεοτίδης επί των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση. Στο πρώιμο στάδιο της επώασης (στις 6 και 12 ώρες) παρατηρήθηκε επαγωγή της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2 ενώ η παρατεταμένη επώαση οδήγησε σε μείωση της έκφρασης των bcl-2 και bcl-xL. Αντιθέτως, η έκφραση στο επίπεδο



του RNA των αποπτωτικών bax και bcl-xS, έδειξε σταθερή μείωσή τους στο πέρασμα του χρόνου. Παρόμοια χρονοεξαρτώμενη μείωση παρουσίασε και η έκφραση του LICE υπό την επίδραση της οκτρεοτίδης. Τα αποτελέσματα αυτά ίσως αποτελούν μία ένδειξη ότι η αύξηση της δραστηριότητας των κυττάρων του Kupffer η οποία έχει αναφερθεί σε πειραματικά μοντέλα ηπατοκυτταρικού καρκίνου υπό την επίδραση της οκτρεοτίδης ίσως οφείλεται σε αυτήν ακριβώς την αντιαποπτωτική της δράση.

Τέλος, τα αποτελέσματα της συνδυασμένης επίδρασης με οκτρεοτίδη και LPS δείχνουν παρόμοια μείωση της έκφρασης του LICE στις 6, 12 και 24 ώρες. Η έκφραση του αντιαποπτωτικού bcl-xL παρέμεινε σταθερά σε υψηλά επίπεδα σε όλα τα χρονικά διαστήματα, γεγονός που ίσως είναι ενδεικτικό της, τουλάχιστον σε πρώιμη φάση, συνεργιστικής δράσης του LPS στην αναστολή της απόπτωσης από την οκτρεοτίδη. Όμως, σε αντίθεση με τη μεμονωμένη επίδραση του LPS ή της οκτρεοτίδης, εμφανίζεται αύξηση της έκφρασης του LICE στις 48 ώρες, πιθανόν λόγω της αυξημένης έκφρασης των bax και bcl-xS στον ίδιο χρόνο. Αυτό σημαίνει με κλινικούς όρους ότι στην ενδοτοξιναιμία (κοινό εύρημα σε ασθενείς σε τελικό στάδιο κίρρωσης του ήπατος ή ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα), η αντικαρκινική δράση της οκτρεοτίδης ίσως αμβλύνεται όταν η κατάσταση αυτή διαρκεί για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Όμως, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για να διασαφηνιστεί η περίπτωση αυτή.

Με βάση τα ανωτέρω, η οκτρεοτίδη προκαλεί μείωση της έκφρασης των αποπτωτικών πρωτεϊνών εντός διαστήματος 48 ωρών, που συνοδεύεται από πρώιμη επαγωγή της έκφρασης αντιαποπτωτικών γονιδίων. Τα αποτελέσματα αυτά ίσως εν μέρει εξηγούν την ευεργετική δράση της οκτρεοτίδης σε πειραματικά μοντέλα ηπατοκυτταρικού καρκίνου και στη θεραπεία καρκινοπαθών.

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Τα κύτταρα του Kupffer, ως μακροφάγα κύτταρα του ήπατος, έχουν σημαντικό ρόλο στην πρωτογενή ανοσολογική αντίδραση του ήπατος συμμετέχοντας ενεργά στην αμυντική διαδικασία κατά των ιών και των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά εμπλέκονται και στο μηχανισμό ινώσεως μέσω της παραγωγής μεταλλοπρωτεασών και TGF- $\beta$ . Ο ρόλος των κυττάρων του Kupffer στη διαδικασία της ινόλυσης παραμένει αδιευκρίνιστος, ενώ η ενεργοποίησή τους θεωρείται ως ο κύριος μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης του ήπατος.

Η οκτρεοτίδη, το συνθετικό ανάλογο της φυσικής σωματοστατίνης, χρησιμοποιείται ευρέως σε ασθενείς με ηπατική κίρρωση και θεωρείται ότι παρατείνει τη βιωσιμότητα των ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνο μέσω αδιευκρινίστου, έως σήμερα, μηχανισμού.

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε η παραγωγή δύο ινωτικών (TGF- $\beta$ 1 και λεπτίνης) και δύο αντι-ινωτικών (MMP-1 και uPA) παραγόντων, καθώς και η έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση, σε καλλιέργειες κυττάρων του Kupffer που απομονώθηκαν από ήπαρ αρουραίου υπό την επίδραση ενδοτοξίνης ή/ και οκτρεοτίδης.

Τα απομονωμένα κύτταρα Kupffer του αρουραίου επιβεβαιώθηκε ότι αποτελούν σημαντική πηγή TGF- $\beta$ 1, ενώ παράγουν MMP-1 και uPA, αλλά όχι λεπτίνη. Η επίδραση της ενδοτοξίνης μειώνει την παραγωγή του TGF- $\beta$ 1, ενώ το ίδιο συμβαίνει όταν στα κύτταρα επιδράσει η οκτρεοτίδη. Η οκτρεοτίδη προκαλεί σημαντική αύξηση της παραγωγής MMP-1 από τα κύτταρα του Kupffer και ο συνδυασμός της οκτρεοτίδης με την ενδοτοξίνη δρα συνεργιστικά στην παραγωγή MMP-1. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε επίσης σταθερή παραγωγή uPA από τα κύτταρα του Kupffer, η οποία ήταν σημαντικά ηυξημένη μετά την επώαση με LPS ή/ και οκτρεοτίδη.

Επιπλέον, η μελέτη σε μοριακό επίπεδο έδειξε ότι τα κύτταρα του Kupffer εκφράζουν αποπτωτικά γονίδια. Τα αδιέγερτα κύτταρα Kupffer εκφράζουν στο επίπεδο του RNA

τις αποπτωτικές πρωτεΐνες bax και bcl-xS, η έκφραση των οποίων αυξάνεται συνεχώς με το πέρασ του χρόνου και συνοδεύεται από επαγωγή στην έκφραση του LICE. Η επίδραση της ενδοτοξίνης προκάλεσε αναστολή της έκφρασης των γονιδίων bax και bcl-xS, ενώ η έκφραση του LICE εμφανίσθηκε μειωμένη σε σχέση με το χρόνο. Η επίδραση της οκτρεοτίδης έδειξε σταδιακή μείωση των αποπτωτικών γονιδίων η οποία συνοδεύθηκε από πρόιμη αύξηση και όψιμη μείωση των αντιαποπτωτικών γονιδίων bcl-2 και bcl-xL, με σταδιακή μείωση της έκφρασης του LICE. Ο συνδυασμός ενδοτοξίνης και οκτρεοτίδης είχε παρόμοιο αποτέλεσμα με εξαίρεση την όψιμη αύξηση της έκφρασης του LICE ίσως λόγω της χρονικά συμπίπτουσας αύξησης των αποπτωτικών γονιδίων bax και bcl-xS.

Συμπερασματικά, ο ρόλος των κυττάρων του Kupffer πιθανώς επεκτείνεται όχι μόνο στην εναπόθεση εξωκυτταρίου ουσίας μέσω της υπερπαραγωγής TGF-β1, αλλά και στην ινόλυση μέσω της παραγωγής μεταλλοπρωτεασών του διάμεσου ιστού και uPA. Επιπλέον, η οκτρεοτίδη ίσως αποτελεί χρήσιμο θεραπευτικό μέσο για τη μείωση της ινώσεως στη νόσο του ήπατος και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Στο μοριακό επίπεδο η επίδραση ενδοτοξίνης ή/ και οκτρεοτίδης δείχνουν να ανατρέπουν την αποπτωτική διαδικασία σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων του Kupffer, επηρεάζοντας την έκφραση και των αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών στο επίπεδο του mRNA. Τα ανωτέρω αποτελέσματα δείχνουν ότι η αντικαρκινική δράση της οκτρεοτίδης στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ίσως μπορεί να ερμηνευθεί από την αντιαποπτωτική της δράση επί των κυττάρων του Kupffer.

## **SUMMARY - CONCLUSIONS**

Kupffer cells, the resident liver macrophages, play an important role in the primary immune response of the liver by actively participating in the defense mechanism against viruses and cancer cells. Moreover, these cells are implicated in fibrosis through the production of matrix metalloproteinases and TGF- $\beta$ . The role of Kupffer cells in fibrolysis remains unclear, while Kupffer cell stimulation is considered the main mechanism of liver antitumour activity.

Octreotide, the synthetic analogue of somatostatin, is widely used as therapeutic agent in cirrhotic patients and it is considered to prolong survival in patients suffering from hepatocellular carcinoma, though an identified, as yet, mechanism.

In the present study, we investigated the production of two profibrotic (TGF- $\beta$ 1 and leptin) and two antifibrotic (MMP-1 and uPA) agents, as well as the expression of apoptotic proteins in rat liver isolated primary Kupffer cell cultures stimulated by lipopolysaccharide (LPS) and/ or octreotide.

We found that isolated rat Kupffer cells produce TGF- $\beta$ 1 and uPA, but not leptin. LPS stimulation reduces TGF- $\beta$ 1 production and the same effect occurs by octreotide stimulation. Octreotide causes a significant increase on MMP-1 production by Kupffer cells. The concomitant stimulation by LPS and octreotide acts synergistically on MMP-1 production. We also observed a constant uPA production by unstimulated Kupffer cells which was significantly induced following stimulation by LPS and/ or octreotide.

Moreover, mRNA studies revealed that Kupffer cells express apoptotic genes. Unstimulated Kupffer cells express bax and bcl-xS mRNA in a time dependent manner and this expression is paralleled by LICE. LPS stimulation inhibited the expression of proapoptotic bax and bcl-xS, while LICE expression showed a time-dependent reduction. Stimulation by octreotide showed a constant reduction of the proapoptotic gene expression which was accompanied by early induction and a late decrease on the expression of antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL genes with a constant

reduction of LICE. Concomitant stimulation by LPS and octreotide produced a similar result with the exception of early expression of LICE mRNA, which was probably due to the paralleled increase of the proapoptotic bax and bcl-xS.

In conclusion, Kupffer cells exceed their role not only to the extracellular matrix accumulation through the overproduction of TGF- $\beta$ 1, but also to fibrolysis by producing matrix metalloproteinases and uPA. Moreover, octreotide might be a useful therapeutic agent for reducing liver fibrosis, an issue which needs to be further investigated. Kupffer cell stimulation by LPS and/ or octreotide reverse the apoptotic process on the mRNA level, by influencing the proapoptotic and antiapoptotic protein expression. These results show that the antitumour activity of octreotide on patients with hepatocellular carcinoma may be due to its antiapoptotic activity on Kupffer cells.

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- (1) Afford S, Randhawa S. Apoptosis. *Mol Pathol* 2000; 53(2):55-63.
- (2) Zornig M, Hueber A, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1551(2):F1-37.
- (3) Geske FJ, Gerschenson LE. The Biology of Apoptosis. *Hum Pathol* 2001; 32(10):1029-1038.
- (4) Pan H, Yin C, Van Dyke T. Apoptosis and cancer mechanisms. *Cancer Surv* 1997; 29:305-327.
- (5) Ehlert JE, Kubbutat MH. Apoptosis and its relevance in cancer therapy. *Onkologie* 2001; 24(5):433-440.
- (6) Tsujimoto Y. Role of anti-apoptotic Bcl-2 protein in spinal muscular atrophy. *J Neural Transm Suppl* 2000;(58):41-52.
- (7) Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol* 2000; 1(6):469-474.
- (8) Thomson BJ. Viruses and apoptosis. *Int J Exp Pathol* 2001; 82(2):65-76.
- (9) Petit F, Corbeil J, Lelievre JD, Moutouh-de Parseval L, Pinon G, Green DR et al. Role of CD95-activated caspase-1 processing of IL-1beta in TCR-mediated proliferation of HIV-infected CD4(+) T cells. *Eur J Immunol* 2001; 31(12):3513-3524.
- (10) Orth M, Schapira AH. Mitochondria and degenerative disorders. *Am J Med Genet* 2001; 106(1):27-36.
- (11) Turner C, Schapira AH. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders and ageing. *Adv Exp Med Biol* 2001; 487:229-251.
- (12) Eldadah BA, Faden AI. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J Neurotrauma* 2000; 17(10):811-829.
- (13) Zhou JH, Broussard SR, Strle K, Freund GG, Johnson RW, Dantzer R et al. IL-10 inhibits apoptosis of promyeloid cells by activating insulin receptor substrate-2 and phosphatidylinositol 3'-kinase. *J Immunol* 2001; 167(8):4436-4442.
- (14) Mubagwa K, Flameng W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res* 2001; 52(1):25-39.
- (15) Cain K, Freathy C. Liver toxicity and apoptosis: role of TGF-beta1, cytochrome c and the apoptosome. *Toxicol Lett* 2001; 120(1-3):307-315.

- (16) Gastman BR. Apoptosis and its clinical impact. *Head Neck* 2001; 23(5):409-425.
- (17) Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandenabeele P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(3):356-370.
- (18) Zhang JH, Xu M. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res* 2000; 10(3):205-211.
- (19) Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 2001; 3(11):E255-E263.
- (20) Geske FJ, Monks J, Lehman L, Fadok VA. The role of the macrophage in apoptosis: hunter, gatherer, and regulator. *Int J Hematol* 2002; 76(1):16-26.
- (21) Denecker G, Vercammen D, Steemans M, Vanden Berghe T, Brouckaert G, Van Loo G et al. Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. *Cell Death Differ* 2001; 8(8):829-840.
- (22) Petak I, Houghton JA. Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy. *Pathol Oncol Res* 2001; 7(2):95-106.
- (23) Schlegel RA, Williamson P. Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ* 2001; 8(6):551-563.
- (24) Kasof GM, Lu JJ, Liu D, Speer B, Mongan KN, Gomes BC et al. Tumor necrosis factor-alpha induces the expression of DR6, a member of the TNF receptor family, through activation of NF-kappaB. *Oncogene* 2001; 20(55):7965-7975.
- (25) Antoku K, Maser RS, Scully WJ, Jr., Delach SM, Johnson DE. Isolation of Bcl-2 binding proteins that exhibit homology with BAG-1 and suppressor of death domains protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286(5):1003-1010.
- (26) Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 2000; 301(1):5-17.
- (27) Ranganath RM, Nagashree NR. Role of programmed cell death in development. *Int Rev Cytol* 2001; 202:159-242.
- (28) Seiffert BM, Vier J, Hacker G. Subcellular Localization, Oligomerization, and ATP-Binding of *Caenorhabditis elegans* CED-4. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290(1):359-365.
- (29) Yang X, Chang HY, Baltimore D. Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 1998; 281(5381):1355-1357.
- (30) Grutter MG. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* 2000; 10(6):649-655.

- (31) Hu Y, Ding L, Spencer DM, Nunez G. WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 1998; 273(50):33489-33494.
- (32) Jaroszewski L, Rychlewski L, Reed JC, Godzik A. ATP-activated oligomerization as a mechanism for apoptosis regulation: fold and mechanism prediction for CED-4. *Proteins* 2000; 39(3):197-203.
- (33) Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 2001; 26(1):61-66.
- (34) Goyal L. Cell death inhibition: keeping caspases in check. *Cell* 2001; 104(6):805-808.
- (35) Lauber K, Appel HA, Schlosser SF, Gregor M, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. The adapter protein apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) is proteolytically processed during apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276(32):29772-29781.
- (36) Bratton SB, Walker G, Roberts DL, Cain K, Cohen GM. Caspase-3 cleaves Apaf-1 into an approximately 30 kDa fragment that associates with an inappropriately oligomerized and biologically inactive approximately 1.4 MDa apoptosome complex. *Cell Death Differ* 2001; 8(4):425-433.
- (37) Hisahara S, Takano R, Shoji S, Okano H, Miura M. Role of caspase-1 subfamily in cytotoxic cytokine-induced oligodendrocyte cell death. *J Neural Transm Suppl* 2000;(58):135-142.
- (38) Bleackley RC, Heibein JA. Enzymatic control of apoptosis. *Nat Prod Rep* 2001; 18(4):431-440.
- (39) Adams JD, Jr., Chang ML, Klaidman L. Parkinson's disease--redox mechanisms. *Curr Med Chem* 2001; 8(7):809-814.
- (40) Kumar S, Doumanis J. The fly caspases. *Cell Death Differ* 2000; 7(11):1039-1044.
- (41) Kim JW, Choi EJ, Joe CO. Activation of death-inducing signaling complex (DISC) by pro-apoptotic C-terminal fragment of RIP. *Oncogene* 2000; 19(39):4491-4499.
- (42) Kidd VJ, Lahti JM, Teitz T. Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11(3):191-201.
- (43) Adrain C, Slee EA, Harte MT, Martin SJ. Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem* 1999; 274(30):20855-20860.
- (44) Budd RC. Activation-induced cell death. *Curr Opin Immunol* 2001; 13(3):356-362.



- (45) Springer JE, Nottingham SA, McEwen ML, Azbill RD, Jin Y. Caspase-3 apoptotic signaling following injury to the central nervous system. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(4):299-307.
- (46) Bi B, Littlewood NK, Crispe IN. Cleavage of E2F-1-regulating proteins and activation of E2F-1 during CD95-induced death of thymocytes. *Immunology* 2001; 104(1):37-42.
- (47) McCarthy N, Mercer J, Bennett M. Apoptotic proteins. p53 and c-myc related pathways. *Cardiol Clin* 2001; 19(1):75-89, viii.
- (48) Razzaque MS, Ahsan N, Taguchi T. Role of apoptosis in fibrogenesis. *Nephron* 2002; 90(4):365-372.
- (49) Nucci C, Piccirilli S, Rodino P, Nistico R, Grandinetti M, Cerulli L et al. Apoptosis in the dorsal lateral geniculate nucleus after monocular deprivation involves glutamate signaling, NO production, and PARP activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278(2):360-367.
- (50) Holcik M, Gibson H, Korneluk RG. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* 2001; 6(4):253-261.
- (51) Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R et al. Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* 2001; 21(19):7551-7560.
- (52) Debatin KM. Cell death in T- and B-cell development. *Ann Hematol* 2001; 80 Suppl 3:B29-B31.
- (53) Juin P, Hueber AO, Littlewood T, Evan G. c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev* 1999; 13(11):1367-1381.
- (54) Honarpour N, Tabuchi K, Stark JM, Hammer RE, Sudhof TC, Parada LF et al. Embryonic neuronal death due to neurotrophin and neurotransmitter deprivation occurs independent of Apaf-1. *Neuroscience* 2001; 106(2):263-274.
- (55) Wakabayashi T, Karbowski M. Structural changes of mitochondria related to apoptosis. *Biol Signals Recept* 2001; 10(1-2):26-56.
- (56) Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(1):67-71.
- (57) Tsujimoto Y, Shimizu S. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* 2000; 7(12):1174-1181.
- (58) Pan Z, Bhat MB, Nieminen AL, Ma J. Synergistic movements of Ca(2+) and Bax in cells undergoing apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276(34):32257-32263.

- (59) Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D. Osteoblast apoptosis and bone turnover. *J Bone Miner Res* 2001; 16(6):975-984.
- (60) Shi Y. A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nat Struct Biol* 2001; 8(5):394-401.
- (61) Carmody RJ, Cotter TG. Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Rep* 2001; 6(2):77-90.
- (62) Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000; 69:217-245.
- (63) Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharm Acta Helv* 2000; 74(2-3):281-286.
- (64) Crispe IN, Dao T, Klugewitz K, Mehal WZ, Metz DP. The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol Rev* 2000; 174:47-62.
- (65) Mouawad R, Antoine EC, Khayat D, Soubrane C. Effect of endogenous interleukin-6 on Fas (APO-1/CD95) receptor expression in advanced melanoma patients. *Cytokines Cell Mol Ther* 2000; 6(3):135-140.
- (66) Muschen M, Rajewsky K, Kronke M, Kuppers R. The origin of CD95-gene mutations in B-cell lymphoma. *Trends Immunol* 2002; 23(2):75-80.
- (67) Morgan MJ, Thorburn J, Thomas L, Maxwell T, Brothman AR, Thorburn A. An apoptosis signaling pathway induced by the death domain of FADD selectively kills normal but not cancerous prostate epithelial cells. *Cell Death Differ* 2001; 8(7):696-705.
- (68) Bang S, Jeong EJ, Kim IK, Jung YK, Kim KS. Fas- and tumor necrosis factor-mediated apoptosis uses the same binding surface of FADD to trigger signal transduction. A typical model for convergent signal transduction. *J Biol Chem* 2000; 275(46):36217-36222.
- (69) Peter ME. The TRAIL DISCUSSION: It is FADD and caspase-8! *Cell Death Differ* 2000; 7(9):759-760.
- (70) Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 2000; 12(6):611-620.
- (71) Gomez-Angelats M, Cidlowski JA. Protein kinase C regulates FADD recruitment and death-inducing signaling complex formation in Fas/CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276(48):44944-44952.
- (72) Wu X, Deng Y. Bax and BH3-domain-only proteins in p53-mediated apoptosis. *Front Biosci* 2002; 7:d151-d156.
- (73) Wenzel J, Sanzenbacher R, Ghadimi M, Lewitzky M, Zhou Q, Kaplan DR et al. Multiple interactions of the cytosolic polyproline region of the CD95

ligand: hints for the reverse signal transduction capacity of a death factor. FEBS Lett 2001; 509(2):255-262.

- (74) Schultheiss U, Puschner S, Kremmer E, Mak TW, Engelmann H, Hammerschmidt W et al. TRAF6 is a critical mediator of signal transduction by the viral oncogene latent membrane protein 1. EMBO J 2001; 20(20):5678-5691.
- (75) Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA. TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. Nat Cell Biol 2001; 3(8):708-714.
- (76) Toman RE, Spiegel S, Faden AI. Role of ceramide in neuronal cell death and differentiation. J Neurotrauma 2000; 17(10):891-898.
- (77) Dorothee G, Ameyar M, Bettaieb A, Vergnon I, Echchakir H, Bouziane M et al. Role of Fas and granule exocytosis pathways in tumor-infiltrating T lymphocyte-induced apoptosis of autologous human lung-carcinoma cells. Int J Cancer 2001; 91(6):772-777.
- (78) Inagaki-Ohara K, Yada S, Takamura N, Reaves M, Yu X, Liu E et al. p53-dependent radiation-induced crypt intestinal epithelial cells apoptosis is mediated in part through TNF-TNFR1 system. Oncogene 2001; 20(7):812-818.
- (79) Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. Bone 2002; 30(2):340-346.
- (80) Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. Genome Biol 2001; 2(7):REVIEWS3009.
- (81) Gotz R. Regulation of neuronal cell death and differentiation by NGF and IAP family members. J Neural Transm Suppl 2000;(60):247-259.
- (82) Yang YL, Li XM. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. Cell Res 2000; 10(3):169-177.
- (83) Odoux C, Albers A, Amoscato AA, Lotze MT, Wong MK. TRAIL, FasL and a blocking anti-DR5 antibody augment paclitaxel-induced apoptosis in human non-small-cell lung cancer. Int J Cancer 2002; 97(4):458-465.
- (84) Srivastava RK. TRAIL/Apo-2L: Mechanisms and Clinical Applications in Cancer. Neoplasia 2001; 3(6):535-546.
- (85) Evan GI, Littlewood TD. The role of c-myc in cell growth. Curr Opin Genet Dev 1993; 3(1):44-49.
- (86) Klefstrom J, Kovanen PE, Somersalo K, Hueber AO, Littlewood T, Evan GI et al. c-Myc and E1A induced cellular sensitivity to activated NK cells involves cytotoxic granules as death effectors. Oncogene 1999; 18(13):2181-2188.

- (87) Cole MD, McMahon SB. The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene* 1999; 18(19):2916-2924.
- (88) Mandlekar S, Kong AN. Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis* 2001; 6(6):469-477.
- (89) Amati B, Dalton S, Brooks MW, Littlewood TD, Evan GI, Land H. Transcriptional activation by the human c-Myc oncoprotein in yeast requires interaction with Max. *Nature* 1992; 359(6394):423-426.
- (90) Wang Y, Sun Y. Insulin-like growth factor receptor-1 as an anti-cancer target: blocking transformation and inducing apoptosis. *Curr Cancer Drug Targets* 2002; 2(3):191-207.
- (91) Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, Sandberg C, Beckmann S, Bayer E et al. Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against. *Oncogene* 2000; 19(48):5477-5486.
- (92) Hockenbery DM. The bcl-2 oncogene and apoptosis. *Semin Immunol* 1992; 4(6):413-420.
- (93) Rupnow BA, Murtha AD, Alarcon RM, Giaccia AJ, Knox SJ. Direct evidence that apoptosis enhances tumor responses to fractionated radiotherapy. *Cancer Res* 1998; 58(9):1779-1784.
- (94) Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 2000; 256(1):50-57.
- (95) Wang GQ, Gastman BR, Wieckowski E, Goldstein LA, Rabinovitz A, Yin XM et al. Apoptosis-resistant mitochondria in T cells selected for resistance to Fas signaling. *J Biol Chem* 2001; 276(5):3610-3619.
- (96) Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15(22):2922-2933.
- (97) Marsden VS, Strasser A. Control of Apoptosis in the Immune System: Bcl-2, BH3-Only Proteins and More. *Annu Rev Immunol* 2002.
- (98) Baliga BC, Kumar S. Role of Bcl-2 family of proteins in malignancy. *Hematol Oncol* 2002; 20(2):63-74.
- (99) Esposti MD. The roles of Bid. *Apoptosis* 2002; 7(5):433-440.
- (100) Gross A. BCL-2 proteins: regulators of the mitochondrial apoptotic program. *IUBMB Life* 2001; 52(3-5):231-236.
- (101) Voehringer DW, Meyn RE. Redox aspects of Bcl-2 function. *Antioxid Redox Signal* 2000; 2(3):537-550.
- (102) Harris MH, Thompson CB. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ* 2000; 7(12):1182-1191.

- (103) Pacher P, Csordas G, Hajnoczky G. Mitochondrial  $Ca^{2+}$  signaling and cardiac apoptosis. *Biol Signals Recept* 2001; 10(3-4):200-223.
- (104) Gottlieb RA. Mitochondria: execution central. *FEBS Lett* 2000; 482(1-2):6-12.
- (105) Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome *seas*. *Trends Biochem Sci* 2001; 26(6):390-397.
- (106) Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1999; 1(1):5-15.
- (107) Goldman GH, McGuire SL, Harris SD. The DNA damage response in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 2002; 35(3):183-195.
- (108) Craig RW. MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* 2002; 16(4):444-454.
- (109) Shen Y, White E. p53-dependent apoptosis pathways. *Adv Cancer Res* 2001; 82:55-84.
- (110) Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281(5381):1317-1322.
- (111) Pruschy M, Rocha S, Zaugg K, Tenzer A, Hess C, Fisher DE et al. Key targets for the execution of radiation-induced tumor cell apoptosis: the role of p53 and caspases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 49(2):561-567.
- (112) van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998; 31(1):1-9.
- (113) Gottlieb RA. Mitochondria and apoptosis. *Biol Signals Recept* 2001; 10(3-4):147-161.
- (114) Vargas SO, Sampson BA, Schoen FJ. Pathologic detection of early myocardial infarction: a critical review of the evolution and usefulness of modern techniques. *Mod Pathol* 1999; 12(6):635-645.
- (115) Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 2000; 256(1):12-18.
- (116) Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 1999; 35(3):181-195.
- (117) Hingst O, Blottner S. Quantification of apoptosis (programmed cell death) in mammalian testis by DNA-fragmentation ELISA. *Theriogenology* 1995; 44(3):313-319.
- (118) Johnson DE. Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia* 2000; 14(9):1695-1703.

- (119) Counis MF, Torriglia A. DNases and apoptosis. *Biochem Cell Biol* 2000; 78(4):405-414.
- (120) Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995; 339(1):37-59.
- (121) Sgonc R, Gruber J. Apoptosis detection: an overview. *Exp Gerontol* 1998; 33(6):525-533.
- (122) Stadelmann C, Lassmann H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res* 2000; 301(1):19-31.
- (123) Sharma K, Wang RX, Zhang LY, Yin DL, Luo XY, Solomon JC et al. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther* 2000; 88(3):333-347.
- (124) Sgonc R, Wick G. Methods for the detection of apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105(4):327-332.
- (125) Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol* 2001; 38(2):179-193.
- (126) Jerome KR, Vallan C, Jaggi R. The tunel assay in the diagnosis of graft-versus-host disease: caveats for interpretation. *Pathology* 2000; 32(3):186-190.
- (127) Matsushita K, Wu Y, Qiu J, Lang-Lazdunski L, Hirt L, Waeber C et al. Fas receptor and neuronal cell death after spinal cord ischemia. *J Neurosci* 2000; 20(18):6879-6887.
- (128) Sanders EJ. Methods for detecting apoptotic cells in tissues. *Histol Histopathol* 1997; 12(4):1169-1177.
- (129) Bodey B, Bodey B, Jr., Siegel SE, Kaiser HE. Immunocytochemical detection of leukocyte-associated and apoptosis-related antigen expression in childhood brain tumors. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001; 39(1-2):3-16.
- (130) Dini L, Ruzittu MT, Falasca L. Recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Scanning Microsc* 1996; 10(1):239-251.
- (131) van Heerde WL, Robert-Offerman S, Dumont E, Hofstra L, Doevendans PA, Smits JF et al. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. *Cardiovasc Res* 2000; 45(3):549-559.
- (132) Matsumura H, Shimizu Y, Ohsawa Y, Kawahara A, Uchiyama Y, Nagata S. Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *J Cell Biol* 2000; 151(6):1247-1256.
- (133) Bouwens L, De Bleser P, Vanderkerken K, Geerts B, Wisse E. Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. *Enzyme* 1992; 46(1-3):155-168.

- (134) Sasse D, Spornitz UM, Maly IP. Liver architecture. *Enzyme* 1992; 46(1-3):8-32.
- (135) De Leeuw AM, Brouwer A, Knook DL. Sinusoidal endothelial cells of the liver: fine structure and function in relation to age. *J Electron Microscop Tech* 1990; 14(3):218-236.
- (136) Braet F, De Zanger R, Crabbe E, Wisse E. New observations on cytoskeleton and fenestrae in isolated rat liver sinusoidal endothelial cells. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10 Suppl 1:S3-S7.
- (137) Rieder H, Meyer zum Buschenfelde KH, Ramadori G. Functional spectrum of sinusoidal endothelial liver cells. Filtration, endocytosis, synthetic capacities and intercellular communication. *J Hepatol* 1992; 15(1-2):237-250.
- (138) Oda M, Han JY, Nakamura M. Endothelial cell dysfunction in microvasculature: relevance to disease processes. *Clin Hemorheol Microcirc* 2000; 23(2-4):199-211.
- (139) Arii S, Imamura M. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7(1):40-48.
- (140) Shkurupii VA, Indikova IN. [Comparative morphometric study of the ultrastructure of mouse liver sinusoid endothelial and Kupffer cells in physiologically normal animals]. *Tsitologiya* 1978; 20(3):269-274.
- (141) Praaning-van Dalen DP, De Leeuw AM, Brouwer A, Knook DL. Rat liver endothelial cells have a greater capacity than Kupffer cells to endocytose N-acetylglucosamine- and mannose-terminated glycoproteins. *Hepatology* 1987; 7(4):672-679.
- (142) Dan C, Wake K. Modes of endocytosis of latex particles in sinusoidal endothelial and Kupffer cells of normal and perfused rat liver. *Exp Cell Res* 1985; 158(1):75-85.
- (143) Sleyster EC, Knook DL. Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells. *Lab Invest* 1982; 47(5):484-490.
- (144) Rogoff TM, Lipsky PE. Role of the Kupffer cells in local and systemic immune responses. *Gastroenterology* 1981; 80(4):854-860.
- (145) McCuskey RS. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver* 2000; 20(1):3-7.
- (146) Bankston PW, Pino RM. The development of the sinusoids of fetal rat liver: morphology of endothelial cells, Kupffer cells, and the transmural migration of blood cells into the sinusoids. *Am J Anat* 1980; 159(1):1-15.
- (147) Glaumann H. Phagocytosis and intralysosomal digestion of subcellular organelles by Kupffer cells of rat liver. *Adv Exp Med Biol* 1976; 73 PT-A:247-255.

- (148) Murr MM, Yang J, Fier A, Kaylor P, Mastorides S, Norman JG. Pancreatic elastase induces liver injury by activating cytokine production within Kupffer cells via nuclear factor-Kappa B. *J Gastrointest Surg* 2002; 6(3):474-480.
- (149) Fujita H, Kawamata S, Yamashita K. Electron microscopic studies on multinucleate foreign body giant cells derived from Kupffer cells in mice given Indian ink intravenously. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1983; 42(1):33-42.
- (150) Praaning-van Dalen DP, Brouwer A, Knook DL. Clearance capacity of rat liver Kupffer, Endothelial, and parenchymal cells. *Gastroenterology* 1981; 81(6):1036-1044.
- (151) Fan J, Char D, Kolasa AJ, Pan W, Maitra SR, Patlak CS et al. Alterations in hepatic production and peripheral clearance of IGF-I after endotoxin. *Am J Physiol* 1995; 269(1 Pt 1):E33-E42.
- (152) Ayala A, Perrin MM, Ertel W, Chaudry IH. Differential effects of hemorrhage on Kupffer cells: decreased antigen presentation despite increased inflammatory cytokine (IL-1, IL-6 and TNF) release. *Cytokine* 1992; 4(1):66-75.
- (153) Alric L, Orfila C, Carrere N, Beraud M, Carrera G, Lepert JC et al. Reactive oxygen intermediates and eicosanoid production by kupffer cells and infiltrated macrophages in acute and chronic liver injury induced in rats by CCl4. *Inflamm Res* 2000; 49(12):700-707.
- (154) Laskin DL, Sirak AA, Pilaro AM, Laskin JD. Functional and biochemical properties of rat Kupffer cells and peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 1988; 44(2):71-78.
- (155) Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21(3):311-335.
- (156) Szymanska R, Schmidt-Pospula M. [Studies of liver's reticuloendothelial cells by Tadeusz Browicz and Karl Kupffer. A historical outline]. *Arch Hist Med (Warsz )* 1979; 42(3):331-336.
- (157) Wisse E. An ultrastructural characterization of the endothelial cell in the rat liver sinusoid under normal and various experimental conditions, as a contribution to the distinction between endothelial and Kupffer cells. *J Ultrastruct Res* 1972; 38(5):528-562.
- (158) van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 1972; 46(6):845-852.
- (159) van Furth R. Monocyte origin of Kupffer cells. *Blood Cells* 1980; 6(1):87-92.



- (160) Naito M, Takahashi K, Nishikawa S. Development, differentiation, and maturation of macrophages in the fetal mouse liver. *J Leukoc Biol* 1990; 48(1):27-37.
- (161) Gassel HJ, Engemann R, Thiede A, Hamelmann H. Replacement of donor Kupffer cells by recipient cells after orthotopic rat liver transplantation.
- (162) Naito M, Takahashi K. The role of Kupffer cells in glucan-induced granuloma formation in the liver of mice depleted of blood monocytes by administration of strontium-89. *Lab Invest* 1991; 64(5):664-674.
- (163) Friedman SL, Arthur MJ. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J Clin Invest* 1989; 84(6):1780-1785.
- (164) Bouwens L, Baekeland M, Wisse E. Importance of local proliferation in the expanding Kupffer cell population of rat liver after zymosan stimulation and partial hepatectomy. *Hepatology* 1984; 4(2):213-219.
- (165) Stanley ER, Chen DM, Lin HS. Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor. *Nature* 1978; 274(5667):168-170.
- (166) Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990; 192(2):245-261.
- (167) Wake K, Decker K, Kirn A, Knook DL, McCuskey RS, Bouwens L et al. Cell biology and kinetics of Kupffer cells in the liver. *Int Rev Cytol* 1989; 118:173-229.
- (168) Spolarics Z. Endotoxin stimulates gene expression of ROS-eliminating pathways in rat hepatic endothelial and Kupffer cells. *Am J Physiol* 1996; 270(4 Pt 1):G660-G666.
- (169) Latocha G, Dieter P, Schulze-Specking A, Decker K. Fc receptors mediate prostaglandin and superoxide synthesis in cultured rat Kupffer cells. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1989; 370(9):1055-1061.
- (170) Saba TM, Di Luzio NR. Kupffer cell phagocytosis and metabolism of a variety of particles as a function of opsonization. *J Reticuloendothel Soc* 1965; 2(5):437-453.
- (171) Boisvieux JF, Steimer JL, Venot A, Benhamou JP, Peignoux M, Lebrec D. A non-linear mathematical model for the in vivo determination of Kupffer cells number and rate of phagocytosis of radiocolloids in rats. *Int J Biomed Comput* 1979; 10(4):331-340.
- (172) Enomoto N, Schemmer P, Ikejima K, Takei Y, Sato N, Brenner DA et al. Long-term alcohol exposure changes sensitivity of rat Kupffer cells to lipopolysaccharide. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25(9):1360-1367.

- (173) Sung JJ, Go MY. Reversible Kupffer cell suppression in biliary obstruction is caused by hydrophobic bile acids. *J Hepatol* 1999; 30(3):413-418.
- (174) Lindert KA, Caldwell-Kenkel JC, Nukina S, Lemasters JJ, Thurman RG. Activation of Kupffer cells on reperfusion following hypoxia: particle phagocytosis in a low-flow, reflow model. *Am J Physiol* 1992; 262(2 Pt 1):G345-G350.
- (175) Lough J, Rosenthal L, Arzoumanian A, Goresky CA. Kupffer cell depletion associated with capillarization of liver sinusoids in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhosis. *J Hepatol* 1987; 5(2):190-198.
- (176) Zhang W, Arai S, Sasaoki T, Adachi Y, Funaki N, Higashitsuji H et al. The role of Kupffer cells in the surveillance of tumor growth in the liver. *J Surg Res* 1993; 55(2):140-146.
- (177) Balch G, Izzo F, Chiao P, Klostergaard J, Curley SA. Activation of human Kupffer cells by thymostimulin (TP-1) to produce cytotoxicity against human hepatocellular cancer. *Ann Surg Oncol* 1997; 4(2):149-155.
- (178) Schuurman B, Heuff G, Beelen RH, Meyer S. Enhanced human Kupffer cell-mediated cytotoxicity after activation of the effector cells and modulation of the target cells by interferon- gamma: a mechanistic study at the cellular level. *Cell Immunol* 1995; 165(1):141-147.
- (179) ten Hagen TL, van Vianen W, Heremans H, Bakker-Woudenberg IA. Differential nitric oxide and TNF-alpha production of murine Kupffer cell subfractions upon priming with IFN-gamma and TNF-alpha. *Liver* 1998; 18(5):299-305.
- (180) Bikhazi AB, Jurjus AR, Kamal MT, Al Housseini AM, Saab RN, Jaroudi WA et al. Kinetics of lipopolysaccharide clearance by Kupffer and parenchyma cells in perfused rat liver. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001; 129(4):339-348.
- (181) Billiar TR, Maddaus MA, West MA, Curran RD, Wells CA, Simmons RL. Intestinal gram-negative bacterial overgrowth in vivo augments the in vitro response of Kupffer cells to endotoxin. *Ann Surg* 1988; 208(4):532-540.
- (182) Fox ES, Thomas P, Broitman SA. Clearance of gut-derived endotoxins by the liver. Release and modification of 3H, 14C-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells. *Gastroenterology* 1989; 96(2 Pt 1):456-461.
- (183) Ikejima K, Enomoto N, Seabra V, Ikejima A, Brenner DA, Thurman RG. Pronase destroys the lipopolysaccharide receptor CD14 on Kupffer cells. *Am J Physiol* 1999; 276(3 Pt 1):G591-G598.
- (184) Terpstra V, van Berkel TJ. Scavenger receptors on liver Kupffer cells mediate the in vivo uptake of oxidatively damaged red blood cells in mice. *Blood* 2000; 95(6):2157-2163.

- (185) Loegering DJ, Kaplan JE, Vincent PA, Saba TM. Kupffer cell complement receptor clearance function after surgical injury and phagocytosis of immune complexes: effect of changes in plasma fibronectin. *J Lab Clin Med* 1988; 111(5):504-510.
- (186) Ayala A, O'Neill PJ, Uebele SA, Herdon CD, Chaudry IH. Mechanism of splenic immunosuppression during sepsis: key role of Kupffer cell mediators. *J Trauma* 1997; 42(5):882-888.
- (187) Hafenrichter DG, Roland CR, Mangino MJ, Flye MW. The Kupffer cell in endotoxin tolerance: mechanisms of protection against lethal endotoxemia. *Shock* 1994; 2(4):251-256.
- (188) Bankey P, Beecherl E, Bibus D, See D, McIntyre K. Liposomes modulate Kupffer cell endotoxin response. *Arch Surg* 1995; 130(12):1266-1272.
- (189) Kuiper J, Zijlstra FJ, Kamps JA, van Berkel TJ. Identification of prostaglandin D2 as the major eicosanoid from liver endothelial and Kupffer cells. *Biochim Biophys Acta* 1988; 959(2):143-152.
- (190) Koyama Y, Imoto M, Fukuda Y, Nakano I, Hattori M, Urano F et al. Prostaglandin production by isolated Kupffer cells. *Gastroenterol Jpn* 1990; 25(5):660.
- (191) Grewe M, Duyster J, Dieter P, Henninger H, Schulze-Specking A, Decker K. Prostaglandin D2 and E2 syntheses in rat Kupffer cells are antagonistically regulated by lipopolysaccharide and phorbol ester. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1992; 373(8):655-664.
- (192) Billiar TR, Lysz TW, Curran RD, Bentz BG, Machiedo GW, Simmons RL. Hepatocyte modulation of Kupffer cell prostaglandin E2 production in vitro. *J Leukoc Biol* 1990; 47(4):305-311.
- (193) Shimada H, Nakano A, Kurosawa H, Natori S, Fujii Y. The protective effect of prostaglandin E1 on endotoxin-induced hepatocyte injury. *Prog Clin Biol Res* 1998; 397:281-7:281-287.
- (194) Sakagami Y, Mizoguchi Y, Seki S, Kobayashi K, Morisawa S, Yamamoto S. Release of leukotriene B4 from rat Kupffer cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1989; 36(3):125-128.
- (195) Roland CR, Goss JA, Mangino MJ, Hafenrichter D, Flye MW. Autoregulation by eicosanoids of human Kupffer cell secretory products. A study of interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, and nitric oxide. *Ann Surg* 1994; 219(4):389-399.
- (196) O'Neill PJ, Ayala A, Wang P, Ba ZF, Morrison MH, Schultze AE et al. Role of Kupffer cells in interleukin-6 release following trauma- hemorrhage and resuscitation. *Shock* 1994; 1(1):43-47.

- (197) Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. >TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy. *Apoptosis* 2002; 7(5):449-459.
- (198) Zhou M, Yang S, Koo DJ, Ornan DA, Chaudry IH, Wang P. The role of Kupffer cell alpha(2)-adrenoceptors in norepinephrine- induced TNF-alpha production. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1537(1):49-57.
- (199) Li Z, Lin H, Yang S, Diehl AM. Murine leptin deficiency alters Kupffer cell production of cytokines that regulate the innate immune system. *Gastroenterology* 2002; 123(4):1304-1310.
- (200) Sangfelt, Strander H. Apoptosis and cell growth inhibition as antitumor effector functions of interferons. *Med Oncol* 2001; 18(1):3-14.
- (201) Werner-Wasik M, von Muenchhausen W, Nolan JP, Cohen SA. Endogeneous interferon alpha/beta produced by murine Kupffer cells augments liver-associated natural k.
- (202) Ghadirian E, Salimi A. In vitro effect of recombinant interferon gamma in combination with LPS on amoebicidal activity of murine Kupffer cells. *Immunobiology* 1993; 188(1-2):203-219.
- (203) Bai XY, Jia XH, Cheng LZ, Gu YD. Influence of IFN alpha-2b and BCG on the release of TNF and IL-1 by Kupffer cells in rats with hepatoma. *World J Gastroenterol* 2001; 7(3):419-421.
- (204) Lentsch AB, Yoshidome H, Cheadle WG, Miller FN, Edwards MJ. Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: roles for macrophage inflammatory protein-2 and Kupffer cells. *Hepatology* 1998; 27(2):507-512.
- (205) Dambach DM, Watson LM, Gray KR, Durham SK, Laskin DL. Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. *Hepatology* 2002; 35(5):1093-1103.
- (206) Knolle PA, Loser E, Protzer U, Duchmann R, Schmitt E, zum Buschenfelde KH et al. Regulation of endotoxin-induced IL-6 production in liver sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells by IL-10. *Clin Exp Immunol* 1997; 107(3):555-561.
- (207) Armendariz-Borunda J, LeGros L, Jr., Campollo O, Panduro A, Rincon AR. Antisense S-oligodeoxynucleotides down-regulate TGFbeta-production by Kupffer cells from CCl4-injured rat livers. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1353(3):241-252.
- (208) Sankary HN, Chong A, Foster P, Brown E, Shen J, Kimura R et al. Inactivation of Kupffer cells after prolonged donor fasting improves viability of transplanted hepatic allografts. *Hepatology* 1995; 22(4 Pt 1):1236-1242.

- (209) Lohse AW, Knolle PA, Bilo K, Uhrig A, Waldmann C, Ibe M et al. Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* 1996; 110(4):1175-1181.
- (210) Luckey SW, Petersen DR. Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride- induced liver injury and fibrosis in rats. *Exp Mol Pathol* 2001; 71(3):226-240.
- (211) Ito I, Muro H, Kosugi I, Shirasawa H. Alterations in Fc receptor activity in sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells during D-galactosamine (GalN)-induced liver injury in rats. A histological study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1990; 58(6):417-425.
- (212) Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res* 2001; 34(4):325-336.
- (213) Arthur MJ, Kowalski-Saunders P, Wright R. *Corynebacterium parvum*-elicited hepatic macrophages demonstrate enhanced respiratory burst activity compared with resident Kupffer cells in the rat. *Gastroenterology* 1986; 91(1):174-181.
- (214) Yonei Y, Kurose I, Fukumura D, Saito H, Miura S, Tsukada N et al. Evidence of direct interaction between Kupffer cells and colon cancer cells: an ultrastructural study of the co-culture. *Liver* 1994; 14(1):37-44.
- (215) Fukumura D, Yonei Y, Kurose I, Saito H, Ohishi T, Higuchi H et al. Role in nitric oxide in Kupffer cell-mediated hepatoma cell cytotoxicity in vitro and ex vivo. *Hepatology* 1996; 24(1):141-149.
- (216) Ikeda K, Kubo S, Hirohashi K, Kinoshita H, Kaneda K, Kawada N et al. Mechanism that regulates nitric oxide production by lipopolysaccharide-stimulated rat Kupffer cells. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1996; 28(4):239-253.
- (217) Imamura H, Sutto F, Brault A, Huet PM. Role of Kupffer cells in cold ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Gastroenterology* 1995; 109(1):189-197.
- (218) Jaeschke H, Farhood A. Kupffer cell activation after no-flow ischemia versus hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(2):210-219.
- (219) Manthey CL, Kossmann T, Allen JB, Corcoran ML, Brandes ME, Wahl SM. Role of Kupffer cells in developing streptococcal cell wall granulomas. Streptococcal cell wall induction of inflammatory cytokines and mediators. *Am J Pathol* 1992; 140(5):1205-1214.
- (220) Enomoto N, Takei Y, Hirose M, Ikejima K, Miwa H, Kitamura T et al. Thalidomide prevents alcoholic liver injury in rats through suppression of Kupffer cell sensitization and TNF-alpha production. *Gastroenterology* 2002; 123(1):291-300.

- (221) Laskin DL. Sinusoidal lining cells and hepatotoxicity. *Toxicol Pathol* 1996; 24(1):112-118.
- (222) Lau WY, Chen GG, Lai PB, Chun YS, Leung BC, Chak EC et al. Induction of Fas and Fas ligand expression on malignant glioma cells by Kupffer cells, a potential pathway of antiliver metastases. *J Surg Res* 2001; 101(1):44-51.
- (223) Dehmlow C, Erhard J, De Groot H. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology* 1996; 23(4):749-754.
- (224) Amenta PS, Harrison D. Expression and potential role of the extracellular matrix in hepatic ontogenesis: a review. *Microsc Res Tech* 1997; 39(4):372-386.
- (225) Schirmacher P, Geerts A, Jung W, Pietrangelo A, Rogler CE, Dienes HP. The role of Ito cells in the biosynthesis of HGF-SF in the liver. *EXS* 1993; 65:285-299.
- (226) Arthur MJ, Mann DA, Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases, hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13 Suppl:S33-S38.
- (227) Feinberg MW, Jain MK, Werner F, Sibinga NE, Wiesel P, Wang H et al. Transforming growth factor-beta 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages. *J Biol Chem* 2000; 275(33):25766-25773.
- (228) Janusz MJ, Hare M, Durham SL, Potempa J, McGraw W, Pike R et al. Cartilage proteoglycan degradation by a mouse transformed macrophage cell line is mediated by macrophage metalloelastase. *Inflamm Res* 1999; 48(5):280-288.
- (229) Enomoto N, Yamashina S, Kono H, Schemmer P, Rivera CA, Enomoto A et al. Development of a new, simple rat model of early alcohol-induced liver injury based on sensitization of Kupffer cells. *Hepatology* 1999; 29(6):1680-1689.
- (230) Hussein MF, Tartour G, Imbabi SE, Ali KE. The pathology of naturally-occurring bovine schistosomiasis in the Sudan. *Ann Trop Med Parasitol* 1975; 69(2):217-225.
- (231) Armendariz-Borunda J, Seyer JM, Postlethwaite AE, Kang AH. Kupffer cells from carbon tetrachloride-injured rat livers produce chemotactic factors for fibroblasts and monocytes: the role of tumor necrosis factor-alpha.
- (232) Marra F, Romanelli RG, Giannini C, Failli P, Pastacaldi S, Arrighi MC et al. Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 29(1):140-148.

- (233) Fukuda Y, Imoto M, Koyama Y, Miyazawa Y, Nakano I, Hattori M et al. Immunohistochemical study on tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and pathological human livers. *Gastroenterol Jpn* 1991; 26(1):37-41.
- (234) Gulubova MV. Ito cell morphology, alpha-smooth muscle actin and collagen type IV expression in the liver of patients with gastric and colorectal tumors. *Histochem J* 2000; 32(3):151-164.
- (235) Meng XJ, Qiu BA, Li XJ, Song XH. The role of Kupffer cells in the development of hepatic dysfunction during sepsis. *Chin Med J (Engl)* 1992; 105(1):34-38.
- (236) Eicher SD, McVey DS. Dietary modulation of Kupffer cell and splenocyte function during a *Salmonella typhimurium* challenge in mice. *J Leukoc Biol* 1995; 58(1):32-39.
- (237) Okamura K, Noshima S, Esato K. Cytokine release during hypoxia reoxygenation by Kupffer cells in rats with obstructive jaundice. *Surg Today* 1999; 29(8):730-734.
- (238) Gregory SH, Cousens LP, van Rooijen N, Dopp EA, Carlos TM, Wing EJ. Complementary adhesion molecules promote neutrophil-Kupffer cell interaction and the elimination of bacteria taken up by the liver. *J Immunol* 2002; 168(1):308-315.
- (239) Gregory SH, Wing EJ. Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections. *J Leukoc Biol* 2002; 72(2):239-248.
- (240) Ebe Y, Hasegawa G, Takatsuka H, Umezu H, Mitsuyama M, Arakawa M et al. The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration into the liver by macrophage inflammatory protein-2 in primary listeriosis in mice. *Pathol Int* 1999; 49(6):519-532.
- (241) Kopydlowski KM, Salkowski CA, Cody MJ, van Rooijen N, Major J, Hamilton TA et al. Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *J Immunol* 1999; 163(3):1537-1544.
- (242) Roland CR, Walp L, Stack RM, Flye MW. Outcome of Kupffer cell antigen presentation to a cloned murine Th1 lymphocyte depends on the inducibility of nitric oxide synthase by IFN- gamma. *J Immunol* 1994; 153(12):5453-5464.
- (243) Prasad RN, Virk KJ, Mahajan RC, Ganguly NK. Reactive oxygen species generation by Kupffer cells and blood monocytes of mice infected with *Plasmodium berghei* and the chloroquine treatment. *Jpn J Exp Med* 1990; 60(1):1-4.
- (244) Barnwell JW. Hepatic Kupffer cells: the portal that permits infection of hepatocytes by malarial sporozoites? *Hepatology* 2001; 33(5):1331-1333.

- (245) Smets D, Spapen H, Diltoer M, Nguyen DN, Hubloue I, Huyghens L. Liver perfusion and hepatocellular inflammatory response in sepsis. *Acta Clin Belg* 1999; 54(4):201-206.
- (246) Ohmori S, Shiraki K, Sugimoto K, Sakai T, Fujikawa K, Wagayama H et al. High expression of CD34-positive sinusoidal endothelial cells is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with HCV-associated chronic liver diseases. *Hum Pathol* 2001; 32(12):1363-1370.
- (247) Heuff G, van de Loosdrecht AA, Betjes MG, Beelen RH, Meijer S. Isolation and purification of large quantities of fresh human Kupffer cells, which are cytotoxic against colon carcinoma. *Hepatology* 1995; 21(3):740-745.
- (248) Chen GG, Chak EC, Chun YS, Lam IK, Sin FL, Leung BC et al. Glioma apoptosis induced by macrophages involves both death receptor-dependent and independent pathways. *J Lab Clin Med* 2003; 141(3):190-199.
- (249) Meterissian SH, Toth CA, Steele G, Jr., Thomas P. Kupffer cell/tumor cell interactions and hepatic metastasis in colorectal cancer. *Cancer Lett* 1994; 81(1):5-12.
- (250) Motomura K, Sakai H, Isobe H, Nawata H. Effects of retinoids on the production of tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide by lipopolysaccharide-stimulated rat Kupffer cells in vitro: evidence for participation of retinoid X receptor signalling pathway. *Cell Biochem Funct* 1997; 15(2):95-101.
- (251) Billiar TR, Curran RD, Ferrari FK, Williams DL, Simmons RL. Kupffer cell:hepatocyte cocultures release nitric oxide in response to bacterial endotoxin. *J Surg Res* 1990; 48(4):349-353.
- (252) Qu W, Zhong Z, Goto M, Thurman RG. Kupffer cell prostaglandin E2 stimulates parenchymal cell O2 consumption: alcohol and cell-cell communication. *Am J Physiol* 1996; 270(4 Pt 1):G574-G580.
- (253) Kamimura S, Tsukamoto H. Cytokine gene expression by Kupffer cells in experimental alcoholic liver disease. *Hepatology* 1995; 22(4 Pt 1):1304-1309.
- (254) Roland CR, Naziruddin B, Mohanakumar T, Flye MW. Gadolinium blocks rat Kupffer cell calcium channels: relevance to calcium-dependent prostaglandin E2 synthesis and septic mortality. *Hepatology* 1999; 29(3):756-765.
- (255) Sohara N, Znoyko I, Levy MT, Trojanowska M, Reuben A. Reversal of activation of human myofibroblast-like cells by culture on a basement membrane-like substrate. *J Hepatol* 2002; 37(2):214-221.
- (256) Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(31):21491-21494.
- (257) Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* 2002; 52(4):255-264.



- (258) McDonnell S, Morgan M, Lynch C. Role of matrix metalloproteinases in normal and disease processes. *Biochem Soc Trans* 1999; 27(4):734-740.
- (259) Armstrong DG, Jude EB. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *J Am Podiatr Med Assoc* 2002; 92(1):12-18.
- (260) Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS* 1999; 107(1):137-143.
- (261) Bode W, Maskos K. Structural studies on MMPs and TIMPs. *Methods Mol Biol* 2001; 151:45-77.
- (262) Weiner FR, Shah A, Biempica L, Zern MA, Czaja MJ. The effects of hepatic fibrosis on Ito cell gene expression. *Matrix* 1992; 12(1):36-43.
- (263) Gressner AM. The cell biology of liver fibrogenesis - an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res* 1998; 292(3):447-452.
- (264) Malik R, Selden C, Hodgson H. The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13(6):425-431.
- (265) Hironaka K, Sakaida I, Matsumura Y, Kaino S, Miyamoto K, Okita K. Enhanced interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-13) production of Kupffer cell by gadolinium chloride prevents pig serum-induced rat liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Jan 7;267(1):290-5 2000; 267(1):290-295.
- (266) Vickers AE, Lucier GW. Estrogen receptor levels and occupancy in hepatic sinusoidal endothelial and Kupffer cells are enhanced by initiation with diethylnitrosamine and promotion with 17alpha-ethinylestradiol in rats. *Carcinogenesis* 1996; 17(6):1235-1242.
- (267) Roth S, Gong W, Gressner AM. Expression of different isoforms of TGF-beta and the latent TGF-beta binding protein (LTBP) by rat Kupffer cells. *J Hepatol* 1998; 29(6):915-922.
- (268) Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJ, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 1996; 24(1):176-184.
- (269) Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J et al. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 1994; 269(24):16766-16773.
- (270) Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Arai M, Maruyama K. Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis: with special reference to the role of matrix metalloproteinases. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15 Suppl:D26-D32.

- (271) Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279(2):G245-G249.
- (272) Koolwijk P, Sidenius N, Peters E, Sier CF, Hanemaaijer R, Blasi F et al. Proteolysis of the urokinase-type plasminogen activator receptor by metalloproteinase-12: implication for angiogenesis in fibrin matrices. *Blood* 2001; 97(10):3123-3131.
- (273) Cox G, Steward WP, O'Byrne KJ. The plasmin cascade and matrix metalloproteinases in non-small cell lung cancer. *Thorax* 1999; 54(2):169-179.
- (274) Zhang LP, Takahara T, Yata Y, Furui K, Jin B, Kawada N et al. Increased expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during liver fibrogenesis of rats: role of stellate cells. *J Hepatol* 1999; 31(4):703-711.
- (275) Stewart D, Kong M, Novokhatny V, Jesmok G, Marder VJ. Distinct dose-dependent effects of plasmin and TPA on coagulation and hemorrhage. *Blood* 2003; 101(8):3002-3007.
- (276) Tsatas D, Kaye H. The role of the plasminogen activation cascade in glioma cell invasion: a review. *J Clin Neurosci* 2003; 10(2):139-145.
- (277) Tsatas D, Kanagasundaram V, Kaye A, Novak U. EGF receptor modifies cellular responses to hyaluronan in glioblastoma cell lines. *J Clin Neurosci* 2002; 9(3):282-288.
- (278) Del Rosso M, Fibbi G, Pucci M, D'Alessio S, Del Rosso A, Magnelli L et al. Multiple pathways of cell invasion are regulated by multiple families of serine proteases. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19(3):193-207.
- (279) Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology* 2001; 34(5):859-867.
- (280) Bissell DM. Chronic liver injury, TGF-beta, and cancer. *Exp Mol Med* 2001; 33(4):179-190.
- (281) Hocevar BA, Howe PH. Analysis of TGF-beta-mediated synthesis of extracellular matrix components. *Methods Mol Biol* 2000; 142:55-65.
- (282) Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992; 359(6397):693-699.
- (283) Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2001; 108(4):601-609.
- (284) Akita K, Okuno M, Enya M, Imai S, Moriwaki H, Kawada N et al. Impaired liver regeneration in mice by lipopolysaccharide via TNF-alpha/kallikrein-mediated activation of latent TGF-beta. *Gastroenterology* 2002; 123(1):352-364.

- (285) Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. *J Hepatol* 1999; 30(1):48-60.
- (286) Harvey J, Ashford ML. Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. *Neuropharmacology* 2003; 44(7):845-854.
- (287) Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; 272(10):6093-6096.
- (288) Halle M, Persson PB. Role of leptin and leptin receptor in inflammation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284(3):R760-R762.
- (289) Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68(4):437-446.
- (290) Caldefie-Chezet F, Guillot J, Vasson MP. La leptine : hormone et cytokine impliquee dans la reponse a l'agression: Leptine, hormone and mediator of the response to stress. *Nutrition Clinique et Metabolisme* 2003; 17(1):15-23.
- (291) Caldefie-Chezet F, Poulin A, Tridon A, Sion B, Vasson MP. Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action? *J Leukoc Biol* 2001; 69(3):414-418.
- (292) Santos-Alvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol* 1999; 194(1):6-11.
- (293) Kim GS, Hong JS, Kim SW, Koh JM, An CS, Choi JY et al. Leptin induces apoptosis via ERK/cPLA2/cytochrome c pathway in human bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 2003.
- (294) Artwohl M, Roden M, Holzenbein T, Freudenthaler A, Waldhausl W, Baumgartner-Parzer SM. Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26(4):577-580.
- (295) Brazeau P. Somatostatin: a peptide with unexpected physiologic activities. *Am J Med* 1986; 81(6B):8-13.
- (296) Pradayrol L, Jornvall H, Mutt V, Ribet A. N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett* 1980; 109(1):55-58.
- (297) Yelich MR, Umporowicz DM, Drolet BA. Role of somatostatin in glucose regulation during endotoxemia in the rat. *Am J Physiol* 1993; 264(2 Pt 2):R254-R261.
- (298) Schweitzer P, Madamba S, Siggins GR. Arachidonic acid metabolites as mediators of somatostatin-induced increase of neuronal M-current. *Nature* 1990; 346(6283):464-467.

- (299) Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* 2000; 288(5463):154-157.
- (300) Reichlin S. Somatostatin. *N Engl J Med* 1983; 309(24):1495-1501.
- (301) Reichlin S. Somatostatin (second of two parts). *N Engl J Med* 1983; 309(25):1556-1563.
- (302) Garcia dIT, Wass JA, Turner HE. Antiangiogenic effects of somatostatin analogues. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; 57(4):425-441.
- (303) Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 1999; 20(3):157-198.
- (304) Johansson O, Hokfelt T, Elde RP. Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience* 1984; 13(2):265-339.
- (305) Guillemin R. The brain as an endocrine organ--update 1981. *Endocrinol Exp* 1982; 16(3-4):151-162.
- (306) Portela-Gomes GM, Johansson H, Olding L, Grimelius L. Co-localization of neuroendocrine hormones in the human fetal pancreas. *Eur J Endocrinol* 1999; 141(5):526-533.
- (307) Douziech N, Calvo E, Coulombe Z, Muradia G, Bastien J, Aubin RA et al. Inhibitory and stimulatory effects of somatostatin on two human pancreatic cancer cell lines: a primary role for tyrosine phosphatase SHP-1. *Endocrinology* 1999; 140(2):765-777.
- (308) van Hagen PM, Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Reubi JC, Anker-Lugtenburg PJ, Lowenberg B et al. Somatostatin and the immune and haematopoietic system; a review. *Eur J Clin Invest* 1994; 24(2):91-99.
- (309) Madden KS, Felten DL. Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiol Rev* 1995; 75(1):77-106.
- (310) van Hagen PM, Hofland LJ, ten Bokum AM, Lichtenauer-Kaligis EG, Kwekkeboom DJ, Ferone D et al. Neuropeptides and their receptors in the immune system. *Ann Med* 1999; 31 Suppl 2:15-22.
- (311) Moyse E, Le Dafniet M, Epelbaum J, Pagesy P, Peillon F, Kordon C et al. Somatostatin receptors in human growth hormone and prolactin-secreting pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61(1):98-103.
- (312) Reichlin S. Somatostatin. *N Engl J Med* 1983; 309(24):1495-1501.
- (313) Stanis AM, Scicchitano R, Payan DG, Bienenstock J. In vitro studies of immunoregulation by substance P and somatostatin. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 496:217-225.

- (314) Dickerson C, Udem B, Bullock B, Winchurch RA. Neuropeptide regulation of proinflammatory cytokine responses. *J Leukoc Biol* 1998; 63(5):602-605.
- (315) Matucci-Cerinic M, Pignone A, Lotti T, Partsch G, Livi R, Cagnoni M. Gold salts and somatostatin: a new combined analgesic treatment for psoriatic arthritis. *Drugs Exp Clin Res* 1992; 18(2):53-61.
- (316) Blum AM, Elliott DE, Metwali A, Li J, Qadir K, Weinstock JV. Substance P regulates somatostatin expression in inflammation. *J Immunol* 1998; 161(11):6316-6322.
- (317) Chan AW, Williams G, MacFarlane IA, Bowsher D. Octreotide, a long-acting somatostatin analogue, in diabetic neuropathic pain. *Horm Res* 1991; 36(1-2):86-87.
- (318) Recht LD, Abrams GM. Neuropeptides and their role in nociception and analgesia. *Neurol Clin* 1986; 4(4):833-852.
- (319) Caleri D, Marabini S, Panconesi A, Pietrini U. A pharmacological approach to the analgesizing mechanism of somatostatin in cluster headache. *Ric Clin Lab* 1987; 17(2):155-162.
- (320) Payan DG, Goetzl EJ. Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides. *J Immunol* 1985; 135(2 Suppl):783s-786s.
- (321) Agro A, Padol I, Stanisz AM. Immunomodulatory activities of the somatostatin analogue BIM 23014c: effects on murine lymphocyte proliferation and natural killer activity. *Regul Pept* 1991; 32(2):129-139.
- (322) Karalis K, Mastorakos G, Chrousos GP, Tolis G. Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo. *J Clin Invest* 1994; 93(5):2000-2006.
- (323) Muscettola M, Grasso G. Somatostatin and vasoactive intestinal peptide reduce interferon gamma production by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunobiology* 1990; 180(4-5):419-430.
- (324) Peluso G, Petillo O, Melone MA, Mazzarella G, Ranieri M, Tajana GF. Modulation of cytokine production in activated human monocytes by somatostatin. *Neuropeptides* 1996; 30(5):443-451.
- (325) Goetzl EJ, Payan DG. Inhibition by somatostatin of the release of mediators from human basophils and rat leukemic basophils. *J Immunol* 1984; 133(6):3255-3259.
- (326) Epelbaum J, Dournaud P, Fodor M, Viollet C. The neurobiology of somatostatin. *Crit Rev Neurobiol* 1994; 8(1-2):25-44.
- (327) Vural B, Solakoglu S, Dalcik H, Vural F, Dalcik C, Erk A et al. Antiproliferative effects and insulin-like growth factor-I expression in Balb-C 3T3 fibroblasts after treatment with somatostatin and gonadotropin-releasing hormone analogs. *Acta Histochem* 2000; 102(3):353-363.

- (328) Chowers Y, Cahalon L, Lahav M, Schor H, Tal R, Bar-Meir S et al. Somatostatin through its specific receptor inhibits spontaneous and TNF- $\alpha$ - and bacteria-induced IL-8 and IL-1 beta secretion from intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2000; 165(6):2955-2961.
- (329) Quintela M, Senaris RM, Dieguez C. Transforming growth factor-betas inhibit somatostatin messenger ribonucleic acid levels and somatostatin secretion in hypothalamic cells in culture. *Endocrinology* 1997; 138(10):4401-4409.
- (330) Quintela M, Senaris R, Heiman ML, Casanueva FF, Dieguez C. Leptin inhibits in vitro hypothalamic somatostatin secretion and somatostatin mRNA levels. *Endocrinology* 1997; 138(12):5641-5644.
- (331) Sreedharan SP, Kodama KT, Peterson KE, Goetzl EJ. Distinct subsets of somatostatin receptors on cultured human lymphocytes. *J Biol Chem* 1989; 264(2):949-952.
- (332) Reisine T. Somatostatin receptors. *Am J Physiol* 1995; 269(6 Pt 1):G813-G820.
- (333) Csaba Z, Dournaud P. Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides* 2001; 35(1):1-23.
- (334) Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M. Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinology* 1993; 133(6):2561-2567.
- (335) Elliott DE, Metwali A, Blum AM, Sandor M, Lynch R, Weinstock JV. T lymphocytes isolated from the hepatic granulomas of schistosome-infected mice express somatostatin receptor subtype II (SSTR2) messenger RNA. *J Immunol* 1994; 153(3):1180-1186.
- (336) Sims SM, Lussier BT, Kraicer J. Somatostatin activates an inwardly rectifying K<sup>+</sup> conductance in freshly dispersed rat somatotrophs. *J Physiol* 1991; 441:615-637.
- (337) Artim DE, Meriney SD. G-protein-modulated Ca<sup>(2+)</sup> current with slowed activation does not alter the kinetics of action potential-evoked Ca<sup>(2+)</sup> current. *J Neurophysiol* 2000; 84(5):2417-2425.
- (338) White RE, Schonbrunn A, Armstrong DL. Somatostatin stimulates Ca<sup>(2+)</sup>-activated K<sup>+</sup> channels through protein dephosphorylation. *Nature* 1991; 351(6327):570-573.
- (339) Murthy KS, Coy DH, Makhlof GM. Somatostatin receptor-mediated signaling in smooth muscle. Activation of phospholipase C- $\beta$ 3 by Gbetagamma and inhibition of adenylyl cyclase by Galphai1 and Galphao. *J Biol Chem* 1996; 271(38):23458-23463.
- (340) Guillemin R. Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron. *Science* 1978; 202(4366):390-402.

- (341) Lamberts SW, Oosterom R, Neufeld M, del Pozo E. The somatostatin analog SMS 201-995 induces long-acting inhibition of growth hormone secretion without rebound hypersecretion in acromegalic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60(6):1161-1165.
- (342) Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ. Octreotide. *N Engl J Med* 1996; 334(4):246-254.
- (343) Kouroumalis EA. Octreotide for cancer of the liver and biliary tree. *Chemotherapy* 2001; 47 Suppl 2:150-161.
- (344) Samonakis DN, Moschandreas J, Arnaoutis T, Skordilis P, Leontidis C, Vafiades I et al. Treatment of hepatocellular carcinoma with long acting somatostatin analogues. *Oncol Rep* 2002; 9(4):903-907.
- (345) Kvols LK, Buck M, Moertel CG, Schutt AJ, Rubin J, O'Connell MJ et al. Treatment of metastatic islet cell carcinoma with a somatostatin analogue (SMS 201-995). *Ann Intern Med* 1987; 107(2):162-168.
- (346) Kvols LK. Metastatic carcinoid tumors and the malignant carcinoid syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 733:464-470.
- (347) Goulis J, Burroughs AK. Role of vasoactive drugs in the treatment of bleeding oesophageal varices. *Digestion* 1999; 60 Suppl 3:25-34.
- (348) Le Bail B, Bioulac-Sage P, Senuita R, Quinton A, Saric J, Balabaud C. Fine structure of hepatic sinusoids and sinusoidal cells in disease. *J Electron Microsc Tech* 1990; 14(3):257-282.
- (349) Limmer A, Knolle PA. Liver sinusoidal endothelial cells: a new type of organ-resident antigen-presenting cell. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz )* 2001; 49 Suppl 1:S7-11.
- (350) Steffan AM, Gendrault JL, McCuskey RS, McCuskey PA, Kirn A. Phagocytosis, an unrecognized property of murine endothelial liver cells. *Hepatology* 1986; 6(5):830-836.
- (351) te Koppele JM, Thurman RG. Phagocytosis by Kupffer cells predominates in pericentral regions of the liver lobule. *Am J Physiol* 1990; 259(5 Pt 1):G814-21.
- (352) Park S, Murray D, John B, Crispe IN. Biology and significance of T-cell apoptosis in the liver. *Immunol Cell Biol* 2002; 80(1):74-83.
- (353) Knook DL, Seffelaar AM, de Leeuw AM. Fat-storing cells of the rat liver. Their isolation and purification. *Exp Cell Res* 1982; 139(2):468-471.
- (354) Blomhoff R, Smedsrod B, Eskild W, Granum PE, Berg T. Preparation of isolated liver endothelial cells and Kupffer cells in high yield by means of an enterotoxin. *Exp Cell Res* 1984; 150(1):194-204.

- (355) Knook DL, Sleyster EC. Isolated parenchymal, Kupffer and endothelial rat liver cells characterized by their lysosomal enzyme content. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 96(1):250-257.
- (356) Smedsrod B, Pertoft H, Eggertsen G, Sundstrom C. Functional and morphological characterization of cultures of Kupffer cells and liver endothelial cells prepared by means of density separation in Percoll, and selective substrate adherence. *Cell Tissue Res* 1985; 241(3):639-649.
- (357) Valatas V, Xidakis C, Roumpaki H, Kolios G, Kouroumalis EA. Isolation of rat Kupffer cells: a combined methodology for highly purified primary cultures. *Cell Biol Int* 2003; 27(1):67-73.
- (358) Maher JJ, Lozier JS, Scott MK. Rat hepatic stellate cells produce cytokine-induced neutrophil chemoattractant in culture and in vivo. *Am J Physiol* 1998; 275(4 Pt 1):G847-53.
- (359) Leyland H, Gentry J, Arthur MJ, Benyon RC. The plasminogen-activating system in hepatic stellate cells. *Hepatology* 1996; 24(5):1172-1178.
- (360) Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21(3):373-384.
- (361) Brodsky S, Chen J, Lee A, Akassoglou K, Norman J, Goligorsky MS. Plasmin-dependent and -independent effects of plasminogen activators and inhibitor-1 on ex vivo angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281(4):H1784-H1792.
- (362) Fibbi G, Pucci M, Grappone C, Pellegrini G, Salzano R, Casini A et al. Functions of the fibrinolytic system in human Ito cells and its control by basic fibroblast and platelet-derived growth factor. *Hepatology* 1999; 29(3):868-878.
- (363) Sakaida I, Hironaka K, Terai S, Okita K. Gadolinium chloride reverses dimethylnitrosamine (DMN)-induced rat liver fibrosis with increased matrix metalloproteinases (MMPs) of Kupffer cells. *Life Sci* 2003; 72(8):943-959.
- (364) Melgert BN, Olinga P, Van Der Laan JM, Weert B, Cho J, Schuppan D et al. Targeting dexamethasone to Kupffer cells: effects on liver inflammation and fibrosis in rats. *Hepatology* 2001; 34(4 Pt 1):719-728.
- (365) Melgert BN, Weert B, Schellekens H, Meijer DK, Poelstra K. The pharmacokinetic and biological activity profile of dexamethasone targeted to sinusoidal endothelial and Kupffer cells. *J Drug Target* 2003; 11(1):1-10.
- (366) Hata J, Ikeda E, Uno H, Asano S. Expression of hepatocyte growth factor mRNA in rat liver cirrhosis induced by N-nitrosodimethylamine as evidenced by in situ RT-PCR. *J Histochem Cytochem* 2002; 50(11):1461-1468.
- (367) Cameron RG, Blendis LM, Neuman MG. Accumulation of macrophages in primary sclerosing cholangitis. *Clin Biochem* 2001; 34(3):195-201.



- (368) Luckey SW, Petersen DR. Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in rats. *Exp Mol Pathol* 2001; 71(3):226-240.
- (369) Rivera CA, Bradford BU, Hunt KJ, Adachi Y, Schrum LW, Koop DR et al. Attenuation of CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis by GdCl<sub>3</sub> treatment or dietary glycine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281(1):G200-G207.
- (370) Shimizu I. Antifibrogenic therapies in chronic HCV infection. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2001; 1(2):227-240.
- (371) De Bleser PJ, Niki T, Rogiers V, Geerts A. Transforming growth factor-beta gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol* 1997; 26(4):886-893.
- (372) Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ et al. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002; 122(5):1399-1410.
- (373) Kouroumalis E, Skordilis P, Thermos K, Vasilaki A, Moschandrea J, Manousos ON. Treatment of hepatocellular carcinoma with octreotide: a randomised controlled study. *Gut* 1998; 42(3):442-447.
- (374) Samonakis DN, Moschandreas J, Arnaoutis T, Skordilis P, Leontidis C, Vafiades I et al. Treatment of hepatocellular carcinoma with long acting somatostatin analogues. *Oncol Rep* 2002; 9(4):903-907.
- (375) Sakaida I, Hironaka K, Terai S, Okita K. Gadolinium chloride reverses dimethylnitrosamine (DMN)-induced rat liver fibrosis with increased matrix metalloproteinases (MMPs) of Kupffer cells. *Life Sci* 2003; 72(8):943-959.
- (376) Leyland H, Gentry J, Arthur MJ, Benyon RC. The plasminogen-activating system in hepatic stellate cells. *Hepatology* 1996; 24(5):1172-1178.
- (377) Davies N, Kynaston H, Yates J, Nott DM, Jenkins SA, Taylor BA. Reticuloendothelial stimulation: levamisole compared. *Dis Colon Rectum* 1993; 36(11):1054-1058.
- (378) Frizelle FA. Octreotide inhibits the growth and development of three types of experimental liver metastasis. *Br J Surg* 1995; 82(11):1577.
- (379) Davies N, Kynaston H, Yates J, Nott DM, Nash J, Taylor BA et al. Octreotide inhibits the growth and development of three types of experimental liver metastases. *Br J Surg* 1995; 82(6):840-843.
- (380) Nakaizumi A, Uehara H, Baba M, Iishi H, Tatsuta M. Inhibition by somatostatin of hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosomorpholine in Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 1993; 14(12):2601-2604.

- (381) Schindel DT, Grosfeld JL. Hepatic resection enhances growth of residual intrahepatic and subcutaneous hepatoma, which is inhibited by octreotide. *J Pediatr Surg* 1997; 32(7):995-997.
- (382) Imam H, Eriksson B, Lukinius A, Janson ET, Lindgren PG, Wilander E et al. Induction of apoptosis in neuroendocrine tumors of the digestive system during treatment with somatostatin analogs. *Acta Oncol* 1997; 36(6):607-614.
- (383) Davies N, Yates J, Kynaston H, Taylor BA, Jenkins SA. Effects of octreotide on liver regeneration and tumour growth in the regenerating liver. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12(1):47-53.
- (384) Davies N, Kynaston H, Yates J, Taylor BA, Jenkins SA. Octreotide, the reticuloendothelial system, and experimental liver tumour. *Gut* 1995; 36(4):610-614.
- (385) Cuesta N, Salkowski CA, Thomas KE, Vogel SN. Regulation of lipopolysaccharide sensitivity by IFN regulatory factor-2. *J Immunol* 2003; 170(11):5739-5747.
- (386) Fischer R, Cariers A, Reinehr R, Haussinger D. Caspase 9-dependent killing of hepatic stellate cells by activated Kupffer cells. *Gastroenterology* 2002; 123(3):845-861.